

図3. ScN2aIIにおけるPrP-resとtotal PrP量の継続変化。

ScN2aIIを1:10で播種後4, 8, 12, 24h毎に細胞の状態を観察した(上)。同時に細胞から、PrP-resとtotal PrPを検出した(左)。ライセートの蛋白量を揃えて電気泳動した。既知濃度の精製組み換えPrPの発光強度から、単位蛋白量当たりのPrP-resおよびtotal PrP量を算出し、その結果を右のグラフに示した(右)。黄線はtotal PrP、青線はPrP-resを示す。

の増加は、継代時に Trypsin 処理により消化された PrP^Cが回復したためと考えられた。

細胞内に存在する PrP^{Sc}は、本実験で使用した PK 処理条件でも PK 抵抗性を示す PrP-res と、同条件では PK に消化される比較的 PK に感受性の PrP-res_{LOW} の総和として考えるべきである。実際に、PrP-res の 3~4 倍程度の PrP-res_{LOW}が感染細胞内に存在していた(結果は示さず)。PrP^{Sc}が total PrP (PrP^Cと PrP^{Sc}の総和)の 1/2 から 1/3 程度を占めたことから(結果は示さず)、PrP^{Sc}の存在が細胞に何らかの変化をもたらす可能性がある。そこで、DNA マイクロアレイにより、ScN2a-3 と N2a-3 の遺伝子発現の比較解析を行った。2回の独立した実験で、N2a-3 と比べて発現が 2 倍以上高い遺伝子(表 1、計 22 遺伝子)、および 1/2 以下の遺伝子を抽出した(表 2、計 27 遺伝子)。これらの一部を定量 RT-PCR により遺伝子発現レベルの差を検討した結果、DNA マイクロアレイの結果と一致したことから、今回得られた DNA マイクロアレイの結果は信頼性が高いと考えられる。現在、これらの遺伝子発現の変化とプリオン持続感染の関連を検討中である。

D. 考察

プリオン持続感染 N2a では PrP-res の量は、一定ではなく、細胞の増殖とともに変動することが明らかとなった。継代から 24 時間以内に PrP-res 量は顕著に減少し、培養を s 続けると、再び細胞当たりの PrP-res 量が増加した。播種細胞数を少なくすると、PrP-res の増加が遅れることから、播種後の時間よりも細胞密度の増加が PrP-res 量の増加と関係すると考えられる。今後、二つの可能性を考えて研究を進める予定である。第一は、細胞密度の増加に伴い物理的な細胞間の接着に伴い、PrP-res 産生が増加する可能性である。第二は、感染細胞が放出する因子が PrP-res の産生を促進する可能性である。いずれの場合でも、PrP-res の産生が亢進する時期におこる細胞側の変化の解析・同定から、細胞における PrP^{Sc}産生機構、あるいはプリオン増殖機構に新たな知見が得られることが期待される。

今回認められた細胞内 PrP-res 量の変動が、使用した N2a あるいはプリオン株に特異的な現象であるかを検討する必要がある。予備的な結果ではあるが、同じ Chandler 株が持続感染した GT1-7 では、細胞の増殖にともない PrP-res 量の増加が認められたことから、Chandler 株が感染した、連続継代可能な株化細胞では、共通に認められる現象かもしれない。現在、プリオン株による相違について解析を進めている。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的比較解析から、プリオン感染細胞で発現が高い遺伝子および低い遺伝子を絞り込むことができた。定量 RT-PCR の成績から、今回得られた DNA マイクロアレイの結果は信頼性が高いことが確認できた。これらの中に、シナプス小胞や神経伝達物質の輸送放出などの神経細胞の機構に関連する遺伝子 (Gria2, Nrpl, Syt4)、細胞骨格や細胞接着に関与する遺伝子 (Itgb3, Tgfbi, Mcam, Nefh)、免疫応答や炎症反応に関与する遺伝子 (CD40, Ifi203, Il6, Scg2, Tnfsf13b)、G 蛋白シグナル伝達経路に関与する遺伝子 (Grp126, Tgm2) などが含まれていた。これらの遺伝子がプリオン感染に伴い発現が変化するかを検証するために、現在、使用したプリオン持続感染細胞を硫酸ペンタサンおよび抗 PrP 抗体で処理して、PrP-res を消失させた後に遺伝子発現の変化を解析している。

表1 DNAマイクロアレイ法によるScN2a-3とN2a-3の遺伝子発現の比較

プリオン感染細胞で発現が低い遺伝子				プリオン感染細胞で発現が高い遺伝子			
Gene Symbol	Fold-decrease			Gene Symbol	Fold-increase		
	Microarray		TaqMan		Microarray		TaqMan
	Av	SD	Av		Av	SD	Av
Ass1	2.1	0.0	NT	Ap1s3	2.8	0.7	NT
Atp2b3	2.1	0.1	3.2	Chn2	2.7	0.5	NT
C1s	3.2	1.1	NT	Cpe	6.0	2.0	NT
Calm14	2.2	0.3	NT	Fgf14	4.2	2.0	NT
Ccdc25	2.6	0.6	NT	Fstl5	6.3	0.9	NT
Cd40	2.3	0.5	4.3	Gata3	11.5	11.6	NT
Dach2	3.5	1.5	NT	Gria2	8.3	0.4	35.0
Dock10	4.3	0.4	NT	Id4	2.3	0.2	NT
Efhc2	3.4	0.5	NT	Isl1	25.5	6.2	NT
Epb4.113	2.1	0.2	NT	Isoc1	2.2	0.1	NT
Fthl17	2.7	0.8	NT	Lmo1	2.1	0.0	1.9
Gpr126	20.3	16.6	NT	Mcam	2.7	0.8	NT
Ifi203	2.5	0.5	NT	Nefh	2.2	0.3	1.7
Igf2	2.9	0.6	NT	Nrp1	2.1	0.2	NT
Igfbp2	2.2	0.3	3.7	Scg2	4.3	0.4	4.3
Il6	2.1	0.2	3.4	Slc16a12	3.5	1.2	NT
Islr	3.2	0.5	4.0	St18	2.6	0.1	NT
Itgb3	2.9	0.1	NT	Stmn2	3.9	0.6	2.0
Loh11cr2a	3.7	1.7	NT	Syt4	3.5	0.0	3.5
Pbxip1	2.1	0.1	NT	Tnfsf13b	21.6	21.4	NT
Pof1b	2.7	1.0	4.8	Vegfc	39.8	7.7	NT
S100a11	2.4	0.1	NT	Vip	2.9	0.4	3.0
Steap1	2.3	0.0	NT				
Tgfbi	2.2	0.1	3.2				
Tgm2	2.5	0.7	3.6				
Tspan7	2.1	0.0	3.1				
Xmr	3.4	0.5	NT				

E. 結論

プリオン持続感染マウス神経芽細胞 ScN2a を播種後、細胞当たりの PrP-res 量を調べたところ、細胞播種直後から 24 時間以内に PrP-res 量は急速に減少し、その後細胞密度の増加に伴い、再び PrP-res 量が増加することが判明した。つまり、プリオン持続感染細胞では、恒常的に一定量の PrP-res が産生されているのではなく、細胞密度にともなう細胞の生理状態の変化により、PrP-res 量の増減が繰り返されると考えられた。また、DNA マイクロアレイ法により、ScN2a-3 と非感染 N2a-3 の遺伝子発現を比較解析して、ScN2a-3 で非感染 N2a-3 より 2 倍以上発現が高い遺伝子を 22 遺伝子、ScN2a-3 で発現が 1/2 以下に低下した遺伝子を 27 遺伝子同定した。

F. 健康危険情報 とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim, C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H, Horiuchi M: Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 485-491, 2006.
- 2) Watanabe Y, Inanami., Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Inagaki F, Kuwabara M: Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 549-556, 2006.

2. 学会発表

- 1) Karino A, Furuoka H, Kimura K, Shinagawa M, Horiuchi M: Generation of mAb that

distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. NeuroPrion2006, October 2006, Turin, Italy.

- 2) Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim C-L, Nagatsuka T, Uzawa H, Horiuchi M: Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic *O*-sulfated glycopyranoside and their polymers. NeuroPrion2006, October 2006, Turin, Italy.
- 3) Horiuchi M: Propagation and inhibition of PrP^{Sc} formation in vitro and in vivo. The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, September 2006, Sapporo, Japan.
- 4) 宋昌鉉、古岡秀文、金チャンラン、鈴木章夫、前田秋彦、堀内基広：抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価。2006 年プリオン研究会（安比高原）2006.9.
- 5) 中満智史、瓜生匡秀、堀内基広：プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006.11.
- 6) 瓜生匡秀、堀内基広：マウス神経芽腫細胞 Neuro2a (N2a) サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の相違。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

13. 綿山羊の伝達性海綿状脳症サーベイランスとヒツジ PrP 遺伝子型の分布

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科 教授

研究協力者 小原次郎 (北大・獣医学部)、
戸刈哲朗 (北海道立新得畜産試験場)、
石黒直隆 (岐阜大学・農学部)

研究要旨 平成 13 年 5 月から平成 17 年 9 月までの間、全国 17 自治体から提供された、綿羊 669 頭、山羊 161 頭の計 826 頭の検査をウエスタンブロットにより実施したが、全て陰性であった。日本で飼養されているサフォーク種ヒツジの PrP 遺伝子型の割合は、スクレイピー感受性である AQ/AQ が 48% を占め、欧州諸国と比較してスクレイピー感受性のヒツジの割合が高いことが明らかとなった。都道府県別では、AQ/AQ の割合は 43~63% と地域差が認められた。北海道の牧場では、AQ/AQ の割合が 30~100% と牧場間で大きく差があることも明らかとなった。ポールドーセット種では抵抗性遺伝子型である AQ/AR および AR/AR の割合が 64~83% と高い一方、高感受性ハプロタイプ VQ を有する個体も 13~17% と多いことが判明した。

