



地方独立行政法人 大阪府立病院機構  
大阪母子医療センター  
Osaka Women's and Children's Hospital

# 新型コロナウイルス検出酵素試薬の開発 ～独自酵素開発酵素によるone-step real-time PCR法～

大阪府立病院機構

大阪母子医療センター研究所免疫部門

柳原格



京都大学  
KYOTO UNIVERSITY



関西学院大学  
KWANSEI GAKUIN UNIVERSITY

**BIKEN**

一般財団法人 阪大微生物病研究会

論文タイトル:

# Development of an efficient one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction method for severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 detection

掲載雑誌: PLOS ONE

掲載日時: 6月5日 (土) 午前4時 (日本時間)

著者:

**Yukiko Nakura, Heng Ning Wu, Yuya Okamoto, Muneyuki Takeuchi, Koichiro Suzuki, Yoshitaka Tamura, Yuichiro Oba, Fumiko Nishiumi, Nobuaki Hatori, Shinsuke Fujiwara, Kiyoshi Yasukawa, Shinobu Ida, Itaru Yanagihara**

## 地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪母子医療センター・研究所免疫部門

同・臨床検査科

同・集中治療科・主任部長

大阪はびきの医療センター・感染症内科・主任部長

大阪急性期総合医療センター・総合内科・主任部長

## 一般財団法人阪大微生物病研究会

関西学院大学生命環境学部生物科学科 (関西学院大・生命環境・生物科学) ・教授

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 (京大・院農・食生科) ・教授

名倉由起子 (筆頭1)、呉恒寧 (2)、西海史子 (8)、柳原格 (コレスポ13)

岡本裕也 (3)

主任部長・位田忍 (12)

竹内宗之 (4)

田村嘉孝 (6)

大場雄一郎 (7)

鈴木孝一朗 (5)、羽鳥暢晃 (9)

藤原伸介 (10)

保川清 (11)

