

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07174

研究課題名(和文)脳梗塞における神経血管ユニット保護療法を指向した核酸搭載ナノバブルの開発

研究課題名(英文)Development of nucleic acid-loaded nanobubbles for the neurovascular unit protection from cerebral ischemia

研究代表者

高橋 葉子(遠藤葉子)(Yoko, Endo-Takahashi)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30453806

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):脳梗塞治療において、神経血管ユニット(NVU)と称される血管系・神経系両者の細胞の保護が重要と考えられている。本研究では、核酸医薬による脳梗塞治療への応用を目指し、脳の微小血管を介してNVUへと到達可能な核酸搭載超音波応答性ナノバブルの開発を行った。ナノバブル表面への核酸搭載技術として、多糖類コーティングの有用性を示し、核酸の安定性向上、超音波併用による核酸導入の効率化、高速攪拌(ミキシング)によるナノバブルのサイズ制御(平均粒子径減少と均一性向上)に成功した。これらは、全身投与を介したNVUへの核酸デリバリーに有用なナノバブル開発における基盤技術となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において開発した多糖類コーティングによる核酸搭載技術は、生体内で安定性の高いアニオン性ナノバブルへ負電荷を有する核酸を搭載可能なものであり、全身投与を介した核酸治療において、標的組織や核酸の配列によらず応用可能な汎用性の高い技術と言える。また、ミキシングによるサイズ制御は、脳梗塞のみならず、微小血管を有する虚血性疾患、がんなどの核酸治療においても、標的エリアへの到達性を高める重要な技術である。本ナノバブルは超音波造影能も有していることから、これら技術の融合により、中枢神経系疾患を含め種々の疾患へ応用可能な超音波診断治療システムの構築へ繋がることから、大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文): In the treatment of cerebral infarction, it is important to protect both vascular and nervous system cells, called the neurovascular unit (NVU). In this study, we attempted to develop ultrasound-responsive and nucleic acid-loaded nanobubbles that can reach the NVU via microvessels as nucleic acid delivery tools. We demonstrated that the coating on the surface of nanobubbles with polysaccharides were useful for loading nucleic acids, resulting in improved nucleic acid stability and efficient nucleic acid delivery in combination with ultrasound. Furthermore, we also succeeded in controlling the size of nanobubbles by high-speed agitation, termed mixing, and achieved decreasing average particle size and improving uniformity. These results serve as fundamental technologies in the development of nanobubbles useful for nucleic acid delivery to NVU via systemic administration.

研究分野：薬剤学 ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ナノバブル 多糖類コーティング 超音波 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、本邦での主要な死因である脳血管障害の約 6 割を占める疾患である。超急性期の血栓溶解療法や血管内治療の進歩により死亡率は低下しているものの、これら治療法は適用症例に制限があり、出血の合併症も懸念される。また、後遺症の可能性も高く、早期血流再開とともに神経細胞の保護が重要視されている。近年では、神経細胞、脳血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトなどを含めた神経血管ユニット (Neurovascular unit; NVU) という概念が確立され、神経細胞の機能維持のためには、密接に相互作用する NVU 全体を保護することが有用と考えられている。このような背景のもと、脳梗塞に対する遺伝子治療の基礎研究も進められているが、脳組織の NVU への効率的なデリバリーツール開発が必須とされている。

これまでに申請者らは、超音波造影ガスをリポソームに封入したナノサイズのパブル製剤を開発し、体外からの超音波照射と併用することで、超音波造影のみならず、低侵襲的な遺伝子および核酸の導入ツールとなり得ることを示してきた。これは、超音波に反応してナノパブルが崩壊し、その際に生じるマイクロジェット流を駆動力に、瞬時に遺伝子・核酸を細胞内へ導入可能な方法である。さらに、カチオン性脂質を用い、その表面に遺伝子や核酸を搭載可能なナノパブルの開発に成功している。これにより、全身投与においても核酸の安定化とそれに伴う導入の効率化が可能となり、実際に、下肢虚血モデルマウスにおける治療効果が得られることを明らかにしている。また、ナノパブルと超音波照射の併用により血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) 透過性を一時的に亢進可能であることを明らかにしたほか、脳組織へ集積性を有するペプチド (Angiopep-2; Ang2) で修飾したナノパブルの開発にも成功しており、これらは脳組織への核酸デリバリーの基盤技術となり得るものといえる。また一方で、カチオン性脂質含有ナノパブルと比較して、生体内で安定性の高いアニオン性脂質含有ナノパブルの開発にも成功している。生体内での安定性、ガス保持能が高ければ、超音波造影効果の向上はもちろんのこと、導入の駆動力としての機能性向上も期待される。そこでこれらの技術を融合し、安定な核酸搭載ナノパブルを開発し、さらにサイズ制御も試みることで、NVU 各細胞へ到達可能なものでできれば、全身投与による中枢神経系細胞への核酸導入効率の向上、脳梗塞の核酸治療における有用なキャリア開発に繋がるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに超音波造影と遺伝子導入のツールとしての有用性、および生体内での安定性を示してきたアニオン性脂質含有超音波応答性ナノパブルに、核酸の搭載、サイズ制御を試み、脳梗塞発症時の破綻した BBB を透過し、NVU 各細胞へアクセス可能なナノパブル開発を目指す。体外からの超音波照射と併用した核酸導入に伴い、低侵襲的に NVU の保護を可能とする新規脳梗塞治療システムの基盤構築に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 核酸・遺伝子搭載ナノパブルの調製

アニオン性脂質含有ナノパブルの調製

逆相蒸発 (REV) 法にて、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG_{2k}) を種々の組成比で用いてリポソームを調製した。調製した各リポソームに超音波造影ガス (パーフルオロプロパン) を封入することで、アニオン性ナノパブル (NBs) とした。その粒子径およびゼータ電位は、それぞれ Nanosight (NS500) およびゼータサイザー ナノ ZSP を用いて測定した。

ナノパブルへの多糖類コーティングと核酸・遺伝子搭載

NBs に多糖類の一種であるメチルグリコールキトサン (MGC) を少量ずつ添加することで、多糖類コーティングナノパブル (MGC-NBs) とした。MGC-NBs に FITC 標識 miRNA、あるいは YOYO-1 標識 pDNA を添加・混合後、調製 Buffer で希釈し、フローサイトメトリーにより搭載を評価した。

ミキシング NBs の調製

により調製した NBs を Amalgamator (TECHNO TP-103, Goldsmith & Revere, Inc.) で一定時間高速攪拌したものをミキシング NBs とした。

(2) NBs の超音波造影効果

リポソームへの造影ガス封入確認 (in vitro における超音波造影効果)

NBs の懸濁液を 6 well プレートに添加し、超音波造影装置 (50 MHz, B-mode) (NP60R-UBM; NEPA GENE, CO. LTD) を用いて超音波イメージングを行うことで、ガスの封入・保持を評価した。

In vivo におけるナノパブルの超音波造影効果

超音波造影剤としての有用性について検討するため、ICR マウス (5 週齢、) の尾静脈より各種 NBs を投与し、超音波診断装置 Aplio (東芝) を用いて心臓の超音波イメージングを行った。

(3) MGC-NBsによるmiRNA, pDNA細胞内導入効果

ヒト子宮頸がん上皮細胞 (HeLa) への miRNA (miR-126) および pDNA (pcDNA3-luc) の導入を行った。48well プレートに HeLa を播種し、1 日培養後、miRNA あるいは pDNA を搭載させた MGC-NBs を 10% FCS 含有培地で希釈、混合し、各 well に添加した。その後、速やかに超音波照射 (Frequency: 2 MHz, Duty: 50%, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity: 2.0 W/cm², Time: 10 sec.) (SONOPORE KTAC-3000; NEPA GENE, CO. LTD) を行った。無血清培地にて細胞を 2 回洗浄し、余剰の NBs と miRNA・pDNA を除去した。2 日間培養後に細胞を回収し、リアルタイム PCR により細胞内の miR-126 レベルについて、Luciferase assay により pDNA 導入効果について検討した。導入に伴う細胞傷害性について、Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。

