

## 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランス およびその臨床的・疫学的特徴

研究分担者：西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究協力者：中道一生 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究協力者：林 昌宏 国立感染症研究所ウイルス第一部

**研究要旨** 進行性多巣性白質脳症（PML）は JC ウイルス（JCV）に起因する、様々な種類の免疫抑制が発症に関与する致死的な脱髄疾患である。また、その診断においては脳脊髄液（CSF）中の JCV ゲノム DNA の PCR 検査が有用である。私たちは、2007 年 4 月より定量的リアルタイム PCR 検査による医療機関への診療支援を介して、PML の実験室サーベイランスを行っている。2007 年度から 2016 年度（11 月現在）までに合計 1,659 件の検査が実施され、172 名の PML 患者が確認された。また、2016 年 4 月より、検査受付時に PML サーベイランス委員会における PML 疑い症例登録について主治医から承諾を受け、都立駒込病院内の PML 情報センターにおける臨床情報の収集（41 例分）を支援した。また、本年度から従来の手法よりも鋭敏な超高感度 PCR 検査を導入した。本研究期間である 2014 年 4 月から 2016 年 11 月までに実施された 555 件の検査実績および患者データを集計し、国内における PML の動向を解析した。同期間において当検査が実施された被検者 426 名中 69 名が CSF-JCV 陽性を呈した。陽性患者の基礎疾患については、HIV 感染症、血液腫瘍系疾患、自己免疫疾患、腎疾患、その他の疾患もしくは複数の基礎疾患が、それぞれ 19 名、13 名、12 名、9 名、13 名であった。70 歳以上の高齢者 3 名が JCV 陽性反応を呈したが、基礎疾患は認められなかった。また、フィンゴリモドを長期服用していた多発性硬化症患者 2 名が CSF 中 JCV 陽性を呈したため、本研究班に情報提供した。さらに、超高感度 PCR 検査系（検出下限値 10～50 コピー/mL）を確立し、その検査法を導入したことにより、CSF 中に微量の JCV をより高感度に検出することができるようになった。本研究成績は、日本における PML の疫学的特徴を反映しており、その発症の背景についての有用な情報基盤となる。

### A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症（Progressive Multifocal Leukoencephalopathy：PML）は、免疫不全患者等の脳において JC ウイルス（JCV）が増殖することで引き起こされる。PML は免疫抑制に関連した多様な疾患と合併して発生することから、その動向や背景の把握は、医療行政において重要である。しかし、日本では、PML を含む各種疾患の大規模パブリックデータベースは整備されていない。PML の診断では特異性および侵襲性の点から、脳脊髄液（CSF）中の JCV ゲノム DNA を検出するための PCR が一般的な検査手法となっている。本研究は、国内の医療機関から依頼された CSF 中 JCV の PCR 検査を支援することで実験室サーベイランスを実施し、

PML の動向およびその背景を明らかにすることを目的とした。また、サーベイランスを継続するとともに、CSF-JCV 陽性者の臨床情報から国内の PML に関する最新の動向およびその背景を解析することも目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) 材料および検査系

CSF からの DNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit もしくは QIAamp MinElute Virus Spin Kit（ともに Qiagen 社製）を用いて抽出した。リアルタイム PCR による JCV-DNA の増幅および検出には、LightCycler および LightCycler 480 Probes Master（共に Roche 社製）、JCV の T 遺伝子領域を標的とした合成 DNA（プライマー、TaqMan

プローブ)を用いた。

## 2) 医療機関への JCV 検査支援

検査の周知と効率化を図るため、JCV 検査の受付に関する Web サイトを公開した。臨床医は JC ウイルス検査をキーワードとしてインターネット検索をすることでアクセスが可能である。医療機関よりメールにて依頼を受けた後、当研究所に送付された CSF 検体から DNA を抽出し、リアルタイム PCR による定量検査を実施し、JCV ゲノムのコピー数を測定した。

## 3) 臨床情報の収集と分析

66 項目からなる質問票を担当医に送付し、患者の年齢や性別、検体採取時期、臨床所見、基礎疾患、治療歴等の情報を収集した。得られた情報をデータベース化した後、解析に用いた。

