

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03904

研究課題名(和文) 鳥類消化管のプロバイオティクスとワクチンによる自然免疫機能の強化戦略

研究課題名(英文) Challenge for enhancement of innate immune functions by probiotics and vaccines in the gut of chicks

研究代表者

吉村 幸則 (Yoshimura, Yukinori)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：10167017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒナ消化管に自然免疫機能が形成されていることを明らかにし、ワクチンやプロバイオティクスでこの機能を強化できる可能性を追究することを目的とした。消化管では微生物を認識するToll様受容体(TLR)と抗菌ペプチド発現は孵化時に高く、その後に減少することを示した。これらの発現は腸管微生物の影響を受け、プロバイオティクスの給与で変動することを明らかにした。さらに、腺胃では、ニワトリ伝染性気管支炎ワクチン接種により一部のTLRや抗菌ペプチドの発現が高く保たれた。以上、ヒナ消化管には、自然免疫による感染防御系が形成されており、ワクチンやプロバイオティクスによりこれを制御できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、感染リスクが高い臓器の1つであるヒナ消化管の自然免疫による感染防御機能を解明して、これを強化することを目指したものである。ヒナでは適応免疫系が未発達で、母鳥からの移行抗体も成長に伴って減少するため、自然免疫の強化が期待される。本研究は消化管の自然免疫系の特性と、これに及ぼすワクチンやプロバイオティクスの影響の機構を示したことに学術的意義がある。これをもとに、より有効なワクチンや生菌剤を開発できれば、ヒナを健康を守り、最大限の生産性を発揮させることができるという社会的意義がある。鳥類の自然免疫を強化する方策として確立されれば、全身性の感染予防技術を開発できるという波及性も期待できる。

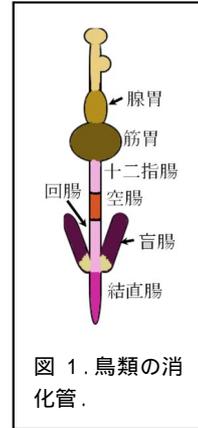
研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine that the innate immune system is formed in the chick gastrointestinal tract, and to examine the possibility that vaccination and probiotics feeding modulate that function. The results showed that Toll-like receptors (TLRs), which recognize microbe-associated molecular patterns, and antimicrobial peptides were expressed at higher levels in neonatal chicks with declining during the growth of them. The expression of the innate immune molecules was affected by intestinal microbes, and also by probiotic bacteria supplemented in the diets. In the proventriculus, Infectious bronchitis virus vaccination modulated the expression of TLRs and antimicrobial peptides in the proventriculus. Thus, we suggest that the innate immune system is formed in the chick gastrointestinal tract, and it may be possible to modulate the function by probiotics and vaccination.

研究分野：動物生産学

キーワード：ニワトリ 消化管 自然免疫 プロバイオティクス ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ニワトリの健康を維持して生産機能を効果的に引き出し、卵肉のサルモネラ菌等の食中毒菌による病原微生物汚染を防ぐには、感染防御機能を強化することが必須である。とりわけ、多くの病原微生物は消化管(図1)を経由して侵入するので、消化管の感染リスクは高い。適応免疫系は特定の病原微生物の感染に対して作動し、ワクチンで強化される。しかし、養鶏現場では多様な微生物が存在しており、また抗生物質・抗菌剤を多用すると薬剤耐性菌の発生が懸念されるので、これらによる感染を防ぐために1つの分子の抗菌スペクトルが広い自然免疫系の強化も重要である。抗菌ペプチドのトリディフェンシン(AvBDs)とカテリシジン(CATHs)は抗菌スペクトルが広く、1つの分子が複数種の細菌やエンベロープウイルスを死滅させるので、この産生能を強化すれば多様な微生物に対する感染防御機能を高めることができると期待される。自然免疫関連分子の抗菌ペプチドや炎症性サイトカインの発現は、Toll様受容体(TLR)が微生物パターン分子を認識することから誘導される。消化管の適応免疫機能は詳細に追究されているが、抗菌ペプチドによる自然免疫機能やその強化策は世界的に注目されはじめたばかりである。プロバイオティクスは腸内マイクロバイームを制御して適応免疫系に影響することが報告されており、私達はプロバイオティクスはリポ多糖(LPS)を投与したヒナ腸管粘膜の抗菌ペプチドの発現性を高めることを見出したが、この生理的機構は不明である。これまで、ワクチンは「適応免疫系」を強化するが、免疫記憶を形成しないと考えられている「自然免疫系」への効果は明らかにされてなかった。近年、ヒトを中心にワクチン接種が自然免疫系の細胞活性を高めるといふ「自然免疫訓練」の概念が提唱されたが、鳥類ではこれに関する報告はない。



