

I. ロタウイルスの概説

I-1. 病原体

ロタウイルスはレオウイルス科 (*Reoviridae*) に属する 2 本鎖 RNA ウイルスであり、ヒトおよび動物の胃腸炎起因ウイルスとして知られる。ウイルス粒子は直径 80~100 nm の正 20 面体構造を取り、コア、内殻、外殻の 3 層で構成される二重殻粒子である。エンベロープを持っていないため、アルコール消毒の効果は低い。電子顕微鏡で観察すると車輪状の特徴的な形態が認められることから、ロタ (rota=ラテン語で車輪の意) の名が付けられた。

ロタウイルスのゲノムは 11 分節 (セグメント) からなる 2 本鎖 RNA で構成されており、6 種の構造タンパク (VP1~4, 6, 7) と 6 種の非構造タンパク (NSP1~6) をコードしている。11 番目のセグメント NSP5 が 2 種のタンパク (NSP5 および NSP6) をコードしているため、11 セグメントから 12 種のタンパクが産生される。

I-2. 分類

ロタウイルスは VP6 (内殻タンパク) の血清型に基づき A~G の 7 群に分類される。ヒトに対して感染性が認められているのは A 群、B 群、C 群の 3 種類であるが、最も大きな流行を引き起こすのは A 群ロタウイルス (RVA) である。RVA の各ゲノムセグメントには、それぞれの遺伝子相同性に基づいて分類された多数の遺伝子型が存在する。特に疫学調査では、中和抗原を有すると考えられる VP7 (外殻糖タンパク、G 型) と VP4 (スパイクタンパク、ヘマグルチニン、P 型) の遺伝子型を調べることが多い。しかし、ロタウイルスは分節型遺伝子を持つために、混合感染時に容易に遺伝子再集合 (リアソートメント) を起こす事が知られており、各ウイルス株の遺伝子学的性状を正確に表すためには全セグメントの遺伝子型を決定する必要がある。そのため、2008 年に Rotavirus Classification Working Group より遺伝子型の表記方法が提唱され、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5

(Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx) の順にそれぞれの遺伝子型を列記する方法が用いられるようになった。

I-3. 疫学

上述の通り、ヒトの間で流行するロタウイルスの大部分は A 群ロタウイルス (RVA) であり、5 歳未満の小児の重症急性胃腸炎の約半数は RVA が原因であると考えられている。我が国におけるロタウイルスの流行のピークは 2 月から 5 月あたりにかけて見られ、年間の患者数はおよそ 80 万人、入院数は 7~8 万人、死亡数は数人~10 人前後である。2011 年現在、VP7 には 27 種類の遺伝子型が報告されているが、ヒトから検出される RVA のおよそ 9 割は G1~G4 および G9 型で占められている。G8 型や G12 型も稀に検出される。B 群ロタウイルスはアジアの一部の地域で感染が報告されているが、日本での感染例はない。C 群ロタウイルス (RVC) は主に年長児~成人に胃腸炎を起こす傾向があり、我が国においても散発的に検出されている。ウンやブタなどを始めとした多くの哺乳動物においてもロタウイルスは存在するが、種を超えて感染・発症する事は稀である。

I-4. 臨床症状

ロタウイルスは糞口感染（ヒト-ヒト感染）により小腸の上皮細胞に感染し、1～4日ほどの潜伏期間を経て発症する。主症状は下痢、嘔吐、発熱であり、それに伴い脱水症や熱性けいれんを引き起こすこともある。我が国ではかつて、“米のとぎ汁様”と表現されるような白色水溶便が特徴的に見られたが、最近では白っぽい黄色便や緑色便であることが多い。合併症としては腎不全や腎結石、腎炎、心筋炎、脳炎（脳症）、胆道閉鎖症、腸重積、HUS（溶血性尿毒症症候群）、DIC（播種性血管内凝固症候群）などが見られる。患者の便1g中には最大 10^{10} ～ 10^{12} 個のウイルス粒子が存在し、 10 ～ 100 個程度の粒子が存在すれば感染が成立することから、感染力は非常に強いとされる。ウイルスの排出は発症後3～5日後がピークであり、症状はおおよそ1週間で軽快するが、ウイルスの排出は数週間に渡って持続することも珍しくない。概ね5歳までにほとんどの小児がRVAに感染するが、一度の感染では十分な防御免疫ができず、複数回発症することもある。但し、2回目以降の感染では重症度は低下し、感染を繰り返す度に軽症化する傾向がある。

I-5. ワクチン

ロタウイルスワクチンは既に世界中（120カ国以上）で使用されているが、我が国においても2011年11月にロタリックス（GlaxoSmithKline）が、2012年7月にロタテック（MSD）が販売開始された。ロタリックスはヒトロタウイルスを弱毒化した単価のワクチン（G1P[8]）である一方、ロタテックはウシロタウイルスとヒトロタウイルスとのリアソータント5種を混合した5価のワクチン（G1、G2、G3、G4、P[8]）である。いずれのワクチンも生ワクチンであるため、今後、ワクチン株による発症事例やワクチン株と野生株との交雑（リアソータント）の発生が予想される。それに従い、検出されたロタウイルスが野生株かワクチン株由来であるかを判定しなければならない事例も増加すると考えられる。ワクチン接種から数日後に発症した例では、野生株とワクチン株の両方が検出されることもある。

