生物化学的測定研究会
Biochemical Assay
Society of Japan

生物化学的測定研究会年報
2022 年　第 26 号　別冊

山本 敬司

新型コロナウイルスワクチン・治療薬・検査技術開発の課題

Curriculum Vitae

Takashi Yamamoto, Ph.D.

Bacillus Tech LLC, Dublin, CA 94568
1-925-556-3423 (landline), 1-510-468-6797 (mobile)

Owner of Bacillus Tech LLC, a biotechnology consulting company. Experienced in managing research projects at Shell, Sandoz, Maxygen and DuPont that require extensive knowledge of virology, microbiology, protein chemistry and molecular biology especially in gene discovery, cloning, expression in *E. coli* and *Bacillus* hosts, protein isolation and characterization, protein engineering (design and construction of mutants), and molecular modeling. Internationally recognized as an expert of *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal proteins (Cry). Also highly experienced in laboratory automation and high throughput screening. Other experiences include university-industry research collaborations, co-founding an international science conference, book editing and reviewer for scientific journals.

Job History

DuPont Pioneer (now called Corteva Agrosciences), Research Fellow
engineering insecticidal proteins, lab automation, 2011- 2019

DuPont Pioneer, Senior Scientist
discovery and engineering insecticidal proteins, 2004-2011

Maxygen (purchased by DuPont Pioneer), Senior Scientist
DNA shuffling of insecticidal proteins, 1998-2004

Sandoz Crop Protection (now a part of Syngenta), Research Manager
Development of sprayable biological insecticides, 1988-1998

Education, Academic Research

Sabbatical Leave (one year), Visiting Scientist
Department of Biochemistry, University of Cambridge, (Molecular Biology)

Academic Position (4 years), Research Scientist
USDA Cotton Insect Laboratory, Brownsville, Texas, (Insecticidal Protein Discovery and Characterization)

Post-doctoral training
Department of Entomological Sciences, University of California, Berkeley
(Virology, Insect Pathology, Entomology)

Ph.D. (Biochemistry)
Division of Biochemistry, Osaka University,
(Protein Chemistry, Structure and Function of Cytochrome Oxidase)

B.S. (Biology)

Department of Biology, Osaka University

新型コロナウイルスワクチン・治療薬・検査技術開発の課題

山本敬司
Bacillus Tech LLC
Dublin, California, USA

はじめに

この度は 2021 年度の生物化学的測定研究会年報に寄稿した「新型コロナウイルス検査技術とワクチン開発の課題」の続編を執筆するよう、研究会特別顧問の大川秀郎神戸大学名誉教授および当研究会会長の上田宏東京工業大学教授からお招きをいただきました。続編は 2022 年 1 月末までの情報に基づいて、最近の m-RNA ワクチンの状況と新規治療薬・検査技術開発が課題です。加えて、これらの課題に関するウイルス独自のタンパク質の構造と機能を少し詳しく解説します。それはこの総説の課題になっている技術開発過程の理解を促進し、さらにこのウイルス、特にオミクロン株の制圧を考える材料にしたいからです。おそらく、研究会の諸賢には不必要な記述が多くあると思いますが、いずれかの項目で参考になることがあれば幸いです。

1. SARS-CoV-2 の構造タンパク質

前報 (文献 1) で新型コロナウイルスの感染・増殖について述べましたが、以下、この続編では正式名 SARS-CoV-2 を使います。図 1 に示すように SARS-CoV-2 はエンベロープウイルス (envelope virus) です(文献 2)。ウイルスエンベロープは、感染した宿主細胞に由来するリン脂質 (phospholipids) と、ウイルスの感染にも関与する構造タンパク質で構成されています。例えば、スパイクプロテイン (Spike Protein、図 1、ピンク色) は標的細胞の ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) を受容体 (receptor) として認識・結合し、ウイルスゲノムが細胞内に侵入します。SARS-CoV-2 のゲノムは約 30 kb の RNA で、ウイルスエンベロープ内に 419 アミノ酸残基の核タンパク質 (Nucleoprotein、緑色) と共に格納されています。エンベロープにはスパイクプロテインの他にエンベローププロテイン (Envelope Protein、橙色) と膜タンパク質 (Membrane Protein、茶色) があります。これらの構造タンパク質はそれぞれの頭文字で N、E および M と略されます。

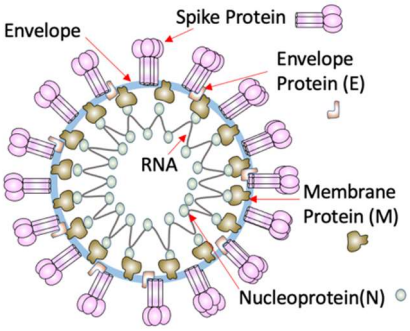


図 1、ウイルス粒子の構造

エンベローププロテイン (E) は 75 アミノ酸残基の比較的小さなタンパク質で N 末端側の膜貫通ドメインと、それに続く C 末端側ドメインの 2 つの異なるドメインで構成されています。このタンパク質は多機能タンパク質で、膜タンパク質 (M) と協働して、ウイルスエンベロープの膜湾曲を誘発するために必要な構造的役割を持っています。さらに、エンベローププロテインの C 末端には、シナプス後肥厚部タンパク質 95/ショウジョウバエディスク大腫瘍抑制因子/細胞接着タンパク質 (Postsynaptic Density protein 95/Drosophila disc large tumor suppressor/Zonula occludens-1 protein) 略して PDZ に結合するモチーフとして知られるアミノ酸配列 VPDLLV があります。エンベ

ローププロテインの PDZ 結合モチーフは宿主肺細胞などの表皮細胞間の密着結合 (TJ、Tight Junction) に関わるタンパク質に結合することにより、宿主の細胞間結合を損壊して、感染者の重症化の原因になるのではと考えられています (文献 3) 。

膜タンパク質 (M) は膜貫通ドメインを持つ糖タンパク質で、222 アミノ酸残基の長さです。このタンパク質の機能はエンベローププロテインやスパイクプロテインと共にウイルスエンベロープの構造を形成する役割と、ウイルスの宿主細胞侵入を助ける役割、さらに宿主の免疫反応の刺激や抑制などの機能があるようです(文献 4)。

スパイクプロテインは 1,273 アミノ酸残基の単量体が 3 分子重合したホモ 3 量体です (図 2-A・ B)。このタンパク質は m-RNA ワクチンの抗原として使用されており、その構造を少し詳しく説明します。図 2-A・ B ではそれぞれの単量体が緑、赤、青の 3 色

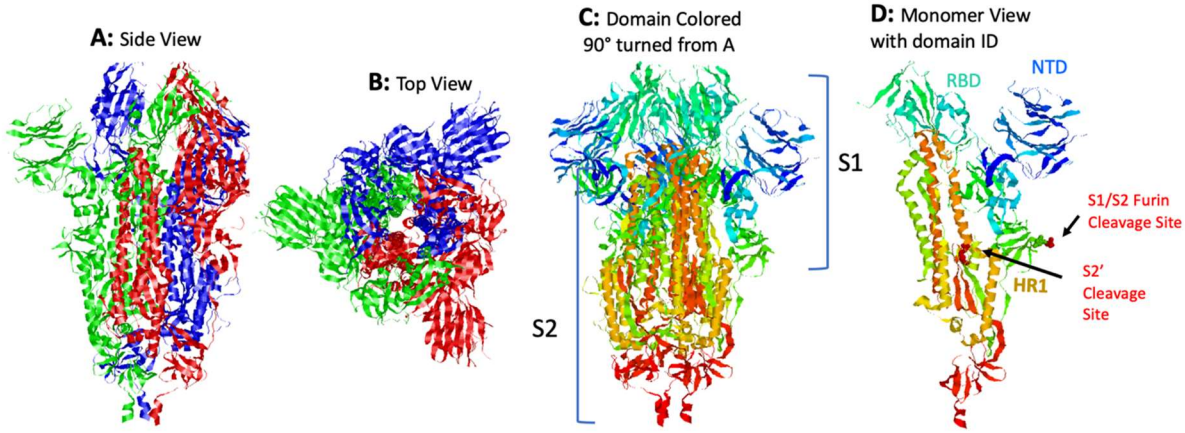


図 2、スパイクプロテインの構造（6VXX.pdb, 27-1147 アミノ酸残基の構造を表示）

に色分けされており、複雑に絡み合って 3 量体を形成しているのが見られます。3 量体の構造は、ウイルスエンベロープから突出している、植物の花茎・花弁の形状に例えられます。図 2-C に示すように、各単量体には S1 と S2 として知られる 2 つの領域があり、3 量体では、N 末端側の S1 領域がウイルスエンベロープ表面から最も遠い花弁のような部分を形成し、S2 領域は 3 量体を所定の位置に保持する花茎のような構造です。

図 2-C・D はアミノ酸配列順によって色分けされており、単量体構造の図 2-D で見ると、S1 にある N 末端ドメイン (NTD、N-Terminal Domain、青色) と受容体結合ドメイン (RBD、Receptor Binding Domain、緑色) が β 鎖の繰り返しであることが認識されます。NTD と RBD ドメインは感染宿主の抗体生成の標的抗原になり、これらのドメインにある変異は受容体親和性を上昇させるのみならず、抗体親和性を低下させる可能性があります。スパイクプロテインの S2 にはウイルスエンベロープと宿主細胞膜の融合に関与し、感染する宿主細胞に侵入してその細胞膜を不安定化する機能を持つ、疎水性アミノ酸の領域が含まれています。さらに S2 には HR1 (Heptad Repeat 1 、図 2-D、茶色) および HR2 と呼ばれる α ヘリックスを形成する、7 アミノ酸残基の反復配列を持つサブドメインも含まれており、これらはスパイクプロテインが宿主細胞と融合する (fusion) 役割への関与から、フュージョンコア (fusion core) 領域とも呼ばれています。これら S2 のサブドメインは、ウイルスの宿主細胞膜との融合プロセスの過程で劇的な構造変化を起こします。その他、S2 にはウイルスエンベロープの膜貫通ドメイン (TM、Trans-Membrane) と、エンベロープ膜内に突出している C 末端