A. 研究目的

我が国では、1980 年代前半にヒツジスクレイピーの存在が確認されて以降、おもに北海道を中心にヒツジスクレイピーが散発している。綿山羊のスクレイピーの発生状況の把握、PrP 遺伝子型の把握は、家畜の伝達性海綿状脳症のコントロールに寄与する。また、欧州では、BSE プリオン様のプリオンに感染していた山羊が摘発されていることから、綿山羊に対しても BSE と同等の対策を講じることは、食の安全・安心を確保するうえで、適切と考えられる。さらに、動物のプリオン病はすべて、ヒトへ伝達しうることを想定して、管理措置を講ずることが望まれる。

本稿では、平成 13 年 5 月から平成 17 年 9 月までに、綿山羊の伝達性海綿状脳症のサーベイランスに則って実施された検査の結果を報告するとともに、我が国で飼養されているヒツジの PrP 遺伝子型の分布について報告する。

B. 研究方法

綿山羊の伝達性海綿状脳症のサーベイランスに則って、北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座に延髄門部が送付された羊、および北海道の個人牧場で飼育されているヒツ

ジを研究の対象とした。

綿山羊の PrP^{Sc} の検出は、定法 (BSE 確認検査実施要領) に従って行った。

延髄からの DNA 抽出は DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) 用いて行った。ヘパリン処理静脈血からの DNA 抽出には、QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いた。

Single nucleotide polymorphism (SNPs) 解析は TaqMan probe を用いる定量 PCR 法により行った。使用した TaqMan probe とプライマーの塩基配列は表 1 に示した。PCR 産物の定量解析および塩基多型の決定は ABI PRISM 7900 HT SDS 2.1 (Applied Biosystems) を用いて行った。

ヒツジ PrP 遺伝子蛋白質コード領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。PCR に使用したプライマーは表 1 に示した。PCR 増幅産物からのプライマーおよび dNTP の除去は、Micro spinTM S-300HR columns (Amersham Biosciences) を用いて行った。精製 PCR 産物を鋳型として BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI-3100 Avant-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。塩基多型の解析は GENETYX-MAC 8.0 (Genetyx) を用いて行った。

表1 SNPs解析、PCR並びにシークエンシングで使用したプライマーとTaqManプローブ

プライマー/TaqManプローブ	適用	プライマー/プローブ配列
プライマー		
356F	SNPs解析	5'CTGCAGCTGGAGCAGTGGTA-3'Ø
450R	SNPs解析	5'GTCCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATA-3'Ø
467F	SNPs解析	5'ACATGTACCGTTACCCCAACCA-3'Ø
553R	SNPs解析	5'TGTTGACACAGTCATGCACAAAAG-3'Ø
sPrP 104	PCR/シークエンシング	5'CATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAG-3'Ø
sPrP 105	PCR/シークエンシング	5'ATGAAAACAGGAAGGTTGCCCTATCC-3'Ø
sPrP 109	シークエンシング	5'GGTCAAGGTGGTAGCCACAG-3'Ø
sPrP 110	シークエンシング	5'GTCAGTTTCGGTGAAGTTCTC-3'Ø
TaqMan プローブ		
136A	SNPs解析	5'FAM ¹⁾ -TGCTGGGAAGTGCCA-MGB ²⁾ -3'Ø
136V	SNPs解析	5'VIC ¹⁾ -ATGCTGGGAAGTGTC-MGB ²⁾ -3'Ø
171R	SNPs解析	5'FAM ¹⁾ -CAGTGGATCGGTATAGTA-MGB ²⁾ -3'Ø
171Q	SNPs解析	5'VIC ¹⁾ -CAGTGGATCAGTATAGTAA-MGB ²⁾ -3'Ø

¹⁾レポーター蛍光色素

²⁾蛍光クエンチャー

C. 研究結果

平成13年5月から平成17年9月までの間、全国17自治体から、綿羊669頭、山羊161頭の計826頭の検査をウエスタンブロットにより実施したが、全て陰性であった。内訳は、平成13年5月17日から平成13年11月12日までが、24ヶ月齢以上の綿羊20頭、平成13年11月13日から平成14年3月31日までが、18ヶ月齢以上の綿山羊11頭、平成14年4月1日から平成17年9月30日までが、12ヶ月齢以上の綿山羊795頭(平成14年度213頭、平成15年度245頭、平成16年度248頭、平成17年度89頭)である。

表2に、日本各地におけるサフォーク種ヒツジのPrP遺伝子型の割合を示した。全国平均では感受性遺伝子型であるAQ/AQを有するヒツ

ジが48%であり、抵抗性ハプロタイプARを有する遺伝子型AQ/ARおよびAR/ARの割合は50%であった。地域別では、宮城および栃木で感受性遺伝子型の割合が高く、抵抗性遺伝子型が低いことも明らかとなった。

表3に北海道の個人牧場におけるサフォーク種ヒツジのPrP遺伝子型の割合を示した。AQ/AQ遺伝子型の頻度は牧場間で30~100%と異なることが判明した。表3にポールドーセット種を飼養している牧場における同種のPrP遺伝子型の割合を示した。スクレイピー抵抗性ハプロタイプARを有する遺伝子型AQ/ARおよびAR/ARの割合が64~83%と高い一方、高感受性ハプロタイプVQを有する個体も13~17%と多いことが判明した。

表2 日本各地域におけるサフォーク種ヒツジのPrP遺伝子型の比率

遺伝子型	北海道		青森		宮城		栃木		新潟		全国 ¹⁾	
	n=395	%	n=18	%	n=24	%	n=130	%	n=7	%	n=575	%
AQ/AQ	172	43.5	9	50	13	54.2	82	63.1	3	42.9	279	48.5
AQ/AR	173	43.8	8	44.4	9	37.5	41	31.5	4	57.1	236	41.0
AR/AR	49	12.4	1	5.6	0	0	4	3.1	0	0	54	9.4
AQ/VQ	0	0	0	0	2	8.3	2	1.5	0	0	4	0.7
AR/VQ ²⁾	1	0.3	0	0	0	0	1	0.8	0	0	2	0.3

¹⁾サーベイランスに供されたサフォーク種ヒツジ、および個人牧場で飼養されているサフォーク種ヒツジを全国の母集団として使用した。

²⁾ AR/VQのPrPハプロタイプは、PCR産物をクローニングし、塩基配列を解析することにより決定した。

表 3 北海道の個人牧場におけるサフォーク種およびポールドーセット種ヒツジの PrP 遺伝子型の比率

牧場 ¹⁾	N ²⁾	遺伝子型									
		AQ/AQ		AQ/AR		AR/AR		AQ/VQ		AR/VQ ³⁾	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A	14	8	57.1	5	35.7	1	7.1	0	0	0	0
B	55	17	30.9	30	54.5	8	14.5	0	0	0	0
C	20	10	50.0	9	45.0	1	5.0	0	0	0	0
D	73	24	32.9	29	39.7	20	27.4	0	0	0	0
E	49	23	46.9	21	42.9	5	10.2	0	0	0	0
F	57	22	38.6	26	45.6	8	14.0	0	0	1	1.8
G	32	10	31.3	20	62.5	2	6.3	0	0	0	0
H	12	6	50.0	6	50.0	0	0	0	0	0	0
I	6	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0
J	61	14	23.0	27	44.3	12	19.7	3	4.9	5	8.2
K	29	0	0	11	37.9	13	44.8	2	6.9	3	10.3

¹⁾A～I 牧場はサフォーク種ヒツジ、J および K 牧場はポールドーセット種ヒツジの PrP 遺伝子型の比率。

²⁾PrP 遺伝子型を解析したヒツジの頭数。

³⁾AR/VQ の PrP ハプロタイプは PCR 産物をクローニングし、塩基配列を解析することにより決定した。

D. 考 察

食用に供される綿山羊のサーベイランスでは、スクレイピー感染綿山羊は検出されなかった。しかし、平成 13 年度にサーベイランスが開始された以降も、神経症状を呈したヒツジや起立不能のヒツジなどのサーベイランスにより、スクレイピー感染ヒツジが摘発されている。臨床症状からスクレイピーを診断することは不可能であるので、家畜の伝達性海綿状脳症の発生状況を正確に把握するためには、PrP^{Sc} の検出によるサーベイランスの継続は必要である。

また、フランスや英国では、BSE プリオンと類似した性状を有するプリオンに感染していた山羊が摘発されている。これらの例が、BSE プリオンの感染が拡大した結果なのか、あるいは元来、BSE プリオン様のプリオンが綿山羊に存在していたのか、について結論を得ることはできない。しかし、BSE プリオン様の病原体が綿山羊から検出されたことから、綿山羊に対しても BSE と同等の対策を講じることは、食の

安心・安全を確保するためにも、適切と考えられる。

また、ノルウェーで発見された Nor98 のように、これまで知られているスクレイピー病原体とは異なる性状のスクレイピー病原体も存在する。これまで、我が国では Nor98 様のスクレイピーの存在は報告されていないが、既報のものとは異なるスクレイピーの存在も考慮して、サーベイランスを継続する必要がある。

日本では、スクレイピー感受性の PrP 遺伝子型 AQ/AQ を有するヒツジの割合が高いことが明らかとなった。ヒツジを用いた計画交配を実施している英国、ドイツなどの欧州諸国と比較して、スクレイピー抵抗性遺伝子型の割合が低いことが明らかとなった。また、個人牧場でも AQ/AQ の割合が高い牧場が散見された。個人牧場では、群の遺伝子型は種畜の遺伝子型により大きく影響を受けることから、AQ/AQ 遺伝子型の頻度が高い牧場では、AR を有する種畜の導入を検討する必要があると思われる。

E. 結 論

平成 13 年以降、綿山羊の伝達性海綿状脳症のサーベイランスによって、帯広畜産大学および北海道大学に送付された計 826 検体を検査したが、全て陰性であった。

日本では、スクレイピー感受性の PrP 遺伝子型の AQ/AQ を有するヒツジの割合が 48% と多かった。地域や牧場間で PrP 遺伝子型の分布に差があることが、総じてスクレイピー感受性のヒツジの割合が多いことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Onoe S, Ohoba Y, Kitagawa H, Ishiguro N: Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J Vet Med Sci* 68: 27-33, 2006.
- 2) Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim, C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H, Horiuchi M: Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic *O*-sulfated glycopyranosides and their polymers. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 485-491, 2006.
- 3) Watanabe Y, Inanami., Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Inagaki F, Kuwabara M: Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 549-556, 2006.