II. 検査方法

II-1. 検査材料の取り扱い

ロタウイルスは BSL2 の病原体であり、臨床検体およびウイルスの取り扱いは P2 実験室の安全キャビネット内で行う。検体や汚染した器材、培養液等は 0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理あるいはオートクレーブ処理してから、しかるべき廃棄を行う。ロタウイルスが成人に重篤な症状を引き起こすことは稀であるが、感染力は非常に強いため、感染拡大を防止するためにも、患者の排泄物の処理には十分な注意が必要である。

II-2. 検査の進め方

ここでは RVA と RVC の検査法について、現在利用されている代表的なものを紹介する。検査材料の採取から、各検査までの流れを図 1 に示す。RVC の検査法に関しては RT-PCR 法 (⑥) についてのみ記載する。

便を直接採取して検査を行うキットも存在するが、基本的には便を 10%PBS 懸濁液としてから検査を進めるものとして記載する。

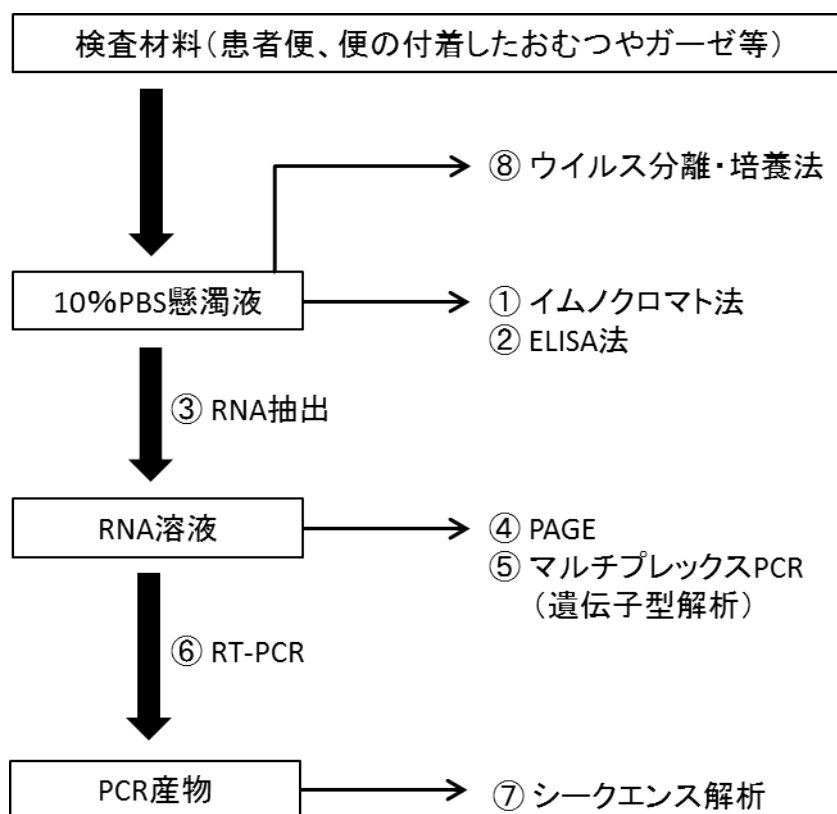


図 1. ロタウイルス検査の流れ図

II-3. 検査材料の採取

患者の下痢便をプラスチック製容器などに採取し密閉する。便の付着したオムツやガーゼ等からも検出可能である。便中に大量のウイルス粒子が含まれることが多いので、微量の検体からも十分に検出される可能性がある。短期間の保存や輸送時は 4℃で問題ないが、長期保存の場合は -20℃あるいは-80℃が望ましい。ただし凍結融解を繰り返すとウイルス粒子が徐々に破壊される。

II-4. 10%懸濁液の作製

器具および試薬

PBS

ピペットエイド、ピペット (10 mL)

マイクロピペット、マイクロチップ

マイクロチューブ (1.5~2.0 mL)

50 mL 遠沈管

シェーカー

遠心機

次亜塩素酸ナトリウム (消毒用)

方法

1. 便検体を 50 mL 遠沈管に取り、重量を測定して 10%になるよう PBS を加える。
オムツ (水溶便) の場合は、便が付着したと思われる箇所の表面材 (ガーゼ) を切り取って、同様に 50 mL 遠沈管に移す。オムツに含まれる吸水材は、後から加える PBS を即座に吸収してしまうので、出来る限り混入しないように注意する。加える PBS の量は 5~10 mL 程度にする。
2. 検査材料と PBS を入れたチューブをシェーカーでよく攪拌する (300 rpm、10 min)。
3. 遠心 (3000 rpm、5 min) して、上清を別チューブ (1.5~2.0 mL) に移し、これを検体として以降の検査を進める。10%懸濁液は-80℃で保存し、凍結融解は最小限にとどめる。

