

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17363

研究課題名(和文)ヒ素曝露による線維芽細胞の細胞老化を介した発癌機序の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of arsenic-induced carcinogenesis via fibroblast senescence

研究代表者

岡村 和幸 (Okamura, Kazuyuki)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：50736064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞老化はSASPと呼ばれる分泌現象を介して発癌に関わることが知られている。本研究ではヒト肝臓由来の線維芽細胞であるLX-2において、価の無機ヒ素である亜ヒ酸ナトリウムを曝露することによって細胞老化が誘導され、それに伴うSASP因子の亢進がおこることを明らかにした。さらにSASP因子の発現増加は培地からヒ素を除いた後にも維持されることを見出し、ヒ素に曝露されなくなった後にも影響が残ることが示された。ヒト由来皮膚線維芽細胞であるHFb16dにおいても亜ヒ酸ナトリウム曝露によって同様の遺伝子発現変化が認められ、線維芽細胞におけるSASP因子の亢進が発癌に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒ素曝露が引き起こす慢性中毒は世界的に深刻な環境問題のひとつであり、その中でも発癌は命に関わる問題であるが、機序は未解明である。これまでにヒ素曝露による細胞老化を介したSASPによる発癌メカニズムを検討した実験的研究は存在せず、本研究は肝臓、皮膚など慢性ヒ素中毒によって癌が生じる組織において発癌の共通機序としてSASP因子の亢進が関与する可能性を明らかにした。これによりヒ素曝露による発癌メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although senescent cells themselves irreversibly stop proliferation, they secrete multiple factors called senescence-associated secretory phenotype (SASP) such as cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinases. SASP is known to involve tumorigenesis. In this study, we revealed arsenite exposure induced premature senescence and following SASP induction in human derived hepatic stellate cell line (fibroblast-like) LX-2. Furthermore, high level of gene expression of SASP factors were remained even after removing arsenite from culture medium. Thus, it was shown that the effect of arsenite exposure persist even after exposure to arsenite has ceased. The gene expression changes of SASP factors were also observed in human derived skin fibroblast cell line HFb16d after arsenite exposure. Therefore, it is suggested that induction of SASP factors in fibroblasts by arsenite exposure is involved in carcinogenesis.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ヒ素 細胞老化 SASP 線維芽細胞 肝臓 皮膚 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

天然由来の環境化学物質である無機ヒ素(III価)は、地下水からの経口曝露および石炭からの粉塵曝露等によって慢性ヒ素中毒をひきおこし、皮膚、肺、肝臓、膀胱への発癌を誘導することが報告されている(Hughes et al., 2011)。しかしながらその発癌機序は明確にはわかっていない。

近年、発癌を誘導する作用機序として細胞老化の関与が注目されている。細胞の老化は不可逆的な細胞増殖の停止で定義され(Sikora et al., 2010)、細胞分裂による染色体末端のテロメア短縮による複製の細胞老化と、酸化ストレスやDNA損傷、がん原遺伝子によって誘導される早期細胞老化に分類される(Kuilman et al., 2010)。老化した細胞は、自身の増殖が停止することから、発見当初は癌抑制の役割が報告されてきた(Hanahan and Weinberg, 2000)。しかし、老化した細胞は生体内で留まり続け、SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる炎症性サイトカインなどの刺激によって、周囲の細胞の増殖を促進し、臓器レベルで癌を誘導することが報告された(Campisi and d'Adda di Fagana, 2007, Naylor et al., 2013)。特にがん原遺伝子などによる線維芽細胞の細胞老化は、SASPを介して癌の形成に重要な役割を果たすことが報告されており(Campisi et al., 2001)、肝臓においても肝臓における線維芽細胞である肝星細胞の細胞老化が発癌促進に関与することが報告されている(Yoshimoto et al., 2013)。

