

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861239

研究課題名(和文)超短時間麻酔薬曝露モデルによる成体の認知記憶障害の検討

研究課題名(英文)Very short exposure of volatile anesthetics induces long-term learning deficit in adult rats

研究代表者

内本 一宏 (UCHIMOTO, Kazuhiro)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：50710951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔後に生じる術後認知障害は、手術後の生存率と生活の質に悪影響を及ぼすことが知られている。本研究では5分間という超短時間の吸入麻酔薬曝露モデルを作成し、遠隔期の文脈的記憶学習障害を生じ、また海馬におけるシナプス可塑性(長期増強現象)が抑制され、その基盤として知られているGluA1サブユニットを含むAMPA受容体のシナプス後膜への挿入現象が抑制されていることを発見した。今回の知見が、臨床上の吸入麻酔薬の使用法に与えるインパクトはきわめて大きく、吸入麻酔薬の安全な使用のために、投与濃度などの使用法と遠隔期の認知記憶能の変化についての臨床研究につなげていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Volatile anesthetics induces long-term deficits of cognition and learning. The IA test showed that hippocampal learning were suppressed at 7 days after very short exposure - 5 minutes. We revealed that hippocampal LTP and trafficking of GluA1 containing AMPAR were suppressed. Very short exposure model of Sevoflurane induces a long-term deficit of cognition and learning.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔 吸入麻酔薬 海馬 長期増強 AMPA受容体 神経可塑性 認知記憶障害

1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬の有害かつ遷延する中枢神経作用は、麻酔後の術後認知障害 (postoperative cognitive dysfunction: POCD) を引き起こす因子として注目され、幼若動物ならび高齢動物では研究が進んでいるが、これまで成体動物ではあまり報告されていない。吸入麻酔薬の麻酔作用ならび副次的な有害作用については、詳細なメカニズムの解明は未だ進んでいない。

全身麻酔下手術後に生じる学習障害を含む術後認知障害は、手術後の生存率と生活の質に悪影響を及ぼすことが知られており、近年強く問題視されており、周術期ストレスなどに加えて、全身麻酔薬の投与自体が発生要因の候補の一つとされている。幼若期また高齢期においては、一過性の認知障害のみならず記憶学習を含む高次脳機能の中長期的な障害を生じることが報告されているが、成年期 (思春期～中年期) の術後患者においてはいまだ十分な報告がなされていないのが現状である。

麻酔後記憶機能障害の機序が明らかになれば、これに対する薬物治療を考える出発点となる。現在日本で年間 200 万件以上の全身麻酔が行われ、その数割で長期的認知機能障害がおきていることを考えると、社会的必要性は極めて大きいと考えられる。

これまでに申請者らは、「成体ラットにおいて、イソフルレン麻酔後の遠隔期に AMPA 受容体のシナプスへの移行障害を介して、学習・記憶機能が低下すること」を明らかにし (Uchimoto et al., 2012 ASA annual meeting にて成果発表、2013 日本麻酔科学会第 60 回学術集会優秀賞、現在 Anesthesiology 誌掲載準備中) さらに成体ラットを用いて開腹疼痛モデル (Uchimoto et al., 2013 ESA annual meeting にて一部成果を発表) や静脈麻酔薬 (プロポフォル) 投与モデル (Uchimoto et al., 2013 ASA annual meeting にて一部成果を発表) を作成し、行動学的実験に加えて、海馬シナプス可塑性に焦点をあてて、生化学的・電気生理学的な手法による解析をすすめてきた。

IA 学習課題は、海馬依存性の文脈依存的な学習であり、海馬シナプスの可塑性にかかわる機序としてシナプス後膜集合電位の海馬における長期増強 (Long Term Potentiation: LTP) を基盤とすることが知られている。また海馬における LTP の発現には、AMPA 型グルタミン酸受容体の海馬シナプスへの挿入が必要であることが示されている。(Whitlock JR, et al, Science, 2006) その分子基盤として 4 量体である AMPA 受容体の GluA1 サブユニットのリン酸化が必要なが知られている。また、IA 試験での学習により AMPA 型グルタミン酸受容体の海馬シナプスへの挿入が起こること、この AMPA 受容体の挿入をブロックすると IA 試験にお

ける学習が阻害されること、また AMPA 受容体の挿入が起こったシナプスの数が学習成績と正の相関を示すことを、我々の研究担当者のグループが報告している。(Mitsushima et al, PNAS, 2011)