# 研究助成・補助

**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 (柳原)**

**日本学術新興財団科研費 (柳原)**

**中谷医工計測技術振興財団 (特別研究助成) (柳原、保川、藤原)**

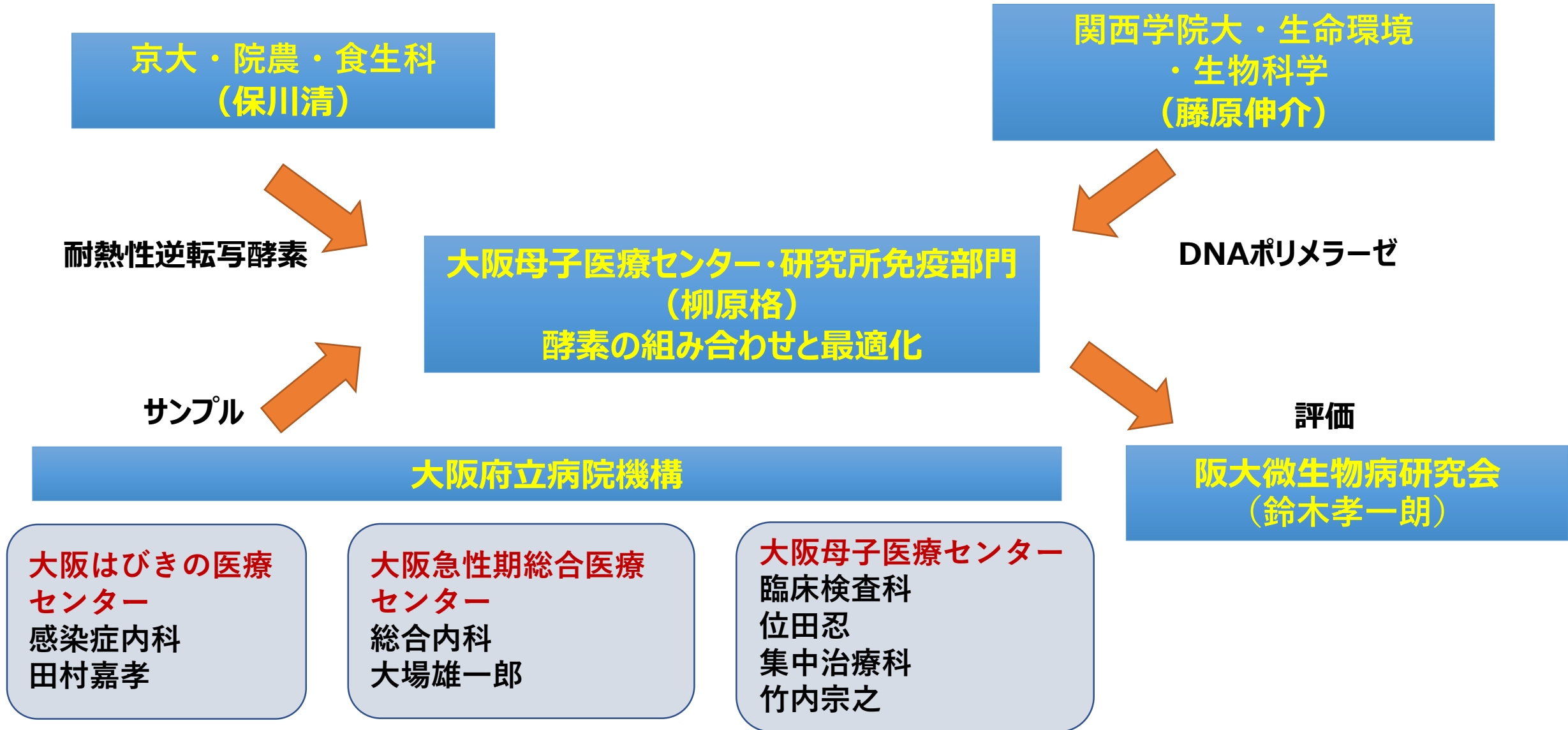
**※一般財団法人阪大微生物病研究会 (共同研究費) (柳原、保川、藤原)**

**R2大阪府新型コロナウイルス感染症検査機関等設備整備事業 (大阪府立病院機構)**

**R2大阪府立病院機構研究活動等支援 (柳原)**

※今後HPで掲載するが現時点では未公表

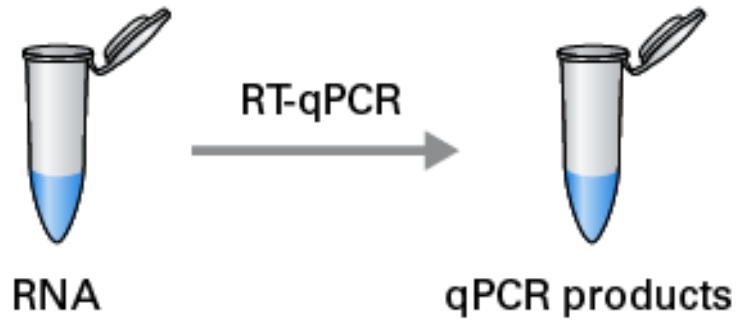
# 研究組織



# 開発技術

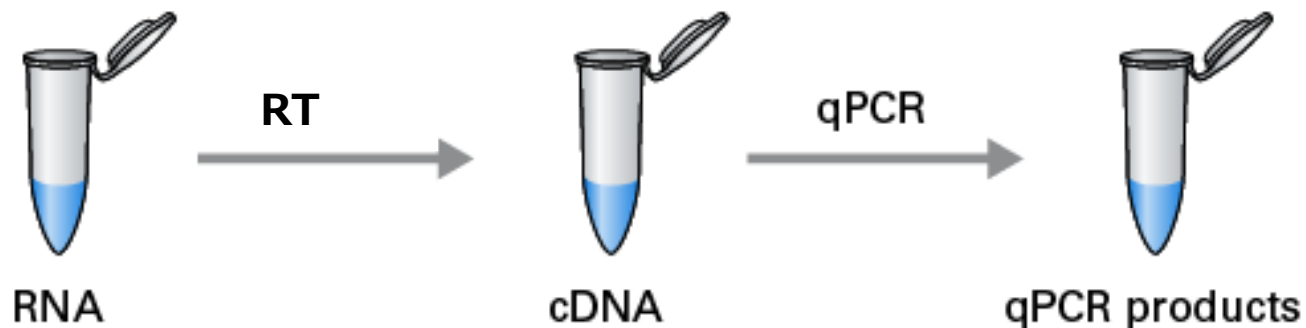
独自の耐熱性逆転写酵素、並びに独自のDNAポリメラーゼを組み合わせ、高感度なone-step real-time RT-PCR法を開発した

