

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19791049
研究課題名 (和文) 骨細胞の三次元培養実験系を用いた骨リモデリング開始メカニズムの 解明
研究課題名 (英文) Study on the initiation mechanism of bone remodeling by using three-dimensional gel-embedded osteocyte culture
研究代表者 藏田 耕作 (KURATA KOSAKU) 九州産業大学・工学部・准教授 研究者番号：00368870

研究成果の概要：

疲労亀裂に起因した骨リモデリング開始メカニズムに関して、三次元ゲル包埋培養した骨細胞を用いて研究を行った。その結果、骨基質中に形成されている骨細胞ネットワークが疲労亀裂によって損傷を受け、骨細胞のネクローシスおよび周辺骨細胞のアポトーシスを誘導すること、細胞死の増加に依存して破骨細胞分化因子の産生が増すこと、ギャップジャンクションによる細胞間情報伝達が骨細胞の抗アポトーシスに影響し、骨リモデリング範囲の決定に影響を与えることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝学，骨細胞，ネットワーク，疲労亀裂，再構築

1. 研究開始当初の背景

生体骨組織は体幹支持や運動に伴う荷重に常にさらされており、この荷重に対して力学的に最適な形態・構造となるように、骨リモデリング（再構築）が行われている。大型哺乳動物の骨で行われているリモデリングでは、骨吸収が先行し、吸収された部位に骨形成が続いて起こるといった代謝様式をとる。ところが、骨リモデリングの発生部位、つまり骨吸収の開始部位がいかんして決定されるのか明白でない。従来、骨吸収開始部位は

ランダムに決められる、あるいは化学的因子によって決められるという説が大勢であった。さらに、先述のように骨は周囲の荷重環境に対して力学的に最適な形態・構造を示していることから、多くの研究者たち、特に工学系研究者たちは機械的刺激と骨の吸収・形成との関係に注目した。つまり、骨の中で荷重が大きく働く部位では骨形成による骨の増強が、荷重が働かない部位では骨吸収による骨基質の除去が生じるというモデルを構築した。このモデルは骨で生じる現象をマク

ロな面によく表現しており、工学的な解析手法である有限要素法によって骨形態と応力分布との関係を容易に可視化できることから、盛んに研究が行われている。このような種々の骨リモデリングモデルが発表されているが、骨吸収・骨形成を実際に担うミクロな細胞の機能変化とマクロに現れてくる骨リモデリングと関連性については不明なままである。

骨細胞の力学応答については、Klein-Nulend (オランダ) や Noble (イギリス) のグループなどが多くのデータを発表している。しかしながら、これらは力学的刺激に対する骨細胞そのものの機能や活性の変化を報告するものばかりであり、骨細胞が骨リモデリングの中で重要な働きを担っていると示唆しながらも具体的なものではなかった。一方、形態学的観察をもとにして、骨基質に見られる微小な亀裂と破骨細胞による骨吸収との関連性を指摘する報告が散見される (Verborgt et al., 2000; Burr, 2002 など)。しかしながら、骨リモデリングの開始、すなわち破骨細胞による骨吸収開始のメカニズムについては骨細胞の関連を推察するにとどまっていた。

2. 研究の目的

本研究では、「骨基質中に大量に分布している骨細胞のネットワークこそが骨代謝の制御を決定する重要な因子である」という知見に基づき、疲労亀裂に起因した骨リモデリング開始メカニズムに関して実験・考察を行うことによって、骨リモデリングにおける骨細胞の役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、下記の研究計画 (1) ~ (3) を遂行した。

(1) 骨細胞ネットワークによる疲労亀裂のセンシングメカニズムの解明

繰り返し負荷によって骨基質に疲労亀裂が生じる際、骨細胞ネットワークがいかなる損傷を受けるのか、いかに亀裂箇所を検知するのかを明らかにした。

(2) 骨細胞ネットワークに対する損傷が骨細胞のタンパク質発現に与える影響の解明

繰り返し負荷によって損傷を受けた骨細胞において、タンパク質の発現がいかに変化するのかを明らかにした。

(3) 骨細胞による破骨細胞の分化誘導メカニズムの解明

骨細胞の機能が変化した結果、骨リモデリングの開始を意味する破骨細胞の分化誘導がいかに亢進・抑制されるのかを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞ネットワークによる疲労亀裂のセンシングメカニズムの解明

実験には、Kato ら (Kato et al., 1997) によって確立されたマウス長管骨由来骨細胞樹立株 MLO-Y4 細胞を用いた。ラット尾腱由来 I 型コラーゲン (Rat tail collagen type I, BD Biosciences) によりコラーゲンコーティングした $\phi 35\text{mm}$ カルチャープレート上に MLO-Y4 細胞を播種し、細胞間ネットワークが形成されるまで 3~4 日培養した。培養には 2.5%FBS, 2.5%iCS, 1%antibiotics を添加した α -MEM を用いた。次に、位相差顕微鏡下においてマイクロニードル (GD-1, Narishige) を用いながら、骨細胞に対して長さ約 1.5mm のスクラッチを与えた (図 1)。スクラッチを与えてから 3 時間培養後、細胞の生存アッセイを行うために MitoPT (Mitochondrial Membrane Permeability Transition Detection Kit, Immunochemistry Technologies) を用いて蛍光染色した。この染色によって、健康な細胞では JC-1 がミトコンドリアに凝集して赤色蛍光を発し、アポトーシスの始まった細胞ではミトコンドリア膜電位が消失して JC-1 が細胞内に分散するために緑色蛍光を発する。染色後、スクラッチ周辺の細胞を蛍光顕微鏡で観察するとともに画像撮影を行った。さらに、 $0.25\text{mm} \times 0.50\text{mm}$ の ROI (Region of interest) を設定し、スクラッチを起点にしてこの ROI を遠方に移動させながら、生細胞およびミトコンドリア膜電位を消失した細胞数の計測をそれぞれ行った。

実験では、スクラッチを与えない Control 群、スクラッチを与える Scratch 群を用意した。さらに骨細胞間の情報伝達を阻害するために、スクラッチ付与の 1 時間前から 3mM ヘプタノールを添加してギャップジャンクションをブロックした Scratch+hept 群を用意した。

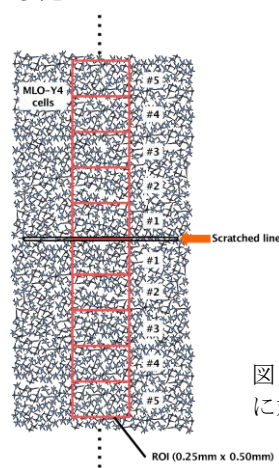


図 1 骨細胞ネットワークに対するスクラッチ

(2) 骨細胞ネットワークに対する損傷が骨細胞のタンパク質発現に与える影響の解明

三次元ゲル包埋した骨細胞に繰り返し伸張ひずみ刺激を与えるため、シリコンゴム (SILGARD 184, World Precision Instruments) を用いてシリコン培養ウェルを作製した (図 2)。

シリコン培養ウェルは 10 個の培養ウェル (8mm x 17mm x 10mm) が 1 列に並んだ構造をしており、中央から両端に向かってウェル壁の断面積を 10% ずつ減じている。そのため両端を把持して伸張を与えると、中央部を対称にウェル 1 からウェル 5 まで、理論的には 10% ずつ増加するひずみを負荷することができる。さらに、ウェル断面における断面二次モーメントの中立軸が両端に設置したロッドの中心と一致していることにより、伸張に伴うシリコン培養ウェルの曲がりやねじれを避けることができる。

次に、作製したシリコン培養ウェルに伸張ひずみを発生させる伸張刺激負荷装置の開発を行った (図 3)。ボールねじに連動して可動するステージにシリコン培養ウェルのロッドを固定し、ステッピングモータによって往復運動させることにより伸張負荷を与えた。ステッピングモータの制御は PIC による発生パルスをもータドライバに入力して行い、プログラム書き換えによって負荷ひずみ量および周波数を設定できるようにした。

生体内における骨細胞の環境を模擬するために MLO-Y4 細胞を三次元ゲル包埋培養した。予めシリコン培養ウェルに Cellmatrix Type I-A (Nitta Gelatin) より調製した中性コラーゲン溶液 100 μ l を流し込み、ベースレイヤーを作った。次に MLO-Y4 細胞を中性コラーゲン溶液 200 μ l と Matrigel (BD Biosciences) 200 μ l の混合溶液中に分散 (2×10^5 cells/ml of gel) させ、シリコンウェルに播種した。37°C

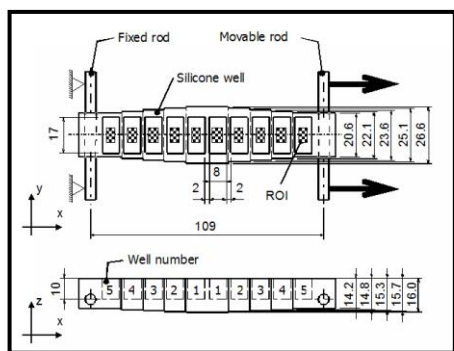


図 2 シリコン培養ウェル

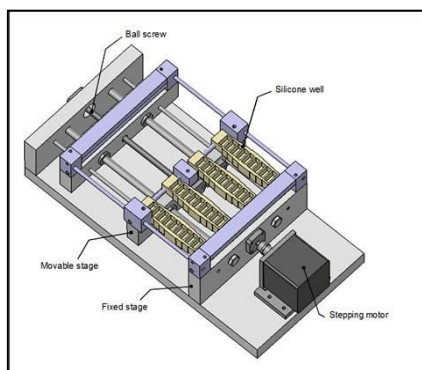


図 3 伸張刺激負荷装置

にて 15 分間加温してゲルを固化させた後、培養液を 400 μ l 加え、インキュベータ内で培養を行った。なお、本培養には 5%FBS, 5%*i*CS, 1% antibiotics を添加した α -MEM を用いた。

実験に先立ち、シリコン培養ウェルに変位を与えて骨細胞間に生じるひずみ量の検定を行った。細胞間ネットワークを形成するまで培養した MLO-Y4 細胞の核を Hoechst33258 (Dojindo) にて染色した。顕微鏡 (IX 71, Olympus) のステージ上でジグを用いて可動側ロッドに変位を与え、一定変位ごとに CCD カメラで細胞分布の撮影を行った。個々の細胞の変位を同定し、これを元に細胞間に生じたひずみを算出した。

繰り返し伸張刺激が骨細胞の生存に与える影響を調べるため、刺激負荷後のゲル包埋骨細胞を 2 μ M ethidium homodimer -1 (EthD-1) で染色し、死細胞の分布を観察するとともに計数した。伸張刺激の条件は、933 μ ε, 1780 μ ε, 2240 μ ε, 2640 μ ε, 3000 μ ε, 4670 μ ε, 8890 μ ε, 11200 μ ε, 13200 μ ε, 15000 μ ε の 10 パターンであり、周波数 2Hz, 負荷時間 24 時間とした。さらに骨細胞間の情報伝達を阻害するために 3mM ヘプタノールを添加してギャップジャンクションをブロックした Stretched+hept 群および無負荷の Control 群を用意した。

培養液上清に含まれる破骨細胞分化因子を同定するために、M-CSF および RANKL の産生量について ELISA 法による定量を行った。伸張刺激の条件は 10000 μ ε, 2Hz とし、24 時間の伸張刺激終了後の培養液上清を採取して定量した。

繰り返し伸張刺激による機械的損傷が骨細胞のタンパク質産生に与える影響を調べるため、タンパク質アレイによる分析を行った。ゲル包埋培養した MLO-Y4 細胞に対して 4000 μ ε あるいは 10000 μ ε の繰り返し伸張刺激を与える群、3mM ヘプタノールを添加してギャップジャンクションをブロックして 4000 μ ε あるいは 10000 μ ε の繰り返し伸張刺激を与える群、それぞれの無負荷群、ゲル包埋培養した線維芽細胞 NIH3T3 細胞に対して 10000 μ ε の繰り返し伸張刺激を与える群およびその無負荷群の計 8 群を準備し、2Hz, 24 時間の伸張刺激終了後に培養液上清を採取した。116 タンパク質がスポットされたアレイ (Mouse Protein Array G series, RayBio) を用いて、タンパク質産生量の比較を行った。

