

サイトメガロウイルス核酸定量について

たか だ きよ のり
高田清式
Kiyonori TAKADA

はじめに

サイトメガロウイルス (CMV) に関する検査法は、従来 CMV 抗体検査 (IgM/IgG) や CMV 抗原検査として、CMV アンチゲネミア法 (ペルオキシダーゼ法による CMV 抗原 pp65 陽性細胞検出) が保険適用され行われてきたが、CMV 感染症の診断又は治療効果判定を目的として、臓器移植後若しくは造血幹細胞移植後の患者又は HIV 感染者又は高度細胞性免疫不全の患者に対し、血液を検体として CMV の DNA をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により定量する方法が 2020 年 8 月に保険収載され、CMV 感染症がより早期かつ確実に多くの施設で利用し診断できるようになった。以下、本稿では CMV の病態、検査法、測定の意味、使用方法について概説する。

I. CMV の病態

サイトメガロウイルス (CMV) は、唾液、尿、子宮頸管分泌液、母乳などの体液に無症候性に排出され、ヒトへの感染源になる。その他、母子感染や血液製剤を介する感染もある。多くは不顕性感染で、乳児期に感染し生涯ヒトの体内に潜伏感染することが多いが、なかには思春期以降の初感染で発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫、末梢血に異型リンパ球が出現する、伝染性単核球様症状を呈することがある。さらに臓器移植、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者、輸血、免疫抑制下、妊娠などでは、免疫機能の低下により再活性化が起こり、血中へ侵入 (ウイルス血

症) が起こり、肺炎、腸炎、肝炎、網膜炎などの全身感染を引き起こし致命的になる例もある。臓器移植では肺移植や小腸移植で発症頻度が高く、AIDS では網膜炎や中枢神経病変が多い。これらの CMV の感染症の診断には、感染臓器を生検し感染細胞 (特徴的な封入体を持った巨細胞: owl's eye など) を検出するのが適切ではあるが、生検ができない場合は、従来の CMV 抗原血症検査 (アンチゲネミア法) や新しい検査法としての PCR 法による抗原検査で補助的診断を行うことが一般的である。

II. CMV の PCR 法について

血漿 (血清) や気管支肺胞洗浄液などの検体を用いて、PCR 法にて CMV DNA を増幅し検出する方法である。感度が高く、特異性に加えて迅速性もある¹⁾。CMV 感染の検出感度は高いが ($\geq 90\%$)、検体や検査法によっては必ずしも検出感度が高くない場合もある。当初は、PCR 法は定量性がなく、抗ウイルス薬の治療により CMV 感染症が改善した後もしばしば PCR 陽性であるために病勢把握の指標としては難点があったが、定量 PCR (real-time PCR) の導入により、その有用性が高まった。定量 PCR 法では、ウイルス量と病勢や治療効果との相関が認められている¹⁾。定量 PCR による CMV 感染のモニタリングでは、全血や組織検体を用いた場合、潜伏感染状態でも CMV DNA が検出されることがあるので、末梢血の場合は、血漿などの細胞成分を含まない検体を用いる必要がある¹⁾。血漿を用いた定量 PCR 法と CMV 抗原血症検査 (アンチゲネミア法: HRP-C7 あるいは C10/C11 法) による CMV 再活性

化のモニタリングにおける有用性を比較した検討が国内でいくつかなされており、定量 PCR 法は、CMV 抗原血症検査と同等もしくはそれ以上の感度・特異度で有用性があることが示されている^{2,3)}。定量 PCR は、ウイルス量を直接定量するため、感度・特異度とも高いが、治療開始基準の cut-off 値はいままでは十分には確立してはいなかった。国内では、定量 PCR 法では、CMV の US17 領域を増幅する方法 (US17-PCR) と、immediate-early (IE) 遺伝子を増幅する方法 (IE-PCR) が用いられていたが、同じ定量 PCR でも、測定系によって感度が異なることが示されている。また、国内の受託検査会社 3 社間における CMV 定量 PCR を直接比較した検討でも、血漿定量 PCR は、CMV 抗原血症検査よりも高感度である可能性が示唆されているが、その結果は各測定系で異なっていた⁴⁾。最近までは、CMV 感染の診断には、主に CMV 抗原血症検査が使用されてきたが、欧米では定量 PCR 法が主流である。このような背景の中で定量 PCR 法は、わが国では 2020 年から保険適用になり、今後わが国でもアンチゲネミア法より優先的に使用が増えると考えられる。さらに、定量 PCR 法の測定法によって感度が異なり、異なる測定法での比較が困難であった点に関しては、現在では、WHO による international standard (IS) が導入され、施設間、異なる測定系での比較ができるようになり、ウイルス量の表記も IU/mL に統一されている^{5,6)}。以上の経緯により今後わが国でも保険収載を契機に定量 PCR 法が適切に検査され、よりさらに正確かつ迅速な CMV 感染の診断が行われることが期待されている (表)。

