



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)

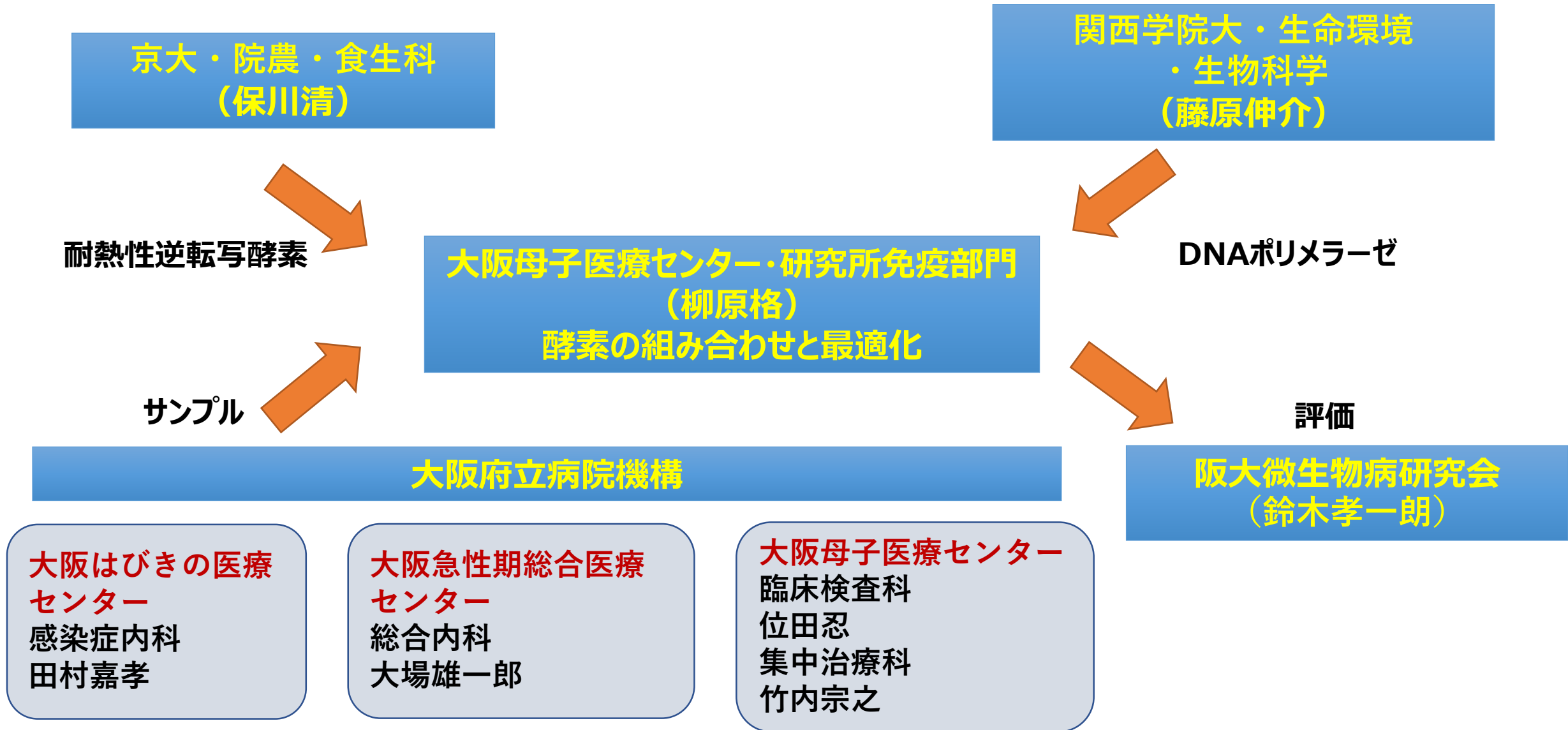
※一般財団法人阪大微生物病研究会 (共同研究費) (柳原、保川、藤原)

