

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350153

研究課題名(和文) 軟骨由来成分の摂取による糖鎖合成因子の発現変動について

研究課題名(英文) Alteration of glycan-related gene expressions by the supplementation of products derived from cartilage

研究代表者

神山 伸 (KAMIYAMA, Shin)

新潟県立大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：70525401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン由来ペプチドが軟骨細胞の初期分化を促進して後期分化を抑制することにより、軟骨形成を促進する可能性を示した。また、II型コラーゲンペプチドとグルコサミンは関節リウマチに異なる作用を有しており、その併用により相乗効果がみられる可能性を示した。一方、I型コラーゲンペプチドの投与は一部の糖鎖合成遺伝子の発現を変化させたが、関節炎症状の改善作用を示さず、その構成アミノ酸の摂取もむしろ関節炎を悪化させた。このことから、II型コラーゲンペプチドの摂取はI型コラーゲンペプチドと異なり、軟骨形成の促進ではなく、主に経口免疫寛容などの機構により関節炎の発症を抑制するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that the two typical collagen dipeptides, prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) and hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly), increase the expression of type II collagen and chondroitin sulfate proteoglycan and promote early chondrogenesis in ATDC5 cells. Further, chicken type II collagen peptides and glucosamine had synergistic effects on the arthritis score and synovial inflammation in SKG mice. In contrast, administration of chicken type I collagen peptides or its constituent amino acids worsened collagen-induced inflammatory arthritis in DBA/1J mice. These findings indicate that supplementation of type II collagen peptides may have beneficial effects on rheumatoid arthritis via oral tolerance rather than stimulation of chondrogenesis unlike type I collagen peptides.

研究分野：栄養学、食品機能学

キーワード：糖鎖 軟骨 コラーゲンペプチド 関節リウマチ グリコサミノグリカン グルコサミン

1. 研究開始当初の背景

軟骨や結合組織はコラーゲンやコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックス成分によって構成されており、加齢や骨粗鬆症などにより減少することが知られている。細胞外マトリックス成分にはグリコサミノグリカンと呼ばれる糖鎖が多く含まれており、コンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸においては高度に硫酸化されている。これらの硫酸化された糖鎖はまた、炎症などに関与するとともに、癌化や発生にかかわる多くの成長因子のシグナル調節にも重要な役割を果たしている。

軟骨を構成する細胞外マトリックス成分が減少すると関節痛などの原因となることから、軟骨由来成分(コラーゲン、グルコサミン、コンドロイチン硫酸等)が関節炎や骨粗鬆症の予防・治癒促進を目的として健康食品やサプリメントに広く用いられているが、その効果と作用機序については未だ不明点が多い。加えて、これらの成分は一度消化吸収を受けてから体内で再合成されるため、その摂取がどの程度体内における細胞外マトリックスの合成量に影響するかについても十分に明確にされていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、これらの問題点を解決するために、コラーゲン加水分解物やプロテオグリカン構成成分などの軟骨由来成分の摂取によって、体内における細胞外マトリックスの合成がどのような影響を受けるかを明確にすることを目的として行った。そのうち特にコラーゲン由来ペプチドの効果に焦点を絞り、マウス embryonal carcinoma 由来細胞である ATDC5 細胞を用いた軟骨分化への影響の検討と、関節リウマチモデルマウスを用いたリウマチ関節炎の軽減に及ぼす影響の両面から検討を行った。

ATDC5 細胞は通常状態では線維芽細胞の形態を示すが、インスリン存在下で培養すると軟骨基質を構成する細胞外マトリックスの発現が上昇して初期軟骨細胞へと分化し、さらに培養を続けると後期軟骨分化をへて軟骨基質の石灰化が生じ、肥大軟骨細胞へと分化する。そこで本研究ではまず、この ATDC5 細胞を軟骨分化モデルとして用いることにより、代表的なコラーゲン由来ジペプチドである prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) と hydroxyproline-glycine (Hyp-Gly) が軟骨細胞の初期分化と細胞外マトリックスを構成する糖鎖の発現にどのような影響を及ぼすかを検討した。

さらに、ヒト関節リウマチのモデル動物として広く用いられているコラーゲン誘導性関節炎モデル (Collagen Induced Arthritis, CIA) を用いて検討した。マウスにおいては DBA/1 系統が CIA によるリウマチ関節炎モデルとして用いられており、コラーゲンを皮下投与することにより、ヒト関節リウマチと類似し

た自己免疫性関節炎を発症する。そこで、コラーゲンペプチドがペプチドとして吸収されて有効性を発揮するかどうかを確認するために、DBA/1J マウスを用いた関節リウマチモデルに I 型コラーゲンペプチドあるいはそれと同組成のアミノ酸を投与して比較検討することにより、コラーゲンペプチド摂取がリウマチ関節炎に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。さらに、関節リウマチ自然発症モデルとして、ヒト関節リウマチに酷似した自己免疫性関節炎を自然発症する SKG マウスを用い、同様に I 型コラーゲンペプチドあるいはそれと同組成のアミノ酸を投与した場合の影響を比較検討するとともに、軟骨由来の II 型コラーゲンペプチドおよび糖鎖成分であるグルコサミンを投与した場合の影響を検討し、これらの軟骨由来成分が関節リウマチの発症と軟骨における糖鎖成分の合成にどのような影響を与えるかを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

3.1 軟骨分化に及ぼすコラーゲンペプチドの影響 (ATDC5 細胞を用いた検討)

ATDC5 細胞は RIKEN 細胞バンクより分譲されたものを用いた。細胞は DMEM/Ham's F12 1:1 培地にウシ胎児血清を 5% 添加した培地を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養し、3 日あるいは 4 日に一度継代培養した。軟骨細胞への分化誘導は、24well プレートに細胞を播種してコンフルエントになるまで培養した後、ITS (Insulin, Transferrin and Selenium, Thermo Fisher Scientific 社) を 20 µg/ml インスリンとなるように添加して行った。コラーゲンペプチドによる刺激は、H-Pro-Hyp-OH あるいは H-Hyp-Gly-OH (いずれも Bachem AG 社製) を 0.5 mM あるいは 1.0 mM の濃度で添加し、2~3 日毎にそれぞれ培地交換を行いながら 7 日間培養した。

軟骨初期分化時における軟骨細胞基質およびグリコサミノグリカン合成酵素遺伝子群の発現状態は、SYBR 法による real-time PCR を用いて解析した。増幅に利用したプライマーはそれぞれの NCBI Reference Sequence の配列をもとに、エキソジャンクションを含む配列を増幅部位とする上流及び下流プライマーを primer 3 を用いて設計した。発現補正用のコントロール遺伝子としては β-actin 遺伝子を用いた。細胞より抽出した RNA は、PrimeScript RT Master mix (タカラバイオ社) を用いた逆転写反応によって cDNA を合成し、それぞれの cDNA に含まれる目的遺伝子産物の量を SYBR premix Ex taq II (タカラバイオ社) と Pikoreal real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定した。

コラーゲン量の測定はシリウスレッド染色を用いて行った。プロテオグリカン量の測定は、硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖を染色するアルシアンブルー染色を用いて行った。いずれも染色後の細胞より色素を抽出し、

マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することにより定量化した。

3.2. 関節リウマチに及ぼす I 型コラーゲンペプチドの影響 (DBA マウスを用いた検討)

DBA/1J Jms Slc マウス (雄、8 週齢) 15 匹のそれぞれに、アジュバントでエマルジョン化した未変性 II 型コラーゲン (ウシ関節軟骨 II 型コラーゲン) 100 µg を尾根部に投与することにより感作させ、2 週間に再度同量の未変性 II 型コラーゲンを追加免疫することにより関節炎を誘発させた。感作させたマウスを体重によりコントロール群、コラーゲンペプチド群、アミノ酸群、の 3 群にわけ、無処置のマウス (ネガティブ群) の 1 群と合わせて合計 4 群 (1 群 4 匹) とした。

実験食として、ネガティブ群とコントロール群は市販粉末飼料 (CE-2 粉末、日本クレア株式会社) に 6:4 の割合で水を加えて成形したものをを用いた。コラーゲンペプチド群とアミノ酸群には、上記の実験食にそれぞれコラーゲンペプチドあるいはそれと同じ組成のアミノ酸を 1 g あたり 100 mg 添加したものをを用いた。コラーゲンペプチドはニワトリ足由来の I 型コラーゲンペプチド (C-LAP、日本ハム) を使用し、C-LAP のアミノ酸組成をもとにアミノ酸群のアミノ酸配合割合を決定した。

追加免疫後 5 週間にわたり、昼 12 時から夕方 18 時までの間、実験食 1 g を制限給餌により経口摂取させた。制限時間外は市販の固形飼料 (CE-2 固形) を自由摂取させた。摂食量を毎日計測するとともに、週に 1 度体重と関節炎スコアを測定した。実験期間終了後解剖を行い、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定するとともに、後肢膝関節部分の軟骨組織を採取し、直ちに -80°C で凍結保存した。軟骨組織より Trizol 試薬を用いて RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いた定量的 RT-PCR により、軟骨・骨分化マーカー、II 型・X 型コラーゲン、ヒアルロン酸合成因子、プロテオグリカン合成因子、マトリックス分解酵素の遺伝子発現量を測定した。

3.3. 関節リウマチに及ぼす I 型コラーゲンペプチドの影響 (SKG マウスを用いた検討)

実験動物として、関節リウマチ自然発症マウスである SKG/Jcl (雌、10 週齢) を用い、20 mg のマンナンを腹腔内投与してリウマチを惹起させた。リウマチ関節炎を発症した動物を (1) コントロール群 (通常餌) (2) アミノ酸群 (100 mg/日アミノ酸混合餌) (3) コラーゲン群 (100 mg/日コラーゲンペプチド混合餌) の 3 群 (1 群 4 匹) に分け、それぞれの飼料で 5 週間飼育した。リウマチ関節炎非発症のネガティブコントロールとして BALB/cA Jcl マウス 4 匹を用い、通常餌で同じ期間飼育した。関節炎の状態は 4 段階関節炎スコアにより週に 1 度評価した。実験終了後、臓器重量を測定するとともに、血液と軟骨、大腿骨、

ひ骨を採取した。また採取した軟骨より RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いた定量的 RT-PCR により、軟骨・骨分化マーカー、II 型・X 型コラーゲン、ヒアルロン酸合成因子、プロテオグリカン合成因子、マトリックス分解酵素の遺伝子発現量を測定した。

3.4. 関節リウマチに及ぼす II 型コラーゲンペプチドとグルコサミンの影響 (SKG マウスを用いた検討)

実験動物として SKG/Jcl (雌、10 週齢) 20 匹を用い、25 mg のマンナンを腹腔内投与することによりリウマチを惹起させた。これを 1 群 5 匹としてコントロール (C) 群、コラーゲンペプチド (Cp) 群、グルコサミン (Gn) 群、コラーゲンペプチド+グルコサミン (Cp+Gn) 群の 4 群に分け、Cp 群と Cp+Gn 群は 1 日あたり 100 mg のトリ軟骨由来コラーゲンペプチドを、Gn 群と Cp+Gn 群は 10 mg のグルコサミンを 5 週間摂取させた。リウマチ関節炎非発症のネガティブコントロール (N) 群としては BALB/cA Jcl マウスを用い、週に 1 度関節炎スコアによりリウマチ関節炎の発症状態を評価した。実験期間終了後解剖し、臓器重量を測定するとともに、血液、大腿骨、腓骨を採取し、大腿骨強度と骨組成を測定した。また、軟骨から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により軟骨における遺伝子発現量を測定した。さらに、血液中の炎症性サイトカインを ELISA 法により定量した。

4. 研究成果

4.1. 軟骨分化に及ぼすコラーゲンペプチドの影響 (ATDC 細胞を用いた検討)

まず、軟骨モデル細胞である ATDC5 細胞を用いて、コラーゲン摂取後に血液中に存在する代表的なジペプチドである Pro-Hyp と Hyp-Gly が軟骨細胞の初期分化と細胞外マトリックスを構成する糖鎖の発現に及ぼす影響を検討した。

シリウスレッド染色により、Pro-Hyp が軟骨初期分化時のコラーゲン合成を増加させることが示された。また、Pro-Hyp は II 型コラーゲン構成タンパク質である Col2a1 遺伝子の発現を増加させるとともに、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質であるアグリカンや、そのグリコサミノグリカン糖鎖の合成遺伝子である Chsy1 の発現を増加させたことから、Pro-Hyp の添加により細胞外マトリックス形成が促進される可能性が示された。一方、Hyp-Gly の添加は X 型コラーゲンの構成タンパク質である Col10a1 遺伝子の発現を抑制したことから、軟骨後期分化への移行と軟骨細胞の骨化を抑制する可能性が示された (図 1)。軟骨初期分化のマーカーである Sox9 遺伝子の発現は、Pro-Hyp と Hyp-Gly のいずれでも増加したことから、これらのジペプチドが軟骨細胞の初期分化を促進させる可能性が示された。

さらに、後期分化への移行期と後期分化のそれぞれの段階において、コラーゲンペプチドの存在が軟骨分化に与える影響を、シリウスレッド染色を用いたコラーゲン量の測定と、アルシヤンブルー染色によるプロテオグリカン量の測定、アリザリンレッド染色によるカルシウム沈着量の測定により評価した。その結果、コラーゲン由来のジペプチドは初期軟骨分化から後期軟骨分化への移行を促進し、それにより軟骨形成を促進する可能性が示された。

軟骨初期分化状態である静止軟骨細胞が後期分化に移行して成熟や肥大化が亢進すると、軟骨が減少するとともに骨棘が形成されて変形性関節症の一因となる。本研究の結果から、コラーゲン由来ジペプチドである Pro-Hyp と Hyp-Gly は軟骨細胞の初期分化を促進して後期分化を抑制することにより、軟骨を構成する静止軟骨細胞を増加させる可能性が示された。

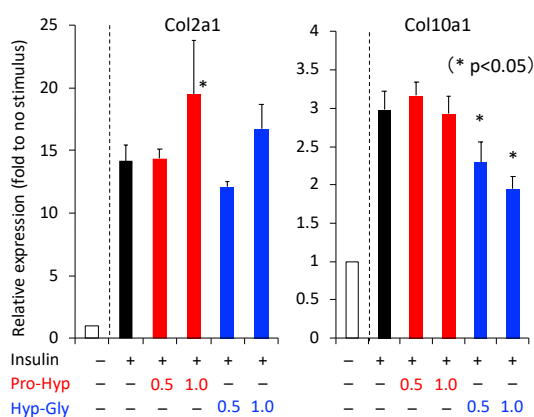


図1. ATDC5細胞の初期分化に及ぼすコラーゲン由来ジペプチドの影響(コラーゲン線維遺伝子の発現量)

4.2. 関節リウマチに及ぼす I 型コラーゲンペプチドの影響 (DBA マウスを用いた検討)

消化されたコラーゲンペプチドの一部はペプチド態のまま血中に移行することから、本項目では、コラーゲン誘導性関節炎モデルである DBA/1J マウスにニワトリ I 型コラーゲン由来のコラーゲンペプチドあるいはそれと同組成のアミノ酸を摂取させて比較検討することにより、ペプチド態としてのコラーゲンペプチドの有効性を検討した。1 日あたり 100 mg の I 型コラーゲンペプチドあるいはそれと同じ組成のアミノ酸を経口投与することにより、予想とは反対に関節での炎症がより強く生じた。また、アミノ酸投与群ではマトリックス分解酵素である MMP13 の発現量が有意に増加しており、コラーゲン構成アミノ酸の投与によりリウマチ関節炎が重症化する可能性が示唆された (図 2)。アミノ酸群はコラーゲンペプチド群よりも早期で重症化したことから、コラーゲンを構成するヒドロキシプロリンなどのアミノ酸自体が自己免疫を誘発したか、あるいは関節での炎症を促進させた可能性が考えられる。I 型コ

ラーゲンペプチド配合の健康食品は多く販売されているが、場合によってはその摂取が逆効果となる可能性があり、注意が必要であるものと考えられる。

軟骨におけるプロテオグリカン糖鎖合成遺伝子の発現量に関しては、有意ではないもののコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸合成酵素ともにコラーゲンペプチド群とアミノ酸群で増加する傾向がみられたが、これは関節炎による組織膨潤化と関連している可能性が考えられる。アミノ酸群とコラーゲンペプチド群ではその両方で重度の関節炎を発症したが、その最終的な関節炎スコアは同程度であり、ペプチド態での摂取による軽減作用は認められなかった。また、感作動物のうち、関節炎発症動物と非発症動物との間で比較した場合は、滑膜細胞で産生されるマトリックス分解酵素である MMP3 とヒアルロン酸合成酵素である HAS 1 が発症動物で高値を示していたことから、食餌組成に関わらず関節炎発症動物で軟骨の破壊と関節の膨潤化が進行していることが示されたが、いずれも関節炎スコアと同様にコラーゲンペプチド投与による軽減作用は認められなかった。これらのことから、今回の実験において I 型コラーゲンペプチドの摂取の影響はそれを構成するアミノ酸の摂取と同様であり、消化吸収率以外にペプチド態であることによる相違はなかったものと考えられる。

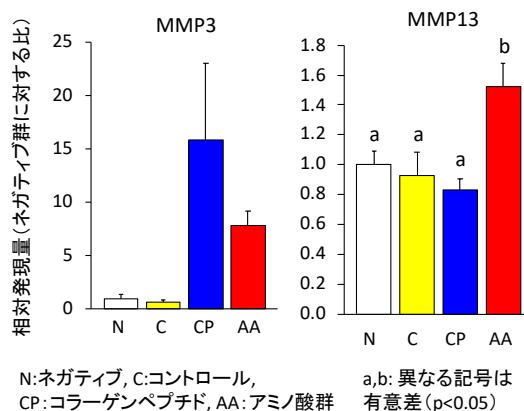


図2. コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにおけるマトリックス分解酵素の発現量

4.3. 関節リウマチに及ぼす I 型コラーゲンペプチドの影響 (SKG マウスを用いた検討)

4.2. の検討で、コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスでは I 型コラーゲンペプチドあるいはそれを構成するアミノ酸の投与により関節炎の悪化現象がみられたことから、関節リウマチ自然発症モデルである SKG マウスに I 型コラーゲンペプチドを摂取させた場合でも同様の影響がみられるかどうかについて検討した。

関節炎スコアで評価した関節炎の状態は、アミノ酸群で増悪傾向がみられたが、コントロール群とコラーゲン群との間では差がみられなかった。臓器重量に関しては、肝臓、

腎臓、脾臓のいずれでも群間で差が認められなかった。また、骨強度と大腿骨ミネラル量についても、群間で差が認められなかった。リアルタイム PCR による遺伝子発現量では、コントロール群（リウマチ関節炎を発症）をネガティブ群（非発症）と比較した場合、II型コラーゲン構成分子である *Col2a1* と軟骨分化因子である *Runx2* の発現が有意に低下しており、マトリックス分解酵素である *Mmp3* が有意に増加していた。コントロール群とアミノ酸群・コラーゲン群の比較では、アミノ酸群とコラーゲン群でヘパラン硫酸合成酵素である *Ext1* の発現のみ有意に低下していた（図3）。さらに、有意差はみられなかったものの、炎症と軟骨破壊に関与している *Mmp3* と *Mmp13*、*Has3* がコラーゲン群で低下する傾向がみられた。

これらの結果から、リウマチ関節炎を発症した SKG マウスにおいては軟骨の分化・成熟が抑制され、軟骨の分解と炎症が亢進していたが、これに対するコラーゲンペプチド投与の明確な効果は認められなかった。一方、CIA リウマチモデルマウスと同様、SKG マウスにおいてもコラーゲンペプチドを構成するアミノ酸の投与によって関節炎が増悪する傾向がみられたことから、コラーゲン構成アミノ酸自体の摂取はリウマチ関節炎に好ましくない影響を与える可能性が考えられる。SKG マウスでは、I型コラーゲンペプチドによる増悪作用はみられなかったが、ペプチド態による有効性も認められなかったことから、コラーゲンペプチドによる軟骨形成促進作用は大きくないものと考えられる。

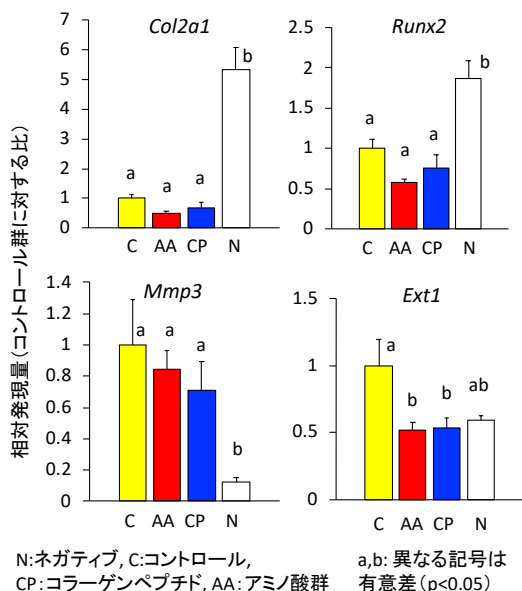


図3. SKGマウスの軟骨における遺伝子発現量

4.4. 関節リウマチに及ぼす II 型コラーゲンペプチドとグルコサミンの影響 (SKG マウスを用いた検討)

I型コラーゲンのペプチドの投与では CIA モデル、SKG マウスともに有効性が認められ

なかったことから、本項目では軟骨構成成分の有効性を明確にするために、軟骨構成成分である II 型コラーゲン由来ペプチドとグルコサミンを関節リウマチ自然発症モデルである SKG マウスに投与することにより、それぞれのリウマチ関節炎の発症に及ぼす影響と相互作用を比較検討した。

関節炎スコアによる関節炎症状の評価では、II型コラーゲンペプチドの摂取は関節炎症状の軽減効果を示したのに対し、グルコサミン単独の摂取では寧ろ悪化傾向がみられた。一方、両者の併用では II 型コラーゲンペプチド単独より関節炎の抑制効果が大きく、相乗効果を持つことが示唆された（図4）。また、グルコサミンの摂取は骨形成を抑制し、骨強度を低下させる可能性が示されたが、これに関しても II 型コラーゲンペプチドとの併用により改善されることが示された。SKG マウスにおけるグルコサミンの作用には、軟骨分化能の低下や骨破壊の促進、骨形成の低下などがみられたが、一方で軟骨を破壊するマトリックス分解酵素を抑制し、組織膨潤化と軟部組織の増加を抑制したことから、関節炎症状進行に対して、二面性を持つものと考えられる（図5）。SKG マウスにおけるリウマチ関節炎の発症には、インターロイキン-6 やインターロイキン-17 などの炎症性サイトカインが関与しているが、II 型コラーゲンペプチドの摂取はこれらを抑制することにより関節炎を軽減したのに対し、グルコサミンはその抑制効果を持たないものの、軟骨基質の破壊を抑制する可能性が示された。

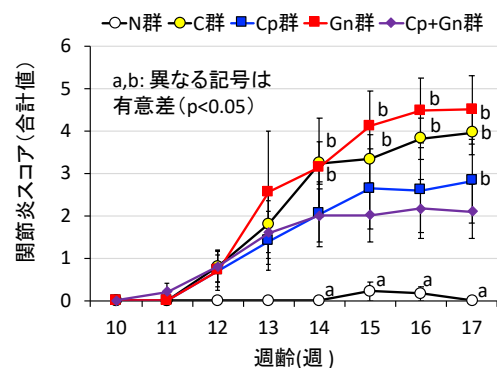


図4. SKGマウスの関節炎スコアに及ぼすII型コラーゲンペプチドとグルコサミンの影響

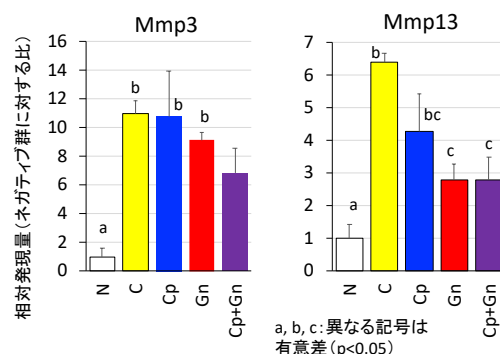


図5. SKGマウスにおける細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) の発現量

これらの結果から、関節リウマチを発症した SKG マウスでは関節の炎症と軟骨分解が亢進するが、軟骨由来成分である II 型コラーゲンペプチドの投与によりその症状が軽減される可能性が示された。一方、グルコサミン単独の投与では有効性が乏しいものの、コラーゲンペプチドの作用を増強することによる相乗効果が期待できることが示された。

4.5. 結論と今後の展望

本研究により、コラーゲン由来ジペプチドである Pro-Hyp と Hyp-Gly は軟骨細胞の初期分化を促進して後期分化を抑制することにより、軟骨を構成する静止軟骨細胞を増加させる可能性が示された。

また、II 型コラーゲンペプチドとグルコサミンは関節リウマチに異なる作用を有しており、その併用により相乗効果がみられる可能性が示された。一方、I 型コラーゲンペプチドの投与は一部の糖鎖合成遺伝子の発現を変化させたが、関節炎症の改善作用を示さず、その構成アミノ酸の摂取もむしろ関節炎を悪化させた。これらのことから、軟骨を構成する成分である II 型コラーゲンペプチドの摂取は I 型コラーゲンペプチドと異なり、軟骨形成の促進ではなく、経口免疫寛容などの機構により関節炎の発症を抑制する可能性が考えられる。ここで、本研究で用いた II 型コラーゲンペプチドは純粋な II 型コラーゲンペプチドではなく、コンドロイチン硫酸などを含む軟骨基質の混合物であることから、II 型コラーゲンペプチドの作用に関しては、純粋な II 型コラーゲンペプチドを用いた検討が必要であるものと考えられる。

コラーゲンとグルコサミンによるリウマチ関節炎の症状軽減作用に関しては、多くの研究があるにもかかわらず統一した見解が得られていない。これはコラーゲン摂取による作用のメカニズムが明確にされていない上、摂取するコラーゲンの分子状態 (I 型由来・II 型由来、非変性・変性、ペプチド態など) が多様であることも一因となっている。今後の研究により、コラーゲンペプチドのみならずグルコサミンとの作用についても、モデル動物を用いた検討による詳細な作用機構の解明がなされるとともに、ヒトを用いた大規模試験から、その有効性が明らかにされることが待ち望まれる。

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 2 件)

1. DBA/1J マウスにおける I 型コラーゲン構成アミノ酸によるコラーゲン誘導性関節炎の誘発促進

神山 伸、中嶋祐里、野口悠希、白井麻由、永田穂乃花、曾根英行

人間生活学研究 9: 57-67 (2018) 査読有

2. コラーゲン由来ジペプチドが ATDC5 細胞の軟骨分化と糖鎖合成に及ぼす影響

神山 伸、野口悠希、中嶋祐里、白井麻由、永田穂乃花、塩沢浩太、曾根英行

Trace Nutrients Research 34, 66-73 (2017)

査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 伸 (KAMIYAMA, Shin)

新潟県立大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：70525401