① イムノクロマト法

(所要時間：15分程度)

市販の検出キットを用いる簡便かつ迅速な検査法であり、臨床現場でも多用されている。検出感度は他の方法と比べると低い。現在、我が国で販売されているキットの一例を以下に示す。

製品名	販売社名
ラピッドテスト・ロタ・アデノ	積水メディカル
ディップスティック‘栄研’ロタ	栄研化学
イムノカード ST ロタウイルス	テイエフビー (TFB)

器具および試薬

マイクロピペット、マイクロチップ

1.5 mL マイクロチューブ (付属されていない場合)

検査方法

それぞれの製品に定められた方法に従う。

備考

A 群ロタウイルスに対する抗体を使用しているため、C 群ロタウイルスは検出できない。

② ELISA 法

(所要時間：2～3 時間)

ロタウイルス抗原に対する ELISA キットとして、ロタクロン (TFB) が販売されている。比較的簡便な ELISA キットであり、検出感度も高い。

器具および試薬

精製水

マイクロピペット、マイクロチップ

アスピレーター

プレートミキサー

マイクロプレートリーダー (波長 450 nm)

次亜塩素酸ナトリウム (消毒用)

検査方法

製品に定められた方法に従う。

備考

検体数が多い場合はアスピレーターがあると便利である。

プレートミキサーがあれば反応時間を短縮できる。

判定は目視で行うことも可能だが、マイクロプレートリーダーがあると判定しやすい。

A 群ロタウイルスに対する抗体を使用しているため、C 群ロタウイルスは検出できない。

③ RNA 抽出

ロタウイルスのゲノムは二本鎖 RNA (dsRNA) であるが、一本鎖 RNA の抽出法をそのまま利用しても問題ない。ウイルス RNA の抽出法には多くの方法があり、抽出キットも多数販売されている。キットにより抽出効率に多少の差はあるが、PCR に用いる目的であれば、どの方法でも利用可能である。ただし、PAGE によるウイルス RNA の検出 (検査法④) を試みる場合は、フェノールを用いた抽出法 (AGPC 法など) を行う方が良い結果が得られる。ここではいくつかの代表的なキットと、キットを用いない AGPC 法について紹介する。

代表的な RNA 抽出キット

製品名	販売社名
High Pure Viral RNA Kit	ロシュ
NucleoSpin® RNA Virus	タカラバイオ
QIAamp Viral RNA Mini Kit	キアゲン

AGPC 法による RNA 抽出

(所要時間：60～90 分程度)

器具および試薬

TRIzol® LS Reagent (Life technologies) または ISOGEN-LS (ニッポン・ジーン)

クロロホルム

エタ沈メイト (ニッポン・ジーン) またはグリコーゲン (キャリアとして)

イソプロパノール

80%エタノール

DNase/RNase-free 滅菌蒸留水

マイクロピペット、マイクロチップ

マイクロチューブ (1.5 mL)

微量高速遠心機

方法

1. マイクロチューブに検体 (10% PBS 懸濁液) 100 μ L を取り、
Trizol LS Reagent (または ISOGEN-LS) を 300 μ L 添加する。
2. よく混和した後、室温で 5 分間静置する。
3. クロロホルムを 80 μ L 添加して、激しく攪拌した後、室温で 5 分間静置する。
4. 遠心 (12000 \times g、4 $^{\circ}$ C、15 分間) して、上層 (水層) を別チューブに移す。
中間層や下層が混入しないよう注意する。
5. 回収した水層にエタ沈メイト (1 μ L) またはグリコーゲン (5・10 μ g) を添加する。
無くても良いが、添加すると回収率が上昇する。

6. 水層と等量のイソプロパノールを添加してよく混和する。
7. 遠心 (12000×g、4℃、15 分間) して、上清を除去する。
8. 80%エタノールを 1 mL 添加する。
9. 遠心 (12000×g、4℃、2 分間) して、上清を除去する。
10. 室温に 5-10 分間置いてエタノールを揮発させる。
11. DNase/RNase-free 滅菌蒸留水を 50 μL 添加して RNA を溶解する。

備考

2 本鎖 RNA は 1 本鎖 RNA より安定であるが、-80℃で保存し、過度の凍結融解は避ける。

最近では TRIzol (ISOGEN) で溶解後、そのままカラムにアプライして RNA を抽出するキットも販売されている。これを用いれば、比較的簡便に高品質の RNA を抽出可能である。

製品名	販売社名
Direct-zol RNA MiniPrep Kit	フナコシ

④ PAGEによるウイルスRNAの検出

(所要時間：3時間、ゲル作製の時間を除く)

