

インフルエンザウイルス核酸キット

Loopamp® H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キット

【重要な基本的注意】

1. 本製品の検査対象はインフルエンザ A(H1N1)pdm (以下 AH1pdm) 感染が疑われる有症状者とする。
2. 本製品で判定が陰性であっても、疾患としての AH1pdm 感染を否定するものではない。
3. 診断は、本製品による検査結果のみで行わず、厚生労働省の最新の症例定義を参照し、臨床症状も含めて総合的に判断すること。本製品はあくまでも AH1pdm 感染が疑われる有症状者を対象とする診断の補助を行うためのものである。
4. 本製品の臨床性能試験における Pandemic(H1N1)2009 患者検体の陽性率は次のとおりであった。

厚生労働省健康局結核感染症課長通知(健感発 0722 第 2 号)の症例定義により新型インフルエンザ(Pandemic(H1N1)2009)確定例とみなされた症例から得られた検体について、本製品による陽性率は検体種別に鼻腔拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 96.6%(85/88)、咽頭拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 100.0%(41/41)、鼻腔拭い液(精製サンプル溶液): 96.6%(85/88)、咽頭拭い液(精製サンプル溶液): 92.7%(38/41)であった。

一方、非新型インフルエンザ(非 Pandemic(H1N1)2009)患者の検体に対する本製品による陰性率は検体種別に鼻腔拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 89.3%(25/28)、咽頭拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 93.8%(15/16)、鼻腔拭い液(精製サンプル溶液): 85.7%(24/28)、咽頭拭い液(精製サンプル溶液): 100.0%(16/16)であった。

尚、リアルタイム濁度検出による判定結果と蛍光目視検出による判定結果とは全例一致した。

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用できない。AH1pdm 検出の臨床診断を目的とした検査のみに使用すること。
2. 添付文書に記載された内容に従って使用すること。本製品の性能に由来しない事由(操作方法を誤った場合等)による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、弊社は一切の責任を負わない。
3. 遺伝子検査の知識や経験を持たない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありうるため、本製品の使用にあたっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導のもとで検査を実施すること。
4. 使用する装置の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等(キットの構成)】

* RNA 増幅用乾燥試薬(dRMR)	8-strip tubes×6
1 反応あたり下記成分含有	
鎖置換型 DNA 合成酵素*1(BST DNA pol)	12 U
逆転写酵素*2(RT)	1.5 U
デオキシアデノシン 5'-3' リン酸(dATP)	17.2 µg
デオキシシチジン 5'-3' リン酸(dCTP)	16.4 µg
デオキシグアノシン 5'-3' リン酸(dGTP)	17.8 µg
デオキシチミジン 5'-3' リン酸(dTTP)	16.9 µg
硫酸マグネシウム	24.1 µg
カルセイン	0.39 µg
塩化マンガン	1.57 µg
プライマーミックス H1P(PM H1P)	0.72 mL×1
1 反応あたり下記成分含有	
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 FIP1(H1FIP-1)	603.55 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 FIP2(H1FIP-2)	519.22 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 F3-1(H1F3-1)	24.69 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 F3-2(H1F3-2)	33.60 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 BIP1(H1BIP-1)	561.97 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 BIP2(H1BIP-2)	462.98 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 B3-1(H1B3-1)	42.75 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 B3-2(H1B3-2)	20.99 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 LoopF1(H1FL-1)	141.57 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 LoopF2(H1FL-2)	116.44 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 LoopB1(H1BL-1)	134.87 ng
H1 pdm 2009 特異的プライマー*3 LoopB2(H1BL-2)	159.38 ng
陽性コントロール H1P(PC H1P)*4	0.16 mL×1
陰性コントロール(NC)	0.16 mL×1

※1: *Bacillus stearothermophilus* 由来の DNA Polymerase I から 5'→3' exonuclease 活性を除いた鎖置換型 DNA 合成酵素。

