



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ハトロウイルスの赤血球凝集抑制試験の確立とそれによるヒトおよび動物における抗体調査

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 源, 宣之, 平尾, 恵, 金城, 俊夫, 平井, 克哉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5601

ハトロタウイルスの赤血球凝集抑制試験の確立と
それによるヒトおよび動物における抗体調査

源 宣之¹⁾・平尾 恵¹⁾
・金城俊夫¹⁾平井克哉²⁾

1) 獣医公衆衛生学研究室

2) 家畜微生物学研究室

(1986年7月31日受理)

Hemagglutination Inhibition Test of
Pigeon Rotavirus and Its Application to
Serological Survey in Humans and Animals

Nobuyuki MINAMOTO¹⁾, Megumi HIRAO¹⁾, Toshio KINJO¹⁾
and Katsuya HIRAI²⁾

1) *Laboratory of Veterinary Public Health*

2) *Laboratory of Veterinary Microbiology*

(Received July 31, 1986)

SUMMARY

As a clue for clarifying a participation as a zoonotic disease-causing agent of rotavirus, a serological survey in humans and several animals was performed by hemagglutination inhibition (HI) test of avian rotavirus, PO-13 strain, which was isolated from feral pigeon in close contact with humans.

The optimal conditions for the newly developed HI test included the use of veronal buffered saline, pH7.0, containing 0.0125% bovine serum albumin and 0.001% gelatin, for dilution of antigen and serum and incubation of a 0.3% suspension of guinea pig erythrocytes at room temperature for 2 hours to antigen-antibody complex. Sera collected from humans and several animals were treated in various ways prior to use in HI test to determine the effective method for removing non-specific inhibitors (NSI) of HA. The best method was the double adsorption of serum with 25% kaolin. The HI antibody titers in immune rabbit sera determined by these conditions were correlated well with neutralizing antibody titers. In addition, cross-reactivity could not be demonstrated by this HI test in sera to bovine rotavirus and human rotavirus type 1, 2 and 3. Therefore, this result suggests that the HI test could detect type-specific rather than group-specific antibody. In a survey of several species for HI antibody to pigeon rotavirus, PO-13 strain, antibody titers of 8 or higher were detected in 279 of 489 (57.1%) chicken sera, 77 of 216 (35.6%) human sera, 112 of 346 (32.4%) pigeon sera, 36 of 133 (27.1%) quail sera and 9 of 99 (9.1%) monkey sera.

The findings including the present results would strongly corroborate the fact that pigeon rotavirus was widespread in human and animal populations.

要 約

ロタウイルスのズーノーシスとしての関与を明らかにすることを目的として、ヒトとの接触頻度の高いと考えられるドバトから分離したハトロタウイルスのヒトを含めた各種動物における分布状況を、比較的类型特異性の高い抗体を検出する血球凝集抑制 (HI) 試験法を用いて血清疫学的な面から調べた。

まず、HI 試験の各種至適反応条件を検討したところ、特異性の高い HI 抗体はウイルス抗原及び血清の希釈に 0.0125% ウシアルブミン (BA) および 0.001% ゼラチンを含むペロナール緩衝食塩水 (VBS) を用い、抗原抗体反応を室温 1 時間行った後、0.3% モルモット血球浮遊液を加えて、室温で 2 時間感作させることによって、測定することができた。なお、被検血清中の非特異凝集抑制物質 (NSI) は血清を 25% カオリンで 2 回処理することによって、ほぼ完全に除去された。この確立した HI 試験によって、各種動物の抗体保有率を調べた結果、いずれの動物も抗体をもっていたが、なかでもニワトリ (57.1%)、ヒト (35.6%) 及びドバト (32.4%) が高い保有率を示した。

