

遺伝子全体を比較すると、遺伝子の一部を取り上げて比較するのには、どのような違いがあるのかについては、少し時間をとって考えてみないとその違いがわからない。病原体の同一性の確認は、全体として比較する必要がある、PCR検査の特異性とは、まったく精度が異なってくる。遺伝子全体の比較が可能であれば、非常に高い精度で同一性の確認をすることができるだろう。しかし、PCR検査では、遺伝子のごく一部だけしかわからない。

この一部の遺伝子だけを比較しても、あまり意味はないだろう。遺伝子のごく一部が類似するのは、生物種を超えた場合でも、ごくありふれて見られる現象だ。現にヒトゲノム遺伝子の中にも、今回のウイルスゲノム遺伝子の部分配列と類似した箇所が数多く存在している。

## 抗原検査は、タンパク質の同一性を調べる

遺伝子レベルの同一性の確認よりも、タンパク質レベルでの同一性の確認は、これ

までも一部の病原体検査において、一般的に用いられてきた。例えば、インフルエンザやマリアの病原体確認のための抗原検査がある。抗原抗体反応を短時間で検出する方法として、イムノクロマトグラフィーという手法が開発された。これによって、短時間に抗原あるいは抗体の有無を調べることができるようになり、臨床検査として一般に普及するようになったのだ。

タンパク質の構造の違いについて抗体を用いて調べる方法については、遺伝子の構造を調べることも、比較的頭の中にイメージを作りやすいかもしれない。遺伝子とは、一般的にはそれ自体に機能があるというものではなく、遺伝子情報に基づいてタンパク質が作られるための設計図に過ぎない。

たとえば言うと、タンパク質は家やビルなどの建築物の実物に相当し、遺伝子は建築物の設計図面である。一般の人にとっては、建築図面よりも、実物の建物を見たほうが理解しやすいであろう。しかし、建物の構造を知りたいというような専門家にとっては、建物の実物とともに、設計図面は重要な情報源になる。

プロであれば、設計図面を見ただけで、建物をイメージすることができらるだろう。

しかし、一般社会では、このようなことができる人は限られている。通常は、設計図面を見ただけで、どのような建物であるのかを想像することは難しいだろう。

## PCR検査は遺伝子検査である

今回の騒動の原因は、PCR検査という、これまで医療で使われてきた検査法とはまったく違う遺伝子検査を持ち出してきたことだ。一般の人にとって、遺伝子という言葉は知っていても、遺伝子構造の話にはなじみがない。医療関係者であっても、ほぼ同様であろう。遺伝子検査とこれまでの一般的な検査は、まったく違う概念のものであるということを理解するのは容易ではない。遺伝子の話を建物の設計図にたとえて考えてみる。

もうだいぶ前の話になるが、マンションが傾いて、建物の基礎工事の施工に問題があるということが、ニュースの話題になったことがあった。設計段階での手抜きでこのようなことが起こったとされている。

これに関して、一般の人には、実際の建物が傾いているという映像が、マスコミによって流された。傾いた建物の映像によって、問題の概要が一般の人に理解されるわけである。しかし、もし問題の設計図面を見せられたとして、その構造上の問題を理解できる人は、どのくらいいるだろう。設計図面を一目見て問題がわかる人は、その分野で仕事をやってきた専門家の中でも、同様の問題に関連することを実際に経験した人に限られるだろう。

P C R 検査は、遺伝子を検査して、病原体を同定しようとするものだ。しかし、同定という手段に用いているのは、全体の遺伝子情報のごく一部である。設計図面の切れ端を見て、建物の全体を想像するようなものなのだ。より正確には、P C R 検査での同定は、設計図面の切れ端だけを見て、2つの建物全体が同じであるという推定をするようなものであるということだ。これが、P C R 検査の実態である。

このように設計図の切れ端だけを比べても、実際の建物の全体がまったく同じと断定できないし、全体が似ているのかもわからない。むしろ、解像度の低い画像で、全体の形の類似性を観た方が全体の同一性の類推には役立つだろう。P C R 検査で、一

体何がわかるのか。つまり、PCR検査で何を観ているのかを原理的に理解できる人が少ないというのが、実体ではないだろうか。

PCRは、遺伝子検査の方法の一つである。その原理を理解することは、それほど難しいことではないが、これまでの検査法とあまりにかけ離れているために、その本質を誤解されやすいのである。一般的な臨床検査は、タンパク質や細胞、組織の形や機能の異常や、病原体との同一性を調べるものがほとんどであった。これらは、実際に視覚化して考えることができる。

タンパク質や細胞は視覚化してイメージを作り上げることができるが、遺伝子は設計図であり、ここから自分で構造物のイメージを作り上げる必要がある。遺伝子変異に関する問題とタンパク質の変異の問題には、お互いに関連することもあるが、遺伝子だけの変異もある。遺伝子検査とタンパク質検査の違いは、その違いを認識することが難しいところにあるようだ。

