

R
00818
4452
89

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Biochemistry,
Chung Shan Medical and Dental College

I. 臺灣地區各年齡層受人類多瘤性病毒感染之研究
Investigation of human polyomavirus infection in individuals of
various ages in Taiwan

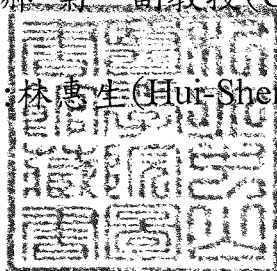
II. 人類多瘤性病毒與中樞神經系統腫瘤相關性之研究
Investigation of correlation between human polyomavirus and
central nervous system tumors

參考書恕不外借

指導教授: 張德卿 教授 (Deching Chang)

郝菊 副教授 (Chu Hao)

研究生 林惠生 (Hur-Sheng Lin)



中華民國八十九年六月

中山醫學院圖書館



C061565

博碩士論文電子檔案上網授權書

(提供授權人裝釘於紙本論文書名頁之次頁用)

本授權書所授權之論文為授權人在中山醫學院生物化學研究所 88 學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文題目：I.臺灣地區各年齡層受人類多瘤性病毒感染之研究 II.人類多瘤性病毒與中樞神經系統腫瘤相關性之研究

指導教授：張德卿 教授、郝菊 副教授

茲同意將授權人擁有著作權之上列論文全文（含摘要），非專屬、無償授權國家圖書館及本人畢業學校圖書館，不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或其他各種數位化方式將上列論文重製，並得將數位化之上列論文及論文電子檔以上載網路方式，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

讀者基於非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法相關規定辦理。

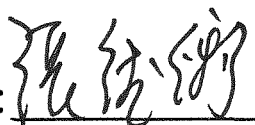
授權人：林惠生

簽名：林惠生 中華民國 89 年 7 月 7 日

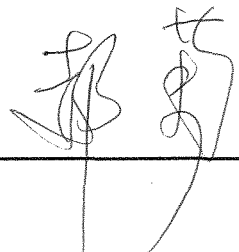
學生 林惠生 論文題目為 I. 臺灣地區各年齡層受人類多瘤性病毒感染之研究. II. 人類多瘤性病毒與中樞神經系統腫瘤相關性之研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：

張德卿 教授

簽名：

郝 菊 副教授

簽名：

中華民國八十九年六月

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中山醫學院醫學系

蔡榮泰 副教授

蔡榮泰

中興大學農科所

孟孟孝 副教授

孟孟孝

中山醫學院生化所

謝碧慧 助教授

謝碧慧

中山醫學院生化所
(論文指導教授)

郝 菊 副教授

郝菊

中山醫學院醫學系微生物科
(論文指導教授)

張德卿 教授

張德卿

中華民國八十九年六月

誌謝

感謝上帝，五年前因聖經上的經節「看風的，必不撒種，望雲的，必不收割」鼓勵內子就讀生物化學研究所，然而主的賞賜和帶領是我眼睛未曾看見，心裡未曾想到的，三年前我反倒受其鼓勵也考取生化所，在這三年中蒙神保守與看顧，使我能兼顧學業與工作。

除了感謝主耶穌基督之外，也非常感謝我的指導老師張德卿教授對我的教導，無論是在研究學習過程中或是日常生活的人生哲學上，無不對我細心指導與敦敦教誨。還有郝菊教授對我在課業上和信仰上的點點滴滴，亦是無微不至的教導與照顧。從事研究其間，更受到威志學長及梅林學姐在實驗上的教導與幫助，謝謝再靜、芳君、玉珍及俊蓓、碧蓮在實驗上及課業上的切磋與幫助，也謝謝玲華、宗萱、啟信、嘉聲及所有實驗室的學弟妹們，沒有你們的打理幫助，對於一個在職進修生是很難走完全程的。

也謝謝生化所馬明琪、陳凌雲老師這三年來在課業上和實驗上的指導與幫助，同時也感謝腦神經科陳秋媚醫師、病理科蔡崇弘醫師、張菡醫師在腦神經疾病、生物統計及顯微判讀上的鼎力相助。更要感謝中興大學農科所孟孟孝教授、生化所謝碧慧教授、醫學系蔡榮泰教授於百忙之中撥冗審查，並提供寶貴意見。

同時更要謝謝我可愛的細胞室同事們麗妙、憶如、乃鼎、夢珊及連泉學弟在我就學期間，對我工作上的配合協助，使我能順利完成學業。也謝謝教會弟兄姐妹的代禱。最後更是感謝家人對我的包容、體諒及鼓勵，尤其是愛妻對家裏的照顧打點，甚至實驗上的幫助，還有小女恩雅的乖巧配合，讓我無後顧之憂，得以完成學業。由衷的感謝伴我這一路走來所有的人，謝謝你們。

第一部份

臺灣地區各年齡層受人類多瘤性病毒感染之研究

Investigation of human polyomavirus infection in
individuals of various ages in Taiwan

目錄

頁次

中文摘要-----	1
英文摘要-----	2
前言	
人類多瘤性病毒的分離與宿主之分佈-----	3
人類多瘤性病毒的基因組-----	4
致病機轉-----	7
流行病學及人種學之研究-----	11
研究的目的及意義-----	13
材料與方法-----	15
結果-----	19
討論-----	22
圖表-----	25
參考文獻-----	46

中文摘要

人類多瘤性病毒包括 JC 病毒及 BK 病毒兩種。本論文是以 Polymerase chain reaction (PCR) 的方法放大各年齡層尿液檢體中 JC 病毒及 BK 病毒的核甘酸，藉核甘酸序列之不同以限制酶切割方式進行基因圖譜分析，以期瞭解在臺灣不同年齡層受人類多瘤性病毒感染的情形。我們收集了 874 位 3 歲到 84 歲個體之尿液檢體，PCR 結果顯示人類多瘤性病毒尿液排放率在 3 至 7 歲幼稚園學童約有 1% (1/104)，而 8 至 13 歲國小學童則為 3.2% (7/216)，14 至 19 歲國高中生則為 6.5% (17/261)，20 至 30 歲大學生則為 13.3% (10/75)，31 至 50 歲成人則為 30.0% (6/20)，51 至 60 歲成人則為 41.7% (5/12)，61 至 70 歲老人則為 45.1% (37/82)，而大於 70 歲之老人則病毒尿液排放率為 58.7% (61/104)。這個結果顯示隨著年齡的增長，人類多瘤性病毒尿液排放率也有漸行增高之趨勢，這或許是因為年齡的增高使得人體的某些免疫機制開始退化的關係，除此之外也發現 JC 病毒 CY 亞型 (44.8%) 及 TW-1 亞型 (55.2%) 為台灣地區主要分佈之兩種亞型。另外我們也針對臺灣地區的原住民族群布農族，受人類多瘤性病毒感染情形進行調查，同時利用血球凝集抑制方法偵測血清中抗 JC 病毒抗體之陽性率的調查結果發現布農族尿液中 JC 病毒排放率為 50.8% (68/134) 而抗 JC 病毒抗體陽性率為 92% (124/136)，該族群中 JCV CY 亞型佔 91.2% (62/68)，比起 8.8% (6/68) 的 JCV TW-1 來得多。這些結果顯示 JCV CY 為臺灣原住民族群布農族主要之亞型。

Abstract

To investigate the prevalence of human polyomavirus in normal population with various ages in Taiwan, 874 urine samples were collected for analysis. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA endonuclease digesting were performed to detect the viral DNA and identify genotype. The results showed that 1% (1/104) of age range 3-7, 3.2% (7/216) of age range 8-13, 6.5% (17/261), 13.3% (10/75) of age range 20-30, 30.0% (6/20) of age range 31-50, 41.7% (5/12) of age range 51-60, 45.1% (37/82) of age range 60-70 and 58.7% (61/104) of age greater than 70 were JCV positive. The results indicate that the incidence of JC viruria is increased with age, which may be correlated with immunity. In addition, CY (44.8%) and TW-1 (55.2%) are the predominant genotypes of JCV prevalent in Taiwan. Prevalence of human polyomavirus in Bunun aboriginal tribe was also investigated. Urine sample were collected for virus genotype analysis. Blood sample was used for anti-JC antibody determination by hemagglutination inhibition assay. The results showed that JC viruria were 50.8% (68/134), and anti-JC antibody positivity were 91.2% (124/136). The predominance of CY genotype [91.2% (62/68)] were more than TW-1 genotype [8.8% (6/68)] in Bunun tribe.

前言

人類多瘤性病毒(Human polyomavirus)簡介

人類多瘤性病毒是屬於乳多泡病毒科(Papovaviridae)的一屬，大小約有 45nm，不含套膜(envelop)，外殼結構是二十面體(icosahedron)對稱結構，病毒外殼(capsid)由 polypeptide 構成的七十二個次殼體(capsomere)所組成，在結構蛋白內包裹著一環形(circular)雙股 DNA 基因組(genome)，約有 5000 對核苷酸，分子量約為 3×10^6 道爾吞(dalton)。多瘤性病毒依不同宿主可分為 JCV、BKV、SV40、murine polyoma virus 及 BFDV 等(139)。其中 JCV 和 BKV 的宿主動物是人類，SV40 的天然宿主動物是恆河猴，murine polyoma virus 是鼠類，而 BFDV 則是鳥類。

一、人類多瘤性病毒的分離及宿主分佈

最初 JC 病毒是在 1965 年時，由 Silverman 等人用電子顯微鏡在進行性多病灶腦白質病(progressive multifocal leukoencephalopathy:PML)病人的腦部組織觀察到的(128)。到了 1971 年 Padgett 等人運用 JCV 可培養在人類胎兒腦細胞的技術從進行性多病灶腦白質病病人的腦部組織中分離出 JC 病毒(115)。同年 BK 病毒也從一位 39 歲的腎臟移植病人尿液中分離出來(51)。1977 年 Padgett 等人廣泛篩選不同動物的檢體均未測得 JC 病毒的抗體(111)，顯示 JC 病毒完全是屬於人類感染的病毒。

1980 年 Hogon 等人在腎臟移植病人的尿液中分離出 JC 及 BK 兩種病毒(66)。此外 Coleman 等人也在懷孕婦女尿液中分離出疑似 JC 的病毒(35)。由此推測 JCV 在原發性感染後可能潛伏在泌尿道，當病人免疫力受到抑制時就活化起來。而此種因為免疫力與 JCV 活化之相關性爾後在各種免疫力受壓抑之狀況下如腎臟移植(4、52、66)、骨髓移植及孕婦(34、35、38、54)，癌症病人(67)及 AIDS 等病人更得証實。1986 年時 Grinnel(59)發現三位進行性多病灶腦白質病病人其身上的 JC 病毒除分佈在腦部外也廣泛的分佈在該病人的脾臟、淋巴結、肺臟、肝臟、腎臟進而推測 JCV 可透過血流散佈在不同器官，尤其是網狀淋巴系統。到了 1992 年 Tornatore 等人(140)在 89%進行性多病灶腦白質病病人身上發現 JCV 存在於周邊淋巴球內，此說明 JCV 是廣

泛性的分佈，且 Tornatore 等人也在 38%AIDS 而無 PML 之病人的周邊淋巴球內發現 JCV。之後經由淋巴球更進一步的証實為 JCV 之特殊標的細胞(107)，且推測扮演著病毒持續性潛伏或其運輸至中樞神經系統之重要角色(45、46、109)。

JC 病毒在體外(in vitro)培養時有非常嚴格的宿主限制，人類的胚胎膠細胞(primary human fetal glial cell)是少數可用於體外組織培養的細胞株之一(111)。這種人類的胚胎膠細胞是寡突膠細胞(oligodendrocyte)的前身，它與神經膠細胞的髓鞘蛋白有關，若將 JCV 由原來的人類胚胎膠細胞培養中移到非洲綠猴細胞或是老鼠的胚胎細胞或人類胚胎、腎臟、小腸、肺及肝等，細胞都無法培養成功(115)。同樣的將 JCV 培養於人類的轉型上皮細胞(11、13)，腦細胞 JCV 也無法持續繁殖，且當 JC 病毒於組織培養時，常會發生基因重組，尤其是病毒調控區(regulatory region)的基因(12、60、99、100)。1971 年 Padgett 等人運用培養在人類胎兒腦細胞的技術分離 JCV，1976 年再分離出新 JCV，由於是在美國 Madison 威斯康辛大學被分離出來，所以命名為 Mad-1(prototype), Mad-2 等(112)。

已知 JCV 在 primary cell culture 很困難，但細胞培養時溫度提高至 39°C 可增加病毒的生長，當培養於人類的胚胎膠細胞時，很難觀察到細胞病變(CPE)，若是培養於神經膠母細胞(spongioblast)約 2-3 個星期則可觀察到神經膠母細胞變大及變形的細胞病變，在接著的數週，細胞便會溶解掉，通常 JCV 造成的細胞溶解比 BKV、SV40 造成的細胞溶解所需時間較久。JCV 感染星形膠細胞(astocyte)會使星形膠細胞核異常變大，核內所產生的病毒顆粒比在神經膠母細胞少，但差別不大(111、149)。因為人類的胚胎膠細胞不易培養且能獲得的來源有限，常造成研究的不便，所以企圖獲得 transformed cell line，其中 SVG 及 cPOS 細胞株是經過 SV40 defective mutant transformed 的人類胚胎膠細胞(92、95)。另外 POJ 細胞株是經過 JCV transformed 的細胞株，可供無缺陷的 JCV 感染也可供 JCV T antigen mutant 或只包含 JCV 複製起始點(ORI site)之載體的 DNA 複製(91、92)。此外這三種 transformed 的細胞株比人類胚胎膠細胞有更長的生命期，其中 POJ 細胞株可繁衍 60-80 代，這三種 transformed 細胞株可使 JCV 的研究更方便。

二、人類多瘤性病毒的基因組(Genome)(圖一)

人類多瘤性病毒基因組是一約有 5000 個左右核甘酸的雙股環形 DNA，分子量約為 3×10^6 dalton，在 CsCl (cesium chloride) 的密度分佈於 1.6g/ml。基因組的功能包含了(A)從複製起始點(ori site) (於 0.67 map unit) 以雙方向不連續方式複製 DNA，(B)分離子股 DNA(機制不明)。(C)兩個步驟方式轉錄基因(包含 early gene 與 late gene)，在早期 JCV、BKV、SV40 的基因組可藉由限制內切酶(restriction endonuclease) 切出不同大小及數目的 DNA 片段以資區分(86、157)。這些大小不同片段的 DNA 可組成 JCV、BKV、SV40 的基因圖(genetic map)(49、98、154、157)，而 map(0.0)的位置是限制酶EcoRI 的切點。

後來因著基因工程技術的進步，已知 JCV(Mad-1 strain)有 5130 個核甘酸比 BKV(MM strain) 的 4963 個核甘酸多(155、156)，比另一個 BKV(Dun strain)(125) 含有 5153 個核甘酸少，也比 SV40 (776 strain) 的 5243 個核甘酸少。JCV、BKV、SV40 三種病毒的基因組可分別產生兩種 early gene 產物，即 large T 和 small T 調節蛋白(regulatory protein)。因為這些蛋白最早是由於被 SV40 感染而產生癌症的倉鼠所產生的抗體偵測到的，所以這些蛋白又稱為腫瘤抗原。除了 early gene 外另有四種 late gene 產物，分別是 VP1、VP2、VP3 結構蛋白及 agnoprotein。

(1)調節序列(regulatory sequence)

SV40 的調節區包含了 414 個核甘酸(base pair)，由第 5164 至第 334 個核甘酸，包含了 promoter、enhancer 及複製起始位，其中複製起始位的主要序列(core sequence)包含了 64 個核甘酸，這 64 個核甘酸又可分為三個功能性的區域，其中一個是 27 個核甘酸的 palindrom sequence，含有 4 個重複的 5'-GAGGC-3'核甘酸序列，此區域的序列可被 large T 調節蛋白結合(39、44)。第二個區域是 inverted repeat (位於 palindrom sequence 的前端)，此區域也可被 large T 調節蛋白結合。第三則是 AT-rich 的序列，位於 palindrom sequence 的後端(15、40、41、53)同樣可被 large T 調節蛋白結合，這三個區域若是被 large T 調節蛋白結合後可促使 DNA 複製。除了主要序列外，還有兩個輔助序列(auxillary sequence)，分別是 GC-rich sequence 可被 SP1 轉錄因子(transcription factor) 結合，另有兩個 72 base pair 的 tandem repeat 的序列，是 enhancer region 這些 palindrom sequence、inverted repeat 序列共同存在於 JCV、BKV、SV40 的複製起始位，且相似性很高

(127)，而且也都可被 large T 調節蛋白結合。這三種區域被 large T 調節蛋白結合後也可促使 DNA 的複製。若此區域發生突變，則無法複製 DNA。

JCV(Mad-1)的調節區位於第 5014 至第 276 個核苷酸，其 promoter 位於複製起始位下游，與 BKV、SV40 不同的是 JCV 具有兩個 TATA Box 的 promoter 且位於 tandem repeat 內，此外 JCV 也有一 GC-rich Box (5'-PyPyCCXCCC-3')序列可被 SP1 轉錄因子結合(61) 結合後可調節 early gene 及 late gene 的轉錄，及 DNA 的複製(15、22、87、88)。JCV 的複製起始位只有兩個 large T 調節蛋白結合位，序列是 5'-GAGGC-3' 位於 promoter/enhancer 上游，稱為 site 1，site 2 與 SV40 具有三個 large T 蛋白結合位不同，且 JCV T 蛋白功能在於促進 JCV DNA 複製或 SV40 DNA 複製不如 SV40 T 蛋白功能(87)，造成此原因仍不明。

JCV large T 蛋白與調節區之 site II 結合時需要 ATP 幫助(19、101)，也與磷酸化有關(57、77、104、124)。JCV enhancer region 是兩個 98 個核苷酸的區域，最早是由 Mad-1 strain 分析出的，在不同株的 JCV 其 promoter 及 enhancer 區域也會有差異，最早由 Miyamura 粗分成兩種 type(103)。Type I JCV 共同特質是兩個 TATA Box 及兩個 98 個核苷酸區域，且無 SP1 的結合位置，例如 Mad-1 的就是屬於這類。Type II JCV 共有的特質是單一的 TATA Box 及在第 36 個核苷酸處插入一段 23 個 GC-rich 核苷酸，此區域可能是 SP1 結合的區域。因此 Feigenbanu 等人(47)認為 JCV 感染宿主有嚴格限制，可能包含兩個原因，一個是 early gene 產物的表現，另一個原因是 DNA 的複製率，而這正是宿主的種特異性及組織特異性因素與病毒調節區不同的密切關係。

(2)結構蛋白基因

人類多瘤性病毒 late region 轉譯三種結構蛋白 VP1、VP2、VP3，這些基因各自有完整的解讀序列(open reading frame)，轉錄方向與 early gene 轉錄方向相反。1975 年發現 SV40 與 BKV 結構蛋白分子量相同(10、108、153)，其中最大的是結構蛋白 VP1，而 VP3 是 VP2 的一部份，VP3 可由 VP2 C-端轉譯出來，VP2 及 VP3 的 C-端核酸序列一部份會與 VP1 的 N-端核苷酸序列一部份重疊。

(3)Agnoprotein 基因

JCV、BKV 與 SV40 三種病毒的 Agnoprotein N-端的 2/3 有很高的

相似性，而近 C-端的部份則有很大的差異。Agno protein 可能與結構蛋白組成有關(14、24、119)。

(4) Early leader peptide 基因

Early leader peptide 最早是在 SV40 發現的(73)，SV40 early mRNA 轉譯起始位置會往前移 69 個核苷酸形成一新的起始點，而多出一段 23 個氨基酸的 peptide 就稱 SELP(SV40 early leader peptide)。同樣的情形也可能出現在 JCV 及 BKV。因為多了一個 AUG 的起始點，可能會干擾下一個 AUG 起始點(79、81)，所以 SELP 的產生對 large T 蛋白及 small t 蛋白的複製可能是有影響的。

三、致病機轉

由血清學的調查知到 JCV 和 BKV 的感染很頻繁，且多發生於兒童期，大部份的初次感染並無臨床徵狀或臨床徵狀不明顯。Possati 等人曾偵測 150 名因為不同的急性或慢性疾病而到小兒科診所就醫的 0 歲到 10 歲的小朋友尿液、糞便、喉嚨或鼻腔分泌物，並無發現 BKV 的存在(116)。然而，也曾有報告 4 名免疫妥協(Immunocompromised)的兒童有 BKV 的初次感染，可能是呼吸感染造成的(96、143)。此外，在 12 名再度發生呼吸道感染的兒童身上切除下來的扁桃腺，以分生雜交的方法在其中有五位偵測到 BKV DNA 的存在，這強烈地暗示著扁桃腺是 BKV 感染及繁殖的部位(56)。近期更以偵測扁桃腺內之基質細胞及淋巴球來推測扁桃腺為 JCV 初次感染之部位(105、106)，而當 JCV 或 BKV 感染到泌尿道或是 JCV 感染了包括腦的多個器官時，可能會有病毒尿症的產生(144、146)。

已經很清楚的瞭解 JCV 是一種人類的伺機性致病源，會造成少見的髓鞘脫失疾病 PML(progressive multifocal leukoencephalopathy；進行性多病灶腦白質病)(144、146)。PML 的特徵是髓質病灶逐漸的變多與擴大，其病人腦部切片中可看到很多脫髓鞘病灶，從 1mm 到幾公分不等。早期損害是在小腦白質(white matter)及皮質(cortex)，晚期損害會擴大到大部份的皮質並侵入灰質(gray matter)，而灰質與白質內形成髓質寡突膠細胞會受破壞，寡突膠細胞能負責產生中樞神經系統的髓質，負責保護與支持神經細胞之傳導作用，所以當寡突膠細胞遭受破壞種，即產生一種中樞神經系統退化的疾病(145、152)，這樣的一個疾病過程稱 leukoencephalopathy。進行性多病灶腦白質病

的病人主要有三種症狀：運動衰弱(motor weakness)、視障(visual disturbance)及心智改變(altered mental status)。視覺的缺失是最早的症狀，只有 25-33%的病人會出現運動衰弱及心智改變的症狀，到後來病人會人格改變甚至癡呆。在 28 個同時患有 AIDS 及進行性多病灶腦白質病的病人，都出現上述症狀，其他的症狀還包括了失語症(aphasia)，感覺異常(abnormal sensory)，頭痛等。

JCV 感染寡突膠細胞會使其溶解(lysis)，而造成脫髓鞘現象，寡突膠細胞的核會變大到原來的 2-3 倍，用 hematoxylin 染色呈藍紫色，且細胞內染色質(chromatin)消失，核內充滿病毒顆粒(160、161)。病毒顆粒是嗜酸性(eosinophilic)的，在電子顯微鏡下觀察有兩種形式，一種是絲狀(filamentous)的，一種是結晶狀(crystalline)的。在無脫髓質的寡突膠細胞也含有病毒的 DNA 及蛋白質，可用免疫細胞化學法(immunocytochemistry)及 in situ hybridization 偵測(94)。同時於腦血管細胞裏也可見到被 JCV 感染的細胞，也說明了 JCV 可能透過血流散佈到中樞神經系統(2、3)。另外的病灶是出現於星狀膠細胞，星狀膠細胞會呈現肥大(hypertrophic)及變大含多染色質的核(enlarged hyperchromatic nuclei)，有時也會有出現雙核，但很少見。在星狀膠細胞可利用 in situ hybridization 方法偵測病毒的 DNA，表示 JCV 可在星狀膠細胞中進行 DNA 複製(2)。然而病毒 late 蛋白較少在星狀膠細胞表現(2)，而導致 JCV 流產感染(abortive infection)。除了寡突膠細胞及星狀膠細胞外，巨噬細胞也會出現在病灶區，這有可能是宿主產生的免疫反應。同時患有 AIDS 及進行性多病灶腦白質病的病人，這種巨噬細胞的浸潤特別明顯。在體外實驗發現 HIV 的基因產物 tat 可活化 JCV promoter，在理論上可解釋 JCV 及 HIV 導致的協同感染(synergistic infection) (120)。

在大多數進行性多病灶腦白質病的病人其免疫功能受到抑制(18、146)，由於免疫功能的缺失，可能導致 JCV 的伺機感染(opportunistic infection)。在過去進行性多病灶腦白質病是一種少見的疾病，大部份是中老年人患了淋巴增生(proliferative)疾病後產生的合併症(18)。最近的調查發現，AIDS 病人也有 2-7%會同時患有進行性多病灶腦白質病。

大部份進行性多病灶腦白質病的病人會有細胞免疫缺陷，符合進行性多病灶腦白質病是 JCV 所造成的中樞神經系統伺機性感染的說

法。一般如淋巴增生、抗癌藥物治療、器官移植後免疫抑制、AIDS 等病人都可能患進行性多病灶腦白質病。由 Willoughby 等人(152)發現進行性多病灶腦白質病的病人會產生細胞免疫的缺陷及不完全的抗體免疫反應(21)。大部份病人在病程時特異性 IgG 效價沒有提高，腦脊髓液也無特異性(17)。進行性多病灶腦白質病在臨床上頗受注意，是因為患進行性多病灶腦白質病的病人在出現症狀後的十八個月內就會死亡，有 80%在九個月內會死亡(152)，若是患 AIDS 又同時患進行性多病灶腦白質病通常四個月就會死亡(128)，不管是否同時患 AIDS，進行性多病灶腦白質病有時也會出現緩解現象而延緩死亡，通常是病人免疫功能增加時會延緩死亡，如移植而患進行性多病灶腦白質病的病人，若停止免疫抑制劑用藥後都會改善進行性多病灶腦白質病的症狀(136)。進行性多病灶腦白質病的病人在診斷上，除了運動衰弱、視障及心智改變等症狀外，可配合 X 光斷層攝影(tomography)，可見到後大腦半球白質脫髓鞘多病灶徵狀(20、23、36)。此外也可以利用核磁共振(M.R.I.)的技術，核磁共振的技術比 X 光斷層攝影更靈敏(17、135)。在實驗室診斷上，抽取腦脊髓液檢查常無異常發現，只有一些病人可測到蛋白質及淋巴球稍為增加。在以前的實驗無法在 PML 腦脊髓液中測得 JC 病毒的抗體(114)或抗原。但後來 Henson 等人(62)在 1/6 PML 病人腦脊髓液中用 PCR 測得 JCV 基因，Tornatore 等人在 10 個病人測到 3 個，Gilson(55)在 13 個病人中測到 10 個。而最可信的診斷應是活體切片(biopsy)，當病理切片不明確時，可輔助免疫組織化學染色法(IHC)或 in situ hybridization(118)來鑑定。至於病毒培養方法鑑定，須四星期才可以測到病毒血液凝集特性，或由培養液於電子顯微鏡下觀察病毒，或觀察病毒造成的細胞病變，所以此法耗時、費力、昂貴且無效率。此外也可以顯微鏡觀察用 hematoxylin 染色的尿液沉渣中，有無包含體(inclusion body)的細胞當初步鑑定，或用電子顯微鏡觀察病毒顆粒於 phosphotungstic acid 染色尿液沉渣。

JCV 的原發性感染是在孩童期，但症狀不明，感染後會在尿液中分離到病毒，因病毒到達腎臟後可以潛伏於此，而尿液中分泌出來(7、8、121)。當 T 細胞功能缺失時，病毒會活化，可由偵測到血清中抗病毒抗體效價提高及尿液中病毒增加來證實。同時病毒活化也見於腎臟移植(4、52、66)、骨髓移植及孕婦(34、35、38、54)、癌症病

人(67)及 AIDS(102)等病人。於 1992 年一名不明原因造成腦膜炎的 11 歲病童腦脊髓液中，偵測到高效價抗病毒抗體 IgM，進而推測是原發性感染(16)，大部份小孩患有進行性多病灶腦白質病都可能是 JCV 造成的原發性感染。現在 PML 廣泛被接受的致病機轉是 JCV 破壞製造髓質的寡突膠細胞，而使腦部功能缺損，且 JCV 通常是伺機性感染，但 JCV 是如何在人與人之間傳播及如何潛入人體，而人體如何對付潛伏性感染都有待進一步了解。

PML 不管是 JCV 原發性感染或潛伏活化後感染，都可預測病毒是透過血流到達腦部，從腦部多病灶可支持此說法，另外從 PML 病人網狀淋巴系統中發現有病毒存在，更證實此可能性。在 1988 年 Houff 等人(68)用 DNA-DNA hybridization 及免疫組織化學法偵測兩位 PML 病人骨髓、脾臟及腦的單核細胞，結果測到有 JCV 存在，這些作者推測 JCV 可能感染骨髓的單核細胞後使潛伏，接著感染 B 細胞，隨著循環進入腦部而感染寡突膠細胞。在淋巴球要測到 JCV 的 DNA 需要有 200-1000 個複製(copy)的基因組(68)。PML 病人產生免疫反應中，較少見單核細胞發炎反應(131)，而淋巴球或漿細胞發炎反應則常見(90、117)。

JCV 會導致嚙齒類及猿猴動物產生腫瘤，但並無 PML 的症狀。在 1975 年時曾發現恆河猴有類似 PML 的疾病(58)，但後來證實是 SV40 引起的(65)。總括來說，JCV 是一種高度種族特異性的感染性病毒，不太容易感染其它動物。近來由於 transgenic 技術的進步，使得小白鼠被成功植入 JCV large T 抗原基因，T 抗原的基因會於腦部及肺部細胞表達，被植入基因的小白鼠會產生脫髓鞘症狀，而 T 基因在心臟和腎臟的表達情形不高，在肝、腸和脾臟則不表達(129)。這些小白鼠的中樞神經系統產生髓鞘功能受損，週邊則不受影響，這些 transgenic mice 所產生的後代，多數不含 JCV 調節基因或 T 蛋白基因，若含有這些基因的小白鼠約生出來後兩個星期後就會有顫抖(tremor)的現象，接著就出現張力性癲間(tonic seizure)，四個星期就會死亡(129)。

JCV 和 BKV 可從尿液檢體中分離出，而培養在 permissive cells，然而病毒的培養是相當緩慢且昂貴的。想要維持細胞培養達 4 星期以上有血球凝集素(hemagglutinin)的產生，在培養的液體中以電子顯微鏡看到病毒顆粒，在被感染的細胞核中看到 virus-specific

nuclear antigens 或 CPE 的出現。

在 1990 年，Yogo 等人首次將存在於腎臟的病毒型稱為原始種(archetype)(159)，當人體處於一種免疫妥協的情況時，病毒會被再活化而排到尿液中(48、97、158)。在長期的免疫抑制下則會出現異於 archetype 的新 strain JCV。新 strain 的 JCV 與 archetype 的不同處出現在病毒的 promoter-enhancer regulatory region，有學者猜測這些新種的病毒可能會在腦細胞中活化進而導致 PML 的產生(151、158)。

四、流行病學及人種學之研究

自從 Padgett 等人於 1971 年從 PML 病人的腦組織分離出 JC 病毒後(115)，其更廣泛地篩檢不同動物的檢體(111)、及一般成人的血清之抗 JCV 抗體(113)，而得知 JCV 完全是屬於人類感染的病毒，且抗體之存在率竟高達 80%。之後陸續更從孕婦(34、35)及免疫抑制病人如腎臟移植的病人尿中偵測到 JC 及 BK 病毒(66)。由此推測人類多瘤性病毒感染於孩童時期時並未活化，待病人處於免疫抑制狀態下，病毒便活化在滲透過血流散佈到其它器官組織中(59)，另外 Kitamura 等人在非免疫抑制的病人當中，依年齡分三個族群:0-29、30-59、60-90，而結果發現在非免疫抑制的老年病人中 JCV 偵測到 52%最高，而 BKV 則偵測數量太少無統計意義(74)，所以病毒活化除了與抑制有關外，或許也牽涉到其他原因。

自從 JCV DNA 能夠由尿液中分離出來，便應用了此技術來探討人類多瘤性病毒之發展情形，包括其種類、地區性、演化性等之研究，其以 regulatory region 分型者主要分兩類；一種是分佈於人類，免疫完全或抑制之尿中、腎臟組織常見的單一 copy 的 promoter-enhancer 之 Archetype JCV (48、75、89、158、159)，另一類為較常見於病變性的個體，經過 Archetype TCR 內序列 deletion 及 duplication 重組，亦可見於淋巴球，腦及腎臟組織之 rearrange type(48、89、100、158)。Yogo 等人進而在 1991 年以 restriction fragment length polymorphisms(RFLPs)方式由日本、台灣、荷蘭、德國等病人尿液分出 type A 及 B 兩型(158)。基於此項結果其與含 VP1 殼體蛋白基因(69)，由 Ault 和 Stoner 等人(9)放大的核苷酸序列 2131 到 2740 IG region 610 bp(VT-intergenic region)，依 phylogenetic tree 方式所得結果亦是