老化した細胞は生体内に留まり続けることによって長期間影響を及ぼすと考えられるが、無機ヒ素曝露による発癌も長期の潜伏期間を経ることが報告されている(Martinez et al., 2011)。さらに無機ヒ素曝露によって癌を発症する臓器(Hughes et al., 2011)と細胞老化が蓄積する臓器(Muñoz-Espín and Serrano, 2014)を比較すると、共通する臓器が多いことから、無機ヒ素曝露による癌発症と細胞老化は密接な関わりがあると考えた。

また、ヒ素は生体内で代謝され、五価のジメチルアルシナス酸として体外に排出されるが、代謝の過程で生じる三価の有機ヒ素化合物であるモノメチルアルソナス酸(MMAIII)および三価のジメチルアルシナス酸(DMAIII)は毒性が高く(Petrick et al., 2000, Mass et al., 2001)、細胞老化誘導にも関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、まず肝臓由来の線維芽細胞である肝星細胞の細胞株を用いて、III価の無機ヒ素曝露によって細胞老化が誘導されるか、その際SASP因子の産生は亢進しているかを明らかにすることを旨とした。さらに、慢性ヒ素中毒による発癌は潜伏期間を経て発症することから、ヒ素曝露がなくなった後も影響が継続するか検討を行った。また、細胞老化を誘導する要因を明らかにするために、これまで細胞老化を誘導することが報告されている酸化ストレス、DNA損傷に着目し検討を行った。加えて、III価の無機ヒ素曝露による細胞老化およびSASP因子の誘導が肝臓の線維芽細胞のみならず、他の臓器においても誘導されるかを明らかにするため、皮膚の線維芽細胞を用いた検討を行った。最後に、V価およびIII価の有機ヒ素化合物の曝露がIII価の無機ヒ素化合物の曝露と比較して細胞増殖抑制の誘導能が高いか否かを明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) III価の無機ヒ素曝露による肝星細胞における細胞老化の誘導とSASP因子産生の検討

III価の無機ヒ素曝露によって細胞増殖抑制がおこる濃度の検討

ヒト由来肝星細胞の細胞株であるLX-2およびマウス由来の肝星細胞の細胞株であるGRXを用い、III価の無機ヒ素である亜ヒ酸ナトリウムを10 nMから100 μMまで曝露し、細胞増殖の変化を72時間まで経時的にPromega社のRealTime-Glo™ MT Cell Viability Assayを用いて検討を行った。

III価の無機ヒ素曝露による細胞老化マーカーおよびSASP因子の遺伝子発現の測定

上記にて細胞増殖抑制が観察された周辺の濃度にてLX-2細胞およびGRX細胞に亜ヒ酸ナトリウム曝露を72時間行い細胞の形態学的な変化を顕微鏡で観察した。曝露後、細胞からRNA抽出、cDNA合成後、細胞老化マーカーおよびSASP因子の遺伝子発現量をReal-time PCR法を用いて測定した。具体的な遺伝子としてはLX-2細胞については細胞老化マーカー*P16*、*P21*、*LAMINB1*、SASP因子*CXCL1*、*IL-1β*、*IL-8*、*MMP1*、*MMP3*を、GRX細胞については細胞老化マーカー*p16*、*p21*、*Laminb1*、SASP因子*Cxcl1*を測定した。内在性コントロールには18S rRNAを用いた。

LX-2細胞においてIII価の無機ヒ素曝露によって不可逆的な細胞増殖抑制がおきているか

の検討

上記において細胞老化マーカーおよび SASP 因子の遺伝子発現変化は特に LX-2 細胞において見られたため、細胞老化の最も大きな特徴である不可逆的な細胞増殖抑制がおきているかを検討した。具体的には、細胞を亜ヒ酸ナトリウム非存在下(対照群)または 5 μ M 存在下にて 72 時間培養し、培養後細胞数をカウントし、対照群とヒ素曝露群で同一の細胞数を、ヒ素を除いた培地で培養を行い細胞増殖の変化を Promega 社の RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay を用いて測定した。