## PCR検査の問題点に気づけるのか

今回のPCR検査についても、同様のことが言えよう。医療関係の専門家でも、PCRを実際にやった経験者はそれほど多くはないだろう。また、分子生物学や遺伝子工学などの専門家で、病原体の検査に携わっている人は、それほど多くはないかもしれない。さらに、利害関係や仕事の関係上、PCRの問題点がわかっていても、そのことを表明しにくいということが考えられる。

前述のように、遺伝子検査というのは、建物の設計図を調べることに相当する。設計図に基づいて建てられた建築物に問題がある場合、設計図の作成とこれに基づいた建築現場の両方の経験がないと、設計図面だけを見て問題点の指摘をすることは難しいのではないだろうか。これと同じようなことが、今回のPCR検査についても言えるのだ。

これまで、PCRを使って病原体の検査法の開発に携わっていた人は、極めて少な

いだろう。その理由は、PCR検査を病原体検査に用いるメリットがそれほど多くないからだ。このように、PCRを使った病原体検査法の開発を経験した人は、設計図に相当する遺伝子構造やその遺伝子構造決定の由来や、その応用先などの情報を得て、その問題点を指摘することができるかもしれない。しかし、このような人材の数は、極めて限られているのだ。

HIV関係を除くと、PCRを使った病原体検査を行っている例は、それほど多くはない。HIVのPCR検査を問題視していたキャリー・マリスは、既にこの世にいない。もしかしたら、PCRを病原体検査に用いることの危うさを語ることができる専門家はほとんどいないのかもしれない。

PCRの原理は、それほど難しいものではない。また、病原体の遺伝子の特徴や、宿主の免疫機構などの仕組みなども、高度な専門的知識が必要というレベルではない。しかし、今回の騒動の原因は、病原体を検査する原則を踏まえたうえで、PCRを病原体検査に用いる時に何が問題になるのかという、考え方の筋道が確立していないということにある。科学の発展とともに、専門分野が細分化されてきたことも、PCR

検査の問題点を議論する機会が少ない一因であると考えられる。

科学者の専門分化の傾向は、専門分野を越えた枠組みでの思考をするという経験をする機会を奪うことになった。専門家の専門志向は、ますます強まる傾向にある。研究費の配分やそれに重要な役割を果たす専門雑誌への掲載のための審査において、専門家集団の役割が大きくなってきている。そのために、専門志向を高める必要性が増しているという面があるかもしれない。

今日の実社会においては、分野を越えた分析力や思考力が欠かせない問題が増えてきているにもかかわらず、各専門分野においては、科学者が専門志向を強めており、実社会の問題には無関心になる傾向にある。このことが、今回の騒動の本質を理解する人材不足の一因になっている。

## 同一性の確認の意味

突き詰めれば、今回の騒動の原因は、病原体の同定の方法が適切であるか、すなわ



ちPCRによる遺伝子同定が、病原体の同定的手段に使えるのかという問題が解決されていないことにある。そこに問題があるという認識すら共有されていないのだ。

本来、感染症における病原体の確認は、対策を立てるうえで極めて重要な作業になる。病原体の同一性の確認には、病原体自体の同一性の確認が最も確実であるが、それが不可能な場合には、病原体のタンパク質を用いる方法や、タンパク質に対する抗体を用いる方法、あるいは遺伝子を用いる方法もある。

ウイルスの場合、病原体そのものを用いて同一性を確認することは、現実的には不可能である。そのために、病原体の確認は、病状や環境要因などで診断をすることが一般的に行われてきた。症状による診断は、病原体の同一性を確認する方法としては、病原体の持つ病原性という機能に着目した方法であり、タンパク質や遺伝子を用いる方法が病原体の持つ物質的な特徴を捉える方法とは、基本的に異なる。当然ながら、症状による診断では、無症状感染という概念は存在しなかった。

## タンパク質を用いた同一性の確認

今回の感染症においては、PCRを用いて遺伝子レベルでウイルスの同一性の確認を行っているという解釈が一般的であろう。抗原検査は、タンパク質の同一性の確認であり、抗体を用いて行う。抗体検査は、病原性とタンパク質の同一性が関与してくる。病原体の同一性を問う場合、これまでは通常、病原性または病原体そのものを用いて、同一性の確認を行ってきた。これらの同定を補助するために、抗体を用いたタンパク質レベルでの同定も用いられてきた。インフルエンザでは、抗原検査も普及してきている。抗原検査はタンパク質を用いて、同一性の確認をしている。

ところで、タンパク質の同一性について、抗体を用いて知ることができるのだろうか。実はこれも簡単には結論が出ない問題である。

特に最近の技術の進歩により、抗体の作り方も新しい方法が出てきた。従来の免疫方法で動物を使って作成した抗体と、人間が病原体に対して作り出した抗体は同一で

はない。モノクローナル抗体という細胞融合技術を使った抗体と、従来の方法で作成した抗体も同一ではない。抗体を使って抗原の同一性は示せるのかについても、そう簡単に結論が出せるわけではない。この抗体が、タンパク質のどこの部分と合致するのかという情報がないことには、判断のしようがない。