以上の抗体調査から、ハトロタウイルスはドバトのみならずヒトを含めた各種動物に広く浸潤している可能性が示唆された。

緒 言

ロタウイルスは主に幼児や幼若動物に胃腸炎を引き起こし、ヒトを含めた多くの動物から分離されている¹⁾²⁾。ヒトと動物由来ロタウイルスは互いに形態、抗原性及び核酸構造に共通部分を保有しており^{3)~7)}、また、その一部のウイルスは種を越えて感染することから⁸⁾⁹⁾、ロタウイルスのズーノーシスにおける病原体としての可能性が議論されている。著者らもこれ迄に、イヌにおける抗体調査により、ヒトとの接触頻度の高いと考えられる飼育犬のヒトロタウイルスに対する抗体保有率が放浪犬より高いことを明らかにし、その可能性を支持した¹⁰⁾。更に、この仮説に対する直接的な証拠を得るために、ヒトの生活圏で生息する動物からのロタウイルスの分離を試み、ドバトから始めて本ウイルスを分離することができた¹¹⁾。この分離株は他のロタウイルスと共通抗原を持ち、鳥類由来にもかかわらず哺乳動物から確立した培養細胞で順化することなしに容易に増殖し、血球凝集 (HA) 能を保有した。

そこで、本研究は補体結合 (CF)、免疫粘着赤血球凝集 (IAHA) あるいは酵素抗体 (ELISA) 試験に比べて、型特異性抗体の検出可能な血球凝集抑制 (HI) 試験を用いて⁵⁾、分離ウイルスに対する抗体調査を各種動物血清で行い、ハトロタウイルスがヒトや他の動物の間にとどの程度浸潤しているかを調べた。その結果、ハトロタウイルスが鳥類のみならずヒトやサルにも分布していることが示唆されたのでその概要を報告する。

材料及び方法

ウイルス株：1984年に隠岐ら¹¹⁾が愛知県知多市に生息するドバトの糞便より分離したハトロタウイルス PO-13 株を用いた。

培養細胞：HA 抗原及び抗血清の免疫原の作製には主に MDBK 細胞を、また中和 (NT) 試験には農林水産省家畜衛生試験場より分与された MA-104 細胞を使用した。細胞増殖用培養液 (G. M) は仔牛血清 10%、トリプトース・ホスフェート・ブコース 0.95% 及び若干の抗生物質を加えたイーグル基礎培養液で、両細胞は共に 37°C、5 日間培養後試験に供した。

血清：抗体調査に供したのは養鶏場勤務者を含めた岐阜市内の成人 216 名、京都大学霊長類研究所で飼育されている主としてニホンザル 99 頭、愛知県知多市の飼料倉庫で捕獲したドバト 346 羽、埼玉県 7 市町で飼育されているニワトリ 487 羽及び岐阜市内で飼育されているウズラ 133 羽の血清である。これらの血清はいずれも 1983 年から 1985 年にかけて採取された。さらに、隠岐ら¹¹⁾と同様な方法で免疫した PO-13 株に対するウサギ経過血清、ウシロタウイルス Lincoln 株並びにヒトロタウイルス Wa 株 (1 型)、KUN 株 (2 型) 及び MO 株 (3 型) に対するウサギ抗血清も用いた。抗 Lincoln 株血清は当教室の Sugiyama ら¹⁰⁾により作製され、抗 Wa 株血清は愛知県衛生研究所の栄 賢司・主任研究員より、残りの抗 KUN 株と抗 MO 株

血清は東北大学医学部の今野多助・教授より分与されたものである。

HA 試験：HA 抗原は感染 MDBK 細胞の培養液を隠岐ら¹¹⁾の方法に従って濃縮して作製したもので、一部の試験には培養液を濃縮せずにそのまま用いた。抗原は使用時まで -80°C に保存した。HA 反応は Inaba ら¹²⁾及び Sato ら¹³⁾の方法を一部改良して行った。即ち、抗原及び血球の希釈液は BA 0.0125%とゼラチン 0.001%を含んだ VBS である。HA 価の測定は 2 倍階段希釈し、これに 0.3%モルモット血球浮遊液を等量加えて混和後、室温で 2 時間感作して行った。HA 価は完全な凝集像を認めた最終希釈倍数の逆数で表した。本研究で作製した抗原の HA 価は 1,024~2,048 倍で、その 4 単位を HI 試験に用いた。なお、至適反応条件を検討するために血球及び希釈液は上記以外に、ヒト O 型、ヒト A 型、ウサギ、ヤギ、ウシ、ウマ、ニワトリおよびガチョウ血球と生理食塩水、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 及びほう酸緩衝液 (BBS) もそれぞれ用いた。