## One-step RT-qPCR



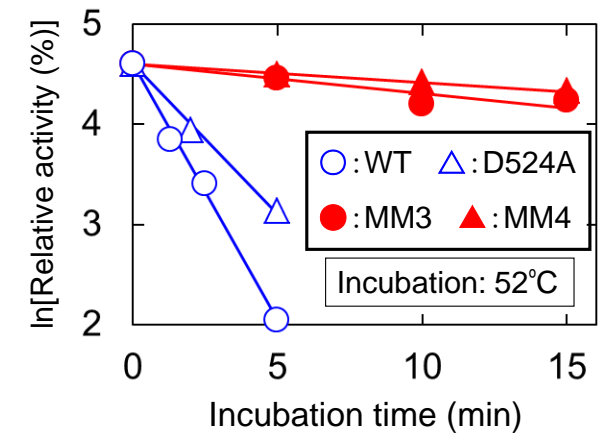
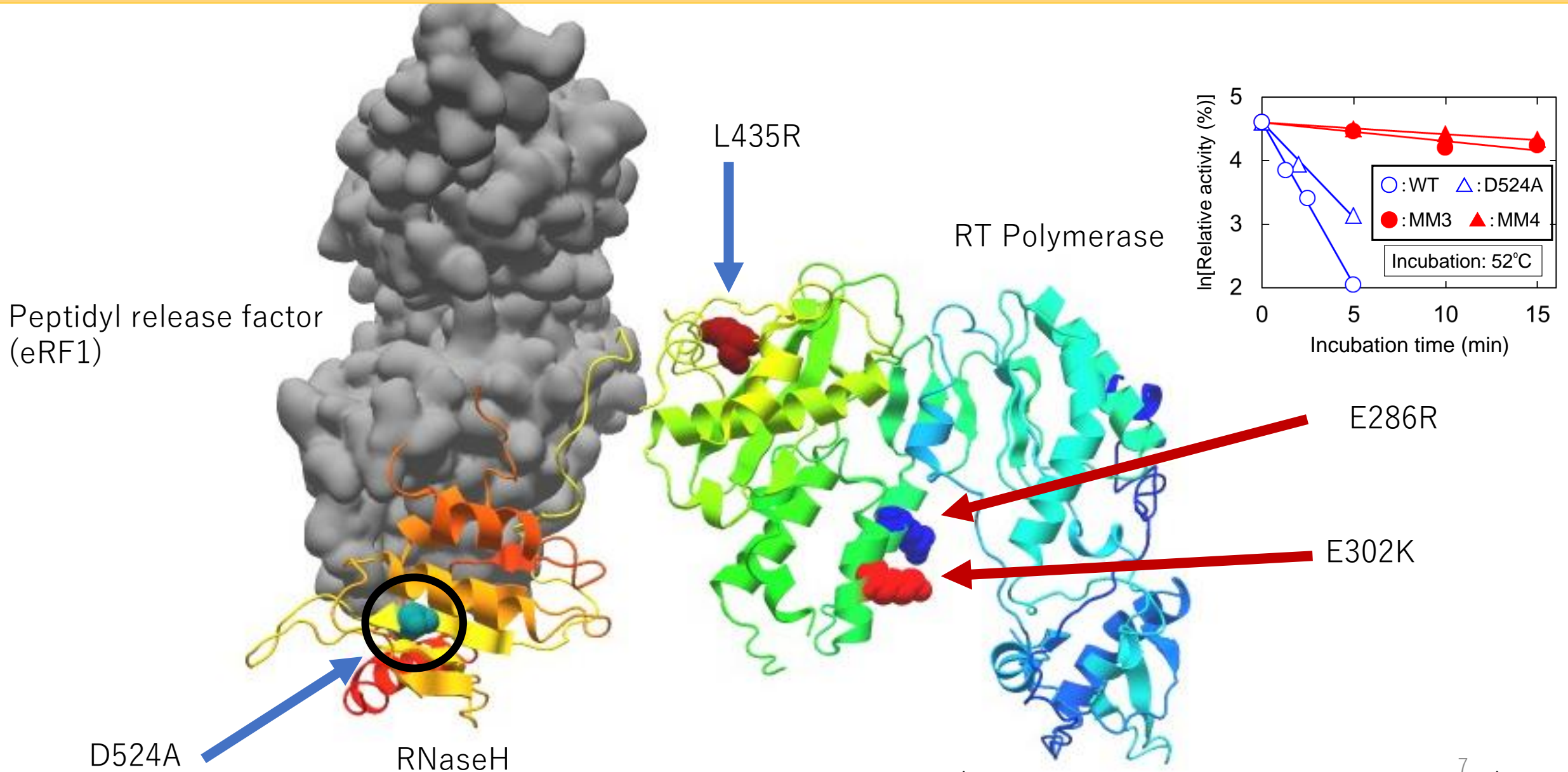
- 1本鎖cDNA合成（逆転写）反応とPCR反応を同じチューブでまとめて行う方法。
- 反応セットアップが簡単で、コンタミネーションのリスクが低い
- 配列特異的プライマーでのみ使用できる

## Two-step RT-qPCR



- RNAを逆転写酵素でcDNAへ逆転写することから始まる。1本鎖合成後に反応液を別のチューブに移し、次のPCRを行う。
- 単一サンプルから複数の遺伝子を検出または定量するのに最適
- 簡便性が低く、コンタミネーションの危険が増す。

