

病原体検出マニュアル
ロタウイルス（第3版）
令和6年5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. コンベンショナル 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
- III-9. 標準品

IV. 問い合わせ先

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 (Family *Reoviridae*) ロタウイルス属 (genus *Rotavirus*) 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。ロタウイルスの粒子は直径 80~100 nm 程度の正 20 面体構造を取り、コア、内殻、外殻の 3 層で構成され、エンベロープを持たない。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) の名が付けられている。

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~J の 9 群 (E は検出例が少ないため除外) 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・発症する例はあり、集団食中毒の原因になることもある。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。日本におけるロタウイルスの流行シーズンはこれまで冬季から春季にかけて（1月から6月頃）、ピークは3月から4月頃であったが、検出数が大幅に減少している近年においては、季節性が明確ではなくなりつつある。RVAはシーズン間および地域間の流行株の違いが大きく、同一時期、同一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群ロタウイルス（RVA）**である。B群ロタウイルス（RVB）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）**は小児～成人に胃腸炎を起こし、日本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、ある程度の種特異性はあるものの、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。かつては白色水溶便が特徴的に多く見られたが、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中には最大で 10^{10} ～ 10^{12} 個ほどの大量のウイルス粒子が存在し、少量のウイルス粒子により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。おおむね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、世界中で広く使用されている。これらはいずれもRVAに対するワクチンであり、RVC等、他の群に対する効果は認められていない。日本では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、2020年10月からは定期接種化された。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]）であり、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経口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。従って、検出されたRVAが野生株かワクチン株由来であるかの判定を求められるケースも発生する。

II. 検査準備

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、ウイルス粒子の安定性は比較的高く、感染力が強いため、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リアルタイム PCR 法 (⑤) および 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。

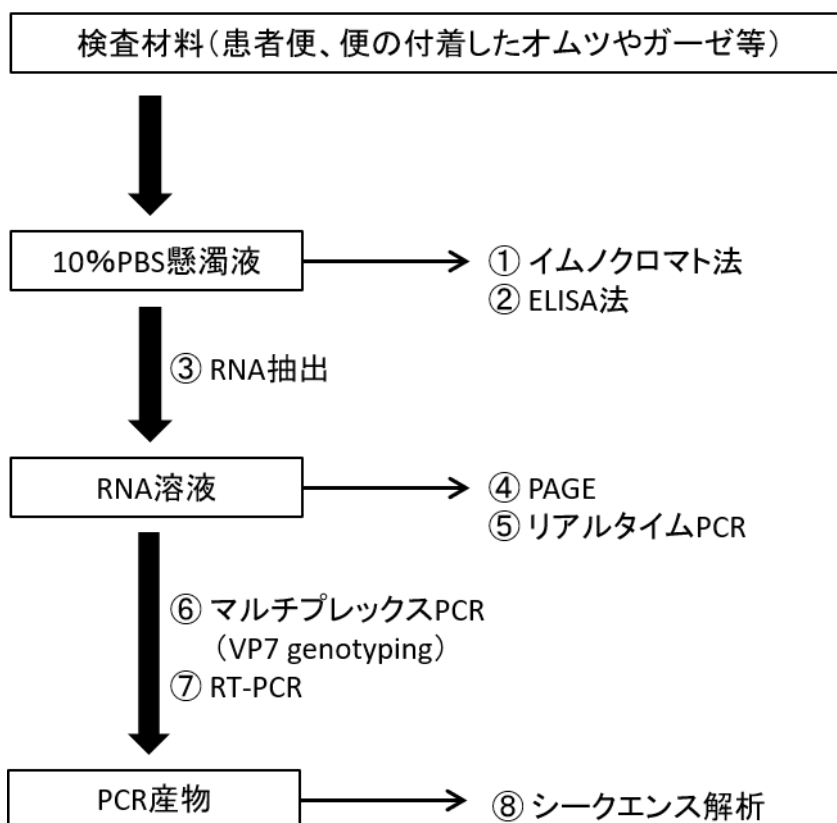


図 1. ロタウイルス検査の流れ図

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。凍結融解は最小限にとどめるのが好ましい。また、ウイルスはPBS(-)に懸濁するよりも、便のままの方が長期間安定的に保存可能である。

