

< Symposium 06-3 > 神経感染症における日本からの新たな発信

## JC ウイルスゲノムの新しい検出—PML への臨床応用

中道 一生<sup>1)</sup> 林 昌宏<sup>1)</sup> 西條 政幸<sup>1)</sup>

**要旨：**進行性多巣性白質脳症（PML）は JC ウイルス（JCV）に起因する中枢神経疾患である。PML の診断では、脳脊髄液中の JCV のゲノム DNA を標的としたリアルタイム PCR 検査が一般的である。しかし、この検査には偽陽性のリスクがあり、その可能性を解析するための新技術が必要である。PML 患者において検出される JCV には、ウイルスゲノムの調節領域に多様な変異が生じる。この特性を応用し、高解像度融解曲線分析をもちいて調節領域の変異を患者レベルで識別するための検査系を開発した。本検査系をルーチン検査後の PML の確認検査にもちいることで、JCV ゲノムの変異の有無、および汚染による偽陽性などを迅速に解析することが可能である。

（臨床神経 2014;54:1028-1030）

**Key words：**進行性多巣性白質脳症, JC ウイルス, リアルタイム PCR, 高解像度融解曲線分析

### はじめに

進行性多巣性白質脳症（progressive multifocal leukoencephalopathy; PML）は、ポリオーマウイルス科の JC ウイルス（JCV）に起因する脱髄疾患である。JCV は多くの成人に持続感染しており、免疫抑制にともなって変異型ウイルスが出現し、大脳白質などを破壊する<sup>1)2)</sup>。予後は悪く、治療がなされないばあいに、多くの患者が発症から 1 年以内に死にいたる。PML の診断では、脳組織をもちいた病理学的検査もしくは PCR 検査がもっとも確実であるが、侵襲性の点から脳脊髄液中の JCV ゲノム DNA を標的とした PCR 検査が広くもちいられている<sup>1)2)</sup>。

### 脳脊髄液中 JCV を標的としたリアルタイム PCR 検査と PML の実験室サーベイランス

当研究室では、JCV の T 遺伝子などを標的とした定量的リアルタイム PCR 検査系を開発し、2007 年 4 月から日本全国の医療機関における脳脊髄液 JCV 検査を支援している<sup>3)4)</sup>。また、質問票を介して患者情報を収集することでデータベースを構築し、日本国内における PML の発生動向やその背景を解析している<sup>5)6)</sup>。2014 年 3 月現在までに、約 1,100 件の検査を受け付け、100 名以上の PML 患者を確認している。日本では、HIV 感染症や血液疾患を有する PML 患者の割合が高い傾向にあったが、自己免疫疾患や臓器移植歴などを有する患者においても PML がみとめられており、様々な背景において PML が発生していることが明らかとなっている<sup>5)6)</sup>。また、近年では、日本国内の民間企業においても当研究室と同様の定量的リアルタイム PCR 検査が導入されているが、確認検査やフォローアップ検査などをふくめ、当研究室への検査依頼

は増加傾向にあり、多数の症例報告論文においてその有用性が示されている。

### リアルタイム PCR をもちいたウイルス検査の課題

リアルタイム PCR はウイルス検査における汎用技術となっており、すぐれた迅速性や感度、特異性を有する<sup>7)</sup>。一方、本法は、鋭敏であるがゆえに、わずかな DNA の汚染を偽陽性として検出するリスクを有する。PCR 検査においてもっとも偽陽性をひきおこす可能性が高い事象は、陽性対照 DNA によるサンプルの汚染である。このリスクに対しては、多くの検査系において対照 DNA の配列や断片長を改変するといった対策が講じられている。しかし、陽性検体から陰性検体へのキャリーオーバーによる汚染が生じたばあいには、偽陽性の判別が困難である。また、リアルタイム PCR 検査系は、一般的に、ウイルスゲノム上の高度に保存された領域を標的としているため、増幅産物の塩基配列の解析によってキャリーオーバーか否かを判定することが困難なばあいが多い。PML のばあいに、患者が基礎疾患に対して免疫抑制をとまなう治療を受けている、もしくは、脳生検による病理学的検査が困難である、といったケースが珍しくない。そのため、脳脊髄液中 JCV の PCR 検査での偽陽性は、患者の QOL に影響を与える可能性が高い。しかし、検体の汚染の可能性を迅速にしらべるための post-hoc 検査系の開発は十分になされていない。

### PML における変異ウイルスを標的としたタイピングの課題

PML 患者の脳組織や脳組織において検出される JCV は、ウイルスゲノムの調節領域に患者個人レベルの多様な変異を有

<sup>1)</sup> 国立感染症研究所ウイルス第一部〔〒 162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1〕  
（受付日：2014 年 5 月 21 日）