相吻合的。至 1996 年分析 JCV DNA 更擴及聯合大公國、西班牙、義大利、瑞士、南韓、大陸、馬來西亞、印尼、蒙古、印度、斯里蘭卡、沙烏地阿拉伯、依索披亞、肯亞、尚比亞、南亞及迦各國、依照 type-specific RFLPs 分型，Type A 主要在歐洲，type B 主要在亞洲及非洲，而 type C 則在部份的非洲(61)。雖然 JCV 傾向於平行的傳染(35、38)，但其主要傳染模式還是經由同住之雙親長期的親近接觸傳染給其小孩(72、84)，基於此理由，Sugimoto 等人才(132)更在歐洲、非洲及亞洲等收集了 34 個國家的原住民之尿液檢體，以 PCR 放大 JCV 的 VT-intergenic region 之 610 bp 之 DNA，並做 DNA 序列分析，依此擴及世界性的分析 phylogentic tree，而構築出 9 個 subtypes，大都數屬於 5 個 subtypes(EU. Af2. Bl. SC. And CY) 而全歐洲、北非、西亞主要為 EU. Af2 包括幾乎全非洲，西南部份亞洲及印度東北方，部份亞洲交互重疊區有 Bl. SC. 及 cy 基於此不同地區性(64)及 JCV 不同型罕見同一族群(7)。而認為其給了一個訊息即依照 JCV 的基因分型能夠了解人類遷移情形(132)。

先前的報告已知高於 80% 的成年人體內帶有抗人類多瘤性病毒的抗體(74、93、97、134)，但是在不同地區、不同族群中到底有多少帶原者，則是所知有限。Kitamura 等人(75)發表了日本東京地區，20 歲以前其尿液 JCV 之排放有 9 到 17% 的比例，而 20 歲到 29 歲的年齡群則有 45.7% 的 JCV 排放率。而早在 1975 年 Brown 等人(21)篩檢一般成人血清中即發現有 70% 以上的受檢血清中有 BKV 抗體的存在。可見人類多瘤性病毒是廣泛地流行於世界各地，而 JCV 和 BKV 流行病學的分佈似乎有所不同。

這幾年我們實驗室研究人類多瘤性病毒 JCV 在台灣感染的流行率(26、27、28、29、30、31、142、150)，分別從免疫完全的健康人，短暫反應免疫衰竭的孕婦及長期免疫抑制的免疫疾病患者，收集尿液檢體，以聚合酶連鎖反應(PCR)及南方墨點法(Southern bolt)，偵測由尿液排放的病毒 DNA，並以 DNA 定序分析 DNA 調節區的基因型(genotype)，發現在孕婦及自體免疫疾病病人存在四種 JCV strain，包括 CY，台灣一號(TW-1)，台灣二號(TW-2)和台灣三號(TW-3)；及兩種 BKV strain，分別是台中一號(TC-1)和台中二號(TC-2)(26、27、28、29、30、31、150)。在這些不同的 JCV 及 BKV strain 中，發現它們的調節區分別產生了一些突變，而與原始種的 JC 及 BK 有些不同。

台灣一號，台灣二號發生了 pentanucleotide-A(GGGAA)及/或 B(AAAGC) 的缺失(deletion)；而台中一號有兩個核苷酸改變，台中二號有六個核苷酸改變的突變。我們實驗室的結果中發現有 3.9%(3/77)的健康人，26%(20/77)的孕婦及 37.5%(18/48)的自體免疫疾病患者可偵測到尿液排放的 JCV DNA。而所有健康人都沒有偵測到 BKV DNA。此外在所有尿液檢體中，24%(48/200)是 JCV 陽性，只有 3%(6/200)BKV 陽性(142)。而且 JCV 陽性的人只感染 TW-1(52%)及 CY(42%)兩種亞型，這些結果顯示：在台灣人類多瘤性病毒從尿液排放的情形，免疫抑制的人高於健康人；同時，JCV 的流行率高於 BKV，此外，TW-1 及 CY 兩種 strain 是 JCV 在台灣族群中主要流行的亞型。

五、本研究的目的及意義

人類多瘤性病毒 JCV 及 BKV 廣泛地存在於多數人的體內(147)，這兩種病毒在腎臟病患者會因免疫力之不同而由尿液中排放出來(74、75、97)，但病人本身並沒有症狀(32、147)。JCV 能造成進行性多病灶腦白質病，而 BKV 則與出血性膀胱炎有關(5、6)。此外這兩種病毒與人類腫瘤的形成亦有其相關性(37、43、78、83)。

Yogo 等人於 1990 年，推測存留在腎臟的 JCV 可能是原始種 Arche type(159)。當人體處於免疫抑制的情況時，病毒可能會被活化，而在調控區造成缺失或複製的重組排列進而產生新的 strain(圖 2)。最後在腦部形成 PML(33、42、50、99、151)，這樣的推測可能與 5%的 AIDS 病人死於 PML 有關(10、82、85、130)。BKV 在調控區(48、133、155)也會有重組排列的情況發生(圖 3)，但與疾病的相關性仍待釐清。

至今病毒活化與免疫受到抑制的關係報導很多(4、34、35、38、52、54、66、67)，但仍未盡全貌，其亦包括本實驗室過去之研究，於正常人、孕婦及自體免疫疾病的病人等族群的尿液檢體(26、27、28、142)，以 PCR 的方式進行篩檢(27)，並以 DNA 定序分析 DNA 調節區的基因型，發現有 13.3%(10/75)的健康人，26%(20/77)的孕婦及 37.5%(18/48)的自體免疫疾病患者可偵測到 JCV DNA，但 3.9%(3/77)的孕婦及 6.2%(3/48)自體免疫疾病患者可偵測到 BKV DNA，所有尿液檢體中，24%(40/200)是 JCV 陽性，只有 3%(6/200)BKV 陽性。而主要為兩種 JCV 亞型 TW-1(52%)及 CY(42%) (表 1)(142)。結果亦顯示人類多瘤性病毒尿液排放情形為免疫抑制的人高於健康人。除此之外，Kitamura 等人

在非免疫抑制的病人當中，依年齡分三個族群:0-29、30-59、60-90，結果發現在非免疫抑制的老年病人中 JCV 偵測到 52%最高，而 BKV 則偵測數量太少無統計意義(74)，另亦有成年人較易排放 JCV DNA 等相關發表(1、25、75)，所以病毒活化除了與免疫的抑制有關之外，是否牽涉年齡等其它原因仍不得而知。所以我們想由台灣地區健康之各年齡層人口進行人類多瘤性病毒之尿液篩檢並進行基因分型，以瞭解其病毒活化與年齡層之間的相關性，而進一步知道台灣地區之人類多瘤性病毒基因型的分佈情形。

本論文另外基於 JCV 之主要傳染模式是經由同住之雙親長期的親近接觸傳染給其小孩(72、84)，感染給小孩時症狀不明然後持續潛伏於腎臟組織(32、76、110、113、138)，直至成年人時較易由尿中排放出來(1、25、75)。我們應用 PCR 及血球凝集抑制反應，篩檢台灣原住民之尿液及血清，並進行基因分型，以期瞭解台灣原住民族群之原始分佈情形。

材料與方法

一、檢體來源

(1) 各年齡層檢體: 幼稚園至老年人之各年齡層包括自南投學校幼稚園、國小、國中、高中, 及中山醫學院學生、成人健康檢查及老人健康檢查之尿液檢體。我們收集了 104 名 3 至 7 歲幼稚園學童, 216 名 8 至 13 歲國小學生, 261 名 14 至 19 歲國、高中生, 75 名 20 至 30 歲大學生, 10 名 31 至 40 歲成人, 10 名 41 至 50 歲成人, 12 名 51 至 60 歲成人, 82 名 61 至 70 歲老人, 及 104 名大於 70 歲老人之尿液檢體, 所有的尿液檢體均採自正常健康狀態之情況下, 所以足以代表為免疫系統正常, 沒有受到抑制的各年齡層。

(2) 原住民檢體: 此部份的檢體來自於臺灣布農族潭南村及雙龍村各年齡層的尿液及血液標本。

二、檢體的處理

收集新鮮尿液即行冷藏運輸, 置於 -20°C 冷凍保存, 再個別拿出執行超高速離心, 取 10ml 尿液運用 Beckman SW41 Tirotor in Beckman L8-70M 超高速離心機在 $142000\times g$ (25000 rpm), 4°C 、90 分鐘的條件下離心。將離心之沉澱物懸浮於 $200\mu\text{l}$ 無菌水中, 取 $3\mu\text{l}$ 懸浮液加上 $7\mu\text{l}$ 無菌水及 $2\mu\text{l}$ 的 lysis buffer (蛋白溶解緩衝液) (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0 及 $500\mu\text{g/ml}$ proteinase K) 溶解病毒顆粒, 將此混合物以 50°C 、15 分鐘處理, 再置於沸水中煮沸 10 分鐘去除 proteinase K 的活性。之後以 10000rpm 離心 10 分鐘, 取上清液做為 PCR 之 Template。

三、PCR (polymerase chain reaction)

人類多瘤性病毒有 JC virus 及 BK virus, 這兩者基因中的調節區 (regulatory region) 在 5' 端及 3' 端各有一段相似的序列, 依此合成兩段引子 (primer), sense primer JBR1 (5'-CCT CCA CGC CCT TAC TAC TTC TGA G-3') 及 antisense primer JBR2 (5'-GTG ACA GCT GGC GAA GAA CCA TGG C-3') (圖 4) (97)。以這兩段引子進行 PCR 來偵測尿液檢體中病毒 DNA 的存在, 這兩段引子所複製出來的 DNA 片段為 334bp (26、28)。PCR 反應物中含有 $9\mu\text{L}$ 前處理過的尿液上清液, $1\mu\text{l}$ sense primer JBR1 ($20\text{ pmole}/\mu\text{l}$), $1\mu\text{l}$ antisense primer JBR2 ($20\text{ pmole}/\mu\text{L}$), 4

μL 2mM dNTP(dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 4 μl MgCl_2 (final concentration 2.5 mM), 5 μl 10 倍緩衝液(Taq polymerase buffer), 0.5 μl 聚合酶(Taq DNA polymerase 5units/ μl)(Promega, USA)及無菌之 dH_2O 26.5 μl , 共計 50 μl , 最後再加入 30 μl 的礦物油(mineral oil), 放入 thermocycler(Hybaid, UK)中進行基因增幅反應。條件如下:95°C、2 分鐘(denaturation), 40 循環的 95°C、45 秒(denaturation), 55°C、1 分鐘(annealing), 及 72°C、1 分鐘(elongation)最後再以 72°C、4 分鐘(extension)。

四、以電泳方法分析 PCR 產物

取 5 μl 的 PCR 產物與 1 μl 的 6 倍 loading dye 置於 1.5% agarose(分生級, IBI Biotechnologies, CN) gel。所配製之緩衝液為 TAE buffer(4mM Tris-HCl, 40mM Sodium acetate, 2mM EDTA, pH 8.5), 以電流強度 140 伏特, 時間 15 分鐘進行電泳。完成電泳後, 將 agarose gel 以 ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 染色 5 分鐘後以水流洗滌殘餘之 ethidium bromide, 在紫外光下觀察病毒的 DNA 片段有無被放大複製出來, 在以照像存檔(Polaroid 667 ISO 3000/36. 調件是光圈 5.6 速度 1 秒), 或者以電泳影像分析系統(Alpha Imager 2000)電腦掃瞄存檔。

五、DNA 片段之純化

將 JCV 或 BKV positive 之檢體的 PCR 產物 45 μl 加 9 μl 的 6 倍 loading dye 混合後, load 在 2% agarose gel, 以電泳方式(140 伏特、20 分鐘)分離開來, 之後 ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)染色 5 分鐘, 以水流洗滌殘餘之 ethidium bromide, 在紫外燈下觀察, 將含有病毒 DNA 片段(334bp)的部份切下來放入 eppendorf tube, 以 GeneClean III Kit (Bio 101)純化。將切下來的 agarose gel 秤其重量, 再加上三倍體積量的 NaI solution (6M Sodium Iodine solution), 以 55°C, 5 分鐘溶解 agarose gel, 確定完成溶解後, 加入 10 μl 的 EZ-glass milk (Crystalline silica matrix), 混合均勻, 待三分鐘後, 離心 10000 rpm 5 秒鐘, 將上清液吸掉, 以 500 μl 的 New Wash solution(14 ml 的 concentrated solution 含有 NaCl, Tris 及 EDTA 加上 280 ml dH_2O 及 310 ml 100% ethanol)離心方式洗三次, 最後一次棄除上清液後, 以

真空冷凍乾燥機抽吸乾 ethanol，約 5 分鐘，直至變成白色粉末狀，在加入 20 μ l Elution solution，離心 10000rpm 30 秒取上清液，此步驟再重覆一次，此上清液即為純化完成的病毒 DNA 片段，接著以 OD 260 波長比色定量 DNA，做為 restriction mapping 之用。

六、Restriction mapping 基因圖譜分析

臺灣地區於尿液中排放，其主要為 JCV 之 CY 及 TW-1 strain(表一)(142)，而其兩者之 RR region 不同在於 TW-1 於 218 至 222 之核甘酸處(以典型的 archetypal strain 數目計算)之 pentanucleotide stretch spanning 之切失(圖 5)(26、28)，因此無法讓限制酶 BstNI 認知其 DNA 序列 CCAGG，所以應用限制酶 BstNI 切割，則在 CY strain 於 169 及 259 處有兩個切點，切成 169bp、90bp、76bp 三個片段，而另外 TW-1 則於 169 處有一個切點，切成 168bp、161bp 兩個片段，而 BKV 則無任何切點。

在 eppendorf tube 內加入已純化定量之 DNA，再加入 0.5 μ l 限制酶 BstNI(New England Biolabs, USA)，1 μ l 之 10 倍緩衝液(NE Buffer 2 50mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, pH7.9 with 100 μ g/ml BSA)及無菌 dH₂O，使總體積成 10 μ l，於 60 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 小時，之後之檢體與 6 倍 loading dye 混合，load 在 5% acrylamide gel(40% acrylamide, 2% Bis, 5 倍 TBE, 10% APS, TEMED)跑電泳 140V、40 分鐘，再次 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)染色 5 分鐘，並以水流洗滌殘餘之 ethidium bromide，置紫外光下觀察 DNA 片段切割情形，因不同之基因型而產生不同之切割片段。再以照像存檔(Polaroid MP-4 Land Camera 底片為 Polaroid 667 ISO 3000/36，條件為光圈 5.6，速度 1 秒)，或者以電泳影像分析系統(Appha Imager 2000)電腦掃瞄存檔。

七、血球凝集抑制反應(HAI)偵測人體 JC 病毒抗體

檢體血清先經由前處理，其方法如下：取 28 μ l 的血清至 eppendorf 離心管中置於 56 $^{\circ}$ C 水浴槽中 30 分鐘，inactive 補體活性，後加入 14ml 0.1M NaIO₄ 置於室溫(RT)30 分鐘，去除非特異性的抑制(non-specific inhibitor)再加入 14 μ l PBS-5% glycerol。先在 96well 的 microtiter plate，第二到第十二 well 加 25 μ l PBS 之後，將經前處理的血清取 50 μ l

到第一個 well 後取出 25ml 到第二個 well, 以此類推連續稀釋到第十二個 well, 丟掉最後的 25 μ l, 在加 25 μ l 含 8HA 的病毒殼體(capsid)37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時, 最後加 50 μ l 0.5% O 型紅血球懸浮液到每一個 well 中, 混合均勻, 室溫靜置 2-3 小時。再觀察其血球凝集情形。

結果

人類多瘤性病毒在無免疫抑制之老年人(74)及人體免疫受到抑制的情況下，如癌症中化學療程之病人、慢性疾病、骨髓移植、孕婦、自體免疫疾病患者及後天免疫缺乏患者，會造成病毒再度活化，而隨著尿液排放出來(26、35、70、71、126)。我們想瞭解病毒除了與身底免疫狀況有關之外，在正常免疫狀況下各年齡分佈之活化情形。本篇論文運用 PCR 偵測病毒 DNA、及其 Regulatory regions 的 Restriction Mapping 以及血球凝集抑制反應(HAI)偵測 JC 病毒抗體等方法探究在正常免疫狀況下各年齡層 JC 病毒分佈之活化情形。

(1)PCR 偵測病毒 DNA

尿液檢體經過超高速離心後之沉澱物，以 lysis buffer 處理，釋出病毒 DNA。將含有病毒 DNA 的溶液直接作為 PCR 複製放大的模板。在 PCR 過程中所使用的 primers JBR1 及 JBR2 可以同時複製 JCV 及 BKV，因為 JCV 及 BKV genome 中的調控區(regulatory region)於 5'端及 3'端各有一段相似的序列(-45—21 及 265-289)(圖 4)，故以此為 primer(97)，進行 PCR，產生 334 base-pair 的 DNA 片段，同時偵測人類多瘤性病毒 JCV 及 BKV 的存在。PCR 完成後的產物，以 agarose 電泳分析，結果顯示(圖 6)3 至 7 歲幼稚園學童 104 名有 1 名男性學童在 334 base-pair 處出現陽性反應(0.96%)，而 8 至 13 歲國小學童 216 名中有 7 名陽性反應(3.24%)，4 名男童，3 名女童，14 至 19 歲國高中生 261 名中有 17 名陽性反應(6.51%)，11 名男性，6 名女性。20 至 30 歲大學生 75 名中有 10 名陽性反應(13.33%)，男生 5 名，女生 5 名。31 至 50 歲成人 20 名中有 6 名陽性反應(33.33%)，男性 4 名，女性 2 名，51 至 60 歲成人 12 名中有 5 名陽性反應(41.67%)，男性 1 名，女性 4 名，61 至 70 歲老人 82 名中有 37 名陽性反應(45.12%)，男性 24 名，女性 13 名，大於 70 歲之老人 104 名中有 61 名陽性反應(58.65%)，男性 48 名，女性 13 名(表 2)。

潭南村 70 名中有 33 名陽性反應(47%)，而雙龍村 64 名則有 35 名陽性反應(55%)(表 5)。

所有的實驗均以 IO-7 JCV (CY)(+)當做陽性控制(26)，另以不含模板之無菌 dH₂O 當做陰性控制，所測之檢體為陰性者均行第二次覆檢，以求其精確性。

(2) Regulatory regions 的 Restriction Mapping

尿液檢體經 PCR 複製出的 334 base-pair 之 DNA 片段, 我們實驗室之前以 JBR-3 oligonucleotide probe(5'-TGG CAG TTA TAG TGA AAC CCC-3')作 southern blot, 確認為人類多瘤性病毒的調控區(26、28), 以 PCR 產物直接純化 DNA 片段, 以 BstNI DNA 內切酶來實行 restriction mapping, 依其 regulatory region 的 DNA 序列不同(圖 5)(26、28)用以區分而切成不同片段, JCV 原始種 CY strain 切成三段為 169bp、90bp、76bp, JCV 台灣一號切成兩段為 168bp、161bp, 而 BKV 則不受 BstNI 內切酶切割。切割反應完成後, 以 5% acrylamide gel 電泳分析並以 Ethidium bromide 染色, 觀察結果(圖 7), 圖中 CY 及 TW-1 之控制組材料取自於已確認核苷酸序列的 PCR 產物所純化之 DNA(26、28)。顯示 3 至 7 歲幼稚園學童中有 1 名為 JCV CY strain, 8 至 13 歲小學生 7 名陽性的學生中, 5 名為 JCV CY strain, 2 名為 JCV TW-1 strain, 14 至 19 歲國高中學生在 17 名陽性的學生中有 5 名為 JCV CY strain, 12 名為 JCV TW-1 strain, 20 至 30 歲大學生 10 名陽性的學生中有 5 名為 JCV CY strain, 5 名為 JCV TW-1 strain, 31 至 50 歲成年人中, 6 名陽性的成人 2 名為 JCV CY strain 另 4 名為 JCV TW-1 strain, 51 至 60 歲成年人中, 5 名陽性的成人裡 2 名為 JCV CY strain, 3 名為 JCV TW-1 strain, 61 至 70 歲老年人中, 37 名陽性的成人中 15 名為 JCV CY strain, 22 名為 JCV TW-1 strain, 而大於 70 歲的 61 名陽性老人中有 30 名 JCV CY strain, 31 名為 JCV TW-1 strain(表 3)。

潭南村 33 名陽性者有 28 名 JCV CY strain, 5 名 TW-1 strain。雙龍村 35 名陽性者有 34 名 JCV CY strain, 1 名 TW-1 strain。總共 68 名中 JCV CY strain 62 名(91.2%), TW-1 strain 6 名(8.8%)(表 5)。

(3) 血球凝集抑制反應(HAI)偵測 JC 病毒抗體

由於 JC 病毒殼體蛋白具有血球凝集的特性, 所以被感染人體所產生之抗體便具有血球凝集抑制的現象。在含血球凝集活性的病毒殼體中, 能夠抑制其凝集反應者, 即血清中含有抗 JCV 抗體(圖 12)。結果為潭南村 70 名受偵測者當中含有抗 JCV 抗體陽性者有 65 名(92.9%), 而雙龍村 64 名受偵測者當中含有抗 JCV 抗體陽性則有 59(56.7%), 總共 136 名受偵測者當中含有抗 JCV 抗體陽性者有 124 名

(91.2%)(表 6)。另外比對同時偵測抗 JC 病毒抗體效價與病毒尿液排放情形者共有 368 名，抗 JC 病毒抗體陰性者 70 名，而病毒尿液排放陰性者 60 名(28.4%)，陽性者 14 名(8.9%)，抗 JC 病毒抗體陽性者 294 名，而病毒尿液排放陰性者 151 名(71.6%)，陽性者 143 名(91.1%)(表 7)。

討論

已知高於 80% 的成年人體內帶有抗人類多瘤性病毒的抗體(93、97、134)，亦即人類多瘤性病毒 JCV 及 BKV 廣泛地存在於多數人的體內(147)，然此兩種病毒出現在腎臟並沒有什麼症狀(32、147)，卻會在各種免疫力受抑制如腎臟移植、(4、52、66)骨髓移植、懷孕(34、35、38、54)、罹患癌症 (67)及 AIDS 病人(102)等狀況下，使得病毒活化，由尿液中排放出來，甚而導致致命性的疾病如 PML(33、144、145)，至今病毒活化與免疫受到抑制的關係報導很多(4、34、35、38、52、54、66、67)。其中亦包括本實驗室過去之研究(26、27、28、142)。但仍未盡全貌，

本實驗室過去研究孕婦及自體免疫疾病的病人等族群的尿液檢體(26、27、28、142)，以 PCR 的方式進行篩選(27)，並以 DNA 定序分析 DNA 調節區的基因型，發現有 13.3%(10/75)的健康人，26%(20/77)的孕婦及 37.5% (18/48) 的自體免疫疾病患者可偵測到 JCV DNA，但 3.9% (3/77) 的孕婦及 6.2% (3/48) 的自體免疫疾病患者可偵測到 BKV DNA (表 1) (142)，結果顯示人類多瘤性病毒尿液排放情形為免疫抑制的人高於健康人。此次我們藉由台灣地區健康之各年齡層人口進行人類多瘤性病毒之尿液篩檢，結果發現尿液排放情形隨著年齡的增高而增加 (表 3)。此結果顯示大於 70 歲之老人族群有最高比率之尿液排放率，其結果亦高於先前研究之孕婦及自體免疫疾病的病人族群(表 1)，此結果與 Kitamura 等人在非免疫抑制的病人當中，發現在非免疫抑制的老年病人中 JCV 偵測到 52%最高相類似，另亦有成年人較易排放 JCV DNA 等相關發表(1、25、75)，所以病毒活化除了與免疫抑制有關外，其牽涉到年齡因素已是明顯可見(表 3)(圖 8)。因此根據函數統計關係建立年齡陽性率：年齡 3-19 陽性率為 4.30%(25/581)，年齡 20-39 陽性率為 15.29%(13/85)，年齡 40-59 陽性率為 36.36%(8/22)，年齡>60 陽性率為 52.69%(98/186)， $r=0.9$ ， $P<0.01$ (表 4)(圖 9)，年齡為 3 至 84 歲，平均年齡 27.43 歲，男女比率為 1.3 比 1，即確立了依照年齡之增長而人類多瘤性病毒尿液排放率也越行增高之趨勢。

我們再以 restriction mapping 方式進行基因分型，而結果為如(表 3)3 至 7 歲幼稚園學童中有 1 名為 JCV CY strain，8 至 13 歲小學生 7 名陽性的學生中，5 名為 JCV CY strain，2 名為 JCV TW-1 strain，14

至 19 歲國高中學生在 17 名陽性的學生中有 5 名為 JCV CY strain，12 名為 JCV TW-1 strain，20 至 30 歲大學生 10 名陽性的學生中有 5 名為 JCV CY strain，5 名為 JCV TW-1 strain，31 至 50 歲成年人中，6 名陽性的成人 2 名為 JCV CY strain 另 4 名為 JCV TW-1 strain，51 至 60 歲成年人中，5 名陽性的成人裡 2 名為 JCV CY strain，3 名為 JCV TW-1 strain，61 至 70 歲老年人中，37 名陽性的成人中 15 名為 JCV CY strain，22 名為 JCV TW-1 strain，而大於 70 歲的 61 名陽性老人中有 30 名 JCV CY strain，31 名為 JCV TW-1 strain 總共 65 名為 JCV CY strain，79 名為 JCV TW-1 strain，然而並沒有偵測到任何 BKV 之發現(表 3)。針對 BKV 排放於某些進行性疾病患者，但是不易在正常人之尿液中排放的結果，和 Sonoe 等多位研究者的報告相吻合(70、80、141)。另外以台灣人類多瘤病毒 JCV 的排放主要為 CY 及 TW-1 兩種亞型的結果，也與我們先前所發表的研究相吻合(26、28)。

本實驗室另外亦致力於研究各年齡層血清中對抗 JCV 抗體的研究，篩檢的年齡層甚廣，初步資料如(表 5)(圖 10)。由研究所得到的數據顯示 JCV 可能在孩童時期就陸續受到感染，直到青少年期達到高峰，感染比率就如 Taguchi 等人(134)及多位學者的研究一樣高達 80% (93、97)。我們依照 JCV 尿液排放率和血清中抗 JCV 抗體這兩項結果做成曲線圖比較(圖 11)，結果發現孩童時期之抗 JCV 抗體由 0 歲至 20 歲，其曲線有慢慢升高的趨勢，直到 20 歲抗體的表現就維持在一平穩的狀態，這顯示孩童在 20 歲以前就已陸陸續續的受到 JCV 的感染且抗體的表現達到最高峰，20 歲以後受感染者持續維持抗體的表現量，而某部份的人可能未被感染或受感染但不產生抗體。至於 JCV 在尿液中的排放率，從曲線圖上可看出有隨著年齡而漸行增高的趨勢，同時也顯示在 20 歲以前 JCV 在尿液中的排放率很低，我們認為在 20 歲以前即便受到 JCV 的感染，尿液中 JCV 也沒有明顯的排放，但是隨著年齡的增長，卻從尿液中檢測出 JCV，這可能是隨著年齡的增長，人體的某些免疫機制開始退化，因此使得 JCV 在尿液中的排放率提高。而比對同時偵測抗 JC 病毒抗體效價與病毒尿液排放情形者共 368 名中(表 7)(圖 14)，可看出抗體效價之產生與病毒尿液排放情形並無相對應之關係。

目前居住在台灣島的人主要是從 17 世紀時移民來的，而最早住在這個島上的原住民散居在山區及花東等地區，主要可分成雅美族、

阿美族、泰雅族、賽夏族、鄒邵族、布農族、卑南族、魯凱族及排灣九個族。而本研的對像潭南村及雙龍村均屬於布農族，基於 JCV 之主要傳染模式是經由同住之雙親長期的親近接觸傳染給其小孩(72、84)，感染給小孩時症狀不明，然後持續潛伏於腎臟組織(76、110、113、138)，直至成年人時較易由尿中排放出來(1、25、75)。我們應用尿液 PCR 篩檢及血球凝集抑制反應，篩檢台灣原住民之尿液及血清，並行基因分型，以期瞭解台灣原住民族群之原始分佈情形，結果如表 5、表 6 以及圖 13，由於原住民各年齡層所採集之檢體標本數較少，較難符合統計參數，所以在年齡層的病毒尿液排放比率方面容易產生誤差，而導致失真的情形。而這批檢體再與日本 Yogo 等人合作，利用 IG region(VT-intergenic region)作 DNA 序列分析，並以 phylogenetic analysis 分析 phylogenetic tree(123、137)，進行族群研究(29)。基因型方面則是 JCV CY 型多於 TW-1 亞型，代表了臺灣原住民布農族群主要為 JCV CY strain。

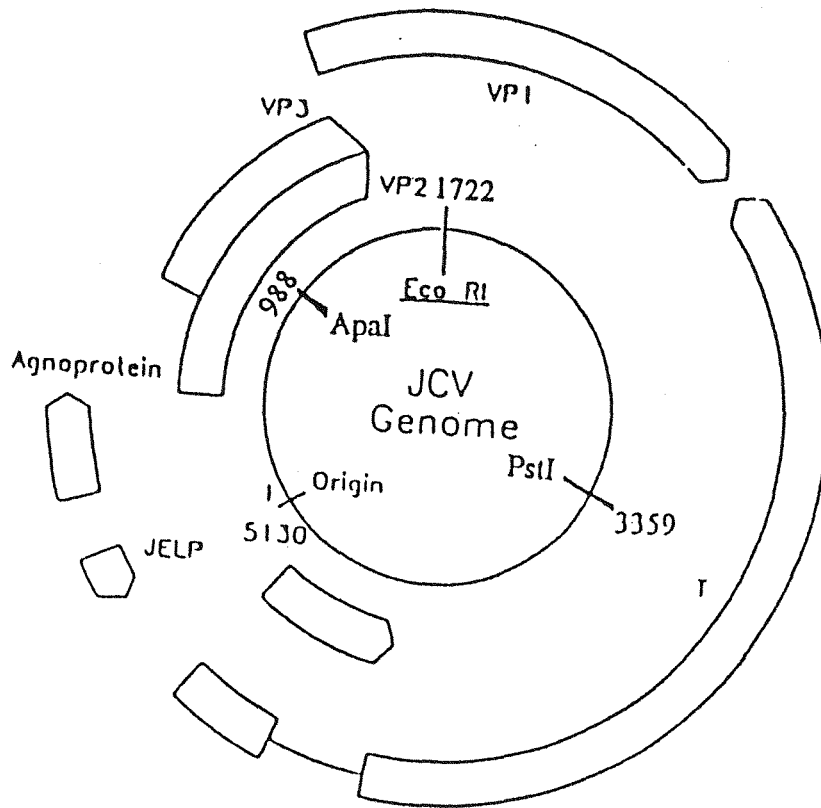


圖 1.人類多瘤性病毒 JCV Mad-1 strain 的基因圖(50)。JCV 的基因調控區包含 Promoter, enhancer 及 replication origion, 位於 nucleotide(nt)5086-289。早期腫瘤蛋白基因位於 nt 5013-2603。其中 nt 4772-4427 藉 differential splicing 切除而產生 Large tumor antigen。Small tumor antigen 位於 nt 5013-4495。晚期結構蛋白則由順時鐘方向製造。VP1 位於 nt 1469-2533, VP2 位於 nt 883-1560, agnoprotein 位於 nt 277-492。

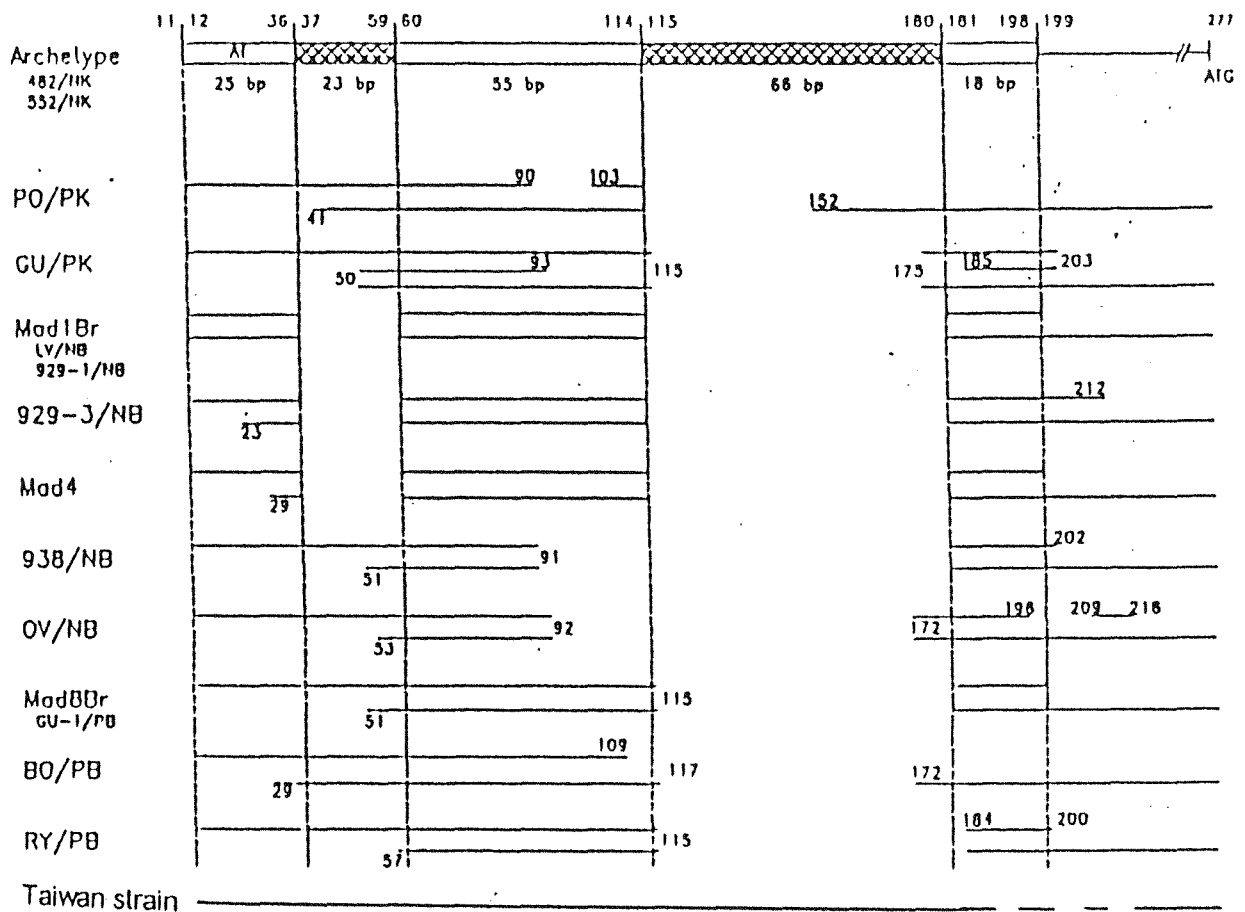


圖 2. 不同 strain 的 JCV，其 regulatory region 的核苷酸序列簡圖。本圖所比較的區域是由核苷酸 11 到 277。原始種是 CY strain，而其他各個 strain 皆與其作比較。數字表示核苷酸序號，空白表示發生缺失，平行線表示 duplication。在 23-bp 及 66-bp 這兩個網狀區域在原始種中是存在的，但在許多變異種中則有缺失；而 55-bp 及 18-bp 這兩個部份則是高度保留區。標識著 AT 的部份是包含有 TATA element。圖中 PK 表示該株是由 PML 病人的腎臟分離出來的，PB 則表示由 PML 病人的腦部分離出來的，而 NB 和 NK 表示該株病毒由非 PML 病人的腦部及腎臟分離出。除 Taiwan strain 核苷酸序列外，本圖摘自 White 等人(151)。

BKV strains

Diagram of DNA sequences of BKV regulatory region

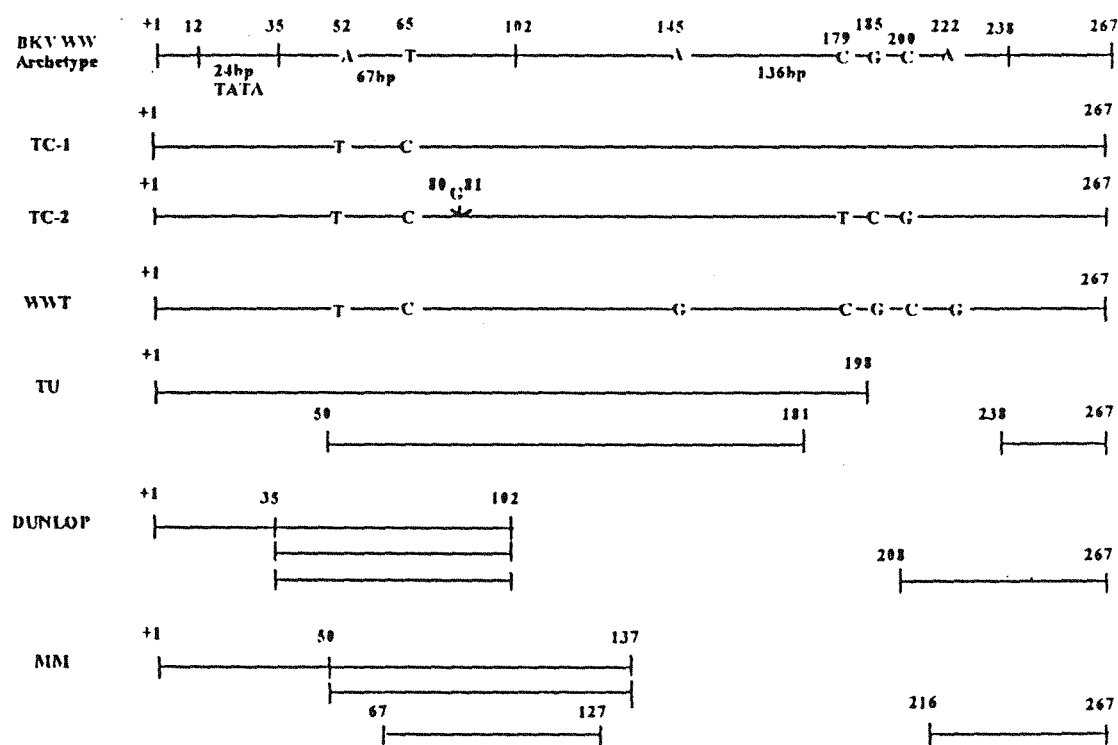


圖 3. 不同 strain 的 BKV 其 regulatory region 的核苷酸序列簡圖。本圖比較的 regulatory region 是從核苷酸 1 到 267。WW strain 和 WWT strain 是原始種，其他各個 strain 皆與其作比較。數字表示核苷酸的序號，箭號表示插入，空白表示缺失，平行線表示 duplication。除 TC-1 及 TC-2 之外，本圖摘自 Rubinstein 等人(122)。

Alignment of JCV (CY) and BKV (WW) archetype DNA sequences

```

*
JCV -45 CCTCCACGCCCTTACTACTTCTGAGTAAGCTTGGAGGCGGAGGCGGCCCTCGGCCTCCTGTATA-TATAAAAAAAAAAGGGAA 34
BKV -45 CCTCCACACCCTTACTACTTGGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAAAAGGC- 34
      JBR1 primer

JCV 35 GGTAGGGAGGAGCTGGCTAAAAGTGGATGGCTGCCAGCCAAGCATGAGCTCATACTAGGGAGCCAACCAGCTGACAGCC 114
BKV 35 CACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAAATGTAGCCA---AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGA----- 100

JCV 115 AGAGGGAGCCCTGGCT-GCATGCCACTGGCAGTTA-TAGTGAAACCCCTCCCATAGTCCTTAATCACAAGTAAACAAAGC 192
BKV 101 -----CTGGGCAGCCCGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCCTA----AAATTCTCAAATAAA-----C 161

JCV 193 ACAAGGGGAAGTGGAAAGCAGCCAGGGGA-----ACATGTTTTGCGAGCCAGAGCTGTTTTGG-CT 252
BKV 162 ACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAA-TCTTGGCCT 240

*
JCV 253 TGTCACCAGCT-----GGCCATGGTTCTTCGCCAGCTGTAC 289
BKV 241 TGTCACCAGCTTAAACTGGACAAAGGCCATGGTTCTTCGCCAGCTGTAC 289
      JBR2 primer

```

圖 4. JCV(CY)(159)和 BKV(WW)(122)原始種的 DNA 序列比對圖。比對 JCV 的 CY strain 及 BKV 的 WW strain，發現在核甘酸-45 及 289 附近各有一段相似的序列，只有在*的位置，也就是在-38bp(JCV 是 G，BKV 是 A)以及 276bp(JCV 是 T，BKV 是 G)兩個核甘酸有異。取 NT-45 到-21 定名為 primer JBR-1，nt 265 到 289 定名為 primer JBR2。以這兩段 DNA 片段為 primers 進行 PCR(97)。

JCV CY Regulatory Region

1 CCTCCACGCC CTTACTACTT CTGAGTAAGC TTGGAGGCGG AGGCGGCCTC GGCCTCCTGT ATATATAAAA AAAAGGGAAG 80
81 GTAGGGAGGA GCTGGCTAAA ACTGGATGGC TGCCAGCCAA GCATGAGCTC ATACCTAGGG AGCCAACCAG CTGACAGCCA 160
161 GAGGGAGCCC TGGCTGCATG CCACTGGCAG TTATAGTGAG ACCCCTCCCA TAGTCCTTAA TCACAAGTAA ACAAAGCACA 240
241 AGGGGAAGTG GAAAGCAGCC AGGGGAACAT GTTTTGCAG CCAGAGCTGT TTTGGCTTGT CACCAGCTGG CCATGGTTCT 320
321 TCGCCAGCTG TCAC 334

JCV TW-1 Regulatory Region

1 CCTCCACGCC CTTACTACTT CTGAGTAAGC TTGGAGGCGG AGGCGGCCTC GGCCTCCTGT ATATATAAAA AAAAGGGAAG 80
81 GTAGGGAGGA GCTGGCTAAA ACTGGATGGC TGCCAGCCAA GCATGAGCTC ATACCTAGGG AGCCAACCAG CTGACAGCCA 160
161 GAGGGAGCCC TGGCTGCATG CCACTGGCAG TTATAGTGAA ACCCCTCCCA TAGTCCTTAA TCACAAGTAA ACAAAGCACA 240
241AGGGGAAGTG GAAAGCAGCC AGCATGTTTT GCGAGCCAGA GCTGTTTTGG CTTGTCACCA GCTGGCCATG GTTCTTCGCC 320
321 AGCTGTCAC 329

BKV WW Regulatory Region

1 CCTCCACACC CTTACTACTT GAGAGAAAGG GTGGAGGCAC AGGCGGCCTC GGCCTCTTAT ATATTATAAA AAAAAAGGCC 80
81 ACAGGGAGGA GCTGCTAACC CATGGAATGT AGCCAAACCA TGACCTCAGG AAGGAAAGTG CATGACTGGG CAGCCAGCCA 160
161 GTGGCAGTTA ATAGTGAAAC CCCGCCCTA AAATTCTCAA ATAAACACAA GAGGAAGTGG AACTGGCCA AAGGAGTGA 240
241 AAGCAGCCAG ACAGACATGT TTTGCGAGCC TAGGAATCTT GGCCTTGTCC CCAGTTAAAC TGGACAAAGG CCATGGTTCT 320
321 GCGCCAGCTG TCAC 334

圖 5. 比較 JCV CY、TW-1 strain 及 BKV WW strain regulatory region 的 DNA 序列圖。受 BstNI endonuclease 之切割點。

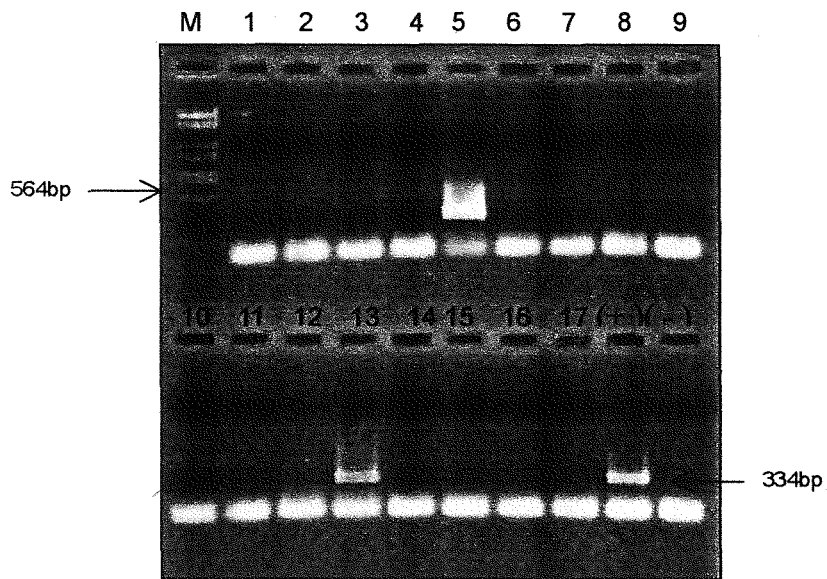


圖 6. 尿液篩檢，PCR 產物的電泳圖。所使用的 Primers 是 JRB1(5'-CTCCACACCCTTACTTGAG-3')和 JRB2(5'-GTGACAGCTGGCGAACCATGGC-3')，所複製出的是 JCV 和 BKV 的 regulatory region，全長是 334bp。將這些 PCR 產物以 1.5% agarose gel 電泳分離，再用 ethidium bromide 染色。Lane M 是 λ DNA 用 EcoRI 及 Hind III 酵素處理作為分子量標記；Lane 1-17 檢體的編號；Lane + 是 positive control；Lane - 是 negative control。

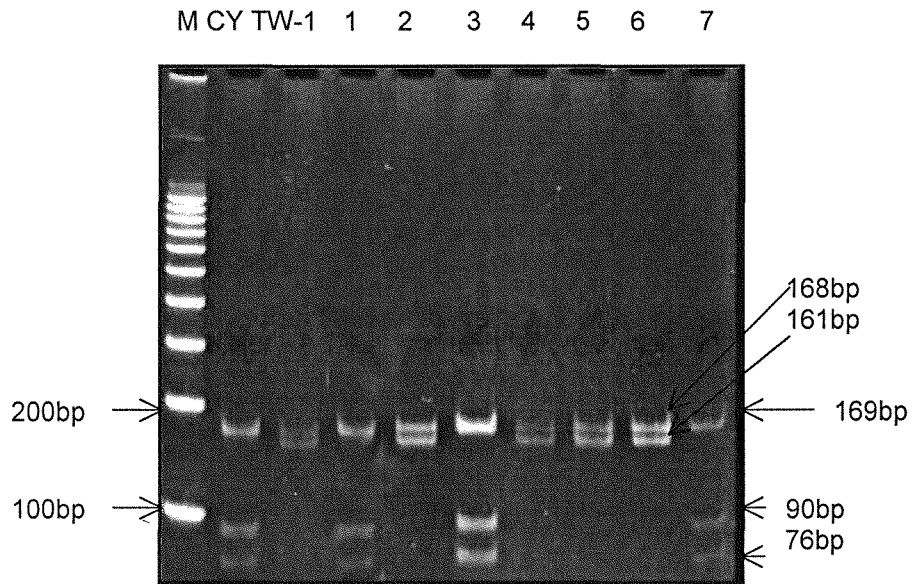


圖 7. 複製出調控區的 DNA 之 Restriction mapping。PCR 產物純化之 DNA 片段，以 BstNI 內切酶切割後，以 5%acrylamide gel 電泳分離，再用 ethidium bromide 染色，Lane M 是 DNA leader Marker 100-1000 作為分子量標記，CY 為 JCV CY strain，TW-1 為 JCV TW-1 strain。Lane 1-7 為檢體編號。

