

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25220207

研究課題名(和文) in vivoイメージングプローブのデザイン・合成・生物応用

研究課題名(英文) Design, Synthesis, and Biological Application of in vivo Imaging Probes

研究代表者

菊地 和也 (Kikuchi, Kazuya)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：70292951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 173,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では機能性化学プローブをデザイン・合成し、生きた状態(in vivo)での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行った。成果としては、(1)パーフルオロカーボン内包シリカナノ粒子を用いた高感度¹⁹F MRIプローブを開発し、プローブのがん組織への集積、生体深部における酵素活性の検出、マルチカラーイメージングへと応用した。(2) pH応答性を有する機能性蛍光プローブを開発し、活性化した破骨細胞が酸を放出して骨を溶かす様子を生きたマウス体内で可視化することに成功した。これらの機能性分子プローブのデザインによって生物個体内の分子動態解析を可能とする新たなツールを提供するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した化学プローブは、生きた動物個体内で起こる細胞や分子の機能を理解するための有用なツールとなりうる。特に、¹⁹F MRIを利用した生体深部における酵素活性の検出や、破骨細胞によって骨が溶解する様子は本研究で開発した化学プローブによって初めて観察できたものである。これらの化学プローブを用いて、動物個体内での生理機能や薬剤に対する応答の詳細な解析が今後期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed and synthesized functional chemical probes for visualization of physiological phenomena in living animals. (1) We developed highly sensitive ¹⁹F MRI nanoprobes composed of perfluorocarbon-encapsulated silica nanoparticles. We used the nanoprobes for visualization of tumor tissue, detection of enzyme activity, and multicolor imaging. (2) We developed pH-responsive fluorescent probes for imaging acidic pH regions in bone tissue during osteoclastic bone resorption. The real-time images revealed actual behaviors of activated osteoclasts in living mice. These functional molecular probes provide new tools for analyzing dynamics and function of biomolecules in vivo.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：in vivoイメージング 化学プローブ 分子イメージング MRI 破骨細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、蛍光プローブの開発により生物機能を明らかにし、さらにスイッチング機能を有する MRI プローブを開発し生体深部での酵素活性を可視化することに成功している。これらのイメージングプローブの開発によって他の技術では見えない分子機能を可視化してきた。この過程で、実際の生物試料において汎用的に使用できるプローブ開発の重要性を実感し、応用範囲の広い蛋白質ラベル化と高感度 MRI プローブ作成に着手した。その発展として今回、本研究によってはじめて可能となる *in vivo* 可視化解析法を企画した。

現在使われているイメージングプローブは蛍光蛋白質 (Fluorescent Protein, FP) を用いる場合が殆どであり、その発現タイミングや発現強度の制御は容易ではない。このため、詳細な時間と局在解明に対応した技術を創り出す研究は皆無であった。この状況下、研究代表者は測定したい分子との反応に着目して化学プローブをデザインするという発想を基に、時間を特定して標的蛋白質に蛍光団を導入する原理を開発し、分子認識あるいは酵素反応を分光情報（蛍光特性変化・NMR 緩和時間変化）へと変換できるプローブをデザイン・合成し、生物応用に成功してきた。本研究ではさらに、動物個体 (*in vivo*) への応用を可能とするよう化学プローブの機能を向上させ、出口の見える基礎研究を推進する (図 1)。

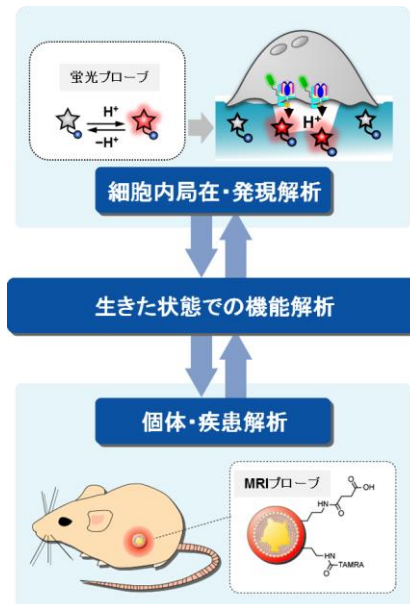


図 1. 化学プローブによる *in vivo* イメージング解析

2. 研究の目的

本研究では機能性小分子プローブをデザイン・合成し、生きた状態での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行う。この目的のため、*in vivo* における可視化解析のための化学原理を精査し、生命科学研究に応用可能なスペックにみあう分子プローブ開発を行う。具体的には、

