

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300194

研究課題名(和文) 膝十字靭帯損傷に対する関節制動と運動が靭帯治癒に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of the joint control and movement on the healing of the anterior cruciate ligament in the knee

研究代表者

高柳 清美 (Takayanagi, Kiyomi)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：20274061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：異常な関節運動の制動により、膝前十字靭帯(以下、ACL)が治癒する要因について検討した。1) ACLの治癒過程におけるMMPとコラーゲンの経時的変化。14日目以降のMMP-13のmRNAが顕著に抑制され、関節制動によりコラーゲン合成に関連するmRNAが増加した。2) 治癒過程におけるNF-κBの動態を腫瘍壊死因子と比較。関節制動でNF-κBのmRNA発現量は経時的に増加し、TNF-αのmRNA発現量は時間経過とともに減少した。3) 関節制動がACL損傷後のCaspase-3に与える影響。損傷後のACLにおいてCaspase-3は不必要な細胞の除去や組織の退縮や消失に伴って発現した。

研究成果の概要(英文)：By control of the abnormal articulation, it was examined the factors to heal of the anterior cruciate ligament (ACL) in the knee.

1) Time courses of MMP and collagen in the ACL during the healing process. After the day 14, and mRNA of MMP-13 were significantly suppressed, and the mRNA related to collagen synthesis was increased by the joint control. 2) Compare with the tumor necrosis factor the dynamics of NF-κB in the healing process. mRNA expression levels of NF-κB in the joint control over time increases, mRNA expression level of TNF-α was decreased with time. 3) Temporal changes of Caspase-3 by the joint control. Caspase-3 in the ACL after injury was expressed with the regression or disappearance of removal and organization of unwanted cells. Suppression of abnormal joint movement has been shown the potential to promote the natural healing of the ACL.

研究分野：運動器障害理学療法

キーワード：前十字靭帯切断 関節制動 自然治癒 MMP-13 collagen nuclear factor-kappa B TNF-

1. 研究開始当初の背景

膝関節前十字靭帯 (ACL) 損傷は、膝関節障害の中で発生頻度は高く、治療をせず放置すると変形性膝関節症に至る可能性が高い。

(1) ACL は関節内靭帯のため栄養因子が内側副靭帯に比較して少ないことが明らかにされている。ACL 損傷後のタンパク質分解酵素 (MMP) は、損傷後に過大に関節内に発現することで組織の分解や炎症の惹起、変形性関節症の進行に深く関連している。

(2) NF- κ B は転写因子として働くタンパク質複合体で、通常時は細胞外に不活性化状態で存在しているが、誘発因子により刺激を受けると細胞内へ移行し、活性化後核内へ移行する。活性化 NF- κ B は標的遺伝子に対し働きかけ、急性および慢性炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの生理現象に関与する。腫瘍壊死因子 (TNF- α) はサイトカインの一種で炎症反応やアポトーシスに関与しているとされる。TNF- α によるアポトーシス誘導は、NF- κ B により抑制されることも報告されており、TNF- α は NF- κ B の標的遺伝子の一つである。

(3) ACL 退縮・消失に関与する因子としては、アポトーシス経路に関与する核内因子である Caspase-3 の動態が重要である。Caspase-3 は炎症刺激などで活性化された誘導型 Caspase 群によって活性化され、MMP と同様にタンパク質を分解し、細胞をアポトーシスへ進行させる実行因子の中核を担っている。遺伝子によって引き起こされるプログラミングされた細胞死に関与し、成体では異常な細胞の除去に関与する。

2. 研究の目的

(1) ACL の治癒過程におけるタンパク質分解酵素ならびにそれらに関連する因子について関節制動の効果、タンパク質分解酵素における継時的な変化を明らかにした。

(2) 先行研究では、NF- κ B が ACL 再生の潜在的なターゲットになりうるとしているものの、ACL 再生における NF- κ B の動態については未だ明らかになっていない。ラット ACL 損傷モデル急性期における NF- κ B の動態を TNF- α と比較して明らかにした。