Ⅲ. CMV 定量 PCR 法の実際の測定

定量 PCR は、血漿から遺伝子を抽出して核酸増幅システムにより CMV の DNA 量を検出する方法であるが、全自動型の PCR 法が新たに開発され実用化されている。国内では自動的に PCR 定量ができる検査キット (体外診断用医薬品) として、「アキュジーン[®]m-CMV」(アボットジャパン合同会社)と「コバス[®]6800/8800 システム CMV」(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)の 2 製品が製造販売の承認を得ている。いずれのキットも正確に CMV-DNA が定量的に測定でき、単位も WHO で統一された IU/ml が用いられている。数値としては、いずれも 30 ~ 10⁷ IU/ml 程度の幅広い範囲内で測定可能であり、アンチゲネミア法の陽性細胞数 1 個は概ね PCR 法で定量可能な下限値付近に相当する。PCR 法で用いられる増幅する遺伝子のターゲット領域としては、「アキュジーン[®]m-CMV」では UL34、UL80.5 の領域で、「コバス 6800/8800 システム CMV」では UL54 の領域が用いられている。いずれも必要最低検体量としては、血漿で 0.5ml (アキュジーンは全血 0.3ml も可能) とされている。また、具体的に、PCR 法自体が高感度であるため単純比較は難しいが、アンチゲネミア法との相関を検討した結果、「アキュジーン[®]m-CMV」では、国内 3 施設における造血幹細胞移植 40 症例 300 検体、腎移植 50 症例 437 検体および HIV 感染患者 22 症例 124 検体の血漿検体を対象とした国内臨床性能試験にて、CMV DNA が検出された検体を、アンチゲネミア法で陽性細胞 1 個以上と判定された検体を

表 CMV 検査におけるアンチゲネミア法と定量 PCR 法の比較

	アンチゲネミア法	定量PCR法
測定の自動化	用手法であり、結果は陽性細胞を目視で数えるため主観的要素が入る	結果表示まで全自動で実施
定量性	半定量	定量性あり (WHOで標準化、単位: IU/ml)
標準物質	なし	あり WHOの標準品によって値付けされている
対象検体	全血から分離する白血球	血漿 患者の白血球数に影響を受けない
検体安定性	保管可能時間が短い 腎移植ガイドラインでは採血後6~8時間までに検査するように記載あり	血漿分離後に保管可能 検体安定性に左右されず測定が可能

(文献7)を参考に作成)

陽性とした場合、全体的な感度は97.7%、特異度は52.7%であり⁸⁾、また、「コバス[®]6800/8800 システム CMV」では、造血幹細胞移植182検体、臓器移植1,754検体を対象とした国内臨床性能試験にて、CMV DNAが検出された検体を、アンチゲネミア法で陽性細胞1個以上と判定された検体を陽性とした場合、全体的な感度は87%、特異度は88%であり⁹⁾、両キットとも従来のアンチゲネミア法との相関が極めて高い結果が得られている。

実際の臨床現場例として、森らは自施設の肝および造血幹細胞移植症例34例におけるCMVのモニタリングを定量PCR法について、アンチゲネミア法との分析学的および臨床的性能に関する比較検討を行い、定量PCR法が同等以上の有用性があることを報告した¹⁰⁾。さらに、検査の工程において、検体作製の手間がアンチゲネミア法の煩雑さに比べ単純で、かつ検査自体も全自動型PCRにて簡便であることを示した(図)。

なお、PCR法は実際の臨床例において、血球を用いないために患者の白血球数に影響されない点は、様々な治療薬によりいまだ血球が回復しない時期にもモニタリング検査が可能であり、アンチゲネミア法に比べ大きな特徴・利点であると考えられる。

今回のPCR法の保険適用での留意事項として、厚生労働省保険局医療課長発通知「検査料の点数の取扱いについて」(令和2年7月31日付. 保医発0731第1号. 令和2年8月1日適用)の改正で「サイトメガロウイルス感染症の診断又は治療効果判定

を目的として、臓器移植後若しくは造血幹細胞移植後の患者又はHIV感染者又は高度細胞性免疫不全の患者に対し、血液を検体としてリアルタイムPCR法によりサイトメガロウイルスDNAを測定した場合に、本区分の「14」単純疱疹ウイルス・水痘帯状疱疹ウイルス核酸定量の所定点数を準用して算定する。ただし、高度細胞性免疫不全の患者については、本検査が必要であった理由について、診療報酬明細書の摘要欄に記載すること。」の付記があり、保険点数は450点で判断料(微生物)150点であるとともに、臓器や造血幹細胞移植、HIV感染者以外の高度細胞性免疫不全患者で検査を行う場合には、検査を必要とした理由の記載が求められていることは周知しておくべきである。