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（正確に濃度を合わせるのは困難なので、おおよそで構わない）。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生地（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。あらかじめオムツ等の中にガーゼを敷いておき、排便後にガーゼを回収すれば、比較的容易に採取することができる。加える PBS(-)の量は 1~10 mL 程度にすると扱いやすい。
2. 検査材料と PBS(-)を入れた 50 mL 遠沈管をシェーカーで攪拌する (300 rpm、10 min 程度)。
3. 遠心 (4℃、5,000×g 程度、10 min 程度) 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

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り、偽陰性・偽陽性が見られることもあるが、いずれもおおむね実用的である。現在、日本で販売されているキットの一例を以下に示す。

製品例

ラピッドテスト® ロタ・アデノ II (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

多くの製品は幅広い遺伝子型を検出可能であり、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

以前はロタウイルスの ELISA キットが日本でも販売され、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たが、現在は日本国内では製造・販売されていないため、利用するためには高額な海外製品を入手する必要がある。現在は検査の現場で利用する機会はほとんどないと考えられるため、詳細は割愛する。

III-3. RNA 抽出

ロタウイルスのゲノムは2本鎖 RNA (dsRNA : double-stranded RNA) であるが、1本鎖 RNA の抽出法をそのまま利用しても問題ない。近年は多くのウイルス RNA 抽出キットが販売されており利用可能である。ただし、キャリア RNA は使用しない方がよい（ノロウイルス等を検出する場合は poly A が oligo dT による逆転写反応を阻害する可能性あり、後述の PAGE によるロタウイルス RNA の検出(III-4)でも検出が困難になる可能性あり)。また、近年はサンプルを TRIzol 等と混合後、そのままカラムにアプライして簡便に抽出できるキットも販売されている。

代表的な RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン)

High Pure Viral RNA Kit (ロシュ)

NucleoSpin® RNA Virus (タカラバイオ)

Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZYMO RESEARCH)

TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) による RNA 抽出方法 (例)

必要な器材

- ・エタノール (96-100%)
- ・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)
- ・マイクロチューブ用遠心機
- ・ボルテックスミキサー

事前準備

- ・ Buffer AW1 および AW2 に指定された量のエタノールを添加して混和する。
- ・ キットに付属のキャリア RNA を添加する必要はない。(ノロウイルスやサポウイルスの場合、キャリア RNA として用いられている poly A が oligo dT による逆転写反応を阻害する可能性がある)

- 1) マイクロチューブに Buffer AVL 560 μ L を取り、10%便懸濁液を 140 μ L 添加する。
- 2) ボルテックスにより充分混和し、室温に 10 分以上置く。
- 3) チューブをスピンドウンし、エタノールを 560 μ L 添加する。
ボルテックスにより充分混和し、再びチューブをスピンドウンする。
- 4) スピнкаラムに 3)の液 630 μ L を入れ遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、残りの 3)の液 630 μ L を入れて再び遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。
- 5) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW1 を 500 μ L 入れて遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。

- 6) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW2 を 500 μ L 入れて遠心する（室温、20,000 \times g、3 min）。
- 7) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、更に遠心する（室温、20,000 \times g、1 min）。
- 8) スピнкаラムをマイクロチューブに移し、Buffer AVE を 70 μ L 入れ、蓋を閉めて室温で 1 分以上置いた後、遠心する（室温、6,000 \times g、1 min）。
- 9) このろ液を RNA サンプルとして -70 $^{\circ}$ C 以下に凍結保存する。

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 $^{\circ}$ C で保存し、過度の凍結融解は避ける。

