

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03039

研究課題名(和文)再生・移植医療用細胞・組織構築物の凍結保存・評価システムの開発

研究課題名(英文)Development of cryopreservation system for cells and tissue constructs in regenerative medicine and transplantation

研究代表者

宮本 義孝 (MIYAMOTO, Yoshitaka)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・上級研究員

研究者番号：20425705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DMSOフリー新規凍結保存液、凍結保存用培養デバイス、凍結装置の開発を行った。DMSOの細胞毒性、および動物由来原料の抗原性変化や病原体混入の可能性等の課題を解決すべく、ヒト組織由来細胞に有効なDMSO-血清フリー細胞凍結保存液の組成を見出した。3D培養デバイスTASCLを用いて、均一な大きさのヒト組織由来幹細胞・組織構築物を大量に創製すると共に、有効な保存液組成の決定からガラス化凍結に成功した。細胞の凍結を制御するために、スターリングエンジンによる凍結装置の開発、および凍結条件の最適化に成功した。以上より、再生・移植医療用細胞・組織構築物の凍結保存システムを構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel (1) DMSO-free cryopreservation solution, (2) culture device for cryopreservation, and (3) freezing system. (1) In order to safely freeze cells, it is necessary to solve the problems such as the cytotoxicity of DMSO, the antigenicity change of animal-derived materials and the possibility of contamination with pathogens. We found an optimal composition of cryopreservation solution without DMSO and serum for human cells. (2) 3D culture device TASCL was used to create a large amount of human tissue-derived stem cell constructs having a uniform size. In addition, we successfully determined a vitrified freezing condition based on the effective composition of the freezing solution. (3) In order to control cell freezing, we succeeded in developing a freezing system with a stirling engine and in optimizing freezing conditions. Consequently, a cryopreservation system of cell tissue construct for regeneration and transplantation medical care was established.

研究分野：医用システム、医療技術評価学

キーワード：移植・再生医療 細胞・組織 マイクロ・ナノデバイス 組織構築物 凍結保存 凍結保護剤 機能評価 システム

1. 研究開始当初の背景

近年、凍結細胞・組織を利用した、農業・食品分野への産業利用、創薬・医療分野への臨床応用が行われている。なかでも、後者の場合、医療現場で再生・移植医療用細胞・組織をいつでもどこでも利用できる、すなわち、質の良い再生・移植医療用凍結細胞の供給が急務である。しかしながら、凍結保存が難しい初代細胞などは、凍結前と比べると、融解後の再生・移植医療用細胞のダメージは著しく、細胞の質が低下してしまう。そこで、本研究では、融解後の再生・移植医療用細胞・組織の質を向上させるために、凍結保存システムの研究開発を行った。

(1) DMSO フリー新規凍結保存液の開発

近年、再生・移植医療や創薬研究開発プロセスにおいて、細胞を用いた評価は必須である。特に、培養細胞株や組織由来細胞は、動物やヒト臨床試験 (in vivo) の前段階として重要な役割を担っている。なかでも、細胞の品質管理において、①安全性、②有効性、③同一性・均一性は極めて重要な項目である。これらの品質を保証するためには、細胞を供給する前段階、「凍結保存」のプロセスが必要不可欠となる。その中でも、凍結保護剤は、細胞の凍結保存に大きな影響を及ぼす。ジメチルスルホキシド (DMSO) は、細胞内へ高い浸透性を有し、凍結融解後の生存率も高いが、その一方、毒性が高く、細胞本来の機能低下からその影響が懸念される。これまでに、宮本らは、DMSO とカイクロミル由来タンパク質セリシン、マルトース (二糖類) が、ヒト由来細胞の凍結保存に有効なことを示した。そこで、本研究では、さらなる凍結融解後の細胞機能を向上させるために、DMSO に代わりうる新規細胞凍結保存液の研究開発について検討した。

