

## 新型コロナウイルス感染症は、PCR の誤用による、まぼろしの感染症 である

2020年8月27日 佐藤 莊太郎

6月17日の、池田としえさんがコーディネートされた大橋眞先生の記者会見講演は大変参考になりました。その講演要旨を纏めました。(PDF にまとめてあります。)

<http://satouclk.jp/%E5%A4%A7%E6%A9%8B%E7%9C%9E%E5%85%88%E7%94%9F%E8%A8%98%E8%80%85%E4%BC%9A%E8%A6%8B.pdf>

さらに、国立感染症研究所の、新型コロナウイルスの PCR テストのマニュアル(日本語)を読みました。

<https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/2019-nCoVmanual20200217-en.pdf>

以前に PCR に関心を持ったことがあり、「改定 PCR 実験ノート」(羊土社)を持っておりました。やっと役立つ機会がきました。

DNA は常温では相補性の2本鎖の状態に結合しているが、温度を上げると1本鎖に別れる。キャリー・マリスはこの状態の DNA に 20 塩基前後の短い DNA (プライマー) を結合させ、温度を戻して DNA ポリメラーゼという酵素を働かせるとプライマーの先の DNA が伸び、2本鎖の状態になることを思いついた。DNA は2倍になる。「いとも簡単に DNA を複製(増幅)できる」ことの発見に、1993 年ノーベル賞受賞した。

PCR の基本は、2 個のプライマーで挟まれた DNA の部分を何億本にも増幅することである。その産物をアガロースゲルの電気泳動にかけることで、「見える化」され、増幅された DNA の長さも推定できる。3 ページ目の下の写真が、新型コロナウイルス検出用 PCR キットの結果である。

新型コロナウイルスの診断においては、武漢型コロナウイルスと定義されているウイルスの DNA の一部をプライマーとして用意しておき、サンプルの DNA にそのプライマーが結合し、DNA の増幅が確認されたとき、新型コロナウイルス陽性と判定される。つまり、**プライマーで新型コロナウイルスかどうかを診断する**。(新型コロナウイルスは RNA ウィルスで 3 万塩基の大きさ。逆転写酵素で DNA 化される)

PCR において、プライマーの最適な長さは 18~25 塩基とされる。短かすぎても長すぎてもうまく行かない。新型コロナウイルスの診断の場合、武漢型と登録されたウイルスの DNA から、このウイルスに特有な配列を選び、そこから、塩基配列の連続したプライマーを 2 組ずつ作る。まず外側のプライマーで 40 サイクルの PCR を行い、次に内側のプライマーに替えて 2 段階めの PCR を行う(nested PCR)。

40 サイクルは 2 の 40 乗、1 兆倍の増幅である。2 段階の PCR が行われるため、DNA の増幅は 2 の 40 乗 × 2 の 40 乗、すなわち 10 の 24 乗倍の増幅となる。(1,000,000,000,000,000,000,000,000 倍、アボガド口定数に近い!) サイクル数が多い時、DNA 断片で目的外の DNA の増幅がおこってしまう可能性が増える。2 段階目の PCR では、小さいピペットの中の塩基の材料が枯渇して、空廻りの PCR が行われる可能性がある。

PCR においては、プライマーの長さが短いので、長いウイルスの塩基配列の中に、目的の箇所以外にプライマーが結合する塩基配列がないか、検討が必要である。新型コロナウイルスの診断のプライマーは、武漢型新型コロナウイルスに特有で、他のウイルスや細菌の DNA と結合することがない、とは言っても、それは「コンピュータに登録されたデータベースのウイルス、(細菌)の DNA を検索した範囲では」ということである。ヒトに問題を起こさない常在ウイルスや細菌は多数存在するはずで、それらは研究調査の対象にならない。

新型コロナウイルスの検査においては、鼻腔や口腔からサンプルを集める。ここには真菌、細菌、クラミジア、ウィルスと、雑多な微生物が生息する。サンプルから RNA を抽出するが、RNA は分解され易く、この段階は細心の注意が必要で、手間がかかるらしい。抽出された RNA は DNA に変換され、PCR にかけるが、常在微生物の DNA に新型コロナウイルス用のプライマーと結合する塩基配列があっても全く不思議ではない。この問題は、大橋眞先生の講演の中でも指摘されている(インフルエンザ用の PCR キットであるが、クラミジアなどに反応する)。

下の YouTube の動画で、愛知県の感染症対策室に問い合わせに行き、新型コロナウイルス用の PCR キットが、インフルエンザ A、B、クラミジアに反応しうることを確認している。

<https://www.youtube.com/watch?v=rxT50mWINu0>

(タカラバイオの PCR キットの注意事項:ヒト、動物への医療、臨床、陰断用には使用しないように(聞き取り))

数学的なセンスのある方なら、上に指摘したような問題は簡単に理解できよう。感染経路のわからない新型コロナウイルス感染が増えているというのは、新型コロナ用 PCR キットから生じる問題と理解されよう。