(3) 未だに損傷後の ACL 実質部における Caspase-3 の動態について報告されていない。そのため ACL 損傷後の Caspase-3 の動態を明らかにするとともに、ACL 損傷後における異常な関節運動の抑制が Caspase-3 の mRNA の発現量に及ぼす影響について明らかにした。

3. 研究の方法

(1) ACL の治癒過程における MMP とコラーゲンの継時的変化

対象および実験群: 12 週齢の Wistar 系雄性ラット 52 匹を用いた。対象は ACL 切断群 (切断群) と関節制動群 (制動群) の 2 群に分類した。切断群は、外科的手術によって ACL を完全断裂させることで、過度な前方引き出

しを引き起こした。制動群は、ACL 完全断裂後に引き起こした前方引き出しを関節包外から制動したモデルである。

組織の採取は、術後 1、3、5 日目時点で生化学分析用とした ACL、内側半月板 (MM)、内側副靭帯 (MCL) を採取した。採取した ACL は、Allprotect reagent に浸潤し、リボ核酸 (以下 RNA: ribonucleic acid) ならびにタンパク質を安定化した。尚、コントロール群として反対側の膝関節を利用した。

RNA 抽出と逆転写反応: 保存された組織は、TissueLyser LT を用いて、50Hz で 5 分間ホモジナイズした。本研究におけるその後の手順は、サンプル組織に応じて Total RNA 抽出における試薬を採用し、キット内のプロトコールに従い Total RNA 抽出した。抽出された Total RNA は、NanoDrop Lite によって RNA 濃度を測定した。

逆転写反応による cDNA 合成には、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit のプロトコールに従い実施し、0.1 μ g の Total RNA を含むように cDNA を合成した。cDNA 合成には、サーマルサイクラー Palm-Cycler を用いた。

real time PCR: real time PCR には Taqman[®] Fast Advanced Master Mix を用い、StepOnePlus を使用した。ターゲット遺伝子は、MMP-13、TIMP-1、collagen type 1A1、3A1 (COL1A1、COL3A1)、TGF- β の mRNA 発現量を定量化した。各 mRNA の発現量は内在性因子として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。相対値は、CT 法にて CON 群を 1 として算出した。

本研究における追加実験: 本研究では、術後 1、3、5 日目時点である急性期をターゲットに組織採取したが、靭帯の治癒におけるリモデリングは急性期反応以降も重要な時期であるため、14 日ならびに 28 日時点の ACL サンプルも実験に追加した。

(2) 治癒過程における NF- κ B の動態を腫瘍壊死因子と比較

対象: Wistar 系雄性ラット (日本 SLC、浜松、日本) 16 週齢 23 匹を対象に、制動群 13 匹、cut 群 5 匹、sham 群 5 匹に割り当てた。制動群 13 匹は、術後 1 日群 4 匹、3 日群 4 匹、7 日群 5 匹とした。cut 群および sham 群の各 5 匹は各群ともに術後 7 日群とした。さらに、いずれの対象も、手術は右後肢とした。

RNA 抽出: Tissue Lyser を使用し破碎後、RNeasy Fibros Tissue mini Kit プロトコールに従い total RNA を抽出した。

RNA の定量および cDNA の合成

Total RNA の濃度測定には、Nano Drop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States) を使用し、濃度測定後、High capacity transcription kit (Applied biosystems, Foster city, United States) にて cDNA を合成した。

real time PCR

逆転写反応により作成した cDNA を鋳型とし、最後に NF- κ B および TNF- α mRNA プライマーを用い、real time PCR 法にて mRNA 発現量を検討した。real time PCR 法には、Step One Plus (Applied biosystems, Foster city, United States)を用いた。各 mRNA 発現量は -actin mRNA で正規化し、Ct 法による[†]比較を行なった。