III 価の無機ヒ素曝露による細胞老化マーカーおよび SASP 因子の遺伝子発現変化は曝露がなくなっても持続するかの検討

LX-2 細胞において亜ヒ酸ナトリウム 7.5 μ M を 144 時間曝露した。曝露後、ヒ素を除いた培地でさらに 120 時間培養を行い、RNA 抽出、cDNA 合成後、細胞老化マーカー *P21*、*LAMINB1*、SASP 因子 *CXCL1*、*IL-1 β* 、*IL-8*、*MMP1*、*MMP3* の遺伝子発現量を Real-time PCR 法を用いて測定した。

(2) III 価の無機ヒ素曝露による LX-2 細胞における細胞老化誘導機序の検討

酸化ストレス関連遺伝子の発現量測定

LX-2 細胞において、亜ヒ酸ナトリウム 1、2、5 μ M 曝露を行い、72 時間後に酸化ストレスマーカーとして *HO-1* を、抗酸化除去酵素として *SOD1*、*CAT* の遺伝子発現量を測定した。*HO-1* に関しては、7.5 μ M 曝露においても検討を行った。

細胞内活性酸素種 (ROS) の測定

LX-2 細胞において、亜ヒ酸ナトリウム 5 μ M または 7.5 μ M 曝露を行い、24 時間後に細胞内の ROS を DCFH-DA を用いて測定した。測定には FACS を使用した。

抗酸化剤添加によって III 価の無機ヒ素曝露による細胞老化誘導が减弱されるかの検討

LX-2 細胞において、作用機序の異なる抗酸化剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC)、Trolox、Apocynin をヒ素曝露 30 分前に培地に添加し、亜ヒ酸ナトリウム 5 μ M または 7.5 μ M を 72 時間曝露後、細胞を回収し RNA 抽出、cDNA 合成後、細胞老化マーカー *P21*、*LAMINB1*、SASP 因子 *IL-8*、酸化ストレスマーカー *HO-1* の遺伝子発現量を Real-time PCR 法を用いて測定を行った。NAC に関しては、ヒ素曝露 30 分前に培地に添加した後、培地から NAC を除き、その後亜ヒ酸ナトリウム 7.5 μ M を 72 時間曝露し、細胞の形態学的な変化と細胞増殖の変化を顕微鏡で観察した。

なお、N-Acetyl-L-cysteine は水に溶かした状態だと強い酸性であったため、PBS に溶かし、pH を NaOH で 7.4 に調製後、実験に使用した。

DNA 二本鎖切断マーカー γ -H2AX の測定

亜ヒ酸ナトリウム 2、5、7.5 μ M 曝露を 72 時間または 144 時間行った LX-2 細胞から 1% SDS 入りの lysis buffer を用いてタンパク質を抽出し、BCA 法にてタンパク質濃度を測定した。その後 DNA 二本鎖切断マーカーである γ -H2AX のタンパク質量を Western blotting 法にて検出した。ローディングコントロールには β -actin を使用した。また 7.5 μ M 曝露を 72 時間行い、培地からヒ素を除いた後にさらに 72 時間培養した LX-2 細胞についても同様の検討を行った。

(3) 皮膚の線維芽細胞における III 価の無機ヒ素曝露による細胞老化および SASP 因子の誘導

ヒト由来の皮膚線維芽細胞の細胞株である HFb16d を用いて上記(1)と同様の検討を行い、細胞増殖の抑制が観察された濃度周辺で 144 時間亜ヒ酸ナトリウム曝露を行い、(1) で検討した細胞老化マーカーおよび SASP 因子の遺伝子発現量を測定した。

(4) III 価および V 価の有機ヒ素化合物の曝露による細胞増殖抑制への影響解析

III 価の有機ヒ素化合物の合成

III 価の有機ヒ素化合物は不安定なため、III 価の有機ヒ素化合物として細胞培養に用いるためにグルタチオン抱合体である monomethylarsonic diglutathione (MADG) と dimethylarsinic glutathione (DMAG) を調製した。具体的には窒素置換を行った超純水中で V 価のメチルアルソン酸とグルタチオンをモル比 1:4 で一晩反応させることで MADG を調製した。また、窒素置換を行った超純水中で V 価のジメチルアルシン酸とグルタチオンをモル比 1:3 で一晩反応させることで DMAG を調製した。調製した MADG および DMAG の濃度測定を ICP-MS、化学形態の分析を HPLC-ICP-MS を用いて行った。