モノクローナル抗体は、動物を使って作成する通常の抗体よりも、特異性が高いと考えられている。しかし、モノクローナル抗体の高い特異性は、欠点にもなり得る。タンパク質全体を認識するのではなく、全体のごく一部だけを見るからだ。もし、この一部に変化が起ると、まったく検出できなくなる可能性がある。PCRは、高い特異性で遺伝子の一部を認識するという特徴が、逆に遺伝子変異に弱いという欠点にもなっている。これは、モノクローナル抗体を使った抗原検査と、よく似ているのだ。モノクローナル抗体を使うと、タンパク質全体の一部だけを取り出して、同一性を確認することになる。PCRが設計図面の切れ端を使っての同定とたとえるなら、モノクローナル抗体を使った同定は、実際の建物の一部を見て、建物全体の同定をするようなものになる。建物全体を眺めるといふ視点は欠如してしまうことに注意

する必要がある。

## 遺伝子レベルの同一性を確認することは困難だ

遺伝子レベルでの同一性の確認は、タンパク質レベルでの同一性の確認とは、異なった問題がある。遺伝子レベルにおいては、遺伝子変異の問題がある。タンパク質のレベルでも変異の問題はあるが、遺伝子のほうが、変異の問題が大きく影響するのだ。同一性の確認という、一見すると単純な課題であるが、そこには様々な問題が存在するのである。PCRでは、遺伝子を何億倍にも増幅させる。遺伝子レベルの変異は、この増幅反応に大きな影響を与え得る。

PCR検査は、遺伝子全体のごく一部の同一性しか検査できないのに対して、RNA遺伝子全体の類似性を見る方法として、ノーザンブロットという方法がある。しかし、操作法が煩雑であり、感度もPCRに比べると落ちる。そのために、病原体の検査法として使えるようなものではない。

しかも、遺伝子構造の同一性というのは、複雑な遺伝子多型や変異体が存在する病原体においては、どのような意味があるのかについて、全体像をイメージするのは容易ではない。今回の感染症の診断法として、PCR検査という方法による遺伝子レベルでの病原体同定が正しいというようなことが、マスコミや政府の意向に沿う専門家により、一方的に宣伝された。

このようにして、ある意味では権威づけされたPCRの問題点を指摘することは、一般社会の人にとっては容易でない。一般の医療従事者にとっても、類似した問題があり得ると思われる。問題のPCRを使って、次々と無症状感染者が作られていくと、多くの人々は、黙ってそれに従うしかないのである。

## 病原体と科学

古来、感染症は病気の主流であった。感染症が病原体によって引き起こされるという事実が明らかになったことにより、科学的に感染症を捉えることができるようになった。

った。コッホの4原則は、病原体確認の方法論の基礎である。しかし、ウイルスの中には、コッホの4原則を満たせないものも出てきている。この現象は、そのウイルスが病原体であることの科学的証明ができないということとほぼ同義である。

問題のウイルスが病原体でないとは断定できないが、現時点において病原体であるとは、科学的に証明ができていないのである。これから技術の進歩により病原性が証明される可能性はあり得る。しかし現時点においては、肯定も否定もできない状態なので、その取り扱いには十分な注意が必要である。

同定に用いる情報としてはあまりに少なすぎるのにもかかわらず、問題の病原体であると断定しすぎていないかということに注意を払う必要がある。情報を伝える側が、不十分な情報により無理矢理に断定してしまわないで、必ずしも断定できないという情報を提供することが、重要なのだ。この情報を聞いた人が、自ら判断するしかないのである。

## PCRは、病原体ウイルスを同定できるか

PCRは、コッホの4原則を確認するために使うことができるのかも定かでない。まずPCRでは、病原体遺伝子の同一性を確認するのは、困難であるという事実がある。さらに、問題となっている遺伝子を持ったウイルスが本当に実存しているのかを確認することも、クローン化が困難なウイルスでは難しい。またこのウイルスが実存したとしても、クローン化ができていない状態では、その病原性を確認することが容易ではない。

感染症の病原体検査において、PCRを使って病原体の同定ができるのかは不明であるが、一般的に多くの問題があることは予測できる。遺伝子の変異が多いRNAウイルスでは、なおさらPCRを使った病原体の同定は困難であろう。仮に中国から出された論文のウイルスが実在のものであったとしても、既にウイルス発生から相当に時間が経っており、遺伝子変異が進んでいることが想定される。そのために、オリジナ

ルな遺伝子配列を持ったウイルスは既にこの世に存在しない可能性が高い。

P C Rの発明者であるキャリー・マリスも、P C Rを病原体検査に用いることの問題点を語っている。しかし、その発言の趣旨は、H I Vウイルスの数の測定にP C Rは使えないとか、P C Rの結果の解釈に間違いがあるというような趣旨の発言が多く、一般的に理解しにくいという問題があった。

具体的にP C R検査にどのような問題点があつて、病原体の同定に向いていないのかわ知るには、P C Rの原理や、病原体の一般的な問題を考える必要がある。したがつて、このようなP C Rの基本的な問題点の情報を共有することが極めて重要になってくる。

