

別紙 1 - 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 山口 慎

論 文 題 目

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)

論文審査担当者 名古屋大学教授

主 査 委員 木村 宏
名古屋大学教授

委員 八木 哲也
名古屋大学教授

委員 梶山 広明
名古屋大学教授

指導教授 高橋 義行

論文審査の結果の要旨

今回、先天性サイトメガロウイルス感染症（cCMV）患者の血清と尿検体に対して、digital droplet PCR（ddPCR）法とリアルタイム定量 PCR 法（qPCR）とを用いてサイトメガロウイルス（CMV）量定量を試行し、両 PCR 法の比較検討を行った。その結果、ddPCR 法は qPCR 法に比して再現性が高いことが示された。次に、cCMV 患者の臨床検体を用いて CMV 量と出生時症候や精神発達遅滞の有無との関連を両 PCR 法で検討した。ddPCR 法で定量した全血中 CMV 量は、生後 36 か月時点で発達遅滞を認める群で高く、その cut off 値は 2,950 copies/ml であることが示された。以上より ddPCR 法によるウイルスの絶対定量は再現性が高く、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。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1.cCMV 患者の CMV 量定量において、尿は一般的に高コピーとなりやすく、ddPCR 法に利用する場合は事前に希釈を要する検体があることはわかっていた。そのため今回は qPCR 法を先に行い、その結果を参考にして ddPCR 法に適する希釈率を計算し定量した。ddPCR 法に適する希釈率は予備実験にて示した範囲に収まるような CMV 量となるように希釈した。

2.尿検体では尿そのものの濃縮の程度により尿中 CMV 量がばらつきやすく、症候や発達遅滞の有無に差が見られなかったと考えている。また、CMV の tropism として尿細管があがっている。尿細管から排泄される CMV が尿中 CMV 量と症候などの結果にばらつきを与えた可能性も考えられる。

3.ddPCR 法は一般的に利用される技術にはなっていないこともあり、試薬が qPCR 法のそれに比して高価である。今回の検討時点での ddPCR 法の費用は一検体あたり qPCR 法の約 3 倍程度であった。今後、ddPCR 法が普及するに伴い試薬価格が下がってくることを期待される。また、検査に要する時間も ddPCR 法は qPCR 法に比して長い。ddPCR 法は PCR 反応後に一検体ごとに droplet カウントを行う時間が必要となる。一方で qPCR 法は、PCR 反応終了後速やかに解析を行うことができる。その点が両検査法で時間差が生じる主因と考えられる。

本研究は、cCMV 患者の発達予後予測において、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	山口 慎
試験担当者	主査 木村 宏		副査 ₁ 八木 哲也	
	副査 ₂ 梶山 広明		指導教授 高橋 義行	
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 尿のような高コピー数を示すような検体の処理について2. 尿検体と血液検体とで傾向が違う理由について3. 検査コスト、時間に関するddPCR法とqPCRとの比較について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、小児科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				