

日本医療検査科学会第53回大会
第4回微生物検査・感染症技術セミナー

新型コロナウイルス検出試薬キット実技編

Loopamp®

新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2)検出試薬キット
(体外診断用医薬品)

栄研化学株式会社
マーケティング推進室
マーケティング3部1課
金子拓也
渡辺恵子



栄研化学株式会社

バイオハザード対策と必要設備

操作上の注意

- 1) 検体の取り扱いは、バイオセーフティーレベル(BSL)2+でおこなう。
BSL2実験施設内の安全キャビネット内で取り扱い、操作中はディスポーザブルのガウン、手袋(2重)マスク(サージカルマスクでよい)、キャップ等の personal protective equipment (PPE)を着用する。
チューブの蓋を開ける時には遠心し、チューブオープナーなどを用い、エアロゾルの発生を極力防止する。
- 2) 実験室内遺伝子コンタミネーション防止とRNase の混入防止に細心の注意を払う。
コンタミネーション防止には、試薬調製場所とPCR 産物などサンプルを扱う場所を物理的に分けることが望ましい。できない場合は、それぞれの操作を別々のキャビネット内で行う。

「国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1(令和2年3月19日)」より引用
※上記マニュアルにつきましては随時**最新版**をご確認ください。



SARSコロナウイルス核酸キット

Loopamp® 新型コロナウイルス2019(SARS-CoV-2) 検出試薬キット

【重要な基本的注意】

1. 本製品で判定が陰性であっても、SARS-CoV-2感染を否定するものではない。
2. 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、臨床症状も含め総合的に判断する事。
3. 検体採取および取り扱いの際には、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を実施する事。最新の国立感染症研究所病原体等安全管理規定を参照する事。
4. 検査に用いる検体については、国立感染症研究所の「2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」を参照する事

使用する試薬

製品名	製品内容	包装単位	貯蔵方法	有効期間	製品コード
Loopamp® 新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2)検出試薬キット	RNA増幅用乾燥試薬 (dRMR) プライマーミックス2019-nCoV (PM nCV19) 陽性コントロール2019-nCoV (PC nCV19) 陰性コントロール (NC)	48テスト分	2～8℃	12ヵ月間	LMP403
Loopamp ウイルスRNA抽出試薬*1	抽出試薬 4 mL × 48	48テスト分	室温保存	18ヵ月間	LMP803

*1 Loopamp ウイルスRNA抽出試薬を使用してヒト由来検体中のウイルスRNAを抽出し、サンプル溶液とします(本製品は一般品です)

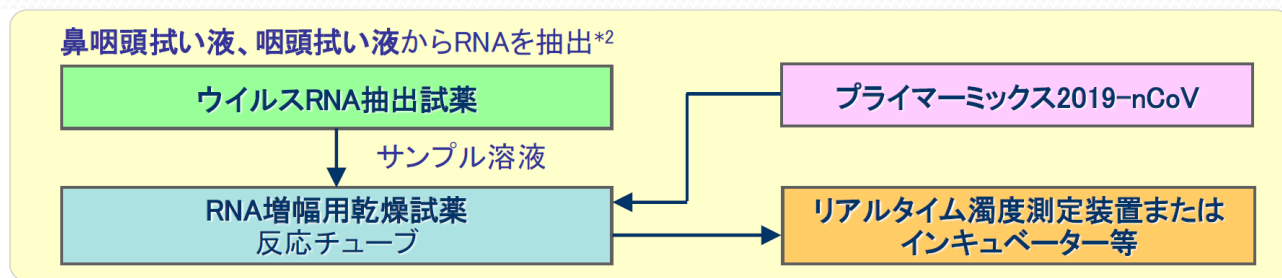
8186 CMK

2020年11月作成



栄研化学株式会社

操作の概要



*2 喀痰検体及び輸送培地等に懸濁した鼻咽頭拭い液の場合は、Loopamp ウイルスRNA抽出試薬をご使用いただけません
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社)、又は同等の性能を有する核酸抽出用試薬をご使用ください

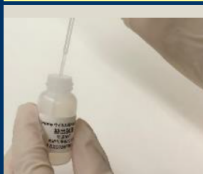
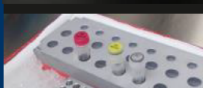
使用する器具類

