

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293287

研究課題名(和文) 肝非実質細胞機能の評価法確立に向けて～ADAMTS13とその先にあるもの～

研究課題名(英文) Diagnostic & Therapeutic Impact of Hepatic Non-parenchymal Cells: ADAMTS13 and the Beyonds

研究代表者

秦 浩一郎 (Hata, Koichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90523118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：<肝虚血再灌流障害> 肝虚血再灌流障害におけるADAMTS13の役割を検証。再灌流後の血清AST/ALT、LDHおよび末梢血血小板数、肝組織中CD42b免疫染色、各種炎症性サイトカインの遺伝子発現は、いずれもADAMTS13 KOで増悪し、rADAMTS13投与で改善することが確認された。

<ラット20%部分肝移植> 本邦における成人生体部分肝移植を模倣したラット20%肝移植モデルを用いて、rADAMTS13投与の治療群、対照群で比較検討。治療群で、移植後の肝障害抑制と、肝機能の改善が認められ、rADAMTS13が成人間生体肝移植における過小グラフト症候群に有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Hepatic IRI provoked significant reduction of ADAMTS13 activity and simultaneous vWF up-regulation. Thus, hepatic microcirculation in KO fell down to 38.4% of the pre-ischemic value, which was significantly lower than in WT (67.5%, $p<0.01$). Interestingly, rADAMTS13 significantly improved such microcirculatory failure up to 80.2% in KO ($p<0.01$), and 89.4% in WT ($p<0.05$). CD42b immunohistochemistry revealed massive platelet aggregation within hepatic sinusoids in KO, which was significantly attenuated by rADAMTS13 not only in KO but also in WT. Consequently, platelet counts ($p<0.0001$), AST ($p=0.0009$), ALT ($p=0.0015$), LDH ($p=0.0011$) and pro-inflammatory cytokines/chemokines (TNF- α ; IL-1 β ; IL-6, IL-10, CXCL-2 and CXCL-10) were all significantly deteriorated in KO, but significantly ameliorated by rADAMTS13 administration. Notably, even in WT, rADAMTS13 significantly improved all such pathologies compared with those without.

研究分野：肝移植

キーワード：肝移植 肝臓外科 ADAMTS13 血栓性微小血管障害症 肝非実質細胞 星細胞 微小循環障害

1. 研究開始当初の背景

肝切除や肝移植を含めた肝臓外科において、その術式を規定する最大の因子は、腫瘍側因子を除けば(残)肝機能、肝予備能であるが、現代医療における肝機能とは、“肝細胞機能”に他ならない。肝臓は、実質細胞(=肝細胞:約60%)と非実質細胞(肝細胞以外の、血管内皮細胞、Kupffer細胞、星細胞など:約40%)に分けられるが、これら”肝非実質細胞機能”が、肝臓外科のみならず幾多の急性・慢性肝疾患治療において評価され、その結果に基づいて治療方針が決定されることはほとんどない、とあってよい。・・・果たしてこれで良いのだろうか?

2. 研究の目的

本研究では、肝非実質細胞の一つ、星細胞に注目し、その産生蛋白である ADAMTS13 の機能・発現解析から、“肝非実質細胞機能”の診断的、治療的意義の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

基礎研究

<肝虚血再灌流障害>

ADAMTS13 ノックアウトマウス (KO) 及び、野生型マウス (SVJ129; WT) を用いて、以下の4群で70%部分肝虚血再灌流障害における ADAMTS13 の役割を検証した。A群: WT + vehicle、B群: KO + vehicle、C群: KO + リコンビナント ADAMTS13 (rADAMTS13)、D群: WT + rADAMTS13。

臨床研究

2014年4月より、肝移植ドナー・レシピエント、肝癌(肝細胞癌、肝内胆管癌、肝門部胆管癌、胆嚢癌を含む)症例の血漿サンプル採取を開始した。引き続き継続採取し、疾患・病態ごとの ADAMTS13 活性解析に移行