2. 研究の目的

- (1)鳥類消化管の自然免疫機能の強化への寄与を目指して、微生物パターン分子の認識から抗菌ペプチド産生までの機構と、この機能をプロバイオティクスとワクチンで強化できる可能性を追究することを目的とした。
- (2)幼若ヒナではリンパ系が未発達で、母鳥からの移行抗体も成長に伴って減少する。自然免疫系は孵化時にはすでに形成されているので、消化管での自然免疫による感染防御系を解明し、この機能を高めるためのプロバイオティクスとワクチンの有効性を追究した。このために、腸管粘膜で、微生物パターン分子が炎症性サイトカインとAvBDsの産生を誘導するか、自然免疫関連分子の発現が腸内細菌叢の影響を受けるか、プロバイオティクスにより腸管自然免疫関連分子の発現を制御できるか、ワクチン接種により消化管自然免疫関連分子の発現を制御でき、その機構として粘膜細胞のDNAメチル化によるエピジェネティクスが関わるかという課題を追究した。

3. 研究の方法

本研究にはプロイラーヒナ(チャンキー)を用いた。解析の対象とした自然免疫関連分子は、事前に消化管での発現を確認した7種のTLRs(TLR2-5, 7, 15, 21), 7種のAvBDs(AvBD1, 2, 4, 6, 7, 10, 12), 4種のカテリシジン(CATH1-CATH33, CTH-B1), 炎症性サイトカイン(IL1, IL6, インターフェロン(IFN))とした。実験1では腸管粘膜で、TLRのリガンドである微生物パターン分子が炎症性サイトカインとAvBDsの産生を誘導するかを解析して、TLRが機能して自然免疫応答を引き起こすかを追究した。実験2と3では、腸管粘膜の自然免疫関連分子の発現が腸内細菌叢の影響を受けるかを検証し、それを確認後に、プロバイオティクスにより腸管自然免疫関連分子の発現を制御できるかを検討した。実験4では、ワクチン接種により消化管自然免疫関連分子の発現を制御できるかを検討するとともに、ワクチン接種の影響は粘膜細胞のDNAメチル化が関わる可能性も追究した。得られた結果から、消化管における自然免疫機能の特性と、この機能を強化するためのプロバイオティクスとワクチン接種の効果について総合的に考察した。本研究の実験は広島大学動物実験委員会の承認を得て行った(No. C15-16)。

4. 研究成果

(実験1) TLRリガンドの微生物パターン分子はヒナ腸管の炎症性サイトカインとAvBDsの産生を誘導するか。

- (1)TLRリガンドの細菌パターン分子がヒナ腸管の炎症性サイトカイン(IL1, IL6)とAvBDs(AvBD1, AvBD4, AvBD7)の発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。3日齢プロイラーヒナの回腸と盲腸を採取し、一部は組織を構成する細胞を同定するための組織学的観察に用いた。一部は培養下において、TLR2, TLR4, TLR21のリガンド(Pam3CSK4, LPSとCpG-ODN; それぞれグラム陽性菌成分, グラム陰性菌成分, 微生物非メチル化DNA)で1ま

たは 3 時間刺激し，炎症性サイトカインと AvBDs の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

