

2)ホルムバーム支持膜の作製

清浄なビーカー(300ml~500ml)に蒸留水を8分目程度入れる。



0.3%ホルムバーム液(二塩化エチレン溶液)を1滴,滴下する*。水面に直径5 cm位の膜ができる状態がよい。



ホルムバーム膜上に400メッシュの銅製グリッドを10枚程度,静かに乗せる。



清浄なスライドガラスの片側下面を膜面にあて,すばやく反転させすくいあげる。



水滴を吸い取り,37℃ふらん器内で乾燥させる。



カーボン蒸着でホルムバーム膜を補強する。

注意

*0.3%のホルムバーム液を滴下するごとに,1~2分目の蒸留水を取り換える。

コロジオン膜,ホルムバーム膜ともに膜の厚さは,滴下する水面の面積,水温,溶液の濃度,滴下量によって決まる。作製条件や使用する器具は一定にし,膜の厚さは滴下量で調整するのがよい。適当な口径のピペットを選び常に同じものを使用するようにする。

4. 親水化処理

イオンスプッターで膜表面を親水化する。親水化の効果は2,3日でなくなるので出来るだけ早く使う。数日後使用する場合は再処理する。

*便材料では通常必要ない。水様便や培養液で,試料の載りが悪い時には有効。

5. ネガティブ染色法

染色剤

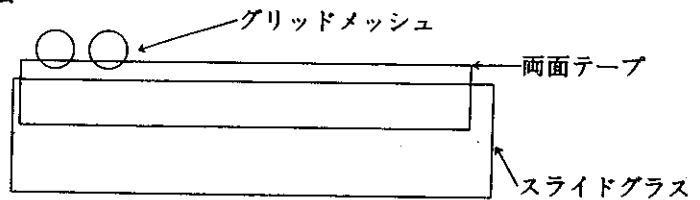
2%リンタングステン酸カリ溶液 (pH7.0)

リンタングステン酸 2g

蒸留水 100ml

2~3 N の KOH で pH7 に調整, 4℃ で 1 年保存

滴下法



グリッド上に試料を 1 滴載せ, 1~2 分後濾紙片で吸い取る。



染色液を 1 滴載せ, 1~2 分後濾紙片で吸い取って自然乾燥させた後, 鏡検する。

* 試料の塩類含量が多い場合は, 試料を吸い取った後, 直ちに蒸留水 1 滴で洗浄してから染色すると良い。

6. 電子顕微鏡による観察

試料の観察は, 3 万倍か 4 万倍で常に同一倍率で行うのがよい。

1 グリッドにつき少なくとも 5 スクエアは観察し, 粒子の有無を判定する。試料の載りかたにより観察するスクエア数を調節する。

免疫電顕法 (IEM 法)

検出されたウイルス粒子の鑑別同定は標準抗血清を用いて、病気との関係は患者のペア血清を用いて検査する。

1. 機器, 試薬

前記(1), ①機器, 試薬に同じ。

恒温槽 (56℃)

2. 検体の採取

患者の血液を急性期および3～4週後の回復期に採取し、血清に分離して-20℃以下に保存する。

3. 検査方法

- 1) ウイルス粒子浮遊液: EM法で用いた粗製鏡検材料を0.01M PBSで、1スクエア当たり5～10粒子の濃度に希釈する。
- 2) 希釈患者血清: 患者ペア血清を0.01M PBSで50～150倍に希釈し、56℃で30分非働化して40,000回rpmで1時間超遠心した上清を用いる。
- 3) ウイルス浮遊液25 μ lと等量の希釈血清を混合し、室温に1時間保ち、4℃で一夜置く。
- 4) 2%リンタングステン染色をして鏡検する。
- 5) ウイルス粒子の凝集塊の大きさとウイルス粒子表面に付着した抗体の多寡を観察して判定する。抗体量が多い場合はウイルス粒子の周囲に密に抗体が付着し、粒子表面の形態は失われる。抗体量が少ない場合は粒子表面形態は明瞭で、大きな凝集塊ができる。急性期と回復期血清とを比較し、明らかな差異が認められた場合、ウイルス粒子と特異的抗原抗体反応陽性とする。

A 群ロタウイルス抗原検出

現在わが国で市販されているキットの一例を示す。

I. ラテックス凝集法	
Rotalex ドライ	ORION DIAGNOSTICA (第一化学薬品)
ロタ-アデノドライ	” ”
ロタ・チェック	三菱化成工業
セロダイレクト栄研ロタ	栄研化学
ロタスクリーン	メルシアダイアグノスティックス (デンカ生研)
II. 酵素免疫法 (ELISA)	
ロタエンザイム IDL	International Diagnostic (東進ケミカル)
ロタザイム II	Abbott Laboratories
ロタクローン	Cambridge BioScience
ロタウイルス抗原テスト	ヘキストジャパン

A 群ロタウイルス抗原検出用キット

検査方法は各キットに添付されている使用説明書に従って行う。

I. ラテックス凝集法

すべての器材がキット内に添付されているので、フィールドでの検査も可能である。検体は採取した便をそのまま使用できる。簡便かつ迅速性（数分）に優れた検査法であるが、検出感度は他の方法より低い。

II. ELISA 法

検出感度は良い。検出時間は 1～2 日必要である。

1. 器具および試薬

マイクロピペット, マイクロチップ

(連続分注ピペットとシリンジ)

試験管, 遠心管

ELISA 洗浄器

ELISA リーダー

(ホモジナイザー)

ELISA キット

PBS

精製水

2. 検査試料の調整

- 1) 急性期に採取した患者下痢便を、PBS または蒸留水を用いて10~20%乳剤を作る
(ホモジナイザーがあれば使用した方がよい)。
- 2) 3,000rpm で15分間遠心し、その上清を検査試料とする。

酵素抗体法によるヒト A 群ロタウイルスの G 血清型別

ヒト A 群ロタウイルスは 1 から 4 型, 8 型, 9 型および 12 型が知られているものの, 下痢症患者から検出されるのは殆どが 1 から 4 型である。ラテックス凝集法あるいは ELISA 法で A 群ロタウイルス陽性の検体について, A 群ロタウイルス, 血清型別キット, ロタ-MA は 1 から 4 の G 血清型別 (外殻蛋白 VP7 の型別) が行える^{1,2)}。

1. 器具および試薬

ELISA 用マイクロプレートリーダー, マイクロプレートミキサー, 恒温槽, マイクロピペット (20, 200, 1,000 μ l), ELISA 用マイクロトレイ, 試験管 (5ml, 10ml, 50ml) (連続分注ピペットとシリンジ—25 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 250 μ l 用)

KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, ロタ-MA (株式会社セロテック, 500 回分), Tween 20, スキムミルク, ウシ血清アルブミン, 抗ヒトロタウイルス過度免疫血清, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ血清, クエン酸, 精製水, o-phenyldiamine 2HCl, Na₂HPO₄, 30% H₂O₂, H₂SO₄, プレートシール

2. 検査方法

基本的には添付されている使用説明書に従って行う。ここではわれわれが使っている方法について記す。

- 1) PBS^{#1} (KH₂PO₄ 0.21g, Na₂HPO₄ 1.495g, NaCl 8.766g を pH7.5 にして蒸留水で 1 l とする) でロタウイルスに対するモノクローナル抗体 (ロタ-MA, 乾燥品) {血清型 1, 2, 3, 4 および抗 A 群 (A 群共通)} を希釈し, 各々イムノプレート^{#2} の各ウェルに (例えば A 群特異抗体は 2-B, 2-C と, 1 型特異抗体は 3-B, 3-C) 100 μ l ずつを入れる (1 検体当たり 5 ウェルを用いる)。

モノクローナル抗体*		A	1	2	3	4	
検 体		1	2	3	4	5	6
	A	○	○	○	○	○	○
1型ウイルス	B	○	○	○	○	○	○
2型ウイルス	C	○	○	○	○	○	○
3型ウイルス	D	○	○	○	○	○	○
4型ウイルス	E	○	○	○	○	○	○
検体 No.1	F	○	○	○	○	○	○
検体 No.2	G	○	○	○	○	○	○

- * A：抗A群ロタウイルスモノクローナル抗体
 1：血清型1ロタウイルスモノクローナル抗体
 2：血清型2ロタウイルスモノクローナル抗体
 3：血清型3ロタウイルスモノクローナル抗体
 4：血清型4ロタウイルスモノクローナル抗体