2 本鎖 RNA サンプルから逆転写反応を行う際には、事前に熱変性を行う必要がある（**熱変性を実施しないと検出感度が 1/100 から 1/1000 程度に下がるので注意**）。この熱変性に必要な温度は RNA の溶媒に依存するが、95 $^{\circ}$ C、2min で熱処理すると溶媒の種類の影響はほとんど受けない。

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。このパターンは株 (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 μ 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 μ L を 6×Loading Buffer 2 μ 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 μ 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。

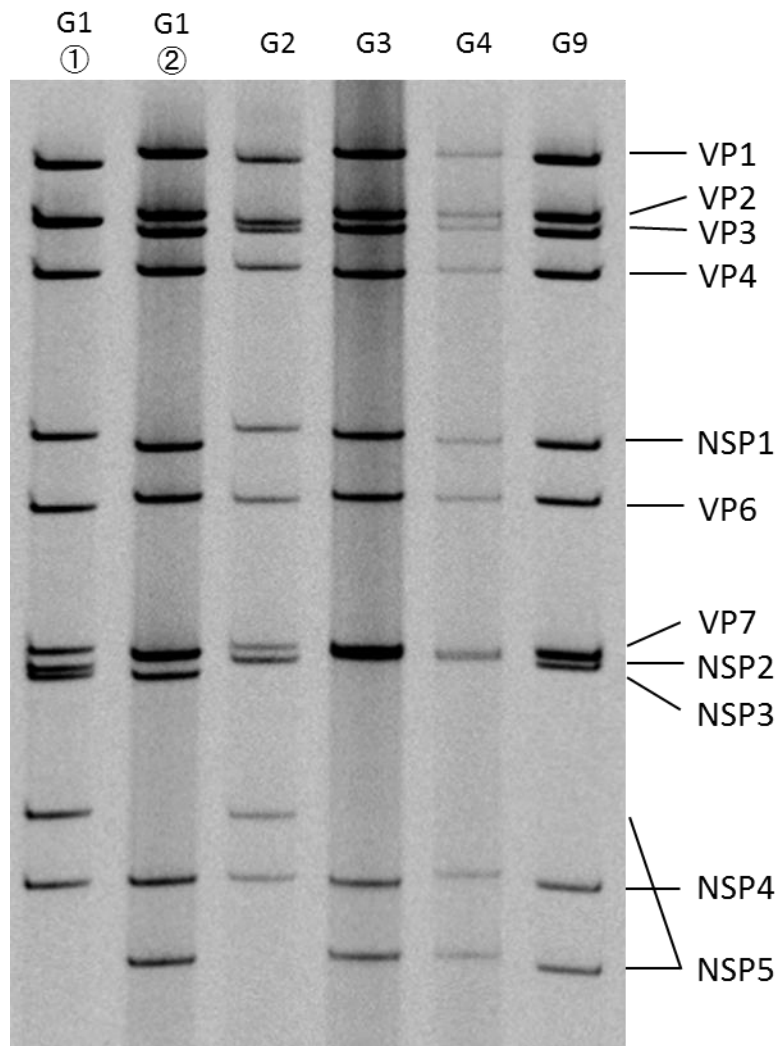


図2. PAGEによるロタウイルスRNAの検出例

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、陽性コントロールを利用することで定量（コピー数の算出）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か月以上）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。検出量が低い場合は、他の病原体検査の結果と合わせて判断することが肝要である。

現在は下記のプライマー・プローブのセットがよく利用されている。遺伝子型間の保存性が高い NSP3 遺伝子に設計されているため、動物ロタウイルスやワクチン株も含め、幅広い流行株を検出可能である。ただし、ヒトゲノムやバクテリア、アストロウイルス等に由来する非特異反応が見られることもあるため、低濃度（ 10^2 コピー程度）で検出された場合は、非特異反応の可能性も考慮する必要がある。

また、RVC 検出用のプライマーについては本項の最後に紹介する。

<RVA 用のプライマーおよびプローブの配列>

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*	ATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	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。

