

OPINION



「PCR法」考 —私の中での「PCR」のW'Waves—

桑野 博行 地方独立行政法人 福岡市立病院機構
福岡市民病院 院長

この度は、W'Wavesに拙文を書かせていただく機会をいただき、誠にありがとうございます。私は、群馬大学外科学教室の教授を約20年間務めさせていただき、平成30年4月より故郷に戻り、福岡市民病院の院長として勤務いたしております。日本癌病態治療研究会は、群馬大学在職中の平成24（2012）年に第21回研究会を「多方面から癌の本質に迫る」というテーマのもとに、前橋の地でお世話させていただきました。今、この機会にその抄録集を改めて開いてみました。そこには多くの秀逸なご講演やご発表がありました。その中に、本研究会前理事長の竹之下誠一先生（福島県立医科大学、当時は副理事長、現理事長兼学長）の特別企画のご講演があり、震災1年目の生々しい状況に当時驚愕いたしました。10年経過した現在、未だ大変なことに変わりはありませんが、復興を着実に進められることに改めて敬意を表します。またこの会では、私の思い入れの一つとしての、『医師、一生学問』との信念から、長く開業されながら、一方で真摯に学問をされている、私の九州大学外科の先輩である大岩俊夫先生と、群馬大学第一内科出身の乾純和先生という尊敬するお二人に、無理にご講演をお願いし、期待どおりの素晴らしいお話を拝聴すること

ことができました。私自身も群馬大学の退任後とはいえ、学問をさらに継続すべきとの思いを、今、また改めて胸に刻んでいるところです。

さて、その時の研究会でご発表いただいた研究にも多く用いられ、もともと形態学を中心として研究を進めてきた私にも幾ばくかの経験もある「PCR法」について、門外漢の私なりにこの機会に少し考えてみたいと思いました。私自身、特に食道癌の発生と進展に関する研究に重きを置いて研究を展開し、腫瘍の「heterogeneity」などから見た「field carcinogenesis」「Bystander effect」の概念を念頭に、遺伝子異常、癌抑制遺伝子の変異検索などに「PCR法」「PCR-SSCP」を九州大学の時代から藤也寸志先生（現、国立病院機構九州がんセンター 院長）をはじめとする多くの仲間と用いてまいりました。群馬大学に赴任した後、竹之下誠一先生と一緒に研究を進めることを契機として、より多くを学ばせていただきました。そのようなことから、「PCR法」については基本的に腫瘍学とのかかわりを中心にその意義を認識してまいりました。

むろん、「PCR法」は生物学一般、感染症診断、法医学、遺伝学、出事前診断、臓器移植の組織タイピング、考古学など、多くの広い分野で応

用されています。一方この中で、一昨年末から昨年、そして今年と、新型コロナウイルス感染症が世界を襲い、その診断ツールとして「PCR法」が常に汎用されるようになりました。感染症診断において、結核や、抗生物質耐性検索や HIV ウイルスなどの診断、検索などに用いられていることは若干の認識はしておりましたが、今回のような事態は初めて経験するものです。私の現在の職場でも COVID-19 の診断、治療など診療に多くかかわっている現状から、従来の「腫瘍学」における「PCR法」と今回の「COVID-19」におけるそれを、素人ながら対比しつつ考察するのも、本来の「基礎と臨床の波」ということとは別の意味での私の中での「W'Waves」となるのではないかと愚考して、筆を執らせていただきました。



まず、「PCR法」の発明者である Kary B. Mullis 博士の自伝ともいべき『マリス博士の奇想天外な人生』（原題『Dancing Naked in the Mind Field』福岡伸一氏訳、早川書房）を改めて読み返してみました。マリス先生の破天荒ともいえるかもしれない人生を興味深く思うことは当然でしたが、彼が若い時代、1968年に Nature 誌に「時間逆転の宇宙論的意味」が掲載されたことがあったとのことです。そして彼は、この論文にも関連して、壮大な宇宙感や自然の前で人類が謙虚であるべきことなど、さまざまな示唆に富むことをこの著書でも述べておられます。一方、この「PCR法」は、勤務先のシータス社の同僚の手による「鎌状赤血球」の迅速な診断法として Science 誌に取り上げられたとはいえ、彼の「PCR法」自体は、Nature 誌、Science 誌には却下され、Methods in Enzymology（ちなみに、2019-2020の impact factor は1.394）に掲載されたものでした。

大変下世話ではありますが、恥ずかしながら少し安心したり、また身近な思いを持ったりしてしまいました。しかしながら、この「PCR法」の原理は誰にでも理解できる「DNA合成・複製の原理」なのに、それまで誰も考えつかなかったことに着目したということでしょう。氏曰く、「2の10乗は、1,024だ。思わず笑えてきた。この反応を10回行うだけで、DNAの一部を1,000コピー作り出すことができるのだ。しかもそれがどんなDNAであっても応用できるのだ。（中略）この反応を20回行えば、100万回コピーを軽く超える。30回行えば、もはや10億以上だ」。1993年のノーベル化学賞の受賞理由は、「DNA化学での手法開発への貢献（PCR法の発明）」とあります。さらに、彼らシータス社のグループは、通常のDNA合成酵素は加熱することによって壊れてしまうので何度もこの酵素を追加する必要があることに対し、「高温の環境にある微生物には耐熱性のDNA合成酵素が含まれているはず」との考えから、米国イエローストーンの温泉にいる細菌、すなわち「極限環境微生物」に目を付け「*Taq* Polymerase」を開発したことが、酵素の「連鎖反応」をもたらすことにつながったことはまさに慧眼で、私は個人的には「セレンディピティ」ともいえることではないかと感動いたします。また、この「PCR法」はマリス博士がドライブ・デート中（その時に乗っていたのはホンダのシビックだったそうです）に閃いたものであったことや、ノーベル賞を受賞する前に「日本国際賞」を受賞した際の、当時の皇后陛下（現、上皇后陛下）とのウイットに富んだやり取りも心が和みます。また、これは私が癌研究を進める過程で「がん遺伝子」を学ぶ際に読んだ本ですが、黒木登志夫先生の『がん遺伝子の発見 ―がん解明の同時代史―』（中公新書）の中にもマリス博士について

てのお話が出てまいります。

「マリスは1993年ノーベル化学賞を受賞した。その前年日本国際賞を受賞した際、式後のパーティーでガールフレンドとドライブした時のエピソードが紹介された。皇后陛下から『今日一緒に来られている方がその方ですね』と尋ねられたマリスは、『いや、別の人です』と答えた。皇后陛下はすかさずおっしゃった。『それではもう一つ大発見ができますね』」(原文のまま)。

昨今、世間に一部殺伐とした空気がある中、とても軽妙でウイットに富んだ素敵な会話で、お人柄の温かさと本当の意味での賢明さにあふれ、読んでいて心が和んだのを思い出します。

今マリス博士がご存命(奇しくも COVID-19 発生直前の2019年8月7日、74歳でご逝去)なら、この COVID-19 感染症ならびにその「PCR法」についてどのように考えられるか興味が尽きません。「PCR法」について、博士は「The test can detect genetic sequences, but not viruses themselves」と述べておられ、このことは厚生労働省の『新型コロナウイルス感染症 COVID-19 診療の手引き 第4.2版』での「2. 伝播様式」の項でも「ただし、病原遺伝子が検出されることと感染性があることは同義ではない」との文言が添えられています。

そこでこの度の COVID-19 診療における「PCR法」についてです(コロナウイルスは RNA ウィルスなので「RT-PCR」が、正確な表現ですが、ここでは一般的に「PCR検査」と表現します)。まず、癌研究における変異などの遺伝子「検索」とはややおもむきを異にし、「臨床検査」との観点から、その一般的な指標、すなわち「検査前確率」「検査後確率」「感度」「特異度」を考慮し

た位置づけが、極めて重要と思われます。今回の COVID-19 診療においては、①「非感染者」、②「ウイルスが粘膜に付着しているだけの状態」、③「ウイルスの残骸だけが存在する状態」(しばしば感染症の治癒過程で陽性が遷延する際などにみられるようですが)、④「ウイルスが実際に細胞内に侵入して感染している状態」(その中で④-1「無症状感染の状態」と④-2「有症状感染」、また④-1,2-infectious「感染者で他に感染性を有する状態」)など、多面的、多重的な状態が存在すると思われます。そこで、この検査法における「Gold Standard(黄金律)」、すなわち、「真の感染者」をどのように規定するのかという命題が大切になると思います。当然上記の④、すなわち症状の有無にかかわらず、また infectious(他への感染性)の程度にかかわらず「感染状態」にある状態であることは言うに及びませんが、それをどのような形で設定するかは簡単ではないように思います(ただし、本当の意味での「感染症」は感染性を持つ、すなわち治療と同時に隔離が必要な場合に限るという考えもあるようですが)。いずれにしても、この Gold Standard をどのように設定するかにより、その評価は左右されるでしょう。そこには「培養法、ウイルス分離」や、実際の感染者を後方視的に検討して評価する方法などがあると思われます。

一般的には COVID-19 の診断における「PCR法」は、その「特異度」は極めて高いものとされています。すなわち「偽陽性」は少ないということで、「診断確定」には有用で、「陽性」と出ればほとんどが「感染者」と判断されるということでしょう。一方で感染力を失ったウイルスも増幅することもあり、「陽性」であっても「感染性のウイルス」が存在しない場合もあるようです。実際に COVID-19 の発症後の日数と Ct 値(Threshold

Cycle、RT-PCRにおける遺伝子の増幅に必要なサイクル数)により推定されるウイルス遺伝子数(Ct値が低ければ遺伝子量が多い)の関係について、発症時点ではCt値が20前後あったものが、日数が経過するごとにCt値は高くなり、9日の時点で30.1であった報告があります。また、発症から日数がたつにつれウイルス培養率が低下し、約10日後にはほとんどウイルスが培養されなくなったとのこと。このようなことから、厚労省の現時点での「退院基準」に「発症から10日以上経過し、かつ症状が経過してから72時間以上過ぎれば、核酸増幅法の結果にかかわらず退院可能である」ことがあると思われます。以上のような、「感染者」を対象とした「経過」からの検討と、COVID-19の「初期診断」とを一概に同列に議論するのは、やや無理があるとしても、「初期診断」におけるCt値のカットオフ(検出限界)

の設定は極めて重要でしょう。

一方、「感度」という観点からみると、検体採取の部位、種類、保存条件、そして検体の取り扱い状況(コンタミネーションを含む)などに影響されることは当然として、それ以上に時期による変動が極めて大きいようです。この「感度」が高ければ、「偽陰性」が少なく疾患の「スクリーニング」に有用で、「陰性」であれば、その疾患は否定的となりますが、このCOVID-19における「PCR法」ではそうはいかないようです。すなわち、本法は「検査の陰性確認」はできても、患者の退院に際しての確認は別として「感染の陰性確認」には適さないと個人的には考えます。

ここで私が、令和2年夏、すなわち感染流行のいわゆる「第二波」の際に、当院の職員に送ったメッセージの一部をお示しさせていただきます。

令和2年8月26日

各位

院長
桑野 博行

平素より、新型コロナウイルスの厳格な対応も含め、病院業務に多大なるご尽力をいただきすべての職員の皆様に心から感謝申し上げます。

さて、今回RT-PCR検査に関してきわめて貴重で重要と思われる論文が2020年8月18日付けで『Annals of Internal Medicine』に発表(Onlineでは5月13日)されましたので、ここに皆様と情報を共有し、当院の病院業務の参考とすべくご報告致します。

論文は、米国 Johns Hopkins 大学の Lauren M. Kucirka 氏らからのもので、「Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase polymerase Chain Reaction — Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure」という論文です。

TABLES AND FIGURES

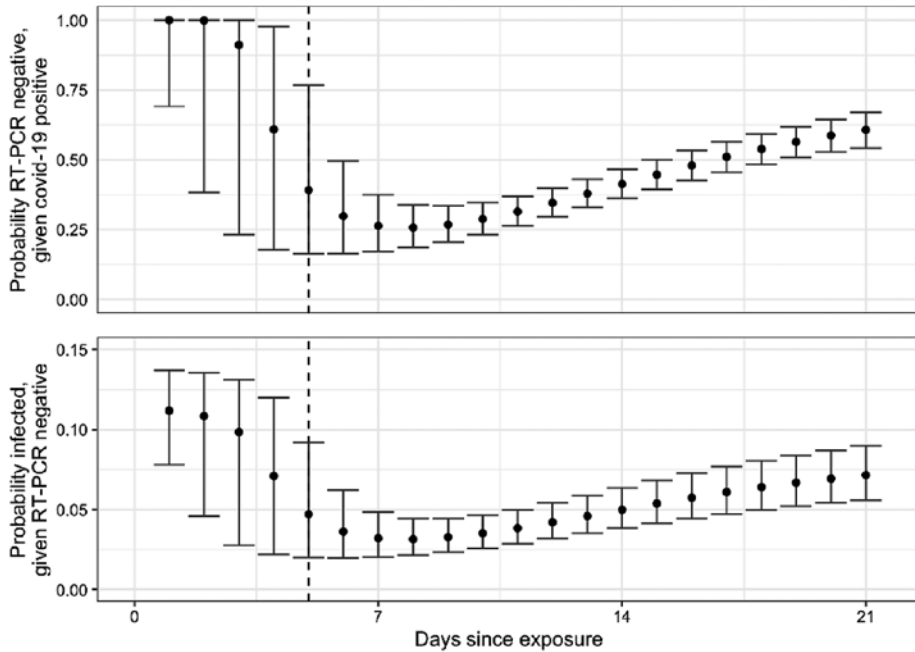


Figure 1: Probability of 1) being RT-PCR positive among SARS-CoV-2 infected patients (Upper Panel), and 2) being infected, given RT-PCR negative (Lower Panel), by days since exposure

SARS-CoV-2感染の RT-PCR 検査の解釈において、特に感染から経過が早期の場合には細心の注意を払うべきで、単に結果に基づいて、二次感染を防ぐための防護策を誤って解除してしまう可能性を十分に考慮する必要があります。臨床的に疑いが高い場合には、単に RT-PCR の結果だけに基づいて除外することは避けるべきで、臨床的、疫学的状況も含めて注意深く判断すべきでしょう。

PCR法の検査の精度は時間ともに変化し、偽陰性率、病気が存在するのに間違えて陰性と判定してしまう確率、見逃しの確率は、最小でも20%程度あり、最大では100%であったとのことで、少なくとも20%は見逃してしまう検査ということを理解しておく必要があります。

このように、RT-PCR 検査（コロナウイルスは、RNA ウイルスなので RT-PCR が正確な表現ですが、以下一般的に「PCR 検査」と表現致します）は、感染者が陽性になる（感度）は、暴露後の日数によって大きく左右されます。感度がきわめて高い検査であれば「偽陰性」は少ないので「疾患のスクリーニング」や、「陰性確認」に有用ですが、この検査は必ずしもそうではなく、むしろ偽陽性が少なく「特異度」が比較的高いので*、「臨床診断の確認」に有用ということになります。したがっ

て、症状の詳細な観察や専門家の診断が何よりも重要で優先されるべきです。

以上のことから、入院時に PCR で陰性だった方々そして職員も含め、症状が出た際には、すみやかに他の患者さんや医療従事者との接触を極力最小限にし、患者さんであれば個室移動、職員であれば自宅待機、そして必要とあらば専門家の診察や PCR 検査（この時こそ最も有用でしょう）を考慮すべきです。

以上、PCR 検査の現状と意義を今一度認識した上で、「院内クラスター」を発生させない事を是非お願い申し上げます。

（※但し、前述の如く、Ct 値の検出限界値、カットオフ値を高くすれば、偽陽性の可能性も高くなるかも知れません）

いずれにいたしましても、検査法、検索法も含めあらゆる方法を用いる際には、そのそれぞれにおける限界も含めた特性を十分に把握して、「過大評価」することなく、また「過小評価」することなく、それらの意義を十分に認識して、対処し適切に運用することが肝要と信じます。「PCR 法」も決してその例外ではありません。当院は、感染症内科、救急科を中心に、多くの診療科、看護師やその他のメディカルスタッフの密なチームワークのもとに、重症者（ECMO や人工呼吸器装着症例など）から軽症者まで診療を行っておりますが、そのコアの一つである「感染症内科」は、少人数でしかも若い医師です。そして病棟は、ゾーニングした「感染陽性者」、「疑似症例」を当然のことながら厳格に隔離しております。これらの「疑似症例」の中に、何度も「PCR」陰性が続き、一般病棟へ転棟する可能性がある患者さんがしばしばおられます。そのような中、この若い感染症内科の医師が、「PCR」陰性が続いても、この患者さんは「臨床的に」疑似症例としてももう少し経過を見たい旨を主張し、

実際にその後の検査で陽性となったケースを複数回経験しました。クラスター発生の可能性を未然に防げたとの思いに胸を撫で下したことでした（このような患者さんに、他への感染力があったか否かは別としても、少なくとも「感染者」としての隔離の必要があると思います）。まさに「臨床症状」「臨床診断」の重要性と検査結果の位置づけを、改めて若い先生方から学んだ気がいたします。そして今こそ「検査のみに頼らない臨床力」が問われている時であることを実感いたしております。さらに、「PCR 法」の結果が陽性であるか、陰性であるか、だけではなく、ウイルス量などを念頭に置いた、その Ct 値も併せて吟味しながら、臨床経過との詳細な分析と評価が必要と考え（例えば、ウイルス量が減少しても、肺の陰影が増強するような際に「サイトカイン・ストーム」の増悪や他の肺炎を想起するなど）、ここにおいても臨床力が厳しく問われているものと思います。

今回の感染症を病院長として目の当たりにして、日々考え、多くの文献に学び、また実践して

きたことを率直に述べさせていただきました。本来ならばこれら個々の文献の出所を提示することが必要かとも考えましたが、COVID-19に関するものは数限りなくあり、割愛させていただくことをお許しください（なお、ご連絡いただければ、出典をご提供いたします）。また、そのような中で浅学非才の身である私が考えた、限りある中でやさやかな思いを述べた拙文ですので、そのことをご理解いただき、また、お気づきのことやご指導をいただくことなどございましたら、ご批判とご教示賜れば幸いに存じます。COVID-19の1

日でも早い終息を祈りつつ、搁筆させていただきます。

「学べば学ぶほど、自分がどれだけ無知であるか思い知らされる。

自分の無知に気付けば気付くほど、より一層学びたくなる。」

アルベルト・アインシュタイン

（令和3年3月）