比較内容: 実験 1 では、術後 7 日目の sham 群・cut 群・制動群における NF- κ B および TNF- α の mRNA 発現量の比較を行なった。実験 2 では、制動群において術後 1、3、7 日目の NF- κ B および TNF- α の mRNA 発現量の経時の変化を比較した。

(3) 関節制動が ACL 損傷後の Caspase-3 に与える影響

対象: Wistar 系雄性ラット(日本 SLC、浜松、日本)10 週齢 30 匹を術後 2 週群と 4 週群に分け、さらに各群において Joint-Stability (JS) 群 5 匹、ACL-Transsection (ACL-T) 群 5 匹、Sham 群 5 匹に割り当てた。いずれの対象も手術は右後肢とした。

RNA 抽出: RNA 抽出には Tissue Lyser を使用し、採取した ACL を 2ml のチューブに入れホモジナイズした。後、RNeasy Fibros Tissue mini Kit プロトコルに従い total RNA を抽出した。

RNA の定量および cDNA の合成: Total RNA の濃度測定には Nano Drop を使用し、濃度測定後、High capacity transcription kit にて cDNA を合成した。

real time PCR: Mix 18 μ l、鋳型となる合成した cDNA を 1 μ l、最後に Caspase mRNA プライマーを 1 μ l 用いて(合計 20 μ l)、real time PCR 法にて mRNA 発現量を検討した。real time PCR 法には、Step One Plus を用いた。mRNA 発現量は -actin mRNA で正規化し、

Ct 法による比較を行った。

比較内容: 実験では術後 2 週群及び 4 週群における JS 群・ACL-T 群・Sham 群における Caspase-3 mRNA の発現量の比較を行った。

(4) 倫理的配慮

本実験は埼玉県立大学の動物実験管理委員会の指針を遵守して実験を施行した。実験動物に対する苦痛軽減処置として、侵襲を与える際は鎮痛剤を皮下注射にて投与した。

(5) 統計解析

統計解析は一元配置分散分析および T ukey 法を採用した。有意水準は 5%未満とした。

4. 研究成果

(1) ACL の治癒過程における MMP とコラーゲンの経時的変化

術後 1 から 5 日まででは関節制動群で有意に MMP-13 mRNA の発現量は増加した。しかし、14 日時点では切断群と関節制動群の MMP-13

mRNA 発現量は逆転し、有意に切断群で増加した(図 1)。インヒビターである TIMP-1 mRNA 発現量は制動群で有意に多く発現していた。

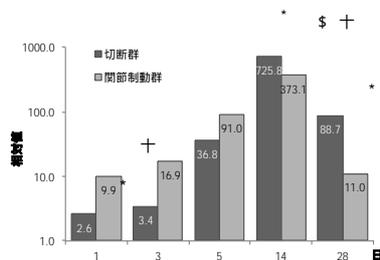


図 1 ACL における MMP-13 mRNA 発現量の推移 (各時期のコントロール群の発現量を 1)

*:コントロール VS 切断群、+:コントロール VS 関節制動群、\$:切断群 VS 関節制動群、 $p < 0.05$

組織治癒におけるコラーゲンについての急性期反応については、COL1A1 mRNA ならびに Col3A1 mRNA の発現量が制動群で有意に増加していた。TGF- β mRNA 発現量についても同様の傾向を示している。

急性期の外科的手術による影響を考慮し、MM ならびに MCL における MMP-13 mRNA 発現量を調査した。結果、MM では、5 日目時点で関節制動群の発現量が有意に減少していた。一方、MCL は術後 1 日目で過剰な発現を示したが、5 日目時点では切断群よりも関節制動群で発現量が減少していたが、すべての時期で有意ではなかった。

図 2 は、MMP-13 mRNA 発現量の経時的な変化をしめしている。切断群では、ACL における MMP-13 mRNA 発現量は漸増しているが、関節制動群では 5 日目時点を超えて漸減している傾向を示した。

