

病原体検出マニュアル  
ロタウイルス（第2版）  
令和元年6月

## 目次

### I. ロタウイルスの概説

- I-1. 病原体
- I-2. 分類
- I-3. 疫学
- I-4. 臨床症状
- I-5. ワクチン

### II. 検査準備

- II-1. 検査材料の取り扱い
- II-2. 検査の進め方
- II-3. 検査材料の採取
- II-4. 10%懸濁液の作製

### III. 検査方法

- III-1. イムノクロマト法
  - III-2. ELISA 法
  - III-3. RNA 抽出
  - III-4. PAGE によるウイルス RNA の検出
  - III-5. リアルタイム PCR
  - III-6. マルチプレックス PCR (VP7 の遺伝子型決定法)
  - III-7. RT-PCR
  - III-8. シークエンス解析
- ※ワクチン株との鑑別について

## 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。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 遺伝子分節 (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質 (NSP1~6) をコードしている。11 番目の遺伝子分節 NSP5 が 2 種類のタンパク質 (NSP5 および NSP6) をコードしているため、11 本の遺伝子分節から 12 種類のタンパク質が産生される。

### I-2. 分類

ロタウイルスは VP6 (内殻タンパク質) の血清型に基づき A~I の 9 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、B、C 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 (Rotavirus A、以下 RVA) である。RVA の各遺伝子分節には、それぞれの塩基配列の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。疫学調査では、中和抗原を有する VP7 (外殻タンパク質、G 型) と VP4 (スパイクタンパク質、P 型) の遺伝子型を調べることが多い。近年の国内 RVA 流行株の多くは G1、G2、G3、G8 および G9 型である。しかし、ロタウイルスは分節型遺伝子を持つため、遺伝子再集合 (リアソートメント) による遺伝子の置換を起こすことがあり、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) の順に各遺伝子型を列記する方法が用いられるようになった。

ヒトから検出される RVA 株のほとんどは、以下に示す遺伝子型構成のパターンのいずれかに属している。それは、Wa 型 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)、DS-1 型 (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)、AU-1 型 (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) の 3 種類であり、典型的には G1、G3、G4、G9 型ウイルスは Wa 型遺伝子型構成、G2、G8 型ウイルスは DS-1 型遺伝子型構成を持つ。しかし、近年は DS-1 型の G1 や DS-1 型の G3 など、非典型的な遺伝子型構成のウイルスが検出されることも多くなっており、流行ウイルスの遺伝子型構成が複雑化している。

### I-3. 疫学

ロタウイルスは主に乳幼児の急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られているが、成人でも感染・発症する例はある。ワクチンが導入されて以降、患者数は減少傾向にあるが、このワクチンは重症化を予防するためのワクチンであり、発症を完全に予防できるものではないため、引き続き注意は必要である。特に保育園、幼稚園、小学校などでは集団感染が発生することがあるため、手洗いや汚物処理時の衛生管理が重要である。我が国におけるロタウイルスの流行シーズンは冬

季から春季にかけて（1月から6月頃）であり、ピークは3月から4月頃である。

RVAはシーズン間および地域間の流行株の違いが大きく、同一の時期および地域に複数のウイルス株が流行することも多い。また、遺伝子型による症状の違いが見られないため、遺伝子検査なしに流行株を推定するのは困難である。

上述の通り、ヒトから検出されるロタウイルスの多くはA群（RVA）である。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、日本での検出例はない。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。また、ロタウイルスはウシやブタ、ウマなどの多くの哺乳動物においても存在し、稀に種を超えて感染・発症する例や、動物ロタウイルスとヒトロタウイルスとの遺伝子再集合体（リアソータント）がヒトの間で流行する例が報告されている。

