

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461825

研究課題名(和文) 14.1 T MR 顕微鏡によるメダカ ヒト疾患モデルでの発ガン過程の経時的可視化

研究課題名(英文) In vivo Imaging of a Disease Model in Medaka by 14.1 T MR Microscopy

研究代表者

上野 智弘 (Ueno, Tomohiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10379034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低温麻酔を用いることでMR顕微鏡のin vivoイメージングによるメダカ ヒト疾患モデルを経時的に可視化し、その病態を定量的に評価することに成功した。ヒト疾患モデルとしては非アルコール性脂肪性肝疾患を作成し、その脂肪肝の状態を組織中の中性脂肪の量として定量的に評価した。また、低温麻酔の最適化により、疾患モデルのメダカの生存率を1とすることに成功した。これらにより、病態の解明や創薬研究に貢献できると考えられる。

また、鉄沈着量や組織の酸素消費量を定量的に評価できる手法である定量的磁化率マッピングを高品質化する新たな手法を見出し、その効果を実証した。

研究成果の概要(英文)：We developed in vivo magnetic resonance microscopy by combining hypothermic anesthesia and a 14.1 T MR microscope. Using a in vivo MR microscopy, we noninvasively evaluated the hepatic steatosis level of a non-alcoholic fatty liver disease model in medaka as the triglyceride fat concentration in liver tissue and followed the individual disease progression. Moreover, we optimized the hypothermic anesthesia procedure to obtain a recovery proportion of 1 in the experiment involving MR microscopy. The in vivo MR microscopy will expand the possibilities of a human disease model in fish.

In addition, we improved spatial resolution and quantitative accuracy of MRI quantitative susceptibility mapping using wider band dipole inversion. This leads to more quantitative evaluation of iron deposits and oxygen consumption in a brain tissue.

研究分野：MRI物理学

キーワード：磁気共鳴映像法 非アルコール性脂肪性肝疾患 定量的磁化率マッピング

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) MR 顕微鏡の開発

我々は 14.1 T の高磁場を用い、高分解能の MRI である MR 顕微鏡の開発を行なっている。図 1 に当時の装置の概要を示す。

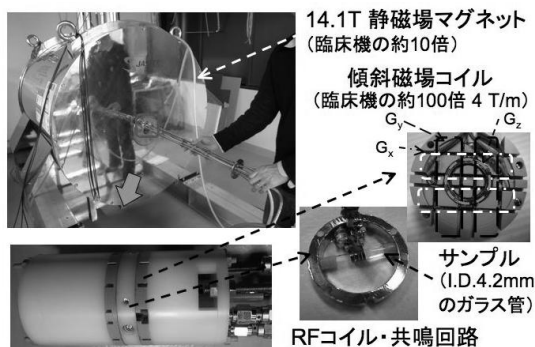


図 1 開発した MR 顕微鏡：14.1 T マグネット、傾斜磁場コイル、小型共鳴回路で構成されている。

MR 顕微鏡で用いている 14.1 T は日本での標準的臨床用 MRI における磁場 1.5 T の約 10 倍の高磁場である。さらに、MR 顕微鏡では約 4 T/m の傾斜磁場強度（標準的臨床用 MRI での強度の約 100 倍）と小型共鳴回路を組み合わせ、20  $\mu\text{m}$  までの空間解像度を達成している。そして、死後直後のガン抑制遺伝子 p53 変異型のメダカと野生型メダカの MR 画像が大きく異なることを見出した (T. Ueno *et al.*, 3rd BMEiCON Conf. Proc. 2010, 201052)。図 2 に MR 顕微鏡によって得られた化学固定したメダカの 3 次元画像（空間解像度 40  $\mu\text{m}$ ）の 2 次元断面画像を示す。図 2 では信号加算や造影剤の添加は行っていない。