そもそも、問題としているウイルスが、本当に病原体であるのかを確認することが一番重要な課題のはずである。しかし、今回の対応に当たってはこの点を省いて、いきなりP C R検査を始めた。P C R検査は本当に病原体ウイルスを同定できるのかという問題があるが、この問題を議論することなく、P C R検査が広がっていった。一見すると、P C Rは病原体の遺伝子断片を同定することにより、病原体の同定に使え



そんな気がする。しかし実際には、PCR検査により、病原体であるRNAウイルスの同定をすることは困難なのだ。

## 病原体同定の重要性

このように、病原体を同定することが、感染症の診断の基本であるにもかかわらず、同定するための工程を理解することは簡単なことではない。しかも、この同定作業を間違えると、大変重大な問題を引き起こす可能性が高い。そのために、病原体同定の方法に対する信頼性に関しては、十分な検討が欠かせないのである。

特に今回のように、PCRという新しい診断法を導入する場合、これまでの病原体同定とは、異なった問題点がある。その問題点を様々な角度から検証していくことが、結局のところ、最も有効な感染症対策になるのだ。最初から、新しい診断法であるPCR検査を信頼しきっては、取り返しのつかない過ちを犯してしまう可能性がある。

このため、本書では、PCR検査の抱えている問題点について、以下のとおりA)

D のカテゴリーに分けて、いくつかの観点から詳細に考えていくことにしたい。

- A. PCR検査は、RNAウイルス変異体が検出できない可能性がある
- B. PCR検査は、未知の微生物を検出している可能性がある
- C. PCR検査による同一性の確認は、事前調査なしでは不可能である
- D. PCR検査は、健康な人を病人にする可能性がある

## 第2章

PCR検査はRNAウイルス変異体を  
検出できない可能性がある

## PCR検査は、遺伝子変異の多いRNAウイルスの検査には使えない

一般的にRNAウイルスは、変異が多いことで知られている。現に今回問題となっているウイルスも、多数の変異体が知られている（20）。PCR検査は、99%の特異性があるとされているが、この高い特異性が他の病原体遺伝子と明確に区別し得る根拠とされている。

したがって、今回問題となっているウイルス自身も変異は進んでいくために、変異率がある時点に達した段階で、PCR検査では検出できなくなるはずである。理論的には、99%の特異性があるということは、変異率が1%まではPCR検査での検出が可能であるが、変異率2%になれば、PCR検査では検出できなくなるということである。したがって、変異の多いRNAウイルスには、病原体の同定にPCR検査は基本的に用いることができないと考えるのが妥当であろう。

## 新型コロナウイルスの定義はあるのか

RNAウイルスは、変異が多いことから、有効なワクチン開発が難しいとされている。この高い変異率に関して、DNAの複製のようなミスコピーを修復する機構が、RNAの複製時には欠如しているということが原因であるとされているが、それ以外の要因があるとする指摘もある。

一般的にRNAウイルスでは、RNAの複製が起こるたびに、変異が蓄積していく。HTLV-I（ヒトT細胞白血病ウイルスI型）、インフルエンザ、ポリオなどでは、ウイルスの変異率に関して複製サイクルあたり $0 \cdot 2 \sim 25 \times 10^{-5}$ 変異／塩基の変異が起こるとされている（3）。新型コロナウイルスの場合も、かなりの頻度で変異をしていることが報告されている。このような多様な遺伝子を持ったウイルスであるが、そもそも新型コロナウイルスとは、どのような定義づけがされているのか。

今回の騒動の発端は、中国上海のグループが科学雑誌『Nature』に出した論文（8）

(以下、参考文献を( )で表示し、巻末に掲載)である。この論文は、武漢の病院に重症肺炎で入院した患者の肺から採集した液体から、ウイルスを精製しないままに、次世代シーエン<sup>フエーシング</sup>スの技術を使って決定したゲノム遺伝子の構造を解析している。この遺伝子の情報は、米国の Genbank という遺伝子バンクに登録されている。

一般的な考え方としては、新型コロナウイルスとは、この遺伝子を持ったウイルスとその変異体を言うのであろう。しかし、どの程度の変異体までを新型コロナウイルスと言うのかについては、いまだに明確な答えは出ていない。実際の新型コロナウイルスの定義は、公には明らかにされていない。新型コロナウイルスの変異体について言及すると、PCR検査の正当性に関する問題に発展しかねないということが、問題をあいまいにしているのではないだろうか。

## PCRの特異性は、何によって決まるのか

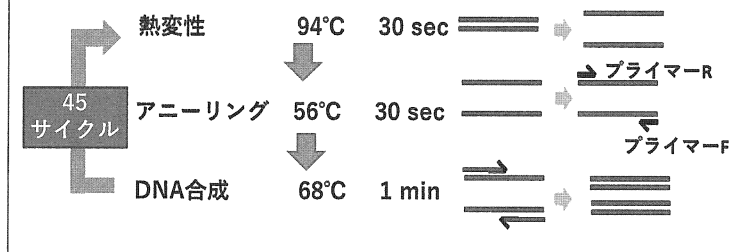
PCRは、増やそうとする1本鎖DNA(テンプレート)にプライマーと呼ばれる

短い遺伝子が結合する必要がある。DNA合成酵素は、増やそうとするDNAがプライマーと結合した後に、その先のDNAを合成していく。これにより、2本鎖DNAが完成し、熱変性により分割されて1本鎖DNAが2本になる。この過程を通じて、DNAが2倍になるわけだ。

PCRでは、DNAが1サイクルで2倍になる。2サイクルで4倍、3サイクルで8倍、 $n$ サイクルでは、2の $n$ 乗倍になる。これは理論的な数値であり、実際の増幅率は、理論値よりも若干低くなる。35サイクルでは、340億倍だが、実際には数億倍ほどである。

PCRの最初の段階において、プライマーがテンプレートに結合しないと、DNA合成酵素は能力を出すことができない。プライマーとDNAの結合は、非常に特異的に進行する。プライマーは、20塩基ほどの長さのものが使われるが、テンプレートがこのプライマーと結合するためには、DNAの配列とプライマーの配列が相補的な関係にある必要がある。そのためには、各塩基が相補的である必要がある。すべての塩

## PCR (ポリメラーゼ 連鎖 反応)



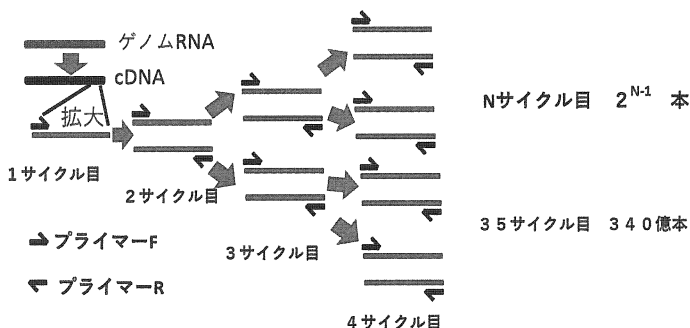
PCR の反応について、そのプロセスを示す。国立感染症研究所のマニュアルの中で紹介されているネステッド法の一部である。実際には、プライマーセットを替えてもう45サイクルを実施する。

基が相補的である場合、結合特異性99%というレベルの反応条件を設定することが可能になる。特異度99%とは、プライマーとテンプレートの結合性に関する特異性である。すなわち、プライマーの長さである20塩基長において、テンプレートと完全に相補的な関係にあるときに、増幅反応が進行する。これが、99%の特異性の本体なのだ。

プライマーとテンプレートを結合させるときに、一時的に56°Cに温度を下げるが、温度を下げすぎると、プライマーとテンプレートの結合において、多少のミスマッチがあっても結合してしまう。そのために、温度の調節をしながら、プライマーとテンプレートがぴったりと結合す



## RT-PCRの原理



RT-PCR は、このようにして、遺伝子を試験管内で増やしていく。遺伝子を増やす前に RNA を相補的な DNA (cDNA) に変換する必要がある。これを鋳型 (テンプレート) にして、このテンプレートに結合する相補的な部分配列を持ったプライマー (プライマー-F) とテンプレートと同じ部分配列を持ったプライマー (プライマー-R) で挟み込むように、各プライマーの遺伝子配列を設計する。

る最低の温度を決める。このような調整がうまくいくと 99 % の特異性を出すことができる。

しかし、99 % の特異性の本体は、あくまでプライマーの結合部位だけの特異性であり、プライマーに挟まれて遺伝子増幅する領域については、遺伝子の一致をみるわけではない。プライマーに挟まれた領域は、遺伝子が完全に一致しなくても反応は進行する。ただしこれは、通常の PCR の場合である。通常の PCR においては、反応が終わった後で、電気泳動をおこなって遺伝子増幅を確認する必要がある。このた

めに、操作が増えるという問題に加えて、サンプル中の遺伝子のコピー数を測ることが難しいという問題がある。

現在、最も汎用的に用いられているのは、リアルタイムPCRである。リアルタイムPCRでは、遺伝子の増幅を経時的にモニターすることができる。PCRにおいて、プローブという短いDNAがどのくらいDNA合成に取り込まれたかで、反応の進行状況をモニターする仕組みである。プローブは、2つのプライマーに挟まれた領域に結合する20塩基ほどのDNAに特殊な仕組みの蛍光色素を標識したものである。したがって、リアルタイムPCRにおける99%の特異性は、20塩基ほどのプライマーの結合部位が2か所、そしてプローブの結合部位の合計約60塩基ほどの長さのDNAの一致ということになる。

## PCRは、遺伝子の変異に弱い

しかし、このような高い特異性は、プライマーとテンプレートの結合性が、非常に

HTLV, bovine leukemia virus,

Influenza A, poliovirus type 1

0.2 ~  $25 \times 10^{-5}$  変異／塩基／複製サイクル

哺乳類

$5.5 \times 10^{-9}$

変異／塩基／年

HIV

$1 \times 10^{-4}$

変異／塩基／年

RNAウイルスの変異速度の比較 佐藤、横山「RNAウイルスと変異」(3)より

デリケートな性質を持つことに関係している。プライマーとテンプレートが完全に相補的な関係にあるときにのみ、両者が結合するが、20塩基の中で、一つでも相補関係にない場合は、両者の結合はうまくいかなくなる可能性がある。両者の結合が起こらないと、PCRのDNA合成は行われない。

