

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11703

研究課題名(和文) アルミニウム塩による腸管上皮からの損傷関連分子の放出と食物アレルギー発症への関与

研究課題名(英文) Release of damage-associated molecular patterns from intestinal epithelia by aluminum salt and involvement in the development of food allergy

研究代表者

若林 あや子 (Wakabayashi, Ayako)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30328851

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)：アルミニウム塩である食品添加物ミョウバンを経口投与したマウス腸管では腸上皮細胞死と好酸球浸潤が増加し、抗生剤処置はミョウバンによる腸上皮細胞死と好酸球浸潤をさらに増悪させた。ミョウバンは腸上皮細胞のIL33遺伝子発現と損傷関連分子である成熟IL-33の産生を増加させ、NLRP6・カスパーゼ1活性化によるピロトーシスを誘導するほか、抗生剤によるカスパーゼ6活性化を介したアポトーシスを促進することが示唆された。食品添加物ミョウバンは腸上皮細胞死と損傷関連分子IL-33の放出を促し、腸上皮バリア損傷と消化管アレルギーの誘導に関与する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年消化管アレルギーは増加しており、なかでも好酸球性消化管疾患は原因がよく分かっていない。アルミニウム塩であるミョウバンは食品添加物として様々な食品に汎用されているが、アルミニウム塩は免疫賦活作用を有しワクチンの免疫賦活剤として使用されることから、ミョウバンは消化管炎症を誘導する危険性がある。我々は本研究によりミョウバンが腸上皮細胞死と腸管の好酸球浸潤を促すこと、抗生剤はミョウバンによる細胞死誘導と好酸球増加作用をさらに増悪させることを明らかにした。食品添加物ミョウバンおよび抗生剤の不適切な摂取は腸上皮バリア損傷および好酸球性消化管疾患などの消化管アレルギーの発症や増悪に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of aluminum ammonium sulfate, an aluminum salt, increased intestinal epithelial cell death and eosinophil infiltration in mice, and treatment with antibiotics further enhanced intestinal epithelial cell death and eosinophil infiltration by an aluminum salt. An aluminum salt increases IL33 gene expression and production of mature IL-33, a damage-associated molecular pattern (DAMP), induces pyroptosis by activation of NLRP6 and caspase-1, and enhances apoptosis through caspase-6 activation triggered by antibiotics, in intestinal epithelial cells. These results suggest that an aluminum salt, a food additive, promotes intestinal epithelial cell death and the release of IL-33, a DAMP, and may be involved in induction of intestinal epithelial barrier damage and gastrointestinal allergies.

研究分野：免疫学、アレルギー学、食品衛生学

キーワード：アルミニウム塩 ミョウバン 食品添加物 腸上皮細胞死 好酸球 消化管アレルギー トランスクリプトーム解析 抗生剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー・消化管アレルギーを含むアレルギー疾患患者は、過去数十年増加の一途を辿っている。近年、食品の加工や保存において重要な役割を果たしてきた食品添加物は、様々なアレルギーの発症や進行に影響を与えている可能性が示唆されているものの、その詳細はよく分かっていない。

アルミニウム塩であるミョウバン(硫酸アルミニウムカリウム)とアンモニウムミョウバン(硫酸アルミニウムアンモニウム)は、形状保存剤・変色防止剤・ベーキングパウダーとして、軟体魚介類・甘露煮・漬け物・パンなどに広く使用される。しかし一般にアルミニウム含有化合物は強い免疫賦活作用を有し(文献①)、破傷風やB型肝炎など感染症のワクチンの免疫賦活剤として使用されるという側面を有する。それ故ミョウバンのようなアルミニウム塩は、上皮バリアを損傷し消化管免疫・炎症を惹起する可能性が考えられるが、これまでそうした研究は行われず、炎症・免疫毒性の面の安全性が明らかでないまま食品添加物として使用が許可されている。

アルミニウム塩は投与部位の細胞死を誘導し、死細胞由来のDNAなどの損傷関連分子パターン(DAMPs)は免疫賦活を媒介する(文献②)。細胞死や損傷に伴って放出されるDAMPsは炎症や免疫反応を誘導する起因为物質である。申請者らは以前、コレラ毒素によって損傷した腸管上皮細胞由来の核タンパク質HMGB1が、腸管での免疫反応を賦活することを報告した(文献③)。アルミニウム塩も腸管上皮細胞を損傷し、DAMPsの放出を促すことで消化管アレルギーの発症や進行に関与する可能性が考えられる。