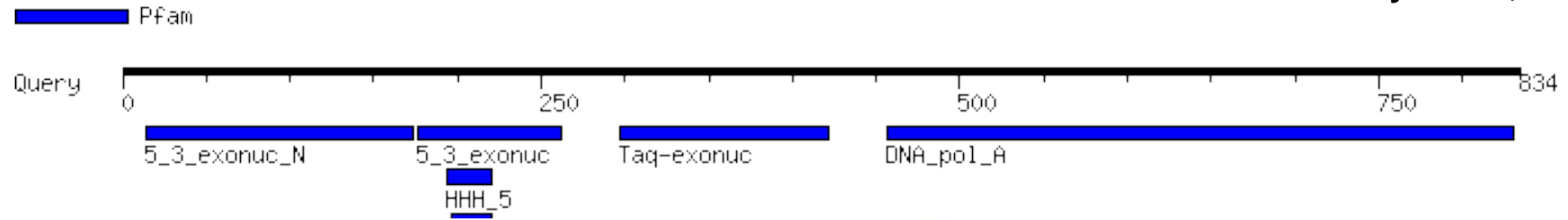
# MM4耐熱性逆転写酵素（京大・保川らが開発） （モロニー Maus 白血病ウイルスの逆転写酵素を改良）



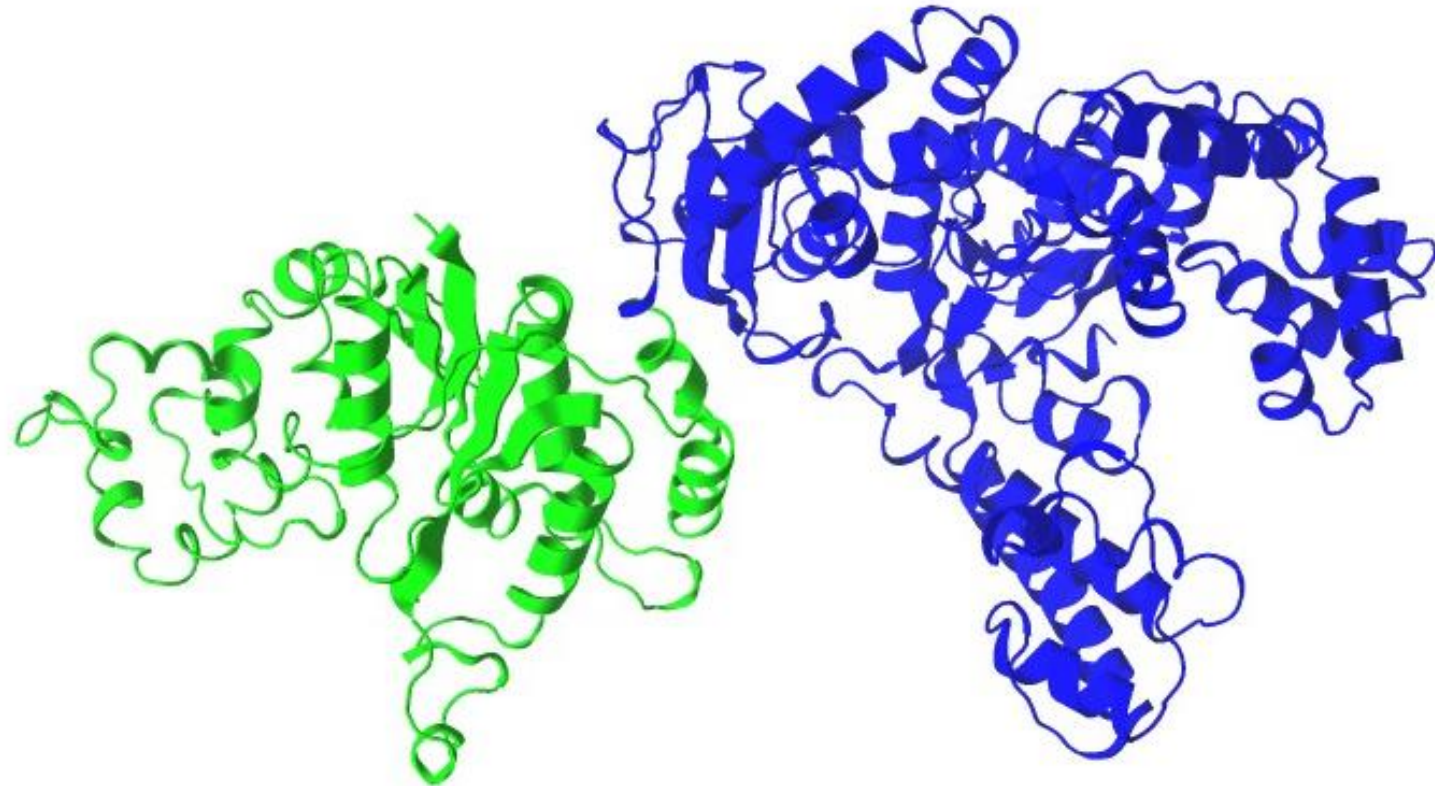
(MM4: Yasukawa, J Biotechnol, 2010)