※2: Avian Myeloblastosis Virus 由来の逆転写酵素。

※3: AH1pdm(GenBank No.GQ165814)のヘマグルチニン領域内に設定したプライマーで、合成オリゴヌクレオチドを HPLC で精製したもの。

※4: 陽性コントロール H1P(PC H1P)は AH1pdm ゲノム RNA 由来の cDNA を鋳型として試験管内転写反応により得た産物を含有。

下記構成試薬には、次の略名とロット番号、製造販売業者の略号(EKN)が記載されている。

構成試薬	チューブ記載事項	キャップ記載略号
プライマーミックス H1P	PM H1P ロット番号, EKN	PM H1P
陽性コントロール H1P	PC H1P ロット番号, EKN	PC H1P
陰性コントロール	NC ロット番号, EKN	NC

【使用目的】

鼻腔拭い液又は咽頭拭い液から抽出されたインフルエンザ A(H1N1)pdm RNA の検出(インフルエンザ A(H1N1)pdm 感染が疑われる有症状者を対象とする診断の補助)

【測定原理】

本製品は、弊社が開発した核酸増幅法である LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法を測定原理としている。LAMP 法は、①遺伝子増幅反応が等温で進行する^{1),2)}、②6 領域を認識する 4 種類のプライマーを使用するため特異性が高い、③増幅効率が高く、短時間に増幅可能である、④増幅産物量が多く、簡易検出に適している^{3),4)}等の特徴を有した方法である。

本製品のプライマーは、AH1pdm ゲノム RNA のヘマグルチニン領域内に設計している。この領域は、AH1pdm の感染が初めて発生した 2009 年 4 月に以降に分離されているウイルス株約 800 株の塩基配列を選択してアライメント解析を行った結果、塩基配列が比較的保存されていることが確認された領域である。

はじめに、別売の Loopamp インフルエンザウイルス抽出試薬を用いてヒト由来検体中の RNA を抽出し、サンプル溶液を調製する。このサンプル溶液と H1 pdm 2009 特異的プライマーを含むプライマーミックス H1P(PM H1P)を RNA 増幅用乾燥試薬(dRMR)の反応チューブ内で混合する。反応チューブの蓋(リブの内側)には、鎖置換型 DNA 合成酵素、逆転写酵素、デオキシヌクレオチド 3 リン酸、カルセインが乾燥・保持されているので、それらを前述の混合溶液(サンプル溶液、プライマーミックス H1P (PM H1P))で溶解し 62.5℃でインキュベートすると、サンプル溶液中の AH1pdm RNA を基に逆転写酵素により cDNA が合成される。この cDNA から鎖置換型 DNA 合成酵素により LAMP 反応が進行する。

核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム(白色沈殿物質)の濁度を測定して行う³⁾。また、紫外線照射装置を用いた目視判定(以下、蛍光目視判定又は検出と呼ぶ。)も可能である。試薬中に含まれているカルセインは、反応前にはマンガンイオンと結合して消光しているが、LAMP 反応が進行すると、生成するピロリン酸イオンにマンガンイオンを奪われるため蛍光を発するようになる⁴⁾。

尚、本製品は定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではない。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質・採取法

- 1) 対象検体
鼻腔拭い液又は咽頭拭い液
- 2) 検体の採取方法

(1) 鼻腔拭い液の場合には両方の鼻孔内を、咽頭拭い液の場合には両側扁桃及び咽頭後部を弊社推奨のスワブで拭い、輸送容器に入れて検査室に持ち込む。

(2) 採取した検体は直ちに使用すること。

(3) 検体採取の際に発生するエアロゾルによって、鋳型 RNA が検査環境中に飛散しコンタミネーションが発生する可能性がある。そのため、検体採取は本製品を使用する部屋とは別の部屋で行うこと。

2. 妨害物質・妨害薬剤・交差反応性

遊離型ビリルビン(18.2 mg/dL)、抱合型ビリルビン(20.1 mg/dL)、乳白(ホルマジン濁度 1,460 度)、溶血ヘモグロビン(4.95 mg/dL)及び唾液(100 倍希釈)による測定への影響は、社内で検討した結果認められなかった。

薬剤の影響については、アセトアミノフェン(1 mg/mL)、ロキソプロフェンナトリウム(1 mg/mL)、クラリスロマイシン(0.1 mg/mL)、セフト

タキシムナトリウム(1 mg/mL), セフトジジム(1 mg/mL), レボフロキサシン(0.01 mg/mL), リン酸オセルタミビル(タミフル)(1 mg/mL), 塩酸アマンタジン(1 mg/mL), ポビドンヨード(0.35 mg/mL), アズレンスルホン酸ナトリウム(2 µg/mL), 塩化セチルピリジニウム(5 µg/mL)及びグリチルリチン酸二カリウム(5 µg/mL)による影響は、社内で検討した結果認められなかった。

