

ロタウイルス

I. ロタウイルスの概説

ロタウイルスはセドレオウイルス科 (family *Sedoreoviridae*) ロタウイルス属 (genus *Rotavirus*) に分類されるヒトおよび動物の胃腸炎起因ウイルスである。特に乳幼児における感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスとして知られ、5 歳までにほとんどのヒトがロタウイルスに一度は感染すると考えられている。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 種類の構造タンパク質 (VP) と 6 種類の非構造タンパク質 (NSP) がコードされている。現在のところ、ロタウイルスは A~J (E を除く) の 9 群に分類されているが、ヒトから検出されるロタウイルスのほとんどは A 群ロタウイルス (*Rotavirus alphagastroenteritidis*, 以下 RVA) であり、現在利用されているロタウイルスワクチンも、RVA による胃腸炎を予防するためのワクチンである。従って、ロタウイルス感染症の感染症流行予測調査も RVA についての調査を行う。尚、本術式において単に「ロタウイルス」と記載している場合は、RVA のことを指すものとする。

RVA の遺伝子型は多彩であり、流行株のシーズン間差および地域差が大きいことが知られている。そのため、なるべく多くの地域で長期的に調査を行うことが望ましい。網羅的な調査を通して RVA 流行株の傾向を把握し、患者の重症度やワクチン接種歴との関連を調査することにより、ワクチン効果の調査や、ワクチン効果の低いウイルス株が出現していないか監視することが可能となる。

II. 検査概要

現在のところ、RVA の抗体測定法は一般的に普及していないため、感受性調査を実施することはできない。従って、感染症流行予測調査では感染源調査のみを実施する。

RVA 胃腸炎の患者の大半は小児であるため、調査対象は小児 (15 歳以下) の感染性胃腸炎患者とする。RVA 胃腸炎患者の便中には大量のウイルスが含まれているため、便からウイルスを検出するのが最も効率的である。RVA と同様の胃腸炎症状を呈するウイルスとして、ノロウイルスやサポウイルスが知られており、これらと鑑別するためにリアルタイム PCR によるスクリーニングを行う。リアルタイム PCR にて RVA 陽性と判定された検体について、RVA の遺伝子型検査を実施する。遺伝子型検査は、中和抗原を有し血清型を反映することが知られている VP7 遺伝子の遺伝子型 (G 型) 検査を行う。

また、RVA 陽性検体のうち、コピー数の多い検体 (1.0×10^4 コピー/test 以上) については、検体を国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所(以下、感染研)に送付してシーケンス解析を行う。RVA は遺伝子再集合 (リアソートメント) により、遺伝子が組み換わることがあるため、11 本の遺伝子分節の組み合わせ (遺伝子型構成) は複雑である。稀に動物 RVA の遺伝子の一部がヒト RVA と組み換わり、新規流行株としてヒトの間で流行を引き起こすことも知られている。このような RVA の複雑な遺伝子型を詳細に調査するため、シーケンス解析によるデータの補強を行う。また、シーケンス解析を行うことにより、ワクチン株と野生株との鑑別も可能となる。

Ⅲ. 検査方法

1. 検体の採取

1.1. 対象患者

各自治体で概ね 1～2 か所の医療機関（ロタウイルス感染症例が受診する可能性の高い医療機関）を指定し、その医療機関に受診した 15 歳以下の患者のうち、1 日 3 回以上の水様性下痢を認め、経静脈輸液を行った者を対象とする。ただし、受診時点で下痢の持続期間が 2 週間以上の者、血便を認める者、院内感染が疑われる者を除く。また、過去に本調査の対象となったことがある者は、前回から 2 カ月以上経過していることとする。各自治体で月初めから順番に 10 人の該当患者を対象に検体を採取する。

1.2. 検体の採取方法

患者の受診時あるいは受診後なるべく速やかに便検体を採取する。予めオムツや下着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。検体は便が望ましいが、やむを得ない場合は直腸スワブも可とする。消毒薬を検体に混入させてはならない。短期間（数日以内）の保存や輸送時は冷蔵で問題ないが、長期保存の場合は冷凍（-20℃以下）が望ましい。

