

# 進行性多巣性白質脳症検査マニュアル

平成24年8月

## 進行性多巣性白質脳症

### 目次

- I. 進行性多巣性白質脳症における検査の概説  
「可能な検査方法」
- II. 検査に関する一般的な注意事項
  1. 病原体の封じ込め
  2. 病原体の不活化
  3. 検査室におけるJCV DNAの汚染対策
- III. 検査材料の採取・輸送および保管
  1. 検査材料の採取において注意すべき点
    - 1) 脳脊髄液
    - 2) 生検, 剖検組織
  2. 検査材料の輸送において注意すべき点
    - 1) 検体の取扱いと保存
    - 2) 検体の輸送
    - 3) 検査実施施設における検体の取扱いと保管
- IV. 検査の実際
  1. 脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査
    - 1) 留意事項
    - 2) 試薬および機器
    - 3) 脳脊髄液からのDNAの抽出
    - 4) リアルタイムPCRによるJCVゲノムDNAの検出
  2. 脳組織を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査
    - 1) 試薬および機器
    - 2) 脳組織からのDNA抽出
    - 3) リアルタイムPCRによるJCVゲノムDNAの検出
  3. 病理組織検査, 免疫組織化学検査
    - 1) 必要な試薬, 器具, 機材
    - 2) 検査手順
  4. JCV検査結果の判定
    - 1) JCVゲノムDNAのPCR検査の判定
    - 2) 病理検査の判定
  5. PMLの診断基準

## 進行性多巣性白質脳症検査マニュアル

### 6. ウイルス分離

- 1) 必要な試薬, 器具, 機材
- 2) ウイルス分離手順

### V. 引用文献等

### VI. 検査問い合わせ先

### VII. 執筆者一覧

添付図 病理組織学的検査

## I. 進行性多巣性白質脳症における検査の概説

進行性多巣性白質脳症（Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ; PML）は高度の免疫不全等を有する患者において、JCウイルス（JC virus, JCV）によって発症する致死的な脱髄性疾患である。JCVはポリオーマウイルス科ポリオーマウイルス属に分類される約5 kbpの環状二本鎖DNAウイルスで、ヒトを宿主とする。ウイルス粒子の直径は約40 nmであり、エンベロープはない。JCVのヒトにおける感染機序の詳細は不明であるが、多くのヒトは幼小児期にJCVに感染し、腎臓および骨髄等においてJCVが持続感染することが知られている。またJCVは世界中のほとんどのヒト集団に広く蔓延しており、成人の約70%が抗JCV抗体を有している。

通常JCVの持続感染は無症候性であり、健常人において病原性を示すことはない。しかしながら免疫不全等を有する患者においては、脳内でJCVが増殖し、PMLを引き起こすことがある。JCVの標的細胞は髄鞘を形成している稀突起膠細胞（オリゴデンドロサイト）であり、JCVが増殖することによって標的細胞が破壊されるため重度の脳機能障害を生じる。PMLの予後は極めて悪く、ほとんどの患者は3～6ヶ月以内に死亡する。根本的な治療法は確立されていない。数種類の治療薬候補が見つかったが、効果が確認されている薬剤はない。

近年、HIV感染者の増加および臓器・造血幹細胞移植療法の実施件数の増加により、PML患者数は増加傾向にある。また、主に自己免疫疾患を有する患者において、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンに対するヒトモノクローナル抗体製剤であるnatalizumabの投与が原因のPMLが報告されている。

PMLの診断には脳MRI所見や神経症状、脳生検試料の病理学的検査、脳脊髄液や脳組織を用いたウイルスDNAのPCR検査を実施する。特に実験室診断では、特異性および侵襲性の点から脳脊髄液を用いたPCR検査が優先される。しかしながら、脳脊髄液中にウイルスが放出されていない状態ではJCV遺伝子の検出が困難であるため、その感度は70～80%程度である。一方、脳の生体組織検査（脳生検）を実施することが可能な場合には、免疫組織化学検査およびPCR検査が極めて有効であり、重要な診断根拠となる。なお、以上述べた詳細については、JCV感染症の総説（文献1, 2）を参照して頂きたい。

