

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659551

研究課題名(和文)低酸素ダイナミクスに着目した悪性グリオーマの病態解明と効果的治療法の検討

研究課題名(英文)Characterization of malignant glioma and development of potent treatment strategy focusing on hypoxia dynamics

研究代表者

稲波 修(Inanami, Osamu)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：10193559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は「低酸素領域の量ではなく変動度合いがグリオーマの治療予後に大きく関わっている」と仮説を立て、これを検証する事であった。まず<sup>18</sup>F-FMISOを複数回投与して連続撮像するsequential PETによって間欠的低酸素の描出を試みたが、放射能減衰には長時間必要であり短時間で変動する間欠的低酸素を明らかにすることは出来なかった。しかし、電子スピン共鳴ESRを用いることでマウスグリオーマ内の低酸素領域を描出する事に成功し、間欠的低酸素の解析法として利用できる可能性を示すことが出来た。加えて、グリオーマに対する低酸素細胞標的放射線増感剤としてドラニダゾールが有効であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the hypothesis that the frequency of tumor hypoxia influences the prognosis of malignant glioma rather than an amount of tumor hypoxia. The results revealed that sequential PET analysis using <sup>18</sup>F-FMISO could not visualize the transient hypoxia in glioma, because it took the relatively long time for the radioactivity attenuation. However, this study achieved the establishment of hypoxia imaging in transplanted murine glioma by using electron spin resonance technique. Furthermore, it was revealed that doranidazole is a potent drug to improve the radiation efficiency against hypoxic glioma cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学/放射線科学

キーワード：脳腫瘍 低酸素 イメージング 放射線治療 核医学イメージング 電子スピン共鳴

### 1. 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍の三割を占める神経膠芽腫(グリオーマ)は、その悪性度に応じて Grade I から IV に分類される。Grade II 以上では外科手術だけでは再発することが多く、Grade IV になると外科手術に最適な化学療法、放射線療法を併用したとしても、生存期間は 1~2 年と非常に予後が悪い。悪性度の高いグリオーマは、腫瘍内酸素分圧が 1~20 mmHg 程度の低酸素状態に陥っていることが多く、この低酸素環境が腫瘍の治療抵抗性や再発に関与している事が明らかとなってきた。

一方で効果的な癌治療を目指す上で、事前に標的腫瘍の治療感受性に影響する要因を明らかにしておくことが非常に重要である。また、治療効果や予後の判定に、これらパラメーターの変化を追跡することも重要である。一般に固形腫瘍内に存在する低酸素領域は治療抵抗性の主要な因子であるとされてきたが、近年、数日間持続する慢性低酸素とは別に数時間間隔で変化する間欠的低酸素が、転移能や細胞死抵抗性の獲得といった腫瘍全体の悪性化に強く関わっていることが分かってきた。従って、現在までの腫瘍採材によるタンパク質解析や免疫染色といった時間的な一部あるいはエンドポイントにおける「静的」解析では、間欠的低酸素を評価できず、十分な診断精度が得られていなかった可能性がある。

### 2. 研究の目的

本課題では、「低酸素領域の量ではなく変動度合い(間欠的低酸素)がグリオーマの治療予後に大きく関わっている」と仮説を立て、これを検証する。本課題で達成される成果として、がんの低酸素バイオロジー研究に時間変化という新概念を加えることで、この分野のより一層の深化が期待できること、既存の病理組織学による悪性度分類をさらに細分化することで個々の疾病に合わせた治療法が提案できることが期待された。間欠的低酸素を評価するためには、短時間で繰り返し低酸素領域をモニター出来るシステムが必要となるが、本研究ではまず陽電子放出断層撮影法(PET)に着目し、半減期 110 分の短時間減衰 RI 製剤である  $^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO) を時間間隔をあけて投与することで新しく生まれた低酸素領域を描出する sequential PET を試みた。また、別の方法として、電子スピン共鳴(ESR)を用いて腫瘍内酸素分圧イメージングを試みた。さらに、低酸素ダイナミクスを標的とした治療法の開発に向けて、新規低酸素細胞標的放射線増感剤ドラニダゾールの C6 ラットグリオーマに対する抗腫瘍効果を検討した。