そこで本研究では、食品添加物として使用されているアルミニウム塩が腸管上皮細胞を損傷するか否か、および損傷した腸上皮細胞から放出されるDAMPsが消化管アレルギー誘導に関与するか検討した。また、抗生剤による腸内細菌の多様性低下(dysbiosis)は腸管バリアを損傷し食物アレルギーを悪化させる(文献④)。抗生剤処置と消化管アレルギーの発症・進行は深く関与することが考えられるが、メカニズムの詳細はよく分かっていないため、抗生剤処置下でのアルミニウム塩投与による腸上皮細胞の損傷と炎症誘導についても検討した。

2. 研究の目的

アルミニウム塩であるミョウバンは腸上皮細胞の細胞死や損傷を促し、DAMPsを放出して消化管アレルギーの発症や増悪に関与する可能性がある。さらに抗生剤によりdysbiosisを誘導した腸管において、アルミニウム塩はより深刻な腸上皮細胞死と腸管炎症を引き起こす可能性がある。本研究では、抗生剤投与・非投与下において、ミョウバンにより腸管上皮細胞が損傷するか否か、損傷した腸管上皮細胞からどのようなDAMPsが放出されて消化管アレルギー誘導に関わるかについて、上皮細胞のトランスクリプトーム解析も含め検討した。食品添加物ミョウバンによる腸管上皮損傷・DAMPsの放出と、消化管アレルギー炎症への関与を明らかにし、消化管アレルギー予防や緩和のためにミョウバン摂取への注意を喚起することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) マウス: 実験には8-12週齢のC57BL/6雄マウス(日本クレア株式会社)を用いた。日本医科大学動物実験委員会の審査・承認・管理のもと、動物の飼育と実験を行った。マウスは同大学動物実験施設において、特定病原体を含まない(SPF)環境下で飼育した。

(2) 抗生剤処置とアルミニウム塩経口投与: アンピシリン(1mg/ml)、バンコマイシン(0.5mg/ml)、ネオマイシン(1mg/ml mg)、メトロニダゾール(0.25mg/ml)を滅菌蒸留水に溶解し、マウスに2週間自由摂取させた。10⁻² mmolのミョウバン(硫酸アルミニウムカリウム)、アンモニウムミョウバン(硫酸アルミニウムアンモニウム)またはPBS 0.3mlを、イソフルラン吸入麻酔下で経口ゾンデを使用して経口投与した。

(3) 腸上皮細胞死の測定: マウスにミョウバン、アンモニウムミョウバン、またはPBSを経口投与し、16時間後に摘出した小腸を反転させ、37°Cの5%FCS HANKSバッファー中で30分攪拌した。腸上皮細胞分画をパーコール比重法により分離し、得られた細胞をZombie試薬、抗CD45抗体、抗EpCAM抗体、Annexin Vで染色し、フローサイトメトリーによりEpCAM+CD45-Zombie+Annexin V+上皮死細胞の割合を測定した。

(4) 好酸球の測定: マウスにミョウバン、アンモニウムミョウバン、またはPBSを7日おきに3回経口投与した。最終経口投与の16時間後に小腸を摘出し、細断した腸をコラゲナーゼDとDNase Iで処理して腸管粘膜固有層の細胞を採取、好酸球分画をパーコール比重法により分離した。得られた細胞を7AAD、抗CD45抗体、抗MHCクラスII抗体、抗Siglec-F抗体で染色し、フローサイトメトリーによりCD45+MHCクラスII-Siglec-F+好酸球の割合を測定した。

(5) 腸上皮細胞の分取と RNA 抽出：マウスにアンモニウムミョウバンまたは PBS をゾンデで経口投与し、1 時間後に小腸を摘出、反転、攪拌し、パーコール比重法により腸上皮分画を分離した。得られた細胞を 7AAD、抗 EpCAM 抗体、抗 CD45 抗体、抗 F4/80 抗体で染色し、BD FACSAria II セルソーターにより、7AAD⁻CD45⁻F4/80⁻EpCAM⁺ 腸上皮生細胞を分取した。分取したマウス腸上皮細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出し、RNA Integrity Number (RIN) 値が 7 以上のサンプル RNA を cDNA ライブラリー作製に用いた。

