

事 務 連 絡
平成 27 年 7 月 6 日

各 $\left\{ \begin{array}{l} \text{都 道 府 県} \\ \text{保健所設置市} \\ \text{特 別 区} \end{array} \right\}$ 衛生主管部局 御中

厚生労働省健康局結核感染症課

都道府県等における MERS RT-LAMP 法の試用について

標記について、国立感染症研究所において、別添 1 のとおり、MERS RT-LAMP 法の研究事業が行われています。

本検査法は MERS 疑い事例の早期診断への応用が期待できることから、厚生労働省としても本研究事業に都道府県等の御協力をいただきたいと考えています。

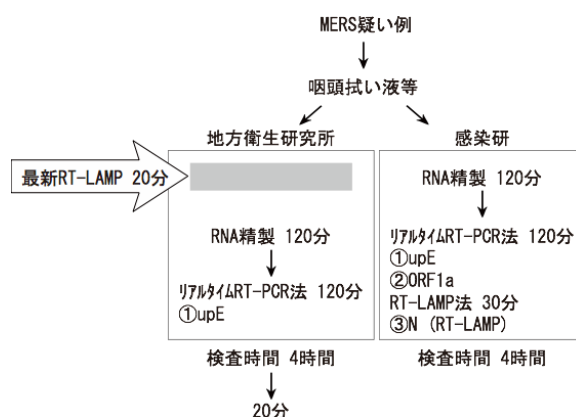
つきましては、御賛同いただける都道府県等におかれては、別添 2 により国立感染症研究所へ御連絡いただきますようお願いいたします。

都道府県等における MERS RT-LAMP 法の試用について（案）

国立感染症研究所ウイルス第3部松山室長らが開発した RT-LAMP 法を用いた MERS 検査法（詳細は以下）は、検体からの RNA 精製が不要な Direct RT-LAMP 法を利用しており、反応時間も極めて短いことから、MERS 疑い事例の早期診断への応用が期待できる。他方、現在、地方衛生研究所で検査体制を構築しており、リアルタイム RT-PCR 法による試験検査との重複などの課題がある。このことから、都道府県等で行う MERS 試験検査体制での RT-LAMP 法の応用について、自治体等の研究協力を募り検査キットを配布し、検証を行うとともに、MERS RT-LAMP 法による試験検査成績を集積する。

MERS RT-LAMP 法（インフルエンザも同時検出可能）

地方衛生研究所での MERS 検査において、検体入手から病原体検出までの時間を 4 時間から 20 分に短縮する試み。検出する病原体は MERS CoV 1 項目とインフルエンザウイルス 5 項目の、計 6 項目。①MERS、②FLUA、③FLUB、④H1pdm、⑤H3、⑥H7 を予定。5 分程度の検体前処理と、15 分程度の RT-LAMP 反応で MERS（もしくはインフルエンザ）陽性が判明し、続く 15 分程度で MERS（もしくはインフルエンザ）陰性が確定する。



今回導入を提案する RT-LAMP 法は、遺伝子の増幅に伴う蛍光シグナルの「消光」を検出する。リアルタイム PCR 検査機器（LightCycler 480、LightCycler Nano、ABI 7500 Fast、ABI StepOnePlus）を使用して検出することが可能である。

〔利点〕

MERS-CoV を大量に排出する患者を迅速に特定することが可能で、早急な感染拡大防止に貢献出来る。また、インフルエンザウイルスも同時に検出可能なことから、これまであった疑い例の多くが早期に排除可能となる。

[課題]

RNA 抽出時間を短縮するために、検体からの RNA 精製を行わずに「専用抽出試薬」と検体を混ぜて、そのまま乾燥反応試薬に添加して検出機にかけるが、リアルタイム RT-PCR と比べて 1 反応あたりの RNA 濃度が約 1/2~1/5 であるため、検出感度がその分低くなる。そのため、RT-LAMP 法で陰性だった場合は、リアルタイム RT-PCR による陰性確認試験が必要となる。

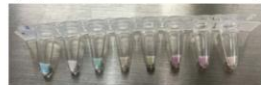
- ✓ 試薬は、常温で6ヶ月保存可能
- ✓ 下記の反応作業時は、常温での作業が可能(氷上で作業する必要がない)

①開封



②サンプル添加

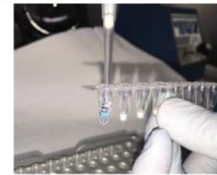
市販の8連PCRチューブに試薬が乾燥化してある。



※各項目ごとに色分けされている
(今回の配色とは異なる)