ドメイン (IC、Intra-Cellular) も含まれます。ちなみに図 2 に使った 6VXX.pdb には 1,148-1,273 アミノ酸残基は含まれていませんので、この図には HR2 (1,163-1,211 アミノ酸残基)、TM (1,212-1,234 残基)、IC (1,235-1,273 残基)は表示されていません。

スパイクプロテインは宿主細胞のプロテアーゼでペプチド鎖が 2 か所で切断されて活性化されます。最初の切断でスパイクプロテインが宿主受容体である ACE2 に結合して、2 番目の切断でウイルスエンベロープと宿主細胞膜の融合がスパイクプロテインの S2 ドメインを介してなされます。スパイクプロテインの構造で、これらの切断場所は分子表面 (solvent exposed) のプロテアーゼが接近しやすいループ部位にあります。

宿主の咽頭や気管細胞に存在するフーリン (furin) と呼ばれる、セリンプロテアーゼはスパイクプロテインを R685 の C 端側で S1 と S2 に切断します。この切断箇所は図 2-D に「S1/S2 Furin Cleavage Site」として示されています。SARS-CoV-2 のスパイクプロテインではフーリン切断サイトは図 2-D に示されているように、分子表面にあるループの一部で構造的に一定しておらず、3 次元構造モデルでは解明されていない部分です。スパイクプロテインは宿主細胞の ACE2 に結合しますが、最初は閉じた構造 (6ZGI.pdb、図 3 左) であり、受容体結合モチーフ (RBM、Receptor Binding Motif) への ACE2 の接近・結合は困難です。そこで、フーリンがスパイクプロテインの S1/S2 フーリン切断サイトに切り込みを入れてタンパク質のレセプター結合ドメイン (RBD) を外向きに開き (6ZGG.pdb、図 3 右)、ACE2 への接近・結合を可能にします。

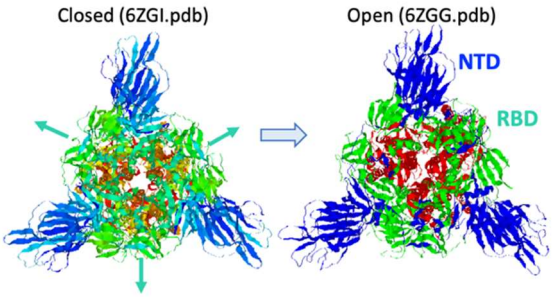


図3、スパイクプロテインの構造変化
(Top View)

SARS-CoV-2 のスパイクプロテインは、フーリンにより S1/S2 フーリン切断サイトのアミノ酸配列 **$N_{679}S_{680}$PRRAR_{685}/S_{686}** が高効率で認識・切断されるので、ウイルスの感染力は以前のコロナウイルスに比べて格段に高くなっています。このサイトはコロナウイルスの仲間では SARS-CoV-2 に特異です (文献 5)。2003 年に流行した SARS-CoV のフーリン S1/S2 切断サイトのアミノ酸配列は **LL----R/S** で、SARS-CoV-2 にある **PRRA** がありません。SARS-CoV-2 の余分なプロリンは、それに続く 2 つのアルギニンと、プロリンの N 端側のアスパラギン (N_{679}) とセリン (S_{680}) の合計 4 残基の親水性アミノ酸と相まって、このサイトを含むペプチド鎖を分子の外側へ押し出す効果があり、フーリンの接近・切断を促進すると考えられます。その上、この SARS-CoV-2 のフーリン切断サイトのアミノ酸配列をコードする RNA の塩基配列も異常です。R (アルギニン) をコードするコドンは 6 種類あり、その利用頻度は種特異性があります。すなわち特定の種、この場合はコロナウイルスが好んで使うコドンがそれぞれのアミノ酸にあります。文献 5 によると、アルギニンに CGG コドンを使うのはコロナウイルスでは稀で、さらにその稀なコドンを CGG-CGG と繰り返すのも不自然で、このウイルスが人工的に作られたのではとの説の論点の 1 つになっています。

さらに、スパイクプロテインには、膜貫通型セリンプロテアーゼ 2 型 (Trans-Membrane Serine Protease 2) などの宿主細胞膜結合プロテアーゼによって、2 番目に切断される S2' 切断サイト (図 2-D、S2' Cleavage Site) があります。この切断で、スパ

イクプロテインは S2 の HR1 と HR2 を含むフュージョンコアの構造が変化することにより宿主細胞膜と融合し、ウイルスが宿主細胞に挿入されます。

2. ウイルスゲノム

高等動物では遺伝情報は DNA で保存されており、発現する遺伝子は m-RNA (messenger-RNA) に転写されタンパク質が合成されます。一方、SARS-CoV-2 のゲノムは m-RNA の形をとっています。例えばポリ A 末端 (poly A tail) があり、RNA 分子をより安定させ、その分解を防ぎます。ウイルスの m-RNA の塩基配列に従ってタンパク質を合成をするのは宿主細胞内のリボゾーム (Ribosome、図 4、茶色) で、酵素や RNA を含む巨大タンパク質合成工場です。このリボゾームが m-RNA を取り込み、その上の 3 塩基単位でコードされたアミノ酸の情報を青写真としてそれぞれのコドンに相補的に合致する t-RNA (transfer-RNA) を介してアミノ酸を結合し、ペプチド鎖 (図 4、Peptide Chain) を合成します。t-RNA は図右のように一方に塩基コドンを持ち、他端にそのコドンで決まるアミノ酸を持っています。細胞内で t-RNA はヘアピン構造と、他の理由 (後述) で比較的安定です。

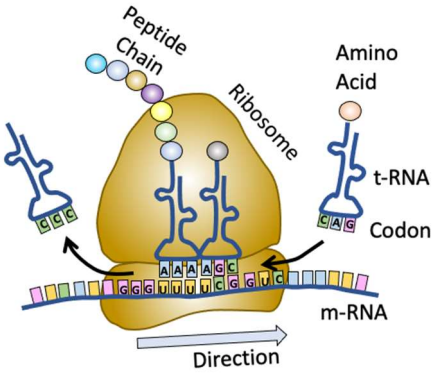


図 4、リボゾームの機能

ウイルス RNA のような 1 本鎖は、細胞内では 2 本鎖 DNA と比較すると不安定です。もし、m-RNA が DNA のように安定であれば、細胞は必要以上に長時間タンパク質を合成して合成量の制御が効かなくなる可能性があります。ヒトなどの高等動物では DNA が 2 本鎖で相補されていますので、化学物質や放射線で一方のヌクレオチドが破損しても相補鎖から修復することができます。これも RNA ウイルスが DNA を持つ高等動物に比べで変異頻度の大きい 1 つの理由です。

3. SARS-CoV-2 の NSP タンパク質

30 kb のウイルス RNA ゲノムの塩基配列はパンデミック初期に中国で解明され (文献 6)、それによると 5' 側の約 21 kb は単一 ORF (Open Reading Frame) で連続した 16 の非

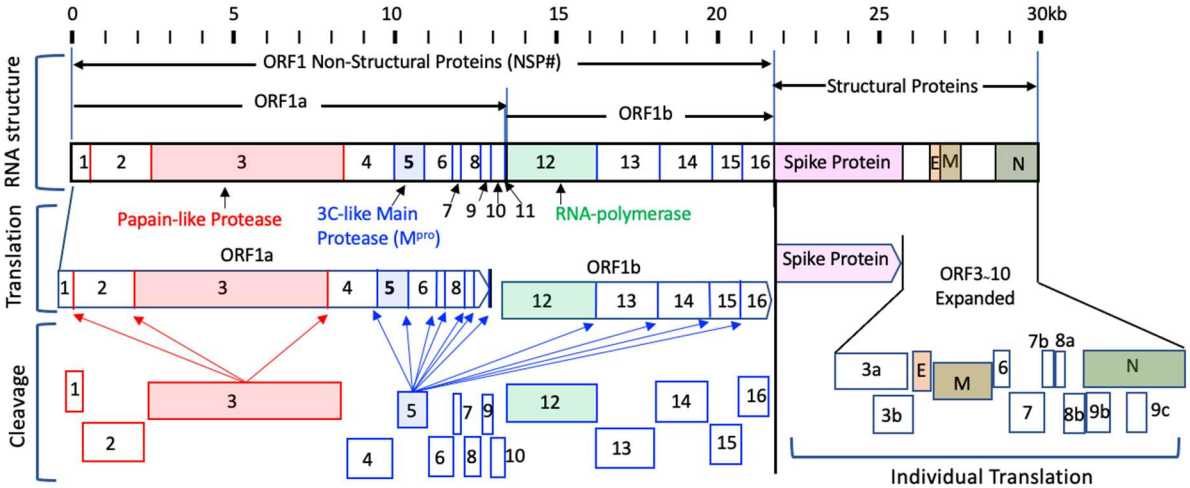


図 5、SARS CoV-2 の RNA にコードされているタンパク質（構造タンパク質の色は図 1 に対応）

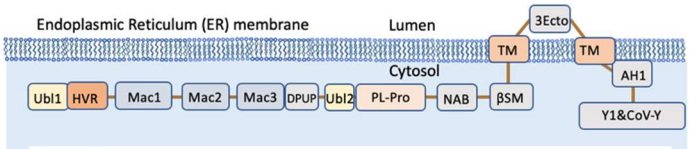
構造タンパク質 (NSP、Non-Structural Protein) のアミノ酸配列をコードしています (図 5)。それらのタンパク質には NSP1 から NSP16 の NSP 番号がついています。NSP の ORF は宿主細胞のリボゾームによって、ORF1a (4,401 アミノ酸残基)と ORF1b (2,704 アミノ酸残基)として RNA から翻訳後、この ORF1a にコードされている 2 つのプロテアーゼのうち、NSP3 (パパイン様プロテアーゼ、papain-like protease、図 5、ピンク色) が NSP1-2、NSP2-3 および NSP3-4 の 3 箇所の境界にある LK(N)GG/A(K)を切断します (赤矢印)。NSP5 (3C 様システインプロテアーゼ、3C-Like Cysteine Protease、3CL Main Protease とも呼ばれる、図 5、青色) は残りの NSP4-5 から NSP15-16 の 11 境界の L(F,V)Q/S(A,N)を切断します (青矢印)。ちなみに、3C-Like とはピコルナウイルスの 3C プロテアーゼに類似しているとの意味です。