V価およびIII価の有機ヒ素化合物の曝露による細胞増殖の変化

LX-2細胞においてMADGまたはV価の有機ヒ素化合物であるメチルアルソン酸またはジメチルアルシン酸の曝露を行い細胞増殖の変化をRealTime-Glo™ MT Cell Viability Assayを用いて測定した。MADGに関してはGRX細胞においても曝露を行い、同様の測定を行った。

4. 研究成果

(1) III価の無機ヒ素曝露による肝星細胞における細胞老化の誘導とSASP因子産生の検討

III価の無機ヒ素曝露によって細胞増殖抑制がおこる濃度の検討

亜ヒ酸ナトリウム曝露によって対照群と比較して、LX-2細胞では1 μMの曝露から、GRX細胞では10 μMの曝露から有意に細胞増殖が抑制された。この濃度を参考に以降の解析を行った。

III価の無機ヒ素曝露による細胞老化マーカーおよびSASP因子の遺伝子発現の測定

LX-2細胞において、亜ヒ酸ナトリウム5 μMおよび7.5 μMの72時間曝露によって細胞老化に特徴的な形態学的変化である巨大化や扁平化が観察された。また、細胞老化マーカー*P21*の遺伝子発現の増加、*LAMINB1*の遺伝子発現の減少が観察された。さらにその際、SASP因子として検討した*CXCL1*、*IL-1β*、*IL-8*、*MMP1*、*MMP3*の遺伝子発現量も有意に増加していることが明らかになった。特に*MMP1*、*MMP3*の遺伝子発現の増加は顕著であった。一方、GRX細胞における亜ヒ酸ナトリウム曝露では1 μMから40 μM曝露まで検討を行ったが、細胞老化マーカー*p16*、*p21*の発現増加や*Laminb1*の有意な発現低下は観察されず、*Cxcl1*の発現増加も観察されなかった。このことからLX-2細胞ではIII価の無機ヒ素曝露によって細胞老化が誘導されるが、GRX細胞においては誘導されない可能性が示された。ヒトとマウスの細胞ではIII価の無機ヒ素曝露に対する感受性が異なる可能性が考えられた。

LX-2細胞においてIII価の無機ヒ素曝露によって不可逆的な細胞増殖抑制がおきているかの検討

亜ヒ酸ナトリウム5 μMを72時間曝露後、培地からヒ素を除いて細胞培養を行った結果、細胞増殖の停止が観察された。成長因子が存在する条件下においても細胞増殖がおきないことから、不可逆的な細胞増殖がおきたと考えられ、上記細胞老化マーカーの発現変化の結果とあわせ、LX-2細胞は無機ヒ素曝露によって細胞老化がおきることが明らかになった。

III価の無機ヒ素曝露による細胞老化マーカーおよびSASP因子の遺伝子発現変化は曝露がなくなっても持続するかの検討

LX-2細胞において、亜ヒ酸ナトリウム7.5 μMを144時間曝露した後に、培地からヒ素を除いてさらに120時間培養した細胞においても細胞老化マーカー*P21*の遺伝子発現量は対照群と比較して有意に高く、*LAMINB1*は低かった。また、SASP因子*CXCL1*、*IL-1β*、*IL-8*、*MMP1*、*MMP3*の遺伝子発現量は対照群と比較して有意に高い状態を維持していた。このことから、細胞老化は無機ヒ素曝露がなくなった後も維持され、影響を及ぼし続ける可能性が示された。

(2) III価の無機ヒ素曝露によるLX-2細胞における細胞老化誘導機序の検討

酸化ストレス関連遺伝子の発現量測定

酸化ストレスマーカーとして検討した*HO-1*の遺伝子発現量はヒ素曝露濃度依存的に顕著に増加していた。一方で、抗酸化除去酵素として検討した*SOD1*、*CAT*の遺伝子発現量は減少しておらず、抗酸化能の低下はおきていない可能性が示された。