2. 便懸濁液の調製

2.1. 検体の取り扱い上の注意点

本調査で取り扱う可能性の高い胃腸炎ウイルス（ロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス等）はいずれも BSL2 の病原体であり、臨床検体の取り扱いは BSL2 基準を満たした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等は 0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等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。患者の便中には大量の病原体が含まれるため、感染事故防止およびコンタミ防止のためにも、検体や器材の消毒には十分な注意が必要である。

2.2. 便懸濁液の調製方法

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リン酸緩衝生理食塩水 PBS(-)
- ・次亜塩素酸ナトリウム（消毒液）
- ・ピペット、電動ピペッター
- ・マイクロピペット、マイクロチップ（必要に応じて使用）
- ・検体保存用マイクロチューブ
- ・50 mL 遠沈管
- ・シェーカー
- ・遠心機

- 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。便 1g に PBS(-)を添加して全量 10 mL 程度になるよう調製すると扱いやすい。便懸濁液を正確に 10%に調製するのが困難な場合は、おおよそでも構わない。便の量が少ない場合は、添加する PBS(-)の量を適宜調整する。オムツ（水溶便が付着したもの）の場合は、便が付着したと思われる箇所の表面生地を切り取って、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。PBS(-)の添加量は、直腸スワブの場合は 0.5 mL、便やオムツの場合も最低 0.5 mL とする。
- 2) 便検体と PBS(-)を入れた 50 mL 遠沈管をシェーカーでよく攪拌する（室温、300 rpm 程度、10-15 min）。検体量（液量）が少ない場合はシェーカーではなく、ピペッティングで十分に攪拌する。
- 3) 遠心（4℃、5,000×g 程度、10-15 min）して、夾雑物をなるべく取らないよう上清を保存用のマイクロチューブ等に移し、これを検体として以降の検査を進める。この検体（便懸濁液）は -70℃以下のフリーザーで凍結保存し、凍結融解は最小限にとどめる。

3. RNA の抽出

3.1. RNA 抽出における注意点

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。キットにより多少、抽出効率に差があるが、本調査ではどの抽出方法を利用しても良いものとする。ただし、各自治体内では年度の途中で方法を変更せず、極力統一の方法で実施することが望ましい。操作方法は、基本的にそれぞれのキットの説明書に従う。どのキットを用いる場合でも、用いる便懸濁液の容量は適宜変更しても構わないが、**最終的な溶出量は、用いる便懸濁液の容量の半分(2倍濃縮)に統一する。**また、ロタウイルスのゲノム RNA (dsRNA) は DNase により分解されるため、**DNase 処理を行ってはならない。**

以下に利用可能な RNA 抽出キットの一例を挙げる。

- ・ QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)
- ・ High Pure Viral RNA Kit (Roche、日本ジェネティクス)
- ・ NucleoSpin RNA Virus (タカラバイオ)
- ・ Direct-zol RNA Kit (ZYMO RESEARCH、フナコシ) (※TRI Reagent LS 等が必要)

これらのキットを用いた RNA 抽出方法のうち、2 例を以下に示す。

3.2. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) による RNA 抽出方法 (例 1)

必要な器材 (それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない)

- ・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。

3.3. Direct-zol RNA Kit (ZYMO RESEARCH) による RNA 抽出方法 (例 2)

必要な器材 (それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない)

- ・ TRI Reagent LS (あるいは TRIzol LS)

液体サンプルからの抽出であるため、TRI Reagent や Trizol ではなく、「LS」の付いた上記の製品を使用すること。フェノールを含む試薬であるため、適切に廃棄すること。

- ・ 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

- ・ Direct-zol RNA PreWash および RNA Wash Buffer に指定された量のエタノールを添加して混和しておく。
- ・ キットに付属の DNase は使用しない。(ロタウイルスのゲノムが分解される)

- 1) マイクロチューブに TRI Reagent LS 240 μ L を取り、10%便懸濁液を 80 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 320 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ラムをコレクションチューブにセットし、カラムに 3) の液 640 μ L を入れて遠心する (室温、12,000 \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、Direct-zol RNA PreWash を 400 μ L 入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 6) ろ液を捨て、再び Direct-zol RNA PreWash を 400 μ L 入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 7) ろ液を捨て、RNA Wash Buffer を 700 μ L 入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 8) ろ液を捨て、更に遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 9) スピнкаラムをマイクロチューブに移し、DNase/RNase-Free Water を 40 μ L 入れ、蓋を閉めて室温で 1 分間以上置いた後、遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 10) 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。

