



新型コロナウイルス、診断と治療



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

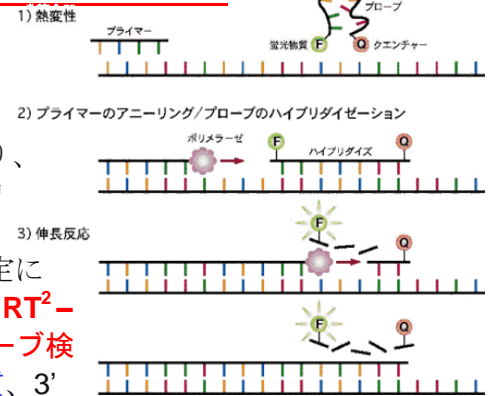
2020.3

感染対策の基礎知識

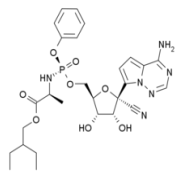
#232

【逆転写 PCR】コロナウイルスは 4 群、1 本鎖 RNA、+鎖。RNA なので PCR はできない^{*1}。ボルチモアとデミン^{*2}が発見した逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT) を使って DNA にコピーし (相補的 DNA, complement DNA) を作り、マリス^{*3}の PCR (polymerase chain reaction) 法で核酸増幅する RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) を行う。

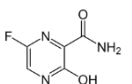
【リアルタイム PCR】PCR は核酸増幅法なので結果の判定には Real-Time PCR: RT-PCR を行う。RNA ウイルスでは RT²-PCR になる? real-time PCR は他にも数種あるが、プローブ検出法はプローブのオリゴヌクレオチドの 5'末端に蛍光物質、3'末端にクエンチャー (quencher: 消すもの) を結合させたプローブを設計する。高温時、あるいは温度を下げてのアニーリング (右図 1) 2)) では標識蛍光物質はクエンチャーの近傍にあるため紫外線を照射しても発光しない。目的とする cDNA の 1 本鎖が存在すると、PCR の伸長反応が進行し、プローブは cDNA 鎖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るので、紫外線で蛍光を発する (図最下段)。この変化を検出するため検査機器は温度を周期的に上下させるサーマルサイクラーと分光器 (紫外線を照射し、特定波長の蛍光を検出) の組み合わせとなる。右上はタカラバイオ製。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変化の検出が必要。RNA の塩基配列をオリジナルの SARS-CoV-2 のそれと比較する。栄研の開発した【LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification)】は thermal cycle なしに 65℃で核酸増幅ができ、迅速に検査ができる。検体遺伝子、4 種のプライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質 (塩基) を混合、65℃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白濁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 R7(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。栄研も新型コロナ用 RT-LAMP 法を開発中【抗体による抗原ウイルス検出】ヒトの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 ウイルス、SARS 蛋白、炭疽菌を ELISA^{*4}で検出する抗体セットを販売。【治療】抗ウイルス薬はウイルスが宿主の蛋白合成系を乗っ取ることから毒性が高い。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表面のノイラミニダーゼ酵素を阻害、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効果が無く、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、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。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 万人分の備蓄契約を富山化学と締結?



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} 2 本鎖 RNA は 1990 年代に発見され RNA 依存性 RNA ポリメラーゼで合成され、RNA 干渉という遺伝子発現抑止作用を持つ。2006 年ファイアーとメローが RNAi 発見でノーベル賞。^{*2} デミンとボルチモアは逆転写酵素の発見で 1975 年ノーベル賞。^{*3} マリスはポリメラーゼ連鎖反応 PCR 開発で 1993 年ノーベル賞。^{*4} 酵素結合免疫吸着法。抗原-抗体複合物に 2 次抗体を結合させ酵素で発色させる。アミラーゼを 2 次抗体とし、ヨード澱粉反応で判定など。