

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450455

研究課題名(和文)メタボローム解析を用いた犬の糖尿病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Metabolome study on mechanism of canine diabetes onset

研究代表者

田崎 弘之(Tazaki, Hiroyuki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：80231405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬とヒトでは糖尿病発症メカニズムが大きく異なっていると考えられている。本研究では、犬筋管様細胞を主たる材料に、インスリン抵抗性に続き糖尿病を発症することが報告されている犬の副腎皮質機能亢進症(HAC)と、インスリン抵抗性が生じるものの糖尿病の発症が報告されていない犬の肥満との違いを代謝産物レベルを中心に比較し犬の糖尿病発症の特性を解析することを目的とした。その結果、HACのモデルとしたデキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞と、肥満のモデルとしたTNF- $\alpha$ を追加した細胞との代謝産物の比較から、同じインスリン抵抗性であっても異なる代謝産物の増加と減少を見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to analyse the characteristic metabolites of the diabetes onset in the dog and compare the difference between the hyperadrenocorticism (HAC) of the dog which reported in that diabetes develops following insulin resistance and the obesity of the dog. In canine myotube-like cell which added dexamethasone, glucose uptake ability was inhibited, and a catabolic reaction of the glucose tended to decrease. On the other hand, with canine myotube-like cells which added TNF- $\alpha$ , L-alanine, L-isoleucine, and L-valine levels significantly increase, and it is thought that it is action to compensate insulin resistance. Difference of these metabolites between HAC and obesity shows the cause that the HAC of the dogs leads to the diabetes onset, and the cause that the obesity of the dogs does not lead to diabetes. Thus, these results may be useful for further study of the diabetes onset mechanism in dogs.

研究分野：農学

キーワード：糖尿病 副腎皮質機能亢進症 肥満 メタボローム解析 BCAA TNF- $\alpha$  犬

### 1. 研究開始当初の背景

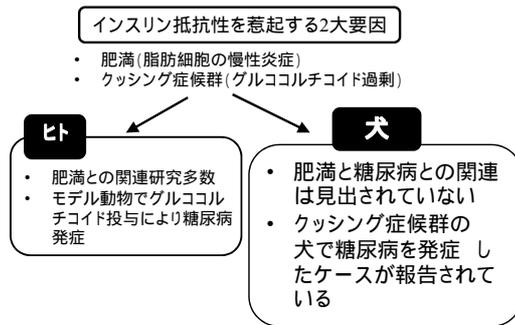
日本糖尿病学会では、「糖尿病はインスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群である」と定義しており、慢性の高血糖を引き起こす成因は非常に不均一である。これらの成因を明らかにするために医学領域では、モデル動物である齧歯類を用いた *in vitro* および *in vivo* の研究が盛んに行われており、発症に関わるタンパク群の発見、それらタンパク群の機能の解明とインスリン抵抗性あるいは糖尿病を発症したマウスにおける病態解明が進められてきた。しかし、犬の糖尿病は背景が異なり、ヒトで2型糖尿病の主な原因となる肥満は、犬ではインスリン抵抗性を引き起こすが糖尿病に推移することはまれである[1]。さらに、犬では主にみられる糖尿病は膵臓細胞が機能していない1型糖尿病である。Versetらは犬の肥満によって引き起こされたインスリン抵抗性と、ヒトでインスリン分泌を亢進させる働きを持つ Adiponectin, Leptin, Glucagon-like peptide-1 について、肥満した犬と健常な犬の血液を比較したところ直接的な関連が見出せなかったとしている[2]。その一方、医学領域の研究でインスリン抵抗性惹起物質として知られるグルココルチコイドは犬でも同様のインスリン抵抗性を発現させ、さらには病的な高グルココルチコイド血症(クッシング症候群)の犬で糖尿病の発症に進行したケースが報告されている[3, 4]。

