



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

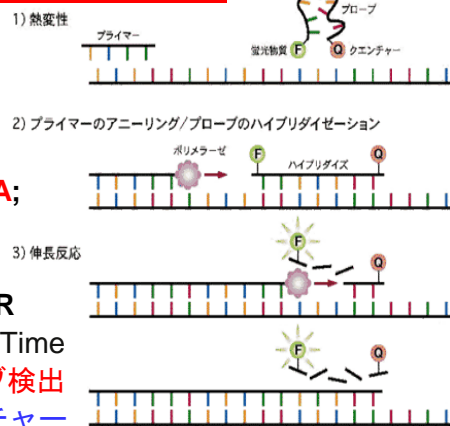
#232

【逆転写 PCR, RT-PCR】 2020/2/11 国際ウイルス命名委員会^{*1}

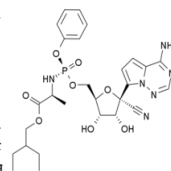
ICTV は塩基配列から新型コロナウイルスを **SARS-CoV-2** と正式に命名。 ICTV 分類 4 群、+鎖 RNA。 RNA ウィルスは PCR 不可^{*2}なので、テミンとボルチモア^{*3}の**逆転写酵素** (reverse transcriptase) で DNA にコピーした相補 DNA (complement DNA; cDNA) についてマリス^{*4}の PCR で核酸増幅する RT-PCR

(Reverse Transcription-PCR) を行う。 【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)。 RNA ウィルスで Real-Time PCR を行くと **RT²-PCR** になる? qPCR は数種あるが**プローブ検出法**はオリゴヌクレオチドの 5'末端に**蛍光物質**、3'末端に**クエンチャー**

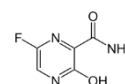
(quencher, 消すもの) を結合したプローブを設計。 右上図 1) 2) の高温時、常温のアニーリング中には標識蛍光物質とクエンチャーが近接しておりアロステリック効果により紫外線で蛍光を発しない。 検索目標の cDNA が存在すると PCR 伸長反応が進行、プローブは cDNA 鎖上から遊離、分解して蛍光物質とクエンチャーが離れ、紫外線で蛍光を発する (図下 2 段)。 Real-Time PCR 機器は温度を周期的に上下する**サーマルサイクラー**と紫外線を照射し特定波長の蛍光を検出する**分光器**の組み合わせになる。 右上はタカラバイオ製 RT-PCR 機。 風邪の 1~2 割はコロナウイルス。 新型コロナウイルス判定には **SARS-CoV-2** と通常のコロナウイルスの RNA 塩基配列を区別できるプライマーやプローブが必要。 (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ェロメトリで濁度を検出するものが多い。 RNA ウィルスに対しては、逆転写酵素を混入する **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) が異なるためで、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 ウィルス、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】 ウィルスは宿主の蛋白合成系を乗っ取って増殖するので区別が困難、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) はインフルウィルスの表面酵素ノイラミニダーゼを阻害、ウィルスが宿主の細胞膜を被って宿主細胞から脱出するのを阻止。 ウィルスをヒト細胞内に閉じ込める。 ウィ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ィルスには無効。 【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治験を 2020/3 開始。 武漢でも効果を確認。 中国、日本の新型コロナウイルス患者に試験投与された。 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ィルスの 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 年日本政府は備蓄契約を富士フィルムと締結?



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} ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) は国際微生物学会所属。 SARS-CoV-2 の全塩基配列は <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947> ^{*2} 2 本鎖 RNA は 1990 年代発見。 RNA 干渉 (遺伝子発現抑制) を起こす。 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 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 抗原抗体結合物に 2 次抗体 (アミラーゼなど) を結合、ヨード澱粉反応で呈色させる。 Radioimmunoassay より簡便。