器具名称	用途
① 滅菌綿棒	検体を採取する場合に使用します 推奨品 鼻咽頭拭い液：FLOQスワブ534C(チューブ入り) [製品コード:E-FQ02] (一般医療機器) 咽頭拭い液：FLOQスワブ519C(チューブ入り) [製品コード:E-FQ01]
② マイクロピペット およびフィルター付きチップ	試薬、サンプル溶液を添加します それぞれ専用のものを用意します
③ 冷却用アルミ製ラックおよびアイスボックス (1.5 mLチューブ用)	プライマーミックス、コントロールを冷却下で操作する際に使用します
④ 冷却用アルミ製ラックおよびアイスボックス (0.2 mLチューブ用)	反応チューブを冷却下で操作する際に使用します
⑤ 微量簡易遠心機 (1.5 mLチューブ用)	プライマーミックス、コントロールをスピンドウンします
⑥ 8連マイクロチューブ用簡易遠心機 (0.2 mLチューブ用)	反応チューブをスピンドウンします 弊社取扱製品 Loopamp 攪拌機能付き遠心機 MS-16 [製品コード:M-L600]

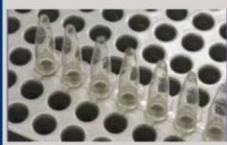


SARSコロナウイルス核酸キット

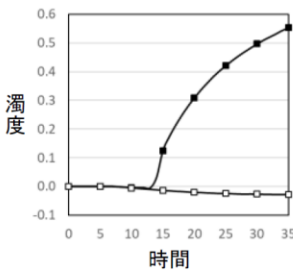
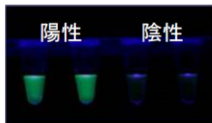
Loopamp® 新型コロナウイルス2019(SARS-CoV-2)検出試薬キット 操作手順

手順	作業	エリア	操作手順		備考
①	清掃	安全キャビネット クリーンベンチ 作業台	操作エリア(安全キャビネット、クリーンベンチ、作業台)や使用器具類を次亜塩素酸ナトリウム水溶液(0.5 %に調製)で清掃する		
②	装置準備	作業台	リアルタイム濁度測定装置:パラメータを設定「2019-nCoV」(「FluA」でも可)		(★)も準備しておく
③	核酸抽出	安全キャビネット	採取した検体(鼻咽頭拭い液・咽頭拭い液)を検査室へ搬送する (検体採取については、厚生労働省から公開されている資料をご参照ください)		
				【スワブ検体の場合】 検体を採取したスワブを「Loopamp ウイルスRNA抽出試薬」に10回程度懸濁し、サンプル溶液とする ⚠ サンプル溶液は安全キャビネットから出さない ⚠ 必要なバイオハザード対策をとること	手袋を二重に装着 サンプル溶液は原則として直ちに使用する
		⚠ 核酸抽出作業は、安全キャビネット内で行うこと ⚠ 抽出操作後は検体を片付け、キャビネット内を次亜塩素酸ナトリウム水溶液で清掃すること ⚠ 操作後は安全キャビネット内で外側の手袋を外すこと			
④	試薬準備	クリーンベンチ (推奨) or 作業台		(★)RNA増幅用乾燥試薬を冷蔵庫より取り出し、アルミパックに入れたまま5分間放置し、室内温度にもどす ⚠ 冷えた状態で反応チューブを取り出すと、乾燥試薬が吸湿し劣化の可能性がある	ここから氷上操作
				(★)この間にプライマーミックス2019-nCoV、陽性コントロール、陰性コントロールを予め氷上で保冷した1.5 mL用アルミ製ラックに置く ⚠ プライマーミックス、各コントロールは使用前にスピンドウンし(1.5 mL用簡易遠心機)、氷上に保存	
			 触らない	反応チューブ(RNA増幅用乾燥試薬)をアルミパックから必要本数分(検体数+2本)取り出し、予め氷上で保冷した0.2 mL用アルミ製ラックに置く ⚠ 反応チューブを取り出す際には、蓋内部を触らないように注意する ⚠ 使用後のアルミパックは密閉して直ちに冷蔵庫に戻す	