# 高度好熱菌（75℃以上で生育する *Thermus thermophilus* M1株）由来 DNAポリメラーゼ（藤原らが単離）：M1pol<sub>Tth</sub>

(Yasukawa & Fujiwara, BBRC, 2012)



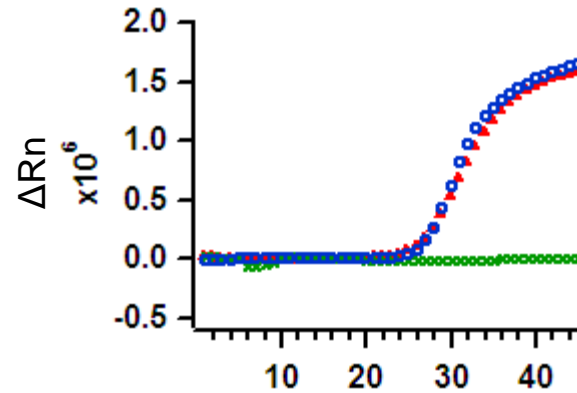
## 構造モデル



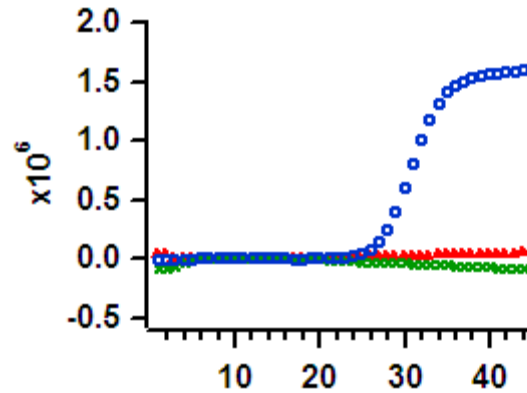


# MM4とDNAポリメラーゼの組み合わせと酵素反応溶液の調製

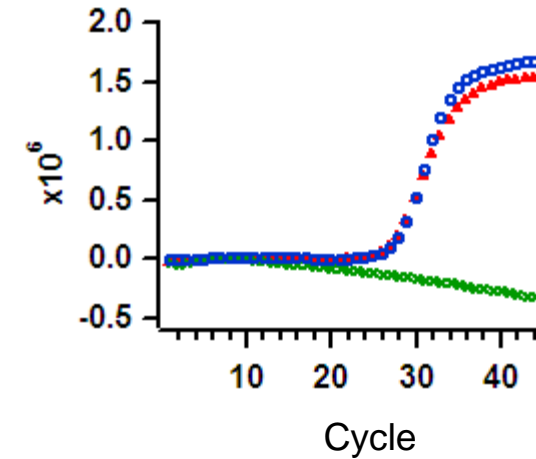
溶液 1



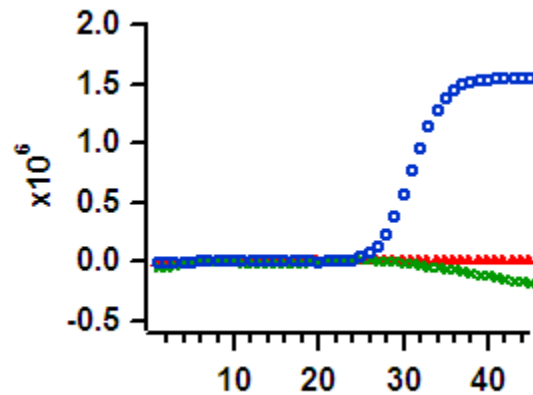
溶液2



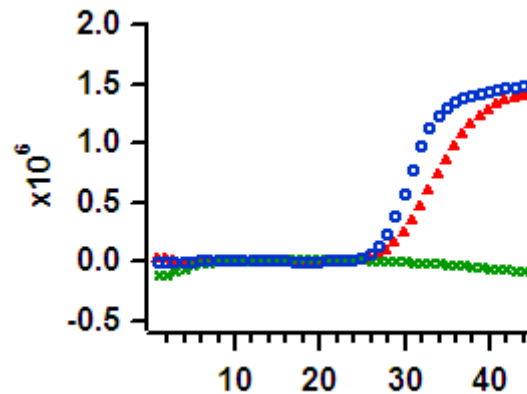
溶液3



溶液4



溶液5



RT: MM4

DNA pol:

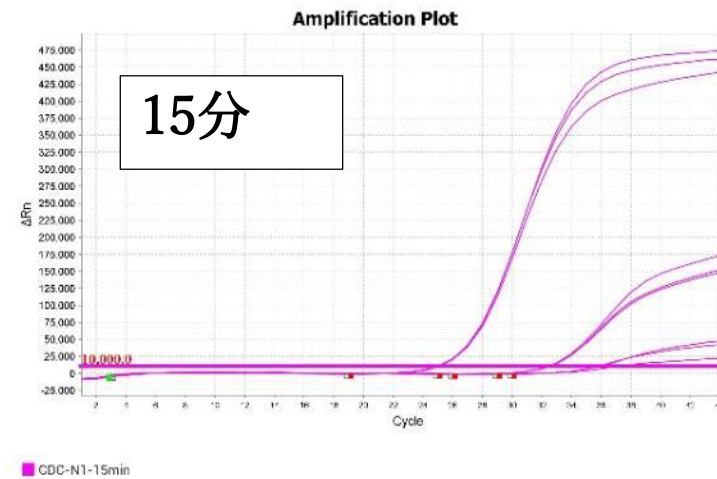
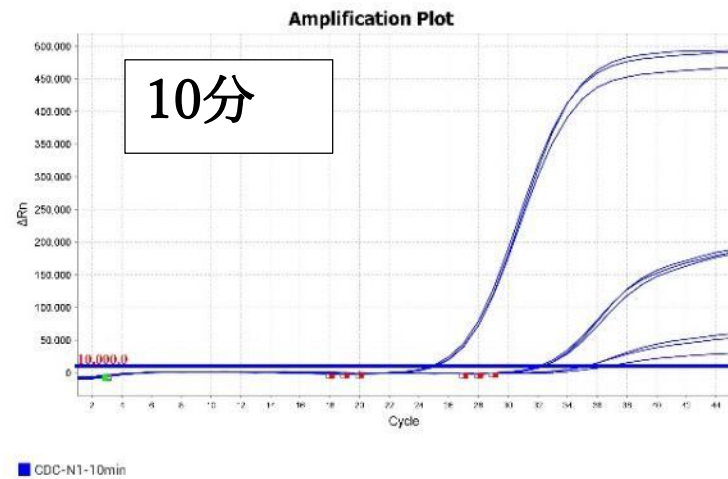
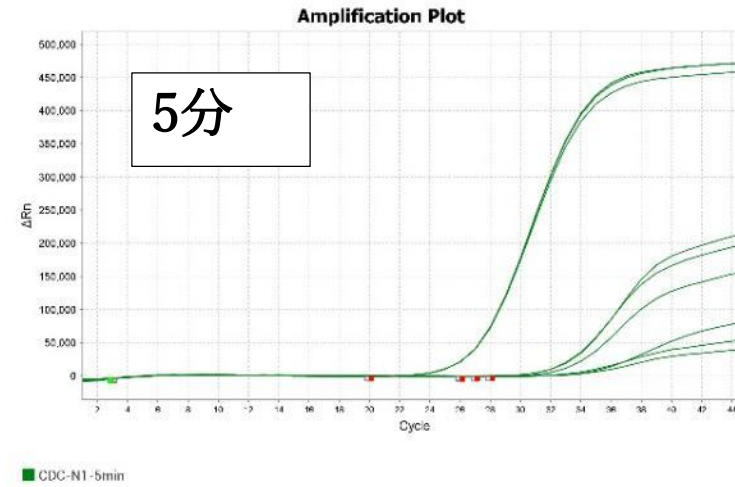
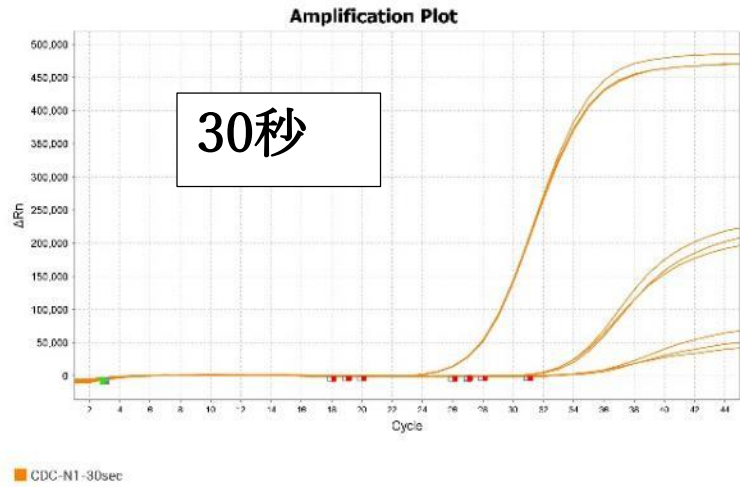
DNA ポリメラーゼ 1

