

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

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)に起因する致死的な脱髄疾患であり、様々な種類の免疫抑制が関与する。また、その診断においては脳脊髄液(CSF)を用いた JCV ゲノム DNA の PCR 検査が有効である。平成 19 年度(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。平成 19 年度から同 29 年度(12 月現在)までに合計 1,874 件の検査を実施し、208 名の PML 患者を確認した。また、平成 28 年度に引き続いて、従来の検査よりも鋭敏な超高感度 PCR 検査、ならびに本研究班の PML サーベイランス委員会における PML 疑い症例登録を支援した。平成 29 年 1 月から 12 月までに医療機関から依頼された 150 件の検査の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を実施した被検者 98 名のうち、28 名が CSF-JCV 陽性を呈した。同検査における陽性者のうち、血液疾患、自己免疫疾患、HIV 感染症、悪性腫瘍、その他の基礎疾患を有した患者が、それぞれ 8 が、6 名、5 名、5 名、4 名であった。また、平成 28 年度に引き続き、フィンゴリモドを服用していた多発性硬化症患者 1 名の CSF において JCV 陽性反応が認められた。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、免疫不全患者等の中枢神経組織において 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、その動向や背景を把握することは、医療行政を適切に実施する上で重要である。

日本では、米国のような PML を含む大規模なパブリックデータベースが整備されていない。PML 診断には特異性および侵襲性の点から、脳脊髄液(CSF)を用いた JCV ゲノム DNA 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。平成 29 年度における本研究では、前年度までと同様の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した。

B. 研究方法

1) 材料および検査系

CSF からの DNA の抽出には QIAamp MinElute Virus Spin Kit(Qiagen 社製)を用いた。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、加水分解プローブ)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情報をインターネットサイトにて公開している。医療機関の主治医等から電子メールにて検査の依頼を受け付けた後、検体輸送用のキットを依頼者に送付した。輸送キットを用いて当研究所に到着した CSF 検体から DNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いた定量検査によって JCV ゲノムのコピー数を測定

した。解析結果を依頼者に報告した。

3) 臨床情報の収集と分析

前年度に引き続き 66 項目からなる質問票を主治医に送付し、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

主治医からの検査依頼を受け付けた際、本研究班における PML 疑い症例の登録について説明し、承諾を得た後で主治医の連絡先を PML サーベイランス委員会に転送した。

(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

平成19年4月から同29年12月現在までに、1,874件のCSF中JCVのPCR検査を実施した。被検者1,492名のうち208名のCSFにおいてJCV-DNAを検出した。また、平成28年4月より、検査受付時に主治医に対して本研究班のPML疑い症例登録について説明し、PMLサーベイランス委員会に主治医の連絡先を転送している。症例登録開始から平成29年12月現在までに、のべ182名の主治医の情報を同委員会に転送することで本研究班におけるPMLサーベイランスを支援した。平成29年1月から12月までの1年間に於いては、150件の検査を実施し、68検体においてJCV-DNAを検出した。同期間において当検査を実施した被検者98名のうち、28名がCSF-JCV陽性を呈し、新規の陽性者として確認された。また、15名の陽性者においては、民間検査会社でのCSF中JCV検査が実施されていたが、3例が陽性の判定に至っておらず、当研究室での超高感度検査を実施することでJCV陽性であることが判明した。

2) CSF-JCV陽性者の分析

平成29年1月から12月における実験室サーベイランスにおいて確認されたCSF-JCV陽性者28名の臨床情報を解析した。陽性者の年齢の中央値は62.5歳であり、男性が50%であった。陽性者

28名の基礎疾患の内訳は、①血液腫瘍系疾患8名(悪性リンパ腫、白血病、骨髄腫等)、②自己免疫疾患6名(SLE、多発性硬化症等)、③HIV感染症5名、④悪性腫瘍5名(肝細胞癌、胸腺腫等)、⑤その他4名であった。多発性硬化症を有した陽性者1名はフィンゴリモドの投与を受けていた。また、同患者については、当研究室および米国NIHにおいてCSF中JCVの超高感度PCR検査が実施され、ともに陽性反応を呈した。

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。

平成 29 年度の本実験室サーベイランスにおいては、昨年度に導入した超高感度 PCR 検査を継続した。本法は高度濃縮精製が可能な核酸抽出カラムを用いる検査系であり、ルーチン検査において検出下限値 50 コピー/mL、最高感度の検査において 10 コピー/mL の JCV-DNA を検出することが可能である。これまでに用いてきた同検査の検出下限値は 200 コピー/mL 程度であり、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。しかし、超高感度 PCR 検査系を用いることで CSF 中の極微量の JCV-DNA を確実に検出することが可能となった。昨年度に引き続き今年度においてもフィンゴリモド投与中の多発性硬化症患者が CSF 中 JCV 陽性を呈したが、検体中のウイルスコピー数は 100 コピー/mL 未満であり、超高感度検査を導入する前の検査では検出が困難であったことが推察される。本症例においては米国 NIH においても超高感度検査が実施され、同じく陽性の結果が得られている。特筆すべき点として、調査票を介して提供された情報から判断すると、本症例においては画像所見から PML が疑われたものの、同疾患に特徴的な症候が認められていない。すなわち、超高感度検査を用いることで、無症候性の PML の検出したことが推察された。本研究班における PML 診療ガイドライン 2017 においては、

無症候性 PML を診断するための診断基準の改訂がなされている。これまでに当研究室において CSF 中 JCV を検出した症例では、何らかの中枢神経症候が認められていた。今後、多発性硬化症を含む様々な基礎疾患を背景とした PML において、無症候に近い段階で JCV を検出することができれば、早期の診断に貢献することが期待される。