(1) *in vivo* における細胞動態や酵素活性を可視化する MRI プローブ開発、(2) 蛍光プローブの高機能化と細胞機能解析を行う。

(1) *in vivo* における細胞動態や酵素活性を可視化する MRI プローブ開発

^{19}F を核種とした ^{19}F MRI は汎用される ^1H MRI に次ぐ感度を有し、また生体内に F 原子がほとんど存在しない。そのため、投与した ^{19}F MRI 造影剤の局在を内在性バックグラウンドシグナルの影響なしに生体深部でイメージングできる。しかしながら、これまでの小分子化合物による ^{19}F MRI プローブは *in vivo* での感度が低く応用限界があった。そこで、MRI の問題点である感度を向上させるために、多数の ^{19}F 化合物を含有したナノ粒子型の MRI プローブの開発を行う。また、プローブの機能化を行うことで酵素活性の検出、体内動態の制御を試みる。

(2) 蛍光プローブの高機能化と細胞機能解析

機能性の蛍光プローブを開発することで、*in vivo* における細胞機能を解析する技術を開発する。特に、骨を溶かす細胞である破骨細胞の活性検出に取り組む。破骨細胞は骨代謝に重要な役割をしている細胞であり、その異常な活性は骨粗しょう症やリウマチのような疾患につながる。現在、骨疾患の診断には X 線 CT や生化学的な骨代謝マーカーが利用されているが、これらの技術では骨格の空間情報と細胞活性とを結び付けることはできない。また、骨粗鬆症治療薬のアッセイとして象牙上で破骨細胞の培養を行い、象牙へのこみを計測する方法が利用されているが、*in vitro* の実験系のため、生体内における破骨細胞の活性をリアルタイムで追跡することはできなかった。そこで、骨を溶かす際に破骨細胞が作る低 pH 環境に着目し、pH 感受性の蛍光プローブを開発する。この技術の応用により、*in vivo* における破骨細胞や蛋白質の機能をイメージング解析する。

これらの課題に対し、生物個体における細胞挙動あるいは細胞内機能挙動を観察できる化学ツールの設計法を確立する。この展開を行うことで、有機合成が得意とする多様な標的への分子設計と、分子生物学技術を融合させることができ、これまでにない機能性小分子デザイン法が確立されるものと期待する。本研究で開発した化学プローブが新技術の端緒を拓くことで、生命動態研究のニーズに基づいた融合研究へと展開し、初めて可能となる時空間を特定した観測技術を創出・応用する。細胞あるいは個体内において生体内分子は、その生理機能が発揮される特殊な生体組織や個体発生上の特殊な時間に発現している。この細胞挙動と蛋白質機能を時間と空間を制御して可視化し、最終的にはその機能解明を行うことを目的とする。このため、化学の手法を用いてプローブ分子をデザイン・合成し、生きた状態における生理活性分子がいつ・どこで・どのぐらい強さの活性を持ちうるかについて作用解析を行う。この結果、生物個体内の分子動態解析が可能となり、*in vivo* へ展開することで、生物学における新たな知見を見出し、問題解決に応用できるものとする。