(2) 凍結保存用培養デバイスの開発

脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells, ASCs) は、多分化能を有し、脂肪組織採取時における侵襲も少なく大量に確保できることから、再生医療分野で幹細胞の供給源として注目されている。安全な細胞治療を行うためには、生体外環境下、ASCs から脂肪細胞へ分化させ、適切な大きさ、品質のマイクロティッシュを作製する必要がある。そこで、本研究では、三次元培養デバイス TASCL (Tapered Stencil for Cluster Culture) によるヒト脂肪由来幹細胞・組織構築物の大量創製から凍結保存の有効性について検討した。

(3) 凍結装置の開発

生体細胞・組織の凍結では、まず、細胞内外での氷晶の成長による細胞膜へのダメージを軽減する必要がある。一般的な凍結方法は、緩慢法とガラス化法の2種類が主に報告されている。その中でも、液体窒素での急速

冷却により氷晶を抑制しガラス化状態で凍結するガラス化法は、生体組織の凍結に有効な方法として知られている。しかしながら、ガラス化法に利用する凍結保護剤は毒性が非常に高く、組織全体に浸透させる必要があるため、組織の大きさによっては利用することが難しい。これらの問題を解決するために、本研究では、過冷却現象に着目し、対象全体を瞬時に凍結する過冷却凍結法を検討した。

(4) 細胞の長期凍結保存 (8年)

凍結保存は、様々な細胞を長期間安定に供給することができる唯一無二の方法である。その一方で、細胞は凍結プロセスなどの環境変化に伴い、大きなダメージを受けることが報告されている。特に、凍結保存液の組成、凍結方法や保存温度などが、凍結融解後の培養細胞の機能回復に影響を及ぼしている。その中でも、細胞の品質を安定に維持する保存温度は、液体窒素下が一般的であり、 -80°C 条件下では長期間品質を維持することが難しいとされている。そこで、本研究では、8年以上前に -80°C 条件下で凍結保存した細胞を用いて、保存温度が細胞に与える影響について検討した。

2. 研究の目的

(1) DMSO フリー新規凍結保存液の開発

細胞毒性障害を軽減する DMSO フリーの新規凍結保存液の研究開発に取り組む。また、動物由来原料の抗原性変化や病原体混入の可能性等の課題を解決すべく、血清フリー凍結保存液の組成も検討した。

再生・移植医療用細胞の新規凍結保護剤を開発するにあたり、従来の糖類 (細胞内非浸透性) やタンパク質の保護効果に加え、細胞内浸透型材料 (未知物質 A) と併用し、DMSO フリー新規細胞凍結保存液が細胞毒性を低減できるか検証した。

(2) 凍結保存用培養デバイスの開発

三次元培養デバイス TASCL による細胞・組織構築物の作製から凍結保存の研究開発に取り組む。再生・移植医療用細胞・組織構築物の調製を行うために、3D 培養デバイス (TASCL, 図1) を作製し、得られたヒト脂肪由来幹細胞・組織構築物を凍結し (緩慢法・ガラス化法)、保存できるかを検証した。

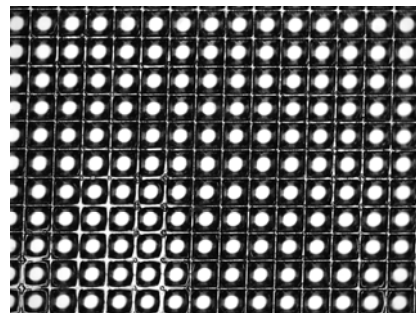


図1. 3D 培養デバイス TASCL の作製。
(底面: 300 μm diameter circular)

(3) 凍結装置の開発

生体細胞 / 組織 / 細胞・組織構築物の凍結を制御するために、スターリングエンジンによる凍結装置の試作を行った。特に、過冷却凍結における過冷度を制御するために、磁場下での凍結を検証し、凍結条件の最適化を行った。

(4) 細胞の長期凍結保存 (8年)

長期間凍結保存した細胞の品質を検証した。マイコプラズマやウイルスなどによる感染を防ぐために、凍結保存下での細胞の安全性を考え、 -80°C 条件下 (気相) および液体窒素下 (液相) での細胞の品質を比較検証した。