AMPA 型グルタミン酸受容体は、中枢神経の覚醒、認知、記憶などにかかわる領域のシナプスでは、興奮性に働き、吸入麻酔薬によって抑制されることが知られている。

今回、新たに 1.3MAC 相当の濃度による 5 分間という超短時間の吸入麻酔薬曝露モデルを作成し、海馬依存性の文脈的記憶学習試験 (Inhibitory Avoidance test: IA test) を用いて予備実験をおこない、2 時間の麻酔曝露モデルと比較して軽度ではあるが、IA test の成績が 7 日後に低下するという知見を見出した。これは、成人患者における全身麻酔で、導入時にのみ吸入麻酔薬を用いたような場合でも、POCD 発症もしくは遠隔期の記憶能低下のリスクとなりうる可能性を示唆しており、早急に詳しく解明する必要があると考えられた。また、今回の超短時間曝露モデルにおいても、吸入麻酔薬の作用点としてはあまり注目されてこなかった AMPA 受容体、特に GluR1 含有受容体の関与が明らかになれば、吸入麻酔薬の麻酔作用ならび副次的な有害作用についての詳細なメカニズムの解明に向けて重要な知見となると期待される。

2. 研究の目的

本研究の麻酔条件で 8～10 週齢の若年成体ラットに吸入麻酔薬を曝露させる場合の、手法や呼吸循環の維持などについては、これまでの研究でノウハウの蓄積があり、本研究に先立って、超短時間曝露モデルにおいて 1.3MAC 程度では麻酔中の呼吸循環動態が安定していることを確認している。これらを踏まえて、本研究では、成体ラットを用いて吸入麻酔薬の超短時間曝露によって記憶学習能がどのように影響をうけるかどうかを包括的に解明する目的で、次の研究を計画した。

(1) イソフルラン、セボフルランに加えて、新たにデスフルランを用いて、成体ラット超短時間曝露モデルを作成し、麻酔中の呼吸循環動態が維持できていることを確認する。

(2) 先行実験に加えて、通常麻酔で使用される 0.5 - 3MAC 相当の濃度条件を新たに設けるほか、4 週間後にも IA test を行い、中長期的な経時的変化を検証した。

(3) 文脈的記憶学習の神経電気生理学的な基盤として知られている海馬 CA1/Schaffer collateral(SC) 経路のシナプス可塑性の変化を経時的に検証した。

(4) 海馬 CA1/SC 経路におけるシナプス可塑性の分子生物学的基盤として知られている AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニッ

トである GluA1 の総量およびシナプス膜挿入量についても経時的に検証した。

3. 研究の方法

(1) 超短時間吸入麻酔薬曝露モデルを作成した。体重 250-300g (8-10 週齢) の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。既に現有稼働している自作プラスチック製麻酔チャンバーを用いた半閉鎖式低麻酔・酸素回路・気化器を用いた。1.43MAC 相当のイソフルラン (2.0%)・セボフルラン (3.6%)・デスフルランを用いた。麻酔中のチャンバーは恒温槽に設置して、カプノグラムおよび直腸用温度センサーでモニターして、一定環境を保った。

(2) 麻酔中の循環呼吸動態の検証した。現有稼働している小動物用酸素飽和度測定装置等を用いて、麻酔中の心拍数・呼吸数・酸素飽和度を経時的に測定した。直腸に体温プローブを挿入しておき、体温も測定した。カプノグラムで、排気中の、酸素濃度、二酸化炭素濃度、吸入麻酔薬濃度を測定した。また、別個の個体群を用いて、麻酔直後に動脈血ガス分析を行った。

(3) 抑制性回避学習課題 (Inhibitory Avoidance test) 麻酔の、1日後、7日後、14日後に専用の試験用ケージを用いて行った。ケージは隣接する明箱と暗箱からなっており、ギロチン式の扉で仕切られていた。まずトレーニングとして、扉を閉めた状態でラットを明箱に入れ、10秒間探索させた後、扉を開けた。ラットは暗い場所を好む為、すみやかに扉から暗箱に入っていくの、暗箱に入ったら扉を閉め、0.2mA、2秒の電気ショックを床よりラットの足に与えた。ショック後15秒間静置したのち、ラットをケージから出して休息させた。トレーニングの24時間にリテンション (想起) テスト、ふたたび試験用ケージの明箱にいれて扉をあけ、暗箱に入っていくまでの潜時を測定して、学習効果の指標とした。麻酔曝露無し、もしくは本研究に近い条件の麻酔曝露後の、同種同週齢のラットで、蓄積したデータがあるので、これと比較した。