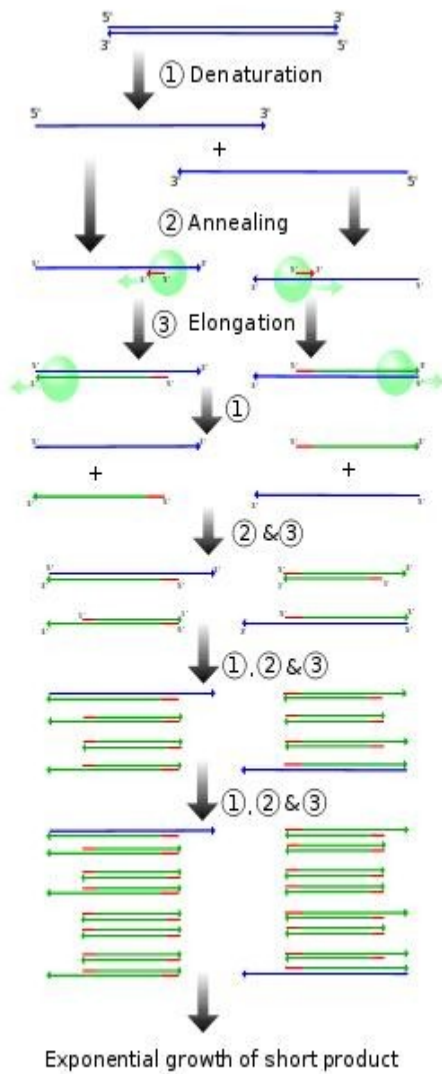


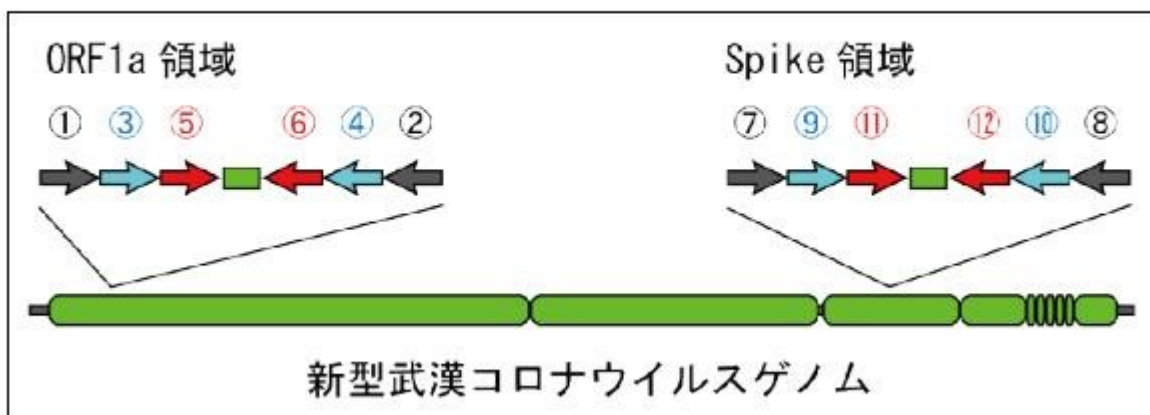
図1 PCR法の原理

No.	Name	direction	sequence (5' to 3')	Expected size (bp)
ORF1a set				
[1]	1 <sup>st</sup> NIID_WH-1_F501	Sense	TTCGGATGCTCGAACTGCACC	413
[2]	1 <sup>st</sup> NIID_WH-1_R913	Antisense	CTTACCAGCACGTGCTAGAAGG	
[3]	2 <sup>nd</sup> NIID_WH-1_F509	Sense	CTCGAACTGCACCTCATGG	346
[4]	2 <sup>nd</sup> NIID_WH-1_R854	Antisense	CAGAAGTTGTTATCGACATAGC	
[5]	Seq NIID_WH-1_Seq_F519	Sense	ACCTCATGGTCATGTTATGG	
[6]	Seq NIID_WH-1_Seq_R840	Antisense	GACATAGCGAGTGTATGCC	
S set				
[7]	1 <sup>st</sup> WuhanCoV-spk1-f	Sense	TTGGCAAATTCAGACTCACTTT	547
[8]	1 <sup>st</sup> WuhanCoV-spk2-r	Antisense	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG	
[9]	2 <sup>nd</sup> NIID_WH-1_F24381	Sense	TCAAGACTCACTTTCTCCAC	493
[10]	2 <sup>nd</sup> NIID_WH-1_R24873	Antisense	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC	
[11]	Seq NIID_WH-1_Seq_F24383	Sense	AAGACTCACTTTCTCCACAG	
[12]	Seq NIID_WH-1_Seq_R24865	Antisense	CAAAGACACCTTCACGAGG	

新型(武漢型)コロナウイルス検出用のプライマーセット  
 プライマーは[1][2][3][4]、[7][8][9][10]で、[5][6][11][12]は  
 PCRの結果得られたDNAの確認のための塩基配列を示して  
 いる。

神奈川県資料から拝借

プライマー位置模式図



上の図は国立感染症研究所の新型コロナウイルス感染症 PCR マニュアルの 4 ページにあります。緑が新型コロナウイルスの DNA の塩基の並びの模式図です。3 万塩基だそうです。

[1][2][3][4]、[7][8][9][10]がプライマーです。[5][6][11][12]は PCR の産物を確認するための塩基の並びです。

第一段階として、[1],[2]に挟まれた DNA を 40 回 PCR 増幅をかけ、次に得られた産物の DNA の[3][4]に挟まれた部分に対して 40 回 PCR 増幅をかける。合わせて 1,000,000,000,000,000,000,000 倍!!

ORF1a は新型コロナウイルスに特有な部分、spike は突起の遺伝子領域だそうです。2 箇所を PCR 増幅するが、片方だけ増幅された場合、どのように判定するのか。

下の図も国立感染症研究所のマニュアルにあります。

PCR の産物(結果)はアガロースゲルの電気泳動で「見える化」して確認します。アガロースゲル板の上端の穴に産物を注ぎ、上端と下端の間に電圧を架けると DNA 片は移動します。短い DNA 片は移動が早く、下端に来ます。長いものは移動が小さく、上に残ります。

Control は生理的食塩水だけです。テンプレート(鋳型)DNA は入っていない、プライマーだけなのですが、沢山の DNA が出来ていることがわかります。

