

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460642

研究課題名(和文) 高比重リポ蛋白(HDL)が粥状動脈硬化進展に及ぼす影響の2面性について

研究課題名(英文) Anti- and pro-atherosclerotic features of high-density lipoprotein

研究代表者

戸塚 実(TOZUKA, MINORU)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：60431954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗粥状動脈硬化作用があるとされる高比重リポタンパク(HDL)は、その量だけではなく機能を評価することが心血管疾患の治療、予防に重要と考えられている。本研究ではHDLの中心的な機能であるコレステロール引き抜き能、抗酸化作用、抗炎症作用について検討し、抗粥状動脈硬化作用機序の一端を明らかにするとともに、機能評価法のわずかな条件の違いで解釈の異なる結果が得られ場合があることを明らかにした。これらの成果は、標準的な機能評価法の確立に向けた基礎データとして重要である。

研究成果の概要(英文)：It is believed that the estimation of the functions of high-density lipoprotein (HDL), anti-atherosclerotic lipoprotein, is essential for medical treatment and prevention of cardiovascular disease. In the present study, we clarified a part of the mechanism of anti-atherosclerotic functions, such as cholesterol efflux capacity, anti-inflammation, and antioxidant ability, induced by HDL. In addition, we indicated that the result of cholesterol efflux capacity given an opposite interpretation was occasionally obtained by using slightly different conditions in the assay procedure accepted widely. These observations could be important to standardize the assay methods for the estimation of the functions of HDL.

研究分野：臨床化学、リポタンパク代謝

キーワード：HDL 酸化LDL コレステロール引き抜き能 抗酸化作用 抗炎症作用 apolipoprotein A-I myeloperoxidase paraoxonase 1

## 1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患による高い死亡率は先進諸国に共通した事象であり、有効な診断法および治療法の開発が期待される疾患の一つである。血清中低比重リポ蛋白 (LDL) の高値は冠動脈疾患発症の代表的な脂質関連リスクであると考えられ、スタチン製剤によりコレステロール合成を阻害し、その結果として血清 LDL-コレステロールを低下させる治療が現在の中心的な治療の一つになっている。本治療により冠動脈疾患発症リスクはある程度軽減され、心筋梗塞による死亡数は3分の2程度に減少したとする報告がある。しかし、その効果は十分とは言えない。

近年、高比重リポ蛋白 (HDL) の抗粥状動脈硬化作用の重要性が再認識され、コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 阻害剤による HDL-コレステロールの増加によって粥状動脈硬化進展とそれに続く冠動脈疾患発症を予防しようという試みが期待を集めている。しかし、HDL-コレステロールを著しく上昇させ、LDL-コレステロールを低下させることは認められるものの、臨床試験によって冠動脈疾患の発症率に対象群と有意差がないという報告がなされ、大きな期待はできないという見方も多い。これは、単に HDL の量を増加させるだけでは不十分であり、あわせて HDL の質について考慮しなければならないことを示している。

## 2. 研究の目的

抗粥状動脈硬化作用のある高比重リポ蛋白 (HDL) を劇的に増加させる CETP 阻害剤が注目されているが、その効果を危ぶむ報告も見られる。これは、HDL-コレステロール定量による病態解析に限界があり、HDL の質を解析することが重要であることを示唆している。すなわち、HDL は常に抗粥状動脈硬化作用を示すとは限らず、むしろ粥状動脈硬化促進的に作用する可能性があると考えられる。本研究では修飾 HDL にターゲットを絞り、HDL の機能解析を実施し、解析法の特徴を明らかにするとともに、分子構造と機能の関係について明らかにすることを目指す。これらの成果は、HDL の粥状動脈硬化における2面性を明らかにし、冠動脈疾患発症の予防的治療に向けたターゲットの開発に繋がると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) myeloperoxidase による酸化の影響

HDL を *in vitro* において myeloperoxidase で酸化し、酸化の進行とその程度は SDS-PAGE によるアポ蛋白の profile 変化にて評価した。酸化 HDL および酸化していない (未酸化) HDL の抗粥状動脈硬化作用は下記のとおり比較検討した。抗酸化作用は硫酸銅による LDL の酸化に及ぼす HDL の影響を、酸化によって生じる脂肪酸分子中のジエン構造の増加を 234 nm でモニターすることで評価した。抗炎症作

用は血管内皮細胞をリポポリサッカライド (LPS) で刺激後、その培養液の単球遊走性ケモカイン (MCP-1) を測定するとともに、Chemotaxicell を用いて直接 THP-1 の遊走を評価した。コレステロール引き抜き能は THP-1 細胞を PMA 刺激で分化後、アセチル LDL および  $^3\text{H}$ -コレステロールを食食させて泡沫化と標識を行った後、酸化あるいは未酸化 HDL を含む培地で培養し、培地中に放出された放射活性により評価した。

### (2) HDL の抗酸化作用発現機序

HDL の抗酸化作用に関係する HDL 上の paraoxonase1 (PON1) がどのように LDL の酸化を抑制しているのか、その機序を明らかにする。超遠心法により HDL と LDL を分離精製し、LDL の一部を硫酸銅で酸化して酸化 LDL を調製した。HDL と酸化あるいは未酸化 LDL をインキュベーションした後、ゲルろ過および再超遠心により再分離し、PON1 の動態について検討した。また、HDL とインキュベーション後の LDL の特性変化について評価した。

### (3) コレステロール引き抜き能評価法

コレステロール引き抜き能の評価法は、アクセプターとして HDL ではなく HDL の主要アポ蛋白である apoA-I を用いた以外は同様に行った。THP-1 細胞の PMA による分化、アセチル LDL 食食による泡沫化の日数を 1-5 日と変化させ、コレステロール引き抜き能の変化を評価した。分化の程度は CD11b 抗原の増加、泡沫化の程度は細胞内油滴 (droplet) の蓄積を定量化することによって評価した。

### (4) HDL と *Mycobacterium avium* (*M. avium*) の結合

HDL と *M. avium* の結合性について、可溶化菌体を試料とした SDS-PAGE 後のイムノブロット法により確認した。*M. avium* の脂質分子との結合を評価するため、抽出脂質を薄層クロマトグラフィで分離後、イムノブロット法によって結合に関与する脂質を特定した。

## 4. 研究成果

### (1) myeloperoxidase による酸化の影響

HDL を *in vitro* において MPO で酸化すると、HDL の粒子サイズに大きな変化は見られないが、アポ蛋白に関しては apoA-I/apoA-II heterodimer, apoA-I dimer, apoA-I trimer などの complex が出現するとともに、monomer にもわずかに大きな分子量のものが確認された (Fig. 1)。MPO 酸化が HDL の抗酸化作用 (Fig. 2)、抗炎症作用 (リポポリサッカライド<LPS>中和作用) (Fig. 3)、コレステロール引き抜き能 (Fig. 4) について検索したところ、抗炎症作用は MPO 酸化で有意に減弱することが明らかになったが、その他の機能には影響を及ぼさなかった。

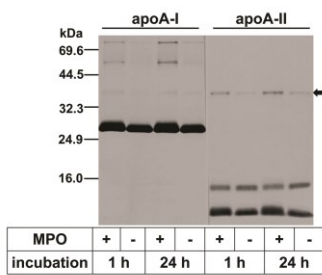


Fig 1. MPO 酸化による HDL 中アポ蛋白の profile 変化 apoA-I および apoA-II 抗体を用いた immunoblot 法により両抗体のいずれとも反応する 37kDa のバンド (矢印) および apoA-I 抗体と反応する 50 および 80kDa のバンドが確認された。

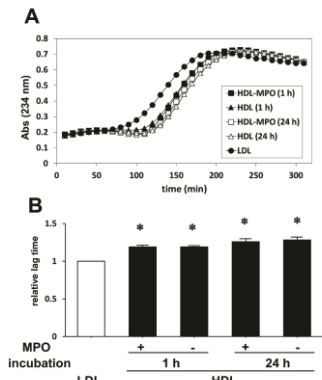


Fig 2. HDL の抗酸化作用に及ぼす MPO 酸化の影響 (A) 硫酸銅による酸化はジェン形成をモニター (234 nm) することで評価した. (B) LDL 単独 (白色棒) における硫酸銅による酸化が急激に進展するまでの時間 (lag time) を 1 とすると, HDL の添加により相対的 lag time は有意に延長した. しかし, HDL の MPO 酸化の有無でその効果に有意な変化は見られなかった.

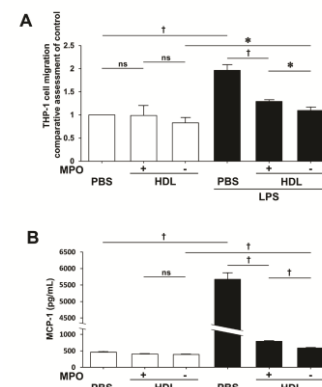


Fig 3. HDL の抗炎症作用に及ぼす MPO 酸化の影響 HDL の抗炎症作用は LPS 刺激内皮細胞培養液を用いた THP-1 細胞の遊走 (A) および培養液中の MCP-1 濃度 (B) で評価した. 対象群 (白色棒) では HDL の有無および MPO 酸化の有無に関わらず, 有意な違いは見られなかった. 一方, LPS 刺激群では HDL なし (PBS) に比べて HDL ありで有意に THP-1 細胞の遊走および MCP-1 分泌を抑制したが, その程度は MPO 酸化によって有意に減弱された.

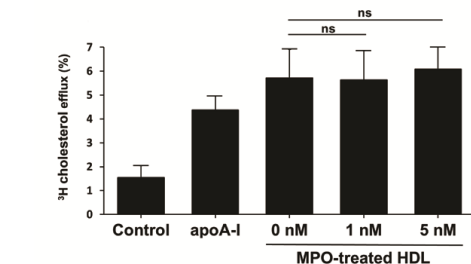


Fig 4. HDL のコレステロール引き抜き能に及ぼす MPO 酸化の影響 HDL のコレステロール引き抜き能は MPO 酸化の程度に無関係に影響を受けなかった.

## (2) HDL の抗酸化作用発現機序

HDL の機能の一つに抗酸化作用がある. HDL 上に存在する paraoxonase1 (PON1) は HDL の抗酸化作用の中心的役割を果たしていると考えられるが, その作用機序は明確ではない. 本研究では PON1 のほとんどが HDL 分画に存在することを確認した上で, HDL 上の PON1 が LDL に転送されることを明らかにした (Fig. 5). また, その転送量は LDL の酸化度が増すほど比例的に増加することが確認された (Fig. 6). LDL に移行した PON1 の役割については解析中であるが, アガロース電気泳動の LDL の移動度が HDL とのインキュベーションによってわずかに減少することから, 酸化抑制に関わっている可能性が示唆される (Fig. 7).

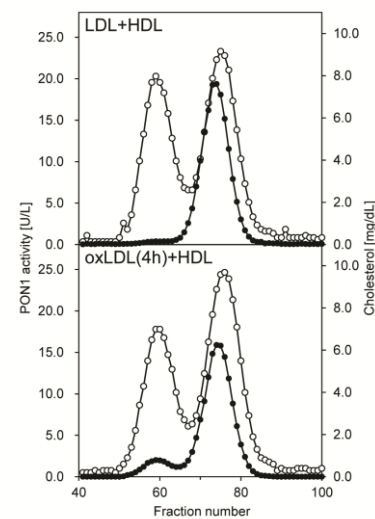


Fig 5 HDL と LDL のインキュベーション後のゲルろ過クロマトグラフィによる分離 LDL および硫酸銅で 4 時間酸化した LDL を HDL とインキュベーション後, CL-6B Sepharose カラムを用いてゲルろ過を行った. 得られたフラクションのコレステロール濃度 (○) および PON1 活性 (●) を示す. 酸化 LDL とのインキュベーションでは Fraction number 60 付近の LDL 分画に有意に増加した PON1 活性のピークが認められる.

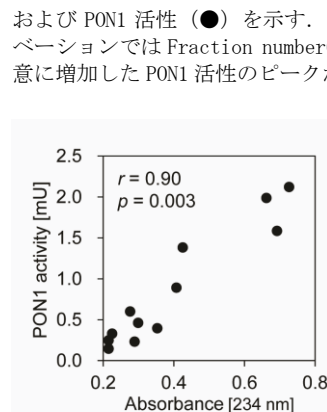


Fig 6 PON1 活性とジェン量の相関 硫酸銅による様々な酸化度の LDL 中のジェン量 (234nm の吸光度) と HDL とインキュベーション後に移行した PON1 活性の相関を示す. 両指標に強い相関があることが認められる.

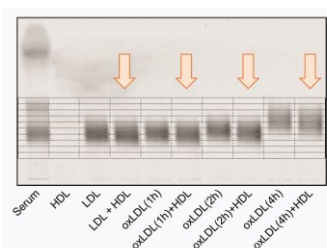


Fig 7 LDL のアガロース電気泳動像 硫酸銅との反応が 1, 2, 4 時間と長くなるにしたがって LDL の酸化が進行し, 移動度が増加する. しかし, HDL とインキュベーション後に超遠心法で分離した LDL の移動度はわずかに減少する傾向が認められる.

### (3) コレステロール引き抜き能評価法

HDL およびその主要構成蛋白である apoA-I の抗粥状動脈硬化作用の中心的機能はコレステロール引き抜き能だと考えられている。多くの研究者によってコレステロール引き抜き能の評価が実施されているが、相反する結果が得られているのが実情である。本研究では、使用単球系細胞のマクロファージへの分化度 (Fig. 8) およびアセチル化 LDL を用いた泡沫化度 (Fig. 9) の違いが結果に及ぼす影響を検索した。その結果、分化度および泡沫化度の違いで解釈の異なる結果が得られることが明らかになった (Fig. 10, 11)。また、過度な分化によるコレステロール引き抜き能の低下は ABCA1 トランスポーターの発現量低下が関与していることが示唆された。一方、過度な泡沫化による低下に関しては ABCA1 トランスポーターの発現量に大きな変化が認められないこと、引き抜かれるコレステロールの絶対量は泡沫化の日数によって大きく変化していないが細胞内のコレステロールが激増することから、%表示のコレステロール引き抜き能が低下したのが一因と考えられた。

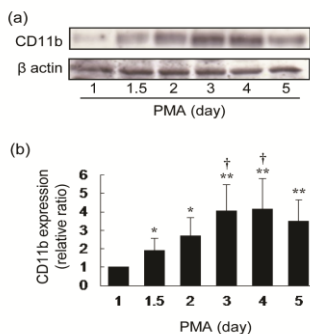


Fig. 8 THP-1 細胞の PMA 刺激による分化の経時変化 THP-1 細胞を PMA で刺激し、経時的に分化のマーカーである CD11b をイムノプロット法で可視化した (a)。また、 $\beta$  アクチンを対照としてデンストメトリーにより CD11b を定量的に評価した (b)。CD11b は刺激後 3 日目でピークに達し、プラトーとなったが、5 日目には減少に転じた。

実際に、修飾 apoA-I の一つとして知られている N-ホモシスチニン化 apoA-I について分化度および泡沫化度の違う THP-1 由来マクロファージでコレステロール引き抜き能を解析したところ、分化度および泡沫化度が比較的軽度の場合は非修飾 apoA-I より有意に低下が認められたが、分化度および泡沫化度が高くなると両者に有意な差は認められなくなった (Fig. 12)。すなわち、初期の病巣では HDL あるいは apoA-I の化学的修飾が抗粥状動脈硬化作用を阻害するが、病巣の進行によって両者に違いがなくなる可能性が示唆された。本研究によって得られた成果はコレステロール引き抜き能の標準化、あるいは病期を意識したコレステロール引き抜き能評価という点で重要な知見である。

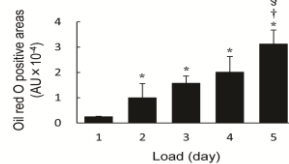


Fig. 9 THP-1 マクロファージのアセチル化 LDL による泡沫化度の経時変化

$^3\text{H}$  標識コレステロールとともに、アセチル化 LDL を用いて THP-1 マクロファージを泡沫化した。脂質ドロップレットの蓄積は経時的に増加し続けた。

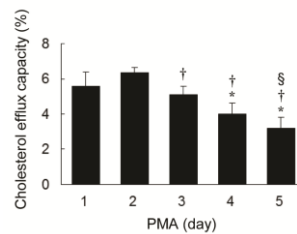


Fig. 10 HDL のコレステロール引き抜き能に及ぼす THP-1 細胞の分化度の影響

アセチル化 LDL による泡沫化を 2 日に固定し、PMA 刺激の日数を変化させ、分化度がコレステロール引き抜き能に及ぼす影響を検討した。2 日の刺激でピークに達しその後徐々に減少した。1 日の刺激でもピーク時 (2 日目) の 90% 弱のコレステロール引き抜き能が認められた。

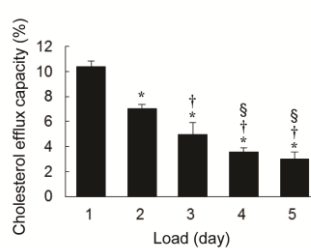


Fig. 11 HDL のコレステロール引き抜き能に及ぼす THP-1 マクロファージの泡沫化度の影響

PMA 刺激による分化を 2 日に固定し、アセチル化 LDL による泡沫化の日数を変化させ、泡沫化度がコレステロール引き抜き能に及ぼす影響を検討した。1 日の泡沫化でピークに達し、その後大きな減少を示した。

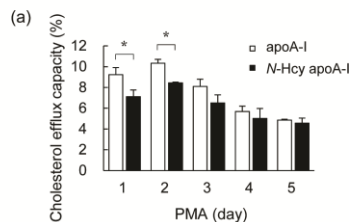
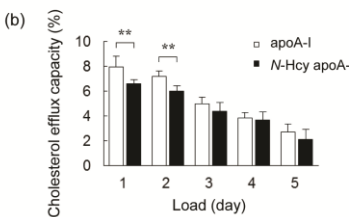


Fig. 12 分化度および泡沫化度が apoA-I および N-ホモシスチニン化 apoA-I のコレステロール引き抜き能に及ぼす影響



泡沫化の日数を 2 日に固定して PMA 刺激による分化の日数を変化させた時 (a) および PMA 刺激を 2 日に固定してアセチル化 LDL による泡沫化の日数を変化させた時 (b) の apoA-I と N-ホモシスチニン化 apoA-I のコレステロール引き抜き能を比較した。分化度、泡沫化度の違いで両 HDL 間に有意の差がある場合とない場合が生じることが示された。

### (4) HDL と *Mycobacterium avium* (*M. avium*) の結合

HDL は LPS に結合して LPS を中和し、炎症を抑制すると考えられるが、本研究においてグラム陰性桿菌よりも *M. avium* に強く結合することが明らかになった (Fig. 13)。また、その結合には *M. avium* のもつ脂質が関与していることが示された。*M. avium* 感染との関連で興味のもたれる知見である。

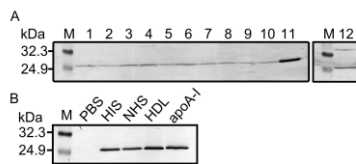


Fig.13 各種細菌とHDLの結合  
(A) 各種細菌抽出物をSDS-PAGEで分離後、

PVDF膜に転写し、HDLとの反応性を抗 apoA-I抗体を用いて可視化した。レーン11が *M. avium*。(B) 同様に *M. avium*抽出物を分離後、熱非動化血清(HIS)、血清(NHS)、HDL、apoA-Iと反応させ、抗 apoA-I抗体を用いて可視化した。

## 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 5件)

- ① Yoshimoto A, Ohkawa R, Yano K, Sato M, Ichimura N, Usami Y, Miyazaki A, Sugano M, Uehara T, Tozuka M. Paraoxonase 1 associated with high-density lipoprotein transfers to oxidized low-density lipoprotein depending on the degree of oxidation. *Int J Anal Bio-Sci*, 査読あり, 4: 99-109, 2016
- ② Ichimura N, Sato M, Yoshimoto A, Yano K, Ohkawa R, Kasama T, Tozuka M. High-density lipoprotein binds to *Mycobacterium avium* and affects the infection of THP-1 macrophage. *J Lipids*, 査読あり, 2016, 2016/4353620
- ③ Sato M, Ohkawa R, Yoshimoto A, Yano K, Ichimura N, Nishimori M, Okubo S., Yatomi Y, Tozuka M. Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein. *Biosci Rep*, 査読あり, 2016. doi: 10.1042/BSR20160075.
- ④ Yano K, Ohkawa R, Sato M, Yoshimoto A, Ichimura N, Kameda T, Kubota T, Tozuka M. Cholesterol efflux capacity of apolipoprotein A-I varies with the extent of differentiation and foam cell formation of THP-1 cells. *J Lipids*, 査読あり, 2016, 2016/9891316
- ⑤ Kameda T, Ohkawa R, Yano K, Usami Y, Miyazaki A, Matsuda K, Kawasaki K, Sugano M, Kubota T, Tozuka M. Effects of Myeloperoxidase-Induced Oxidation on Anti-Atherogenic Functions of High-Density Lipoprotein. *J Lipids*, 査読あり, 2015, doi, org/10.1155/2015/592594

[学会発表] (計 18件)

- ① 頼 劭睿, 大川 龍之介, 矢野 康次, 佐藤 恵美, 吉本 明, 戸塚 実. 赤血球はアポリポタンパク A-Iによる泡沫細胞からのコレステロール引き抜きに関与している。第

27回生物試料分析学会年次学術集会  
2017. 2. 11-2. 12 朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター，新潟県，新潟市

- ② 矢野 康次, 大川 龍之介, 佐藤 恵美, 吉本 明, 市村 直也, 亀田 貴寛, 窪田 哲朗, 戸塚 実. コレステロール引き抜き能評価は細胞の分化・泡沫化の程度に大きく影響を受ける。第27回生物試料分析学会年次学術集会 2017. 2. 11-2. 12 朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター，新潟県，新潟市
- ③ Yoshimoto A., Ohkawa R., Sato M., Yano K., Tozuka M. Oxidized low-density lipoprotein receives an antioxidant enzyme paraoxonase 1 from high-density lipoprotein. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress, 2016 11.26-29, Taipei, Taiwan
- ④ Ikoma H., Ohkawa R., Yoshimoto A., Sato M., Kasama T., Tozuka M. Analysis of oxidative susceptibility and fatty acid profile in apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress, 2016 11.26-29, Taipei, Taiwan
- ⑤ Morita M., Ohkawa R., Satou M., Yoshimoto A., Yano K., Kasama T., Tozuka M. Modification of apo-lipoprotein A-I in high-density lipoprotein by myeloperoxidase and chymase. The 32<sup>nd</sup> World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2016 8.31-9.4. Kobe Convention Center, Hyogo, Kobe, Japan
- ⑥ Kobayashi T., Kurano M., Nojiri T., Ohkawa R., Tozuka M., Okubo S., Yatomi Y. Oxidation and glycation modulate HDL capacity to carry Sphingosine 1-phosphate, an Anti-atherosclerotic Bioactive Lipid. The 32<sup>nd</sup> World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2016 8.31-9.4. Kobe Convention Center, Hyogo, Kobe, Japan
- ⑦ Sato M., Ohkawa R., Yoshimoto A., Yano K., Okubo S., Yatomi Y., Tozuka M., Effect of SAA on the antioxidant ability of HDL. American Association for Clinical Chemistry (AACC) 2016 Annual Meeting and Clinical Lab Expo. 2016 7.31-8.4. Philadelphia, USA.
- ⑧ Yano K., Ohkawa R., Sato M., Yoshimoto A., Kubota T., Tozuka M., Effect of differentiation and foam cell formation on cholesterol efflux capacity of apolipoprotein A-I. American Association for Clinical Chemistry (AACC) 2016 Annual Meeting

- and Clinical Lab Expo. 2016 7. 31-8. 4. Philadelphia, USA.
- ⑨ 佐藤 恵美, 垂門 碧, 大川 龍之介, 吉本明, 矢野 康次, 三上 周子, 生駒 勇人, 森田 真麻, 頼 劭睿, 戸塚 実. 血清アミロイドAがHDLの抗酸化能に与える影響. 第26回生物試料分析科学会年次学術集会. 2016. 2. 20. 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県, 宜野湾市
- ⑩ 亀田 貴寛, 伊藤 さやか, 宇佐美 陽子, 宮崎 あかり, 栗原 由利子, 大川 龍之介, 細萱 茂実, 戸塚 実. リポタンパクがヒト末梢血単核球 (PBMC) のインターロイキン-1 $\beta$ 前駆体の発現に与える影響の解析. 第62回日本臨床検査医学会学術集会, 2015. 11. 21. 岐阜国際会議場, 岐阜県, 岐阜市
- ⑪ Yoshimoto A., Sato M., Yano K., Usami Y., Miyazaki A., Sugano M., Ohkawa R., Tozuka M. Paraoxonase1 participates in antioxidant ability of HDL as a constituent protein but not its enzymatic activity. EuroMedLab Paris 2015 the 21st IFCC-EFLM (European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). 2015 6. 21-25. Paris, France
- ⑫ 西坂薫子, 亀田貴寛, 大川龍之介, 戸塚実, MyeloperoxidaseによるHDLの酸化はapoA-Iのchymase分解を促進する, 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 2014. 11. 22-25, 福岡国際会議場, 福岡県, 福岡市
- ⑬ 間宮周平, 吉本 明, 亀田貴寛, 大川龍之介, 戸塚 実, apoE含有HDLの抗酸化能評価, 第54回日本臨床化学会年次学術集会, 2014. 9. 5-7, 東京大学本郷キャンパス, 東京都, 文京区
- ⑭ 亀田貴寛, 宇佐美陽子, 寒河江 望, 佐藤恵美, 大川龍之介, 戸塚 実, Myeloperoxidaseによる酸化がHDLの機能に及ぼす影響, 第54回日本臨床化学会年次学術集会, 2014. 9. 5-7, 東京大学本郷キャンパス, 東京都, 文京区
- ⑮ 寒河江 望, 宮崎あかり, 吉本 明, 大川龍之介, 戸塚 実, N-homocysteinylated apolipoprotein AIの機能解析, 第54回日本臨床化学会年次学術集会, 2014. 9. 5-7, 東京大学本郷キャンパス, 東京都, 文京区
- ⑯ Kameda T, Usami Y, Sagae N, Ohkawa R., Tozuka M. Effects of myeloperoxidase-modified HDL on reverse cholesterol transport and Association for Clinical Chemistry (AACC), Annual Meeting 2014, 2014. 7. 28-8.1 Chicago, USA
- ⑰ Mamiya S, Yoshimoto A, Sato M, Ohkawa R., Tozuka M. Lipid hydroperoxides in apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein. American

Association for Clinical Chemistry (AACC), Annual Meeting 2014, 2014. 7. 28-8.1 Chicago, USA

- ⑱ Sato M, Ohkawa R., Kameda T, Yoshimoto A, Ohkubo S, Yatomi Y, Tozuka M. Effect of SAA on the structure and measurement method of HDL. American Association for Clinical Chemistry (AACC), Annual Meeting 2014, 2014. 7. 28-8.1 Chicago, USA

[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

[www.tmd.ac.jp/gradh/alc/index.html](http://www.tmd.ac.jp/gradh/alc/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸塚 実 (TOZUKA Minoru)  
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学  
研究科・教授  
研究者番号 : 60431954

### (2) 研究分担者

大川 龍之介 (OHKAWA Ryunosuke)  
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学  
研究科・助教  
研究者番号 : 50420203

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

( )