RNA の 3' 側、約 8.5 kb にコードされている構造タンパク質 (Structural Proteins) はそれぞれ別個に翻訳 (Individual Translation) されます。図 5 右側にある構造タンパク質の ORF3a から ORF10 は NSP タンパク質やスパイクプロテインと同じスケールにしますとこの図ではあまりにも混み合いますので下に拡大して (Expanded) 描きました。

これらの NSP タンパク質の機能とアミノ酸残基数は右の表にまとめられています。NSP3 の切断点のアミノ酸配列は表の「Cleavage Sites」カラム中に赤線で示しています。同じように NSP5 の切断点は青線です。この表にある NSP タンパク質の機能は文献 6 と文献 7 および Uniprot を参考にしましたが、いくつかのタンパク質で複数ドメインによる異なった機能があり (例えば後述の NSP3)、この表では代表的な機能のみを示しています。

	Non-Structural Proteins			Cleavage Sites	
	NSP No	Protein Function	aa	C-term Seq	Next N-term
ORF 1a	1	host cell protein synthesis inhibitor	180	LMRELNGG	AYTRYVDN
	2	modulation of host cell survival signaling pathway (?)	638	NTFTLKGG	APTKVTFG
	3	papain-like protease digests viral NSP proteins (3 sites)	1945	TKIALKGG	KIVNNWLK
	4	bubble maker in host cell for viral production	500	SITSAVLQ	SGFRKMAF
	5	3C-Like Main protease digests viral NSP proteins (11 sites)	306	QCSGVTFQ	SAVKRTIK
	6	inhibits IFN-beta production (?)	290	CIKVATVQ	SKMSDVKC
	7	helper of NSP12 (make viral genomic RNA copy)	83	LDNRATLQ	AIASEFSS
	8	dimer partner of NSP7	198	ANSAVKLQ	NNELSPVA
	9	suppresses cell immune response (?)	113	LAATVRLQ	AGNATEVP
	10	protect RNA from immune attack (host antiviral protein)	139	QLREPMLQ	SADAQSFL
	11	part of NSP12, peptide not sure if it exists independently	9		
ORF1b	12	makes viral RNA copy (RNA polymerase)	932	YTPHTVLQ	AVGACVLC
	13	unwinds viral RNA for translation (helicase)	601	RRNVATLQ	AENVTGLF
	14	proofreading (exonuclease)	527	WNTFTRLQ	SLENVAFN
	15	RNase to digest surplus RNA (endRNase) (?)	346	ETFYPKLQ	SSQAWQPG
	16	protect RNA from immune attack	298	SSDVLVNN	

NSP3 は 1,945 アミノ酸残基で約 200 kDa のプロテアーゼです (文献 8。NSP3 はプロテアーゼ活性を持つ PL-Pro ドメイン以外に 14 ドメインがあり、それぞれ特異な機能を持つ多機能タンパク質です (図 6)。この続編には含まれていませんが、NSP3 は新規治療薬の標的になっています (文献 9)。通常、健康な細胞は不要なタンパク質を破壊するための標識を付けますが、SARS-CoV-2 の NSP3 はこれらの標識を削除して、タンパク質のバランスを変化させ、細胞のウイルスと戦う能力を低下させると言われています。図 6 にあるように NSP3 は小胞体 (Endoplasmic Reticulum) 由来の膜でできたベシクル (vesicle) に含まれており、2 つの膜貫通領域 TM1 および TM2 (Trans-Membrane) を介して、小胞体膜を 2 回通過しま



Ubl	Ubiquitin-like domain, bind to Nucleoprotein/RNA
HVR	Glu-rich Hyper Variable Region
Mac1	Macrodomain, similar to MacroH2A variant of human histone 2A, blocks
Mac2,3	RNA binding, works with DPUP
DPUP	Domain Preceding Ubl2 and PL2^{pro}, fine tunes the RNA binding of Mac2,3 at
PL-Pro	Papain-Like Protease, *aka* PL2^{pro}
NAB	Nucleic-Acid Binding domain,
βSM	Beta-coronavirus-Specific Marker
TM	Trans-Membrane region
3Ecto	NSP3 Ectodomain (extracellular domain), binds to NSP4 to help PL-Pro to cut
AH1	Amphipathic Helix , attaches to the ER membrane,
Y1&CoV-	Unknown function

図 6、NSP3 のドメイン構造（文献 9 引用）

す。AH1 ドメインは TM2 の隣の ER 膜に付着した両親媒性ヘリックス (Amphipathic Helix) です。3Ecto ドメインを除いて、他のすべてのドメインはサイトゾルにあります。図 6 下の表にまとめた NSP3 ドメインの名称と機能はこの文献 9 で述べられている各ドメインの複数機能の一部の抜粋です。

NSP5 は 306 アミノ酸残基でできた 3C 様システインプロテアーゼで、ホモ 2 量体を形成しています。単量体は図 7 に示すように 3 領域に分割できるドメイン構造を持っており、それらのドメインは N 末端から、構造が類似するキモトリプシン様のドメイン I (8-101 アミノ酸残基、青)と、3C プロテアーゼ様のドメイン II (102-184 アミノ酸残基、シアン) があり、それらは 6 本鎖の逆平行 β バレル折り畳み構造を持っています。NSP5 の活性中心 (図 7、赤囲) はドメイン I と II の間の裂け目にある **His41** と **Cys145** が関与しており、ドメイン II は長いループ (184–199 アミノ酸残基、赤色) を介してドメイン III に接続されています。C 末端側には α ヘリックスで構成されたドメイン III (201-303 アミノ酸残基、緑) があり NSP5 の 2 量体を形成するのに寄与しています。後述の NSP5 阻害剤は治療薬として、SARS-CoV-2 に非常に特異的であり、NSP5 はヒトのプロテアーゼと相同性を共有しないため副作用は最小限に抑えられます。NSP5 はウイルスに不可欠な酵素なので活性を阻害することによってウイルスの増殖を強力に阻害することができます。

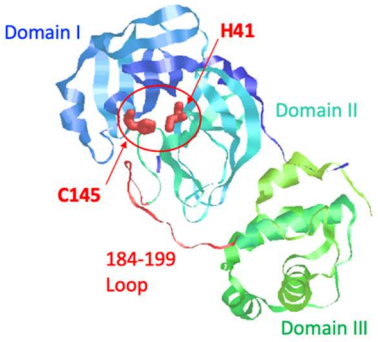


図 7、NSP5 の構造 (6LU7.pdb)

NSP12 は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase、RdRp) です。図 8 にあるように NSP12 は NSP7 と NSP8 のヘルパープロテインと共にヘテロ複合体を作り、この複合体で形成される分子中の空洞で RNA が複製されます。この空洞内側に面する NSP7 (緑色) と NSP12 (灰色)の α ヘリックス上のアミノ酸残基が複製済みの RNA を突起のあるベルトコンベアーのように移動させ、RNA の複製点を酵素の活性サイトに送り込みます。この過程は文献 10 に詳細に解説されています。

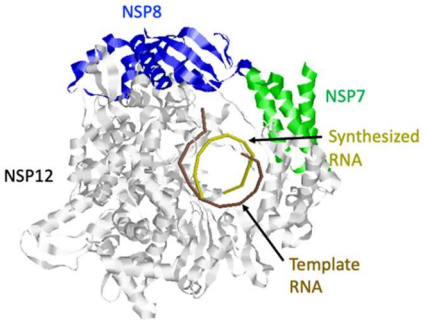


図 8、NSP12 の構造 (7B3B.pdb)

DNA・RNA の構成要素はヌクレオチド (nucleotide) です。ヌクレオチドは、リン酸基と窒素含有塩基 (nitrogenous base) に結合した糖分子 (RNA のリボースまたは DNA のデオキシリボース) で構成されます。DNA で使用される塩基は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン(G)、およびチミン (T) ですが、RNA では、ウラシル (U) がチミンの代わりになります。C と U

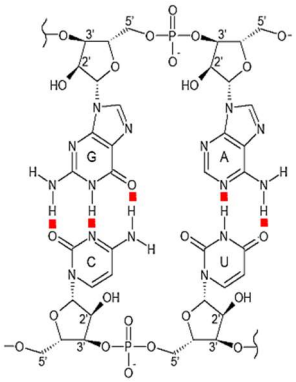


図 9、ヌクレオチド結合

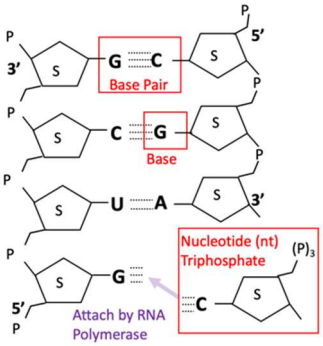


図 10、RNA 複製

はピリミジン (pyrimidine) 骨格を、A と G はプリン (purine) 骨格を持ち、それぞれ A=U、G=C でペアを組みます。図 9 に示すように A=U ペアは 2 重の、G≡C ペアは 3 重の水素結合 (図 9、赤色) を持っています。DNA 複製と RNA 転写、および RNA からのタンパク合成には方向性があり、リボースにリン酸基がついている場所 5'→3' で決まります。RNA 複製は図 10 に示されているように、左側にある鋳型鎖ヌクレオチド、この図の場合はグアニン (G) にマッチするシトシン (C) が複製されつつある RNA 鎖に NSP12 (RNA ポリメラーゼ) の作用で付加されます。NSP12 は後述の新規治療薬の標的になっており、治療薬の作用機作はその項目で考察します。