手順	作業	エリア	操作手順		備考
⑤	試薬分注・ サンプル 添加	クリーンベンチ (推奨) or 作業台		① プライマーミックス2019-nCoVを15 μ Lずつ、全ての反応チューブに分注する	分注後は、反応チューブにごみ等が落ちないように、ラックに蓋をしておく
		安全キャビネット		② サンプル溶液を10 μ L添加し、蓋を閉める ③ 陰性コントロールを10 μ L添加し蓋を閉める ④ 陽性コントロールを10 μ L添加し蓋を閉める ⚠ 陽性コントロールは必ずスピンドウン後に使用する (1.5 mL用簡易遠心機)	手袋を二重に装着 陽性コントロールは必ず最後に添加
		⚠ サンプル溶液と各コントロールの添加は安全キャビネット内で行い、反応チューブの蓋はしっかり閉めること ⚠ 操作後は安全キャビネット内で外側の手袋を外すこと			
		作業台		④ 反応チューブを転倒させ、反応液を蓋に移動し、冷却用アルミ製ラック上で、2分間倒立して静置 ⚠ 蓋に反応液を移動させた後は、指定時間 (2分間)を守る	ここまで氷上操作
				⑤ 反応チューブを5回転倒混和する (チューブの中で反応液を5往復させる) ⑥ 反応チューブのスピンドウンを行う (0.2 mL用簡易遠心機) ・反応液が微量なため、手首を使って軽く振ることで液を移動させる ・蓋の検出試薬が十分溶解されたことを確認する ・気泡がある場合は、指で弾いて取り除く	④～⑥にMS-16を使用する場合 室温操作となるため、反応チューブの装置へのセットまでを 5分以内 に完了させる



手順	作業	エリア	操作手順		備考
⑥	増幅	作業台	 反応チューブをリアルタイム濁度測定装置(LAMP法専用、医療機器)にセット (蛍光目視検出の場合は、インキュベーターにセット) * * 温度精度が±0.5℃以内、ホットボンネット付 ⚠ 反応チューブを装置にセットしたら速やかに測定を開始する 62.5℃ 35分間の反応後、検出結果を判定		* 蛍光目視検出の場合は、反応終了後、必ず80℃ 5分間又は95℃ 2分間の酵素失活処理を行なう
⑦	検出	作業台	 リアルタイム濁度測定装置では濁度上昇の有無を確認して判定を行う ⚠ 判定カードは結果判定の補助とする ■ 陽性コントロール □ 陰性コントロール	 陽性 陰性 蛍光目視検出では蛍光の有無を確認し判定を行なう	* 蛍光目視検出にはブラックライト等の紫外線照射装置(波長 240～260 nm、350～370 nm)を使用する
⑧	廃棄	作業台	反応後のチューブは、ジップ付のビニール袋で二重に包み、施設の基準に従って廃棄する ⚠ オートクレーブ処理は行わないこと ⚠ ⚠ 反応後のチューブのフタを絶対に開けないこと ⚠		
⑨	清掃	安全キャビネット クリーンベンチ 作業台	操作エリア(安全キャビネット、クリーンベンチ、作業台)や使用器具類を次亜塩素酸ナトリウム水溶液(0.5 %に調製)で清掃する 使用後の安全キャビネット、クリーンベンチは紫外線照射する		

<補足>

- ・ 使用する器具類は各エリア専用とすること
- ・ サンプル溶液は原則として直ちに使用すること(サンプル溶液を保存する場合は、4℃で72時間以内であれば使用可能)
- ・ サンプル溶液及びコントロールの添加時は、陽性コントロールを必ず最後に添加すること
(可能であれば陽性コントロール添加時に別のピペットを使用する)
- ・ 不明な判定(増幅曲線)が認められた場合は、結果をUSBに出力すること(リアルタイム濁度測定装置の簡易操作マニュアル資料4(9/9ページ)を参照)



測定の流れ(QIAGEN抽出の場合)

抽出操作

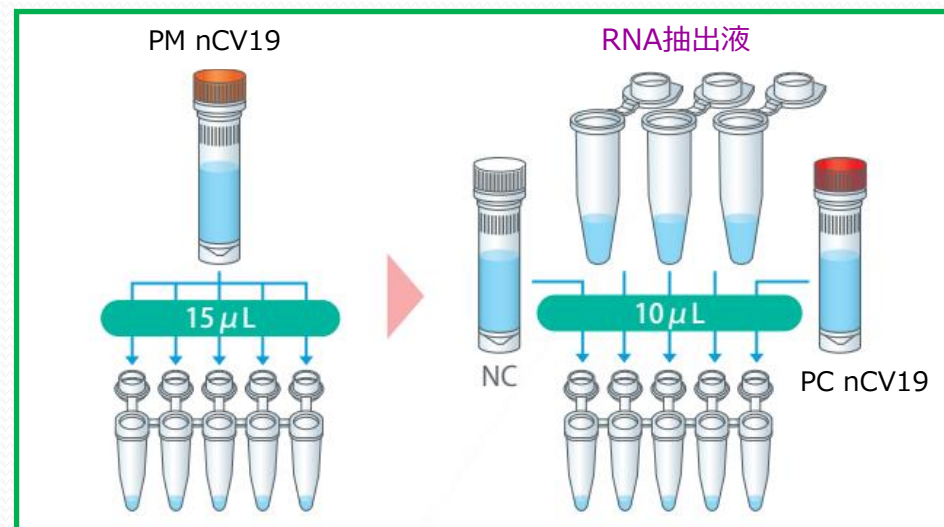
鼻咽頭拭い液(鼻腔拭い液・
咽頭拭い液)、喀痰、唾液

QIAamp Viral RNA Mini Kit

RNA抽出液

約30～60分間

検出試薬による操作



乾燥試薬の溶解、混和

増幅反応

62.5℃ 35分間

結果判定

※ 蛍光目視検出も可能



LoopampEXIA

検体の採取、RNA抽出操作の詳細は国立感染症研究所が提示している

「2019-nCoV (新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取

・輸送マニュアル～2020/06/02 最新版～」

および

「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1(令和2年3月19日)」を

ご参照ください。

※上記マニュアルにつきましては随時最新版をご確認ください。

検体採取から**60～90分程度**で検査可能

測定の流れ(簡易抽出の場合)

抽出操作

鼻咽頭拭い液(咽頭拭い液)、
唾液※

Loopamp ウイルスRNA抽出試薬に
検体を採取したスワブを
10回程度撹拌
(唾液の場合は100 μ Lを添加し、
ゆっくり10回ピペッティング)

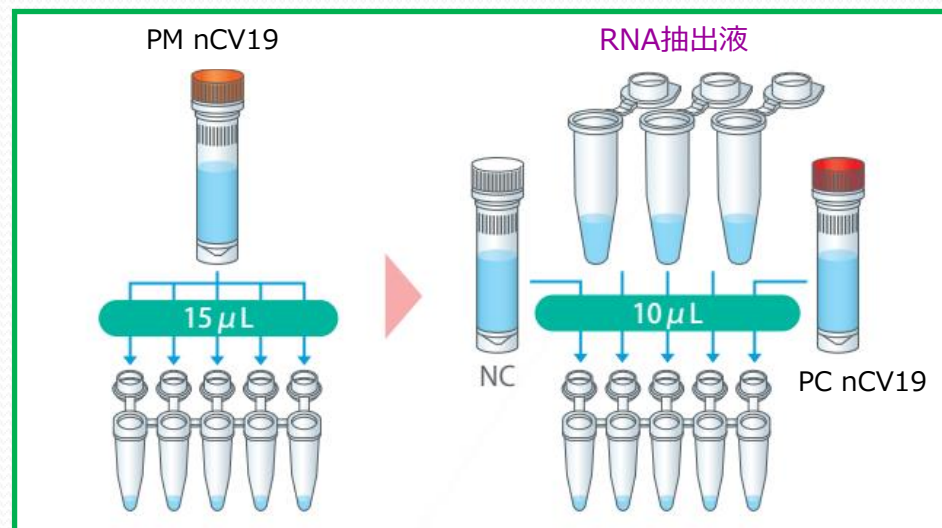
RNA抽出液



約5～10分間

※喀痰検体については、Loopamp ウイルスRNA抽出試薬
は使用できませんのでQIAamp® Viral RNA Mini Kitを
用いてください。

検出試薬による操作



乾燥試薬の溶解、混和

増幅反応

62.5°C 35分間

結果判定

(蛍光目視検出も可能)



LoopampEXIA

鼻咽頭拭い液(咽頭拭い液)、唾液は
検体採取から約45分で検査可能

試薬性能 最小検出感度

◆試験方法

校正用基準物質※から作製した標準品を陰性管理検体で希釈し、濃度既知の3 検体（濃度 120 コピー/テスト、濃度 100 コピー/テスト、濃度 80 コピー/テスト）を作製し、更に陰性管理検体で2倍希釈系列を作製した。

各濃度につきリアルタイム濁度検出にて 5重測定し、最小検出感度を求めた。

※ SARS-CoV-2 の N 遺伝子及び RdRp 遺伝子を人工合成し挿入したプラスミド DNA を制限酵素処理し、試験管内で転写した RNA

◆結果

各濃度を5 重測定した際に 100%の検出率を示す濃度より本製品の検出感度は 20～60コピー/テストであった。

従って、**最小検出感度は 60コピー/テスト**となる。

検体A
： 60コピー/テスト

検体B
： 25コピー/テスト

検体C
： 20コピー/テスト
(社内データ)

検体A	コピー/テスト	120	60	30	15	7.5
	検出率 (陽性数/測定回数)	5/5	5/5	4/5	4/5	1/5
検体B	コピー/テスト	100	50	25	12.5	6.25
	検出率 (陽性数/測定回数)	5/5	5/5	5/5	2/5	3/5
検体C	コピー/テスト	80	40	20	10	5
	検出率 (陽性数/測定回数)	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5

LAMP-083-002 2020年7月作成



栄研化学株式会社

試薬性能 臨床検体での性能評価

◆試験方法

国立感染症研究所（以下、感染研）より供与された濃度未知の25検体（咽頭拭い液）について、感染研の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」（Ver.2.6）に従って処理し、リアルタイム濁度測定装置にて測定した。

また、同一検体を用い感染研によるPCR法を実施し比較対照とした。

◆結果

陽性検体は10検体中9検体で陽性を示した。陰性検体15検体はすべて陰性を示した。感染研によるPCR法に対する陽性一致率は90%（9/10）、陰性一致率は100%（15/15）、全体一致率は96%（24/25）となった。

なお、感染研によるPCR検査で陽性、本製品による検査で陰性であった1検体は、本製品の検出限界以下の濃度であった。

本試薬は、35分と短い反応時間で感染研によるPCR検査と同等の検出能を有する結果となった。

		本製品（LAMP法）		
		陽性	陰性	合計
対照品 （PCR法）	陽性	9	1	10
	陰性	0	15	15
	合計	9	16	25

（社内データ）

陽性一致率: 90% (9/10)
陰性一致率: 100% (15/15)
全体一致率: 96% (24/25)

LAMP-083-002 2020年7月作成



栄研化学株式会社

試薬性能 簡易抽出での検出感度

◆試験方法

新型コロナウイルスを健常者の鼻咽頭拭い液又は咽頭拭い液に添加して24、100、240 ウイルスゲノムコピー/反応となるような擬似陽性検体（各10 検体）を作成しました。これらをLoopamp ウイルスRNA抽出試薬で処理し、本試薬の使用方法に従って測定しました。

◆結果

100、240ウイルスゲノムコピー/反応となるような擬似陽性検体から抽出したサンプルは全て陽性と判定されました。

国立感染症研究所の「新型コロナウイルス（2019-nCoV）の遺伝子検査法の性能評価について」によると、逆転写および遺伝子増幅時間が15 分～1 時間未満の場合、検出限界は100ウイルスゲノムコピー/反応 以下とされています。

本試験の結果はこの基準を満たしていることから、Loopamp ウイルスRNA抽出試薬は、本製品によるSARS-CoV-2 RNAの検出に使用可能です。

ウイルス ゲノムコピー /反応	本製品（LAMP法）	
	咽頭拭い液 (陽性数/テスト数)	鼻咽頭拭い液 (陽性数/テスト数)
240	10/10	10/10
100	10/10	10/10
24	9/10	6/10
0	0/10	0/10

(社内データ)

簡易抽出試薬を使用した唾液検体の検討

◆試験方法

新型コロナウイルスを健常者の唾液に添加して100 ウイルスゲノムコピー/反応となるような擬似陽性検体（10 検体）を作成しました。これをLoopamp ウイルスRNA抽出試薬で処理し、本試薬の使用方法に従って測定しました。

◆結果

100 ウイルスゲノムコピー/反応となるような擬似陽性検体から抽出したサンプルは全て陽性と判定されました。

国立感染症研究所の「新型コロナウイルス（2019-nCoV）の遺伝子検査法の性能評価について」によると、逆転写および遺伝子増幅時間が15 分～1 時間未満の場合、検出限界は100ウイルスゲノムコピー/反応 以下とされています。

本試験の結果はこの基準を満たしていることから、Loopamp ウイルスRNA抽出試薬は、本製品によるSARS-CoV-2 RNAの検出に使用可能です。

ウイルス ゲノムコピー /反応	本製品（LAMP法）
	唾液 (陽性数/テスト数)
100	10/10
0	0/10

(社内データ)

LAMP法によるSARS-CoV-2 RNA検出 まとめ

- ・ 試薬調製が不要
- ・ 感染研によるPCR検査と同等の検出能
- ・ 増幅時間は、35分
- ・ 鼻咽頭拭い液や唾液は、簡易抽出が可能であり、
検体採取から1時間以内で結果報告が可能

以上、ご覧いただきありがとうございました。

お問い合わせ先
栄研化学株式会社
[TEL:03-5846-3287](tel:03-5846-3287)
<https://www.eiken.co.jp>

LAMP-001-20A 2020年6月作成



栄研化学株式会社