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

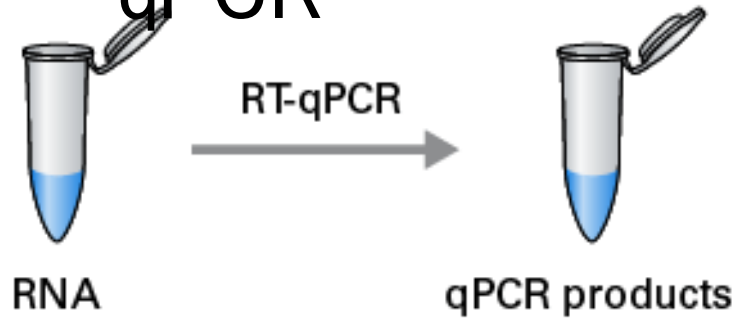
研究組織



開発技術

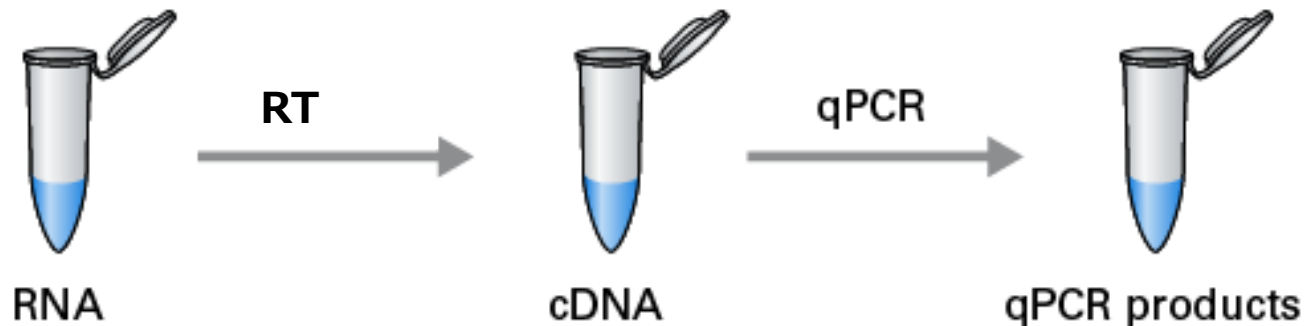
独自の耐熱性逆転写酵素、並びに独自のDNAポリメラーゼを組み合わせ、
高感度なone-step real-time RT-PCR法を開発した

One-step RT-qPCR



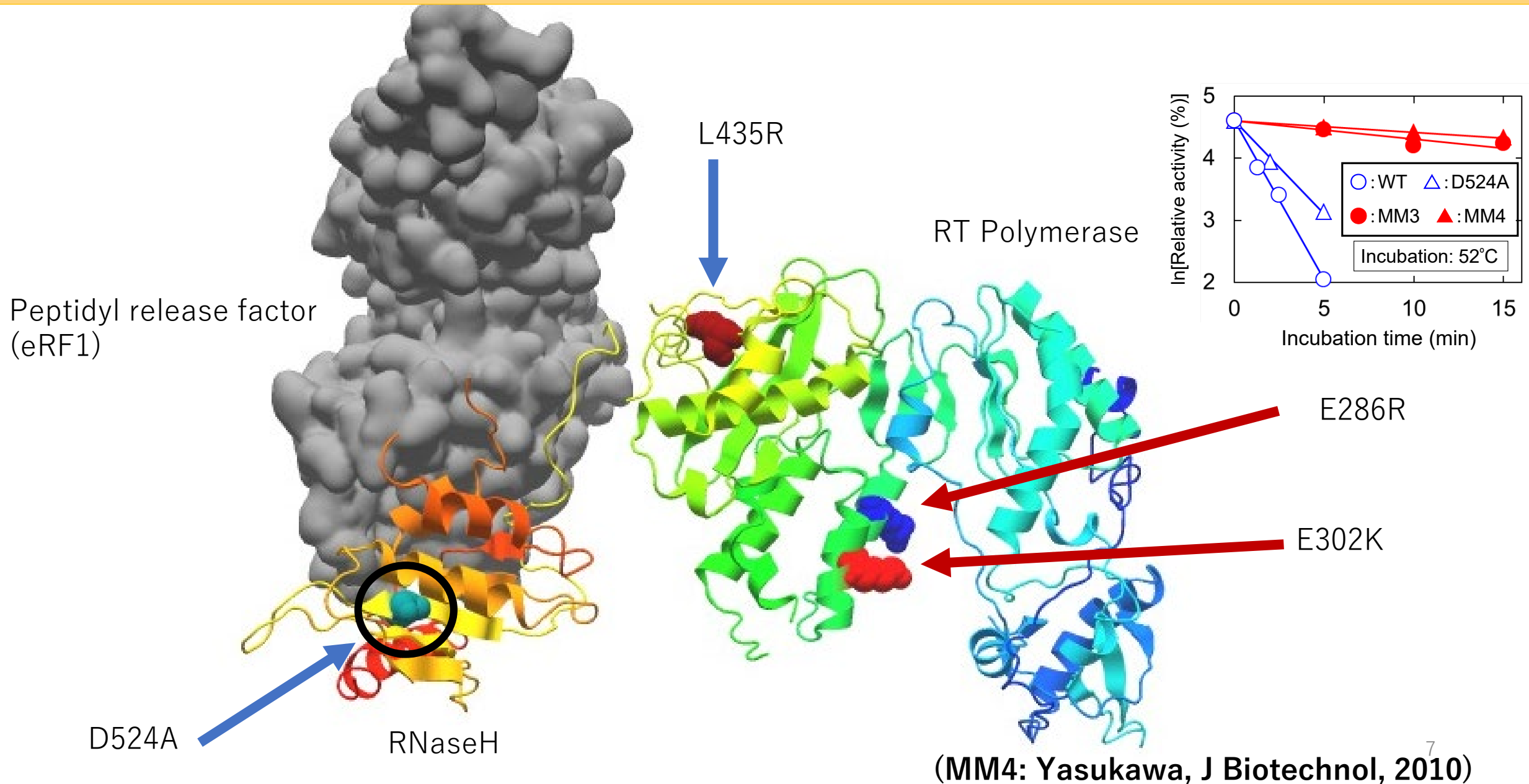
- 1本鎖cDNA合成（逆転写）反応とPCR反応を同じチューブでまとめて行う方法。
- 反応セットアップが簡単で、コンタミネーションのリスクが低い
- 配列特異的プライマーでのみ使用できる