トレイのレイアウト

↓ 4℃に1夜静置。

- 2) ウェルをPBS^{#3}で2回洗浄後、各ウェルに1%BSA加PBS-T(0.05%Tween20加PBS)を250μlずつ加える。

↓ 4℃に1夜置く^{#4}。

- 3) PBSで2回洗浄後、50μlの10~20%糞便遠心上清あるいは感染細胞培養上清^{#5}(2から3回凍結融解後遠心上清)を加える(B-2, 3, 4, 5, 6, C-2, 3, 4, 5, 6等)。

↓ 4℃に1夜置く。

- 4) PBSで3回洗浄後2.5%スキムミルク加PBS-Tで適宜希釈した抗ヒトロタウイルス過度免疫血清(2,500から20,000倍希釈)を各ウェルに50μlずつ入れる。

↓ 37℃に1時間置く^{#6}。

- 5) PBSで3回洗浄後、PBS-Tで適宜希釈(1,000から10,000倍)したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギ血清を各ウェルに50μlずつ加える。

↓ 37℃に1時間置く。

- 6) PBSで4回洗浄後、基質溶液(25mlの0.1M citrate-phosphate buffer(0.1Mクエン酸6.1ml, 0.2M Na₂HPO₄ 6.4ml, 精製水12.5ml, pH5.0)に使用直前に10mgのo-phenyldiamine 2HClと10μlの30%H₂O₂を加えたもの)を各ウェルに100μlずつ加える。

↓ 遮光して30分間置く。

- 7) 各ウェルに20%H₂SO₄を25μlずつ加え、プレートミキサーで軽く攪拌。

8) 波長492nm で吸光度を測定

9) 判定 特定の血清型特異抗体をコーティングしたウエルの吸光度が0.2以上であり、かつ他のどの血清型特異抗体をコーティングしたウエルの吸光度よりも2倍以上高い時にその血清型とする^{#7}。なお、抗A群抗体は検体中のヒトA群ロタウイルスを再確認するもので、吸光度0.2/ウエルが陽性限界とする。

3. 注意

^{#1}モノクローナル抗体を固相化する時にはPBSの方が炭酸緩衝液(pH9.6)よりも感度が高い。

^{#2}用いるプレートは高結合タイプのGreinerのイミュロン600、LINBROのCode NO.76-341-05等がよい。

^{#3}ウエルの洗浄はPBSで行う。PBS-Tはよりバックグラウンドが高くなる。

^{#4}1%BSAのインキュベーションは4℃一夜のかわりに、4℃4時間に短縮できるが、吸光度が若干低下することがある。

^{#5}糞便遠心上清あるいは感染細胞培養上清を10%スキムミルク加PBS-Tと3:1の割合で混合したもの。

^{#6}37℃でのインキュベーションは、プレートを恒温槽に浮かべるか、フラン器内からかじめ37℃に保たれている水槽に浮かべる等の方法がより効果的である。

^{#7}このキットに用いられている血清型3モノクローナル抗体は一部の3型ウイルスとは反応しないことがある。

RPHA 法による C 群ロタウイルスの検出

ロタウイルスは A~G 群に分類されているが、ヒトの胃腸炎から日本では A 群と C 群が検出されており、A 群と C 群ロタウイルスの群別検出を行う必要がある。この 2 群については簡易検査キットが開発されている。ここではデンカ生研(株)より入手可能な RPHA 法試薬による C 群ロタウイルスの検出について説明する。

1. 器具及び試薬

マイクロチューブ、V 型マイクロプレート、ドロッパー(25 μ l 用)、マイクロピペット(25 μ l 用)、マイクロチューブ用ミキサー、マイクロプレート用ミキサー、C 群ロタウイルス検出用 RPHA 法試薬(デンカ生研株式会社、50 検体用)、PBS (-)

2. 検査方法

基本的には添付されている使用説明書に従って行う。ここでは我々が使っている方法について記す。

1) 抗体感作赤血球液(C 群ロタウイルス特異モノクローナル抗体感作赤血球液)及び対照赤血球液(正常マウス IgG 感作赤血球液)を使用直前に良く振り混ぜ、必要量を希釈液で 10 倍に薄める。吸収用赤血球液は緩やかに振って均等にし、そのまま使用する。

2) 検体の前処理

① マイクロチューブに糞便 0.1g をとり、PBS (-) 1 ml を加え、約 1 分間、激しく攪拌後、6,000rpm、10 分間遠心する。上清 100 μ l を別のマイクロチューブにとり、吸収用赤血球液 25 μ l を添加する。