2. 学会発表

- 1) Karino A, Furuoka H, Kimura K, Shinagawa M, Horiuchi M: Generation of mAb that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *NeuroPrion2006*, October 2006, Turin, Italy.
- 2) Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim C-L, Nagatsuka T, Uzawa H, Horiuchi M: Inhibition of PrP^{Sc} formation by

synthetic *O*-sulfated glycopyranoside and their polymers. *NeuroPrion2006*, October 2006, Turin, Italy.

- 3) Horiuchi M: Propagation and inhibition of PrP^{Sc} formation in vitro and in vivo. The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, September 2006, Sapporo, Japan.
- 4) 宋昌鉉、古岡秀文、金チャンラン、鈴木章夫、前田秋彦、堀内基広：抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価。2006 年プリオン研究会（安比高原）2006.9.
- 5) 高橋 泉、瓜生匡秀、堀内基広：EGFP-PrP 融合蛋白による PrP^{Sc} 産生の干渉。2006 年プリオン研究会（岩手）2006.9.
- 6) 中満智史、瓜生匡秀、堀内基広：プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006.11.
- 7) 瓜生匡秀、堀内基広：マウス神経芽腫細胞 Neuro2a (N2a) サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の相違。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

14. プリオンの免疫系における増殖・伝播機構の研究

分担研究者 大西 和夫 国立感染症研究所免疫部

研究協力者 樋口好美、佐多徹太郎（感染研・感染病理部）

中村優子、萩原健一、山河芳夫（感染研・細胞化学部）

研究要旨 プリオンを経口摂取した動物において海綿状脳症（TSE）が発症する過程に免疫担当細胞が関与することは様々な報告から明らかである。しかしどの免疫担当細胞がプリオンの脳への伝達を引き起こしているのか、また、末梢組織のどこでプリオンが増殖しているのかという基本的な疑問はまだ理解が進んでいない。本研究では、免疫系と神経系に共通したプリオンの形成・保持の機構を解明するために、そのような機構に関与する分子の候補としてBILLカドヘリンとS100蛋白質ファミリーに焦点をあてて検討している。BILLカドヘリン遺伝子欠損マウスのLittermateを用いた解析では、-/-の個体は+/+より早くTSEを発症したことからBILLカドヘリンのプリオン形成過程での軽度の関与が示唆された。マウス神経芽細胞ScN2aをもちいたプリオン形成の*in vitro*実験系では、形成されるプリオンの量はBILLカドヘリンとS100A8で抑制され、S100A9で促進された。S100Bでは、変化がなかったが、これはScN2aにendogenousに発現しているS100Bのためと考えられた。これまで例のない免疫系細胞株によるプリオン増殖*in vitro*システムを構築する目的で、B細胞、各種マクロファージ亜群由来の細胞株樹立を試みており、これまでに濾胞樹状細胞（FDC）のマーカーであるCD21やBILLカドヘリンを強発現するマクロファージ株及びミクログリア株が利用可能となった。これらの細胞株をもちいて*in vitro*でプリオンを伝播・保持する分子機構について研究を進めている。

A. 研究目的

免疫系におけるプリオンの動態については、B細胞が濾胞樹状細胞（FDC）の分化を誘導し、FDC細胞上のプリオンが中心静脈交感神経を経由して中枢神経系に伝搬するというAguzzi等の仮説が有名であるが、FDCの分化が認められないTNFR1ノックアウトマウスでも伝達性海綿状脳症（TSE）が発症することから、FDCの存在は必須ではなく他の免疫系細胞によってもプリオンの増殖や中枢神経系への伝達が起こっていると考えられる。おそらく、マクロファージ系列の細胞亜群がそのような機能を持っていると考えられている。本研究では、この問題について以下の4つのアプローチで研究を進めている。1) 免疫系細胞群におけるプリオンの発現と分布を磁性粒子結合抗体法（MACS法）を用いて検討し、プリオンの伝播に関与する免疫系細胞群を同定する。2) そのような細胞の培養系・株化を通して、免疫系細胞におけるプリオン増殖の*in vitro*モデルシス

テムを確立する。3) Bリンパ細胞とマクロファージに発現する細胞接着分子であるBILLカドヘリンの遺伝子欠損マウスにおけるプリオンの動態を検討する。4) 免疫系と神経系に特徴的なパターンを以て発現されるS100蛋白質ファミリーがプリオン蛋白質形成に関与する可能性を検討する。

B. 研究方法

1) プリオンを保持する免疫担当細胞の同定とその株化：TSE発症マウス（ウシ・プリオン遺伝子トランスジェニックマウスにobihiro株脳乳剤を接種し、256日後の個体）の脾臓を摘出し、コラゲネースで処理した後、MACS法により細胞を分画した。使用した抗体は、B220（B細胞マーカー）、CD3（T細胞マーカー）、CD11b（マクロファージ・マーカー）、CD21（C3bR、B細胞亜群とFDCに発現）。各カラムに保持された細胞群（マーカー陽性）と通過した細胞群（マーカー陰性）について、純度検

定をフローサイトメトリー法で行った。各細胞分画に含まれるプリオンを、プロテイナーゼK (PK) 耐性プリオンとして定法に従い検出した。この検査によって陽性となった B リンパ球をハイブリドーマ法により株化した。細胞融合パートナーとして SP2/O ミエローマ株を用い、ポリエチレングリコール法により定法に従い B 細胞ハイブリドーマを作製した。

2) マクロファージ細胞・FDC 様細胞の株化 : マウス (C57BL/6) の脾臓より免疫担当細胞を調製し、培養条件を最適化することにより、細胞株の樹立を行う。培養条件として、ステロイド系化合物 (プレドニゾロン等、リンパ球の増殖を抑制するため) の添加、細胞外マトリックス (コラーゲンゲル, フィブロネクチン等) の添加、各種サイトカイン (M-CSF, GM-CSF, 等) の添加を検討する。樹立した細胞株および、現在入手可能な興味有る細胞株 (例えば Microglia 細胞株) などについて、その分類を細胞表面マーカー (CD21, CD45, CD3, CD11b, CD11c など) のフローサイトメトリー解析により行った。

3) BILL カドヘリン遺伝子欠損マウスにおける TSE 発症機序の解析 : BILL カドヘリンは B 細胞とマクロファージの一部に発現する細胞接着分子で、免疫担当細胞に発現するカドヘリンとしては唯一知られている分子である。Ca²⁺ 依存性にホモティピックな細胞接着を引き起こし、B 細胞・マクロファージの分化段階に従ってその発現が制御されている。BILL カドヘリン遺伝子の機能を解析するためにこの遺伝子のエクソン 16-18 を欠損させたノックアウトマウスをすでに作製してある。このマウスに、TSE 脳乳剤 (Obihiro 株) を脳内接種および経口投与し、プリオン病発症過程を野生型マウスと比較観察している。本年度は実験の精度を上げるために、+/+および-/の Littermate を用い、投与ルートとして、脳内接種、腹腔接種、経口投与の 3 通りについて検討している。

4) S100 ファミリー蛋白質とプリオン形成の相関に関する検討 : 結果の項で述べる理由から、S100 ファミリー蛋白質がプリオン形成に関与する可能性が高いと考えている。この点を検討

するために、S100A8、S100A9、S100B の cDNA を PCR 法を用いてクローニングし、pCI-neo 発現ベクターに組み込んだ。この発現ベクターを MHM2_prion の発現ベクターと共に ScN2a (プリオンを保持するマウス神経芽細胞) に遺伝子導入し、MHM2_prion の異常型への変換速度に及ぼす S100 ファミリー蛋白質の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト由来材料を用いず、研究用に確立された細胞株、プリオン株、マウス系統を用い、倫理上問題になる実験を含まない。

C. 研究結果

1) プリオンを保持する免疫担当細胞の同定とその株化 : 昨年度までに、TSE 発症マウスの脾臓細胞を B220, CD3, CD11b, CD21 等の表面マーカーで磁性粒子結合抗体法 (MACS) により分画すると、B220⁺CD21⁺ の B 細胞またはマクロファージのサブポピュレーションがプロテイナーゼK (PK) 抵抗性プリオンを保持していることを明らかにしている。B220 抗原は、B 細胞において、プロ B 細胞の段階から発現が始まり、形質細胞にいたる最終分化の段階でダウンレギュレーションされる。B 細胞以外では、樹状細胞の小さなサブセット (plasmacytoid dendritic cell) で発現している。CD21 抗原は、分子量 145kDa の膜貫通型糖タンパクで、補体調節タンパクの遺伝子ファミリーに属す。CD21 抗原 (CR2) は、C3d および Epstein-Barr ウィルス (EBV) のレセプターで、成熟 B リンパ球や FDC に存在するが、T リンパ球や顆粒球、単球には存在しない。これらの B220⁺CD21⁺ 細胞群のうち、B 細胞集団についてハイブリドーマ法を用いてライン化すると、いくつかのクローンは PK 抵抗性プリオンを保持している。しかし、これらのクローンを 1 ヶ月以上培養するとプリオンが検出できなることから、その一つの説明として、プリオンの形成を促進するか、プリオンを保持するのに必要な因子が初期の B 細胞ハイブリドーマにはあったもののそれが長期培養の過程で消失してしまったことが考えられた。