HI 試験：被検血清中の NSI の除去は概ね Clarke 及び Casals¹⁴⁾の方法に準拠したが、25%カオリンの 2 回処理を行った。まず、2 倍希釈血清に等量の 25%カオリンを加えて室温で 20 分間感作し、その遠心上清を更に等量の 25%カオリンで処理した。次いで、この遠心上清にモルモット血球を滴下して自然凝集素を除いた。これらの処理血清を 8 倍希釈血清として HI 抗体価を測定した。その他に、Table 3 に示す処理方法も型の如く行ってカオリン処理と比較した。HI 反応は 2 倍階段希釈血清と抗原を室温で 1 時間感作後、0.3%モルモット血球浮遊液を加えて、更に室温で 2 時間感作させて行った。

ウイルス価および中和 (NT) 抗体の測定：共に Sugiyama ら¹⁰⁾の方法によって測定した。

結 果

HA 試験の反応条件の検討：ハトロタウイルス PO-13 株は Table 1 に示すように種々の動物血球を凝集したが、そのうちヒト O 型、A 型及びモルモット血球で HA 価が高く凝集像も明瞭であった。またモルモット 8 匹の間には、HA 価に影響する程の固体差は認められなかった。HA 価は感作温度によってほとんど影響されなかったが、室温 2 時間で最も良好な凝集像が得られた。次に、抗原と血球の希釈液を検討したところ、高い HA 価と鮮明な像は BA およびゼラチン添加の VBS で、ついで BA 添加の PBS (-) 及び生理食塩水で得られたが、BA 無添加の希釈液では何れも HA 価が低いか反応パターンが不鮮明であった。そこで、希釈液に添加する BA の濃度を調べた結果、Table 2 の如く 0.0125~0.05%の範囲で高い HA 価を示した。

以上の成績から、以後の試験は希釈液に 0.0125% BA および 0.001%ゼラチンを含む VBS と 0.3%モルモット血球浮遊液を用い、抗原と血球を室温で 2 時間感作させる条件のもとで行った。なお、ハトロタウ

Table 1. Effect of erythrocyte on HA titer of PO-13 strain.

Erythrocytes	HA titer
Human type O	128
Human type A	128
Guinea pig	128
Rabbit	64
Goat	8
Cattle	< 2
Horse	< 2
Chicken	16
Goose	< 2

Antigen: Culture fluid of infected MA-104 cells
HA reaction was carried out at 37°C .

Table 2. Effect of diluent containing different concentration of bovine serum albumin on HA titer.

Concentration of bovine serum albumin* (%)	HA titer
0.2000	128
0.1000	256
0.0500	1024
0.0250	1024
0.0125	1024
0.0063	**
0.0000	**

* Fraction V, Sigma, USA.

** HA pattern was not satisfactorily clearness for reading.

Table 3. HI titers of rabbit sera treated with various methods to remove non-specific-inhivitors (NSI)

Methods of serum treatment	Serum							
	No. of pre-immune				No. of post-immune			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Untreated	40	>10,240	>10,240	>10,240	20	>10,240	>10,240	1,280
Heat*	40	20	20	40	< 10	>10,240	640	1,280
Kaolin	< 10	< 10	< 10	< 10	40	5,120	5,120	640
Acetone	160	160	160	320	160	>10,240	2,560	1,280
KIO ₄	10	10	10	20	40	2,560	640	640

* 56° C, 30 min.

Table 4. HI titers of sera treated with kaolin to remove NSI

Times of kaolin treatment	Sera without NT antibody (< 4)						
	Pigeon				Chicken		Human
	1	2	3	4	1	2	1
0	64	16	64	ND*	32	32	< 8
1	16	32	< 8	8	32	16	< 8
2	< 8	< 8	< 8	8	< 8	< 8	< 8

Times of kaolin treatment	Sera with NT antibody (> 4)						
	Pigeon				Chicken		Human
	1	2	3	4	1	1	
0	ND	ND	ND	ND	32	64	
1	32	16	16	8	16	64	
2	8	8	16	< 8	16	32	

* Not done.