患者便中には大量のウイルスが含まれていることが多い。従って、抽出したRNAをポリアクリルアミドゲル(PAGE)で電気泳動すると、ロタウイルスゲノムに由来する11本の特徴的なバンドパターンを検出することができる。このパターンは遺伝子型によって異なり、場合によっては同じ遺伝子型でも僅かな塩基配列の違いで異なるパターンを示すことがあるため、得られたバンドパターンを比較することによって流行株の傾向を推測することも可能である。また、A群以外のロタウイルスも検出可能であるという点も大きな利点である。

従来は大型ゲルを用いて低電圧で長時間泳動し、銀染色で検出する方法が一般的であり、多大な労力と時間を要していたが、現在市販のミニプレキャストゲルを用いて30 mA、100分程度泳動し、EtBrやSYBR Greenによる染色を行っても十分な結果が得られる。

器具および試薬

PAGE用装置一式(電気泳動槽、定電流・定電圧供給装置)

10%ポリアクリルアミドゲル(市販のプレキャストゲル、高さが8~10 cm程度のもの)

トリス-グリシンバッファー(25 mM Tris、192 mM Glycine、pH 8.3)

6×Loading Buffer(BPB、グリセロール含有)

エチジウムブロマイド(EtBr)、SYBR Green I・II、SYBR Goldなどの染色剤

紫外線イルミネーター(波長250~300 nm)

方法

1. 泳動槽にゲルをセットして、泳動バッファー(トリス-グリシンバッファー)を静かに入れる。ゲルの下部に気泡が入らないよう注意する。
2. ゲルに刺さっているコームを取り除き、各ウェルを泳動バッファーで洗浄しておく。
(200 µLのマイクロピペット等でピペッティングする。ウェルに残っている塩類等の影響で泳動像が乱れることがあるため)
3. RNAサンプル10 µLを6×Loading Buffer 2 µLと混合し、ゲルのウェルへ静かに加える。
4. 電源の+極を下部、-極を上部に接続し、30 mA定電流で90~100分間泳動する。
泳動条件はゲルの大きさによって異なるので適宜調節する。
5. 染色剤を精製水または泳動バッファーで希釈し、そこにゲルを浸して30~60分間振盪する。
EtBrは0.5 µg/mL、SYBR Goldは10000倍希釈で行う。
EtBrを使用した場合は染色後に水で脱色する。
6. 紫外線イルミネーターでバンドを確認する。ウイルス量が少ない場合でも、露光時間やコントラストを調節することで検出できる場合がある。

備考

サンプル間のバンドパターンを比較するには、1枚のゲルで同時に泳動する必要がある。

[ポリアクリルアミドゲルを自作する場合]

器具および試薬

0.5 M トリシュー塩酸 (pH 6.8)

1.5 M トリシュー塩酸 (pH 8.8)

30%アクリルアミド・ビスアクリルアミド (N, N'-Methylenebisacrylamide) 溶液
(アクリルアミド 30 g、ビスアクリルアミド 0.8 g に蒸留水を加えて 100 mL にする)

10% SDS

TEMED

10% APS (過硫酸アンモニウム) (用事調製)

ゲル板 (ガラスプレート 2 枚、高さ 10~12 cm 程度)、ゴム製スペーサー、コーム、クリップ
三角フラスコ、マイクロチューブ (1.5 mL)、電子天秤

ゲルの組成 (1 枚あたり)

試薬	分離用ゲル (10%)	濃縮用ゲル (3%)
精製蒸留水	5.5 mL	5.4 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)		2.2 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	3.4 mL	
30% アクリルアミド・ ビスアクリルアミド溶液	4.5 mL	0.86 mL
10% SDS	135 μ L	90 μ L
TEMED	10 μ L	15 μ L
10% APS	54 μ L	27 μ L
Total	13.6 mL	8.6 mL

ゲル作製方法

1. ゲル板を 100%エタノールでよく拭いてから、ゲル板を組み立てる。
ゲル板には予め分離用ゲルを入れる高さ (コームの下 3~4 mm) に印を付けておく。
2. 上のゲル組成表に従って分離用ゲルを作製し、ゲル板内に流し込む。
10% SDS を加えた時点でよく混和しておく。
TEMED と 10% APS を加えた後は素早く混和して、ゲル板内に流し込む。
3. 精製蒸留水を静かに重層してゲルが固まるまで静置する。(30 分程度)
4. 濃縮用ゲルを作製し、重層した水を除去した後、ゲル板内に流し込む。
5. 気泡が入らないようにコームを挿入して、精製蒸留水を静かに重層し、
ゲルが固まるまで静置する。(30 分程度)