(4) 多点皿電極 (MED64 system) を用いた海馬における細胞外シナプス電位の測定。麻酔の、1日後、7日後、14日後のラットをイソフルラン麻酔の後に断頭し、海馬または扁桃体を含む脳スライス (厚さ 300 μ m) を作成した。スライスの作成は現在行っている方法に則って行った。スライスを倒立顕微鏡にセッティングした MED コネクター (Alpha MED Science, Osaka, Japan) 上の電極 (MED515A) に静置し、ペリスタポンプによる人工脊髄液

の灌流を開始した。スライスの画像を CCD カメラで取り込み、64個の電極のスライス上での位置を同定できるようにしておいた。20分程度スライスをなじませた後、海馬では CA1 領域で、もっとも刺激が得られる場所を探索し記録を開始した。海馬における興奮性シナプス集合電位 (fEPSP) の入力-出力特性を記録した上で、刺激強度は得られる最大シナプス電位の約 50% になるように調節した。40分以上 paired pulse 刺激による fEPSP が安定していることを確認し、10Hz および 100Hz で 0.1ms、900 回のテタヌス刺激を与え、シナプス電位の長期増強 (LTP) を誘発し、fEPSP の amplitude と slope を 40 分にわたり記録した。

(5) AMPA 受容体および NMDA 受容体の生化学的検討。麻酔曝露モデルラットについて、Inhibitory Avoidance test の実施無し、トレーニングの 30 分後、記憶想起 (リテンション) の 30 分後、のタイミングで各々イソフルラン麻酔下に断頭し、迅速に海馬検体を採取した。採取した海馬について、シナプス膜分画を抽出後、Western blotting を行い、蛋白量を測定し半定量をおこなった。また、トータルホモジネートでも同様に半定量をおこなった。

4. 研究成果

(1) 麻酔による呼吸状態の変化。2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) もしくは 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) に 5 分間曝露させた後、動脈血ガス分析 (ABG) を行って測定した pH、PaO₂、PaCO₂、SaO₂ は通常の麻酔時に知られている生理的变化の範囲内であって、有意な変化は見られなかった。低酸素血症、高二酸化炭素血症、高血糖は認められなかった。

(2) 行動学試験 (抑制性回避試験: IA test)

5 分間の 3.6% セボフルラン曝露の 7 日後に、空間認知・文脈的記憶学習が障害されていた。5 分間の 2.0% イソフルラン曝露後では、有意な変化は無かった。(one-way ANOVA, $F(2, 42) = 3.784$, * $P = 0.031$; post hoc Dunnett's test, control - day7 vs. Iso 2.0% - day7, $P = 0.415$; control - day7 vs. Sev 3.6% - day7, * $P = 0.017$)

5 分間の 2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) もしくは 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) に曝露させた 1 日後では、IA test に有意な変化を認めなかった。(one-way ANOVA, $F(2, 43) = 0.169$, $P = 0.845$; post hoc Dunnett's test, control - day1 vs. Iso 2.0% - day1, $P = 0.786$; control - day1 vs. Sev 3.6% - day1, $P = 0.929$)

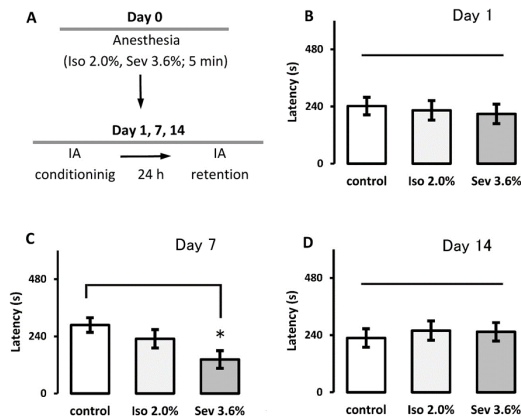


図1 行動学試験(IA test)Day7において、Sev3.6%群で、学習成績が低下している。

2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) もしくは 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) に曝露させた 14 日後でも、IA test に有意な変化を認めなかった。(one-way ANOVA, $F(2, 42) = 0.179$, $P = 0.836$; post hoc Dunnett's test, control - day14 vs. Iso 2.0% - day14, $P = 0.8006$; control - day14 vs. Sev 3.6% - day14, $P = 0.8542$)