(3) 骨細胞による破骨細胞の分化誘導メカニズムの解明

繰り返し伸張刺激による骨細胞ネットワークの損傷が骨リモデリングに与える影響を調べるために、培養液上清を用いて骨髄細胞の培養を行った。破骨細胞の分化実験には、8~12 週齢の雄 ICR マウス (日本クレア) 長管骨より非付着性の未分化骨髄細胞を採取

して用いた。骨芽細胞の活性を評価する実験には、同様に採取した骨髄細胞を 10^{-8} M dexamethasone, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 μ M β -glycerophosphate 存在下で1週間培養したものを骨芽細胞として用いた。2Hz, 24時間の伸張刺激を与えた骨細胞のゲル包埋培養から培養液上清を得て、これを20%添加した培養液で骨髄細胞および骨芽細胞を培養した。1週間の培養後、細胞溶解物に含まれるTRACPおよびALPを、p-nitrophenylphosphateを発色基質に用いた方法によってそれぞれ定量した。なお、骨細胞間の情報伝達を阻害するために3mMヘプタノールを添加してギャップジャンクションをブロックしたStretched+hept群および無負荷のControl群を用意した。

4. 研究成果

(1) 骨細胞ネットワークによる疲労亀裂のセンシングメカニズムの解明

単層培養骨細胞に対しマイクロニードルによるスクラッチを与えて3時間後、MitoPTによって蛍光染色した結果を図4に示す。また、得られた蛍光画像においてミトコンドリア膜電位消失細胞の数を計数し、スクラッチ跡からの距離によって整理した結果を図5に示す。Control群ではミトコンドリア膜電位消失細胞の割合は小さく、その分布はほぼ一様であった。Scratched群ではスクラッチ跡から約0.125mmまでの領域でミトコンドリア膜電位消失細胞の割合が有意に増加していたが、それよりも遠方では割合が減少し、Control群と変わらなくなった。一方、Scratched+Hept群でもScratched群と同様に、

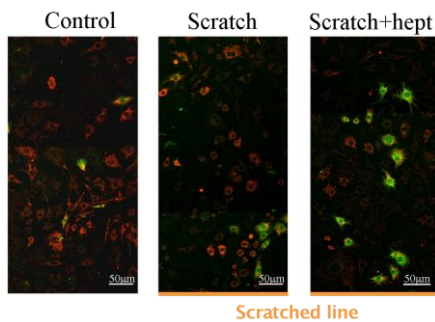


図4 スクラッチ周辺の骨細胞の生存

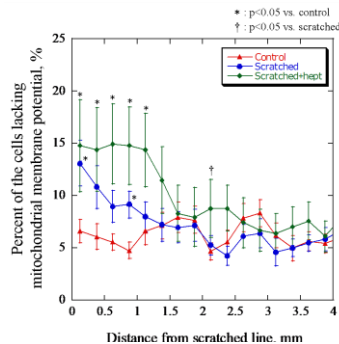


図5 ミトコンドリア膜電位消失細胞の分布

スクラッチ跡近傍においてミトコンドリア膜電位消失細胞が有意に増加していた。スクラッチの影響はより広範囲であり、ミトコンドリア膜電位消失細胞の割合が有意に増加した領域はスクラッチ跡より遠方約1.125mmにまで及んでいた。

本実験から、局所的な機械的ダメージの影響が周囲の骨細胞に伝播してアポトーシスを誘導することが明らかになった。さらに、このアポトーシスの伝播がギャップジャンクションのブロックによって広範囲にまで及ぶようになること、つまりギャップジャンクションによる細胞間情報伝達が抗アポトーシス作用に関連して骨細胞の生存に関わっていることが示唆された。骨基質におけるマイクロダメージの発生は骨細胞の細胞膜を損傷させるなどのネクローシ的な様式によって骨細胞死を誘発するが、その周辺には骨細胞のアポトーシスが広がっており、これらが局所的な骨リモデリング開始、つまりtargeted remodeling開始のシグナルとしての役割を果たしている可能性が高い。さらにアポトーシス細胞の周辺にはアポトーシスに抗する骨細胞が分布しており、これはリモデリングが行われる範囲を制限あるいは規定する役割を果たしている可能性がある。

(2) 骨細胞ネットワークに対する損傷が骨細胞のタンパク質発現に与える影響の解明

シリコン培養ウェルに発生する引張軸方向(x方向)およびそれと直角方向(y方向)の骨細胞間ひずみは、すべてのウェルにおいて、ロッドの変位と線形の関係が見られた(グラフ省略)。

三次元ゲル包埋培養した骨細胞に繰り返し伸張刺激を負荷し、EthD-1染色して死細胞を計数した結果を図6に示す。Stretched群においては、約4600 μ mまでのひずみ範囲では死細胞数に有意差は認められなかった。一般的に非生理的といわれる 100μ mを超える範囲では、死細胞数の有意な増加が確認された。Stretched+hept群では、Stretched群と同じようにひずみ量がある値を超えると死細胞数が増加したが、その閾値はStretched群よりも低く、約4600 μ mであった。さらに、ひずみの増加とともに死細胞の割合は増加したが、その増加の程度はStretched群よりも大きかった。なお、生細胞数はいずれの伸張刺激条件でも

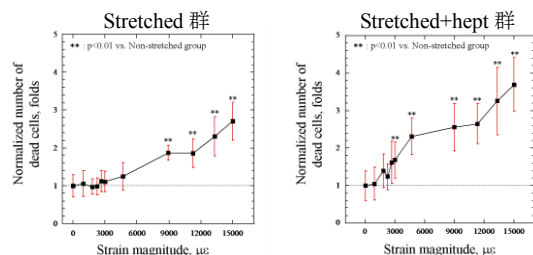


図6 細胞間ひずみと死細胞数の関係

有意差はなく、この培養時間内においては伸張刺激が細胞増殖性へ与える影響は無視できることが分かった。

培養液上清に含まれる M-CSF および RANKL を ELISA 法によって定量した結果を図 7 に示す。M-CSF の産生に関しては、無負荷群と比較して Stretched 群の方が増加傾向にあったが有意差はなかった。一方、RANKL に関しては、Stretched 群において産生の有意な亢進が認められた。

培養液中に分泌されたタンパク質を 116 タンパク質がスポットされたアレイによって分析したところ、Fcr RIIB, Fractalkine, GITR, HGF-R, ICAM-2, IL-11, IL-3Rb, L-Selectin, SDF-1 alpha, Shh-N, TARC, TCA-5, TECK, Thymnsck-1, Timp-1, TNF alpha, TNF-RI, TNF RII, TPO, TRANCE, TREM-1, TROY の 22 個のタンパク質について変化が認められた(グラフ省略)。

(3) 骨細胞による破骨細胞の分化誘導メカニズムの解明

繰り返し伸張刺激を与えた骨細胞の培養液上清で未分化骨髄細胞を培養し、TRACP 活性を評価した結果を図 8 に示す。約 9000 $\mu\epsilon$ に閾値があり、これを超えるひずみ条件によ

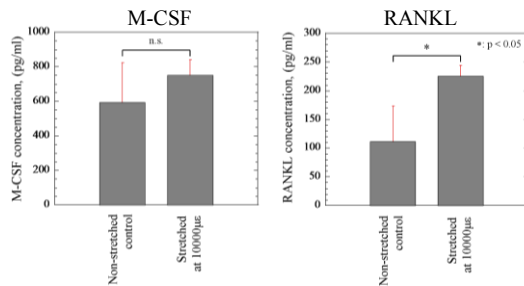


図 7 M-CSF と RANKL の産生

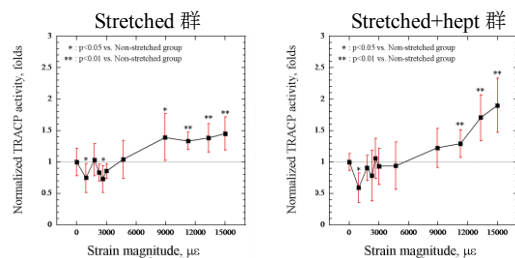


図 8 骨細胞培養液上清で培養した骨髄細胞の TRACP 活性

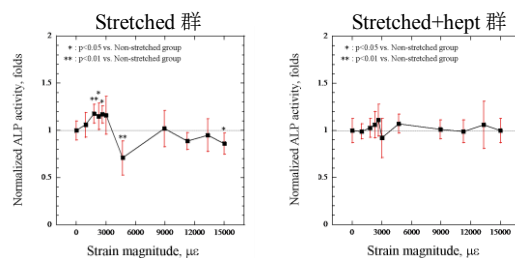


図 9 骨細胞培養液上清で培養した骨髄細胞の ALP 活性

って得た培養液上清では TRACP 活性の有意な上昇を認めた。閾値を超えてしまった条件間では TRACP 活性の上昇具合に有意差はなかった。ギャップジャンクションをブロックした Stretched+hept 群でも、同じく約 9000 $\mu\epsilon$ を閾値として TRACP 活性が上昇した。閾値を超えた条件でも、ひずみ量に依存して TRACP 活性が増加し続けていた。骨細胞の培養液上清で骨芽細胞を培養し、ALP 活性を評価した結果を図 9 に示す。2000~3000 $\mu\epsilon$ のひずみ量では ALP 活性の有意な上昇が見られたが、それを超えた条件では有意な減少に転じていた。ギャップジャンクションをブロックした Stretched+hept 群では、いずれの条件間においても有意差は認められなかった。

本実験では、9000 $\mu\epsilon$ 以下のひずみ量では死細胞の割合に有意差は見られなかった。TRACP 活性においても、同範囲のひずみ量では無負荷の Control 群と有意差はなかった。ところが、約 9000 $\mu\epsilon$ を超えるひずみ量では死細胞数が増加し、骨細胞が機械的損傷を受けたことを示していた。さらに、培養液上清を添加された骨髄細胞が破骨細胞様細胞へ分化したことは、過度の伸張刺激によって骨細胞にマイクロダメージが与えられ、破骨細胞分化因子が産生されることを意味する。Lee ら (2002) は、マイクロダメージの発生部位と骨吸収窩の位置が一致することを骨の薄切標本の形態学的観察によって明らかにした。マイクロダメージと骨吸収窩の関係に関する過去の報告を考慮すると、本研究で得た結果は、機械的刺激を受けた骨細胞が骨吸収を開始させる引き金としての役割を担っていることを示唆する。

骨の中で大多数を占める骨細胞は細胞間ネットワークを介してシグナル伝達を行える機構を有しており、骨への適度な機械的刺激により骨細胞の機能維持、ならびに骨量の維持や増強を行っていると考えられる。このネットワークは常に骨に生じるひずみを感じており、閾値を超えた過度のひずみによって損傷を受ける。さらにこの損傷によって骨細胞死が生じることで骨リモデリングの対象領域が決定されるとともに、破骨細胞の分化誘導が行われる。日常生活の中で骨基質に生じる微小亀裂は骨質の低下を招くものであるから、この微小亀裂をターゲットにした骨リモデリングの開始機序は理にかなっており、骨の健康維持のために不可欠であるといえる。

骨細胞の機能と骨吸収開始との関係の重要性は臨床的にも指摘がなされている。長期臥床や微小重力環境下での骨の不動は骨吸収の亢進をもたらす、廃用性骨粗鬆症を招く。また、関節リウマチや喘息の治療に用いられる副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドは、副作用として骨粗鬆症を引き起こす