これまで申請者らは、犬の末梢白血球における細胞内インスリンシグナリング遺伝子の発現量は腹腔内脂肪と同程度であることを明らかとした。これを応用して内因性のグルココルチコイド過剰症であるクッシング症候群の犬の末梢白血球においてインスリンシグナリング遺伝子発現が低下していることを見出した。さらに、クッシング症候群の犬では健常の犬に比べて末梢組織での糖取り込みが有意に低下していることも明らかにした。本研究は、肥満が惹起するインスリン抵抗性とクッシング症候群が惹起するインスリン抵抗性の違いに着目することで、犬のインスリン抵抗性の発現および糖尿病への発症メカニズムを解明することを目的にした。また、犬の肥満と糖尿病の関係性を明らかにすることで、ヒト医学領域における肥満糖尿病の抑制に関わる基盤形成につながると考えた。

### 2. 研究の目的

犬では、先天的異常がない場合、糖尿病の発症には何らかの因子がインスリン抵抗性を増大させ膵臓β細胞を疲弊させると考えられている。中でも、肥満とクッシング症候群はインスリン抵抗性の二大要因と考えられている(図)。しがしながら、図に示すように犬とヒトでは糖尿病発症の状況が少し異なってくる。そこで本研究は、1) 2つの要因が惹起するインスリン抵抗性を分子

レベルで解明することで犬特有の糖尿病発症メカニズムを明らかにする、2) 肥満した犬での糖尿病の発症を回避する補償作用を明らかにする、3) ヒトで肥満による糖尿病を抑制する候補因子を抽出することを目的とした。



### 3. 研究の方法

(1) 副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量の解析

本研究の対象としている HAC 症例犬におけるインスリンシグナリング遺伝子の発現に及ぼすグルココルチコイドの影響を明らかにすることを目的として、その影響評価に末梢白血球を利用できるか検討した。単球や好酸球は絶対量が少なく、リンパ球はグルココルチコイド製剤の投与によって末梢血中で減少するため解析には不向きであり、定量に充分な量を確保できるという利点を有する末梢血中の好中球を用いて検討を行った。

(2) デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析

末梢血単核球を使用して、グルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンの添加による、細胞内へのグルコース取り込み能と取り込み後の細胞内代謝産物の影響について検討した。グルコース取り込み能は、2-デオキシ-D-グルコース(2-DG)の細胞内への取り込み量で評価した。2-DGはグルコースの2-ヒドロキシル基が水素原子に置換した構造を持ち、グルコーストランスポータによって取り込まれリン酸化により2-デオキシグルコース-6-リン酸(2DG6P)までは代謝が進むが、その次の酵素反応には進まず細胞内に留まるため、細胞内の2DG6Pを定量することによりグルコース取り込み能を評価することができる。また、細胞内代謝産物の測定については、代謝産物を網羅的に定性、定量できるキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(Capillary Electrophoresis - Time of Flight-Mass Spectrometer: CE-TOF-MS)を使用した。

(3) デキサメサゾンおよび TNF-α が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシグナリング遺伝子発現に及ぼす影響の解析

犬の正常骨格筋細胞を用い、グルココルチ

コイド製剤であるデキサメサゾンと、ヒトにおいて肥満により高値を示し、インスリン抵抗性を惹起する腫瘍壊死因子- (TNF-) の影響を *in vitro* で検討した。

まず、デキサメサゾン、TNF- を犬骨格筋培養細胞の培地に添加し、代謝産物を分析し、影響を解析した。代謝産物のアミノ酸 20 種、脂肪酸 14 種、有機酸 11 種についてそれぞれ異なる誘導体化後にガスクロマトグラフ質量分析計 ( Gas Chromatograph-Mass Spectrometer: GC-MS ) で定量を行った。また、糖と糖リン酸 9 種については液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 ( Liquid Chromatograph tandem Mass Spectrometer: LC-MS/MS ) を用いて定量を行った。

次にデキサメサゾン、TNF- を犬骨格筋培養細胞の培地に添加し、糖取り込み能の評価とインスリンシグナリング遺伝子に及ぼす影響を解析した。2-DG の細胞取り込み後の代謝産物である 2-デオキシグルコース-6-リン酸 ( 2DG6P ) について、LC-MS/MS により定量を行うことで、糖取り込み能が評価できるか検討した。さらに糖取り込み能の評価に最適なインスリン濃度を求めたのち、デキサメサゾンと TNF- の影響を検討した。また、インスリンシグナリング遺伝子である IRS-1、PI3-K、Akt2 の mRNA 量を定量 PCR 法によって測定した。

( 4 ) 健康犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物変動の比較

アミノ酸の変動がインスリン作用低下の指標、すなわちインスリン抵抗性の指標になると考え、膵細胞からのインスリン分泌の有無を調べるために獣医療臨床でも実施されている静脈内糖負荷試験により間接的にインスリンの一過性上昇を生じさせ、この時の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中アミノ酸の変動を比較することにした。

( 5 ) 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較検討

副腎皮質機能亢進症 ( HAC ) の犬と、肥満の犬を比較することで、HAC の慢性的なグルココルチコイドの過剰環境によるインスリン抵抗性から糖尿病に進行するメカニズムについての新たな知見を得ることを目的とした。血清検体を用いて、( 4 ) までに個体レベルおよび細胞レベルで変動の認められた代謝産物のアミノ酸と脂肪酸をガスクロマトグラフ質量分析計 ( Gas Chromatograph-Mass Spectrometer: GC-MS ) で定量した。また、獣医療臨床でも行われている血液生化学パラメータについても測定した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) 副腎皮質機能亢進症の犬における末梢

血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量の解析

グルココルチコイドが犬に及ぼす影響を明らかにするために、その影響を評価するのに末梢血白血球を利用できるか検討した。定量 PCR 法により、末梢血白血球を用いて、HAC 症例犬と健康犬のインスリンシグナリング遺伝子として IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2、PKC- の mRNA 発現量を測定した。末梢血好中球における IRS-1 の遺伝子発現量は HAC untreated 群、HAC treated 群ともに軽度の低下傾向を示した。IRS-2、PI3-K、Akt-2 の遺伝子発現量は HAC untreated 群、HAC treated 群の両群ともに Control 群の約半分に低下し、HAC treated 群での差は統計学的に有意であった。インスリンシグナリングのダウンレギュレーションは、ヒトやげっ歯類のグルココルチコイドによるインスリン抵抗性の原因と考えられており、副腎皮質機能亢進症の犬においても同様であることが明らかになった。

従って、グルココルチコイドが及ぼす影響を検討するのに末梢血白血球を利用することは妥当であると考えられる。

( 2 ) デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析

グルココルチコイドが犬の末梢血単核球の細胞内代謝物質にどのような影響を及ぼすかについて検討した。健康な犬から単離した、末梢血単核球の培養液中にデキサメサゾンを添加し、48 時間培養後の細胞内代謝産物を CE-TOF-MS により分析し、解析した。デキサメサゾンを添加することで CnPBMCs における ATP 産生の減少が示された。デキサメサゾンを添加すると CnPBMCs のグルコース-1-リン酸は 1.29 倍、グルコース-6-リン酸は 2.04 倍、フルクトース-6-リン酸は 2.16 倍、セドヘプトロース-7-リン酸は 1.41 倍、アセチル-CoA は 1.25 倍有意に高値を示し、ピルビン酸は 0.67 倍有意に低値を示し、パスウェイ解析の結果からも、主に TCA サイクルおよび解糖系 / 糖新生経路に変化を認めた。

糖新生経路上流の代謝産物の増加傾向と、TCA サイクル中間体、ピルビン酸の減少傾向から、デキサメサゾンの添加によって培養犬末梢血単核球におけるグルコースの異化作用が減少したということが考えられる。さらに、デキサメサゾンによる糖取り込み能の変化は培養犬末梢血単核球で認められず、また細胞内での糖異化作用が減少していることから、細胞内のグルコース濃度が維持され、細胞への糖取り込みが不要であり、高血糖を招きやすい状態にあることが考えられる。犬の末梢血単核球での代謝産物の解析は、生体におけるグルコース代謝障害を反映し、グルココルチコイドによって誘発される糖尿病発症に関する評価法として有用となる可能性が考えられた。

(3) デキサメサゾンおよび TNF- $\alpha$  が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシグナリング遺伝子発現に及ぼす影響の解析

犬骨格筋細胞の分化誘導により得られた筋管様細胞を用いてデキサメサゾンと TNF- $\alpha$  が細胞内代謝産物、糖取り込み能およびインスリンシグナリング遺伝子発現量に及ぼす影響を検討した。1  $\mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾン含有 DMEM と 2 ng/mL の TNF- $\alpha$  含有 DMEM をそれぞれ 4 日間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$  の湿潤条件下にて培養し、培養中は 24 時間毎に新鮮なデキサメサゾン含有培地あるいは TNF- $\alpha$  含有培地に交換することで細胞におけるインスリン抵抗性誘導を行った。代謝産物の測定には、GC-MS、LC-MS/MS を使用し、20 種のアミノ酸と 14 種の脂肪酸、20 種の解糖系 / 糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物を測定した。糖取り込み能の評価は取り込まれた 2-DG が細胞内ヘキソキナーゼにより変換され生じる 2DG6P 量を LC-MS/MS にて測定し、インスリンシグナリング遺伝子である IRS-1、PI3-K、Akt2 の発現量は定量 PCR 法にて測定した。

デキサメサゾンの添加では多くの代謝産物の減少が観察され、糖の取り込み能は減少傾向を示した。糖の取り込み能が減少し、かつ細胞内代謝産物量が減少するということは、細胞におけるグルコースの異化作用が減少していることを示唆する。また、特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の減少は著しく、これはグルココルチコイドによる細胞内 BCAA の分解促進と、細胞内への BCAA 輸送の減少の 2 つの作用により細胞内 BCAA の低下が生じたと考えられた。細胞内 BCAA 量の低下はタンパク質翻訳系も抑制することから、細胞内の代謝産物は減少し、筋の萎縮が起こることが知られている。骨格筋は生体において最大の糖取り込み器官であることから、デキサメサゾンにより生じる筋萎縮は糖取り込み量の減少に繋がり、HAC において高血糖を引き起こす要因の一つとなると考えられる。

TNF- $\alpha$  の添加では、細胞中の  $\alpha$ -アミノイソ酪酸の顕著な増加を認め、IRS-1 遺伝子発現量に減少傾向は見られたものの、糖の取り込み能に変化は認められなかった。 $\alpha$ -アミノイソ酪酸は、ヒトやマウスにおいて持続的な運動によって骨格筋中での PGC-1 の増加に伴い、血液中で増加し、ミトコンドリア量や GLUT-4 量を増加させインスリン感受性を増強させる。また、げっ歯類の筋管細胞の培養液中に  $\alpha$ -アミノイソ酪酸を添加することで糖取り込み等の糖代謝異常が改善することが知られている。今回の TNF- $\alpha$  添加による細胞内性  $\alpha$ -アミノイソ酪酸の増加は、犬が肥満しても糖代謝異常を引き起こしにくい要因の一つとなると考えられる。

(4) 健康犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物変動の比較

健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、インスリン分泌を促した時の血清中代謝産物としてアミノ酸の変動について評価することで、犬にインスリンが作用した時の血中アミノ酸の変動について検討した。代謝産物の測定には、ガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、23 種のアミノ酸を測定した。

23 種のアミノ酸データは多変量解析ソフトウェア SIMCA を用いた PLS パッチモデリングを行い、時間の進展をモデリングすることにより経時的変化に伴うアミノ酸の変動をローディングプロットにより可視化することができ、アミノ酸は 4 つのクラスターに分類された。このうちバリン、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンにより形成されたクラスターはインスリンがピークを示す 0-60 分で有意に減少しており、とくに BCAA はインスリンに反応して速やかに骨格筋に取り込まれたと考えられた。今後さらなる検討は必要ではあるが、データを蓄積することで犬におけるインスリンによる治療効果のモニタリング項目としても期待できるかもしれない。

(5) 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較検討

インスリン抵抗性から糖尿病へ進行するケースが知られている HAC 症例犬を対象とし、インスリン抵抗性は生じるものの糖尿病の直接的な原因とはされていない肥満犬を比較対象に、副腎皮質機能亢進症および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを代謝産物レベルで比較した。代謝産物の測定には、GC-MS を使用し、25 種のアミノ酸と 14 種の脂肪酸の定量を行い、また 11 項目の生化学パラメータの測定を行った。

解析の結果、HAC 群では Obesity 群と比較し、ALP と ALT が有意に高値を示した。犬の ALP アイソザイムにはコルチコステロイド誘導性 ALP があることが知られている。また ALT についても過剰のグルココルチコイドにより肝細胞壊死を起こし高値を示すことが報告されており、これらの変化は既報と一致する結果であった。

血液中のシスチンは、ヒトでは肥満と強い正の相関があるとされているが、本研究において Control 群と比較して、HAC 群では有意な増加を認め、Obesity 群では減少傾向であるという、ヒトとは異なる動態が示された。ヒトでは、過剰なシスチンはインスリン分泌抑制とインスリンシグナリング抑制に繋がることが報告されている。また、HAC 群で、Obesity 群に対して有意に血清中グルタミンが低下しており、グルタミンの低下はインスリン感受性の低下に繋がるとされている。さらに、stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性が HAC 群は Obesity 群より上昇していた。これはヒトにおいて肝臓での糖新生が亢進していることを示す指標である。BCAA であるバリンとイソロイシンは Control 群と比較し、

HAC 群、Obesity 群ともに有意に高値であった。BCAA はヒトの 2 型糖尿病では血中で上昇するが、これはインスリン抵抗性が生じると細胞内への BCAA 取り込みが抑制されるからであると説明されている。したがって、本研究でも HAC 群、Obesity 群ともにインスリン抵抗性が生じていたと考えられる。

これらのことから、HAC 群、Obesity 群のどちらでも Control 群に比べてインスリン抵抗性が生じていたが、HAC 群は、Obesity 群と比較してインスリン感受性が低下し、糖新生も亢進しており、より糖尿病を発症しやすい状態であると考えられる。

以上のように、健常な犬では血清中インスリン増加に伴い血清中 BCAA が低下したが、これはインスリン依存的に BCAA が細胞に取り込まれたことを示している。デキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞では、細胞内の BCAA がコントロールに対して有意に低値であったことから、インスリン抵抗性が高まっていたと示唆される。さらに、デキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞では、糖取り込み能が抑制され、糖の異化作用が減少する傾向にあった。糖異化作用の減少は、健常な犬から単離した末梢血単核球にデキサメサゾンを追加した時の代謝産物の解析結果でも示されていた。一方、TNF- $\alpha$  を追加した犬筋管様細胞では、逆にインスリン感受性を増強する  $\alpha$ -アミノイソ酪酸が有意に高値を示し、生じたインスリン抵抗性を代償する作用が働いたと考えられる。また、HAC 群と Obesity 群の血清中代謝産物を Control 群と比較したところ、血清中 BCAA が高値であった。これはどちらもインスリン抵抗性が生じていることを示唆しているが、HAC 群では、Obesity 群と比較してインスリン感受性低下の指標である血清中グルタミンの低下と、糖新生が亢進している傾向が見られた。

副腎皮質機能亢進症で認められるが肥満では認められない、これらの代謝産物の違いは、犬の副腎皮質機能亢進症が糖尿病発症に至る一方、犬の肥満が糖尿病に至らない一因を示しており、犬における糖尿病の発症機序を解明していく上で有用な知見になると考えられる。また、犬骨格筋培養細胞を対象としたメタボローム研究は、犬特有の糖尿病発症機序を解明する有用な手段であると考えられる。

#### <引用文献>

1. Rand, J.S., et al., *Canine and feline diabetes mellitus: Nature or nurture?* Journal of Nutrition, 2004. **134**(8 SUPPL.): p. 2072S-2080S.
2. Verkest, K.R., et al., *Compensation for obesity-induced insulin resistance in dogs:*

*assessment of the effects of leptin, adiponectin, and glucagon-like peptide-1 using path analysis.* Domest Anim Endocrinol, 2011.