- (2) 回腸と盲腸の粘膜では白血球，表面上皮と腸腺上皮が数的に主要な細胞群のため，腸管粘膜での TLR や AvBDs，サイトカインの発現はこれらの細胞において起こると思われる。Pam3CSK4 は回腸の IL-1，AvBD1 と AvBD7 の発現を抑制する傾向を示し，盲腸ではこれらの発現を高めた。LPS は回腸と盲腸のいずれでも IL-1 と IL-6 の発現を抑制したが，盲腸の AvBD1，AvBD4 と AvBD7 の発現を上昇させた。CpG-ODN は回腸の IL-6 と AvBD7 (図 2)，盲腸の IL-1 の発現を増加させたが，回腸の，その他の AvBDs と IL-1 発現を低下させる傾向を示した。
- (3) これらの結果から，ヒナ腸管の炎症性サイトカインと AvBD の発現は TLR2, TLR4 と TLR21 リガンドの刺激で変動することが明らかになり，腸管組織では細菌の侵入により自然免疫応答が影響を受けるものと考えられた。

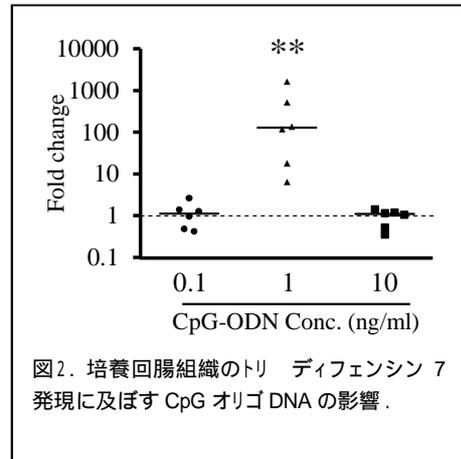


図2. 培養回腸組織のトリ ディフェンシン 7 発現に及ぼす CpG オリゴ DNA の影響。

(実験 2) 腸管粘膜の自然免疫関連分子の発現は腸内細菌叢の影響を受けるか。

- (1) ヒナ盲腸粘膜の自然免疫関連分子の発現が腸内細菌叢の変化によって変動するかを明らかにすることを目的とした。腸内細菌叢構成は抗生物質の給与によって制御した。プロイラーのヒナに抗生物質(ペニシリンとストレプトマイシン)を初生時から 7 日間または 14 日間毎日経口投与した。これらのヒナの盲腸内容物の細菌叢構成頻度を 16SrRNA 菌叢解析により解析した。自然免疫関連分子の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析し，AvBD2 および CATH-1 蛋白を保有する細胞の局在を免疫組織化学により解析した。