4. リアルタイム PCR

概要

本調査では、定量的リアルタイム PCR（プローブ法）により、検体中のロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルスの各遺伝子を定量する。本調査では、逆転写反応と定量的リアルタイム PCR を別々に行う 2 ステップ法で実施する。つまり、逆転写反応までは共通で実施し、リアルタイム PCR はウイルス別に実施する。リアルタイム PCR では、感染研が提供する各ウイルス遺伝子の標準品を用いて検量線を作成し、コピー数を算出する。現在、逆転写反応およびリアルタイム PCR の試薬が様々なメーカーから販売されており、ほとんどの試薬は問題無く定量可能であると考えられるため、どの試薬を使用しても構わない。

4.1. 逆転写反応

4.1.1. 逆転写反応における注意点

リアルタイム PCR 用の逆転写反応試薬は、多くのメーカーから販売されている。以下にその代表的なものを挙げる。試薬キットによっては、ランダムプライマーのみを用いるものや、ランダムプライマーと oligo dT プライマーを混合して用いるものがある。ノロウイルスとサポウイルスは poly A 配列を有しているが、ロタウイルスは poly A を持たないため、oligo dT プライマーだけで逆転写を行うことはできない。従って、oligo dT プライマーは必須ではないが、ランダムプライマーは必須である。ロタウイルスのゲノムは dsRNA であるため、**逆転写反応前に 95℃、2 分間の熱変性を行う必要がある**。また、どの試薬キットを用いる場合でも、**RNA サンプルの添加容量は、逆転写反応の全反応容量の 1/5 量（5 倍希釈）に統一する**。調製中の試薬や RNA サンプルは、氷上等で冷却した状態を保つことが望ましい。

代表的な逆転写反応試薬

- ・ SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher)
- ・ PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ)
- ・ ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)

これらの試薬を用いた逆転写反応の方法のうち、2 例を以下に示す。

4.1.2. SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher) による逆転写反応（例 1）

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・ 超純水（DNase/RNase-free Water）
- ・ 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 チューブあるいは PCR プレート
- ・ サーマルサイクラー

- 1) PCR チューブあるいは PCR プレートに、DNase/RNase-free Water を 6 μ L 入れる。
- 2) RNA サンプルを 4 μ L 入れる。
- 3) サーマルサイクラー等で 95°C、2 分間の熱変性を行う。変性後 4°C に急冷させる。
- 4) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。

試薬	容量/well
熱変性した RNA サンプル	10 μ L
DNase/RNase-free Water	4 μ L
5x VILO Reaction Mix	4 μ L
10x SuperScript Enzyme Mix	2 μ L
Total	20 μL

- 5) サーマルサイクラーで、25°C で 10 分間、42°C で 60 分間、85°C で 5 分間の反応を行い、反応後はすぐに 4°C に冷却する。

4.1.3. PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) による逆転写反応 (例 2)

必要な器材 (それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない)

- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・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 チューブあるいは PCR プレート
- ・サーマルサイクラー

- 1) PCR チューブあるいは PCR プレートに、DNase/RNase-free Water を 6 μ L 入れる。
- 2) RNA サンプルを 4 μ L 入れる。
- 3) サーマルサイクラー等で 95°C、2 分間の熱変性を行う。変性後 4°C に急冷させる。
- 4) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。(Oligo dT Primer を添加する必要は無い)

試薬	容量/well
熱変性した RNA サンプル	10 μ L
DNase/RNase-free Water	1 μ L
5x PrimeScript Buffer	4 μ L
Random 6-mers (100 μ M)	4 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix	1 μ L
Total	20 μL

- 5) サーマルサイクラーで、37°C で 15 分間、85°C で 10 秒間の反応を行い、反応後はすぐに 4°C に冷却する。

※合成した cDNA をすぐ (数日以内) に使用しない場合は -20°C 以下に凍結保存する。

4.2. リアルタイム PCR 法

4.2.1. 各ウイルスの検出に共通する注意点

リアルタイム PCR の反応試薬も、多くのメーカーから販売されており、どの試薬も大きな性能差はないと考えられるため、どの試薬を使用しても良い。以下にその代表的なものを挙げる。また、リアルタイム PCR 装置も多くのメーカーが販売しており、大きな性能差はないと考えられるため、どの装置を使用しても良い。Applied Biosystems 等の ROX による補正が必要な機器を使用する場合には、反応系に ROX が含まれていることを確認すること。また、伸長反応の温度はプライマーのアニーリング効率に大きな影響を与えるため、**伸長反応の温度は変えるべきではない**。他の反応条件は、各試薬の説明書に記載されている一般的な条件に沿って変更しても構わない。ただし、以下の**検量線の成立基準を満たすことは必須**とする。正確性を期すため、各サンプル、標準品、陰性対照 (No Template Control) はそれぞれ 2 ウェル以上置くこと。また、定量結果 (コピー数) の有効数字は 2 桁とする。