NSP14 は RNA の校正機能 (proof-reading)を持つ、3'-5'エキソリボヌクレアーゼ (3'-5' exoribonuclease) です。NSP12 でウイルスゲノムを複製する時、新しいコピーに間違った塩基が取り込まれると、NSP14 はこれらのエラーを排除するためその塩基を取り除き、代わりに正しい塩基を追加することで複製の忠実度を高めます。高等動物の DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase) はそれ自身 NSP14 のような校正機能がありますが、NSP12 のようなウイルス RNA ポリメラーゼや PCR で利用される Taq DNA ポリメラーゼはこの機能を欠くため高等動物の DNA 複製エラー頻度の 100 倍に相当する 10^4 塩基当たり 1 塩基のエラー (変異) を生じ，変異が起こりやすいのです。SARS-CoV-2 は NSP14 の校正機能を持っているのでその頻度は低いはずです。それにも関わらず頻繁に変異株が出現するのは、全世界であまりにも感染者が多いため、このウイルスの複製が超高頻度でなされているからです。文献 11 によりますと、感染のピーク時には感染者一人当たり推定 10 億から 1,000 億のウイルス粒子を持っているそうです。Worldometer (文献 12) では 2022 年 1 月時点、全世界で通算約 3 億人の感染者が出ましたので、増殖されたウイルス総数は通算 10^{17} から 10^{19} になります。この巨大数字でこのパンデミックがいかに大変な事態で、頻繁な変異株の出現も理解できると思います。

ここまでウイルスやそのゲノムの構造を述べましたが、これはこの続編の課題であるワクチン・新規治療薬・検査技術開発と、デルタ株やオミクロン株などの変異株を理解するための材料です。以下に述べる m-RNA ワクチンはスパイクプロテインが、新規治療薬は NSP5 と NSP12 が標的になっていますので、なぜそれらが標的になっているのか、また変異によってワクチンや治療薬の効果がどのように変化するのかなど、タンパク質の構造と機能をもとに考察します。

4. m-RNA ワクチン開発の基本技術

日本で使用されている Pfizer-BioNTech や Moderna のワクチンは m-RNA ワクチンです。m-RNA ワクチンの研究はこのコロナ禍以前からありました。m-RNA ワクチンの原理は、病原体抗原の遺伝情報をコードする m-RNA を体内に注入し、宿主細胞中で病原体抗原を作らせ、免疫反応を惹起させるものです。従来型ワクチンは病原体を培養して、それを弱 (無) 毒化して使う弱毒化ワクチンで、免疫に必要な抗原以外の病原体構成物質に対するアレルギーの可能性が高くなります。m-RNA ワクチンでは必要な抗原のみ (SARS-CoV-2 ではスパイクプロテイン) を使うので不必要な抗体産生やアレルギー反応などが起こりにくいはずです。しかし、開発初期には m-RNA を実験動物に注射しても抗体の生成

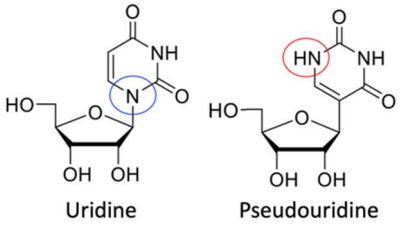


図 11、**Pseudouridine**

があまりにも低く、原因を調べるとワクチンの m-RNA が体内で急速に分解されることが見つかりました。一方、細胞内で比較的安定な t-RNA (transfer RNA)は uridine の類縁体である pseudouridine (図 11) を利用していることから、pseudouridine を使って合成した m-RNA ワクチンを実験動物体内に注射すると大量の抗体ができることが分かりました。この発見は在米のハンガリー出身女性研究者 Katalin (Kati) Kariko 博士 (写真右、文献 11 引用) が米国での長年にわたる地道な RNA 安定性の研究でなしとげた成果です。この技術に着目してそれぞれのワクチンを開発したのが、我々に多大な恩恵をもたらした Pfizer-BioNTech と Moderna の m-RNA ワクチンです。

他の基本技術はナノ脂質粒子 (NLP、Nano-Lipid Particle) です。裸の m-RNA は不安定で細胞に取り込まれ難いので、それをリン脂質で出来た微小粒子に組み込んでワクチンにします (文献 14) 。図 12 に示すように、ワクチンの m-RNA は電荷を持った脂質 (Ionized lipid) を含む超微小脂質粒子に収納されており、さらにそれらの塊がリン脂質 (Phospholipid)、コレステロール (Cholesterol) および PEG (Poly-Ethylene Glycol) 化された脂質 (PEGylated lipid) などでできた約 200 nm の NLP に格納されています。この外側の脂質膜は m-RNA を保護すると共に、NLP が細胞と融合して m-RNA を細胞内に配達する役割を持っています。m-RNA ワクチンは不要な抗原になる可能性のあるタンパク質は含みませんが、PEG が特に若い女性に多いアナフィラキシーの原因となっているのではないかと言われています。これは PEG を含有する化粧品が多い事に関係があるのかもしれません。

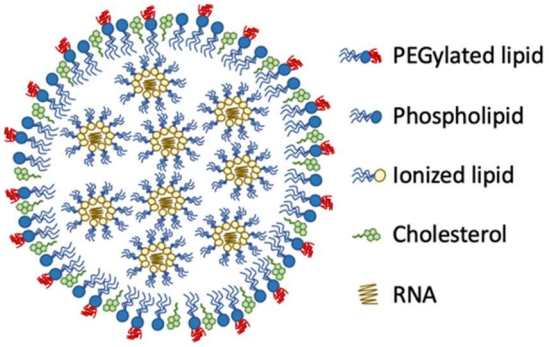


図 12、ワクチンの超微小脂質粒子

5. ワクチン製造技術の概略

この項目は複数の論文・記事を参考にしましたが、ここでは製造方法を New York Times の記事 (文献 15)を主な引用源としました。まず図 13 に示すように SARS-CoV-2 のスパイクプロテイン遺伝子をプラスミドにクローニングします (図 13-A) 。おそらくこのウイルス遺伝子は人工合成されていると思います。

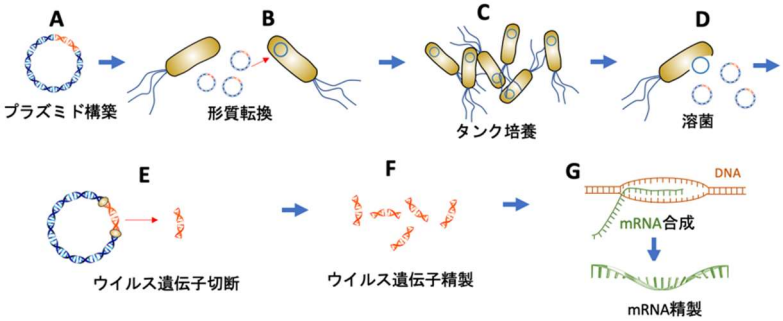


図 13、m-RNA ワクチン製造工程 (文献 15 参照)

プラスミドは、細胞の染色体 DNA とは異なる小さな環状の DNA 分子で、細菌細胞や一部の真核生物に自然に存在しています。多くの場合、プラスミドに含まれる遺伝子は、抗生物質耐性などの細菌生存に優位な役割を細菌に提供します。プラスミドの長さは、およそ 1,000 から数 10 万の DNA 塩基対までさまざまです。細菌分裂時に細胞内に含まれるプラスミドが複製され、それぞれの娘細胞にコピーが分配されます。研究者たちは

プラスミドを利用して、遺伝子のクローン作成や形質転換などを行うためのツールとして使用しています。

このスパイクプロテインの遺伝子がクローニングされたプラスミドを大腸菌に形質転換し(図 13-B) 、巨大な培養タンクで培養して菌体を増やしてから (図 13-C) 、大腸菌を溶解してプラスミドを回収し精製します (図 13-D) 。精製されたプラスミド DNA を制限酵素で切断してウイルス遺伝子を分離・精製します (図 13-E・F)。Pfizer ではこの工程までを Missouri 州 St Louis 近郊の Chesterfield にある工場 (写真右、文献 15 引用)で実施して、遺伝子 DNA を Massachusetts 州 Andover にある工場に送り、そこで DNA から RNA ポリメラーゼを用いて m-RNA を合成・精製します(図 13-G)。その後 m-RNA を−20°C で冷凍して Michigan 州 Kalamazoo に送り、そこで RNA をナノ粒子脂質に収納し、最終製品として瓶詰めされます。この全工程は分子生物研究者の小規模実験では容易ですが、工業化するのは写真のような高価な設備費と、政府認可を受けた医薬品基準の製造技術が必要です。

ワクチンに使用される遺伝子 DNA はおそらく化学的に人工合成されますので、これを新規の変異株、例えばオミクロン株に適用するのは容易です。スパイクプロテインの遺伝子は約 3.8 kb ですので合成は約 1 週間ほどで出来るはずです (文献 16)。合成された遺伝子をプラスミドにクローニングするのは研究室レベルで短時間で成し遂げられ、その後は既存の生産設備が使えます。しかし、ワクチン開発で時間がかかる過程は安全性と有効性の確認をする臨床治験で、この過程に多くの時間と莫大な経費が必要です。ワクチン商品化の問題は多大な時間と経費をかけて開発し、使用認可を受けてもその時まで流行が続かない可能性です。もし南アフリカで見られたように、オミクロン株の流行が他国でも短期に収束すればこの株に対するワクチンの必要性は無くなるので製薬会社は投資に慎重にならざるを得ません。