② マイクロチューブ用ミキサーで良く混和後、室温、30 分間、ときどき振り混ぜながら反応させる。

③ 5,000rpm、10 分間遠心し、その上清を注意深く採取し検体として用いる¹⁾。

3) 本試験

① 1 検体につきマイクロプレートの 2 列を用い、希釈液を各列第 1 穴~第 8 穴に 25 μ l ずつ滴下する。

② 被検検体を各列の第 1 穴に 25 μ l ずつ入れる。

③ 第 1 穴から第 8 穴まで 2 倍段階希釈を行う。

④ 同一検体希釈列の左側に抗体感作赤血球液を、右側に対照赤血球液を 25 μ l ずつ滴下する。なお、陽性コントロールについても同様に行い、血球対照も作成する。

- ⑤ マイクロプレートをミキサーで約1分間振とうし、室温（15～25℃）に1時間静置し、結果を判定する。

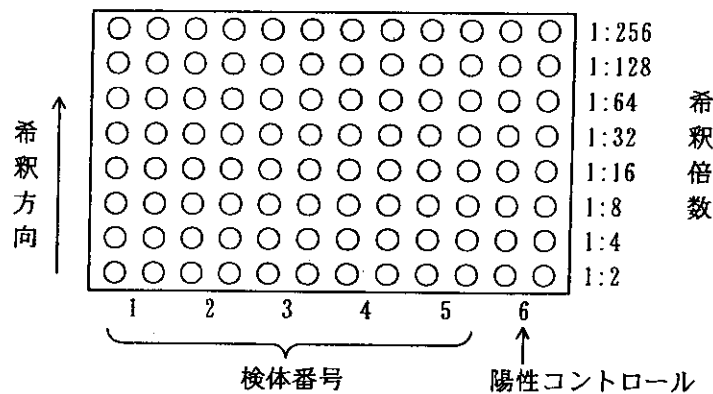


図 マイクロプレートのレイアウト

表 (希釈方法)

ウェル No.	1	2	3	4	5	6	7	8
希釈液 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25
被検検体 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25
検体希釈倍数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
抗体感作赤血球液 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	
又は対照赤血球液 (μl)								捨てる
フタをしてミキサーにかけ、室温、1時間静置								
判定								

4) 結果の判定

- ① マイクロプレートの管底に凝集がみられるものを陽性とし、ボタン状に沈降しているものを陰性とする^{#2}。凝集価は陽性を示した検体の最高希釈倍数で表示する。
- ② 陽性コントロールについて凝集価が1:32以上であることを確認する。
- ③ 感作赤血球に対し16倍以上の凝集価を示し、対照赤血球に対し陰性を示す検体を陽性とする。対照赤血球に対し陽性を示した検体であっても、感作赤血球に対する凝集価が、対照赤血球に対する凝集価より4倍以上高ければ、C群ロタウイルス陽性とする。なお、第8穴までで最高希釈倍数が決まらない場合は、さらに希釈して最高希釈倍数を決定する。

表 (凝集像の判定)

凝 集 像	読 み	判 定
血球がボタン状に集まり、外縁がなめらかな円形を示すもの	(-)	陰性
血球ボタンが血球対照よりやや大きく、周辺にわずかな凝集のみられるもの および、(+)と(-)の中間的凝集を示すもの	(±)	
血球ボタンが血球対照より大きく薄く、周辺に多くの凝集を生じているもの	(+)	陽性
血球凝集が均一で膜状となるもの	(++)	
凝集像の一部が中心に向かってスリップした状態にあるもの	(+++)	

5) 確認試験 (凝集阻止反応)