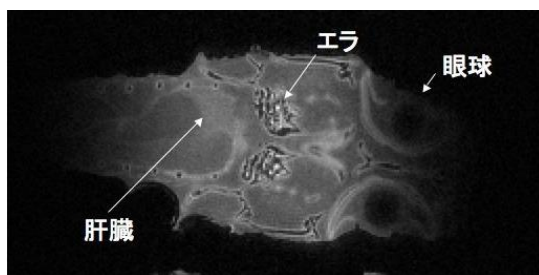


図 2 MR 顕微鏡で 3 次元撮像されたメダカの冠状断面画像：化学固定されたメダカの眼球、エラ、肝臓が確認できる。

### (2) メダカの低温麻酔

我々は MR 顕微鏡を用いてメダカを生きのまま撮像する (in vivo イメージング) ために、メダカを低温で麻痺させる予備実験を行っていた。この予備実験では、1 時間以上の間、メダカの心拍を維持しながら、酸素を供給せずに呼吸を停止させられることが分かった。さらに、麻酔後に水温を上昇させることで、通常の遊泳に戻ることがわかった。一方、麻酔薬を使った麻痺では鰓の停止と心停止が同時に起きて死んでしまう。この低温麻酔を用いて、空気中においたメダカの in vivo イメージング (スライス撮像) に成功している。

### (3) 定量的磁化率マッピング

組織の状態を定量化するために、我々は組織中の磁化率の分布を画像化する定量的磁化率マッピング (QSM) の MR 顕微鏡への適用を行っていた。ここで求められた磁化率は、組織中の鉄含有量と相関が強く、組織の鉄沈着を画像化することになる。我々は、QSM の測定された MRI の画像から組織の磁化率を求める逆問題で、空間双極子場の働きのシミュレーションを行ない、デジタルサンプリングによる問題を見出した (M. Murashima *et al.*, Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. 2013 Jul. 1049-1052)。

### (4) 非アルコール性脂肪性肝疾患モデル

近年、肥満はガンを含む様々な病気の大きなリスクファクターとして認識されてきている。この肥満によって引き起こされる肝疾患群は非アルコール性脂肪性肝疾患である。さらに進行する脂肪肝として非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) があげられ、B 型肝炎や C 型肝炎以外での肝硬変や肝臓ガンの主たる原因となると考えられている。

2010 年にメダカの NASH モデルが作成された (T. Matsumoto *et al.*, Disease Models & Mechanisms 3, 431-440 (2010))。ここで、メダカは雑食性であり、糖や脂質の代謝様式が哺乳類に類似し、ヒト NASH の動物モデルとして齧歯類よりも優れている。また、マウスにおいて、NASH から肝細胞ガンを起こすモデルが作成され、腸内細菌の代謝産物と発ガンの関連が示唆されている (S. Yamamoto *et al.*, Nature 499, 97-101 (2013))。

酸素輸送に必須の鉄も、その過大な集積はガン化を引き起こす。最近の報告では、マウス腹部への鉄ニトリロ三酢酸の投与で、腎細胞ガンが高頻度に誘発されている (S. Akatsuka *et al.*, PLoS ONE 7, e43403 (2012))。

## 2. 研究の目的

上記の背景及びこれまでの研究経過をもとに、メダカの非アルコール性脂肪性肝疾患モデルを作成し、MR 顕微鏡により、疾患モデルを高解像度に 1 個体を経時的に定量的に可視化することを目標とした。さらに、定量的磁化率マッピングを高解像度化することで、鉄沈着や静脈 (オキシヘモグロビンの酸素が使われた状態のデオキシヘモグロビンの含有量が多く磁化率が変化する) を定量的に高分解能で可視化し、最終的には MR 顕微鏡に適用することも目指した。

## 3. 研究の方法

(1) メダカの非アルコール性脂肪性肝疾患モデルの作成

遺伝的な揺らぎの少ない近交系の Kyoto Cab と呼ばれる野生型のメダカとガン抑制遺伝子である p53 を変異させたメダカの 2 種類

を用いた。生後 12 週目から、高脂肪食餌を 1 日 3 回と通常食餌 1 日 1 回投与した群と通常食餌を 1 日 2 回投与した群の 2 つの食餌群を 2 種類のメダカに対して、それぞれ作成した。高脂肪食餌の投与期間は 16 週間以上である。

高脂肪食餌の投与期間 6 週間目、12 週間目、16 週間目において、ヘマトキシリン・エオジン染色とアザン染色をそれぞれ施した近交系メダカの肝臓組織切片を作成し、肝臓の状態を評価した。

## (2) メダカの低温麻酔

低温麻酔のメカニズムを明らかにするために、野生型の近交系のメダカを用いて、メダカの鰓蓋運動数と水温の冷却速度の関係を調べた。

平均 27 週齢のオスの近交系のメダカ、Kyoto-Cab、18 尾に対し、3 種類の冷却速度 ( $-0.7$ 、 $-0.2$ 、 $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) で飼育温度から麻酔期 III (平衡能を失い、鰓蓋運動が停止した状態) に移行させた。冷却中は流水による酸素供給を行った。麻酔期 III に移行後は流水を停止させた。10 分間の麻酔期 III の後に、メダカを飼育温度の水に戻して、麻酔から回復させた。冷却中のメダカをビデオ撮影し、ビデオ解析によって鰓蓋運動数を温度の関数として求めた。水温は熱電対によって計測した。さらに 9 週齢の Kyoto-Cab に対しても同様の実験を行った。さらに、透明メダカを用いて、鰓蓋運動数と心拍数を低温麻酔終了後まで同時に計測した。

## (3) MR 顕微鏡によるメダカの in vivo イメージング

作成した非アルコール性脂肪性肝疾患モデルを用いて、MR 顕微鏡により in vivo イメージングを行った。3 つの 3 次元画像データを傾斜磁場エコー法により取得した。3 つのデータのエコー時間は 1.15ms、1.309ms、1.467ms に対応し、繰り返し時間は 125ms、画素の大きさは  $34 * 58 * 58 \mu\text{m}^3$  を用いた。

MR 顕微鏡のイメージングにおけるイメージング終了後の生存率について、非アルコール性脂肪性肝疾患モデル群 (近交系から作成された群とガン抑制遺伝子に変異しているものから作成された群) とその対照群の 4 つの群において、比較を行った。さらに、疾患群の生存率を向上させるために、馴化過程を加えた。

非アルコール性脂肪性肝疾患モデルの脂肪肝の状態を定量的に評価するために、得られた 3 つの 3 次元 MR 顕微鏡データから、MRI-PDFF を求めた。ここで MRI-PDFF は、組織中のトリグリセリドの量を示す指標であり、ヒトの脂肪肝の非侵襲的イメージングによるバイオマーカーとして認識されている。また、3 ポイントディクソン法と呼ばれる 3 つの異なるエコー時間を用いた MR 画像を撮像する方法によって、MRI-PDFF (トリグリセリドの量) を求める基礎となる MR 画像をえるために、3 つの 3 次元 MR 顕微鏡データを得ている。3 ポイ

ントディクソン法によって得られた MR 画像を、核磁気共鳴における化学シフトの違いを用いて、1 画素ごとに独立に脂肪含有量と水含有量に分離する手法により、脂肪画像と水画像に再構成した。この 2 種類の画像から脂肪割合 (トリグリセリドの量) を求めた。

MRI-PDFF の値を高脂肪食餌の投与期間 6 週間目、12 週間目、16 週間目において、疾患群と対照群で比較検討した。

## (4) 定量的磁化率マッピングの高解像度化

定量的磁化率マッピングを計算する際に用いる双極子磁場のデジタル化の影響を考察した結果から、広いバンド幅の双極子磁場を用いることで、取得画像の解像度よりも高解像度に磁化率マップを求める手法を提案した。寒天を用いて作成した磁化率のファントム、ヒトの脳の静脈の視認性において、提案手法の効果を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) メダカの非アルコール性脂肪性肝疾患モデルの作成

野生型のメダカにおける高脂肪食餌の投与期間 6 週間目、12 週間目、16 週間目での、肝臓の組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色とアザン染色を図 3 に示す。

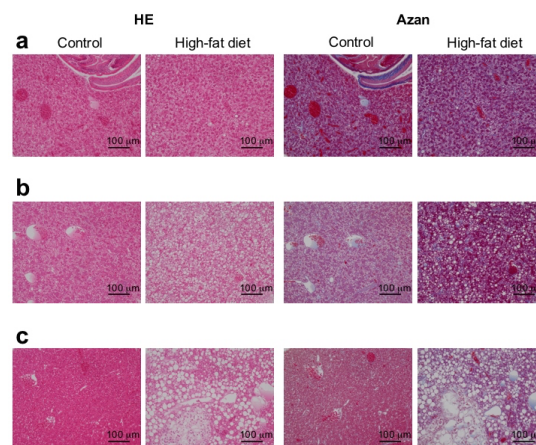


図 3 野生型メダカの高脂肪食餌投与群と通常食餌群の肝臓組織切片：左側 2 列がヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) と右側 2 列がアザン染色 (Azan) に対応する。また、高脂肪食餌投与期間 6 週間目 (a)、12 週間目 (b)、16 週間目 (c) が各行に対応している。高脂肪食餌投与により、脂肪肝が形成されていくのがわかる。

高脂肪食餌投与群において、投与期間とともに脂肪肝が進展していくことがわかる。通常食餌群の 6 週間目の組織切片 (a) においても、軽度の脂肪肝が観測されたが、12 週間目 (b)、16 週間目 (c) では、健康な状態に戻っている。高脂肪食餌投与群の 12 週間目 (b) では、繊維化が多少観測されたが、16 週間目 (c) での個体では観測されなかった。また、炎症はどの期間においてもあまり観測されな



かった。

この結果により、我々の方法を用いて、メダカの子アルコ-ル性脂肪性肝疾患モデルの作成がなされたことがわかる。

### (2) メダカ-の低温麻酔

27 週齢のメダカ-の鰓蓋運動数は冷却速度によらず、温度によく相関して変化していた。さらに、鰓蓋運動数の温度依存性は、冷却速度によらず高温領域と低温領域の 2 つに分かれた。このとき、高温領域で求められた活性化エネルギーは、冷却速度に依存していた。さらに、冷却速度の違いによる高温領域の挙動の違いが見られた。これらのことは、メダカ-の体温と水温の解離ということでは説明できず、鰓蓋運動の温度適応プロセスに複数のプロセスが関与していることを示唆している。このことは、9 週齢のメダカ-に対しても同様であった。

透明なメダカ-を用いた鰓蓋運動と心拍を低温麻酔終了後まで同時計測では、鰓蓋運動と心拍の温度応答性の違いが明らかになり、その違いが生存率に大きな寄与をすることがわかった。

### (3) MR 顕微鏡によるメダカ-の in vivo イメージング

作成した野生型のメダカ-の子アルコ-ル性脂肪性肝疾患モデルと対照群を、MR 顕微鏡により in vivo イメージングを行った結果の MR 画像を図 4 に示す。

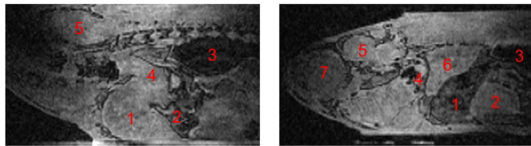


図 4 非アルコ-ル性脂肪性肝疾患モデルと対照群の MR 顕微鏡 in vivo イメージング画像：左側が対照群、右側が疾患群に対応する。高脂肪食餌投与期間 12 週目のメダカであり、1 肝臓、2 胆のう、3 浮き袋、4 消化管、5 脳組織、6 腎臓、7 眼球が見て取れる。肝臓の見え方が異なっている。

図 4 では、エコー時間は 1.15ms の MR 顕微鏡 3 次元画像の矢状断面図を示し、画素の大きさは  $34 \times 34 \times 34 \mu\text{m}^3$  の等方画素に補間している。肝臓のコントラストが疾患群と対照群で異なっているのがわかる。

MR 顕微鏡の in vivo イメージング後の生存率を 4 つの群 (野生型とガン抑制遺伝子変異型、それぞれに高脂肪食餌を投与した群とその対照群) での比較したものと、実験開始前の 1 晩の馴化過程の有無による疾患モデルの生存率の比較を図 5 に示す。

図 5 から、疾患群は野生型の通常食餌群に比べ、有意に生存率が低いことがわかった。また、1 晩の馴化過程を実験に組み込むことで、疾患群の生存率を有意に向上させ、1 にすることができたことがわかる。これは、馴化

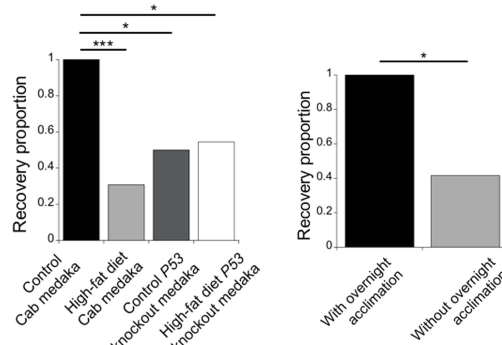


図 5 MR 顕微鏡 in vivo イメージングでの生存率：左が疾患群と対照群の比較、右が馴化過程の有無による比較である。野生型は疾患群に対し、有意に生存率が高かった。疾患モデルでも、馴化過程により有意に生存率が向上した。 (\*\*\*)  $P < 0.0001$ 、\*  $P < 0.05$ )

過程により、疾患モデルでも MR 顕微鏡 in vivo イメージング中の低代謝状態を維持しやすくてきたためだと考えられる。

3 ポイントディクソン法から得られた組織中のトリグリセリドの量を示す指標である MRI-PDFP 像を図 6 に示す。これは図 4 と同じ個体、同じ断面像である。

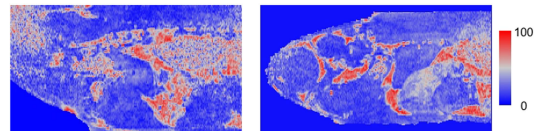


図 6 MR 顕微鏡による疾患群と対照群の MRI-PDFP 像：左側が高脂肪食餌投与期間 12 週目のメダカ-の対照群、右側が疾患群に対応する。肝臓の値が疾患群で大きくなっている。

肝臓での MRI-PDFP の値が非アルコ-ル性脂肪性肝疾患モデルで高くなっていることがわかる。3 次元画像での体軸の中心付近の矢状断面画像での肝臓の領域における MRI-PDFP の平均値の高脂肪食餌期間での変動を図 7 に示す。

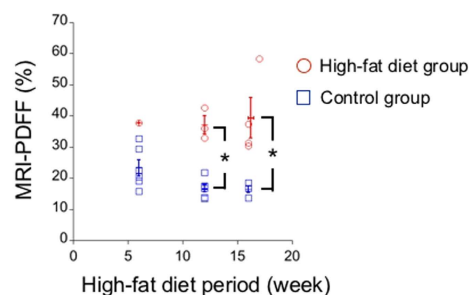


図 7 肝臓での MRI-PDFP の平均値の推移：高脂肪食餌投与期間 12 週目と 16 週目で疾患群が有意に高い値となっている。 (\*  $P < 0.05$ )

図 7 は野生型のメダカ-での疾患群と対照群の比較であり、高脂肪食餌投与期間 12 週目と 16 週目で、非アルコ-ル性脂肪性肝疾患モデル群が有意に高い値を示している。また、対照群では、MRI-PDFP が低くなる傾向を示してい

る。これらは、組織切片から得られた定性的な傾向と一致する。

また、低温麻酔の方法に馴化過程を付け加えることにより、同一個体の MRI-PDF の計測も達成することができた。馴化過程を付け加えることで、疾患モデルにおいても生存率が 1 となったことから、同一個体を経時的に観測し、病態を評価できると考えられる。

(4) 定量的磁化率マッピングの高解像度化  
磁化率ファントムで、提案手法によって、磁化率の定量性と分布の分解能が向上されたことがわかった。さらに、図 8 で示すように、ヒトの脳の磁化率画像の最大値投影画像 (MIP) を比較すると、提案手法によって、ヒトの画像でも磁化率の定量性と分布の分解能の向上が得られることがわかった。

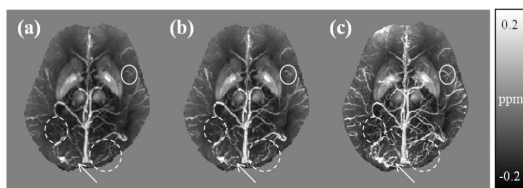


図8 磁化率画像のMIPの比較：(a) 低解像度画像の従来法、(b) 低解像度の提案手法、(c) 高解像度の従来法である。(b) が (c) をよりよく再現していることがわかる。

## 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 3 件)

- ① Ueno T, Suzuki H, Hiraishi M, Amano H, Fukuyama H, Sugimoto N.  
In vivo Magnetic Resonance Microscopy and Hypothermic Anaesthesia of a Disease Model in Medaka. Scientific Reports, 査読有, Vol. 6, 2016.  
DOI:10.1038/srep27188
- ② Umemoto Y, Ueno T, Urayama S, Aso T, Fukuyama H, Sugimoto N.  
Visibility improvement of cerebral blood vessels by High Resolution Quantitative Susceptibility Mapping. Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med., 査読有, Vol.24, 2016, 1553.
- ③ 梅本勇哉, 上野智弘, 浦山慎一, 麻生俊彦, 福山秀直, 杉本直三.  
神経変性疾患および脳機能の解析に向けた MRI 定量的磁化率マッピングにおける空間解像度と磁化率定量性の向上. 信学技報, 査読無, 巻 115, 2016, 131-134.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 上野智弘, 宗像大朗, 鈴木宏和, 武藤愛乃, 天野秀昭, 杉本直三.

低温麻酔でのメダカ鰓蓋運動数の冷却速度依存性.

第 1 回 Biothermology workshop, 2016 年 12 月 10 日~2016 年 12 月 11 日, 「岡崎コンベンションセンター (愛知県・岡崎市)」.

- ② 上野智弘, 鈴木宏和, 平石真寛, 天野秀昭, 福山秀直, 杉本直三.  
MR 顕微鏡によるメダカ非アルコール性脂肪性肝疾患モデルの in vivo イメージング.  
ゼブラフィッシュ創薬研究会, 2016 年 11 月 04 日, 「みんなの森 ぎふメディアアコスモス (岐阜県・岐阜市)」.
- ③ Umemoto Y, Ueno T, Urayama S, Aso T, Fukuyama H, Sugimoto N.  
Improved Visualization of Cerebral Blood Vessel Using Wider Dipole Band Inversion in Quantitative Susceptibility Mapping.  
第 44 回日本磁気共鳴医学会大会, 2016 年 09 月 10 日, 「大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)」.
- ④ Umemoto Y, Ueno T, Urayama S, Aso T, Fukuyama H, Sugimoto N.  
Quantitative Susceptibility Mapping with Wider Band Inversion in MRI for Investigating a Neurodegenerative Disease Model in Medaka.  
第 22 回小型魚類研究会, 2016 年 08 月 20 日~2016 年 08 月 21 日, 「岡崎コンベンションセンター (愛知県・岡崎市)」.
- ⑤ Umemoto Y, Ueno T, Urayama S, Aso T, Fukuyama H, Sugimoto N.  
Visibility improvement of cerebral blood vessels by High Resolution Quantitative Susceptibility Mapping. ISMRM 24<sup>th</sup> Annual Meeting & Exhibition (国際学会), 2016 年 05 月 09 日~2016 年 05 月 13 日, 「Singapore (Singapore)」.
- ⑥ 梅本勇哉, 上野智弘, 浦山慎一, 麻生俊彦, 福山秀直, 杉本直三.  
MRI Quantitative Susceptibility Mapping by Wider Band Dipole Inversion for Investigating Neurodegenerative Disease Model in Medaka.  
International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research (国際学会), 2016 年 03 月 18 日, 「岡崎コンベンションセンター (愛知県・岡崎市)」.
- ⑦ 上野智弘, 鈴木宏和, 平石真寛, 天野

- 秀昭, 杉本直三.  
In vivo MR imaging of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Model in Medaka. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research (国際学会), 2016年03月18日, 「岡崎コンベンションセンター (愛知県・岡崎市)」.
- ⑧ 梅本勇哉, 上野智弘, 浦山慎一, 麻生俊彦, 福山秀直, 杉本直三.  
神経変性疾患および脳機能の解析に向けたMRI定量的磁化率マッピングにおける空間解像度と磁化率定量性の向上. 日本電子情報通信学会 医用画像研究会, 2016年01月19日, 「那覇市ぶんかテンプス館 (沖縄県・那覇市)」.
- ⑨ 上野智弘, 鈴木宏和, 平石真寛, 天野秀昭, 杉本直三.  
In Vivo MR Imaging of NAFLD Model in Medaka. 第21回小型魚類研究会, 2015年09月19日, 「大阪大学 (大阪府・吹田市)」.
- ⑩ 梅本勇哉, 上野智弘, 杉本直三.  
Phantom Study of High Resolution QSM for Investigating Neurodegenerative Disease Model of Medaka. 第21回小型魚類研究会, 2015年09月19日, 「大阪大学 (大阪府・吹田市)」.
- ⑪ 上野智弘, 鈴木宏和, 平石真寛, 天野秀昭, 杉本直三.  
非アルコール性脂肪性肝疾患モデルメダカの in vivo での可視化. 第43回日本磁気共鳴医学会大会, 2015年09月12日, 「東京ドームホテル (東京都・文京区)」.
- ⑫ 梅本勇哉, 原口桜, 上野智弘, 杉本直三.  
寒天ファントムを用いた高解像度定量的磁化率マッピング. 第43回日本磁気共鳴医学会大会, 2015年09月11日, 「東京ドームホテル (東京都・文京区)」.
- ⑬ 梅本勇哉, 原口桜, 上野智弘, 杉本直三.  
Quantitative Susceptibility Mapping by Densely Sampled Dipole Field for Investigating Neurodegenerative Disease Model of Medaka. 第20回小型魚類研究会, 2014年09月20日, 「慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス (東京都・港区)」.
- ⑭ 鈴木宏和, 武藤愛乃, 天野秀昭, 上野智弘, 杉本直三.

Differences in temperature dependence of breathing rate of adult medaka due to various cooling rates.

第20回小型魚類研究会, 2014年09月20日, 「慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス (東京都・港区)」.

- ⑮ 梅本勇哉, 原口桜, 上野智弘, 杉本直三.  
定量的透磁率マッピングにおける高解像度空間双極子場の影響. 第42回日本磁気共鳴医学会大会, 2014年09月19日, 「ホテルグランヴィア京都 (京都府・京都市)」.
- ⑯ 鈴木宏和, 武藤愛乃, 天野秀昭, 上野智弘, 杉本直三.  
メダカの鰓蓋運動回数の温度変化における冷却速度依存性. 日本動物学会 第85回仙台大会, 2014年09月11日, 「東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)」.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human\\_health/mt0601/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/mt0601/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 智弘 (UENO, Tomohiro)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 10379034

### (2) 研究分担者

杉本 直三 (SUGIMOTO, Naozo)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 20196752

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

鈴木 宏和 (SUZUKI, Hirokazu)  
梅本 勇哉 (MEMOTO, Yuya)  
原口 桜 (HARAGUCHI, Sakura)  
武藤 愛乃 (MUTO, Sayano)  
小鍛治 遥 (KOKAJI, Haruka)  
西垣 貴裕 (NISHIGAKI, Takahiro)  
宗像 大朗 (MUNAKATA, Taro)