6. COVID19 新規治療薬

治療薬については以前の総論 (文献 1) で 2021 年 2 月時点での情報を紹介していますので、この総説では、新規の Pfizer のウイルスのプロテアーゼ阻害剤 と Merck, Sharp and Dohme (MSD) の RNA ポリメラーゼ阻害剤について紹介します。これらの治療薬は前述の「SARS-CoV-2 の NSP タンパク質」の項目で述べた NSP5 と NSP12 が標的です。

Pfizer は 2003 年の旧コロナウイルス (SARS-CoV) 流行時に、治療薬としてウイルスの NSP5 (3C-Like Main protease、3CL-M^{pro}) を標的にする阻害剤を研究・開発していましたが、流行が終息したので棚上げになっていました。しかし今回のパンデミックで開発を再開し、初めは lufotrelvir (PF-07304814) なる化合物を静脈注射剤で治験していましたが、2021 年には類似化合物 nirmatrelvir (PF-07321332) を NSP5 を阻害する経口薬として感染者に対する治験を始め、2021 年 11 月には重症化で入院や死亡するリスクが 89%防げるとする第 2・3 相試験の中間結果が発表されました (文献 17)。この nirmatrelvir の第 3 相治験中のエピソードとして、偽薬を投与された患者群には死者が出るのに、真薬を投与された患者には死者が無く、このままでは助かる命も救え

ないので倫理的に問題であるとの議論があったそうです。COVID-19 による医療崩壊を防ぐのに希望が持てる治療薬です。

この化合物の構造は図 14 左のようにニトリル基 (赤囲) の炭素が酵素の活性に必須の Cys145 チオール基とチオイミデート付加物を形成して (図 14 右、赤囲) 酵素活性が阻害されます。図 14 右では緑色表示の nirmatrelvir が結合する NSP5 のアミノ酸残基は灰色です。この化合物は NSP5 の 3CL-M^{pro} 活性の強力な阻害剤 (Ki = 3.11 nM) であり、抗ウイルス活性も Vero E6 細胞を使って EC_{50} = 74.5 nM とされました (文献 18)。Vero E6 はアフリカミドリザルの腎臓上皮細胞に由来する培養可能な細胞株で、SARS-CoV-2 に高い感受性を示すので治療薬研究によく使われています。

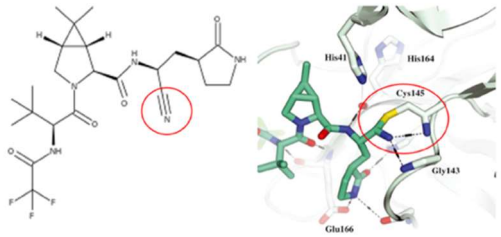


図 14、nirmatrelvir 構造と NSP5 との結合
（文献 18 引用）

このように nirmatrelvir は NSP5 (3CL-M^{pro}) 酵素活性を阻害しますが、経口薬として効果を高めるため ritonavir (商品名 Norvir®)と混合して使用します。Norvir は以前からある抗 HIV ウイルス薬でそれ自身 HIV ウイルスのプロテアーゼ阻害剤ですが、その上 nirmatrelvir を患者の体内で代謝するヒトの酵素 (cytochrome P450) の阻害剤でもあります。Pfizer は 2021 年 11 月 16 日に nirmatrelvir-ritonavir 複合薬を商品名 Paxlovid™ (パクスロビド、日本名パキロビッド) として低・中程度の症状を持つ患者が重症化して入院または死亡するのを防止するために緊急使用認可を申請して、同年 12 月 22 日に米国 Food and Drug Administration (FDA)によって承認されました (文献 19) 。シオノギの S-217622 経口抗ウイルス薬も Pfizer のような SARS-CoV-2 の NSP5 (3CL-M^{pro}) の阻害剤です。

別種の抗ウイルス薬は Merck により開発された経口薬で、ウイルスの NSP12 がコードする RNA ポリメラーゼ (RdRp) を標的とする molnupiravir (モルヌピラビル) です (文献 20)。molnupiravir の成分である β-d-N^4-hydroxy-cytidine (NHC) triphosphate (図 15 左) の塩基部分はシトシン (C) とウラシル (U) の類縁体です。図 15 右には比較のためシトシンとウラシルの構造を示しています。前項で述べたように NSP12 (RdRp) がこれらの塩基で鋳型 RNA にあるグアニン (G) やアデニン (A) とペアを組むとき、シトシン (C) とウラシル (U) の代わりに NHC を取り込みます。このことによりウイルス RNA に高頻度の変異を生じさせ、ウイルスを不活化します。Merck の経口薬は米国で 2021 年 12 月 23 日に FDA により、商品名 Lagevrio® (ラゲブリオ) として緊急使用が認可がなされました(文献 21)。

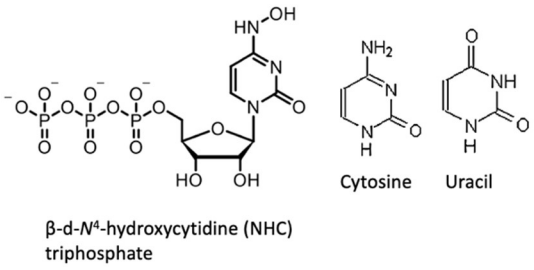


図 15、molnupiravir (NHC) の構造

しかしこの治療薬の効果は期待されていたほど高くなく臨床治験の初期段階で感染後の入院必要性の減少が 50%とされていたのが、その後、30%に低下して専門家の間で懸念が表明されています (文献 22)。この違いは、被治験者が感染しているウイルスの変異株が治験中に高感染性変異株に置き換わり、治験後期にはこの治療薬の効果が低下したのかもしれません。そこで、文献 22 にある治験の経過をこの文献の記

述を日本語訳して引用します。引用にある 2 つの治験者グループの時期の違いに着目してください。『Merck の最初の被治験者グループには、2021 年 5 月から 8 月初旬までの 5 日間、モルヌピラビルまたは偽薬 (プラセボ) のいずれかの 4 錠を 1 日 2 回連続して投与された 762 人が含まれていました。2 番目のグループは、同年 8 月から 10 月初旬に同じ治療を受けた 646 人でした。治験参加者全員は COVID-19 症状の発症から 5 日以内に薬の投与を受け始め、治験実施者は参加者をグループごとに追跡し、COVID-19 感染により入院・死亡した人の数を調べました。最初のグループでは、参加者がモルヌピラビルを服用した場合、入院・死亡の割合が偽薬グループに比べて半分 (50%) に減少しました。しかし、2 番目のグループでは、偽薬と比較して抗ウイルス薬の結果にほとんど違いはありませんでした』とのことで後の項目で考察しているように、おそらく後期 (2021 年 8 月から 10 月) の治験期間中ではデルタ株が蔓延しており、それによってモルヌピラビルの効果が低下したと考えられます。これはデルタ株の NSP12 にある変異が原因とするよりは、単にデルタ株の高感染性が原因だと思います。このようにワクチンや治療薬の開発はウイルス変異に比べて後手になっており、何らかの革新的な考え方が必要では無いでしょうか？

7. オミクロン変異株

インドで初めて分離されたデルタ株による感染者数の急上昇が日本でも 2021 年夏にありましたが、この懸念が 2022 年 1 月に突然流行し始めた南アフリカ由来のオミクロン株で現実となりました。図 16 の SARS-CoV-2 の進化系統樹が示すように、オミクロン株は他の系統から独立しているようです (文献 23)。これはおそらくアフリカ大陸内で独自に進化していながら、ゲノム分析が不充分で、SARS-CoV-2 の研究者に捕捉されることなく、南アフリカで初めて発見されたのではないでしょうか？新型コロナウイルスの系統樹はどれだけの株が分離され、ゲノムの塩基配列が調べられているかで違ってくるはずです。

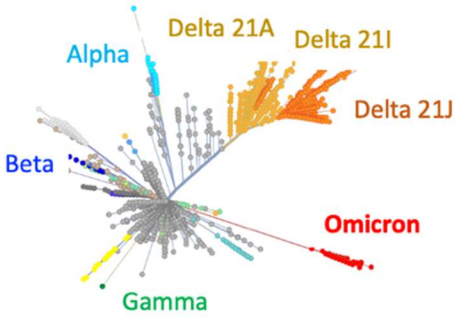


図 16、SARS-Cov-2 の進化系統樹
（文献 23 引用）

図 17 は文献 24 に基づいた、デルタ株 B.1.617.2 とオミクロン株 BA.1 のアミノ酸変異とその遺伝子上の位置を示しています。この図にある変異表記は、例えば、P323L