(6) cDNA ライブラリー作製とシーケンシング：Total RNA 30-100 ng を使い、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) によりライブラリー作製を行った。NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (Illumina) を用いて、NextSeq (Illumina) でシーケンスを行った。

(7) 遺伝子発現変動解析：Fold change (遺伝子発現倍率変化) が 1.5 以上または -1.5 以下で False discovery rate (FDR) p-value が 0.05 未満のものを発現変動遺伝子として抽出した。RNA-seq データ解析には、統計解析ソフトウェアである R と iDEP (integrated Differential Expression and Pathway analysis) を用いた。

(8) ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とウエスタンブロッティング：マウス腸上皮細胞分画を採取し、CD45 陽性細胞を磁気ビーズで除いた後、細胞溶解したサンプルを用いた。サンプル中のタンパク質を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写し、特異的な抗体 (抗 NLRP6 抗体、抗 caspase-1 抗体、抗 caspase-4 抗体、抗 IL-18 抗体、抗 IL-33 抗体、抗 caspase-6 抗体、抗 β -アクチン抗体) を用いて、各ペプチドやタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) ミョウバンおよび抗生剤によるマウス小腸における腸上皮細胞死と好酸球浸潤の促進

食品添加物であるミョウバンやアンモニウムミョウバンといったアルミニウム塩を経口投与したマウスの腸管では、腸上皮細胞死および好酸球浸潤が有意に増加した (図 1A)。また抗生剤 (アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾール) を

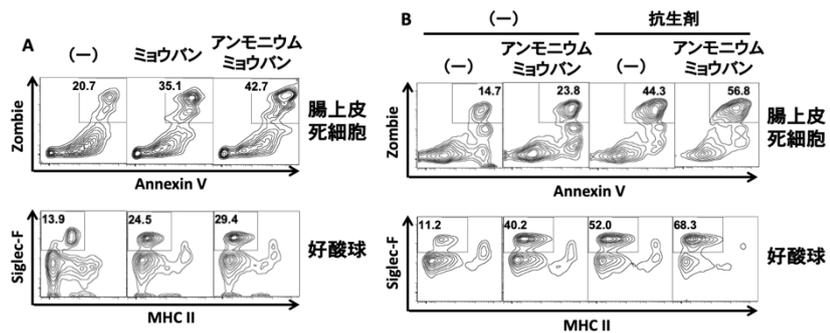


図1 ミョウバンおよび抗生剤によるマウス小腸における腸上皮細胞死と好酸球浸潤の促進

経口処置したマウスにおいても腸上皮細胞死と腸管の好酸球浸潤が見られ、これら抗生剤処置マウスにアンモニウムミョウバンを投与すると腸上皮細胞死と好酸球浸潤はさらに増悪した (図 1B)。これらの結果より、アルミニウム塩の経口投与は腸上皮細胞死を引き起こし、好酸球浸潤を伴う消化管アレルギーの誘導に関与する可能性がある。

(2) ミョウバンと抗生剤を投与したマウス小腸上皮細胞のトランスクリプトーム解析

次に経口処置したマウスの腸上皮細胞のトランスクリプトーム解析を行った。主成分分析により、アンモニウムミョウバン投与と抗生剤処置による遺伝子発現変動プロファイルは異なることが明らかになった (図 2A)。アンモニウムミョウバンは腸上皮細胞において *I133* 遺伝子など 376 遺伝子の発現を増加させ、249 遺伝子の発現を低下させた (図 2B)。抗生剤は *Nlrp6* や *Casp6* を含む 999 遺伝子の発現を増加させ、*Casp4* や *Casp8* など 801 遺伝子

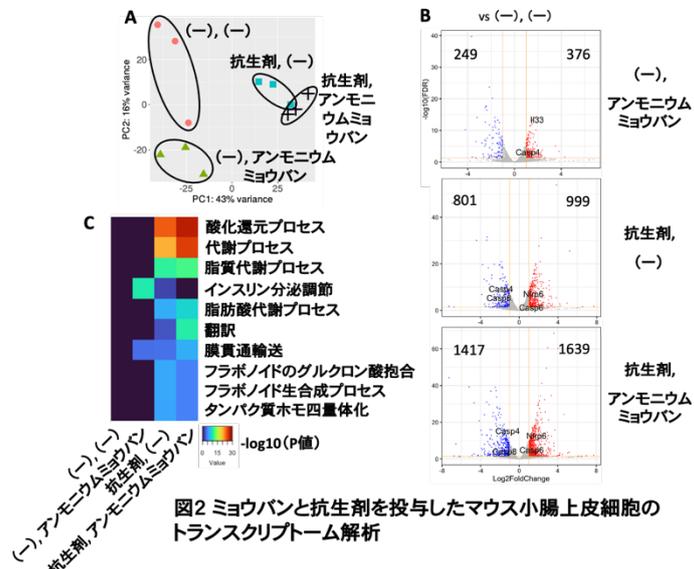


図2 ミョウバンと抗生剤を投与したマウス小腸上皮細胞のトランスクリプトーム解析

の発現を低下させた (図 2B)。抗生剤投与下でのアンモニウムミョウバンの投与は、発現増加遺伝子数 (1417) および発現低下遺伝子数 (1639) をさらに増加させた (図 2B)。また遺伝子オントロジー・エンリッチメント解析により、抗生剤は腸上皮細胞の酸化還元や代謝プロセスに関わる遺伝子発現を増加させ、それらはミョウバン投与によりさらに増強することが明らかになった (図 2C)。

これらの結果より、ミョウバンは腸上皮細胞の *IL133* 遺伝子の発現を増加させてアレルギー発症に関わる可能性が示唆された。また、抗生剤処置はアポトーシスに関わる *Casp6* 遺伝子とピロトーシスに関わる *Nlrp6* 遺伝子発現を増加させ、ミョウバンはこれら遺伝子発現を増強して複合的な強い細胞死を誘導する可能性が考えられる。

(3) ミョウバンによる小腸上皮細胞における caspase-1 活性化と成熟 IL-18・IL-33 産生

マウス細胞溶解液のウェスタンブロッティング解析を行ったところ、腸上皮細胞においては NLRP6 の発現が見られ、アンモニウムミョウバン投与 4 時間で活性化 caspase-1 p20 と成熟 IL-18 p18 の増加が観察された (図 3)。ミョウバンは腸上皮細胞の NLRP6 インフラマソームを活性化して、caspase-1 と IL-18 の断片化を誘導することが示唆された。また、アンモニウムミョウバン投与による成熟 IL-33 p25 の増加も観察された (図 3)。アンモニウムミョウバン投与 8 時間と 16 時間では断片化 caspase-1, IL-18, IL-33 が消失していることから、8 時間以降にはこれらが細胞外に放出された可能性が考えられる。さらに抗生剤処置下でのミョウバン投与では、caspase-1 に加えて caspase-4 の活性化も見られ、より強いパイロトーシスが誘導される可能性がある (図 3)。

これらの結果より、ミョウバンは NLRP6 インフラマソームを活性化してパイロトーシスと IL-18 放出を誘導すること、および DAMPs である IL-33 放出を促し 2 型炎症反応の誘導に関与する可能性が示唆された。

(4) 抗生剤による小腸上皮細胞における caspase-6 の活性化

また、抗生剤処置したマウスの小腸上皮細胞においては活性化 caspase-6 が観察され、抗生剤によるアポトーシス誘導の可能性が示唆された (図 3)。アンモニウムミョウバン投与 4-8 時間後に caspase-6 の断片化は促進し、16 時間後には減少、細胞外へ放出されたと考えられる (図 3)。

(5) 結論

これらの結果から、食品添加物であるミョウバン・アンモニウムミョウバンのようなアルミニウム塩は、小腸上皮細胞において NLRP6 インフラマソームを活性化し、パイロトーシスと IL-18 放出を誘導すると考えられる。加えてアルミニウム塩は、IL-33 の断片化と DAMPs としての放出を引き起こす可能性がある。IL-18 は好塩基球からの IL-4 とヒスタミンの放出を活性化し (文献⑤)、IL-33 は 2 型自然リンパ球 (ILC2) の IL-5, IL-13 産生を活性化して、いずれも腸管の好酸球浸潤と 2 型炎症を促進すると考えられる。