尚、ロタウイルスおよびサポウイルスの標準品は感染研ウイルス第二部第一室で、ノロウイルスの標準品は感染研感染症危機管理研究センター第五室で作製し、提供される。連絡先は末尾を参照。

各ウイルス遺伝子検査における検量線の基準 (実験成立条件)

- ・標準品の測定点は 1.0×10^7 コピーから 1.0×10^2 コピーの範囲内に少なくとも 3 点以上置く。
(必要に応じて、この範囲外の測定点を置いても差し支えはない)
- ・陽性の判断基準となる 1.0×10^2 コピーは必ず置き、その測定 Ct 値は 40 未満である。
- ・明らかな外れ値は棄却しても良いが、少なくとも 1.0×10^2 コピーを含む 3 測定点は採用する。
- ・決定係数 (相関係数 R の 2 乗) が 0.99 以上であることが望ましい。

代表的なリアルタイム PCR 試薬

- ・TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher)
- ・Premix Ex Taq (Probe qPCR) (タカラバイオ)
- ・THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO)
- ・Quantitect Probe PCR Kit (Qiagen)

以下の例では、特定の機器、試薬を用いた方法を紹介するが、適宜変更しても良い。

4.2.2. ロタウイルス遺伝子の定量

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リアルタイム PCR 試薬 (TaqMan Universal PCR Master Mix)
- ・リアルタイム PCR 測定機 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System)
- ・リアルタイム PCR 測定用プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)
- ・プレート用遠心機
- ・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)
- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・プライマー、プローブ (下表を参照)
- ・ロタウイルスのリアルタイム PCR 用標準品 (感染研ウイルス第二部第一室で作製)

※ロタウイルスの標準品は NSP3 遺伝子のリアルタイム PCR 増幅部位を含むプラスミド DNA である。DNA は低濃度で保存すると劣化しやすいため、 10^8 コピー/ μL 以上の濃度で -20°C 以下に凍結保存する。分注して保存し、過度の凍結融解は避けること。また、段階希釈は検査当日に用時調製すること。

ロタウイルス用プライマー・プローブ

(参考文献 : Journal of Medical Virology, 2008, 80(8): 1489-1496)

Name	5'- sequence -3'	Position
NSP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	988-1007
NSP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA	1055-1074
NSP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	1009-1041

* NSP3-Probe は、Integrated DNA Technologies (IDT) 社のダブルクエンチャープローブ (5'-FAM/9-10 番目の塩基の間に ZEN/3'-IBFQ) の使用を推奨。プローブの配列が長いため、通常の3'末端にクエンチャーを付加させたものではバックグラウンドが高くなるので注意。

1) 以下の表に従い、反応液を調製する。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	6.5 μL
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	10 μL
Forward primer (NSP3-FDeg) (10 μM)	0.5 μL
Reverse primer (NSP3-R1) (10 μM)	0.5 μL
Probe (NSP3-Probe) (10 μM)	0.5 μL
Total	18 μL

2) リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 18 μL ずつ入れる。

3) 「4.2. 逆転写反応」で合成した cDNA を 2 μL /ウェル添加する。

4) 陰性対照 (No Template Control) として、DNase/RNase-free Water を 2 μL /ウェル添加する。

- 5) 標準品を DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 1.0×10^7 - 1.0×10^2 コピー/2 μL の範囲の濃度に調製し、各濃度の標準品 2 μL /ウェル添加する。（ロタウイルスの場合は 1.0×10^7 コピーを越えることもあるが、高濃度では概ね検量線の直線性は保たれるので、必ずしも 1.0×10^7 コピーより高濃度の測定点を置く必要はない）
- 6) プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 7) 下記の通り、リアルタイム PCR 反応を行う。