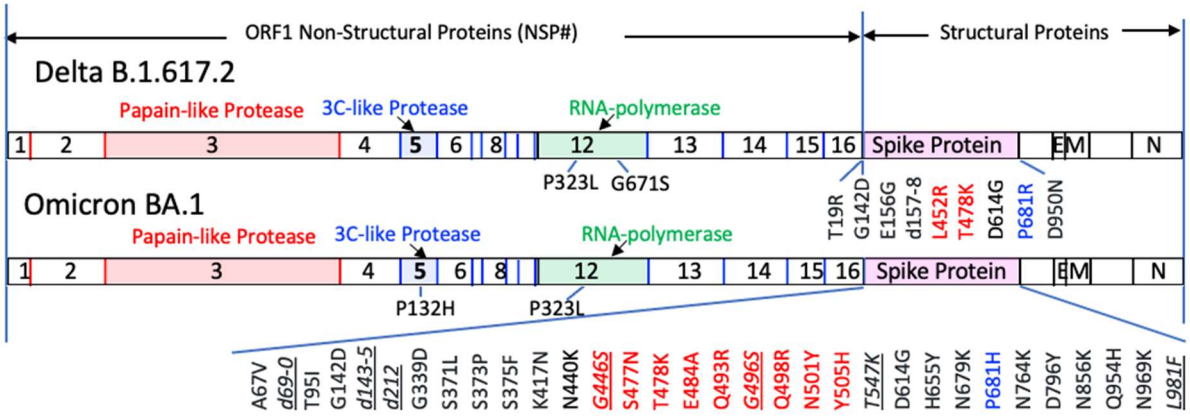


図 17、デルタ、オミクロン変異株のアミノ酸変異

は 323 番目のプロリン (P) がロイシン (L) に変異しており、d-157 の「d」は deletion で、157 番目のアミノ酸残基の欠落です。この図では NSP5 と NSP12 の治療薬標的酵素とスパイクプロテインの変異のみを示しています。なお、NSP12 のヘルパープロテイン NSP7 と NSP8 にはいずれの変異株でも変異はありません。スパイクプロテインにある赤字の変異はこのタンパク質の受容体結合モチーフ (RBM) にある変異で、青字の変異は S1/S2 フーリン切断サイトです。図 16 の SARS-Cov-2 進化系統樹にあるようにデルタ株、オミクロン株系統にはアミノ酸変異が異なったウイルスが分離されております。最近話題になっているいわゆるステルスオミクロンは BA.2 で、BA.1 のスパイクプロテインにあるいくつかのアミノ酸変異がありません。BA.1 にあって BA.2 に無い変異は図 17 の変異リスト中、下線で示されています。おそらく、BA.1 は進化時間軸上で BA.2 の後に出現したと思います。ステルスとはヨーロッパで使用されているオミクロン株同定の PCR プライマーが BA.2 には反応しないことから来ています。注目すべき差異は BA.1 の NTD にあるアミノ酸残基の欠落 (d69-0、d143-5、d212) で、NTD の 3 次元構造に有意な変化をもたらす可能性があり、BA.1 が BA.2 よりワクチンによる抗体の親和性が低いことを示唆しています。その他の差異は RBD にある BA.1 特有の G446S と G496S の変異です。ヨーロッパで報告されているように、BA.2 の感染性が BA.1 と同じか、より強いのであれば、これらの BA.1 特有の変異はあまり受容体との結合には関与していないと思います。

SARS-CoV-2 オミクロン株 BA.1 のスパイクプロテインにあるアミノ酸変異を構造上にマップしたのが図 18 です。この図は 7A96.pdb を編集してスパイクプロテインの単量体構造 (A Chain) のみを提示しており、緑色 (7A96.pdb、D Chain) の部分は ACE2 で、NTD (N 末端ドメイン) と RBD (受容体結合ドメイン) はそれぞれ分子の左と右側にあり、そのうち RBD は図の右側に拡大されています。スパイクプロテイン上の抗原決定基 (antigen epitope) の内、ウイルスに対する免疫に重要な部位は NTD と RBD です。RBD にある S371L、S373P および S375F の変異は分子表面にあり、それらは親水性から疎水性アミノ酸への変異 (S371L、S375F)と、プロリンによるペプチド鎖ターン (S373P) を疎水性アミノ酸 (L-F) の中間に挿入による構造変化で、RBD を認識する抗体の結合を阻害する可能性が考えられます。一方 NTD の変異 (G142D) は RBD にある変異に比べて抗体結合を阻害する可能性は低いように思えます。

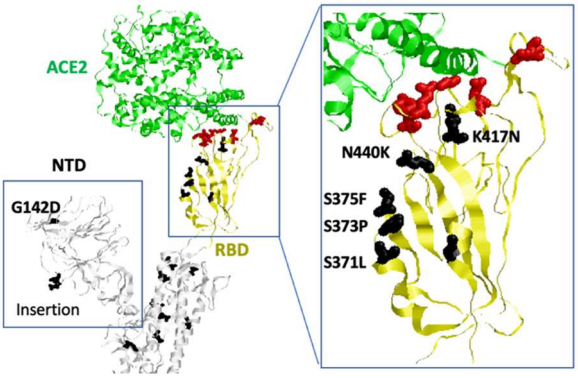


図 18、スパイクプロテイン の変異

図 18 は最多の変異位置を認識できるように分子の方向を設定しており、図 19 ではこれらの赤字変異体を平面で認識するのに適した方向に分子が左回転されています。この図 19 に示すようにほとんどの変異は RBD が直接 ACE2 (緑で表示) に接触するアミノ酸でこの変異株の特異性が理解できます。これらの変異が全て RDB の ACE2 に結合する親和性を向上させるのかどうかわかりませんが、これらはウイルス進化の過程で選択され、この位置にあることは特記すべきです。この変異の内、**N501Y** は以前の高感染性変異株 (アルファ、ベータおよびガンマ株) でも見られ、その変異は

RBD をより強固に ACE2 に結合する可能性がいくつかの論文で発表されています (文献 25)。チロシン (Y) はタンパク質同士の相互作用 (例えば、受容体との結合) 部位に頻繁に見られ、アスパラギンのチロシンへの変異 (N501Y) が親和性の向上に寄与しているのは容易に推察されます。しかし、この N501Y 変異は高感染性変異株であるデルタ株では共有されておらず、デルタ株の高感染性は他の変異に起因していると思われます。

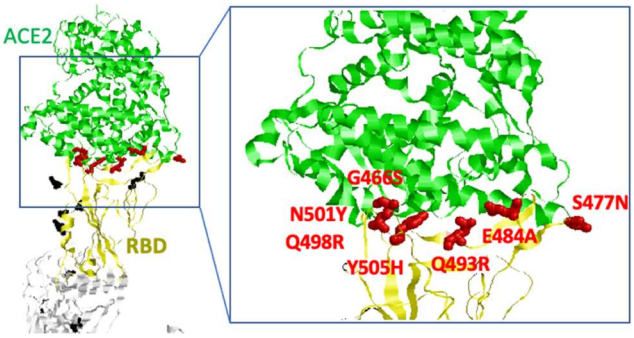


図 19、RBD の ACE2 結合部位にある変異

高感染性変異株でさらに注目すべき変異はフーリンによる S1/S2 切断サイトの P681 変異です。デルタ株では **P681R** で、オミクロン株では **P681H** です (図 17、青字変異)。いずれもプロリンをプラスに帯電するアミノ酸に変異しており、これらの変異はフーリンによるペプチド鎖の切断をより容易にすると言われています (文献 26)。

デルタ株では Pfizer 治療薬の標的である NSP5 には変異がありませんがオミクロン株では **P132H** があります(図 20)。この図は NSP5 の項目にあるように 6LU7.pdb を使った単量体の構造モデルです。P132H はプロリンの変異ですが、親水性ヒスチジンへの変異で、その位置は NSP5 のプロテアーゼの活性中心である H41 と C145 から離れています。また、他のアミノ酸残基とも有意義な構造的関与は見られず、この変異は NSP5 の分子構造に大きな変化はもたらさないでしょう。したがって、Pfizer 治療薬の効果には影響がないと考えられます。

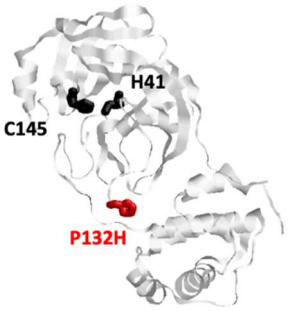


図 20、NSP5 の変異

デルタ株の NSP12 には **P323L** と共に **G671S** 変異があり (図 21)、オミクロン株は P323L のみです。これら変異は、特に P323L は NSP12 の構造に何らかの変化をもたらす可能性があります。しかし、前述の NSP12 の項目で述べましたが NSP12 はヘルパープロテインの **NSP7** と **NSP8** との共同で RNA ポリメラーゼ機能を持っており、文献 10 で述べられている酵素活性に関わるアミノ酸残基、これは約 70 ものアミノ酸残基が関わっていますが、それらとはこの変異は直接接点がないようです。この図 21 左はリボンモデルで変異は赤字で示してあり、鋳型 RNA (Template RNA) は茶色の、複製済 RNA (Synthesized RNA) は黄色の骨格トレースで示しています。図 21 左は変異位置が認識しやすい方向で、それを上向きに傾けて NSP12 の 3 量体で RNA 複製がなされる空洞を可視化したのが図 21 右の空間充填モデルです。この空間充填モデルでは NSP12 変異はこの RNA 複製箇所である空洞とは離れていますので見ることができません。

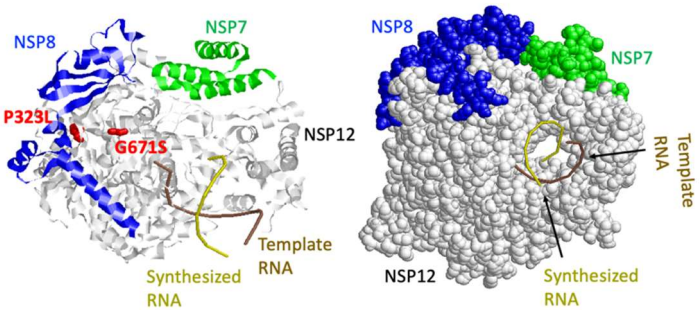


図 21、デルタ株 NSP12 の変異

これは推測ですが、おそらく Pfizer と Merck は原株の、言い換えると変異のない、NSP5 と NSP12 を使用してそれぞれの酵素の阻害剤を開発したものと思います。さらに臨床治験中、特に第 3 相ではデルタ株が蔓延しており、Merck 治療薬の治療効果が期待されたほど良好で無かったのは、デルタ株の NSP12 にある変異が原因ではなく、むしろデルタ株の高感染性による可能性が高いと思います。