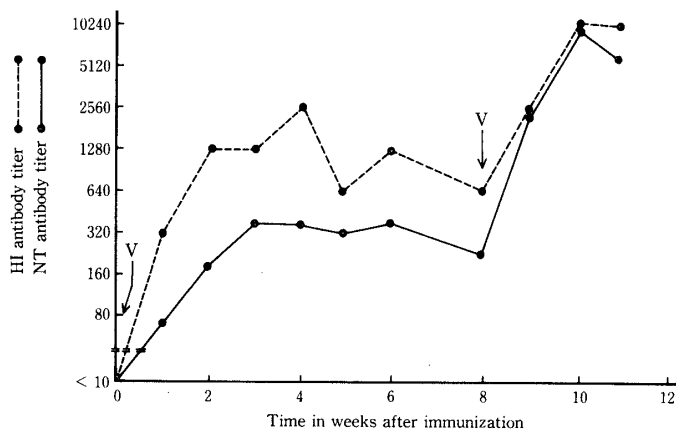


Fig. 1. HI and NT antibody responses in the rabbit immunized with the PO-13 strain.

* V ; Vaccination.

Table 5. HI titers to the PO-13 strain in several anti-rotavirus sera.

Antibody to (NT titer)	HI titer
PO-13 (6,653)	2,560
Lincoln (4,096)	< 40
Wa (160) *	< 40
KUN (26,000)	< 40
MO (64,000)	< 40

* IAHA titer

Table 6. Prevalence of HI antibody titers to the PO-13 strain in humans, monkeys and several fowls.

serum	No. of tested sera	HI antibody titers					No. of positive sera* (%)
		< 8	8	16	32	64	
Human							
Poultry rancher	106	68	29	9	0	0	38 (35.8)
Common run of people	110	71	33	5	1	0	39 (35.5)
Monkey	99	90	5	1	2	1	9 (9.1)
Pigeon	346	234	97	13	2	0	112 (32.4)
Chicken	489	210	188	87	4	0	279 (57.1)
Quail	133	97	28	8	0	0	36 (27.1)

* > 8

ウイルスの HA 活性はポリエチレングリコール (PEG) で失活したが10 μ g/ml のトリプシン処理ではやや増強された。

血清中の NSI の除去：血清中の NSI の除去を PO-13 株で免疫したウサギ血清を用いて Table 3 に示した各種処理方法で試みた。いずれの血清も未処理では40~10, 240倍以上の様々な HI 抗体価を示したが、25%カオリンの1回処理で、免疫前血清はいずれも10倍未満となり NSI を除くことができた。しかも、NT 抗体価が80~16, 384倍の陽性血清では HI 抗体価の極端な低下を認めなかった。しかし、他の処理方法ではいずれも NSI が残存した。この結果に基づいて、ドバト、ニワトリ及びヒト血清について、それぞれカオリン処理を行ったところ、前二者の血清中の NSI はウサギ血清に比べて低値であったにもかかわらず、1回処理では完全に除去出来なかった。そこで、再度カオリン処理をした結果、Table 4 に示すように陽性血清の HI 抗体価が若干低下するものも認められたが、NSI をほぼ完全に除去することができた。

HI 抗体価と NT 抗体価との関係：この HI 試験法で測定される抗体の特異性を確認するために、PO-13 株で免疫したウサギの経過血清の抗体を本法と NT 試験で測定した。Fig. 1 に示すように、両抗体はほぼ平行して産生された。また抗体価の間には $r = 0.947$ の高い相関関係が認められた。さらにドバト血清での抗体検出を両試験で行ったところ、その一致率は92.3% (24/26) であった。

片側交差 HI 試験：HI 試験で検出される抗体の型特異性を Table 5 に示すハト、ウシ及びヒト (1, 2, 及び3型) ロタウイルスの各高度免疫ウサギ血清で調べた。その結果、PO-13 株に対する HI 抗体はホモのみで検出された。