そこで、このような機能を持つ分子を X とすると、それは、1) 正常型プリオンが異常型に

なる過程を触媒または促進する、2) 異常型プリオンを FDC 細胞表面などで結合してそれを濃縮する、3) 免疫系と神経系細胞に共通して発現している、などの条件を満たすことが期待される。

本研究では、そのような分子 X の候補として、BILL カドヘリンと S100 ファミリー蛋白質に着目して研究を進めている。その根拠として、BILL カドヘリンと S100 ファミリー蛋白質の脾臓などリンパ組織での局在性がプリオンの局在性と一致すること、また、それぞれの分子表面の荷電の分布状態を見ると強い電荷の局在が特徴的である点があげられる (図 1)。

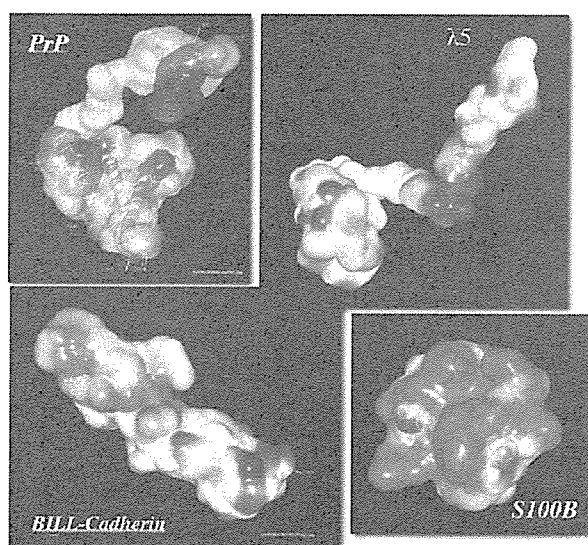


図 1. 分子表面の電荷分布
マウス・プリオン (PrP)、Lambda5、BILL カドヘリン、S100B のホモロジーモデリングによる立体構造と分子表面の電荷分布 (青-陽性荷電、赤-陰性荷電)。

Surface Phenotype of the Cell Lines

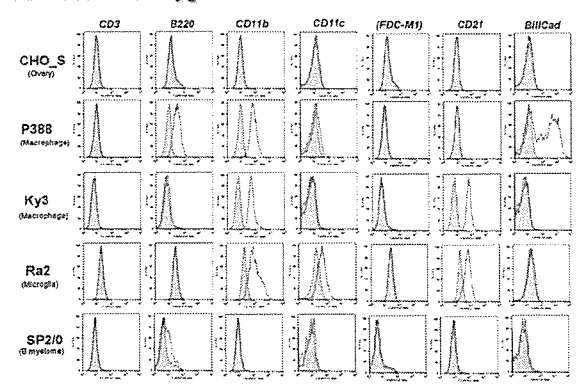


図 2. 細胞株の表面マーカー解析
CHO-S はハムスター卵巣由来細胞 (遺伝子導入実験に汎用される細胞株)、P388 と Ky3 はマクロファージ由来細胞、Ra2 はマイクログリア細胞、SP2/O は B ミエロマ細胞。

2) マクロファージ細胞・FDC 様細胞の株化 : 昨年度より、マウス脾臓の非リンパ球細胞、ストロマ細胞やマクロファージ細胞の株化を行っている。本年度は、現在細胞バンクなどから入手可能なマクロファージ細胞株やマイクログリア細胞株 (Ra2 は名古屋大学・澤田誠博士のご厚意により提供された) も含めて細胞表面マーカーの解析 (図 2) をはじめ、FDC への分化能、すなわち LT (リンホトキシン) / TNF (腫瘍壊死因子) 存在下で FDC マーカーである CD21/FDC-M1 を発現できるか否か、また、*in vitro* でプリオンを保持する能力があるか否か等を検討している。現在、BILL カドヘリンを強く発現するマクロファージ株として P388、CD21 を強く発現するマクロファージ・マイクログリア株として Ky3 株と Ra2 株を得ている。これらの細胞を用いて免疫系細胞におけるプリオン形成の *in vitro* 実験系の構築を試みている。

3) BILL カドヘリン遺伝子欠損マウスにおける TSE 発症機序の解析 : BILL カドヘリンは、典型的なカドヘリンドメインを細胞外に 5 つ持ち、細胞内ドメインはカテニン結合部位を持たないことから非古典的・カドヘリンに分類される。Ca²⁺ 依存的に細胞接着を誘導し、B 細胞、マクロファージ、小腸上皮等に発現している。この遺伝子をノックアウトしたマウスにおけるプリオン病発症のカイネティクスを解析している。昨年度の実験で、BILL カドヘリン遺伝子欠損マウスに TSE 脳ホモジェネートを脳内接種および経口投与したとき、野生型マウスとノックアウトマウスで平均生存日数が異なるという結果を得ている。異常型プリオンを脳内接種した時は野生型とホモ個体でそれぞれ 163±4.8、175±5.6 日 (p=0.037)、経口投与した時はそれぞれ 338±14.5、372±19.2 日 (p=0.022) と有意な延命が観察された。この BILL カドヘリン・ノックアウトマウスの TSE 病変は、野生型と変わらず、脾臓、脳において野生型と同様の TSE 病理所見が観察される。今年度は、さらに詳細に検討するため、対照群を C57BL/6 ではなく、Littermate を用いて解析した。現在までのところ、TSE 脳ホモジェネートの腹腔内投与で、-/- の個体は C57BL/6 よりやや延命するものの、+/+ よりは早く死ぬ結果を得ている (図 3)。

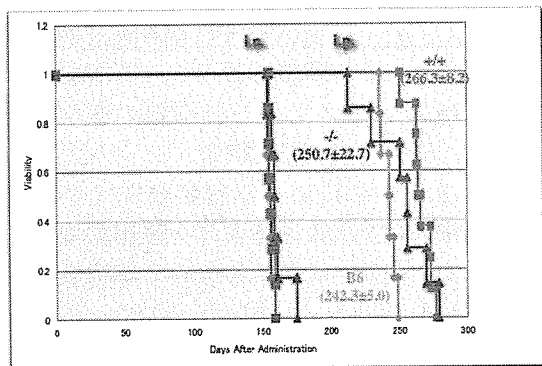


図3. TSE 脳乳剤を投与した BILL カドヘリン遺伝子欠損マウスの生存曲線 (詳細は本文参照)

この結果は、プリオン形成と BILL カドヘリン分子の機能相関の解釈を難しくする結果であるが、現在進行中である経口投与の結果をふまえて最終的な結論を出したい。以上は、BILL カドヘリンに関する *in vivo* 実験系による解析であるが、次項に述べるように *in vitro* の系でもプリオン形成との関連を検討している。

4) S100 ファミリー蛋白質とプリオン形成の相関に関する検討：研究結果 (1) 項で述べた理由から、S100 ファミリー蛋白質のプリオン形成に及ぼす効果を検討している。S100 蛋白質は、分子量 1 万前後の Ca^{2+} 結合蛋白質で、現在 14 ほどのパラログが知られており、遺伝子ファミリーを形成する。その中で、免疫系と神経系に共通して発現し、その分子表面に特徴的な電荷分布を持つファミリー分子として、S100A8、S100A9、S100B を選び、BILL カドヘリン分子も含めて、*in vitro* の実験系においてプリオン形成に及ぼす影響を検討した。

ScN2a 細胞 (プリオンを継代保持するマウス神経芽細胞) を用いた実験系、即ち、ScN2a に MHM2-prion を BILL カドヘリンまたは S100 遺伝子とともにトランスフェクトし、4 日後の PK 抵抗性プリオンの量を MHM2 特異的 3F4 抗体で定量した (図 4)。

形成されるプリオンの量は BILL カドヘリンと S100A8 の共発現で有意に抑制され、S100A9 では促進される。これらのことから、BILL カドヘリン、S100A8、S100A9 など、分子表面電荷に強い局在を持つ分子は ScN2a 細胞上のプリオン形成効率に影響することが明らかになった。S100 蛋白質ファミリーのうち最も分子表面電荷の局在の強い S100B は、予想に反してほとんど効果がなかったが、抗 S100b 抗体を

用いた免疫ブロッティング法により、ScN2a には endogenous な S100B の発現があることが判明した。また、S100A8、S100A9、S100B などはヘテロ 2 量体を形成する性質があるため、干渉 RNA 法などによって endogenous な S100B の発現を制御した系でこれらの分子群の相互作用をさらに詳しく検討する必要がある。

Effect of Bill-Cadherin and S100 Proteins on PrP^{Sc} Conversion

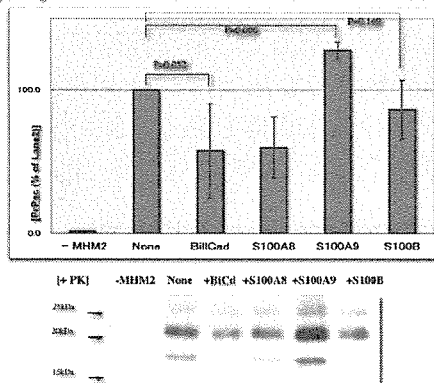


図4. プリオン形成に及ぼす BILL カドヘリンと S100 蛋白質の効果 (詳細は本文参照)

