

主論文の要旨

**Quantitative assessment of viral load in the blood and
urine of patients with congenital cytomegalovirus
infection using droplet digital PCR**

〔先天性サイトメガロウイルス感染におけるdroplet digital PCR法を
用いた血中および尿中ウイルス量評価〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

山口 慎

【緒言】

サイトメガロウイルス (CMV) は先天性ウイルス感染症の中で主要な病原体の一つであり、全出生の 0.7% に生じるとされる。先天性サイトメガロウイルス感染症 (cCMV) は神経障害を呈する先天性ウイルス感染症としては最多である。cCMV 患者の多くは出生時無症候であるが、10-15% に感音性難聴、小頭症、肝脾腫、網膜炎などを呈する症候性患者である。cCMV の診断には唾液や尿の体液を用いたウイルス培養やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法等が用いられ、近年ではリアルタイム定量 PCR 法 (qPCR) が一般的に利用されている。患者の中には qPCR 法で測定された血液中や尿中でウイルス量が高値を示す者もいるが、症候の有無や重症度とウイルス量との関連には議論がある。

droplet digital PCR (ddPCR) 法は絶対定量により、従来の qPCR 法に比べて高感度で再現性が高い手法とされている。本研究では、cCMV 患者の全血中および尿中のウイルス量を ddPCR 法、qPCR 法により定量し、cCMV 患者に対する臨床における ddPCR 法の有用性の検討を行った。

【対象および方法】

初めに予備実験として ddPCR 法と qPCR 法の感度と定量性、再現性の比較を行った。世界保健機関 (WHO) の CMV 標準物質を健康成人の全血 200 μ l に spike in し、10 倍ごとに 1×10^2 - 1×10^5 IU/ml の希釈列を作成した。同検体より DNA を抽出し、それぞれのウイルス量を ddPCR 法と qPCR 法とで定量した。ddPCR 法と qPCR 法では同一の Primer と TaqMan probe を使用した。CMV 量は ddPCR、qPCR 法ともに copies/ml と表記した。assay 内、assay 間の再現性の比較には標準偏差を平均値で除した変動係数を用いた。

次に名古屋大学医学部附属病院を受診した cCMV 患者の対象として cCMV 診断時の全血中および尿中 CMV 量と、診断時の症候の有無や生後 18 か月および 36 か月時点での発達遅滞の有無との関連を後方視的に検討した。患者背景を表 1 に示す。cCMV 患者の DNA は診断時の全血 200 μ l および尿 140 μ l より抽出したものを使用した。CMV 量は ddPCR 法と qPCR 法との両方を用いて定量した。精神発達の評価には developmental quotient (DQ) を用い、生後 18 か月と 36 か月でそれぞれ評価した。DQ 80 未満を発達遅滞とした。

【結果】

図 1 に予備実験の ddPCR 法と qPCR 法の定量結果を示す。5、50、500 および 5,000 IU/reaction の CMV 量に対する定量値を示す。感度は両 PCR 法とも 50 IU/reaction であり同等であった。ddPCR 法、qPCR 法の相関係数はそれぞれ 0.998、0.969 と高い値を示した。表 2 に両 PCR 法の assay 内、assay 間の比較結果を示す。assay 内比較での 50、500 および 5,000 IU/reaction の CMV 量を定量した際の変動係数は、ddPCR 法でそれぞれ 0.267、0.071、0.042 であり、qPCR 法で 0.438、0.029、0.060 であった。ddPCR

法の定量性は qPCR 法と同等ないしはそれ以上であった。Assay 間比較での 50、500 および 5,000 IU/reaction の CMV 量を定量した際の変動係数は、ddPCR 法ではそれぞれ 0.25、0.128、0.021 であり、qPCR 法では 0.625、0.149、0.141 であった。ddPCR 法は qPCR 法に比して再現性が高いことが示された。