(4) MGC-NBs への搭載核酸の血清存在下における安定性評価

miRNA と NBs の混合溶液、あるいは miRNA 搭載 MGC-NBs を 50% 血清存在下で 1 時間 37 °C インキュベーションし、SDS を添加した後、15% アクリルアミド電気泳動により、核酸の安定性を評価した。

(5) ミキシング NBs による脳における機能性評価

In vivo における超音波造影剤としての有用性について検討するため、ICR マウス (5 weeks, male) の尾静脈より各種 NBs を投与し、超音波診断装置 Aplio (東芝), 7.5 MHz のプローブを用いて脳の超音波イメージングを行った。

さらにミキシング NBs による BBB 透過性向上が可能か否か評価するため、ICR マウス (5 weeks, male) の尾静脈より Evans blue を投与し、5 分後にミキシング NBs を尾静脈より投与、その直後に集束超音波 (1 MHz) の照射を行った。1 時間後に PBS により灌流し、脳組織を摘出し EB の漏出の有無を観察した。

(6) 担癌モデルを用いた微小血管を介した MGC-NBs 投与による核酸導入の有用性評価

Balb/c nu/nu マウス (6 weeks, female) に対し、MDA-MB-231 細胞を 5x10⁶ 個皮下へ移植し、腫瘍サイズが 50 mm³ に達したマウスから治療を開始した。治療においては、担癌モデルマウス尾静脈より miRNA (miR-145) 搭載 MGC-NBs (NBs: 120 μg, miRNA: 20 μg) を 1 日おきに 5 回投与し、腫瘍径を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) アニオン性 NBs へのカチオン性多糖類コーティングと核酸搭載

アニオン性 NBs (DPPG:PEG2k=92:8) の表面をカチオン性高分子である多糖類の一種 MGC によりコーティングすることで、負電荷を有する核酸・遺伝子を搭載が可能となると考えられた。そこで、アニオン性 NBs 表面への MGC コーティングの可否について、表面電荷の変化を指標に評価したところ、MGC の添加濃度依存的に増大、および負電荷から正電荷への反転が認められ、表面コーティングが可能であることが示された (図 1)。さらに、蛍光標識 miRNA の搭載について、フローサイトメトリーにより評価したところ、MGC コーティングによる蛍光強度の増大が認められ、miRNA の搭載が可能であること示唆された (図 2)。これらは、アニオン性 NBs 表面へアニオン性の核酸を簡便に搭載可能とする技術であり、本課題の基盤となる重要な成果である。さらに、核酸搭載率の評価を行ったところ、多糖類を過剰に加え高い電位を有するナノバブルではなく、電荷の反転が生じる付近の電位を有する NBs において核酸搭載率が増大することが明らかとなった。これは、溶液中の過剰な多糖類は、コーティング NBs への核酸の結合において拮抗するためと考えられる。

また、コーティングによる NBs の超音波応答性への影響は小さく、超音波照射との併用により、従来の NBs と同様に超音波造影効果、および in vitro における低侵襲的な核酸導入効果を有することを明らかとした (図 3)。さらに、安定性、表面電位、コーティングの可否等を指標に NBs の脂質組成として DPPG の含有率 (30-92mol%)、PEG2k の含有率 (4-10mol%) の比較検討も行った結果、DPPG:DPPC:PEG2k=50:44:6 が有用であることが示唆され、電荷の反転が生じる付近の MGC 濃度によるコーティングにより、miRNA のみならず、