Two-step RT-qPCR



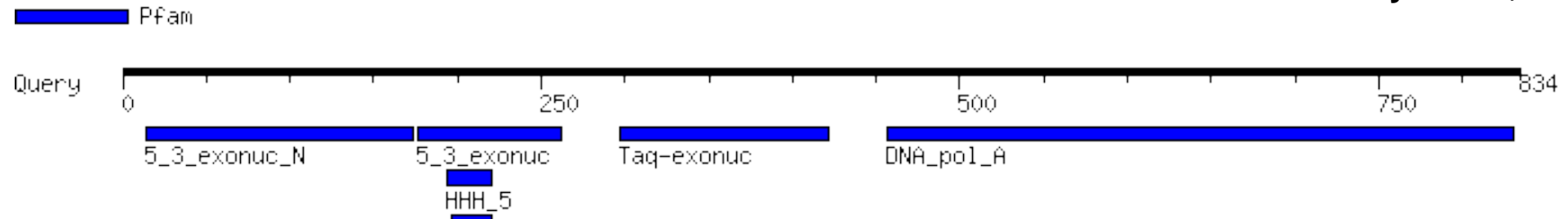
- RNAを逆転写酵素でcDNAへ逆転写することから始まる。1本鎖合成後に反応液を別のチューブに移し、次のPCRを行う。
- 単一サンプルから複数の遺伝子を検出または定量するのに最適
- 簡便性が低く、コンタミネーションの危険が増す。