次に臨床検体の全血中及び尿中の CMV 量を ddPCR 法、qPCR 法でそれぞれ測定した。測定した cCMV 患者の cCMV 診断時の全血中 CMV 量は、ddPCR 法、qPCR 法ともに症候性患者と無症候性患者との間に有意な差は認めなかった。また、症候性患者内で聴覚障害の有無、頭部画像異常所見の有無による全血中 CMV 量も検討したが、ddPCR 法、qPCR 法ともに CMV 量に有意な差を認めなかった。次に精神発達と cCMV 診断時の全血中 CMV 量との関連について検討した。生後 18 か月時点での発達遅滞の有無による全血中 CMV 量に違いは認めなかった。しかし、ddPCR 法で測定した全血中 CMV 量は、生後 36 か月時点で発達遅滞のある群のほうが、発達遅滞のない群に比して高い傾向がみられた (ddPCR 法 中央値: 3.0×10^3 vs 6.2×10^2 copies/ml, $p=0.059$ 、qPCR 法 中央値: 3.9×10^2 vs 2.9×10^2 copies/ml, $p=0.172$)。そこで、生後 36 か月時点での発達遅滞の有無に関して、全患者の ddPCR 法による cCMV 診断時の全血中 CMV 量から ROC 曲線を作成した。発達遅滞を認める患者を陽性とした場合の感度は 57.1%、特異度は 84.1%であった。さらには生後 18 および 36 か月時点での発達遅滞のリスクを予測する ddPCR 法による cCMV 診断時の全血中 CMV 量の cut off 値を算出した。結果は生後 18 か月で 662 copies/ml、生後 36 か月で 2,950 copies/ml であった。この cut off 値を用いて生後 18 および 36 か月時点での発達遅滞の有無を検討した。生後 18 か月では cCMV 診断時の全血中 CMV 量と発達遅滞の有無に有意な差は認められなかった (図 3 (A))。一方で生後 36 か月時点の検討で、全血中 CMV 量 2,950 copies/ml 以上では 4/7 人に発達遅滞を認め、CMV 量 2,950 copies/ml 未満で発達遅滞を認める患者の割合 (3/19 人) より有意に多いことがわかった (図 3 (B、C))。cCMV 診断時の尿中 CMV 量でも全血中 CMV 量と同様に ddPCR 法、qPCR 法により CMV 量を測定し、出生時症候の有無、症候性患者での聴覚障害、頭部画像異常所見の有無、生後 18 および 36 か月時点での発達遅滞の有無との関連を検討したが、有意差を認める項目はなかった (図 4)。

【考察】

今回、cCMV 患者に対する cCMV 診断時の全血中 CMV 量の ddPCR 法を用いた測定により、2,950 copies/ml 以上の CMV 量を呈する患者では生後 36 か月時点で発達遅滞を呈する可能性が高くなることを示した。新生児期の血液中 CMV 量と神経障害との関連についての過去に報告は聴力障害を主体にしているものが中心で、精神発達遅滞との関連を示す報告はわずかである。Lanari M, et al.による報告では、多核白血球 10^5 個あたりの CMV 量が 100 copies を超える場合は生後 12 か月時点での発達遅滞を認める可能性が高くなることを示している。一方で、Marsico C, et al.による報告では症候性患者の新生児期の血液中 CMV 量と神経障害との関連は認めなかったとしており、現状では CMV 量と精神発達との関係について定まった見解はない。今回の報告は生

後 36 か月まで長期にフォローし、新生児期の全血中 CMV 量が精神発達遅滞に関連することを示した初めての報告である。

本研究の課題は単一施設での後方視的研究であることから患者数が限定されていたことがあげられる。また、cCMV に関してユニバーサルスクリーニングを行っていないことで無症候性患者に比して症候性患者が多かった。症候性患者は発達遅滞を認める割合が高いことから、全体に発達遅滞を認める例が多くなった可能性がある。

【結語】

ddPCR 法は qPCR 法に比べて検出感度は同程度であるが、再現性が高いことが示された。また、ddPCR 法による cCMV の診断時の全血中の CMV 量は、生後 36 か月時点での発達予後予測に利用できる可能性があることが示唆された。ddPCR 法によるウイルスの絶対定量は再現性が高く、CMV 量測定 of 標準化や、治療介入の指標として臨床応用されることが期待される。

(表 1) Characteristics of cCMV patients.