### 3. 研究の方法

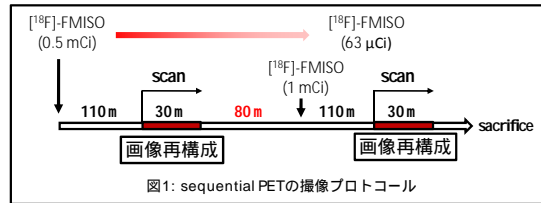
#### (1) グリオーマ移植モデル

ラット悪性脳腫瘍細胞株として C6 細胞を用いた。またマウス悪性脳腫瘍細胞株として

U251 細胞および U87 細胞を用いた。C6 細胞は WKAH ラットの、U251 および U87 細胞は athymic ノードマウスの脳室内に移植し、移植腫瘍を作製した。腫瘍体積は 7T MRI (Varian 社) もしくは 1T ICON MRI (Bruker 社) により T2 強調画像を撮像し、長径と短径から算出した。

#### (2) sequential PET

PET イメージングには PET/SPECT/CT 複合機 Inveon (シーメンス社) を使用した。坦がんラットに 0.5 mCi の  $^{18}\text{F}$ -FMISO を静脈投与し 110 分後に最初の撮像を行った。さらに最初の投与から 220 分後に 1 mCi の  $^{18}\text{F}$ -FMISO を再度静脈投与し、それから 110 分後に 2 回目の撮像を行った(図 1)。各 PET 撮像の後に CT 撮像も行い、画像の重ね合わせを行った。

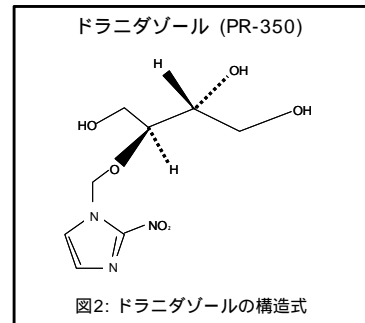


#### (3) ESR 酸素イメージング

ESR 装置は 15 mT 磁場マグネット(Philips 社)と、カスタムメイドのマイクロ波発生装置、磁場勾配制御システムならびに画像解析装置からなる。プローブとしてトリチルラジカル(TAM)を用い、パルス後のラジカルの自由誘導減衰から酸素分圧を求めて 3D マッピングを行った。この実験にはマウス脳腫瘍モデルで評価し、TAM は撮像直前にボラスで 1.13  $\mu\text{mol/g BW}$  で静脈投与した。ESR 撮像後、1T MRI に動物を移し、T2 解剖像を撮像することで酸素分圧画像と重ね合わせを行った。

(4) ドラニダゾールによる放射線増感効果の検討

C6 脳腫瘍が 80  $\text{mm}^3$  前後に成長したタイミングで、ドラニダゾール(図 2) を 200 mg/kg BW の濃度で静脈投与した。X 線照射との併用では薬剤投与 90 分後に 6 Gy の X 線照射を行った。処置後 7 日目に再度 MRI 撮像を行い、腫瘍体積を算出した。また組織学的検討として、安楽殺 90 分前に低酸素プローブであるピモニダゾールを 60 mg/kg BW で投与し、腫瘍採材後、免疫染色にて低酸素領域を描出した。



### 4. 研究成果

(1) sequential PET による低酸素領域変化の解析

まず C6 ラットグリオーマモデルにおいて、 $^{18}\text{F}$ -FMISO を時間差投与し、連続的に撮像を行うことで低酸素領域の変化が検出できるかを検討した。2 回目の撮像時には最初に投与した  $^{18}\text{F}$ -FMISO が十分減衰するよう半減期の 3 倍の間隔をとってセッティングを行った。しかし、得られた結果図 3 から分かるように、1 回目の画像と 2 回目の画像の間には、見ために認識できる明らかな変化は観察されず、PET の解像度で認められる変化を描出するには至らないことが分かった。この理由として、2 回目の撮像時にイメージ上で検出されない程度まで最初に投与した  $^{18}\text{F}$ -FMISO が減衰されるには、より長く時間間隔を開ける必要があることが考えられた。しかし、文献で示されている間欠的低酸素の時間スケール(数分~数時間)を考慮すると、これ以上長く撮像間隔をあけることは難しく、この方法では間欠的低酸素の評価は難しいと考えられた。