**41**(1): p. 24-34.

3. Peterson, M.E., N. Altszuler, and C.E. Nichols, *Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism.* Res Vet Sci, 1984. **36**(2): p. 177-82.
4. Peikes, H., D.O. Morris, and R.S. Hess, *Dermatologic disorders in dogs with diabetes mellitus: 45 cases (1986-2000).* Journal of the American Veterinary Medical Association, 2001. **219**(2): p. 203-208

#### 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 3 件)

S. Nozawa, T. Sato, K. Katayama, K. Ishioka, T. Sako, T. Arai, H. Tazaki, Metabolic analysis of canine peripheral blood mononuclear cells treated ex vivo with dexamethasone, The Veterinary Journal, 査読, 207(1), 2016, 184-187, DOI: 10.1016/j.tvij.2015.10.054

S. Nozawa, H. Tazaki, A. Mori, Y. Momota, D. Azakami, T. Sako, K. Ishioka, Decreased gene expression of insulin signal molecules in canine Cushing's syndrome, Journal of Veterinary Medical Science, 査読, 76, 2014, 1177-1182, DOI:10.1292/jvms.14-0033

Fujiwara, M., T. Sato, H. Tazaki, I. Yamamoto, K. Kawasumi, T. Arai, Changes in Plasma Fatty Acid Composition in Hyperlipidemia Dogs. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読 8 (4), 639-612

[学会発表](計 6 件)

野澤聡司、佐藤稲子、片山欣哉、田崎弘之、デキサメタゾンおよび TNF- $\alpha$  が犬骨格筋培養細胞の代謝産物に及ぼす影響、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 09 月 07 日 ~ 2015 年 09 月 09 日、北里大学十和田キャンパス (青森県十和田市)

野澤聡司、佐藤稲子、関根舞、村田貴輝、川角浩、片山欣哉、新井敏郎、田崎弘之、肥満した犬の血清中アミノ酸プロファイル、第 11 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2015 年 02 月 20 日～2015 年 02 月 22 日、バシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

関根舞、野澤聡司、片山欣哉、佐藤稲子、田崎弘之、インスリンによる犬の骨格筋培養細胞中のタンパク発現量の変化、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 09 月 09 日～2014 年 09 月 12 日、北海道大学（北海道札幌市）

野澤聡司、佐藤稲子、片山欣哉、田崎弘之、グルココルチコイドが犬の骨格筋培養細胞の代謝産物に及ぼす影響、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 09 月 09 日～2014 年 09 月 12 日、北海道大学（北海道札幌市）

野澤聡司、佐藤稲子、関根舞、片山欣哉、田崎弘之、犬の骨格筋培養細胞におけるインスリンによる糖取り込みと細胞内代謝産物の変動、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 03 月 29 日～2014 年 03 月 29 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

佐藤稲子、村田貴輝、野澤聡司、秋山蘭、小田民美、片山欣哉、左向敏紀、田崎弘之、健常犬における餌の違いによる血液中インスリン濃度とアミノ酸濃度の検討、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 09 月 19 日～2013 年 09 月 23 日、岐阜大学（岐阜県岐阜市）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

田崎 弘之（TAZAKI, Hiroyuki）  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：80231405

### (2)研究分担者

佐藤 稲子（SATO, Touko）  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教  
研究者番号：70633478

### (3)連携研究者

左向 敏紀（SAKO, Toshinori）  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：70153971

### (3)研究協力者

野澤 聡司（NOZAWA Satoshi）