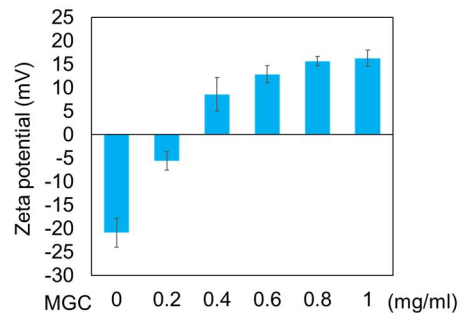


図1. MGC添加に伴うNBsの表面電荷の変化

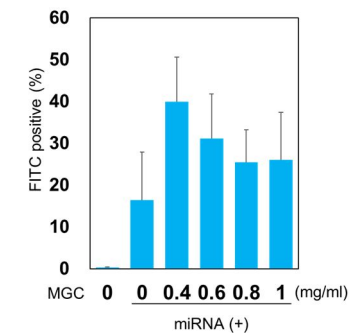


図2. MGC-NBsへの蛍光標識miRNA搭載評価

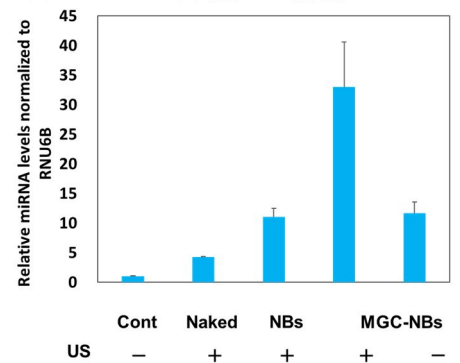


図3. MGC-NBsと超音波併用によるmiRNA細胞内導入効果

分子サイズのことなる pDNA の搭載も可能であること、超音波照射との併用により pDNA の細胞内導入効果が得られることを明らかとした。以上より、カチオン性高分子による NBs のコーティングは、核酸・遺伝子搭載型の全身投与に向けたキャリア開発において有用な方法となり得るものと期待される。

(2) MGC-NBs への核酸搭載に伴う血清存在下における miRNA 安定性評価

MGC-NBs への核酸搭載により、導入の駆動力となる NBs と miRNA の血管内挙動が一致することは、全身投与における導入効率の向上に繋がるものと期待される。さらに、NBs への搭載により、NBs 表面に存在する PEG 鎖の水和相内に核酸が保護され、安定性が向上することも考えられる。そこで、血清存在下で核酸搭載 MGC-NBs のインキュベーションを試み、その後電気泳動により評価したところ、MGC コーティングを施していない NBs との混合溶液と比較して、miRNA の安定性が向上することが示された。以上の結果より、NBs への核酸搭載が血管内投与に適応するうえで有用となることが示唆された。

(3) ミキシング NBs の調製と物性評価

脳梗塞の発症時には BBB が破綻することが知られている。核酸治療により NVU の保護を可能とするためには、血管内皮細胞近傍、あるいは血管から漏出して神経系細胞近傍へと NBs が到達する必要があると考えられる。そこで高速攪拌(ミキシング)による NBs のサイズ制御を試みた。その結果、一定条件(回転数・時間)でミキシングした結果、NBs の均一性の向上と平均粒子径の減少、個数濃度の増大が認められた(図4)。これにより、組織深部への到達性の向上が期待される。

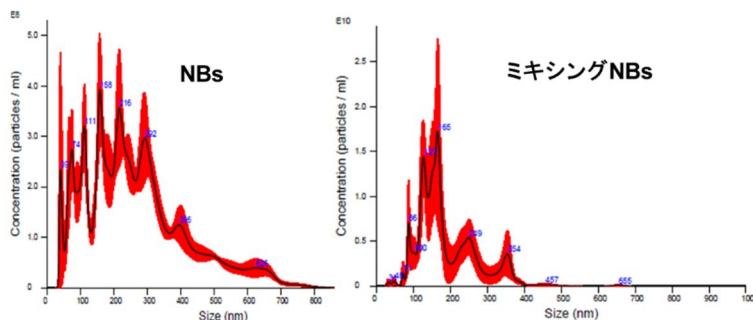


図4. NBsの高速攪拌による粒径分布の変化

さらに、ミキシングによる粒子径、個数濃度などの物性変化に伴い、NBs の振動・圧縮(キャビテーション)誘導に適した条件が変わることも明らかとした。キャビテーション誘導は、核酸の細胞内導入において駆動力となることから、今回得られたミキシング NBs における導入条件は、核酸導入に伴う治療効果を目指す本課題において重要な情報である。また、ミキシング NBs においては NBs と比較して表面積が減少すると考えられるが、MGC コーティング、miRNA 搭載が可能であること、またその至適条件を見出した。miRNA 搭載 MGC-ミキシング NBs による細胞内核酸導入効果については、引き続き条件の最適化を進めながら評価していく予定である。