### 「可能な検査方法」

脳脊髄液を対象にPCR法によるウイルス遺伝子検出が、脳組織（生検、剖検）を対象に病理組織学的検索や抗JCV抗体を使用した免疫組織化学検査によるウイルス抗原検索が行われる。

## II. 検査に関する一般的な注意事項

### 1. 病原体の封じ込め

検査室における感染対策として、JCVがBSL2の病原体であることを念頭に置いた適切な感染防止策を講じる必要がある。PCR検査および凍結病理組織の検体の取扱いに際しては、検体および組織等の飛散に十分注意を払い、安全キャビネット（クラスII）内で作業する。作業中は防護手袋、マスク等を必ず使用する。

### 2. 病原体の不活化

JCVはエーテルおよびエタノール等に対して耐性を示すため、70% エタノール等の有機溶剤では不活化されない。一方、加熱処理や紫外線処理、次亜塩素酸処理はJCVの不活化に有効であるが、場所や用途によっては実施が困難な場合がある。そのため二酸化塩素（日本クレア等から販売されている）を用いた処理が最も確実かつ簡便である。

### 3. 検査室におけるJCV DNAの汚染対策

PMLの診断にはウイルスDNAを標的としたPCR検査が有用であるが、その実施においては陽性対照もしくは患者検体に由来するウイルスDNAによる実験環境の汚染、検体間の汚染等により偽陽性が生じるリスクを考慮する必要がある。PML疑い患者の中には継続的に免疫抑制剤を投与されている患者も多く、誤った結果は治療方針に影響を与えかねない。そのため、ウイルスDNAによる汚染に対して細心の注意を払う必要がある。検査の実施に際しては安全キャビネットを用い、必要に応じて紫外線およびDNA除去剤等を用いた汚染対策を行う。また使用する試薬および検体を分注し、可能な限りウイルスDNAによる汚染のリスクを低減させることも重要である。

### III. 検査材料の採取・輸送および保管

#### 1. 検査材料の採取と注意点

##### 1) 脳脊髄液

PMLの遺伝子診断では脳脊髄液からのウイルスDNAのPCR検査，および脳組織を用いた免疫組織化学検査が有効である．血液を用いたウイルス検査は感度および特異性が低いため，診断には適さない．またJCVは多くの健常人において持続感染しており，平常時であっても尿中に排出されることがあるため，血清を用いた抗体検査および尿を用いたウイルス検査は有効ではない．一方，培養細胞でのウイルス分離を用いた検査は一般的ではないが，サル腎臓細胞由来でSV40のT抗原を発現しているCOS-7細胞を用いればウイルス分離も可能である．

##### 2) 生検，剖検組織

生検，剖検組織サンプルは組織学的検査，免疫組織化学検査，PCR検査に用いる．白質病変部分の組織を採取する．確実に病変部組織が含まれている必要があり，生検では画像診断から推察される病変部を，脳機能をつかさどる周辺組織に極力ダメージを加えないように確実に採取する必要がある．通常，大豆大程度の大きさが必要であるが，周辺健常組織に障害を与えないよう，必要最小限の大きさにとどめる．検体は2分割し，ホルマリン固定サンプル（組織学的検査，免疫組織化学検査）及び凍結サンプル（PCR検査用）を作製する．ホルマリン固定サンプルは常温で，凍結サンプルはチューブ等に密封して-80℃で保存する．ホルマリン固定標本は凍結してはならない．

#### 2. 検査材料の輸送と注意点

##### 1) 検体の取扱いと保存

脳脊髄液をPCR検査に用いる場合には，採取した検体を-25℃以下で凍結保存する．また，脳組織をPCR検査に用いる場合には，採取した検体を-80℃以下で保存する．この場合には，病変部を含む組織を確実に採取することが重要であり，必要に応じて該当部分を半凍結状態で細切する．一方，病理組織検査用にホルマリン固定された標本はすでに感染性が失われているので，非感染性物質として取扱うことが可能である．脳組織を免疫組織化学検査に用いる場合は，ホルマリン固定およびパラフィン包埋後にシランコートガラスに貼り付けた未染標本を作製する．