AH1pdm 以外のインフルエンザウイルス、呼吸器疾患原因菌及びウイルスについて測定したところ、結果は次の表のとおりすべて陰性であり、交差反応は認められなかった。

AH1pdm 以外のインフルエンザウイルス			呼吸器疾患原因菌及びウイルス		
H1(AH1pdm 以外)	3 株	陰性	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 株	陰性
H2	1 株	陰性	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 株	陰性
H3	5 株	陰性	<i>Haemophilus influenzae</i>	1 株	陰性
H4	1 株	陰性	<i>Moraxella catarrhalis</i>	1 株	陰性
H5	6 株	陰性	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 株	陰性
H6	1 株	陰性	<i>Escherichia coli</i>	1 株	陰性
H7	3 株	陰性	<i>Legionella pneumophila</i>	1 株	陰性
H8	1 株	陰性	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 株	陰性
H9	1 株	陰性	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2 株	陰性
H10	1 株	陰性	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1 株	陰性
H11	1 株	陰性	Respiratory syncytial virus 1	1 株	陰性
H12	1 株	陰性	Adenovirus	1 株	陰性
H13	1 株	陰性	Rhinovirus	1 株	陰性
H14	1 株	陰性	Respiratory syncytial virus	1 株	陰性
H15	1 株	陰性	Parainfluenza virus 3	1 株	陰性
B 型	3 株	陰性	Human metapneumovirus	1 株	陰性
			Human coronavirus	1 株	陰性

3. AH1pdm 株反応性

以下の AH1pdm 株と反応を示した。

A/Narita/1/2009, A/Aichi/198/2009, A/Saitama/85/2009, A/Shiga/44/2009, A/Kagoshima/56/2009, A/Kobe/1/2009, A/Shiga/2/2009, A/Kanagawa/140/2009, A/Hiroshima/310/2009 (国立感染症研究所, 愛知県衛生研究所, 埼玉県衛生研究所, 滋賀県衛生科学センター, 鹿児島県環境保健センター, 神戸市環境保健研究所, 神奈川県衛生研究所, 広島県立総合技術研究所保健環境センター提供のウイルス株を使用した。)

【用法・用量(操作方法)】

1. 必要な器具・器材・試薬等

- Loopamp インフルエンザウイルス用抽出試薬 (栄研化学株式会社別売品)
- ピペット(20 µL 容量可変又は 0.5~10 µL, 10~100 µL)及びフィルター付きチップ
- 冷却用アルミ製ラック及び氷(クラッシュアイス)又はそれに相当するもの
- 微量簡易遠心機
- 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
- リアルタイム濁度測定装置(LAMP 法専用、波長: 600~700 nm、増幅温度: 62.5°C)
尚、蛍光目視検出には、リアルタイム濁度測定装置の代わりに次のものが必要となる。
 - インキュベーター(温度精度が±0.5°C以内: ホットボンネット付)
 - ヒートブロック
 - 紫外線照射装置(波長 240~260 nm, 350~370 nm)
 - 広幅の眼鏡又は防護面

2. サンプル溶液の調製 (RNA 抽出溶液の調製)

患者の鼻腔又は咽頭を拭ったスワブで、別売の Loopamp インフルエンザウイルス用抽出試薬を 10 回程度撹拌し、サンプル溶液とする。ウイルス輸送培地に採取された検体を測定する場合は、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて抽出した RNA をサンプル溶液とする(QIAamp Viral RNA Mini Kit の使用法に従うこと)。

3. 試薬の調製方法

- RNA 増幅用乾燥試薬 (dRMR)
 - 冷蔵庫(2~8°C)で保存していた RNA 増幅用乾燥試薬(dRMR)をアルミバックに入れたまま室内温度で 5 分間放置する。
 - 必要本数(検体数+2)の RNA 増幅用乾燥試薬(dRMR)を取り出し、氷上で保存する。残りの試薬は直ちに元のアルミバックで密封して冷蔵庫(2~8°C)に戻す。
- プライマーミックス H1P (PM H1P) スピンダウンしてから使用する。
- 陽性コントロール H1P (PC H1P) スピンダウンしてから使用する。1 日 1 回は測定すること。
- 陰性コントロール(NC) スピンダウンしてから使用する。毎回測定すること。