3. 研究の方法

(1) in vivo における細胞動態や酵素活性を可視化する MRI プローブ開発

高感度 ^{19}F MRI プローブの開発においては1分子内にフッ素を20個有する perfluoro 15-crown-5 ether (PFCE)などのパーフルオロカーボン脂質により内包し、その周りをシリカで被覆することで調製した。さらに表面を化学修飾し in vivo における血中滞留性向上や、スイッチング機能を付与した。これらのナノ粒子型 MRI プローブの構造は、透過型電子顕微鏡により確認した。また、酵素活性を可視化するために、プローブと酵素を混合した後に MRI ファントム像を撮像し、スイッチング機能を有しているかどうかを評価した。in vivo イメージング実験として、プローブをマウスに投与し、MRI による撮像を行うことでプローブの体内動態の評価、ならびに生体内における酵素活性の検出を行った。

(2) 蛍光プローブの高機能化と細胞機能解析

破骨細胞の機能を解析するため、骨を溶かす pH 環境下で蛍光が上昇する pH 感受性の低分子蛍光プローブを設計・合成した。これらのプローブの pH に依存する蛍光スイッチング能、光安定性などの機能を蛍光測定により評価した。その後、マウスを生かした状態で二光子励起顕微鏡によるイメージングを行い、標的とする骨組織への送達能、in vivo 環境下での pH 応答性、二光子励起顕微鏡観察下での光安定性を評価した。

4. 研究成果

(1) 高感度 ^{19}F MRI プローブの開発

^{19}F MRI プローブの問題点である低感度を克服するため、ナノ粒子型 ^{19}F MRI 造影剤 FLAME (FLuorine Accumulated silica nanoparticle for ^{19}F MRI Enhancement) を開発した。FLAME は PFCE が脂質により内包され、周りがシリカで被覆された構造である。1 ナノ粒子内に液体として運動性を保った PFCE を 10^6 個のオーダーで含むため感度が高く、安定で表面修飾が可能であるといった利点を有する。このナノ粒子はマウス投与後もプローブの局在に由来するシグナルを得ることができ、高感度化に成功した。また、担癌マウスへの投与により、癌組織へのプローブの集積を可視化することができた(図2) (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1008 (2014))。また、FLAME のシリカ表面を多孔質のメソポーラスシリカで被覆し、薬剤を取り込ませることで、 ^{19}F MRI シグナルを基にした診断検出とドラッグキャリアを兼ね備えた材料としての応用を示した (*Chem. Sci.* 6, 4934 (2015))。

さらに本課題では、生体内における環境変化や酵素活性を検出する高感度 ^{19}F MRI プローブの開発に取り組んだ。常磁性緩和促進 (PRE) 効果による OFF/ON スwitching 機構に基づき、FLAME 表面上に還元条件下で切断が起こるジスルフィド結合を介し Gd^{3+} 錯体を修飾したプローブをデザインした。プローブデザインにあたり、PRE 効果の距離依存性 (^{19}F と Gd^{3+} の 50% の効果距離は約 4 nm) により、表面のシリカの厚みが 5 nm ある FLAME では効果が現れないことが危惧されたが、 Gd^{3+} 錯体を FLAME に修飾し、20 nm 離れていても PRE 効果による緩和時間 (T_2) の短縮が観測された。また、還元剤の投与により ^{19}F MRI シグナルの回復が観察された (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007 (2015))。この成果から、プローブの ^{19}F MRI シグナルは一時的に消失しているが、ジスルフィド結合が切断され Gd^{3+} 錯体が FLAME 表面から解離することで ^{19}F MRI シグナルが回復すると期待した。続いて、切断される部位を免疫応答に関与するカスパーゼ-1

酵素基質に置き換えたプローブをデザインした。酵素反応後に ^{19}F MRI シグナルの増大が確認され、マウス体内の免疫応答の可視化に成功した (*Chem. Commun.* 54, 11785 (2018))。さらに本検出メカニズムをカスパーゼ 3/7 に対して応用し、FLAME 表面上にカスパーゼ-3/7 基質を有するプローブ、FLAME-DEVD X (X=1, 2) を設計した (図 3a)。特に、タンデムに酵素基質をつなげる設計を施すことで、カスパーゼ 3/7 処理後、 ^{19}F MRI シグナルのより大きな変化が観察された。この結果は、基質をタンデムに連結することでナノ粒子表面へ酵素が近づきやすくなり、基質が切断される確率が向上したものと考えられる。本プローブを用いて、マウスの脾臓で起こるアポトーシスに伴いカスパーゼ 3/7 活性が上昇する様子を in vivo で検出することに成功した (図 3b, c) (*Bioconjugate Chem.* 29, 1720 (2018))。

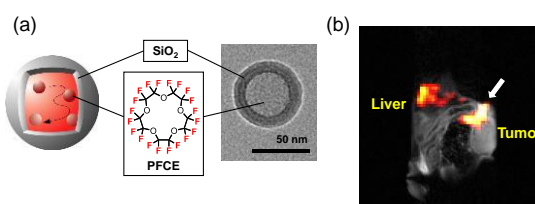


図 2. (a) FLAME の構造と TEM 像 (b) FLAME を用いた担癌マウスの ^{19}F MRI

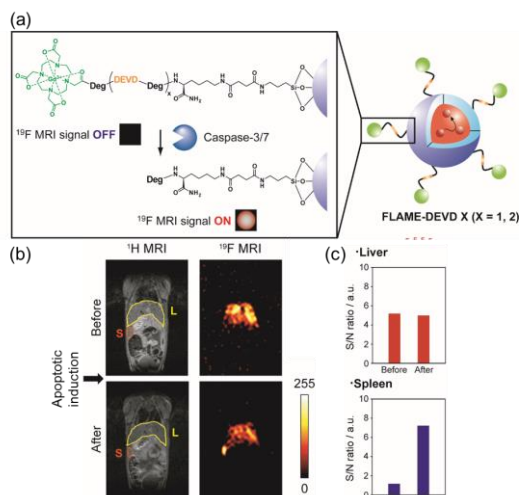


図 3. (a) FLAME-DEVD X の構造 (b) アポトーシス誘導時の ^{19}F MRI 画像 (c) マウス肝臓と脾臓における FLAME-DEVD 2 由来 ^{19}F MRI シグナル

さらに、FLAME を用いたマルチカラーイメージング法の開発に着手した。マルチカラーイメージングは複数の生体分子、細胞由来のシグナルを同時に検出できる有用なツールである。MRI は組織深部への透過性に優れているため、組織深部を高い空間解像度でマルチカラーイメージングが可能である。特に、フッ素化合物の化学シフトは広範囲にわたっており、特有のピークを選択、励起することでマルチカラーイメージングが達成可能である。FLAME のコアに内包する PFC として、下記の PFCE、TPFBME、PFTBA を選択した。これらの化合物は常温で液体であり、それぞれの ^{19}F NMR スペクトルから、選択的に励起可能なピークを有していることが確認された。

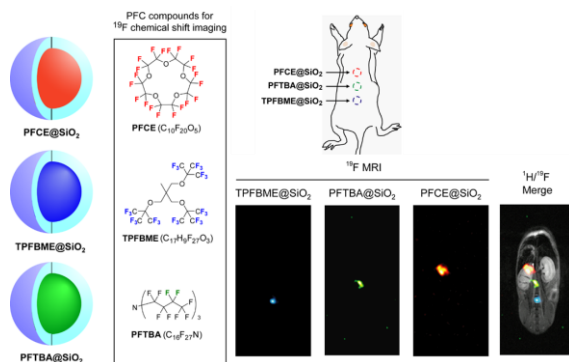


図 4. ^{19}F MRI ナノプローブを用いたマルチカラーイメージング

これらの PFC を用いて 3 種の FLAME の作製を行い、コアシェル型のナノ粒子が生成していることを確認した。これらのナノ粒子をマウスに皮下注射し、各 PFC 特有のピークを選択的に励起・撮像することで 3 色のマルチカラー画像を得ることに成功した (図 4)。

本手法の応用として、FLAME ナノ粒子表面の化学修飾が肝臓への取り込みに与える影響を 1 匹のマウスに 3 色の異なるナノプローブを投与して評価した。それぞれ表面にヒドロキシ基、カルボキシ基、ポリエチレングリコール (PEG) 基を有するナノプローブを作製し、マウスに静脈注射で投与後、MRI 画像を取得した。プローブ由来のシグナル強度を補正、定量した結果から、PEG で表面修飾されたナノ粒子において肝臓への取り込みが最も抑えられていることが示された (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007 (2018))。

以上の結果より、ナノプローブによる ^{19}F MRI イメージングは生体内における酵素活性、細胞動態、細胞間コミュニケーションを探るためのツールとして応用可能であることを示した。

(2) 蛍光プローブの高機能化と細胞機能解析

In vivo における細胞機能の解析を目指し、骨組織を溶解する破骨細胞活性を検出する蛍光プローブの開発に取り組んだ。骨吸収時、局所の pH 環境は約 4.7~6.8 まで下がることが知られているため、酸性条件下で蛍光 ON となるスイッチ機能を持った小分子プローブにより、破骨細胞活性を検出できると考えた。pKa = 4.5~6.0 で蛍光の OFF/ON 応答を示すプローブを開発することで、中性状態では消光し、破骨細胞が活性し骨を溶解する時のみ発蛍光性になると考え、蛍光プローブを設計した。また、生体内の破骨細胞活性を検出するためには、破骨細胞が存在する骨組織にプローブを送達させる必要があるため、骨組織に対して強く結合するビスホスフォネート基に着目し、蛍光プローブの分子構造に導入した。その結果、ビスホスフォネート基による骨組織への能動輸送能を有する pH 感受性プローブ” pHocas” (pH-activatable fluorescence probe for osteoclast activity sensing) を合成した (図 5)。このプローブをマウスに投与し、二光子励起顕微鏡を用いて骨組織における低 pH 領域の観察を行った。pHocas は光安定性の高いプローブであるため、二光子励起顕微鏡観察下で、長時間に渡り破骨細胞活性を可視化することが可能となった。破骨細胞自身を蛍光タンパク質によってラベル化し、pHocas で破骨細胞の活性化を検出することで、イメージングによる細胞動態のリアルタイム解析を行ったところ、骨吸収中の破骨細胞には、①あまり動かず酸性領域を広げて骨を溶かす細胞と、②刻々と形を変えながら酸性領域と共に動いている細胞が存在することを、明らかにした (*Nat. Chem. Biol.*, 12, 853 (2016))。また、本プローブを用いることで、破骨細胞と骨芽細胞の相互作用による骨吸収活性の動態解析、ならびに薬剤やリガンド投与による破骨細胞活性の定量的解析への応用を示した。

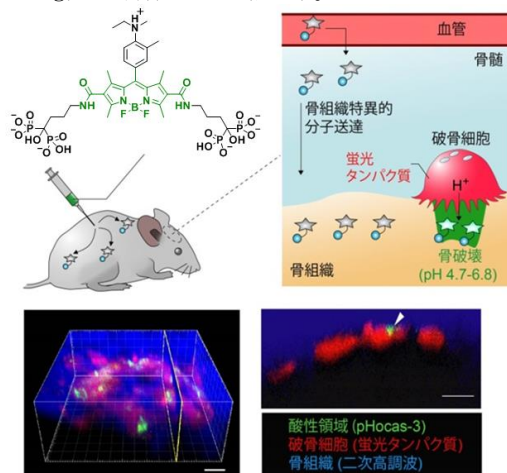


図 5. pH 感受性プローブ pHocas を用いた破骨細胞活性の in vivo イメージング

さらに、緑色蛍光プローブに加え、より組織透過性に優れた赤色蛍光を有するプローブの開発に取り組んだ。新たな蛍光色素としてローダミンのスピロラクタム体に着目した。ラクタムのスピロ環化が pH により変化することを利用し、低 pH で蛍光性の開環体となるローダミン色素群を合成、評価した。ラクタムの窒素上置換基がスピロ環化反応に影響を及ぼしており、pH 応答性においては置換基の高さ、応答速度においては置換基の電子求引性が寄与していると考えられた。特に、置換基としてトリフルオロエチル基を有する色素が速い応答速度を示したため、この色素にビスホスフォネート基を導入し、赤色蛍光を示す pH 応答性蛍光プローブ、