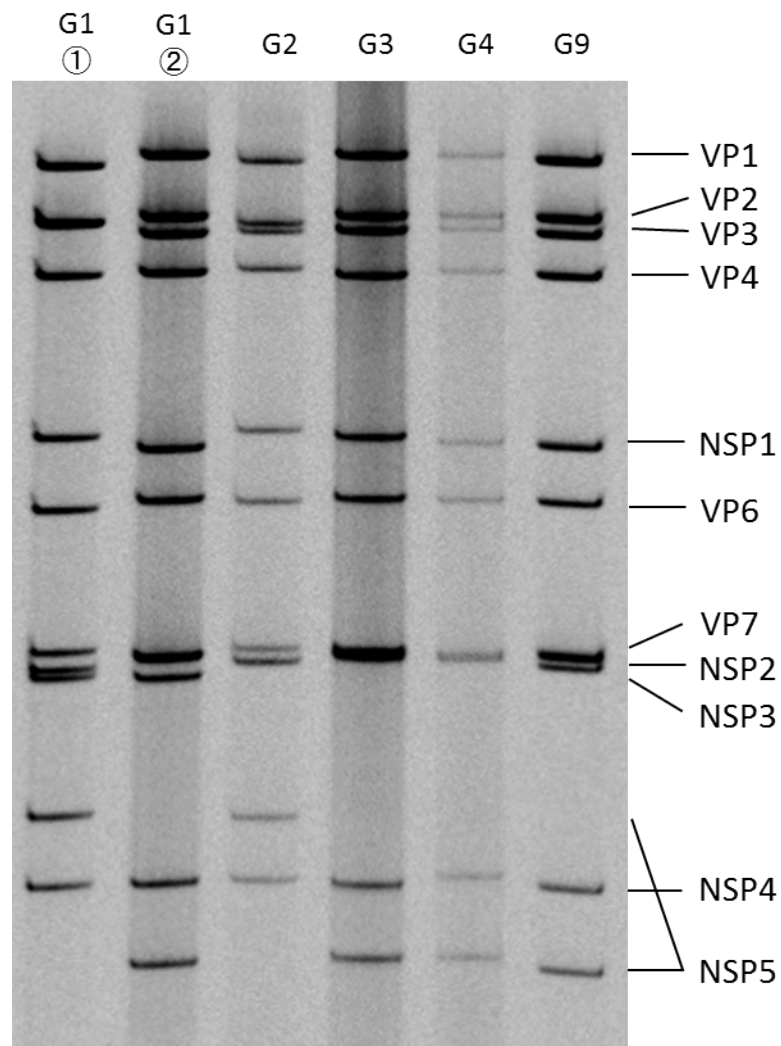


図2. PAGEによるロタウイルスRNAの検出例

G1、G2、G3、G4、G9型ウイルス株のRNAを泳動した結果を示す。

G1型のうち、①の遺伝子型構成はG1-P[8]-I2--R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2であり、②の遺伝子型構成はG1-P[8]-I1--R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1であった。①は我が国において2012年以降に検出されるようになったタイプである。

⑤ マルチプレックス PCR (VP7 の遺伝子型決定法)

ロタウイルスの VP7 の遺伝子型決定法は、1990 年に Gouvea らが開発したマルチプレックス RT-PCR 法をベースにした方法が、現在でも一般的に利用されている。しかし、流行株の変化に合わせたプライマー配列の再考があまりなされていないため、現在の流行株では検出できないケースや非特異的反応による誤判定を招くケースも見られるため、注意が必要である。正確な判定にはシーケンス解析を行うのが肝要である。

ここでは Gouvea らの方法を少し改変した方法を紹介する。ここで紹介する試薬や酵素は一例であるが、最近販売されている逆転写酵素やポリメラーゼは、旧来のものより格段に増幅効率や速度が改良されているため、試薬の選択が検出率に大きな影響を与える点も考慮すべきである。また、以前は逆転写反応前に DMSO を添加する方法が主流であったが、現在市販されている試薬キット等で逆転写反応を行う場合は DMSO の添加は必要ない。

検出法概要：VP7 の両端のプライマー (Beg9 および End9) で逆転写および 1st PCR を行う。

続いて、共通リバースプライマー (RVG9) と遺伝子型特異的フォワードプライマーを混合したマルチプレックス PCR (2nd PCR) を行い、増幅産物のサイズをアガロースゲル電気泳動で確認する。

器具および試薬

DNase/RNase-free 滅菌蒸留水 (DW)

プライマー (下表を参照)

TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (タカラバイオ)

Premix Ex Taq™ Hot Start Version (タカラバイオ)

電気泳動用アガロース、DNA 分子量マーカー、TAE または TBE バッファー
マイクロピペット、マイクロチップ

マイクロチューブ (1.5 mL)、PCR チューブ (0.2 mL)

サーマルサイクラー、電気泳動装置

使用するプライマー配列および PCR 産物のサイズ

	Primer	5' - Sequence -3'	Product size (bp)	Genotype
RT-PCR	Beg 9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCT(1062	
	End 9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		
2nd PCR	RVG 9	GGTCACATCATACAATTCT		
	aAT 8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	885	8
	aBT 1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	749	1
	aCT 2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	652	2
	aDT 4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	583	4
	aET 3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	374	3
	aFT 9	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	306	9