ヒト、サル及び数種の鳥類でのハトロタウイルスに対する HI 抗体調査：ヒト、サル、ドバト、ニワトリ及びウズラの HI 抗体調査の結果を Table 6 に示した。8倍以上を抗体陽性とした場合、それらのハトロタウイルスに対する HI 抗体保有率は9.1%のサルを除き、いずれも27%以上を示し、なかでもニワトリは57.1%と最も高い値を示した。ヒトについて、ニワトリとの関連性を調べるために養鶏場勤務者と一般人とに区分したが、両群の保有率に差を認めなかった。抗体価は保有率に比べていずれの群も低く、幾何平均は10倍前後であった。

考 察

ロタウイルスの自然界での広範囲な分布並びにその諸性状から、本ウイルスがヒトと動物との間を往来し、それらに胃腸炎を引き起こすのではないかという仮説を証明するために、動物ロタウイルスのヒトとの関わりを検討している¹⁰⁾¹¹⁾。本研究ではヒトの生活圏で生息し、幼児との接触も十分に考えられているドバトから分離したロタウイルスの HA 能を利用して、ハトロタウイルスのヒトや鳥類における分布状況を血清学的に調べた。ロタウイルスの HA 素は各種動物由来ウイルスで確認されているが^{5)12)15)~17)}、HI 反応による抗体の測定は術式が簡易で感度も CF 試験より良いにもかかわらず、主に抗原性の検討に使われているのみで、野外の抗体調査には殆ど応用されていない。これは HI 抗体が群特異性を示す CF, IAHA 或

いは ELISA 抗体に比べて型特異性を強く表すためと考えられる¹⁵⁾¹⁸⁾。しかし、この性状は特定のウイルスの浸潤度を調べるには好都合といえる。

そこで、先ず抗体調査を行う前に、ハトロタウイルスの HA 及び HI 試験の 2, 3 の反応条件を調べた。その結果、ハトロタウイルス PO-13 株は他のロタウイルスと同様にヒト O 型, A 型及びモルモット血球を強く凝集し、1 日齢ヒナ及びガチョウ血球のみを凝集するヒトロタウイルス(1, 2 及び 3 型)¹⁷⁾とは、明らかに違っていた。また、HA 素のトリプシン処理に対する態度もヒトロタウイルスの場合と対照的に PO-13 株では失活しなかった。これらの成績から、ハトロタウイルスはヒトロタウイルスの少なくとも 1, 2 及び 3 型の粒子構造と異なっていることを示唆している。抗原、血清及び血球の希釈液は概ね Inaba ら¹²⁾及び Sato ら¹³⁾と同じく、BA 添加の緩衝液で高い HA 価と明瞭な像がえられた。ただ、添加する BA の濃度は Sato ら¹³⁾に比べて低くしかもその至適範囲も狭いことが確認された。この違いが使用したウイルス、赤血球、BA の純度あるいはその他の要因によるのかどうか明確にすることができなかった。なお、ウイルスの濃縮精製の過程で一般的に用いられている PEG で PO-13 株を処理したところ、その HA 能が失活した。HA 素は外層カプシドに局在しており¹⁵⁾¹⁸⁾、Fukusho ら¹⁹⁾も PEG を用いて濃縮精製したブトロタウイルス粒子の多くが外層カプシドを欠いていることを明らかにしていることから、PEG はロタウイルス粒子の外層カプシドを破壊欠落させているものと思われる。従って、ロタウイルスの濃縮精製における PEG の使用には十分な注意が必要である。

HI 試験を実施するに当たり常に考慮しなければならないのは動物血清中の NSI の存在である。ロタウイルスに対する NSI の除去はこれまで殆んど 25%カオリン処理で行われており¹²⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²⁰⁾、本研究においてもウサギやヒトの高濃度の NSI がカオリン処理のみで除去することができた。しかしトリ血清中の NSI はウサギに比べて低いにもかかわらずカオリンの 1 回処理では完全に除去することができなかった。Hancock ら¹⁶⁾は各種トリ血清について種々の処理を行い、そのうちヘパリンと $MnCl_2$ の二重処理がシチメンチョウロタウイルスに対して最も効果的であるとした。著者らは多数の血清の抗体測定を容易に実施する必要性から、比較的安価なカオリンによる再処理を行ったところ、NT 抗体陽性血清中の HI 抗体価が一部低下する傾向を示したものの極端な減少は認められず、ほぼ NSI を除去することができた。以上の条件下で測定された HI 抗体価は NT 抗体価と高い相関関係を示し、しかもそれらの値は良く一致すること、更にこの HI 反応が PO-13 株とヘテロの関係にあるウシやヒトロタウイルスに対する抗体を検出しないことから、今回確立した HI 試験は NT 試験と同程度の感度と型特異性の有ることが分かった。