細胞内活性酸素種(ROS)の測定

DCFH-DAを用いた細胞内ROSの検出では、ポジティブコントロールとして用いた過酸化水素曝露ではROSの増加が検出されたが、亜ヒ酸ナトリウム曝露ではROSは検出されなかった。

抗酸化剤添加によってIII価の無機ヒ素曝露による細胞老化誘導が减弱されるかの検討

TroloxおよびApocyninを事前に培地に添加をしても、亜ヒ酸ナトリウム曝露による細胞老化マーカーの遺伝子発現量の変化および*IL-8*の遺伝子発現量の増加は全く减弱されなかった。

一方で、NAC 10 mMの添加では亜ヒ酸ナトリウム曝露による*LAMINB1*の発現抑制、*IL-8*、*HO-1*の発現増加が减弱された。しかし、*P21*の発現増加は抑制されず、NAC 10 mMの単独曝露においても*P21*の発現増加が観察され細胞増殖の抑制も観察された。また、亜ヒ酸ナトリウム曝露30分前にNAC 10 mMを添加し、培地からNACを除去後、亜ヒ酸ナトリウム曝露を行った場合には、細胞老化に特徴的な形態学的な変化や細胞増殖の抑制は全く减弱されなかった。この結果と上記において亜ヒ酸ナトリウム曝露によって細胞内ROSが検出されなかった結果をあわせて考えると、大過剰のNACの添加は細胞内のROSを除去するのではなく、細胞外で亜ヒ

酸ナトリウムと直接結合することで毒性を減弱させた可能性が高いと考えられた。

以上の結果からⅢ価の無機ヒ素曝露による細胞老化の誘導に活性酸素種は寄与せず、亜ヒ酸ナトリウム曝露によって増加した *HO-1* は酸化ストレス以外の機序で誘導される可能性が示唆された。

DNA 二本鎖切断マーカー γ -H2AX の測定

亜ヒ酸ナトリウムを 72 時間曝露することによって、対照群と比較して 5 μ M から γ -H2AX のタンパク質の増加傾向が観察され、7.5 μ M 曝露で顕著な増加が認められた。また、144 時間曝露では 5 μ M、7.5 μ M とともに顕著な γ -H2AX のタンパク質量の増加が見られた。一方 2 μ M の曝露では γ -H2AX のタンパク質量の増加は観察されなかった。この γ -H2AX の増加と細胞老化マーカーの遺伝子発現変化および SASP 因子の遺伝子発現増加の結果が対応していたことから、DNA 損傷の誘導が細胞老化の誘導に関わっている可能性が考えられた。 γ -H2AX のタンパク質量の増加は亜ヒ酸ナトリウム 7.5 μ M を 72 時間曝露後、培地からヒ素を除いてさらに 72 時間培養した場合にも継続して観察された。このことから DNA 損傷の蓄積が細胞老化および SASP 産生の継続に関わる可能性が考えられた。

(3) 皮膚の線維芽細胞におけるⅢ価の無機ヒ素曝露による細胞老化および SASP 因子の誘導

HFb16d 細胞に亜ヒ酸ナトリウムを曝露すると、5 μ M から細胞増殖の抑制が観察された。また亜ヒ酸ナトリウム 10 μ M を 144 時間曝露することによって細胞老化マーカー *P21* の遺伝子発現量の増加、*LAMINB1* の遺伝子発現量の抑制が観察され、SASP 因子 *CXCL1*、*IL-1 β* 、*IL-8*、*MMP1*、*MMP3* の遺伝子発現量の増加が観察された。LX-2 細胞で見られた結果と同様に特に *MMP1*、*MMP3* の遺伝子発現量の増加は顕著であった。このことから、Ⅲ価の無機ヒ素曝露による線維芽細胞の細胞老化の誘導および SASP 産生の亢進は肝臓に限った現象ではなく、皮膚においてもおこることが示唆された。