DNA ポリメラーゼ 2

M1pol<sub>Tth</sub>

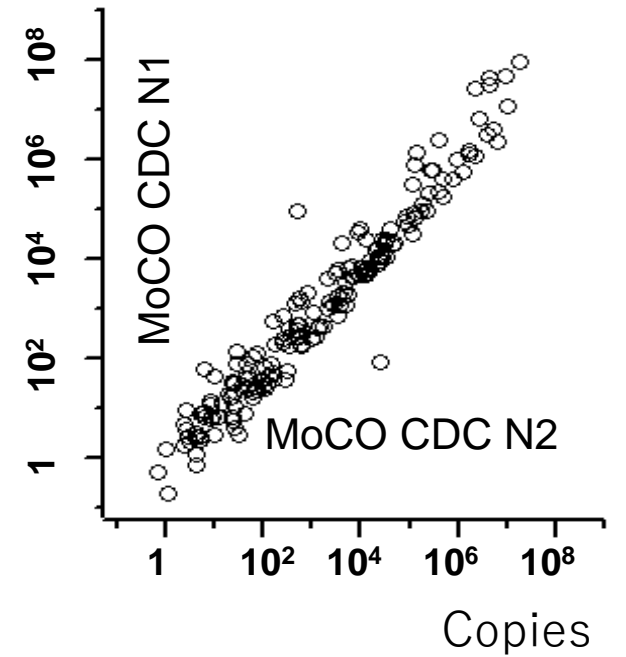
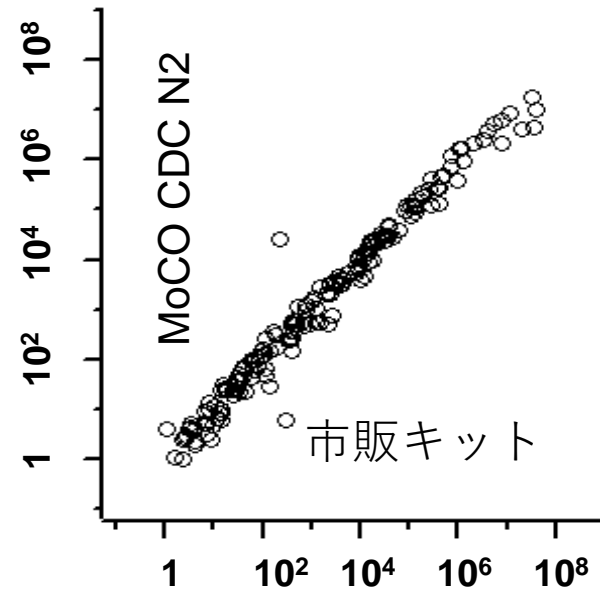
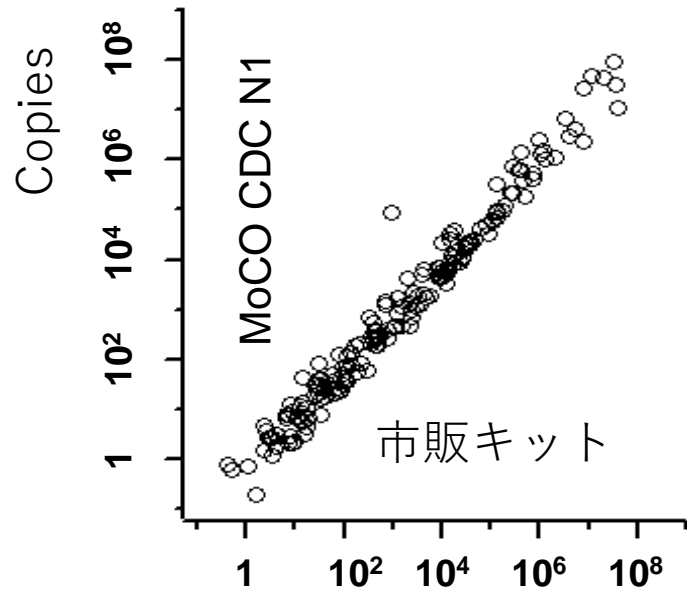
合成SARS-CoV-2 RNA 10,000 コピー

# 逆転写反応時間の検討



5分、50°Cの逆転写反応でSARS-CoV-2の合成RNAからDNAが増幅された

# 市販キットとの相関



**n = 213**

感度 : 99.44%  
特異度 : 100%

# MoCO キット

- 独自酵素によるone-step real-time PCR法を開発した
- 増幅時間が短く、検出感度が高い
- 新たな感染症や、変異型に対して迅速に対応できる
- 緊急時（診断用試薬が入手できず枯渇した場合）の研究用試薬として、大阪府立病院機構において数万テスト分を常備
- 新型コロナウイルス研究検査では利用可能  
ただし薬事承認を得ていないため、保険適応でのPCR検査には使用不可



