

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462967

研究課題名(和文) 培養骨膜細胞が再生骨にもたらす骨代謝促進の3D-CT精密画像解析による質的検出

研究課題名(英文) Qualitative analysis of the activated bone metabolism in bone regeneration with the cultured autogenous periosteal cell grafting by high quality 3D-CT image analysis

研究代表者

星名 秀行 (Hoshina, Hideyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30173587

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)：【目的】培養自家骨膜細胞(CAPC)の歯槽骨再生効果を精密3D-CTで解析した。【方法】CAPC+骨細片+PRPによる上顎洞底挙上(SL)を23症例に実施した。CAPCは下顎骨の骨膜小片を10% FBS加M199で6週間培養・製造した。骨細片+PRPによるSLの16症例を対照とした。術前、術後4か月および1年の3D-CTデータを軟組織、海綿骨、皮質骨のCT値域で解析した。【結果】CAPCはSL後4か月から1年で海綿骨域の増加と皮質骨域の減少をもたらした。CAPCは移植床の骨の崩壊を抑制することが示された。【結論】CAPCが骨形成と骨吸収を賦活し、同時に移植床骨の維持に作用することを示した。

研究成果の概要(英文)：Purpose: Evaluation of the effect of cultured autogenous periosteal cells (CAPC) on sinus lift (SL). Materials and Methods: SL with autologous bone and PRP plus CAPC [CAPC(+)] was performed in 23 cases. Pieces of mandibular periosteum were cultured in M199 medium with 10% FBS for 6 weeks. As control, 16 cases received SL with autologous bone and PRP [CAPC(-)]SL. High-resolution 3D-CT was performed before, 4 months and 1 year after SL, and stratified data based on CT numbers corresponding to soft tissue, cancellous bone, and cortical bone were subject to analysis. Results: CAPC(+)]SL revealed an increase in CT numbers corresponding to cancellous bone as well as a decrease in those to cortical bone. CT numbers corresponding to cancellous bone were increased in CAPC(+)]SL while they were decreased in CAPC(-)]SL. Implant insertion torque was significantly higher in CAPC(+)]SL. Conclusion: By promoting bone anabolic activity, CAPC is expected to aid osseointegration in clinical applications.

研究分野：再生医療

キーワード：培養骨膜細胞 歯科インプラント 骨再生 3D-CT 画像解析 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

イヌ歯槽骨の骨欠損に自口腔内より採取した培養骨膜細胞を移植した研究では、歯根の周囲に完全に骨が再生され、組織学的にも正常の解剖学的構造を逸脱する所見はないことが示された。同様に骨膜を起源とする骨再生現象は骨折の治癒機転においても知られている。生体内での間葉系幹細胞と骨膜細胞の比較では、骨膜細胞がはるかに良好な骨再生をもたらす能力を有することが報告されているこれらの知見は骨膜組織が骨形成における骨芽細胞、血管、破骨細胞を含む多様な骨組織構成細胞の再生を統合的もたらすことを示す。

これまでの研究成果：新潟大学医歯学総合病院では移植部・口腔外科・インプラント治療部の連携により、自家骨に再生条件である細胞、足場、増殖因子を混合させ、移植を行う臨床試験を実施した(2007年~2016年)。骨系細胞が豊富で骨組織の維持再生に重要な役割を果たす骨膜組織を口腔内から採取し、由来自家組織として使用した。本研究申請の段階で60症例を超える患者に対して臨床試験を行い、その結果において、従来自家骨移植を適応としない重症の歯槽骨萎縮にも骨膜細胞の併用によって臨床的に良質な骨再生が観察された。インプラント埋入を完了し、最長6年の観察で異常経過は確認されなかった。

私達のこれまでの研究成果

2. 研究の目的

本研究では、3D-CT精密画像解析法を用い、これまで蓄積した多くの試験症例、ならびに今後の臨床症例の長期分析により、細胞投与がもたらす再生骨の骨形成と骨吸収の様相を解明し、骨再生細胞療法の臨床的有効性のエビデンスを確立する。それに加え、基礎的探索として、これまでに確立した骨膜の無血清幹細胞培地による培養法を発展し、その臨床的実用性を高める。

3. 研究の方法

〔対照患者〕

高度の上顎臼歯部歯槽骨と上顎洞底骨の萎縮を有する患者で、重要臓器疾患、代謝性疾患の既往、感染症等を有しない患者で自家細胞を用いる再生治療について、説明文書を用いた説明を行い、内容を理解したうえで同意が得られた患者を対象とする。対照群として細胞投与に同意を得られなかった患者、並びに時間的制約や培養上の諸事情で細胞投与の準備ができなかった患者で研究の主旨に同意を得られた患者とした。研究プロトコールは新潟大学医歯学総合病院 研究倫理審査委員会による審査と承認を得て、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針を遵守して行われた。

〔骨膜培養および移植手技〕

培養自家骨膜細胞(cultured autogenous periosteal cell: CAPC)は新潟大学医歯学

総合病院細胞プロセッシングセンターバイオクリーンルームで培養製造され、同中央手術室で移植された。いかに方法を簡潔に記載すると、下顎臼歯部から採取した骨膜小片を10% FBS, 25mg アスコルビン酸および抗生物質を含有したMedium199を満たしたシャーレ上に静置して培養した。6週間の培養期間中に骨膜小片から骨膜細胞が遊走してCAPCシートが形成される。小片化したCAPCシートは自家骨細片とともに多血小板血漿(PRP)の糊化による塊状の移植材を上顎洞底拳手術の術式に準じて移植した。対照群は基本手技は同じであるがCAPCを含有しない移植材を同様の手術で移植した。(Figure 1)

〔3次元CTデータによる再生骨の分析〕

SLに際して、CAPCを投与した介入群23症例31上顎洞と培養骨膜細胞非投与のコントロール群16症例17上顎洞について、上顎臼歯部歯槽突起の既存骨の3次元座標領域と上顎洞底の再生骨をDual Energy CT(64-multidetector CT: 0.5 mm slice, 0.3 mm interval, 21 helical pitch; Aquillon, Toshiba, Tokyo, Japan)で術前・術後4か月と1年に撮影し3次元座標領域の経時的な画像解析を行った。再生骨の経時的画像データを画像解析プログラム(リアリア)によって体積ならびに再生骨の代謝状況の分析を行った。骨再生部位から離れた顔面頭蓋骨内に複数の基準点を設定し、経時的に移植骨から再生骨の形態およびCT値の詳細な変化を追った(Int J Oral Maxillofac Surg 41: 2012)。一般にCT値では骨の質的評価は難しいとされているが、この経時的・精密重ねあわせによる形態・CT値比較によって再生骨の骨形成と骨吸収の様相を精密に分析し、再生骨の骨組織代謝能を評価した。

〔インプラント埋入トルクの計測〕

SL後、5か月から7か月でインプラント埋入が施行された。そのうち、骨造成を行う以前の歯槽頂から上顎洞底の間の既存骨の厚み(sinus floor thickness)が3mm以下の38部位のインプラント埋入トルク(Ncm)をトルクレンチで計測した。その計測結果をCAPC投与群30部位と投与なし群8部位の間で比較した。

4. 研究成果

〔結果〕全症例でインプラント埋入を完了した。平均3.9年(1年半~6年半)経過し、現時点で腫瘍発症や異常な骨吸収、インプラントの脱落、等の異常経過はない。CAPC投与症例群の当初の上顎洞底骨の厚みは平均2.97 mm(0.6-8.0 mm)であり、歯の喪失後の歯槽突起の萎縮が高度に進行したものが多くを占めた。これは骨再生の難症例として、CAPCの臨床試験に積極的に勧誘する契機となったためである。それに対してCAPC投与なしの対照群は当初の上顎洞底骨の厚みは平均4.46 mm(1.2-8.0mm)であり、歯槽堤の萎縮傾向は比較的軽症であり、介入群より骨

造成に有利な条件の対照群を設定した。

SL CAPC 投与(CAPC+)および非投与(CAPC-)のいずれの群も全症例にインプラント埋入が予定通り行われた。3D-CT 画像では CAPC+、CAPC-に関わらず、SL 後 4 か月に対し SL 後 1 年の画像には造成骨領域の退縮がみられる。その一方で、CAPC-の造成骨には SL 後 4 か月と 1 年の同一座標上に青色で示す皮質骨レベルの領域 (Misch の分類 D1、D2) を確認できる。D1-D2 は本来、上顎骨の海綿骨内に存在する CT 値ではなく、移植した自家下顎骨皮質骨細片が同化されることなく長期間残存する所見である (Figure 2: 矢印)。SL 後の造成骨の体積変化を SL CAPC+の 25 上顎洞と SL CAPC-の 15 上顎洞で比較した (Figure 3)。SL 後 4 か月から 1 年にかけての造成骨全体の比較では双方に差はみられなかった (Figure 3 左グラフ)。しかし、軟組織、海綿骨、皮質骨レベルの CT 値に層別化した比較では (Figure 3 右グラフ)、CAPC+群が海綿骨レベル (350~850HU [Misch の分類 D3]) の領域で 20%の増加、反対に、皮質骨レベル (850HU 以上 [Misch の分類 D1-D2]) の領域で 40%の減少を示した。これらは SL CAPC+の造成骨内で骨添加と共に自家下顎骨皮質骨細片の吸収が促進されることを反映している。

SL においては移植床となる上顎洞底と上顎歯槽骨の代謝にも変化を生ずる。Fig. 4 右に示すよう、SL 後 4 か月に上顎歯槽骨の外形に変化は見られなかったが、移植材に接する上顎洞底の骨は吸収され、軟組織あるいは海綿骨レベルの CT 値が分布した。この骨吸収促進傾向は CAPC-の上顎骨において視覚的に強く認められ (Figure 4B: asterisk) 歯槽骨内においても、海綿骨レベル D3 領域の減少と、軟組織レベル D4-D5 領域の増加が観察された。SL に伴う移植床の上顎洞底と上顎歯槽骨の体積変化を CAPC+の 15 上顎洞と CAPC-の 7 上顎洞で比較した (Figure 5)。SL 後の移植床の上顎歯槽骨全体の計測では SL 後 4 か月の時点でいずれの群にも体積の変化は示されなかった (Figure 5 左グラフ)。しかし、軟組織、海綿骨、皮質骨レベルの CT 値に層別化した比較では (Figure 5 右グラフ)、視覚的所見に一致して、CAPC-群が軟組織レベルの <350HU (Misch の分類 D4-D5) の領域で概ね 40%弱の増加、反対に、海綿骨レベルの 350~850HU (Misch の分類 D3) の領域で 30%弱の減少を示した。CAPC+の SL 後 4 か月では、軟組織レベル D4-D5 に変化はなく、海綿骨レベル D3 に 20%増加が検出された。皮質骨レベルの D1-D2 の領域は CAPC+、-ともに 30%弱の減少を示した。CAPC+の SL での皮質骨の改造と骨梁形成、CAPC-の SL での移植床の破壊の進行の過程を反映している。

インプラント埋入時の埋入トルク値は造成骨と移植床の骨形成の状況を反映した。SL 症例の中で当初の上顎洞底の厚みが 3mm 以下の部位に埋入したインプラントの埋入トルク値を SL CAPC+群と SL CAPC-群で比較した

結果は、有意に CAPC+群が高い値を示した (Fig. 6)。これは 3D-CT 精密画像解析において示した、CAPC 投与による、迅速な骨新生と SL 後の移植床の骨吸収を抑制する効果を臨床所見によって反映している。

〔考察〕私たちは、前哨研究において、CAPC は骨形成と骨吸収の両面を協調的に活性化し、骨組織再生を促進することを推論した【2】。本研究で用いた Dual Energy CT は複数の方向から照射を行うため、従来の CT では造画しにくいインプラント体周囲の骨形態に対しても精密な画像データの測定を可能にする。私達は Dual Energy CT により撮影した骨造成部位を含む顎骨の画像データを画像解析プログラム (Real Intage, Cybernet Systems) に適用し、複数の基準点を顔面頭蓋骨内に設定することによって、3次元座標上の CT 値データを 3 つの時点で作成し、分析した。一般に CT 値では骨の質の評価は難しいとされているが、この経時的・精密重ねあわせによる形態と CT 値の比較によって、骨造成部の骨形成と骨吸収の様相を質的に分析し、骨再生領域の骨代謝活性を評価することが可能となった【2, 10】。

本研究の 3D-CT 画像解析により明らかになった CAPC の骨形成作用は骨形成と骨吸収の共役的な促進にある。CAPC の骨形成促進を主に期待したが、結果では CAPC+群の SL 1 年後の骨造成部において、海綿骨レベルの CT 値領域の増加と共に、皮質骨レベルの CT 値領域の減少が検出された。この皮質骨レベルの CT 値を示す領域の減少は、造成骨の CT 値による階層化 3D 画像が視覚的に示すように (Figure 2) 移植材に加えた皮質骨細片の改造を反映している (Figure 7)。私たちが前報告で組織学的に示した CAPC による豊富な骨芽細胞の増生と、それに伴う破骨細胞の誘導も、これらの所見を支持している【2】。

私達は移植床の上顎洞底骨の SL 後の変化についても 3D-CT 精密画像解析を行った。上顎骨の栄養血管は骨内を穿通せず、上顎骨は骨膜や上顎洞粘膜下を走行する血管の支配を受けている。それゆえに、SL の手術操作は上顎骨自体に危機的な状況を引き起こすことが推定された。上顎洞底骨の 3D 画像が視覚的に示すように (Figure 4)、CAPC-の SL においては移植後に上顎洞底骨の軟組織への置換が顕著であり、この骨破壊傾向は CT 値による層別化比較でも矛盾なく示された (Figure 5)。一方の CAPC+の SL の場合は上顎洞底骨の破壊は抑制され、海綿骨レベルの領域はむしろ増加を示した。これらの所見は、CAPC 投与が SL 後の上顎洞底骨の維持にも効果を有することを示している。

CAPC 投与が骨造成と上顎洞底骨の維持を統合的に促進するとする分析結果は (Figure 7)、インプラント埋入時の埋入トルクの改善という事実によって、臨床的にも裏付けられた (Fig. 6)。細胞の投与がインプラント埋入トルクによい影響を与える効果は間葉系幹

細胞を用いた実験動物への SL でも報告されている【11】。良好な初期固定は、インプラント体のオッセオインテグレーションにおいて重要な要因である【12】。私たちは SL による上顎骨造成後概ね 5~7 か月でインプラント埋入を実施しているが、一般に、自家骨移植による SL では、最適なインプラントの埋入時期は骨移植後 4~8 か月とされる【13】。CAPC の骨同化促進作用を考慮すると、骨造成後の待機時間を短縮できることが期待される。インプラントの早期埋入と早期荷重は再生骨の形態維持においても有利であり【14】。ゆえに、CAPC 投与は治療期間の短縮と良好な治療成績の両立を可能にするかもしれない。

細胞投与を用いた骨再生療法については、製造環境や品質の管理にかかるコストあるいは技術的な障壁から、その実用化の可能性あるいは必要性を十分に勘案して臨床試験を実施することが必須である。しかし、将来の細胞培養の技術的革新や社会基盤の充実の可能性も十分あり、骨再生細胞療法の更なる効果検証と実用化に向けた基盤研究の歩みを止めるべきではない。この報告が示すように、骨再生細胞療法は骨組織回復において多面的な効果を有するので、インプラント治療の歯槽骨萎縮の骨再生にとどまらず【2, 3, 15】、腫瘍や外傷による広範囲の顎骨欠損【16, 17】、骨壊死や骨代謝異常：たとえば骨代謝調節薬に関連する骨壊死や放射線性骨髄炎、など、難治性骨関連疾患の新たな治療戦略としての意義も今後重視すべきである。

[REFERENCES]

【1】 Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K.(2012) Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. *Journal of Prosthodontic Research* 56:229-248.

【2】 Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Yoshie H, Takagi R.(2012) A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: Coordinated activation of bone formation and resorption. *BONE* 50:1123-1129.

【3】 Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhani M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N.(2008) Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 106:203-209.

【4】 Kim YK, Yun PY, Kim SG, Kim BS, Ong JL.(2009) Evaluation of sinus bone resorption and marginal bone loss after sinus bone grafting and implant placement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 107:e21-28.

【5】 Zijderveld SA, Schulten EA, Aartman IH, ten Bruggenkate CM.(2009) Long-term changes in graft height after maxillary sinus floor elevation with different grafting materials: radiographic evaluation with a minimum follow-up of 4.5 years.

Clinical Oral Implants Research 20:691-700

【6】Buyukkurt MC, Tozoglu S, Yavuz MS, Aras MH.(2010) Simulation of sinus floor augmentation with symphysis bone graft using three-dimensional computerized Tomography. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 39:788-792.

【7】Osca A-I, Cristina B-D, Natalia M-R, Ricardo O-A, Jose M M-G.(2010) Pre-operative evaluation of the volume of bone graft in sinus lifts by means of CompuDent. *Medicina oral, patologia oral cirugia bucal* 15: e512-516

【8】Cosso MG, de Brito RB.Jr, Piattelli A, Shibli JA, Zenóbio EG.(2014) Volumetric dimensional changes of autogenous bone and the mixture of hydroxyapatite and autogenous bone graft in humans maxillary sinus augmentation. A multislice tomographic study. *Clinical Oral Implants Research* 25:1251-1256.

【9】Misch CE.(2008) Bone density: a key determinant for treatment planning. In: Misch CE, eds. *Contemporary Implant Dentistry, third edition.*, p.130-146. St. Louis, Mosby.

【10】Arasawa M, Oda Y, Kobayashi T, Uoshima K, Nishiyama H, Hoshina H, Saito C.(2012) Evaluation of bone volume changes after sinus floor augmentation with autogenous bone grafts. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 41: 853-857.

【11】Riecke B, Heiland M, Hothan A, Morlock M, Amling M, Blake FAS.(2011) Primary implant stability after maxillary sinus augmentation with autogenous mesenchymal stem cells: a biomechanical evaluation in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 22: 1242-1246.

【12】Javed F, Ahmed HB, Crespi R, Romanos GE.(2013) Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. *Interventional Medicine and Applied Science* 5: 162-167.

【13】Jensen S, Katsuyama H.(2011) ITI treatment guide, volume 5: sinus floor elevation procedures, In:Chen S, Buser D, Wismeijer D, eds. Tokyo: Quintessence Publishing Co, Ltd.

【14】Zambon R, Mardas N, Horvath A, Petrie A, Dard M, Donos N.(2012) The effect of loading in regenerated bone in dehiscence defects following a combined approach of bone grafting and GBR. *Clinical Oral Implants Research* 23: 591-601.

【15】Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, Ueda M.(2008) Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. *Tissue Engineering Part A* 14: 1699-1707.

【16】Wolff J, Sándor GK, Miettinen A, Tuovinen VJ, Mannerström B, Patrikoski M, Miettinen S.(2013) GMP-level adipose stem cells combined with computer-aided manufacturing to reconstruct mandibular ameloblastoma resection defects: Experience with three cases. *Annals of Maxillofacial Surgery* 3: 114-125.

【17】 Wolff J, Sándor GK, Miettinen A, Tuovinen VJ, Mannerström B, Patrikoski M, Miettinen S. (2013) GMP-level adipose stem cells combined with computer-aided manufacturing to reconstruct mandibular ameloblastoma resection defects: Experience with three cases. *Annals of Maxillofacial Surgery* 3: 114-125.

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6件) *すべて査読あり

Kawase T, Okuda K, Nagata M, Tsuchimochi M, Yoshie H, Nakata K. Non-invasive, quantitative assessment of the morphology of γ -irradiated human mesenchymal stem cells and periosteal cells using digital holographic microscopy. *Int J Radiat Biol.* 2016; 92: 796-805.

Kawase T, Hayama K, Tsuchimochi M, Nagata M, Okuda K, Yoshie H, Burns DM, Nakata K. Evaluating the Safety of Somatic Periosteal Cells by Flow-Cytometric Analysis Monitoring the History of DNA Damage. *Biopreserv Biobank.* 2016;14: 129-37.

Ogawa S, Hoshina H, Nakata K, Kazuho Y, Uematsu K, Kawase T, Takagi R, Nagata M. High resolution three-dimensional computed tomography analysis of the clinical efficacy of cultured autogenous periosteal cells in sinus lift bone grafting. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18:707-16.

奥田一博, 永田昌毅, 高木律男, 中田 光, 吉江弘正: 再生医療 - 新たな医療を求めて - 再生医療の臨床研究・治験 培養自家骨膜細胞シートを用いた歯槽骨・顎骨再生. *日本臨牀* 2015: 473-478.

Ogawa S, Hoshina H, Nakata K, Kazuho Y, Uematsu K, Kawase T, Takagi R, Nagata M. High resolution three-dimensional computed tomography analysis of the clinical efficacy of cultured autogenous periosteal cells in sinus lift bone grafting. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18:707-16.

Kawase T, Uematsu K, Kamiya M, Nagata M, Okuda K, Burns DM, Nakata K, Yoshie H. Real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometric analyses of cell adhesion molecules expressed in human cell-multilayered periosteal sheets in vitro. *Cytotherapy.* 2014;16(5):653-61.

〔学会発表〕(計3件)

永田昌毅. インプラント患者の歯槽骨再生細胞療法の実際について. 第16回日本再生医療学会 イブニングセミナー 仙台市, 2017年3月7日.

Masaki NAGATA and Ritsuo TAKAGI. Knowledge from a clinical trial of the use of cultured autogenous periosteal cells in

gnathic bone regeneration and challenges for the future. The Special Lecture of our 3rd International Symposium in Kyung Hee University. June 25th, 2016. Seoul, Korea.

小川 信, 永田昌毅, 星名秀行, 山田一穂, 高木律男. 日本口腔インプラント学会近畿・北陸支部学術大会 京都府 京都市, 2015年1月31日

〔図書〕(計1件)

Tomoyuki Kawase, Kazuhiro Okuda, Masaki Nagata and Hiromasa Yoshie. The Cell-Multilayered Periosteal Sheet - A Promising Osteogenic and Osteoinductive Grafting Material. In "New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine", Chapter 2 (19-35). Edited by Hideharu Hibi and Minoru Ueda, INTECH, Rijeka, Croatia. 2014 ISBN 978-953-51-1724-7

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星名 秀行 (HOSHINA, Hideyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 30173587

(2) 研究分担者

永田 昌毅 (NAGATA, Masaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 10242439

山田 一穂 (YAMADA, Kazuho)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号: 20397152

川瀬 知之 (KAWASE, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 90191999

Fig.1

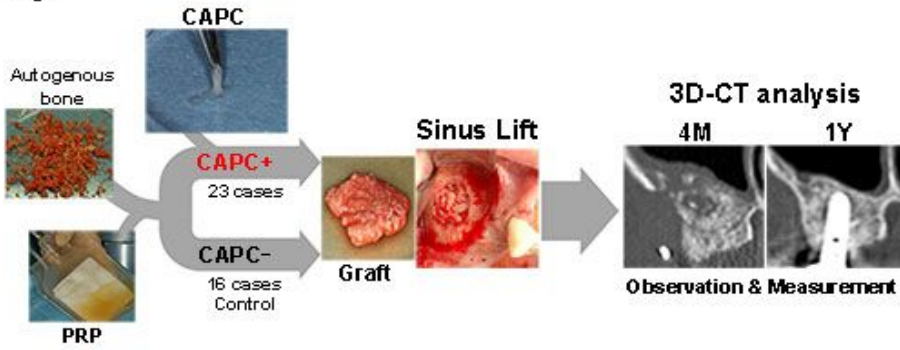


Fig.2

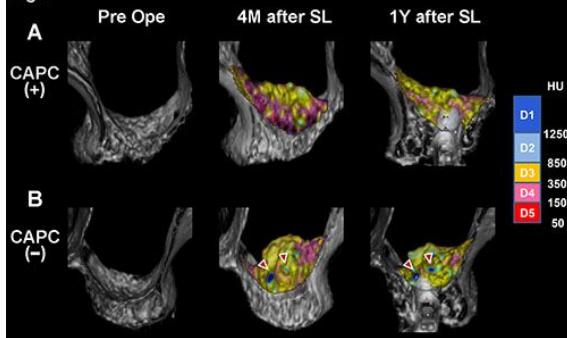


Fig. 3

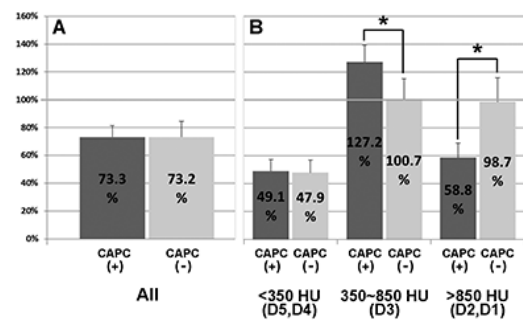


Fig.4

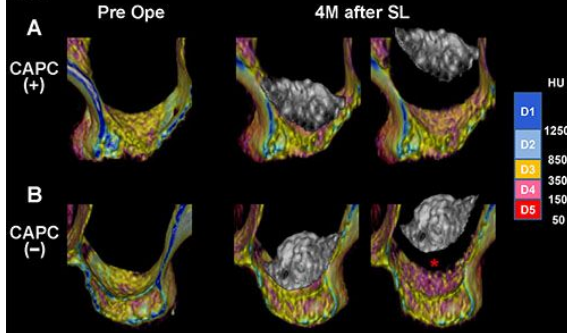


Fig. 5

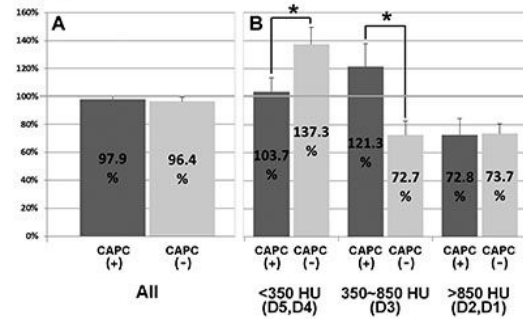


Fig. 6

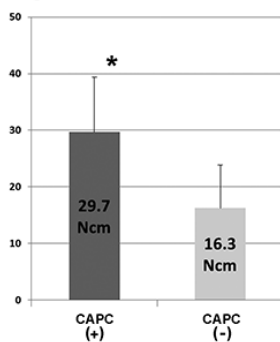


Fig.7