##### 2) 検体の輸送

PCR検査のための検体を医療機関から検査実施施設に送付する際には，冷凍輸送が原則である．ホルマリン固定標本は室温で輸送する．PML疑い患者の多

くは基礎疾患としてHIV等、他の感染性疾患に罹患していることも否定できないため、採取された検体の取扱には注意を要する。患者検体の輸送に際しては、「WHO感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」におけるカテゴリーBの感染性物質に準じ、必要事項（①患者IDなど、②年齢、③性別、④採取部位、⑤サンプル数、⑥剖検、生検の別、⑦簡単な臨床経過、⑧検査結果の情報提供を受ける担当者名、連絡先、住所、電話、FAXとe-mailアドレス）を記載した書類（データシート）を検査材料に添付して検体の梱包および発送を行う。免疫組織化学検査に用いる未染標本等、ホルマリン等によりすでに不活化処置がなされたサンプルは、感染性物質として取り扱う必要はない。未染標本は標本の破損を防ぐためにスライドグラス専用容器に入れ室温で輸送する。なおカテゴリーBの感染性物質の輸送に必要な容器および梱包手順等については以下の国立感染症研究所のホームページに記載されている。

病原体等の輸送用包装容器：カテゴリーB容器

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-lab-e/481-biosafe/947-youkisb.html>

### 3) 検査実施施設における検体の取扱いと保管

検体が到着した際には、検体情報および到着日等を明記し、適切な条件で保管する。脳脊髄液および未固定の脳組織の検体については、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下にて長期保存が可能である。また、検査において一時的に検体を冷蔵保管する際には、可能な限り短時間に留める。ホルマリン固定標本は室温で長期保存が可能である。

## IV. 検査の実際

### 1. 脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査

#### 1) 留意事項

近年、ウイルスDNAのPCR検査では、検出感度と特異性の点からリアルタイムPCRが主流となっている。特に本検査では、脳脊髄液中に存在する微量のウイルスDNAを検出し、かつ定量する必要があるため、リアルタイムPCRを推奨する(文献3～9)。また、リアルタイムPCRの定量性および再現性の点から、DNAを抽出する際には市販のカラム精製キットを用いるべきであり、in houseの試薬は推奨されない(文献10)。ここでは、国立感染症研究所ウイルス第一部における脳脊髄液PCR検査に用いられているTaqManリアルタイムPCRのプロトコール(文献11)を紹介する。本法を用いることで数コピーのJCV-DNAを検出することが可能であるが、実施に際しては各施設における標準DNAを用いた条件検討および感度の確認が必要である。

#### 2) 試薬および機器

- ① 陽性対照DNA: JCVゲノムを含むプラスミド (JCRB遺伝子バンク, もしくは理化学研究所バイオリソースセンター, 国立感染症研究所ウイルス第一部にて分与可能であり, 下記のプライマー/プローブの適合性に問題はない).
- ② DNA抽出キット: QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- ③ リアルタイムPCR用試薬: LightCycler 480 Probes Master (Roche)
- ④ JCV-T遺伝子検出用PCRプライマー: 5'- AAG TAC ATG CCC ATA AGC AA -3' および 5'- AGA CAG CCA TAT GCA GTA G -3'
- ⑤ JCV-T遺伝子検出用TaqManプローブ: 5'- AAA CCT GCT TAG TTT CTT CTG GTT CTT -3' (5末端 6-carboxyfluorescein標識, 3末端 Black Hole Quencher-1標識)
- ⑥ リアルタイムPCR機器: LightCycler ST300 (Roche)もしくは同等品

#### 3) 脳脊髄液からのDNAの抽出

脳脊髄液からのDNAの抽出の詳細は上記 QIAamp DNA Blood Mini Kit に添付のプロトコールに準ずる。

- ① 凍結保存された検体を30℃程度の温度で解凍する。なお、感染性物質は下記②の溶解液によって不活化されるため、熱処理等は必要ない。
- ② 200 μLの検体に等量の溶解液 (Buffer AL) を加え、15秒間混和する。
- ③ 上記②に20 μLのQiagen proteaseを加え、15秒間混和する。
- ④ チューブを56℃にて10分間加温する。
- ⑤ サンプル液を室温に戻した後、230 μLの100%エタノールを加え、15秒間混和する。