50°C, 2 min	45 サイクル
95°C, 10 min	
95°C, 15 sec	
56°C, 60 sec	

- 8) データを解析して、各サンプルのコピー数（実測値）を算出する。複数のウェルのデータは相乗平均（幾何平均）として算出し、 1.0×10^2 コピー以上を陽性と判定する。

4.3.3. ノロウイルス遺伝子の定量

※ノロウイルス遺伝子の定量は、Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) を別々に実施する。
プライマー・プローブや標準品も別なので、取り違えないよう注意する。

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リアルタイム PCR 試薬 (TaqMan Universal PCR Master Mix)
- ・リアルタイム PCR 測定機 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System)
- ・リアルタイム PCR 測定用プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)
- ・プレート用遠心機
- ・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)
- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・プライマー、プローブ (下表を参照)
- ・ノロウイルスのリアルタイム PCR 用標準品 (感染研感染症危機管理研究センター第五室で作製)

※ノロウイルスの標準品は、GI、GII それぞれのリアルタイム PCR 増幅部位を含むプラスミド DNA である。DNA は低濃度で保存すると劣化しやすいため、 10^8 コピー/ μL 以上の濃度で、 -20°C 以下に凍結保存する。分注して保存し、過度の凍結融解は避けること。また、段階希釈は検査当日に用時調製すること。

ノロウイルス用プライマー・プローブ

(参考文献：Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(4): 1548-1557)

Primer		
Name	5'- sequence -3'	Position
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291-5310
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5354-5375
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003-5028
ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	5003-5028
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACA	5080-5100

*Probe		
Name	5'- sequence -3'	Position
RING1-TP(a)	AGATYGCATCYCCTGTCCA	5321-5340
RING1-TP(b)	AGATCGCGGTCTCCTGTCCA	5321-5340
RING2AL-TP	TGGGAGGGGATCGCRATCT	5048-5067

* Probe は 5'末端に蛍光色素 (FAM や VIC 等)、3'末端にクエンチャー (TAMRA や BHQ 等) を標識したものを使用。

1) 以下の表に従い、反応液を調製する。

試薬	GI	容量/well	GII	容量/well
DNase/RNase-free Water		4.4 μ L		4.6 μ L
Taq Man Universal PCR Master Mix		10.0 μ L		10.0 μ L
Forward primer (10 μ M)	COG1F	0.8 μ L	COG2F	0.8 μ L
			ALPF	0.8 μ L
Reverse primer (10 μ M)	COG1R	0.8 μ L	COG2R	0.8 μ L
Probe (4 μ M)	RING1-TP (a)	1.5 μ L	RING2AL-TP	1.0 μ L
	RING1-TP (b)	0.5 μ L		
Total		18.0 μ L		18.0 μ L

- 2) リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 18 μ L ずつ入れる。
- 3) 「4.2. 逆転写反応」で合成した cDNA を 2 μ L/ウェル添加する。
- 4) 陰性対照 (No Template Control) として、DNase/RNase-free Water を 2 μ L/ウェル添加する。
- 5) 標準品を DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 1.0×10^7 - 1.0×10^2 コピー/2 μ L の範囲の濃度に調製し、各濃度の標準品 2 μ L/ウェル添加する。
- 6) プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 7) 下記の通り、リアルタイム PCR 反応を行う。

50°C, 2 min	45 サイクル
95°C, 10 min	
95°C, 15 sec	
56°C, 60 sec	

- 8) データを解析して、各サンプルのコピー数 (実測値) を算出する。複数のウェルのデータは相乗平均 (幾何平均) として算出し、 1.0×10^2 コピー以上を陽性と判定する。

4.3.4. サポウイルス遺伝子の定量

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リアルタイム PCR 試薬 (Quantitect Probe PCR Kit Master Mix)
- ・リアルタイム PCR 測定機 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System)
- ・リアルタイム PCR 測定用プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)
- ・プレート用遠心機
- ・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)
- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・プライマー、プローブ (下表を参照)
- ・サポウイルスのリアルタイム PCR 用標準品 (感染研ウイルス第二部第一室で作製)

※サポウイルスの標準品はリアルタイム PCR 増幅部位 (RNA-dependent RNA polymerase と capsid 遺伝子の一部) を含むプラスミド DNA である。DNA は低濃度で保存すると劣化しやすいため、 10^8 コピー/ μL 以上の濃度で -20°C 以下に凍結保存する。分注して保存し、過度の凍結融解は避けること。また、段階希釈は検査当日に用時調製すること。