D. 考 察

プリオンを経口摂取した動物において海綿状脳症 (TSE) が発症する過程に免疫担当細胞が関与することはこれまでの様々な報告から明らかである。しかしその実態すなわちどの免疫担当細胞がプリオンの脳への伝達を引き起こしているのか、また、末梢組織のどこでプリオンが増殖しているのかという基本的な疑問はまだ全く理解されていない。本研究でも明らかにした、脾臓においてプリオンを保持している $B220^{+}CD21^{+}$ の細胞群は主に B 細胞亜群からなり、マクロファージの一部と FDC を含む。ハイブリドーマ法を用いて株化した B 細胞では、ハイブリドーマの確立初期にはプリオンが保持されていたにもかかわらず 1 ヶ月後には異常型プリオン量は検出限界以下に低下していた。この結果の解釈の一つとして、B 細胞ハイブリドーマはもとの B 細胞には存在した、プリオンの形成・保持に関与する因子「X」を欠損しているという説明が可能である。本研究では、その因子「X」の候補として、BILL カドヘリン、S100 蛋白質ファミリーに焦点を絞り、検討している。

本年度行った、BILL カドヘリン遺伝子欠損

マウスの Littermate を用いた解析では、-/-の個体は C57BL/6 よりやや延命するものの、+/+より早く TSE を発症して死ぬ結果となった。そのカイネティクスの差は、これまで得ている腹腔投与の群ではあまり大きくない。プリオン形成と BILL カドヘリン分子の機能相関については、現在進行中である経口投与の結果をふまえて最終的な解釈する必要がある。

プリオン分子はその N 末側領域に強い陽性電荷の集中がある。BILL カドヘリンの特徴の一つはその分子表面にネガティブチャージ・クラスターを持つことで、プリオンとよく似た電荷分布を持つ Lambda5 という代替軽鎖分子と結合する。S100 蛋白質も、その分子表面に特徴的な電荷分布を持つファミリー分子であり、本年度はそのうち免疫系と神経系に共発現する S100A8、S100A9、S100B を選び、BILL カドヘリン分子も含めて、*in vitro* の実験系においてプリオン形成に及ぼす影響を検討した。その結果、形成されるプリオンの量は BILL カドヘリンと S100A8 で抑制され、S100A9 で促進された。S100B では、変化がなかったが、これは ScN2a に endogenous に発現している S100B のためと考えられた。また、S100 蛋白質はヘテロ 2 量体を形成する性質があるため、S100B にプリオン形成促進機能があったとしてもそれがヘテロ二量体形成により抑制される可能性も考えられる。これらの分子群の相互作用をさらに詳しく検討するためには、干渉 RNA 法などによって endogenous な S100B の発現を制御した系が必要であり、この点を来年度の課題としたい。

プリオンの増殖・保持機能を持つ免疫系細胞株を樹立し、これまで例のない非神経細胞におけるプリオン増殖機構を検討するための *in vitro* システムを構築する目的で、B 細胞、各種マクロファージ亜群由来と考えられる細胞株の樹立を試み、既知の細胞株も含めて検討している。これまでに BILL カドヘリンを強発現するマクロファージ株、FDC のマーカーである CD21 を発現するマクロファージ株及びミクログリア株が利用可能となった。これらの細胞株について、FDC への分化能や *in vitro* でプリオンを保持する能力について研究を進めている。

E. 結論

BILL カドヘリン遺伝子欠損マウスの Littermate を用いた解析では、-/-の個体は C57BL/6 よりやや延命するものの、+/+より早く TSE を発症したことから BILL カドヘリンのプリオン形成過程への軽度の関与が示唆された。

分子表面に特徴的な電荷の集中を有する BILL カドヘリンと S100 ファミリー分子について、*in vitro* 実験系で形成されるプリオンの量は BILL カドヘリンと S100A8 で抑制され、S100A9 で促進されることが明らかになった。S100B では、変化がなかったが、これは ScN2a に endogenous に発現している S100B のためと考えられた。

非神経細胞におけるプリオン増殖機構を検討する *in vitro* システムを構築する目的で、B 細胞、各種マクロファージ亜群由来と考えられる細胞株の樹立を試み、これまでに BILL カドヘリンを強発現するマクロファージ株、FDC のマーカーである CD21 を発現するマクロファージ株及びミクログリア株が利用可能となった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 大西和夫、山口沙由里：BILLカドヘリン (cadherin-17) 遺伝子欠損マウスにおけるプリオン病発症遅延 (II) 日本分子生物学会 2006フォーラム (名古屋) 2006.12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

15. BSE リスク解明を目的としたプリオン蛋白質構造変換改変による構造変換機序解析に関する研究

分担研究者 堂浦 克美 東北大学大学院 医学系研究科 教授

研究協力者 逆瀬川裕二 (東北大大学院・医学系研究科)

研究要旨 新たに構築したインビトロ蛋白質アンフォールディング活性測定法を用いて、マウス神経芽腫細胞 N2a の細胞破碎液より正常プリオン蛋白質 (PrP^C) をアンフォールドする活性成分を探索した。その結果、分子シャペロンであるヒートショック蛋白質 90 (Hsp90) とその小胞体局在ホモログである Grp94 を見出した。これらのシャペロン蛋白質は、プロテアーゼに部分耐性をもつ銅イオン結合型 PrP^C を ATP などのヌクレオチド存在下でアンフォールドし、PrP^C の代謝や機能調節に関与する可能性を示した。

A. 研究目的

プリオンすなわち異常型プリオン蛋白質の複製増殖の機構は未だ解明されておらず、そのためより有効な早期診断法や治療法の開発が遅れている。そこで、本年度はプリオンの複製機構とされる正常型から異常型へのプリオン蛋白質の高次構造変化において、その初期過程と考えられる正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) の高次構造を変化させる細胞内因子の探索を行った。

B. 研究方法

1) リコンビナントプリオン蛋白質の調製

3F4 タグを導入したマウスプリオン蛋白質 (rPrP) を大腸菌にて封入体として発現させ、8M 尿素により可溶化した後、アルギニン存在下でリフォールドした。フーリエ変換赤外分光分析法 (FT-IR) によって、 α ヘリックスに富む正常型プリオン蛋白質と同様の高次構造をとっていることを確認した。

2) インビトロ PrP アンフォールド試験系の構築

rPrP は低濃度のトリプシンには部分耐性をもつことを利用したインビトロ PrP アンフォールド活性測定系を構築した。100 ng の rPrP と活性成分を含む 10 μ l の 50 mM Hepes-KOH (pH7.5)、0.5 μ g/ml ベスタチン、0.5 μ g/ml キモスタチン、0.5 μ g/ml ペプスタチン A、0.5 ng/ml アプロチニンを 16°C、15 分間保温した。1 μ g/ml

になるようにトリプシンを添加し、さらに 20 分間消化反応を行った。消化産物は、SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした後、3F4 抗体によって検出した。

3) PrP アンフォールド活性成分の精製

N2a 細胞破碎液の遠心上清 (200,000 g、30 分間) より、インビトロ PrP アンフォールド活性を指標に精製を行った。まず、破碎液を濃縮し、ゲルろ過カラム Superdex200 (GE ヘルスケア) により分画した。活性分画はさらに陰イオン交換カラム MiniQ (GE ヘルスケア) および PhenylSepharose (GE ヘルスケア) によって分離し、ほぼ均一な成分にまで精製した。

4) 精製標品の同定

精製標品は SDS-PAGE によって分離後、切り出したゲルよりトリプシンによってゲル内消化を行い、定法に従って、MALDI-TOF MS/MS 解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

マウス神経芽腫細胞 N2a を新たに構築したインビトロ PrP アンフォールド活性測定系を用いて、rPrP をアンフォールドする活性成分を単離した。単離した成分は MALDI-MS/MS 解析により、マウスヒートショック蛋白質 90

(Hsp90) の β アイソフォームであることがわかった。

抗体を用いた方法により、活性分画には、 β アイソフォームだけでなく、 α アイソフォームを含むことが明らかとなった。 α アイソフォームと β アイソフォームのアンフォールド活性を比較したところ、ほぼ同程度の比活性を示し、大きな違いは認められなかった。また、Hsp90 の小胞体局在型ホモログ Grp94 と、他のシャペロン蛋白質である Hsp70 についても PrP アンフォールド活性を測定した。その結果、Grp94 は活性を示したものの、Hsp70 は活性を示さなかった。Hsp90 と Grp94 が示すアンフォールド活性には、ATP などのヌクレオチド依存性は認められなかった。

アンフォールドされた rPrP はトリプシンによって消化され、分子中央部を認識する 3F4 抗体では検出することはできなかった。しかし、N 末側のオクタペプチドリピートを認識する SAF32 抗体や、C 末側を認識する 6H4 抗体、M-20 抗体によって、それぞれ、10 kDa と 13 kDa のペプチドが検出された。

rPrP は Cu^{2+} 結合性を示すことが知られている。そこで、 Cu^{2+} 結合型 rPrP に対する PrP アンフォールド活性を調べた。その結果、60 μM 以上の Cu^{2+} によって rPrP の高次構造変化によるプロテアーゼ部分耐性を示すこと、また、この部分耐性を示す rPrP については、アンフォールドに ATP などのヌクレオチドが必要なことがわかった。ADP や加水分解しないアナログ ATP γ S や AMP-PNP においても添加効果があることから、アンフォールド活性には ATP の加水分解は必要でないこと、また GTP や UTP、CTP においても添加効果があることから、Hsp90 や Grp94 に存在する 2 つのシャペロンドメインの内、C 末側シャペロンドメインの関与が示唆された。

Hsp90 の N 末側シャペロンドメインの阻害剤、ゲルダナマイシンやラディシコール、また C 末側シャペロンドメインの阻害剤、ノボビオシン、シスプラチンのいずれも阻害効果を示さなかった。