また、抗生剤処置により酸化還元反応・代謝が亢進している腸上皮細胞では、caspase-6 活性化を介したアポトーシスが起これ、ここにミョウバンを投与することでアポトーシス誘導がさらに促進する上に NLRP6 インフラマソーム活性化と caspase-4 活性化によるパイロトーシスも起こる可能性がある。これら複合的な強度の上皮細胞死は、腸上皮バリアの損傷を招き、より強い腸管炎症を引き起こすであろう。

このようにアルミニウム塩であるミョウバンは腸上皮細胞の細胞死を誘導し、腸上皮バリア損傷と消化管アレルギーの発症や増悪に関与すると考えられる。ミョウバンは食品添加物として認可され広く食品に使用されているが、腸上皮細胞に対する毒性を有し、消化管アレルギーの誘導因子・増悪因子となる危険性がある。また、抗生剤の不適切な使用は腸上皮細胞死を著しく促進し、腸上皮バリアの損傷と消化管アレルギーを増悪させる危険性がある。

今後さらにマウス由来腸上皮細胞株を用いた研究や腸内細菌叢の解析も行い、食品添加物ミョウバンによる細胞死誘導の詳細な分子機構を解明し、消化管アレルギーの病態と原因の解明、予防や治療への発展に繋げる所存である。

<引用文献>

- ① P Marrack, et al. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 9(4): 287-93, 2009
- ② T Marichal, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant

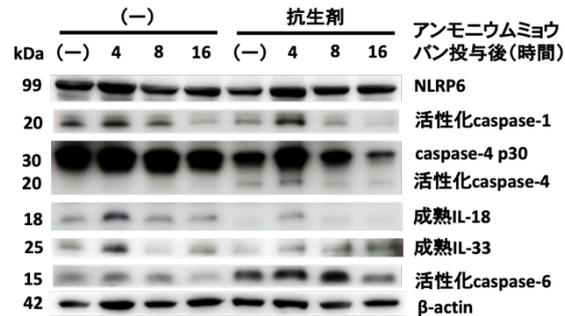


図3 ミョウバンによる小腸上皮細胞におけるcaspase-1 活性化と成熟IL-18・IL-33産生、および抗生剤による caspase-6活性化

- activity. *Nat Med* 17(8): 996-1002, 2011
- ③ A Wakabayashi, et al. HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin adjuvant contributes to activation of mucosal dendritic cells and induction of intestinal cytotoxic T lymphocytes and IgA. *Cell Death Dis*, 9(6) 631, 2018
 - ④ Q Zhang, et al. Antibiotic-Induced Gut Microbiota Dysbiosis Damages the Intestinal Barrier, Increasing Food Allergy in Adult Mice. *Nutrients* 13(10): 3315, 2021
 - ⑤ T Yoshimoto, et al. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *PNAS* 96(24): 13962-13966, 1999

