

SARS-CoV-2 PCR 検査が長期陽性持続した 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の 2 例

¹⁾ 横浜市立大学附属病院感染制御部, ²⁾ 横浜市立大学医学部血液・免疫・感染症内科,

³⁾ 横浜市立大学大学院医学研究科呼吸器病学, ⁴⁾ 横浜市立大学附属病院救急科,

⁵⁾ 同 臨床検査部, ⁶⁾ 横浜市衛生研究所

加藤 英明^{1)2)*} 渡邊 弘樹^{3)*} 小林 信明³⁾ 原 悠³⁾
 酒井 和也⁴⁾ 中嶋 賢人⁴⁾ 小川 史洋⁴⁾ 佐野加代子¹⁾⁵⁾
 山崎 悦子⁵⁾ 宇宿 修三⁶⁾ 田中 伸子⁶⁾ 竹内 一郎⁴⁾
 中島 秀明²⁾ 金子 猛³⁾

(令和 2 年 5 月 13 日受付)

(令和 2 年 5 月 22 日受理)

Key words: COVID-19, polymerase chain reaction, sputum, symptom

序 文

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は咽頭、鼻咽頭、喀痰等からの polymerase chain reaction (PCR) 検査による新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の検出が標準的な診断法である。同様に隔離解除基準としても使用されており、退院の基準として症状がない状態が 24 時間持続してから 48 時間以降に、12 時間あけて 2 回の PCR 検査の陰性確認が設定されている¹⁾。しかし PCR 検査の陰性化までに 15 日かかり、そのため退院までは 18 日間かかることが報告されている²⁾。軽症、および酸素投与が必要な中等症であったが、PCR 検査が症状改善後も 19、16 日 (症状出現から 33、28 日間) 持続した症例を報告する。患者から症例報告の同意を口頭で取得した。

症 例

【症例 1】

66 歳の男性。4 日前より発熱、咳嗽が出現し行政による検査で SARS-CoV-2 PCR 検査が行われた。PCR 検査陽性だったため発症 4 日目に入院した (day 1)。2 型糖尿病の既往があり食事療法によって HbA1c 6.5% にコントロールされていた。入院時のバイタルサインは意識清明、体温 37.6℃、脈拍数 92 回、血圧 165/87mmHg、呼吸数 24 回、SpO₂ 96% (室内気) で

あった。両側肺野に coarse crackle を聴取し、胸部 CT では両側肺野にスリガラス状陰影を認めた (Fig. 1)。Day 2 に呼吸困難の増悪と SpO₂ の低下がみられ 2L/分の酸素投与が開始された。胸部レントゲン像は day 7 まで増悪傾向がみられた (Fig. 1)。Day 7 には解熱が得られ、day 11 には咳症状もほぼ消失、酸素投与も終了した。退院に向け day 13 より PCR 検査を行った。

【症例 2】

39 歳の男性。2 月上旬より発熱、咳嗽、呼吸困難を自覚した。行政による検査で SARS-CoV-2 PCR 検査陽性が判明した。発症 4 日目に精査・加療目的に当院へ入院した (day 1)。喘息の既往があるが、現在は無加療で喘息発作はない。入院時のバイタルサインは意識清明、体温 37.3℃、脈拍数 86 回、血圧 143/92mmHg、呼吸数 21 回、SpO₂ 95% (室内気) であった。胸部 CT 検査では両側肺野にスリガラス状陰影を認めた (Fig. 2)。Day 9 に解熱した。経過中酸素投与は不要で全身状態は安定していたため、退院に向けて day 11 より PCR 検査を行った。

検体採取・PCR 検査

国立感染症研究所の検査マニュアル³⁾に従い下気道検体由来 (喀痰もしくは気管吸引痰)・咽頭拭い液・鼻咽頭拭い液を検体とし担当医師が採取を行った。また、下気道由来検体はスクリーキャップ付きのプラスチック容器に採取し、咽頭拭い液・鼻咽頭拭い液は FLOQSwab を用いて拭い、3mL の Universal Trans-

*2 名は本研究において同等の貢献をしており、筆頭著者 2 名である

別刷請求先: (〒236-0004) 横浜市金沢区福浦 3-9

横浜市立大学附属病院感染制御部 加藤 英明

Fig. 1 Case 1: Chest radiographic images.

- A: Chest CT showing bilateral ground-glass opacities (GGO) with predominantly peripheral distribution on admission.
 B: Chest x-ray showing bilateral infiltrates in the right upper lung field and left middle lung field on admission.
 C: Bilateral worsening of the infiltrates on day 7.
 D: Almost all the abnormal opacities have disappeared on day 13.