方法

RT-PCR 反応

1. プライマー Beg 9 および End 9 をそれぞれ 10 μM になるように混合しておく。
2. 抽出した RNA に、DW およびプライマーを加えて 65°C で 5 分間加熱処理する。

	/Sample
Template (サンプルRNA)	1 μL
DW	2 μL
10 μM フォワードプライマー (Beg9)	1 μL
10 μM フォワードプライマー (End9)	1 μL
Total	5 μL

3. 下表のように試薬を加えて RT-PCR 反応を行う。

	/Sample
加熱処理したサンプル	5 μL
DW	8.5 μL
25mM MgCl ₂	5 μL
10mM dNTP	2.5 μL
10x One Step RNA PCR Buffer	2.5 μL
RNase Inhibitor	0.5 μL
AMV Rtase XL	0.5 μL
AMV-Optimized Taq	0.5 μL
Total	25 μL

RT-PCR反応条件	
50 °C, 30 min	40 cycles
94 °C, 2 min	
94 °C, 30 sec	
55 °C, 30 sec	
72 °C, 2 min	40 cycles
72 °C, 5 min	
4 °C, ∞	

2nd PCR (Semi-nested PCR)

4. 7 種のプライマーを、それぞれ 5 μM になるように混合しておく。
5. 1st PCR 産物を DW で 100 倍希釈する。
6. 希釈した 1st PCR 産物に、下記の通り試薬を加えて PCR 反応を行う。

	/Sample
RT-PCR product (x100 diluted)	1 μL
DW	10.5 μL
2x Premix Ex Taq HS ver.	12.5 μL
Primer set (5 μM each)	1 μL
Total	25 μL

2nd PCR反応条件	
94 °C, 30 sec	20 cycles
94 °C, 30 sec	
42 °C, 30 sec	
72 °C, 90 sec	
72 °C, 5 min	20 cycles
4 °C, ∞	

アガロースゲル電気泳動によるバンドの確認

7. RT-PCR 産物を、1～1.5%アガロースゲルで 100V、20～25 分程度、電気泳動を行う。
電気泳動バッファーには TAE または TBE バッファーを用いる。
8. ゲルをエチジウムブロマイド染色液で 15～20 分間染色する。
9. ゲルを 5～10 分間水洗し、UV 照射装置で UV を照射してバンドサイズを確認する。

⑥ RT-PCR

前述の通り、ロタウイルスのゲノムは 11 本のセグメント (VP1~4、6、7 および NSP1~6) で構成されており、各セグメントの長さはおおよそ 660~3300 bp まで様々である。近年は逆転写酵素やポリメラーゼの改良が進み、数千 base におよぶ長鎖でも、効率良く増幅可能な試薬が販売されている。このような試薬を用いてロタウイルスゲノムのほぼ全長を RT-PCR で増幅させる方法が開発されているので、これを紹介する。この RT-PCR から、続けて⑦シーケンス解析を行うことも可能である。また、最後に RVC の RT-PCR による検出法についても紹介する。

器具および試薬

DNase/RNase-free 滅菌蒸留水 (DW)

プライマー (下表を参照)

PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ)

PrimeSTAR® GXL DNA polymerase (タカラバイオ)

電気泳動用アガロース、DNA 分子量マーカー、エチジウムブロマイド、

TAE または TBE バッファー

マイクロピペット、マイクロチップ

マイクロチューブ (1.5 mL)、PCR チューブ (0.2 mL)

サーマルサイクラー、電気泳動装置、UV 照射装置

RVA の RT-PCR による検出法で使用するプライマー配列

Gene	Primer name	5' - Sequence -3'	Position	Product size (bp)	Full genome size (bp)
VP1	VP1 F primer	GCTGTACAATGGGAAGTA	1-22	3299	3302
	VP1 R primer	GGTCACATCTAAGCRCTCTAA	3277-3299		
VP2	VP2 F primer	GGCTATTAAGGCTCAATGG	1-20	2688	2717
	VP2 R primer	TACAGTTCGTTTCATRATGCG	2669-2688		
VP3	VP3 F primer	AGTAGTGYGTTTTACCTCTG	19-38	2573	2591
	VP3 R primer	GGTCACATCRTGACTAGTGTGTTA	2568-2591		
VP4	VP4 F primer	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-32	2352	2359
	VP4 R primer	GGGGGTCACATCCTC	2353-2359+3		
VP6	VP6 F primer	GGCTTTAAAACGAAGTCTTC	1-20	1356	1356
	VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	1340-1356		
VP7	VP7 F primer	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTCC	1-22	1065	1062
	VP7 R primer	GGGGGTCACATCATACAATTCT	1044-1062+3		
NSP1	NSP1 F primer	GGCTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG	1-25	1547	1564
	NSP1 R primer	CTAGGCGCTACTCTAGT	1531-1547		
NSP2	NSP2 F primer	GGCTTTAAAGCGTCTCAGTC	1-21	1058	1058
	NSP2 R primer	GGTCACATAAGCGCTTTCTATTC	1036-1058		
NSP3	NSP3 F primer	GGCTTTAATGCTTTTTCAGTGGTTG	1-25	1074	1074
	NSP3 R primer	GGTCACATAAGCCCTATAG	1054-1074		
NSP4	NSP4 F primer	CTTTAAAAGTTCTGTTCCGAGAG	3-26	739	750
	NSP4 R primer	TAAGACCATTCCCTCCATTAAC	721-742		
NSP5	NSP5 F primer	GGCTTTAAAGCGCTACAGT	1-20	663	663 or 816
	NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGA	642-663		