4. 測定 (操作) 法

1) 試薬及びサンプル溶液の混合 (氷上で行うこと。)

- ピペットを用いて、15 µL のプライマーミックス H1P(PM H1P)を反応チューブ(RNA 増幅用乾燥試薬(dRMR))に分注する。
- ピペットを用いて、サンプル溶液を 10 µL 添加して全量を 25 µL とした後、反応チューブの蓋を閉める。
- コントロール反応用に、サンプル溶液の代わりに陰性コントロール(NC)10 µL を添加して蓋を閉め、陰性コントロールとする。
- 陽性コントロール H1P (PC H1P)10 µL を添加して蓋を閉め、陽性コントロールとする。
- スピンドウンし、反応チューブのライン(2 本あるうちの下のライン)を目安に、すべての溶液が添加されていることを確認する。
- 反応チューブを転倒して溶液を蓋に移し、転倒した状態のまま 2 分間放置する。
- 反応チューブを 5 回転倒混和する。この際、蓋の増幅試薬が十分溶解されたことを確認すること。
- 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンする。

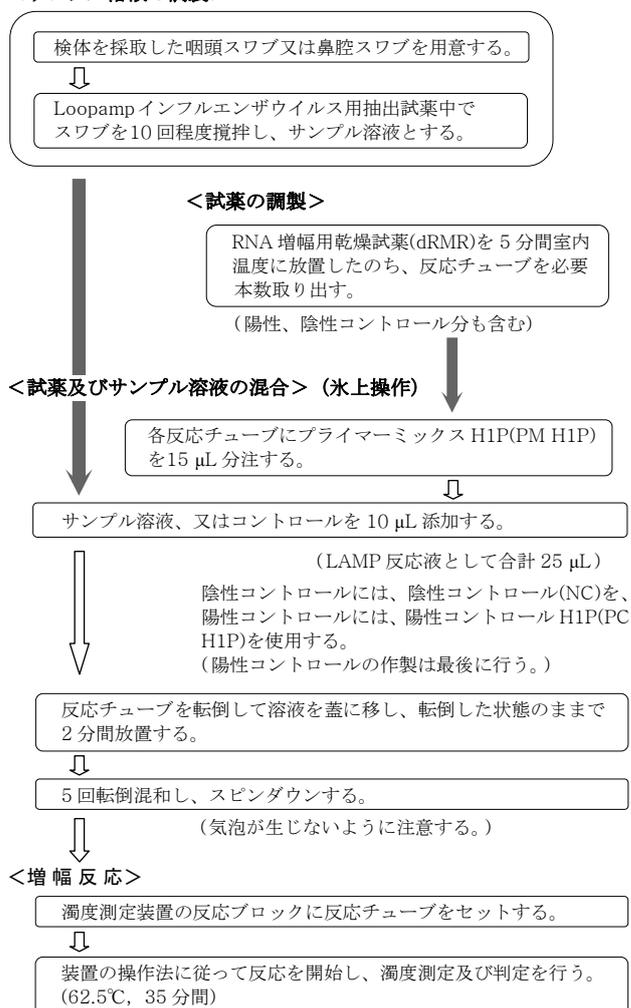
2) 増幅反応

A. リアルタイム濁度検出を行う場合 (標準法)

- リアルタイム濁度測定装置のプログラムを本製品用にあわせて設定する。
- 表示温度が 62.5°C に達していることを確認する。(リアルタイム濁度測定装置は 20 分間ウォームアップしてから使用すること。)
- 反応チューブをセットし測定を開始する。
- 装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認する。陽性コントロール H1P(PC H1P)で濁度が上昇し、陰性コントロール(NC)で濁度が上昇していなければ、増幅反応は正常に進行している。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製から再検査を実施する必要がある。(図 1)
- 酵素失活処理(リアルタイム濁度測定装置では自動処理される。)が終了していることを確認した後、装置から反応チューブを取り出し、そのまま蓋を開けずに廃棄する。