#### 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、1～2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、腹痛であり、脱水が重症化すると輸液療法等の処置が必要となる。通常は1～2週間で自然治癒するが、胃腸炎関連けいれん等の合併症を引き起こし、死亡あるいは後遺症を残すこともある。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、最近では極端に色の薄い便は稀である。他の合併症としては腎不全や腎結石、腎炎、心筋炎、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、数週間に渡って持続することもある。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多い。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複数の製品が開発され、世界中（130カ国以上）で使用されている。これらはいずれもRVAに対するワクチンであり、RVCに対する効果は認められていない。我が国では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、どちらも広く利用されている。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弱毒生ワクチンであるため、ワクチン株による発症事例やワクチン株と野生株との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RVA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 (⑦) についてのみ記載する。

ロタウイルスは患者の便中に多量のウイルスが排出されるため、便検体について検査を行うのが合理的である。ウイルス血症を起こすこともあるが、血清や髄液等からのウイルスの検出率は低い。通常は便を 10% PBS 懸濁液としてから各種検査を進める。

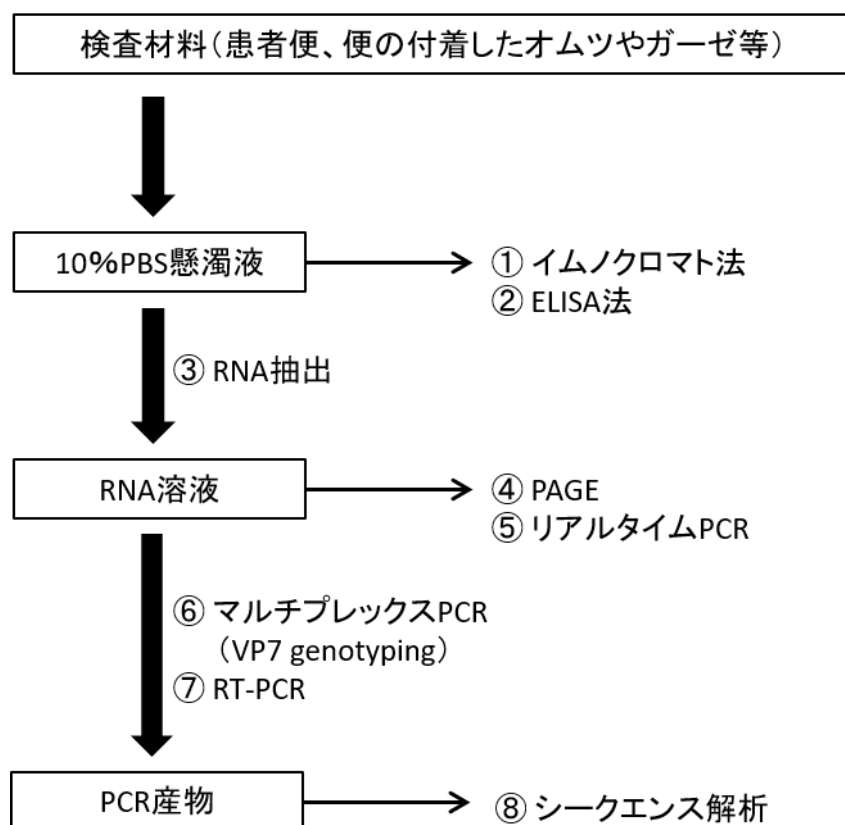


図 1. ロタウイルス検査の流れ図

### 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%便懸濁液の作製

器具および試薬

PBS(-)

電動ピペッター、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 w/v %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 1~10 mL 程度にする。
2. 検査材料と PBS(-)を入れた 50 mL 遠沈管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、夾雑物をなるべく取らないよう上清をマイクロチューブ (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。検体は-80℃で保存し、凍結融解は最小限にとどめる。

### Ⅲ. 検査方法

#### Ⅲ-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。検出感度は製品によって若干の差があるが、いずれも十分実用的であると言える。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

#### 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。

おおよその方法としては、便検体を緩衝液に懸濁し、その懸濁液を測定器の定められた箇所に滴下し、バンドの有無を目視で判定する。

#### 備考

ワクチン株も検出される。

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。

### III-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（富士レビオ）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。疫学調査におけるスクリーニング法としても広く利用されている。