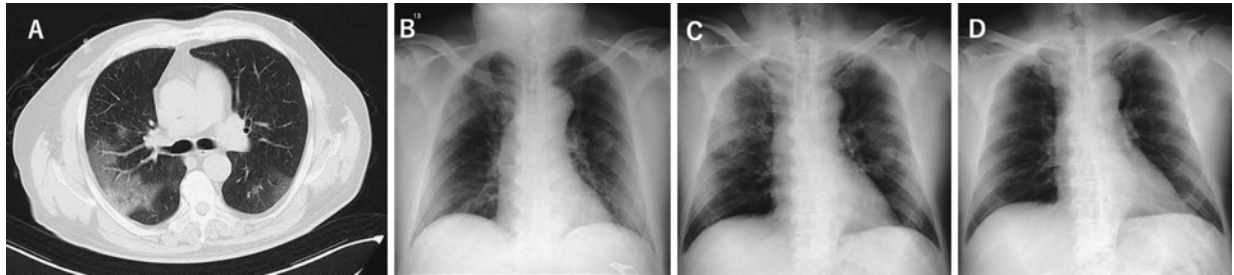
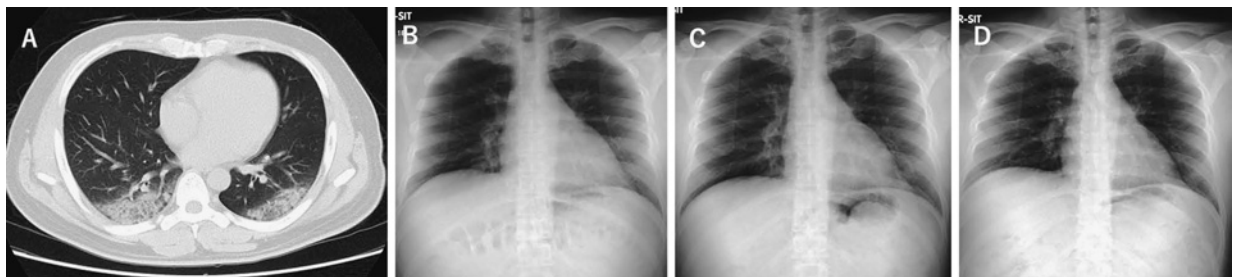


Fig. 2 Case 2: Chest radiographic images.

- A: Chest CT showing bilateral ground-glass opacities (GGO) in both lower lobes with predominantly peripheral distribution on admission.
 B: Chest x-ray showing infiltrates in the left lower lung field, overlapping with the cardiac shadow on admission.
 C: The infiltrates improved on day 4.
 D: Almost all the abnormal opacities have disappeared on day 24.



port Medium (UTM) (コパンジャパン株式会社)に採取した。喀痰検体は、患者に採取容器を渡し自身で喀出されたものを検査に用いた。これらの検体はカテゴリーBの容器を用いて三重梱包を行い、横浜市衛生研究所へ輸送を行った。採取された検体は1検体2ウェル用いてリアルタイムRT-PCRを行った。ウイルス量既知のスタンダードを用いて検量線を作成し、Ct値からウェル内のウイルス量を求めた。

結 果

症例1はday 9, 13, 15, 19, 21, 23, 26, 28, 30に、症例2はday 11, 15, 17, 19, 22, 24, 25にPCR検査を行った。得られたCt値と、そこから計算されたウェルあたりのウイルス量をTableに示した。症例1ではday 13からday 21まで鼻咽頭ぬぐい液もしくは喀痰で13,000copy/ウェル以上のウイルス遺伝子が検出された。Day 15, 19では鼻咽頭ぬぐい液と喀痰で検出ウイルス量に大きな差があり、この期間では鼻咽頭より喀痰の方が、ウイルス量が多かった。Day 23では喀痰でのウイルス量が77copy/ウェルへ急速に減少したが、その後も100copy/ウェル前後のウイルス

遺伝子陽性が続いた。症例2は、症例1と比較するとウェルあたりのウイルス量は少なかった。鼻咽頭拭い液ではday 11に18,000copy/ウェルと高いウイルス量が得られたがday 15には急速に検出されないレベルとなった。一方、喀痰のウイルス量はday 11で9,200copy/ウェル検出され、day 15で25copy/ウェルに減少したが、その後も100copy/ウェル以下の低レベルのSARS-CoV-2検出が継続した。Day 24には一旦不検出となったもののday 25には再び検出された。

考 察

状態は安定しているにも関わらず長期PCR検査陽性の2例を経験した。症例1, 症例2ともに入院からそれぞれ30日, 25日後(発症から33日, 28日)の現時点までPCR陽性が持続した。2例とも経過とともにウイルス量が減少し、100copy/ウェル以下の低いレベルでの検出が続いていたと考えられる。また、喀痰からのPCR検査は、咽頭または鼻咽頭拭い液と比較して長期間陽性が続くことが観察された。前提として鼻咽頭、喀痰検体を用いたPCRの結果の解釈には注意が必要である。血清のPCR検査とは異なり、鼻