逆転写反応とリアルタイム PCR 反応を一度に実施する 1-step 法でも、別々に実施する 2-step 法でも、概ね問題なく検出可能である。

代表的な 1-step リアルタイム RT-PCR 試薬

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix（タカラバイオ）

Luna Probe One-Step RT-qPCR 4X Mix with UDG（NEB : New England Biolabs）

THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit（TOYOBO）

代表的な逆転写反応試薬

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)（タカラバイオ）

LunaScript RT SuperMix Kit（NEB : New England Biolabs）

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（TOYOBO）

代表的な 2-step 用リアルタイム PCR 試薬

Premix Ex Taq (Probe qPCR)（タカラバイオ）

Luna Universal Probe qPCR Master Mix (NEB : New England Biolabs)

THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO)

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)

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 1-5 μL 取り、DW を加えて全量を 5 μL にする。使用する RNA 量は適宜変更可能。
2. 95°C で 2 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。

(例) Luna Probe One-Step RT-qPCR 4X Mix with UDG (NEB)

		反応条件
熱処理したRNA	/Sample 5 μL	25 °C, 30 sec 55 °C, 10 min 95 °C, 60 sec 95 °C, 10 sec 56 °C, 30 sec 45 cycles
DW	8.4 μL	
Luna Probe One-Step RT-qPCR 4X Mix with UDG	5 μL	
Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL	
Probe (10 μM)	0.4 μL	
Total	20 μL	

備考

反応条件は使用する試薬の説明書に従って適宜変更する。伸長反応の温度 (3 step 法の場合はアニーリング温度) は 55-60°C で概ね安定した結果が得られる。プライマー・プローブの濃度が多少変動しても、結果に大きな影響は与えない。

陽性コントロール (DNA、RNA とともに) は 1-step 法でも 2-step 法でも熱変性せずに使用する。また、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 ($10^8 \sim 10^9$ copies/ μL 程度) を少量ずつに分注して凍結保存し、必ず使用時に段階希釈を行うこと。

C 群ロタウイルス (RVC) のリアルタイム PCR による検出方法

RVC を検出する場合も上述の RVA と同様の条件で実施する。ヒトから検出される RVC のほとんどは G4 型であるため、現在の RVC 検出法は G4 型 VP7 遺伝子をターゲットとしている。現時点では、これによって検出可能な RVC 株の範囲は厳密に検証されていない。

<RVC の検出に用いるプライマー・プローブの配列>

Target	Primer name	5'- sequence -3'	Position	Product size
VP7	RVC-VP7-616F	GCTGCATTTGGTAGTGACTGYGA	616-638	
	RVC-VP7-705R	AGTTTCTGTACTAGCTGGTGAACA	682-705	90
	RVC-VP7-649P(29)	TGTCCATTAGATACTACAAGTAATGGAAT	649-677	

* J Virol Methods. 2013;191:141–147.を参照し、改変を加えた。

* 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。

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等は一例であり、反応条件は使用する試薬の説明書に従って適宜変更して良い。また、1st PCR 産物について、同プライマー (VP7 C-040F および VP7 C-941R) を用いてシーケンス解析を実施することも可能である。

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

- 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 1-5 μL 取り、DW を加えて全量を 5 μL にする。使用する RNA 量は適宜変更可能。
- 95°C で 2 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。
- 下表のように試薬を加えて、RT-PCR 反応を行う。

		/Sample	RT-PCR 反応条件	
加熱処理した RNA サンプル		5 μL	45 °C, 15 min	45 cycles
DW		3 μL	94 °C, 2 min	
10 μM フォワードプライマー (VP7 C-040F)		1 μL	98 °C, 10 sec	
10 μM リバースプライマー (VP7 C-941R)		1 μL	55 °C, 15 sec	
2x One Step High Fidelity Buffer		12.5 μL	68 °C, 20 sec	
PrimeScript II RT Enzyme Mix		0.5 μL	68 °C, 3 min	
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR		2 μL	4 °C, ∞	
Total		25 μL		