(3) 海馬シナプスの長期増強

5 分間の 3.6% セボフルラン曝露の 7 日後に、高頻度刺激 (100Hz; HFS) に誘発される長期増強 (LTP) の低下が生じていた。2.0% イソフルラン曝露後では、有意な変化を認めなかった。(2-way ANOVA; Group x Day, $F(4, 85) = 3.517$, $*P = 0.0105$; Group, $F(2, 85) = 2.544$, $P = 0.0845$; Day, $F(2, 85) = 0.1289$, $P = 0.8792$)。

5 分間の 2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) もしくは 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) に曝露させてから 1 日後では、LTP の増強率に有意な変化を認めなかった。(post hoc Dunnett's test, control - day 1 vs. Iso 2.0% - day 1, $P = 0.0884$; control - day 1 vs. Sev 3.6% - day 1, $P = 0.4762$)。

5 分間の 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) に曝露させてから 7 日後に作成した海馬急性性スライスでは、LTP の増強率が有意に低下していたが、2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) では優位な変化を認めなかった。(post hoc Dunnett's test, control - day 7 vs. Iso 2.0% - day 7, $P = 0.0604$; control - day 7 vs. Sev 3.6% - day 7, $*P = 0.0006$)。

5 分間の 2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) もしくは 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) に曝露させてから 14 日後に作成した海馬急性性スライスでは、LTP の増強率に有意な変化を認めなかった。(post hoc Dunnett's test, control - day 14 vs. Iso 2.0% - day 14, $P = 0.4054$; control - day 14 vs. Sev 3.6%

- day 14, $P = 0.2570$)。

また一切の操作を加えていないラットを WT 群として、各 control 群と比較したが有意な差を認めなかった (WT, control - day 1, control - day 7, control - day 14; 1-way ANOVA, $F(3, 32) = 2.288$, $P = 0.0973$)。

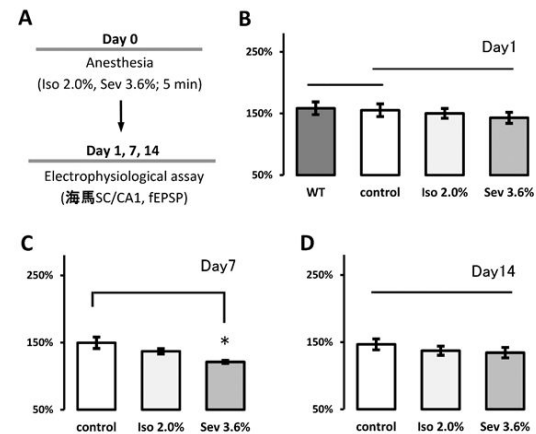


図2 電気生理学試験(海馬シナプスの長期増強)Day7において、Sev3.6%群で、学習後の長期増強率が低下している。

(4) シナプトソーム分画および全分画 GluA1 の発現量

5 分間の 3.6% セボフルラン (Sev 3.6%) 曝露の 7 日後に、シナプトソーム (P2) 分画の GluA1 が一時的に増加し、さらに conditioning によるシナプトソーム (P2) 分画の GluA1 の増加が抑制されていた。1 日後と 14 日後では control および 2.0% イソフルラン (Iso 2.0%) 曝露群と比較して有意な差は認めなかった。

シナプトソーム (P2) 分画では (2-way ANOVA; Group x Day, $F(4, 43) = 2.141$, $P = 0.0921$; Group, $F(2, 43) = 5.998$, $*P = 0.0050$; Day, $F(2, 43) = 3.695$, $*P = 0.0331$)、7 日後に Sev 3.6% 群で GluA1 の一時的な増加を認めた (post hoc Dunnett's test, control - day 7 base vs. Iso 2.0% - day 7 base, $P = 0.9721$; control - day 7 base vs. Sev 3.6% - day 7 base, $*P = 0.0288$)。しかし、1 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 1 base vs. Iso 2.0% - day 1 base, $P = 0.3963$; control - day 1 base vs. Sev 3.6% - day 1 base, $P = 0.5194$) および 14 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 14 base vs. Iso 2.0% - day 14 base, $P = 0.6368$; control - day 14 base vs. Sev 3.6% - day 14 base, $P = 0.0688$) では統計学的に有意な変化は認めなかった。

conditioning 後のシナプトソーム (P2) 分画の GluA1 増加率 (conditioned / base) は (2-way ANOVA; Group x Day, $F(4, 36) = 6.226$, $*P = 0.0006$; Group, $F(2, 36) = 1.702$, $P = 0.1966$; Day, $F(2, 36) = 9.435$, $*P =$