D. 考 察

今回、我々は rPrP を基質としてアンフォールド反応を促進する細胞内因子として、分子シ

ャペロンである Hsp90 および Grp94 を見出した。

Hsp90 および Grp94 は、サイトゾル、小胞体内腔に局在する Hsp90 ファミリー蛋白質である。Hsp90 には α 、 β の 2 つのアイソフォームがあり、 α アイソフォームはストレス応答することが知られている。Grp94 は小胞体内腔に局在する糖蛋白質であり、C 末側に小胞体膜に係留されるための KDEL 配列をもつ。いずれも N 末側と C 末側にそれぞれ独立したシャペロンドメインがあることが知られており、以下の特徴により区別することができる。前者は ATP 結合型であり、ゲルダナマイシンやラディシコールによって特異的に阻害され、後者は、ATP だけでなく、GTP などの他のヌクレオチドとも結合し、ノボビオシンやシスプラチンによって阻害される。Grp94 は、PrP^C の糖鎖修飾が異常な際に小胞体内腔にて PrP^C と複合体を形成することが知られている。

Hsp90 の二つのアイソフォームと Grp94 はインビトロ PrP アンフォールド活性測定系にて同程度の比活性を示し、活性に大きな違いは認められなかった。また、銅と結合していない rPrP に対しては、ATP などのヌクレオチドを必要しないのに対し、銅と結合した rPrP については ATP だけでなく GTP、CTP、UTP の存在下でアンフォールド活性を示した。このヌクレオチドの特異性は、Hsp90 および Grp94 の示す PrP アンフォールド反応には、C 末側シャペロンドメインが関与していることを示す。しかしながら、N 末側シャペロンドメインの阻害剤だけでなく、C 末側シャペロンドメインの阻害剤も阻害活性を示さなかったことから、今回見出した Hsp90 と Grp94 が示すアンフォールド活性は、従来知られている作用期序とは異なるシャペロン反応であることが予想される。

Hsp90 は主にサイトゾルと核に局在するが、他方、細胞外マトリクス中にも検出されることが報告されている。また、Grp94 は小胞体内腔に局在しているが、条件によっては細胞膜に局在することが報告されている。PrP^C は小胞体、ゴルジ体、分泌小胞体内腔および細胞膜に局在するが、Hsp90 や Grp94 との相互作用については、Grp94 については報告されているが、今後さらなる解析が必要である。

一方、アンフォールドされた rPrP 分子は、

トリプシンによって N 末側と C 末側のそれぞれ 10 kDa と 13 kDa の 2 本のポリペプチドに分断された。rPrP は 23 kDa であることと、分子中央部を認識する 3F4 抗体によって検出できないことから、トリプシンによる消化は、3F4 エピトープを含む分子中央部で起こっていること、また、N 末側、C 末側はほぼ安定な形でトリプシン消化から保護されていることが示唆された。この結果は、Hsp90 や Grp94 が示すアンフォールド活性は、分子中央部であることを示している。

分子中央部は、PrP^C の代謝の過程で切断を受けることが知られており、Hsp90 や Grp94 はこの過程を調節している可能性がある。また、この部分はアミロイドになりやすく、神経毒性を示す 106-126 にも対応しており、プリオン複製だけでなく、神経毒性の発現にも関与する可能性がある。

E. 結 論

プリオンの高次構造変化を促進する細胞内因子として Hsp90 および Grp94 を見出した。これらの分子シャペロンは Cu²⁺ に結合し高次構造変化を起こした PrP 分子についてもヌクレオチド存在下でアンフォールドする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuuchi T, Doh-ura K, Yoshihara S, Ohta S: Metal complexes with superoxide dismutase-like activity as candidates for anti-prion drug. *Bioorg. Med Chem Lett* 16: 5982-5987, 2006.
- 2) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem* 99:198-205, 2006.
- 3) Sasaki K, Doh-ura k, Ironside J, Mabbott N, Iwaki T: Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. *J Pathol* 209(4): 484-91, 2006.
- 4) Wakisaka Y, Santa N, Doh-ura K, Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T: Increased asymmetric pulvinar magnetic resonance imaging signals in Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques following a cadaveric dura mater graft. *Neuropathology* 26: 82-88, 2006.
- 5) Shintaku M, Yutani C, Doh-ura K: Brain stem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A histopathological and immunohistochemical study. *Neuropathology* 26: 43-49, 2006.
- 6) Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* 29(5): 927-932, 2006.
- 7) Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y: Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. *Cell Mol Neurobiol.* (in press)
- 8) 石川謙介、堂浦克美：プリオンイメージングの試み。CLINICAL NEUROSCIENCE(月刊 臨床神経科学) 24(3):313-316, 2006.
- 9) 逆瀬川裕二、堂浦克美：プリオン病の治療－その現状と展望－。Brain Medical, 2006. (印刷中)
- 10) 逆瀬川裕二、堂浦克美：孤発性クロイツフェルトーヤコブ病と 6 種類のサブタイプ。Medical Briefs in Brain & Nerve, 2006. (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Doh-ura K: Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, October 2006, Munich, Germany.
- 2) Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T: Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. TheraPrion 2006, November 2006, Paris, France.
- 3) Doh-ura K, Rainov N, Ishikawa K, Kawasaki Y, Tsuboi Y: Pentosan polysulfate and amyloidophilic chemicals for prion diseases.

- NeuroPrion 2006, October 2006, Torino, Italy.
- 4) Sakasegawa Y, Doh-ura K: Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. NeuroPrion 2006, Torino, October, 2006.
 - 5) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of prion diseases. NeuroPrion 2006, October 2006, Torino, Italy.
 - 6) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen C.J, Doh-ura K: Effectiveness of an orally administered anti-prion chemical. NeuroPrion 2006, October 2006, Torino, Italy.
 - 7) Rainov N.G, Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V: Experimental treatments for human prion diseases. NeuroPrion 2006, October 2006, Torino, Italy.
 - 8) Sakasegawa Y, Doh-ura K : A coumarin antibiotic Novobiocin directly induces aggregation of the cellular prion protein. The 20th IUBMB Congress and 11th FAOBMB Congress, June 2006, Kyoto, Japan.
 - 9) 堂浦克美: プリオン病の治療戦略を展望するー即戦力的方略ー. 第 28 回日本薬学会九州支部コロキウム(福岡)2006.10.
 - 10) 堂浦克美: プリオン病の治療開発. 第 64 回慶應神経病理カンファレンス(東京)2006 年 9.9.
 - 11) 照屋健太、魚本幸、堂浦克美: プリオン感染細胞からの迅速かつ効率的な PrPres 回収法. 2006 年プリオン研究会(安比高原)2006.9.
 - 12) 川崎ゆり、川越敬一、陳忠正、堂浦克美: 経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究. 2006 年プリオン研究会(安比高原)2006.9.
 - 13) 堂浦克美、魚本幸、西澤桂子、川崎ゆり、伊波真彦: Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. 2006 年プリオン研究会(安比高原)2006.9.
 - 14) 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫: プリオン病に対するペントサンポリサルフェート脳室内持続投与の試み(続報). 2006 年プリオン研究会(安比高原)2006.9.
 - 15) 石川謙介、木村朋寛、工藤幸司、西田教行、岩城徹、堂浦克美: Styrylbenzazole 誘導体を用いたプリオンアミロイド斑のイメージングおよび伝達性海綿状脳症の治療. 2006 年プリオン研究会(安比高原)2006.9.
 - 16) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Doh-ura K, Kaneko K. Heat shock protein 90 kDa unfolds the copper loaded full length recombinant prion protein in a nucleotide dependent manner. 2006 年プリオン研究会(安比高原)2006.9.
 - 17) 照屋健太、堂浦克美: 蛋白質ライゲーションを利用したカルボキシ末端選択的に修飾を施したプリオン蛋白質の調製. 東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台)2006.5.
 - 18) 山口恭史、三浦隆史、照屋健太、堂浦克美、竹内英夫: 銅イオンによるプリオンタンパク質のコンホメーション変化. 東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台)2006.5.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) 堂浦克美: コンフォメーション病医薬組成物. 特願 2006-117294、2006 年 4 月 20 日
 - 2) 堂浦克美、照屋健太、竹中繁織、大塚圭一: 異常型プリオン蛋白質濃縮方法、および除去方法. 特願 2006-071881、2006 年 3 月 15 日
 - 3) 竹中繁織、大塚圭一、堂浦克美、照屋健太: 電気化学的抗原検出法とそのための装置並びに検出チップ. 特願 2006-65744、2006 年 3 月 10 日

16. 脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するためのとさつ解体処理方法の開発

分担研究者 月川 由紀子 東京都芝浦食肉衛生検査所長

研究要旨 当研究では、まず、脳・脊髄組織による枝肉等の汚染防止対策の構築を目的に、グリア繊維性酸性タンパク（GFAP）を指標とした枝肉汚染状況の実態把握とその汚染除去方法について検討した。その結果、背割り後のスチームバキューム、脊柱付近の予備洗浄、洗浄時間の延長等が脳・脊髄組織の残留量を少なくすることができる作業方法であると判明した。さらにこの調査結果をもとに、枝肉の脳・脊髄組織汚染防止のための SSOP のモデルを作成した。次に、舌扁桃の分布に関する調査を実施した。昨年度の調査範囲（最後位有郭乳頭前後）では全域にわたり舌扁桃が幅広く分布していたため、今年度はさらにその調査範囲を最前位有郭乳頭まで広げるとともに検体数を増やし、舌扁桃の分布状況を調査した。その結果、舌扁桃は粘膜固有層のみに分布し、その9割以上は最後位有郭乳頭から最前位有郭乳頭までのほぼ中間位置に分布していた。しかし最前位有郭乳頭付近で舌扁桃が検出された個体もあり、追加調査によりさらに舌尖方向でもその存在が確認された。よって、舌扁桃は、舌隆起部先端から舌根部まで舌の背面および側面の粘膜固有層までを、筋層が露出するよう処理することで、その除去が確実となる。