する予定である。

4. 研究成果

基礎研究

<肝虚血再灌流障害>

再灌流後の肝障害(血清 AST/ALT、LDH および末梢血血小板数、肝組織中 CD42b 免疫染色、各種炎症性サイトカインの遺伝子発現(qRT-PCR))は、いずれも ADAMTS13 KO で増悪し、rADAMTS13 投与で改善することが確認され、現在投稿中である。

<ラット20%、30%部分肝移植モデル>

本邦における成人生体部分肝移植を模倣したラット20%肝移植モデルを用いて、rADAMTS13 投与の治療群、溶媒投与の対照群で比較検討した。治療群で、移植後の肝障害抑制と、肝機能の改善が認められ、rADAMTS13 が成人間生体肝移植における過小グラフト症候群に有効である可能性が示された(投稿準備中)。また、より実臨床に近いモデルとして、ジメチルニトロソアミン(DMN)投与による肝硬変作成後に、20%部分肝移植を行うモデルを既に完成させた。

臨床研究

本研究により、成人間での生体部分肝移植においては、ドナー年齢が若いほどレシピエント予後が良いことを見出し、論文発表(論文1)と共に、ドナー年代別の ADAMTS13 解析を行っている。

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15件)

1: Kubota T, Hata K, Sozu T, Ueda Y, Hirao H, Okamura Y, Tamaki I, Yoshikawa J, Kusakabe J, Tanaka H, Kageyama S, Uemoto S, et al. Impact of Donor Age on Recipient Survival in Adult-to-adult Living-donor Liver Transplantation. Ann Surg. 2017 Mar 10. doi: 10.1097/SLA.0000000000002194. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28288061.

2: Okamura Y, Hata K, Uemoto S. Reply to "Representing Subnormothermic Machine Perfusion in Fatty Livers: The Complete Picture?" *Am J Transplant*. 2017 May;17(5):1423-1424. doi: 10.1111/ajt.14254. Epub 2017 Mar 27. PubMed PMID: 28251800.

3: Okamura Y, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Inamoto O, Kageyama S, Tamaki I, Yermek N, Yoshikawa J, Uemoto S. Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting. *Am J Transplant*. 2017 May;17(5):1204-1215. doi: 10.1111/ajt.14110. Epub 2016 Dec 19. PubMed PMID: 27860296.

4: Sabra TA, Okajima H, Yoshizawa A, Okamoto T, Anazawa T, Ygi S, Hata K, Uemoto S, et al. Portal vein reconstruction using vein grafts in pediatric living donor liver transplantation: Current status. *Pediatr Transplant*. 2017 May;21(3). doi: 10.1111/petr.12888. Epub 2017 Jan 22. PubMed PMID: 28111865

5: Iskandarov E, Kadaba Srinivasan P, Xin W, Hata K, Agayev B, Tolba R, et al.. Protective Effects of Adenosine Receptor Agonist in a Cirrhotic Liver Resection Model. *Hepat Mon*. 2016 Jul 24;16(8):e36821. eCollection 2016 Aug. PubMed PMID: 27799962; PubMed Central PMCID: PMC5075226.

6: Kirino I, Fujimoto Y, Hata K, Uemoto S. Liver transplantation for acute liver failure accompanied by severe acute pancreatitis. *BMJ Case Rep*. 2016 Sep 6;2016. pii: bcr2016215959. doi: 10.1136/bcr-2016-215959. PubMed PMID: 27600056.

7: Okamura Y, Hata K, Inamoto O, Kubota T, Hirao H, Tanaka H, Uemoto S, et al.. Influence of hepatorenal syndrome on outcome of living donor liver transplantation: A single-center experience in 357 patients. *Hepatol Res*. 2017 Apr;47(5):425-434. doi: 10.1111/hepr.12764. Epub 2016 Jul 19. PubMed PMID: 27323334.

8: Uemura T, Wada S, Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Uemoto S, et al.. How far can we lower graft-to-recipient weight ratio for living donor liver transplantation under modulation of portal venous pressure? *Surgery*. 2016 Jun;159(6):1623-30. doi: 10.1016/j.surg.2016.01.009. Epub 2016 Feb 28. PubMed PMID: 26936527.

9: Sato A, Kaido T, Iida T, Yagi S, Hata K, Uemoto S, et al.. Bundled strategies against

infection after liver transplantation: Lessons from multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Liver Transpl*. 2016 Apr;22(4):436-45. doi: 10.1002/lt.24407. PubMed PMID: 26824429.

10: Glowka TR, Wei L, Hata K, Tolba RH. Oxygen Insufflation in University of Wisconsin Solution Ameliorates Reperfusion Injury in Small Bowel after Cold Storage and Reperfusion. *Ann Transplant*. 2015 Aug 13;20:469-77. doi: 10.12659/AOT.893732. PubMed PMID: 26268948.

11: Hirao H, Tanaka H, Yamauchi A, Hata K, Terajima H, Uemoto S, et al.. The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice. *Liver Transpl*. 2015 Jul;21(7):969-81. doi: 10.1002/lt.24159. PubMed PMID: 25931247; PubMed Central PMCID: PMC4744675.

12. Srinivasan PK, Hata K, Uemoto S, and Tolba RH, et al. Impact of oxygen free radicals in rat partial liver transplantation. *J Surg Res*. 2014 Oct;191(2):469-75. doi: 10.1016/j.jss.2014.05.002. Epub 2014 May 9. PubMed PMID: 24888787.

13. Tolba RH, Fet N, Hata K, Okamura Y, Yamaoka Y, Yamamoto Y, et al. Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Eur Surg Res*. 2014;53(1-4):11-24. doi: 10.1159/000362411. Epub 2014 May 14. PubMed PMID: 24854565.

14. Kageyama S, Hata K, and Uemoto S, et al. Graft reconditioning with nitric oxide gas in rat liver transplantation from cardiac death donors. *Transplantation*. 2014 Mar 27;97(6):618-25. doi: 10.1097/TP.000000000000025. PubMed PMID: 24521773.

15. Saito S, Hata K, and Uemoto S, et al. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatol Res*. 2014 Apr;44(4):460-73. doi: 10.1111/hepr.12140. Epub 2013 Jun 30. PubMed PMID: 23607402.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 境界グラフトの健全性維持と機能再生を目指した移植肝臓器保存戦略 京都大学の取り組み. Author: 秦 浩一郎(京都大学 肝胆膵・移植外科学), 岡村 裕輔, 玉木 一路, Nigmat Yermek, 田中 宏和, 平尾 浩史, 久保田 豊成, 稲本 道, 吉川 潤一, 上本 伸二 Source: *Organ Biology*(1340-5152)

2. 移植肝冷保存後の経門脈的水素灌流は、冷虚血/温再灌流障害を軽減する。 Author: 玉木 一路(京都大学 大学院医学研究科肝胆膵・移植外科学), 秦 浩一郎, 岡村 裕輔, Nigmat Ermek, 平尾 浩史, 久保田 豊成, 稲本 道, 吉川 潤一, 上本 伸二 Source: Organ Biology(1340-5152)23 卷 3 号 Page70(2016.10)
3. Koichiro Hata, Hirokazu Tanaka, Kayoko Endo, Hirofumi Hirao, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Ichiro Tamaki, Akira Shimizu, and Shinji Uemoto, et al.. Post-operative thrombocytopenia determines the fate of adult-to-adult living donor partial liver transplantation; Proposal of "Thrombotic Microangiopathy (LTx-TMA) Score" 26th The Transplant Society (TTS) Congress, August 19-23, 2016, Hong Kong.
4. Yusuke Okamura, Koichiro Hata, Ichiro Tamaki, and Shinji Uemoto, et al. Impact of Hepatorenal Syndrome on Outcome of Living Donor Liver Transplantation: A Single-Center Experience in 357 Patients. 26th The Transplant Society (TTS) Congress, August 19-23, 2016, Hong Kong.
5. 再(再々)肝移植例に対する脳死ドナー肝の配分の是非 自験 111 例の解析から Author: 秦 浩一郎(京都大学 肝胆膵・移植外科), 田嶋 哲也, 上本 伸二ら Source: 移植 (0578-7947)51 巻 総会 臨時 Page265 (2016.09)
6. 生体肝移植 260 例における early allograft dysfunction の検討 Author: 岡村 裕輔(京都大学 肝胆膵移植外科), 八木 真太郎, 吉澤 淳, 秦 浩一郎, 上本 伸二ら Source: 移植 (0578-7947)51 巻 総会 臨時 Page247(2016.09)
7. Yusuke OKAMURA, Koichiro HATA, Hirokazu TANAKA, Hirofumi HIRAO, Toyonari KUBOTA, Shoichi KAGEYAMA, Benedict M Doorschodt, Rene H Tolba, and Shinji UEMOTO. Subnormothermic Machine Perfusion Preservation of >30% Macro-steatotic Livers; A New Means to Expand the Donor Pool? 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium
8. Toyonari Kubota, Koichiro Hata, Takashi Sozu, Hirokazu Tanaka, Hirofumi Hirao, Yusuke Okamura, Osamu Inamoto, and

- Shinji Uemoto. Impact of Donor Age on Patients' Survival of Adult Living Donor Partial Liver Transplantation: Single-Center Experience in 316 Patients. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium
9. Hirofumi Hirao, Koichiro Hata, Hirokazu Tanaka, Shoichi Kageyama, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, and Shinji Uemoto. Impact of ADAMTS13, von Willebrand factor-cleaving protease, on hepatic ischemia/reperfusion injury. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium
10. Hirokazu Tanaka, Koichiro Hata, Hirofumi Hirao, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Shoichi Kageyama, and Shinji Uemoto, et al. Post-operative thrombocytopenia may determine the fate of adult-to-adult living donor partial liver transplantation; Proposal of "Thrombotic Microangiopathy (LTx-TMA) Score" . 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium
11. Yusuke OKAMURA, Koichiro HATA, Hirokazu TANAKA, Hirofumi HIRAO, Toyonari KUBOTA, Osamu INAMOTO, Shoichi KAGEYAMA, Benedict M Doorschodt, Rene H Tolba, and Shinji UEMOTO Subnormothermic Machine Perfusion Preservation of >30% Macro-steatotic Livers; A New Means to Expand the Donor Pool? The 50th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Liverpool, UK, 10-13th June, 2015.
12. 肝胆膵 脂肪肝グラフトに対する室温灌流保存の保護効果 "Extended-criteria donor"の移植利用に向けて Author: 岡村 裕輔(京都大学 肝胆膵・移植外科), 秦 浩一郎, 田中 宏和, 稲本 道, 久保田 豊成, 平尾 浩史, 影山 詔一, 上本 伸二 Source: 日本外科学会定期学術集会抄録集 115 回 Page OP-078-6(2015.04)
13. 肝胆膵 脳死肝腎同時移植の経験 Author: 小川 晃平(京都大学 肝胆膵・移植外科), 秦 浩一郎, 吉澤 淳, 上本 伸二ら Source: 日本外科学会定期学術集会抄録集 115 回 Page OP-070-2(2015.04)
14. 肝胆膵 門脈血栓症例に対する肝移植術後合併症 Author: 森 章(京都大学 肝胆膵・移植外科), 海道 利実, 飯田 拓, 秦 浩

一郎,上本 伸二 ら Source : 日本外科学会定期学術集会抄録集 115 回 Page 0P-069-7(2015.04)

15. 世界へ発信する移植外科医療 成人生体肝移植における肝静脈再建と門脈再建の標準化 Author : 森 章(京都大学 大学院肝胆膵・移植外科学), 海道 利実, 小川 晃平, 藤本 康弘, 秦 浩一郎, 上本 伸二 ら Source : 日本消化器外科学会総会 70 回 Page SY-6-3(2015.07)

16. 臓器移植法案改正がもたらした移植の変化 臓器移植法改正がもたらした急性肝不全に対する初期治療アルゴリズムの変化 Author : 秦 浩一郎(京都大学 大学院肝胆膵・移植外科学), 宮田 仁美, 山田 博之, 八木 真太郎, 小川 晃平, 塚本 達雄, 柳田 素子, 上本 伸二 ら Source : 日本消化器外科学会総会 70 回 Page WS-8-3(2015.07)

17. 室温灌流保存は>30%大滴性脂肪肝グラフトのPNFを抑制し、移植可能肝へと変貌させる Author : 岡村 裕輔(京都大学 大学院肝胆膵・移植外科学), 秦 浩一郎, 田中 宏和, 平尾 浩史, 久保田 豊成, 稲本 道, 門野 賢太郎, 影山 詔一, 上本 伸二 Source : 日本消化器外科学会総会 70 回 Page 0-23-4(2015.07)

18. 肝虚血再灌流障害におけるADAMTS13の役割 Author : 平尾 浩史(京都大学 大学院肝胆膵・移植外科学), 秦 浩一郎, 田中 宏和, 岡村 裕輔, 久保田 豊成, 稲本 道, 影山 詔一, 上本 伸二 Source : 日本消化器外科学会総会 70 回 Page 0-23-2(2015.07)

19. 肝腎症候群合併例に対する生体肝移植の治療成績 自験 349 例の解析から Author : 岡村 裕輔(京都大学 大学院医学系研究科肝胆膵・移植外科), 秦 浩一郎, 平尾 浩史, 久保田 豊成, 稲本 道, 宮田 仁美, 塚本 達雄, 柳田 素子, 上本 伸二 ら Source : 移植 (0578-7947)50 巻 4-5 号 Page519(2015.10)

20. 肝移植周術期における血小板、凝固・線溶動態からみた抗凝固療法について Author : 秦 浩一郎(京都大学 大学院医学系研究科肝胆膵・移植外科), 上本 伸二 ら Source : 移植 (0578-7947)50 巻 4-5 号 Page503(2015.10)

21. Hirokazu TANAKA, Koichiro HATA, Syoichi KAGEYAMA, Hirohumi HIRAO, Toyonari KUBOTA, Yusuke OKAMURA, Osamu INAMOTO, and Shinji UEMOTO. Normothermic perfusion preservation protects

non-parenchymal cells of liver grafts in rats. World Transplant Congress (WTC) July 26-31, 2014, San Francisco, USA.

22. Hirofumi Hirao, Koichiro Hata, Hirokazu Tanaka, Shoichi Kageyama, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto and Shinji Uemoto. Impact of ADAMTS13, von Willebrand factor-cleaving protease, on hepatic ischemia/reperfusion injury; A preliminary study in mice. 49th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), 21-24 May 2014, Budapest, Hungary.

23. Y. Okamura, K.Hata, H. Tanaka, O. Inamoto, T. Kubota, H. Hirao, S. Kageyama, and S.Uemoto. Development of A New Method for Dual Machine Perfusion Preservation of Rat Livers. 12th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery (ISEM) Kyoto, Japan, April 11-13, 2014

24. H. Tanaka, K. Hata, S. Kageyama, H. Hirao, Y. Okamura, K. Kubota, O. Inamoto, S. Uemoto. Impact of normothermic perfusion preservation on the protection of non-parenchymal cells of liver grafts in rats. 12th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery (ISEM) Kyoto, Japan, April 11-13, 2014

25. S.Kageyama, S.Yagi, T.Kubota, Y.Okamura, M.Yoshimura, H.Hirao, H.Tanaka, S.Saito, K.Nagai, K.Hata, Y.Ogura, Y.Takada, R.Tolba, S.Uemoto. Ex vivo Graft reconditioning of livers donated after cardiac death with nitric oxide gas in rat liver transplantation. International Society for Experimental Microsurgery (ISEM), Kyoto, Japan, April 11-13, 2014

〔図書〕(計 8 件)

1. 秦 浩一郎 「現場で役立つ! DIC 診療エッセンス」 Vol.2, No.2, 2017 年 9 月号, in press イラストで学ぶ DIC 「血栓性微小血管障害症 Thrombotic Microangiopathy (TMA)」
2. 秦 浩一郎, 上本 伸二 「現場で役立つ! DIC 診療エッセンス」 Vol.2, No.2, 2017 年 9 月号, in press. DIC と基礎疾患 診断・治療の進め方 「診断困難な DIC ~ 肝移植周術期 ~ 」
3. 秦 浩一郎. 「京大式肝臓外科のすべて」

<総論> “脱転、テーピング. IVC, Hanging Maneuver, 右副腎の剥離” 最新医学社 p80-87, 2015

4. 田中 宏和, 秦 浩一郎, 森 章, 上本伸二. 肝移植後微小血管障害における抗体医薬を用いた新たな治療戦略. 分子細胞治療フロンティア 2015 国内
5. 【ハイリスク・特殊血液浄化】劇症肝炎・急性肝不全における血液浄化 Author: 塚本 達雄 (京都大学 腎臓内科), 秦 浩一郎 (京都大学 肝胆膵・移植外科) Source: 腎臓内科・泌尿器科 (2188-9147)1 巻 6 号 Page551-555(2015.06)
6. ICU・CCU あんな症例、こんな症例(第37回) 高容量血液浄化療法により肝性脳症を制御し脳死肝移植を施行し得た亜急性劇症肝炎の1例 Author: 富山浩司(京都大学 肝胆膵・移植外科), 秦浩一郎, 塚本達雄, 柳田素子, 上本伸二ら Source: ICUとCCU (0389-1194) 39巻4号 Page 256-259 (2015.04)
7. 【アフェレシス療法の新しい展開】消化器肝臓疾患とアフェレシス療法 劇症肝炎、肝移植へのアフェレシス療法 Author: 山田 博之(京都大学 大学院医学研究科腎臓内科学), 塚本 達雄, 秦浩一郎, 上本 伸二, 柳田 素子ら Source: 腎と透析(0385-2156)78巻2号 Page218-221(2015.02)
8. 【消化器外科領域におけるDIC】肝移植周術期におけるDIC. Author: 秦 浩一郎 (京都大学 大学院医学研究科 肝胆膵・移植外科), 田中 宏和, 上本 伸二 Source: Thrombosis Medicine(2186-0327)4巻2号 Page142-149(2014.06) 論文種類: 原著論文/特集

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: ADAMTS 13を主成分とする診断薬および医薬品

発明者: 秦浩一郎、平尾浩史、久保田豊成、上本伸二

権利者: 京都大学、化血研

種類: 特許

番号: 特願 2016-002685 号

出願年月日: 2016/01/08

国内外の別: 国内

名称: ADAMTS 13を主成分とする診断薬および医薬品

発明者: 秦浩一郎、平尾浩史、久保田豊成、上本伸二

権利者: 京都大学、化血研

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/000316

出願年月日: 2017/01/06

国内外の別: 国際

取得状況(計 0 件) 未

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

秦 浩一郎 (Koichiro Hata)

京都大学大学院 医学系研究科 外科学講座

肝胆膵・移植外科学分野 助教

研究者番号: 90523118

(2)研究分担者

上本 伸二 (Shinji Uemoto)

京都大学大学院 医学系研究科 外科学講座

肝胆膵・移植外科学分野 教授

研究者番号: 40252449

(3)連携研究者

(4)研究協力者

()