もし、増やそうとするDNAに変異があつて、本来のDNAの塩基配列と違った塩基に置き換わっている場合には、プライマーとテンプレートは結合しなくなってしまう。簡単に言うと、20塩基のプライマーに結合するテンプレートの20塩基の領域の中で、いくつかの塩基がオリジナルな形から変異していると、PCRによるDNA合成が行われなくなるということが起こってしまうわけだ。

反応の条件にもよるが、20塩基の中で1塩基の変異があると、PCR反応は大きな影響を受ける可能性がある。20塩基の中で2塩基の変異が起きていると、PCRはまったく反応しなくなるだろう。

そのために、遺伝子変異が数%になった時点で、PCRは、大きな影響を受けて、遺伝子の増殖は低下する。ウイルス発生からウイルスは複製を繰り返す。複製のたびにミスコピーが一定の割合で発生する。ミスコピーは遺伝子の変異となる。ウイルスの遺伝子変異の進行に従って、この遺伝子を検出するためのPCRにおいて使用するプライマー遺伝子とのミスマッチが増えてくる。そのために、ウイルス遺伝子の変異が進行していくと、ある時点でPCRの効率が急速に低下する。変異がさらに進むと、PCRはまったく反応しなくなると考えてよいだろう。

それ以降、遺伝子の変異はさらに起こり続け、二度と、もとに戻ることはない。しかも、プライマーが結合しなくなると、PCRが使えない状態になるために、どのような変異が起こったのかを調べることも容易ではない。遺伝子変異は、地域性があるために、変異体の地域分布を調べないとPCR検査の意味もなくなるだろう。

## 変異体の中には、PCRで検出されないものが存在する

PCR検査は、非常に特異性が高いことで知られている。反応条件をうまく設定すると、最大99%の特異性が得られるほど、遺伝子を見分ける能力があるのだ。しかし、このような特性は、負の問題点も併せ持つことに注意しないといけない。

ウイルスは変異すると、PCRでは検出できなくなるという問題が生じ得る(21)。99%の特異性という条件下でPCR検査を行い、2%以上遺伝子が増えたと、ウイルスの遺伝子を検出できないことを示している。検出できない変異遺伝子が増えるとPCR検査の意味がなくなる。そのために、ウイルス遺伝子が、どのように変異をしているのかを時間経過を追って調べていくことが必要だ。変異率がPCR検査に適さないレベルに達するのはいつなのか。それが、このPCR検査の有効期限である。

PCRの反応条件を変えると特異性もある程度下げることができる。温度を下げるとか、ある種のイオンを加えてプライマーとテンプレートの結合を起こりやすくする

ことにより、特異性が下がる。

しかしあまり特異性を下げすぎると、非特異的な反応が多くなり、特異的に遺伝子を調べるという検査の意味がなくなる。そのために、特異性の下限は95%程度である。検査から漏れるウイルスが出ては検査の意味がなくなるので、PCRの条件を検討したとしても、ウイルスの変異率2〜3%程度の時点を、ウイルス検出にPCR検査を使うタイムリミットとして設定することが必要であると考えられる。

## ウイルスの変異速度

今回問題となっている新型コロナウイルスの変異速度を算出するためには、ウイルスの複製サイクルについての情報が必要だ。1年間に何回複製されるのかを調べる手段として、ここでは培養細胞を使った実験のデータを利用する。国立感染症研究所(14)やオーストラリア(11)から出されている論文によると、このウイルスは1日あたり3回程度複製するという結果が出されている。HTLV, BLV, SNV, Influenza A,

poliovirus type 1, VSV, の複製時の突然変異発生頻度について、 $0 \cdot 2 \sim 25 \times 10^{-5}$  変異／塩基／複製サイクルという数値が出されているので、今回のウイルスにこの値を当てはめると、1年あたりの変異率は $0 \cdot 2 \sim 25 \times 10^{-2}$  変異／塩基程度であると予測ができる。1塩基あたり、最大25%の確率で変異する可能性があることになる。

ウイルスの変異率は、ウイルスの複製回数に比例すると考えられている。今回のウイルスが、どのような形で複製を繰り返しているかについての実態は、不明な点が多い。ここに示した変異率の予測は、複製が常に起こっているという想定での数値であり、実際の変異を調べると複製の休止期と複製期の割合が算出できるだろう。

## ウイルスの変異を知る手がかり

今回問題となっている新型コロナウイルスの変異を知るもう一つの手がかりは、国立感染症研が作成したPCR検査マニュアルに記された遺伝子配列法における陽性限界値だ。このPCR検査マニュアルは、大別して3種類のPCR検査法が記されている。

2段階でPCRを行うネステッド法、遺伝子複製がどのように進行しているかを実際の反応過程においてモニターするリアルタイムPCR、そしてPCRで増やした遺伝子の塩基配列を決定するシーケンス<sup>シークエンス</sup>解析法だ。