協力研究者：

旭川市食肉衛生検査所長	高橋俊幸
青森県十和田食肉衛生検査所長	前田良博
茨城県県西食肉衛生検査所長	佐藤正宏
茨城県県南食肉衛生検査所長	庄司 昭
栃木県県北食肉衛生検査所長	高岩澄夫
群馬県食肉衛生検査所長	信澤敏夫
埼玉県中央食肉衛生検査センター長	平井 茂
さいたま市食肉衛生検査所長	内田 彰
千葉県東総食肉衛生検査所長	高浦芳一
横浜市食肉衛生検査所長	森島保男
富山県食肉検査所長	高田正耕
金沢市食肉衛生検査所長	桐原公郎
岐阜県食肉衛生検査所長	長谷川孝明
名古屋市食肉衛生検査所長	菅井康仁
三重県松阪食肉衛生検査所長	村田耕一郎
滋賀県食肉衛生検査所長	溝口博久
兵庫県食肉衛生検査センター	
西播磨食肉衛生検査所長	友久健二
愛媛県食肉衛生検査センター長	勇 孝徳
宮崎県小林食肉衛生検査所長	湯地信夫
鹿児島県末吉食肉衛生検査所長	特手洋美
東京都芝浦食肉衛生検査所	
八王子支所長	村松 哲

I. 脳・脊髄組織汚染状況調査及び汚染除去方法の検討

A. 研究目的

わが国の BSE 対策の一環として、と畜場においては SRM（特定部位）を適正に除去することが求められており、各と畜場で SRM 除去について SSOP（Sanitation Standard Operation Procedure 衛生標準作業手順）が作成され実行されている。しかし、最終洗浄後の枝肉から中枢神経系組織の細胞マーカーであるグリア繊維性酸性タンパク（GFAP：Glial Fibrillary Acidic Protein）が検出される¹⁾ 場合があることから、不十分な洗浄では脳・脊髄組織による汚染が十分に除去されないことが示唆されている。枝肉の脳・脊髄組織の汚染防止には、効果的な洗浄方法について研究データを蓄積し各と畜場における衛生管理に反映させることが必要である。

分担研究の初年度である昨年度は、各と畜場の状況に応じた洗浄方法の改善策を講じ、汚染除去効果を検証した。また、作業従事者や使用器具の汚染実態を把握、作業従事者の防護策や枝肉への二次汚染防止策を検討した。今年度は、昨年度枝肉洗浄に対し効果の認められたファクター等に焦点を絞り、規模を拡大し調査を実施した。また、これらの調査結果をもとに、洗浄方法を中心とした SSOP のモデルを作成した。

B. 研究方法

と畜場でとさつ解体された牛枝肉について、GFAP を指標として、脳・脊髄組織の残留量を測定した。GFAP の測定はRIDASCREEN Risk Material 10/5 (R-Biopharm 社製) を用いた。ふき取りは、背割り直後 (洗浄前) 及び表 1 に示される 1~6 の各調査により設定されたポイントで行い、乾燥滅菌綿棒で濡れた状態の枝肉表面をふき取った。ふき取り部位は、昨年度までの調査で GFAP 検出率が高かった背割り面 (内側) の第三頸椎周囲及び最後胸椎周囲の計 2 か所とし、ふき取り面積は筋肉又は脂肪部分 100 cm² である。調査は全国 8 か所のと畜場で行い、検査枝肉数は 476、ふき取り検体数は 1,770 である (表 1)。

なお、検査キットの GFAP 検出限界は 100 cm² あたり 3 ng で、定量範囲は 3~12 ng である。GFAP が上限を超えて検出された場合は、検体を定量範囲の濃度まで希釈した後再度測定し、得られた値と希釈倍率から検体の濃度を求めた。

【表 1 に示す 1~6 の調査方法】

1) 背割り後の GFAP 残留量の実態について (8 機関)

A~H と畜場において、背割り後の枝肉でふき取り検査を行い、と畜場ごとの GFAP 残留実態を調査した。

2) スチームバキュームによる GFAP 除去効果について (2 機関)

F 及び H と畜場において、背割り後、スチームバキューム後、最終洗浄後のそれぞれでふき取り検査を行い、スチームバキュームによる GFAP 除去効果を調査した。なお、GFAP が高温スチームにより変性し抗原性を失っている可能性もあるため、F と畜場において、スチーム機能を解除しバキュームのみ実施した場合の除去効果についても調査を行った。

3) 自動高圧洗浄前の予備洗浄による GFAP 除去効果について (2 機関)

昨年度の調査で、自動高圧洗浄機のみを使用する施設で GFAP の枝肉への残留が認められる場合があった。自動高圧洗浄機は水圧やノズルの位置等の設定変更が困難であるため、そのような施設でも効果が期待できる予備洗浄について調査を行った。

B 及び C と畜場において、自動高圧洗浄前に通常圧による手動予備洗浄を実施し、背割り後、予備洗浄後、最終洗浄後のそれぞれでふき取り検査を行い、予備洗浄の効果を調査した。予備洗浄は枝肉背割り面を中心に 15 秒間行った。C と畜場においては予備洗浄を 30 秒間とした場合についても同様に調査を行った。

4) 手動高圧洗浄時の GFAP 残留動態について (3 機関)

① (背割り面全体を洗浄) D 及び E と畜場において、背割り後の枝肉を手動高圧により 15~60 秒間洗浄し、背割り後、設定時間経過後にふき取り検査を行い、洗浄時間の経過にともなう GFAP の残留動態について調査した。

② (背割り面上部洗浄後に下部を洗浄) G と畜場において、背割り後にまず枝肉上部を手動高圧により洗浄し、その後に枝肉下部を洗浄する手順で洗浄し、背割り後、上部洗浄後、下部設定時間洗浄後にふき取り検査を実施し、枝肉下部の洗浄時間経過にともなう GFAP 残留動態を調査した。なお、枝肉上部洗浄は背割り面を中心に 40 秒間とし、下部洗浄は背割り面中心に 30 秒間又は 45 秒間行った。

5) 洗浄角度による GFAP 除去効果について (1 機関)

A と畜場において、背割り後の枝肉を手動通常圧により角度を変えて洗浄し、背割り後及び洗浄後にふき取り検査を行い、残留 GFAP の除去効果を比較した。洗浄角度は枝肉に対し直角の場合と上部から鋭角 (45 度) の場合の 2 パターン、洗浄時間は 5 秒間とした。

6) 最終洗浄後の GFAP 残留量とノコ屑残留との関連について (6 機関)

A~E 及び H と畜場において、最終洗浄後の枝肉のノコ屑残留について目視で確認し、ふき取り検査の結果と合わせて、第三頸椎周囲の GFAP 残留量と枝肉のノコ屑残留との関連について調査した。

表 1 参加機関数及び検体数の内訳

調査内容	機関名	検体数
1 背割り後のGFAP残留量の実態	ABCDEFGHIH	476枝肉 897検体
2 スチームバキュームによるGFAP除去効果	FH	140枝肉 720検体
3 自動高圧洗浄前の予備洗浄によるGFAP除去効果	BC	40枝肉 240検体
4 手動高圧洗浄時のGFAP残留動態	DEG	130枝肉 400検体
5 洗浄角度によるGFAP除去効果	A	40枝肉 160検体
6 最終洗浄後のGFAP残留量とノコ屑残留との関連	ABCDEH	218枝肉 218検体
合 計	8機関	476枝肉 1770検体

※ 調査1及び6と、調査2~5の検体は一部重複している

C. 研究結果

1) 背割り後の GFAP 残留量の実態について

背割り後の GFAP 残留状況について、GFAP 残留度の階級別割合を図 1 及び図 2 に、GFAP 平均残留量を図 3 に示した。

GFAP 残留度は、厚生労働省の通知に基づき、GFAP 残留量 3 ng 未満/100 cm² を残留度 0 に、3 ng 以上 6 ng 未満/100 cm² を残留度 1 に、6 ng 以上 9 ng 未満/100 cm² を残留度 2 に、9 ng 以上 12 ng 未満/100 cm² を残留度 3 に、12 ng/100 cm² 以上を残留度 4 として換算した。(研究結果 2) (以降についても同様)

と畜場により、背割り後の GFAP 残留状況は大きく異なり、残留度 0 の検体が 80% 近くを占める機関もあれば、残留度 4 の検体が 90% 以上を占める機関もあった。

また、GFAP 残留量は枝ごとのばらつきが大きく、同一と畜場においても、残留度 0 から 4 までの検体が混在していた (図 1、2)。

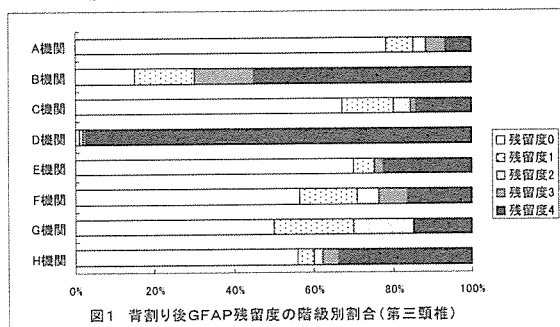


図1 背割り後GFAP残留度の階級別割合(第三頸椎)

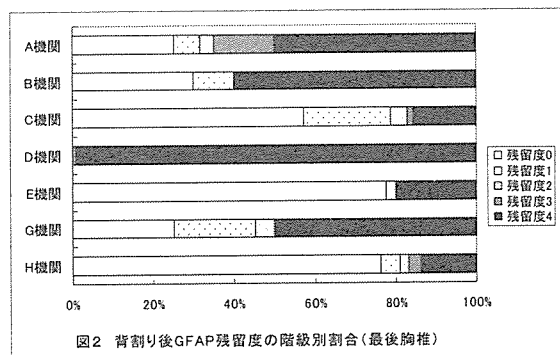


図2 背割り後GFAP残留度の階級別割合(最後胸椎)