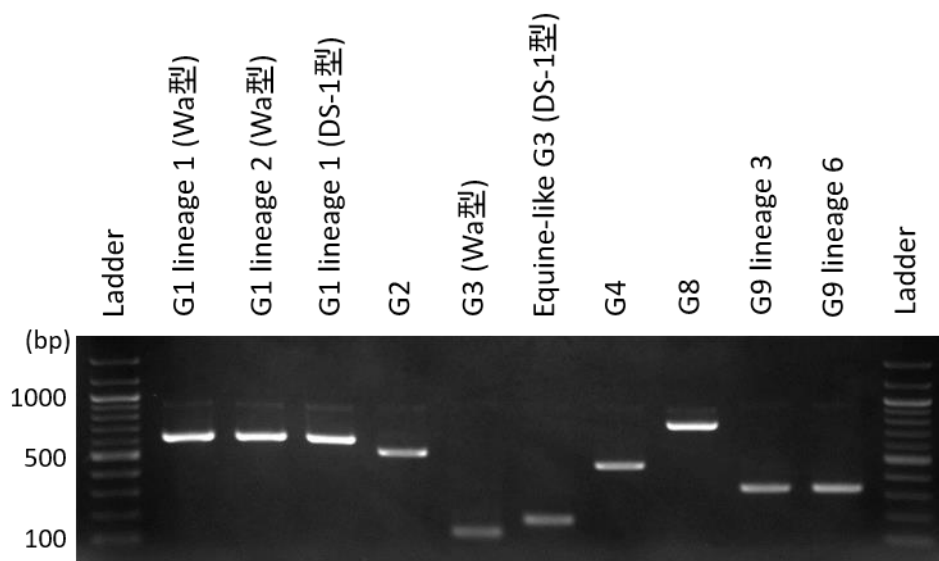
2nd PCR (Semi-nested PCR)

- 上表にある 2nd PCR 用の 9 種のプライマーを、それぞれ 5 μM になるよう混合しておく。
- 1st PCR 産物を DW で 50 倍希釈する。
- 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	2nd PCR 反応条件	
50倍希釈した 1st PCR 産物		1 μL	98 °C, 10 sec	25 cycles
DW		15 μL	98 °C, 10 sec	
5x PrimeStar GXL Buffer		5 μL	55 °C, 15 sec	
dNTP (2.5 mM each)		2 μL	68 °C, 20 sec	
PrimeStar GXL polymerase		1 μL	68 °C, 3 min	
Primer set (5 μM each)		1 μL	4 °C, ∞	
Total		25 μL		

アガロースゲル電気泳動によるバンドの確認

- 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。
- ゲルを EtBr や SYBR Gold 等の染色液で 15~20 分間染色する。
- 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. コンベンショナル 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よそ 660~3300 bp である。各セグメントの両端に保存性の高い配列があり、そこに設計されたプライマーを用いることにより、ほぼ全長配列の増幅が可能である。更に同じプライマーを用いてシーケンス解析を行うことも可能である。ここで紹介する試薬等は一例であり、反応条件は使用する試薬の説明書に従って適宜変更して良い。

また、RVC 検出用のプライマーについては本項の最後に紹介する。

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 1-5 μL 取り、DW を加えて全量を 5 μL にする。使用する RNA 量は適宜変更可能。
2. 95°C で 2 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 μL		45 °C,	15 min
DW	3 μL		94 °C,	2 min
10 μM フォワードプライマー	1 μL		98 °C,	10 sec
10 μM リバースプライマー	1 μL		55 °C,	15 sec
2x One Step High Fidelity Buffer	12.5 μL		68 °C,	45 sec
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μL		68 °C,	3 min
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	2 μL		4 °C,	∞
Total	25 μL			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	GGGGGTCACATCATACAATTCT	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	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGGTTG	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	663
	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。