“Red-pHocas” を合成した (図 6)。Red-pHocas を用いて、マウス体内における骨組織の低 pH 領域の検出・追跡を行った。二光子励起顕微鏡を用いて、マウスの骨髓腔を観察したところ、同様に骨組織表面の一部からプローブ由来の蛍光シグナルが見られ、低 pH 環境を選択的に可視化できていることが示された。さらに、プロトンポンプを GFP (緑色蛍光タンパク質) で標識したマウスを用いて、開発した赤色蛍光プローブとのマルチカラーイメージングを行ったところ、プロトンポンプの集積化に伴い、酸性領域が広がっていく様子を捉えることに成功した。実際にプロトンポンプの機能を阻害する薬剤を投与したところ、投与後徐々に蛍光が減衰していく様子を観察することができた。この結果より、*in vivo* において細胞膜上の蛋白質 (プロトンポンプ複合体) が機能している様子をその動態と共に観察し、解析することが可能となった (*ACS Cent. Sci.* in press, (2019))。

以上の結果より、本研究によって *in vivo* における破骨細胞ならびに蛋白質の動態と機能をイメージングによって明らかとすることができ、骨吸収メカニズムの解明につながる成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 44 件) 全て査読有

- (1) M. Minoshima, J. Kikuta, Y. Omori, S. Seno, R. Suehara, H. Maeda, H. Matsuda, M. Ishii, & *K. Kikuchi, “In Vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps”, *ACS Cent. Sci.*, in press (2019). DOI: 10.1021/acscentsci.9b00220
- (2) K. Akazawa, F. Sugihara, T. Nakamura, H. Matsushita, H. Mukai, R. Akimoto, M. Minoshima, S. Mizukami, & *K. Kikuchi, “Perfluorocarbon-based ^{19}F MRI Nanoprobes for In Vivo Multicolor Imaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 16742–16747 (2018). DOI: 10.1002/anie.201810363
- (3) Y. Hori, N. Otomura, A. Nishida, M. Nishiura, M. Umeno, I. Suetake, & *K. Kikuchi “Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation” *J. Am. Chem. Soc.* 140, 1686–1690 (2018). DOI: 10.1021/jacs.7b09713
- (4) R. Sato, J. Kozuka, M. Ueda, R. Mishima, Y. Kumagai, A. Yoshimura, M. Minoshima, S. Mizukami, & *K. Kikuchi “Intracellular Protein-Labeling Probes for Multicolor Single-Molecule Imaging of Immune Receptor-Adaptor Molecular Dynamics” *J. Am. Chem. Soc.* 139, 17397–17404 (2017). DOI: 10.1021/jacs.7b08262
- (5) S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki, & *K. Kikuchi, “Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-glycosylation in Intracellular Trafficking”, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 853–859 (2016). DOI: 10.1038/nchembio.2156
- (6) H. Maeda, T. Kowada, J. Kikuta, M. Furuya, M. Shirazaki, S. Mizukami, *M. Ishii & *K. Kikuchi, “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity”, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 579–585 (2016). DOI: 10.1038/nchembio.2096.
- (7) T. Nakamura, H. Matsushita, F. Sugihara, Y. Yoshioka, S. Mizukami & *K. Kikuchi, “Activatable ^{19}F MRI Nanoparticle Probes for the Detection of Reducing Environments”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007–1010 (2015). DOI: 10.1002/anie.201409365
- (8) T. Nakamura, F. Sugihara, H. Matsushita, Y. Yoshioka, S. Mizukami & *K. Kikuchi, “Mesoporous Silica Nanoparticles for ^{19}F Magnetic Resonance Imaging, Fluorescence Imaging, and Drug Delivery”, *Chem. Sci.*, 6, 1986–1990 (2015). DOI: 10.1039/C4SC03549F
- (9) H. Matsushita, S. Mizukami, F. Sugihara, Y. Nakanishi, Y. Yoshioka & *K. Kikuchi, “Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ^{19}F MRI”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1008–1011 (2014). DOI: 10.1002/anie.201308500
- (10) Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, S. Shirakawa & *K. Kikuchi, “Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins”, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12360–12365 (2013). DOI: 10.1021/ja405745v, *JACS* Highlight Paper