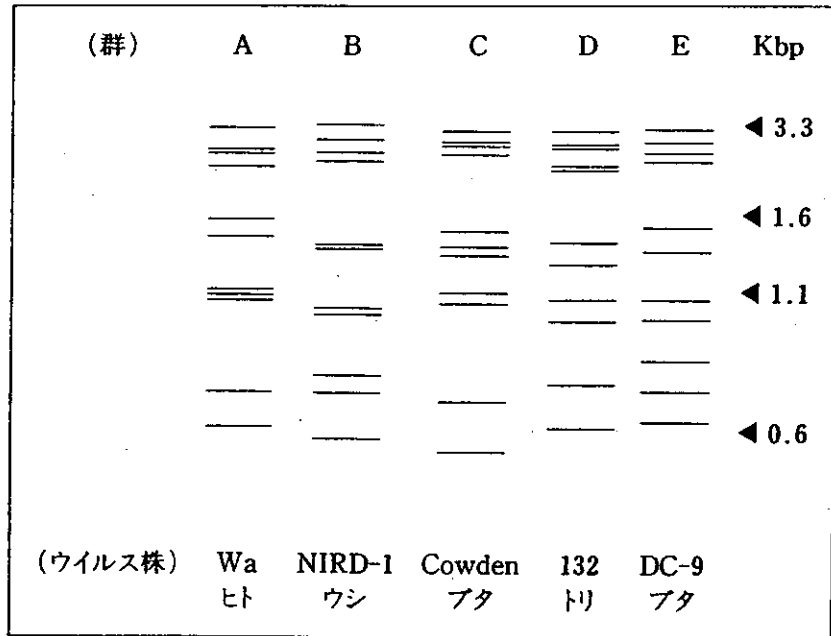
- ① 1検体につきマイクロプレートの2列を使い、希釈液を各列とも先の本試験で得られた凝集価より2管高い穴まで、25 μ lずつ滴下する。
- ② 被検検体を各列の第1穴に25 μ lずつ入れる。
- ③ 第1穴から最終穴まで2倍段階希釈を行う。
- ④ 同一検体希釈列の左側に希釈液を、右側に凝集阻止抗体を25 μ lずつ滴下する。
- ⑤ マイクロプレートをミキサーで約1分間振とうし、室温(15~25 $^{\circ}$ C)に1時間静置する。
- ⑥ 感作赤血球液を検体希釈した全部の穴に25 μ lずつ滴下する。なお、陽性コントロールについても同様に行い、血球対照も作成する。
- ⑦ マイクロプレートをミキサーで約1分間振とうし、室温(15~25 $^{\circ}$ C)に1時間静置し、結果を判定する。凝集阻止抗体滴下列の凝集価が、希釈液滴下列の凝集価より4倍以上低下した場合、C群ロタウイルス陽性と判定する。

3. 注意

- *1 この吸収操作によっても非特異反応が吸収しきれない場合は、吸収に用いる血球の量を増やして再吸収するか、HCFC-141b(ダイキン工業株式会社)等で抽出を行う。
- *2 ウイルス量の多い検体では低希釈段階で血球がスリップして、プレートの管底に塊状に落ち込むことがあるので、判定の際に十分注意する必要がある。

ロタウイルス RNA の検出 (SDS-PAGE)

ロタウイルスの核酸は11分節の2本鎖RNAから成り、ポリアクリルアミド電気泳動法³⁾により分析できる。泳動パターンにより群別に分類でき、現在群別分類ができる唯一の方法である。ヒトの下痢症から日本ではA群とC群が検出されている。



各群別ロタウイルス RNA 電気泳動パターン (模式図)

1. 器具および試薬

PAGE 用装置一式

定電流定電圧装置

紫外線イルミネーター

微量高速遠心機

マイクロチューブ

試験管

ミキサー

マイクロピペット

マイクロチップ

アスピレーター

ゲル染色用容器

(ゲル乾燥器, ゲル乾燥用ろ紙またはセロファン)

(マイクロシリンジ)

アクリルアミド・ビスアクリルアミド溶液

(アクリルアミド30g, ビスアクリルアミド0.8gに蒸留水を加えて100mlにする。)

3M トリス-塩酸 (pH8.8)

0.5M トリス-塩酸 (pH6.8)

フェノール溶液

クロロホルム

10%SDS, TEMED, 10%過硫酸アンモニウム, BPB

泳動用緩衝液(Trizma Base 1.5g, Glycine 7.2g, 10%SDS 5ml, 蒸留水495ml)

2. RNAの抽出

RNAの抽出には多くの方法があり、いろいろのRNA抽出キットが販売されているので、どの方法でも良い。ここではわれわれが使用している非常に簡単な方法を記す。

- 1) マイクロチューブに便50 μ lを採り試料希釈液^{#1}300 μ lを加える(または10~20% 便乳剤300 μ lに10倍濃度の試料希釈液25 μ lを加える)。
- 2) フェノール150 μ lを加え、ミキサーで1分間攪拌する。
- 3) クロロホルム 150 μ lを加え、ミキサーで1分間攪拌する(フェノール:クロロホルム=1:1の溶液を使用してもよい)。
- 4) 5,000rpmで1分間遠心し、その上清をフェノール抽出RNA試料とする。