- ⑥ スピнкаラムをコレクションチューブに入れ、サンプル液を加える。
- ⑦ チューブを10,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑧ コレクションチューブを交換し、スピнкаラムに500 μLの洗浄液 (AW1) を加える。
- ⑨ チューブを10,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑩ コレクションチューブを交換し、スピнкаラムに500 μLの洗浄液 (AW2) を加える。
- ⑪ チューブを20,000 x g にて3分間遠心する。
- ⑫ コレクションチューブを交換し、チューブを20,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑬ スピнкаラムをコレクションチューブに入れ、60 μLの溶出液 (AE)を加える。
- ⑭ チューブを室温にて5分間放置する。
- ⑮ チューブを10,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑯ サンプル液を回収し、PCR用チューブに移す。
- ⑰ 上記⑯のチューブを94°Cにて5分間加温し、微量に含まれているエタノールを完全に除去する。

#### 4) リアルタイムPCRによるJCVゲノムDNAの検出

- ① 上記 2)-① の陽性対照DNAのコピー数を算定し、適切な濃度に希釈する。定性検査では20コピー (/反応)、定量検査では10E6から10E2コピー (/反応) の希釈系列を用いる。
- ② 下記の反応液を調製する。

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Premix                   | 10 μL |
| Sense primer (10 μM)     | 1 μL  |
| Antisense primer (10 μM) | 1 μL  |
| Probe (3.2 μM)           | 1 μL  |
| H <sub>2</sub> O         | 5 μL  |
| 抽出後のDNA                  | 2 μL  |
| 合計                       | 20 μL |

- ③ 下記の条件にて反応および測定を行う。その他の詳細な条件については、キットおよびPCR機器に添付のプロトコール等に準じて設定する。

熱変性

95°C (10 min)

PCR/測定 (45サイクル)

95°C (10 sec)

60°C (20 sec)

72°C (1 sec)

- ④ 定量検査の場合には、PCR機器に付属のソフトウェア等を用いてJCVゲノムのコピー数を算定する。

## 2. 脳組織を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査

### 1) 試薬および機器

脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査法に準ずる。

### 2) 脳組織からのDNAの抽出

脳組織からのDNAの抽出の詳細は QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) の添付のプロトコール (組織からのDNA精製) に準ずる。

- ① 凍結保存された脳組織を30℃程度の温度で解凍する。組織量は25 mg以下とし、機械的に細かくすり砕く。なお感染性物質は下記②の溶解液によって不活化されるため、熱処理等は必要ない。
- ② 脳組織に180 μLのBuffer ATLを加える。
- ③ 上記②に20 μLのProteinase Kを加え、15秒間混和する。
- ④ チューブを56℃にて60分間加温した後、180 μLのBuffer ALを加え15秒間混和してから70℃にて10分間加温する。
- ⑤ サンプル液を室温に戻した後、200 μLの96～100%エタノールを加え、15秒間混和する。
- ⑥ スピнкаラムをコレクションチューブに入れ、サンプル液を加える。
- ⑦ チューブを6,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑧ コレクションチューブを交換し、スピнкаラムに500 μLの洗浄液 (AW1) を加える。
- ⑨ チューブを6,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑩ コレクションチューブを交換し、スピнкаラムに500 μLの洗浄液 (AW2) を加える。
- ⑪ チューブを20,000 x g にて3分間遠心する。
- ⑫ コレクションチューブを交換し、チューブを20,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑬ スピнкаラムをコレクションチューブに入れ、60 μLの溶出液 (AE) を加える。
- ⑭ チューブを室温にて5分間放置する。
- ⑮ チューブを6,000 x g にて1分間遠心する。
- ⑯ サンプル液を回収し、PCR用チューブに移す。
- ⑰ 上記⑯のチューブを94℃にて5分間加温し、微量に含まれているエタノールを完全に除去する。

### 3) リアルタイムPCRによるJCVゲノムDNAの検出

リアルタイムPCRによるJCVゲノムDNAの検出は脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査法に準ずる。

### 3. 病理組織検査, 免疫組織化学検査

ホルマリンで固定された検体は通常の方法でパラフィン包埋, 薄切を行い, パラフィン切片を作成する. 免疫組織化学に加え, HE 染色も同時に行い, 組織学的所見を加え, 結果を判定する.