8. 変異株蔓延と検査体制

この項目では変異株蔓延とそれに伴う検査体制の適応について述べます。一般にウイルスは宿主中で増殖する過程で常時突然変異が起こります。そのうちの特定変異がウイルスに都合がよければ、すなわち感染性が高く、より多くの宿主に感染すると子孫を残すことができますので、その変異は選択されます。反対に変異によって感染性が低くなると宿主の数が限られますので、ウイルスにとっては不都合で淘汰されます。これがウイルスの進化 (evolution) です。私事ですが、私は過去 10 年ほど進化技術を使ってタンパク質改変の研究をやっていました。これは特定の生物活性を持つタンパク質のアミノ酸を人工的に変異させて (saturation mutagenesis)、その何千あるいは何万の変異タンパク質の活性を高速大量検索 (high throughput screening) で検索して、有益な変異を見つけそれらを組み合わせることです。すなわち、指向性進化法 (directed evolution) です。この研究でわかったことは有益アミノ酸変異をある一定数以上組み合わせると予期しないことが起こることです。このことを SARS-CoV-2 に当てはめますと、オミクロン株のように多数の変異箇所があると、たとえ感染力が上昇しても他の何らかの生物活性が犠牲になっている可能性があります。これがデルタ株やオミクロン株での重症化率や致死率の低下の一因になっていると思います。指向性進化研究の経験からですが、オミクロン株には以前の変異株に比べて異様に多い変異があり、それらが全て感染性向上に寄与しておらず、幾つかはウイルスにとって不都合な変異が含まれている可能性があります。何が不都合なのか現在私には分かりませんが、後述のオミクロン株の急速な収束は、その何か不都合な変異から来ているのかもしれません。

図 22 は米国の日毎の新規感染者数 (上のグラフ)、死亡者数 (中) がどの変異株 (下) で発生しているのかを示しています。この図で見られるように 2021 年 12 月末から米国ではオミクロン株が 2021 年夏大流行したデルタ株 (日本の第 5 波に相当) を凌駕しつつあることを示しています。感染者数と死亡者数は Worldometer (文献 12) から、変異株の割合は文献 27 からの引用です。この図は感染者数と死亡者数の関係を示しています。2021 年 1 月のいわゆる従来株が原因のピーク時は日毎の感染者数が 20 万程度で、死亡者数は 4,000 人に達しています。2021 年 8 月のデルタ株流行では日毎の新規感染者数がほぼ 20 万に達していましたが、死亡者数は従来株の約半分の 2,000 人で、これはデルタ株の死亡率が従来株より低下していることを示しています。オミクロン株ではデルタ株より顕

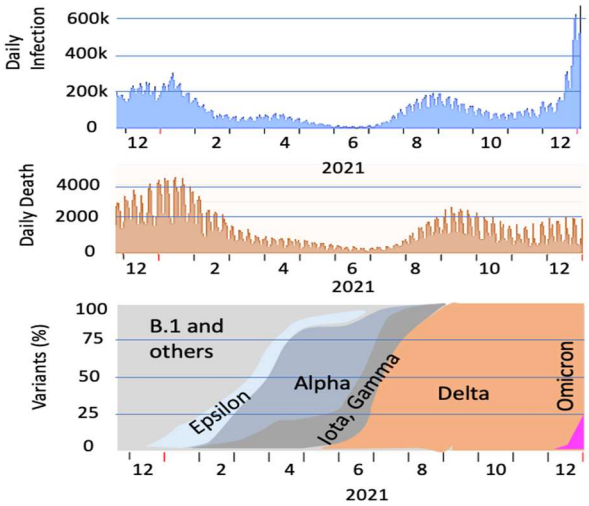
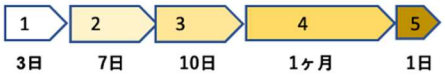


図 22、米国の COVID-19 流行状況

著に死亡者数が減少していると言われています。もちろん 2021 年にはワクチン投与が始まり、感染者数にはワクチン投与済みにも関わらず感染しても軽症ですむ患者も含まれているはずですし、対症療法も 2020 年よりは進歩して死亡率を下げた可能性もあると思います。しかし、この図 22 で確実に言えることはデルタ株の感染性の高いことと、オミクロン株はデルタ株を上回っていることです。デルタ株やオミクロン株の発症率が低いと感染者同定・隔離に問題が生じ、より頻繁なウイルス検査の必要性が高まります。

検査体制を討論するためのモデルの図 23 は感染してから死に至るまでの経過をステージ 1 から 5 で示しています。下の数字はそれぞれのステージの大まかな目安の期間でもしこのウイルス感染・発症モデルでデルタ株やオミクロン株のように重症化しない患者が多いとすると感染抑制は困難になります。言い換えれば、もし感染していても無症状か軽症であれば医者にかかることがなく、従って PCR 検査を受けず、本人も周囲も感染がわからずにウイルスを排出し続け、感染を広げてしまう可能性です。空港検疫で PCR 陰性であったのが後でオミクロン株感染が見つかるのは、空港検疫ではステージ 1 ですでに感染しているのが、その後ステージ 2 になり PCR 陽性になるのでしょう。このことより、1 回の PCR 検査で陰性であるからと安心することは危険ですので数日後に再度検査を受ける必要があると思います。



ステージ	期間 (日)	症状	ウイルス排出量	PCR	抗原検査
1	3	無	+/-	+/-	-
2	7	軽	+	+	+/-
3	10	中	++	+	+
4	30	重	+++	+	+
5	1	死亡	-		

図 23、COVID-19 の感染経過

抗原検査は分単位で結果が出ますので便利ですが感度が悪く、以前の総説 (文献 1) で述べたように、ステージ 1 と 2 では偽陰性になる可能性が約 60%もあり、初期の感染者発見には不向きで、PCR 検査が望まれます。オミクロン株の拡散によって PCR 検査体制が検査希望者数に対応できず、抗原検査を多用する傾向が日米でありますが注意が必要です。過大な検査数により、個人別の PCR 検査が限界を超える事態では、下水サンプルの PCR で地域の感染状態を把握することが出来ます (文献 28)。米国内での好例はカリフォルニア州ヨセミテ国立公園です (写真右)。公園は大都会から隔離されており、任意 PCR 検査での陽性者は皆無でしたので、ウイルスフリーと考えられていました。しかし、公園下水の PCR 検査では何百人もの公園訪問者がウイルスに感染していたと推察されました (文献 29)。おそらく、ヨセミテ訪問者は図 23 にあるステージ 1 か 2 の無症状か軽症状感染者で、自身でも感染したことが分からず、何時間ものドライブでヨセミテを訪問することが許容される状態で、PCR 検査は受けなかったのでしょう。この事例は下水 PCR 検査の疫学的有用性を明確に示しています。

私達にできるオミクロン株への対応はワクチンの 3 回目ブースター接種を受けることです。米国では 2 回目の接種後 6 ヶ月経過していると 3 回目を受けることができます。Pfizer と Moderna のいずれの選択でも良いとされています。もし Moderna の

Pfizer より高い副反応を 3 回目に心配されているのでしたら、それは無用かもしれません。Pfizer と Moderna の 1 ・2 回目の主な違いは接種量で、Pfizer は 30 mg ですが Moderna は 3 倍以上の 100 mg で Moderna の方が副反応を起こす可能性が高いです。しかし、米国では、おそらく副作用の懸念からか (筆者推測)、Moderna の 3 回目接種量を半分の 50 mg にするとのことです (文献 30)。

文献 31 によりますと発症予防効果はブースター後でもオミクロン株に対しては 37% だそうです。しかし、これは発症に基づく公式ワクチン有効率で、重症化率を防ぐ効果はより高いはずです。米国の新聞その他の報道ではデルタ株やオミクロン株で死亡するケースはワクチン未接種者がほとんどとのことで、もしこれが統計的に有意であるならば、ワクチンは接種後、感染・発症を期待するほど防げなくても、重症化や死亡する可能性を低下させることが出来ると思います。一般によく誤解されますが、ワクチン有効率は感染防御に基づいていません。ワクチン接種後でも感染者が出たことでワクチンは無意味とする向きもありますが、たとえ感染防御のワクチン効果が低下したとしても、重症化・死亡率を低下させますので、3 回目ブースターはオミクロン株でも有益と言えます。

オミクロン株は南アフリカで初めて見つかり、感染者数が 2021 年の 11 月末から急増しましたが、2 ヶ月以内に急速に収束しました (図 24、矢印)。この現象は他国でのオミクロン株対策に多大な期待を持たせています。果たして南アフリカに続いてオミクロン株の感染者数が急上昇したイギリスや米国でも顕著な減少傾向が見られます。南アフリカでの感染者数の急激な減少の理由を知るため多数の文献を検索しましたが明確な理由は見つかりませんでした。おそらく集団免疫ではないかと推測している文献がごく少数ありましたが、南アフリカの人口 6,000 万人で累積感染者数は 350 万人 (約 6%) なのでこれだけの感染者数で集団免疫が出来るとは考えにくいです。南アフリカのワクチン接種率は約 30%でこれも集団免疫の理由にするには程遠いです。今後はいかなる理由にせよ、同じような現象が他国でも見られるか注目すべきです。それにこれが世界的な現象になれば良いのですが。