#### 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。

おおよその方法としては、便検体を緩衝液に懸濁し、その懸濁液を、抗体を吸着させたウェルに滴下する。更に酵素標識抗体を滴下して 60 分間インキュベートする。精製水で洗浄した後、基質液および発色液を滴下して 10 分間インキュベートする。最後に反応停止液を滴下して、目視あるいはマイクロプレートリーダーで測定して判定する。

#### 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。

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れば定量も可能である。

ワクチン株も検出される。

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。



### III-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 (III-4) を試みる場合は、フェノールを用いた抽出法 (AGPC 法など) を行い、RNA をキャリアとして使用することは避ける。

#### 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 (Thermo Fisher Scientific) あるいは他社同等品

DNase/RNase-free 滅菌蒸留水

クロロホルム、イソプロパノール、80%エタノール

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)

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 TRIzol LS Reagent を 300  $\mu$ L 取り、検体 (10%便懸濁液の遠心上清) 100  $\mu$ L を添加する。
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  $\mu$ 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  $\mu$ L) またはグリコーゲン (5 - 10  $\mu$ 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 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、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 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、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  $\mu$ L 添加して RNA を溶解する。

備考

ロタウイルスのゲノムである 2 本鎖 RNA は 1 本鎖 RNA より安定であるが、基本的に -80°C で保存し、過度の凍結融解は避ける。

最近では TRIzol 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	ZYMO RESEARCH
TRIzol™ Plus RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific

### III-4. PAGE によるウイルス RNA の検出

(所要時間：3～4 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電気泳動 (PAGE) 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 Gold など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、パワーサプライ)

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

トランスイルミネーター

#### 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  $\mu$ L 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添加したサンプルが溢れたり、泳動像が乱れたりするのを防ぐため)
3. RNA サンプル 10  $\mu$ L を 6×Loading Buffer 2  $\mu$ L と混合し、ゲルのウェルへ静かに加える。
4. 電源の+極、-極を正しく接続し、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  $\mu$ g/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. トランス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。