1) 必要な試薬, 器具, 機材 (指定品目または同等品を使用)

- ① 抗JCVウサギ抗体 (長嶋和郎博士より供与, 文献12), および, 抗JCVウサギ抗体 (文献13)
- ② ダコ社製Envision ポリマー試薬 抗ウサギ抗体用, または抗マウス抗体用
- ③ 0.01M クエン酸バッファー (pH6.0)
- ④ PBS (-)
- ⑤ 蒸留水
- ⑥ 封入剤
- ⑦ 染色バット
- ⑧ 染色籠
- ⑨ 特級エタノール
- ⑩ 特級メタノール
- ⑪ 特級キシロール
- ⑫ 30%過酸化水素水
- ⑬ ピンセット
- ⑭ スライドグラス
- ⑮ カバーグラス
- ⑯ 湿潤箱 (免疫組織化学反应用)
- ⑰ 恒温槽 (37°C)
- ⑱ 光学顕微鏡
- ⑲ オートクレーブ

[リリーの緩衝ホルマリンの組成]

|   |         |
|---|---------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 44.0 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 163.8 g |
| 特級ホルマリン   | 1.0 L   |

蒸留水全量10 Lとなるように蒸留水を加える

2) 検査手順

- ① パラフィン切片を, スライドが完全に浸漬する量の特級キシロールを入れた染色バットに浸漬する. 5分間, 時折, 上下に動かす. バットを換えて, 計3回繰り返す, 脱パラフィンを行う.
- ② 100% エタノールを入れた染色バット中に5分間, 3回繰り返す. 次に70% エタノールを入れたバット中に5分間浸漬, 最後に蒸留水に浸漬して親水化する.
- ③ 0.3% 過酸化水素メタノール溶液中に30分間, 室温で浸漬する.

- ④ 蒸留水中にスライドを浸漬する。
- ⑤ クエン酸バッファーにスライドを浸漬しオートクレーブ121℃10分かける。
- ⑥ 5%-正常ヤギ血清/PBS (-)で切片をカバーし、室温で20分間静置する。
- ⑦ 過剰の正常ヤギ血清を拭き取り、抗JCVウサギ抗体と4℃にて1晩反応させる（検査のために調整した抗体は1週間以内に使用する。使用抗体は4℃に保存する）。
- ⑧ PBS (-)で抗体を洗い流し、十分量のPBS (-)を入れたバットに浸漬する。5分間3回繰り返す。
- ⑨ Envision ポリマー試薬を室温で30分反応させる。
- ⑩ PBS (-)で抗体を洗い流し、充分量のPBS (-)を入れたバットに浸漬する。5分間3回繰り返す。
- ⑪ 切片をDAB 発色キットを用いて発色させ必要に応じて核染を行う。
- ⑫ 脱水、透徹、封入する。

#### 4. JCV検査結果の判定

##### 1) JCVゲノムDNAのPCR検査の判定

JCVのリアルタイムPCR検査の判定は20コピー以上を陽性とする。しかしながら、本疾患の診断は画像所見や神経症状、他の各種検査、基礎疾患等に基づいて総合的になされるべきであり、JCV検査は診断のためのデータの一部に過ぎない。とりわけ、脳脊髄液のPCR検査の場合には、PMLを発症していても脳脊髄液中にJCVが放出されていない場合があるため、結果が陰性であってもPMLを否定するものではない。このような場合には期間をおいて再検査するか、脳生検検体としたPCR検査や病理学的検査を検討する。ただし、脳生検試料のPCR検査では、非PML患者の脳組織において脳内に持続感染しているJCVのゲノムが検出された例が報告されている。このPCRの場合にはPMLの診断根拠とはなり得ず、免疫組織化学検査もしくは脳脊髄液検査以外の指標を加えて総合的に判断する必要がある。