(4) ミキシング NBs の脳における機能性評価

(3)で明らかとなったように、ミキシング NBs は従来の NBs と比較して、粒子径や個数濃度などの物性が異なる。そこで in vivo における機能性も異なる可能性が考えられることから、超音波造影効果および BBB 開口作用について評価を試みた。

ミキシング NBs の投与により、NBs と同様に脳での造影効果が得られ、NBs とミキシング NBs に顕著な差は認められなかった(図5a)。しかし、3 min を過ぎるとミキシング NBs の方が僅かに造影強度が高いことが示された(図5b)。今回の検討においては、脂質濃度を統一し、個数濃度が異なるため、個数濃度の高いミキシング NBs において超音波の振動に対し、安定に共振可能な NBs が数多く存在したことによると考えられる。今後さらに、最適な超音波条件、投与条件などを適用したうえで、より詳細な解析が必要といえる。

また、マウス尾静脈へのミキシング NBs の尾静脈投与と集束超音波(1 MHz)の照射により、事前に投与したエバンスブルーの脳組織への漏出が確認されたことから、ミキシング NBs も NBs と同様に、超音波照射との併用による BBB の一時的な開口を誘導可能であることが示された。こちらにおいても NBs とは至適条件が異なることも示唆されたことから、今後、さらなる検討を進

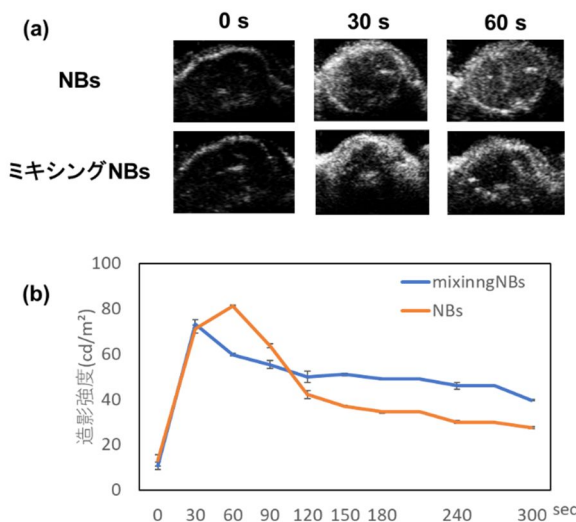


図5. ミキシングNBsによる脳組織の超音波造影効果 (a) 脳組織の超音波イメージング画像 (b) 投与後の造影強度変化

め、治療において有用な超音波照射条件の最適化と導入効果の評価をしていく予定である。

(5) 担癌モデルを用いた微小血管を介した MGC-NBs 投与による核酸導入の有用性評価

核酸搭載 MGC-NBs の導入ツールとしての評価において、経頭蓋的超音波照射となる脳組織への導入の前に、超音波照射を施しやすく、かつ微小血管を有する担癌モデルを用いた評価を行った。その結果、搭載核酸による腫瘍の増殖抑制効果が示され、本法が全身投与による微小血管を介した核酸導入において有用となり得ることが示唆された(図 6)。