(4) V価およびⅢ価の有機ヒ素化合物の曝露による細胞増殖抑制への影響解析

Ⅲ価の有機ヒ素化合物の合成

MADG、DMAG を合成後、加水分解をし HPLC-ICP-MS を用いて化学形態分析を行った結果、MADG 中のヒ素は 90% 以上の割合で MMA (Ⅲ) であり、DMAG 中のヒ素は 85% 程度の割合で DMA (Ⅲ) であった。以降の実験には Ⅲ価の有機ヒ素化合物を高純度を含む MADG を用いて検討を行うことにした。

V価およびⅢ価の有機ヒ素化合物の曝露による細胞増殖の変化

LX-2 細胞においてV価の有機ヒ素化合物であるメチルアルソン酸またはジメチルアルシン酸の曝露を行った結果、メチルアルソン酸は 10 mM 以上、ジメチルアルシン酸は検討した最大濃度の 100 mM において細胞増殖の抑制が観察された。この濃度はⅢ価の無機ヒ素曝露の増殖抑制が見られた濃度よりも 1000 倍以上高い濃度であった。

一方 LX-2 細胞に MADG の曝露を行った結果、MMA (Ⅲ) 濃度 100 nM から細胞増殖の抑制が観察された。GRX 細胞へ MADG を曝露した場合は MMA (Ⅲ) 濃度 1 μ M の曝露から細胞増殖の抑制が観察された。このことから、V価の有機ヒ素化合物はⅢ価の無機ヒ素化合物と比較して細胞増殖抑制の誘導能が低く、Ⅲ価の有機ヒ素化合物はⅢ価の無機ヒ素化合物と比較して 10 倍程度細胞増殖抑制の誘導能が高いことが観察された。

(5) まとめ

本研究では、慢性ヒ素中毒による発癌メカニズムとして線維芽細胞の細胞老化を介した SASP 因子の産生が関与するか検討を行った。その結果、Ⅲ価の無機ヒ素である亜ヒ酸ナトリウムをヒト由来の肝星細胞の細胞株に曝露することによって細胞老化が誘導され SASP 因子が亢進されることを明らかにした。またその誘導は DNA 損傷が関与している可能性を見出した。この影響は曝露がなくなっても継続していたことから、長期の潜伏期間を経ておこるヒ素曝露による発癌メカニズムとして細胞老化の誘導および SASP 因子の亢進が関与する可能性を明らかにした。また、肝臓由来の線維芽細胞のみならず、皮膚由来の線維芽細胞においても同様の変化が認められたことから、線維芽細胞の細胞老化誘導と SASP 因子の亢進は様々な臓器で誘導されるヒ素の発癌に重要なメカニズムである可能性が考えられた。Ⅲ価の無機ヒ素曝露がどのようにして DNA 損傷を誘導するのか、Ⅲ価の有機ヒ素化合物の曝露が細胞老化を誘導するのか、ヒト由来とマウス由来の細胞における感受性の違いに関しては今後さらなる検討が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村和幸、野原恵子
2. 発表標題 無機ヒ素曝露による肝星細胞の細胞老化誘導を介した肝上皮細胞の増殖亢進
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 岡村和幸、野原恵子
2. 発表標題 TGF-beta曝露はヒト肝上皮細胞の細胞株において細胞老化とSASPを誘導するが星細胞の細胞株LX-2では誘導しない
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡村和幸、鈴木武博、野原恵子
2. 発表標題 無機ヒ素曝露によるヒト肝星細胞の細胞老化誘導に酸化ストレスは寄与しない
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 岡村和幸、鈴木武博、野原恵子
2. 発表標題 無機ヒ素曝露によって誘導されたヒト肝星細胞LX-2の細胞老化ではSASP因子が増加し、曝露を中止しても高発現が維持される
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 弥生 (Kobayashi Yayoi) (00391102)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員 (82101)	
研究協力者	鈴木 武博 (Suzuki Takehiro) (60425494)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員 (82101)	
研究協力者	野原 恵子 (Nohara Keiko) (50160271)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー (82101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------