

氏 名 (本籍)                    田                    澤                    二                    三                    代

学 位 の 種 類                    医                    学                    博                    士

学 位 記 番 号                    医                    第                    1 6 4 8                    号

学 位 授 与 年 月 日                    昭 和 6 0 年 2 月 2 7 日

学 位 授 与 の 要 件                    学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                    昭 和 4 8 年 3 月  
弘前大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                    酵 素 免 疫 法 (ELISA) に よ る ヒ ト ロ タ ウ ィ ル ス 感 染 に 関 す る 研 究

第 一 編   ELISA に よ る ヒ ト ロ タ ウ ィ ル ス の 検 出 法

第 二 編   新 生 児 室 収 容 児 の 糞 便 ロ タ ウ ィ ル ス の 検 索

第 三 編   単 ク ー ロ ン 抗 体 を 用 い た ELISA に よ る ロ タ ウ ィ ル ス 亜 群 別 頻 度

(主 査)

論 文 審 査 委 員   教 授 多 田 啓 也      教 授 今 野 多 助

教 授 山 根                    績

## 論 文 内 容 要 旨

乳幼児胃腸炎の多くはロタウイルス感染によることが明らかとなっている。現在、ヒトロタウイルスは中和反応により4つの血清型に、補体結合反応 (CF), 免疫粘着赤血球凝集反応, 酵素免疫法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) などの方法により、血清型とは区別される3つ以上の亜群に分類されているが、これらの血清疫学的検索はまだ充分にはなされていない。

本研究の第一編では、Yolken らの方法に基づき ELISAによる急性胃腸炎患者糞便からのロタウイルス検出を試み、成績を電子顕微鏡 (電顕) によるものと比較検討した。ELISAは二抗体サンドイッチ法を用い、抗ヒトロタウイルスヤギ血清でプレートの各ウエルをコーティングし、次いで約10%のホモジネートにして3,000回転で遠心した急性症患児糞便上清を添加し、37°Cで1時間インキュベーションを行ない、洗滌後、抗ロタモルモット血清、アルカリフォスファターゼ標識抗モルモット IgGを反応させて行なった。最後にP-ニトロフェニールリン酸を加えて、波長430 nmにて吸光度を測定した。判定は検体の吸光度Pとロタウイルス陰性の対照検体の吸光度Nとの比、 $P/N$ をとり、この値が2.1以上の場合を抗原陽性とした。結果は全検体796例中、ELISA陽性は急性胃腸炎355例中162例、非胃腸炎患者の対照群441例中7例の計169例あり、この中で電顕によりウイルス粒子が検出されたのは142例であった。電顕陰性でELISA陽性であった患者から得られたペアー血清の中にはCFの有意上昇が認められた例もあり、ELISAは鋭敏な方法と考えられた。またELISAの反応は抗ヒトロタウイルスモルモット血清によりブロックされることから、得られた成績は特異的と考えられた。ELISAは多数の検体を短時間に処理でき、操作が簡便であり、呈色反応であるため肉眼的判定も可能であった。また抗ヒトロタウイルス抗体でコーティングされたプレートは1カ月以上、アルカリフォスファターゼ標識抗ロタ IgGは1年以上に渡って使用が可能であり、試薬の安定性の点からも実用的であることを確認した。

第二編では、従来、無症候性にロタウイルスの排出がみられるとの報告がなされ、疫学的に興味を持たれてきた新生児を対象として、実際にELISAを応用し、1年間に渡って551例の新生児室収容児の糞便検索を行なった。ELISAは第一編の方法に改善を加えて実施した。即ち、米国NIHで継代培養に成功したヒトロタウイルスWa株の分与を受け、これをウサギに免疫して得られた抗血清からIgG分画を精製、プレートのコーティング及びアルカリフォスファターゼ標識に用いた。乳幼児下痢症の流行期には電顕による検索をも併用したが、ロタウイルス陽性例はなく、新生児室内でのロタウイルス感染は必ずしも一般的ではないことが明らかとなった。