##### 2) 病理検査の判定

HE染色では、脱髄、すなわち髄鞘を形成しているオリゴデンドロサイトの破壊が顕著である。感染細胞の核はクロマチンが増量し、著明に腫大し、すりガラス状の核内封入体を確認することができる（添付図）。免疫組織化学ではこれらの感染細胞にJCVの抗原が検出される。

#### 5. PMLの診断基準

①症状（進行性の神経症状を呈し、発熱や視神経異常、脊髄疾患を有していないこと）、②MRI所見（白質において単巣性もしくは多巣性のシグナルを認め、これらが造影剤増強効果や占拠性病変を示していないこと）、および③PCR

検査（脳脊髄液もしくは脳生検試料においてJCVのDNAが検出されること）の各項目を満たすことが診断基準として挙げられている（文献1）。

国内では2004年に示された厚生労働省調査研究班によるガイドラインにより、①症状や画像、脳脊髄液JCV-DNA陽性等の項目を満たす場合にはProbable PMLとして、②脳生検試料において特徴的病理所見とJCV感染が証明された場合は、症状や画像に関係なくDefinite PMLとして診断することが提唱されている（文献14）。

## 6. ウイルス分離

以前は初代ヒト胎児グリア細胞を用いたJCV分離が行われていたが、現在では倫理上の問題により当該細胞の入手が困難であるため、JCV分離にはSV40のT抗原を発現しているサル腎臓由来細胞であるCOS-7細胞を用いて分離を行う（文献15）。

1) 必要な試薬，器具，機材（指定品目または同等品を使用）

- ① Eagle's MEM（Sigma）
- ② ウシ胎児血清（56℃，30分間非働化したFBS）
- ③ PBS (-)
- ④ 組織培養用プレート（24 well）
- ⑤ 0.45 μmフィルター
- ⑥ 炭酸ガス培養器
- ⑦ 遠心器

2) ウイルス分離手順

- ① 最初に培地の調製を行う。つまり，Eagle's MEMにウシ胎児血清を10%になるように添加したものを細胞増殖用培養液とし，2%になるように添加したものを細胞維持培養液とする。
- ② 細胞増殖用培養液を用いて，COS-7細胞を24 wellプレートに培養する。
- ③ 細胞が約50～70% confluentになった時点で，プレートの培養液を除き，検体を各wellあたり100 μL接種して37℃，1時間培養器内に静置する。
- ④ 1時間後，細胞維持培養液を0.5 mL加えて培養器内で培養を続ける。細胞変性効果（CPE）の観察は毎日行い，細胞維持培養液は1週間ごとに交換する。CPEはわかりにくくウイルスの増殖も遅いので，1ヵ月まではウイルス分離を続ける。
- ⑤ ウイルス同定は感染細胞の一部をチャンバースライドに培養し冷アセトン液で10分間固定した後，上述した免疫組織化学検査の手順に従って，JCV抗原を検出する。なお，JCV持続感染細胞であるJCI細胞（神戸市環境保健研究所より分与可能）を陽性コントロールとして用いる（文献16）。
- ⑥ JCVは培養液にウイルスが放出されにくいため，感染細胞を回収して3回の凍

結融解操作により細胞を破壊する。細胞破砕液は3,000 rpmで10分間遠心して上清を回収し、ウイルス液とする。

- ⑦ ウイルス量が少ない場合は凍結融解操作で回収したウイルス液をあらたにCOS-7細胞に接種して増殖させる。

## V. 引用文献等

1. Brew BJ et al., 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol* 6:667-679.
2. White MK et al., 2009. Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *J Virol* 83:10846-10856.
3. Ryschkewitsch C et al., 2004. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* 121:217-221.
4. Pal A et al., 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods* 135:32-42.
5. Elfaitouri A et al., 2006. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. *J Virol Methods* 135:207-213.
6. Seh bani L et al., 2006. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV and JCV by LightCycler real-time PCR. *J Clin Virol* 36:159-162.
7. Dumonceaux TJ et al., 2008. Internally controlled triplex quantitative PCR assay for human polyomaviruses JC and BK. *J Clin Microbiol* 46:2829-2836.
8. Bialasiewicz S et al., 2009. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol* 45:249-254.
9. Mancuso R et al., 2010. Detection of viral DNA sequences in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Med Virol* 82:1051-1057.
10. Espy MJ et al., 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19:165-256.
11. Nakamichi K et al., 2011. 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* 64:211-216.
12. Okada Y et al., 2002. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol* 104:130-136.