リアルタイム濁度検出 (標準法) 時の操作手順

<サンプル溶液の調製>



酵素失活処理(80℃, 5分間又は95℃, 2分間)が終了したことを確認後、反応チューブを破損しないように注意しながら装置から取り出し、蓋を開けずに廃棄する。

増幅曲線パターン

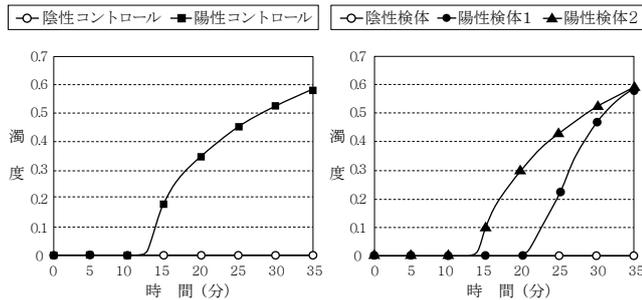


図1. コントロールの増幅曲線パターン 図2. 検体の増幅曲線パターン
(使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C)

B. 蛍光目視検出を行う場合

- インキュベーター(温度精度が±0.5℃以内: ホットボンネット付)を62.5℃に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認する。
- 反応チューブをセットし、増幅反応(62.5℃, 35分間)を行う。
- 35分後にヒートブロックを用いて酵素失活処理(80℃, 5分間又は95℃, 2分間)を行い、反応を停止する。

<測定にあたっての注意>

- LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、増幅産物等の DNA がごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となる恐れがある。このようなコンタミネーションを回避するために、検体採取は本製品を使用する部屋とは別の部屋で実施すること。必要に応じて、クリーンベンチの使用又は手袋やアイソレーションガウンの着用等でコンタミネーションを防ぐ措置を取ることが望ましい。
- RNA 分子は非常に不安定なため、取扱いには注意が必要である。特に RNA 分解酵素(RNase)により容易に分解されてしまう。RNase は材料である検体、検査器具、試薬、更には検査従事者自身の唾液や汗からも混入する恐れがある上、熱に強くオートクレーブ処理でも完全に失活させることができない。また、DNase も増幅反応に悪影響を及ぼすことがわかっている。このため、極力 RNase 及び DNase の混入を防ぐことが重要であり、そのために以下の注意が必要となる。
 - RNA 検査を行う検査台や検査器具を他と区別する。
 - 検査従事者は、必ず手袋、マスクを着用し、検査従事者自身の唾液や汗からの RNase、DNase の混入を防ぐ。
- 血液を多く含む検体は、測定結果に影響を及ぼす場合があるため使用を避ける。
- サンプル溶液は原則として直ちに使用すること。やむを得ず保存する場合は、冷蔵庫(2~8℃)で保存し、72時間以内に使用すること。
- サンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度測定の支障となり誤判定の原因となるので、気泡が生じないように注意すること。気泡が残っている場合には、スピンドウンして気泡を取り除くこと。
- RNA 増幅用乾燥試薬(dRMR)の溶解は確実にを行うこと。溶解が不十分な場合、感度が低下する等十分な性能が得られないことがある。
- 陽性コントロール H1P(PC H1P)は高コピー数である。他のサンプルへのコンタミネーションを避けるため、陽性コントロール用反応チューブ以外のすべての反応チューブの蓋を閉め、最後に陽性コントロール H1P (PC H1P)を添加すること。
- 陽性コントロール H1P(PC H1P)を扱う際は、キャップを開ける前に必ずチューブをスピンドウンし、キャップを開けている時間も必要最小限となるようにすること。
- リアルタイム濁度測定装置では、酵素失活処理は自動的に行われる。
- 反応後のチューブの蓋は決して開けないこと。特に反応チューブを装置から取り出すときにチューブの蓋が開かないよう慎重に取り出すこと。また、増幅産物の取扱い(電気泳動等)は避けること。
- 別売の Loopamp インフルエンザウイルス抽出試薬以外で採取された検体を用いて蛍光目視判定を行う場合、RNA を抽出・精製する際の RNA 溶解液やウイルス輸送培地に金属キレートが含まれていないことを確認してから使用すること。EDTA 等の金属キレートにより、増幅の有無にかかわらず蛍光を発する場合がある。
- 蛍光目視判定は、酵素失活処理(80℃, 5分間又は95℃, 2分間)後に行うこと。酵素失活処理を怠ると誤判定する可能性がある。
- 紫外線照射装置を用いる際は、点灯中に紫外線ランプを直接見ないこと。必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけること。