また、実臨床では免疫不全がなくとも、ICUに入室するような重症例では、約1/4程度に感染症徴候が明らかでなくても血液検査でCMVの存在を認めることが報告されており¹¹⁾、この場合CMVの治療を行っても予後は改善しないことから、たとえ定量的PCR法で陽性であっても臨床症状と併せてCMV感染症としての病態の有無を診断する必要がある。

おわりに

今後さらに、移植の適応患者が増加し、また新しい免疫抑制剤などの使用により治療の選択肢が広がり免疫不全状態がより強く起こりえることが予測される。この背景のもと移植後のCMVの感染管理は

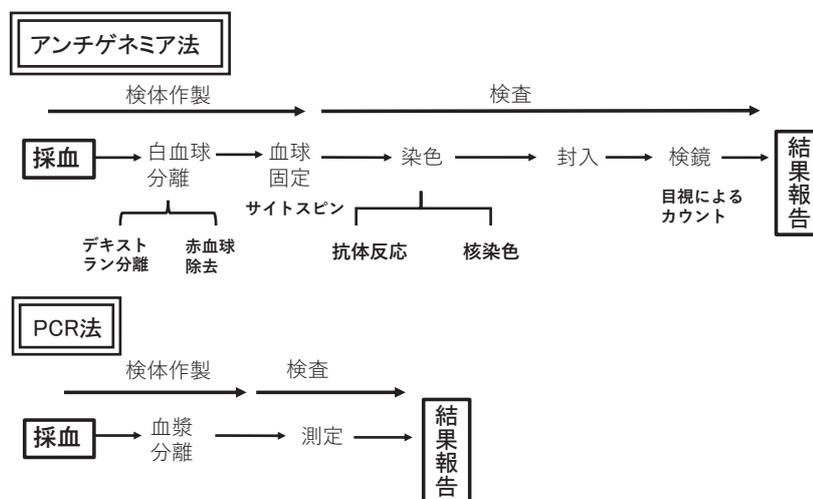


図 アンチゲネミア法 (C7HPR 法) と PCR 法の検査の工程
(文献10)より転載、一部改変)

ますます重要になってくると考えられる。今回欧米では主流である定量 PCR 法が保険適用になったことで各施設にて実施しやすくなり、CMV 感染の早期発見、治療効果の判定に関して、WHO の標準化による精度管理の向上も加わり、従来のアンチゲネミア法より多くの利点のもとに円滑になされることが見込まれる。ガイドラインでも定量 PCR の明確な記載などによりさらに整備され、移植患者の予後の改善の目的のもと、各施設で必要に応じて円滑に検査が行われることを期待する。

文 献

- 1) 日本造血器移植学会. 造血器移植ガイドライン ウイルス感染症の予防と治療 サイトメガロウイルス感染症 (第4版). 2018: 3-4.
- 2) Mori T, Mori S, Kanda Y, et al. Clinical significance of cytomegalovirus (CMV) antigenemia in the prediction and diagnosis of CMV gastrointestinal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004; **33** (4): 431-434.
- 3) Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant.* 2002; **29** (7): 599-606.
- 4) 森毅彦, 加藤淳, 山根明子, 他. 受託検査会社間における サイトメガロウイルス DNA 定量 polymerase chain reaction の比較検討. *臨床血液.* 2011; **52** (4): 204-209.
- 5) Kotton C, Kumar D, Caliendo A, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* 2018; **102** (6): 900-931.
- 6) World Health Organization International Standard. 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques. Website: <http://www.nibsc.org/documents/ifu/09-162.pdf>. Accessed Feb 20, 2021.
- 7) コバス 6800/8800 システム CMV 製品概要(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社作成).
- 8) サイトメガロウイルスキット アキュジーン[®]m-CMV 添付文書(アボットジャパン合同会社2020年1月作成).
- 9) サイトメガロウイルスキット コバス[®]6800/8800 システム CMV 添付文書(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社2020年1月作成).
- 10) 森紗耶香, 森永芳智, 澤山靖, 他. 肝および造血幹細胞移植症例におけるサイトメガロウイルスモニタリングにおける PCR の有用性. *医学と薬学* 2020; **77** (8): 1181-1188.
- 11) 上山伸也. サイトメガロウイルス (CMV) 抗原・抗体・核酸検査、ウイルス培養検査. *内科.* 2020; **125**: 920-921.