そこで、ヒトを含めた各種動物のハトロタウイルスに対する抗体調査を本試験で行った。その結果、最も高い抗体保有率はニワトリで確認され、次いでヒト及びドバトであった。各種ロタウイルスに対するヒトや動物の抗体調査は CF, IAHA 或いは ELISA 反応による群特異抗体の測定によって数多く報告され、高い抗体保有率が明らかにされている¹¹⁾¹⁰⁾²¹⁾²²⁾。しかし、鳥類の抗体調査は極めてすくない。McNulty ら²³⁾は北アイルランドで調べたニワトリの 59%がロタウイルス群特異抗体を保有していることを間接蛍光抗体法で明らかにしている。使用したウイルスや測定方法が異なるにもかかわらず、抗体保有率が今回の成績とほぼ一致していることは興味深いことである。ドバトに関して、Vindevogel らは²⁴⁾その IAHA 抗体保有率が 10.7%であり、隠岐らは¹¹⁾PO-13 株に対する NT 抗体保有率が 20.8%であることをそれぞれ報告しており、今回の成績も含めて何れもニワトリより低い値である。このことはニワトリがドバト以上にロタウイルスの伝播に大きな役割を担っているのかも知れない。また、愛知県に生息するドバトから分離されたハトロタウイルスに対する抗体が埼玉県で飼育されているニワトリで高率に検出されたことは、本ウイルスが広範な地域に蔓延していることを推測させる。更に、ウズラも比較的高い抗体を保有しており、ハトロタウイルスが各種鳥類に広く浸潤していることが伺える。

サルでの抗体保有率は今回調べた中で最も低かったが、これは測定したサルが研究所という比較的閉鎖的な環境で飼育されていたことが原因と思われる。

ヒトについてはニワトリが高率に抗体を保有したことから、それらと接触する機会の多い養鶏場勤務者の抗体保有率を調べたが、一般のヒトの値とほぼ同じであった。しかし、その保有率は高く、ハトロタウイルスがヒトの間にも広く伝播しているものと思われた。これらの所見と、ハトロタウイルスの順化なし

の哺乳動物由来細胞での増殖や¹¹⁾、ハトロタウイルスの他動物への感染の成立⁹⁾を考慮すると、この PO-13 株は鳥類からヒトへ伝播しているのではなく、逆にヒトからニワトリや他の動物へ感染の輪を広げているのかも知れない。ただ、PO-13 株がハトロタウイルスのうち 1, 2 及び 3 型に対する抗体と反応しないことは、本ウイルス株が多くの動物由来ロタウイルスと交差する 4 型⁴⁾或いは更に新しい型²⁵⁾である可能性も考えられる。このことは早急に解明されなければならない。何れにせよ、今回の成績から PO-13 株が広く自然界に分布していることが示唆されたことは公衆衛生学的に大変興味ある知見といえる。