【測定結果の判定法】

A. リアルタイム濁度検出を行う場合(標準法)

陽性コントロール H1P(PC H1P)で濁度が上昇し、陰性コントロール(NC)で濁度が上昇していないことを確認した上で、下記に従い判定する。(図1, 2)
陽性: 濁度の上昇が認められた場合
陰性: 濁度の上昇が認められなかった場合

B. 蛍光目視検出を行う場合

判定は、紫外線照射装置を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して、反応チューブ側面より目を眼鏡等で保護した状態で観察して行う。陽性コントロール H1P(PC H1P)が緑色の蛍光を発生し、陰性コントロール(NC)が蛍光を発生していないことを確認した上で、下記に従い判定する。記録が必要な場合は、判定時にデジタルカメラ等を用いて画像として保存する。
陽性: 緑色の蛍光を発生した場合
陰性: 蛍光を発生しなかった場合

<判定上の注意>

- コントロールの判定が異常な場合は試薬調製から再検査を実施する。
- 本製品の最小検出感度は 80 コピー/テストである。判定の結果が陰性であっても、症状が持続し AH1pdm 感染が否定できない状況では再検査を実施する必要がある。
- 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果とあわせて厚生労働省の最新の症例定義を参照し、総合的に判断すること。
- 比較的変異の少ない領域を選んでプライマーが設計されているが、AH1pdm が今後この領域内で更に変異し、本製品での検出感度を低下させる可能性が考えられるため、判定が陰性であっても、疾患としての AH1pdm 感染を否定するものではない。
- 本製品は定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではない。リアルタイム濁度測定装置における濁度の立ち上がり時間及び、蛍光目視検出における蛍光の強さでコピー数を特定することはできない。これらと検体のコピー数の間に相関はない。
- 経鼻弱毒生インフルエンザワクチン接種後一定期間は、ワクチン由来のインフルエンザウイルスで本製品が陽性反応を示す可能性がある。

【臨床的意義】

2009年4月、メキシコにおいて報告された Pandemic(H1N1)2009 はヒトの移動に伴い急速に世界各国に拡がり、180カ国以上で感染が確認されている。本邦においても、若年層を中心に感染が拡大したが、従来の季節性インフルエンザと異なり、夏場になっても流行は収まらず、累積の推計患者数は 2000 万人を超えた(2010年3月現在)。感染患者の大半はインフルエンザ様症状のみで合併症もなく治癒しているが、主に 65 歳以下の年齢層で重症化する例が認められ、重症化の進行速度が速いと言われている。(財)ライフ・エクステンション研究所付属永寿総合病院、座間小児科診療所、及び藤田保健衛生大学において行った検討から、本製品による判定結果を厚生労働省健康局結核感染症課長通知(健感発 0722 第 2 号、平成 21 年 7 月 22 日)による新型インフルエンザ(A/H1N1)の症例定義に準じて、ウイルス分離培養法で陽性、あるいはリアルタイム RT-PCR 法で陽性(AH1pdm)と判定された症例を新型インフルエンザ(Pandemic(H1N1)2009)確定例とし、ウイルス分離培養法、リアルタイム RT-PCR 法の判定結果が共に陰性の場合には非新型インフルエンザ(非 Pandemic(H1N1)2009)として集計した(次表)。尚、リアルタイム濁度検出による判定結果と蛍光目視検出による判定結果とは全例一致した。そのため、試験成績については両者を区別せずに記載する。

新型インフルエンザ確定例とみなされた症例から得られた検体について、本製品による陽性率は検体種別に鼻腔拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 96.6%(85/88)、咽頭拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 100.0%(41/41)、鼻腔拭い液(精製サンプル溶液): 96.6%(85/88)、咽頭拭い液(精製サンプル溶液): 92.7%(38/41)であった。