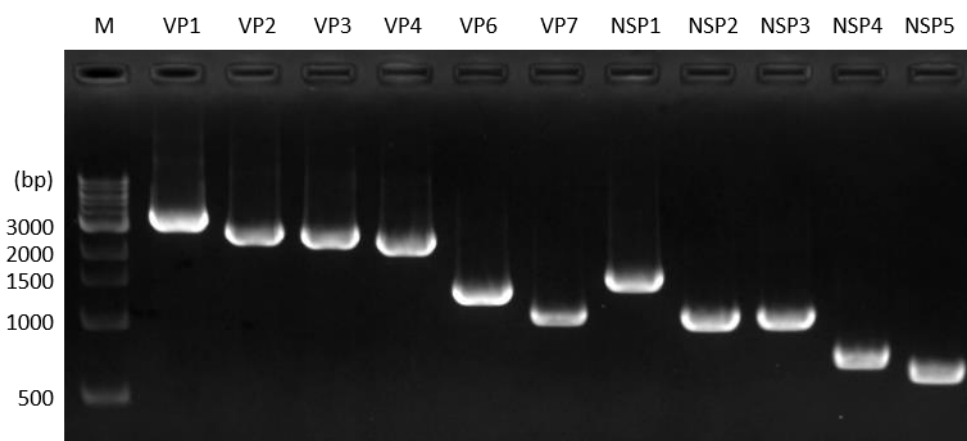


図 4. RVA の RT-PCR 産物の電気泳動結果例

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。

ヒトから検出される RVC のほとんどは G4 型であるため、現在の RVC 検出法は G4 型 VP7 遺伝子をターゲットとしている。現時点では、これによって検出可能な RVC 株の範囲は厳密に検証されていない。

RVC の検出に用いるプライマー

	Primer name	5'- Sequence -3'	Product size (bp)
RT-PCR	G8S	GGCATTAAAAAAGAAGAAGCTGT	1063
	G8A	AGCCACATGATCTTGTTCACGC	
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。ここで紹介する試薬等は一例であり、反応条件は使用する試薬の説明書に従って適宜変更して良い。

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. 使用するシークエンサーに対応したシークエ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 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 µL		

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 シークエンサーで解析し、塩基配列を決定する。

5. 得られた塩基配列データについて、BLAST や Rotavirus A Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/rotavirusa/>) などのツールを用いて解析する。

※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、日本ではロタリックス (Rotarix) とロタテック (RotaTeq) の2種類の経口弱毒生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アクセッション番号を示す。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、参考となるアクセッション番号を示す。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。

ワクチン株のアクセッション番号 (accession number) 一覧

遺伝子分節	ロタリックス
	vRIX4414
VP7	OR187597
VP4	OR187595
VP6	OR187596
VP1	OR187592
VP2	OR187593
VP3	OR187594
NSP1	OR187598
NSP2	OR187599
NSP3	OR187600
NSP4	OR187601
NSP5	OR187602

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

*灰色はヒトロタウイルス由来

Ⅲ-9. 標準品

ロタウイルスの検査に利用可能な標準品（陽性コントロール）として、国立感染症研究所では以下のものを配布している。必要に応じて下記の請求先に連絡（メール）すれば入手可能である。

- ・ RVA (NSP3) 陽性コントロール RNA：リアルタイム PCR、コンベンショナル PCR 兼用
- ・ RVA (NSP3) 陽性コントロール DNA：リアルタイム PCR、コンベンショナル PCR 兼用
- ・ RVC (VP7) 陽性コントロール DNA：リアルタイム PCR、コンベンショナル PCR 兼用

Ⅳ. 問い合わせ先

国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室（腸管感染ウイルス室）

〒208-0011 東京都武蔵村山市 4-7-1

TEL: 042-561-0771

FAX: 042-561-4729

標準品請求先

ノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター：novrefctr@nih.go.jp

執筆者一覧

国立感染症研究所 染谷雄一、藤井克樹