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）

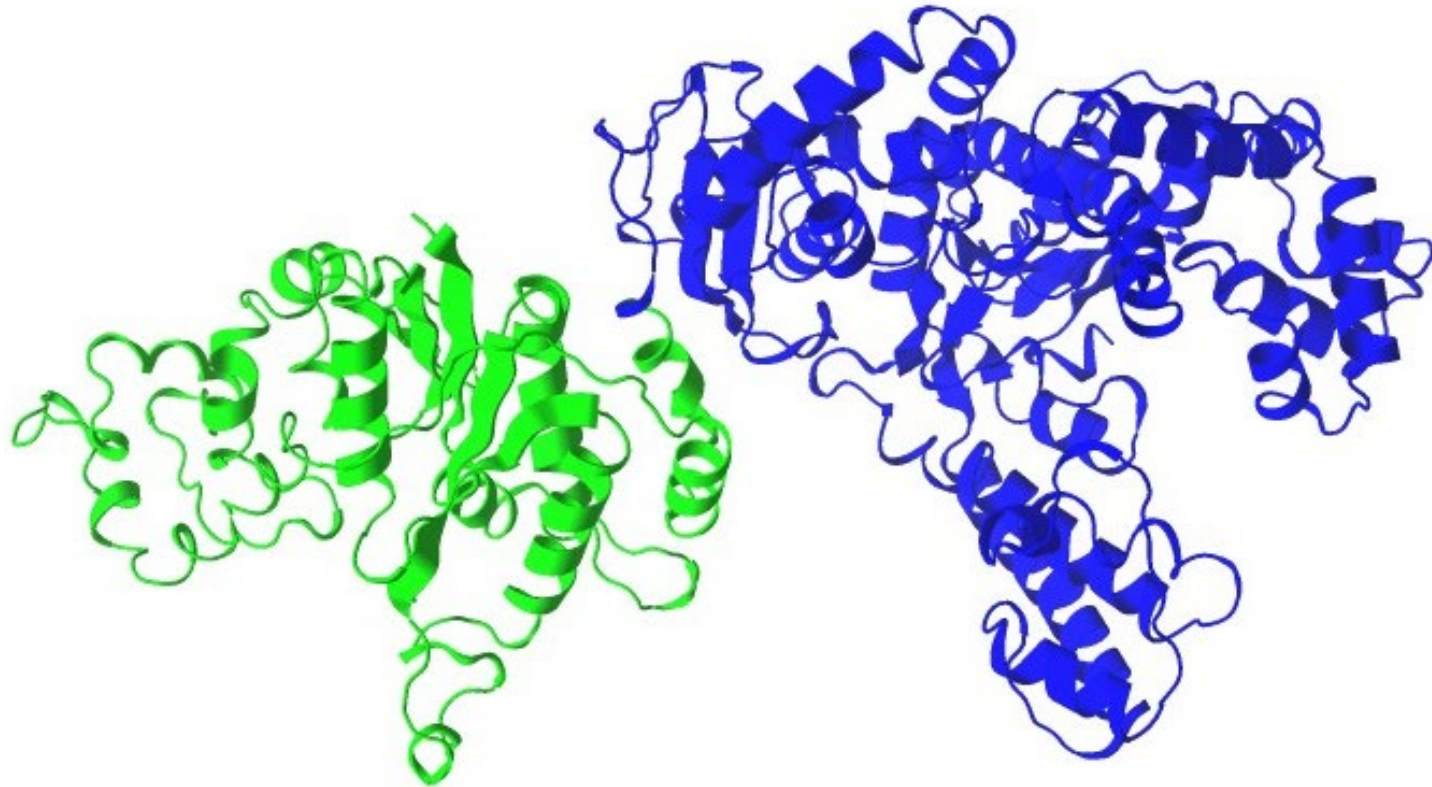


高度好熱菌（75℃以上で生育する*Thermus thermophilus* M1株）由来 DNAポリメラーゼ（藤原らが単離）：M1pol_{Tth}

(Yasukawa & Fujiwara, BBRC, 2012)