	Symptomatic (n = 21)	Asymptomatic (n = 18)	p value
Gestational age (weeks)	38 (36.0–39.0)	39.0 (38.0–40.0)	0.008
Birth weight (g)	2,580 (2,040–2,831)	2,814 (2,580–3,122)	0.018
Hearing loss	13/21 (62%)	0/18 (0%)	<0.001
Abnormal brain image	14/21 (67%)	0/18 (0%)	<0.001
Developmental delay at aged 18 months (DQ < 80)	6/17 (35%)	3/13 (23%)	0.691
Developmental delay at aged 36 months (DQ < 80)	7/13 (54%)	1/14 (7%)	0.013

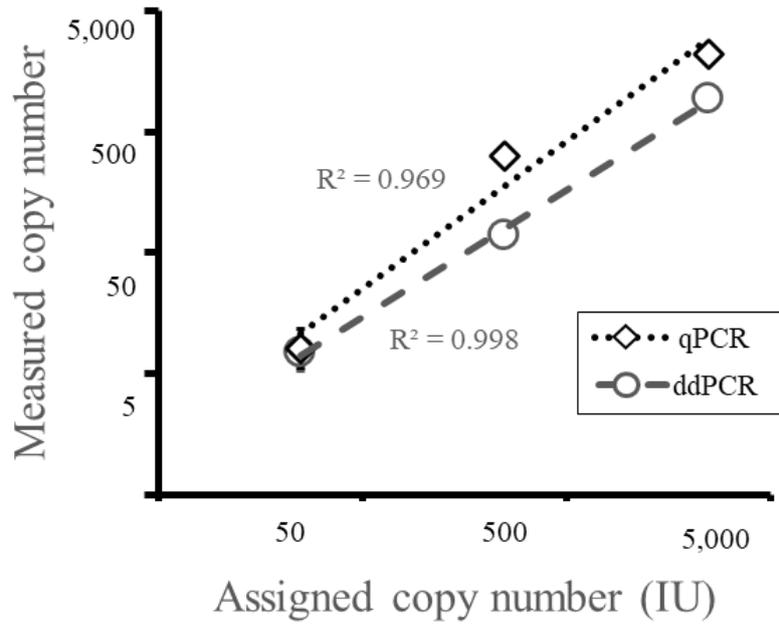
Note: Data of gestational age and birth weight are median (IQR, interquartile range).

Abbreviations: cCMV, congenital Cytomegalovirus infection; DQ, developmental quotient.

(表 2) Comparison of within-run (intra-assay) and between-run (inter-assay) variability for ddPCR and qPCR using the WHO standard

		ddPCR				qPCR			
Assigned copy number (IU)		5	50	500	5,000	5	50	500	5,000
Intra-assay (n=4)	Mean	n.d	15	140	1,875	n.d	16	631	4,320
	SD	-	4	0	78	-	7	18	260
	CV	-	0.267	0.071	0.042	-	0.438	0.029	0.060
Inter-assay (n=3)	Mean	n.d	12	156	1,821	n.d	32	601	3,783
	SD	-	3	20	39	-	20	90	533
	CV	-	0.250	0.128	0.021	-	0.625	0.149	0.141