3. 研究の方法

(1) DMSO フリー新規凍結保存液の開発

DMSO フリー細胞凍結保存液を用いて、HEK293 細胞 (ヒト胚性腎細胞由来) と SK-N-SH 細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来) の凍結融解後の生細胞率、回収率、増殖率および形態観察からその有効性を評価した。中でも、SK-N-SH 細胞は、レチノイン酸により神経細胞へ分化誘導し、未分化および分化細胞での保存液の有効性を検討した。凍結方法は、 -80°C 下で 24 時間凍結した後、液体窒素内で保管した。融解は、凍結保存サンプルを 37°C 温浴中に移し急速解凍した。

(2) 凍結保存用培養デバイスの開発

本実験では、微細加工技術を用いて、ポリジメチルシロキサン (PDMS) から成る TASCL を作製した。本デバイスは、10mm 四方の基板に、貫通孔の上部・下部形状を自在に設計可能であり、1 枚のデバイス内に多数配置することができる。親水化処理後の TASCL を超低接着性培養皿上に設置し、所定量のヒト脂肪由来幹細胞懸濁液を播種・培養した後、クラスターの形成、脂肪細胞への分化、および凍結保存について評価した。

ヒト脂肪由来幹細胞 (ASCs) は、インフォームドコンセントにより供給された Zen-Bio 社製、継代数 2 を使用した (#ASC-F, LotASC062801; sex/age/BMI(average)/Number of patients: Female/37/23.29/1(single)等)

(3) 凍結装置の開発

スターリング冷却機 (ツインバード工業社) に設置した凍結槽一体型磁場コイル (試作) に、冷媒 (無水エタノール) を加え、試料を設置した。磁場強度を変えながら有効な凍結条件を検討した。

(4) 細胞の長期凍結保存 (8年)

本実験では、細胞凍結保存液としてセルバンカー-1 を用いた。細胞株は、HepG2 細胞 (ヒト肝臓癌由来細胞株)、NIH 3T3 細胞 (マウ

ス繊維芽細胞株)、HH 細胞 (ウシ頸動脈正常血管内皮細胞株)、STO 細胞を使用した。培養細胞をトリプシン処理した後、1 本あたり約 1×10^6 cells/mL の細胞密度で、急速冷凍 (-80°C ディープフリーザー) にて凍結した。凍結細胞は、 -80°C ディープフリーザー内で長期間保存した (8 年以上)。対照群として、液体窒素下で保存した細胞を用いた。融解後、凍結細胞の生存率を測定すると共に、培養後の細胞の形態を観察し、その増殖能を検討した。また、ヒト細胞の STR (short tandem repeat) 遺伝子多型解析より、HepG2 細胞の同定・認証と共に、アルブミン分泌能も評価した。

<倫理面への配慮>

国立成育医療研究センターにおいては、ヒト細胞 (ヒト間葉系細胞等) の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施した。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめた。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を行った。

4. 研究成果

(1) DMSO フリー新規凍結保存液の開発

DMSO 含有保存液とその代替物 (未知物質 A, DMSO フリー) とともに、凍結融解後の細胞生存率に有意差は見られなかった。また、市販製と比べて、生存率、増殖能ともに差がないことから、有効な DMSO フリー凍結保存液組成を見出すことに成功した (1%セリシン加水分解物、0.1M マルトース、10%未知物質 A)。

続いて、未分化の SK-N-SH 細胞を用いて、凍結評価したところ、先と同様の傾向が見られた。さらに、SK-N-SH 細胞の神経分化後に同様の検討を行ったところ、DMSO・血清含有凍結保存液と比べて、DMSO・血清フリー凍結保存液は生細胞率等に大きな差は見られなかった。以上の結果より、未分化・分化したヒト神経細胞にも有効な保存液が得られた (論文投稿中)。

(2) 凍結保存用培養デバイスの開発

超低接着性培養皿上に設置した TASCL 内に、所定量のクラスターを形成させ、脂肪細胞への分化を確認すると共に細胞・組織構築物 (マイクロティッシュ) を大量に作製することに成功した。

