

## **Patients and methods**

We collected CSF samples from 100 patients, diagnosed CJD, AD, cerebrovascular disorders (CVD), Pick disease, Parkinson disease (PD), corticobasal degeneration (CBD), Huntington disease, front-temporal dementia (FTD), progressive supranuclear palsy (PSP) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We also obtained CSF from four healthy volunteers. We analyzed biochemical markers (14-3-3 protein, t-tau protein and p-tau protein) in CSF samples.

All cases with CJD were classified as “definite”, “probable”, or “possible” cases by Master’s criteria (Master et al, 1979).

Genomic DNAs extracted from peripheral blood leukocytes were used to amplify the open reading frame (ORF) of the PrP gene by polymerase chain reactions. The products were searched for polymorphisms at codon 129 and 219 by sequencing as described.

According to the clinical criteria including EEG examination, all suspected cases of CJD were classified as “definite”, “probable” or “possible” cases on Master’s criteria.

### **Analysis of t-tau protein and p-tau protein in CSF samples**

Kits from Innogenetics NV (Ghent, Belgium) were used to determine t-tau

protein in CSF samples derived from one hundred patients. Innotech h-tau Ab and Innotech p-tau Ab were used as first monoclonal antibodies.

The ELISA is sensitive in detecting t-tau protein from 70-1120 pg/ml on CSF of human. ELISA test was constructed to detect both t-tau using three different phosphorylation independent antibodies (AT120:218-224, HT7, BT2:192-198) to tau protein.

Innogenetics NV (Ghent, Belgium) showed that p-tau protein using one phosphorylation dependent antibody (AT270: threonine 181, HT7) against tau protein. The ELISA is sensitive in detecting p-tau protein from 25-150 pg/ml on CSF of human.

We measured the ELISA of t-tau protein and p-tau protein according to the manuals of manufacturer's instruction and using an identical standard in all experiments.

The resulting signals were measured and quantified using Labry system image station 440nm accompanying software. These measurements were used to calculate the ration of each signal to standard.

#### **Detection method of $\square$ -isoform of 14-3-3 protein**

The 14-3-3 protein immunoassay in CSF was performed on all samples according to previously published standard sample (Hsich G et al., 1996). Detection of

the bands by polyclonal antibody against  $\beta$ -isoform of 14-3-3 (Santa CruzBiotech and IBL Company) was performed by using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham Buchler).

## **Results**

### **Selection of Patients**

The profiles of 100 patients were listed in Table1. One hundred patients were divided into two groups (CJD group (n=13) and non-CJD group (n=87)). Non-CJD group included other neurodegenerative diseases except CJD and normal subjects.

Thirteen patients were classified into 4 “definite” cases (1 case M232R, 2 case MM2-cortical form, 1 case MM1) and 9 “probable” cases (7 cases; MM1, 1 case; Heindenhein variant, 1 case; dura graft associated CJD) by Master’s criteria (Master et al, 1979) and Parchi’s classification (Parchi P et al, 1999).

### **Detection of $\beta$ isoform of 14-3-3 protein**

We analyzed  $\beta$  isoform of 14-3-3 protein in all CSF samples. In CJD group, all 13 patients showed  $\beta$  isoform of 14-3-3 protein on CSF samples at least at certain clinical phase. In two cases of early stage CJD, 14-3-3 protein was detectable. In these cases, second assay performed with CSF obtained one month later showed positive bands. On the other hand, two patients with AD in non-CJD group were positive for 14-3-3 protein.

### **ELISA assay of t-tau protein and p-tau protein in CSF samples**

T-tau protein levels in CSF were also determined(Fig. 1). Titers of t-tau in

CJD group (1,248pg/ml) ranged higher than non-CJD group (16,087pg/ml) (mean±SD: 7.174±6552 pg/ml). (Fig. 1 and Table 2) In AD group, levels of t-tau protein ranged between 117pg/ml and 1389pg/ml (mean ± SD: 387.37 ± 280.2pg/ml). The levels of CVD patients ranged between 172pg/ml and 1300pg/ml (mean ± SD: 623.4 ± 612 pg/ml). T-tau levels of CJD patients were significantly higher than those of the non-CJD group ( $p<0.001$ ). T-tau levels of CJD were higher than those of CVD and AD ( $p<0.05$ ).

Levels of p-tau protein ranged between 27pg/ml and 44.48pg/ml (mean±SD: 36.38±4.86 pg/ml) in CJD. In AD, titers ranged between 22.0pg/ml and 178.9pg/ml (mean±SD:55.2±31.56pg/ml) (Fig. 2 and Table 2). In CVD, titers ranged between 20 and 95.23pg/ml (mean 55.7 ±31.6pg/ml).

#### **The ratio of p-tau protein / t-tau protein in CSF sample**

The ratio of p-tau protein / t-tau protein (p/t ratio) was calculated with all CSF samples. The p/t ratio of patients with CJD ranged between  $0.181 \times 10^{-2}$  and  $3.21 \times 10^{-2}$  (mean±SD:  $1.147 \times 10^{-2} \pm 1.079 \times 10^{-2}$ ). In contrast, it ranged between  $4.40 \times 10^{-2}$  and  $145 \times 10^{-2}$  (mean±SD:  $18.36 \times 10^{-2} \pm 18.38 \times 10^{-2}$ ) in AD (Fig. 2 and Table 2), and in CVD it ranged between  $2.64 \times 10^{-2}$  and  $23.8 \times 10^{-2}$  (mean±SD:  $9.593 \times 10^{-2} \pm 7.588 \times 10^{-2}$ ).

Particularly among patients with higher levels of t-tau protein ( $>1300$  pg/ml), p/t ratio of CJD patients stayed lower than the other patients with AD or CVD ( $P<0.001$ ). The

lowest was the patients with CJD among other groups. Also difference of p/t ratio between CJD group and non-CJD group was significant ( $P < 0.001$ ). The ratio showed no overlap with any other single case in non-CJD group.

## **Discussion**

We checked the level of t-tau protein and p-tau protein in CSF samples derived from one hundred patients with CJD, non-CJD with various neurodegenerative diseases and normal subjects. Our data indicated the significance of t-tau protein and p-tau protein as diagnostic markers of CJD.

Sixteen out of one hundred patients showed  $>1,000$  pg/ml of t-tau protein in CSF. These sixteen patients comprised all thirteen patients with CJD and three patients of non-CJD groups (2 patients with AD and 1 patient with CVD).

Judging from our data, the best results for the sensitivity and the specificity were obtained at a cut-off of 1,260 pg/ml. According to Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis by SPSS software, the sensitivity was 92.3%, and the specificity was 97%. On the other hand, we could not distinguish two patients with AD from with CJD patients by using both t-tau protein and 14-3-3 protein.

Neuropathological significance of AD is formation of neurofibrillary tangles (NFT), which is originated by phosphorylation of tau protein. In contrast, spongiform

changes, astrocytic gliosis and the accumulation of PrP<sup>Sc</sup> but no NFT accumulation can be observed in CJD brain. The phosphorylation of tau protein is not involved in the pathogenetic process of CJD brain damage.

Thus, we focused on the phosphorylated tau in CSF of patients with AD and other neurodegenerative diseases.

Therefore, we designed to measure the p/t ratio to discriminate CJD from AD. According to our results of p/t ratio, all patients with AD were identified at the ratio of >0.04, but all patients with CJD were identified at <0.04(Fig. 3). We could clearly distinguish CJD from AD by detecting p/t ratio.

As a conclusion, we recommend to use t-tau protein (>1000pg/ml) and as a first screening test, and the p/t ratio as a second screening test in CSF.

T-tau levels of CJD in our study showed slightly lower than previously reported (Otto M et al, 2002 and Van Everbroeck B et al, 2003). CSF materials used in this study were collected at early stages. Nine out of thirteen cases of CJD were examined within three month after onset. On the other hand, CSF samples were mainly obtained from 4 month to 12 month after onset in previous report, which is middle stage of clinical course of CJD (Van Everbroeck B et al, 2003). In general, t-tau levels in middle stage were showed higher than in early stage (data not shown).

We serially examined t-tau protein of CSF with CJD in clinical course. However, the abnormal findings of the diffusion-weighted MRI and 14-3-3 protein were not detected in two cases of CJD in early stage, high concentration of t-tau protein (2,841pg/ml and 1,460pg/ml) could be detected. One month after the first assay, we found typical changes to CJD by diffusion-weighted MRI, positive 14-3-3 protein bands and an elevated t-tau protein (10,634/ml and 3,495pg/ml). This result indicates that t-tau protein may be a possible diagnostic marker of CJD at early stage.



References

Demerosl P, Heiner L, et al. (1999) Diffusion-weighted MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. **52 (1): 205-208**

Otto M, Wiltfang J, et al. (2002) Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. **58(2): 192-197**

Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, et al. (1998), Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. **43(1): 32-40**

Hsich G, Kenney K, et al. (1996) The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med*. **26; 335(13): 924-930**

Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretschmar H. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol*. **46(2): 224-233.**

Van Everbroeck B, Quoilin S, Boons J, Martin JJ, Cras P. (2003) A prospective study of

CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*

*Neurosurg Psychiatry.* **74(9): 1210-1214**

Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Bernoulli C, Asher DM. (1979)

Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of

familial and sporadic clustering. *Ann Neurol.* **5(2): 177-188.**

Fig.1

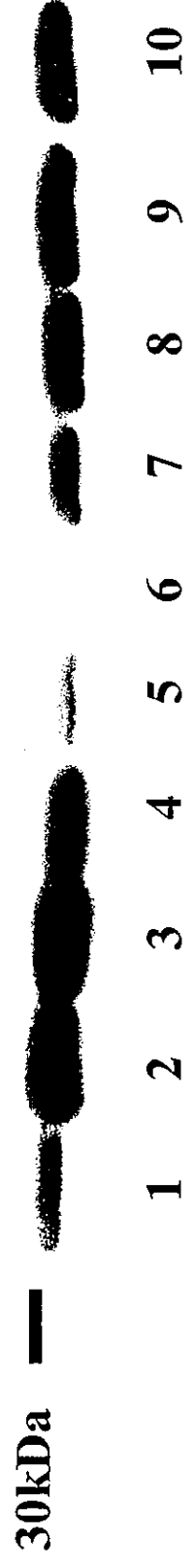


Fig.2

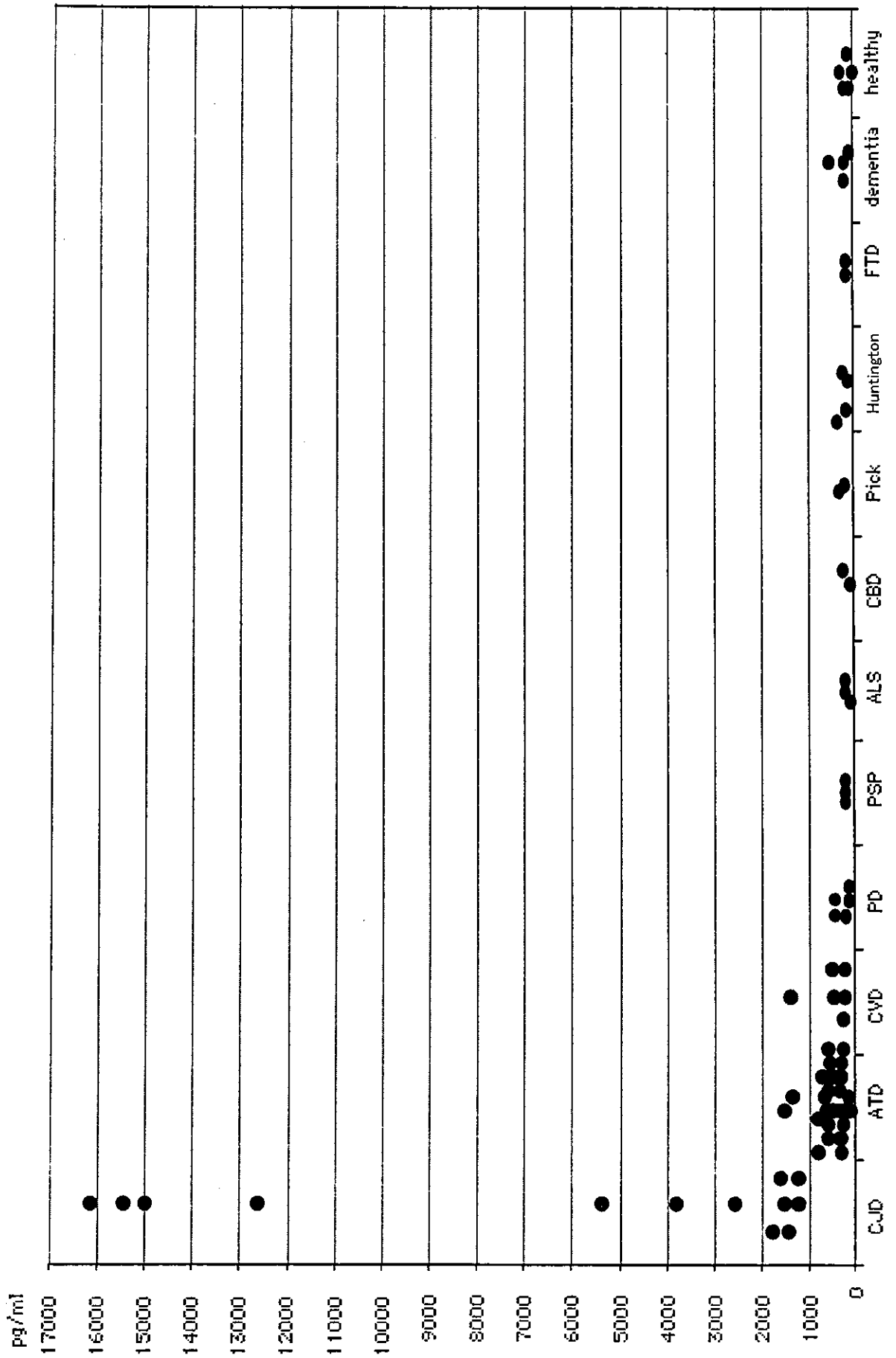


Fig.3

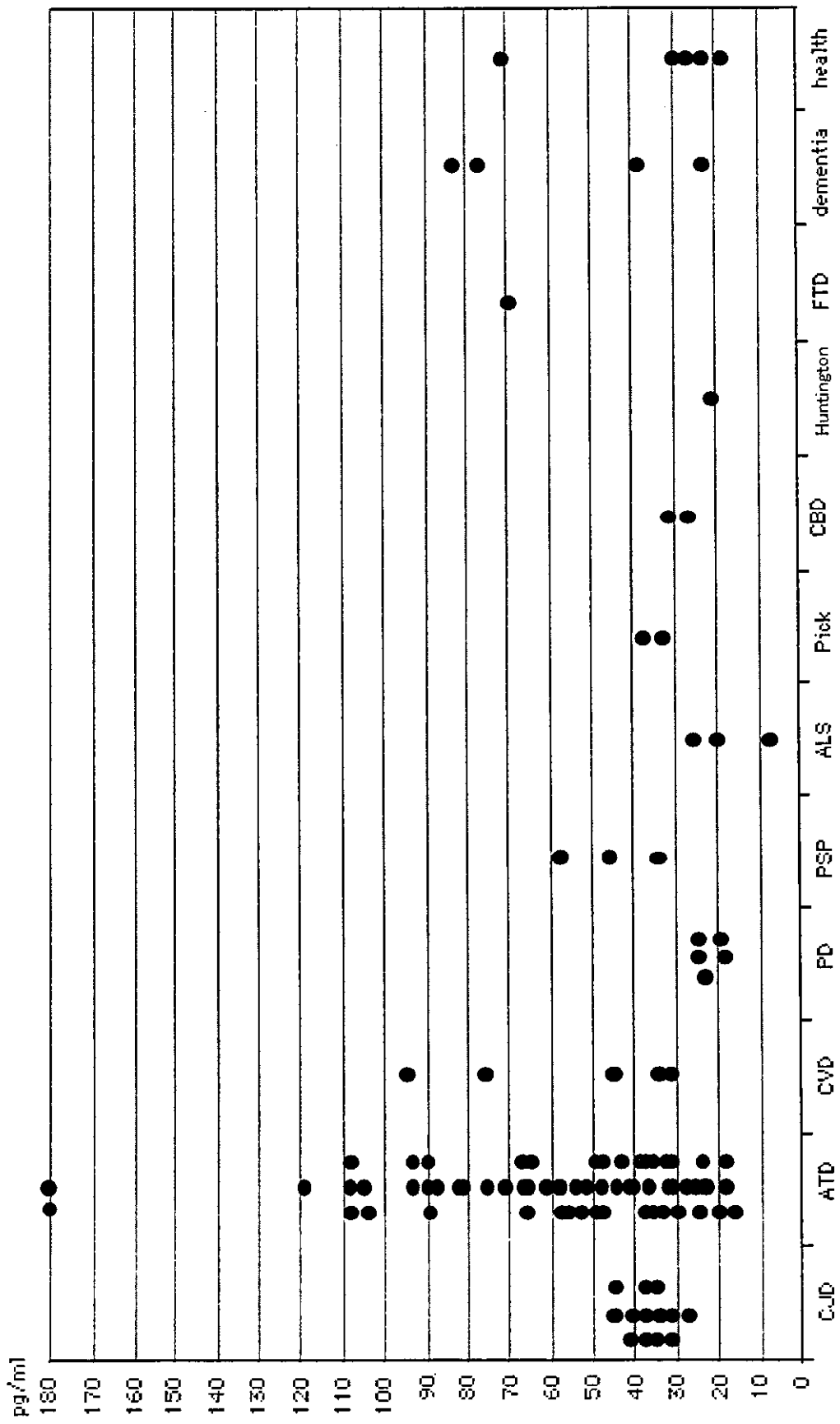
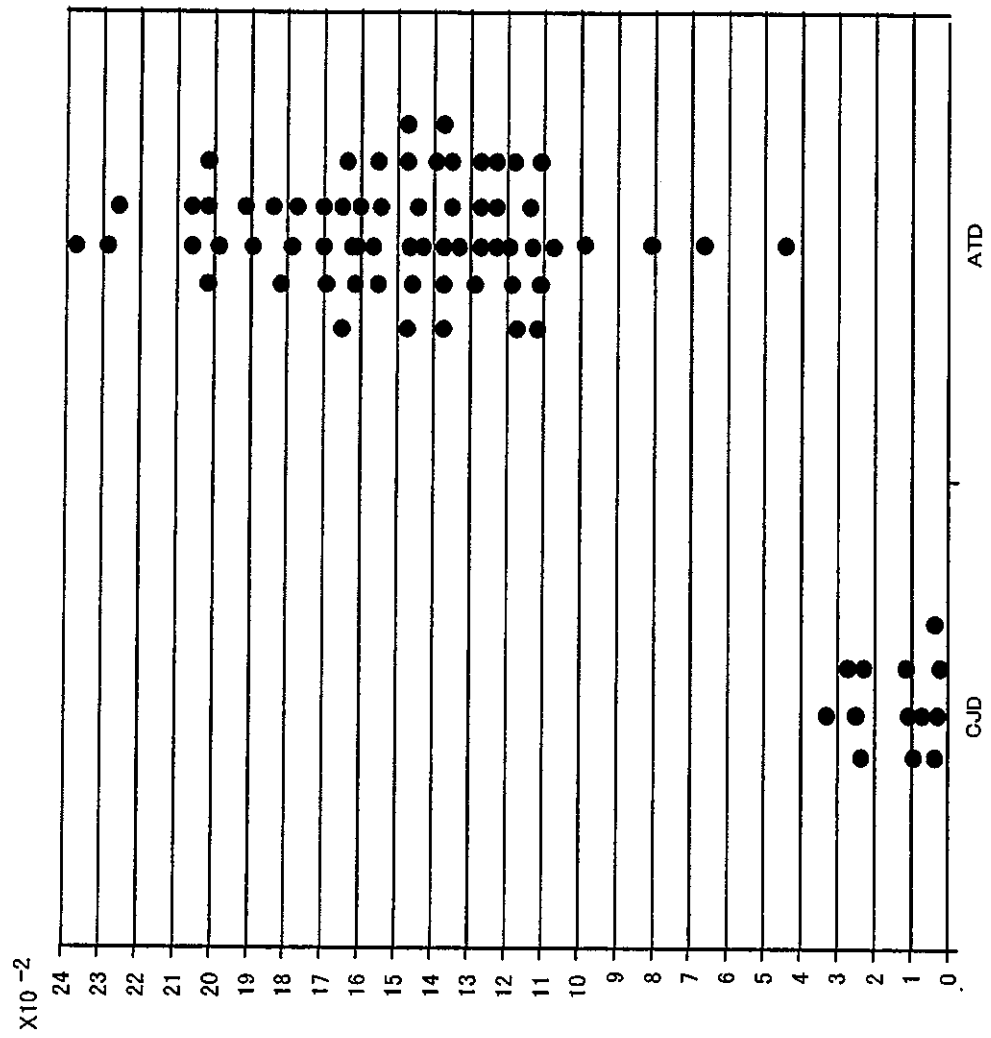


Fig.4



日本臨牀 62 卷 増刊号 1 (2004 年 1 月 28 日発行) 別刷

# 痴呆症学 (2)

—高齢社会と脳科学の進歩—

臨床編—各論—

IV. 一般身体疾患による痴呆

脳・髄膜感染症

孤発性プリオン病

医原性 Creutzfeldt-Jakob 病

佐藤克也<sup>1</sup> 調 漸<sup>1</sup> 片峰 茂<sup>1</sup> 村本 環<sup>2</sup> 北本哲之<sup>2</sup>

表 1 硬膜移植後 CJD のサブタイプの比較検討について

1. 臨床的な側面では
① 潜伏期間および罹病期間はほぼ等しい
② 脳波所見では PSD の所見がみられないことが多く、みられても PSD は後期にみられる。
③ 無動性無言は non-plaque type は plaque type に比べ、早期にみられる。
④ ミオクローススは non-plaque type は plaque type に比べ、早期にみられる。
2. 病理学的な側面では (plaque type での特徴)
① 大脳皮質および小脳において florid plaque が認められる。
② 免疫染色において小脳白質で数珠状変化が認められる。
③ 免疫染色において小脳白質で血管周囲濃染が認められる。
④ 免疫染色において大脳白質で神経周囲での濃染が認められる。

でに多い。また、硬膜移植後 CJD 患者の移植後潜伏期間の検討を図 2 にて示す。発症曲線はまだ右肩上がりであり、今後の発症例の増加が懸念される。

### c. 硬膜移植後 CJD の臨床

硬膜移植後 CJD の発症年齢は孤発性 CJD に比べ、若干若く、平均 53 歳であるが、年齢層は 15-73 歳と幅広い。手術の内容を反映して若年発症例は脳腫瘍手術による症例が多い。潜伏期間については 16 カ月から 17 年までと極めて多様で、当然ではあるが、観察期間が長くなるにつれて潜伏期間は延長する傾向にある。男女比については有意差を示すデータは得られていない。初発症状は小脳失調、歩行のふらふら感が多い。死亡までの経過は平均 17 カ月程度である。硬膜移植部位によって臨床症状は異なるといわれている。特に天幕下移植の症例では小脳失調の症例が多く、天幕上移植では高次機能障害が多い<sup>9)</sup>。

### 3. 診断(硬膜移植後 CJD に限る)

耳鼻科、整形外科および脳外科による硬膜移植の既往があり、高次機能障害および進行性痴呆に加え、小脳失調があり、診察上ミオクローススが認められたケースでは積極的に疑わなければいけない。更に臨床症状に加え、髄液検査にて 14-3-3 蛋白の定性的および tau 蛋白の定量的検出、神経特異エノラーゼ(NSE)、S-100 蛋白の上昇が参考になる。

脳波所見で周期性同期性放電(PSD)所見が認められるケースが多いが、PSD がみられないケ

ースも存在するために注意を要する(後述)。

現在、画像診断として MRI での拡散強調画像は孤発性 CJD において特異性が高く、有用な診断法の一つである。医原性 CJD においても、MRI での拡散強調画像は今後詳細に検討すべき事項の一つであろう。

### 4. 硬膜移植後 CJD のサブタイプの確立

北本ら<sup>9,10)</sup>は硬膜移植後 CJD について、孤発性 CJD (古典的 CJD) と臨床的・病理学的に類似したケース (non-plaque type) と病理学的に florid plaque をもったタイプ (plaque type)<sup>11-15)</sup> の 2 つのタイプに分類できると報告している(表 1)。特徴を臨床と病理学的な側面に分けて説明すると、plaque type では臨床的には潜伏期間および罹病期間は non-plaque type とほぼ等しいものの、脳波所見では PSD がみられないことが多く、みられても PSD は後期にみられる。無動性無言は non-plaque type は plaque type に比べ、早期からみられる。ミオクローススは non-plaque type は plaque type に比べ、早期にみられる。病理学的には plaque type では大脳皮質および小脳において特徴的な florid plaque が認められるほか、免疫染色(3F4 抗体)において①小脳白質での数珠状変化、②小脳白質血管周囲の濃染、③大脳白質神経周囲での濃染などの特徴的变化が認められる。今後硬膜移植後 CJD のサブタイプの存在理由の解明が早急に必要であろう。



## 5. 予防と治療

日本においては1991年までで汚染硬膜の使用が全面禁止されたにもかかわらず硬膜移植後CJDはその極めて長い潜伏期のためにいまだに散発的な発症がみられており、引き続き重要な問題として継続的にスクリーニングをしておく必要がある。現在まで医原性CJDの原因は、深部脳波電極、脳外科手術、角膜移植、成長ホルモン、ゴナドトロピン、ヒト硬膜移植に限定されている。血液感染はまず成立しないと考えられており、また医療関係者における感染事故も

現在まで報告されていないが、その可能性が完全には否定されたわけではない。今後とも医療関係者における感染事故を防止するためにも、採血や脳脊髄液の採取の際の針刺し事故や、CJDの剖検における事故に正確に対処できるマニュアルの周知徹底が必要であると思われる。

今後、医原性CJDの早期診断と治療法の開発は緊急な課題であるが、正確な病態評価と福岡大学や長崎大学におけるキナクリンやペントサンポリ硫酸による治療法の開発・改良および強力な治療法の開発が急務であろう。

## ■ 文 献

- 1) 厚生省：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報告書(班長：佐藤 猛)，1997年3月。
- 2) Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts—Japan. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 46(45): 1066-1069, 1997.
- 3) 佐藤 猛ほか：感染性プリオン病：硬膜移植後CJDと変異型CJD. *神経研究の進歩* 47(1): 100-108, 2003.
- 4) Brown P, et al: Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 55(8): 1075-1081, 2000.
- 5) Hoshi K, et al: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* 55(5): 718-721, 2000.
- 6) Thadani V, et al: Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. *J Neurosurg* 69(5): 766-769, 1988.
- 7) Miyashita K, et al: Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with a cadaveric dural graft. *Neurology* 41(6): 940-941, 1991.
- 8) Hannah EL, et al: Creutzfeldt-Jakob disease after receipt of a previously unimplicated brand of dura mater graft. *Neurology* 56: 1080-1083, 2001.
- 9) 厚生労働省遅発性ウイルス研究班(班長：北本哲之)：クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル，p28-31, 2002.
- 10) 佐藤克也ほか：硬膜移植後発症クロイツフェルト-ヤコブ病のサブタイプの確立. *臨床神経* 42(12): 1353, 2002.
- 11) Lane KL, et al: Creutzfeldt-Jakob disease in a pregnant woman with an implanted dura mater graft. *Neurosurgery* 34(4): 737-739; discussion 739-740, 1994.
- 12) Kopp N, et al: Creutzfeldt-Jakob disease in a 52-year-old woman with florid plaques. *Lancet* 348(9036): 1239-1240, 1996.
- 13) Takashima S, et al: Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques after cadaveric dural graft in a Japanese woman. *Lancet* 350(9081): 865-866, 1997.
- 14) Shimizu S, et al: Creutzfeldt-Jakob disease with florid-type plaques after cadaveric dura mater grafting. *Arch Neurol* 56(3): 357-362, 1999.
- 15) Kimura K, et al: Atypical form of dural graft associated Creutzfeldt-Jakob disease: report of a post-mortem case with review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70(5): 696-699, 2001.

脳・髄膜感染症  
孤発性プリオン病

## 医原性 Creutzfeldt-Jakob 病

Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease

佐藤克也<sup>1</sup> 調 漸<sup>1</sup> 片峰 茂<sup>1</sup> 村本 環<sup>2</sup> 北本哲之<sup>2</sup>

**Key words:** 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病, non-plaque type, plaque type, florid plaque

### 1. 概 念

英国にて牛海綿状脳症(いわゆる狂牛病: BSE)がヒトへ伝播したと考えられる新型の Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)患者症例が見いだされ, 1996年3月に変異型 CJD(vCJD)と命名され報告された。これを受け, 同年我が国において緊急に厚生省研究班が組織され<sup>1)</sup>, 日本でも変異型 CJD を含めたすべての CJD に関する実態調査が初めて行われた。皮肉にもこの調査で, 我が国には硬膜移植後の CJD が各国に比べて極めて多数例の発症がある実態が明らかになった。佐藤ら MMWR<sup>2)</sup>は我が国でのヒト硬膜移植後の CJD の症例をこの時点で 43 例と報告した。その後も徐々に報告例が増え, 2003年1月現在では 91 例に達している<sup>3)</sup>。

医原性 CJD は脳外科手術などの医療行為によって感染し発症した CJD のことを指すが, 我が国では後述するようにヒト硬膜移植例以外の医原性 CJD の発症は極めてまれであり, 本稿ではヒト硬膜移植例を中心に述べる。

### 2. 臨床的特徴

#### a. 医原性 CJD の原因

2000年に Brown らが報告した医原性 CJD の内訳は, 深部脳波電極埋め込み術によるものが 6 例, 脳外科手術が 3 例, 角膜移植 3 例, 成長ホルモン 146 例, ゴナドトロピン 4 例, ヒト硬膜移植例 113 例となっている<sup>4)</sup>。その中で硬膜移植後 CJD は日本に 63 例と飛び抜けて多く, 次いでドイツ, イタリアなどで報告があるが, ヨーロッパでは成長ホルモンによる CJD の報告例の方が多い。現在までに我が国においては角膜移植 2 例と硬膜移植例 91 例が報告されており, 成長ホルモンやゴナドトロピンによる症例の報告はない。硬膜移植に関連しない脳外科手術による症例の報告が 1 例あるのみである。

#### b. 硬膜移植後 CJD の歴史および問題点

1973年にドイツの B. Brown 社が Lyodura(ヒト乾燥硬膜)の日本での販売を開始し, 更に Tutoplast 社も日本での販売に参入した。以来, 年間計約 1 万個の汚染された可能性のある硬膜が, 約 10 年間継続して輸入されることとなった。ちなみに, 日本でのヒト乾燥硬膜のシェアは Lyodura 社と Tutoplast 社とは 2:1 であった。

<sup>1</sup>Katsuya Satoh, Susumu Shirabe, Shigeru Katamine: First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine 長崎大学医学部第1内科 <sup>2</sup>Tamaki Muramoto, Tetsuyuki Kitamoto: Department of Neurological Science, Tohoku University, Graduate School of Medicine 東北大学大学院医学系研究科神経科学病態神経学分野

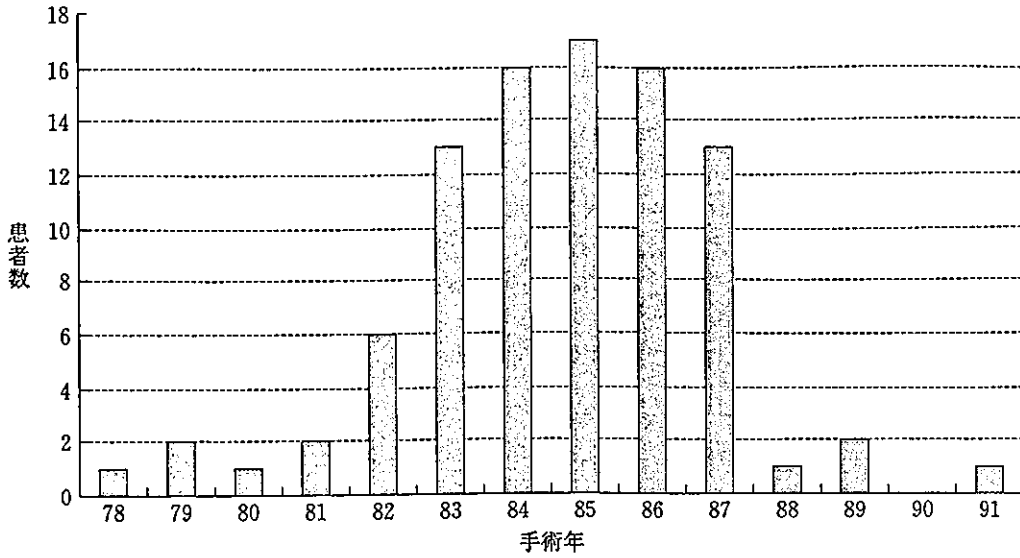


図1 硬膜移植年と患者数

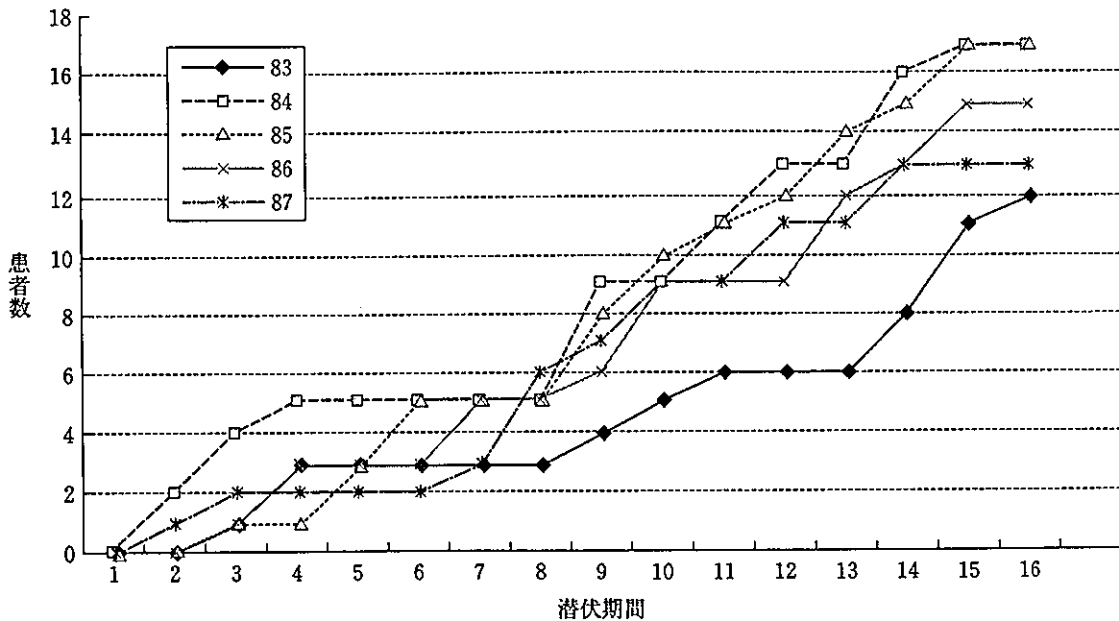


図2 硬膜移植年別の患者数

ヒト乾燥硬膜移植後のCJD例を1987年Thadaniら<sup>6)</sup>が最初に報告し、我が国でも1991年に新潟大学脳研究所の宮下ら<sup>7)</sup>が日本で最初の症例を報告している。原因はアルカリ処理が行われていない汚染硬膜による感染であると考えられている。海外では1987年以後アルカリ未処理硬膜は回収され、1N NaOHで処理した硬膜が使用された。残念なことに日本では未処理の硬膜の一部のみしか回収されず、1988年以降も硬膜使用による感染が散発することとなった。

1997年厚生省によってヒト乾燥硬膜の使用が全面的に禁止された。ヒト硬膜移植後CJDはLyodura社とTutoplast社の製品のいずれにおいても報告があるが、Tutoplast社の製品からはアメリカで1例報告<sup>8)</sup>があるのみで、日本では報告例はない。我が国のすべての症例がLyodura社の製品の使用によるものである。現在までの移植年度と硬膜移植後CJD患者の推移を図1に示す。汚染ヒト乾燥硬膜が移植された時期は1978-91年であり、なかでも1983-87年ま

発症早期から MRI 拡散強調画像を経時的に  
しらべえた Creutzfeldt-Jakob 病の 1 例

富田 逸郎 佐藤 克也 調 漸  
長郷 国彦 佐藤 聡 辻畑 光宏

臨床神経学 第44巻 第3号 別刷  
(2004年3月1日発行)