注) Full genome size および product size は、株により多少異なることがある。

方法

逆転写反応

- 抽出した RNA に、プライマーと dNTP を加えて、65°C で 5 分間加熱処理する。
加熱処理後は 4°C (または氷上) に置いて急冷させる。

	/Sample
Template (サンプルRNA)	2 µL
DW	6 µL
dNTP (10 mM each)	1 µL
Random 6mer (50 µM)	1 µL
Total	10 µL

- 加熱処理した RNA サンプルに、下記の通り試薬を加えて逆転写反応を行う。

	/Sample
加熱処理したサンプル	10 µL
DW	4.5 µL
5x PrimeScript Buffer	4 µL
RNase Inhibitor	0.5 µL
PrimeScript RTase	1 µL
Total	20 µL

逆転写反応条件	
30 °C,	10 m in
42 °C,	30 m in
70 °C,	15 m in
4 °C,	∞

PCR

- 逆転写産物 (cDNA) に、下記の通り試薬を加えて PCR 反応を行う。
プライマーは前項の各セグメント特異的プライマーを用いる。

	/Sample
cDNA サンプル	1 µL
DW	14 µL
5x PrimeStar GXL Buffer	5 µL
dNTP (2.5 mM each)	2 µL
PrimeStar GXL polymerase	1 µL
Forward Primer (10 µM)	1 µL
Reverse Primer (10 µM)	1 µL
Total	25 µL

PCR条件	
98 °C, 10 sec	30-40 cycles
55 °C, 15 sec	
68 °C, 45 sec	
68 °C, 3 m in	

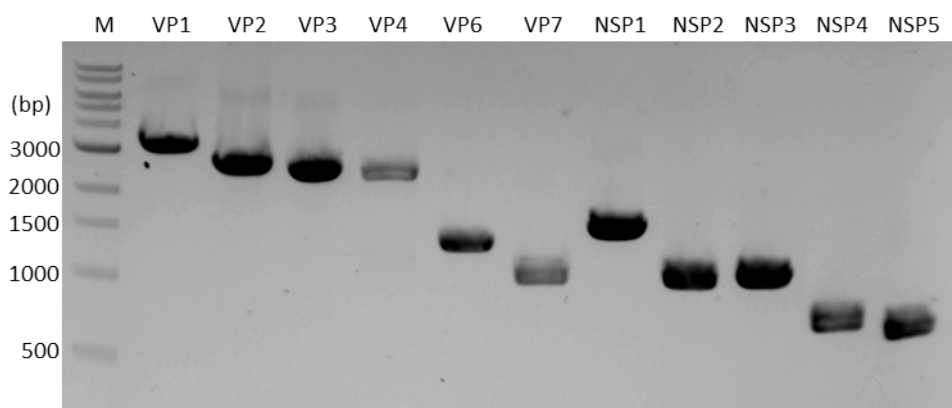
※伸長反応の時間は、増幅させるセグメントの長さに応じて適宜変更して構わない。

PrimeSTAR® GXL DNA polymerase の上記反応条件における伸長速度は 10 sec/kb である。

アガロースゲル電気泳動によるバンドの確認

6. RT-PCR 産物を、1%アガロースゲルで 100V、15～25 分程度、電気泳動を行う。
電気泳動バッファーには TAE または TBE バッファーを用いる。
7. ゲルをエチジウムブロマイド染色液で 15～20 分間染色する。
8. ゲルを 5～10 分間水洗し、UV 照射装置で UV を照射して写真を撮影する。

図 3. RT-PCR 産物の電気泳動結果例



C 群ロタウイルス (RVC) の RT-PCR による検出方法

RVC を検出する場合も上述の逆転写反応および PCR と同様の条件で実施する。プライマーの配列は下表の通りである。まず逆転写と 1st PCR を行い、必要に応じて 2nd PCR を実施する。

RVC の検出に用いるプライマー (参照 : J Clin Microbiol. 1996 Dec;34(12):3185-9.)