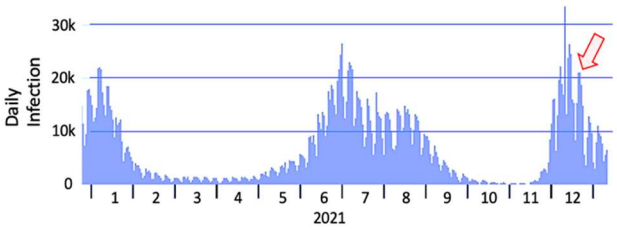


図 24、南アフリカでの日毎新規感染者数
（文献 12 引用）

9. 医療現場での PCR 検査

ウイルス感染を診断する PCR 検査については以前の総説 (文献 1) で詳しく説明しましたので、この項目では PCR でオミクロン株の検出方法を文献 32 から引用します。PCR に使用する DNA ポリメラーゼは鋳型鎖に結合した順方向プライマー (forward primer) の 3′ 末端から 5′→3′の方向に塩基鎖を伸展します (図 25 上段、紫)。その時、もしプライマーの 3′ 末端塩基が鋳型鎖の塩基に結合しなければ合成は始まりません(図 25 下段)。このことを利用してオミクロン株の変異がある

図 25、オミクロン株検出の PCR プライマー

領域を標的にプライマーのデザインをするとき、プライマーの最後の 3'末端塩基がオミクロン株特有の変異塩基で終わるようにすれば、オミクロン株 DNA のみ特異的に PCR 反応が起こります。この図 25 にある例ではスパイクプロテイン (SP) をコードしている RNA 領域の 22,991 塩基から始まるプライマー、Primer-F の 3'末端がオミクロン株のスパイクプロテイン (**SP-22991**) に特異な変異塩基 (**G**) に対応している (**C**) なので DNA ポリメラーゼが合成を始めることが出来ます。一方、変異のない株 (**SP-22991**) にはこのプライマーの 3'末端塩基 (**C**) に対応する鋳型鎖塩基は (**T**) ですので DNA ポリメラーゼは合成を開始することが出来ません。その結果、PCR 反応はオミクロン株由来の DNA のみに起こり PCR 検査は陽性となり、変異のない株では陰性になります。さらなる変異株の同定は PCR で増幅された DNA のシーケンシングで可能です。

前述のように、ウイルス感染を認定する簡易検査は抗原検査が多用されています。抗原検査は結果が分単位で判明しますが感度は低いです。それに比べると PCR 検査は高感度ですが、検査に時間がかかります。現在 PCR 検査の時間は大幅に短縮されているようですが、これを医療機関の現場 (PoC、Point of Care) で患者や家族など広範囲に応用するのは経費と技術の点からも容易ではありません。

そこで、この PCR 検査の所要時間の問題を解決するために ThermoFisher Scientific で 30 分で結果が出る PCR 検査方法が開発され、米国で緊急使用が認可されました (文献 33)。これは図 26 に示すように OSCAR™ (Oscillating Amplification Reaction) と名付けられた 80°C と 60°C の反応温度を急速に繰り返して PCR を短時間で達成する方法です。ThermoFisher のウエブサイトでは臨床試験で旧来の PCR 検査方法に比べて陽性・陰性サンプル同定率は 100%同じであったそうです。米国ではこの検体採取・テストカセットキットは 25 検体用約$1,600、1 検体当たり約$60 で販売されています。

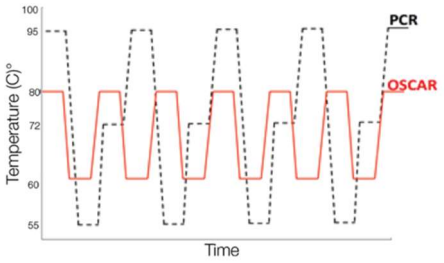


図 26、ThermoFisher OSCAR™
文献 33 より引用

終わりに

この再度の総説がお役に立てる事を心より願っております。引用注が無い図は著者の原作で研究会の許可を得て転載可能です。引用注のある図の転載は出典を確認してください。なお、この総説の一部は私の出身校 (大阪大学理学部生物学科) の同窓会誌に要約として発表されています。この総説は Bacillus Tech LLC (有限会社) としての Free Educational Information (無料教育情報) で必ずしも当研究会の見解とは限りません。ご了承下さい。最後になりますが、この原稿を親切にレビューしていただいた神戸大学大川秀郎名誉教授と熊本大学三浦洌名誉教授に心より感謝いたします。さらに投稿の機会を与えてくださり、原稿の校正をしていただいた当研究会上田宏会長並びに事務局の方々に深く感謝いたします。

引用文献 (2022 年 2 月 9 日リンク有効確認)

1. 総説: 新型コロナウイルス検査技術とワクチン開発の課題, http://www.basj.info/report/separate/2021sv.pdf
2. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis, 2021, J. Microbiology, Immunology and Infection, 54, 159-163, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118220300827

3. Coronavirus envelope protein: current knowledge, 2019, Virology J. Vol 16 Article 69, https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-019-1182-0,
4. Coronavirus membrane protein, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Coronavirus_membrane_protein#cite_note-wong_2021-3
5. A Bayesian analysis concludes beyond a reasonable doubt that SARS-CoV-2 is not a natural zoonosis but instead is laboratory derived, Steven C. Quay, 2021, Zenodo 464, 2956, https://zenodo.org/record/4477081 - .YeRKpS-B30q
6. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, 2020, Nature, 579, 265-269 (NCBI Locus NC_045512), https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015508/
7. Bad News Wrapped in Protein: Inside the Coronavirus Genome, New York Times, 4-3-2020, https://www.nytimes.com/interactive/2020/04/03/science/coronavirus-genome-bad-news-wrapped-in-protein.html
8. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein, 2018, Antiviral Research 149, 58–74, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29128390/
9. Targeting SARS-CoV-2 Nsp3 macrodomain structure with insights from human poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) structures with inhibitors, 2021, Prog. Biophys. Mol. Biol. 163, 171-186, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33636189/
10. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase, 2020, Nature 584, 154–156, https://www.nature.com/articles/s41586-020-2368-8
11. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions, 2021, Pro. Natl. Acad. Sci. 118 (25) e2024813118, https://www.pnas.org/content/118/25/e2024815118
12. Worldometer, Coronavirus Cases, USA, https://www.worldometers.info/coronavirus/
13. She is a key hero in defeating the new crown virus, why has she been ignored for many years with a low salary, 2021, DayDayNews, 4-10-21, https://daydaynews.cc/en/science/she-is-a-key-hero-in-defeating-the-new-crown-virus-why-has-she-been.html
14. Without these lipid shells, there would be no mRNA vaccines for COVID-19, Chem. Eng. News, Vol 8, Issue 8, https://cen.acs.org/pharmaceuticals/drug-delivery/Without-lipid-shells-mRNA-vaccines/99/i8
15. How Pfizer Makes Its Covid-19 Vaccine, 2021- The New York Times, 4-28-21, https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/pfizer-coronavirus-vaccine.html
16. Genscript gene synthesis service site: https://www.genscript.com/gene_synthesis.html
17. Pfizer's novel COVID-19 oral antiviral treatment candidate reduced risk of hospitalization or death by 89% in interim analysis of phase 2/3 epic HR study, Pfizer press release 11-5-2021, https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizers-novel-covid-19-oral-antiviral-treatment-candidate
18. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19, 2021, Science, 374, 1586-1593, https://www.science.org/doi/10.1126/science.abl4784
19. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19,FDA News Release December 22, 2021, https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19
20. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis, Nature Struc. Molec. Biol. 2021, 28, 740-746, https://www.nature.com/articles/s41594-021-00651-0.pdf
21. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Additional Oral Antiviral for Treatment of COVID-19 in Certain Adults, US FDA News Release December 23, 2021, https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-oral-antiviral-treatment-covid-19-certain
22. Merck's COVID pill loses its lustre: what that means for the pandemic, Nature News 13 December 2021 https://www.nature.com/articles/d41586-021-03667-0
23. PANGO Lineages: Latest epidemiological lineages of SARS-CoV-2, cov-lineages.org, https://cov-lineages.org
24. SARS-CoV-2 Variants, Stanford University Coronavirus Antiviral & Resistance Database, https://covdb.stanford.edu/page/mutation-viewer/#omicron
25. Structural studies offer glimpse of how coronavirus initiates human cell invasion, 2020, Chemistry World, 3 April, 2020, https://www.chemistryworld.com/news/structural-studies-offer-glimpse-of-how-coronavirus-initiates-human-cell-invasion/4011452.article
26. Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant, 2021, bioRxiv, 2021 Sep 5;2021.08.12.456173, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.12.456173v3

27. Tracking Omicron and Other Coronavirus Variants, New York Times, Jan, 5, 2022 update, https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html
28. Wastewater Surveillance Testing Method, 7-23-2021 last revised, US Center for Disease Control and Prevention (US CDC), https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/wastewater-surveillance/testing-methods.html
29. The proof is in the sewage: hundreds of Yosemite visitors may have had coronavirus, 2020, The Guardian, Article, 7-23-20, https://www.theguardian.com/environment/2020/jul/22/yosemite-coronavirus-covid-19-sewage-tests
30. COVID-19 Booster Shots: Eligibility, Safety, and More You Should Know, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Patient Information, https://www.mskcc.org/coronavirus/booster-dose-covid-19-vaccine
31. Effectiveness of COVID-19 vaccines against Omicron or Delta infection、2022, January 1, medRxiv, https://doi.org/10.1101/2021.12.30.21268565
32. In Silico Design of Specific Primer Sets for the Detection of B.1.1.529 SARS-CoV-2 Variant of Concern (Omicron) Proposal from European Commission, December 1, 2021, https://zenodo.org/record/5747872#.YeRSBC-B30o
33. ThermoFisher Scientific Accula SARS-CoV-2 Test, https://www.thermofisher.com/us/en/home/clinical/clinical-genomics/pathogen-detection-solutions/accula-rapid-pcr-system.html?ef_id=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhkamdAYT4Y8ilZa75Tg1lrpD1Odn0YSuliLHlPhj7UYBWGzYNJs-9BoChs4QAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!5348634251