文 献

- 1) Flewett, T. H. & Woode, G. N.: The rotaviruses. *Arch. Virol.* **57**: 1-23, 1978.
- 2) McNulty, N. S.: Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **40**: 1-8, 1978.
- 3) Gaul, S. K., Simpson, T. F., Woode, G. N. & Fulton, B. W.: Antigenic relationships among some animal rotavirus: virus neutralization in vitro and cross-protection in piglets. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 495-503, 1982.
- 4) Hoshino, Y., Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., Flores, J. & Kapikian, A. Z.: Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* **149**: 694-702, 1984.
- 5) Hoshino, Y., Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., Kalica, A. R., Flores, J. & Kapikian, A. Z.: Serological comparison of canine rotavirus with various simian and human rotaviruses by plaque reduction neutralization and hemagglutination inhibition tests. *Infect. Immun.* **41**: 169-173, 1983.
- 6) Woode, G. N., Bridger, J. C., Janes, J. M., Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H. A. & White, G. B. B.: Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immun.* **14**: 804-810, 1976.
- 7) Birch, C. J., Heath, R. L., Marshall, J. A., Liu, S. & Gust, I. D.: Isolation of feline rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electropherotype and serotype. *J. Gen. Virol.* **66**: 2731-2735, 1985.
- 8) Tzipori, S. & Makin, T.: Propagation of human rotavirus in young dogs. *Vet. Microbiol.* **3**: 55-63, 1978.
- 9) Gouvea, V. S., Alencar, A. A., Barth, O. M., Castro, L. D., Fialho, A. M., Araujo, H. P., Majerowicz, S. & Pereira H. G.: Diarrhoea in mice infected with a human rotavirus. *J. Gen. Virol.* **67**: 577-581, 1986.
- 10) Sugiyama, M., Minamoto, N., Kinjo, T. & Hashimoto, A.: A serological survey on rotavirus infection in dogs by immune adherence hemagglutination test. *Jpn. J. Vet. Sci.* **6**: 767-769, 1984.
- 11) 隠岐京子・源 宣之・金城俊夫・鈴木義孝: ドバトからのロタウイルスの分離. 第97回日本獣医学会講演 1984.
- 12) Inaba, Y., Sato, K., Takahashi, E., Kurogi, H., Satoda, K., Omori, T. & Matumoto, M.: Hemagglutination with Nebraska calf diarrhea virus. *Microbiol. Immunol.* **21**: 531-534, 1977.
- 13) Sato, K., Inaba, Y., Takahashi, E., Kurogi, H., Satoda, K., Omori, T. & Matumoto, M.: Effect of serum albumin on hemagglutination with Nebraska calf diarrhea virus. *Microbiol. Immunol.* **22**: 109-111, 1978.
- 14) Clarke, D. E. & Casals, J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 561-573, 1958.
- 15) Kalica, A. R., James, H. D. Jr. & Kapikian, A. Z.: Hemagglutination by simian rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* **7**: 314-315, 1978.
- 16) Hancock, K., Gary, G. W. & Palmer, E. L.: Adaptation of two avian rotaviruses to mammalian cells and characterization by hemagglutination and RNA electrophoresis. *J. Gen. Virol.* **64**: 853-861, 1983.
- 17) Kitaoka, S., Suzuki, H., Numazaki, Y., Sato, T., Konno, T., Ebina, T., Ishida, N., Nakagomi, O. & Nakagomi, T.: Hemagglutination by human rotavirus strains. *J. Med. Virol.* **13**: 215-222, 1984.
- 18) Cukor, G. & Blacklow, N.: Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* **48**: 157-179, 1984.
- 19) Fukusho, A., Shimizu, Y. & Ito, Y.: Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller cultures in the presence of trypsin. *Arch. Virol.* **69**: 49-60, 1981.
- 20) Fauvel, M., Spence, L., Babiuk, L. A., Petro, R. & Bloch, S.: Hemagglutination and hemagglutination-inhibition studies with a strain of Nebraska calf diarrhea virus (bovine rotavirus). *Intervirology* **9**: 95-105, 1978.
- 21) Takahashi, E., Inaba, Y., Sato, K., Kurogi, H., Akashi, H., Satoda, K. & Omori, T.: Antibody to rotavirus

- in various animal species. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* **19**: 72-73, 1979.
- 22) Ghose, L., Schnagl, R. D. & Holmes, I. H. : Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of rotavirus antibodies with complement fixation in an epidemiological survey. *J. Clin. Microbiol.* **8**: 268-276, 1978.
 - 23) McNulty, M. S., Allan, G. M., Todd, D. & McFerren, J. B. : Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. *Arch. Virol.* **61**: 13-21, 1979.
 - 24) Vindevogel, H., Dagenais, L., Lansival, B. & Pastoret, P. P. : Incidence of rotavirus, adenovirus and herpesvirus infection in pigeons. *Vet. Rec.* **109**: 285-286, 1981.
 - 25) Matsuno, S., Hasegawa, A., Mukoyama, A. & Inouye, S. : A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* **54**: 623-624, 1985.