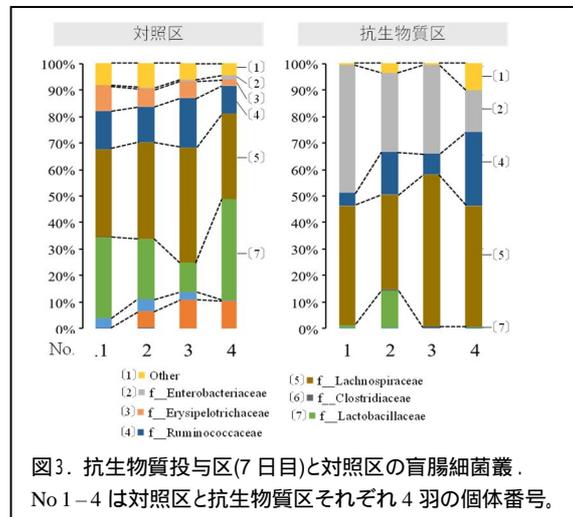


図3. 抗生物質投与区(7日目)と対照区の盲腸細菌叢。No 1-4 は対照区と抗生物質区それぞれ 4羽の個体番号。

- (2) 抗生物質を経口投与したところ，Enterobacteriaceae 科細菌の相対頻度が増加し，グラム陰性菌の Barnesiellaceae 科細菌と，グラム陽性菌の Clostridiaceae 科及び Erysipelotrichaceae 科細菌の相対頻度は減少した(図 3)。一方，抗生物質投与 7 日目に，投与に伴う自然免疫関連分子の発現変化を解析すると，解析した 4 つの TLR (TLR 2, 4, 5 及び 21) の発現は低下し，また AvBD1 と 2 及び CATH1 の発現も低下する傾向を示した(図 4)。また，投与により，炎症性サイトカインの IL1B とケモカイン作用のある IL8 発現も低下したが，抗炎症作用のある TGF 3 と TGF 4 の発現には影響しなかった。抗生物質投与 14 日目に解析すると，投与により発現が低下した分子は認められず，IL-1，TGF 3 と IL-8 の発現は非投与区より高い傾向を示した。

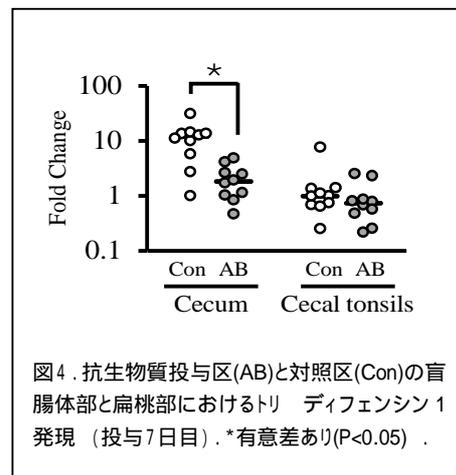


図4. 抗生物質投与区(AB)と対照区(Con)の盲腸体部と扁桃部におけるトリ ディフェンシン 1 発現 (投与 7 日目). *有意差あり(P<0.05)。

AvBD2 と CATH1 を免疫染色すると，これらの蛋白は，盲腸の粘膜固有層に小さいクラスターを形成して局在する白血球様細胞に認められた。これらの細胞は盲腸での抗菌ペプチド産生にかかわると考えられる。

- (3) これらのことから，盲腸の自然免疫関連分子の発現は腸内細菌叢の影響を受けると思われ，有効なプロバイオティクスを用いることにより，細菌叢を制御し，それに伴う自然免疫による感染防御機能を制御することが可能になるものと思われた。

(実験 3) プロバイオティクスにより腸管自然免疫関連分子の発現を制御できるか。

- (1) プロバイオティクスの，Lactobacillus reuteri (LR; ロイテリ菌) と Clostridium butyricum (CB; 酪酸菌) 生菌剤がヒナ回腸と盲腸における自然免疫関連分子の遺伝子発現

に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。孵化後 1 日から 6 日齢のヒナに 500 μ l の生菌剤 (LR (2×10^9 CFU) または CB (1.3×10^7 CFU)) 水溶液を毎日経口投与した。7 日齢ヒナの回腸と盲腸を採材して自然免疫関連分子 (TLRs, 抗炎症性サイトカイン, 炎症性サイトカイン, 抗菌ペプチド [AvBDs と CATHs]) の遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量解析した。

- (2) 回腸における TLR2 の遺伝子発現は CB 給与で増加し, TLR5 の遺伝子発現量は LR 給与と CB 給与で増加した(図 5)。回腸における IL-1 と TGF 2 と盲腸における TGF 3 と TGF 4 の遺伝子発現は LR 給与または CB 給与で増加した。盲腸における AvBD1 と CATH 3 の遺伝子発現量は CB 給与で有意に増加し(図 6), また AvBD4 の遺伝子発現量は LR 給与で増加した。一方で, 回腸における CATH2 の遺伝子発現量は LR 給与により減少した。
- (3) これらの結果から, LR と CB 給与は一部の自然免疫分子 (TLRs, 抗炎症性サイトカイン, 炎症性サイトカイン, 抗菌ペプチド) の遺伝子発現量に影響を及ぼすことが示唆された。LR と CB とでは, 発現が増加する AvBDs と CATHs の分子種が異なるため, ヒナ腸管の感染防御力の向上のためには, これらのプロバイオティクスを同時給与することが望ましいと考えられる。

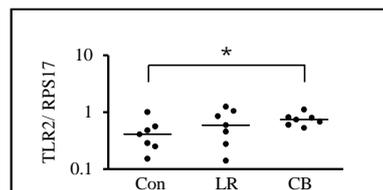


図 5. 回腸 TLR2 発現に及ぼすプロバイオティクスの影響. *有意差あり (P<0.05) .

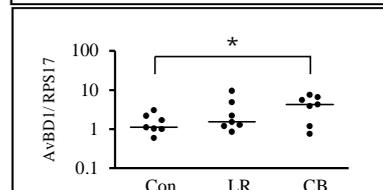


図 6. 盲腸 AvBD1 発現に及ぼすプロバイオティクスの影響. *有意差あり (P<0.05) .

(実験 4) ワクチン接種により腸管自然免疫関連分子の発現を制御できるか。

- (1) 私たちの先行研究では伝染性気管支炎 (IB)・ニューカッスル病 (ND) ワクチンとマレック病 (MD) ワクチンが卵巣や腎臓の TLRs と AvBD 発現に影響することを明らかにした。腺胃と回腸でも, 自然免疫関連分子の発現が孵化後の成長に伴って変化し, また初生時のワクチン接種が成長期のこれらの分子の発現に影響するかを明らかにすることを目的とした。さらに, 成長やワクチン接種の影響が DNA メチル化のエピジェネティックなリプログラミングにより起こる可能性を検討した。このために, 初生時に, IB/ND 混合ワクチンまたは IB ワクチンを接種して, 2 - 10 日目に腺胃と回腸における自然免疫関連分子の発現と DNA メチル化率を解析した。

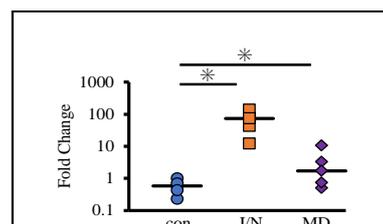


図 7. 腺胃 TLR4 発現に及ぼす IB/ND 及び MD ワクチンの影響. *有意差あり (P<0.05) .

- (2) IB/ND または MD ワクチンを接種すると, 非接種区に比べて, 腺胃において 3 日目に CATH1 発現が高まったが, 多くの AvBDs と CATHs 発現は 10 日目までに低下した。また, 10 日目には, IB/ND と MD ワクチンにより, TLR4 (図 7) と TLR21 の発現が高まった。回腸では, ワクチン接種により, 一部の AvBD の発現が高まり, TLR7 の発現も高まったものの, 他の TLR 発現への影響は抑制的であった。

- (3) IB ワクチン接種区と非接種区を設けて, 2 日目または 7 日目の回腸における TLR と抗菌ペプチドの発現性を解析すると, ワクチン非接種区において 2 日より 7 日目で TLR3, 4, 7, AvBD4 の発現が低かった (図 8, 9), 7 日目までの成長に伴って, これらの発現は低下するものと考えられた。一方, 7 日目の接種区と非接種区を比べると, TLR4 (図 8), AvBD4 (図 9) と CATH-B1 の発現は接種区で高かった。この組織における DNA メチル化解析を行ったところ, 各 TLR と AvBD の遺伝子関連領域 (上流 5000bp) におけるメチル化率へのワクチンの影響は認められなかった (図 10, 11)。

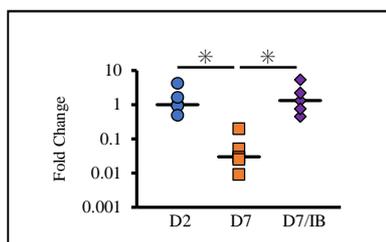


図 8. 回腸 TLR4 発現に及ぼす成長とニワトリ伝染性気管支炎 (IB) ワクチンの影響. D2 = ワクチン非接種 2 日齢. D7 = ワクチン非接種 7 日齢. D7/IB = ワクチン接種 7 日齢. *有意差あり (P<0.05) .

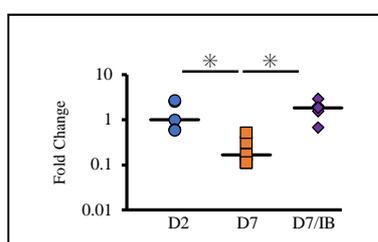


図 9. 回腸 AvBD4 発現に及ぼすヒナの成長とニワトリ伝染性気管支炎 (IB) ワクチンの影響. D2, D7, D7/IB 区の説明は図 8 を参照. *有意差あり (P<0.05) .

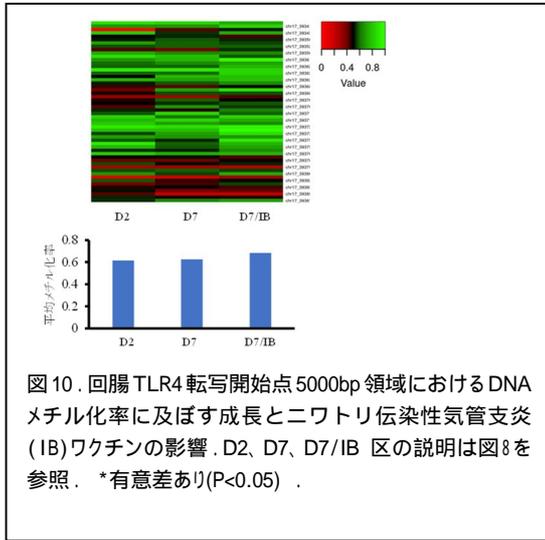


図 10. 回腸 TLR4 転写開始点 5000bp 領域における DNA メチル化率に及ぼす成長とニワトリ伝染性気管支炎 (IB) ワクチンの影響. D2、D7、D7/IB 区の説明は図 8 を参照. *有意差あり(P<0.05).

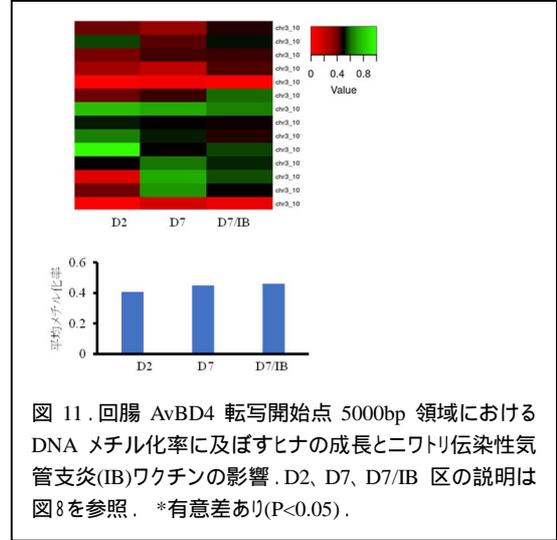


図 11. 回腸 AvBD4 転写開始点 5000bp 領域における DNA メチル化率に及ぼすヒナの成長とニワトリ伝染性気管支炎 (IB) ワクチンの影響. D2、D7、D7/IB 区の説明は図 8 を参照. *有意差あり(P<0.05).

(4)これらのことから、IB ワクチン接種は消化管の TLRs と AvBDs 発現に影響を及ぼすが、TLRs と AvBDs の分子によってワクチンの影響は異なると思われた。またこのワクチンによる影響には DNA メチル化の関りは少ないものと思われた。

(まとめ)

本研究の結果から、ヒナの消化管では微生物パターン分子を認識する TLRs と抗菌ペプチドが発現し、自然免疫による感染防御機能が備わっていることが明らかとなった。これらの関連分子の発現は、ヒナの成長に伴って孵化 7 日目程度までに低下することも明らかになり、この低下には腸内細菌叢の発達による刺激の変化や粘膜細胞の幼若型から成熟型への変化に関わる可能性が推定される。プロバイオティクスとワクチン接種により、全てではないものの、自然免疫関連分子の発現が変動したので、より有効なプロバイオティクスとワクチン製剤を開発して自然免疫機能を制御できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Terada T, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 99
2. 論文標題 Effect of antibiotic treatment on microbial composition and expression of antimicrobial peptides and cytokines in the chick cecum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 3385-3392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2020.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Terada Takumi, Nii Takahiro, Isobe Naoki, Yoshimura Yukinori	4. 巻 57
2. 論文標題 Effects of Probiotics Lactobacillus reuteri and Clostridium butyricum on the Expression of Toll-like Receptors, Pro- and Anti-inflammatory Cytokines, and Antimicrobial Peptides in Broiler Chick Intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 310 ~ 318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/ jpsa.0190098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Terada T, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 57
2. 論文標題 Effects of Toll-like receptor ligands on the expression of proinflammatory cytokines and avian -defensins in cultured chick intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 210-222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0190086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Terada Takumi, Nii Takahiro, Isobe Naoki, Yoshimura Yukinori	4. 巻 55
2. 論文標題 Changes in the Expression of Avian -defensins (AvBDs) and Proinflammatory Cytokines and Localization of AvBD2 in the Intestine of Broiler Embryos and Chicks during Growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 280 ~ 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0180022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉村幸則
2. 発表標題 プロバイオティクスとワクチンによるニワトリ消化管粘膜の自然免疫機能強化の展望
3. 学会等名 第44回鳥類内分泌研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松杏壮、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ニワトリヒナ腺胃のカテリシジン陽性細胞頻度に及ぼすワクチン接種の影響
3. 学会等名 第69回関西畜産学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terada T, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y
2. 発表標題 Expression profiles of avian α -defensin (AvBDs) in the chick cecum and effect of probiotics treatment on the AvBDs expression.
3. 学会等名 The 8th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺田 拓実、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ブロイラーヒナ腸管におけるトリ α -ディフェンシン (AvBDs) 発現の成長に伴う変化とToII様受容体のリガンドに対する応答
3. 学会等名 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田巧実、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ニワトリヒナの上部消化管、脾臓と肝臓におけるトリ -ディフェンシン蛋白の局在
3. 学会等名 平成30年度第68回関西畜産学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田巧実、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 Toll 様受容体のリガンドがヒナ盲腸のトリ -ディフェンシン発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴田実里、新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ブロイラーヒナ腸管における -ディフェンシン局在に及ぼすワクチン接種の影響
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Terada, Takahiro Nii, Naoki Isobe, Yukinori Yoshimura
2. 発表標題 Changes in the expression of Avian -defensin (AvBDs) in the intestine of broiler embryo and chicks during their growth
3. 学会等名 11th Asia Pacific Poultry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴田実里・新居隆浩・磯部直樹・吉村幸則
2. 発表標題 プロイラーヒナ腸管における抗原刺激に伴う α -ディフェンシン2細胞分布の変化に及ぼす影響
3. 学会等名 平成29年度第67回関西畜産学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺田拓実・新居隆浩・磯部直樹・吉村 幸則
2. 発表標題 ニワトリ胚とヒナ腸管におけるトリ α -ディフェンシン (AvBD) 2の局在と成長に伴う変化
3. 学会等名 日本家禽学会2017年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高松杏壮・新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ニワトリヒナ腺胃における自然免疫関連分子の発現に及ぼすワクチン接種の影響
3. 学会等名 第70回関西畜産学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村幸則・寺田拓実・新居隆浩・磯部直樹
2. 発表標題 プロバイオティクスによるニワトリ消化管粘膜の自然免疫機能強化の展望
3. 学会等名 動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学統合生命科学研究科家畜生体機構学研究室
<https://anat.hiroshima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------