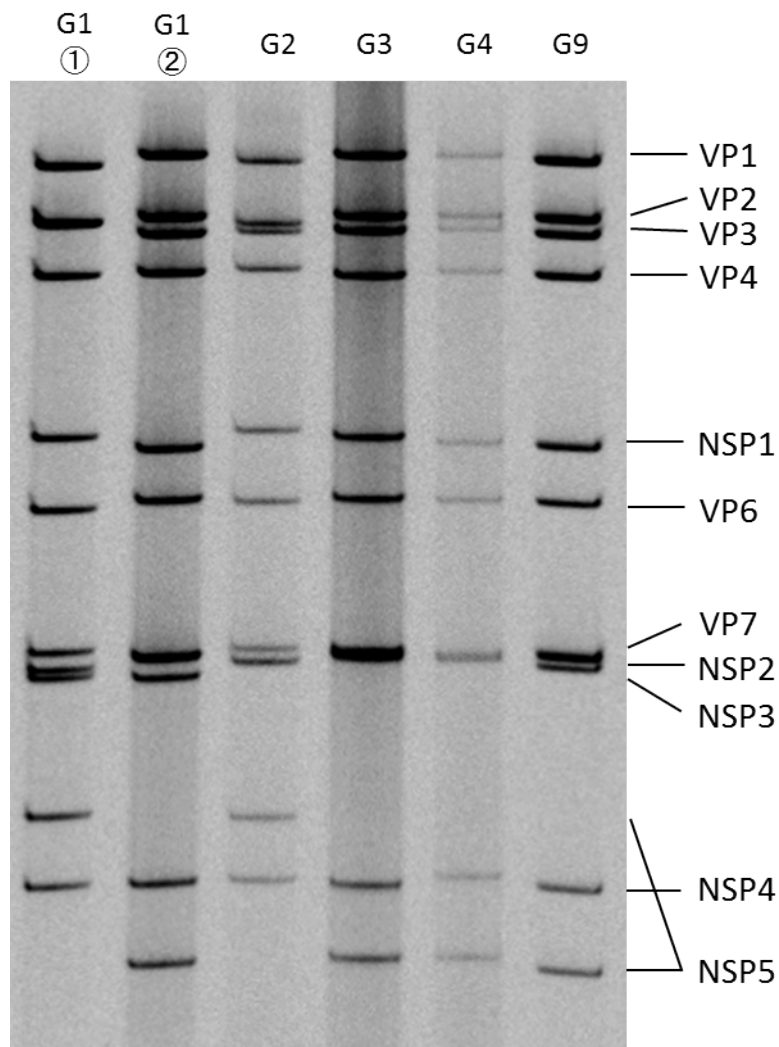


図2. PAGEによるロタウイルスRNAの検出例

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である。

NSP5は遺伝子型によってサイズが大きく異なる。H1型等（H2型以外）は660bp程度、

H2型は820bp程度であるため、NSP4遺伝子（750bp程度）と順番が入れ替わる。

泳動距離が異なることから、H1型等をロングパターン、H2型をショートパターンと呼ぶ。

### III-5. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は非常に高感度であるため少量のウイルスでも検出が可能である。また、スタンダードサンプルを用意することでコピー数の定量も可能となる。ただし、ロタウイルス感染症においては、快復した後も暫くの間（長い場合は1か月程度）ウイルスの排泄が続くことがあるため、便中にウイルス遺伝子が検出されたからと言って直近の胃腸炎症状の原因であったとは限らない。このことを考慮した上で、必要に応じて利用すべきである。

現在、TaqMan プローブを用いた RVA のリアルタイム PCR 法がよく利用されているが、プライマー・プローブのセットは大きく分けて以下の論文に基づく2種類がある。どちらも遺伝子型間の保存性が高い NSP3 遺伝子に設計されている。

<プライマーおよびプローブの配列>

参考文献：Journal of Virological Methods 155 (2009) 126-131

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Position	Product size
NSP3	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	17-39	
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA	123-147	131
	JVKP*	ACAACCTGCAGCTTCAAAGAAGWGT	72-96	

\* 5'-FAM、3'-BHQ を修飾。

参考文献：Journal of Medical Virology 80 (2008) 1489-1496

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Position	Product size
NSP3	NSP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	988-1007	
	NSP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA	1055-1074	87
	NSP3-Probe*	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	1009-1035	

\* Integrated DNA Technologies (IDT)社のダブルクエンチャープローブ (5'-FAM/9-10 塩基の間に ZEN/3'-IBFQ) の使用を推奨。通常の 5'-FAM/3'-BHQ 等では、プローブの配列が長いため、バックグラウンドが高くなるので注意。

器具および試薬

DNase/RNase-free 滅菌蒸留水 (DW)

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)

プライマーおよびプローブ (上表を参照)

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) あるいは他社同等品

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (タカラバイオ) あるいは他社同等品

リアルタイム PCR 用 96 well マイクロプレート

リアルタイム PCR 装置

## 方法

1. 抽出した RNA をマイクロチューブまたは PCR 用マイクロプレートに 1  $\mu\text{L}$  取り、DW を 4  $\mu\text{L}$  加えて全量を 5  $\mu\text{L}$  にする。使用する RNA 量は適宜変更可能。
2. 65°C で 5 分間加熱処理して RNA を変性させる。熱処理後はすぐに氷冷する。
3. 下表のように試薬を加えて、リアルタイム PCR 反応を行う。  
測定は各伸長反応後に行うように設定する。

	/Sample
熱変性させたRNA	5 $\mu\text{L}$
DW	7.5 $\mu\text{L}$
2x One Step RT-PCR Buffer III	10 $\mu\text{L}$
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 $\mu\text{L}$
Takara Ex Taq HS	0.5 $\mu\text{L}$
Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Reverse Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
TaqMan Probe (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Total	25 $\mu\text{L}$