サポウイルス用プライマー・プローブ

(参考文献 : Journal of Medical Virology, 2019, 91(3): 370-377)

Name	5'- sequence -3'	Position
HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAYG	5079-5098
HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA	5078-5100
HuSaV-F3	GCWRYKGCWTGYTAYAACAGC	5121-5141
HuSaV-R	CCYTCCATYTCAAACACTA	5159-5177
HuSaV-TP-a*	CCNCCWATRWACCA	5101-5114
HuSaV-TP-b*	CCNCCWACRWACCA	5101-5114

* TaqMan MGB プローブ (5'末端に FAM、3'末端に Minor Groove Binder (MGB)とクエンチャーを標識したもの) の使用を推奨。HuSaV-TP-a と HuSaV-TP-b で異なる塩基 (T/C) を混合塩基(Y)や Inosine として1本にした場合、同等の反応性が得られないので注意。

1) 以下の表に従い、反応液を調製する*。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	2.5 μ L
Quantitect Probe Kit Master Mix (2 \times)	12.5 μ L
HuSaV-F1 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-F2 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-F3 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-R primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-TP-a probe (5 μ M)	1.0 μ L
HuSaV-TP-b probe (5 μ M)	1.0 μ L
Total	23.0 μ L

*反応液量は上記組成と同等の反応性が得られる範囲で調整してもよい。

- 2) リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 23.0 μ L ずつ入れる。
- 3) 「4.2. 逆転写反応」で合成した cDNA を 2 μ L/ウェル添加する。
- 4) 陰性対照 (No Template Control) として、DNase/RNase-free Water を 2 μ L/ウェル添加する。
- 5) 標準品を DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 1.0×10^7 - 1.0×10^2 コピー/2 μ L の範囲の濃度に調製し、各濃度の標準品 2 μ L/ウェル添加する。
- 6) プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 7) 下記の通り、リアルタイム PCR 反応を行う。

95°C, 15 min	45 サイクル
95°C, 15 sec	
60°C, 60 sec	

- 8) データを解析して、各サンプルのコピー数 (実測値) を算出する。複数のウェルのデータは相乗平均 (幾何平均) として算出し、 1.0×10^2 コピー以上を陽性と判定する。

5. ロタウイルスの VP7 遺伝子型決定法

ロタウイルスの VP7 遺伝子型は、semi-nested multiplex-PCR 法により簡便に判定することができる（参考文献：Front Microbiol. 2019 Mar 29;10:647）。まず 1st PCR primer を用いて 1st PCR (RT-PCR) を実施し、次いで 2nd PCR primer set を用いて 2nd PCR (multiplex-PCR) を実施する。2nd PCR の増幅産物のサイズを電気泳動で確認し、そのサイズから VP7 の遺伝子型を判定する。

RT-PCR 用および PCR 用の試薬についても、様々なメーカーから販売されており、ほとんどの試薬は問題無く利用可能であると考えられるため、どの試薬を使用しても構わない。ただし、アニーリング温度は 1st PCR、2nd PCR とともに 55℃とし、この温度は変えるべきではない。また、伸長反応の時間は充分（1,000 bp が十分に増幅できる程度の時間）に設定する。

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・超純水（DNase/RNase-free Water）
- ・プライマー（下表を参照）
- ・One-step RT-PCR 試薬および PCR 試薬（下記代表例を参照）
- ・電気泳動用アガロース、TAE または TBE バッファー、6×Loading Buffer
- ・DNA 分子量マーカー（100 – 1,000 bp まで 100 bp 間隔になっている製品を推奨）
- ・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、PCR チューブあるいはプレート
- ・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

代表的な One-step RT-PCR 試薬

- ・PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（タカラバイオ）
- ・TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)（タカラバイオ）

代表的な PCR 試薬

- ・PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（タカラバイオ）
- ・Premix Ex Taq™ Hot Start Version（タカラバイオ）

以下の実施例では、1st PCR (RT-PCR) で PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (タカラバイオ) を使用し、2nd PCR (multiplex-PCR) で PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用する場合の例を示す。

5.1. 1st PCR (RT-PCR)

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'	Product Size (bp)
1st PCR		
VP7 C-040F	CTCCTTTTAATGTATGGTATTGAATATACC	
VP7 C-941R	GTATAAAANACTTGCCACCATTTTTTCCA	902