ことが問題となっている。このグルコルチコイドは、*in vitro*において骨細胞死を引き起こすことが報告されている (L.I. Plotkin *et al.*, 1999)。本研究で明らかとなった骨細胞死と骨吸収開始の関連を適用すれば、前者では骨の不動によって低酸素状態におかれた骨細胞が細胞死して骨吸収を亢進させ、後者ではグルコルチコイドによる骨細胞死が骨吸収を亢進させていると説明できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① S. Imai, T.J. Heino, A. Hienola, K. Kurata, K. Buki, Y. Matsusue, H.K. Väänänen, H. Rauvala, Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading, *Bone*, 44(5): 785-794, 2009, 査読有り。
- ② 藏田耕作, 福永鷹信, 日垣秀彦, 骨細胞と力学応答, *運動・物理療法*, 19(3): 184-191, 2008, 査読有り。
- ③ Takanobu Fukunaga, Kosaku Kurata, Junpei Matsuda, Hidehiko Higaki, Effects of strain magnitude on mechanical responses of three-dimensional gel-embedded osteocytes studied with a novel 10-well elastic chamber, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 3(1):13-24, 2008, 査読有り。
- ④ Kosaku Kurata and H. Kalervo Väänänen, The role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling, 九州産業大学工学部研究報告, 第 44 号, 325-330, 2007, 査読無し。
- ⑤ Kosaku Kurata, Hiroyasu Taniguchi, Takanobu Fukunaga, Junpei Matsuda, Hidehiko Higaki, Development of a compact microbubble generator and its usefulness for three-dimensional osteoblastic cell culture, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2(4):166-177, 2007, 査読有り。
- ⑥ Guoliang Gu, Kosaku Kurata, Zhi Chen and Kalervo H. Väänänen, Osteocyte: a cellular basis for mechanotransduction in bone, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2(4):150-165, 2007, 査読有り。
- ⑦ Kosaku Kurata, Takanobu Fukunaga, Junpei Matsuda, Hidehiko Higaki, Role of mechanically damaged osteocytes in the initial phase of bone remodeling, *International Journal of Fatigue*, 29(6): 1010-1018, 2007, 査読有り。

[学会発表] (計 11 件)

- ① 米徳一博, 繰り返し刺激による疲労亀裂

に対する骨細胞の力学応答, 日本機械学会九州学生会第 40 回卒業研究発表講演会, 2009 年 3 月 9 日, 福岡。

- ② 中村彬洋, 繰り返し荷重によるマウス脛骨部への微小亀裂誘導装置の開発, 日本機械学会九州学生会第 40 回卒業研究発表講演会, 2009 年 3 月 9 日, 福岡。
- ③ 松野充, マウス脛骨部への繰り返し荷重が骨形成量に与える影響, 日本機械学会九州学生会第 40 回卒業研究発表講演会, 2009 年 3 月 9 日, 福岡。
- ④ 藏田耕作, マイクロダメージを受けた骨細胞ネットワークの力学応答, 第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 2009 年 1 月 23 日, 札幌。
- ⑤ 福永鷹信, 疲労亀裂に起因する骨リモデリングにおいて骨細胞ネットワークが果たす役割, 第 28 回日本骨形態計測学会, 2008 年 7 月 26 日, 東京。
- ⑥ T. Fukunaga, Tartrate-resistant acid phosphatase-positive cell differentiation influenced by over-physiological stretched osteocytes, Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2007 年 11 月 6 日, 東京。
- ⑦ K. Kurata, Effects of microbubble-induced hyperoxia on alkaline phosphatase activity in three-dimensional osteoblast culture, Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2007 年 11 月 6 日, 東京。
- ⑧ 福永鷹信, 骨細胞間に発生する生理的・非生理的ひずみが骨芽細胞の ALP 活性に与える影響, 第 18 回バイオフロンティア講演会, 2007 年 10 月 7 日, 福岡。
- ⑨ 福永鷹信, 生理的・非生理的ひずみ範囲の伸張刺激に対する骨細胞の力学応答, 日本機械学会 2007 年度年次大会, 2007 年 9 月 10 日, 大阪。
- ⑩ 松田純平, 細胞間ネットワークの抑制が多方向重力環境下の骨細胞に及ぼす影響, 日本機械学会 2007 年度年次大会, 2007 年 9 月 10 日, 大阪。
- ⑪ 藏田耕作, 骨リモデリング開始を決める骨細胞の力学応答, 第 19 回日本運動器リハビリテーション学会, 2007 年 7 月 7 日, 軽井沢。

6. 研究組織

(1)研究代表者

藏田耕作 (KURATA KOSAKU)

九州産業大学・工学部・准教授

研究者番号：00368870