脂肪細胞の分化評価法として、Oil Red O 染色より細胞・組織構築物内の脂肪滴を観察し (図 2)、細胞内のトリグリセライド蓄積量を測定した。さらに、2D 培養と比べて、TASCL による 3D 培養法を用いることで、脂肪細胞への分化を短期間で誘導できた。

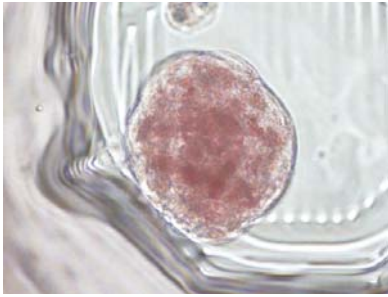


図 2. TASCL 内のヒト脂肪組織由来幹細胞・組織構築物 (Oil Red O 染色済み) の位相差顕微鏡観察。

続いて、得られた細胞・組織構築物に対して、長期間品質を維持するために、凍結融解が細胞・組織構築物に与える影響を検証した。その結果、細胞・組織構築物に対して有効な凍結保存液組成およびガラス化凍結による有効性を見出すことができた (論文投稿中)。

(3) 凍結装置の開発

生体細胞・組織の過冷却凍結における過冷度を制御するスターリングエンジン凍結装置の試作に成功した。また、凍結槽一体型磁場コイルを用いることにより、磁場の強度を変化させ、有効な凍結条件の最適化に成功した。

(4) 細胞の長期凍結保存 (8 年)

液体窒素下で凍結保存した細胞は、解凍後の生存率は 93% 以上であり、それぞれ細胞の形態も良かった。一方、 -80°C で凍結保存した細胞は、解凍後の生存率はそれぞれの細胞ごとに異なるが (96-72%)、細胞の形態も良く、液体窒素下と比べて増殖能も差は見られなかった。また、STR 解析により -80°C および液体窒素下で凍結保存した細胞を識別判定し、HepG2 細胞と同定することができ、アルブミン分泌能も同程度であることが確認できた。マイコプラズマ試験においても、液体窒素下および -80°C で凍結保存した細胞ともに陰性であった。

以上の結果より、凍結保存液セルバンカー 1 を用いて、 -80°C 条件下での細胞の長期凍結保存の有効性を示すことができた。

再生・移植医療用細胞・組織構築物を治療に利用するためには、凍結保存技術の発展が、時空間を制御できる唯一無二の手段である。本研究では、各凍結保存技術の研究結果 (研究成果 1,2,3) をシステム化することで、我が国の再生・細胞医療の質を向上させるとともに、細胞医薬品としての品質安全性、臓器移植待機中の患者の減少も期待できる。また、凍結技術開発だけでなく、凍結細胞の長期保存状態からその品質を評価することで (研究成果 4)、より安全な再生・移植医療を推進することが可能となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yoshitaka Miyamoto, Masashi Ikeuchi, Hirofumi Noguchi, Shuji Hayashi. Long-term Cryopreservation of Human and other Mammalian Cells at -80°C for 8 Years. *Cell Medicine*. 査読有、Volume 10、2018、1-7、DOI: 10.1177/2155179017733148
2. Keiichi Yoshida, Woojin Kang, Akihiro Nakamura, Natsuko Kawano, Maito Hanai, Mami Miyado, Yoshitaka Miyamoto, Maki Iwai, Toshio Hamatani, Hidekazu Saito, Kenji Miyado, Akihiro Umezawa. Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg. *Reproductive Toxicology*. 査読有、Volume 76、2018、71-77、DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.01.001.
3. Kenji Yamatoya, Kazuki Saito, Takakazu Saito, Woojin Kang, Akihiro Nakamura, Mami Miyado, Natsuko Kawano, Yoshitaka Miyamoto, Akihiro Umezawa, Kenji Miyado, Hidekazu Saito. Birthweights and Down syndrome in neonates that were delivered after frozen - thawed embryo transfer: The 2007 - 2012 Japan Society of Obstetrics and Gynecology National Registry data in Japan. *Reproductive Medicine and Biology*. 査読有、16(2)、2017、228-234、DOI: 10.1002/rmb2.12033
4. Kenta Shimba, Kazuma Shoji, Yoshitaka Miyamoto, Tohru Yagi. Self-spreading method for forming lipid bilayer on a patterned agarose gel: Toward precise lipid bilayer patterning. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 査読有、2017、1877-1880、DOI: 10.1109/EMBC.2017.8037213.
5. Yoshitaka Miyamoto, Masashi Ikeuchi, Hirofumi Noguchi, Tohru Yagi, Shuji Hayashi. Enhanced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in an In Vitro Microenvironment: The Preparation of Adipose-Like Microtissues Using a Three-Dimensional Culture. *Cell Medicine*. 査読有、9(1-2)、2017、35-44、DOI: 10.3727/215517916X693096
6. Yoshitaka Miyamoto, Masashi Ikeuchi, Hirofumi Noguchi, Tohru Yagi, Shuji Hayashi. Spheroid Formation and

Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device. *Cell Medicine*. 査読有、8(1-2)、2015、47-56、
DOI: 10.3727/215517915X689056

[学会発表] (計25件)

1. 宮本義孝、池内真志、三次元培養による神経細胞スフェロイドの創製、第17回日本再生医療学会総会(横浜)、2018年
2. 室伏善照、松下佐知、池内真志、林衆治、独自開発した胚様体培養デバイス TASCL を用いた幹細胞クラスター長期培養法と分化誘導法の開発、第17回日本再生医療学会総会(横浜)、2018年
3. 池内真志、青山千裕、中西彩子、細胞塊量産・回収システムの開発、第17回日本再生医療学会総会(横浜)、2018年
4. 永井悠也、大和屋健二、寺本直純、中田一弥、八木透、宮本義孝、再生医療・細胞医療における DMSO フリー、血清フリーの細胞凍結保存液の開発、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (神戸)、2017 年
5. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、林衆治、 -80°C でのヒト脂肪組織由来幹細胞の長期凍結保存(8年間)、第44回日本臓器保存生物医学会学術集会(大阪)、2017年
6. 室伏善照、本多和也、池内真志、林衆治、胚様体大量培養デバイス TASCL (Tapered Stencil for Cluster Culture) を用いた幹細胞クラスター長期培養法、第44回日本臓器保存生物医学会学術集会(大阪)、2017年
7. Yuya Nagai, Kenji Yamatoya, Naozumi Teramoto, Kazuya Nakata, Tohru Yagi, Yoshitaka Miyamoto, Cryopreservation of human and mammalian cell by using DMSO-free freezing medium. 第44回日本低温医学会総会(千葉)、2017年
8. Yoshitaka Miyamoto, Masashi Ikeuchi, Hirofumi Noguchi, Shuji Hayashi. Differentiation evaluation in long-term cryopreserved human adipose tissue-derived stem/progenitor cells at -80°C . 第44回日本低温医学会総会(千葉)、2017年
9. 永井悠也、大和屋健二、寺本直純、中田一弥、八木透、宮本義孝、DMSOフリー細胞凍結保存液の開発と凍結融解が細胞に与える影響、第69回日本生物工学会大会(東京)、2017年
10. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、生田幸士、林衆治、 -80°C 下における細胞の長期凍結保存: 保存温度が細胞に与える影響、第69回日本生物工学会大会(東京)、2017年
11. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、八木透、生田幸士、林衆治、三次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞からマイクロティッシュの作製、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター(宮城)、2017年03月07日~2017年03月09日
12. 池内真志、青山千裕、本多和也、林衆治、3次元培養デバイス TASCL を用いた胚様体形成プロセスの評価、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター(宮城)、2017年03月07日~2017年03月09日
13. 本多和也、池内真志、林衆治、胚様体大量培養デバイス TASCL を用いた幹細胞クラスターの長期間培養法の検討、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター(宮城)、2017年03月07日~2017年03月09日
14. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、鈴木聡、八木透、生田幸士、林衆治、シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来、東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京)、2017年01月31日
15. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、生田幸士、林衆治、 -80°C 条件下における細胞株の長期凍結保存、第43回日本臓器保存生物医学会、東京薬科大学(東京)、2016年11月26日~2016年11月27日
16. MIYAMOTO Yoshitaka, IKEUCHI Masashi, NOGUCHI Hirofumi, HAYASHI Shuji. The long-term cryopreservation of various cell lines at -80°C . 第43回日本低温医学会総会、国立スポーツ科学センター(東京)、2016年10月17日~2016年10月18日
17. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、八木透、生田幸士、林衆治、ヒト脂肪由来幹細胞からマイクロティッシュの大量作製、第52回日本移植学会総会、グランドプリンスホテル新高輪(東京)、2016年09月29日~2016年10月01日
18. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、八木透、生田幸士、林衆治、3次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞の脂肪への分化とマイクロティッシュの作製、富山国際会議場(富山)、2016年09月28日~2016年09月30日
19. 八木透、宮本義孝、菅原路子、中谷裕教、神経インタフェースの現状と将来、第24回日本コンピュータ外科学会大会、東京大学(東京)、2015年11月21日~2015年11月23日
20. Sobhan Ubaidus、石井理絵、蛇口達造、小澤秀登、山下紘正、澤芳樹、田畑泰彦、土岐彰、千葉敏雄、胎児治療のための子宮内でのゼラチン複合体細胞シート移植、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ(京都)、2015年11月09日~2015年11月10日
21. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、鈴木聡、八木透、生田幸士、林衆治、培養デバイス TASCL を用いた肝細胞組織体の創製、第22回HAB研究機構学術年会、昭和