リアルタイムPCR反応条件	
42 °C,	5 m in
95 °C,	30 sec
95 °C,	5 sec
60 °C,	20 sec
45 cycles	

## 備考

NSP3 遺伝子の陽性コントロールを作製し、段階希釈を行うことにより、検量線からコピー数を算出して絶対定量を行うことも可能である。その際、陽性コントロールは低濃度で保存すると劣化が早いため、高濃度の溶液 (10<sup>10</sup> copies/ $\mu\text{L}$  程度) を分注して凍結保存し、必ず使用時に段階希釈を行うこと。

### III-6. 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 らが開発したプライマーセットが長く利用されてきた。しかし、このプライマーセットでは、現在の流行株のいくつかで誤判定を招くケースが報告されているため使用するべきではない。現在の流行株に対応したプライマーセットが報告されているため (Front Microbiol. 2019 Mar 29;10:647)、ここではその方法を紹介する。

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反応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。

#### 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™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (タカラバイオ) あるいは他社同等品

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) あるいは他社同等品

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

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

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、トランスイルミネーター

#### 使用するプライマーの配列および PCR 産物のサイズ

	Primer	5'- Sequence -3'	position	Product Size (bp)
1st PCR	VP7 C-040F	CTCCTTTTAATGTATGGTATTGAATATAACC	40-69	
	VP7 C-941R	GTATAAAANACTTGCCACCATTTTTTCCA	913-941	902
2nd PCR	VP7 C-0932R	ACTTGCCACCATTTTTTCCA	913-932	
	G1-297F	GTATTATCCAACCTGAAGCAAGTAC	297-320	636
	G2-401F	TTAAAGACTACAATGATATTACTACATT	401-428	532
	G3-809F	CAAGGGAAAACGTRGCAGTTA	809-829	124
	G3e-757F*	CTAGATGTTACTACGGCTAC	757-776	176
	G4-478F	TTCGCTTCTGGTGAGGAGTTG	478-498	455
	G8-179F	TTACRCCATTTGTAAATTCACAG	179-201	754
	G9-606F	GATGGGACARTCTTGACCATA	606-627	327
	G12-669F	TACRACAACCGACGTCACA	669-687	264

\*G3e:ウマロタウイルス様 G3(equine-like G3)

## 方法

### RT-PCR 反応

1. 抽出した RNA をマイクロチューブまたは PCR 用マイクロプレートに 1  $\mu\text{L}$  取り、DW を 4  $\mu\text{L}$  加えて全量を 5  $\mu\text{L}$  にする。使用する RNA 量は適宜変更可能。
2. 65°C で 5 分間加熱処理して RNA を変性させる。熱処理後はすぐに氷冷する。
3. 下表のように試薬を加えて、RT-PCR 反応を行う。

		RT-PCR 反応条件
加熱処理した RNA サンプル	/Sample 5 $\mu\text{L}$	45 °C, 10 min
DW	3 $\mu\text{L}$	94 °C, 2 min
10 $\mu\text{M}$ フォワードプライマー (P7 C-040F)	1 $\mu\text{L}$	98 °C, 10 sec
10 $\mu\text{M}$ リバースプライマー (P7 C-941R)	1 $\mu\text{L}$	50 °C, 15 sec
2x One Step High Fidelity Buffer	12.5 $\mu\text{L}$	68 °C, 20 sec
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 $\mu\text{L}$	45 cycles
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	2 $\mu\text{L}$	
Total	25 $\mu\text{L}$	4 °C, $\infty$