機関ごとの GFAP 平均残留量は、2.4~156.3 ng/100cm² の範囲にあり、機関により大きく差があった (表 2、図 3)。

なお、残留度 4 の検体が 90% 以上を占めた D と畜場では、調査時脊髄吸引装置が稼動していなかった。このことから、枝肉への脳・脊髄組織汚染防止のために、脊髄吸引が重要であることがあらためて確認された。

表2 背割り後のGFAP残留量 (ng/100cm²)

ふき取り部位: 第三頸椎周囲								
実施機関	A	B	C	D	E	F	G	H
検体数	60	20	70	111	40	55	20	100
最大値	29.6	651.8	1,112.3	303.5	36.1	190.6	168.7	648.8
最小値	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0
平均値	2.4	89.0	27.6	49.6	5.7	8.7	9.8	36.4
標準偏差	5.7	150.3	138.5	49.1	10.3	26.5	27.9	91.0

ふき取り部位: 最後胸椎周囲								
実施機関	A	B	C	D	E	F	G	H
検体数	60	20	70	111	40	55	20	100
最大値	178.3	1,076.4	578.0	490.9	121.8	161.3	1,328.4	161.3
最小値	0.0	0.0	0.0	10.2	0.0	0.0	0.0	0.0
平均値	22.3	156.3	19.4	149.6	12.0	16.9	32.2	32.2
標準偏差	31.4	283.1	80.2	132.6	28.2	32.0	152.2	32.0

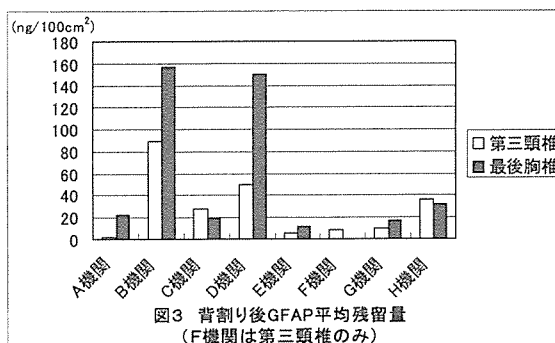


図3 背割り後GFAP平均残留量 (F機関は第三頸椎のみ)

2) スチームバキュームによる GFAP 除去効果について

GFAP はスチームバキュームにより、42.9~70.9%除去でき、最終洗浄後の平均残留量はほぼ残留度 0 のレベルとなった。また、スチームを解除しバキュームのみ実施した場合でも、55.7%の除去効果が認められた (表 3、図 4)。

表3 スチームバキュームの効果 (GFAP平均残留量 ng/100cm²)

	背割り後	バキューム後	洗浄後	スチームバキュームの効果
F機関(第三頸椎)バキュームのみ	6.1	2.7	0.0	55.7%減
F機関(第三頸椎)	11.7	3.4	0.5	70.9%減
H機関(第三頸椎)	36.4	13.6	3.0	62.6%減
H機関(最後胸椎)	32.2	18.4	1.3	42.9%減

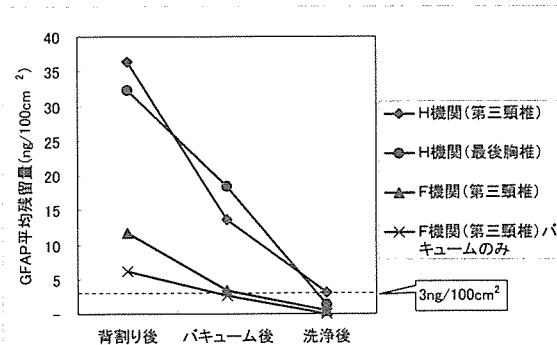


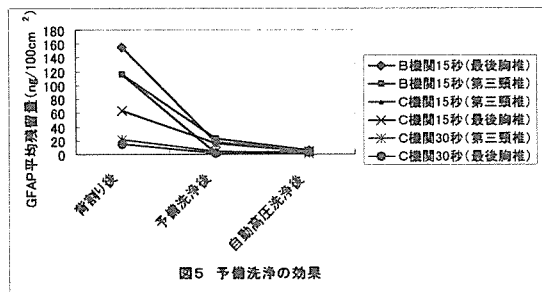
図4 スチームバキュームの効果

3) 自動高圧洗浄前の予備洗浄による GFAP 除去効果について

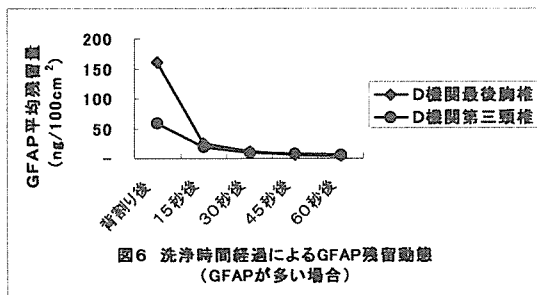
自動高圧洗浄前に 15~30 秒の予備洗浄を行うことにより、GFAP は 75.3~99.3%除去され、自動高圧洗浄後の平均残留量は残留度 0 又は 1 のレベルとなった。(表 4、図 5)

表4 予備洗浄の効果 (GFAP平均残留量 ng/100cm²)

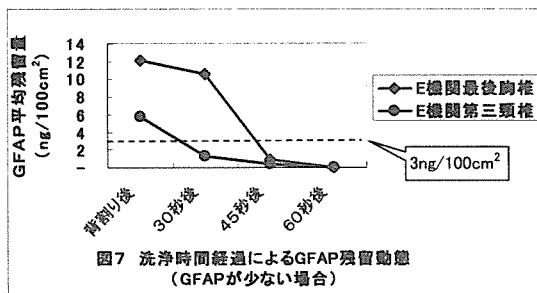
	背割り後	予備洗浄後	自動高圧洗浄後	予備洗浄後の効果
B機関15秒(第三頸椎)	115.8	21.7	4.7	81.3%減
B機関15秒(最後胸椎)	155.4	17.2	5.0	88.9%減
C機関15秒(第三頸椎)	115.1	0.8	4.6	99.3%減
C機関15秒(最後胸椎)	63.1	15.6	4.0	75.3%減
C機関30秒(第三頸椎)	20.4	3.9	1.2	80.9%減
C機関30秒(最後胸椎)	13.8	1.5	3.1	89.1%減



4) 手動高圧洗浄時の GFAP 残留動態について
 ① (背割り面全体を洗浄) 背割り後の GFAP 残留量が比較的多い機関においては、GFAP 残留量は最初の 15 秒間で激減し、その後ゆるやかに減少した。第三頸椎、最後胸椎周囲ともに、60 秒後に残留度 1 のレベルになった (図 6)。

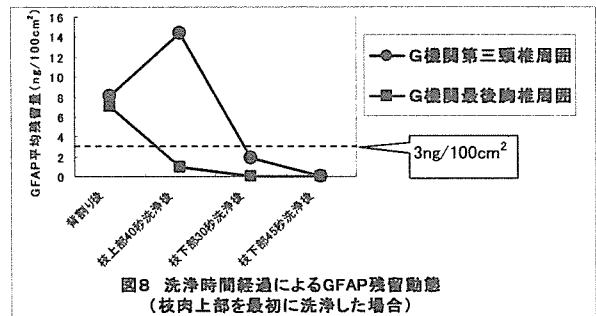


背割り後の GFAP 残留量が比較的小さい機関においては、GFAP 残留量はゆるやかに減少し、第三頸椎周囲では 30 秒後に、最後胸椎周囲では 45 秒後に残留度 0 のレベルになった (図 7)。

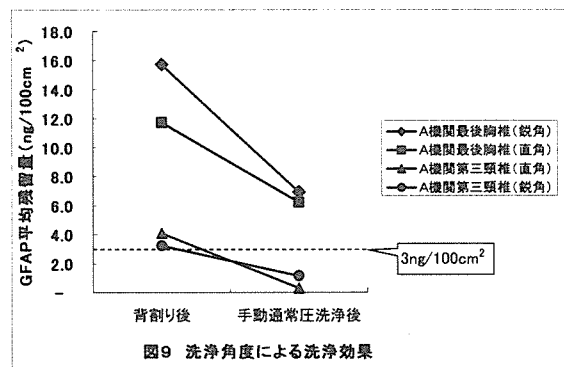


② (背割り面上部洗浄後に下部を洗浄) GFAP 平均残留量は、最後胸椎周囲では上部洗浄後に残留度 0 のレベルになった。第三頸椎周囲では、

上部洗浄後に GFAP 平均残留量が一時的に増加し、その後下部洗浄 30 秒後に残留度 0 のレベルになった (図 8)。



5) 洗浄角度による GFAP 除去効果について
 背割り後及び設定角度で洗浄後の GFAP 平均残留量の変化について図 9 に示した。第三頸椎周囲、最後胸椎周囲ともに、洗浄前後における GFAP 残留量の変化について、洗浄角度による差は特には認められなかった。



6) 最終洗浄後の GFAP 残留量とノコ屑残留との関連について

最終洗浄後の枝肉において目視でノコ屑が認められた 141 検体のうち、52 検体 (37.0%) から GFAP が検出され、肉眼的に見て洗浄不良の枝肉では 4 割近くで GFAP が残留していた。一方、最終洗浄後の枝肉において目視でノコ屑が認められなかった 77 検体のうち、12 検体 (15.6%) から GFAP が検出された (表 5)。

表5 最終洗浄後のGFAP残留とノコ屑視認との関連

GFAP残留度	ノコ屑視認なしの検体数	ノコ屑視認ありの検体数
0	65 (84.4%)	89 (63.0%)
1	9 (11.7%)	19 (13.5%)
2	1 (1.3%)	9 (6.4%)
3	0 (0%)	6 (4.3%)
4	2 (2.6%)	18 (12.8%)
合計	77検体	141検体