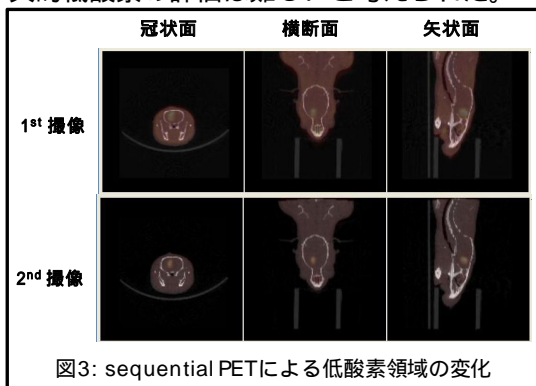


図3: sequential PETによる低酸素領域の変化

### (2) ESR による脳腫瘍酸素分圧イメージング法の樹立

次に、パルス ESR を用いた酸素分圧の撮像を試みた。ESR の原理は不対電子のスピンを共鳴させて信号を読み取るものであるが、TAM という周囲の酸素分子と相互作用して ESR スペクトルを変化させるフリーラジカルを酸素プローブとして用いた。マウス U251 および U87 グリオーマモデルを作製し、MRI で生着を確認した後、ESR イメージングを行った。TAM が脳腫瘍に取り込まれるかが最初の課題であったが、U251 および U87 脳腫瘍共に、血液脳関門が破綻しており、十分腫瘍領域に分布していることが確認された。さらに

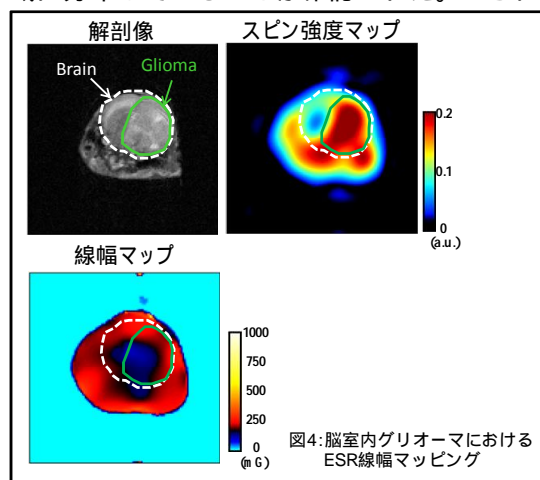


図4: 脳室内グリオーマにおける ESR線幅マッピング

その ESR スペクトル線幅をマッピングすることに成功した(図 4)。現在は、この方法を更に高速化し、酸素分圧の短時間変動を検出できるか検討している途中である。

### (3) 低酸素標的ドラニダゾールによる放射線増感効果の検討

最後に、脳腫瘍の低酸素を標的とした薬剤が放射線治療効果を向上させるかを検討した。すでに *in vitro* では低酸素細胞に対して放射線増感効果を有していることを明らかにしているドラニダゾールという薬剤を C6 グリオーマ担がんラットに投与し、X 線照射との併用を試みた。MRI による腫瘍成長の変化から、薬剤もしくは X 線単独でもある程度の腫瘍成長の抑制が観察された。しかしながら両者を併用することにより、有意な増強効果が現れた(図 5)。加えて、低酸素マーカーピモニダゾールを用いた免疫組織化学染色から、薬剤と X 線を併用した群では、広範囲に渡る壊死領域と、無処置の腫瘍で広く見られる低酸素領域のまだら状の構造が崩壊していた。以上の結果から、ドラニダゾールが低酸素領域に働き、X 線作用を増強した可能性が示唆された。

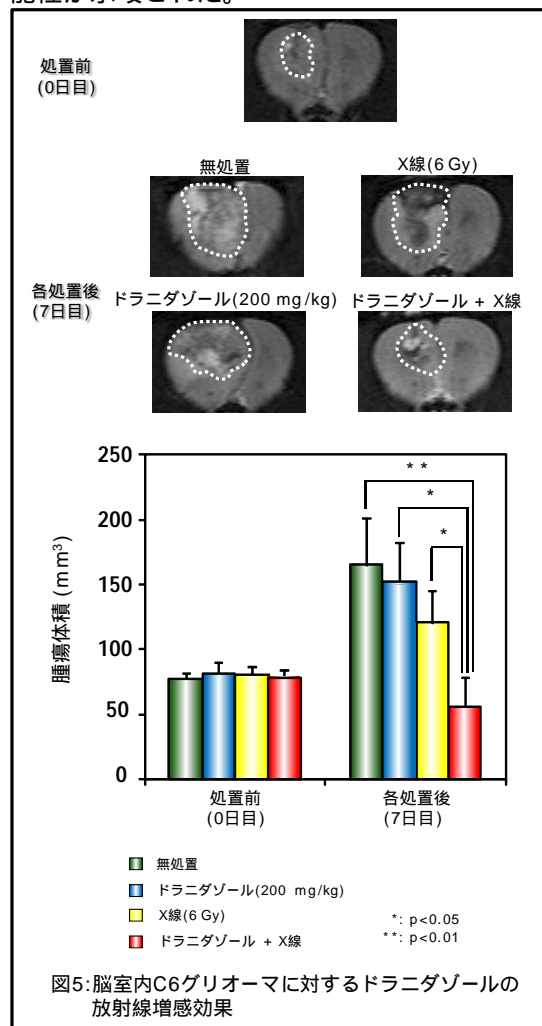


図5: 脳室内C6グリオーマに対するドラニダゾールの放射線増感効果

### (4) 結論

間欠的低酸素はその動態の複雑さおよび時間間隔の短さから PET により描出することは依然として困難であった。しかし、ESR を

用いることにより腫瘍内酸素分圧を画像化することに目処がつきつつあり、この方法であればある程度の撮像時間の短縮が期待される。さらに、低酸素増感剤ドラニダゾールがグリオーマ低酸素領域の放射線感受性を増強することを明らかにした。本挑戦的萌芽研究で得られた成果を基に、今後はESRを用いた酸素イメージングを駆使して間欠的低酸素を含む治療抵抗性領域への薬効評価を行っていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

- 1: Yasui H., Takeuchi R., Nagane M., Meike S., Nakamura Y., Yamamori T., Ikenaka Y., Kon Y., Murotani H., Oishi M., Nagasaki Y., and Inanami O. (2014) Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 347(1):151-158. 査読有
- 2: Goodwin J., Yachi K., Nagane M., Yasui H., Miyake Y., Inanami O., Bobko A.A., Khramtsov V.V., and Hirata H. (2014) In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X-ray irradiation. *NMR Biomed.* 27:453-458 査読有
- 3: Nishida N., Yasui H., Nagane M., Yamamori T., and Inanami O. (2014) 3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines. *J. Radiat. Res.* 55(3):455-463.
- 4: Yamamori T., Meike S., Nagane M., Yasui H., and Inanami O. (2013) ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. *FEBS Lett.* 587(20):3348-3353 査読有
- 5: Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S., Kuge Y., Tamaki N., Kameya H., Nakamura H., Fujii H., and Inanami O. (2013) Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437(3):420-425. 査読有
- 6: Matsumoto S., Saito K., Yasui H., Morris H.D., Munasinghe J.P., Lizak M., Merkle H., Ardenkjaer-Larsen J.H., Choudhuri R., Devasahayam N., Subramanian S., Koretsky A.P., Mitchell J.B., and Krishna M.C. (2013) EPR oxygen imaging and hyperpolarized (13) C MRI of pyruvate metabolism as noninvasive biomarkers of tumor treatment response

to a glycolysis inhibitor 3-bromopyruvate. *Magn. Reson. Med.* 69(5):1443-1450. 査読有

- 7: Yasui H., Asanuma T., Kino J., Yamamori T., Meike S., Nagane M., Kubota N., Kuwabara M., and Inanami O. (2013) The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption. *BMC Cancer.* 13:106. 査読有
- 8: Saito K., Matsumoto S., Yasui H., Devasahayam N., Subramanian S., Munasinghe J.P., Patel V., Gutkind J.S., Mitchell J.B., and Krishna M.C. (2012) Longitudinal imaging studies of tumor microenvironment in mice treated with the mTOR inhibitor rapamycin. *Plos One.* 7(11): e49456. 査読有
- 9: Eitaki M., Yamamori T., Meike S., Yasui H., and Inanami O. (2012) Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC Cancer.* 12:469. 査読有
- 10: Yamamori T., Yasui H., Yamazumi M., Wada Y., Nakamura Y., Nakamura H., and Inanami O. (2012) Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.* 53(2):260-270. 査読有
- 11: Krishna M.C., Matsumoto S., Yasui H., Saito K., Devasahayam N., Subramanian S., and Mitchell J.B. (2012) Electron paramagnetic resonance imaging of tumor pO<sub>2</sub>. *Radiat. Res.* 177(4):376-386. 査読有
- 12: Indo H.P., Inanami O., Koumura T., Suenaga S., Yen H.C., Kakinuma S., Matsumoto K., Nakanishi I., St. Clair W., St. Clair D.K., Matsui H., Cornette R., Gusev O., Okuda T., Nakagawa Y., Ozawa T., and Majima H.J. (2012) Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic. Res.* 46(8):1029-1043. 査読有

〔学会発表〕(計44件)

- 1: “がん代謝標的薬剤ジクロロ酢酸処理後の腫瘍内酸素環境の経時的解析と放射線併用プロトコールの最適化” 安井博宣、齋藤圭太、西田直哉、松元慎吾、山盛徹、Murali C. Krishna、稲波修 第16回癌治療増感研究シンポジウム in 奈良県文

- 化会館 (奈良市, 奈良) 2014.2.7-8
- 2: "LONGITUDINAL ANALYSIS OF TUMOR OXYGENATION AFTER THE METABOLIC-TARGETED TREATMENT WITH DICHLOROACETATE USING PULSED ESR IMAGING" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. *The FIRST Joint International Symposium (Sapporo meeting)/ The 1st GI-CoRE Medical Science and Engineering Symposium* in Sapporo Park Hotel (Sapporo, Hokkaido) 2014.2.23-24
  - 3: "HSP90/ATM signalling pathway activates eNOS after ionizing radiation" Nagane M., Yasui H., Sakai Y., Yamamori T., Inanami O. *The FIRST Joint International Symposium (Sapporo meeting)/ The 1st GI-CoRE Medical Science and Engineering Symposium* in Sapporo Park Hotel (Sapporo, Hokkaido) 2014.2.23-24
  - 4: "Optimization of the metabolic-targeted radiosensitizing treatment by longitudinal analysis of tumor oxygenation" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. *The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR 2014)* in Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto) 2014.3.23-26
  - 5: "Ionizing radiation activated eNOS through HSP90/ATM pathway" Nagane M., Yasui H., Sakai Y., Yamamori T., Inanami O. *The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR 2014)* in Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto) 2014.3.23-26
  - 6: "The Role of HSP90 and ATM in the Radiation-Induced eNOS Activation." Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Sakai Y., Niwa K., Inanami O. *The 20th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine* in Grand Hyatt San Antonio (San Antonio, TX) 2013.11.20-24
  - 7: "The metabolic-targeted treatment with dichloroacetate transiently decreases tumor oxygenation in a murine squamous cell carcinoma model" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. *The 20th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine* in Grand Hyatt San Antonio (San Antonio, TX) 2013.11.20-24
  - 8: "パルス EPR イメージングを用いたがん代謝標的薬剤ジクロロ酢酸処理後の腫瘍内酸素環境の経時的解析" 安井博宣、齋藤圭太、西田直哉、松元慎吾、山盛徹、Murali Krishna、**稲波修** **第52回電子スピサイエンス学会年会** in 大宮ソニックシティ (さいたま市, 埼玉) 2013.10.24-26
  - 9: "電子スピン共鳴法を用いた酸素イメージングによる腫瘍内間欠的低酸素の描出とその意義" 安井博宣、松元慎吾、齋藤圭太、山盛徹、Murali C. Krishna、**稲波修** **日本放射線影響学会第56回大会** in クラウンパレス青森 (青森市, 青森) 2013.10.18-20
  - 10: "放射線により引き起こされる eNOS 活性化に対する ATM の関与" 永根大幹、安井博宣、山盛徹、丹羽光一、**稲波修** **日本放射線影響学会第56回大会** in クラウンパレス青森 (青森市, 青森) 2013.10.18-20
  - 11: 安井博宣 "ラットグリオーマ細胞における間欠的低酸素曝露による細胞周期調節を介した放射線抵抗性獲得機構" **第72回日本癌学会学術総会** in パシフィコ横浜 (横浜市, 神奈川) 2013.10.3-5
  - 12: "The assessment of mitochondrial-derived ROS production in X-irradiated tumor cells by ESR spin-trapping and oximetric methods" Yasui H., Yamamori T., Inanami O. *The 1st Sapporo Summer Seminar for One Health* in Hokkaido University (Sapporo, Hokkaido) 2013.9.25-26
  - 13: "Ionizing radiation upregulates endothelial nitric oxide synthase through ATM pathway" Nagane M., Yasui H., Suzuki M., Yamamori T., Inanami O. *The 1st Sapporo Summer Seminar for One Health* in Hokkaido University (Sapporo, Hokkaido) 2013.9.25-26
  - 14: 永根大幹、安井博宣、山盛徹、丹羽光一、**稲波修** "放射線による内皮型一酸化窒素合成酵素活性化における ATM および HSP90 の関与" **第156回日本獣医学会学術総会** in 岐阜大学 (岐阜市, 岐阜) 2013.9.20-22
  - 15: "放射線誘導性一酸化窒素の生成機構および放射線感受性の調節に関する研究" 永根大幹、安井博宣、山盛徹、中村秀夫、**稲波修** **第66回日本酸化ストレス学会学術集会** in ウィンクあいち (名古屋市, 愛知) 2013.6.13-14
  - 16: "放射線照射による内皮型一酸化窒素合成酵素活性化メカニズムの解析" 永根大幹、安井博宣、山盛徹、丹羽光一、**稲波修** **第19回癌治療増感研究会** in 東京医科歯科大学 (文京区, 東京) 2013.6.8
  - 17: "ラット C6 移植脳腫瘍における脳血液関門の破綻を介した低酸素性放射線増感剤ドラニダゾールの放射線増感効果"