## 4) PML 疑い症例登録の支援

検査受付時に主治医に対して本研究班への情報提供について説明し、承諾が得られた場合に、主治医の連絡先（患者情報は含まれない）を都立駒込病院脳神経内科（三浦義治医師、本研究班の研究分担者）に転送した。

### （倫理面への配慮）

本研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認のもとに実施された。

## C. 研究結果

### 1) 検査実績

2007 年 4 月から 2016 年 11 月現在までに、1,659 件の検査が実施され、272 検体の CSF から JCV-DNA が検出された。また、被検者 1,348 名中 172 名の CSF が JCV-DNA 陽性を呈した。また、2016 年 4 月より、検査受付時に本研究班の PML サーベイランス委員会における PML 疑い症例登録について主治医から承諾を受け、都立駒込病院内の PML 情報センターにおける臨床情報の収集（41 例分）を支援した。本研究期間である 2014 年 4 月から 2016 年 11 月においては、555 件の検査が実施され、111 検体の CSF が JCV-DNA 陽性を呈した。同期間に当検査が実施された被検者 426 名中 69 名が CSF-JCV 陽

性を呈した。また、20 名の陽性者においてコマーシャルベースの CSF 中 JCV 検査が実施されていたが、確認検査もしくはフォローアップ検査を目的として当研究室に検体が提出されていた。これら患者のうち 75%（15/20 件）は、従来の検査よりも鋭敏な超高感度 PCR 検査が導入された 2016 年以降に検査が依頼されており、コマーシャルベースの検査を実施した後でも当研究室に検査が依頼されるケースが増加傾向にあった。

### 2) CSF-JCV 陽性者の分析

2014 年度から 2016 年 11 月の実験室サーベイランス期間において確認された JCV-DNA 陽性者 69 名の臨床情報を解析した。年齢中央値は 62 歳、男性が約 61%を占めた。男女を含む陽性者の基礎疾患の内訳としては、HIV 感染症、血液腫瘍系疾患、自己免疫疾患、腎疾患、その他の疾患もしくは複数の基礎疾患が、それぞれ 19 名、13 名、12 名、9 名、13 名であった。基礎疾患の認められない 3 名の患者が JCV-DNA 陽性を呈したが、3 名とも 70 歳以上の高齢者であった。HIV 感染症を有した陽性者は全て男性であった。65 歳以上の患者は 4 名であった。また、血液腫瘍系疾患の陽性者においては、悪性リンパ腫の割合が約 54%であった。自己免疫疾患を有した陽性者においては、1 名を除く全ての患者が女性であり、約 58%が SLE を有していた。特記すべき事項として、以下の事実が明らかにされた。フィンゴリモドの長期投与を受けていた多発性硬化症患者 2 名が PCR 法で PML と診断された。

### 3) 超高感度 PCR 検査系の実用化と評価

2016 年には、従来の CSF 中 JCV の PCR 検査（検出下限値 200 コピー/mL 程度）よりもより高感度 PCR 検査系（検出下限値 10~50 コピー/mL）を確立し、バリデーションを経た後に本実験室サーベイランスに導入した。その結果、PML 疑い患者 4 名の CSF において従来の検査の検出限界（200 コピー/mL）を下回る微量の JCV-DNA が検出された。また、同時期にコマーシャルベースの CSF 中 JCV 検査が実施された 20 名の患者のうち、約 35%の患者では JCV-DNA が検出されず陰性を呈していたが、当研究室に

において陽性を判定された。陽性者 69 名中 2 名の CSF 検体は、米国 NIH および当研究室にて JCV の超高感度 PCR 検査が実施され、両施設で陽性反応が確認された。

#### D. 考察

本サーベイランスは PML 患者数の規模が限られる反面、詳細な臨床情報をリアルタイムで収集することができるという利点を有する。また、PML 患者だけでなく被検者全体の情報が集積されるため、基礎疾患や性別といった様々な角度から PML 発生の背景を解析することが可能である。