- 1: MERS
- 2: Type A
- 3: Type B
- 4: H1pdm09
- 5: H3
- 6: H7
- 7: RSV A
- 8: RSV B

輸送培地に採取した検体 もしくは
検体スワブそのまま
+
抽出試薬
を混合したもの



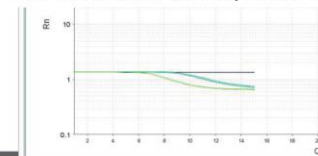
③転倒混和



④リアルタイムPCR機で測定(63°C30min、陽性なら15分前後で判定可能)



LightCycler 480, Nano (Roche)
ABI 7500Fast, ABI Step-one Plus (ABI)に対応済み



消光が見られたら、陽性

Table 1 The primer set for MERS-CoV RT-LAMP assay

Primers	Position (EMC, JX869059.2)	Sequence (5' – 3')
F3	28848–28866	GCTCCCAGGTGGTACTTCT
B3	29061–29042	cagtcccctcaatgtggaag
FIP (F1c + F2)	28939–28918 + 28872–28890	tcattggacccaacgatgccatACTGGAAGTGGACCCGAAG
BIP (B1c + B2)	28956–28977 + 29028–29011	GCTCCTTCAACTTTTGGGACGtagtaccggcgcgcaatt
LF	28906–28891	cggatgggagtgctg
LB	28978–29000	GGAACCCTAACAATGATTGAGCT

Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T, Notomi T, Matsuyama S. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Viro J.* 2014 Aug 8;11:139.

(参考) LAMP 法とは

「LAMP とは Loop-Mediated Isothermal Amplification の略であり、栄研化学が独自に開発した、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法です。標的遺伝子の 6 つの領域に対して 4 種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴とします。サンプルとなる遺伝子、プラ

イマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等を混合し、一定温度（65℃付近）で保温することによって反応が進み、検出までの工程を 1 ステップで行うことができます。増幅効率が高いことから DNA を 15 分～1 時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅することができ、また、極めて高い特異性から増幅産物の有無で目的とする標的遺伝子配列の有無を判定することができます。」（栄研化学 HP より <http://www.loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>）

都道府県等における MERS RT-LAMP 法の試用に関する
各自治体で必要な事務手続き等について

＜事前に自治体内で調整が必要な点＞

本検査は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（以下、AMED） 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「感染症の診断機能向上のための研究」研究開発代表者 影山 努（以下、委託研究）の一環として実施します。そのため、研究参加前に各施設で以下の手続きや作業が実施可能かご確認をお願いします。

なお、本研究は、国立感染症研究所医学研究倫理審査の研究課題「感染症の診断機能向上ならびに重症化因子に関する研究」の承認を得て行っております。本研究への参加は同審査の承認および AMED 委託研究への参加が前提となります。

MERS 疑い患者収容病院において

- ・各病院の倫理委員会での承認（研究開始前）
- ・検体採取の際、医師による患者へのインフォームドコンセントの実施
（注：咽頭拭い液を採取する場合、通常検査用に輸送培地に採取した検体を RT-LAMP に使用してもよいが、希釈により検体の持ち込み量が 2.5 倍程度少なくなる。RT-LAMP 用に 1 本追加して採材し、直接 RT-LAMP に使用すると若干の感度の上昇が見込まれる。）
- ・各病院の協力医師を AMED 委託研究「感染症の診断機能向上のための研究」の研究協力者として登録することへの承諾
- ・各病院の協力医師を国立感染症研究所医学研究倫理審査 研究課題名「感染症の診断機能向上ならびに重症化因子に関する研究」の分担研究者として登録することへの承諾

地方衛生研究所において

- ・LightCycler 480、LightCycler Nano (以上 Roche 製)、7500 Fast[®]、StepOnePlus (以上 Applied Biosystems 製)のいずれかのリアルタイム PCR 機を本研究に使用でき

ること

※ABI 7500 Fast を使用の場合は、解析ソフトウェアが 7500 Software version 2 以降であること

- ・各地衛研の担当者を AMED 委託研究「感染症の診断機能向上のための研究」の研究協力者として登録することへの承諾
- ・各地衛研の担当者を国立感染症研究所医学研究倫理審査 研究課題名「感染症の診断機能向上ならびに重症化因子に関する研究」の分担研究者として登録することへの承諾

なお、以上の条件を満たす希望自治体が揃い次第、国立感染症研究所倫理委員会に承認を諮ります。その承認が得られてから本事業を開始します。

連絡先

国立感染症研究所

インフルエンザウイルス研究センター第2室

室長 影山 努

連絡先：042-848-7166

tkage@nih.go.jp