一方、非新型インフルエンザ患者の検体に対する本製品による陰性率は検体種別に鼻腔拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 89.3%(25/28)、咽頭拭い液(簡易抽出サンプル溶液): 93.8%(15/16)、鼻腔拭い液(精製サンプル溶液): 85.7%(24/28)、咽頭拭い液(精製サンプル溶液): 100.0%(16/16)であった。

臨床性能試験の総集計

	検体の種類	n	本製品			
			簡易抽出サンプル溶液 ^{*7}		精製サンプル溶液 ^{*8}	
			陽性	陰性	陽性	陰性
新型インフルエンザ ^{*5} (Pandemic(H1N1)2009)	鼻腔拭い液	88	85	3	85	3
	咽頭拭い液	41	41	0	38	3
合計		129	126	3	123	6
非新型インフルエンザ ^{*6} (非Pandemic(H1N1)2009)	鼻腔拭い液	28	3	25	4	24
	咽頭拭い液	16	1	15	0	16
合計		44	4	40	4	40

- ※5：厚生労働省健康局結核感染症課長通知（健感発 0722 第 2 号）の症例定義により新型インフルエンザ（Pandemic (H1N1) 2009）確定例とみなされた症例
（ウイルス分離培養法：陽性、又はリアルタイム RT-PCR 法：AH1pdm）
- ※6：新型インフルエンザウイルス（AH1pdm）感染が疑われ、最終的にウイルス分離培養法及びリアルタイム RT-PCR 法の結果が陰性で、感染が否定された症例
（ウイルス分離培養法：陰性、且つリアルタイム RT-PCR 法：陰性、又は判定不能）
- ※7：採取した検体を別売の Loopamp インフルエンザウイルス用抽出試薬で処理したサンプル溶液
- ※8：ウイルス輸送培地に採取された検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit により抽出した RNA サンプル溶液

また、ウイルス分離陽性 84 検体について、検体採取日別の検出率をみると、迅速抗原検査では発症当日の検出率が鼻腔拭い液で 40.0 (2/5) ~ 86.7% (13/15)、咽頭拭い液で 71.4% (5/7) と低かったが、本製品は発症当日の検体から高い検出率であった。

ウイルス分離陽性検体に対する採取日別の検出率（鼻腔拭い液）

発症日～	0 日後	1 日後	2 日後	3~7 日後	
迅速抗原検査	A キット	13/15 86.7%	39/41 95.1%	4/4 100.0%	0/0
	B キット	2/5 40.0%	11/12 91.7%	4/4 100.0%	3/3 100%
本製品 （精製サンプル溶液） （nasal swab 2）		19/20 95.0%	53/53 100.0%	7/8 87.5%	3/3 100%
	本製品 （簡易抽出サンプル溶液） （nasal swab 3）	19/20 95.0%	52/53 98.1%	8/8 100.0%	3/3 100%

nasal swab 2：ウイルス輸送培地鼻腔拭い液検体

nasal swab 3：LAMP 用インフルエンザウイルス抽出液鼻腔拭い液検体

ウイルス分離陽性検体に対する採取日別の検出率（咽頭拭い液）

発症日～	0 日後	1 日後	2 日後	3~7 日後
迅速抗原検査 （A キット）	5/7 71.4%	26/29 89.7%	2/2 100.0%	1/2 50.0%
本製品 （精製サンプル溶液） （throat swab 2）	7/7 100.0%	27/29 93.1%	2/2 100.0%	2/2 100.0%
	本製品 （簡易抽出サンプル溶液） （throat swab 3）	7/7 100.0%	29/29 100.0%	2/2 100.0%

throat swab 2：ウイルス輸送培地咽頭拭い液検体

throat swab 3：LAMP 用インフルエンザウイルス抽出液咽頭拭い液検体

以上の臨床成績より、本製品は、ウイルス量が少なく、迅速抗原検査による A 型インフルエンザウイルス検出が難しい発症初期でも、迅速、高感度に AH1pdm 核酸検出が可能であるため、周囲への感染拡大や感染者の重症化を招くリスクを抑えることに貢献できる。また、診療当日に検査結果をリターンできることにより、適切な服薬指導等に貢献できる。

【性能】

1. 感度・正確性

陰性管理検体（濃度 0 コピー/テスト）、陽性管理検体 1（濃度 250 コピー/テスト）及び陽性管理検体 2（濃度 10⁴ コピー/テスト）を測定したとき、陰性管理検体は陰性に、陽性管理検体 1 及び 2 は陽性に判定される。