本研究期間の実験室サーベイランスにおける大きな変更点としては、超高感度 PCR 検査系の確立とその導入が挙げられる。当研究室において 2015 年度まで用いられてきた CSF 中 JCV の PCR 検査は、日本国内で一般的に実施可能なコマーシャルベースの検査と同様に検出下限値が約 200 コピー/mL であった。超高感度 PCR 検査系は、高度濃縮精製が可能な核酸抽出カラムおよび独自のプロトコルを用いる検査であり、最小量の検体を用いる簡便なルーチン検査の場合には検出下限値 50 コピー/mL、さらに感度を高めた検査では 10 コピー/mL の JCV-DNA を検出することができる。超高感度 PCR 検査系を用いることで CSF 中の極微量の JCV を検出することが可能となった。そのため、従来の検査法では PCR において微量のシグナルが検出されたにも関わらず、陽性判定に至らないケースが散見されたが、超高感度 PCR 検査系導入により、より高感度に PML 診断に寄与することが可能となった。

近年、ナタリズマブ投与中に PML を発症した 20 名の患者の CSF を対象として米国 NIH における超高感度 PCR 検査の結果を解析したところ、①患者 14 名において JCV のコピー数が 100 コピー/mL 未満であり、うち 8 名では 50 コピー/mL 未満であったこと、②これらの検体は、一般的な感度を有するローカルラボラトリーの PCR 検査において JCV が検出できず陰性と判定されていたことが、海外の研究グループによって報告されている（参考文献 1）。さらに、American Academy of Neurology の Neuroinfectious Disease Section による PML の診

断基準においても超高感度 PCR 検査の有用性が記載されている（参考文献 2）。2016 年に日本国内で初めて確認されたフィンゴリモド投与中の多発性硬化症患者 2 名の検査においては、この超高感度 PCR 検査系が用いられ、米国 NIH での超高感度 PCR 検査と同程度の感度で CSF 中の JCV-DNA を検出することが可能であった。

また、PML と診断される前に抗レトロウイルス療法が施行された患者の場合には、CSF 中の JCV 量が減少し、PCR 検査において陰性を呈することが珍しくない。しかし、本検査系を用いた場合には同療法を受けた HIV 陽性者においても CSF 中 JCV が検出された。超高感度 PCR 検査系は、様々な基礎疾患を有する PML 疑い患者を対象とした検査においても有用であることが確認された。また、PML の診断後に定期的実施されるフォローアップ検査においても、本検査を用いることで微細なウイルス量の変動を把握することが可能となった。

特筆すべき点として、本研究期間における JCV-DNA 陽性者のうち、15 名の患者でコマーシャルベースの PCR 検査が実施されていたが、約 47% の患者においては陰性であり、当研究室の超高感度 PCR 検査において陽性を呈したことが挙げられる。国内において一般的に実施されるコマーシャルベースの CSF 中 JCV のリアルタイム PCR 検査は、検出下限値が 200 コピー/mL 前後であることが知られており、これらの検査において陰性であったとしても PML の可能性を否定せず、超高感度検査を実施することの重要性が示された。

本研究期間において確認された 69 名の CSF 中 JCV-DNA 陽性者のデータベースを解析した。これまでの研究期間におけるサーベイランスの結果と同様に、日本国内では様々な基礎疾患を背景として PML が発生していることが示唆された。高齢者においては、免疫能の低下に関わる基礎疾患を有していないにも関わらず CSF 中 JCV が陽性を呈する場合があります。頭部 MRI 画像や神経学的所見においても PML と考えて矛盾のないデータが認められていた。これらのケースでは、CSF 中に微量の JCV-DNA しか検出されないことが多く、今後、超高感度 PCR 検査を継続することで新たな知見が得られる可能性が考えられた。

本研究班の PML サーベイランス委員会（三浦義治委員長）では、平成 28 年度より PML 疑い症例の登録制を開始し、匿名化した臨床情報をより広範囲かつ詳細に解析することになった。当研究室においては、医療機関から JCV-DNA 検査が依頼された時点で本研究班への患者情報の提供について説明し、主治医から承諾が得られた場合に PML サーベイランス委員会に連絡先を転送する役割を担っている。その後、同委員会から PML 疑い症例の登録について主治医に説明および同意の取得が行われ、より早い段階での症例情報の把握、ならびに PML の診断や治療におけるコンサルテーションが可能となった。

当研究室における PML の実験室サーベイランスは開始から 10 年目を迎え、これまでに蓄積したデータやノウハウに基づいて超高感度検査系を確立し、PML 疑い症例の登録等において臨床の専門家との連携をさらに深めた。これらの取り組みは日本国内における PML の発生动向の把握および診断や治療法の検討等において大きな意義を有する。