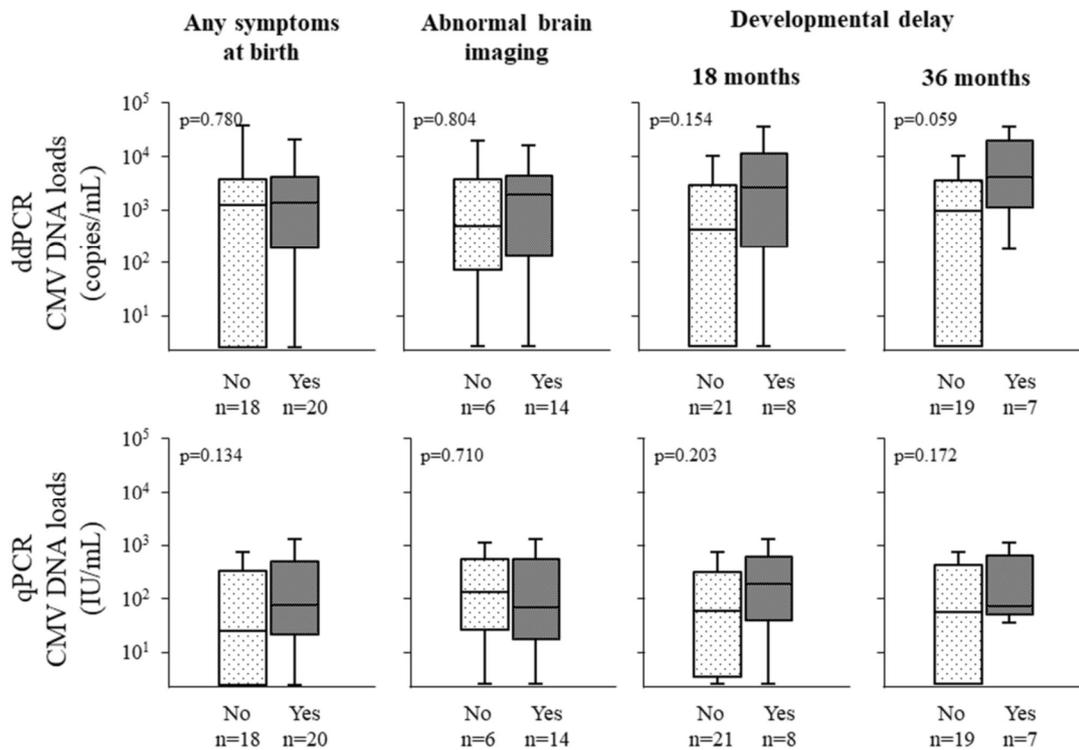
ddPCR, Droplet Digital PCR; qPCR, quantitative PCR; SD, standard deviation; CV, coefficient of variance (=SD/Mean); n.d, not detected



(图 1)

Regression analysis of measured values of ddPCR and qPCR against assigned CMV copy number. Each dilution was assayed in four replicate reactions.

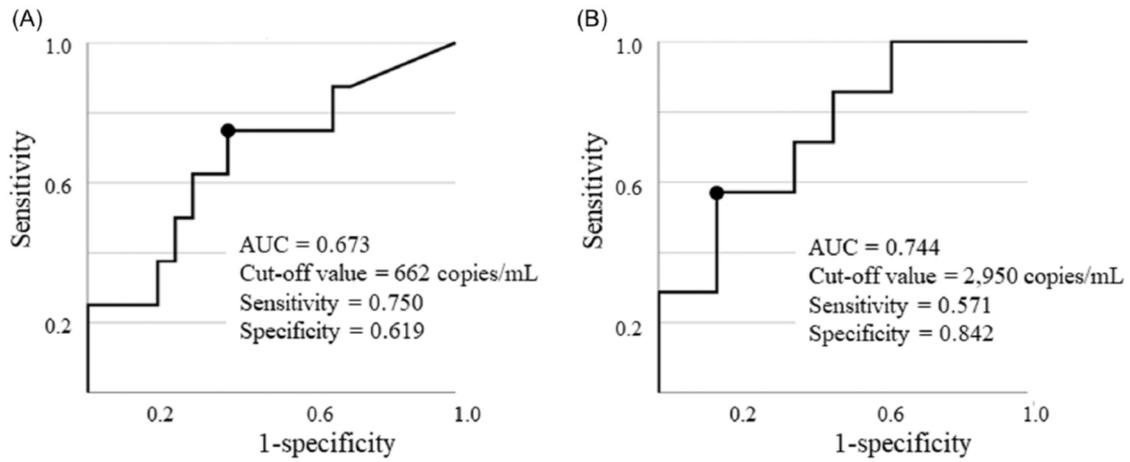
CMV, cytomegalovirus; ddPCR, droplet digital PCR; qPCR, quantitative PCR.