Table 1 Cycle threshold value and estimated viral load in each specimen together with laboratory data at each time-point

Case 1 (Admission, day 1; resolution of fever, day 7; resolution of respiratory symptoms, day 11)

Date	Day 9		Day 13		Day 15		Day 19		Day 21		Day 23		Day 26		Day 28		Day 30	
	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well
Pharyngeal swab	ND	ND																
Nasal swab			27	20,000	26	15,000	34	72	27	13,000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sputum	36	33	29	7,000	32	300	26	29,000	26	18,000	34	77	37	8.5	34	120	36	140
LDH (U/mL)	257	261	237			236												
CRP (mg/dL)	5.00	0.64	0.27			0.16												
WBC (μ L)	4,500	4,700	4,400			4,200												
Neu (%)	52	55	40			50												
Lym (%)	26	32	44.5			30.8												

Case 2 (Admission, day 1; resolution of fever, day 9)

Date	Day 11		Day 15		Day 17		Day 19		Day 22		Day 24		Day 25	
	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well	Ct value	Viral load/well
Nasal swab	25	18,000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sputum	26	9,200	35	25	35	27	34	76	37	10	ND	ND	36	39
LDH (U/mL)	255	215		187	168									
CRP (mg/dL)	0.58	0.16		0.10	0.11									
WBC (μ L)	4,500	5,400		5,200	5,700									
Neu (%)	60.5	57.4		56.8	51.1									
Lym (%)	23.9	28.1		30.1	34.1									

Abbreviations: Ct, cycle threshold; ND, not detected; LDH, serum lactate dehydrogenase; CRP, serum C-reactive protein; WBC, white blood cell count; Neu, neutrophil; Lym, lymphocyte.

咽頭、咽頭を拭ったスワブをウイルス保存液に抽出して PCR 検体とするため、スワブ検体の採取方法、拭き取り方によって大きくウイルス量が異なる可能性があり、同様に検体の拭い液の量、喀痰量も一定ではないため copy/mL というような絶対的な単位でのウイルス量評価はできないことにも留意が必要である。今回は検査反応の 1 ウェル（検査用のプレートの 1 つの穴）中のウイルス量の概数を用いて評価した。しかしながら、2 症例とも入院初期にウイルス量が増加し、症状改善に遅れてウイルス量が減少することが観察された。陰性確認のために採取した喀痰検体は、無色透明で、いずれも Miller and Jones 分類での M1, M2 であった。それでも咽頭、鼻咽頭拭い液よりも感度が高い理由として SARS-CoV-2 が II 型肺胞上皮細胞上のアンジオテンシン II 受容体に接着することが考えられる⁴⁾。流行時期の喀痰での SARS-CoV-2 陽性率は 50.88% と、鼻咽頭拭いでの陽性率 (40.81%) よりも高いと報告され、発熱クリニックにおいては喀痰での陽性率は 85.71% に上昇すると報告されている⁵⁾。陰性確認には患者自身で喀痰採取をしており、感度が高く医療職の曝露も防げるものと考えられる。

症状消失後も検出限界前後まで減少しながらも比較的長期に遺伝子が検出され続けることが報告されてお

り⁶⁾、我々もクルーズ船から搬送され、入院治療後に軽快退院した患者 48 症例において PCR の陽性確認から最初の陰性検査まで平均 15 日かかっていることを報告した²⁾。横浜市衛生研究所では国立感染症研究所の検査マニュアルに従い、45 サイクルの PCR 反応で増幅が認められない場合を陰性 (ND) と判定している。しかし、症状が軽快し、かつウイルス量が少ないレベルで推移した今回の 2 症例のようなケースで、どこまで陰性確認に用いるかは今後の課題である。

RT-PCR でのウイルス量は発症から 15~18 日後には検出限界以下 (40 サイクルの PCR で検出されない) になると報告されている⁶⁾。本研究において症例 2 は入院後 day 11 (発症後 14 日) にはウイルス量が著明に低下しているが、症例 1 は入院 day 21 (発症 24 日) でも喀痰検体で 18,000copy/ウェルのウイルス RNA が検出されている。症例 1 は明らかな免疫不全の背景はなかったが糖尿病のため食事療法を行っていた。糖尿病は重症化のリスクと指摘されているが⁷⁾、PCR の陰性化までの長時間化との関連は不明である。定量的 PCR 検査によるウイルス量は経時的に低下するが、抗体の上昇はホストの免疫状態に影響を受ける可能性が指摘されており⁸⁾、高齢や基礎疾患等の免疫不全によってウイルス陰性化に時間がかかる可能性が推測され