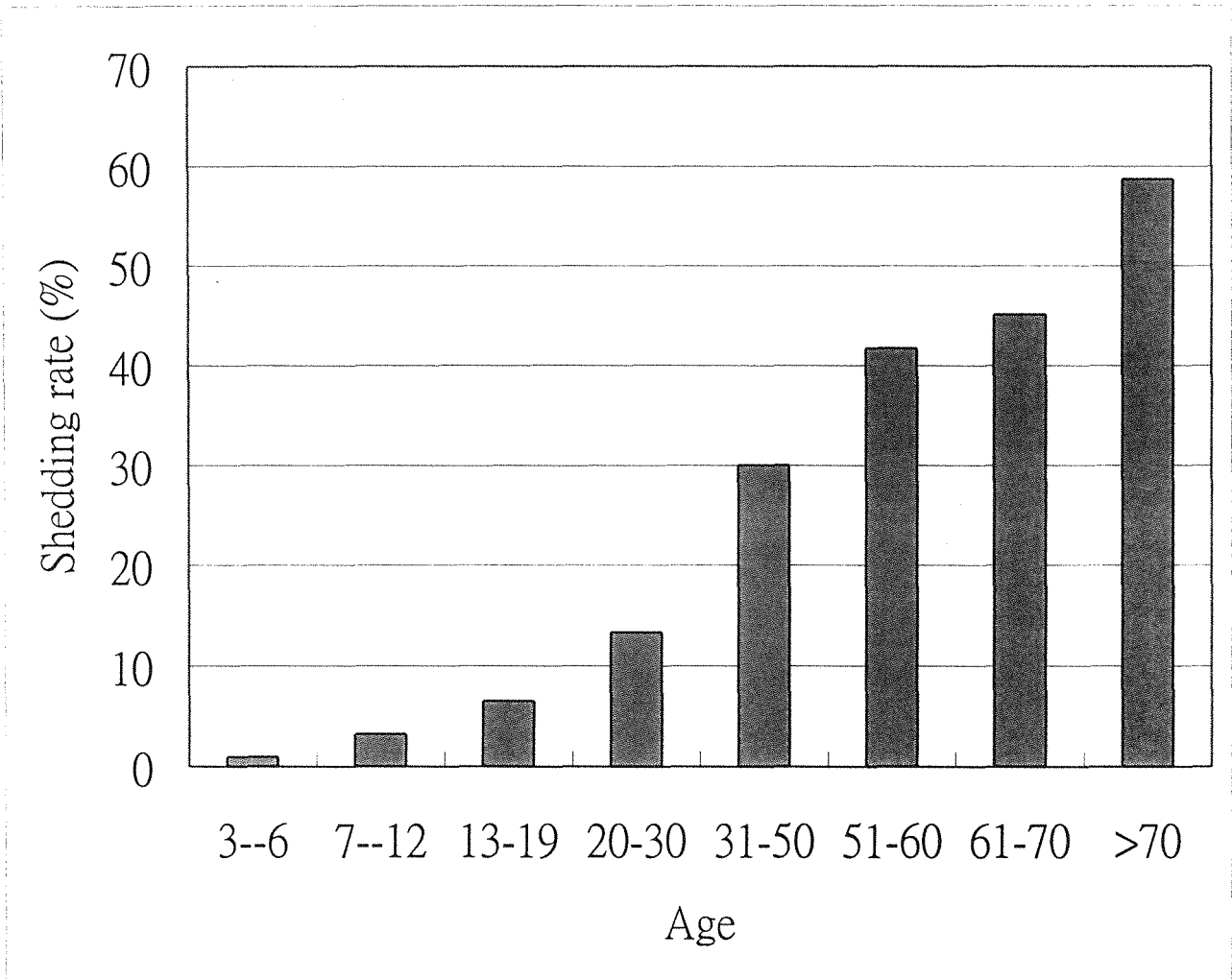


圖 8. 各年齡族群多瘤性病毒尿液排放率，橫軸表示年齡族群，縱軸為病毒尿液排放率。

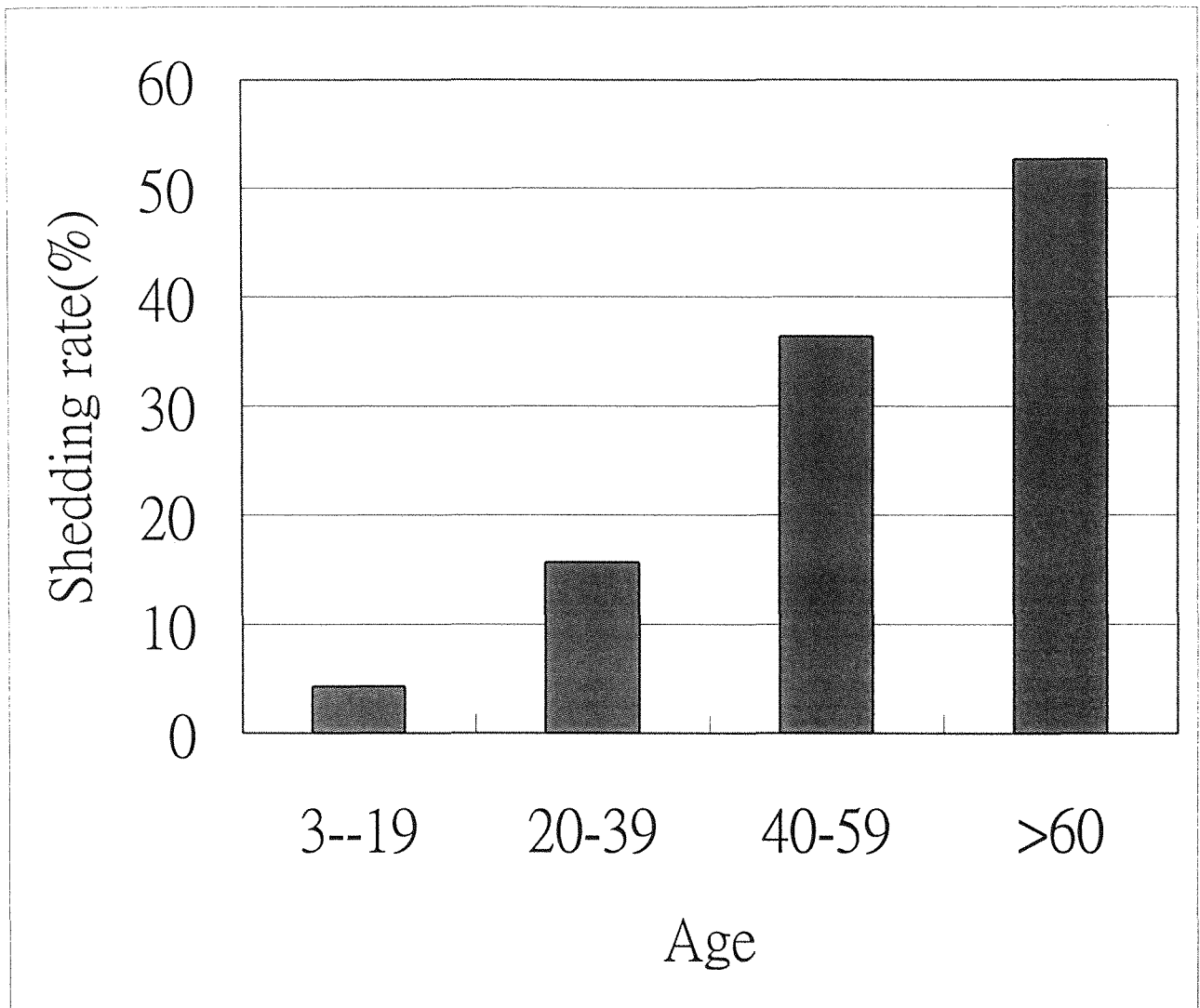


圖 9. 函數統計各年齡層多瘤性病毒尿液排放率，橫軸表示年齡，縱軸為病毒尿液排放率。

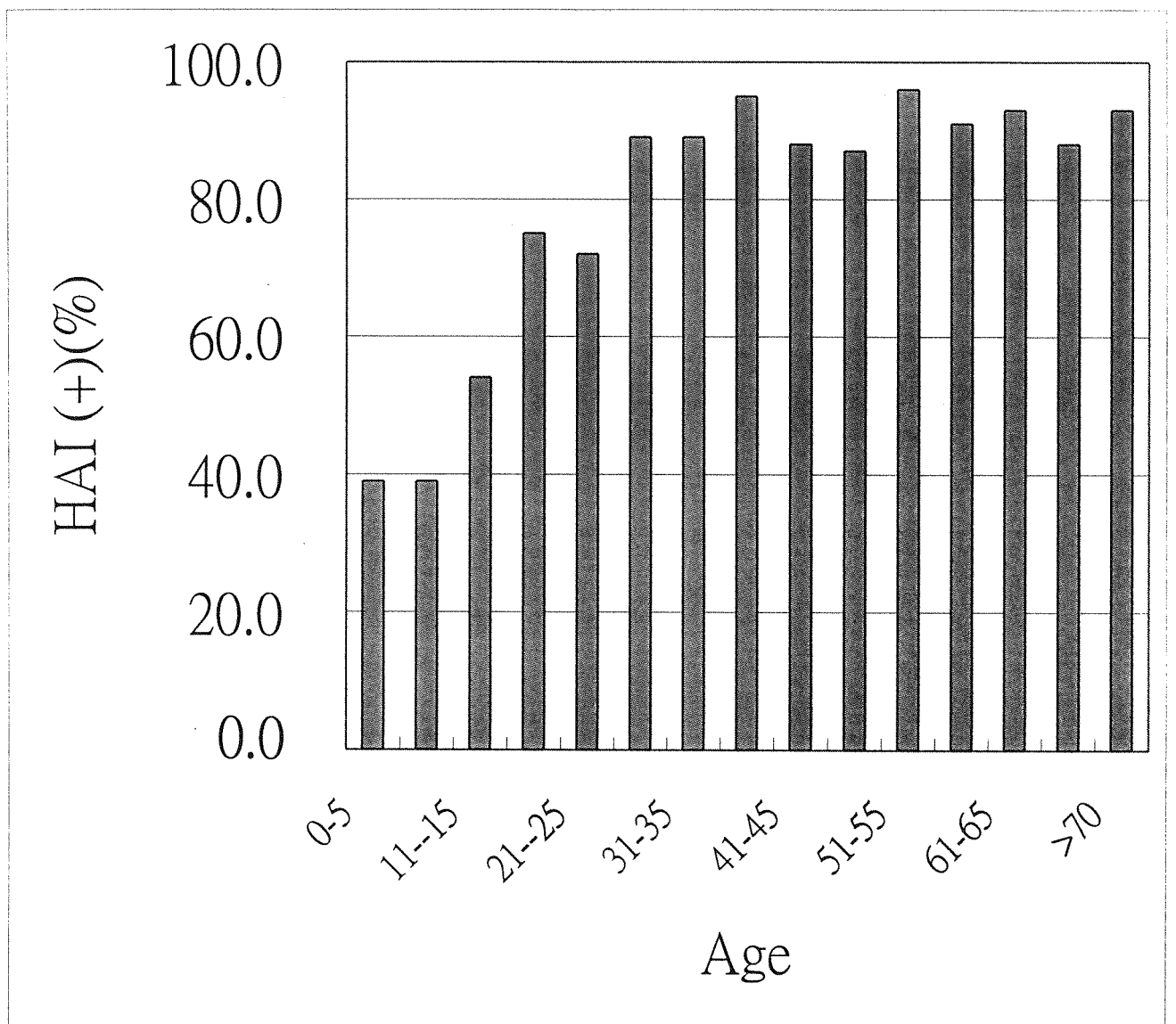


圖 10. 各年齡層血清中抗 JC 病毒抗體陽性率量化圖，橫軸表示年齡，縱軸為病毒抗體陽性率。

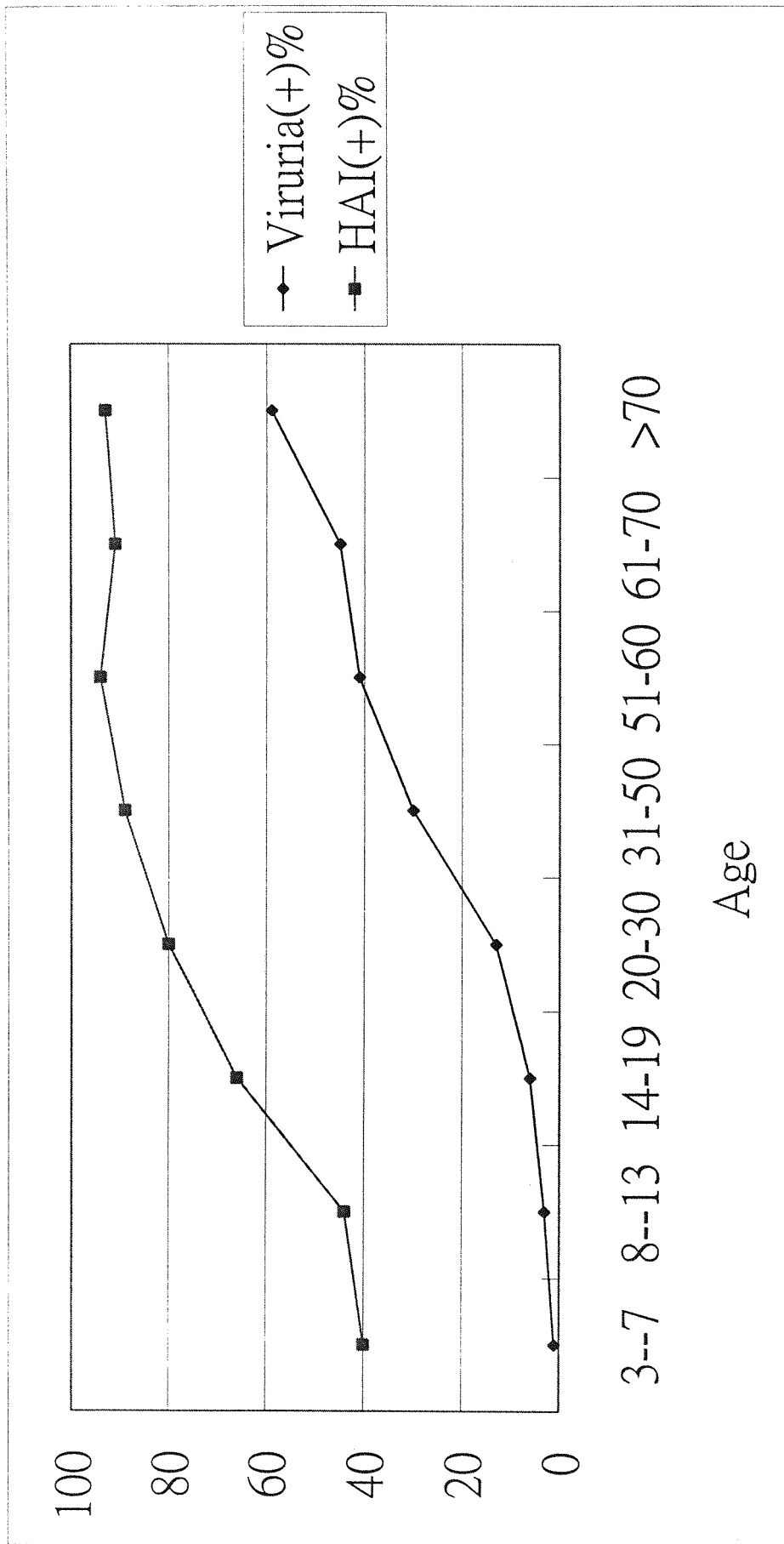


圖 11. 各年齡層多瘤性病毒尿液排放率與血清抗 JC 病毒抗體陽性率比較曲線圖。

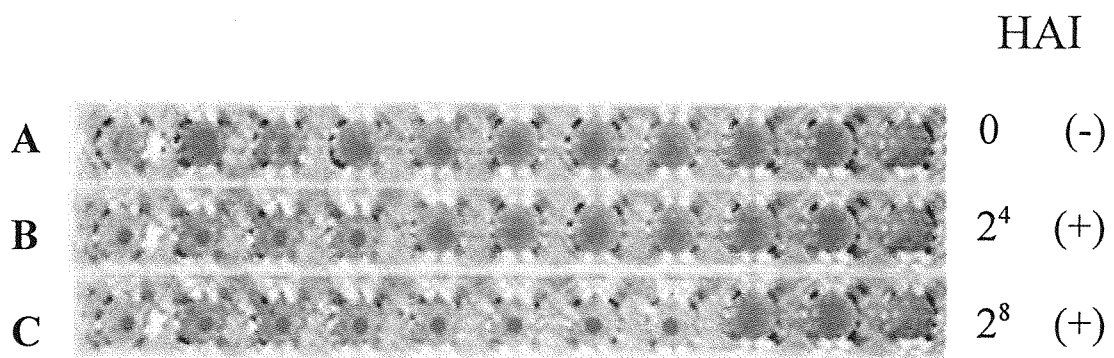


圖 12. 血球凝集抑制反應。A 為血清中不含抗 JC 病毒抗體，B, C 為血清中含有抗 JC 病毒抗體。

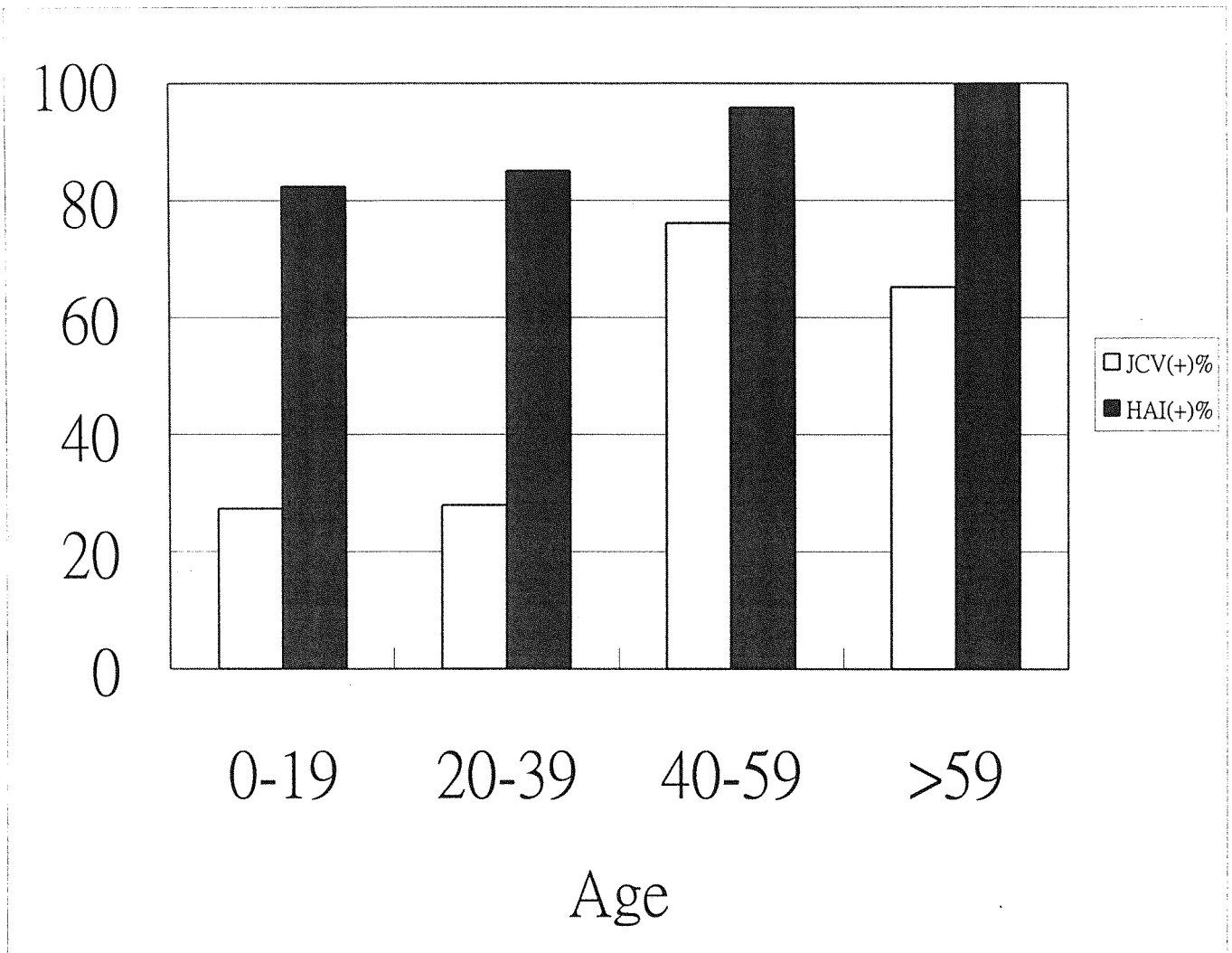


圖 13. 布農族各年齡族群多瘤性病毒尿液排放率與血清抗 JC 病毒抗體陽性率比較圖，橫軸表示年齡，縱軸為百分比。

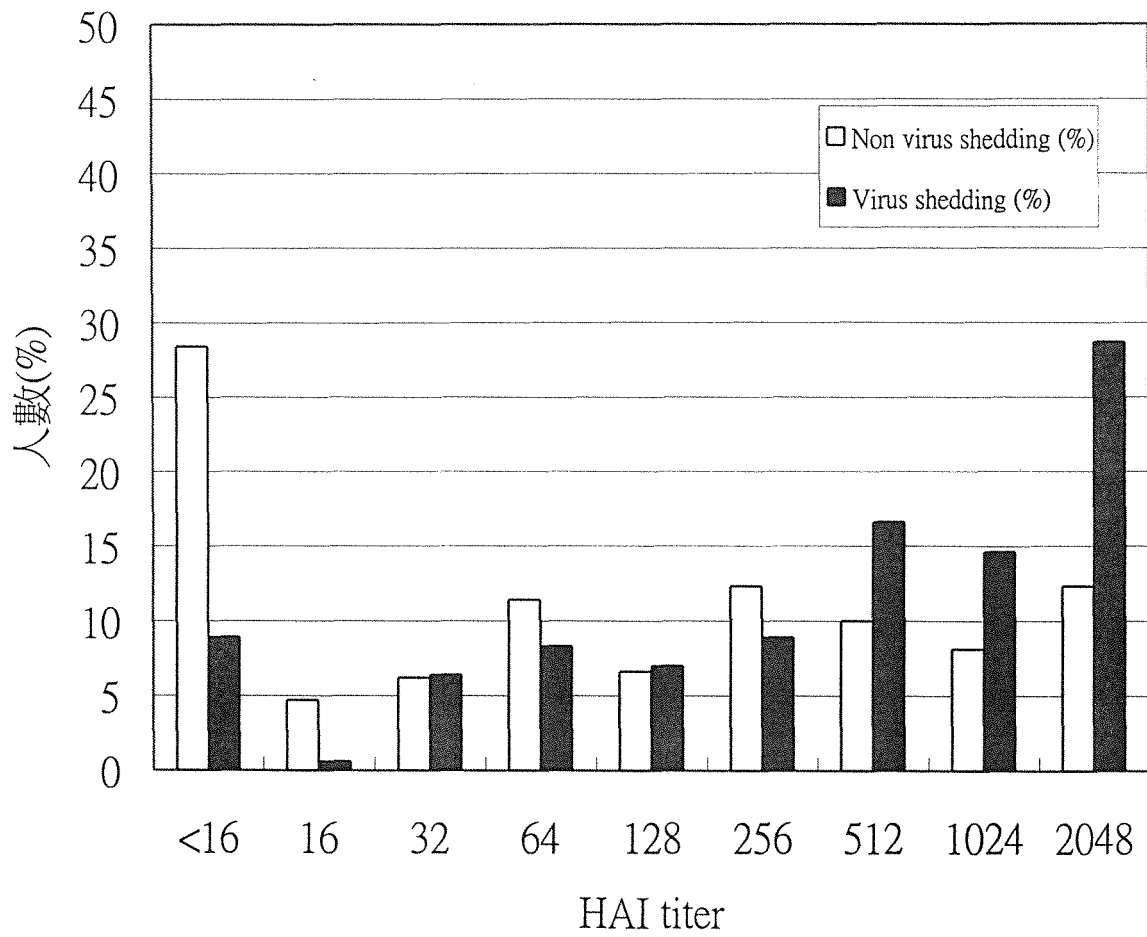


圖 14. 各血清中抗 JC 病毒抗體效價與病毒尿液排放情形比對圖，橫軸表示各血清中抗體效價，縱軸為人數百分比。

Group	Virus	JCV				BKV	
		CY	TW-1	TW-2	TW-3	TC-1	TC-2
Healthy individuals (n = 75)		50%	13.3% (10/75) 50%	0%	0%	0% (0/75) 0%	0%
Pregnant women (n = 77) ^a		40%	26.0% (20/77) 60%	0%	0%	3.9% (3/77) 100%	0%
Autoimmune disease patients (n = 48) ^b		39%	37.5% (18/48) 44%	11%	6%	6.2% (3/48) 67%	33%
Total (n = 200) ^{a,b}		42%	24.0% (48/200) 52%	4%	2%	3.0% (6/200) 83%	17%

表 1. 人類多瘤性病毒在臺灣之健康個體、孕婦及自體免疫疾病患者三類族群之基因型分佈情形(142)。

age	JCV(+)%	CY %	TW1 %	Male	Female
3--6	0.96(1/104)	100.0(1/1)	0.0(0/1)	1.9(1/54)	0.0(0/50)
7--12	3.24(7/216)	71.4(5/7)	28.5(2/7)	3.4(4/117)	3.0(3/99)
13-19	6.51(17/261)	29.4(5/17)	70.5(12/17)	7.3(11/151)	5.5(6/110)
20-30	13.33(10/75)	50.0(5/10)	50.0(5/10)	11.9(5/42)	15.2(5/33)
31-50	30.00(6/20)	33.3(2/6)	66.7(4/6)	36.4(4/11)	22.2(2/9)
51-60	41.67(5/12)	40.0(2/5)	60.0(3/5)	20.0(1/5)	57.0(4/7)
61-70	45.12(37/82)	40.5(15/37)	59.5(22/37)	53.3(24/45)	35.1(13/37)
>70	58.65(61/104)	49.2(30/61)	50.8(31/61)	78.7(48/61)	30.2(13/43)
Total	16.48(144/874)	45.1(65/144)	54.9(79/144)	20.2(98/486)	11.9(46/388)

表 2. 各年齡族群多瘤性病毒尿液排放率。

Age	Total No.	Positive No.	Positive%
3--19	581	25	4.30%
20-39	85	13	15.29%
40-59	22	8	36.36%
>60	186	98	53%
Total	874	143	16.40%

表 3. 各年齡層多瘤性病毒尿液排放率。

Age group	No. of HAI (+)	No. of sera tested	% of HAI (+)
0-5	156	402	38.8
6--10	127	327	38.8
11--15	68	127	53.5
16--20	67	89	75.3
21--25	157	218	72.0
26-30	218	246	88.6
31-35	230	258	89.1
36-40	162	171	94.7
41-45	119	135	88.1
46-50	100	115	87.0
51-55	103	107	96.3
56-60	92	101	91.1
61-65	88	95	92.6
66-70	145	164	88.4
>70	167	180	92.8

表 4. 各年齡層血清中抗 JC 病毒抗體陽性率。

	潭南村			雙龍村			
Age	CY	TW-1	Total	CY	TW-	Total	Total
0-19	3	0	33.33(3/9)	3	0	23.01(3/13)	27.27(6.22)
20-39	5	2	24.14(7/29)	5	0	35.71(5/14)	27.91(12/43)
40-59	14	2	72.72(16.22)	18	1	79.17(19/24)	76.09(35/23)
>59	6	1	70.0(7/10)	8	0	61.53(8/13)	65.22(15/23)
Total	28	5	47.14(33/70)	34	1	54.69(35/64)	50.75(68/134)

表 5. 布農族多瘤性病毒尿液排放率。

Age	潭南村%	雙龍村%	總計%
0-19	66.67(6/9)	100.0(8/8)	82.35(14/17)
20-39	81.25(26/32)	93.33(14/15)	85.11(40/47)
40-59	95.65(22/23)	96.15(25/26)	95.91(47/49)
>59	100.0(11/11)	100.0(12/12)	100.0(23/23)
Total	92.86(65/70)	96.72(59/61)	91.18(124/136)

表 6. 布農族血清中抗 JC 病毒抗體陽性率。

HAI titer	Non virus shedding	Virus shedding
<16	60 (28.4%)	14 (8.9%)
16	10 (4.7%)	1 (0.6%)
32	13 (6.2%)	10 (6.4%)
64	24 (11.4%)	13 (8.3%)
128	14 (6.6%)	11 (7%)
256	26 (12.3%)	14 (8.9%)
512	21 (10%)	26 (16.6%)
1024	17 (8.1%)	23 (14.6%)
2048	26 (12.3%)	45 (28.7%)
Total	211	157

表 7. 各血清中抗 JC 病毒抗體效價與病毒尿液排放情形比對表。

參考文獻

1. Agostini H. T., Ryschkewitsch C. F., Stoner, G. L. (1996) Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 64:159-164.
2. Aksamit, A. J. Major, E. O., and Ghatak, J. G. (1987) Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by brain biopsy with biotin labeled DNA: DNA in situ hybridization. *J. Neuropathol. Exp, Neurol*, 46, 556-566.
3. Aksamit, A. J., Mourrain, P., Sever, J. L., and Major, E. O. (1985) Progressive multifocal leukoencephalopathy: investigation of three cases using in situ hybridization with JC virus biotinylated DNA probe. *Ann. Neurol.* 18,490-496.
4. Andrews, C. A., Shah, K. V., Daniel, R. W., Hirsch, M. S., and Rubin, R. H. (1988) A serological investigation and BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J. Infect. Dis.* 158,176-181.
5. Apperley, J. F., Rice, S. J., Bishop, J. A., Chia, Y.C., Krauz, T., Gardner, S. D., and Goldman, H. M. (1987) Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. *Transpla*, 43, 108-112.
6. Arthur, R. R., Shah, K. V., Baust, S. J., Santos, G. W., and Saral, R. (1986) Association of BK viraemia with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N. Eng. H. Med.* 315, 230-234.
7. Arthur, R. R., and Shan, K. V. (1989) Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine, *Prog. Med. Virol.* 36,42-61.
8. Arthur, R. R., Dagnostin, S., and Shah, K. V. (1989) Detection of BKV and JCV in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27,1174-1179.
9. Ault, G. S., and Stoner, G. L. 1992 Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences. *Journal of General Virology* 73, 2669-2678.
10. Barbanti-Brodano, G., Minello, G.P., and Portolan, M. (1975) Structural proteins of human papovavirus (BK virus) L a comparison with the structural proteins of simian virus 40. *Virol.* 64,269-271.
11. Barkman, A., W., and Shah, K. V. (1983) Propagation and primary isolation of JCV and BKV in urinary epithelial cell cultures. *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. Sever, J.L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York, pp 3-14.
12. Barkman, A., W., and Shah, K. V., and Mounts, P. (1985) Genetic heterogeneity of the human papovaviruses BK and JC. *J. Med. Virol.* 15,239-250.
13. Barkman, A., W., Shah, K. V., and Padgett, B.L. (1982) Propagation and primary isolation of papovavirus JC in epithelial cells derived from human urine. *Infect. Immun.* 38,774-777.
14. Barkman, A., Welch, R.C., and Mertz, H.E. (1987) Missense mutations in the VP1 gene of simian virus 40 that compensate for defects caused by deletions in the viral genome. *J. Virol.* 61,3190-3195.
15. Bergsma, D. J., Olive, D. M., Hartzell, S. W., and Subramanian, K. N. (1982) Territorial limits and functional anatomy of the simian virus 40 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79,381-385.
16. Blake, J., Pillay, D., Knowles, W., Brown, D. W. G., Griffiths, P. D., and Taylor, B. (1992) JC virus associated meningoencephalitis in an immunocompetent girl. *Arch. Dis. Child.* 67, 956-957.

17. Boerman, R. H., Arnoldus, E. O.P. J., Rapp, A. K., Peters, A. C. B., TerScheget, H., and Van den Ploeg, M.(1989) Diagnosis of progressive multifocal heuliencephalopathy by hybridization techniques. *J. Clin. Pathol.* 42,153-161.
18. Books, B. R., and Walker, D. L.(1984) Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.* 2, 299-313.
19. Borowiec, J. A., and Hurwitz, J. (1988) situmulates the binding of simian virus 40 (SV40) large tumor antigen to the SV40 origin of replication. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA.* 85,64-68.
20. Bosch, E. P., Cancilla, P. A., and Cornell, S. H.(1976) Computerized tomography in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch, Neurol.* 33,216.
21. Brown, P., Tsai, T., Gaidusek Am, D. C. (1975) Seroepidemiology of human papovaviruses:discovery of virgin population and some unusual patterns of the world. *Am. J. Epidemiol.* 102,331-340.
22. Byrne, B. J., Davis, M. S., Yamaguchi, J., Bergsma, D. J., and promoter region and demonstration of a host range bias in the enhancement effect of the simian virus 40 72-base-pair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 721-725.
23. Carroll, B. A., Lane, B., Norman, D., and Enzmann, D. (1977) Progressive multitocal leukoencephalopathy diagnosis by computerized tomography. *J. Radiol.* 122, 137-141.
24. Carswell, S., and Alwine, J. C. (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilities perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.* 60, 1055-1061.
25. Cavalli-Sforza L. L., Menozzi, P., Piazza, A.(1994) The history and genography of human genes. Princeton University Press, Princeton.
26. Chang, D., Tsai, R-T., Wang, M., Ou, W-C. (1996) Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiman. *J. Med. Virol.* 48, 204-209.
27. Chang, D., Wang, M., Ou, Wang, M., Ou, W-C., Tsai, R-T., Fung, C-Y., and Hwang, Y-J.(1996) A simple method for detecting human polyomavirus DNA in urine by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 58, 131-136.
28. Chang, D., Wang, M., Ou, W-C., Lee, M-S., H-N., and Tsai, R-T. (1996) Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnat individuals in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48, 95-101.
29. Chang, D.C., Sigimoto, C., Wang, M. L., Tasi, R.T. and Yogo, Y. (1999) JC virus genotypes in the Taiwan aboriginal tribe (Bunun): implication for its population history. *Arch. Virol.* 144:1081-1090.
30. Chang, D.C., Wang, M. L., and Tsai, R.T. (2000) Treatment with cytotoxic immunosuppression agents increases JC viruria in autoimmune disease patients. *J. Med, Virol.* In press.
31. Chen, C. H., Wen M. C., Shu, K. H., Chang, D., C., Wu, M. J., Cheng, C. H., and Lian, J. D. (2000) BK virus induces interstitial nephritis in a kidney allograft. *J. Med virol.* In press.
32. Chesters, P. M., Heritage, J., and McCance, D. J.(1983) Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissue and in diseased tissues. *J. Inf. Dis.* 147,676-684.
33. Chuke, W. F., Walker, D. L., Peitzman, L. B., and Frisque, R. J. (1986) Construction and characterization of hybrid polyomavirus genomes. *J. Virol.* 60, 960-971.
34. Coleman, D. V., Gardner, S. D., Mulholland, C., Fridiksdottir, V., Porter, A. A. Liford, R., and Valimarsson, H. (1983) Human polyomavirus in pregnancy. A

- model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. *Clin. Exp. Immunol.* 53,289-296.
35. Coleman, D. V., Wolfendale, M. R., Daniel, R. A., Dhanial, N. K. Gardner, S. D., Gibson, P. E., and Field, A. M. (1980) A prospective study of juman polyomavirus infection in pregnancy. *J. Infect. Dis.* 142, 1-8.
 36. Conomy, J. P., Weinstein, M. A., Norman, D,m Agamanolis, D., and Holt, W. S. (1976) Computed tomography in progressive multifocal leuloencephalopathy. *Am. J. Roentgenol.* 127, 663-665.
 37. Corallini, A., Pagnani, M., Viadana, P., Silini, E., Mottes, M., Milanesi, G., Gerna, G., Vettor, R., Treapella, G., Silvani, V., Gaist, G., and BarbantiBrodano, G. (1987) Association of BK virus with human tumors and tumor of pancreatic islets. *Int. J. Cancer.* 39, 60-67.
 38. Daniel, R., Shah, K., Madden, D., and Stagno, S. (1981) Serological investigation of the possibility of congenital transmission of papovavirus JCV. *Inf. Imm.* 33,319-321.
 39. Dean, F. B., Bullock, P., Murakami, Y., Wobbe, C. R., Weissabach, L., and Hurwitz, J. (1987) Simian virus 40 *SV40) DNA replication: SV 40 large T antigen unminds DNA containing the SV 40 origin of replication, *Proc. Natl. Acad. Sdi. USA.* 84, 16-20.
 40. Deb, S., Delucia, A. L., Koff, A., and Tegtmeyer, P. (1986) The adeninthymine domain of the simian virus 40 core region directs DNA bending and coordinately regulates DNA replication. *Mol. Cell, Biol.* 6, 4578-4584.
 41. DiMail, D., and Nathans, D.(1980) Cold sensitive regulatory mutants of simian virus 40. *J. Mol. Viol.* 140, 129-142.
 42. Dorries, K. (1984) Progressive multifocal leukoencephalopathy: analysis of JC virus DNA from brain and kidney tissue. *Vir. Res.* 1, 25-38.
 43. Dorries, K., Loeber, G., and Meixensberger, J. (1987) Association of polyomaviruses JC, SV 40 and BK with human brain tumors. *Virology* 160, 268-270.
 44. Dason, M., Dean, F. B., Bullock, P., Echols, H., and Hyurwitz, H. (1987) Unwinding of duplex DNA from the SV 40 origin of replication by T antigen. *Science.* 238,946-967.
 45. Dubois, V., Dutronc, H., and M. E., Lafon.1997 Latency and Reactivation of JC virus in Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus Type I- Infected Patients *J. Clin.. Microbiol.* 35. 2288-2292.
 46. Dubois, V., M. E., Lafon, J. M. Ragnaud, J. L. Pellegrin, F-Damasio, C. Baudouin, V. Michaud, and H. J. A. Fleury. 1996. Detection of JC virus DNA in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients. *AIDS* 10:353-358.
 47. Feigenbaum, L., Khalili, K., Major, E., and Khoury, G. (1987) Regulation of the host range of hyman papovavirus JCV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 3695-3698.
 48. Flaegstad, T., Sundsfjord. A., Arthur, R. R., Pedersen, M., Trraavik, T., and subramani, S. (1991) Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus in human urine by polymerase chain reaction. *Viology.* 180. 553-563.
 49. Freund, J., DiMayorca, G., and Subramanian, K. N. (1979) Mapping and ordering of fragements of BK virus DNA produced by restriction endonucleases. *J. Virol.* 27, 915-925.
 50. Frisque, R. J. Bream, G. L., and Cannella, M. T. (1984) Human polyomaviruse JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.

51. Gardner, S. D., Field, A. M., and Coleman, D. V. (1971) New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation, *Lancet*. 1, 1253-1257.
52. Gardner, S. D., MacKenzie, E. F., Smith, C., and Porter, A. A. (1984) Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* 37, 578-586.
53. Gerard, R., and Gluzman, Y. (1986) Functional analysis of the role of the A+T-rich region and upstream flanking sequences in simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell Biol.* 6, 4570-4577.
54. Gibson, P. E., Field, A. M., Gardner, S. D., and Coleman, D. V. (1981) Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. *J. Clin. Pathol.* 34, 674-679.
55. Gibson, P. E., Knowles, W. A., Hand, J. F., and Brown, D. W. G. (1993) Detection of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Med. Virol.* 39, 278-281.
56. Goudsmit, J., Wertheim-van, D. P., and van Strien, A. (1982) The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.* 10, 91-99.
57. Grasser, F. A., Mann, K., and Walter, G. (1987) Removal of serine phosphates from simian virus 40 large T antigen increases its ability to stimulate DNA replication in vitro but has no effect on ATPase and DNA binding. *J. Virol.* 61, 3373-3380.
58. Gribble, D. H., Haden, C. C., Schwartz, L. W., and Hendrickson, R. V. (1975) Spontaneous progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in macaque. *Nature (London)*. 254, 602-604.
59. Grinnell, B. W., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Distribution of non-integrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 147, 669-675.
60. Grinnell, B. W., Martin, J. D., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Naturally occurring and passage-induced variation in the genome of JC virus, in polyomaviruses and Human Neurological Diseases. Sever, J. L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York, pp61-77.
61. Guo, J., Kitamura, T., Ebihara, H., Sugimoto, C. and Yogo, Y. 1996. Geographical distribution of the human polyomavirus JC virus type A and B and isolation of a new type from Ghana. *J Gen Virol.* 77. 919-927.
62. Hensin, J., Rosenblum, M., Armstrong, D., D., and Furneaux, H. (1991) Amplification of JC virus DNA from brain and cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology.* 41. 1967-1971.
63. Hertz, G. A., Young, M. R., and Mertz, J. E. (1987) The A+T-rich sequence of the simian virus 40 origin is essential for replication and is involved in bending of the viral DNA. *J. Virol.* 61, 2322-2325.
64. Ho, L., Chan, S.-Y., Burk, R.D., Das, B. C., Fujinaga, K., Icenogle, J. P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P., Labropoulou, V., Mitrani-Rosenbaum, Norrild, B., Pilla, M. R., Stoerker, J., Syrjaenen, K., Syrjaenen, S., Tay, S.-K., Villa, L. L., Wheeler, C., M., Williamson, A.-L. and Bernard, H.-U. (1993) The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a measure of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J. Virol.* 67, 6413-6423.
65. Holmberg, C. A., Gribble, D. H., Takemoto, K. K., Howley, P. K., Espana, C., and Osburn, B. I. (1977) Isolation of simian virus 40 from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with spontaneous multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 136, 593-

66. Horgan, T. F., Borden, E. C., McBain, H. A., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1980) Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann. Intern. Med.* 92,373-378.
67. Horgan, T. F., Padgett, B. L., Walker, D., L., Borden, E.C., and Frias, Z. J. L. (1983) Survey of human polyomavirus (JCV, BKV) infections in 139 patients with lung cancer, breast cancer, melanoma, or lymphoma, in polyomaviruses and Human Neurological Disease, Sever, D. L. Madden, Alan R, Liss, Hew York, pp 311-324.
68. Houff, S.A., Major, E. O., Katz, D., A., Jufta, C. V., Sever, J. L., Pittaluga, S., Roberts, R. J., and Gett, J. (1988) Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Eng. J. Med.* 318, 301-305.
69. Ida, T., Kitamura, T., Guo, J., Taguchi, F., Aso, Y., Nagashima, K. and Yogo, Y. 1993. Origin of JC polyoma. Virus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90. 5062-5065.
70. Itoh S, Irie K, Nakamura Y, Ohta Y, Haratake A, and Morimatsu M. (1998) Cytologic and genetic study of polyomavirus- infected or polyomavirus-activated cells in human urine. *Arch Pathol Lab Med*; 122:333-337.
71. Kahan AV. Coleman DV, Koss LG. (1980) Activation of human polyomavirus infection- detection by cytologic techniques. *Am J Clin Pathol*; 74: 326-332.
72. Kato. A, Kitamura T, Sugimoto C. Ogawa Y, Nakazato K, Nagashima. K, Hall WW, Kawabe K, Yogo Y 1997 Lack of evidence for the transmission of JC polyomavirus between populations. *Arch Virol* 142:875-882.
73. Khalili, K., Brady, J., and Kjoury, G. (1987) Translational regulation of SV40 early mRNA defines a new viral protein. *Cell.* 48,639-645.
74. Kitamura, T., Aso, Y., Kuniyoshi, N., Hara, K. and Yogo, Y. (1990) High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J. Inf. Dis.* 161, 1128-1133.
75. Kitamura, T., Kunitake, T., Guo, J., Tominaga, T., Kawabe, K., and Yogo, Y. (1994) Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. *J. Clin. Microbiol.* 32,2359-2363.
76. Kitamura T. Sugimoto C. Kato A. Ebihara H. Suzuki M, Taguchi F, Kawabe K. Yogo Y (1997) Persistent JC virus (JCV) infection is demonstrated by continuous shedding of the same JCV strains. *J Clin Microbiol* 35:1255-1257.
77. Klausning, K., Scheckner, M., Scheidtmann, K. H., Stahl, H., and Knippers, R. (1988) DNA binding properties and replication activity of the T antigen related D2 phosphoprotein. *Biochemistry*, 28, 2238-2244.
78. Knepper, H. E., and diMayorca, G. (1987) Cloning and characterization of BK virus-related DNA-sequences from normal and neoplastic human tissue. *J. Med. Virol.* 29, 289-299.
79. Korzak, M. (1984) Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: Effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence of preproinsulin. *Nucleic. Acids. Res.* 12,3873-3893.
80. Koss LG. *Diagnostic Cytology of the urinary Tract.* Philadelphia, Pa:JB Lippincott; 1995:52-55.
81. Kozak, M. (1984) Complication and analysis of sequence upstream from the transcriptional start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 857-872.
82. Krupp, L., Lipton, R., Swedlow, M., Leeds, N., and Llena, J. (1985) Progressive

- multifocal leukoencephalopathy: Clinical and radiographic features. *Ann. Neurol.* 17, 344-349.
83. Krynska B. Otte J. Franks R. Khalili K and Croul S. (1999) Human ubiquitous JCV (CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. *Oncogene* 18:39-46.
 84. Kunitake, T., Kitamura. T., Guo, J., Taguchi, F., Kawabe, K., and Yogo, Y. (1995) Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J. Clin. Microbiol.* 33,1448-1451.
 85. Kure, K., Llena, J. F., Lyman, W. D., Soeiro, R., Weidenheim, K.M., Hirano, D., and Dickson, WS. (1991) Human immunodeficiency virus-1 infection of the nervous system: An autopsy study of 268 adult, pediatric, and fetal brains, *Hum. Path.* 22,700-710.
 86. Law, M. F., Martin, J. D., Takemoto, K.K., and Howley, P.M.(1979) The co-linear alignment of the genomes of papovaviruses JC. BK. And SV40. *Virology.* 9, 576-587.
 87. Lee-Chenm G. J., and Woodworth-Gutai, M. (1986) Somoan voris 40 DNA replication: functional organization of regulatory element. *Mol, Cell, Biol,* 6, 3086-3093.
 88. Li, J. J., Peden, P. W. C., Dixon, R. A. F., and Kelly, T. (1986) Functional organization of simian virus 40 origin of DNA replication, *Mol. Cell. Biol,* 6,1117-1128.
 89. Loeber, G., and Dorries, K. (1988) DNA rearrangements in organspecific variants of polyomavirus JC strain GS. *J. Virol,* 62, 1730-1735.
 90. London, W. T., Houff, S. A., Mckeever, P. E., Wallen, W.C., Sever, J. L., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Viral-induced astrocytomas in squirrel monkeys, in polyomavirus and Human Neurological Disease. Sever, D. L. Madden, and Alan R. Liss. 227-237.
 91. Lynch, K. J., and Frisque, R. J. (1990) Identification of critical elements within the JC virus DNA replication origin. *J. Virol.* 64,5812-5822.
 92. Lynch, K. J., and Frisque, R. J. (1991) Factors contributing to the restricted DNA replicating activity of JC virus. *Viology.* 180, 306-317.
 93. Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR: Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Micro Rev* 1992; 5:49-73.
 94. Major, E. E., Miller, A. E., Murrain, P., Traub, R. G., deWidt, E., and Sever, J. (1985) Establish of a line of human fetal glial cells that support JC virus multiplication. *Proc. Natl. Sci. USA.* 82, 1257-1261.
 95. Major, E. O., Murrain, P., and Cummins, C.(1984)JC virus- induced owl monkey glioblastoma cells in culture: Biological properties associated with the viral early gene product. *Virology.* 136, 359-367.
 96. Mantyjarvi, R. A., Meurman, O. H., and Viham, L. (1973) A human papovavirus (BK), biological properties and seroepidemiology. *Ann. Clin. Res.* 5, 283-287.
 97. Markowitz, R. B., Eaton, B. A., Kubik, M, F., Latorra, D., McGregor, J. A. and Dynan, W. S. (1991) BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions.*J. Virol.* 65, 4515-4519.
 98. Marthin, J. D., Frisque, R. J., and Padgett, B. L (1979) Restriction endonuclease cleavage map of the DNA of JC virus. *J. Virol.* 29, 846-855.
 99. Martin, J. D., and Foster, G. C. (1984) Multiple JC virus genomes from one patient. *J. Gen. Virol.* 65, 1405-1411.

100. Martin, J. D., King, M., Slauch, J. M., and Frisque, R. J. (1985) Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants., *J. Virol.* 53, 306-311.
101. Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C., Wall, J. S., Dobson, M., Dean, F. B., and Hurwitz, J. (1989) ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication, *Nature (London)*. 338, 658-662.
102. Miller, J. R., Barret, R. E., Britton, C. B., Tapper, M. L., Bahr, G. S., Bruno, P. J., Marquardt, M. D., Hays, A. P. J. McMurtry, G. I. I., Weissman, J. B., and Bruno, M. S., (1982) Progressive multifocal leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immunodeficiency. *N. Eng., J. Med.* 307, 1436-1438.
103. Miymuras, T., Furuno, A., and Yoshike, K. (1985) DNA rearrangement in the control region for early transcription in a human polyomavirus JC host range mutant capable of growing in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* 54, 750-756.
104. Mohr I. J., Stillman, B., and Gluzman, Y. (1987) regulation of SV40 DNA replication by phosphorylation of T antigen. *EMBO J.* 6, 153-160.
105. Monaco, M. C., G., W. J. Atwood, M. Gravell, C., S., Tornatore, and E. O., Major. 1996 JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* 70: 7004-7012.
106. Monaco, M. C., G., Jensen, P. N., Hou, H., Durham, L. C. and Major, E. O. 1998 Detection of JC virus DNA in Human Tonsil Tissue: Evidence for site of Infection. *J. Virol.* 72. 9918-9923.
107. Monaco, M.C.G., W.J.Atwood, M. Gravell, C. S., Tornatore, and E. O. Major. (1996) JC virus infection of hematopoietic progenitor cells. Primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implication for viral latency. *J. Virol.* 70:7004-7012.
108. Mullarkey, M. F., Hruska, J. F., Hruska, J. F., and Takemoto, K. K. (1974) Comparison of two human papovaviruses with simian virus 40 by structural protein and antigenic analysis. *J. Virol.* 13, 1014-1019.
109. Newman J. T., Frisque R. J. 1997. Detection of Archetype and Rearranged Variants of JC virus in Multiple Tissues From a Pediatric PML Patient *J. Med. Virol.* 52:243-252.
110. Padgett BL, Walker DL (1976) New human papovaviruses. *Prog Med Virol* 22:1-35.
111. Padgett, B. L., Rogers, C. M., and Walker, D. L. (1977) JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. *Infect. Immun.* 15, 656-666.
112. Padgett, B. L., D.L.Walker, G. M. XuRhein, A. E., Hodach, and S. M.Cou.(1976) JC papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 133: 686-690.
113. Padgett, B. L., Walker, D. L.(1973) Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Inf. Dis.* 127, 467-470.
114. Padgett, B. L., Walker, D. L.(1983) Virologic and serologic studies of progressive multifocal leukoencephalopathy, in polyomaviruses and Human Neuro. Disease. Sever, D. L. Madden, and Alan R. Liss. 107-117.
115. Padgett, B. L., Walker, D. L., Zu Phein, G. M., Echroade, R. J., and Dessel, B. H. (1971) Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive

- multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*. 1, 1257-1260.
116. Possati, L., and Bartolotta. E. (1981) Attempts to isolate BKL virus from children affected by various diseases. *Acta. Virol.* 25, 254-255.
 117. Reith, K. G., Dichiro, G., London, W. T., Sever, J. L., Houff, S. A., Kornblith, P. L., Mckeever, P. E., Buonomo, C., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1980) Experimental glioma in primates: A computed tomography model. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 4, 285-290.
 118. Rentier-Delrue, F., Lubinieck, A., and Howley, P. M. (1981) Analysis of JC virus DNA purified directly from human progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *J. Virol.* 38, 761-769.
 119. Resnick, J., and Shenk, T. (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell to cell spread of virus. *J. Virol.* 60, 1098-1106.
 120. Rhodes, R. H., Ward, J. M., Walker, D. L., and Ross, A. A., (1988) Progressive multifocal leukoencephalopathy and retroviral encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112,1207-1213.
 121. Rockwell, D., Rubin, F. L., Winklestein, A., and Mendelow, H. (1976) Absence of immune deficiencies in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Am. J., Med.* 61, 433-436.
 122. Rubinstein, R. Pare, N., and Harleu, E. H., (1987) Structure and function of transcriptional control region of nonpassaged BK virus. *J., Virol.* 61, 1747-1750.
 123. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
 124. Schneider, J., and Fanning, E., (1988) Mutations in the phosphorylation sites of simian virus 40 (SV40) T antigen alter its origin DNA-binding specificity for site I or site II and affect SV40 DNA replication activity. *J. Virol.* 62, 1598-1605.
 125. Seif, I., Khoury, G., and Dhar, R. (1979) The genome of human papovavirus BKV. *Cell.* 18. 963-977.
 126. Shah, K., Daniel, R., Madden, D., and Stagno, S. (1980) Serological investigation of BK papovavirus infection in pregnant women and their offspring. *Inf. Imm.* 30, 29-35.
 127. Sieda, E.(1979) The primary sequence of the late region polyoma virus DNA II. The expression of the late genes and comparison with DNA sequences of SV40 and BKV. *Nucleic, acids, Res.* 6,157-160.
 128. Silverman, L., and Rubinstein, L. L. (1965) Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta. Neuropathol.* 5, 215-224.
 129. Small, J. A., Scangos, G. A., Cork, L., Jay, G., and Khoury, G.(1986) The early region of human papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell.* 46, 13-18.
 130. Snider, W. D., Simpson, D., M., Nilsen, S., Gold, J. W., Metroda, C., E., and Posnerm J. B., (1983) Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann. Neurol.* 14,403-418.
 131. Stam, F. C., (1966) Multifocal leukoencephalopathy with slow progression and very long survival. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.* 69, 453-459.
 132. Sugimoto, C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, Ondrejka P, Chollet J-Y, El-Safi S, Ettayebi M, Gresenguet G, Kocagoz T, Chaiyarasamee S, Thant KZ, Thein S, Moe K, Kobayashi N, Taguchi F, Yogo Y., Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations 1997. *Proc. Natl. Aca. Sci USA* 94,9191-9196.

133. Sundsfjord, A., Jchansen, T., Flagsta., Moens, U., Villand, P., Sibramani, S., and Traavik, T.(1990) At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J. Virol.* 64, 3864-3871.
134. Taguchi, F., Kajioaka, J., and Miyamura, T. (1982) Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC and BK virus in human sera. *Microbio. Imm.* 26, 1057-1064.
135. Tashiro, K., Doi, S., Moriwaka, F., Mauro, Y., and Nomura, M. (1987) Progressive multifocal leukoencephalopathy with magnetic resonance imaging verification and therapeutic trials with interferon. *J. Neurol.* 234, 427-4293.
136. Tegtmeyer, P. (1981) Genetics of SV40 and polyoma virus, in Tooze J(ed): *DNA Tumor Viruses. Molecular Biology of Tumor Viruses, Part 2*, ed 2, NY, Cold Spring Harbor Laboratory. 197-337.
137. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
138. Tominaga T, Yogo Y, Kitamura T, Asl Y (1992) Persistence of archetypal JC virus DNA in normal renal tissue derived from tumor-bearing patients. *Virology* 186:736-741.
139. Tooze, J.(1981) *DNA tumor viruses*, 2nd ed, pp:61-370. Cold spring Harbor, NY: Cold spring Harbor Laboratory.
140. Tornatore, C. S., Berger, H. R., and Houff, S. A. (1992) Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.* 31, 454-562.
141. Traystman MD. Identification of viruses in the urine of renal transplant recipients by cytomorphology. *Acta Cytol.* 1980;24:501-510.
142. Tsai, R.R., Wang, M. L. , Ou, W. C., Lee, Y. L., Li, S. Y., Fung, C. Y., Huang, Y. L., Tzeng, T. Y., Chang, D. C. (1997) Viruria incidence of JC virus is higher than that of BK virus in Taiwan. *J. Med. Virol.* 52:253-257.
143. Van der Noordaa, J. V., and Wertheim-Van Dilon, P. (1977) Rise in antibodies to human papovavirus BK in clinical disease. *Letter. Br. Med. J.* 1,1471.
144. Walker, D. L. (1978) *Origressuve multifocal leukoencephalopathy: An opportunistic viral infection of the central nervous system.* In Vinken PJ, Bryun GW (eds): *Handbook of Clinical Neurology.* Amsterdam, North-Holland Publishing Co. 18, 307-329.
145. Walker, D. L. (1983) *Progressive multifocal leukoencephalopathy*, in *Comprehensive Vrology* Plenum, B. L. Padgett, H. Frankel-Conrat, R. R. Wanger New York. 18, 161-193.
146. Walker, D. L. (1985) *Progressive multifocal leukoencephalopathy*, in *Handbooi of Clinical Neurology*, P. J. Vinken, G. W. Bruyn, and H. L. Elsevier Science. Amsterdam. 3,503-524.
147. Walker, D. L. and Frisque, F. J. (1986) *The biology and molecular biology of JC virus.* In N. P. Saltzman (ed): "The papovaviridae" . New York: Plenum.
148. Walker, D. L.(1978) *Biology of JC virus, a human papovavirus* in Schlessinger D (ed): *Microbiology 1978.* Washington, DC, Am. Socie. Microbiol. 432-434.
149. Walker, D. L.Padgett, B. L., Zu Rhein, G. M., Albert, A., E., and Marsh, R. F.(1973) *Current study of an opportunistic papovavirus*, in *Slow Virus Diseases.* W. Xeman, and E. H. Lennette, Willims and Williams, Baltimore, MD. 49-58.
150. Wang, M. L., Tzeng, T. Y., Fung, C. Y., Ou, W. C., Tsai, R. T. Chen C. H., and

- Chang, D. C., (1999) Human anti-JC virus serum reacts with native but not denatured JC major capsid protein VP1. *J. Virol. Meth.* 78:171-176.
151. White III, F. A., Ishaq, M., Stoner, G. L., and Frisque, R. J. (1992) JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* 66, 5726-5734.
 152. Willoughby, E., Price, R. W., Padgett, B. L., Walker, D. L., and Dupont, B. (1980) Progressive multifocal leukoencephalopathy(OML): in vitro cell-mediated immune responses to mitogens and JC virus. *Neurology.* 30, 256-262.
 153. Wright, P. J., and Di Mayorca, G. (1975) Virion polypeptide composition of the human papovavirus BK: comparison with simian virus 40 and polyoma virus. *J. Virol.* 15, 828-835.
 154. Yang, R. C. A., and Wu, R. (1978) Physical mapping of BK virus DNA with Sac I, Mbo II, and Alu I restriction endonucleases. *J. Virol.* 28, 851-864.
 155. Yang, R. C. A., and Wu, R. (1979) BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science.* 206, 456-562.
 156. Yang, R. C. A., and Wu, R. (1979) Comparative study of papovavirus DNA: BKV(MM), BKV(WT) and SV40. *Nucleic. Acad. Sci. USA.* 76, 1179-1183.
 157. Yang, R. C. A., and Wu, R. (1987) Cleavage map of Bk virus DNA with restriction endonucleases Mbo I and Hae III. *J. Virol.* 27, 700-712.
 158. Yogo, Y., Iida, T., Taguchi, F., Kitamura, T., Aso, Y. (1991) Typing of human polyomavirus JC virus on the basis of restriction fragment length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2130-2138.
 159. Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, k., AND Taguchi, F. (1990) Isolation of a possible archetypical JC virus DNA sequence from non-immunocompromised individuals. *J. Virol.* 64, 3139-3143.
 160. Zu Rhein, G. M. (1972) Virions in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Pathology of the Nervous System.* Minkler, H., ed., McGrawHill, New York. 3,2893-2912.
 161. Zu Rhein, G. M., and Chou, S. M. (1968) Papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Res. Publ. Assoc. Nerve. Ment. Dis.* 44, 307-362.

第二部份

人類多瘤性病毒與中樞神經系統腫瘤相關性之研究

Investigation of correlation between human polyomavirus
and central nervous system tumors

目錄

	頁次
中文摘要-----	58
英文摘要-----	59
前言	
JC 病毒對實驗動物致癌性之相關研究-----	60
JC 病毒對人類致癌性之相關研究-----	63
JC 病毒致癌分子機制-----	65
研究的目的及意義-----	67
材料與方法-----	69
結果-----	73
討論-----	74
圖表-----	77
參考文獻-----	95

中文摘要

中樞神經系統的腦瘤佔人類腫瘤近 2%，其主要分佈於小孩及老人，而腦瘤的真正原因至今未明。人類嗜神經性 JC 病毒可感染人類腦細胞是引起進行性多病灶腦白質病的因素，為一種致命性的脫髓鞘疾病，其導致神經系統產髓質細胞的溶解破壞，但 JCV 也在許多動物實驗上顯示其有促成腫瘤的潛在性。轉殖基因老鼠表現 JCV 之早期蛋白 T-抗原進而發展出未分化之腫瘤，類似人類神經膠質性衍生之腫瘤。在許多病例報告中有伴隨 PML 或無 PML 的情況下，亦偵測到 JCV 與中樞神經系統腫瘤之相關性。本篇研究探討人類腦腫瘤與 JCV 之間的相關性，我們收集腦腫瘤檢體共 47 個及非腦瘤病變 9 個，使用蘇木精伊紅染色做為病理診斷以及免疫組織化學染色做為輔助確認診斷，所有檢體均使用病毒早期蛋白 T 抗原免疫組織化學染色，陽性反應者為源自於神經膠質性衍生之腫瘤(glial-derived tumor) 11 個(11/29)，轉移性腫瘤(metastatic tumors) 3 個(3/11)及非腫瘤性腦組織 3 個(3/9)，非神經膠質性衍生腫瘤(non-glial-derived tumor) 7 個則均為陰性反應。這些觀察提供了 JCV T 抗原與神經膠質性衍生之腫瘤並包含轉移後之腫瘤有關，而非神經膠質性衍生之腫瘤則無 T 抗原之呈現，另外非腫瘤性腦組織則可在部份星狀細胞內發現 T 抗原。

Abstract

Brain tumors represent near 2% of human neoplasm is preferentially affect children and older adults. The etiology of brain tumors in humans remains unknown. Human neurotropic JC virus is able to infect human brain glial cells. The causative agent of the fatal human demyelinating disease progressive multifocal leukoencephalopathy(PML), that cytolyses and destroys oligodendrocytes, the myelin-producing cells of the central nervous system. Also results from several experiments have indicated the JCV is able to induce neoplasms. Transgenic mice expressing the JCV early protein, T-antigen, develop neoplasms that exhibit a phenotype similar to that of human glial-derived tumors. Several case reports have detected JCV with human CNS tumors in patients with or without concomitant PML. In this study, we have examined the possible association of JCV with human brain tumor. We collected 47 specimens of brain tumor and 9 brain non-neoplasms specimens. By using pathological diagnosis in Hematoxylin-Eosin stain with auxiliary confirm immunohistochemistry stain of tissue section. Immunohistochemistry stain was used for viral early protein T-antigen. Positive samples included 11 of 29 glial-derived tumors, 3 of 11 metastatic tumors, and 3 of 9 non-neoplasms change. All of 7 non-glial-derived tumors showed negative results. These results provided evidence for a possible association of JCV T-antigen with glial-derived tumors and metastatic tumors. In addition, samples with non-neoplasm showed JCV LT positive in some astrocytes.

前言

JCV 為一好發於神經細胞的 DNA 腫瘤病毒，為引起進行性多病灶腦白質病(progressive multifocal leukoencephalopathy:PML)之主要因素，PML 為一種引發中樞神經系統致命性的脫髓鞘疾病。JCV 蘊含於人類族群中，根據其 JCV 的特殊抗體顯示世界各地的成人有大於 80% 的抗體存在(60、63、97)。據了解此病毒之感染於早期的孩童時期，而維持著潛伏狀態，直到免疫抑制的狀況而活化進而導致 PML(15、76)。JCV 也在許多動物實驗上顯示其有促成腫瘤的潛在性。JCV 直接注入新生倉鼠腦內則引發髓質母細胞瘤(medulloblastomas)，星狀細胞瘤(astrocytoma)及原發性神經外胚層腫瘤(primitive neuroectodermal tumors)，轉殖基因老鼠表現 JCV 之早期蛋白 T-抗原而發展出來未分化神經脊源之腫瘤。再則注射非人類之靈長類動物 owl 恆河猴及 squirrel monkeys，也會導致星狀細胞瘤(astrocytoma)及多形性膠母細胞瘤(glioblastomas multiforme)，許多病例報告在伴隨 PML 或者無 PML 狀況下，亦發現 JCV 與中樞神經系統腫瘤之相關性。

一、JC 病毒對實驗動物致癌性之相關研究

許多研究者在實驗動物上調查受 JCV 誘導引起的神經性疾病之病理變化。最初是 1973 年 Walker 及 Zu Rhein 等人在倉鼠(Syrian hamster)腦中注射 JCV 為在實驗動物中觀察 PML 與 JCV 之研究而卻意外的將病毒與致癌性產生相關連，其在新生倉鼠腦內注射生出不超過 72 小時的高效價的 JCV 經過四至八個月後有高於百分之八十的倉鼠產生了各種神經源的腫瘤(104)。進一步 JCV 以 intraocularly 注射倉鼠則經過了 6 至 11 個月的潛伏期之後。31 隻有 10 隻在腹腔、骨盆腔、縱膈腔及頸部區域長出了原發性的腫瘤，神經母細胞瘤(neuroblastomas)，且有些產生了轉移至肝、骨髓及淋巴結等現象(103)。而我們知道自發性的腦瘤在倉鼠身上是很罕見的(110)。而許多類似實驗亦引發其它部位之不僅一種的腫瘤，如內臟肌瘤週邊神經母細胞瘤及松果體瘤等(104、110、111)。而最常見的腫瘤包括三級的髓質母細胞瘤(medulloblastoma)、四級的星狀細胞瘤(astrocytoma)、多形性神經膠母細胞瘤(glioblastoma multiforme)及腦外之原始型神經外胚層腫瘤(extracranial primitive neuroectodermal tumors)(104、110)值得注意的是類似的實驗在新生鼠也引起了原始型神經外胚層腫瘤(73)。

另外為 Nagashima 等人以 JCV 不同 strain Tokyo 1 strain 亦做誘導腫瘤之相似實驗，其從患有 PML 的病人腦中分離出 JCV Tokyo 1 strain，且由血清學實驗中確定為 JCV 後，將其直接培養於新生倉鼠的腦內，則平均約五個月的時間都發展成了腦瘤。這些腦瘤有小腦髓質母細胞瘤及網狀母細胞瘤。而 JCV Tokyo 1 只給予右小腦半球，而在大腦或其他內部器官則沒有腫瘤的發生(69)。小腦髓質母細胞瘤的發展開始於新生的、外層的顆粒層細胞，然後帶著插入的 JCV DNA 及表達的 T 抗原以及表現形的癌化(phenotypic transformation)而向內侵襲(69)。

許多細胞採由倉鼠腫瘤培養而來亦被證實，其中如 Raj GV 等人所研究之細胞株 HJC-15 即由混合星狀細胞源及室管膜細胞源得來用於進一步研究(80)。此 HJC-15 細胞株為混合型式，其核內充分表現病毒 T-抗原，其實驗中由 HJC-15a 到 HJC-15e 均顯示不同的大小、生長速率、雙倍數量及細胞循環參數，此與 Frisque 等人(30)及 Mandl 等人(62)所培養之 POJ 細胞株有相同的 T 抗原表達結果。而應用免疫沉澱及西方墨漬法分析均顯示了各個細胞株 T 抗原的不同類型(isoforms)之不同性質及不同數量。而較詳盡的研究顯示高量 T 抗原比低量 T 抗原有更高的倍數生長時間及較高量的 Cyclin-dependent kinase 活性(80)。而這些細胞株注入新生倉鼠腦內或皮下注射均能使得誘導腫瘤產生，此種利用倉鼠模式產生腫瘤之生物體內實驗，進而利用核磁共振影像(magnetic resonance imaging(MRI))及影像處理追蹤技術(image post-processing techniques)之進一步分析，而發現活的倉鼠內可被影像測出含有生長的神經膠細胞腫瘤及細胞增殖的變化(36)。

非常有趣的是將 JCV 直接送入靈長類成猴(owl monkeys、squirrel monkeys)的腦內，則會造成大腦神經膠質瘤(57、83)，這是第一次 JCV 人類的腦病毒在其他靈長類身上造成腫瘤的報告。這些腦瘤顯示，JCV 在這些猴子腦中發展的情況比在人類腦中發展得好。而將 BKV 或 SV40 送入這兩種猴子(66)或將 JCV 送入恆河猴(rhesus)(110)，觀察 36 個月，則均無腦瘤的發生。將 JCV 送入 owl monkey 腦後，有一半的猴子在 16 到 34 個月後就長出了大腦神經膠質瘤。病毒送入五個月後，23 隻猴子中 22 隻有 T 抗體的表現。但 T 抗體偵測到的時間有很大的變異性，有些動物的抗體力價一直都維持著，可能是反應了 JCV 基因的持續表達。而 T 抗體的多寡與腫瘤的生長尚未確立其一定關係，有些動

物的血清學試驗中呈陰性反應，而腫瘤卻依然存在。

Miller 等人曾嘗試從 owl monkey 的腦瘤中分離出 JCV，沒有成功(67)，但可以 ^{32}P -labeled probes 去偵測到腦瘤中 JCV DNA 的存在。病毒的 DNA 會插入宿主的基因中，在不同的細胞中插入的情況也有所不同，所以在這些腫瘤中就存在著不同的插入情形(67)。JCV 基因的插入會以兩個以上的 tandem copies 方式插入。這可能反應出 genome 重要部份需要不可分開的 copy(猜測這些區域可轉譯 T 抗原)。

關於 BKV 培養新生倉鼠的報告，剛開始都顯示了很低的致癌性。將 BKV 以皮下注射方式送入新生期或青春期的倉鼠中，僅有 14%會造成局部肌瘤(17、20、37、70、90、99)。若以 antithymocyte serum 作免疫抑制後，則有 75%的新生倉鼠會長出腫瘤(37)。而 Uchids 等人(65)報告了新生倉鼠以皮下注射 BKV 則有不同比率產生腫瘤，79%產生骨肉瘤(osteosarcoma)或胰島腺瘤(insulinoma)；送入腹膜內則有 64%造成骨肉瘤(osteosarcoma)，橫紋肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)或胰島腺瘤(insulinoma)；而送入腦內則有 86%會長出腦瘤(室管膜瘤ependymoma、脈絡膜叢乳突瘤(choroid plexus papilloma)、神經母細胞瘤 neuroblastoma、松果腺瘤 pinealoma)，abdominal tumors(胰島腺瘤 insulinoma、腹膜腫瘤 peritoneal tumors)；以靜脈注入病毒，則會發展出惡性或轉移性的胰島腺體腫瘤 islet cell tumors(16、102)。因此 BKV 和 JCV 很相似，都是會在很多地方發生腫瘤。不過在人類腦瘤方面，則有 Arthur 等人敘及並無 BKV 存在之證據(1)。僅有 Elsner 等人在 67 個正常腦組織中偵測到 2 個 BKV 的 DNA(26)。

應用轉殖基因(transgenic)老鼠此項動物實驗之優點在於不受外在因素之干擾影響，在宿主細胞中即含有欲作實驗之基因序列於正常之染色體內，如此即能夠觀察其正常之表達情形(35、77)。1986 年 Small 等人(92、93)是最早應用此項技術探討因 JCV 感染而造成神經性疾病的學者。Small 等人將 JCV early region 基因包括完整的調節區域序列及 T 抗原基因，打入老鼠受精卵，使得生產出來的老鼠含有高比例的病毒基因，也就是轉殖基因老鼠。經由此一實驗模式，證實轉殖入的基因存在於各組織當中，但是只會引起屬於神經性疾病甚至產生轉移，同時 RNA T 抗原的表現在腫瘤組織遠高於正常組織，這顯示該病毒具有組織特異性及趨向性的疾病關係。而另外某些老鼠產生了抽搐

或顫抖，並且有較高的 T 抗原 mRNA 表現，經過分析產生了脫髓鞘現象，在 Haas 等人也發現其影響髓鞘基礎蛋白質 myelin basic protein (MBP) 之表達(39)，這些均奠定了運用轉殖基因老鼠研究 PML 疾病的相關性(93、100)。隨後又陸續的發現轉殖基因老鼠產生不同種的腫瘤及在分子層面上表現不同量的變化(29、54)，進一步用 JCV CY type 之轉殖基因老鼠產生 brain tumor，使得 CY type 非 PML type 產生 PNET 和人類腦瘤的相關性更為接近(52)。根據許多研究者利用實驗動物研究有關 JCV 引起神經性疾病之病理變化由 Gordon 等人整理於表一(36)。

二、JC 病毒對人類致癌性之相關研究

估計中樞神經系統的腦瘤佔全身腫瘤的 1.2-1.4%，其主要分佈高峰於 0-4 歲的小孩及 55-65 歲的老人，但腦瘤發生的原因至今未明，與腦瘤有關之因素包括家族遺傳、染色體異常、腦傷害、放射線、病毒、等等(88)。在分子層面則牽涉到了腫瘤抑制基因 tumor suppressor gene NF1、NF2、p53、pRb 等基因(89)及腫瘤基因(oncogenes): erbB1、N-myc、c-myc、v-fos、n-ras、c-mil/raf1、neu、n-ras 等基因(32、107)。

人類多瘤性病毒 JCV 由於其 narrow-species 及 tissue-tropism 之關係又稱為人類嗜神經性乳多泡病毒 (human neurotropic papovavirus)(105)，其在免疫抑制狀態下是引起中樞神經系統致命性脫髓鞘疾病 PML 的主要因素(5、60)。但是在病毒與人類神經源腫瘤之相關性，卻由於涉及病患診斷及組織檢體來源之取得的關係所發表的參考文獻不多，僅有部份的案例提供了 CNS 腫瘤與乳多泡病毒(包括 JCV 及 SV 40)之間的關係(6、34、53、84、91)。而 B 淋巴球為 JCV 另一攻擊目標的細胞，它能使病毒複製且持續性的潛伏在細胞內(21、68)，並扮演著一運輸者的角色，所以 JCV 可藉由淋巴球傳輸至中樞神經系統(22、44)，且由無 PML 患者腦內發現 JCV DNA 存在，而證實其亦可潛伏於腦內(26、108)。

近來學者們研究證實 SV40 及早期孩童時期的兩類腫瘤人類脈絡膜叢乳突瘤(Choroid plexus papillomas)及室管膜瘤(ependymomas)有相關性(6)。此外，也有許多文獻案例報告著 PML 伴隨中樞神經系統腫瘤，最初 Richardson 於 1961 年提出因慢性淋巴性白血病(chronic lymphocytic leukemia)，且有 15 年的 generalized seizures 的病史，經屍

體解剖確認患有 PML 及意外地發現有 oligodendrogloma，但當時並沒有偵測任何病毒(86)。之後 Davies 等人在 1973 年從疑似 Hodgkin's disease 因免疫抑制所導致的 PML 患者中發現合併性中樞神經淋巴瘤(CNS lymphoma)，同時運用電子顯微鏡觀察腦組織發現了人類乳多泡病毒(19)。1974 年 Castaigne 等人則從 AIDS 病人所引發的 PML 患者中發現合併性神經膠質瘤(glioma)，作者運用電子顯微鏡及抗血球凝集抗體的方法證實了 JC 病毒的存在(11)。GiaRusso 及 Koeppen 兩人在 1978 年，從慢性淋巴性白血病(chronic lymphocytic leukemia)引發異常 PML 的患者中，發現該患者合併了中樞神經淋巴瘤(CNS lymphoma)，但是該患者的組織運用電子顯微鏡和免疫螢光染色法偵測時，均未發現病毒的存在(34)。除此之外，另有四位學者發表有關免疫抑制狀態下引發 PML 且合併中樞神經淋巴瘤的報導(25、42、56、109)。其中有兩份分別是 Egan 及 Ho 等人於 1980 年運用電子顯微鏡及免疫組織化學染色法偵測到乳多泡病毒(25、42)的報導。而另兩份則為 Liberski 等人(56)及 Williamson 等人(109)分別於 1982 年及 1989 年僅有 PML 之證據，但並未進一步偵測病毒存在與否。

有四個案例報告 PML 伴隨著神經膠源之腫瘤(11、38、86、91)，第一案例為前已述及由 Richardson 於 1961 年所發表。第二個案例是由 Castaigne 等人於 1974 年報告，同時有神經膠質瘤及 PML 之證據，而 JCV 以血液凝集方法及電子顯微鏡在 PML 的區域偵測到，但是在神經膠質瘤內卻無法偵測到病毒(11)，第三案例為 1983 年 Sima 等人從一位 67 歲死於支氣管肺炎患者中發現其合併惡性的星狀細胞瘤(astrocytoma)，運用電子顯微鏡觀察發現在寡突軸細胞(oligodendrocytes)及星狀細胞(astrocytes)內有乳多泡病毒的存在(91)。1992 年 Gullotta 等人在典型的 PML 患者中發現其合併神經膠質瘤(glioma)，運用原位雜交方式 in situ hybridization 偵測證實為 JCV(38)。以上相同的有兩個個案分別報告在沒有任何免疫抑制情況下，在 PML 病灶處以電子顯微鏡或原位雜交法均偵測到乳多泡病毒(91、38)。無論如何，此兩個案例只在 PML 病灶處之寡突神經膠細胞內偵測到病毒，而並沒有在腫瘤的星狀細胞內發現。

而 Renci 等人於 1996 年報告在有寡突膠細胞及星狀細胞混合的神經膠原腫瘤偵測到了 JCV (84)。而值得注意的是此個案為無免疫抑制狀態 HIV-1 陰性且無 PML 之患者，而分子機制的研究顯示病毒早期

蛋白 T-抗原之表達到了 mRNA 及蛋白質的層級。而病毒調控區的序列分析顯示與 JC Mad-4 種完全吻合。而用免疫組織化學染色法證實寡突狀神經膠細胞瘤的部份有超過百分之五十的細胞核染出陽性的 JCV T 抗原染色，但是在星狀細胞瘤的部份則否。此個案為第一個報告在免疫完全病人身上偵測到病毒 DNA、RNA 及蛋白質。

最近 1999 年 Krynska 等人(53)收集了 4 家醫院中 23 個小兒科患有髓質母細胞瘤(medulloblastoma)病患之檢體進行與 JCV 相關的研究，作者運用 PCR 的方法偵測，在 23 個病患檢體中有 20 個病患檢體(87%)含有 JCV T 抗原 C 端區域及 VP1 區域之序列。另外也以免疫組織化學染色法偵測 T 抗原在腫瘤組織細胞核內的表現，結果發現有 4 個患者的檢體有 T 抗原的表現。這些觀察均顯示小兒髓質母細胞瘤可能與 JCV 病毒的存在有其相關性(53)。而 Caldarelli-S 等人(9)也於 2000 年發表由 25 個神經膠源腫瘤(glial-derived tumor)中以 Nested PCR 方式偵測到 6 個腫瘤(4 個星狀細胞瘤(astrocytoma)1 個寡突神經膠細胞瘤(oligodendroglioma)及 1 個室管膜瘤(ependymoma))之 T 抗原區域的 DNA，而其中各有一個以 T 抗原免疫組織化學染色法呈現陽性反應，亦探討了 JCV 在腫瘤的病理過程(pathogenesis)之角色。

三、JC 病毒致癌分子機制

JCV 基因能依結構分成三個功能性區域，早期密碼區轉譯出調節蛋白 Large T 及 small t，晚期密碼區轉譯出結構蛋白 VP1、VP2、VP3 及 agnoprotein 及非密碼區或調節區包含病毒 DNA 複製起始點及轉錄控制區，而調節區內之 promoter，以相反方向調控早期基因及晚期基因之表現，並有不同的轉錄起始點在早期及晚期感染的 promoter 內(圖 1) (18、78)。在病毒 promoter 控制 T 抗原表現之轉殖基因老鼠能夠發展出不同的神經外胚層腫瘤及或低髓鞘表現型老鼠(44、93、100)，由此知道 T 抗原之重要性。病毒溶解循環是由病毒早期蛋白 T 抗原之表現開始，即 T 抗原在病毒複製前先行呈現，T 抗原是一個多功能的蛋白質(31)其能與許多宿主調控蛋白反應，然後調控接下來的病毒週期循環步驟，包括病毒 DNA 複製及晚期基因轉錄的活化，晚期基因的產物殼體蛋白質聚集在核內與複製的病毒 DNA 產生感染性病毒顆粒，然後再溶解宿主細胞，所以 T 抗原是病毒溶解循環的中心調控者。而其如何調控又與宿主細胞內之參與分子息息相關(31、78)此亦涉及了不

同種及特殊組織之細胞的局限性及趨向性等問題(27)，如 JCV 在神經膠源細胞的早期 promoter 之活性高於非神經膠源細胞(28、45、55、96)。也就是說藉由宿主細胞之 trans-acting cellular factors 包括 Tst-1、NF-1、Sp-1、GPi、NF-kB、YB-1 及 GF-1(12、13、14、27、41、46、47、50、61、79、81、82、87、96、106)認知在 JCV 的 non-coding regulatory region 內之特殊序列(31、61、78)如圖 2，以致達到誘導病毒早期及晚期基因之表達，尤其是 T 抗原，再行調控接下來的步驟，其包括行病毒複製溶解循環或潛伏調控宿主細胞(71、78)。

JCV T 抗原之核甘酸序列與 SV 40 T 抗原有百分之七十的相似性，其最大區域之不同為 C 端區域，主要負責與宿主區域之影響力，如圖 3(36)而許多 SV 40 T 抗原之功能亦証實與 JCV T 抗原相似，例如結合到 p53 及 pRb 等功能(31)。而此兩個生長調節蛋白在致癌過程(tumorigenesis)中扮演著非常重要的角色(23、24、59、94)。SV 40 T 抗原是一個多功能性的蛋白質包括了 ATPase 及解旋酶 helicase 功能，且可結合到 DNA、alpha 多聚合酶、細胞循環調節因子 p53 及 pRb 上。如圖 Fig 2，由於 SV 40 T 抗原的結合而改變了多項正常細胞的功能，從細胞培養及許多動物實驗上也証實了 SV 40 T 抗原的結合會導致細胞癌化之產生(30、57、62、73)。近來因轉殖基因老鼠技術之進步，而用以評估 JCV T 抗原的致癌性。Franks 等人(29)用了 JCV T 抗原 DNA 片段的轉殖基因老鼠，結果均發展出分化不良神經外胚層來源之腫瘤，而 T 抗原以 RT-PCR 方式偵測，發現幾乎在每一種組織均有表達，而僅在腫瘤組織才可偵測到 T-抗原蛋白質的層級表達。事實上由 JCV T 抗原誘導神經腫瘤之真正機轉一直未能全然揭曉，但藉由 co-immunoprecipitation 免疫沉澱分析知道 T 抗原與腫瘤抑制蛋白家族 p53(8、40)，p107(24)及 pRb(23)會產生相連結。最近學者即針對細胞訊息傳遞路徑研究，尤其是牽涉到細胞循環調節因子及腫瘤抑制因子的方面，由腫瘤組織中萃取所得之 T 抗原與 p53 是以連結的複合體型態存在著，與預測相吻合的偵測到低量的 p53 下游因子 p21/WAF1。再者蛋白 cyclin E 及其伴隨因子 cdk2 之量及活性上，腫瘤組織均比其它正常組織顯現較高的量(54)。最後，另一個重要的調節因子 Rb，發現與 T-抗原在磷酸化狀態下形成一複合形式(95)，同時釋放其伴隨因子 E2F，進而誘導增殖現象的產生。這些觀察所得，證實了一個可能的調控路徑如圖 4(54)，說明為何 JCV T 抗原能夠在生物體內引起

神經源腫瘤。當然 T 抗原所誘導腫瘤之方式由其它實驗如連接 P107(24)，或造成染色體傷害(3、72)，活化 Pax(51)等，推測不只一調控路徑，但無論如何轉殖基因研究的結果顯示 JCV 容易在神經細胞內促使病毒早期蛋白 T 抗原顯現。且證明了兩個路徑可能被誘導，一為導致中樞神經系統的脫髓鞘現象，一為導致神經源組織的不正常增殖現象如圖 5(33)。

四、研究的目的及意義

B 淋巴球為 JCV 攻擊目標細胞之一，它能使病毒複製且持續性的潛伏在細胞內(68、21)，並扮演著一運輸者的角色，所以 JCV 可藉由淋巴球傳輸至中樞神經系統(22、44)，且經由 PML 患者腦內發現 JCV DNA 的存在，進而證實其亦可潛伏於腦內(26、108)。其在免疫抑制狀態下是引起中樞神經系統致命性脫髓鞘疾病 PML 的主要因素(5、60)。但是在病毒與人類神經源腫瘤之間，卻仍無法清楚的界定明瞭其間的相關性。

我們已經知道 JC 病毒能對細胞培養有致癌之能力(30、62、74、80、98)，對實驗動物(倉鼠)的注射能產生各種腫瘤如(medulloblastoma)，原始型外胚層腫瘤(primitive neuroectodermal tumor)及星狀細胞瘤(astrocytoma)(73、69、103、104、110)。對人類以外之靈長類成猴及恆河猴之注射也會產生大腦神經質瘤(glioma)(57、83)。對轉殖基因老鼠除了脫髓鞘現象亦有腦瘤之產生(29、52、54、93、100)。除此之外，在人類的研究報告上，亦有 PML 患者伴隨著中樞神經系統腫瘤包括星狀細胞瘤(astrocytoma)寡突膠細胞瘤(oligodendroglioma)及中樞神經系統淋巴瘤(CNS lymphoma)(33)。同時且有兩案例是在沒有免疫抑制情況下發現 CNS 腫瘤與 JCV 相關連，包括了寡突膠細胞瘤(oligodendroglioma)及孩童的星狀細胞瘤(xanthoastrocytoma)(7、84)及最近研究小兒髓質細胞瘤(medulloblastomas)及神經膠源腫瘤(glial-derived tumors)亦評估其與 JCV 有其相關性(9、49、53)，這些發現再再顯示 JCV 除了在實驗動物之致癌機轉外，與人類的 CNS 腫瘤亦有其相關性。

JCV 不只見於 PML 病灶的星狀細胞或腫瘤相關處，事實上，它是在寡突膠細胞 lineage 內偵測到的。或許是因為受到 JCV 感染的細胞遭受病毒的破壞引起脫髓鞘現象，亦或是受 JCV 感染的細胞無法執

行病毒複製完成其生活循環，其可能用另外一種方式以適應於宿主體內。病毒早期蛋白 T-抗原，在非人類靈長類及倉鼠動物實驗模式中，並不呈現 JCV 複製現象及感染性病毒顆粒的產生，所以這些動物均無顯現出脫髓鞘現象，反而替代性的產生神經源的腫瘤。已知此致病機轉是由於早期蛋白在轉殖基因老鼠的腫瘤組織中連結到腫瘤抑制蛋白質 p53 及 RB，推測進而改變了細胞循環調節因子 p21/WAF-1、E2F-1 及 cyclins/cdks 的數量及活性(3、54)。在沒有寡突膠細胞的溶解破壞情況下，此類增加表達的 T 抗原干擾了正常生長控制機制，可能導致細胞的癌化且促進腫瘤的生長及分化。我們藉由免疫組織化學染色法分析 JCV 之腫瘤性 T 抗原，在人類各種非腫瘤性腦組織及腫瘤性腦組織之表現情形，以探討 JCV 在腦內潛伏活化情形是否改變了細胞生長的控制路徑及腫瘤形成之相關性。

材料與方法

一、標本來源:

由 86 年至 89 年臨床上有腦腫瘤及非腫瘤性病變之病患給予外科手術開刀，取出異常部份之腦部組織，共 56 個檢體作為組織切片診斷用。如(表二)平均年齡為 41 歲，男女比為 4:1.7，經由組織切片、H&E 染色，根據世界衛生組織(World Health Organization)(WHO)之分類，病理診斷的結果包含 20 個神經膠質瘤(gliomas)，5 個腦膜瘤(meningiomas)，2 個原始型外胚層腫瘤(primitive neuroectodermal tumors)，5 個神經鞘瘤(schwannomas)，2 個惡性淋巴瘤(lymphoma)，1 個神經肉瘤(gliosarcoma)，1 個神經元細胞瘤(gangliocytoma)及 11 個轉移性腫瘤(metastatic tumors)。9 個非腫瘤性腦組織，包括 4 個囊腫(abscess)，4 個動靜脈異常(arteriovenous malformation)，及 1 個神經膠細胞增生(gliosis)。

以經由 SV40 癌化之非洲綠猴腎細胞 COS7，其能持續表達 T 抗原，做為 L-T 免疫組織化學染色之 positive control 及經由 adenovirus type 5 癌化之人類胚胎腎細胞 293 其不表達 T 抗原，做為 L-T 免疫組織化學染色之 negative control。

二、樣本處理:

外科切取之腦組織，將組織浸泡於 10% neutral buffered formalin 中固定，然後脫水、浸潤、包埋及切片，最後作 H&E stain(Hematoxylin and Eosin)及 IHC stain (immunohistochemistry stain)。處理步驟及染色的方式分述如下:

1. 固定(fixation):

外科切取之腦組織立即放入 10% neutral buffered formalin 中固定 24 小時以上，切成 0.5x0.5x0.3 mm 大小，置入包埋盒

中，以連續水流沖洗以去除福馬林。

2. 脫水(*dehydration*):

將沖掉福馬林包埋盒用吸水紙吸掉多餘的水份，進行以下的脫水步驟(1)80%酒精一小時(2)95%酒精 I 一小時(3)95%酒精 II 一小時(3)95%酒精 III 一小時(4)100%酒精 I 一小時(5)100%酒精 II 一小時(5)100%酒精 III 一小時。

3. 浸潤(*infiltration*):

浸潤的目地在使石蠟進入組織空隙以便切取，但是酒精和石蠟無法互溶，二甲苯可和石蠟互溶並且可脫除酒精因此在浸潤石蠟前先用二甲苯脫除酒精步驟如下:(1)二甲苯(xylene)I 一小時(2)二甲苯(xylene)II 兩小時(3)55°C 石蠟 I 兩小時(4)55°C 石蠟 II 一個半小時(5)55°C 石蠟 III 兩小時。

4. 包埋(*embedding*):

將浸潤完全的腦組織自包埋盒內取出，放於包埋模中央，將石蠟加入模內覆蓋組織，利用原包埋盒置於模子上，再加入少許石蠟使腦組織包埋完全，將包埋好的石蠟塊放置於-20°C 冰盤上，等石蠟凝固後取下包埋模子，完成包埋工作。

5. 切片(*section*):

將包埋好的腦組織蠟塊固定於組織切片機(*microtome*)上，調整切片刀和蠟塊之距離，先以約 20 μ m 的厚度粗切至腦組織面，調為 5 μ m 細切，將切下之組織薄片放於冷水使攤平，用玻片撈起放入 45°C 水浴中，使切片完全展開，將展開之切片用玻片撈起做 HE 染色用，用塗上特殊成份的玻片(*silane coated slide*)撈起組織片作為免疫組織化學染色用。染色前置於 63°C 烤箱溶蠟。

6. 染色(stain):

A. *Hematoxylin and eosin stain*:

經 15 分鐘烘片後取出玻片置於三道二甲苯各 5 分鐘做脫蠟處理，脫完蠟後運用降濃度酒精從 100%兩道 95%兩道，85%，75%各 10 秒藉以脫除二甲苯，之後水洗約 3 分鐘，接著先染細胞核，放入蘇木精(Hematoxylin)溶液染 2-5 分鐘。(時間可長可短，視蘇木精溶液新鮮與否而定)。以水稍微沖洗。浸入氫水(水 1000 ml 中滴入氫水 2 滴)約 5 秒。玻片置於流水中沖洗，至少須 15 分鐘。之後放入染伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘，用以染細胞質。之後依次通過 80%，90%，95%，酒精。最後移入 100% 酒精、二甲苯:100% (1:1)5 分鐘，二甲苯兩道各 5 分鐘。之後用封片膠封片。

B. *Immunohistochemistry stain (IHC)*:

經 55°C 隔夜烘片後取出玻片置於三道二甲苯各 5 分鐘做脫蠟處理，脫完蠟後運用降濃度酒精從 100%兩道 95%兩道，85%，75%各 10 秒藉以脫除二甲苯，之後切片以水沖洗 10 分鐘。然後又置於蒸餾水中 5 分鐘潤濕。將切片移至 Tris-Buffered Saline (TBS) 中 5 分鐘。將 Citrate buffer (0.01M citric acid monohydrate, 2M NaOH pH6.0, 0.1% NP40(nonidet-P40)) 以微波爐加熱至沸騰；約 5 分鐘。將已脫蠟完全的切片移至煮沸中的 citrate buffer，再繼續加熱 5 分鐘。加入 5-20 ml 蒸餾水，再放入微波爐加熱 5 分鐘。取出，待其自動降至室溫。玻片取出後以蒸餾水沖洗。用 Tris buffer 潤濕 5 分鐘。用 3% H₂O₂ 用以去除內生性過氧化酶。將玻片取出後以蒸餾水潤濕 5 分鐘。浸於 TBS buffer (含 0.05% Tween 20) 中 5 分鐘。玻片取出擦拭多餘水份。加入 10% goat non-immune serum blocking 溶液 (Zymed Histostain-Plus Bulk kits, USA) 進行 blocking 10 分鐘。之後甩掉 blocking serum，不須沖洗。加入 primary antibody 反應 60 分鐘。Primary antibody 包括:

Monoclonal antibodies to SV40 T-antigen, cross-reacts with JCV T antigen (1:50 dilution, pAb416; Oncogene science); Monoclonal mouse anti-proliferating cell

nuclear antigen(PCNA)(1:50 dilution, clone PC 10 ; DAKO) ; Monoclonal mouse anti-human glial fibrillary acidic protein (GFAP)(1:50 dilution, clone 6F2 ; DAKO); Monoclonal mouse anti-human leucocyte common antigen (LCA) (1:50 dilution, clone PD7/26&2B11; DAKO); Monoclonal mouse anti-human cytokeratin(CK) (1:100 dilution, clone BA17; DAKO) ; Monoclonal mouse anti-human epithelial membrane antigen (EMA)(1:50 dilution, clone E29; DAKO)

將玻片取出後以蒸餾水輕輕沖洗。浸於 TBS buffer 中 5 分鐘。再浸於 TBS bufferr (含 0.05% Tween 20)中 5 分鐘。玻片取出擦拭多餘水份。加入 Biotinlated second Antibody(Zymed Histostain-Plus Bulk kits, USA)反應 20 分鐘。將玻片取出後以蒸餾水輕輕沖洗。將玻片取出後浸於 TBS buffer 中 5 分鐘。再浸於 TBS bufferr (含 0.05% Tween 20)中 5 分鐘。玻片取出擦拭多餘水份。加入 Streptavidin-labelled peroxidase (Zymed Histostain-Plus Bulk kits, USA)反應 20 分鐘。將玻片取出後以蒸餾水輕輕沖洗。將玻片取出後浸於 TBS buffer 中 5 分鐘。再浸於 Tris buffer(含 0.05% Tween 20)中 5 分鐘。玻片取出擦拭多餘水份。加入 30 分鐘內泡製之 diaminobenzidine solution(DAB, 0.01% final concentration)及 H_2O_2 (0.012% final concentration)呈色劑室溫下反應 2-10 分鐘。以蒸餾水終止反應，輕輕沖洗、浸泡組織片 5 分鐘。Hematoxylin (Mayer's Hematoxylin) 做為背景染色，30 秒-1 分鐘。以緩緩流動水輕輕沖洗、浸泡組織片 15 分鐘。用濾紙吸乾多餘水份，經 100%酒精再脫水，再用濾紙吸乾多餘水份，放入二甲苯內 5 分鐘，用封片膠封片。

結果

先前有許多報告表示 PML 患者往往伴隨著中樞神經系統的腫瘤(33)。或沒有免疫抑制情況下發現 CNS 腫瘤與 JCV 具有關連性(7、84)。這些發現再再顯示 JCV 除了在實驗動物之致癌機轉外和人類的 CNS 腫瘤的確有其相關性。我們收集到的腦病變組織共有 56 個(表二)，經由組織切片、Hematoxylin & Eosin 染色，再由病理專科醫師根據世界衛生組織(World Health Organization) (WHO)分類，依其組織形態病理變化及免疫組織化學染色做為病理診斷，其形態特徵及免疫組織化學染色結果均見述於附圖。其結果包含 T 抗原 positive control COS7 細胞及 negative control 293 細胞(圖 6)，20 個神經膠質瘤(gliomas)(圖 7、8)，5 個腦膜瘤(meningiomas)(圖 9)，2 個原始型外胚層腫瘤(primitive neuroectodermal tumors)(圖 10)，5 個神經鞘瘤(schwannomas)，2 個惡性淋巴瘤(lymphoma)(圖 11)，1 個神經肉瘤(gliosarcoma)，1 個神經元細胞瘤(gangliocytoma)及 11 個轉移性腫瘤(metastatic tumors)(圖 12)，9 個非腫瘤性腦組織，包括 4 個囊腫(abscess)(圖 13)，4 個動靜脈異常(arteriovenous malformation)，及 1 個神經膠細胞增生(gliosis)(圖 14)。我們以免疫組織化學染色染腫瘤抗原 T 蛋白，其結果如表三，在腫瘤組織方面，20 個神經膠質腫瘤(gliomas)中有 7 個呈陽性反應(圖 7、8)。在 5 個神經鞘瘤(schwannomas)中有 2 個呈現陽性反應(圖 10)。在 11 個轉移性腫瘤(metastatic tumors)中有 3 個呈現陽性反應(圖 12)。神經膠肉瘤(gliosarcoma)及神經元腫瘤(gangliocytoma)均呈陽性反應。而 5 個腦膜瘤(meningioma)、2 個原始型外胚層瘤(primitive neuroectodermal tumors)及 2 個惡性淋巴瘤(lymphoma)均呈陰性反應(圖 9、11)。在 9 個非腫瘤性腦組織中 2 個囊腫 abscess(圖 13)及 1 個神經膠細胞增生(gliosis)(圖 14)的組織中有些星狀細胞 astrocyte 呈陽性反應。

討論

我們已經知道 JC 病毒對培養的細胞有致癌之能力(30、62、74、80、98)，對嚙齒類實驗動物的注射也能產生各種腫瘤如(medulloblastoma)，原始型外胚層腫瘤(primitive neuroectodermal tumor) 及星狀細胞瘤(astrocytoma)(69、73、103、104、110)。對人類以外之靈長類成猴及恆河猴之注射也會產生大腦神經質瘤(glioma)(57、83)。對轉殖基因老鼠除了脫髓鞘現象外也會造成腦瘤(29、52、54、93、100)。除此之外，在人類的研究報告上，亦有 PML 患者伴隨著中樞神經系統的腫瘤包括星狀細胞瘤(astrocytoma)寡突膠細胞瘤(oligodendroglioma)及中樞神經系統淋巴瘤(CNS lymphoma)(33)。同時也有兩個案例包括寡突膠細胞瘤(oligodendroglioma)及孩童的星狀細胞瘤(xanthoastrocytoma)(7、84)是在沒有免疫抑制情況下發現 CNS 腫瘤與 JCV 的相關性。最近在研究小兒髓質母細胞瘤(medulloblastoma)及神經膠源腫瘤(glial-derived tumors)方面亦評估其與 JCV 有其相關性(9、53)。這些發現再再顯示 JCV 除了在實驗動物之致癌機轉外與人類的 CNS 腫瘤的確有其相關性。

中樞神經系統的腦瘤比率不超過 2%，其發生原因不明。根據流行病學的研究知道 JCV 在人類族群中是一個高感染比率的病毒。所以我們想探討 JCV 與腦病變組織之相關性及其所扮演的角色。我們所得到的檢體染色處理後經病理診斷結果包含原發性腫瘤組織 36 個，轉移性腫瘤 11 個及 9 個非腫瘤性腦組織。

我們以免疫組織化學染色法染腫瘤抗原 T 蛋白，其結果如表三，腫瘤組織方面，陽性反應者為源自於神經膠質性衍生之腫瘤(glial-derived tumor) 11 個(11/29)，轉移性腫瘤(metastatic tumors) 3 個(3/11)及非腫瘤性腦組織 3 個(3/9)，非神經膠質性衍生腫瘤(non-glial-derived tumor) 7 個則均為陰性反應。由以上結果可看出所有 29 個原發性腦腫瘤中有 11 個在腫瘤細胞內為陽性反應(38%)。這些均屬於神經膠質性衍生之腫瘤細胞，其中髓質母細胞瘤、星狀細胞瘤免疫染色結果為陽性反應，和先前文獻報導之結果相一致(9、53)。而神經鞘瘤(schwannomas)陽性反應雖無文獻報導，但是卻是已知 JC 病毒在培養的人類胚胎神經鞘細胞(Human fetal schwann cells)能 multiplication(2)。而神經膠肉瘤及神經元腫瘤雖無文獻報導，亦屬於神經膠質性衍生之腫瘤細胞，也是有可能受 JC 病毒感染並進行癌化。而有兩個原始型外胚層腫瘤(primitive neuroectodermal tumor)屬於陰性反應，其雖屬於神經膠質性衍生之腫瘤細胞，及其他文獻曾報導

可發現陽性反應(19、25、33)，但也許檢體數量太少，僅只有兩個因此未發現之故，而五個腦膜瘤(meningioma)則均屬陰性反應(圖 9)，由於腦膜瘤(meningioma)之細胞來自於硬腦膜細胞而不屬於神經膠質性衍生之細胞，所以或許可解釋均呈現陰性反應之故，所以以上呈現陽性反應者均屬於神經膠源之細胞。而有趣的是轉移性腫瘤也有 3 個陽性反應，這亦涉及其原發部位腫瘤之來源，值得進一步探討原發部位是否有 JCV 之存在或 T 抗原表現，若無這些現象，則可能是轉移癌侵襲腦部後刺激腦內神經細胞之 JC 病毒活化，亦或是加成癌化作用。若原發部位即存在著 JC 病毒，那有可能是攜帶 JC 病毒侵襲而至。綜合以上原因腫瘤細胞呈現 T 抗原，其相關性自不在話下，但進一步探討實不能免。

而更有趣的是在 9 個非腫瘤性腦組織中 2 個囊腫(abscess)組織及 1 個神經膠細胞增生(gliosis)的組織中在星狀細胞(astrocyte)均呈現陽性反應(圖 13、14)。目前在非腫瘤方面尚無這類報導，但是在 1983 年 Sima 等人(91)，曾報導由一位 67 歲患有 PML 及星狀細胞瘤(astrocytoma)患者發現非腫瘤性的正常星狀細胞及 oligodendrocyte 內發現 papovarius 的證據，反而腫瘤性星狀細胞並沒有發現乳多泡病毒。所以正常的星狀細胞(astrocyte)亦有可能有 T 抗原的活化表現。

從免疫組織化學染色 T 抗原陽性反應的結果可顯示並非所有的腫瘤細胞均有 T 抗原的反應，或許 JCV T 抗原的呈現已經結束了，所以沒有 T 抗原的表現，但並非所有的腫瘤細胞均如此，根據這個觀察與先前 Krynska 等人在轉殖基因老鼠表現 T 抗原誘導腫瘤的實驗(52)，及偵測小兒髓質母細胞瘤(pediatric medulloblastomas)的病毒腫瘤蛋白(53)，所呈現的結果也是如此，也許並非所有的腫瘤細胞均可能產生 T 抗原，依此有一可能為在腦瘤的發展當中 T 抗原扮演了一個打帶跑的角色(hit-and-run)，T 抗原之呈現誘導一連續性的訊息路徑導致癌症之產生，當細胞被引導產生非控制性的增殖，T 抗原的產生或許不再須要也或許達到終點。而另外一個可能是敏感度的問題，包括腦組織檢體經過固定脫水浸蠟等處理或許某種程度的抗原蛋白流失，或許 T 抗原表現量沒有達到偵測之閾值，此兩種外在或本身之因素而無法呈現陽性反應。未來進一步的研究，可能需採取新鮮的檢體，運用冷凍切片的技術切取組織先行測定 T 抗原，以避免 T 抗原的流失。另外亦可運用轉殖基因的技術使培養的細胞癌化，依時間差來研究 T 抗原表現的位置和量的變化，以瞭解 T 抗原所扮演的角色。

有許多證據證明不同的 JCV strain 產生不同的病理變化，而其較有意義的分類在於其不同的轉錄調控區 transcriptional control region (TCR) 序列，因為此區域能控制產生不同的表達情形，而不同的表達情形正控制著其走向，病毒複製或潛伏路徑，也就是其不同病理變化，如 Mad-1 可由正常的腦組織及 PML 的腦組織偵測到。而 Mad-4 可由人類及動物之神經膠原腫瘤 (glial tumor) 分離出 (75)。為了瞭解不同的 JCV strain 是否導致腦瘤之產生進一步的分析 TCR 的序列，也是可以做為繼續探討的目標。還有探討病毒能否正常的組裝殼體蛋白 (encapsidation)，如 Rencic 等人 (84) 由寡突星狀細胞瘤分離之 JCV，在 Agnoprotein 的基因序列上有一突變，而此一 8-Kda 的病毒晚期蛋白質，在 SV40 的殼體蛋白質 VP-1-3 中為組裝殼體蛋白而扮演了重要的角色 (10、48)。Agno 基因的突變可能阻礙了病毒的完整溶解循環。若無法正常 encapsidation 而導致僅走向和細胞各項因子作用而引起腦瘤或許也有可能，所以針對陽性檢體進一步的 DNA 序列分析將是進一步的研究。

我們也觀察到 JCV 抗原能在腫瘤細胞中出現，而 T 抗原會經由與腫瘤抑制蛋白 p53 與 pRB 之結合，而降低對 cyclin/Cdk 等調節之功能 (54、101)，或產生染色體傷害 (72) 及活化 Pax (51) 或其它基因，所以 T 抗原的確經由不同路徑誘導了細胞的生長，而更深入的探討則有賴分子生物技術之運用與分析，包括用 Western blot 探討其它結合之覆合物以瞭解其作用機轉，使用高敏感度的 PCR 或 RT-PCR 等。然而在獲取技術上卻不容易，因為必須面對這高感染比率的病毒，在腫瘤細胞與週邊的非腫瘤細胞之間不互相污染來源，所以也有賴 in situ hybridization。然而要顧及位置與靈敏度則須更進一步的用 in situ PCR。

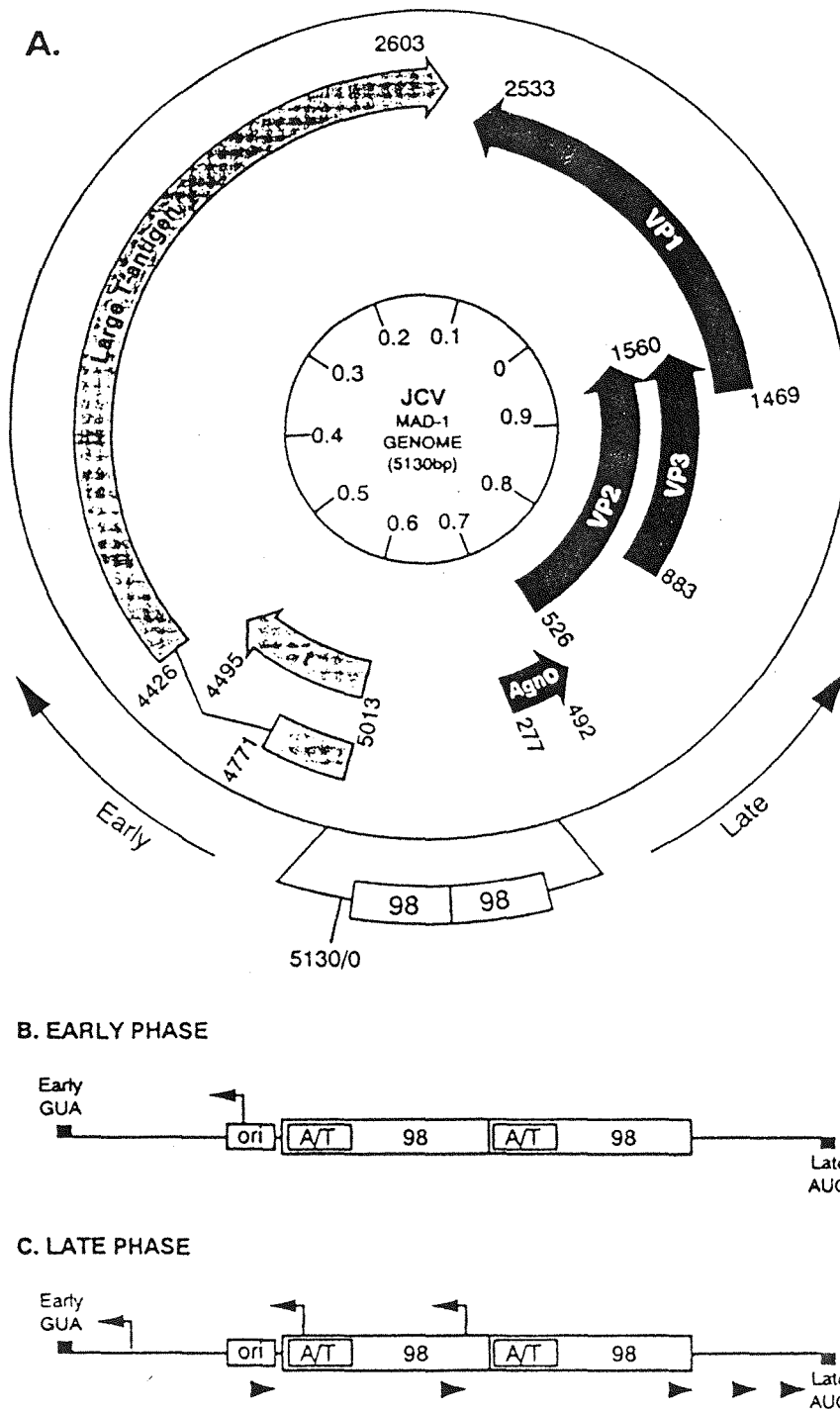


圖 1. 人類嗜神經性病毒 JCV Mad-1 strain 的基因圖。(A) 圖內圈由 EcoRI 切點 0.0 起依序代表基因圖位置。著色箭號代表基因序列區轉錄成各種病毒蛋白。號碼表示其基因之位置。最外圈空白框處為病毒轉錄控制區亦稱調節區。(B)圖及(C)圖描繪早期及晚期之轉錄起始位置。本圖摘自 Raj 等人(78)。

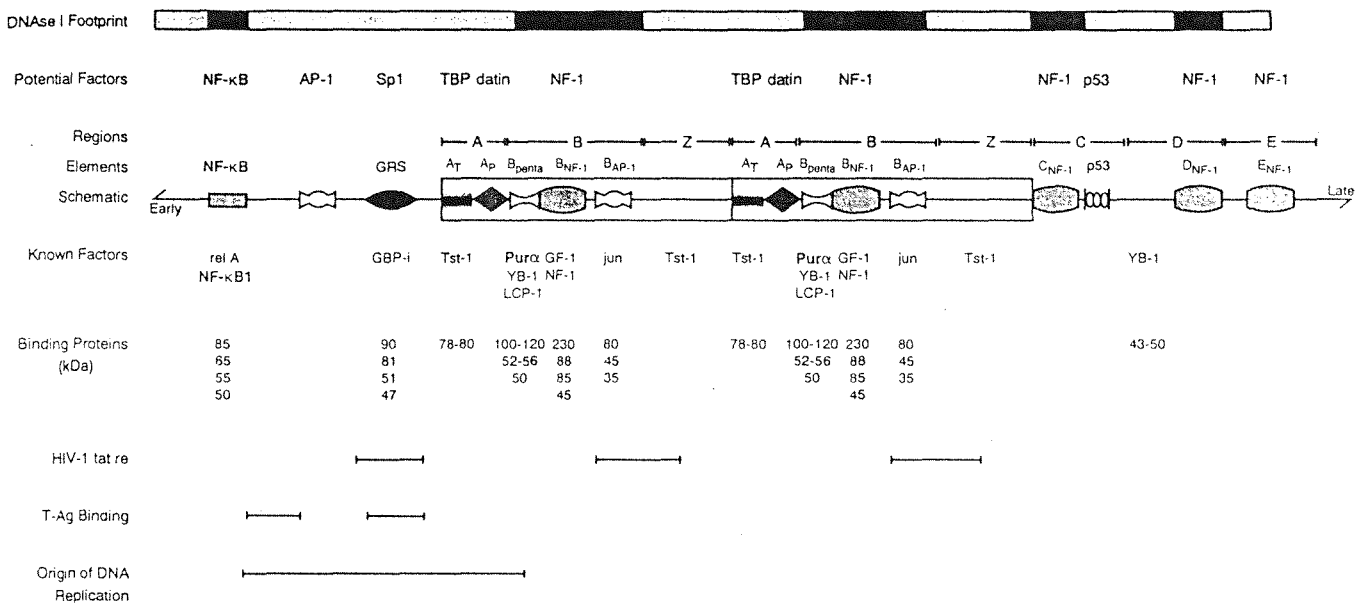


圖 2.人類嗜神經性病毒 JCV 轉錄控制區(TCR)之構造區域圖。中間方塊框框處為病毒 promoter 區域，有兩個 98base pair 的重覆序列，另有潛在及已知的轉錄因子結合位置。其它外加的 elements 包括 HIV-Tat-responsive elements(TAR)及 T-抗原結合位置，以及 DNA 複製起始位置。本圖摘自 Raj 等人(78)。

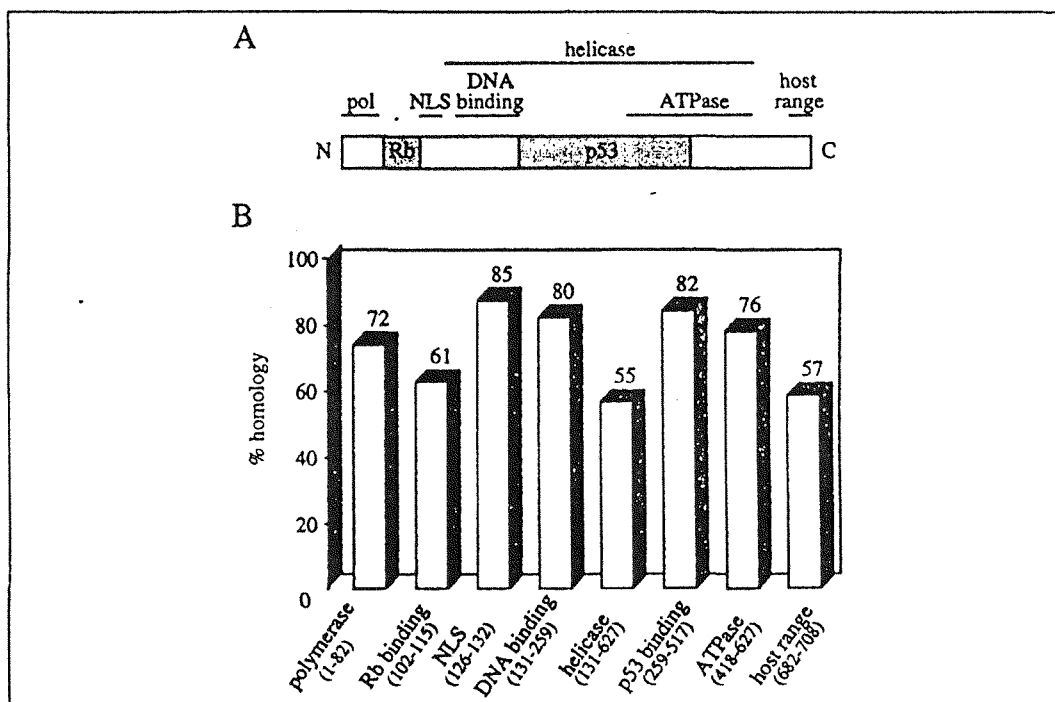


圖 3. SV40 及 JCV T 抗原之多樣功能及相似序列簡圖。A 圖顯示 SV40T 抗原的各種功能性區域，包括 Rb 及 p53 binding domains。B 圖為 SV40T 抗原及 JCV T 抗原之相似序列百分比。圖下數字表示每一 domain 的胺基酸相關位置。簡寫 pol 為 polymerase，NLS 為 nuclear localization signal。本圖摘自 Gordon 等人(36)。

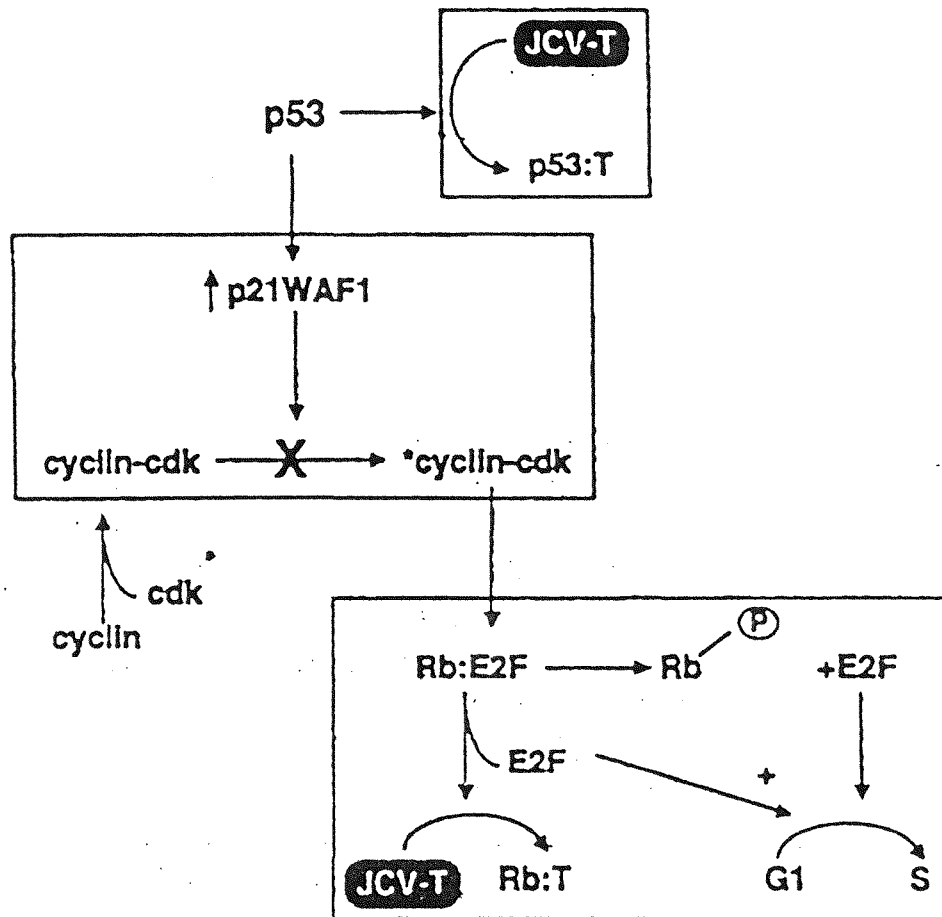


圖 4. 實驗動物模式中 JCV T 抗原誘導腫瘤之可能調控路徑。本圖摘自 Krynka 等人(54)。Wild type p53 能夠促進 cyclin kinase(含 cyclin E、A 及相關 kinase)的抑制調控者 p21WAF-1 的轉錄作用，降低了 cyclin:kinase 的能力使維持 pRb 在低磷酸化的狀態下不釋放出 E2F-1，使細胞週期不進入 S phase。而 JCV T 抗原與 p53 相連結降低了 p53 調控 p21WAF-1 的能力，此外，JCV T 抗原與 pRb 相連結或可由 pRb:E2F-1 複合體釋放出 E2F-1 而使 E2F-1 誘導 S-phase-specific gene 的轉錄作用。

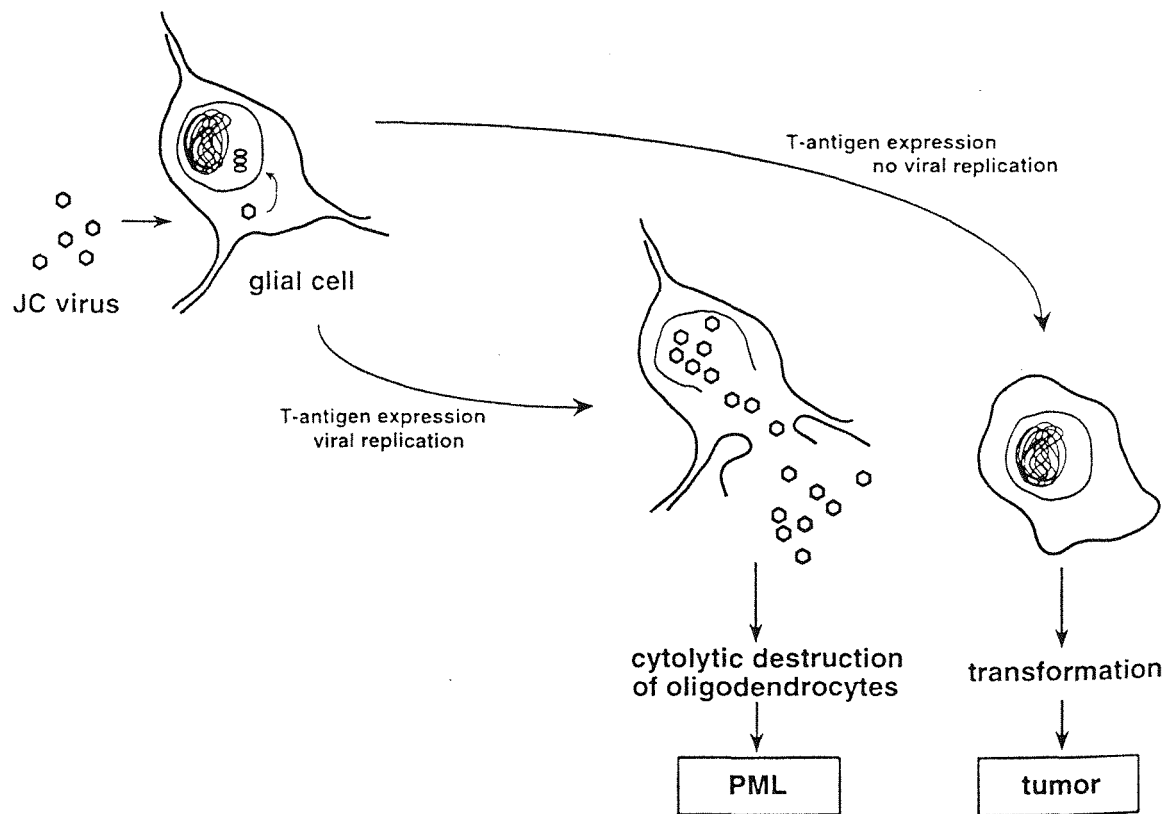
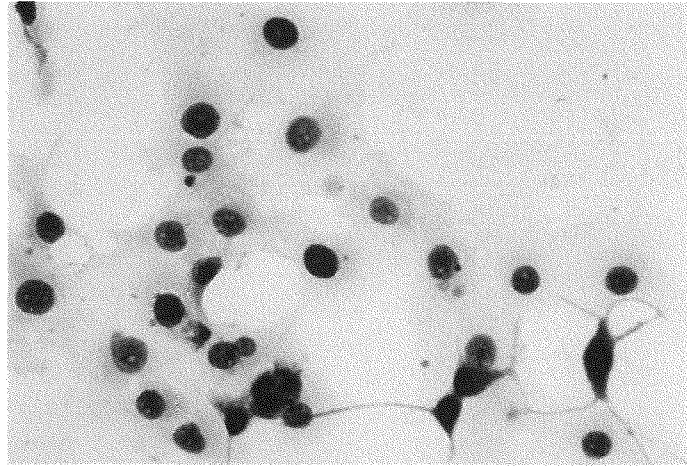


圖 5. 人類嗜神經性病毒 JCV 誘導致命性去髓鞘疾病 PML 及 CNS 神經膠源腫瘤之潛在性兩路徑之繪圖。JCV 感染後由早期蛋白 T 抗原調控病毒複製及溶解破壞，使 CNS 的髓質生產細胞，寡突膠細胞溶解破壞而導致去髓鞘現象的病灶。另外，在 T 抗原表現而無病毒複製情形可能導致細胞機制的改變而致癌變之產生。本圖摘自 Gallia 等人(33)。

A



B

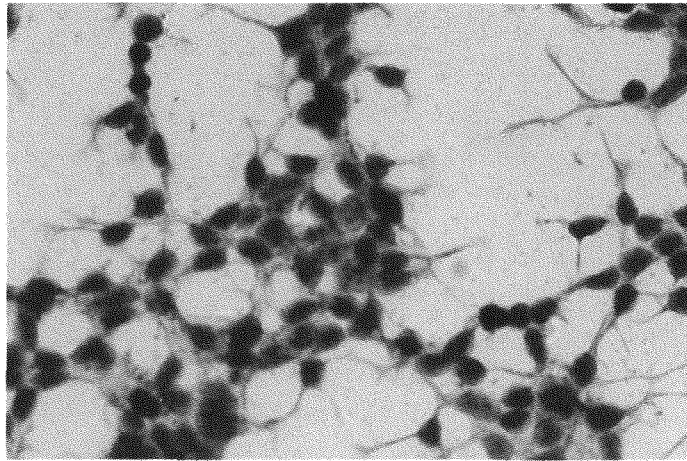
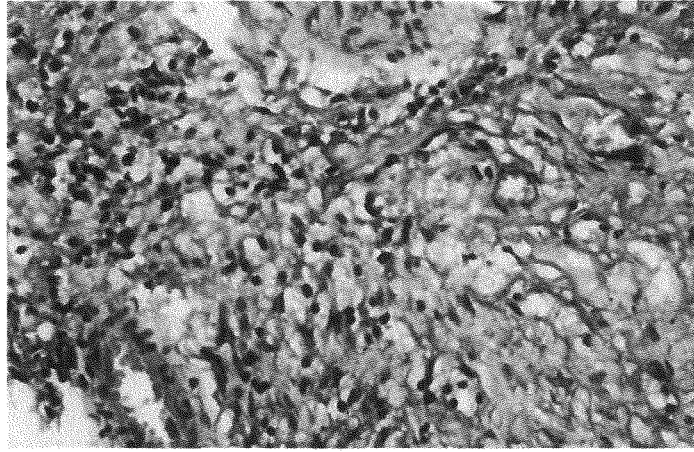
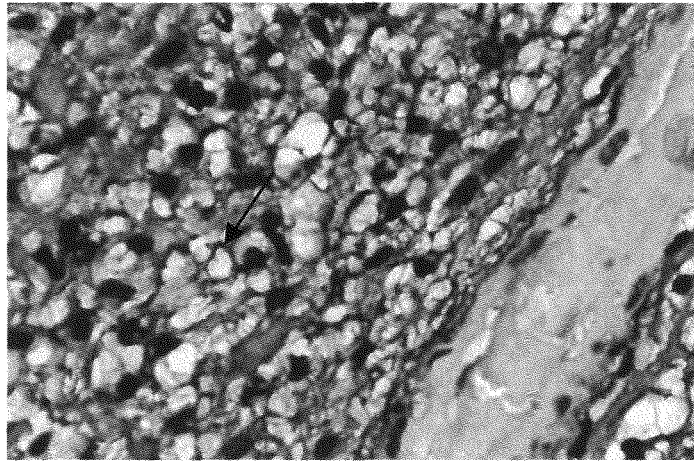


圖 6 非洲綠猴癌化腎細胞 COS7 及人類胚胎癌化腎細胞 293 之 L-T 免疫組織化學染色圖。A 圖為經由 SV40 癌化之猴腎細胞持續表達 T 抗原，在以 L-T 免疫組織化學染色產生之陽性反應做為 positive control(200X)。B 圖為經由 adenovirus type 5 癌化之人類胚胎腎細胞，不表達 T 抗原，再以 L-T 免疫組織化學染色產生之陰性反應做為 negative control(200X)。

A



B



C

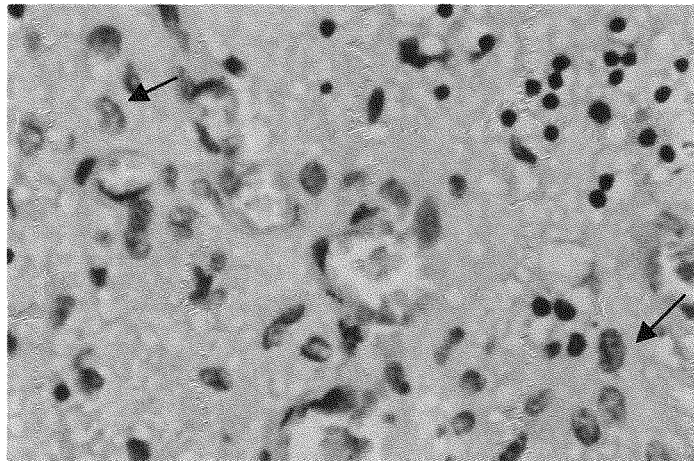


圖 7.星狀細胞瘤 Astrocytoma H&E 染色的組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示為不規則形狀的惡性細胞(anaplastic and neoplastic tumor cells)具有嗜伊紅性細胞質，空泡狀不規則的細胞核(vesicular nucleus)(200X)。B 圖顯示 glial fibrillary acidic protein(GFAP)免疫組織化學染色，箭號標示處為腫瘤細胞呈陽性反應(400X)。C 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，箭號標示陽性反應處為腫瘤細胞核(400X)。

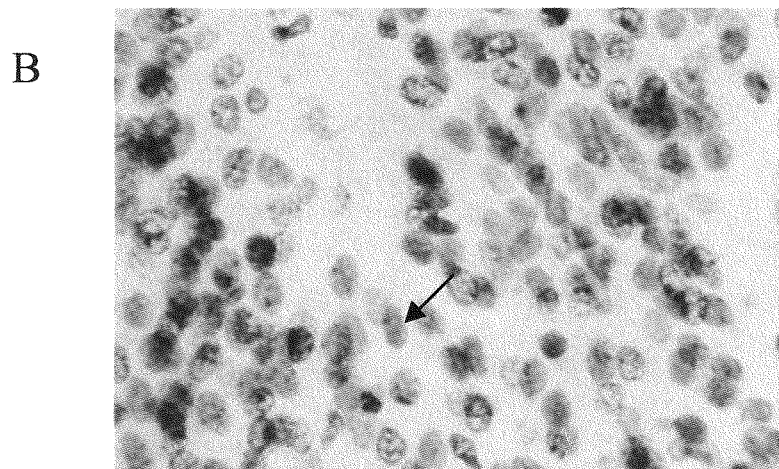
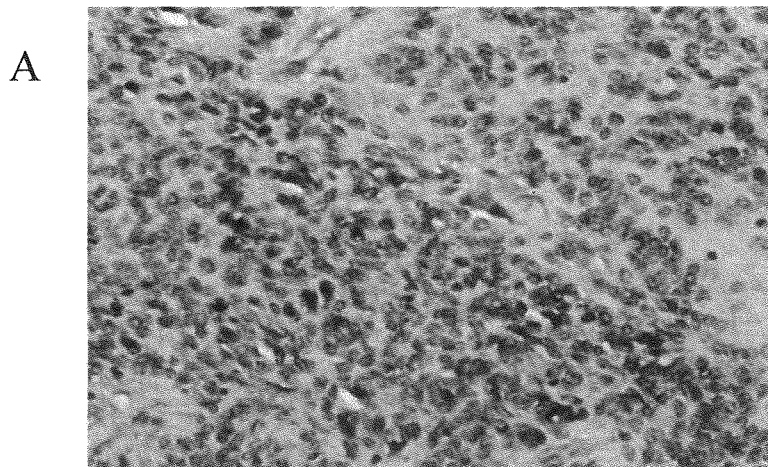
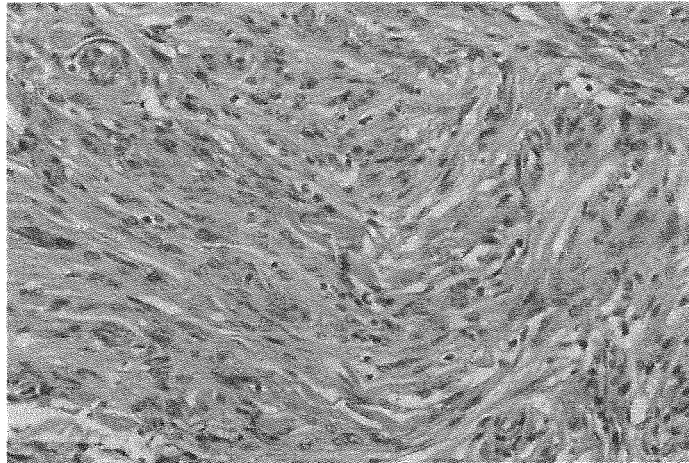
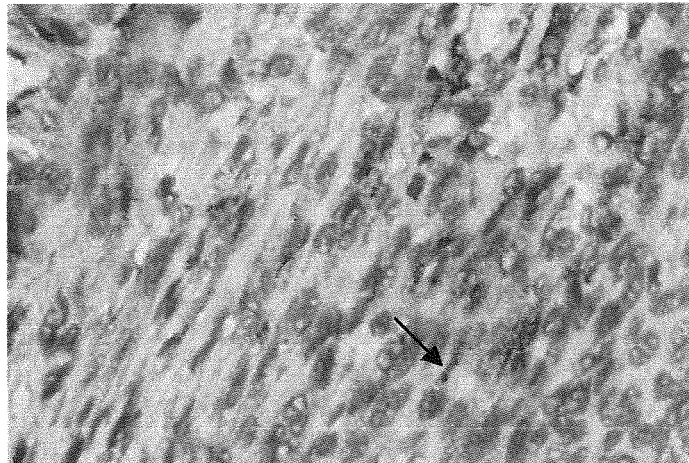


圖 8. 髓質母細胞瘤 Medulloblastoma H&E 染色的組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示惡性特徵大小形狀較一致之腫瘤細胞，胡蘿蔔形的細胞核圓而濃染，高的 nuclear-to-cytoplasmic (N/C)核質比、常聚集成簇，呈放射形如花圈 (rosette)(200X)。B 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，箭號標示陽性反應處為腫瘤細胞核(400X)。

A



B



C

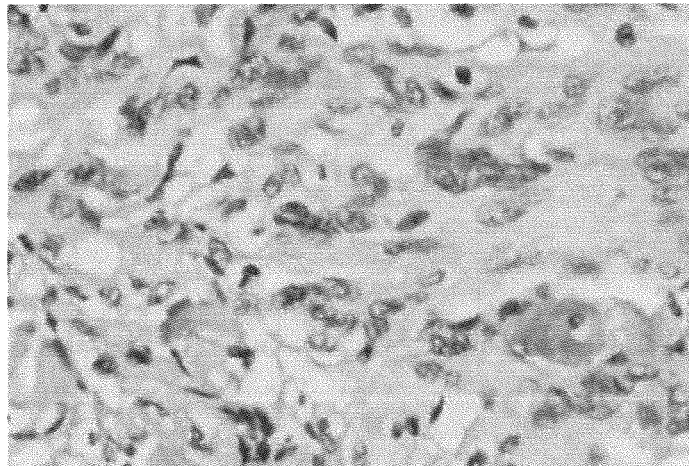


圖 9. 腦膜瘤 Meningioma H&E 染色的組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示惡性特徵腫瘤細胞為卵圓形具豐富細胞質，或 spindle shape 之腫瘤細胞 (200X)。B 圖顯示 epithelial membrane antigen (EMA) 免疫組織化學染色，箭號標示處為腫瘤細胞呈陽性反應 (400X)。C 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，腫瘤細胞呈現陰性反應 (400X)。

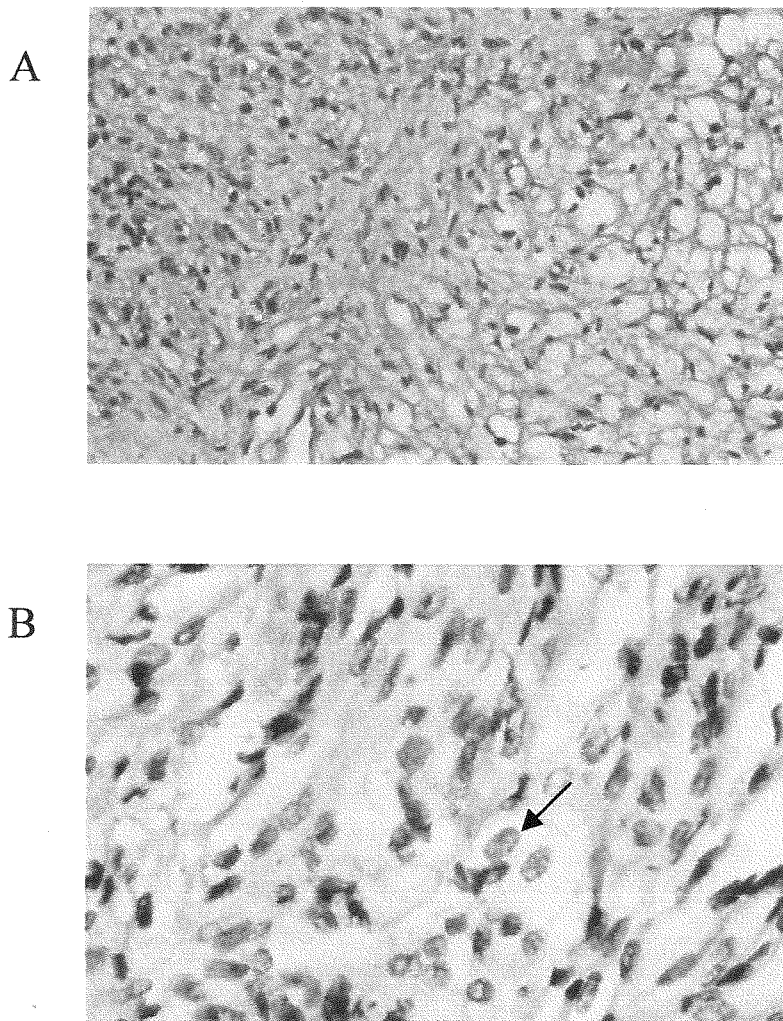


圖 10. 神經鞘瘤 Schwannoma H&E 染色的組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示高細胞區核並排(nuclear palisading)成 verocay body 及細胞稀疏處有 myxoid stroma(200X)。B 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，箭號標示陽性反應處為腫瘤細胞核(400X)。

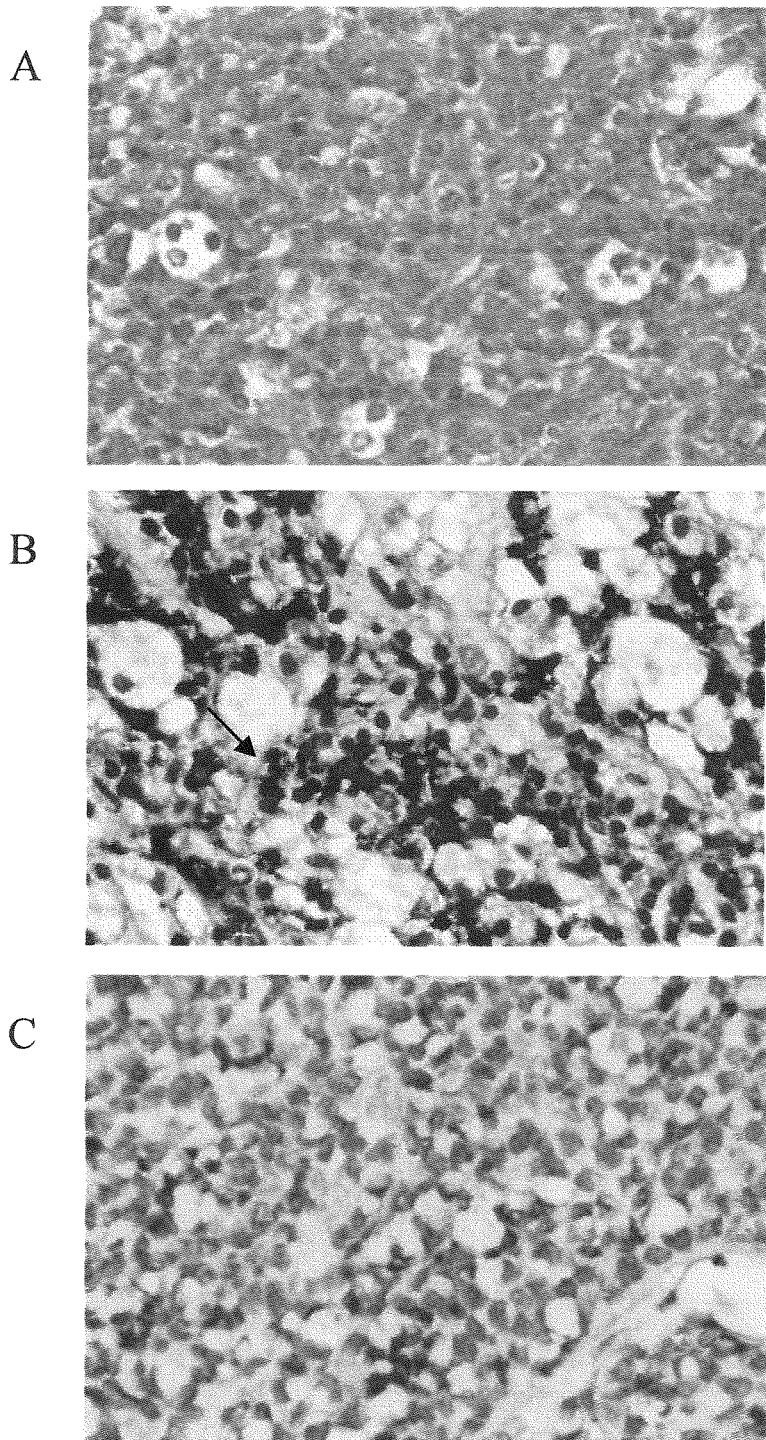


圖 11. 惡性淋巴瘤 Malignant lymphoma H&E 染色的組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示惡性淋巴細胞浸潤腦組織(400X)。B 圖顯示 leucocyte common antigen (LCA)免疫組織化學染色，箭號標示處為腫瘤細胞呈陽性反應(400X)。C 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色細胞核呈現陰性反應(400X)。

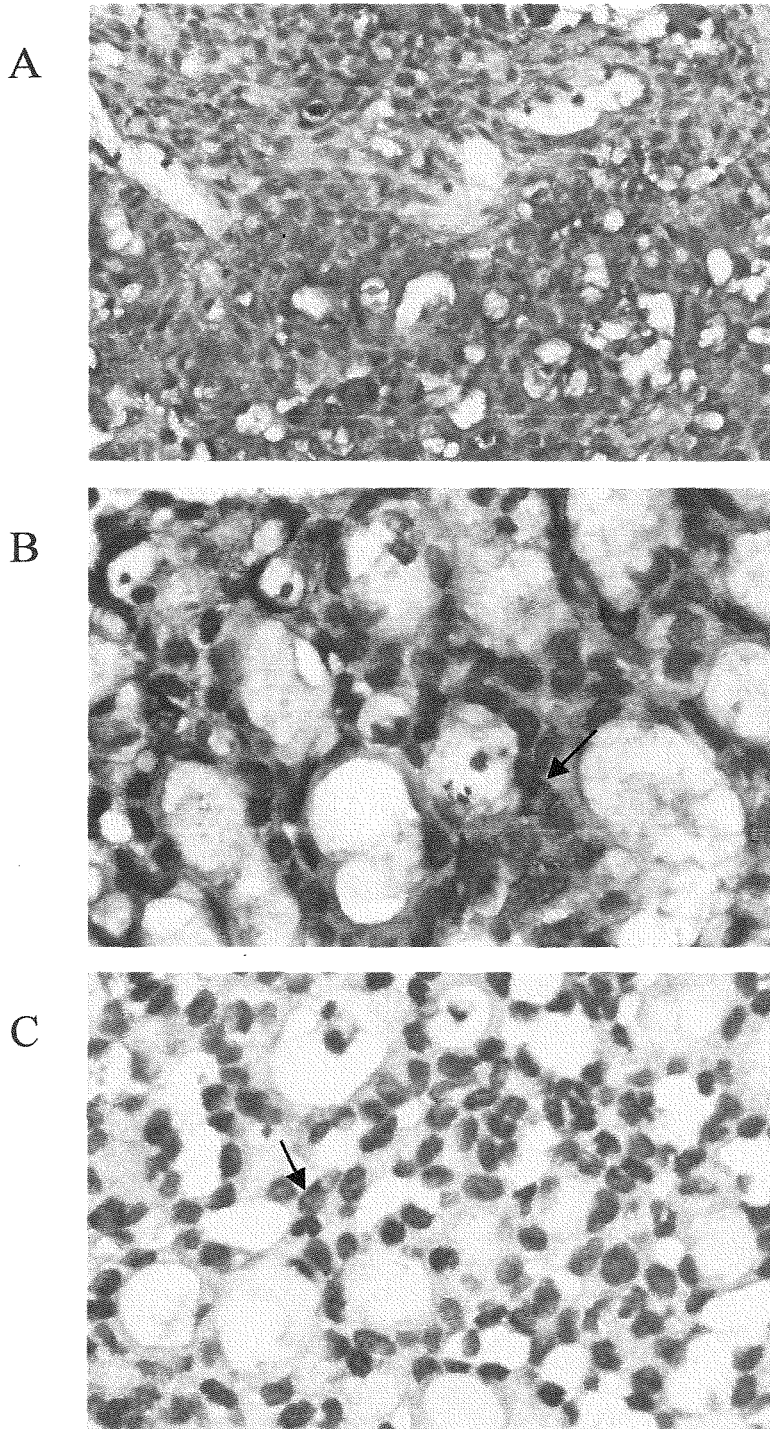


圖 12. 轉移腺瘤 Metastatic adenocarcinoma H&E 染色的組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示外來性成腔狀(luman)排列之腫瘤細胞(200X)。B 圖顯示 cytokeratin(CK)免疫組織化學染色，箭號標示處為陽性反應(400X)。C 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，箭號標示陽性反應處為腫瘤細胞核(400X)。

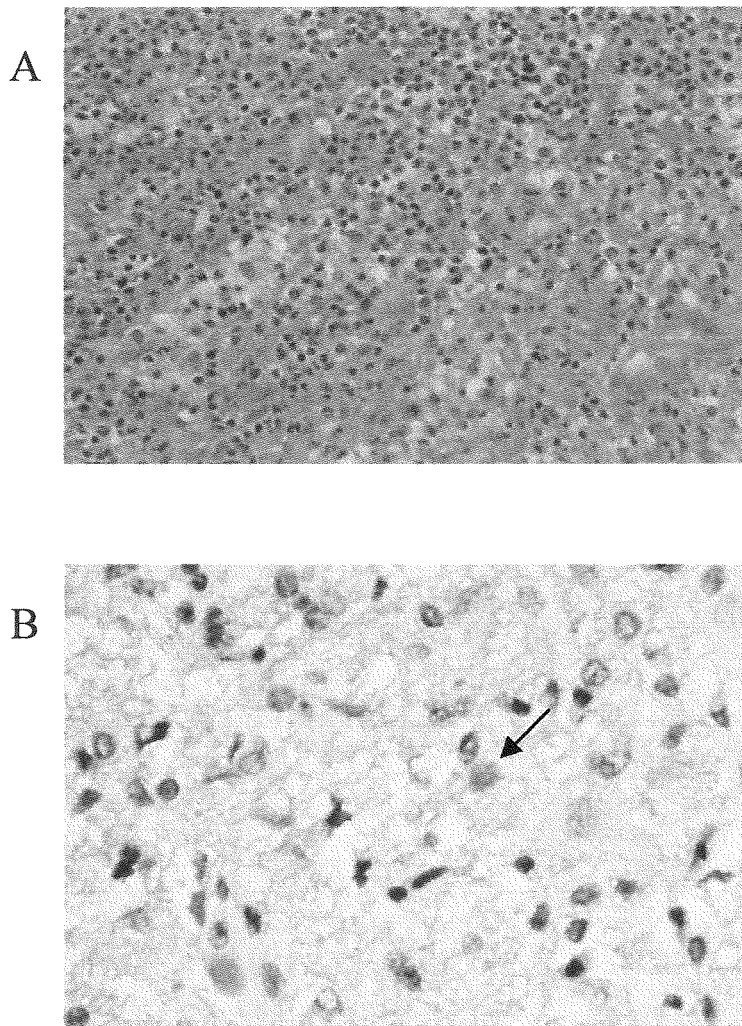


圖 13.腦腫瘍 Brain abscess 檢體的 H&E 染色組織圖及免疫化學染色圖，A 圖顯示其特徵為各種發炎細胞浸潤(200X)。B 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，箭頭標示處為陽性反應之星狀細胞(astrocyte) (400X)。

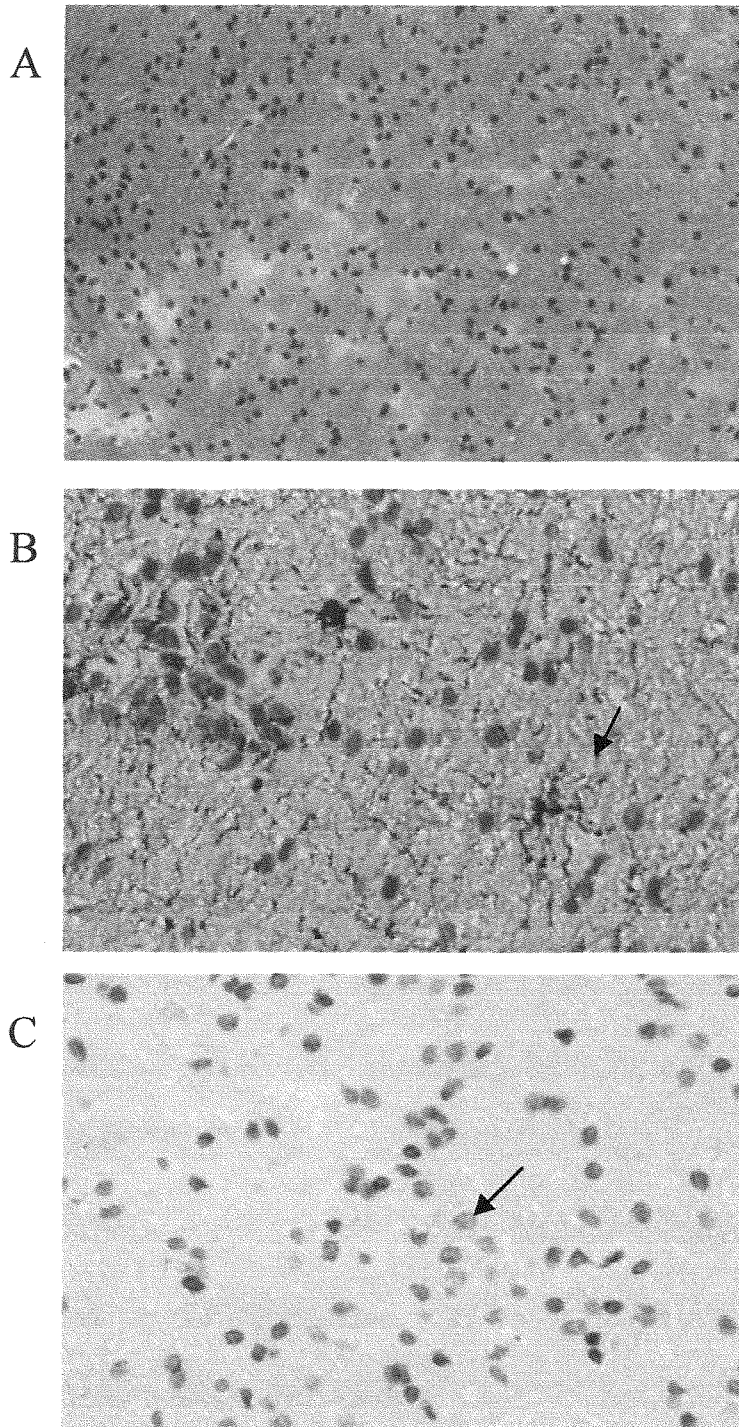


圖 14. 神經膠細胞增生 Gliosis H&E 染色組織圖及免疫組織化學染色圖。A 圖顯示特徵為神經膠細胞活化增生(200X)。B 圖顯示 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫組織化學染色，箭號標示處為星狀細胞(astrocyte)呈陽性反應(400X)。C 圖顯示 L-T 免疫組織化學染色，箭頭標示處為陽性反應之星狀細胞(400X)。

Species	Tumour type	References
Owl monkey/ Squirrel monkey	astrocytoma glioblastoma multiforme	London, 1978, 1983
Syrian hamster	medulloblastoma astrocytoma glioblastoma multiforme primitive neuroectodermal ependymoma pineocytoma	Walker, 1973; ZuRhein, 1983
Rat	primitive neuroectodermal	Ohsumi, 1985
Transgenic mouse	CNS dysmyelination adrenal neuroblastoma neuroectodermal	Small, 1986; Franks, 1996

表 1. 各種實驗動物受 JC 病毒誘導引起之腫瘤型式。本表摘自 Gordon 等人(36)。所有的實驗動物除了轉殖基因老鼠以在 JCV promoter 控制下表達完整的 T 抗原，其餘均以 JCV 腦內注射方式完成。

表 2. 各種腦病變之病理診斷及 T 抗原免疫組織化學染色結果。

編號	性別	年齡	病理診斷	L-T(IHC)
1	M	60	Anaplastic astrocytoma	-
2	F	70	Astrocytoma	-
3	M	32	Astrocytoma	-
4	M	36	Astrocytoma	-
5	M	31	Astrocytoma, high grade	-
6	M	59	Glioblastoma	+
7	F	47	Glioblastoma	-
8	F	61	Glioblastoma multiforme	-
9	F	35	Glioblastoma multiforme	+
10	M	63	Glioblastoma multiforme	+
11	F	53	Malignant astrocytoma	+
12	M	26	Malignant glioma	-
13	M	7	Medulloblastoma	-
14	M	7	Medulloblastoma	-
15	M	7	Medulloblastoma	-
16	F	2	Medulloblastoma	+
17	F	3	Medulloblastoma	+
18	F	3	Medulloblastoma	-
19	F	11	Pilocytic astrocytoma	+
20	F	11	Pilocytic astrocytoma	-
21	M	79	Meningioma	-
22	F	55	Meningioma	-
23	M	61	Meningioma	-
24	F	81	Meningioma	-
25	F	48	Meningioma	-
26	M	2	Primitive neuroectodermal tumor,undifferentiated	-
27	M	2	Primitive neuroectodermal tumor,undifferentiated	-

28	F	39	Schwannoma	-
29	F	46	Schwannoma	-
30	F	46	Schwannoma	+
31	F	3	Schwannoma	-
32	F	25	Schwannoma	+
33	M	75	Burkitt's lymphoma	-
34	M	75	Malignant lymphoma	-
35	F	41	Gliosarcoma	+
36	M	27	Gangliocytoma	+
37	M	68	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	+
38	M	40	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	-
39	M	40	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	-
40	M	68	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	+
41	M	68	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	-
42	M	70	Metastatic adenocarcinoma, mod. differentiated	+
43	M	65	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	-
44	M	65	Metastatic carcinoma, poorly differentiated	-
45	M	60	Metastatic malignancy tumor	-
46	M	65	Metastatic malignancy tumor	-
47	M	65	Metastatic malignancy tumor	-
48	M	27	Abscess	+
49	M	34	Abscess	+
50	F	1	Abscess	-
51	M	23	Necrosis	-
52	F	72	Arteriovenous malformation	-
53	M	56	Arteriovenous malformation	-
54	F	14	Arteriovenous malformation	-
55	M	65	Hematoma	-
56	M	40	Hypercellularity, consistent with gliosis	+

Classification	LT(+)
Glial-derived tumors astrocytoma, glioblastoma medulloblastoma/PNET gliosacoma, gangliocytoma, schwannoma	38% (11/29)
Non-glial-derived tumors meningioma malignant lymphoma	0% (0/7)
Metastatic tumors	27% (3/11)
Non-neoplastic lesions	33% (3/9)

表 3. 相關腦病變之 T 抗原免疫組織化學染色結果。

參考文獻

1. Artur, R. R., Grossman, S. A., Ronnett, B. M., Bigner, S. H., Vogelstein, B., and Shah, K. V. (1994). Lack of association of human polyomaviruses with human brain tumors. *J. Neurooncol.* 20, 55-58.
2. Assouline, J. G., and Major, O. E., (1991) Human fetal schwann cells support JC virus multiplication. *J. Virol.* 65, 1002-1006
3. Atwood, W. J. , Wang, L., Durham, L. C., Amemiya, K., Traub, R. G., Major, E. O. (1995) Evaluation of the role of cytokine activation in the multiplication of JC virus (JCV) in human fetal glial cells. *J. Neurovirol.* 1, 40-49.
4. Beggs, A. H., Miner, H. H., and Scangos, G. A. (1990). Cell type-specific expression of JC virus T antigen in primary and established cell lines from transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 71, 151-164.
5. Berger, J. R. & Concha, M. (1995) Progressive multifocal leukoencephalopathy: The evolution of a disease of once considered rare. *J. Neurovirol.* 1, 5-18.
6. Bergsagel, D. J., Finegold, M. J., Butel, J.S., Kupsky, W. J., Garcea R. L. (1992) DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N. Engl. J. Med.* 326, 988-93
7. Boldoroni, R., Caldarelli-Stefano, R., Monga, G., Zocchi, M., Mediati, M., Tosoni, A. & Ferrante, P. (1998) PCR detection of JC virus DNA in the brain tissue of a 9-year-old child with pleomorphic xanthoastrocytoma. *J. Neurovirol.* 4, 242-245
8. Bollag, B., Chuke, W. F. and Frisque, R. J. (1989) Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *J. Virol.* 63, 863-872.
9. Caldarelli-Stefano, R., Boldorini, R., Monga, G., Meraviglia, E., Zorini, E.O., and Ferrante, P. (2000) JC virus in human glial-derived tumors *Hum. Pathol.* 31, 394-395
10. Carswell, S., Alwin, J. C. (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localize of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.* 60, 1055-1061.
11. Castaigne, P., Rondot. P., Escourolle, R., Ribadeau, dumas, J.L., Cathala, F., Hauw, J. J., (1974) Progressive multifocal leukoencephalopathy and multiple gliomas. *Rev. Neurol.* 130, 379-92
12. Chang, C. F., Gallia, G. L., Muralidharan, V., Chen, N. N., Xoltick, P., Hohnson, E., and Khalili, K. (1996). Evidence that replication of human neurotropic JC virus DNA in glial cells is regulated by the sequence-specific single-stranded DNA-binding protein Pur alpha. *J. Virol.* 70, 4150-4156.
13. Chen, N. N., and khalili, K. (1995) Transcriptional regulation of human JC polyomavirus promoters by cellular proteins YV-1 and Pur alpha in glial cells. *J. Virol.* 69, 5843-5848.
14. Chen, N. N., Chang, C. F., Gallia, G. L., Kerr, D., A., Hohnson, E., M., Krachmarov, C. P., Barr, S. M., Frisque, R., J., Bollag, B., and khalili, K. (1995). Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the virally lytic control element. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1087-1091.
15. Chesters, P. M., Heritage, J., and McCance, D. J. (1983) Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissue and in disease tissue. *J. Inf. Dis.* 147, 676-684.
16. Corallini, A., Altavilla, G., and Carra, L. (1982) Oncogenicity of BK virus for immunosuppressed hamsters. *Arch. Virol.* 73, 243-253.

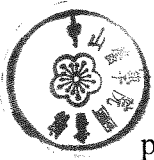
17. Corallini, A., Barbanti-Brocano, G., and Bortoloni, W. (1977) High incidence of ependymomas induced by BL virus, a human papovavirus (MMV). *J. Natl. Can. Inst.* 59, 1561-1563.
18. Daniel, A. M., and Frisque, R. J. (1993). Transcription initiation sites of prototypes and variant JC virus early and late messenger RNAs. *Virology.* 194, 97-109.
19. Davies, J. A., Hughes, J. T., Oppenheimer, D. R., (1973) Richardson's disease (progressive multifocal leukoencephalopathy) *Q. J. Med.* 167, 481-801.
20. Dougherty, R. M. (1976) Induction of tumors in Syrian hamsters by a human renal papovavirus RF strain. *J. Natl. Cancer. Inst.* 57, 395-398.
21. Dubois, V., Dutronc, H., and M. E., Lafon. (1997) Latency and Reactivation of JC virus in Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus Type I-Infected Patients *J. Clin. Microbiol.* 35. 2288-2292.
22. Dubois, V., M. E., Lafon, J. M. Ragnaud, J. L. Pellegrin, F-Damasio, C. Baudouin, V. Michaud, and H. J. A. Fleury. 1996. Detection of JC virus DNA in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients. *AIDS* 10:353-358.
23. Dyson, N., Bernards, R., Friend, S. H., Gooding, L. R., Hassell, J. A., Major, E. O., Pipas, J. M., van Dyke, T. and Harlow, E. (1990) Large T antigens of many polyoma viruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 64, 1353-1356.
24. Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P. and Harlow, E. (1989) The cellular 407k protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell.* 58, 249-255.
25. Egan, J. D., Ring, B. L., Reding, M. L., Wells, I. C., Shuman, R. M., (1980) Reticulum cell sarcoma and progressive multifocal leukoencephalopathy following renal transplantation. *Transplantation.* 29, 84-86.
26. Elsner, C. and Dorries, K. Evidence of Human Polyomavirus BK and JC infection in Normal Brain Tissue (1992) *Virology*, 191, 72-80.
27. Feigenbaum, L., Hinrichs, S. H. and Jay, G. (1992) JC virus and simian virus 40 enhancers and transforming proteins: role in determining tissue specificity and pathogenicity in transgenic mice. *J. Virol.* 66, 1176-1182.
28. Feigenbaum, L., Khalili, K., Major, E., and Khoury, G. (1987) Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3695-3698.
29. Franks, R. R., Rencic, A., Gordon, J., Zoltick, P., W., Curtis, M., Knobler, R. L., Khalili, K. (1996) Formation of undifferentiated mesenteric tumor in transgenic mice expressing human neurotropic polyomavirus early protein. *Oncogene.* 12, 2573-2578.
30. Frisque, R. J., Rilkin, D. B. and Walker, D. L. (1980) Transformation of primary hamster brain cells with JC virus and its DNA. *J. Virol.* 35, 265-269.
31. Frisque, R. J. & White, F. A. (1992) The molecular biology of JC virus causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy. in *Molecular Neurovirology*, ed. Roos, R. P. (Humana, Towana, NJ), pp. 25-158.
32. Fujimoto M, Sheridan PJ, Sharp D, Weaker FJ, Kagan-Hallet KS, Story JL (1989b) Proto-oncogene analyses in brain tumors. *J Neurosurg* 70:910-915.
33. Gallia, G. L., Gordon, J. & Khalili, K. (1998) Tumor pathogenesis of human neurotropic JC virus in the CNS. *J. Neurovirol.* 4, 175-181.
34. GiaRusso, M. H., Koeppen, A. H., (1978) Atypical progressive multifocal leukoencephalopathy and primary cerebral malignant lymphoma. *J. Neurol. Sci.* 35, 391-398.
35. Gordon, J. W., and Ruddle, F. H. (1982) Germline transmission in transgenic mice. *Prog. Clin, Biol. Res.* 85, 111-124.
36. Gordon, J., Krynska, B., Otte, J., Houff, S. A. and Khalili, K. (1998) Oncogenic

- potential of human neurotropic papovavirus, JCV, in CNS. *Dev. Biol. stand.* 94, 93-101.
37. Greenlee, J. E., Narayan, O., and Johnson, R. T. (1977) Induction of brain tumors in hamsters with BK virus. *Lab. Invest.* 36, 636-641.
 38. Gullotta, F., Masini, T., Scarlato, G., Kuchelmeister, K., (1992) Progressive multifocal leukoencephalopathy and gliomas in a HIV-negative patient. *Pathol. Res. Pract.* 188, 964-972
 39. Haas, S., Haque, N. S., Beggs, A. H., Khalili, K., Knobler, R. L., Small, J. (1994) Expression of the myelin basic protein gene in transgenic mice expressing human neurotropic virus, JCV, early protein. *Virology.* 202, 89-96.
 40. Haggerty, S., Walker, D. L. and Frisque, R. J. (1989) JC virus simian virus 40 genomes containing heterologous regulatory signals and chimeric early regions: identification of regions restricting transformation by JC virus. *J. Virol.* 63, 2180-2190.
 41. Henson, J., Saffer, J., and Furneaux, H. (1992). The transcription factor Sp1 binds to the JC virus promoter and is selectively expressed in glial cells in human brain. *Ann. Neurol.* 32, 72-77.
 42. Ho, K-C., Garancis, J. C., Paegle, R. D., Gerber, M. A., Borkowski, W. J. (1980) Progressive multifocal leukoencephalopathy and malignant lymphoma of the brain in a patient with immunosuppressive therapy. *Acta. Neuroathol.* 52, 81-83.
 43. Howley, P. M. (1980) *Virology oncology* ed. Klein, G. (Raven, New York), pp489-550.
 44. Jensen, P. N., and Major, E. O. (1999) Variant nucleotide sequences help expose leukocytic positioning in the JC virus pathway to the CNS. *J. Leukoc. Biol.* 65, 428-438
 45. Kenney, S., Natarajan, S., Strika, V., Khoury, G. and Salzman, N. P. (1984) JC virus enhancer-promoter active in human brain cells. *Science* 226:1337-1339
 46. Kerr, D., and Khalili, K. (1991). A recombinant cDNA derived from human brain encodes a DNA binding protein that stimulates transcription of the human neurotropic virus JCV. *J. Biol. Chem.* 266, 15876-15881.
 47. Kerr, D., Chan, C. F., Chen, N., Gfallia, G., Raj, G., Schwartz, B., and Khalili, K. (1994). Transcription of a human neurotropic virus promoter in glial cells. Effect of YB-1 on expression of the JC virus late gene. *J. Virol.* 68, 7637-7643.
 48. Khalili, K., Brady, J., Pipas, J. M., Spence, S. L., Sadofsky, M. & G. (1988) Carboxyl-terminal mutants of the large tumor antigen of simian virus 40: a role for the early protein late in the lytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 354-358.
 49. Khalili, K., Krynska, B., Valle, L. D., Katsetos, C., Croul, S., (1999) Medulloblastomas and the human neurotropic polyomavirus JC virus. *Lancet.* 353, 1152-1153.
 50. Khalili, K., Rappaport, J., and Khoury, G. (1988) Nuclear factors in human brain cells bind specifically to the JCV regulatory region. *EMBO J.* 7, 1205-1210.
 51. Kozmik, Z., Sure, U., Ruedi, D., Busslinger, M. & Aguzzi, A. (1995) Deregulated Expression of PAX5 in Medulloblastoma *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5709-5713
 52. Krynska, B., Otte, J., Franks, R., Khalili, K. and Croul, S. (1999) Human ubiquitous JCV (CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. *Oncogene.* 18, 39-46.
 53. Krynska, B., Del Valle, L., Croul, S., Gordon, J., Katsetos, C. D., Carbone, M., Giordano, A. and Khalili, K., (1999) Detection of human neurotropic JC virus DNA sequence and expression of the viral oncogenic protein in pediatric medulloblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11519-11524.
 54. Krynska, B., Gordon, J., Otte, J., Franks, R., Knobler, R., Giordano, A., DeLuca, A. & Khalili, K. (1997) Role of cell cycle regulators in tumour formation in transgenic mice expressing the human neurotropic virus, JCV, early protein. *J. Cell. Biochem.* 67, 223-

55. Lashgari, M., Tada, H., Amini, S. and Khalili, K. (1989) Regulation of JCV promoter function. Transactivation of JCV promoter by JCV and SV 40 early proteins. *Virology*. 170, 292-295.
56. Liberski, P. P., Alwasiak, J., Wegrzyn, Z., (1982) Atypical progressive multifocal leukoencephalopathy and primary cerebral lymphoma. *Neuropat. Pol.* 20, 413-419
57. London, W. T., Houff, S. A., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Gravell, M., Wallen, W. C., Palmer, A. E., Sever, J. L., Padgett, B. L., Walker, D.L., ZuRhein, G. M., Ohashi, T., (1978) Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science*. 201,1246-1249
58. London, W. T., Houff, S. A., Mckeever, P. E., Wallen, W.C., Sever, J. L., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Viral-induced astrocytomas in squirrel monkeys, in polyomavirus and Human Neurological Disease. Sever, D. L. Madden, and Alan R. Liss. 227-237.
59. Ludlow, J. W. (1993) Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. *FASEB J.* 7, 866-871.
60. Major, E. O., Amemiya, K., Tornatore, C. S., Houff, S. A., Berger, J. R. (1992) Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin. Micro. Rev.* 5: 49-73.
61. Major, E. O., Amemiya, K., Elder, G., and Houff, S. A., (1990). Glial cells of the human developing brain and B cells of the immune system share a common DNA binding factor for recognition of the regularoty sequences of the human polyomavirus. *JCV. J. Neurosci. Res.* 27, 461-471.
62. Mandl, C., Walker, D. L., and Frisque, R. J. (1987) Derivation and characterization of POJ cells, transformed human fetal glial cells that retain their permissivity for JC virus. *J. Virol.* 61, 755-763.
63. Markowitz, R. B., Eaton, B. A., Kubik, M, F., Latorra, D., Mcgregor, J. A. and Dynan, W. S. (1991) BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J. Virol.* 65, 4515-4519.
64. Marshall, C. J. (1991) Tumor suppressor genes. *Cell.* 64, 313-326.
65. Martin, J. D., and Foster, G. C. (1984) Multiple JC virus genomes from one patient. *J. Gen. Virol.* 65, 1405-1411.
66. McDeever, P. E., Chronwall, B. M., and Houff, S. A., (1983) Glial and divergent cells in primate central system tumors induced by JC virus isolated from hyman progressive multifocal leukoencephalopathy(PML), in sever JL, Madden DL (eds): *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. New York, Alan R Liss. 105, 239-251.
67. Miller, N. R., London, E., and Padgett, B. L. (1983) The detection of JC viral genome in owl monkey tumors, in Sever JL, Madden DL (eds): *Polyomaviruses and Juman Heurological Disease*. New York, Alan R Kliss. 271-288.
68. Monace, M. C., G, W. J. Atwood, M. Gravel, C., S., Tornatore, and E. O., Major. (1996) JC virus infection of hematopioetic progenitor cells, primary B lymphocytes, and stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* 70: 7004-7012.
69. Nagashima, K., Yasui, K., Kimura, J., Washizu, M., Yamaguchi, K., and Mori, W. (1984) Induction of brain tumors by a newly isolated JC virus (Tokyo-1 strain). *Am. J. Pathol.* 116, 455-463.
70. Nase, L. M., Karkkainen, M., and Mantyjjarvi, R. A., (1975) Transplantable hamster tumors induced with the BK virus. *Acta, Pathol, Microbiol, Scand.* 83,347-352.
71. Nasmyth, K. (1996) Viewpoint: putting the cell cyle in order. *Science.* 274, 1643-1644.
72. Neel, J. V., Major, E. O., Awa, A. A., Glover, T., Burgess, A., Traub, R., Curfman, B. &

- Satoh, C. (1996) Hypothesis: "Rogue cell"-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncogenesis Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2690-2695
73. Ohsumi, S., Ikehara, I., Motoi, M., Ogawa, K., Nagashima, K., Yasui, K. (1985) Induction of undifferentiated brain tumours in rats by a human polyomavirus (JCV). Japan J Cancer Res 76, 429-431.
 74. O'Neill, F. J., Frisque, R. J., Xu, X., Hu, Y. X. & Carney, H. (1995) Immortalization of human cells by mutant and chimeric primate polyomavirus T-antigen genes. Oncogene 10, 1131-1139
 75. Padgett, B. L., Walker, D. L. XuRhein, G. M. (1997) Differential neuroncogenicity of strain of JC virus, a human polyoma virus, in newborn syrian hamsters. Cancer. Res. 57, 718-720.
 76. Padgett, B. L., Walker, D. L.(1983) Virologic and serologic studies of progressive multifocal leukoencephalopathy, in polyomaviruses and Human Neuro. Disease. Sever, D. L. Madden, and Alan R. Liss. 107-117.
 77. Palmiter, R.D., and Brinhrster, R., L. (1985)Transgenic mice. Cell, 41, 343-345.
 78. Raj, G. & Khalili, K. (1995) Transcriptional regulation; lessons from the human neurotropic polyomavirus, JCV. Virology. 213, 283-291
 79. Raj, G. V., and Khalili, K. (1994). Identification and characterization of a novel GGA/C-binding protein, GBP-I, that is rapidly inducible by sytokines. Mol. Cell, Biol. 14, 7770-7781.
 80. Raj, G. V., Gordon, J., Logan, T. J., Hall, D. J., DeLuca, A., Giordano, A., Khalili, K. (1995) Characterization of glioma cells derived from human polyomavirus-induced brain tumors in hamsters. Int J Oncol 7, 801-808.
 81. Raj, G. V., Safak, M., MacDonald, G. H., and Khalili, K. (1996). Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: Evidence for a functional interaction between RelA(p65) and the Y-box-binding protein, YB-1, J. Virol. 70, 5944-5953.
 82. Ranganathan, P. N., and Khalili, K. (1993). The transcriptional enhancer element, kappa B, regulates promoter activity of the hyman neurotropic virus, HCV. In cells derived from the CNS. Nucleic Acids Res. 21, 1959-1964.
 83. Reith, K. G., Dichiro, G., London, W. T., Sever, J. L., Houff, S. A., Kornblith, P. L., Mckeever, P. E., Buonomo, C., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1980) Experimental glioma in primates: A computed tomography model. J. Comput. Assist. Tomogr. 4, 285-290.
 84. Rencic, A., Gordon, J., Otte, J., Zoltick, P., Khalili, K. & Andrews, D. (1996) Detection of JCV DNA sequence and expression of the viral oncoprotein, tumour antigen, in brain of immunocompetent patient with oligoastrocytoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7352-7357.
 85. Resnick, J., Shenk, T. (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus. J. Virol. 60, 1098-1106.
 86. Richardson, E. O. Jr, L. (1961) Progressive multifocal leukoencephalopathy. New. Engl. J. Med. 265 815-823.
 87. Safak, M., Gallia, G. L., and Khalili, K. (1999). Reciprocal interaction between two cellular proteins. Puralpha and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVCY in glial cells. Mol. Cell. Biol. 19, 2712-2723.
 88. Schiffer, D., Giordana, M. T., Mauro, A. and Soffietti, R. (1993) Brain tumors pp:14-110. Springer-Verlag Berlin Heidelberg N. Y.
 89. Seizinger BR, Breakfield XO (1990) The role of tumor suppressor genes in neural tumors. TINS 16:3-6.
 90. Shah, K. V., Daniel, R. W., and Strandberg, J. D., (1975) Sarcoma in a hamster

- inoculated with BK virus, a human papovavirus. *J. Nat. Cancer Inst* 54, 945-950.
91. Sima, A. A., Finkelstein, S. D., McLachlan, D. R. (1983) Multiple malignant astrocytomas in a patient with spontaneous progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.* 14:183-188
 92. Small, I. A., Khoury, G., Jay, G., Howley, P. M. and Scangos, G. A. (1986) Early regions of JC virus and BK virus induce distinct and tissue-specific tumors in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8288-8292.
 93. Small, J. A., Scangos, G. A., Cork, L., Jay, G., and Khoury, G. (1986) The early region of human papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell.* 46, 13-18.
 94. Staib, C., Pesh, J., Gerwig, R., Gerber, J.-K., Brehm, U., Stangl, A. & Grummt, F. (1996) p53 inhibits JC virus DNA replication in vivo and interacts with JC virus large T-antigen. *Virology.* 219, 237-246.
 95. Swenson, J. J., Trowbridge, P. W., Frisque, R. J. (1996) Replication activity of JC virus large T antigen phosphorylation and zinc finger domain mutants. *J. Neurovirol.* 2, 78-86.
 96. Tada, H., Lashgari, M., Rappaport, J. and Khalili, K., (1989) Cell type-specific expression of JC virus early promoter is determined by positive and negative regulation. *J. Virol.* 63, 463-466.
 97. Taguchi, F., Kajioaka, J., and Miyamura, T. (1982) Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC and BK virus in human sera. *Microbio. Imm.* 26, 1057-1064.
 98. Tavis, J. E., Trowbridge, P. W. & Frisque, R. J. (1994) Converting the JCV T antigen Rb binding domain to that of SV40 does not alter JCV's limited transforming activity but does eliminate viral viability. *Virology* 199, 384-392
 99. Ter Schegget, J., Voves, J., and van Strien, A. (1980) Free viral DNA in BK virus-induced hamster tumor cells. *J. Virol.* 35, 331-339.
 100. Trapp, B.D., Small, J. A., Pulley, M. Khoury, G., and Scangos, G. A. (1988) Dysmyelination in transgenic mice containing JC virus early region. *Ann. Neurol.* 23, 38-48.
 101. Tretiakova, A., Keynska, B., Gordon, J., and Khalili, K. (1999). Human neurotropic JC virus early protein deregulates glial cell cycle pathway and impairs cell differentiation. *J. Neurosci. Res.* 55, 588-599.
 102. Uchida, S., Watanabe, S., and Aizawa, K. (1979) Polyoncogenicity and insulino-inducing ability of BK virus, a human papovavirus, in Syrian golden hamsters. *J. Natl. Cancer. Inst.* 63, 119-126.
 103. Varakis, J., ZuRhein, G. M., Padgett, B. L., Walker, D. L. (1978) Induction of peripheral neuroblastomas in Syrian hamsters after injection as neonates with JC virus, a human polyoma virus. *Cancer. Res.* 38, 1718-1722.
 104. Walker, D. L., Padgett, B. L., and Zu-Rhein, G. M. (1973) Human papovavirus(JC): induction of brain tumors in hamsters. *Science.* 181, 674-676.
 105. Walker, D., L., and Frisque, R. J. (1986) The biology and molecular biology of JC virus. In "The Papovaviridae, The polyomaviruses" (N. P. Salzman, Ed.), Vol, 1, pp.327-377. Plenum, New York.
 106. Wegner, M., Drolet, D. W., and Rosenfeld, M. G.. (1993). Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: Implications for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4743-4747.
 107. Wgyte P, Buchkovich KJ, Horwitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weiberg RA, Harlow E (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334:124-129.
 108. White III, F. A., Ishaq, M., Stoner, G. L., and Frisque, R. J. (1992) JC virus DNA is



- present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* 66, 5726-5734.
109. Williamson, P. J., Allan, N. C., McIntyre, M. A., (1989) Cerebral Hodgkin's disease and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin. Lab. Haemat.* 11, 281-285.
 110. Zu Rhein, G. M. (1983) Studies of JC virus-induced nervous system tumors in the Syrian hamster: A review. *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. Sever, J. L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York. 205-221.
 111. Zu Rhein, G. M., and Varakis, J. N. (1979) Perinatal induction of medulloblastomas in Syrian golden hamsters by a hamster polyoma virus (JC). *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 51, 205-208.