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 Antibiotics promote epithelial cell death and eosinophilic infiltration in the gut caused by an aluminum-containing food additive
3. 学会等名 第 51 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Keisuke Tanaka, Soichiro Kumamoto, Yasutaka Osada, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 Antibiotics-induced dysbiosis promotes epithelial cell death and eosinophilic infiltration in the gut caused by aluminum-containing food additives
3. 学会等名 第 71 回 日本アレルギー学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若林あや子, 大脇敦子, 長田康孝, 森田林平
2. 発表標題 抗生剤が促進する食品添加物ミョウバンによる腸管上皮の炎症性細胞死の解析
3. 学会等名 文部科学省科学技術人材育成費補助事業 ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ(牽引型) 2021 年度共同研究・研究支援員配置 研究成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 町田雪乃, 道下正貴, 若林あや子
2. 発表標題 イヌの肝細胞癌のオルガノイドバンクの構築および新規治療法の開発
3. 学会等名 文部科学省科学技術人材育成費補助事業 ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ(牽引型) 2021 年度共同研究・研究支援員配置 研究成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 An aluminum-containing food additive upregulates gene expression involved in inflammatory cell death in intestinal epithelial cells
3. 学会等名 第 50 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Keisuke Tanaka, Yasutaka Osada, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 Increased inflammatory cell death in intestinal epithelial cells by oral administration of aluminum salt as a food additive
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林あや子、大脇敦子、岩槻健、田中啓介、長田康孝、西山康裕、松根彰志、森田林平
2. 発表標題 アルミニウム含有食品添加物で誘導されるアレルギーと腸管上皮細胞死の解析
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林あや子
2. 発表標題 食物アレルギーと腸管免疫
3. 学会等名 令和3年度日本女子大学食物学科縦の会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Masumi Shimizu, Ken Iwatsuki, Rimpei Morita
2. 発表標題 Antigen sensitization and intestinal infiltration of eosinophils by oral administration of aluminum salt as a food additive
3. 学会等名 Japanese Society of Allergology (JSA) / The World Allergy Organization (WAO) joint Congress 2020・第 69 回日本アレルギー学会 学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Shuji Toriumi, Eri Koike, Yasuhiro Nishiyama, Rimpei Morita, Hidemi Takahashi
2. 発表標題 Damage and enhanced cytoplasmic IL-33-expression in EpCAM+ intestinal epithelial cells and antigen sensitization by oral aluminum salt
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Masumi Shimizu, Eiji Shinya, Rimpei Morita, Hidemi Takahashi
2. 発表標題 HMGB1 released from damaged intestinal epithelia activates mucosal dendritic cells and induces intestinal cytotoxic T lymphocytes and IgA
3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmins Symposium, Okayama, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Shuji Toriumi, Masumi Shimizu, Yasuhiro Nishiyama, Hidemi Takahashi
2. 発表標題 Induction of damage of EpCAM+ intestinal epithelial cells and antigen sensitization by aluminum salt as a food additive
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Masumi Shimizu, Eiji Shinya, Hidemi Takahashi
2. 発表標題 HMGB1 released from damaged intestinal epithelia contributes to activation of mucosal DCs and induction of intestinal CTLs and IgA
3. 学会等名 23rd Edition of International Conference on Immunology and Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>〔報告書、ニュースレター〕(計5件)</p> <p>(1) 若林 あや子. ミョウバンによる腸管上皮損傷に伴う炎症・アレルギー誘導性損傷関連分子の放出の解析と免疫学的安全性評価の検討. 日本食品化学研究振興財団 第 28 回 (令和 3 年度)研究成果報告書, 28, 57-62, 2022 年 12 月</p> <p>(2) 若林あや子, 森田林平, 岩槻健, 隈本宗一郎. 食品添加物ミョウバン刺激後に腸上皮細胞に侵入して炎症性細胞死を誘導する腸内マイクロバイオームへ抗生剤が与える影響の16S rRNAメタゲノム解析. 東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター 9,33, 2022年3月</p> <p>(3) 若林 あや子. ミョウバンによる腸管上皮損傷に伴う炎症・アレルギー誘導性損傷関連分子の放出の解析と免疫学的安全性評価の検討. 日本食品化学研究振興財団 第 27 回 (令和 2 年度)研究成果報告書, 27, 110-120, 2021 年 12 月</p> <p>(4) 若林あや子, 森田林平, 岩槻健, 田中啓介, 食品添加物ミョウバンによるマウス腸上皮細胞インフラマソーム活性化のトランスクリプトーム解析. 東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター 8,18, 2021 年 3 月</p> <p>(5) 若林 あや子. ミョウバンによる腸管上皮損傷に伴う炎症・アレルギー誘導性損傷関連分子の放出の解析と免疫学的安全性評価の検討. 日本食品化学研究振興財団 第 27 回 (令和元年度)研究成果報告書, 26, 130-136, 2020 年 12 月</p> <p>〔ホームページ〕(計3件)</p> <p>(1) https://researchmap.jp/read0064948/</p> <p>(2) https://nrid.nii.ac.jp/ja/nrid/1000030328851/</p> <p>(3) https://www.nms.ac.jp/college/schoolroom/kisoigaku/biseibutsu-meneki/kenkyunaiyou.html</p>

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

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