遺伝子の塩基配列を決定する方法においては、95%以上中国の論文に付随して発表された塩基配列のデータと一致した場合に、陽性と判定するという記載がある。いわゆる陽性限界値が、遺伝子の変異率5%ということになる。一般的に、陽性限界値はテストサンプルについて、どの程度のばらつきがあるかを調べて、標準偏差を計算して決定する。

慣例的に医学の検査法の開発においては、簡易的に陽性限界を決めるときに、陰性であるサンプルの平均の2倍を陽性限界とすることが多い。実際にどの程度のばらつきがあったのかについてのデータは不明であるが、この時点で既に2~3%の変異があったために、5%の変異までは許容するとして、陽性限界値が設定されたと思われる。

もし、そのときの変異が1%程度であれば、陽性限界を2%にしていたはずだ。実際に変異率が2~3%であったから、5%程度の変異を許容せざるを得なかったので



あろう。12月の初旬に新型コロナウイルスが発生していたとすると、2か月間に2・5%の変異が起こったことになり、1年間あたり、15%の変異／塩基と計算される。この値は、休止期と複製期が半々であるとする、前述の年間最大25%という値とも概ね一致する。そのために、仮に年間変異率を15%として、PCRの有効性について考えていく。

## 新型コロナウイルス遺伝子変異の現状

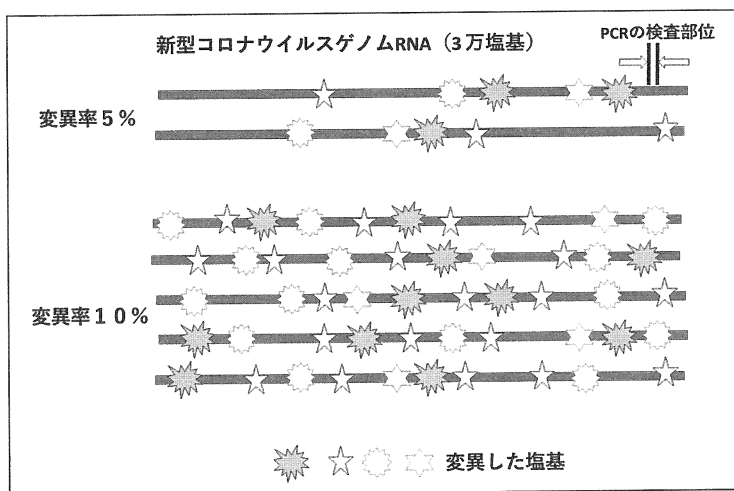
現時点の新型コロナウイルスは、どのような変異率になっているだろうか。前述のように年間15%の変異率であるとするならば、4か月で5%の変異が起こる計算になる。仮に12月の初旬にこのウイルスが発生したとすると、4月には5%、8月には10%に達していることになる。

変異率5%と推定される4月時点では、新型コロナウイルスゲノム全体は3万塩基とすると、1500塩基が変異をしていることになる。プライマーが結合する部位で

も変異は起こるために、相当数の新型コロナウイルスが検出不可能になっていたと考えられる。検出できない変異型があるものの、新型コロナウイルスの検出には、なんとか使えるレベルであったかもしれない。しかし、8月には、計算上では変異率10%になっており、PCR検査ではほとんど検出できないレベルである。ほとんどの新型コロナウイルスは、もう検出するすべもないという理屈になる。

しかしながら、7月以降も新型コロナウイルスの感染者と呼ばれるPCR陽性者が続けた。特に東京などの都市部において、PCRの陽性者数は、緊急事態宣言が全国レベルで発出された4月～5月の数を上回った。この7月以降のPCR陽性者は、一体何を意味するのであろうか。RNAウイルスである新型コロナウイルスは、前述のように変異率10%になるとPCRでは検出できないはずなので、このウイルス以外の遺伝子を検出している可能性が高いが、その検証はされていない。

20塩基の長さのプライマーを2本使って、テンプレートDNAとの結合を起こさせて、PCRの反応をさせる。20塩基が2本で合計40塩基になる。この部分の遺伝子配列に限定しても、多数の変異体が存在し得る。プライマーセットの種類にもよるが、



新型コロナウイルスの遺伝子変異。ウイルスのゲノム RNA（全長 3 万塩基）の遺伝子変異率 5 % と、10 % の場合に、変異した塩基がどのように配置されるのかを模式的に示した。変異した塩基は、オリジナルから変化した塩基を示す。実際には、5 % の変異率の時には、1500 の変異した塩基、10 % の変異率の時は、3000 の変異した塩基が、3 万塩基のゲノム全体に存在する。PCR 検査で調べる場所も、模式的に示した。

多くのプライマーは、ゲノム遺伝子の中のタンパク質に翻訳される領域に設定されているために、このプライマー部分の遺伝子も、他の部分と同様に翻訳されてタンパク質になる。タンパク質に翻訳される遺伝子の一部がプライマー部分に相当する。遺伝子の変異は、プライマー部分やそれ以外の部分に関係なく一律に起こるので、プライマー部分の 40 塩基も、1 年で 15 % の遺伝子変異が起ることが予測される。