^{#1}試料希釈液(Trizma Base 0.32g, EDTA 0.28g, SDS 0.13g, NaCl 0.4g, 2ME 0.13ml, 蒸留水で100mlにする)

3. 検査方法

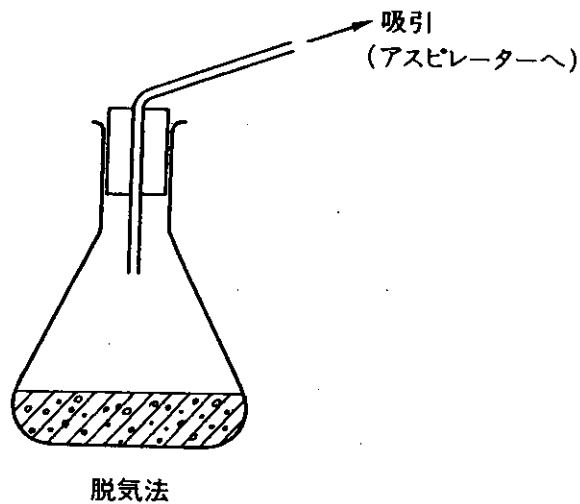
(a) SDS-PAGE

10%分離用ゲルと3%濃縮用ゲルを使用する。ゲルの組成を下の表に示す(市販されている既製のゲルを使用してもよい)。

SDS-PAGE用ゲルの組成

試 薬	分離用 (10%)	濃縮 (3%)
蒸留水	5.25ml	6.3ml
3M トリス-塩酸	1.25	—
0.5M トリス-塩酸	—	2.5
アクリルアミド・ビスアクリルアミド (30 : 0.8)	3.33	1.0
	混和後脱気	
10%SDS	0.1	0.1
TEMED	0.005	0.005
10%過硫酸アンモニウム	0.07	0.07
計	≒10ml	≒10ml

- 1) 電気泳動装置を組み立てる (多数市販されていて装置が多少異なるので、添付されている説明書に従う)。ガラス板のゲルが作られる側を無水アルコールでよく拭いておく。試料孔用コウムを所定の位置まで挿入し、その下端に当たる位置をガラス板上に印を付けたのちコウムを抜いておく。
- 2) 分離用ゲルを調製する。量は装置により異なるので比例計算で算出し、少しの余分を見込む。蒸留水、3M トリス-塩酸、アクリルアミド混液を加え十分に混和したのち、アスピレーター等を使って脱気する(2~3分でよい)。簡単な脱気法を下図に示す。10%SDS、10%過硫酸アンモニウム、TEMED を加えて軽く混和する。



- 3) 直ちにガラス板内に流し込む。ゲル液高はコウムの印から3~4mm下までとする。*n*-ブタノールを液高1mm位に静かに重層し、空気との接触を断つ(ブタノー

ルの代わりに蒸留水でもよい)。

- 4) ゲルとブタノールの中に明瞭な界面が出現した (20~30分後) のち、ブタノールを除き界面を蒸留水で洗う。
- 5) 濃縮用ゲルを調製し、分離ゲル上に重層する。直ちに試料用コウムをコウムの先端に気泡が残らないように注意しながら挿入する。
- 6) 重合が完了した (通常20~30分) のち、装置を完全に組み立てる。
- 7) 泳動槽に泳動用緩衝液を静かに入れる。ガラスプレート下部と緩衝液の間のできる気泡は装置を傾斜させたり、注射器などで除く。
- 8) コウム下端中央それぞれに相当する位置を外側ガラス板にマジックペンなどで印を付け、コウムを静かに抜き取る。試料 (抽出 RNA 試料20 μ l, BPB 5 μ l) をマイクロシリンジまたはマイクロチップで印を目標にして静かに注入する。
- 9) \ominus 極を上部、 \oplus 極を下部に接続し泳動する。泳動条件はゲルの大きさと厚さによって決定されるが、1.0mm厚で90 \times 70mmゲルでは30mAの定電流で90~120分泳動する。
- 10) 泳動終了後、電源を切り、リード線ははずしてからガラスプレートを装置からはずす。切り込みの入ったプレートを上方にして、プレート間をスパーク等で静かに押し上げて切り込みプレートをはずす。濃縮ゲルを切り離し、上下左右がわかるように1カ所の角を小さく斜めに切り取る。