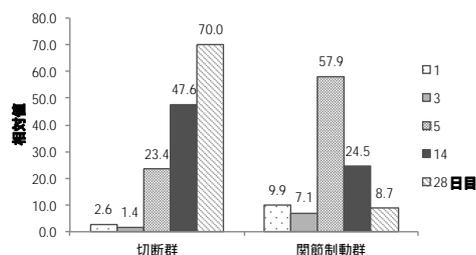


図 2 ACL における MMP-13 mRNA 発現量の推移 (1 日目のコントロール群の発現量を 1)

本研究結果は、関節制動が早期にタンパク質分解酵素である MMP-13 を抑制し、急性期のコラーゲン合成能を改善する可能性を示した。

本研究において関節制動によって 14、28 日時点での明らかな抑制を示したのは関節内の MMP-13 の過剰な発現によって、遺骸靭帯の分解が抑制できた可能性を示唆し、ACL の治癒に関連した可能性を示唆している。しかし、1、3、5 日時点では、関節制動群において MMP-13 の発現量が増加していたことは、外科的処置の多さが疑われた。

関節内組織である MM ならびに関節外組織である MCL の組織についても同様の解析を実施したところ、5 日目時点ではすでに関節制動群の発現量は切断群と比較して低下していた。これは、5 日時点で関節内・外の炎症所見は比較的軽減していることを示し、同時に関節制動が関節内外の炎症カスケードに影響を与えることを示すデータであるかもしれない。本研究で示した結果は、関節制動が膝関節構成組織の MMP 発現を抑制し、周囲組織の炎症軽減に役立つ可能性もある。

リモデリングに重要な COL1A1、Col3A1、TGF- β についても検証も同時に実施した。結果、関節制動群では 5 日目時点で有意に増加していたが、1、3 日目では差は認めなかった。創傷治癒過程における急性期では、炎症に伴う血管反応やマクロファージ浸食後に、線維芽細胞が増殖し、コラーゲンが合成されていくことが報告されている。我々の研究でも、関節制動に伴う靭帯組織の治癒には 2 週間程度の時間を要している。Haslauer らの研究でも、 α 1(I) 型コラーゲンのタンパク質発現量が ACL 損傷後 14 日で増加していることを示しているが、5 日目時点では極めて不明瞭である。このことから、コラーゲンや TGF- β においても、MMP と同様に 14 日や 28 日時点の検証が必要であり、本研究のみではまだ断定はできない事象であるといえる。

本研究で最も興味深い点は、時系列を示す図 2 である。関節制動によって、MMP-13 の発現量に与える影響は明確で、MMP-13 は靭帯の治癒にとって重要であるが、異常な関節運動は MMP-13 を過剰に惹起し、ACL 治癒を抑制する可能性がある。我々が考案した関節制動モデルによって、異常な関節運動を抑制することが MMP-13 の過剰な発現を抑制し、靭帯の治癒に貢献する可能性を示した。

(2) 治癒過程における NF- κ B の動態を腫瘍壊死因子と比較

(2)-1 実験 1：術後 7 日における群間差 NF- κ B の発現量

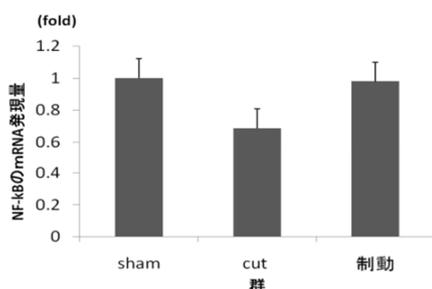


図 3 NF- κ B の mRNA 発現量の群間比較

Ct 法で算出した NF- κ B mRNA 発現量は、sham 群の発現量を 1 とすると、cut 群で 0.69 倍、制動群で 0.98 倍であった。各群の間に有意な差は認められなかったが、cut 群は sham 群や制動群と比較すると mRNA 発現量が少ない傾向を示した (図 3)。

TNF- α の発現量

Ct 法で算出した TNF- α mRNA 発現量は、sham 群の発現量を 1 とすると、cut 群で 0.72 倍、制動群で 0.88 倍であった。各群の間に有意な差は認められなかったが、cut 群は sham 群や制動群と比較すると mRNA 発現量が少ない傾向を示した。

(3) NF- κ B および TNF- α の発現量

Ct 法で算出した NF- κ B および TNF- α mRNA 発現量は、NF- κ B の sham 群の発現量を 1 とすると、cut 群で 0.69 倍、制動群で 0.98 倍、TNF- α の sham 群で 0.12 倍、cut 群で 0.09 倍、制動群で 0.11 倍であった。各群の間に有意な差は認められなかったが、いずれの群においても NF- κ B に対して TNF- α は mRNA 発現量が大幅に少ない傾向を示した。TNF- α 単独での発現量は群間差を認めなかった。

(2)-2 実験 2：制動時の経時的変化

NF- κ B の発現量

Ct 法で算出した NF- κ B mRNA 発現量は、術後 1 日群の発現量を 1 とすると、術後 3 日群で 0.83 倍、術後 7 日群で 1.40 倍であった。術後 3 日群と 7 日群の間に有意差が認められ ($p < 0.05$)、関節制動を行なうことで NF- κ B の mRNA 発現量は時間経過とともに増加した。

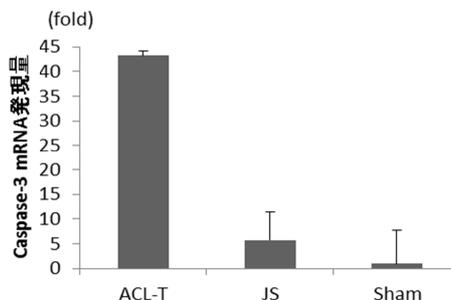


図 4 NF- κ B の mRNA 発現量経時的変化

TNF- α の発現量

Ct 法で算出した TNF- α mRNA 発現量は、術後 1 日群の発現量を 1 とすると、術後 3 日群で 0.73 倍、7 日群で 0.15 倍であった。術後 1 日群と 7 日群の間、術後 3 日群と術後 7 日群の間に有意差が認められ ($p < 0.01$)、関節制動を行なうことで TNF- α の mRNA 発現量は時間経過とともに減少した (図 4)。

ACL は、比較的良好的に治癒する MCL と比較して、乏しい治癒能力を有することが知られている。先行研究では、ACL の再生能力の乏しさは、MMP が MCL 損傷後の関節内組織に対し ACL 損傷後の関節内組織に過剰に発現するからであるとしている。さらに、MMP の過剰発現に対し、NF- κ B が働きを抑制するため、ACL 再生の潜在的なターゲットになりうるとしている。

本研究では、ラット ACL 損傷モデル急性期における NF- κ B の動態を検討した。

実験1では、術後7日目のsham群、cut群、制動群におけるNF-kBおよびTNF- α のmRNA発現量を比較した。NF-kBについて、統計的有意差は認められなかったが、NF-kBのSham群と制動群に対し、cut群の発現量は少ない結果となった。Murrayらは、切断後のヒトACLは徐々に後退し、大腿骨と脛骨間に連続性は見られないと報告している。また、NF-kBは、アポトーシスに働くだけでなくアポトーシス抑制に働くことも知られている。cut群で最も発現量が小さいという本研究の結果から、ACL再生においてNF-kBはアポトーシスへ進行させる因子ではないと考えられる。また、NF-kBのSham群の発現量を1とした結果から、統計的に有意な差は認められなかったが、NF-kBに対し、TNF- α の発現量が少ない結果となった。TNF- α は、急性炎症反応時に作用するとされている。そのため、術後7日目では急性期を脱していたため発現量が少なかった可能性があると考えられる。

実験2では、制動群において術後1、3、7日目のNF-kBおよびTNF- α の発現量の経時的变化を比較した。その結果、関節制動を行なうことで、NF-kBは時間経過とともに有意に増加していくのに対し、TNF- α は有意に減少していく結果となった。TNF- α によるアポトーシス誘導はNF-kBの活性化により抑制されるとの報告もあり、今回の結果からNF-kBがTNF- α の働きを抑制し、アポトーシス抑制をしている、つまりNF-kBは間接的にACL再生に関与していると考えられる。

本研究の結果から、NF-kBはTNF- α の働きを抑制し、間接的にACL再生に関与していることを示唆することができた。本研究の限界としてACLをメスで切除したモデルであるため、ヒトACL損傷とは損傷の仕方が異なるという点や、real time PCR法を用いたmRNA発現量を生化学的に検討したのみであり、損傷靭帯においてどのような組織学的な変化が起きているのか明らかにできなかったことが挙げられる。今後は、たんぱく質の発現、免疫組織化学染色等の組織学的検討を行なっていくことや、ACL再生におけるNF-kBの動態をより明らかにするために、術後1・3日のsham群/cut群を作成し、急性期の群間変化をみることで、さらに直接ACLの再生に関与する、またACLの退行に関与するNF-kBの標的遺伝子を探し、各因子とNF-kBの関連を調べることが必要であると考えられる。

(3) 関節制動がACL損傷後のCaspase-3に与える影響

術後2週群のCaspase-3 mRNA発現量

Ct法で算出したCaspase-3 mRNA発現量は、Sham群の発現量を1とすると、ACL-T群で39.0倍、JS群で31倍であった。Sham群とACL-T群間、Sham群とJS群間には有意な差が認められ($p < 0.05$)、JS群はACL-T群と比較して少ない傾向を認めた(図5)。

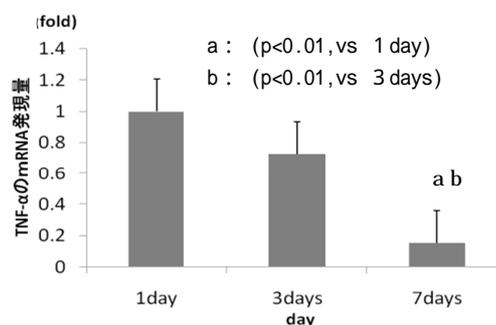


図5 TNF- α のmRNA発現量経時的变化

術後4週群のCaspase-3 mRNA発現量

Ct法によって算出したCaspase-3 mRNAの発現量は、Sham群の発現量を1とすると、ACL-T群で43.0倍、JS群で6.0倍であった。各群の間に有意な差は認められなかったが、mRNA発現量はACL-T群と比較してJS群で非常に少ない傾向を示した(図6)。

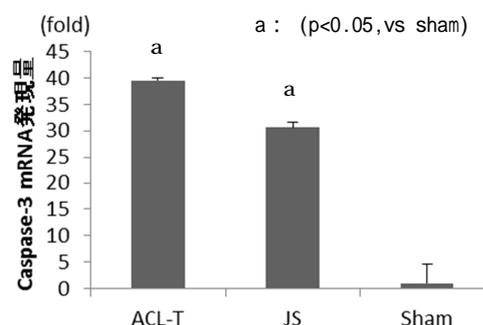


図6 術後4週群の各群におけるCaspase-3 mRNA発現量

ACLは損傷頻度が非常に高いが、自己治癒力は低く、損傷後には退縮・消失してしまうため、自家再腱術を用いることが多い。先行研究ではACLの再生能力の乏しさはACL損傷後に関節内にMMPが過剰に発現するためとしているが、MMPと同様に細胞内基質やDNAのようなタンパク質を分解し、細胞をアポトーシスへ進行させる因子、特に実行因子であるCaspase-3も非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究ではACL損傷後のACL実質部におけるCaspase-3の動態を検討するとともに、異常な関節運動を抑制することによってCaspase-3 mRNAの発現にどのような影響が及ぼされるのかを検討した。

ACL-T群では、各Sham群と比較して、術後2週群で39倍、術後4週群で43倍とほぼ変化を認めなかった。これは術直後の急性炎症反応から慢性炎症へと移行していることが考えられる。先行研究において、Caspase阻害薬を投与した群は、投与を行わなかった群と比較して、軟骨破壊の進行が抑制され、KOAへの進行を減少させた報告や、超音波非照射群と比較して、照射群においてCaspase-3、Caspase-8、MMP-13の発現量が減少し、それ

によって軟骨組織の退縮や破壊が抑制されたことなどより、Caspase-3 の発現量に変化がないということは炎症の継続を示唆していると考えられる。ACL 損傷後に関節内の炎症が持続することによって、マクロファージによるサイトカインの分泌や MMP の分泌が盛んに行われ、細胞や間質成分の除去がされるが、炎症時には Caspase-3 もタンパク質の分解を盛んに行うことで損傷後の ACL の退縮や消失に関与しているのではかと推察された。

次に JS 群では、各 Sham 群と比較して 2 週群では 31 倍、4 週群では 6 倍と減少する傾向にあった。先行研究では、ACL 損傷後、異常な関節運動を抑制した群において、術後 4 週の画像所見で ACL 組織が再生し、治癒していることが確認されており、治癒した ACL 周囲には線維芽細胞の付着があることが指摘されている。またヒトのような多細胞生物は、個体が形成されてから死ぬまで細胞の分裂や分化に際して生じる不必要な細胞を除去することで、生体の恒常性を維持しており、そのためアポトーシスは生体恒常性を維持するために必要な機能であるといえるが、アポトーシスに関与している Caspase-3 の発現は ACL 治癒過程で不可欠なものであると考えられる。

これらより本研究の 2 週群においては靭帯治癒の過程であり、炎症急性期では治癒の促進のために線維芽細胞が増殖するが、その後不必要な細胞の除去が必要となるため Caspase-3 の発現量が増加しているのではないかと考えられる。そして先行研究より 4 週群では既に靭帯が治癒していることから、再生に伴い増殖していた線維芽細胞が減少し、発現量も減少していると考えられる。

ACL-T 群と JS 群での Caspase-3 mRNA の発現量の変化より考えると、異常な関節運動を抑制した JS 群においては炎症反応を抑制することが可能となり、ACL-T 群にみられたような組織を退縮・消失へ向かわせる Caspase-3 としての働きではなく、不必要な細胞を除去する働きをしている、つまり間接的に ACL の治癒を促進することが出来る可能性がある。

本研究の結果より、ACL 損傷後の Caspase-3 の動態は組織の退縮や消失に伴ったタンパク質を分解する働きと、不必要な細胞を除去し生体恒常性を維持する働きに関与していることが示唆された。今後は治癒した ACL 組織や治癒した組織周囲の線維芽細胞を組織学的に検討することや、炎症に関与する Caspase-3 以外の因子との関連性、Caspase 阻害薬を投与したモデルを作成し発現量の差異を検討する必要があると考えられる。さらに、Caspase-3 の継続的な変化を明らかにするために術後急性期の ACL-T 群、JS 群、Sham 群での群間差を検討する必要があると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

村田健児, 国分貴徳, 金村尚彦, 藤野努, 森下佑里, 中島彩, 高柳清美: 前十字靭帯の保存的治癒過程における MMP-2 mRNA と TGF- β mRNA の急性期反応について. 第 33 回関東甲信越ブロック理学療法士学会, 2014. 10. 25-26

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 清美 (TAKAYANAGI, Kiyomi)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号: 20274061

(2) 研究分担者

金村 尚彦 (KANEMURA, Naohiko)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授
研究者番号: 20379895

(3) 研究分担者

国分 貴徳 (KOKUBUN, Takanori)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教
研究者番号: 10616395