

Vol.18(2020) No.09(04/30)L03

COVID-19に対するネルフィナビルおよびセファランチンによる併用治療

[Multidrug treatment with nelfinavir and cepharanthine against COVID-19](#)

Ohashi H, Watashi K, Saso W, et al.

[bioRxiv. 2020 April 15]-not peer reviewed

(抜粋・要約)

◇背景

COVID-19を適応として承認された治療薬はまだなく、現行の候補薬以外にも新たな抗ウイルス薬が緊急に求められている。本研究では、培養細胞を用いたSARS-CoV-2感染系を用い、日米欧のさまざまな既承認薬をパネルスクリーニングした結果、HIVプロテアーゼ阻害薬ネルフィナビルおよび抗炎症薬セファランチンという作用機序の異なる2種の医薬品が、抗SARS-CoV-2活性を臨床用量で有することを見出した。

◇方法

◇培養細胞を用いるSARS-CoV-2感染アッセイ

SARS-CoV-2による細胞変性を防御する医薬品を探索するため、培養細胞ベースのスクリーニング系を構築した。VeroE6/TMPRSS2細胞に対しSARS-CoV-2臨床分離株を種々の薬剤共存下で接種し(MOI^A=0.01)、1時間感染させた後、未結合のウイルスを洗浄により除去し、さらに薬剤存在下で24~48時間培養した。培養上清中のウイルスRNA放出量、またSARS-CoV-2 Nタンパク質の発現は、24時間後にそれぞれ測定した。ウイルス誘発性細胞変性の観察および細胞生存率測定は、48時間後にそれぞれ実施した。

◇time of additionアッセイ

各薬剤がウイルス複製サイクルのどの段階に作用するか調べるため、サイクル全体にわたる薬剤処理のほか、ウイルス侵入時(ウイルス接種~洗浄後2時間まで)およびウイルス侵入後(洗浄後2時間以降)の3通りの薬剤処理についてウイルスRNA量を測定した。

◇ウイルス動態に関するネルフィナビルおよびセファランチンの効果に関する数理的予測

ネルフィナビル(500 mg経口投与)とセファランチン(100 mg点滴静注又は120 mg経口投与)による時間依存的な抗ウイルス活性や体内ウイルス量への影響を、薬物動態/薬力学モデルにより予測した。

◇結果

◇ネルフィナビルおよびセファランチンの抗SARS-CoV-2活性

日米欧の既承認薬306種をスクリーニングした結果、DMSO(溶媒対照)に比べ20倍の細胞変性防御効果を示す薬剤を数種見出した。それぞれのSARS-CoV-2抑制活性を数値化するため、対象2種の薬剤についてさまざまな濃度で細胞を処理し、接種24時間後のウイルスRNA放出量を測定した。50%および90%ウイルス複製阻害濃度(IC₅₀, IC₉₀)および50%細胞毒性濃度(CC₅₀)は以下の通りであった。

^A multiplicity of infection: 感染多重度。1細胞に感染するウイルス粒子の数。ウイルス-細胞接着アッセイ、多剤併用による相乗効果をみる実験などでは、MOI=0.001を用いた。

・ネルフィナビル:	IC ₅₀ =0.77 μM	IC ₉₀ =1.18 μM	CC ₅₀ >64 μM
・セファランチン:	IC ₅₀ =0.35 μM	IC ₉₀ =0.91 μM	CC ₅₀ =25.1 μM

SARS-CoV-2感染抑制効果が既に報告されている2剤(ロピナビルおよびクロロキン)よりも、ネルフィナビルはウイルス抑制効果が若干高く、セファランチンの活性はより高かった。これらネルフィナビルおよびセファランチンの作用濃度は、患者への臨床用量の投与で達成可能な範囲内であった。

ネルフィナビルおよびセファランチンの安全域(CC₅₀/IC₅₀)は70を超えており、ほぼ細胞毒性なくSARS-CoV-2増殖抑制効果を示すことができる。

ネルフィナビルとセファランチンのSARS-CoV-2増殖抑制効果は、Nタンパク質発現の有意な減少によっても確認された。

◇ネルフィナビルおよびセファランチンの作用機序

ネルフィナビルはHIVプロテアーゼ阻害剤、セファランチンは抗炎症作用と抗酸化作用を持つタマサキツヅラフジ抽出アルカロイドである。ネルフィナビルの複製阻害は、SARS-CoV-2ウイルスの主要プロテアーゼとの直接相互作用を介することが示唆され、また、セファランチンは標的細胞へのウイルスの接着を阻害することが確認された。ネルフィナビルおよびセファランチンはウイルスの複製サイクルの異なる段階で阻害作用を示すことが明らかになった。

◇ネルフィナビルとセファランチンの相乗的抗ウイルス活性

ネルフィナビルとセファランチンは作用機序が異なっていたため、相乗効果についても検討した。ネルフィナビルとセファランチンはそれぞれ単独で用量依存的にウイルスRNA量を抑制し、両剤を併用することによって抑制効果はさらに増大した。各4 μMのネルフィナビルとセファランチンを併用することにより、24時間後にウイルスRNA量を検出限界以下にまで低下させた。

◇ウイルス動態に関するネルフィナビルおよびセファランチンの効果に関する数理的予測

既報の薬物動態データを用いて、数理的モデルを構築した。ネルフィナビルは、非投与に比して、ウイルス除去までの期間を約4日間短縮すると予測された。さらにセファランチンとの併用により、約5.5日間短縮されると予測された。

◇考察および限界

セファランチンとネルフィナビルの併用により、ウイルス量の低下・除去が促進されたことは注目に値する。多剤併用療法は、抗ウイルス活性を強めるだけでなく、コロナウイルスのようなRNAウイルスで多く報告されている薬剤耐性の出現を抑制できる可能性がある。

本研究での薬剤有効性のモデリングの限界の1つは、*in vitro*培養細胞感染系のデータを使用しており、*in vivo*の感染モデルによる確認がなされていないことである。ネルフィナビルとセファランチンはいずれも、現時点で候補に挙げられている他の多くの医薬品よりも高い抗ウイルス活性を示しており、COVID-19の新たな併用療法として有望と考えられる。