(b) 臭化エチジウム染色

- 1) 容器に0.5 μ g/ml臭化エチジウム液100mlを準備し、ゲルを下端の方から両手で静かにプレートから持ち上げるようにして離して、染色液に入れる。
- 2) 30分間浸したのち、ゲルを水洗いする。
- 3) 紫外線イルミネーター上にのせRNAパターンを観察する (紫外線から眼を保護するため眼鏡を使用する)。ポラロイドの撮影装置があれば、写真を撮っておく。臭化エチジウムは発がん性があるとされているので必ず手袋を使用する。

(c) 銀染色

この操作はすべて室温で行い、振とう装置があれば使用したほうがよい。また銀染色は核酸ばかりでなくタンパクも染めるので、ゲルを素手で触れてはいけない。手袋を使用するのが便利である。銀染色用キットも市販されている。

- 1) 固定液^{#2} (90 \times 70mmゲルの場合100mlで可) にゲルを浸し、ときどき振とうしながら30分置く。

^{#2} 固定液 (酢酸0.5ml, エタノール10ml, 蒸留水90ml)

2) ゲルを硝酸銀液^{#3}に移し30分間染色する。ときどき軽く振とうし、むらなく染色されるようにする。

^{#3}硝酸銀液 (硝酸銀0.19g, 蒸留水100ml)

3) 蒸留水で2回水洗いする^{#4}。

4) 発色液^{#4}を少し入れ、直ちによく振とうしてゲル前面にまぶされるようにする(ゲル全面が一様に発色するように)。残りの発色液を入れ、ときどき振とうしながら RNA バンドを観察する。RNA 量にもよるが5~10分で観察可能である。時間とともに濃くなるが、同時にバックの色も濃くなることがあるので注意する。

^{#4}発色液 (5M NaOH 15ml, フォルマリン0.8ml, 蒸留水85ml)

5) 発色液を捨て、反応停止液^{#5}を入れる。

^{#5}反応停止液 (酢酸10ml, 蒸留水90ml)

[注]

水道水で洗うと、水道水中の塩素と銀が反応し塩化銀の白い沈殿ができ、量が多いとゲル表面に塩化銀の膜を作ることがある。

硝酸銀溶液は褐色ビンに保存し、数回は使用可能である。廃棄する場合は別容器に保存し、特定の処理を行う必要がある。

(d) 乾燥

ゲルを長期に保存する場合、乾燥させると便利である。

市販の乾燥器の説明書に従って使用する。

ゲル乾燥用ろ紙を使う場合は、ろ紙をゲルよりやや大きめに切り水に浸しておく。ゲルを十分に水洗いして、ろ紙、ゲル、プラスチックフィルム(ろ紙より少し大きめ)の順に乾燥器にのせて、作動させる。

セロファンを使う場合、セロファン2枚をゲルより大きめに切って、十分に水につける。乾燥器上にセロファン、ゲル、セロファンと各間に気泡が入らないようにのせて乾燥させる。

電気泳動は同じ条件で行っても常に同じというわけではない。1枚のゲルで同時に泳動した検体の RNA パターンは比較できるが、別々のゲルでは細かい変化は指摘できない。2つの検体の微妙な差異を調べるためには、1本の試料孔に2検体の試料を入れて泳動しなければならない。

RNA 量が少なく、パターンが不明瞭で分子量の小さいバンドが見えない場合、抽出 RNA をエタノール沈殿で濃縮する。抽出 RNA の2.5倍量のエタノールを加え、

軽く振とうして -80°C に30~60分（または -20°C に一夜）放置したのち、10,000~15,000rpm, 10分間遠心する。上清を捨てて沈渣を十分に乾燥し（風乾または減圧乾燥）、 $20\mu\text{l}$ の試料希釈液を加えて溶かし、BPB $5\mu\text{l}$ を加え泳動用試料とする。

ロタウイルス RT-PCR 法

A 群ロタウイルスを糞便から検出するためには、他の簡便なキットが多く市販されているので RT-PCR 法はあまり良い方法ではない。RT-PCR 法を使用するのは、A 群ロタウイルスが髄液、血清、咽頭拭い液など極微量に含まれていると思われる検体と血清型判定 (Serotyping) を行なう場合であろう。