[学会発表] (計 243 件) うち招待講演 40 件

- (1) K. Kikuchi, “In Vivo Chemical Probes for MRI and Fluorescence Imaging”, 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC9), 9–14 December 2018, Singapore. (Plenary Lecture)

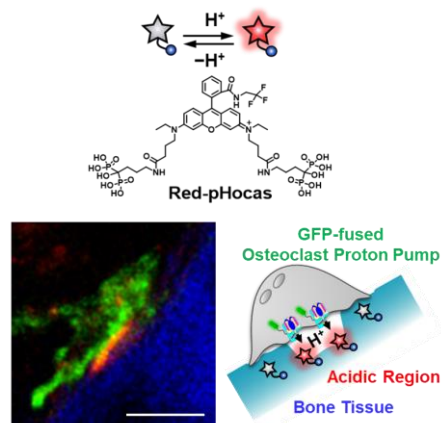


図 6. Red-pHocas による破骨細胞プロトンポンプ機能の *in vivo* イメージング

- (2) K. Kikuchi, “Tunable In Vivo Imaging Probes with Functional Metal Complex Switches” *14th International Conference on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC14)*, 7–10 June, 2017, Toulouse, France.
- (3) K. Kikuchi, “Challenges in Development of Chemical Probes in vivo Fluorescence and Magnetic Resonance Imaging”, *Challenges for Chemistry in Molecular Imaging, Royal Society of Chemistry*, 21, March, 2017, London, England.
- (4) K. Kikuchi, “Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches”, *Molecular Sensors & Molecular Logic Gate 2016*, 24–28 July, 2016, Bath, U.K.
- (5) K. Kikuchi, “Highly Sensitive ^{19}F MRI Probes with Tunable Chemical Switches Using Metal Complexes”, *ICBIC-17, International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, 20–24 July, 2015, Beijing, China.
- (6) K. Kikuchi, “Development of Multifunctional ^{19}F MRI Contrast Agents with Fluorine-encapsulated Silica Nanoparticle”, *13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC13)*, 12–15 June, 2015, Galway, Ireland.
- (7) K. Kikuchi, “Development of Highly Sensitive ^{19}F MRI Probes with Tunable Chemical Switches”, *Gordon Research Conferences, Metals in Medicine*, 22–27 June, 2014, Andover NH, U.S.A.
- (8) K. Kikuchi, “Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches”, *Labeling and Nanoscopy*, 24–26 September, 2014, Heidelberg, Germany.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：メチル化DNAを蛍光標識する方法

発明者：菊地和也、堀雄一郎、乙村法道

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願 2014-158061

出願年：2014 年

国内外の別：国内

○取得状況 (計 4 件)

名称：メチル化DNAを蛍光標識する方法

発明者：菊地和也、堀雄一郎、乙村法道

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特許第 6274632 号

取得年：2018 年

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：堀 雄一郎

ローマ字氏名：(HORI, Yuichiro)

研究協力者氏名：杉原 文徳

ローマ字氏名：(SUGIHARA, Fuminori)

研究協力者氏名：蓑島 維文

ローマ字氏名：(MINOSHIMA, Masafumi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。