

プリオン滅菌の現実的方法論の検討

研究分担者：大久保 憲（東京医療保健大学・医療情報学科 学科長・教授）

研究要旨

手術器械を対象としたプリオンの滅菌法については、アルカリ洗浄剤を使用したウォッシュ・デイスインフェクターによる洗浄後にプリバキューム式高圧蒸気滅菌器による134~135℃ 8~10分間の処理法がある。しかし、臨床現場においては内視鏡手術の増加に伴い、非耐熱性の手術器材を滅菌する機会が多くなっている。非耐熱性の器材に対するプリオン対策としては、文献的検索において過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法がクローズアップされている。今回の報告では、プラズマ滅菌に関する代表的な文献を示し、あわせて臨床現場での処理を念頭にした研究者4名からのコメントが得られたので原文とともに日本語訳を提示する。

A. 研究目的

プリオン滅菌については、臨床現場での二次感染防止の手段として高温でアルカリ洗浄後にプリバキューム式高圧蒸気滅菌をおこなうことが一般的となっているが、非耐熱性器材についての滅菌法は、酸化エチレンガス滅菌法が無効であるため、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法を使用しなければならない。今回、プリオンに対する低温滅菌法についての文献を提示するとともに、研究者4名から日本手術医学会総会におけるグローバルシンポジウム「世界のプリオン対策」での講演に対して寄せられた最近の情報である。

B. 文献及び権威者からの報告

1. Yan ZX, Stitz L, Heeg P, Roth K, Mauz P-S. Low-Temperature Inactivation of Prion Protein on Surgical Steel Surfaces with Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterillization. *Zentr Steril* 2008; 16: 26-34. (文献提示)
2. 連合王国(英国)の臨床細菌学者 Geoff. Ridgway MD, FRCP, FRCPath. CJD and vCJD in the UK: Reprocessing guidelines for reusable surgical instruments. (報告提示)
3. 世界のプリオン不活性化実験の第一人者であるドイツの Klaus Roth. Low-temperature inactivation of prion protein on surgical steel surfaces. (報告提示)
4. フランスの医療現場で病院疫学者として

活躍している Professor Philippe Hartemann. Situation of prion-CJD issue in France. (報告提示)

5. 米国の感染制御学の第一人者である Professor William A. Rutala. Prions and processing of reusable surgical instruments: United State perspective. (報告提示)

C. 文献提示

Yan ZX, Stitz L, Heeg P, Roth K, Mauz P-S. Low-Temperature Inactivation of Prion Protein on Surgical Steel Surfaces with Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterillization. *Zentr Steril* 2008; 16: 26-34.

病原性プリオン蛋白(PrP^{Sc})は、医療施設で日常的におこなわれている滅菌法に抵抗性であり、手術器具を介して医原性伝播が起きる可能性がある。非耐熱性の器材に対して、2種類の異なる低温プラズマ滅菌工程(過酸化水素ガスプラズマ滅菌器)による有効性及びアルカリ洗浄剤との併用による有効性が検証されている。

スクレイパー感染ハムスターの10%脳ホモジネートを摂取材料として用いている。

その結果、70℃でのアルカリ洗浄後に高圧蒸気滅菌をおこなったところ、5~6 log以上の感染性の低下が認められた。アルカリ洗浄後に過酸化水素プラズマ滅菌器(ステラッド™100S)のロングサイクルを2回連続行った場合にも同様の結果が得られた。

55℃でのアルカリ洗浄後、過酸化水素ガス

プラズマ滅菌のロングサイクルを2回連続で行ったところ、感染性は消失していた。

新型の機種である過酸化水素ガスプラズマ滅菌器（ステラッド™NX）にて滅菌をおこなった場合には感染徴候は全く見られなかった。

D. 報告紹介

報告 1

英国における CJD および vCJD：再使用可能な手術器具に対する再処理指針

Geoffrey L Ridgway MD, FRCP, FRCPath,
Clinical Microbiologist,
Ringwood, Hampshire, 205, BH24 3AN,
England

伝播性海綿状脳症 (TSEs) に関連した孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の約 50 例から 60 例が毎年英国内で発生している。これまでに英国では変異型の CJD167 例が発生している。患者 3 名は依然生存しているが、健康状態は不良である。vCJD の最初の例は 1995 年に確認され、2000 年にその数はピークに達し、その後 2008 年までに 1 例に減少した。報告されたすべての臨床例はヒト染色体 20 のコドン 129 のメチオニンが同型であると報告されてきた。一方、このコドンでメチオニンまたはバリンが異型であるかバリンが同型である英国人口中には、vCJD に関連した異常プリオンのキャリアが存在することが知られている。これらのグループは疾患の潜伏期が長期であり、生じる可能性のある二次波がその後 20 年以上に及ぶと考えられている。

英国人口内のキャリア状態の有病率に関するデータは信頼の置けるものではない。最近の最も信頼できるデータから有病率は 4,000 名中 1 名とされており、その信頼区間は非常に広いものである。保存された扁桃試料についての最近の大規模試験は有病率を明らかにすることに寄与しなかった。

異常プリオンが不適切に汚染除去された歯科器具または手術器械に移行する可能性は、特に R_0 計算値 (疾患の伝染性の測定値) が 1 に近い場合には極めて現実的であると考えられている。その結果、英国保健省は汚染された器具を経由してのプリオンの移行を減じるためにこれまでに多くの手段を講じている。

診断試験：

特に、供血者となる可能性のある者のスクリーニングに適応可能な試験は、現在評価中である。その問題点は偽陽性結果が真の陽性数を上回る見込みであり、それらを識別する明白な手段はないことである。このため、そのような試験を実施する方法は困難である。

国の汚染除去戦略：

この戦略の目的は以下の通りである。

最も高度な欧州基準の採用

外部査察

国の基準—地方に配信

国民健康保健 (NHS) または営利業者に対する同等の機会

滅菌サービスに対する NHS/営利業者の提携

イングランドの首席医務官は、判定基準が以下の取り組みにより達成され得ると付け加えることによって上記の目的を最近明らかにした。すなわち、医療機器規制により承認されたユニットを用い、ヘルスケア委員会の監査に従った汚染除去サービスを用い、CE マークが付与された単回使用器具またはこれらすべて 3 種類の組み合わせを用いることであった。

技術および科学諮問委員会のプリオン除去
この委員会の委任事項は研究所見の効果的
点検を確実に実施し、エビデンスにより変更
の必要性が指示される手術器具の汚染除去
における実務上の適用に向けてその所見
を確実に展開させることである。同委員会には
分科委員会が 3 つあり、業界、研究および
内視鏡を対象としている。短期ワーキング
グループは、現在市場にあるか、まもなく市場
に出る抗プリオン技術の点検を付託されて
おり、それらの技術が汚染除去のライフサイ
クルにいかにか組み入れ可能であるかを特定
することを目的とし、さらに研究と今後の手
段に対する助言との間のギャップを特定す
ることを目的としている。

同グループの報告は以下になされている。

http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_086805

海綿状脳症諮問委員会 (SEAC)

この政策諮問委員会は 2006 年にプリオンの汚染除去に関して以下の声明を作成した。汚染除去技術の評価に対する重要な基準に

は次の内容が含まれている。(i) 特定の技術の適用による汚染低下の広範かつダイナミックレンジを超える定量化、(ii) さまざまな技術の直接的比較を可能にする実験的取り組みの標準化、および(iii) 手術器械由来のヒトプリオン感染力の除去に適用する際に技術の有効性について信頼可能な予測をすること。

これに加えて同委員会が勧告した内容は、汚染除去処理が新規技術の使用により変更されるときには、研究者はいつそう広範な動物モデル（ハムスターのみにとどまらない）を用い、その使用により残留物が確実に残らないか他の感染物質の不活性化を傷害しないようにし、バイオアッセイを含み、汚染除去サイクルを通じて器具の水分を維持する必要性を考慮する目的で、力価における低下度を定量化する必要があるとの内容であった。

2006年、英国海綿状脳症諮問委員会(SEAC)は歯科に対して以下の声明を発表した。報告のあった試験で用いられた齧歯類動物の妥当性に関しては懸念があるものの、予備調査の所見から歯科処置を介した潜在的なvCJDの伝染リスクが依然に予想されたよりも大きい可能性があることが示唆されている。同委員会はすべての歯内のファイルおよびリーマーは単回使用として用いられるように勧告した。

英国立医療技術評価機構(NICE)

2006年11月、NICEは高リスク組織(中枢神経系および後方眼組織)に対して使用される再使用可能な手術器具について次の勧告を発表した。高リスク組織と接触する器具からの漏出を防止し、補助器具がそのセットとともにかならず存在しているようにすること。軟性神経内視鏡よりも鋼製のものを使用すること。脳神経外科には単回使用のアクセサリを用い、1997年以降は小児に対して分離プールした器具を用いること。単回使用器具は再使用可能な器具に対して同等の品質である場合にのみ使用するべきである。

2008年の追跡調査試験では汚染除去に対する品質管理システムの基準に明らかな低下はなかったが、NICEの勧告を完全に実施したエビデンスがほとんどないことが明らかになった。若年小児向け器具の分離プールに対する勧告は準拠されておらず、高リスク手術に対する単一器具追跡システムが中枢には用いられていないのである。特に懸念さ

れることは手術セットが経済的理由で小規模なセットに分割され、それによりいつそう多くの補助パックの使用が必要とされ、セット間の漏出リスクが高まっていることである。

迅速調査委員会

同委員会は、病院の感染管理向上および院内感染の減少においてNHSにとって価値があると思われる新規かつ新種の装置、材料およびその他の製品またはプロトコルの迅速評価を提供している。

抗プリオンの申し立てをしている2つの製品、すなわちDuPont-Rely+On(TM)プリオン不活性剤およびGenecor-Prinzyme M, Prinzyme MGはこの委員会がこれまでに審査した。双方の製品は入手可能な汚染除去製品への有益な追加になる可能性が高いとみなされたが、実務にその製品を適用する際に特別な懸念が生じた。

医療機器の汚染除去、病院における技術的注意書き

HTM01-01 医療機器の汚染除去

パートA 管理および環境(発行済)

2007年

パートB 装置

2009年春

HTM01-02 病理学的な汚染除去

2009年

HTM01-03 薬学的な汚染除去

2009年

HTM01-04 洗濯(ランドリー)による汚染除去 2008年12月

HTM01-05 歯科の汚染除去(一部発行済) 2008年

HTM01-06 内視鏡の汚染除去

2009年春

HTM01-07 プライマリーケアの汚染除去 2009年

2006年保健法、2008年保健法

この法律によりヘルスケア関連感染の予防および制御のための業務規約の作成が求められた。職務内容4はヘルスケア提供者にヘルスケアに対して清浄かつ適切な環境を提供、維持することを求めており、職務内容10は感染の予防および制御に適用可能なすべての方策およびプロトコルを遵守するための要件である。再使用可能な手術器具の汚染除去およびTSEsの管理が特にこの規

約に含まれている。2008年保健法はヘルスケア関連の感染の制御についての権限を独立した医療分野、社会的分野およびケアホーム分野にまで拡大している。

報告 2

外科用スチール器械表面上のプリオンタンパクの低温不活性化

Klaus Roth

SMP GmbH, Pruefen Validieren Forschen,
Tubingen, Germany.

病的なプリオンタンパク(プリオン)は伝染性海綿状脳症(TSE)を引き起こす感染因子としてみなされている。プリオンの存在が中枢神経系に限定されるとの以前の見解とは対照的に、プリオンはその後リンパ組織、非リンパ組織、血液、骨格筋および皮膚などの神経外組織にも発見されている。このため、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)による交差感染のリスクを最小限にする目的で手術器械を再処理するための具体的な規制が数カ国において実施されてきた。ドイツではロベルト・コッホ研究所(RKI)がvCJDに対して一部の有効性が示された2種類の処理段階の組み合わせ、たとえばpH10以上のアルカリ洗浄後に134°Cの蒸気滅菌をすることを新たな変異型CJDによる交差感染を防止する予防措置として推奨している。

プリオンの新たな汚染除去/排除処理を評価するためにハムスターとスクレイパーの263K株で人工的に汚染した鋼線ワイヤーとを用いて病的なプリオンの感染モデルについてこれまでに報告した。われわれは、ハムスターに適応したプリオンが乾燥状態の鋼線ワイヤーに接着し、汚染されたワイヤーを脳に移植した後または短時間挿入後でさえも疾患を引き起こすことをこれまでに明らかにした。汚染されたワイヤーが移植前に数種類の洗浄、消毒処理および/または滅菌処理を用いて処置されれば、被験動物の生存期間延長により示されたように感染性は低下した。このモデルは、手術器械に対する再処理手順の妥当性を検証するためのプリオン不活性化のバイオアッセイとして非常に有用である。

プリオンは日常的な病院の滅菌手順の多くに対して非常に抵抗性が強いことが知られている。この理由により、効果的なプリオ

ンの汚染除去処置が、特に内視鏡などの非耐熱性器具に対してプリオン病の偶発的病原性伝播を防止するために現在評価されている。

内視鏡には通常高精度の電気光学部品と精密な機械部品の双方か一方が組み込まれ、従来的高温汚染除去処置には不適切である。低温滅菌処置の評価においてわれわれは、汚染されたワイヤーの感染力への効果に対して現在病院で用いられている滅菌手順のみならず洗浄剤と消毒薬とを試験した。被験動物の生存期間平均値により反映される汚染除去の有効性の評価にこのバイオアッセイ方法を用いて、われわれは生存期間と成功を収めた再処理との間に直接的な相関関係を明確に示すことができる(成功を収めた再処理は再処理ワイヤーの移植後18ヵ月の総生存期間として定義された)。

われわれは、自らの過去の試験において70°Cのアルカリ洗浄後のプラズマ滅菌がスチール器具表面上のプリオンに対して有効であることをこれまでに明らかにしている。現行の試験では、2種類の低温プラズマ滅菌処置(STERRAD®100SおよびSTERRAD®システムの新世代であるSTERRAD®NX)を単独か、これらの滅菌処置との高い有効性を示しているアルカリ洗浄剤2種類と組み合わせる追加試験を実施した。

われわれは、未処置の汚染ワイヤーが移植された動物の潜伏期間が約80日であることを見出した。汚染ワイヤーが永久移植の代わりに5分間脳内に挿入されたのみの場合には動物は約100日間生存したことから、鋼線ワイヤーがプリオン伝播の強力なキャリアとしての役割を果たすことが明確に示された。

脳のホモジネートが脳内に直接注入された場合には、その潜伏期間は汚染ワイヤーと比較して有意に短期間とはならなかった(約80日)。酵素洗浄剤が汚染ワイヤーに対して単独で用いられれば、プリオンの感染力の低下に対する効果はほとんどない。

pH11かつ55°Cのアルカリ洗浄剤を用いてワイヤーを処理すれば、感染力の有意な低下が生じる。同じ洗浄処置の後に2回連続してSTERRAD®100Sの長期サイクルが実施された時にはその潜伏期間はさらに延長し、疾患の伝播は認められなかった。

汚染ワイヤーが新世代のSTERRAD®システムであるSTERRAD®NXにより処理された時にはすべての動物は18ヵ月の試験期間を生き

残り、いかなるスクレイパーの臨床徴候も認められなかった。同様に、STERRAD®NX の更なるサイクルを後に実施した洗剤洗浄グループの動物にはいかなる同疾患の臨床徴候も認められなかった。

要するに、われわれは外科用鋼製小物の表面上の伝染性プリオンタンパクの低温不活化が従来の処理処置/工程の組み合わせにより達成できることを明らかにしたのである。さらに言えば、少なくともわれわれの実験環境でわれわれの試験においてテストした洗剤を用いれば、アルカリ洗剤は酵素洗剤に比べて有効性が高いと思われる。

新世代の STERRAD® プラズマ滅菌器 (STERRAD®NX) は、単一段階処理においてさえプリオンタンパクの感染力を消失させるために最も効果的であることが判明した。この結果として、これらの処理または処理の組み合わせが、薬剤およびその他の適用物において病的プリオンタンパクを生じさせる疾患の除去と不活性化の双方または一方に向けた強力なツールに相当しているのである。

報告 3

フランスにおけるプリオン・クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 問題の状況

Philippe Hartemann

ナンシー大学公衆衛生大学院およびナンシー大学病院センター病院衛生部

フランスでは国の専門のサーベイランスによれば、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の発生数は 1992 年の年間 38 件から 2001 年には 110 件に増加し (明らかな増加は恐らくこの国家ベースの監視ネットワークの確立に関連したバイアスが原因であろう)、2008 年までそのまま継続した (6000 万人の居住者である全人口に対して年間約 110-120 例)。これと同じ期間中にフランスは成長ホルモンに関連した深刻な CJD の発生を経験し (1992 年から 2006 年までに死者 100 名)、CJD の全例中約 50%には成長ホルモンが投与されていた。その他の医原性の CJD 例に関連した死者数は同時期に 13 名であった。新たな変異型 CJD 例 (全 22 例、英国に次いで世界で 2 番目) は、フランス (1996 年に 1 例、2000 年に 1 例、2002 年に 3 例) のほうが英国 (1995 年に最初の例) よりも遅れて牛海綿状脳症として発生した。

英国の経験を踏まえて英国と密接に協力しつつ、フランスの衛生当局は医療において CJD および変異型 CJD (v-CJD) の蔓延を防止するための強力な法的規制を策定することを決定した。最初の規制文書は予防原則すなわち手術および病理学における特別な予防法に基づいて作成された (通達 45、1994 年 7 月 12 日付)。同文書は「通達 100」により完成され (1995 年 12 月 22 日付)、医療機器の事前処置および滅菌消毒の双方に対する質問票および設定プロトコールにより発生し得る CJD 症例および CJD キャリアの体系的調査を策定している。

通達 138 (2001 年 3 月 14 日付) は引き続き実施されており、以下のようにさらに詳細な項目を示している。

- リスクのレベルに従った適切な処置
- 内視鏡に対する (洗剤を用いた) 二重洗浄の必要性
- グルタルアルデヒドの代わりに内視鏡の滅菌消毒に対して過酢酸を使用
- すべての再使用可能な滅菌品目に対して 134°C 18 分間でオートクレーブ
- 不活性化処置 (1N NaOH または 2% 次亜塩素酸、1 時間)
- すべての医療器具に対するトレーサビリティ

医療器具の再使用に用いられる適切な処置は、プリオン感染のリスクに従い以下のように定義された。

- ・ リスクのない患者 + リスクのない組織
→ 処置 I
 - ・ リスクのある患者 + リスクのない組織
→ 処置 II (可能であれば単回使用)
- またはリスクのない患者 + リスクのある組織
- ・ リスクのある患者 + リスクのある組織
→ 処置 III (= 廃棄)

供血に関連するリスクは極めて早期に考慮された (過去に英国に滞在したドナーの除外など)。

プリオン除去に対する洗浄剤の有効性 (二重洗浄義務 I の確認) および過酢酸の有効性については 2001 年以降にさらに多くの情報が得られた。

現在まで、医療機器による感染は直近の 10 年間に発生していないようである。

集中的調査は比較不可能な方法、モデル、

製品などを用いて実施されたため、主力調査グループ群は現在、ヒト系統またはその代用物の使用、鋼線ワイヤーの熱感受性表面の使用、生化学的検査用動物の使用からなる抗プリオンの有効性を試験するための標準的のプロトコールを入念に作成する試みにともに取り組んでいるところである。われわれは現在、生化学的な細胞培養および動物実験の双方で得られたさまざまな洗浄剤の有効性、鋼線ワイヤー表面の役割、pH および妨害物質の影響からなる洗浄剤に関する研究について非常に興味深い結果を得ている(共同調査グループ GR13)。

われわれは現在、2001年に発行された「通達138」の改定作業中であり、新たに得られた結果を考慮に入れているところである。その考慮内容の要点を以下に示す。

- あらゆる品目に対する滅菌条件(134°C 18分間)を維持するための現実的な必要性
- 3つのリスクグループを維持するための正当な理由
- 孤発性 CJD 患者に接触した後のすべての医療機器を廃棄する正当な理由
- 市販製品の配合物が有効性の重要な要素であるとわれわれが知っている場合に陽性リスト中に総称的な化学物質名を考慮する正当な理由
- 殺プリオン活性に対するゴールドスタンダードの定義(洗浄剤、接触時間、滅菌消毒など)

結論としてわれわれは以下の内容を明確に示すことができる。

→ v-CJD 発生はフランスでは依然として限定的と考えられる。

• 狂牛病(BSE)は終息していない。現在さらなる発生例が認められ、非定型的形態に注意を払うことのみが必要である

• ヒト v-CJD の第一波は現在終息し、パリんに関連する第二波もおそらく限定されたものとなると考えられている

→ 供血に関連したリスクの早期予防と発生以来の優れた医療機器の安全性が原因で、病院内 v-CJD は非常に少数にとどまると予想されている。

→ このため、最新の科学的調査結果を考慮して一部の抑制手段を再評価する傾向がある。

→ われわれは今後1~2年以内に試験プロトコールが標準化されるように望んでいる。

る。

報告 4

プリオンおよび再使用可能な手術器具の処理：米国の考え方

William A. Rutala

ノースカロライナ大学(UNC)ヘルスケアシステム、UNC医学部、Chapel Hill, NC, USA.

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)はヒトの退行性神経障害であり、米国での発生率は年間に人口百万人あたり約1例である。CJDはタンパク性感染因子すなわちプリオンにより引き起こされる。CJDはその他のヒトに感染可能な海綿状脳症(TSEs)に関連があるが、それらにはGertsmann-Straussler-Scheinker(GSS)症候群(1例/4千万人)および致死性家族性不眠症候群(FFI)(<1例/4千万人)が含まれる。プリオン病は免疫反応を誘発せず、中枢神経系に限定した非炎症性の病的経過をもたらす、数年の潜伏期間をたどって通常は診断後1年以内に致命的となる。

CJDは孤発性疾患(症例の85%まで)および家族性または遺伝性疾患(症例の15%まで)の双方として生じる。CJD症状の出現の1%未満が医療関連の感染に由来し、大部分は汚染された組織またはグラフトの使用にこれまで由来してきた。医原性CJDは次の3つの環境中のヒトにおいて記述されてきた。すなわち、汚染されたEEG電極の脳内留置(スイスで2例)と脳神経外科の処置(疑診例4例、英国で3例およびフランスで1例)を実施した患者に対して汚染した医療器具を使用した後、患者がホルモン療法(すなわち、死体のヒト成長ホルモンすなわちゴナドトロピン)を受けた後(>190例[29例は米国])、および患者がヒト由来の汚染されたグラフトを移植された後であった(昏睡度2の例、硬膜>190例[米国で3例、リスク因子は1987年以前に処理されたLyoduraブランドのグラフト])。すべての既知の医原性CJD症例は感染した脳、脳下垂体または眼球組織への曝露にこれまで起因してきた。

CJDおよびその他のTSEsの原因物質は従来の化学物質および物理的な汚染除去法に例外的な抵抗性を示す。手術器具がプリオン伝播の媒介物としての役割を果たすためには、感染患者の手術中に感染組織(たとえば脳)と接触しなければならず、汚染除去および滅菌がなされた後に粘着性を伴う感染力が維持さ

れなければならず、また被移植者の感染し易い組織と接触する必要がある。CJD に対する汚染除去および滅菌の推奨内容はこの事象の連鎖を破壊し、感染予防手段が以下の内容に基礎を置く必要があるとの信念に基づいている。すなわち、CJD の伝播に特定の体組織または体液が関連しているとの疫学的エビデンス、体組織または体液が感染性プリオンにより汚染されていることを示す感染力の検定、洗浄剤・微生物学的指標およびタンパクを用いた洗浄データ、プリオンの不活性化データ、器具または用具の使用による疾患の伝播リスク、および権威者によるその他の推奨内容の再検討に基礎を置く必要がある。

プリオンに汚染された医療器具の汚染除去および滅菌処理に組み合わせられた3つのパラメータは、プリオン病に罹患した患者のリスク、さまざまな体組織の感染力比較、および医療器具の意図された使用からなる。

高リスクの患者には、既知のプリオン病に罹患した患者、プリオン病に罹患している可能性に合致した急速に進行する痴呆の患者、CJD、GSS、FFI の家族歴のある患者、家族性TSEs に関与する PrP 遺伝子中に突然変異を有することが知られた患者、硬膜移植歴のある患者、TSE を示唆する EEG 所見または検査室のエビデンスのある患者（たとえば、14-3-3 タンパクなどの神経損傷マーカー）、または死体由来の脳下垂体ホルモンの既知の注入歴がある患者が挙げられる。

高リスク組織には、脳、脊髄および眼球後部（網膜または視神経が含まれる）が挙げられる。その他のすべての組織は低リスクまたはリスクなしと考えられている。危険な器具は、無菌組織または無菌の脈管系に進入する器具と定義されている（たとえば、手術器械）。やや危険な器具は、創のある皮膚または粘膜と接触する器具と定義されている（たとえば、消化器内視鏡）。

プリオンに汚染された医療器具の汚染除去および滅菌に対する推奨内容は以下の通りである。器具は使用後および汚染除去がなされるまでは濡れた状態（水中または殺菌プリオン洗浄剤に浸漬）または湿った状態としておく必要があり、使用後に可能な限り速やかに汚染除去される必要がある（たとえば、自動洗浄・汚染除去機）。乾燥した組織の膜は、湿った状態を保った組織に比べて蒸気滅菌によるプリオンの不活性化に対する抵抗性が強い。

このことは大量のサンプルに比べて乾燥

材料の膜に生じる迅速な加熱および乾燥膜中のプリオンタンパクの迅速な固定または脱水と関係があると考えられている。脳の浸軟物の乾燥部分のプリオンは、乾燥されていない組織に比べて不活性化効率が低いと思われる。これに加えて特定の消毒薬（たとえば、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、エタノール）はプリオンを固定または脱水することが可能であり、プリオンの不活性化がいっそう困難となる。

標準的な滅菌法へのプリオンの強力な抵抗性は手術器械の再処理における特殊な手順を正当化する根拠となっている。特殊なプリオンの再処理は、高リスク患者由来の高リスク組織に接触した重要またはやや重要な医療器具の再処理時に必要である。洗浄後、同器具はオートクレーブ処理（すなわち、蒸気滅菌）または水酸化ナトリウムとオートクレーブ処理の組み合わせのいずれかを用いて滅菌する必要がある。すなわち以下に示す4種類のオプション中の1つを用いる。

オプション 1—プレバキューム式高圧蒸気滅菌器において 134°C、18 分間の処理

オプション 2—重力置換式高圧蒸気滅菌器において 132°C、1 時間の処理

オプション 3—1N の NaOH 中に 1 時間浸漬（1N の NaOH は 1 リットルの水に 40g の NaOH を含む水溶液）した後に取り出して水洗いし、開放皿に移動して 1 時間高圧蒸気滅菌処理（121°C の重力置換式滅菌器または 134°C のポーラスタイプかつプリバキューム式滅菌器）

オプション 4—1N の NaOH 中に 1 時間器具を浸漬し、121°C の重力置換式滅菌器中で 121°C 30 分過熱し、洗浄し、日常的滅菌を実施する。

器具が滅菌剤（たとえば蒸気）に完全に接触可能であることが滅菌処理、特にプリオンに汚染された器具については不可欠である。洗浄不可能または蒸気およびその他の滅菌剤に完全に曝露不可能であり、プリオンに汚染された医療器具は廃棄する必要がある。フラッシュ滅菌は再処理に用いるべきではない。単回使用器具は常に廃棄すること。

環境汚染を最小限とするためには、危険ではない環境中の表面をプラスチックで裏打ちした紙で覆い、高リスク組織で汚染された場合にはその紙は適切に廃棄する必要がある。

環境表面上のプリオンの不活性化に対し特異的に米国環境保護庁（EPA）が登録し

た抗菌製品は存在しておらず、再使用可能な手術器械の滅菌に対して米国食品医薬品局 (FDA) が承認した滅菌処理も存在していない。

一方、EPA はいくつかの州に検疫の規制免除書を発行し、汚染されているか汚染されている可能性のある動物組織および動物の廃棄物を取り扱う検査室中の硬質かつ非浸透性表面上に付着したプリオンの不活性化に対してフェノール (6.4%の *o*-ベンジル-*p*-クロロフェノール、3.0%の *p*-第3級-アミルフェノール、0.5%の *o*-フェニルフェノール、4.9%のヘキシレングリコール、12.6%のグリコール酸、8%のイソプロパノールを含有) の暫定的使用を認めている。

EPA の登録製品または規制免除製品が入手不可能な場合には、高リスク組織 (たとえば、脳組織) で汚染された危険ではない環境表面 (たとえば、検査室の表面) は洗浄した後に、理想的には最低 15 分間の接触時間で 1:5 から 1:10 に希釈した次亜塩素酸塩溶液を用いて即座に汚染除去する必要がある。

高リスク患者由来の低リスク組織により汚染された危険またはやや危険な器具の再処理に対する特殊なプリオンの再処理法の実施については、いかなる推奨内容も作成できていない。低リスク組織は低い頻度で CJD を伝播することが認められてきたが、伝播は低リスク組織が感染を受け易い動物の脳内に接種された時にのみ認められてきた。

一方、ヒトでは低リスク組織により汚染された医療器具は、その器具が中枢神経系には使用されることにはならないことから標準的な洗浄および滅菌の後に感染が生じる可能性は低い。低リスク組織により汚染された環境表面は標準的な消毒のみが必要である。危険ではない表面は疾患の伝播には関与していないため、通常の曝露時間は (>1 分) が推奨されている。

CJD が事後に診断される患者に対して実施される処置の間に汚染されている可能性のある脳神経用手術器械を使用する可能性を低減するためには、医療施設は具体的に病変が明らかになっていない患者に実施された脳生検時に使用した脳神経用手術器械に対して、以下に概説した滅菌指針を用いることを考慮する必要がある (たとえば、MRI または CT スキャンによる)。

もう一つの対応方法として、そのような患者に用いられた脳神経用手術器械は使い捨て品であるか、脳生検の病理が検討されて

CJD の可能性が除外されるまで器械は隔離保管される。使い捨て器具が使用される場合は、それらは再使用可能な器具と同じ品質である必要がある。一部の国 (たとえば、フランス、スイス) は高度な滅菌規定を実施し、すべての手術器械に 134°C 18 分間の蒸気滅菌の実施を求めることにより手術器械を介した CJD をこれまで予防している。その他の国 (たとえば、英国) は、CJD に感染していることが判明した患者由来の高リスク組織に使用したすべての手術器具を廃棄している。

これらの推奨内容に厳格に従えば、プリオンに汚染された医療器具および手術器械を介した感染伝播のリスクは排除されるはずである。

E. 結論

プリオンの低温滅菌法として、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法の有用性が確認できた。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(2008年4月1日～2009年3月31日迄)

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, <u>Kitamoto T</u> , Sobue G.	Clinicopathologic characteristics of five autopsied cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease.	Neuropathology	28(1)	51-61	2008
Hoshino A, Iwasaki Y, Izumi M, Kimura S, Ibi T, <u>Kitamoto T</u> , Yoshida M, Hashizume Y, Sahashi K.	MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with unusually prolonged disease duration presenting with panencephalopathic-type pathology.	Neuropathology	28(3)	326-332	2008
Ikeda S, Kobayashi A, <u>Kitamoto T</u> .	Ther but Asn of the N-glycosylation sites of PrP is indispensable for its misfolding.	Biochem Biophys Res Commun	369(4)	1195-1198	2008
Niimi Y, Iwasaki Y, Umemura T, Tanaka F, Yoshida M, Hashizume Y, <u>Kitamoto T</u> , Hirayama M, Sobue G.	MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with early stage cerebral cortical pathology presenting with a rapidly progressive clinical course.	Neuropathology	28(6)	645-651	2008
Haraguchi T, Terada S, Ishizu H, Sakai K, Tanabe Y, Nagai T, Takata H, Nobukuni K, Ihara Y, <u>Kitamoto T</u> , Kuroda S.	Coexistence of Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease pathology: An autopsy case showing typical clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease.	Neuropathology			2008 (in press)
Kobayashi A, Arima K, Ogawa M, Murata M, Fukuda T, <u>Kitamoto T</u> .	Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients.	Acta Neuropathol	116(5)	561-566	2008

Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside J W, <u>Mohri S</u> , and <u>Kitamoto T</u> .	Human PrP 219K is converted to PrP ^{Sc} but shows heterozygous inhibition in vCJD infection.	J. Biol. Chem	284	3603-3609	2009
Yokoyama T., Masujin, K., Iwamaru Y., Imamura M., and <u>Mohri S</u> .	Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models.	J. Gen. Virol.	90(1)	261-268	2009
Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Endo R, Tagawa Y, Ushiki-Kaku Y, Takenouchi T, Kitani H, <u>Mohri S</u> , Yokoyama T and Okada H.	Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation.	Journal of Neurochemistry	107	636-646	2008
Yokoyama T, <u>Mohri S</u> .	Prion diseases and emerging prion diseases.	Current Medicinal Chemistry	15	912-915	2008
Suzuki SY, Takata M, Teruya K, Shinagawa M, <u>Mohri S</u> , Yokoyama T.	Conformational change in hamster scrapie prion protein (PrP27-30) associated with proteinase K resistance and prion infectivity.	J. Vet. Med. Sci	70	159-165	2008
<u>Akita S</u> , Akino K, Tanaka K, Anraku K, Hirano A.	A basic fibroblast growth factor improves lower extremity wound healing with a porcine-derived skin substitute.	J Trauma	64	809-815	2008
Akino K, <u>Akita S</u> , Yakabe A, Minoda T, Hayashi T, Hirano A.	Human mesenchymal stem cells may involve in keloid pathogenesis.	Int J Dermatol,	47	1112-1117	2008
<u>Akita S</u> , Akino K, Imaizumi T, Hirano A.	A basic fibroblast growth factor accelerates and improves 2 nd degree burn wound healing.	Wound Repair Regen	16	635-641	2008

秋田定伯、平野明喜	創傷外科総論 創傷治癒に関する細胞増殖因子	形成外科	51	S25-S31	2008
吉本浩、 <u>秋田定伯</u> 、平野明喜	創傷ケアに必要なドレッシング材と薬剤の知識	EMERGENCY CARE	21	997-1003	2008
<u>秋田定伯</u> 、秋野公造、RenSong-Guang MelmedShlomo、今泉敏史、平野明喜	広範囲熱傷患者における血中白血球抑制因子の上昇	熱傷	34	32-39	2008
<u>秋田定伯</u>	創傷治癒における癒痕期の柔軟性、硬度、カラーマッチ、角質機能改善に貢献するbFGF製剤	癒痕・ケロイド治療ジャーナル	2	53-54	2008
<u>秋田定伯</u>	ケロイドの分類 ケロイドの国際分類比較	癒痕・ケロイド治療ジャーナル	2	24-26	2008
<u>Takumi I</u> , Mori O, Mizutani N, Akimoto M, Kobayashi S and Teramoto A.	Expansile neurenteric cyst arising in the frontal lobe associated with status epilepticus—Report of a case and discussion of epileptogenesis.	Brain Tumor Pathology	25(2)	97-101	2008
<u>Takumi I</u> , Akimoto M.	Catcher's mask cranioplasty for extensive cranial defects in children with an open head trauma: a novel application of partial cranioplasty.	Childs Nerv Syst. Aug	24(8)	927-932	2008
児玉 南海雄, <u>太組 一朗</u>	第6章 脳神経外科手術、プリオン病感染予防ガイドライン要約 (2008年版) http://www.wam.go.jp/wamappl/bb11GS20.nsf/0/35e4e324175b3e374925748300201147/\$FILE/20080711_7sankou_1.pdf				

研究成果の刊行物・別刷

Original Article

Clinicopathologic characteristics of five autopsied cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease

Yasushi Iwasaki,¹ Maya Mimuro,² Mari Yoshida,² Yoshio Hashizume,² Tetsuyuki Kitamoto³ and Gen Sobue¹

¹Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, ²Department of Neuropathology, Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University, Aichi-gun, and ³Division of CJD Science and Technology, Department of Prion Research, Center for Translational and Advanced Animal Research on Human Diseases, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

We present five cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD) that were analyzed clinicopathologically and review previous reports. The average age at dura mater transplantation was 54.4 ± 7.3 years, and the average age at CJD onset was 66.0 ± 8.2 years, with an average latency period of 11.6 ± 1.1 years. The average age at death was 67.6 ± 8.7 years, with an average CJD disease duration of 16.8 ± 10.4 months. Symptoms of CJD onset in four patients who received dura mater transplantation below the cerebellar tent reflected cerebellar or brainstem dysfunction, whereas symptoms of one patient who received transplantation above the cerebellar tent reflected cerebral cortical involvement. All patients showed rapidly progressive cognitive impairment, and both periodic sharp-wave complexes on electroencephalogram and myoclonus were observed in the early disease stage. Neuropathologic evaluation showed one case of subacute spongiform encephalopathy and four cases of panencephalopathic-type CJD. Widespread cerebral neocortical, subcortical gray matter and cerebellar cortical involvement were observed to varying degrees, and severity tended to be associated with CJD disease duration. There were no instances of kuru plaques or florid plaques. Prion protein (PrP) immunostaining showed widespread synaptic-type PrP deposition. No differences between our dura-CJD cases and typical cases of sporadic CJD were found with respect to clinicopathologic findings, except history of dura

mater transplantation. Although a specific association between the dura mater graft site and neuropathologic observations was not evaluated in the present study, the initial symptoms appear to be closely related to the graft site, indicating a direct transmission of CJD from the graft site to the adjacent brain.

Key words: cadaveric dura mater graft, dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease, panencephalopathic-type, polymorphic codon 129, prion protein deposition.

INTRODUCTION

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) can be classified as sporadic, hereditary or acquired.^{1–3} The cause of sporadic CJD is unknown, whereas acquired forms are caused by the transmission of abnormal prion protein (PrP) from human to human or from cattle to human.^{1–3} Although acquired forms of CJD are rare, the transmission of this untreatable and fatal neurologic disorder has had major implications for public health and public policy.³ Accidental transmission of CJD from human to human appears to have occurred with cadaveric dura mater grafts, corneal transplantation, receipt of human growth hormone or pituitary gonadotropin, contaminated electroencephalogram (EEG) electrodes and contaminated surgical instruments or apparatuses.^{1,3,4} Since 1987, when the first report of association between dura mater grafts and CJD was published,⁵ many cases of CJD after implantation of dura mater grafts (dura-CJD) have been reported.^{6–21} The most probable vehicle of transmission was a single brand of dura mater graft (Lyodura®; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) produced before May 1987.²² In 1997, a CJD

Correspondence: Yasushi Iwasaki, MD, Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan. Email: iwasaki@sc4.so-net.ne.jp

Received 28 March 2007; revised 30 June 2007 and accepted 2 July 2007.

surveillance group in Japan reported 43 cases of CJD associated with implantation of dura mater grafts.²³ As of March 2003, ongoing surveillance in Japan had identified an additional 54 dura-CJD cases,²⁴ and cases continue to be identified in Japan.²² Currently, at least 196 cases have been identified worldwide, including 123 cases in Japan.²² The widespread use of Lyodura in neurosurgical procedures in Japan is the most probable source of the unusually high number of dura-CJD cases in Japan.^{4,24} The minimum risk has been estimated at approximately one case of dura-CJD per 3000 Lyodura recipients in Japan.^{3,25} Here we present five postmortem cases of dura-CJD and review previous reports to clarify the clinicopathologic features of dura-CJD.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Five formalin-fixed brains from patients with dura-CJD were obtained from the Department of Neuropathology, Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University, Aichi, Japan. Clinical features of all patients were also obtained and reviewed retrospectively. Disease duration of CJD was calculated starting from the presentation of neurologic signs or symptoms suggestive of organic involvement. The prodromal stage was not considered. All patients were Japanese; two had lived in Aichi prefecture, two in Gifu prefecture and one in Mie prefecture of the Tokai district. None of the patients had a family history of prion disease, and there was no evidence of iatrogenic CJD etiology, except for implantation of dura mater graft, or of variant CJD. No patient had any other neurologic disorder. Reports of these five cases have not been published elsewhere.

Neuropathologic examination

Tissues were immersed in 99% formic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) for 2 h to inactivate prion infectivity. For neuropathologic examination, sections from paraffin-embedded blocks of the cerebrum, cerebellum and brainstem were stained with HE and Klüver-Barrera stains and subjected to PrP immunostaining. Spinal cord was not available for any of these cases. Eight-micrometer-thick sections were placed on silanized slides (Dako, Glostrup, Denmark). Immunohistochemistry for PrP was performed with mouse monoclonal antibody 3F4 (dilution, 1:100; Dako) and the EnVision amplified method (EnVision Plus kit, Dako). The 3F4 monoclonal antibody was raised against residues 109–112 of human PrP.²⁶ After deparaffinization, non-specific endogenous peroxidase activity was blocked by pretreatment with 3%

H₂O₂ for 30 min. For antigen retrieval, the sections were autoclaved at 121°C for 10 min in beakers filled with 3 mM HCl in distilled water. After the pressure in the autoclave had decreased to atmospheric pressure and the temperature had decreased to 60°C slowly over 1 h, the sections were removed. After a wash in phosphate-buffered saline (PBS), Fc-receptors were blocked with 10% normal non-immune goat serum (Dako) for 30 min at room temperature prior to incubation with PrP antibody. Sections were treated with PrP monoclonal antibody for 2 h at room temperature and washed in PBS. Sections were then incubated at room temperature with EnVision solution for 60 min and washed in PBS. Immunoreactivity was visualized with 3,3'-diaminobenzidine/peroxidase (Wako). Sections were counterstained with hematoxylin for 5 min to stain cell nuclei.

We performed semiquantitative neuropathologic analysis with scales of 0–4 for gray matter lesions (0, no spongiform change or gliosis; 1, mild spongiform change or mild gliosis; 2, moderate spongiform change or moderate gliosis without apparent neuron loss; 3, tissue rarefaction with hypertrophic astrocytosis or neuron loss; 4, status spongiosus), none to IV for white matter lesions (none, no myelin pallor or gliosis; I, slight myelin pallor with mild gliosis; II, mild myelin pallor with hypertrophic astrocytosis; III, moderate myelin pallor with hypertrophic astrocytosis and foamy macrophages; IV, severe myelin pallor and tissue rarefaction with axon loss) and – to +++ for degree of PrP deposition (–, no staining; ±, little staining; +, mild staining; ++, moderate staining; +++, strong staining).

PrP gene analysis and Western blot analysis of protease-resistant PrP

In two of the cases (cases 3 and 4) for which brain samples were cryopreserved, PrP gene analysis of codon 129 and codon 219 polymorphism and Western blot analysis of protease-resistant PrP were performed. In one case (case 5), PrP gene analysis had been performed with genomic DNA extracted from peripheral blood before death. The protocols for PrP gene analysis and Western blot analysis were as described previously.²⁷

RESULTS

Clinical features

Clinical features, arranged according to CJD disease duration, are listed in Table 1. All patients received dura mater grafts during the period 1985–1987. In two cases, the graft brand name was known (Lyodura), but in the other cases, no information about the brand name was available. Medical conditions leading to the receipt of dura mater

Table 1 Clinical features, PrP gene polymorphism and PrP type for five cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD)

Case	Sex	Dura mater graft					Dura-CJD					Polymorphic analysis of PrP gene			
		Medical condition leading to transplantation	Year received	Age at receipt	Graft brand name	Latency period (years)	Age at onset	Initial symptoms	Appearance after CJD onset (months)		Age at death	Codon 129	Codon 219		
									Myoclonus	PSWCs				Akinetic mutism	Death
1	F	LI-facial spasm	1985	43	NA	10	53	Gait disturbance, dysarthria	2.5	2.5	2.5	9	54	N.A.	N.A.
2	M	LI-acoustic neuroma	1985	53	NA	11	64	Gait disturbance	2	2	2	10	65	N.A.	N.A.
3	M	Parietal meningioma	1986	57	NA	12	69	Movement disturbance of left hand	2	2.5	3	12	70	Met/Met	Glu/Glu
4	F	LI-cerebello-pontine angle neuroma	1985	63	Lyodura	12	75	Dizziness	2	2	3	19	77	Met/Met	Glu/Glu
5	M	Cervical tumor	1987	56	Lyodura	13	69	Gait disturbance, diplopia	2	2	4	34	72	Met/Met	Glu/Glu

F, female; Glu, glutamic acid; LI, left; M, male; Met, methionine; NA, not available; PSWCs, periodic sharp-wave complexes.

grafts included tumors ($n = 4$) and a Jannetta procedure for hemifacial spasm ($n = 1$). One patient (case 3) received the dura mater graft transplant above the cerebellar tent (supratentorial), and the other patients received the transplant below the cerebellar tent (infratentorial). The sites of dura mater graft transplant were the parietal region in one case (case 3) and on the left side below the cerebellar tent in 3 cases (cases 1, 2 and 4). In one patient (case 5), the dura mater graft was used for a cervical lesion. The average age at dura mater transplantation was 54.4 ± 7.3 years (range, 43–63 years). The average age at CJD onset was 66.0 ± 8.2 years (range, 53–75 years), with an average latency period of 11.6 ± 1.1 years (range, 10–13 years). In the patient who received the dura mater graft above the cerebellar tent, the symptom of onset (movement disturbance of the left hand) indicated cerebral cortical involvement, and in the other patients, the symptoms of onset (gait disturbance, dysarthria, dizziness, diplopia) indicated brainstem or cerebellar involvement. The average age at death was 67.6 ± 8.7 years (range, 54–77 years), with an average CJD disease duration of 16.8 ± 10.4 months (range, 9–34 months). All patients showed rapidly progressive cognitive impairment with myoclonus and periodic sharp-wave complexes (PSWCs) on EEG before the development of akinetic mutism. Duration from the onset of symptoms to the appearance of myoclonus, presence of PSWCs on EEG and demonstration of a state of akinetic mutism was 2.1 ± 0.2 months (range, 2–2.5 months), 2.2 ± 0.3 months (range, 2–2.5 months) and 2.9 ± 0.7 months (range, 2–4 months), respectively.

Neuropathologic findings

Neuropathologic findings are listed in Table 2. The average brain weight was 940.0 ± 63.6 g (range, 880–1015 g; brain weight was not available for case 4). According to cerebral pathology findings,²⁷ one case was classified as subacute spongiform encephalopathy (SSE), and four cases were classified as panencephalopathic (PE)-type CJD (Fig. 1a1–e1). Cerebral neocortical involvement was observed to varying degrees, and severity tended to be associated with CJD disease duration (Fig. 2). Spongiform degeneration showed fine vacuole-type spongiform change, and status spongiosus was observed in many neocortical lesions. Large confluent vacuole-type spongiform change was not observed in any of the cases. The hippocampus was predominantly spared, regardless of disease duration, and fine vacuole-type spongiform change was present in the subiculum and entorhinal cortex. Severe neuron loss, hypertrophic astrocytosis and spongiform degeneration, including status spongiosus, were observed in the striatum and medial thalamus. In case 1, although the cerebral white matter was relatively preserved from myelin loss, some

Table 2 Neuropathologic findings and degree of PrP deposition

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
Brain weight (g)	970	1015	880	N.A.	895
Cerebral pathology classification	SSE	PE-type	PE-type	PE-type	PE-type
Cerebrum					
Neocortex	2-3/+++	2-4/++ - +++	2-4/+++	3-4/++ - +++	3-4/++ - +++
Hippocampus	1/++ - +++	1/+++	1/+++	1/+++	1/+++
Striatum	2/++	3/++	3/++	4/+	4/++
Pallidum	1/+	2/+	2/+	3/+	3/+
Medial thalamus	2/++	3/++	3/+++	4/++	4/++
Lateral thalamus	1/+	2/+	2/++	3/+	3/+
White matter	none -I/-	II-III/-	III/-	III-IV/-	III-IV/-
Cerebellum					
Molecular layer	2-3/++	3-4/++	3-4/+++	3-4/+++	4/± - +
Purkinje neuron layer	1-2/+	1-2/+	1-2/+	1-2/+	3/±
Granule cell layer	3/++	3/++	3/++	3/++	4/± - +
Dentate nucleus	1/+	1-2/++	1-2/+++	2/++	2/±
White matter	none/-	none -I/-	none -I/-	II-III/-	III-IV/-
Brainstem					
Midbrain					
Substantia nigra	0/+	1/+	1/+	1/+	2/±
Red nucleus	0/±	0/+	0/±	0/±	1/±
Quadrigeminal body	1/+	2/+	1/++	2/+	3/±
Periaqueductal gray matter	1/±	2/+	1/+	2/+	3/±
Cerebral peduncle	none/-	none/-	none/-	I/-	IV/-
Pons					
Pontine nucleus	1-2/+	2-3/++	2/++	3/+	4/+
Oculomotor nerve	1/+	2/+	1/+	1/+	2/±
Central gray matter	1/±	2/+	1/+	1/+	2/±
Locus ceruleus	0/+	1/++	1/+	1/+	2/±
Longitudinal fibers	none/-	none/-	none/-	I/-	IV/-
Medulla oblongata					
Inferior olivary nucleus	0/++	0/++	0/++	0/++	1/+
Dorsal nucleus of the vagal nerve	0/+	0/+	0/±	0/±	2/±
Hypoglossal nucleus	0/+	0/+	0/+	0/±	2/±
Central gray matter	1/±	1/±	1/+	0/±	2/±
Pyramid	none/-	none/-	none/-	I/-	IV/-
Medial longitudinal fibers	none/-	none/-	none/-	none/-	none/-
Medial lemniscus	none/-	none/-	none/-	none/-	none/-

Cerebral pathology classification: SSE, subacute spongiform encephalopathy; PE-type, panencephalopathic-type. Gray matter lesions: 0, no spongiform change or gliosis; 1, mild spongiform change or mild gliosis; 2, moderate spongiform change or moderate gliosis without apparent neuron loss; 3, tissue rarefaction with hypertrophic astrocytosis or neuron loss; 4, status spongiosus (burnt-out lesion). White matter lesions: none, no myelin pallor or gliosis; I, slight myelin pallor with mild gliosis; II, mild myelin pallor with hypertrophic astrocytosis; III, moderate myelin pallor with hypertrophic astrocytosis and foamy macrophages; IV, severe myelin pallor and tissue rarefaction with axon loss. Degree of prion protein deposition: -, no staining; +, little staining; ++, moderate staining; +++, strong staining.

gliosis was observed in areas predominantly in the subcortex, below the severe neocortical lesions. In the other four cases, the cerebral white matter showed myelin pallor with tissue rarefaction, foamy macrophages and hypertrophic astrocytosis. Cerebral white matter involvement tended to be associated with either disease duration or severity of the cerebral neocortical lesions. Cerebellar cortical involvement was observed, particularly in the molecular and granule cell layers (Fig. 3a1-e1). The molecular layer showed severe atrophy, and the granule cell layer showed severe neuron loss (Fig. 4). The Purkinje neuron layer was relatively preserved from gliosis and neuron loss, except for case 5, in which the Purkinje neuron layer showed severe neuron loss with Bergmann's gliosis. The dentate nucleus was relatively preserved in all of the cases

(Fig. 3a1-e1). Cerebellar white matter showed slight to severe myelin pallor, except for case 1. Cerebellar cortical and white matter involvement also tended to be associated with disease duration. In case 1, the brainstem was preserved from atrophy, neuron loss and gliosis. In the other cases, the brainstem showed mild to moderate atrophy of the pontine base, mild to severe gliosis of the red nucleus, substantia nigra, quadrigeminal body, periaqueductal gray matter, pontine nucleus, oculomotor nerve, central gray matter of the pons, locus ceruleus, dorsal nucleus of the vagal nerve, hypoglossal nucleus, central gray matter of the medulla oblongata and inferior olivary nucleus and mild to severe neuron loss in the quadrigeminal body and pontine nucleus. Pyramidal tract degeneration in the brainstem, including the cerebral peduncles of the midbrain, pontine

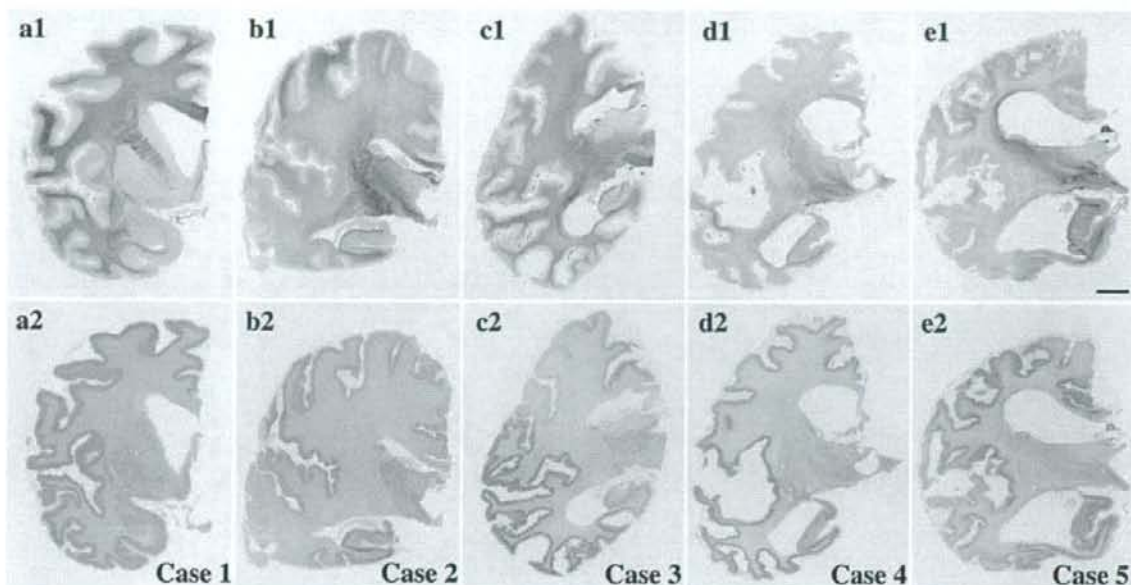


Fig. 1 Macroscopic appearance of cerebral coronal sections in five dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD) cases. (a1) Case 1 shows relatively well-preserved cerebral white matter without myelin pallor and subacute spongiform encephalopathy according to cerebral pathology findings. (b1–e1) Cases 2–5 show extensive degeneration of the cerebral white matter with myelin pallor and panencephalopathic-type CJD according to cerebral pathology findings. Cerebral cortical and white matter atrophy tends to be associated with disease duration. (a2–e2) Widespread PrP deposition is observed in the cerebral cortex, basal ganglia and thalamus. (a) Case 1; (b) Case 2; (c) Case 3; (d) Case 4; (e) Case 5. (a1–e1) Klüver-Barrera staining, (a2–e2) PrP immunostaining. Scale bar = 1 cm.

longitudinal fibers and pyramid of the medulla oblongata, was observed in cases 4 and 5. There were no instances of kuru plaques or florid plaques in the cerebrum, cerebellum or brainstem in any of the cases. Transplant dura mater grafts could not be examined in any of the cases. There was no evidence of particular accentuation of neuropathologic findings near the dura mater graft sites.

According to the PrP immunostaining results, synaptic-type PrP deposition was observed particularly in the cerebral neocortex, hippocampus, striatum, medial thalamus, cerebellar cortex (particularly the molecular and granule cell layers), dentate nucleus, quadrigeminal body, pontine nucleus and inferior olivary nucleus (Figs. 1a2–e2, 3a2–e2, 5, 6). The pallidum, lateral thalamus, Purkinje neuron layer, substantia nigra and locus ceruleus showed mild to moderate PrP deposition. In severe lesions, such as those of status spongiosus, particularly in the cerebral neocortex and cerebellar cortex, PrP deposition was relatively decreased and sparse. Small plaque-like PrP deposition was observed in some lesions, particularly in the cerebellar molecular and granule cell layers, but it was generally sparse. Perivacuolar-type PrP deposition was not observed in any of the cases. PrP deposition was not observed in the cerebral, cerebellar or brainstem white matter. PrP deposition was not accentuated near the dura mater graft sites.

PrP gene analysis and Western blot analysis

According to PrP gene analysis, the three cases analyzed showed no PrP gene mutation and showed methionine homozygosity at polymorphic codon 129 and glutamic acid homozygosity at polymorphic codon 219 (Table 1). According to Western blot analysis, the two cases analyzed showed the type 1 pattern (Fig. 7).²⁸ According to the CJD classification system of Parchi *et al.*²⁸ these two cases were of the MM1 type.

DISCUSSION

The five patients with dura-CJD in the present study had an average age at CJD onset of 66.0 ± 8.2 years, with an average latency period of 11.6 ± 1.1 years. The average age at CJD onset was the same as that reported for sporadic CJD in Japan (66 years).²⁴ The average latency period from dura mater transplantation to the occurrence of symptoms was similar to that reported in the literature (10.4 years; range, 14–275 months).²⁴ Many reported patients with dura-CJD show clinicopathologic features resembling those of patients with typical sporadic CJD, including rapidly progressive cognitive impairment, mental deterioration, ataxia, myoclonus and characteristic EEG findings

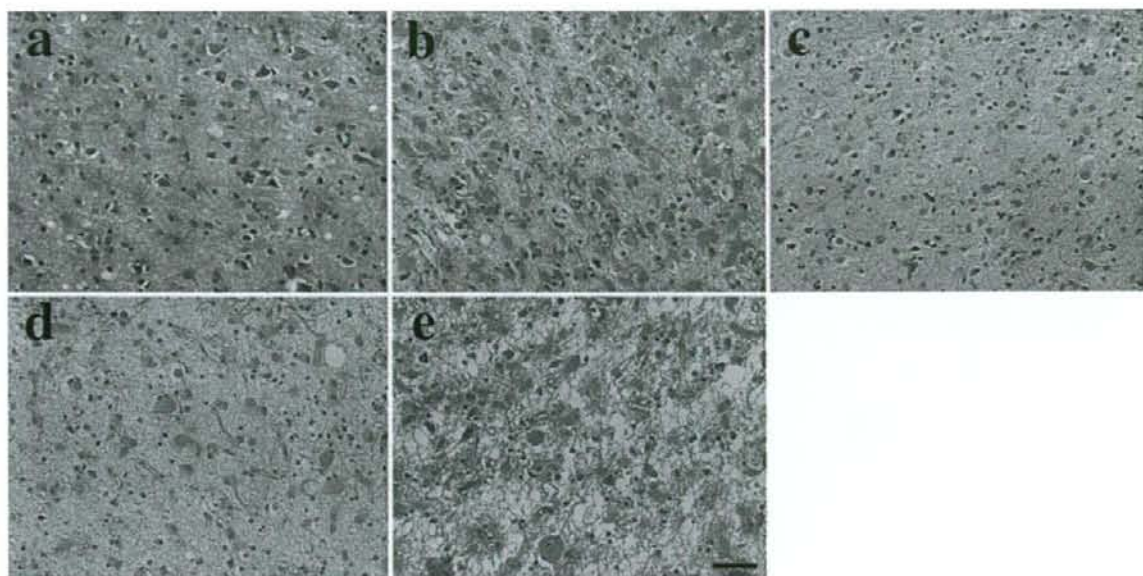


Fig. 2 Neuropathologic findings of the cerebral neocortex in five dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD) cases. (a) Fine vacuole-type spongiform change, showing diffuse small round vacuoles, is present in the neuropil. Hypertrophic astrocytosis without apparent neuronal loss is present. (b-d) Intense hypertrophic astrocytosis with neuron loss and tissue rarefaction are seen. (e) Severe neuron loss with hypertrophic astrocytosis and irregular cavities indicate status spongiosus. (a) Case 1; (b) Case 2; (c) Case 3; (d) Case 4; (e) Case 5. HE staining. Frontal lobe. Scale bar = 50 μ m.

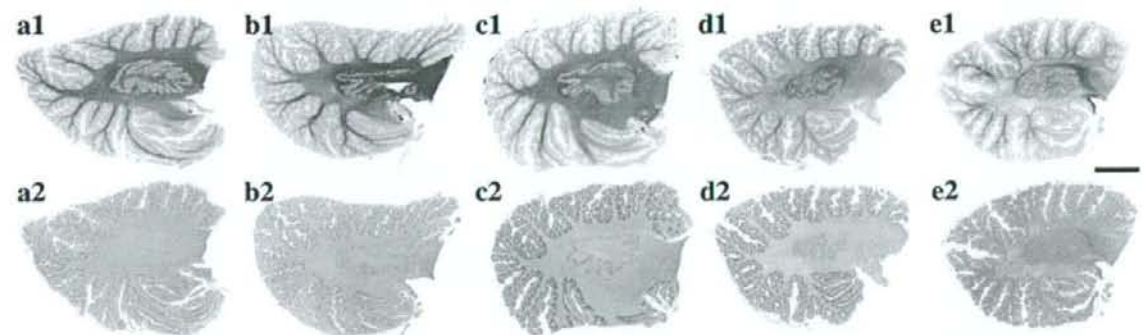


Fig. 3 Macroscopic appearance of cerebellar sagittal sections in five dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD) cases. (a1) Well-preserved cerebellar white matter without myelin pallor is observed. (b1-e1) Cerebellar white matter shows slight to severe myelin pallor. The dentate nucleus is relatively preserved. Cerebellar cortical and white matter atrophy tends to be associated with disease duration. (a2-e2) Widespread PrP deposition is observed in the cerebellar cortex and dentate nucleus. (a) Case 1; (b) Case 2; (c) Case 3; (d) Case 4; (e) Case 5. (a1-e1) Klüver-Barrera staining. (a2-e2) PrP immunostaining. Scale bar = 1 cm.

such as PSWCs.²⁹ In our dura-CJD cases, the rapidly progressive clinical course and pathologic findings were relatively stereotypical and resembled those of typical sporadic CJD. These observations indicate that dura-CJD is not distinct from sporadic CJD clinicopathologically and emphasize the importance of obtaining information regarding dura mater transplantation.

How the infective agent migrates from the site of inoculation into the brain remains a matter of speculation.^{7,30} In a murine model of scrapie, it was found that in response to various methods of peripheral inoculation, the infection spread via the lymphoreticular system to the spinal cord and then to the brain.³¹ Subsequent work has shown the presence of PrP in follicular dendritic cells in the spleen of

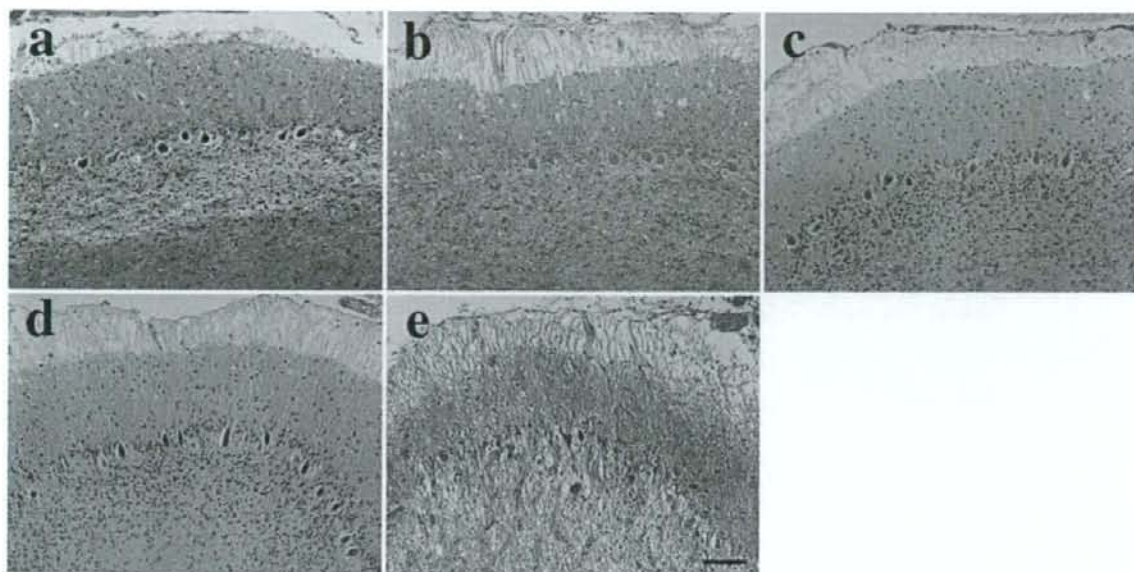


Fig. 4 Neuropathologic findings of the cerebellar cortex in five dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD) cases. (a-d) The molecular layer shows severe atrophy, and the granule cell layer shows moderate to severe neuron loss. The Purkinje neuron layer is relatively preserved from gliosis and neuron loss. (e) Severe neuron loss and tissue rarefaction is apparent in the molecular and granule cell layers. The Purkinje neuron layer also shows severe neuron loss with Bergmann's gliosis. Kuru plaques are not observed in any of the cases. (a) Case 1; (b) Case 2; (c) Case 3; (d) Case 4; (e) Case 5. HE staining. Scale bar = 100 μ m.

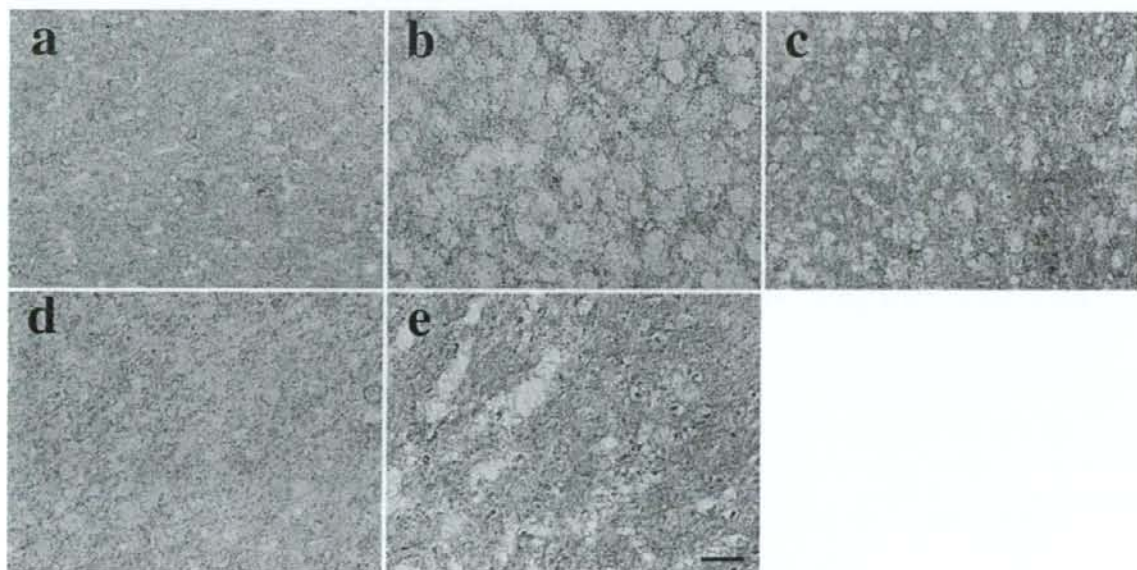


Fig. 5 PrP deposition in the cerebral neocortex in five dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease (dura-CJD) cases. (a-e) Synaptic-type PrP deposition is present in all cases. PrP deposition is sparse in severe lesions, such as those of status spongiosus in case 5. (a) Case 1; (b) Case 2; (c) Case 3; (d) Case 4; (e) Case 5. PrP immunostaining. Frontal lobe. Scale bar = 50 μ m.