1. 器具および試薬

サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器、マイクロピペット (2, 20, 200, 1000 μ l)、電気泳動装置 (ミュージッド-2, 株式会社アドバンス)、UV 照射写真撮影装置、マイルドミキサー (タイテック社)、マイクロチューブ (0.5, 1.5ml)、電気泳動用アガロース、分子量マーカー、グアニジンチオシアネイト (Fluka 社製)、Dimethyl sulfoxide, 1M Tris-HCl (pH8.3), 1M KCl, 1M MgCl₂, 1%ゼラチン, 100mM DTT, プライマー, AMV reverse transcriptase, 精製水。

2. ウイルス RNA の抽出

RNaid 法 (BIO101, Inc.フナコシ株式会社)、Isogen LS 法 (ニッポンジーン社)、その他、色々な RNA 抽出キットが販売されている。抽出方法はキットに添付されているのでそれを参照して行う。我々は RNaid 法を使用しているのでその方法を紹介する。

1. 滅菌チューブ (1.5ml) に検体 0.2ml を入れ、6M グアニジンチオシアネイトを等量加える。
2. RNAMATRIX を 5 μ l 加えた後、マイルドミキサーで 1 時間攪拌する。
3. マイクロ冷却遠心器で 8,000rpm でスピンドウン。上清を除く。
4. RNaid Kit に添付されている、Washing solution を 1ml 加えてミキサーにて沈さが無くなるまで良く攪拌する。
5. マイクロ冷却遠心器で 8,000rpm でスピンドウン。上清を除く。
6. この操作を 3 回繰り返し、沈さを残し乾燥させる。
7. 乾燥させた RNAMATRIX に 25 μ l の滅菌蒸留水を加えて良く攪拌する。
8. 65 $^{\circ}$ C 10 分間加熱する。
9. マイクロ冷却遠心器で 8,000rpm でスピンドウンし、その上清を検体とする。

3. RT-PCR 法

ここでは、VP 7 をコードする分節 9 を検出し、型別を行なう Gouvea⁴⁾らの方法を少し変更した現在我々が使用している方法を紹介する。

- 1) 抽出した dsRNA に 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) を加え 97°C で 5 分間加熱処理後、急冷する。
- 2) その検体に RT-PCR 反応液を加え 42°C に 1 時間置く。

反応液

1 M Tris-HCl (pH8.3)	1.5 μ l
1 M KCl	2.75 μ l
1 M MgCl ₂	0.15 μ l
1 % Gelatin	2.5 μ l
100mM DTT	0.25 μ l
2.5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	4.0 μ l
33.3 μ M プライマー (Beg 9 と End 9)	1.0 μ l
38.6unit AMV reverse transcriptase	0.5 μ l
DDW	31.85 μ l
Sample dsRNA	5.0 μ l
Total	50.00 μ l

- 3) その後、1 単位の Taq または Tth polymerase 0.5 μ l を加えて PCR 反応を行う。

94°C 1 分間	}	30 回
42°C 2 分間		
72°C 3 分間		
72°C 7 分間		1 回

4. PCR 法 (Secondary PCR)

RT-PCR を行なった検体 1~5 μ l に各々 1 μ M プライマー (RVG 9 と aAT 8, aBT 1, aCT 2, aDT 4, aET 3, aFT 9 の混合) と reverse transcriptase を除いた RT-PCR に使用した反応液を加え PCR を行なう。

5. アガロースゲル電気泳動

1.2% Seakem agarose を使用し、0.5g/ml ethidium bromide を含む Tris-borate buffer (0.089M Tris-0.089M boric acid-0.002M EDTA, pH 8) で 100V 約 40 分間電

電気泳動後, UV ライト上でバンドのサイズを確認して血清型を決定する。泳動液は Tris-acetate-EDTA でも良い。我々はミュージックの電気泳動装置を使用している。

表 PCRプライマー塩基配列

Primer 名	Sequence (5'-3')	Position	Sizu(bp)	serotype
Beg 9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28		
End 9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1062-1036		
RVG 9	GGTCACATCATAACAATTCT	1062-1044	1062	
aAT 8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	178-198	885	8
aBT 1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335	749	1
aCT 2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411-435	652	2
aDT 4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498	583	4
aET 3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709	374	3
aFT 9	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	757-776	306	9