



新型コロナウイルス^{*1}、診断と治療

— PCR は血液、ヘパリン混入による PCR 阻害に注意 —

<https://l-hospitalier.github.io>



2020.3

感染対策の基礎知識

#232

【逆転写 PCR】コロナウイルスは ICTV^{*1} の 4 群、+鎖 1 本鎖 RNA。RNA なので PCR は不可^{*2}。ボルチモアとテミン^{*3} 発見の逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT) を使って DNA にコピーし相補的 DNA (compliment DNA, cDNA) にしてマリス^{*4} の PCR (polymerase chain reaction) で核酸増幅する RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) を施行【リアルタイム PCR】PCR は核酸増幅法なので結果の判定は Real-Time PCR; RT-PCR (定量(quantitative) PCR; qPCR とも)

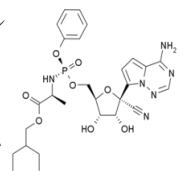
。Real-time PCR は数種あるがプローブ検出法ではオリゴヌクレオチド 5'末端に蛍光物質、3'末端にクエンチャー (quencher; 消すもの) を結合したプローブを設計する。右上図 1) 2) の高温時、あるいは温度を下げたアニーリング中には標識蛍光物質はクエンチャーの近傍にあるためアロステリック効果で紫外線を照射しても発光しない。目標の cDNA の 1 本鎖が存在すると PCR の伸長反応が進行、プローブは cDNA 鎖上から追い出されて遊離、分解して蛍光物質とクエンチャーが離れ、紫外線で蛍光を発する (図最下段)。RNA ウイルスで RT-PCR を行うと RT²-PCR? 蛍光検出のため検査機器は温度を周期的に上下するサーマルサイクラーと紫外線を照射、特定波長の蛍光を検出する分光器の組み合わせになる。右上はタカラバイオ製 RT-PCR 機。風邪の 1~2 割はコロナウイルスなので、新型の判定には遺伝子塩基配列変化の検出が必要。RNA の塩基配列をオリジナルの SARS-CoV-2^{*1} のそれと比較する。(株) 栄研が開発した

【LAMP 法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)】は thermal cycle を使わず定温で核酸増幅、迅速に検査できる。検体遺伝子、4 種のプライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素と基質 (核酸) を混合、65°C で 15~60 分。判定は 650 nm の吸収を測定するネフエロメトリで濁度を検出するものが多い。RNA ウイルスに対しても逆転写酵素を混入する RT(reverse transcription)-LAMP 法の SARS コロナウイルス検出キット (蛍光、濁度) がある。栄研も SARS-CoV-2 用 RT-LAMP 法を開発中。

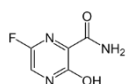
【抗体による抗原ウイルス検出】病状が風邪と異なるのはウイルス表面の蛋白官能基 (エピトープ) が異なるため、抗体を使ったウイルス表面抗原の検出も可能。インフル同様の固相液体クロマトを使う迅速検査も開発中 (デンカ)。コスモ・バイオは H5N1 インフルのヘマグルチニン/ノイラミニダーゼ、West Nile ウイルス、SARS 蛋白、炭疽菌を ELISA^{*5} で検出する抗体キットを販売中【治療】ウイルスは宿主の蛋白合成系を乗っ取って増殖するので抗ウイルス薬は毒性が高い。ギリアドサイエンシズが開発したオセルタミビル (タミフル、1996 年ロッシュにライセンス) はインフルウイルスの表面酵素ノイラミニダーゼを阻害、ウイルスが宿主の細胞膜を被って宿主細胞を脱出するのを阻止。ウイルスをヒト細胞内に閉じ込める。ウイルスが全身細胞に広がってからは無効、病状を悪化させるので投与は発症後 48 時間以内に規制。ノイラミニダーゼを持たないウイルスには無効【レムデジビル】はギリアドが抗エボラ薬として開発し効果を認めた。NIH は新型コロナに対する世界規模の治験を 3 月開始。武漢でも効果を確認。中国、日本の新型コロナウィルス患者に試験使用された。2020/2/24 中国現地を訪問した WHO 代表の一人が「現時点で本当に効果があるとみられる唯一の薬」と発言、注目された。アデノシンヌクレオチドアナログでウイルスの RNA ポリメラーゼを混乱させる? 【ファビピラビル (アビガン)】富山大と富山化学 (富士フィルム) が開発した RNA ポリメラーゼ阻害薬でエボラに有効? 新型インフル対応のため 2017 年日本政府は 4.5 万人分を備蓄する契約を富山化学と締結? ファビピラビル



日本板硝子のモバイル・リアルタイム PCR 装置 picogene PCR1100



レムデジビル



ファビピラビル

^{*1} 国際ウイルス分類委員会正式名称は SARS-CoV-2 (2/11)。 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947> に全塩基配列 ^{*2} 2 本鎖 RNA は 1990 年代発見。 RNA 干渉 (遺伝子発現抑制) 作用。ファイアーとメローが RNA inhibition で 2006 ノーベル賞。 ^{*3} テミンとボルチモアは逆転写酵素で 1975 ノーベル賞。 ^{*4} マリスは PCR 開発で 1993 ノーベル賞。 ^{*5} 酵素結合免疫吸着法。抗原抗体結合に 2 次抗体を結合。2 次抗体にアミラーゼを用いヨード澱粉反応で呈色など。