

Figure 1

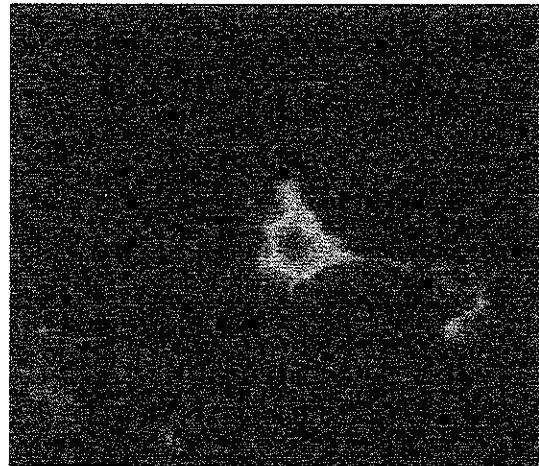


Figure 2

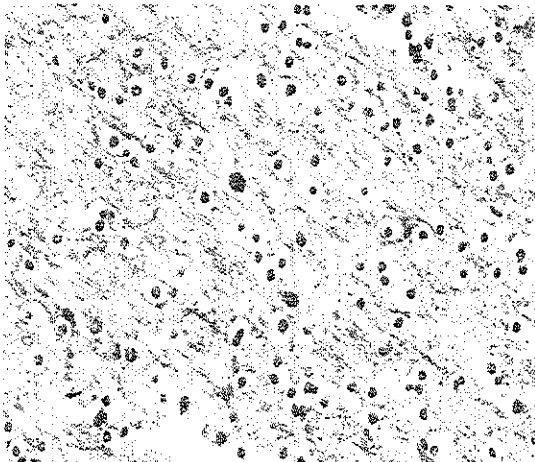


Figure 3

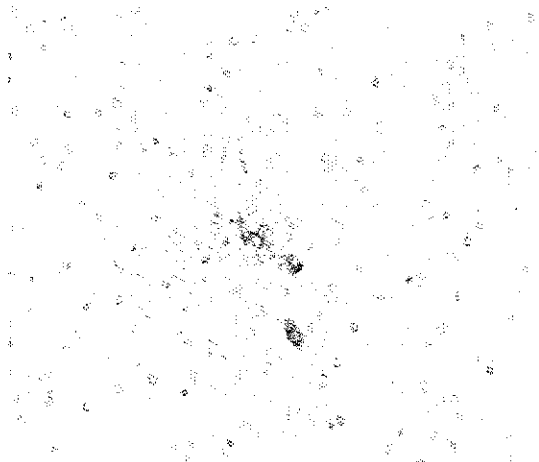


Figure 4

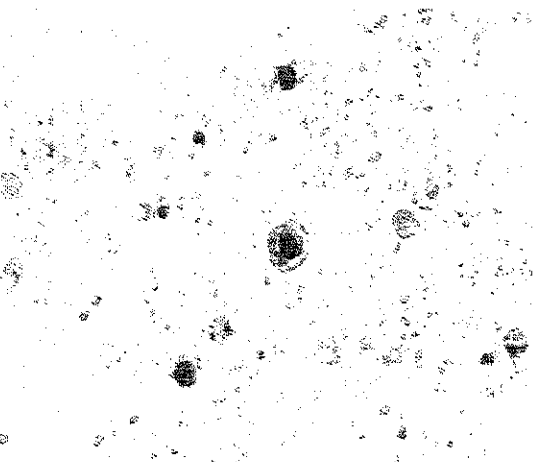


Figure 5

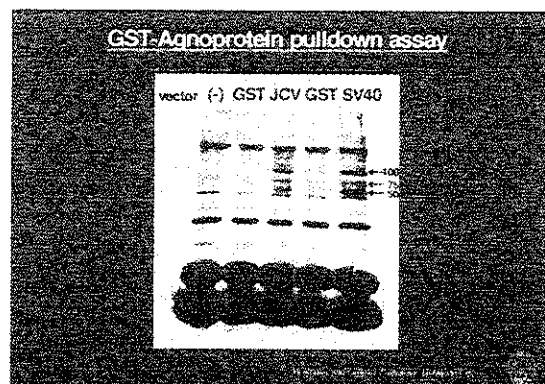


Figure 6

Figure 1: JCV genome の模式図。JCV は二本鎖環状構造をとる DNA virus である。JCV 感染後 regulatory region は large T、small t 蛋白方向に翻訳を開始し、早期蛋白を合成し、その後後期方向に翻訳を行ない、agnoprotein、VP1、VP2、VP3 を合成する。

Figure 2: 作成した抗 agnoprotein 抗体を用いた間接蛍光免疫染色。細胞は我々が樹立した JCV 感染細胞である JCI 細胞 (5)を用いた。agnoprotein の発現は細胞質に認められ、核は染色性が認められなかった。

Figure 3: JCV 感染により生じた PML 脳の Klüver-Barrea (KB)髄鞘染色像。この部位は未だ脱髄は起こっておらず、myelin は残存している。Myelin が保たれていることは MBP 染色でも確認している。図の中心部に認められる腫大濃染する核を有する細胞が JCV に感染していると考えられ、この核が large T 抗原、VP1 抗体を用いた免疫染色で陽性であった。

Figure 4: Figure 3 と同部位の抗 agnoprotein 抗体を用いた免疫染色像。茶褐色の部分が agnoprotein 陽性反応を示す。agnoprotein は細胞質に局在している。感染細胞周囲に agnoprotein の陽性反応が樹枝状に認められ、oligodendrocytes の細胞質に agnoprotein が発現していると考えられる。

Figure 5: Figure 3 と同部位の JCV 外核蛋白質である VP1 と agnoprotein の二重免疫染色。VP1 は青紫色、agnoprotein は茶褐色で染色を行なった。図の中心の細胞に認められるように VP1 は核に、agnoprotein は細胞質に限局して発現している。Matrix に点状に分布している像は感染細胞の細胞質に agnoprotein が蓄積しているものと推測される。

Figure 6: GST-agnoprotein を用いた pulldown assay。293T 細胞に GST-agnoprotein を強制発現させた 293T 細胞に、<sup>35</sup>S で metabolic labeling を行い、Glutathione Sepharose column で pulldown を行ない polyacrylamide gel で泳動した。vector を transfection していない細胞、GST のみを発現させた細胞と比較して、JCV agnoprotein、SV40 agnoprotein を発現させた細胞では約 50、75、100 kDa の位置に band が認められ、agnoprotein binding protein の存在が示された。

## クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス結果

班 員：中村好一（自治医大・保健科学・疫学）  
班 長：北本哲之（東北大学・大学院医・病態神経）  
班 員：佐藤猛（国立精神・神経センター国府台病院）  
研究協力者：柳川洋（埼玉県立大学）

### 〔研究要旨〕

厚生省が1997年2月から1999年3月まで実施したクロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランスに報告があった108例について、疫学的に解析を行った。患者は男44人（41%）、女64人（59%）であった。発病時の年齢は平均62.1歳、標準偏差11.5歳、中央値62.1歳であった。60歳代が46人で最も多く、次いで50歳代、70歳代となっていた。発病年はサーベイランスが開始される前年の1996年以降の患者が多数を占めていた。硬膜移植歴がある患者が新たに21人判明した。1996年の全国調査で明らかにされた例を合わせた65人の解析をおこうと、硬膜移植から発病までの期間は最も短い者は14か月、最長は218か月で、平均103.1月、標準偏差49.9月であった。硬膜移植年と発病年の観察から、今後とも硬膜移植歴を持つ患者が新たに出現することが予想された。

### Results of surveillance for Creutzfeldt-Jakob disease in Japan

Yosikazu NAKAMURA, Tetsuyuki KITAMOTO, Takeshi Sato, and Hiroshi YANAGAWA

Department of Health Science, Division of Epidemiology and Community Health, Jichi Medical School,  
Department of Neuropathology, Tohoku University School of Medicine,  
National Neuro-Psychiatry Center Kohnodai Hospital,  
and Saitama Prefectural University

### ABSTRACT

Epidemiological analyses were conducted for 108 patients with Creutzfeldt-Jakob disease that were reported to the surveillance system conducted by the Ministry of Health and welfare between February 1997 through March 1999. There were 44 male patients and 64 females. The average, standard deviation, and median of age at onset were 62.1 years, 11.5 years, and 62.1 years, respectively. The major age group was their 60's years, followed by 50's and 70's. Many of the patients were affected in and after 1996, which was the previous year when the surveillance started. Another 21 patients with a history of cadaveric dura mater transplantation on to those who were reported to the nationwide epidemiologic survey in 1996. The analyses of 65 such patients who were reported to the survey or the surveillance told that the duration between the transplantation and disease onset was 14 months for the shortest, 218 months for the longest with the average of 103.1 months and standard deviation of 49.9 months. Considering the period of time on the transplantation and disease onset, some other patients with the history were estimated to be manifest near future.

〔はじめに〕

英国における新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病に端を発し、わが国では1996年にクロイツフェルト・ヤコブ病(以下、「CJD」と略)の緊急全国疫学調査が実施された<sup>1,2)</sup>。幸いなことに新変異型 CJD は存在しなかったが、ヒト乾燥硬膜移植歴を持つ患者が43人報告された<sup>3)</sup>。硬膜移植による CJD 発病の危険性は症例報告としてなされてきていたが<sup>4-9)</sup>、このような患者の集積は初めての報告であった。そして、1年間に硬膜移植を受けた者の数を2万人と仮定し、硬膜移植を受けた者の CJD 発病の相対危険を計算すると、約30~100となった<sup>10)</sup>。

その後厚生省では、同疾患の発生動向を把握する目的で1997年2月より「クロイツフェルト・ヤコブ病及びその類縁疾患調査」により同疾患のサーベイランスを開始した<sup>11)</sup>。CJD を診断した医師に、患者の性、生年月日、居住歴(都道府県)、職業歴、既往歴、臨床症状などの報告を求めたものである。結果の解析は厚生省特定疾患調査研究「遅発ウイルス感染調査研究」班(班長:北本哲之東北大学教授)にゆだねられている<sup>11)</sup>。このサーベイランスは1999年4月1日に「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」が施行され、CJD が第4類感染症として届出が法制化されるまで続いた。

本研究は1997年2月~1999年3月の2年2か月間にわたって報告された患者の疫学像を解析したものである。さらに硬膜移植例について、既に全国調査で報告されている43人<sup>3)</sup>に加えて、新たに明らかになった硬膜移植歴のある CJD 患者の情報を加えて解析を行った。解析の主眼として、次の2点が挙げられる。まず第1は、硬膜移植歴のある CJD の疫学像、特に硬膜移植から発病までの潜伏期間、を明らかにすることである。さらに、今後ともこのような患者の発生が続くかどうかについて考察を行うことを目的の第2点としている。このような患者の硬膜移植を受けた時期は、移植硬膜が1規定水酸化ナトリウムによるアルカリ処理が開始される以前の1987年より以前に集中している。1987年以前の硬膜移植が危険因子だとすると、危険因子へ曝露したグループ(硬膜移植歴がある者)は曝露から相当の時間が経過しており、CJD が感染症であることを考えると、多くの曝露者は既に潜伏期間を経過して、今後の発病の可能性が小さいことも考えられるからである。

#### 〔方法〕

1997年2月~1999年3月の2年2か月間にわたって厚生省が実施した「クロイツフェルト・ヤコブ病及びその類縁疾患調査」に報告され、公衆衛生審議会成人病難病対策部会クロイツフェルト・ヤコブ病等専門委員会で CJD と判定された CJD 患者について、疫学像、臨床像を集計解析した。なお、「クロイツフェルト・ヤコブ病及びその類縁疾患調査」は要綱により CJD を診断した医師に対して、患者情報の厚生省への報告を求めたものである<sup>11)</sup>。

硬膜移植例については、1996年に厚生省特定疾患調査研究事業「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査研究班」(班長:佐藤猛国立精神・神経センター国府台病院院長[当時])が実施した全国疫学調査結果から、硬膜移植歴のある CJD 患者43人<sup>3)</sup>のデータをそのまま用いた。さらに、上記サーベイランスに硬膜移植歴ありと報告された21人のデータも使用した。さらに、1996年の全国調査では硬膜移植歴が報告されなかったが、その後の調査で移植歴があることが判明した1人の情報を加え、合計65人の解析を行った。

解析したデータは、性別、生年月日、硬膜移植年、硬膜移植時の年齢、硬膜移植の原疾患、移植された硬膜の種類(商品名;Lyodura®かTutoplast®か)、CJD 発病年、発病時の年齢、硬膜移植から発病までの期間、CJD の診断基準に基づいた診断の確実性(病理所見により診断が確定した確定[definite]例、病理所見はないが脳波所見で PSD を認めるほぼ確実[probable]例、及び臨床的には確実だが脳波上 PSD を欠く疑い[possible]例)<sup>12)</sup>である。なお、各症例の診断の確実性については、全国調査報告例は臨床所見の詳細を求めた2次調査票に基づき神経内科専門医が判定の確認を行い、サーベイランス報告例では神経内科専門医などで構成される上述の専門委員会で検討された結果である。

本研究では、厚生省が実施したサーベイランス、および研究班が実施した全国調査の小票のデータ

を解析している。それぞれの小票には CJD 患者の個人データが記載されている。個人データの中には疫学解析に必須の性と生年月日は含まれているが、倫理面に配慮して、情報として入手した氏名(姓・名ともにイニシャルのみ) および住所(住所地の都道府県名のみ)は不完全なものであり、個人を同定することは不可能である。従って、本研究の倫理面での問題は無いと判断した。

## 〔結果〕

サーベイランスには合計133例が報告された。このうち、1996年の全国疫学調査との重複例や「厚生省公衆衛生審議会成人病難病対策部会クロイツフェルト・ヤコブ病等専門委員会」(委員長:佐藤猛国立精神・神経センター国府台病院名誉院長)で CJD ではないと判定された例を除き、新たに108例の CJD 患者が確認された。診断名、診断の確実性は表 1 に示すとおりである。

患者は男44人(41%)、女64人(59%)であった。発症時の年齢は平均62.1歳、標準偏差11.5歳、中央値62.1歳であった。発症時の年齢分布は図 1 に示すとおりであり、60歳代が46人で最も多く、次いで50歳代、70歳代となっていた。なお、40歳未満で発症した4人(10歳代1人、20歳代2人、30歳代1人)はいずれもヒト由来乾燥硬膜移植歴(後述)があった。

出身・生活・現住所都道府県は北海道から鹿児島まで分布しており、特定の都道府県への集積は見られなかった。

発症年および初診年は図 2 に示すとおりであり、サーベイランスが開始される前年の1996年以降の患者が多数を占めているが、結果として全国調査への報告漏れとなるような例も存在した。

受診状況は5人が通院、101人が入院、1人が在宅と、大部分の患者が入院治療を受けていた。

CJD や痴呆の家族歴を有するものが5人いた。このうち CJD の家族歴を有するものは3人(父、兄、父と父方従兄弟)、CJD とされてはいないが痴呆の家族歴を有するものが2人(母、兄)であった。

職業歴、食品嗜好には一定の傾向は見られなかった。他の CJD 患者(組織なども含む)との接触歴があるもの、職業として動物への接触歴がある者(と畜業、畜産業など)もいなかった。職業以外の動物との接触歴を持つ者は9人だったが、多くはペットとしての犬や猫であった。

手術の既往歴がある者が58人いた。このうちヒト由来乾燥硬膜移植歴がある者が21人いた。移植を受けた年は、多くの患者で硬膜処理方法の変更(1N水酸化ナトリウム処理)が行われた1987年以前であった。硬膜移植から CJD 発病までの期間は平均131.6月、標準偏差48.0月、幾何平均116.6月、中央値141月、最大216月、最小13月であった。1996年の全国調査で報告された硬膜移植歴のある患者43人の移植から発病までの期間は平均89.4月であり<sup>1)</sup>、潜伏期間の延長傾向が見られる。これは硬膜の移植時期が1987年以前に集中しており、その後の発症の観察が時間的に後方にずれてきているためである。硬膜移植以外の手術既往については、特定の傾向は見られなかった。

輸血歴がある者は18人、鍼治療歴がある者は9人であった。これらの既往歴は本サーベイランスをもとにした症例・対照研究では危険因子とはされていない。

主な臨床所見を有する者の割合は図 3 に示すとおりである。プリオン蛋白遺伝子異常の検索は42人で実施されていた。このうち11人で異常が認められていた。

日本における現在までに判明している硬膜移植歴のある CJD 患者は男26人、女39人の合計65人である。硬膜移植年は図 4 に示すように1979年から1991年までだったが、特に1983年から1987年に集中していた。硬膜移植時の年齢は図 5 に示すとおりで、1歳から70歳まで分布しており、平均44.4歳、標準偏差14.4歳であった。硬膜移植の原因となった疾患は、腫瘍30人、脳出血9人、脳動脈瘤(出血の記載なし)5人、脳内血腫3人、奇形5人、事故1人、その他11人、不明1人であった。使用した硬膜は情報のない4人を除いた61人で Lyodura が使用されており、Tutoplast が使用されたことが確認

された者はいなかった。

CJD 発病時期は図 6 に示すとおりで、1985年から1998年まで毎年、発病者がいたが、特に1993年、1995年、1997年に多い傾向が見られた。発病時の年齢は図 7 に示すとおりであり、15歳から80歳まで分布していて、平均53.0歳、標準偏差14.1歳であった。硬膜移植から発病までの期間は図 8 に示すとおりであり、最も短い者は14か月、最長は218か月で、平均103.1月、標準偏差49.9月であった。移植後 2 年、7～9 年、13～14年に比較的多い傾向が見られた。CJD の診断の確実性は、確実例21人、ほぼ確実例34人、疑い例10人であった。

硬膜移植年ごとの移植から発病までの期間の分布を表 2 に示す。表 2 の太枠の部分は未だに観察されていない部分であり、1979～1981年に移植を受けた者の発病までの期間をそのまま、これ以降に移植を受けた者に当てはめると、今後とも新たな患者が発生することが予想される。

#### 〔考察〕

本研究では硬膜移植歴のある CJD 患者65人の疫学像を明らかにした。CJD 発病時の平均年齢は53.0歳であり、年齢分布はわが国の CJD 全患者の分布<sup>1) 2)</sup>と比較して若年層に偏った傾向がある。これは硬膜移植を受ける原因となった疾患が比較的若年者でも発症する疾患も含まれており、従って図 5 に示すように硬膜移植時の年齢も若い者が含まれているためである。

硬膜移植歴のある CJD 患者の硬膜移植年は、図 4 に示すように1983年から1987年に集中していた。1988年以降に移植を受けた患者が少ないのは Lyodura に対して1987年 5 月より 1 規定水酸化ナトリウムによるアルカリ処理が導入されたため<sup>3)</sup>と考えられる。しかしアルカリ処理導入後も旧処理法の硬膜の回収は行っていないため、1988年以降に移植を受けた患者の中には旧処理法の硬膜によった者も含まれている可能性もある。

硬膜移植から CJD 発病までの潜伏期間は延長傾向にある。1996年の全国調査で判明した43人の平均は89月であったが<sup>3)</sup>、これらを含めた今回の65人の平均は103月であった。これは、硬膜移植歴のある CJD 患者のほとんどがアルカリ処理が導入される1987年<sup>3)</sup>以前に移植を受けており、発病の観察期間が延びている（全国調査では1996年まで、今回は1999年まで）ことによるものである。

1982年以前に移植を受けた患者が少ないことは、1982年以前の硬膜のリスクが小さいことを意味しているものではない。1996年の全国調査は1985年以降に発病した CJD 患者を対象としている。図 8 や表 2 に示すように、硬膜移植から CJD 発病までの期間において 2 年にひとつのピークがあるが、1982年以前に硬膜移植を受け、その後 2 年で発病した患者は全国調査の対象となっていない。また、硬膜移植と CJD の関連が最初に報告されたのが1987年であり<sup>4)</sup>、これ以前に硬膜移植歴のある患者がいても、CJD を診断した医師が硬膜移植について認識していなかった可能性もある。このような理由で、図 8 や表 2 に示す硬膜移植から CJD 発病までの期間について、短い期間の分布が過小評価されている可能性がある。

今後の硬膜移植歴を持つ者からの CJD 発病については、次のような 2 つの理由により、可能性が高いと考えざるを得ない。まず第 1 は1979年に移植を受け、18年、及び16年後に発病した患者が存在しており、潜伏期間の最長がどの程度なのか、今回のデータでは予想できず、さらに長期間の潜伏期間で CJD を発病する可能性が否定できないためである。第 2 の理由として、今回の観察が1999年 3 月までに発病した CJD 患者に限定されていることである。移植後13～14年に潜伏期間のひとつのピークがあるが、1985年以降に硬膜移植を受けた者はこのピーク年を未だ迎えていない。したがって、これまで観察された潜伏期間の分布に従って CJD 患者が発生してくるとすれば、1985年の移植者から 1 人、1986年、1987年両年の移植者からそれぞれ 2 人ずつの、移植後13～14年目の発病が予測される。また、これ以前に移植を受けた者も含めて、更に長い潜伏期間で発病してくる患者が出てくる可能性も十分あり得る。

以上、日本における硬膜移植歴のある CJD 患者65人の疫学像を明らかにすると共に、今後ともこ

のような患者が発生する可能性の高いことを示した。

〔結論〕

厚生省が実施した CJD サーベイランス結果を疫学的に解析した。新たに21人の硬膜移植歴を有する患者が判明し、1996年の全国調査で判明している者も含めた65人の移植年と発病年の解析から、今後ともこのような患者が発生する可能性を指摘した。

〔参考文献〕

- 1)厚生省特定疾患調査研究事業「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査研究班」研究報告書。1997.
- 2)Nakamura Y, Yanagawa H, Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Sato T. Incidence rate of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *Int J Epidemiol.* 28:130-134, 1999.
- 3)Sato T, Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H. Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts: Japan, January 1979-May 1996. *MMWR.* 46:1066-1069, 1997.
- 4)CDC. Rapidly progressive dementia in a patient who received a cadaveric dura mater graft. *MMWR.* 36:49-50,55, 1987.
- 5)CDC. Update: Creutzfeldt-Jakob disease in a patient receiving a cadaveric dura mater graft. *MMWR.* 36:324-325, 1987.
- 6)CDC. Update: Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. *MMWR.* 38:37-38,43, 1989.
- 7)Martinez-Lage JF, Poza M, Tortosa JG. Creutzfeldt-Jakob disease in patients who received a cadaveric dura mater graft: Spain, 1985-1992. *MMWR.* 42:560-563, 1993.
- 8)Yamada S, Aiba T, Endo Y, Hara M, Kitamoto T, Tateishi J. Creutzfeldt-Jakob disease transmitted by a cadaveric dura mater graft. *Neurosurgery.* 34:740-744, 1994.
- 9)Lang CJG, Schuler P, Engelhardt A, Spring A, Brown P. Probable Creutzfeldt-Jakob disease after a cadaveric dural graft. *Eur J Epidemiol.* 11:79-81, 1995.
- 10)Nakamura Y, Aso E, Yanagawa H. Relative risk of Creutzfeldt-Jakob disease with cadaveric dura transplantation in Japan. *Neurology.* 53:218-220, 1999.
- 11)厚生省保健医療局疾病対策課監修：クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル。新企画出版社，東京。27-30, 1997.
- 12)Masters CL, Harris JO, Gajdusek C, Gibbs CJ Jr, Bernoulli C, Asher DM. Creutzfeldt-Jakob disease: Patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol.* 5:177-88, 1979.
- 13) Masullo C, Pocchiari M, Macchi G, Alema G, Piazza G, Panzera MA. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by dural cadaveric graft. *J Neurosurg.* 71:954-955, 1979.

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1)Nakamura Y, Yanagawa H, Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Sato T. Incidence rate of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *Int J Epidemiol.* 28:130-134, 1999.
- 2)Nakamura Y, Aso E, Yanagawa H. Relative risk of Creutzfeldt-Jakob disease with cadaveric dura transplantation in Japan. *Neurology.* 53:218-220, 1999.

3) 中村好一, 大木いずみ, 谷原真一, 尾島俊之, 柳川洋. 日本におけるクロイツフェルト・ヤコブ病患者数の年次推移に関する一考察. 日本衛生学雑誌. 54 : 534-538, 1999.

2. 学会発表

1) 中村好一, 大木いずみ, 谷原真一, 尾島俊之, 柳川洋. クロイツフェルト・ヤコブ病の症例対照研究. 日本衛生学雑誌. 54 : 407, 1999.

2) Nakamura Y, Oki I, Tanihara S, Ojima T, Yanagawa H. A case-control study of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. The XV International Scientific Meeting of the International Epidemiological Association Abstract Book I; 405, 1999.

〔知的所有権の取得状況〕

該当なし



表1. 108人の診断名と診断の確実性

診断名	確実例	ほぼ確実例	疑い例	計
クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)	6	85	14	105
ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)	1	2		3
致死性家族性不眠症(FFI)				-

表2. 硬膜移植年別硬膜移植からクロイツフェルト・ヤコブ病発症までの期間の分布

硬膜移植年	硬膜移植からクロイツフェルト・ヤコブ病発症までの期間(年)																		計	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18
1979														1						3
1980															1					1
1981								1	1		1	1		1						3
1982												1								4
1983			1	1						1	1			1	4					9
1984		1	4					1	2			2		1						11
1985			1		2	2			3	2			2							12
1986			1		1	1		1	1	3		1								9
1987		1	1				1	3	1	2		1								10
1988										1										1
1989									1											1
1990																				0
1991			1																	1
計	2	9	1	3	3	1	7	6	10	2	5	0	7	5	0	1	0	1		65

(日本における硬膜移植歴のあるCJD患者65人)  
 太枠の中は将来であり、現段階では観察対象ではない。

図1. 108人の発病時年齢分布

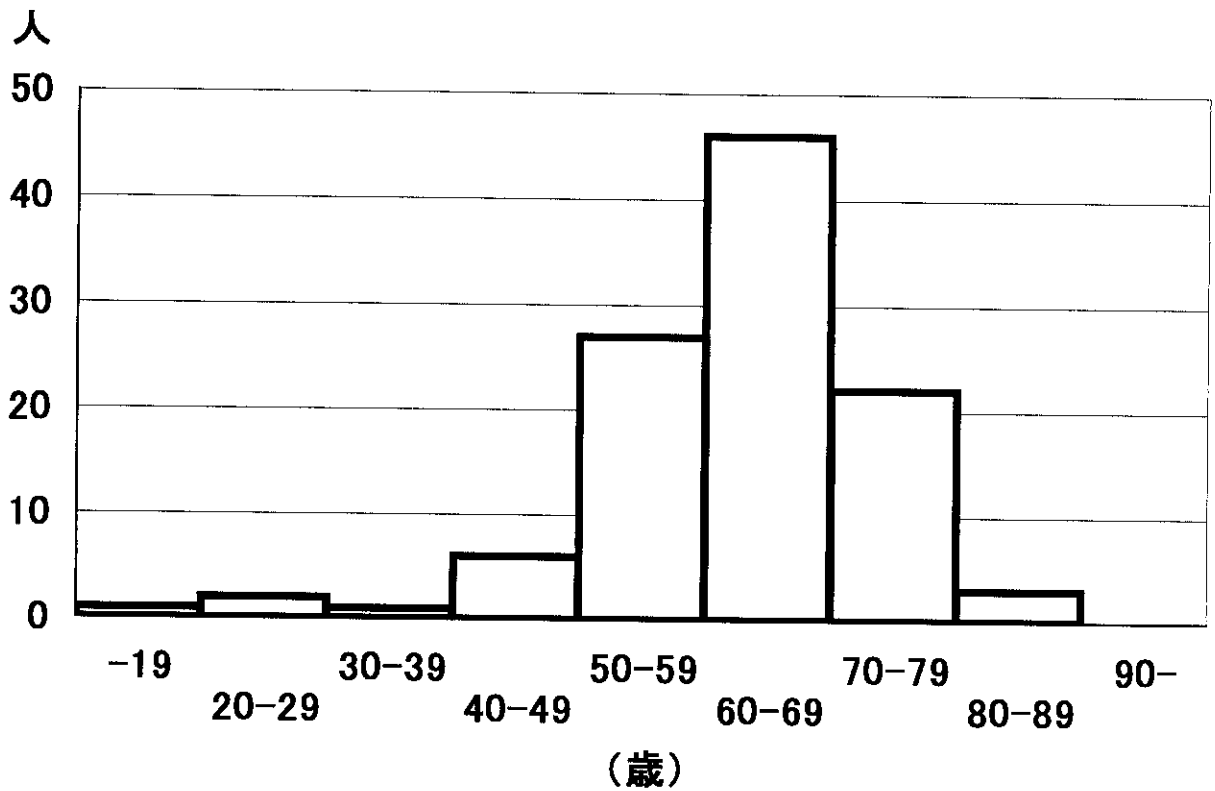


図2. 108人の発病年・初診年別患者数

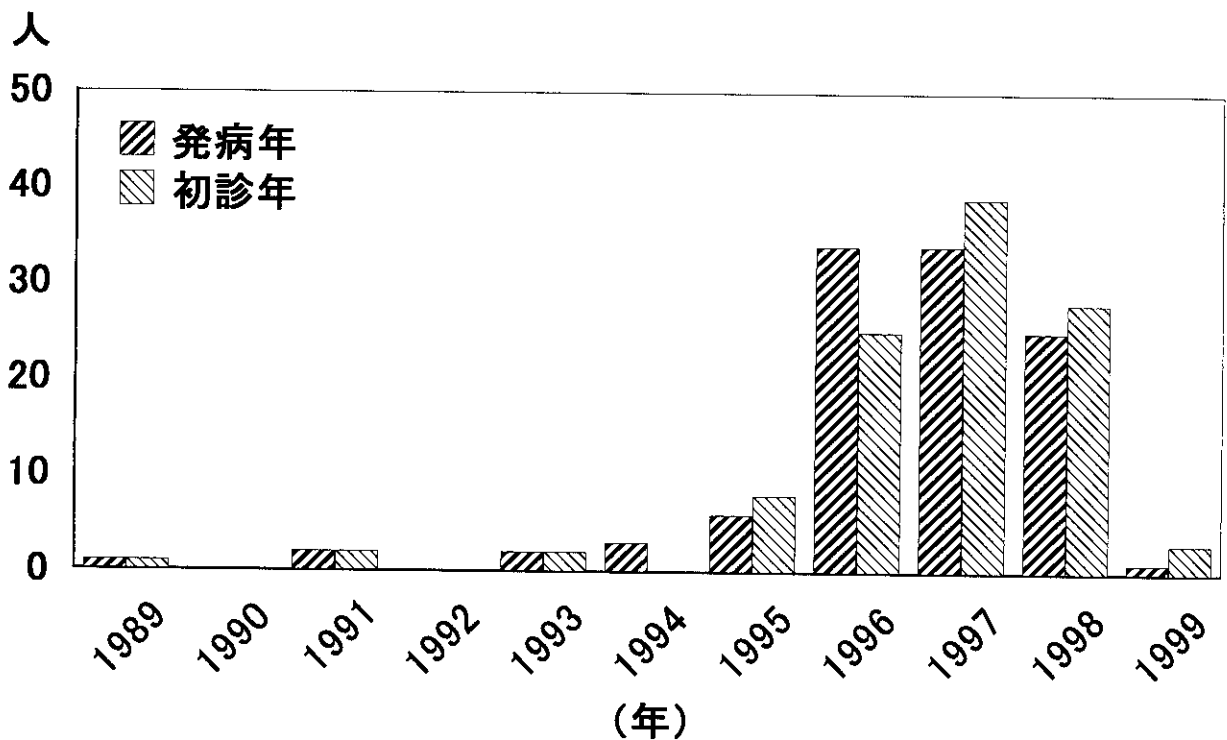


図3. 108人の主な所見の出現割合

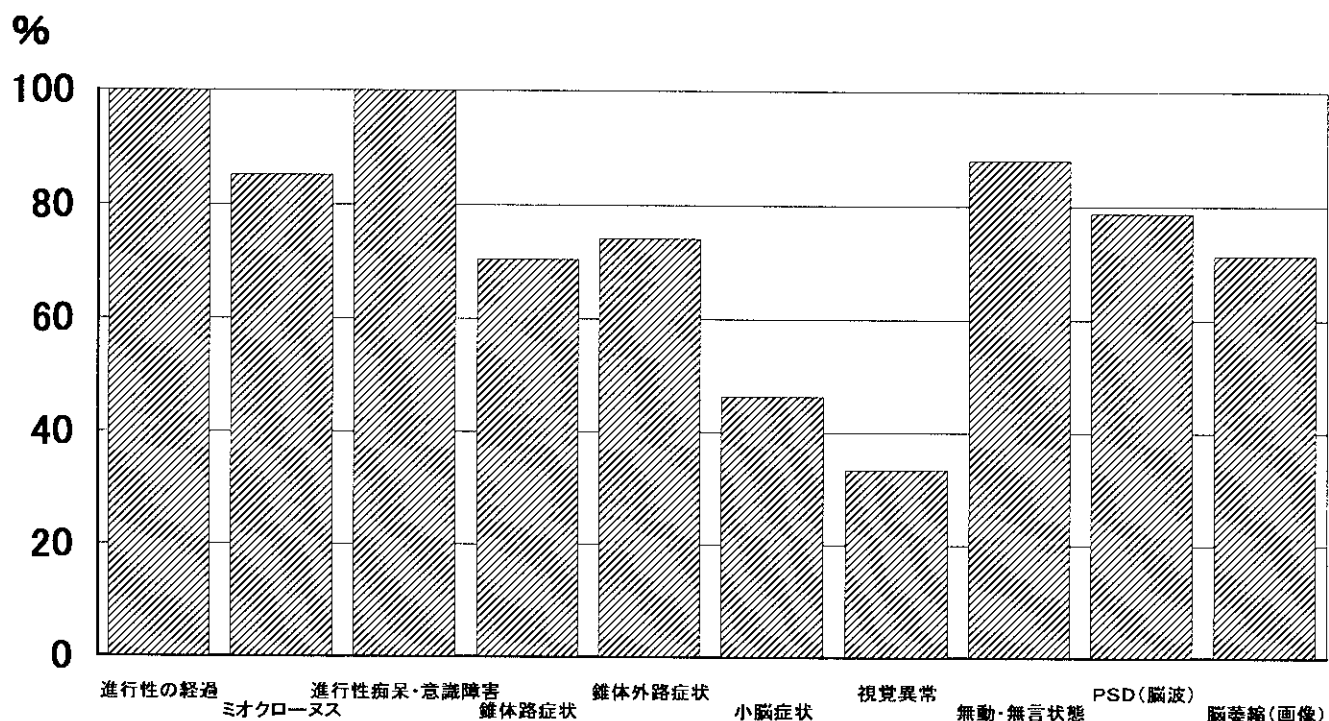


図4. 硬膜移植例65人の硬膜移植年の分布

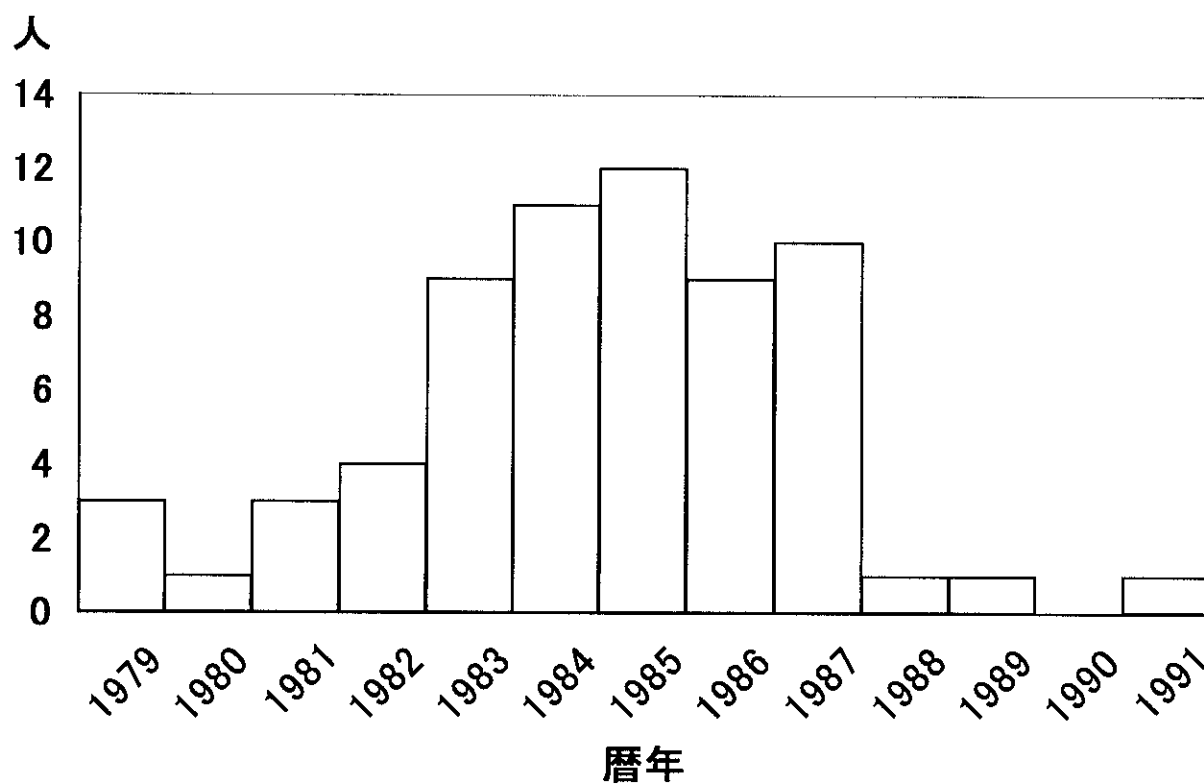


図5. 硬膜移植例65人の硬膜移植時の年齢分布

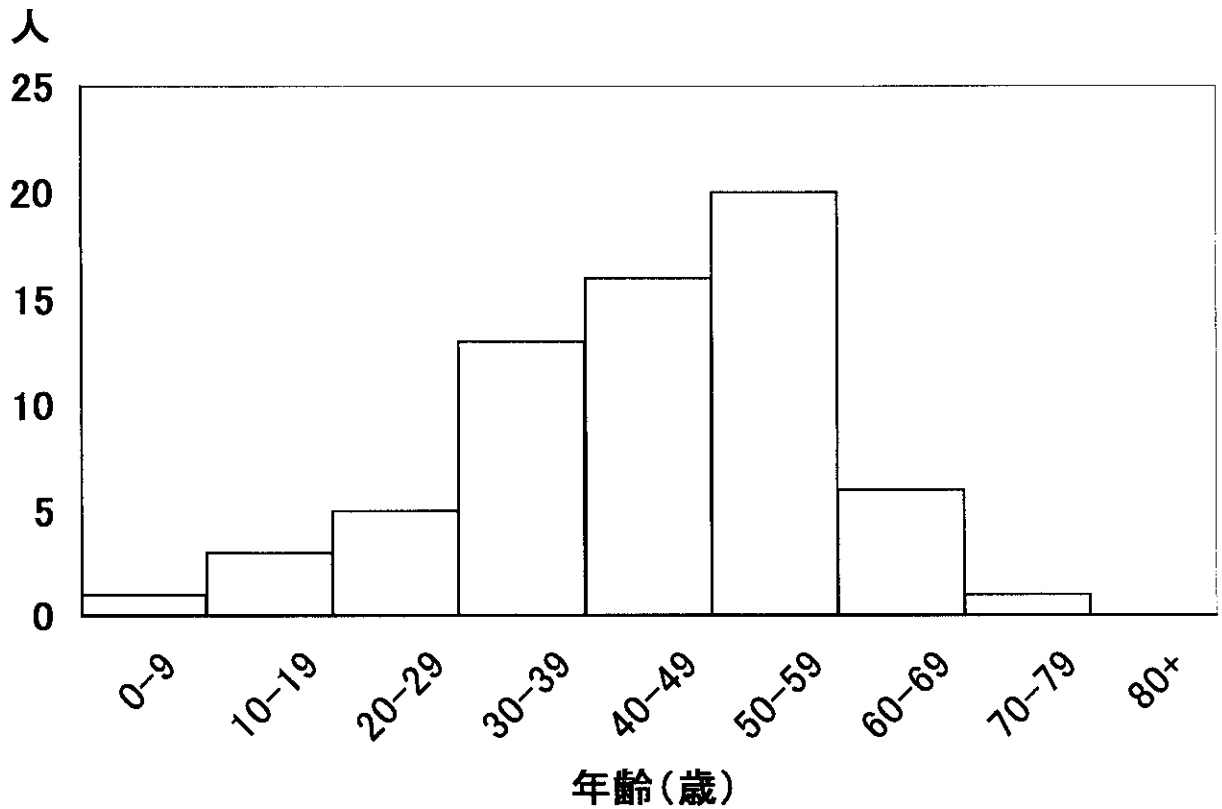


図6. 硬膜移植例65人のクロイツフェルト・ヤコブ病発病年の分布

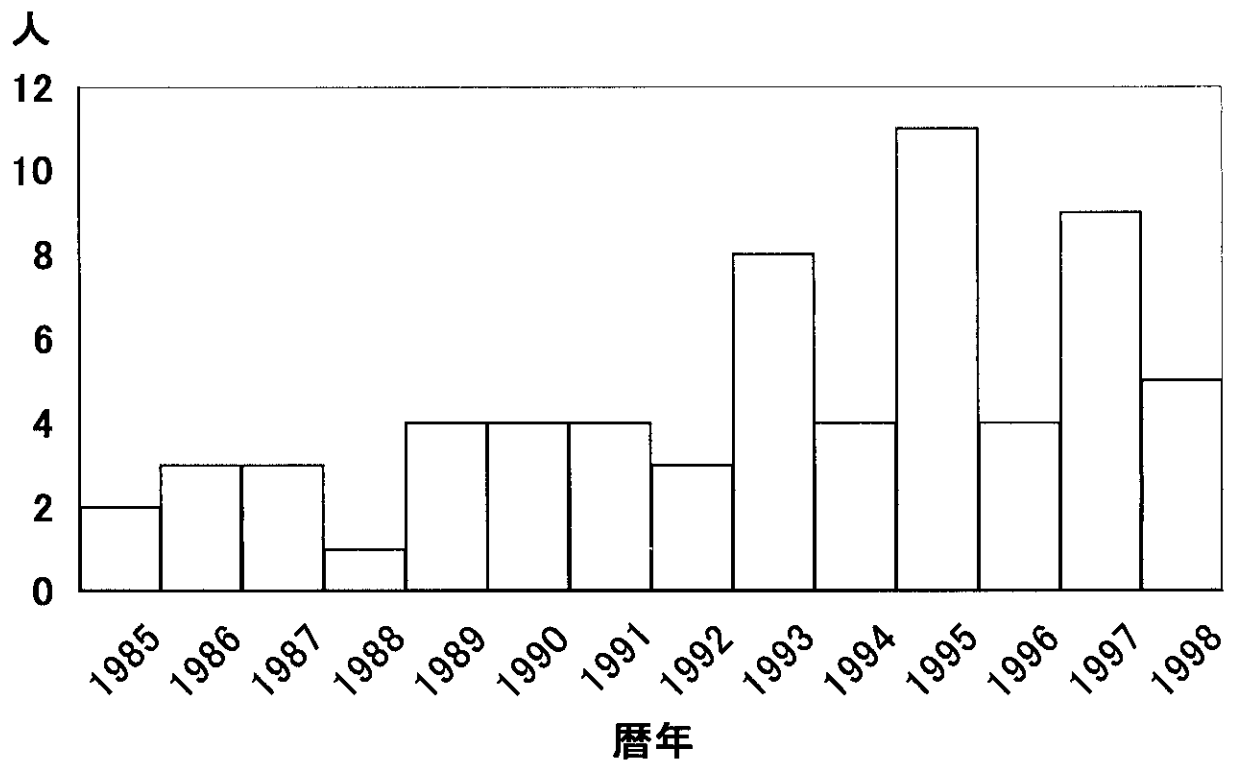


図7. 硬膜移植例65人のクロイツフェルト・ヤコブ病発病時の年齢分布

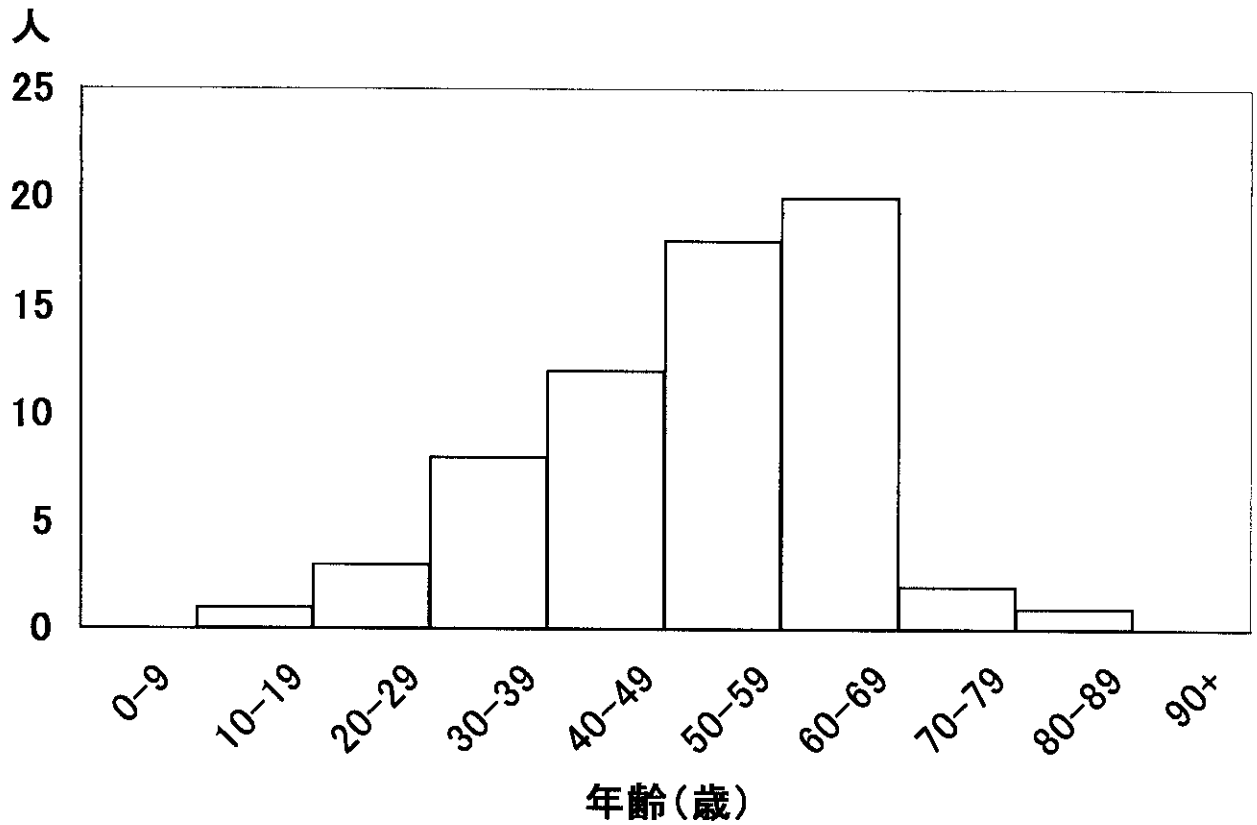
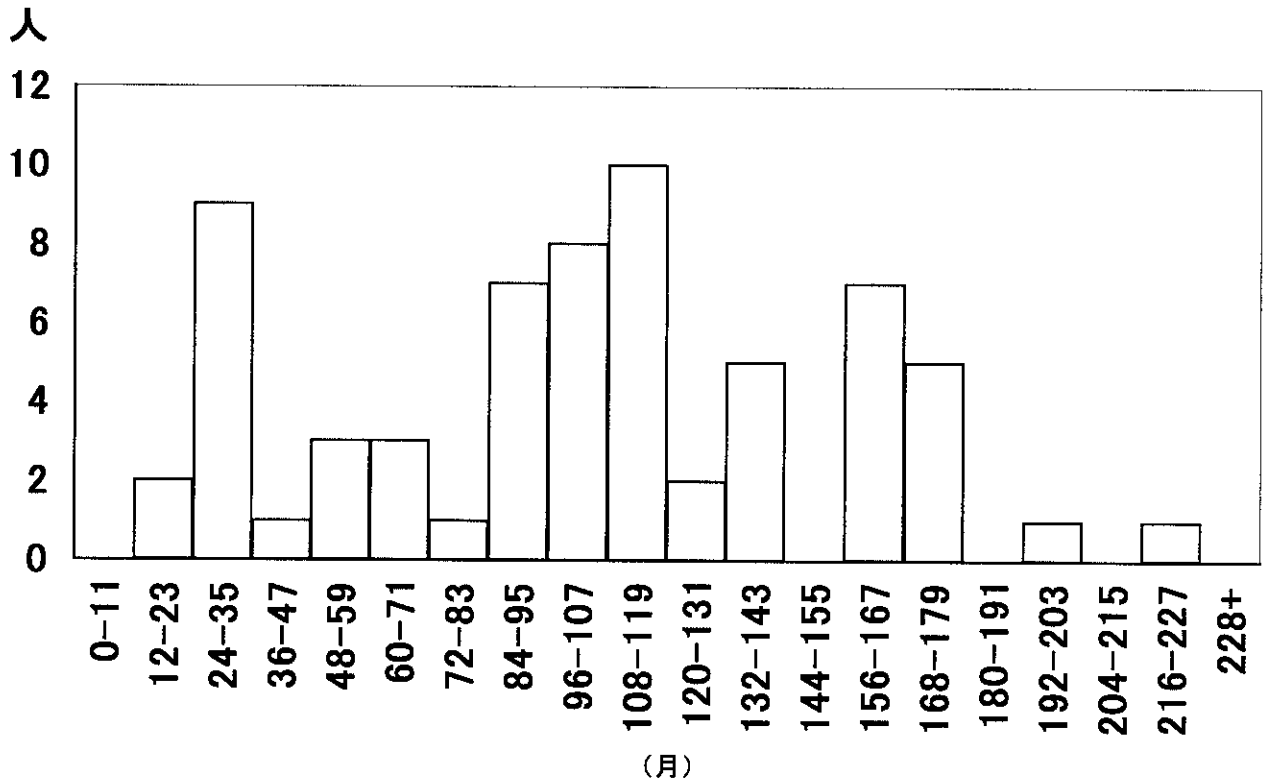


図8. 硬膜移植例65人の硬膜移植からクロイツフェルト・ヤコブ病発病までの期間の分布



## 硬膜移植後および孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の早期診断 ： CT での脳萎縮率

班 員：佐藤 猛（国立精神・神経センター国府台病院）  
研究協力者：増田眞之、赫 寛雄、向後かずさ、内海裕也（東京医大第三内科）  
中野今治（自治医大神経内科）  
中村好一（自治医大保健科学疫学）  
平井俊策、八木皓一（都立神経病院）

### 〔研究要旨〕

発症早期には MRI 拡散強調画像や SPECT が有用とされているが、一般に普及している CT を用い脳萎縮率を測定し早期診断での有用性を検討した。CT 画像上、第三脳室、第四脳室、側脳室の各幅と頭蓋幅との比を脳萎縮率とした。CT 上、正常群と CJD 患者群で age マッチングを行い二群間検定を行った。いずれの部位の測定においても、有意差をもって、発症初期においても、CJD 患者群は明らかに脳萎縮傾向を示した。萎縮率の経過を追うと脳萎縮率は無動性無言後は、全例急速に増大を示すが、その数カ月前よりすでに増大傾向を示していた。他の変性疾患では、かかる急速な萎縮は示さず、鑑別診断上有用であった。

CT in patients with dural grafts and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease:  
early changes in brain atrophy rate.

Masayuki MASUDA, Hiroo TERASHI, Kazusa KOUIGO, Yuuya UTSUMI, Imaharu NAKANO,  
Kazuyuki NAKAMURA, Syunnsaku HIRAI, Kouiti YAGI, Takeshi SATO

### ABSTRACT

In order to prevent iatrogenic transmission of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), the early identification of patients is important. Diffusion-weighted MRI might be useful provide a noninvasive methods for diagnosis patients with CJD. However, the diffusion weighted MRI is not yet common techniques in many hospital. CT or traditional MRI have not been particularly useful in the early diagnosis of CJD. We measured atrophy rates form the lateral, third and fourth ventricles on axial CT of 11 patients with CJD associated with dural grafts and 18 sporadic CJD, and compared with aged matched control. We found, significant reduction of brain atrophy rates of the third, forth and lateral ventricles on CT in the early stage of CJD patients. Atrophy rates in these CJD patients shows rapid progression within a few months in the clinical course. Measuring brain atrophy rates in CT are useful for the early diagnosis of CJD patients.

### 〔目的〕

CJD の早期診断は感染対策上、重要である。昨年の、本班会議において CJD 患者、発症初期の CT では一見、異常所見が無いように見えても、脳室の幅を測定すると正常者に比べ、萎縮傾向を示すことを予報した<sup>1)</sup>。発症早期には MRI 拡散強調画像や SPECT が有用とされているが<sup>2)</sup>、一般に普及している CT を用い脳萎縮率を測定し早期診断での有用性を検討した。本年度は、正常対照者について各年齢ごとに測定し、さらに、孤発性及び硬膜移植歴を有する CJD 患者の CT について経過を追って計測し、早期診断に有用なことを明らかにした。

## 〔対照〕

正常対照者は、21歳から81歳の男性55名、女性62名計、117名 CJD患者は、孤発例、18名、硬膜移植例、11名。

## （倫理面への配慮）

本研究は対象者の個人情報公開もなく、倫理面の問題はないと判断した。

## 〔計測方法〕

CT画像上、第三脳室、第四脳室、側脳室の各幅と頭蓋幅との比を脳萎縮率とした。第三脳室は、主に大脳基底核の萎縮を反映し、第四脳室は、小脳の萎縮を反映し、側脳室前角は、主に、前頭葉の萎縮を反映していると考えられた。

## 〔結果、結論〕

正常対照：測定結果をピアソンの相関係数にて検討すると、第三脳室萎縮率、相関係数 0.638、 $p$  値 $<0.0001$ ；小脳萎縮率、相関係数 0.286、 $p$  値 $=0.0017$ ；側脳室萎縮率、相関係数 0.35、 $p$  値 $<0.0001$ ；と年齢と脳萎縮率の間には、有意水準 1%以下で、相関関係が認められ、年齢にしたがって脳萎縮率は、軽度の拡大を示した（図 1）。便宜的に、正常萎縮率を回帰直線で表すと、萎縮率  $Y$ 、年齢を  $X$  とし、 $Y = AX + B$  という一次関数の計算式になった。

CJD 患者：CJD 患者で測定した第三脳室、いずれの症例も、発症初期で、症状は、精神症状が主体であり、CT 画像上もほとんど変化が指摘されていなかった時期のものである。ほとんどの症例が正常者とは明らかに、萎縮率は高く、異常を示していた（図 2）。

正常対照群と患者群の二群間において、age マッチングを行い第三脳室幅を比較すると正常者では平均値 0.39 標準偏差  $\pm 0.014$ 、患者全体で平均値 0.67 標準偏差  $\pm 0.025$  となった。スチューデントの  $t$  検定及び Mann-Whitney の  $U$  検定で、いずれも有意水準 1%で、 $P$  値（危険率）0.0001 以下で明らかに有意差が示された。

小脳における第四脳室幅でも、第三脳室幅と同様三分の二の、症例が異常数値を示した。同様に、二群間検定をおこない検定を行ったところ有意水準 1%で有意差を認めた。

側脳室では、第三脳室、小脳に比べ萎縮が少ない傾向が見られた。このことから、側脳室前角よりも、第三脳室、小脳の萎縮が早期から起こっている可能性が示唆された。このことは、MRI で、基底核の信号異常が早期に出現することが報告されておりそれとも合致すると考えられた。統計的には同様に、有意水準 1%で、有意差を認めた。

経過：CJD 患者について経過を追って観察した、第三脳室の、脳萎縮率の推移では（図 3）80%近い症例は、発症後三ヶ月から六ヶ月のうちに、急速に症状の進行し、CT における計測でも同時期に脳萎縮率の急速な増大を示した。緩徐進行例で、症状の進行も遅く、1 年後より、症状の急速な進行するが、その症例は、その時期より急速な画像上の進行を見た。

小脳における第四脳室脳萎縮率、側脳室の計測でも、同様に経過とともに、萎縮を認めた。側脳室においては、発症初期、脳萎縮率の差が正常に比べ、少ないことを指摘したが、経過を追うと、急速に萎縮率の増大を認め、同様に、診断上重要な指標となった。

CJD 患者は無動性無言になると、臨床的診断も容易だが、無動性無言になる以前では、他の疾患との鑑別が問題となる症例も存在する。無動性無言となった時期を測定上のゼロ病日とすると（図 4）、ほとんど全例が同じ傾きで、萎縮率の拡大を示した。脳萎縮率で見ると、無動性無言になる数ヶ月前から、異常を示した。すなわち、CJD 患者では、経過の早い時期から脳萎縮率が異常を示すことが解った。

これらの萎縮率の拡大の経過を、更に統計学的に証明するために、無動性無言の時期を境に、その前後で二群に分類し、萎縮のスピードを、各症例ごとに、萎縮率を目的変数  $y$  とし、病日を説明変数  $x$  とし、一次関数の回帰直線で比較検討した。それらは回帰直線の、傾き、切片、ともに、無動性無

言の前後では、大きく差が見られず。統計的に Mann-Whitney の U 検定を行っても、有意差はなかった。つまり、発症初期から脳の萎縮のスピードは、ほぼ変わらない早さで、進行しており、無動性無言前の診断のつけがたい、発症初期においても、画像上の萎縮率の経過を追うことにより、CJD の特徴である、急速な、脳の萎縮を捕らえうることが解った。

〔まとめ〕

(1) CT 上、全ての測定部位で、ほとんど異常が見られないとされていた精神症状が主体の発症初期でも、脳萎縮率は増大傾向を示した。

(2) 脳萎縮率は無動性無言後は、全例急速に増大を示すが、その数カ月前からすでに増大傾向を示し、発症初期からの、急速な脳の萎縮を反映しており、他の変性疾患では、かかる急速な萎縮は示さず、鑑別診断上有用である。

〔参考文献〕

- 1) 佐藤 猛、増田 眞之、内海 裕也、星 研一、山下真理子：硬膜移植後に発症した CJD:症状と経過の特徴. 厚生省「遅発性ウイルス感染調査研究班」平成 10 年度報告書 p122-125, 1999.
- 2) 佐藤 猛、星 研一、増田眞之、吉野 英、浦田重治郎：医原性プリオン病：ヒト硬膜移植後に発症したクロイツフェルト・ヤコブ病. 神経研究の進歩 43:145-154, 1999.
- 3) De Priester JA, Jansen GH, de Kruijk JR et al : New MRI findings in Creutzfeldt-Jakob disease: high signal in the globus pallidus on T1-weighted images. Neuroradiology 41:265-268, 1999.



図.1 年代別正常者計測値:第三脳室.小脳.側脳室

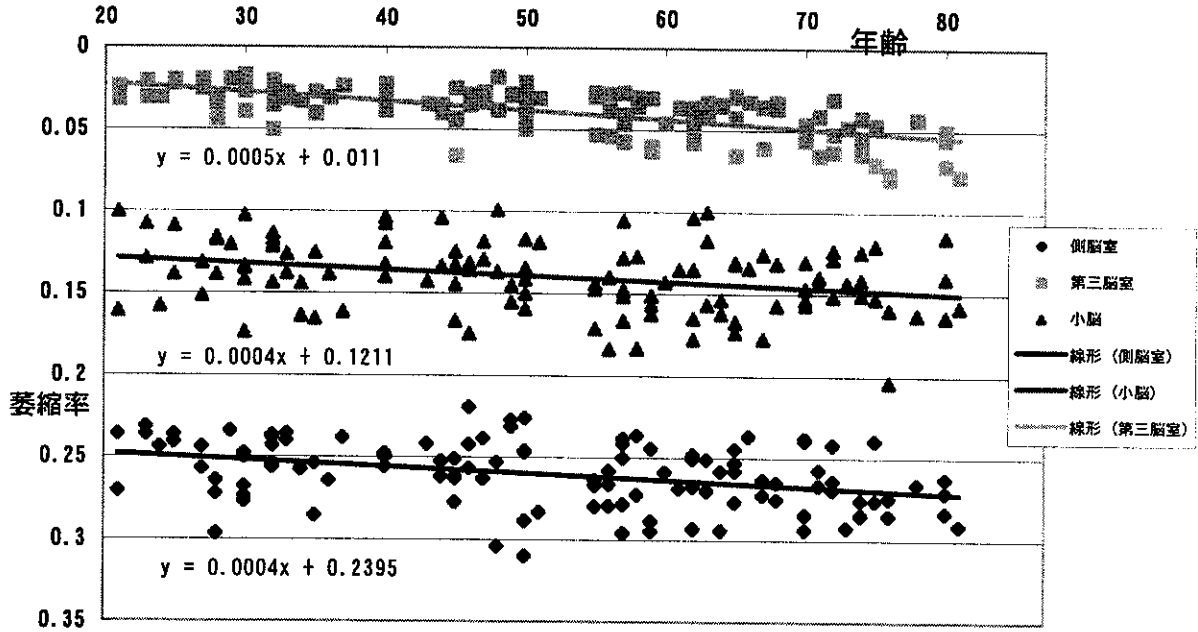


図.2 第三脳室:正常者及びCJD患者初診時CT

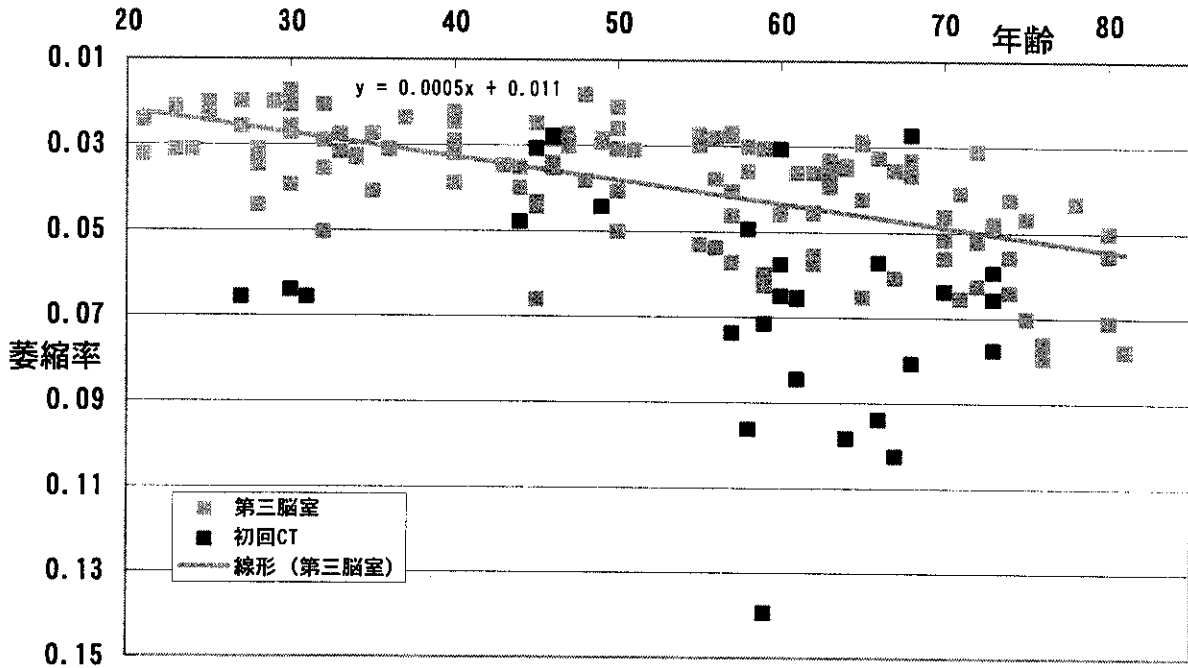


図.3 CJD:第三脳室萎縮率

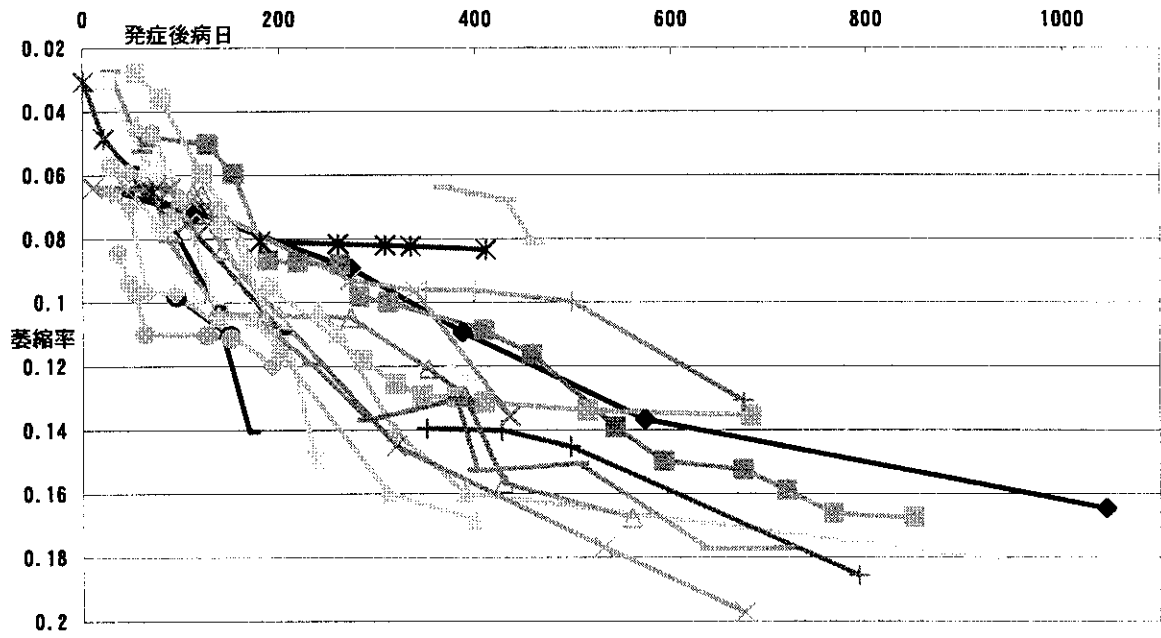
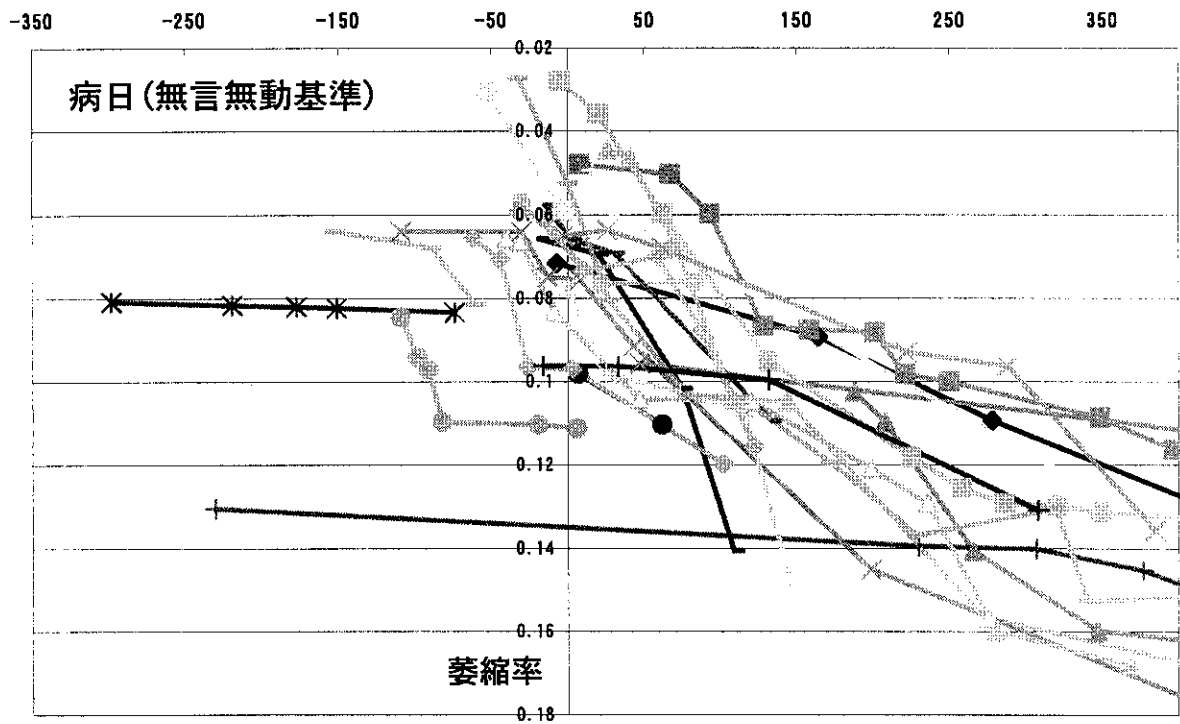


図.4 第三脳室萎縮率



## エチレンオキサイドによるプリオン不活化機構について

班 員：品川 森一（帯広大・獣医・公衆衛生）  
研究協力者：堀内 基広（帯広大・獣医・公衆衛生）  
石黒 直隆（帯広大・獣医・公衆衛生）  
金子 健二（日本製薬）  
松尾 宇人（日本製薬）  
梶原 庸生（日本製薬）

### 〔研究要旨〕

エチレンオキサイド（EO）によるプリオン不活化機構をマウススクレイビープリオンを用いて調べた。プリオンを液化エチレンオキサイド（LEO）処理で処理すると濃度依存性に不活化、PrP<sup>Sc</sup> のバンドが消失、12kd 以下のバンドが出現・増加が見られることを先に報告した。2%LEO 処理プリオンの MALDI-TOF-MS 解析により、12kd 以下に6つの主ピークが検出された。このことは切断箇所はある程度限定されることが分かった。12kd 以下のバンドは PrP<sup>core</sup> の N 端の抗体では反応しないが、C 端の抗体と反応し、C 端が保存された分子が存在することが分かった。LEO 処理した組換えマウス PrP から分離した断片のアミノ酸配列解析結果から、切断点の一つは 129Ala であることが分かった。これらのことから、EO によるプリオンの不活化は EO によるアミノ酸修飾の可能性もあるが、PrP 分子が特定の部分で切断されることによって起きることが推定された。

### Mechanisms of prion inactivation with liquid ethylene oxide

Morikazu SHINAGAWA<sup>1)</sup>, Motohiro HORIUCHI<sup>1)</sup>, Naotaka ISHIGURO<sup>1)</sup>, Kenji KANEKO<sup>2)</sup>,  
Takato MATSUO<sup>2)</sup> and Yousei KAJIHARA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, Obihiro Univ. of Agriculture and Veterinary Medicine and <sup>2)</sup>Nihon Pharmaceutical Co

### ABSTRACT

Mechanisms of prion inactivation with liquid ethylene oxide (EO) were studied using mouse adapted scrapie prion. We have observed previously that treatment of prion with liquid EO caused inactivation of infectivity, a loss of the immunoreactivity of PrP<sup>Sc</sup> to an antiserum raised to a synthetic peptide corresponding to N-terminus of PrP<sup>core</sup>, and the appearance and increase of low molecular weight substance liquid EO-dose dependently. In MALDI-TOF-MS analysis of 2% liquid EO treated prion fraction, 6 major fragments were detected as degraded products of PrP<sup>Sc</sup>, suggesting that EO cleaves PrP<sup>Sc</sup> at somewhat specific sites. An antiserum to C-terminus reacted with a degraded fragment, indicating that C-terminal region of some of the fragments is intact. Data from MALDI-TOF-MS analysis and amino acid analysis of 2% liquid EO treated prion revealed that five kinds of amino acid residue of lysine, histidine, cysteine, methionine and tyrosine were modified with EO and roughly half of the total number of these were modified. N-terminal amino acid sequence analysis of a degraded fragment derived from liquid EO-treated mouse recombinant PrP revealed that EO cleaved PrP mainly at codon 129. These results indicate the prion is inactivated by modification of amino acid residues of PrP<sup>Sc</sup> and/or cleavage of PrP<sup>Sc</sup>, but it is not clear which plays the major role in prion inactivation.

## 〔はじめに〕

医薬品、高度医療機器あるいは畜産食品を介してヒトからヒトあるいは動物からヒトへのプリオンの伝播が現実のものとなり、その阻止のためには高感度にプリオン汚染を検出・摘発することと同時に、汚染機器のプリオンの不活化・除染が必要である。精密医療機器のプリオン除染法は未だ確立されておらず、医療現場でその開発が望まれている。我々は先に、液化エチレンオキシド(LEO)がプリオンを不活化することを見出した。本研究ではLEOによるプリオンの不活化機構を調べた。

## 〔材料と方法〕

プリオンとして、マウス馴化スクレイビー帯広株のプリオンを用いた。帯広株を脳内接種して発病し、死期が近づいたマウスの脳の10%乳剤をPBSで作成し、プリオン原液として-30℃に保存した。

マウス実験では接種時はエーテル麻酔下で、脳の採取にあたってはエーテル麻酔下で安楽死させた。

精製プリオンは先に報告した方法(1)に従い、マウス脳から調整した。組換えマウスPrP(rPrP)のため、マウスPrPコドン22から230までをPCRで増幅し、発現ベクターpRSETB(Invitrogen)に挿入して大腸菌BL21(DE3 pLysS)に導入した。rPrPをニッケルキレートカラムに吸着させ、6MグアニジンのpHを低下させて溶出して精製した。ウエスタンブロットにはPrPcoreのN末領域としてB103抗体(2)、中央領域はM142抗体(3)及びC末領域はM218抗体(3)を用いた。MALDI-TOF-MS解析にはVoyager DE-STR(PE Biosystems)を用いた。LEO処理プリオンはそのまま、に処理プリオンはあらかじめSDSで変性させたアルコール沈殿物を1% trifluoroacetic acid (TFA) 50% acetonitrileに溶解して試料とした。N末端アミノ酸配列はprotein sequencer G1000A(Hewlett Packard)で得られた成績をPTH analyzer 1090(Hewlett Packard)で解析・決定した。なお、動物実験は本学「動物実験委員会」の指針の範囲内で実施された。

## 〔成績〕

図1に精製プリオンの2%LEO処理前と後のMALDI-TOF-MS解析の成績を示した。処理前の試料の低分子部分には明りょうなピークは見られないが、処理後の試料には矢印で示すように幾つかのピークが集まったおおまかな6つのピークが検出された。このことはPrPがLEOによってランダムに切断されるのではなく、ある特定の部分で切断が起きることを示している。

PK処理されたPrP<sup>Sc</sup>の3本のバンドは処理前では18800、21300及び24200を中心にしたピークとして観察され、処理後では20300、22900及び25600に分子量が増加していた。即ち、LEO処理により3本のバンドはそれぞれ分子量が1500、1600および1400増加した。

LEOによる切断点を調べた。この目的には、プリオンは複数分子種のPrPから構成されているため不向きと考え、組換えPrPを用いた。図2Aに2%LEO処理したrPrPの泳動パターンを示した。分解産物である主なバンドが1本と弱いバンドが検出された。メンブランフィルターに転写された主バンドのN末端アミノ酸配列を末端から15残基まで調べた所、主たる配列はAAGAVVGGGLGGYMLでありコドン129からの配列に一致した。1サイクル前、あるいは後に主配列と同じアミノ酸が出現することから、主たる切断点がコドン129であり、その前後で切断された分子も存在することが示唆された。

LEOによって切断された断片にC端が保存されている可能性があるため、認識部位の異なる3つの抗体で処理前後のプリオンを調べた(図2B)。処理前のプリオンに含まれる低分子部分には何れの抗体とも反応する断片が含まれているが、処理後にはC端に対する抗体とだけ反応する断片(矢印で示す)だけとなった。LEOによる切断はプリオン特異的か否か、アルブミンを用いて調べた。図2Cに示すようにアルブミンからもLEOによって1本の切断断片と推定されるバンド(矢印で示す)が検出された。しかしスメア様のバンドは見られないことから、切断は特定部分で起きることが示唆された。