

9. 節足動物媒介性ウイルスの迅速検出への RT-LAMP 法の改良

江下 優樹[○]・松原 祥恵・Lucky R. Runtuwene・野口 香緒里・川上 絵理・大塚 靖・福田 昌子・
小林 隆志 (大分大)・高崎 智彦・倉根 一郎 (感染研)・Raweewan Srisawat・
Narumon Komalamisra (Mahidol Univ.)・Bouasy Hongvanthong (CMPE, Lao PDR)・
成田 弘成 (桜花学園大)・牛島 廣治 (日本大)・Arthur E. Mongan (Sam Ratulangi Univ.)・
今田 美穂子 (慶応大)・前田 龍一郎 (帯広畜産大)・森田 公一 (長崎大)・杉本 千尋 (北海道大)

RT-LAMP 法は栄研化学(株)が開発した方法で、
鋳型 DNA あるいは RNA が試験管内で一定の温度
条件で増幅し、また増幅の有無を目視で観察するこ
とが出来る。本法を用いて、デングウイルスやチク
ングニアウイルスなどの節足動物媒介性ウイルスに
感染した媒介蚊あるいは患者血液から迅速にウイル
スゲノムを検出する方法の改良を行っている。

デングウイルス (DENV) 感染蚊からウイルス
ゲノム検出の条件を検討した。実験的に DENV に
感染したネッタイシマカ雌を 14 日間飼育後、蚊か
ら精製した総 RNA を用いて、RT-LAMP 法を実
施した。栄研科学(株)の RNA 増幅試薬キット (RT-
LAMP) の手順に従って鋳型 RNA を含む反応液
に、蛍光・目視検出試薬を加えて、63℃で 1 時間反
応させた。ウイルスゲノム増幅が認められた反応チュー
ブは、目視で黄色に染まっていた。ゲノムの増幅を
確認のために、電気泳動を行い、ラダー状の複数の
泳動バンドを確認した。

デング熱流行地のラオス国において、方法を実施
した。ラオス保健省の協力を得て、デング熱患者宅
で蚊の採集を行った。採集した蚊は、ラオス保健省
の実験室において、DENV の 4 つの血清型に特異
的な RT-LAMP プライマーおよび、蛍光・目視検
出試薬を用いた RT-LAMP 法を実施した結果、患
者宅内で採集した別々の雌蚊から DENV1 型と 2
型が検出された。翌日には、患者宅で蚊駆除がなさ
れた。

RT-LAMP 法の更なる簡便化を図るために、(1)
蚊から RNA を精製することなく目的の増幅産物を
得る方法、(2)UV ライトによる目視検査での擬陽
性の低減方法について検討したところ、(1)では、
RT-LAMP の反応時間を短くすることにより、ま
た(2)では、長波長 UV ライトを用いることにより、
目視検査の陰性と陽性をより明確に区別できた。試

験サンプルを目視判定する場合は、陽性・陰性コン
トロールを準備することが重要であることが判明し
た。一連の結果から、RNA 精製過程を省略しても
目的の増幅産物が得られること、さらに携帯型長波
長 UV ライトを使用することによって、設備の整っ
ていない流行地においても、本法が実施可能となっ
た。

改良 RT-LAMP 法を用いて、ヒト血液を精製す
ることなくウイルスゲノムを検出する方法を検討し
た。供試したチクングニアウイルスは、マダガスカ
ル島近くのレウニオン島で発生後、東南アジアの国々
に拡大して猛威をふるっている強毒性株である。本
ウイルスに感染したチクングニア熱患者の日本国内
における輸入症例は、既に報告されていて、迅速診
断の確立は意義がある。ヒト血液材料を精製するこ
となく 1 時間以内にウイルスゲノムの有無を判定可
能かどうか検討した。未感染ヒト血液とチクングニ
アウイルスを試験管内で混和して模擬の患者血液を
作製し、精製することなく、RT-LAMP を行った。
比較のために RT-PCR を同じ条件下で検討した結
果、RT-LAMP 法では反応液中のウイルス数が 10
PFU 以上で陽性検出が可能であった。それに対し
て、RT-PCR では全く増幅産物が認められなくて
陰性であった。

以上の結果から、改良 RT-LAMP 法は、RT-
PCR 法よりも検出感度が高く、短時間で結果が得
られることから、媒介蚊のみならずヒト患者の迅速
診断に有用と考えられる。また、節足動物媒介性ウ
イルスの流行地での媒介蚊動態の把握が短時間で実
施可能なことから、媒介蚊対策にも適用される方法
であろう。

キーワード：RT-LAMP, 迅速検出, ネッタイシマ
カ, デングウイルス, チクングニアウイルス