0.0005)と、7日後に Sev 3.6 %群で一時的な上昇を認めた (post hoc Dunnett's test, control - day 7 conditioned / base vs. Iso 2.0 % - day 7 conditioned / base, $P = 0.8197$; control - day 7 conditioned / base vs. Sev 3.6 % - day 7 conditioned / base, $*P = 0.0444$)。しかし、1 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 1 conditioned / base vs. Iso 2.0 % - day 1 conditioned / base, $P = 0.1879$; control - day 1 conditioned / base vs. Sev 3.6 % - day 1 conditioned / base, $P = 0.3804$) および 14 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 14 conditioned / base vs. Iso 2.0 % - day 14 conditioned / base, $P = 0.4270$; control - day 14 conditioned / base vs. Sev 3.6 % - day 14 conditioned / base, $P = 0.2023$) では統計学的に有意な変化は認めなかった。

全分画の GluA1 は、Sev 3.6 %群でやや低下傾向をみとめたものの、統計学的に有意な変化を認めなかった (2-way ANOVA; Group x Day, $F(4, 45) = 0.2330$, $P = 0.9184$; Group, $F(2, 45) = 4.547$, $*P = 0.0159$; Day, $F(2, 45) = 0.4421$, $P = 0.6455$)。1 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 1 base vs. Iso 2.0 % - day 1 base, $P = 0.4655$; control - day 1 base vs. Sev 3.6 % - day 1 base, $P = 0.4199$)、7 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 7 base vs. Iso 2.0 % - day 7 base, $P = 0.6328$; control - day 7 base vs. Sev 3.6 % - day 7 base, $P = 0.8964$)、14 日後 (post hoc Dunnett's test, control - day 14 base vs. Iso 2.0 % - day 14 base, $P = 0.9222$; control - day 14 base vs. Sev 3.6 % - day 14 base, $P = 0.2562$) であった。

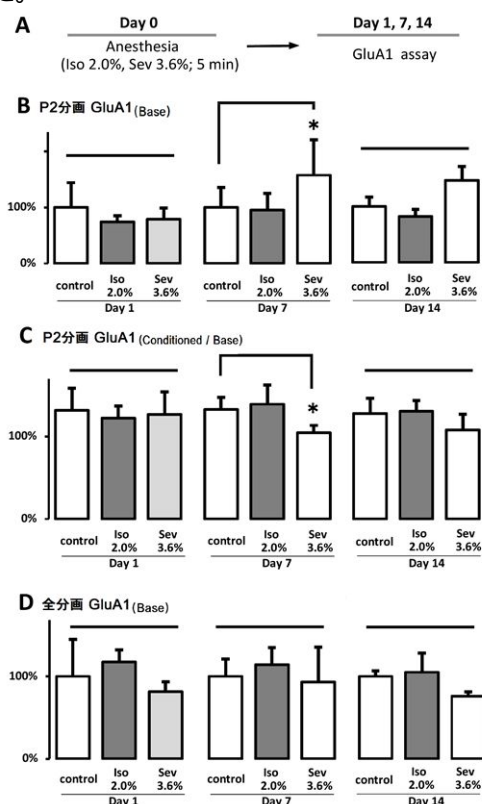


図3 生化学試験 (海馬シナプスにおける GluA1 発現レベル) Day7 において、Sev3.6%群で、学習前の GluA1 が増加し、学習後の増加率が低下している。

(5) まとめ

本研究では、若年成体雄性ラットに対する5分間の3.6%セボフルランによる全身麻酔は、2時間の1.8%イソフルランによる全身麻酔と同様に、遠隔期(7日後)に可逆的な海馬依存性記憶学習の障害を生じた。7日目には海馬記憶学習の障害と一致して、海馬 SC/CA1 における LTP の抑制が生じていた。海馬 SC/CA1 シナプスにおける GluA1 含有 AMPAR の膜への挿入 (trafficking) を検証したところ、同様にシナプトソーム分画の GluA1 が増加していた。加えて、conditioning 後の synaptoneurosome 分画の GluA1 の増加率が減少しており、シナプスにおける GluA1 含有 AMPAR の増加によって、trafficking が抑制されていることが強く示唆された。一方、5分間の2.0%イソフルランによる全身麻酔では、有意な変化を認めなかった。