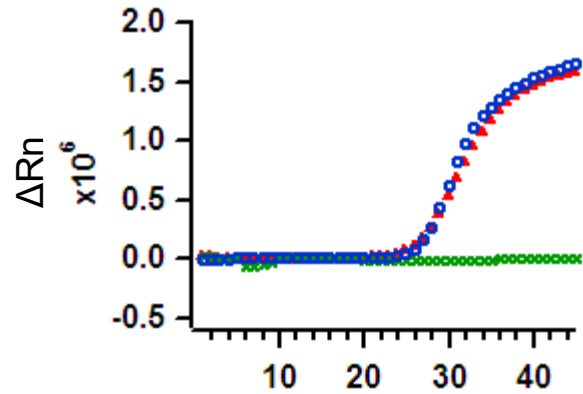


構造モデル

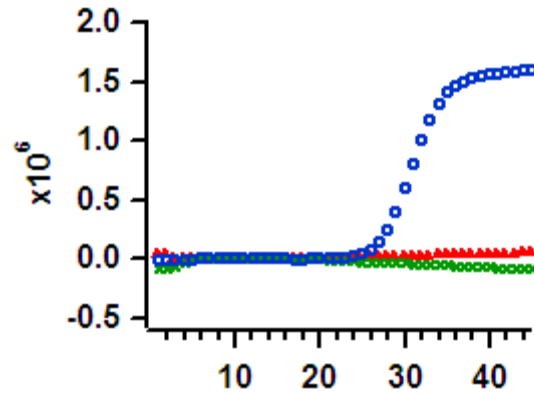


MM4とDNAポリメラーゼの組み合わせと酵素反応溶液の調製

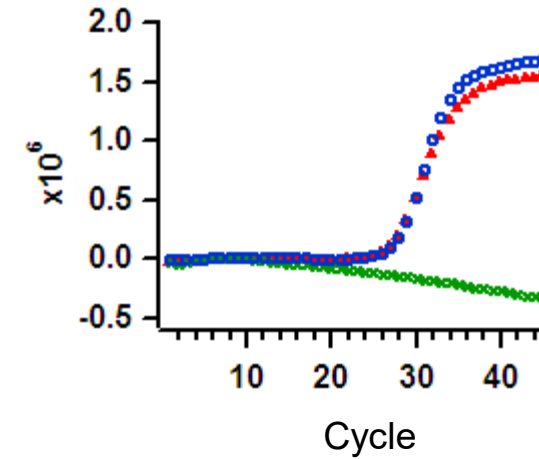
溶液 1



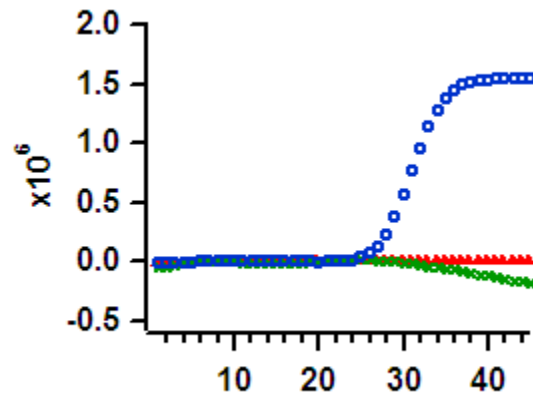
溶液2



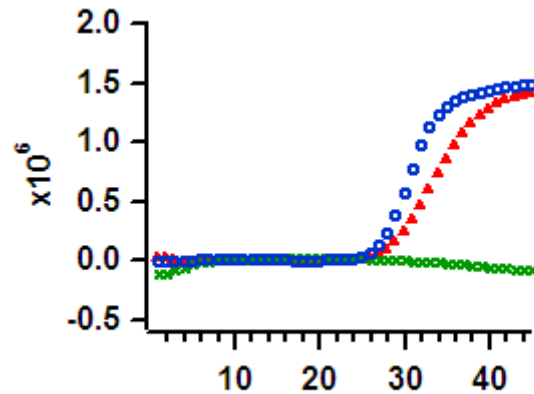
溶液3



溶液4



溶液5



RT: MM4

DNA pol:

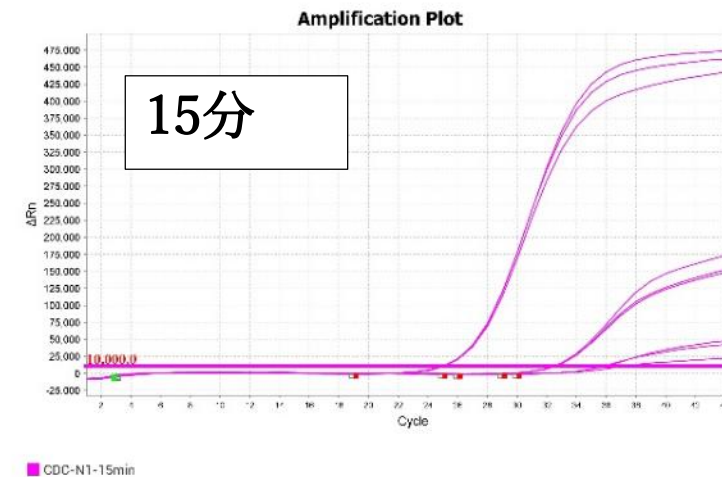
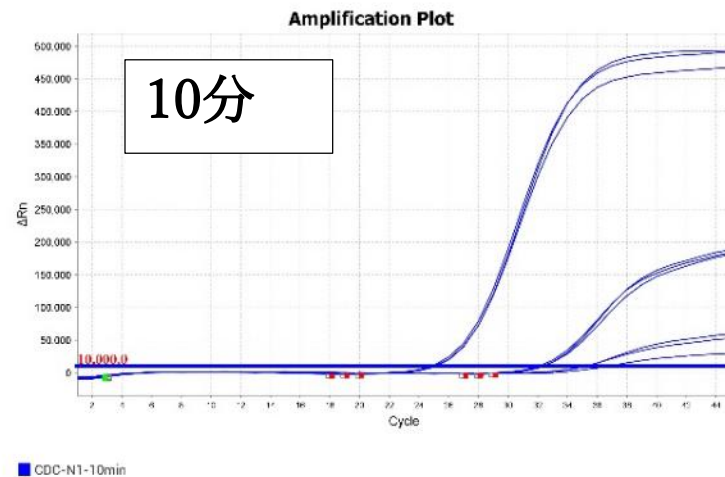
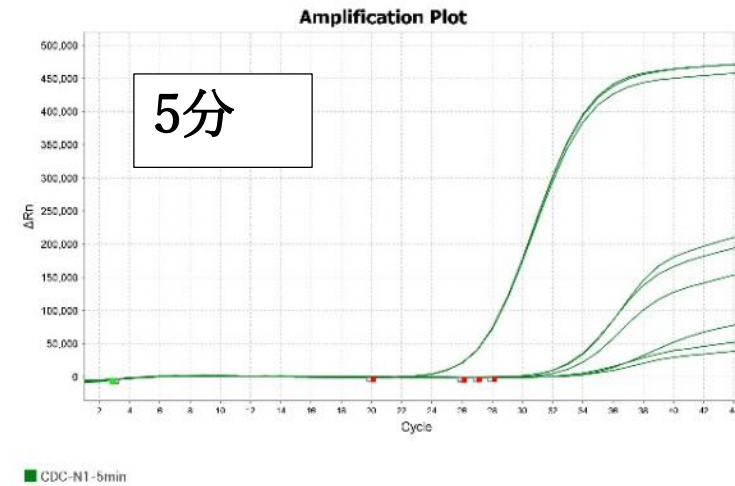
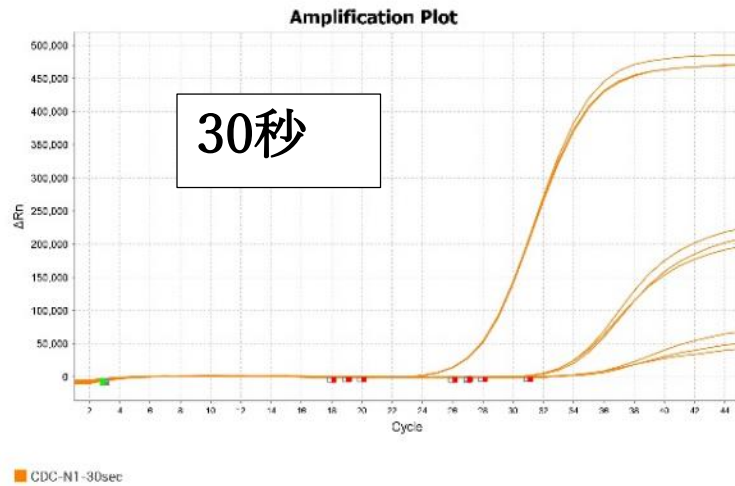
DNA ポリメラーゼ 1