モコにゃん（大阪母子医療センターマスコット）

MoCO (Mother's and Children's, Osaka) キットと名付けた

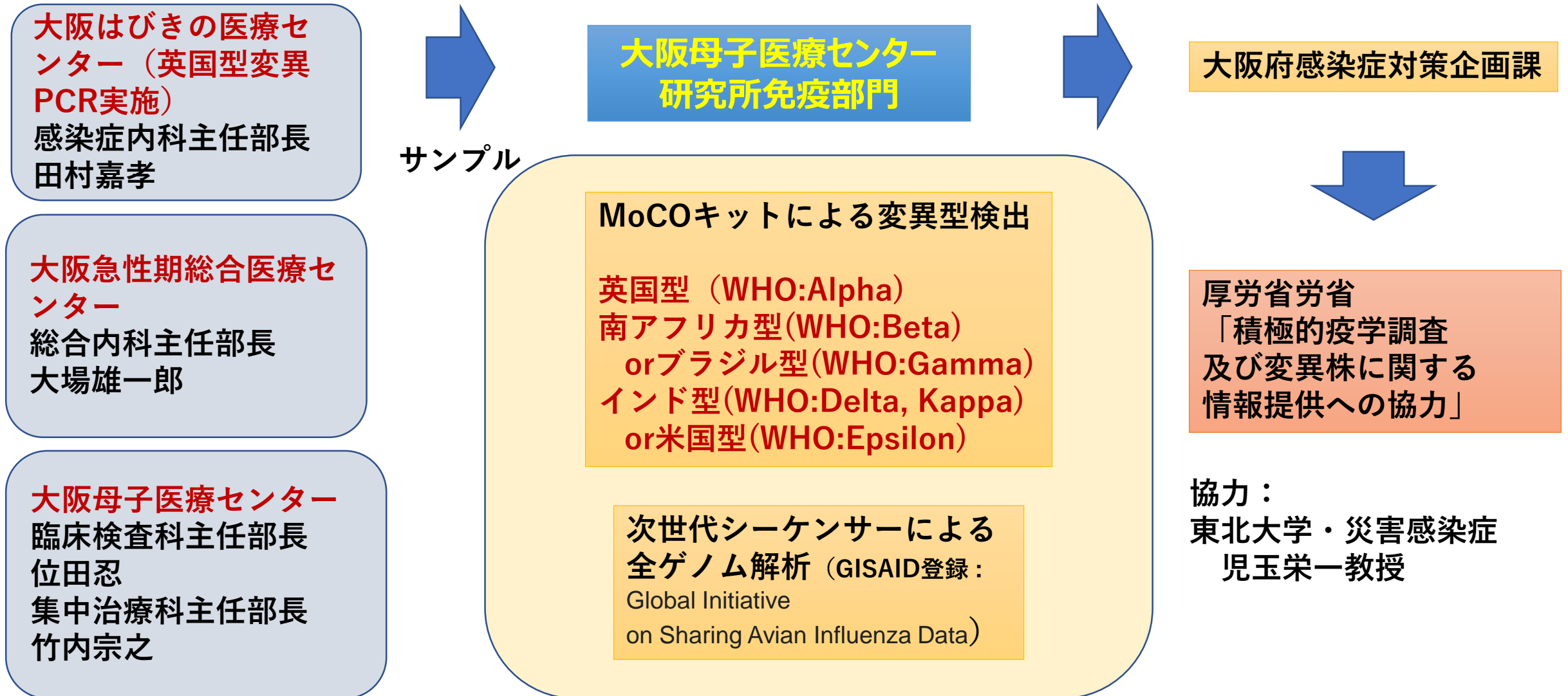
ようこそ！  
モコニャンのページへ



その他

変異型新型コロナウイルス検出の流れと  
次世代シーケンス結果

# 変異型新型コロナウイルス検出の流れ(20210603)



# 次世代シーケンス結果(大阪府立病院機構)

SARS-CoV-2	～2021年2月	2021年3月～
B.1.1.7 (UK, N501Y, D614G…) いわゆる英国変異型 (WHO: Alpha)	0	18
B.1.1.284 (JAPAN, D614G : 11)	13	0
B.1.1.214 (JAPAN, D614G : 9)	9	1
B.1.1.64 (UK, D614G)	1	0
B.1.296 (UK, D614G)	1	0
合計	24	19

謝辞

大阪府立病院機構職員