5分間の麻酔によっても、2時間の麻酔と同様の学習障害をきたしたことから、吸入麻酔薬が海馬に与える影響については、ある一定の濃度以上に達したならば、その曝露時間には因らない可能性がある。5分程度の短時間の作用によって、数日間も機能的な影響が残存すると、臨床的に全身麻酔薬の使用法に与えるインパクトはきわめて大きい。また、動物実験においては、薬物投与や手術、検体採取の際に数分程度の麻酔をかけることは、動物愛護の観点からむしろ必須となされており、特定の組織に影響が残りうるとすると相当にインパクトが大きい。しかしながら、たかだか5分間の麻酔薬曝露でそのような影響が長期にわたって残存するメカニズムについては、当初計画以上には十分な解明を進められず、この点は次の課題である。

吸入麻酔薬の成体動物の中枢神経系に対する吸入麻酔薬の作用はいまだ未解明な部分が多く、吸入麻酔薬の臨床的必要を鑑みても、今後の更なる研究が望まれる。また、げっ歯類における記憶学習の障害はヒトにおける術後認知障害と関連すると考えられる。吸入麻酔薬の安全な使用のために、吸入麻酔薬の投与濃度などの使用法と遠隔期の認知記憶能の変化についての臨床研究につなげていく必要があると考える。

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)

Hung Tae Kim, Kazuhiro Uchimoto,
Tyler Duellman, Hay Yang,
“Automated assessment of pain in rats

using a voluntarily accessed static weight-bearing test”, Physiology & Behavior. (2015 Jul 21; 151: 139-146.), 査読有

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Yoshinori Kamiya, Takahiro Mihara, Yukihide Koyama, Masataka Taguri, Gaku Inagawa, Takuya Takahashi, Takahisa Goto, “Isoflurane Impairs Learning and Hippocampal LTP via the Saturation of Synaptic Plasticity”, Anesthesiology. (2014 Aug; 121(2):302-10.), 査読有

Kazuhiro Uchimoto, Hiroko Fujimoto, Kumiko Yonezaki, Tomoyuki Miyazaki, Tomio Ando, Takahisa Goto, “Very short exposure of volatile anesthetics induces long-term learning deficit in young adult male rats”, European Journal of Anaesthesiology (2014 Jun; 31:121.), 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

村瀬頼子, 内本一宏, 後藤隆久, 柚崎通介: 若年マウスに対するイソフルラン曝露後に遷延する空間学習能力低下は、集団飼育下の全自動行動解析装置による解析においても存在する。日本麻酔科学会第 62 回合同学術集会, 2015.5.29, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
朝倉彩子, 内本一宏, 伊奈川岳, 後藤隆久: デスフルラン曝露が海馬記憶学習に与える影響。日本麻酔科学会第 62 回合同学術集会, 2015.5.29, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Kazuhiro Uchimoto, Hiroko Fujimoto, Kumiko Yonezaki, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto, “Very short exposure of volatile anesthetics induces long-term learning deficit in young adult male rats.”; ESA2014, Jun 2. 2014, Stockholm, Sweden. Poster presentation.

内本一宏, 後藤隆久: 全身麻酔薬が認知記憶に及ぼす影響～成体ラットモデルを中心に。日本麻酔科学会第 61 回学術集会, シンポジウム, 2014.5.16, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

内本一宏, 紙谷義孝, 藤本寛子, 宮崎智之, 安藤富男, 後藤隆久: 単純開腹疼痛が海馬認知記憶能に与える影響。日本麻酔科学会第 61 回学術集会, 2014.5.16, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

内本一宏: 単純開腹モデルにおける急性侵害疼痛は、若年雄性ラットの認知学習能に影響を与えるか? 第 7 回「麻酔科痛みのメカニズムを語る会」, 2014.3.5, 芝パークホテル(東京都港区)

〔図書〕(計 1 件)

『ラットの行動解析ハンドブック』 / Ian Q. Whishaw, Bryan Kolb 編 ; 高瀬堅吉, 柳井修一, 山口哲生監訳 / 16 章 翻訳 内本一宏 - 西村書店, 125-134, 2015.10,

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内本一宏 (UCHIMOTO, Kazuhiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号: 50710951

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

宮崎 智之 (MIYAZAKI, Tomoyuki)

水原 敬洋 (MIHARA, Takahiro)

富永 洋介 (TOMINAGA, Yosuke)

朝倉 彩子 (ASAKURA, Ayako)

弓場 由紀 (YUBA, Yuki)

米崎 久美子 (YONEZAKI, Kumiko)

足立 明子 (ADACHI, Akiko)