### 2nd PCR (Semi-nested PCR)

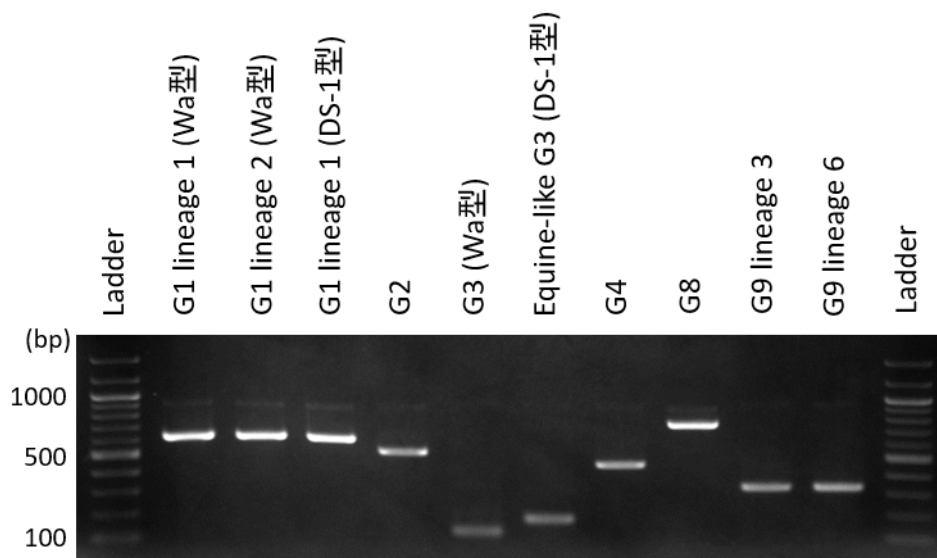
4. 上表にある 2nd PCR 用の 9 種のプライマーを、それぞれ 5  $\mu\text{M}$  になるよう混合しておく。
5. 1st PCR 産物を DW で 50 倍希釈する。
6. 希釈した 1st PCR 産物に、下記の通り試薬を加えて PCR 反応を行う。

		2nd PCR 反応条件
50倍希釈した1st PCR産物	/Sample 1 $\mu\text{L}$	98 °C, 10 sec
DW	15 $\mu\text{L}$	98 °C, 10 sec
5x PrimeStar GXL Buffer	5 $\mu\text{L}$	55 °C, 15 sec
dNTP (2.5 mM each)	2 $\mu\text{L}$	68 °C, 20 sec
PrimeStar GXL polymerase	1 $\mu\text{L}$	20 cycles
Primer set (5 $\mu\text{M}$ each)	1 $\mu\text{L}$	
Total	25 $\mu\text{L}$	4 °C, $\infty$

### アガロースゲル電気泳動によるバンドの確認

7. 2nd PCR 産物について 1.5%程度のアガロースゲルで 100V、25-30 分、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 EtBr や SYBR Gold 等の染色液で 15~20 分間染色する。
9. トランスイルミネーターでバンドサイズを確認する。





VP7 genotype	Product Size (bp)
G1	619
G2	532
G3	124
Equine-like G3	176
G4	455
G8	754
G9	327

図3. マルチプレックス PCR による VP7 遺伝子型決定法の結果例  
 (Front Microbiol. 2019 Mar 29;10:647 を参照)

### III-7. 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 (次項の表を参照)

PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) あるいは他社同等品

PrimeSTAR® GXL DNA polymerase (タカラバイオ) あるいは他社同等品

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、

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

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、トランスイルミネーター

#### 方法

##### RT-PCR 反応

1. 抽出した RNA をマイクロチューブまたは PCR 用マイクロプレートに 1  $\mu$ L 取り、DW を 4  $\mu$ L 加えて全量を 5  $\mu$ L にする。使用する RNA 量は適宜変更可能。
2. 65°C で 5 分間加熱処理して RNA を変性させる。熱処理後はすぐに氷冷する。
3. 下表のように試薬を加えて、RT-PCR 反応を行う。

		/Sample	RT-PCR reaction	
加熱処理したRNAサンプル		5 $\mu$ L	45 °C,	15 m in
DW		3 $\mu$ L	94 °C,	2 m in
10 $\mu$ M フォワードプライマー		1 $\mu$ L	98 °C,	10 sec
10 $\mu$ M リバープライマー		1 $\mu$ L	55 °C,	15 sec
2x One Step High Fidelity Buffer		12.5 $\mu$ L	68 °C,	45 sec
PrimeScript II RT Enzyme Mix		0.5 $\mu$ L	68 °C,	3 m in
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR		2 $\mu$ L	4 °C,	$\infty$
	Total	25 $\mu$ L		45 cycles