第三編では、亜群 I 特異的単クローン抗体 (monoclonal antibody, MA) 152 と亜群 I 及び II に交叉反応性の単クローン抗体 (MA) 133 を用いた ELISA により、過去 4 年間の急性胃腸炎の流行期に得られたロタウイルス株の亜群分類を行ない、さらに、RNA パターンのいわゆる S 型、L 型との比較を行なった。結果は検索した 130 株のうち 7 株のみが亜群 I に、119 株が亜群 I 以外の亜群に属しており、亜群 I 以外の亜群に属するロタウイルスが極めて優位な流行を起こしていることが明らかとなった。一方、ロタウイルスが 11 の分節から成る二重鎖 RNA ウィルスであることから、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による RNA パターンの比較がなされ、10、11 番目の分節の移動度の違いにより、L 型と S 型の 2 つのタイプに分類されている。これまでの検索から、RNA パターンでの L 型、S 型は各々亜群 II、I に対応していることが知られていたが、最近、亜群は 6 番目の RNA 分節上の遺伝子に支配されるウィルス蛋白  $V_p 6$  で規定されることが明らかになっており、我々が ELISA で用いた亜群特異的単クローン抗体も、MA 152 は Wa 株 (亜群 II)、KUN 株 (亜群 I) のロタウイルスの  $V_p 6$  と、MA 133 は KUN 株のみの  $V_p 6$  と反応することが免疫沈降反応で確認されている。我々が行なった RNA パターンと亜群の比較結果は亜群 I は S 型を、亜群 I 以外の亜群は L 型を呈したが、ウシロタウイルスでは L 型のパターンで亜群 I に属する株の存在が知られており、RNA パターンと亜群の対応に関しては更に今後の検討が必要と思われる。また検索した中で、L 型と S 型の混合感染が 2 例に認められた。

## 審査結果の要旨

1. ELISA によるヒトロタウイルスの検出
2. 一年間の新生児収容児の糞便ロタウイルスの検索
3. 単クローン抗体を用いた Elisa によるロタウイルス亜群別頻度

乳幼児胃腸炎の多くはロタウイルス感染によることが明らかとなっている。現在、ヒトロタウイルスは中和反応により4つの血清型に、補体結合反応（CF）、免疫粘着赤血球凝集反応、酵素免疫法（ELISA）などの方法により血清型とは区別される3つ以上の亜型に分類されているが、これらの血清疫学的検索はまだ充分にはなされていない。

本研究の第一篇では、Yolken らの方法に基づき ELISA による急性胃腸炎患者糞便からのロタウイルス検出を試み、電顕による成績と比較検討した。全検体 796 例中 ELISA 陽性は急性胃腸炎 355 例中 162 例、非胃腸炎患者の対照群 441 例中 7 例の計 169 例であり、この中で電顕によりウイルス粒子が検出されたのは 142 例であった。電顕陰性で ELISA 陽性であった患者から得られたペアー血清の中には CF の有意上昇が認められた例もあり、ELISA は鋭敏な方法と考えられた。ELISA は多数の検体を短時間に処理でき操作が簡便であり、呈色反応であるため肉眼的判定も可能である点、試薬が安定である点から実用的であると思われる。

第2篇では、従来、無症候性にロタウイルスの排出がみられるという報告がなされ、疫学的に興味のある新生児を対象とし ELISA 法により1年間にわたって 551 例の新生児収容児の糞便検索を行なった。その結果ロタウイルス陽性例は見出されず、新生児室内でのロタウイルス感染は一般的ではないことが明らかにされた。

第3篇では、亜群 I 特異的単クローン抗体 152 と亜群 I 及び II に交叉反応性の単クローン抗体 133 を用いた ELISA により、過去4年間の急性胃腸炎の流行期に得られたロタウイルス株の亜群分類を行ない、さらに RNA パターンのいわゆる S 型、L 型との比較を行なった。結果は検索した 130 株のうち 7 株のみが亜群 I に、119 株が亜群 I 以外の亜群に属しており、亜群 I 以外の亜群に属するロタウイルスが極めて優位な流行を起していることが明らかとなった。RNA パターンと亜群の比較結果では亜群 I は S 型を、亜群 I 以外の亜群は L 型を呈した。また検索した中で L 型と S 型の混合感染が 2 例に認められた。

以上の研究成果は、ロタウイルス感染の血清疫学的研究に有意の知見を加えたものであり医学博士の授与に値するものと評価された。