また、近年では、コマーシャルベースの CSF 中 JCV 検査において陰性と判断された検体が、当研究室における超高感度検査によって陽性を呈するケースが珍しくない。併せて、民間検査会社において CSF 中 JCV 検査が実施された後、当研究室に超高感度検査が依頼されるケースが増えている。CSF 中 JCV の超高感度検査は、検体中のウイルス DNA を極微量の溶液にまで高度に濃縮するため、その工程においては熟達した作業者が手作業で検査を行う必要がある。そのため、企業において汎用されている核酸抽出ロボットによる検査の自動化が困難である。本実験室サーベイランスにおいて実施している超高感度検査は、処理しうる検体数においてコマーシャルベースの民間検査に劣るものの、検出下限値の点からメリットがある。そのため、医療機関から当研究室への検査依頼数は減少していない。同時に、民間企業の CSF 中 JCV 検査はハイスループット化がなされており、迅速性や簡便性において利点を有する。近年では、PML が疑われた場合にコマーシャルベースで迅速検査が実施された後、当研究室に確認検査もしくはフォローアップ検査が依頼されるケースが目立っている。つまり、より多くの PML 疑い患者について民間検査会社でスクリーニングが実施された後、超高感度検査を目的として当研究室に症例情報が集積されるフローが考えられる。この現状は、本研究班における PML サーベイランスの効率化において有用であることを示している。

昨年度から引き続き本年度においても検査依頼者に対して PML 疑い症例の登録について説明し、承諾を得た上で本研究班に主治医の連絡先を転送している。PML の診断や治療に関する研究では、様々な分野の専門家がチームを組織し、多面的に分析を行うことが重要である。また、PML サーベイランス委員会における取り

組みにおいては、情報の収集や分析に加えて主治医からのコンサルテーションに対応しており、PML の医療の向上に貢献している。本実験室サーベイランスは国内における PML の発生を検知するための役割を担っており、今後も継続して研究班に情報を伝達する必要がある。

E. 結論

CSF-JCV の PCR 検査によって国内の PML 診療を支援し、実験室サーベイランスを継続した。本年度における CSF-JCV 陽性者のパターンは近年と同様であり、多発性硬化症患者 1 名において陽性例が認められた。また、昨年度から引き続き超高感度 PCR 検査を継続し、より早い段階での PML の診断に貢献した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishibashi K, Miura Y, Matsumura K, Kanemasa Y, Nakamichi K, Saijo M, Toyohara J, Ishii K. PET imaging of ^{18}F -FDG, ^{11}C -methionine, ^{11}C -flumazenil and ^{11}C -4DST in progressive multifocal leukoencephalopathy: a case report. *Intern Med* 56:1219-1223, 2017.
- 2) Ikeda J, Matsushima A, Ishii W, Goto T, Takahashi K, Nakamichi K, Saijo M, Sekijima Y, Ikeda SI. Brain biopsy is more reliable than the DNA test for JC virus in cerebrospinal fluid for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Intern Med* 56:1231-1234, 2017.
- 3) Nishiyama S, Misu T, Shishido-Hara Y, Nakamichi K, Saijo M, Takai Y, Takei K, Yamamoto N, Kuroda H, Saito R, Watanabe M, Tominaga T, Nakashima I, Fujihara K, Aoki M. Fingolimod-associated PML with mild IRIS in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 5:e415, 2018.

2. 学会発表

- 1) 佐藤翔紀, 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 矢部一郎, 遠藤知之, 豊嶋崇徳, 東海林菊太郎, 宝金清博, 松野吉宏, 太田雅之, 三浦義治,

中道一生, 西條政幸, 佐々木秀直. 脳生検により診断した進行性多巣性白質脳症の長期生存例. 第 22 回日本神経感染症学会学術大会, 福岡, 10.13-14, 2017.

2) 宍戸-原由紀子, 松林 純, 中道一生, 西條政幸, 相澤仁志, 秋元治朗, 長尾俊孝. 画像・病理・遺伝子解析で悪性リンパ腫が疑われた、高度リンパ球浸潤を伴った進行性多巣性白質脳症の 1 例. 第 22 回日本神経感染症学会学術大会, 福岡, 10.13-14, 2017.

3) 三浦義治, 中道一生, 西條政幸, 高橋健太, 鈴木忠樹, 阿江竜介, 濱口 毅, 原由紀子, 三條伸夫, 雪竹基弘, 岸田修二, 澤 洋文, 奴久妻聡一, 水澤英洋, 山田正仁. 本邦における進行性多巣性白質脳症 (PML) サーベイランスの現状—PML サーベイランス委員会報告—. 第 22 回日本神経感染症学会学術大会, 福岡, 10.13-14, 2017.

4) 中道一生, 西條政幸. 脳脊髄液中 JC ウイルスの超高感度リアルタイム PCR 検査における CLIA 認定プライマーおよびプローブの有用性. 第 22 回日本神経感染症学会学術大会, 福岡, 10.13-14, 2017.

5) Nakahara J, Kufukihara K, Tanikawa M, Nakamichi K, Saijo M, Miura Y, Fujiwara H, Jinzaki M, Yoshizaki T, Suzuki S, Takahashi S, Suzuki N. Third Japanese case of fingolimod-associated PML in natalizumab naïve MS: Coincidence or alarm bell? 7th JointECTRIMS ACTRIMS Meeting 2017, October 25-28, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし