

老化を促進する酸化損傷タンパク質の機能プロテオミクス解析と  
病的老化予防法の開発

(課題番号：17390170)

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金（基盤研究(B)一般）

研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 及 川 伸 二

(三重大学大学院医学系研究科 准教授)

平成17年度～平成19年度

科学研究費補助金（基盤研究（B）一般）研究成果報告書

研究課題番号

17390170

研究課題

老化を促進する酸化損傷タンパク質の機能プロテオミクス解析と  
病的老化予防法の開発

研究組織

研究代表者	及川 伸二	（三重大学・大学院医学系研究科・准教授）
研究分担者	村田 真理子	（三重大学・大学院医学系研究科・教授）
研究分担者	堅村 信介	（三重大学・大学院医学系研究科・准教授）
研究分担者	古川 絢子	（愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・研究員）

研究経費

平成17年度	3, 200千円
平成18年度	6, 000千円
平成19年度	6, 000千円
計	15, 200千円

## 老化を促進する酸化損傷タンパク質の機能プロテオミクス解析と病的老化予防法の開発

### 研究成果

#### 【目的】

日本人の平均寿命は、衛生・公衆衛生学の寄与で男女とも世界の中でトップクラスとなるに至った。しかしその一方で、急速な高齢化が進み老年疾患の罹患率が上昇している。その主要な原因の一つとして酸化ストレスが注目され、活性酸素種により酸化損傷されたタンパク質の増加・蓄積が老化促進につながると考えられている。しかし、老化に伴って蓄積する酸化損傷タンパク質の種類や機能はほとんど解明されていない。

本研究では、酸化ストレスによって修飾（カルボニル化やリン酸化など）される個々のタンパク質を以下の各種モデル動物を用い機能プロテオミクス解析により明らかにする。また、内因性の酸化ストレス生成機構や酸化ストレスによる老化促進の分子機構についてもあわせて解明する。（1）老化促進モデルマウス（SAM）系で特に脳機能障害を示す SAMP8 や SAMP10 は酸化ストレス状態であることが示されている。本研究では、SAMP8 と SAMP10 を用いて、老年期脳機能障害に関与する可能性がある酸化（カルボニル化）やリン酸化タンパク質を機能プロテオミクス解析を用いて明らかにする。（2）内因性の酸化ストレス生成機構を解明するため、ドーパミンやその代謝物による活性酸素生成機構を明らかにする。

（3）酸化ストレスによる新たな老化制御因子 SIRT1 の活性低下を介した細胞老化促進機構についても解明を行う。さらに、慢性腎不全や脳虚血をヒトにおける病的老化のモデルのひとつとしてとらえ、本研究において、（4）慢性腎不全を示すコラーゲン IV 型ノックアウトマウスの腎臓および（5）虚血再還流による酸化ストレス暴露サルの脳を用いてプロテオミクス解析を行い、酸化ストレス高感受性タンパク質を明らかにする。

#### 【研究成果】

##### （1）老化促進モデルマウス SAMP8、SAMP10 におけるタンパク質の修飾と発現量変化のプロテオミクス解析

高酸化ストレス状態にある SAMP8 において、Cu, Zn-SOD や selenium binding protein などの抗酸化タンパク質および 78kDa glucose-regulated protein や protein disulfide isomerase といった分子シャペロンが酸化傷害を受けている事が明らかになった。また、Cu, Zn-SOD の酸化修飾には過酸化水素が重要な働きをしており、SAMP8 の高酸化ストレス状態の主要な因子の一つと考えられる。

さらに、加齢に伴い大脳萎縮が認められる SAMP10 において、萎縮部位で  $\alpha$ -internexin や pyridoxal phosphate phosphatase などが顕著に増加していることが明らかになった。加えて、 $\alpha$ -internexin のリン酸化も認められた。 $\alpha$ -internexin は、

前頭側頭型認知症において封入体の成分として観察されるという報告や internexin 類のリン酸化はタンパク質の凝集に関与するとの報告もあることから、 $\alpha$ -internexin は SAMP10 の神経変性に重要な役割を果たしていると考えられる。

#### (2) ドーパミンやその代謝物による活性酸素生成機構

ドーパミンは、銅の存在下で過酸化水素を生成することが認められた。その生成量は、マンガンや生体内還元物質 NADH の存在下において著しく増強された。また職業性パーキンソニズムの原因物質と考えられているマンガンは、神経細胞の培養モデル PC12 細胞の細胞死と 8-oxodG の生成を増強した。従って、NADH やマンガンにより、ドーパミンの自動酸化に伴う過酸化水素の生成が促進されることが明らかになった。さらに、ドーパミン代謝物テトラヒドロパパベロリン、6-ヒドロキシドーパミン、ノルサルソリノールについても金属イオン存在下で過酸化水素の生成を認めている。

#### (3) 酸化ストレスによる SIRT1 活性低下を介した細胞老化促進機構

活性酸素 ( $H_2O_2$ ) による DNA 損傷が細胞内  $NAD^+$  の減少を誘引し、新たな老化制御因子である SIRT1 の活性低下を介してアセチル化 p53 が増加し、引き続き p21 が発現することにより細胞分裂を停止させ、細胞老化を促進するという新しい老化促進機構を明らかにした。

#### (4) 慢性腎不全を示すコラーゲン IV 型ノックアウトマウスの機能プロテオミクス解析

発現プロテオミクス解析では、コントロールに対しノックアウトマウスで有意に増加傾向を示した 19 スポットと減少傾向を示した 33 スポットが認められた。これらのスポットは、 $\alpha$ -チュブリンや Rho GDI1 などと同定され、現在これらのタンパク質の変動が慢性腎不全に及ぼす影響を解明している。

#### (5) 虚血再還流による酸化ストレス暴露サル海馬におけるプロテオミクス解析

一過性脳虚血において海馬 CA1 領域では選択的な神経細胞死が起こり、記憶障害に至ることが示唆されている。また、血流再開に伴い強い酸化ストレスが曝露されることもよく知られている。本研究では虚血再灌流を行ったサル海馬 CA1 領域を用いて機能プロテオミクス解析を行い、各々のタンパク質の酸化損傷度について検討した。更に発現プロテオミクス解析を行い、タンパク質発現量の経時変化についても同時に検討を行った。その結果、細胞死抑制機能が知られている Heat shock 70 kDa protein 1 (Hsp70-1) が非常に強く酸化損傷を受けていることを初めて明らかにした。Hsp70-1 の顕著な酸化損傷は虚血再灌流における神経細胞死誘導機構に重要な役割を果たしていると考えられる。また Dihydropyrimidinase-like 2 (DRP2) は神経細胞死のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

研究発表

(1) 出版物

1. 及川伸二、川西正祐 pp.13-19  
酸化修飾 DNA  
酸化ストレスマーカー (二木鋭雄 他編) 学会出版センター 108-113 (2005)

(2) 学会誌等

1. Furukawa, A., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S. and Oikawa, S. pp.20-29  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD<sup>+</sup> depletion.  
*Cell Physiol Biochem*, 20, 45-54 (2007).
2. Fukuhara, K., Oikawa, S., Hakoda, N., Sakai, Y., Hiraku, Y., Shoda, T., Saito, S., Miyata, N., Kawanishi, S. and Okuda, H. pp.30-34  
9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy.  
*Bioorg Med Chem*, 15, 3869-3873 (2007).
3. Pinlaor, S., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Tada-Oikawa, S., Ma, N., Pinlaor, P., Sithithaworn, P., Sripan, B., Murata, M., Oikawa, S. and Kawanishi, S. pp.35-40  
iNOS-dependent DNA damage via NF- $\kappa$ B expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel.  
*Int J Cancer*, 119, 1067-1072 (2006).
4. Oikawa, S., Nagao, E., Sakano, K. and Kawanishi, S. pp.41-48  
Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper.  
*Free Radic Res*, 40, 966-973 (2006).
5. Oikawa, S., Ito, T., Iwayama, M. and Kawanishi, S. pp.49-57  
Radical production and DNA damage induced by carcinogenic 4-hydrazinobenzoic acid, an ingredient of mushroom *Agaricus bisporus*.  
*Free Radic Res*, 40, 31-39 (2006).

6. Oikawa, S., Hirosawa, I., Tada-Oikawa, S., Furukawa, A., Nishiura, K. and Kawanishi, S. pp.58-66  
Mechanism for manganese enhancement of dopamine-induced oxidative DNA damage and neuronal cell death.  
*Free Radic Biol Med*, 41, 748-756 (2006).
7. Nabeshi, H., Oikawa, S., Inoue, S., Nishino, K. and Kawanishi, S. pp.67-75  
Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice.  
*Free Radic Res*, 40, 1173-1181 (2006).
8. Kobayashi, H., Oikawa, S. and Kawanishi, S. pp.76-85  
Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by tetrahydropapaveroline, a metabolite of dopamine.  
*Neurochem Res*, 31, 523-532 (2006).
9. Ichihara, S., Noda, A., Nagata, K., Obata, K., Xu, J., Ichihara, G., Oikawa, S., Kawanishi, S., Yamada, Y. and Yokota, M. pp.86-95  
Pravastatin increases survival and suppresses an increase in myocardial matrix metalloproteinase activity in a rat model of heart failure.  
*Cardiovasc Res*, 69, 726-735 (2006).
10. Sakano, K., Mizutani, M., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y. and Kawanishi, S. pp.96-104  
Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage.  
*Free Radic Biol Med*, 39, 1041-1049 (2005).
11. Pinlaor, S., Sripa, B., Ma, N., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Wongkham, S., Pairojkul, C., Bhudhisawasdi, V., Oikawa, S., Murata, M., Semba, R. and Kawanishi, S. pp.105-110  
Nitrate and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion.  
*World J Gastroenterol*, 11, 4644-4649.
12. Piao, F., Ma, N., Hiraku, Y., Murata, M., Oikawa, S., Cheng, F., Zhong, L., Yamauchi, T., Kawanishi, S. and Yokoyama, K. pp.111-115

Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels.

*J Occup Health*, 47, 445-449 (2005).

13. Kawanishi, S., Oikawa, S. and Murata, M. pp.116-127  
Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents.  
*Antioxid Redox Signal*, 7, 1728-1739 (2005).
14. Horiike, S., Kawanishi, S., Kaito, M., Ma, N., Tanaka, H., Fujita, N., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Hiraku, Y., Oikawa, S., Murata, M., Wang, J., Semba, R., Watanabe, S. and Adachi, Y. pp.128-135  
Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C.  
*J Hepatol*, 43, 403-410 (2005).
15. Hirakawa, K., Yoshida, M., Nagatsu, A., Mizukami, H., Rana, V., Rawat, M.S., Oikawa, S. and Kawanishi, S. pp.136-141  
Chemopreventive action of xanthone derivatives on photosensitized DNA damage.  
*Photochem Photobiol*, 81, 314-319 (2005).
16. Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M.J. and Kawanishi, S. pp.142-147  
Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone.  
*Biochem J*, 388, 813-818 (2005).
17. Chaiyarit, P., Ma, N., Hiraku, Y., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Jintakanon, D., Murata, M., Oikawa, S. and Kawanishi, S. pp.148-154  
Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis.  
*Cancer Sci*, 96, 553-559 (2005).
18. Oikawa, S. pp.155-161  
Sequence-specific DNA damage by reactive oxygen species: Implications for carcinogenesis and aging.  
*Environ Health Prevent Med*, 10, 65-71 (2005).

(3) 学会賞

1. 及川伸二  
癌原物質および抗酸化物質による DNA 酸化損傷機構の解析  
日本環境変異原学会 研究奨励賞 平成18年11月

(4) 口頭発表 (招待講演、特別講演、シンポジウム等)

1. 及川伸二、  
UVA による DNA 損傷：発がんおよび老化における役割  
環境紫外線による生物影響に関する研究会、2007年10月11-12日、岡崎市
2. 及川伸二、  
癌原物質および抗酸化物質による DNA 酸化損傷機構の解析  
日本環境変異原学会第35回大会、奨励賞受賞講演、2006年11月21日、大阪
3. Ayako FURUKAWA, Shinji OIKAWA, Shosuke KAWANISHI,  
The distinct effect of iron and copper ion on catechin-dependent DNA  
damage.  
第15回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2005年6月9-10日、大阪

(5) 学会発表

1. 小林果、山田智子、古川絢子、山嶋哲盛、及川伸二  
虚血再還流による酸化ストレス暴露サル海馬および黒質におけるプロテオミクス  
解析  
第78回日本衛生学会総会、2008年3月28-31日、熊本市
2. 村田真理子、平工雄介、及川伸二、川西正祐  
タイ肝吸虫感染者および胆管癌患者における酸化ストレスマーカー  
8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine の有用性の検討  
第78回日本衛生学会総会、2008年3月28-31日、熊本市
3. 山田智子、古川絢子、山嶋哲盛、及川伸二  
プロテオミクス解析を用いた虚血サル海馬におけるタンパク質の変動