## 遺伝子変異がウイルスの機能に影響しないことも多い

宿主の細胞内において、ウイルスは宿主の細胞の仕組みを利用して、ゲノムRNAからタンパク質を作り出す。しかし、ウイルス遺伝子に変異が起こっても、遺伝子から翻訳されるタンパク質に変化を生じないという遺伝子変異が存在するのだ。それが、同義置換という変異である。例えば、グアニン→グアニン→グアニンというコドンは、3番目の塩基が変化してグアニン→グアニン→ウラシルになっても、グリシンというアミノ酸に翻訳される。しかし、2番目のコドンが変化して、グアニン→ウラシル→グアニンになるとバリンに翻訳される。これを、非同義置換という。本来は、遺伝子に変異して、翻訳されるタンパク質が変わってしまうと、これまでの機能が変わってしまう。通常は、様々な機能を持ったタンパク質が相互作用しながら、全体として調和を保っている。この全体としての調和という概念が重要なのだ。しかし、その中の一つのタンパク質の機能が変わってしまうと、全体の調和が保てなくなる。

そのために、タンパク質の変異が起こると、そのウイルスは、弱体化するのが通例だ。非常にまれに、ウイルスの増殖が盛んになるという強毒化の変異も起こり得る。しかし、この場合には、感染者に強い症状が出るために、他の人と接触することがなくなってしまう。広く伝播するということがないために、結果として、この強毒化したウイルスは、絶えてしまうか、再び変異して、強毒でなくなる。

このような理由により、遺伝子変異したもののの中で、一番残りやすいのが、タンパク質の変化を伴わない同義置換という遺伝子変異である。およそ全体の遺伝子変異の90%ほどは、この同義置換である。タンパク質に変化を起こす非同義置換の中で、比較的起こりやすいのが、性質のよく似たアミノ酸への変化である。

ところが、性質のまったく異なるアミノ酸への変化は非常に起こりにくい。性質の違ったアミノ酸に変わると、タンパク質の形が変わるとか、タンパク質の重要な機能を担う部分に影響を与える場合があり、通常は今までの機能が果たせなくなる。その結果として、変異を起こしたウイルスは、自然に消滅するだろう。消滅するから、そのような変異を起こしたウイルスは、見つけることができないというわけだ。

ダーウィンは、その生物が生き残るのに有利になるように遺伝子変異が起こると考えた。いわゆるダーウィンの進化説である。しかし、今では遺伝子変異は、有利になる変異が選択的に起こるというのではなく、遺伝子変異自体は、その結果として有利になるとか不利になるとかということとは無関係に、ランダムに起こるという中立説（2）が一般的に受け入れられている。木村資生博士<sup>もとお</sup>によつて提唱されたこの説は、若干の修正が加えられることがあるが、遺伝子変異はその生物にとつて、有利か不利かに関係なく起こるのであつて、有利か不利かは、遺伝子変異の結果論であり、遺伝子変異が起こる仕組みに、影響するものではないということである。

繰り返しになるが、ウイルスの場合、変異することにより、強毒化しても、結果として自滅の道を進むだろう。また、ウイルスとしての基本的な機能を果たせない変異が起こると自滅する。したがつて、遺伝子の変異は、アミノ酸を変えない同義置換が大半を占め、残りの大部分は、よく似た性質を持ったアミノ酸への変異となる。アミノ酸の性質を大きく変える変異は、極めてまれにしか起こらないという結果になる。

## 同義置換による変異体の種類について

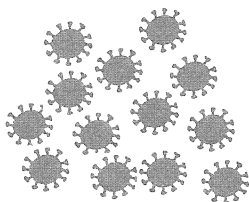
前述のように、遺伝子の変異の大部分は、アミノ酸の種類も変えない同義置換である。アミノ酸が変わらなければ、当然ながらタンパク質の性質も変わらない。タンパク質の性質も変わらないので、ウイルスの顔形もまったく同じであり、病原性などの性質に関わる部分もまったく違いがない。

遺伝子からタンパク質に翻訳されるときに、アミノ酸の種類は、核酸塩基3つが一つの情報単位となった遺伝子コドンにより、決定される。RNAの塩基には、グアニン・アデニン・ウラシル・シトシンの4種類があり、これが3つ並ぶと序列として、3の4乗＝64通りが存在する。アミノ酸は20種類あるので、基本的には平均すると、1つのアミノ酸あたり、約3種類のコドンが存在する。プライマーは20塩基の長さがあり、これをPCRでは2本使うので、合計40塩基の遺伝子情報を持つ領域になる。コドンで考えるとアミノ酸では、およそ13アミノ酸に相当する。1つのアミノ酸は平



1 種類

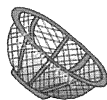
PCRにより検出可能



159万種類

PCRでは検出不能

RNA ウイルスの同義置換体の中で、PCR で検出できるものは、ほんの一部に過ぎない。プライマーの認識する部位における遺伝子の同義置換体（アミノ酸の変化のない変異体）だけを考えても、PCR では159万種の変異体が検出できない。



=



PCR

ザルでバケツの水を汲む人はいないだろう。変異体のたくさんできているRNA ウイルスは、PCR 検査で検出できないウイルスの遺伝子が増大して、天文学的な種類があり得る。したがって、医学的な検査には、使えない。