DNA ポリメラーゼ 2

M1pol_{Tth}

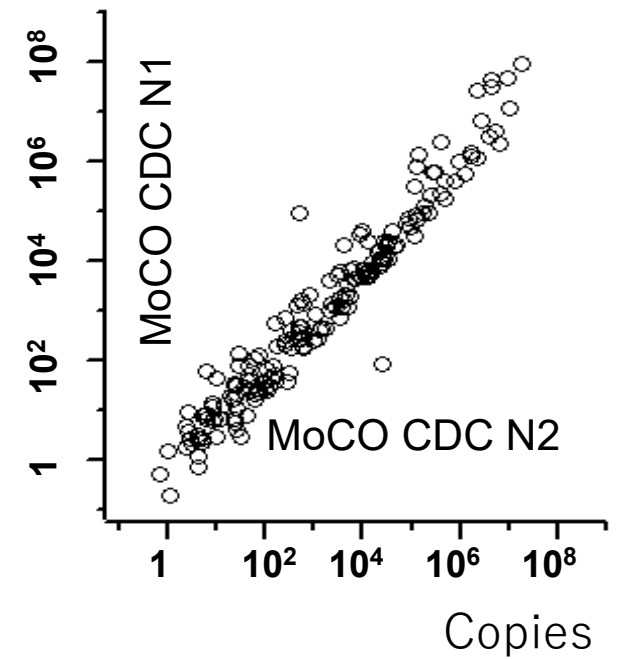
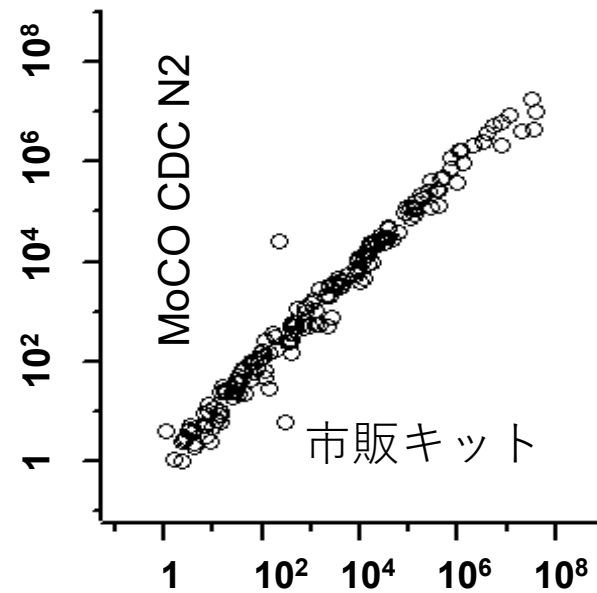
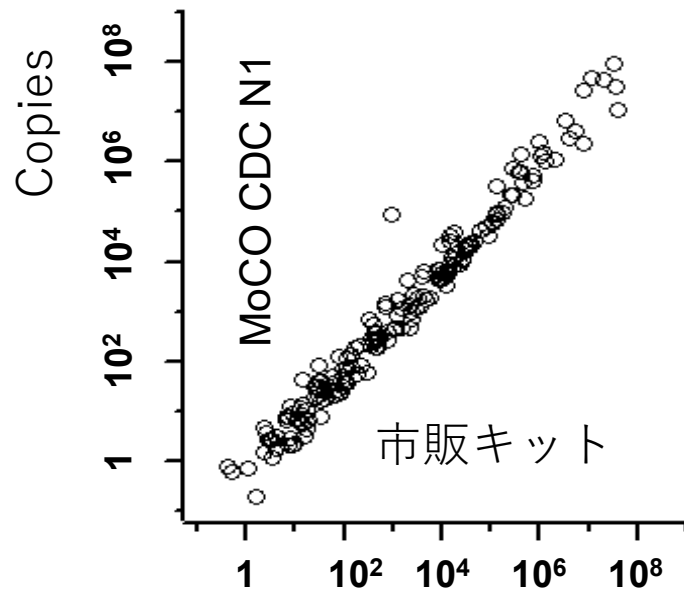
合成SARS-CoV-2 RNA 10,000 コピー

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)

大阪はびきの医療センター（英国型変異PCR実施）

感染症内科主任部長
田村嘉孝

大阪急性期総合医療センター

総合内科主任部長
大場雄一郎

大阪母子医療センター
臨床検査科主任部長
位田忍

集中治療科主任部長
竹内宗之

サンプル

大阪母子医療センター
研究所免疫部門

MoCOキットによる変異型検出

英国型（WHO:Alpha）
南アフリカ型（WHO:Beta）
orブラジル型（WHO:Gamma）
インド型（WHO:Delta, Kappa）
or米国型（WHO:Epsilon）

次世代シーケンサーによる
全ゲノム解析（GISAID登録：
Global Initiative
on Sharing Avian Influenza Data）

大阪府感染症対策企画課

厚労省
「積極的疫学調査
及び変異株に関する
情報提供への協力」

協力：
東北大学・災害感染症
児玉栄一教授

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