することが知られており、この領域の塩基配列を解析することでウイルス変異の有無を確認する、もしくは複数の検体を識別するという手法が古くからおこなわれている<sup>8)</sup>。しかし、この解析手法では、検体中にふくまれる様々な亜型のウイルスゲノムをプラスミドにクローニングした後、塩基配列を決定し、その変異パターンを *in silico* で解析する必要がある。その解析のためには多くの経済的、時間的なコストを要し、確認検査における使用は困難である。米国 NIH の研究グループは、持続感染しているアーキタイプウイルスが有する調節領域のみを標的としたリアルタイム PCR を開発し、通常のリアルタイム PCR と併用することで変異ウイルスを計測するという手法を発表した。しかし、この方法では変異ウイルス自体が検出されないため、検体間でのキャリアオーバーを解析することが困難である<sup>9)</sup>。

### JCV ゲノムを患者個人レベルで識別するための 新技術の開発とその応用

上記の背景から、当研究室は、変異型 JCV のゲノム DNA に生じる多様な変異を標的として、ウイルスの亜型を迅速に同定するためのスキニング技術を開発し、PML の高精度診断技術へと応用することを目的として研究を続けてきた。その結果、JCV の調節領域をリアルタイム PCR によって増幅した後、増幅産物の解離温度を高解像度融解曲線分析 (High-Resolution Melting analysis; HRM) によって測定することで、調節領域の変異パターンを迅速かつ容易に識別しうることをみだした<sup>10)</sup>。本検査系においてももちいられる PCR プライマーは、データベース上に登録されている多数の JCV ゲノムの配列を対象とした *in silico* 解析に基づいて設計されており、持続感染しているアーキタイプウイルスおよび PML 型の変異ウイルスを検出しうる。また、陽性検体中にふくまれている微量の JCV ゲノムにおいて変異が生じているか否か、もしくは複数の陽性検体中において検出された JCV ゲノムを患者個人レベルで識別することが可能である。

### おわりに

PML 型の JCV は、ウイルスゲノムにランダムな変異を有する。これらの変異を HRM によってスキニングし、検体中にふくまれている JCV の変異パターンを患者個人レベルで識別するための検査技術を開発した。また、多数の患者の脳脊髄液をもちいた検査系のバリデーションを経て、その実用化に成功した。本検査系は、脳脊髄液検査において検出されたウイ

ルスの変異の有無、ならびに偽陽性の可能性を解析する上で有用であり、より確実な PML の診断に貢献することが期待される。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

### 文 献

- 1) Brew BJ, Davies NW, Cinque P, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6:667-679.
- 2) Shishido-Hara Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 2010;120:403-417.
- 3) Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without nucleic acid extraction. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:211-216.
- 4) 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* 2014; 67:307-310.
- 5) Nakamichi K, Mizusawa H, Yamada M, et al. Characteristics of progressive multifocal leukoencephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan. *BMC Neurol* 2012;12:121.
- 6) Nakamichi K, Inoue N, Shimokawa T, et al. Detection of human herpesviruses in the cerebrospinal fluid from patients diagnosed with or suspected of having progressive multifocal leukoencephalopathy. *BMC Neurol* 2013;13:200.
- 7) Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.
- 8) Nakamichi K, Kishida S, Tanaka K, et al. Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 2013;158:639-650.
- 9) Ryschkewitsch CF, Jensen PN, Major EO. Multiplex qPCR assay for ultra sensitive detection of JCV DNA with simultaneous identification of genotypes that discriminates non-virulent from virulent variants. *J Clin Virol* 2013;57:243-248.
- 10) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, et al. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 2014;159:1687-1696.

**Abstract****A new approach for JC virus detection and its application for PML diagnosis**Kazuo Nakamichi, Ph.D.<sup>1)</sup>, Chang-Kweng Lim, D.V.M., Ph.D.<sup>1)</sup> and Masayuki Saijo, M.D., Ph.D.<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a rare but fatal demyelinating disease of the central nervous system (CNS) caused by JC virus (JCV). The current diagnostic standard for PML is real-time PCR testing of extracted DNA for assessing the presence of JCV DNA in cerebrospinal fluid (CSF). However, because of its sensitivity, real-time PCR assay for JCV testing has a risk of false-positive results due to DNA contamination. JCV isolates recovered from the brain or CSF of PML patients contain hypervariable mutations within the non-coding control region (NCCR) of the viral genome. In our laboratory, the high-resolution melting (HRM) assay was developed to distinguish the patient-dependent NCCR patterns of JCV DNA variants in clinical specimens. The HRM-based scanning of NCCR serves as a quick and convenient technique for comparing the mutational patterns of JCV variants in clinical samples and for the confirmation of PML diagnosis when combined with routine real-time PCR testing.

(Clin Neurol 2014;54:1028-1030)

**Key words:** progressive multifocal leukoencephalopathy, JC virus, real-time PCR, High-Resolution Melting analysis

---