※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。

RVA の各遺伝子増幅用プライマー

Gene	Primer name	5'- Sequence -3'	Position	Product size (bp)	Full Genome size (bp)
VP1	VP1 F primer	GCTGTACAATGGGGAAGTA	11-29	3292	3302
	VP1 R primer	GGTCACATCTAAGCRCTCTAA	3282-3302		
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	GGGGGTCACATCATAACAATTCT	1044-1062+3		
NSP1	NSP1 F primer	GGCTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG	1-25	1547	1564
	NSP1 R primer	CTAGGCGCTACTCTAGT	1531-1547		
NSP2	NSP2 F primer	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	1-21	1058	1058
	NSP2 R primer	GGTCACATAAGCGCTTTCTATTC	1036-1058		
NSP3	NSP3 F primer	GGCTTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTG	1-25	1074	1074
	NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAG	1054-1074		
NSP4	NSP4 F primer	CTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAGAG	3-26	740	750
	NSP4 R primer	TAAGACCATTCTCCATTAAC	721-742		
NSP5	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	1-20	663 or 816	663 or 816
	NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	642-663		

\* Microbiol Immunol. 2012, 56(9):630-8 を参照し、改変を加えた。

\* Full genome size および product size は Wa 株を基準として示している。サイズは株により多少異なる。

アガロースゲル電気泳動によるバンドの確認

4. RT-PCR 産物を、1%アガロースゲルで 100V、20-30 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。
5. ゲルを EtBr や SYBR Gold 等の染色液で 15~20 分間染色する。
6. トランスイルミネーターでバンドサイズを確認する。

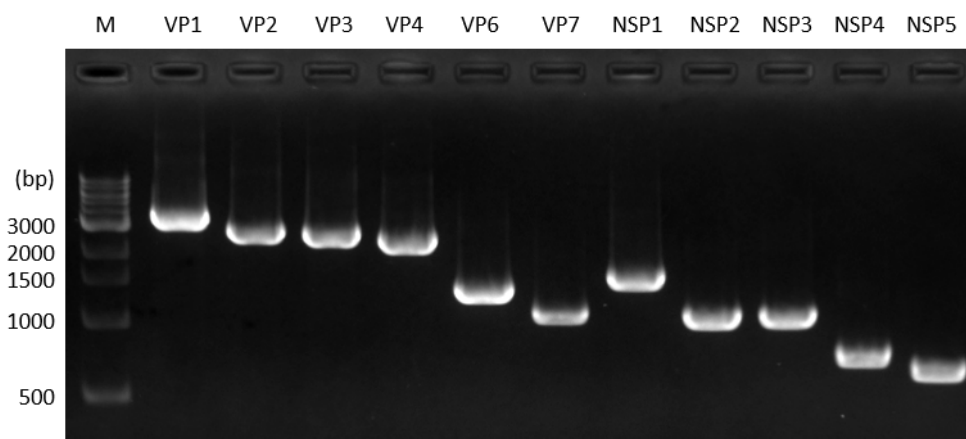


図 4. RVA の RT-PCR 産物の電気泳動結果例

#### 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 RT-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 RT-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

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

\* J Clin Microbiol. 1996, 34(12):3185-9 を参照。

### III-8. シークエンス解析

上述のIII-6. マルチプレックス PCR またはIII-7. RT-PCR で得られた PCR 産物について、ダイレクトシークエンス解析を行う。PCR による増幅産物の配列を確認することにより、結果の信頼性が大幅に向上する。更に、検体間の比較、流行株の傾向調査、ワクチン株と野生株との判別など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等を用いる)

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)や

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等の DNA 精製キット

AutoSeq G-50 (GE ヘルスケア) あるいは他社同等品

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

#### 方法

1. PCR 産物について QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)等のキットを用いて DNA の精製を行う。  
電気泳動時に非特異的なバンドが確認された場合は、ゲルから目的のバンドのみを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等のキットを用いて DNA を精製する。
2. 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遺伝子増幅反応を行う。  
以下に BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた例を示す。
3. 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、1つのサンプルチューブにつき片側のプライマーのみを添加する。

		/Sample	Sequencing reaction	
DNA Sample		2 $\mu$ L	96 °C, 30 sec	25-30 cycles
DW		6 $\mu$ L	96 °C, 10 sec	
5 $\times$ Sequence buffer		3 $\mu$ L	50 °C, 5 sec	
3.3 $\mu$ M primer		1 $\mu$ L	60 °C, 4 min	
BigDye Terminator		3 $\mu$ L	4 °C, $\infty$	
Total		15 $\mu$ L		

4. 反応後、AutoSeq G-50 (GE ヘルスケア) 等を用いて未反応のダイターミネーターを除去する。BigDye XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) 等でも代用可能である。この試料を DNA シーケンサーで解析し、塩基配列を決定する。

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、遺伝子型を自動判定してくれる web 上のツールである。

#### ※ワクチン株との鑑別について

ワクチン接種から数日以内に採取した便検体の場合、ワクチン株が検出される可能性が高い。概説でも述べたように、現在、我が国ではロタリックス (Rotarix) とロタテック (RotaTeq) の 2 種類のロタウイルスワクチン使用されている。ワクチン株の遺伝子型はいずれも広く流行している型であるため、III-6. マルチプレックス PCR (VP7 の遺伝子型決定法) だけではワクチン株か野生株かを見分けることはできない。しかし、シーケンス解析を行い、塩基配列を比較すれば、容易に判別可能である。

以下に GenBank に登録されているワクチン株の accession number を示す。RotaTeq の配列は全て公開されている。Rotarix については、ワクチン株の配列は公開されていないが、ワクチン株とほぼ一致する配列が様々な研究者から報告されているため、参考となる accession number を示す。検体から検出されたロタウイルスの配列をこれらと比較し、ほぼ 100%一致すればワクチン株であると判定できる (PCR のエラーなどにより数塩基の違いは起こり得る)。

#### ロタリックス

	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Reference	HG917354	JN849113	HG917356	JX943609	JX943610	JX943611	KC580607	HQ392411	HQ392420	HG917357	KC580611

#### ロタテック

Strain	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
WI79-9 (G1)	GU565057	GU565055	GU565056	GU565052	GU565053	GU565054	GU565058	GU565059	GU565060	GU565061	GU565062
SC2-9 (G2)	GU565068	GU565066	GU565067	GU565063	GU565064	GU565065	GU565069	GU565070	GU565071	GU565072	GU565073
WI78-8 (G3)	GU565079	GU565077	GU565078	GU565074	GU565075	GU565076	GU565080	GU565081	GU565082	GU565083	GU565084
BrB-9 (G4)	GU565090	GU565088	GU565089	GU565085	GU565086	GU565087	GU565091	GU565092	GU565093	GU565094	GU565095
WI79-4 (P[8])	GU565046	GU565044	GU565045	GU565041	GU565042	GU565043	GU565047	GU565048	GU565049	GU565050	GU565051

ロタテックの場合、VP7、VP4、VP3 は複数の遺伝子型がワクチンに混在しているため、シーケンス解析が困難である。従って、ロタテックが検出される可能性がある場合は、他の遺伝子 (VP6 や NSP4 等) をターゲットにしてシーケンス解析するべきである。

また、複数の RVA 株による混合感染 (ワクチン株と野生株による混合感染も含む) の場合も、複数の型の配列が混在するため塩基配列を特定できないことがある。この場合は分子クローニングを行うか、次世代シーケンス解析を行うなど、特殊な解析方法が要求される。

## 執筆者一覧

国立感染症研究所 藤井克樹、染谷雄一

## 問い合わせ先

国立感染症研究所 ウイルス第二部

〒208-0011 東京都武蔵村山市 4-7-1

TEL: 042-561-0771、FAX: 042-561-4729