(图 2)

The CMV load in whole blood was measured using ddPCR (upper row) and qPCR (lower row). Whole blood CMV DNA loads were compared between cCMV patients with and without any symptoms at birth, abnormal brain imaging, and developmental delay at 18 and 36 months of age.

cCMV, congenital CMV infection; CMV, cytomegalovirus; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR.

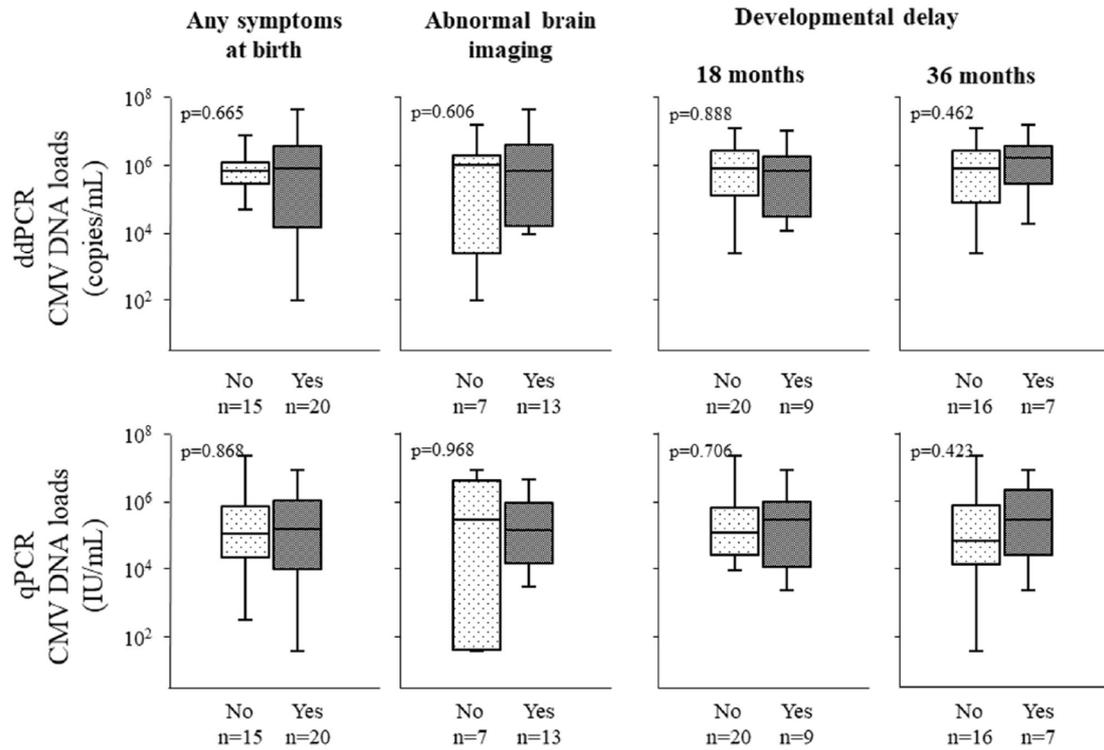


(C)

Developmental delay at 36 months old			
CMV DNA loads (copies/mL)	Yes (n)	No (n)	Total (n)
≥2,950	4	3	7
<2,950	3	16	19
	7	19	26

p=0.034

(图 3) ROC curves derived from CMV load in whole blood as measured with ddPCR and the presence of developmental delay in congenital CMV patients at (A) 18 months and (B) 36 months old. Black dots indicate the best cutoff values. (C) Association between CMV load in whole blood as measured by ddPCR and developmental delay at 36 months old. p value was calculated by Fisher's exact test. Developmental delay was defined as a developmental quotient <80. CMV, cytomegalovirus; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; ROC, receiver operating characteristic.



(图 4)

CMV load in urine was measured with ddPCR (upper row) and qPCR (lower row). Urine CMV DNA loads were compared between cCMV patients with and without any symptoms at birth, abnormal brain imaging, and developmental delay at 18 and 36 months old.

cCMV, congenital CMV infection; CMV, cytomegalovirus; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR.