計畫編號：DOH102-DC-2208

衛生福利部疾病管制署 102 年度科技研究發展計畫

計畫名稱： 人類庫賈氏病檢驗技術建立之分析評估

102 年 度 研 究 報 告

執行機構：衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林建州

研究人員：黃仲德、辛宜鴻

執行期間： 102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意*

目　　錄

	頁碼
封面	
目錄	(i)
摘要	(1)
壹、前言	(3)
貳、材料與方法	(7)
參、結果	(13)
肆、討論	(15)
伍、結論與建議	(18)
陸、重要研究成果及具體建議	(19)
柒、參考文獻	(20)
捌、圖、表	(23)

摘　要

人類庫賈氏病是正常普因蛋白質(PrP^{C})變異成 PrP^{Sc} 蛋白質，大量累積於患者腦部組織後造成病變。確認過程不容易辨別，根據 WHO 的判定準則，除臨床病程症狀、生理(MRI、EEG)或一般血液學檢查數據外，尚需分子生物學或特殊生物標誌輔助，確認診斷需腦組織病理切片染色或西方墨點法才能確認。

本研究計畫成功建立庫賈氏病蛋白質 Tau　ELISA 和變性蛋白(PrP^{Sc})西方墨點檢驗方法。蛋白質 Tau ELISA 和目前檢驗之 14-3-3 西方墨點法結果比較，在 198 件已判定為庫賈氏病極可能病例和 134 件排除個案(陰性)，Tau 試驗之靈敏度與專一性分別為 75.8%(150/198)和 76.9% (103/134)；14-3-3 試驗靈敏度與專一性分別為 74.7%(148/198)和 83.6% (112/134)，兩者方法檢測結果相近。若採用兩者任一為陽性作判定，其靈敏度可為 90% 。

實驗室自美國庫賈氏病參考實驗室(NPDPSC)引進庫賈氏病組織檢體，設立了變性蛋白 (PrP^{Sc})西方墨點檢驗方法，以利後續臨床診斷和陽性變性蛋白(PrP^{Sc})之綜合研判以確定庫賈氏病。

庫賈氏病的判定是有嚴謹性和困難度，本研究 Tau ELISA 及變性蛋白(PrP^{Sc})西方墨點檢驗方法有助於庫賈氏病的確認，其檢驗結果可提供庫賈氏病工作小組作個案研判，以持續監控國內庫賈氏病的發生率及流行病學變化。

關鍵字: 庫賈氏病、蛋白質 14-3-3、Tau、西方墨點法

Abstract

Human prion disease is proposed that the isoform PrP^{Sc} acts as a template that promote the conversion of PrP^{C} to PrP^{Sc} , results in the infectious disease. It is difficult to classify the cases of CJD. Based on the guideline of WHO investigation can be performed to support the diagnosis including clinical diagnosis, history, electroencephalography (EEG), MRI, and CSF analysis for 14-3-3 protein. The final definite diagnosis of CJD, including vCJD, requires neuropathological confirmation or western blot of tissue.

The development of biomarkers as Tau ELISA and western blot for PrP^{Sc} for CJD diagnosis had been completed. The study included 198 patients with probable CJD and 134 with non-CJD diagnoses. The sensitivity and specificity of both assays were similar and respectively were 75.8% (150/198) and 76.9% (103/134) for Tau; 74.7% (148/198) and 83.6% (112/134) for 14-3-3. Either both positive could improve the sensitivity to 90%.

The CJD reference laboratory, National Prion Disease Pathology Surveillance Center kindly offered the positive samples for CJD that we could develop successfully the standard assay for fresh tissue. It will promote the evidence for the diagnosis of CJD.

The diagnosis of CJD can be critical and difficult. This study indicates that the CSF biomarker, Tau and western blot for PrP^{Sc} could be effective tests for CJD. The results of assay could offer to the committee of CJD for case definition and enhance the incidence rate and epidemiology of CJD.

Keywords: Creutzfeldt-Jakob disease、14-3-3、Tau、prion、Western blot

前　言

隨著氣候與環境之變遷，人類除需運用農業科技的方式增加飼料的生產量，同時也為了養殖物加快生長速度與效率，添加動物性的衍生物如骨粉於飼料中以促其生長。然而，卻於 1980 年代爆發狂牛病後，流行病學調查食用牛肉的飲食習慣與人類庫賈氏病相關。牛與人類的大腦中除了有相同空泡化之病理特徵外，皆發現有大量不正常蛋白質堆疊，原本只在老年人才較易發現庫賈氏病案例，卻陸續也在青壯年人口中發現(14)，最後驗證出該蛋白質為變異之普因蛋白(PrP^{Sc}) ，經過一系列動物感染實驗也證實該蛋白質具傳染力，並歸類為人畜共通傳染病(2, 15)，因此，全球國家陸續禁用動物衍生物當作哺乳類畜產動物的營養添加物(9)，並禁止疫區之牛肉進口，但不時尚有國家傳出狂牛症之病例(http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/cjd/)。

庫賈氏病相關病例約於 1920 年代初期首先被報告，各國之發生率約為 0.5~1/百萬人口。常見之庫賈氏病為散發型，占全部病例約 80%以上，另有遺傳型、醫源型及新型庫賈氏病。散發型庫賈氏病病症初期將引發病人記憶力衰退、行為異常、步態不穩及類似失智等症狀，隨著病程的進展，也會觀察到病患會有肌躍症，造成四肢與軀幹會有劇烈之抽動，同時合併

症狀也包含視力模糊、肢體無力、麻木感、癲癇等，在末期則以嚴重失智且病人無法自理。新型庫賈氏病則與散發型之臨床表徵不同，會造成精神異常、感覺神經異常、神經傳導延遲、運動失調及失智症等症狀出現，腦波並無短間隔之陣發性棘波，該病的診斷需由神經科專科醫師依患者之臨床症狀和腦脊髓液蛋白質 14-3-3 檢驗，並配合腦電圖(EEG)、電腦斷層攝影(MRI)等檢查，確定診斷需靠腦部病理切片或腦組織西方墨點法檢測(7)。

除了依據WHO的指引與配合EEG、MRI的結果進行判斷外，從相關研究論文指出，可利用病人於發病過程於腦脊髓液所產生的生物標誌也是一項重要指標，可有效於鑑定散發型庫賈氏病，常用的分子檢測技術為蛋白質14-3-3與Tau蛋白質的檢測(4)，而新型庫賈氏病的分子檢測上，目前英國參考實驗室已開發出於血液檢體中檢測到變性蛋白的存在，但仍需進行大規模測試才可證實其真正之效果(3)。由於檢測生物標誌有其優勢，可針對腦脊髓液、血液或相關體液等檢體，利用蛋白體學的技術去找出其他可用於辨別病症之生物標誌，以減少對病人進行侵入性的採檢工作。

散發型庫賈氏病、遺傳型庫賈氏病與新型庫賈氏病的基因型別的分析

可有助於流行病學上的分類，尤其當有一定比率的個案其家族史與相關背景資料缺乏時可提供一定之資訊。檢體變性蛋白(PrP^{Sc})可於均質後的腦部組織中發現，可利用西方墨點法進行具有蛋白水解酶 K (proteinase K)抵抗力的PrP檢測。該技術已有相關參考實驗室建立，且為散發型庫賈氏病確定診斷的標準之一，同時於蛋白電泳的結果中發現，在經過酶切後的蛋白質會有兩種型別可觀察到，一種是type 1 PrP^{Sc} 其移動後的分子量大小為21 kDa，type 2 PrP^{Sc}其移動後的分子量大小為19 kDa。利用質譜儀進行分析發現，type 1的主要切點在胺基酸82而type 2在胺基酸97，而會伴隨著有次要的切點產生，其主要的位置介於胺基酸74與102之間(7, 11, 20)。因此，檢測組織檢體中PrP^{Sc}的存在除可為確定病例判定之依據外，也可搭配基因型的結果進行分子流行病學的分析。

消毒的有效性受組織的特性及物理性影響而不同，受污染的物質應直接浸泡消毒劑或化學消毒液以去除PrP^{Sc}的感染力。完成檢驗後的可拋棄式醫療廢棄物經過134℃至少18分鐘的高溫高壓滅菌後送甲級醫療廢棄物處理場經過1,000℃的焚化處理，需再使用之實驗器具需經過1N NaOH的浸泡1小時處理才可再使用。因此，庫賈氏病相關的檢驗除了核酸萃取與基因定序在一般實驗室操作外，其他檢驗工作需於生物安全第三等級(BSL-3)以上之實驗室進行操作，並依照進出實驗室之標準程序進出與完成檢驗後清理

工作。

本計畫擬先建立庫賈氏病標準檢驗方法，並測試蛋白質 Tau ELISA 於台灣庫賈氏病極可能案例之判定能力。而腦部組織的病理學判定為人類庫賈氏病診斷的黃金標準，尤其像腦部空泡化，神經細胞的消失，神經膠變性為病理診斷的特徵。以免疫組織染色或 PrP^{Sc} 會澱粉樣的斑點沉積以西方墨點法方式去確認(5, 7)。上述檢驗結果，是提供庫賈氏病病歷審查委員之重要參考，並作為公共衛生防治政策上制定的依據。

材料方法

一、血液

（一）收集與前處理

全血檢體(5ml)將暫存於 4℃冷藏櫃中，再進行後續 DNA 萃取及定序分型的實驗。

（二）DNA 的萃取

取 400μl 的全血進行 DNA 萃取。利用 Roche 磁珠自動核酸萃取儀進行 DNA 的純化，完成後存放於–80℃進行保存以利後續實驗的進行。

（三）PCR 增幅

增幅引子使用針對 PRNP 基因設計專一性引子，片段總長為 956 bp(表一)。PCR 反應容積為 25μl，加 2μl 待測 DNA，12.5 μl 2XPCR ready mix，0.5μl 各種引子（40pmol），其餘加入 ddH_2O 混勻。增幅初始變性反應 94℃ 4 分鐘溫度，30 次循環的變性反應 94℃ 30 秒→黏和 58℃ 10 秒→72℃ 10 秒聚合延長反應，最後為 72℃ 4 分鐘聚合延長反應(1)。

（四）瓊脂膠體電泳分析（agarose gel electrophoresis）使用 1.5%（wt/vol）的瓊脂膠體搭配 1X 的 TBE 緩衝溶液（0.1 M Tris, 0.09 M boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.4）100V 進行電泳 1~2 小時；染膠 15 分鐘，接者以蒸餾水去染色數次，確認片段大小後送基因定序。

（五）核酸序列比對及資料庫建立

將定序後的圖形檔轉入 BioEdit 分析軟體，在軟體上比對序列後無誤後，將核酸序列轉成胺基酸序列已確認胺基酸 129 的型別，同時也針對其他的位點進行分析，以建立序列資料庫。

二、腦脊髓液（CSF）

（一）收集前處理

本(2013)年度預計取用經庫賈氏病例審查委員會判定為極可能個案(Probable)和排除(陰性)之 CSF 檢體，極可能個案之定義如下：

1. 進行性失智症，且於常規性檢查未被診斷為其他種疾病，並伴隨至少以下二種症狀：(1) 肌躍症（myoclonus）。(2) 視覺性或小腦性運動失調（visual or cerebellar ataxia）。(3) 錐

體路/錐體外路功能異常（pyramidal/extrapyramidal dysfunction）。(4) 失能性不語症 (akinetic mutism）。

2.具有第一項症狀，且符合下列任一個條件：(1) 腦電圖顯示典型的週期性棘波。(2) 腦脊髓液 14-3-3 抗體分析法陽性，且發病 2 年內死亡。 (資料來源：庫賈氏病及其他人類傳播性海綿樣腦症感染管制與病例通報指引手冊-第三版)。

CSF 檢體 2 ml 送至檢驗室後將暫存於-80℃冷藏櫃中保存，累積到一定量後將進行檢體分裝與西方墨點法。分裝與檢驗須於 BSL-3 實驗室中進行。

（二）蛋白質 14-3-3 西方墨點法檢測

取 18μl 的檢體與 16.2μl 2X sample buffer 與 1.8μl 2-mecaptoethanol 混合，並於 95℃的乾浴槽中加熱 10 分鐘去活化，將去活化的樣本與陽性對照組加入商用配置之蛋白質電泳膠片(4-20%)，以 150V 跑 1.5 小時，以濕式蛋白質轉漬的技術將膠上的蛋白質轉印至 PVDF 膜上。接著以含有 5% skim milk 的 Blocking buffer (Tris base 12g, NaCl

9g,ddH2O 配至 1L)進行背景阻斷，再分別以 1:1000 的 anti-14-3-3 的兔子抗體(SantaCruz Cat no.SC-629)與 anti-rabbit IgG-HRP antibody (SantaCruz Cat no.SC-2004)進行雜交反應，可以利用冷光檢測儀或於暗房壓片的方式進行訊號偵測(參考本局檢驗標準操作程序)。

（三）蛋白質 Tau ELISA 檢測：

以商用 Invitrogen Human (Hu) Tau ELISA 進行檢測。取 10μl 檢體進行檢驗，其敏感性最低可達 60pg/ml，而>1200 pg/ml 則判定為陽性。正常人頭痛、神經痛或相關心理方面等腦部的疾病下，其 Tau 蛋白質的最高含量約為 315 pg/ml (mean +2.5 SD)，

三、病理組織

（一）組織的前處理：

送檢的組織先以 10%中性甲醛進行固定，供組織檢查之標本不宜過厚，普通以半公分即可，以便固定液很快滲入組織，固定液之數量約為標本體積之二十倍，固定時間為 24 小時至 48 小時，於進行組織模擬試驗時，檢體固定化再放

入蟻酸(formic acid,96%)處理 1 小時。組織固定完後可依需求進行其他試驗，或經由脫水過程再包埋成蠟塊，可於 4~-20℃下長久保存。

（二）病理組織 PrP^{Sc} 的西方墨點法試驗

動物腦部組織以 10%(w/v)配置於 lysis 緩衝液:

Tris-HCl, pH7.5 200mL, NaCl 1.75g, EDTA 0.74g, sodium deoxicolate 1.0g, IGEPAL CA-630 1mL, ddH2O 200mL.。樣本進行 proteinase K (PK) (2mg/ml 溶於 PBS): 3ul of 2 mg/mL 於 37℃反應 1 小時，對照組不須加入 proteinase K。PK 水解反應加入 2 uL of 72 mM phenylmethylsulfonyl 進行終止反應。取蛋白質樣本與蛋白質 loading buffer 混合，並於 100℃的乾浴槽加熱 10 分鐘。接下來同材料方法 7 的西方墨點實驗，所用的 1 級抗體為 3F4 。

（三）病理組織包埋與切片試驗

收集臨床獸醫檢驗機構的組織檢體進行脫水與包埋試驗。

先將組織塊初步以鋒利小刀做修整，厚度控制在 3-5mm，再將組織檢體放置於密閉式的脫水機 (RVG1,Intelsint)進行

組織脫水與滲蠟約 1 天，後續進行組織的石蠟包埋。

四、清消處理

人員處理檢體時應穿著防護衣物。腦脊髓液與組織檢驗儘量使用可拋棄式耗材，醫療廢棄物皆須經過 134℃至少 18 分鐘的高溫高壓滅菌後處理，再依醫療廢棄物處理規定送甲級醫療廢棄物處理場進行焚化處理。器械或容器等以高溫高壓滅菌 134℃ 18 分鐘。相關廢液應加入 NaOH 處理，使液體之最終濃度為 1N，然後再滅菌或焚燬。工作檯面之消毒先以 1N NaOH 擦拭後，再以 1N HCl 中和，最後再用清水擦拭。地板則以漂白水來清潔。

結　果

一、蛋白質 Tau ELISA 檢驗方法建立

收集 2001 至 2013 年通報疑似庫賈氏病患者之腦脊髓液檢體(CSF)共 332 件，經庫賈氏病病例審查委員會判定為極可能個案為 198 件，病患年齡範圍從 34 至 88 歲，取其中位數年齡為 68 歲、男/女比率為 0.98。排除個案(陰性)為 134 件，病患年齡範圍從 18 至 90 歲，中位數為 69 歲，男/女比率為 0.88。

利用蛋白質 Tau ELISA 方法偵測 CSF 內生物標誌 Tau 蛋白之含量，一般常人為 315 pg/mL (mean +2.5 SD)，濃度高於 1200 pg/mL，即可判定為陽性。本方法係使用已鍵結 anit-Tau 抗體的商用 96 孔試劑盤，採 sandwich 的原理，將 CSF 檢體 2 倍稀釋後加入孔盤內反應兩小時，再依序進行清洗孔盤、加入抗體、呈色劑等流程，每次需 5 小時檢驗時間。

二、蛋白質 Tau ELISA 與 14-3-3 西方墨點法的比較分析

庫賈氏病極可能病例 198 件和排除個案 134 件，其靈敏度分別為 75.8%(150/198)和 74.7%(148/198)，專一性為 76.9% (103/134)和 83.6% (112/134)，兩者生物標誌檢測之靈敏度相近，但仍以 14-3-3 之專一性較高(表二)。分析採用 Tau 與 14-3-3 任一陽性預測極可能病例，其靈敏度

為 90.0% (178/198)，專一性為 72.3% (97/134)，但以 2 種檢驗結果皆為陽性，其靈敏度為 60.6% (120/198)，專一性為 88.1% (118/134)。

分析兩件個案，其 14-3-3 第一次檢體結果為陰性，之後分別於第 3 和 4 個月進行 2 採檢體檢驗，其 14-3-3 之檢驗結果呈現陽性，且 Tau 二採相較於一採有 1.45 與 12.8 倍上升(表三)。

三、腦組織 PrP^{sc} 西方墨點標準檢驗方法建立

庫賈氏病確認診斷需符合 WHO 所定義之病程準則，並依據 PrP^{sc} 變性蛋白病理切片染色或組織西方墨點法之結果才可判定確診病例。已取得由美國庫賈氏病參考實驗室提供之陽性組織檢體為診斷與未來新式研究之對照組，參考國際相關實驗室作業流程及文獻資料已完成檢驗標準程序。實際測試結果如圖一，可發現經過專一性抗體(anti-PrP 3F4)辨識之 PrP^{sc} 共有三條 Band，且經過蛋白質水解酵素 PK 反應後，其位置會再往下位移，經比較國際期刊與美國參考實驗室的結果為一致。

四、國際合作

已與英國庫賈氏病參考實驗室建立聯繫，並請該實驗室以血液檢驗 vCJD 病原的方式，協助確認疑似個案血液是否有PrP^{sc}的存在，經確認後為陰性，所需檢驗時程約1個月。

討　論

庫賈氏病分散發型、遺傳型及新型庫賈氏病，型別的分析可有助於流行病學上的分類，而目前常用來進行基因分型的為PRNP基因，該基因組在哺乳類的組成具有高度的保守性，由此可見其扮演極吃重之角色，然而在人類個體間卻有顯著之差異性。有超過20個以上之錯義(missense)與無義(nonsense)的突變在該基因中發現，且可與相關prion基因型別有一定之相關性(8) 由於正常的prion (PrP^{C})在轉變成PrP^{Sc}的過程中有聚合與重組的情形產生，因此可能由基因突變所造成的胺基酸改變，進而造成蛋白質結構的異變(6)。PRNP最為關注的突變點在於胺基酸129(M變成V)，同時該基因也有allele，常見的allele為MM與MV，約佔所有群體的40-50%，然而在日本MM的比率為92%，MV為8%，VV人口為0%(12)。由於MM於群體中所佔的比率約為40%，而約70%的散發型庫賈氏症個案與100%新型庫賈氏症的個案皆為該基因型，因此也有相關研究指出胺基酸129的MM同質性(homozygosity)為人類庫賈氏病的危險因子之一(19)。國內從2010至今所檢測之基因型分析的結果均為MM型，保留此結果以利爾後分析比較。

WHO 所認可採用之生物標誌為腦脊髓液中的蛋白質 14-3-3，但國際上有許多文獻發表，除蛋白質 14-3-3 外，亦採用蛋白質 Tau 作為生物指標(10, 16)。本研究成功建立蛋白質 Tau ELISA 標準檢驗方法，其靈敏度與

14-3-3 比較雖無顯著差異，但採用 Tau 與 14-3-3 任一陽性預測極可能病例，其靈敏度為 90.0%。國際文獻資料 Tau 和 14-3-3 專一性/靈敏度分別為 0.86/0.88 和 0.85/0.84 (13, 18)，而本研究 Tau 和 14-3-3 蛋白質檢測其靈敏度與專一性較低，亦有可能為檢體較為陳舊及統計分析判定閥值設定過高，而導致靈敏度與專一性不如預期，另外相關腦部退化疾病如阿茲海默症、栓塞性腦中風、腦腫瘤、腦炎等相關疾病也將導致 CSF 生物標誌結果呈現偽陽性。本研究中發現 2 名個案其 14-3-3 及 Tau 二採檢體之訊號相較於一採有顯著性的上升表現，這可能與個案其 14-3-3 與 Tau 之表現會隨病程的演進而有不同的表現，同時相關文獻也建議，當個案臨床上為高度疑似庫賈氏病時，但仍尚未符合 WHO 所建議的準則時，可於追蹤 2-3 周後再次送驗 14-3-3 與 Tau，並與 MRI 及 EEG 結果做綜合研判(16)。

庫賈氏病由於民情及缺乏生物安全第三等級之解剖室等因素，導致難以病理解剖的方式採取組織檢體進行 PrP^{sc} 檢測，目前庫賈氏病的判定，乃委由庫賈氏病工作小組，根據個案的病程、相關臨床表徵、MRI、EEG、14-3-3 等結果，並依據 WHO 或歐盟的準則，對個案進行研判。發病中的個案也無法從常見之檢體如血液、尿液等進行 PrP^{sc} 的檢驗。本研究計畫其中腦組織 PrP^{sc} 西方墨點檢驗，已完成檢驗標準程序繕寫及方法學建立，提升日後對於已判定為極可能病例或高度疑似新型庫賈氏病之病

理組織檢驗的能力，亦可有助於開發相關新式檢測方法，使能實際應用於臨床上。

通常 PrP^{Sc} 對一般的消毒或滅菌方法具有抗性，不論是物理性或化學性的方法皆為同樣。一般使用的化學消毒方法如漂白水與酒精，不能當做消毒的過程，因曾被證實不是無效就是部分有效阻止 PrP^{Sc} 的感染性。相關廢液應加入 NaOH 處理，文獻中提及 1N 或 2N 等 NaOH 溶劑皆具有去活化 PrP^{sc} 的效果(17)。工作檯面或檢體送驗箱須以 1N NaOH 擦拭，以確保實驗室生物安全。

結論與建議

隨著高齡化社會的來臨，在老年失智症與庫賈氏病的區別診斷實是一大挑戰。疑似個案早期或臨床診斷，以幫助醫療單位及家屬後續感染管制及醫療措施，因此如 14-3-3 western blot、Tau ELISA、於 CSF 檢體中檢測 PrP^{Sc}(RT-QUIC)等非侵入性方法的持續開發及改良將是研發重點。

庫賈氏病之最終確定診斷必需採取病人之腦部組織進行病理切片或組織西方墨點法，本實驗室具生物安全第三等級設施及技術進行組織西方墨點法 PrP^{Sc} 檢驗，對國內在庫賈氏病的判定具有開發及設定的意義。

重要研究成果及具體建議

1、蛋白質 Tau ELISA 與 14-3-3 western blot 之結果可為庫賈氏病判定之重要參考指標。

2、由於個體差異，從發病至確認診斷間其 Tau 或 14-3-3 表現於 CSF 之情形不一，而當個案臨床上為高度疑似庫賈氏病時，可於追蹤 2-3 周後再次送驗 14-3-3 與 Tau。

3、國內進行 autopsy 或 biopsy 仍有相關硬體及軟體上的難度，可建立以 CSF 檢體內直接偵測 PrP^{Sc} 變異蛋白，將有助疾病診斷。

參考文獻

1. M. T. Bishop, C. Pennington, C. A. Heath, R. G. Will, and R. S. Knight. PRNP variation in UK sporadic and variant Creutzfeldt Jakob disease highlights genetic risk factors and a novel non-synonymous polymorphism. *BMC Med Genet* 2009； 10:146.

2. J. Collinge. Cell biology. The risk of prion zoonoses. Science 2012;335:411-413.

3. J. A. Edgeworth, M. Farmer, A. Sicilia, P. Tavares, J. Beck, T. Campbell, J. Lowe, S. Mead, P. Rudge, J. Collinge, and G. S. Jackson. Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 2011; 377:487-493.

4. A. J. Green, E. J. Thompson, G. E. Stewart, M. Zeidler, J. M. McKenzie, M. A. MacLeod, J. W. Ironside, R. G. Will, and R. S. Knight. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:744-748.

5. A. F. Hill, R. J. Butterworth, S. Joiner, G. Jackson, M. N. Rossor, D. J. Thomas, A. Frosh, N. Tolley, J. E. Bell, M. Spencer, A. King, S. Al-Sarraj, J. W. Ironside, P. L. Lantos, and J. Collinge. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999;353:183-189.

6. M. Horiuchi, S. A. Priola, J. Chabry, and B. Caughey. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5836-5841.

7. H. A. Kretzschmar. Diagnosis of prion diseases. *Clin Lab Med*

2003;23:109-128, viii.

8. C. A. Llewelyn, P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, and R. G. Will. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417-421.

9. N. Nathanson, J. Wilesmith, and C. Griot. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am J Epidemiol* 1997;145:959-969.

10. C. R. Newey, A. Sarwal, D. Wisco, S. Alam, and R. J. Lederman. Variability in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease using standard and proposed diagnostic criteria. *J Neuroimaging* 2013;23:58-63.

11. S. Notari, R. Strammiello, S. Capellari, A. Giese, M. Cescatti, J. Grassi, B. Ghetti, J. P. Langeveld, W. Q. Zou, P. Gambetti, H. A. Kretzschmar, and P. Parchi. Characterization of truncated forms of abnormal prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 2008;283:30557-30565.

12. M. H. Nurmi, M. Bishop, L. Strain, F. Brett, C. McGuigan, M. Hutchison, M. Farrell, R. Tilvis, S. Erkkila, O. Simell, R. Knight, and M. Haltia. The normal population distribution of PRNP codon 129 polymorphism. *Acta Neurol Scand* 2003;108:374-378.

13. M. Otto, J. Wiltfang, L. Cepek, M. Neumann, B. Mollenhauer, P. Steinacker, B. Ciesielczyk, W. Schulz-Schaeffer, H. A. Kretzschmar, and S. Poser. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192-197.

14. J. Pattison. The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg Infect Dis* 1998;4:390-394.

15. S. B. Prusiner, M. R. Scott, S. J. DeArmond, and F. E. Cohen. Prion protein biology. *Cell* 1998;93:337-348.

16. G. Puoti, A. Bizzi, G. Forloni, J. G. Safar, F. Tagliavini, and P. Gambetti. Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis. *Lancet Neurol* 2012;11:618-628.

17. W. A. Rutala, and D. J. Weber. Guideline for disinfection and sterilization of prion-contaminated medical instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol* 201031:107-117.

18. B. Van Everbroeck, S. Quoilin, J. Boons, J. J. Martin, and P. Cras. A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1210-1214.

19. H. J. Ward. Surveillance of Creutzfeldt Jakob disease in the United Kingdom. *Euro Surveill* 2000;5:90-94.

20. H. M. Yull, D. L. Ritchie, J. P. Langeveld, F. G. van Zijderveld, M. E. Bruce, J. W. Ironside, and M. W. Head. Detection of type 1 prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 2006;168:151-157.

附圖、表

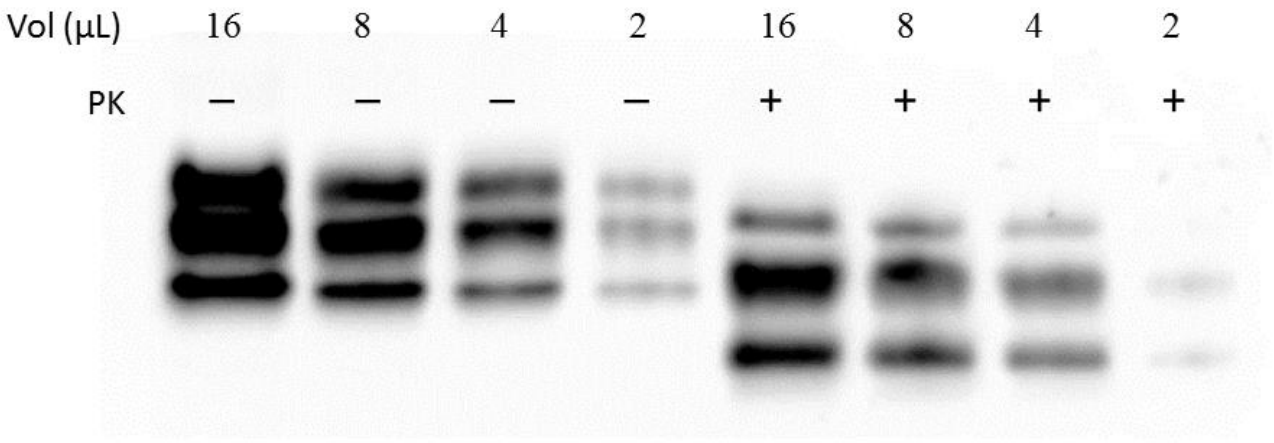
表一、PRNP 基因設計性引子

name	primer/probe sequence	mer
PR01	TGATACCATTGCTATGCACTCATTC	25
PR02	GACACCACCACTAAAAGGGCTGCAG	25

表二、生物標誌蛋白質 Tau ELISA 和 14-3-3 西方墨點法之準確度比較表

Marker	Threshold	Sensitivity (%)	95%CI	Specificity (%)	95%CI
14-3-3		74.7	68.6-80.8	83.6	77.2-89.9
Tau	>1200 pg/mL	75.8	67.7-81.3	76.9	67.8-83.4
14-3-3 + Tau 同時陽性		60.6	53.7-67.5	88.1	82.5-93.6
14-3-3 or Tau 任一陽性		90	86.7-94.1	72.4	64.7-80.1

表三、生物標誌 Tau ELISA 與 14-3-3 西方墨點法陽性個案結果比較

		14-3-3 western blot		Tau ELISA (pg/mL)	
	採檢間隔（月）	1st	2nd	1st	2nd
案例1	3	Negative	Positive	2534	3686
案例2	4	Negative	Positive	800	10202

圖一、西方墨點法檢測陽性組織內 PrP^{Sc} 蛋白質