	Primer	5' - Sequence -3'	Product size (bp)
RTおよび 1st PCR	G8S G8A	GGCATT TAAAAAAGAAGAAGCTGT AGCCACATGATCTTGT TTTACGC	1063
2nd PCR	G8NS G8NA2	ATTATGCACAGACTATCGCCAC GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC	352

⑦シーケンス解析

上述の⑤Genotyping および⑥RT-PCR で得られた PCR 産物について、ダイレクトシーケンス解析を行う。これにより genotyping および RT-PCR の結果の精度が格段に向上する。更に得られた塩基配列を調べることにより、検体間の比較、流行株の傾向、ワクチン株の存在などについて解析を行うことも可能となる。

器具および試薬

DNase/RNase-free 滅菌蒸留水 (DW)

プライマー (直前の PCR で用いたプライマーを用いる)

方法

1. PCR 産物を電気泳動した後のアガロースゲルに UV を照射して、目的のバンドの位置を確認しながら、バンド部分のゲルを切り出す。
2. 切り取ったゲルから DNA を精製する。
QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN)などの精製キットを用いるのが便利である。
3. 使用するシーケンサーに対応したシーケンス試薬を用いて反応を行う。
以下に BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた例を示す。
4. 精製した PCR 産物に、下記の通り試薬を加えて反応を行う。
プライマーは直前の PCR に用いたプライマーの片方を用いる。

		/Sample	Sequencing reaction	
DNA Sample	2	μL	96 °C, 30 sec	25-30 cycles
DW	6	μL	96 °C, 10 sec	
5 × Sequence buffer	3	μL	50 °C, 5 sec	
3.3 μM primer	1	μL	60 °C, 4 min	
BigDye Terminator	3	μL	4 °C, ∞	
Total		15		

5. 得られた配列を BLAST や RotaC など解析する。
RotaC (<http://rotac.regatools.be/>)は、ロタウイルスの配列 (500 塩基以上が必要) を入力すると、遺伝子型や配列の近い代表株を出力してくれる web 上のツールである。

⑦ウイルス分離・培養法

ロタウイルスの分離培養法は RVA および RVC で成功している。ただし、ロタウイルスの検査には前述のような各種検出法があるため、ウイルスの分離培養は特別な目的や大量のウイルスを必要とする研究以外ではほとんど行われていない。ここでは、MA104 細胞（アカゲザル胎児腎細胞）を用いた RVA の代表的なウイルス分離方法について、簡単に紹介する。

注意点

1. ロタウイルスは細胞に感染させる時にスパイクタンパクである VP4 をトリプシンで開裂させる（ウイルスを活性化させる）必要がある。
2. 静置培養でも可能だが、振盪培養や回転培養の方がウイルスの増殖が良く、効率的である。

器具および試薬

組織培養用チューブまたはフラスコ

CO₂ インキュベーター

振盪培養器または回転培養器

0.45 μm フィルター

Eagle's MEM 培地 (EMEM)

Penicillin / Streptomycin

L-Glutamine

ウシ胎児血清 (FBS)

リン酸緩衝生理食塩水 PBS (-)

0.25%トリプシン-EDTA 液

アセチル化トリプシン (SIGMA) (PBS で 0.1%溶液に調製して使用する)

MA104 培養用の培地組成は以下の通り

培地組成 (5%FBS-EMEM)	
EMEM	500 mL
100×Penicillin / Streptomycin	5 mL
200 mM L-Glutamine	5 mL
FBS (非働化済み)	25 mL

方法

ここでは底面積 25 cm² の培養フラスコを用いる方法について述べる。

1. 便の 10% PBS 懸濁液を調製し、0.45 μm フィルターでろ過する。さらに適量の EMEM で希釈して、これを接種材料とする。
2. 接種材料（ウイルス液）200～500 μL に 0.1 %アセチル化トリプシンを 2～5 μL 添加する。トリプシンの添加量はウイルス液に対して 1～2%が目安。増えにくい場合は多めに加える。
3. 37℃で 1 時間インキュベートして、ウイルスを活性化させる。
4. コンフルエントになった MA104 細胞の入った培養フラスコを、EMEM（FBS 不含有）で静かに洗浄して FBS を取り除く。
5. トリプシンで活性化したウイルス液 200～500 μL を細胞に接種する。
6. 37℃で 1 時間インキュベートする。この際、ウイルス液を均一に広げるため、および乾燥を防ぐ為に、15 分毎にフラスコを振盪する。
7. 維持用培地（FBS 不含有の EMEM）を 5 mL 添加する。培養液に対して、0.1%トリプシン溶液の最終的な添加量が 0.1～0.2%程度になるように調節する。
8. 37℃、CO₂ インキュベーターまたは振盪培養器で培養する。
9. 細胞変性効果（CPE）を観察しながら 7 日間程度培養する。培地を採取して迅速検査キットで増殖を確認することもできる。
10. フラスコごと凍結融解を 2 回行い、その上清を次代への接種材料とする。CPE が出現するまでに 3～4 回以上の継代が必要な場合もある。