- 1) PCR チューブあるいは PCR プレートに、DNase/RNase-free Water を 3 μ L 入れる。
- 2) RNA サンプルを 2 μ L 入れる。
- 3) サーマルサイクラーで 95°C、2 分間の熱変性を行う。変性後は 4°C に急冷させる。
- 4) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	1 μ L
VP7 C-040F primer	1 μ L
VP7 C-941R primer	1 μ L
2x One Step High Fidelity Buffer	10 μ L
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.4 μ L
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	1.6 μ L
Total	15 μ L

- 5) 熱変性させた RNA サンプル 5 μ L に、4) の逆転写反応液 15 μ L を添加する。
- 6) サーマルサイクラーで、下記の通り RT-PCR 反応を行う。

45°C,	15 min	40 サイクル
94°C,	2 min	
98°C,	10 sec	
55°C,	15 sec	
68°C,	20 sec	
68°C,	3 min	
4°C,	∞	

5.2. 2nd PCR (multiplex-PCR)

2nd PCR (multiplex-PCR) で用いるプライマー9種類 (下表参照) は、各濃度が5 μ Mとなるように予め混合しておく。

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'	Product Size (bp)
2nd PCR		
VP7 C-0932R	ACTTGCCACCATTTTTTCCA	
G1-297F	GTATTATCCAACCTGAAGCAAGTAC	636
G2-401F	TTAAAGACTACAATGATATTACTACATT	532
G3-809F	CAAGGGAAAACGTRGCAGTTA	124
G3e-757F	CTAGATGTTACTACGGCTAC	176
G4-478F	TTCGCTTCTGGTGAGGAGTTG	455
G8-179F	TTACRCCATTTGTAAATTCACAG	754
G9-606F	GATGGGACARTCTTGTACCATA	327
G12-669F	TACRACAACCGACGTCACA	264

*G3e : ウマロタウイルス様 G3 (equine-like G3)

- 1) 5.1. 1st PCR (RT-PCR) で得られた 1st PCR 産物を、DNase/RNase-free Water で 100 倍に希釈する。
- 2) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	10.6 μ L
Primer set (5 μ M each)	1 μ L
5x PrimeStar GXL Buffer	4 μ L
dNTP (2.5 mM each)	1.6 μ L
PrimeStar GXL polymerase	0.8 μ L
Total	18 μ L

- 3) PCR 用チューブあるいはプレートのウェルに、上記の反応液を 18 μ L ずつ入れる。
- 4) 100 倍希釈した 1st PCR 産物を 2 μ L/ウェル添加する。

5) 遠心機でスピンドウンし、下記の通り PCR 反応を行う。

98°C,	10 sec	} 25 サイクル
98°C,	10 sec	
55°C,	15 sec	
68°C,	20 sec	
68°C,	3 min	
4°C,	∞	

6) 得られた 2nd PCR 産物について、1.5%程度の濃度のアガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドや SYBR Gold 等で染色し、増幅産物のサイズを確認する。

7) 下表に従い、VP7 遺伝子型を判定する。

VP7 遺伝子型 (G type)	2nd PCR 産物 サイズ (bp)
G1	636
G2	532
ヒト G3	124
ウマ様 G3	176
G4	455
G8	754
G9	327
G12	264

6. ロタウイルスのシーケンス解析

「4.3.2. リアルタイム PCR 法によるロタウイルス遺伝子の定量」において、ロタウイルス遺伝子の定量値が 1.0×10^4 コピー以上となった検体について、その RNA サンプル 10 - 20 μL を感染研（村山キャンパス）ウイルス第二部第一室に送付（冷凍）する。

感染研ウイルス第二部第一室は、その検体についてロタウイルスのシーケンス解析を実施し、その結果を各自治体に通知する。

連絡先（サンプル送付先）

- ・ロタウイルス感染症流行予測調査 担当
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室
〒208-0011 東京都武蔵村山市 4-7-1
TEL: 042-561-0771

標準品に関する問い合わせ

- ・ノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター
メールアドレス：novrefctr※nih.go.jp
(※を@に変換してください)

尚、検体送付に関しては、感染症流行予測調査事務局宛にも一報を入れる事
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 予防接種研究部第四室
yosoku@nih.go.jp