13. Aoki N et al., 1996. Antibody against synthetic multiple antigen peptides (MAP) of JC virus capsid protein (VP1) without cross reaction to BK virus: a diagnostic tool for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurosci Lett* 205:111-114.
14. 岸田修二. 2007. PMLの疫学と臨床. *Brain and Nerve* 59:125-137.
15. Hara K et al., 1998. Archetype JC virus efficiently replicates in COS-7 cells, simian cells constitutively expressing simian virus 40 T antigen. *J Viro* 72:5335-5342.
16. Nukuzuma S et al., 1995. Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titers of polyoma JC virus. *J Med Virol* 47:370-377.

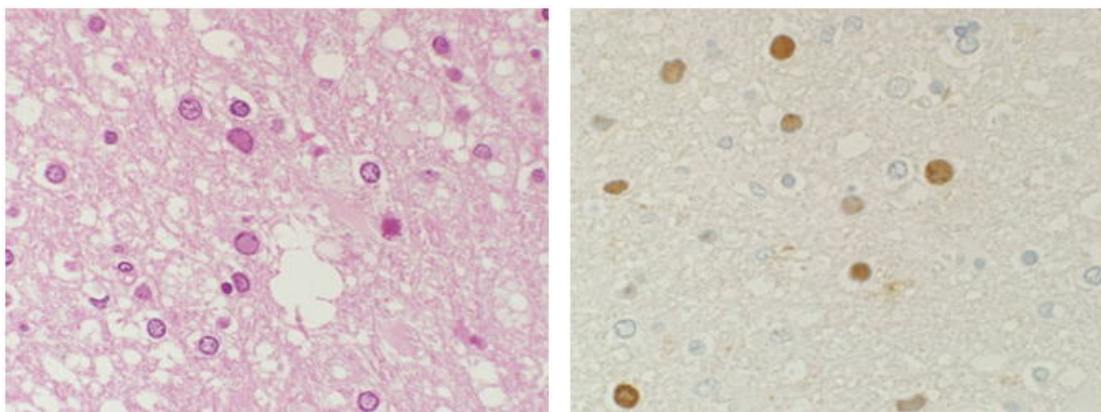
## VI. 検査問い合わせ先

|         |                       |  |
|---------|-----------------------|--|
| 遺伝子検査：  | 中道一生,<br>林昌宏,<br>西條政幸 | 国立感染症研究所ウイルス第1部<br>〒162-8640 東京都新宿区戸山1丁目23-1<br>電話 03-4582-2667      |
| 病理検査：   | 片野晴隆,<br>長谷川秀樹        | 国立感染症研究所感染病理部<br>〒162-8640 東京都新宿区戸山1丁目23-1<br>電話 03-5285-1111 (代表)   |
| ウイルス分離: | 奴久妻聡一                 | 神戸市環境保健研究所微生物部<br>〒650-0046 兵庫県神戸市中央区港島中町4-6<br>電話：078-302-6197 (代表) |

## VII. 執筆者一覧

|       |                      |
|-------|----------------------|
| 奴久妻聡一 | 神戸市環境保健研究所微生物部副部長    |
| 片野晴隆  | 国立感染症研究所感染病理部第1室長    |
| 長谷川秀樹 | 国立感染症研究所感染病理部長       |
| 中道一生  | 国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官 |
| 林昌宏   | 国立感染症研究所ウイルス第1部第3室長  |
| 西條政幸  | 国立感染症研究所ウイルス第1部長     |

添付図 病理組織学的検査



左： PMLのHE染色．スリガラス状の核内封入体が見られる．

右： JCVの免疫染色．核内封入体を持つ細胞に一致して陽性シグナルが見られる．一部は細胞質にも陽性となる．（国立感染症研究所感染病理部ホームページより転載）