第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月  
11-15 日、横浜市

4. Hatasu Kobayashi, Yoshiaki Isono, Shosuke Kawanishi and Shinji Oikawa,  
Cellular and isolated DNA damage induced by a metabolite of aspirin as a risk  
factor for pancreatic cancer.  
1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The  
Japanese Environmental Mutagen Society, November 28-30, Kitakyushu, Japan
5. Shiko Takeuchi, Mariko Murata, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi,  
Formation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by nitric  
oxide (NO) and superoxide ( $O_2^-$ ).  
1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The  
Japanese Environmental Mutagen Society, November 28-30, Kitakyushu, Japan
6. Hatasu Kobayashi, Shinji Oikawa, So Uemura, Iwao Hirose and Shosuke  
Kawanishi,  
Iron and copper mediated DNA damage and apoptosis induced by 6-hydroxydopamine.  
SFRR Europe 2007 Meeting, October 10-13 2007, Portugal
7. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa and Shosuke Kawanishi.  
Manganese enhances oxidative damage to cellular and isolated DNA induced by  
a coffee polyphenol, chlorogenic acid.  
European Meeting 2007 of the Society for Free Radical Research, 2007 年 10 月  
10-13 日, Portugal.
8. 村田真理子、古川絢子、平工雄介、及川伸二、川西正祐  
プロテオーム解析によるタイ肝吸虫関連胆管癌における cytokeratin 19 の検出  
第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3-5 日、横浜
9. 古川絢子、及川伸二、島田厚良、細川昌則  
老化促進モデルマウス SAMP10 の大脳萎縮に伴うタンパク質の発現変動  
日本プロテオーム機構 第 5 回大会、2007 年 7 月 30-31 日、東京
10. 古川絢子、及川伸二、島田厚良、細川昌則  
プロテオミクス解析を用いた SAMP10 の加齢性大脳萎縮に伴うタンパク質の発現変動

第 20 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会、2007 年 7 月 26-27 日、酒田市

11. 及川 (多田) 佐枝子、及川伸二、平山淳也、平川和貴、川西正祐  
ポルフィリン類 TMPyP による細胞死誘導と DNA 損傷機構：光線力学的療法への応用の可能性  
第 29 回 日本光医学・光生物学会、2007 年 7 月 13 日、富山市
12. 小林果、及川伸二  
L-DOPA 代謝物 tetrahydropapaveroline によるアポトーシス誘導と酸化的 DNA 損傷機構  
日本基礎老化学会第 30 回大会、2007 年 6 月 20-22 日、札幌市
13. 古川絢子、及川 (多田) 佐枝子、川西正祐、及川伸二  
過酸化水素による SIRT1 の機能低下を介したアセチル化 p53 の蓄積による細胞老化促進機構  
日本基礎老化学会第 30 回大会、2007 年 6 月 20-22 日、札幌市
14. 及川伸二、古川絢子、原田夏菜子、杉山浩一、川西正祐  
アミトロールによる発がん機構の解明  
第 29 回日本フリーラジカル学会学術集会、2007 年 6 月 9-10 日、名古屋市
15. 竹内士紘、村田真理子、及川伸二、平工雄介、川西正祐  
NO と  $O_2^-$  による 8-nitroguanine および 8-oxodG 生成の定量と塩基配列特異性の解析  
第 7 回日本 NO 学会学術集会、2007 年 5 月 17-18 日、大津市
16. 古川絢子、原田夏菜子、及川伸二、川西正祐  
発がん物質アミトロールの代謝物による DNA 損傷機構  
第 77 回日本衛生学会総会、2007 年 3 月 25-28 日、大阪
17. 小林果、梅村想、及川伸二  
6-ヒドロキシドーパミンによる酸化的 DNA 損傷機構：パーキンソン病との関連  
第 77 回日本衛生学会総会、2007 年 3 月 25-28 日、大阪市
18. 古川絢子、及川 (多田) 佐枝子、川西正祐、及川伸二  
過酸化水素による Sirt1 を介した細胞老化促進機構の解明  
日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 6-8 日、名古屋市

19. 及川伸二、川西正祐  
ポルフィリン類 TMPyP の光増感反応による一重項酸素の生成と DNA 損傷：光線力学的療法への応用の可能性  
第 65 回日本癌学会学術総会、2006 年 09 月 30 日、横浜
20. 小林果、平工雄介、及川伸二、村田真理子、吉田利通、川西正祐  
ビルハルトツ住血吸虫感染患者における NO を介した DNA 損傷：膀胱癌発症との関連性  
第 65 回日本癌学会総会、2006 年 9 月 28-30 日、横浜市
21. 古川絢子、及川伸二、島田厚良、箱田奈南、細川昌則、川西正祐  
SAMP8 の脳内タンパク質発現量変化と酸化傷害タンパク質のプロテオミクス解析  
第 21 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会、2006 年 7 月 27-28 日、名古屋市
22. 古川絢子、島田厚良、箱田奈南、細川昌則、川西正祐、及川伸二  
老化促進モデルマウスを用いた海馬タンパク質発現量変化と酸化傷害タンパク質のプロテオミクス解析  
日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会、2006 年 7 月 18-19 日、東京
23. 及川伸二、佐々木航、川西正祐  
UVA 照射下クロルプロマジンによる DNA 損傷機構  
第 28 回日本光医学・光生物学会、2006 年 7 月 7 日、徳島
24. Saeko T. Oikawa, Somchai Pinlaor, Puangrat Yongvanit, Yusuke Hiraku, Ning Ma, Mariko Murata, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi,  
Mechanism of iNOS-dependent DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-related carcinogenesis.  
20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress. 2006 年 6 月 22 日、京都市
25. Ayako Furukawa, Shinji Oikawa, Saeko Tada-Oikawa and Shosuke Kawanishi,  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by acetylation of p53 via decrease of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase activity of SIRT1.  
20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress. 2006 年 6 月 18-23 日、京都市

26. 小林果、平工雄介、馬寧、及川伸二、村田真理子、EL-Karef Amro、吉田利通、川西正祐  
ビルハルツ住血吸虫感染によるiNOS依存性DNA損傷の膀胱癌における役割  
第28回日本フリーラジカル学会学術集会、2006年5月13-14日、津市
27. 古川絢子、及川伸二、島田厚良、箱田奈南、細川昌則、川西正祐  
老化促進モデルマウスを用いた機能プロテオミクス解析による酸化損傷タンパク質の検出  
第28回日本フリーラジカル学会学術集会、2006年5月13-14日、津市
28. 及川伸二、廣澤巖夫、及川(多田)佐枝子、古川絢子、川西正祐  
マンガンによるドーパミン依存性DNA損傷の増強機構と神経細胞死  
第76回日本衛生学会総会、2006年3月25-28日、宇部市
28. 小林果、及川伸二、川西正祐  
L-DOPAの代謝産物tetrahydropapaverolineによる酸化的DNA損傷機構  
第28回日本分子生物学会年会、2005年12月7-10日、福岡市
29. 小林果、平工雄介、馬寧、及川伸二、村田真理子、川西正祐  
Role of nitratative and oxidative DNA damage in urinary bladder carcinogenesis induced by infection with *Schistosoma haematobium*  
日本環境変異原学会第34回大会、2005年11月16-18日、東京都
30. 及川伸二、古川絢子、川西正祐  
Site-specific DNA damage induced by purpurin, a natural pigment, with reference to carcinogenesis  
日本環境変異原学会第34回大会、2005年11月16-18日、東京都
31. 箱田奈南、福原潔、及川伸二、及川(多田)佐枝子、平工雄介、奥田晴宏、宮田直樹、川西正祐  
紫外線照射下におけるアントラセン誘導体によるDNA損傷  
第64回日本癌学会総会、2005年9月14-16日、札幌市
32. 及川伸二、川西正祐  
マッシュルームに含まれる発がん性 4-hydrazinobenzoic acid によるラジカル生成とDNA 損傷機構  
第64回日本癌学会総会、2005年9月14-16日、札幌市

33. 及川伸二、平山淳也、平川和貴、川西正祐  
ポルフィリン類TMPyPによるDNA損傷機構：光線力学的療法への応用の可能性  
第27回日本光医学・光生物学会、2005年8月6-7日、京都市
34. 及川伸二、磯野功明、川西正祐  
アスピリン代謝物2,3-ジヒドロキシ安息香酸によるDNA損傷機構  
第12回日本がん予防研究会・第28回日本がん疫学研究会、2005年7月14-15日、  
岐阜市
35. 及川伸二、古川絢子、川西正祐  
過酸化水素によるSir2を介したアセチル化p53の増加による細胞老化促進機  
第28回日本基礎老化学会、2005年6月15-17日、東京都
36. 古川絢子、及川伸二、川西正祐  
炭素中心ラジカルと窒素中心ラジカルによる塩基配列特異的 DNA 損傷  
第27回日本フリーラジカル学会学術集会、2005年6月4-5日、岡山市
37. Hatasu Kobayashi, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi,  
Mechanism of oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid,  
a metabolite of antioxidant propyl gallate.  
ISCaP Symposium in Kyoto, 2005年5月20-21日、京都市
38. 及川伸二、廣澤巖夫、川西正祐  
ドーパミン依存性DNA損傷とマンガンによる増強効果：パーキンソニズムとの  
関連  
第78回日本産業衛生学会、2005年4月23日、東京都