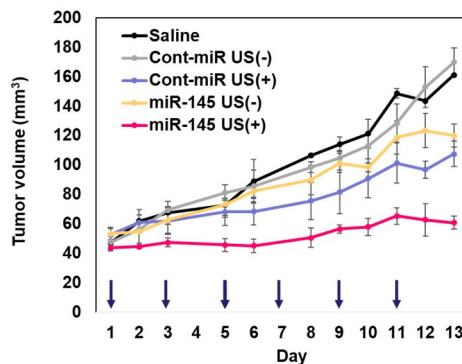


図6. 担癌モデルマウスにおける核酸搭載MGC-NBsの有用性評価

以上の結果は、本研究の目的の核となるアニオン性 NBs への核酸搭載技術や NBs のサイズ制御技術の確立に繋がる重要な成果であるが、本研究期間内ではミキシング NBs による脳組織への核酸導入や治療効果の評価までは到達しなかった。今後更なる条件最適化とペプチド修飾による標的指向性の付与などの技術の融合を進め、本法の脳梗塞治療における有用性評価に繋げていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo-Takahashi Y, Negishi Y	4. 巻 44
2. 論文標題 Gene and oligonucleotide delivery via micro- and nanobubbles by ultrasound exposure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2022.100445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋 葉子, 濱野 展人, 根岸 洋一	4. 巻 36
2. 論文標題 超音波とバブル製剤によるドラッグデリバリー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 166-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.36.166	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo-Takahashi Yoko, Negishi Yoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Microbubbles and Nanobubbles with Ultrasound for Systemic Gene Delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 964 ~ 964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12100964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高橋葉子、畠中祐希、小野滉太、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 高速攪拌を利用したナノバブルの微小化と多糖類コーティングによる 核酸搭載の基礎的検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋葉子、小野滉太、齋藤聖純、畠中祐希、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 miRNA搭載多糖類コーティングナノバブルによる腫瘍細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口泰暉、高橋葉子、畠中祐希、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 pDNA搭載多糖類コーティングナノバブル開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口泰暉、高橋葉子、小野滉太、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 全身投与適応に向けた pDNA 搭載多糖類コーティングナノバブルの開発
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会 第20回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoko Endo-Takahashi
2. 発表標題 Development of nucleic acids-coated nanobubbles and its application for cancer therapy
3. 学会等名 2021 台湾介入治療超音波學術年會 ~State of the Art: Interventional & Therapeutic Ultrasound~ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiki Yamaguchi, Yoko Endo-Takahashi, Kota Ono, Arina Ihara, Yoichi Negishi
2. 発表標題 Ultrasound-responsive nanobubbles loading nucleic acids for cancer therapy
3. 学会等名 American Society of Gene & Cell Therapy 25th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口泰暉、高橋葉子、伊原安莉菜、小野滉太、根岸洋一
2. 発表標題 miRNA-145を搭載した超音波応答性ナノバブルによる抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野滉太、高橋葉子、齋藤聖純、畠中祐希、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 miRNA搭載多糖類コートナノバブルを用いた核酸DDSキャリアの開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野滉太、高橋葉子、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 多糖類コーティングナノバブルを用いた核酸DDSキャリアの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kota Ono, Yoko Endo-Takahashi, Kiyosumi Saito, Nobuhito Hamano, Yoichi Negishi
2. 発表標題 The Development of Nucleic Acids-loaded Nanobubbles
3. 学会等名 The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋葉子、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 多糖類コーティングによる核酸搭載可能なアニオン性ナノバブルの調製と基礎的検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋葉子、齋藤聖純、小野滉太、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 核酸搭載メチルグリコールキトサンコーティングナノバブルの開発
3. 学会等名 日本DDS学会第35年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野滉太、高橋葉子、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 超音波応答性多糖類コートナノバブル製剤の開発
3. 学会等名 第44回製剤・創剤セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野滉太、高橋葉子、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 超音波応答性多糖類コートナノバブルによる核酸送達システムの基盤構築
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第19回夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠中祐希、高橋葉子、小野滉太、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 多糖類を利用した核酸搭載アニオン性ナノバブルの調製と基礎的検討
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野滉太、高橋葉子、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 多糖類を用いた超音波応答性核酸ナノキャリアの開発
3. 学会等名 第4回日本遺伝子細胞治療学会 若手研究会セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野滉太、高橋葉子、齋藤聖純、畠中祐希、濱野展人、根岸洋一
2. 発表標題 核酸搭載多糖類コートアニオン性ナノバブルを用いた核酸DDSキャリアの開発
3. 学会等名 第18回日本超音波治療研究会 (JSTU2019)
4. 発表年 2019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	小野 滉太 (ONO Kota)		
研究協力者	齋藤 聖純 (SAITO Kiyosumi)		
研究協力者	畠中 祐希 (HATANAKA Yuki)		
研究協力者	山口 泰暉 (YAMAGUCHI Taiki)		

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
---------	---------