- 安井博宣、浅沼武敏、木野潤一、永根大幹、久保田信雄、山盛徹、桑原幹典、**稲波修 第15回癌治療増感研究シンポジウム** in 猿沢荘 (奈良市, 奈良) 2013.2.9-10
- 18: “放射線誘導性一酸化窒素産生は固形腫瘍の放射線感受性を増加させる” 永根大幹、**安井博宣**、**山盛徹**、亀谷宏美、中村秀夫、**稲波修 第15回癌治療増感研究シンポジウム** in 猿沢荘 (奈良市, 奈良) 2013.2.9-10
- 19: “間欠的低酸素曝露後の細胞周期変化と放射線抵抗性への関与” **安井博宣**、中村吉就、永根大幹、**山盛徹**、**稲波修 第10回がんとハイポキシア研究会** in 横浜開港記念館 (横浜市, 神奈川) 2012.12.6-7
- 20: “Radiation-Induced Nitric Oxide Contributes to the Tumor Reoxygenation in SCCVII Tumors” Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S., Kuge Y., Tamaki N., Kameya H., Nakamura H., Inanami O. *The 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine* in Hilton San Diego Bayfront (San Diego, CA) 2012.11.14-18
- 21: “がんの放射線治療効率化に向けた ESR 技術の適用” **安井博宣**、松元慎吾、伊藤慎治、**山盛徹**、兵藤文紀、市川和洋、中村秀夫、内海英雄、Krishna M.C.、**稲波修 第51回電子スピサイエンス学会年会シンポジウム** in 札幌コンベンションセンター (札幌市, 北海道) 2012.11.1-3
- 22: “In vivo ESR oxymetry を用いた放射線照射による腫瘍の再酸素化動態の解析” 永根大幹、**安井博宣**、**山盛徹**、中村秀夫、**稲波修 第51回電子スピサイエンス学会年会** in 札幌コンベンションセンター (札幌市, 北海道) 2012.11.1-3
- 23: “固形腫瘍内における放射線誘導性再酸素化の動態の評価” 永根大幹、**安井博宣**、趙松吉、久保直樹、玉木長良、久下裕司、**稲波修 第52回日本核医学会学術総会/第32回日本核医学技術学会総会学術大会** in ロイトン札幌, ニトリ文化ホール (札幌市, 北海道) 2012.11.1-3
- 24: “Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint” Yamamori T., Yasui H., Yamazumi M., Wada Y., Nakamura H., Inanami O. *The 16th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research* in Imperial College London (London, United Kingdom) 2012.9.6-9
- 25: “放射線照射により生成される一酸化窒素は固形腫瘍の再酸素化に必須である” 永根大幹、**安井博宣**、**山盛徹**、趙松吉、

久下裕司、中村秀夫、**稲波修 第154回日本獣医学会学術総会** in 岩手大学 (盛岡市, 岩手) 2012.9.14-16

- 26: “放射線照射後に生成される一酸化窒素は固形腫瘍の再酸素化に関与する” 永根大幹、**安井博宣**、**山盛徹**、趙松吉、久下裕司、中村秀夫、**稲波修 第65回日本酸化ストレス学会学術集会** in あわぎんホール (徳島市, 徳島) 2012.6.7-8

他、共同演者として、18件。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://vetradserver.vetmed.hokudai.ac.jp/radiobiol/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲波 修 (INANAMI OSAMU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号: 10193559

### (2) 研究分担者

山盛 徹 (YAMAMORI TOHRU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号: 00512675

安井 博宣 (YASUI HIRONOBU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教  
研究者番号: 10570228