2. 同時再現性

管理検体を 5 回同時に測定したとき、陰性管理検体はすべて陰性に、陽性管理検体はすべて陽性に判定される。

3. 最小検出感度

80 コピー/テスト

4. 較正用基準物質に関する情報

本製品の性能は、AH1pdm のゲノム RNA から得られた cDNA を鋳型として、試験管内で作製した転写 RNA により確認している。

【使用上又は取扱い上の注意】

* 1. 取扱い上（危険防止）の注意

- 検体は感染の危険があるものとして注意して取り扱い、必要なバイオハザード対策⁵⁾を実施すること。
- プライマーミックス H1P(PM H1P)、陽性コントロール H1P(PC H1P) 及び陰性コントロール(NC)には、保存剤として微量のアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムには毒性があるので、目や口に入らないよう、また皮膚に付着させないよう注意すること。
- 試薬が誤って目や口、皮膚に付着したときは、直ちに大量の水で十分に洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けること。
- 蛍光目視判定時に紫外線照射装置を使用する場合、ランプより放射される紫外線（殺菌線）は有害で、点灯中のランプを短時間見ただけでも後で目が痛くなり、結膜炎に似た症状を起こす場合があるので、紫外線を直接目に入れることは避けること。また、点灯中のランプを見る必要があるときは、必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけて判定すること。

2. 使用上の注意

- 試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。凍結保存は品質維持のため避けること。
- 試薬の劣化を防止するために、使用時は必要な試薬だけをキットケースから取り出して使用すること。
- 検査環境へのコンタミネーションを避けるため、陽性コントロール H1P(PC H1P)は本添付文書に記載の操作方法以外での使用（希釈や検体等への添加等）は、絶対に行わないこと。
- 陽性コントロール H1P(PC H1P)及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して保管すること。
- 使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- 他のロットと組み合わせて使用しないこと。また、試薬の注ぎ足しは行わないこと。

（RNA 増幅用乾燥試薬 (dRMR) の取扱い）

- RNA 増幅用乾燥試薬 (dRMR) は、反応チューブの蓋（リブの内側）に乾燥・保持されている。蓋に過度の衝撃を加えないように注意すること。また、蓋の内側を直接手で触らないように注意すること。
- RNA 増幅用乾燥試薬 (dRMR) は熱及び光により劣化するので、必要本数（検体数+2）取り出した後、直ちに元のアルミパックに戻し、密封して冷蔵庫（2~8℃）に保存すること。
- RNA 増幅用乾燥試薬 (dRMR) は、破損しやすいため、取扱いには注意すること。使用前にキズ・ヒビ等がないことを目視で確認すること。反応チューブにキズ・ヒビがあると正しく測定できないばかりか、チューブの破損により装置を汚染する可能性がある。
- 冷蔵庫（2~8℃）から取り出した試薬は、アルミパックを開封する前に室内温度に戻すこと。
- 紫外線照射による変色等で誤った結果をもたらす場合があるので、紫外線照射による滅菌はしないこと。

3. 廃棄上の注意

- 反応後のチューブは蓋を開けずに、焼却処理又は密閉できるビニールの袋を二重に施し医療用廃棄物として処理する。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないこと。
- 反応チューブ及び構成試薬チューブはポリプロピレン (PP)、チューブ用トレイは PET、アルミパックはアルミ、キットケースは紙を主な材質としている。
- 使用後の試薬や容器及び器具類は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：2~8℃

有効期間：6 ヶ月間

【包装単位】

製品名	包装単位	製品コード
Loopamp H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キット	48 テスト分	LMP462

** 【主要文献】

- Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research. 28(12), e63, 2000.
- Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47(9), 1742-1743, 2001.
- Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289(1), 150-154, 2001.
- Tomita N., et al.: Nat Protoc. 3(5), 877-882, 2008.
- 日本細菌学会：病原体等安全取扱・管理指針(改訂版), 2023

Loopamp は栄研化学株式会社の登録商標です。

【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口
フリーダイヤル ☎0120-308-421

【製造販売業者の名称及び住所】

栄研化学株式会社
〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地