- 大学(東京)、2015年06月26日～2015年06月27日
22. 石井理絵、ソブハン・ウバイダス、蛇口達造、佐藤智夫、山下紘正、田畑泰彦、土岐彰、千葉敏雄、脊髄髄膜瘤に対する細胞シート移植を応用した胎児治療、第52回日本小児外科学会学術集会、神戸国際会議場(神戸)、2015年05月28日～2015年05月30日
 23. 宮本義孝、池内真志、野口洋文、鈴木聡、八木透、生田幸士、林衆治、培養デバイス TASCL による初代肝細胞スフェロイド培養、および均一・大量生産系の確立、第54回日本生体医工学会大会、名古屋国際会議場(名古屋)、2015年05月07日～2015年05月09日。
 24. 増田洋一、宮本義孝、八木透、培養筋細胞を用いたアクチュエータに関する研究、第54回日本生体医工学会大会、名古屋国際会議場(名古屋)、2015年05月07日～2015年05月09日
 25. 池内真志、豊田悠司、林衆治、生田幸士、気液透過性を付与した TASCL による hiPS 胚様体の高効率生産、第54回日本生体医工学会大会、名古屋国際会議場(名古屋)、2015年05月07日～2015年05月09日

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 義孝 (MIYAMOTO, Yoshitaka)
国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・上級研究員
研究者番号：20425705

(2) 研究分担者

池内 真志 (IKEUCHI, Masashi)
東京大学・大学院情報理工学系研究科・講師
研究者番号：90377820

山下 紘正 (YAMASHITA, Hiromasa)
日本大学・総合科学研究所・准教授
研究者番号：00470005
(平成29年度より研究協力者)

大和屋 健二 (YAMATOYA, Kenji)
東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教
研究者番号：80447309
(平成29年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

宮戸 健二 (MIYADO, Kenji)
国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・室長
研究者番号：60324844

八木 透 (YAGI, Tohru)
東京工業大学・工学院・准教授
研究者番号：90291096

寺本 直純 (TERAMOTO, Naozumi)
千葉工業大学・工学部・准教授
研究者番号：80327163

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)
琉球大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50378733

(4) 研究協力者

生田 幸士 (IKUTA, Koji)

三浦 巧 (MIURA, Takumi)