## E. 結論

医療機関における CSF-JCV の PCR 検査の支援を介して、PML の実験室サーベイランスを継続し、日本国内における PML の背景や動向を明らかにした。また、CSF 中 JCV の超高感度 PCR 検査系を立ち上げ、PML の診断における有用性を示した。

## [参考文献]

- 1) Warnke C, von Geldern G, Markwerth P, Dehmel T, Hoepner R, Gold R, Pawlita M, Kümpfel T, Mäurer M, Stangel M, Wegner F, Hohlfeld R, Straeten V, Limmroth V, Weber T, Hermsen D, Kleinschnitz C, Hartung HP, Wattjes MP, Svenningsson A, Major E, Olsson T, Kieseier BC, Adams O. Cerebrospinal fluid JC virus antibody index for diagnosis of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 76:792-801, 2014.
- 2) Berger JR, Aksamit AJ, Clifford DB, Davis L, Korolnik IJ, Sejvar JJ, Bartt R, Major EO, Nath A.

PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology* 80:1430-1438, 2013.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamichi K, Lim CK, Saijo M. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn J Infect Dis* 67: 307-310, 2014.
- 2) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, Saijo M. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 159: 1687-1696, 2014.
- 3) Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirofumi M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, Nakamichi K, Saijo M, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H. Usefulness of <sup>11</sup>C-methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol* 261:2314-2318, 2014.
- 4) Ohara H, Kataoka H, Nakamichi K, Saijo M, Ueno S. Favorable outcome after withdrawal of immunosuppressant therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy after renal transplantation: case report and literature review. *J Neurol Sci* 341:144-146, 2014.
- 5) Matsudaira T, Araki K, Oishi W, Sugiura A, Miura K, Nakamichi K, Saijo M, Obi T. Mirtazapine treatment ceased the progression of progressive multifocal leukoencephalopathy associated with systemic sarcoidosis. *Neurol Clin Neurosci* 2:158-160, 2014.
- 6) Sano Y, Nakano Y, Omoto M, Takao M, Ikeda E, Oga A, Nakamichi K, Saijo M, Maoka T, Sano H, Kawai M, Kanda T. Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy

derived from non-Hodgkin lymphoma: neuropathological findings and results of mefloquine treatment. *Intern Med* 54:965-970, 2015.

7) Yoshida T, Kawamoto M, Togo M, Kohara N, Ito T, Nakamichi K, Saijo M, Mizuno T. Progressive multifocal leukoencephalopathy developing after liver transplantation showing marked neurological symptom improvement and arrest of further deterioration of imaging findings: A case report. *J Neurol Sci* 359:1-3, 2015.

8) Aotsuka Y, Uzawa A, Nishimura K, Kojima K, Yamaguchi M, Makino T, Nakamichi K, Saijo M, Kuwabara S. Progressive multifocal leukoencephalopathy localized in the cerebellum and brainstem associated with idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Intern Med* 55:1645-1647, 2016.

9) Yokokawa K, Hisahara S, Matsuura Y, Ikeda K, Tsuda E, Saitoh M, Nakamichi K, Saijo M, Kamihara Y, Sato T, Kawamata J, Shimohama S. Progressive multifocal leukoencephalopathy after autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with multiple myeloma treated with combination therapy. *J Neurol Sci* 368:304-306, 2016.

10) Ishibashi K, Miura Y, Matsumura K, Kanemasa Y, Nakamichi K, Saijo M, Toyohara J, Ishii K. PET imaging of 18F-FDG, 11C-methionine, 11C-flumazenil and 11C-4DST in progressive multifocal leukoencephalopathy: a case report. *Intern Med*, in press.

## 2. 学会発表

1) 中道一生, 林 昌宏, 西條政幸. JC ウイルスゲノムの新しい検出-PML への臨床応用. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 5.21-24, 2014.

2) 三浦義治, 岸田修二, 中道一生, 西條政幸, 山田正仁, 水澤英洋. 本邦における進行性多巣性白質脳症発症者の近年の傾向について—厚労省 PML 研究班報告. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 5.21-24, 2014.