る。なお症例1は、症例2と比較して症状が強くウイルス量が多かった。臨床症状とウイルス量の間に関連がある可能性も示唆される。

現報告時点では抗体検査による診断も検討されており、IgMは上昇しにくいもののIgGは発症6日から上昇、検出可能であることが報告されている⁹⁾。ただし抗体は、発症後23日間は上昇するため隔離解除のための基準に用いるのは困難と思われる¹⁰⁾。

米国疾病予防管理センター (CDC) の暫定ガイドラインでは、症状が出現してから10日間での職務復帰が示されている¹¹⁾。無症状で長期PCR陽性となる患者が一定数いることを考慮した上で、PCR陽性がすなわち感染性を示すのかどうかさらなる知見の蓄積が必要であり、症状や経過による隔離解除基準の構築が必要と考えられる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課：厚生労働省：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における新型コロナウイルス感染症患者の退院及び就業制限の取扱いについて（一部改正）。厚生労働省 [Internet]. Available from: www.mhlw.go.jp/content/10900000/000597947.pdf.
- 2) Kato H, Shimizu H, Shibue Y, Hosoda T, Iwabuchi K, Nagamine K, *et al.* : Clinical course of 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) in individuals present during the outbreak on the Diamond Princess cruise ship. *J Infect Chemother.* 2020 May 13 ; doi : 10.1016/j.jiac.2020.05.005. [Epub ahead of print].
- 3) 国立感染症研究所：2019-nCoV（新型コロナウイルス）感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル [Internet]. [cited 2020 May 17]; Available from: www.mhlw.go.jp/content/2019-nCoV_200416.pdf.
- 4) Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z : Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020 ; 14 (2) : 185-92.
- 5) Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, *et al.* : Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta.* 2020 ; 505 : 172-5.
- 6) Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, *et al.* : SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 2020 ; 382 (12) : 1177-9.
- 7) Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, *et al.* : Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020 ; 382 (18) : 1708-20.
- 8) Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, *et al.* : Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020 Mar 21 ; ciaa310 doi : 10.1093/cid/ciaa310. [Epub ahead of print].
- 9) 国立感染症研究所：迅速簡易検出法（イムノクロマト法）による血中抗SARS-CoV-2抗体の評価 [Internet]. [cited 2020 May 11]; Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/9520-covid19-16.html>.
- 10) Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, *et al.* : Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020 Apr 29 ; doi : 10.1038/s41591-020-0897-1. [Epub ahead of print].
- 11) Centers for Disease Control, and Prevention : Criteria for Return to Work for Healthcare Personnel with Suspected or Confirmed COVID-19 (Interim Guidance) [Internet]. [cited 2020 May 11]; Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/return-to-work.html>.

Sustained Positivity of The Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Test for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Two Patients with Novel Coronavirus Disease-2019 (COVID-19)

Hideaki KATO^{1)2)*}, Hiroki WATANABE^{3)*}, Nobuaki KOBAYASHI³⁾, Yu HARA³⁾, Kazuya SAKAI⁴⁾, Kento NAKAJIMA⁴⁾, Fumihiro OGAWA⁴⁾, Kayoko SANO¹⁾⁵⁾, Etsuko YAMAZAKI⁵⁾, Shuzo USUKU⁶⁾, Nobuko TANAKA⁶⁾, Ichiro TAKEUCHI⁴⁾, Hideaki NAKAJIMA²⁾ & Takeshi KANEKO³⁾

¹⁾Infection Prevention and Control Department, Yokohama City University Hospital, ²⁾Department of Hematology and Clinical Immunology, Yokohama City University School of Medicine, ³⁾Department of Pulmonology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, ⁴⁾Department of Emergency Medicine and ⁵⁾Clinical Laboratory Department, Yokohama City University Hospital, ⁶⁾Yokohama City Institute of Public Health

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay is used for the diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19), and for identifying those patients with COVID-19 who have recovered but may require ongoing isolation. We report two cases of COVID-19 in whom the RT-PCR test remained persistently positive until 16 and 19 days after resolution of the symptoms (33 and 28 days after the onset of symptoms), respectively. While the viral load in the respiratory specimens had decreased after resolution of the symptoms, the RT-PCR test result continued to be positive. Mucoïd sputum samples obtained by handing containers to the patient returned positive results for even longer periods than nasal swab samples. Our findings have led us to question the usefulness of the RT-PCR assay for determining the appropriate time to release patients from isolation after they show symptomatic recovery. RT-PCR performed using mucoïd sputum samples was also sensitive and safe, because of the low exposure of the healthcare workers to the virus while collecting the test samples.

*Both authors contributed equally to this study.

[J.J.A. Inf. D. 94 : 591~595, 2020]