3) 小原啓弥, 形岡博史, 中道一生, 西條政幸, 上野 聡. 免疫抑制剤の中止により良好な転帰をたどった HIV 陰性腎移植後 PML の臨床学的検討. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡,

5.21-24, 2014.

4) 三條伸夫, 喜納里子, 能勢祐里江, 石橋 哲, 宍戸-原由紀子, 中道一生, 西條政幸, 前原健寿, 江石義信, 水澤英洋. メフロキン治療が有効な進行性多巣性白質脳症における脳の病理学的特徴. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

5) 吉田健二, 佐々木格, 瀬川茉莉, 村上丈伸, 吉原章王, 星 明彦, 杉浦嘉泰, 宇川義一, 守谷 新, 中村耕一郎, 中道一生, 西條政幸. Mirtazapine と mefloquine 治療が有効であった全身性サルコイドーシスに発症した進行性多巣性白質脳症の 1 例. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

6) 山本詞子, 石井一弘, 本間晋介, 岡田克典, 中道一生, 西條政幸, 玉岡 晃. 肺移植術後に発症した進行性多巣性白質脳症の 60 歳女性例. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

7) 中道一生, 林 昌宏, 西條政幸. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11.10-12, 2014.

8) 吉田誠克, 川本未知, 十河正弥, 幸原伸夫, 伊藤孝司, 中道一生, 西條政幸, 水野敏樹. メフロキン投与により神経症状の改善と画像所見の進行停止がみられた, 肝移植後発症の進行性多巣性白質脳症の 1 例. 第 20 回日本神経感染症学会, 長野, 10.22-23, 2015.

9) 中道一生, 林 昌宏, 西條政幸. コンピューターシミュレーションによる JC ウイルスゲノムの変異様式の解析. 第 20 回日本神経感染症学会, 長野, 10.22-23, 2015.

10) 木下一美, 中道一生, 伊藤睦代, 塩田愛恵, 林 昌宏, 倉根一郎, 西條政幸. LAMP法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウイルス診断. 第 20 回日本神経感染症学会, 長野, 10.22-23, 2015.

11) 中道一生, 西條政幸. JC ウイルス感染の実態と検出法. 第 21 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

12) 三浦義治, 岸田修二, 中道一生, 西條政幸, 高橋健太, 鈴木忠樹, 三條伸夫, 阿江竜介, 澤 洋文, 奴久妻聡一, 宍戸-原由紀子, 雪竹基弘, 浜口 毅, 水澤英洋, 山田正仁. PML の診断と治療. 第 21 回日本神経感染症学会総

会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

13) 伊崎祥子, 田中 覚, 田島考士, 中道一生, 西條政幸, 高橋健太, 長谷川秀樹, 野村恭一. 特発性 CD4+リンパ球減少症の関連が示唆され, メフロキンが有効であった小脳・脳幹型進行性多巣性白質脳症の1剖検例. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

14) 福田晃史郎, 石橋賢士, 松村 謙, 金政祐典, 中道一生, 西條政幸, 三浦義治. 血管免疫芽球形T細胞リンパ腫治療後に両側視力障害にて発症し, PET 検査が有用であった進行性多巣性白質脳症の63歳男性例. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

15) 古川貴大, 松井尚子, 山崎博輝, 和泉唯信, 中道一生, 西條政幸, 梶 龍兒. 非 HIV 関連進行性多巣性白質脳症の3例. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

16) 三浦義治, 中道一生, 西條政幸, 岸田修二, 高橋健太, 鈴木忠樹, 三條伸夫, 阿江竜介, 澤 洋文, 奴久妻聡一, 原由紀子, 雪竹基弘, 浜口 毅, 水澤英洋, 山田正仁. 本邦発症進行性多巣性白質脳症患者に対する塩酸メフロキン治療の多数例における有効性の解析. 第21

回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

17) 中道一生, 林 昌宏, 西條政幸. 限外濾過デバイスを用いた脳脊髄液中 JC ウイルスの高感度 PCR 検査系の確立および臨床検査における有用性の評価. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 金沢, 10.21-22, 2016.

18) 中道一生, 林 昌宏, 西條政幸. JC ポリオーマウイルスの調節領域における転写因子結合配列の *in silico* 解析. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 10.23-25, 2016.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1.取得特許

なし

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし