

1. 研究目標及び研究成果の概要

課 題 名 :胎盤の機能異常に着目した環境有害物質による胎仔の発育阻害メカニズムの解明
研究機関名 :独立行政法人 国立環境研究所
任期付研究員氏名 :石村 隆太

【研究目標】

環境中に存在する多くの有害物質は、極めて低濃度で胎仔の異常を引き起こす。これまで有害物質の胎仔への直接作用に関心がもたれていた。しかし、哺乳動物は胎盤を介して胎仔を母体内で育てる特異な発育形態を有している。胎盤が酸素や栄養物あるいは老廃物の交換等の胎仔の発育に欠くことのできない多様な機能を営んでいること、および胎盤には血液関門があり、毒性物質の中には通過しにくいものがあることを考え合わせると、有害物質による胎仔異常は胎盤機能の変調に起因する可能性が考えられる。胎盤機能異常をおこす第一段階のメカニズムとして酸化ストレスとステロイドホルモン攪乱作用が考えられ、これらは根本的に発生機序が異なる。そこで本研究では、有害物質が胎盤に作用し、結果として胎仔の異常をひきおこすメカニズムを主に酸化ストレス作用とステロイドホルモン攪乱作用の両方から解明する。第1年次と2年次に、妊娠動物への投与実験を行い、組織レベルでの観察と遺伝子の発現を調べ、胎盤異常と胎仔異常の相関性を明らかにする。また胎盤モデル培養細胞(Rcho-1細胞)を用いて、遺伝子の機能を明らかにしていく。第3年次では、分子レベルでより詳細に胎盤の異常機構について明らかにしていく。第4年次に機能が明らかになった遺伝子について、胎盤特異的な遺伝子破壊動物を作成し、この動物に有害物質を曝露し、胎盤・胎仔への影響を評価する。

【研究成果】

先ず、酸化ストレス作用を有すると考えられる TCDD を妊娠ラットに曝露させ、胎盤におきる変化を解析した。胎仔の死亡が観察される 1.6ug/kg の TCDD を妊娠 15 日に曝露し、胎盤におきる組織学および生化学的な変化を観察したところ、胎盤のグリコーゲン細胞の変性、グリコーゲン量の増加、およびグルコーストランスポーター3の発現量の増加を明らかにした。すなわち胎仔が死亡する TCDD 用量で胎盤のグルコース動態に変化がおきることを初めて明らかにし、2002 年の Toxicology and Applied Pharmacology に誌上発表した。また、TCDD 曝露により胎盤で変動する遺伝子を明らかにする目的で、二次元電気泳動(2D/E)による解析を試みた。その結果、TCDD に曝露した胎盤は妊娠末期に低酸素状態になっていることが明らかとなった。同結果を本年度新たに Toxicology and Applied Pharmacology に投稿し受理された。これまでの研究から、妊娠母体が TCDD に曝露されると、まず胎盤機能に変調をきたし、最終的に胎盤と胎仔が低酸素状態になり、胎仔の死亡率が上昇するという概念を新たに築くことができた。この概念は、環境有害物質による胎仔の発育異常のメカニズムについて初めてのものであり、しかも我々は既に分子レベルまでの解析を世界に先駆け行ったことになる。また、興味深いことに、TCDD に曝露された胎盤の変化は母体が糖尿病になったときの胎盤の変化、カドミウムに曝露されたときの変化、およびアルコールを摂取した場合の変化と酷似していることが明らかとなった。本研究の更なる展開が、TCDD の胎仔毒性にとどまらず、産婦人科の基礎医学へ貢献する波及効果が大きいと期待される。

ステロイドホルモン攪乱作用の研究では、Rcho-1 細胞に様々なステロイドホルモン様作用を有する化学物質を曝露し胎盤細胞の分化に対する影響について調べた。Rcho-1 細胞にはエストロゲン受容体が無いことを明らかにし、しかもエストロゲン作用を有すると考えられていた幾つかの化学物質が、Rcho-1 細胞の分化に異常をもたらすことを明らかにした。今後、より詳細な解析系を用いて研究を展開していく予定である。

2. 研究実施計画

課題名：胎盤の機能異常に着目した環境有害物質による胎仔の発育阻害メカニズムの解明
研究機関名：独立行政法人 国立環境研究所
任期付研究員氏名：石村 隆太

①研究の意義・目的・必要性

環境中の汚染物質のなかには、日常生活における慢性的蓄積により、胎児の奇形、発育不全、流産や死産をおこす有害な物質が多く存在する。このような胎児発育への影響は母体には障害性を示さない極めて低濃度でおきるため、極めて重要な社会問題である。胎児の発育阻害の発症メカニズムを早急に解明し、リスク評価のための準備を行うことは国研として必要な研究であると考えられる。

環境有害物質による胎仔への影響の研究は、胎仔への直接影響のみが議論されているため、胎盤や母体側(子宮)の機能に着目した研究は少ない。胎盤には胎仔由来の栄養膜細胞によって形成される血液関門が存在するため、物質によって透過性が異なる。メチル水銀などは透過性が高く、胎仔神経組織に蓄積する事で産仔に神経傷害を起こす。しかし環境中に存在する極微量の有害物質の多くは胎盤というバリアでまず防御されるため、多くの場合、胎盤機能の変調は胎仔影響に先行すると考えられる。

妊婦の血圧上昇を伴い胎児の発育不全をおこす疾患である子癇前症は、酸化ストレスによって栄養膜細胞の子宮内膜への浸潤効率が減少するために、胎盤の形成が未熟となり、胎児への栄養供給が低下することが原因である。酸化的ストレス作用を有するカドミウムのような重金属やダイオキシンのような多環芳香族炭化水素は胎仔の発育不全をおこすことが知られている。従って、これらの有害物質により、胎仔の発育不全がおきるメカニズムとして、胎盤の異常が原因として考えられる。また、胎盤は、妊娠期間中、卵巣と共にステロイドホルモンを分泌する器官で、妊娠母体のステロイドホルモンの血中濃度は厳密に制御されている。妊娠中に女性ホルモンであるエストロジェンを投与すると胎仔の非特異的な死亡がおきる。また、多産仔の動物において胎盤が形成される時期に胎仔の生存率が減少するのは、胎仔が曝露されるステロイドホルモン濃度が僅かに上昇することによる。一方、分娩直前は胎盤のステロイドホルモンの合成能及び母体血中の様々なステロイドホルモンのバランスが大きく変化する時期であり、妊娠動物にタモキシフェンのような偽ステロイドホルモンを投与すると胎仔の子宮内死或いは分娩異常をおこすことが知られている。従って、胎盤形成期および分娩時期は、ステロイドホルモン攪乱作用により胎仔の子宮内死或いは分娩異常をおこしやすい時期であり、胎盤のステロイドホルモン合成能の変化や血液関門のバリア機構の損失等が原因として考えられる。

本研究では、リスク評価のための基礎研究として、有害物質による①酸化的ストレス作用と②ステロイドホルモン攪乱作用に焦点を当て、胎盤の機能異常の結果引き起こされる胎仔の発育阻害のメカニズムを明らかにする。

②研究計画・内容(方法も含む)

本研究では、先ず有害物質を妊娠ラットに投与し、胎盤を含めた胚体外組織の異常を、有害物質による①酸化的ストレス作用と②ステロイドホルモン攪乱作用に焦点を当てて解析する。組織レベルでの観察や、遺伝子の発現変化の解析を行い、胎盤と胎仔の異常の相関性を明らかにしていく。次に胎盤の異常の発症メカニズムを明らかにする目的で、胎盤のモデル培養細胞を用いて、増殖・分化、ステロイドホルモン合成能、子宮内膜への浸潤能について調べる。さらに、胎盤の機能変化との関連性が明らかになった遺伝子については、胎盤特異的に遺伝子を破壊し、胎仔の異常が胎盤の機能異常に起因するか否かについて評価を行う。

(1)妊娠動物への投与による解析

①酸化的ストレス作用による異常発症メカニズムの解析

酸化的ストレスをおこす有害物質として、2,3,7,8-ダイオキシシン(TCDD)を妊娠ラットに投与し、胎仔

の発育不全をおこさせ、組織レベルでの変化、及び遺伝子の発現の変化等を解析する。妊娠動物や胎盤モデル培養細胞を用いてダイオキシン類により発現量が増加し、胎盤細胞に特徴的な遺伝子群を二次元電気泳動法により解析する。

②ステロイドホルモン攪乱作用による異常発症メカニズムの解析

ステロイドホルモン攪乱作用を示す物質として、タモキシフェン、ビスフェノール A を用い、胎盤形成期前、及び分娩前に集中的に投与実験を行う。ステロイドホルモン合成酵素や胎盤特異的な遺伝子(胎盤性プロラクチンファミリー)をもとに発現変化および機能変化を解析していく。

(2)胎盤モデル培養細胞を用いた解析系

胎盤のモデル培養細胞として、ラット胎盤細胞の機能をよく反映する細胞株として広く用いられている Rcho-1 細胞を用いる。有害物質を曝露し、ステロイドホルモン合成酵素や胎盤特異的な胎盤性プロラクチンファミリー遺伝子の発現に変化があるかを調べる。妊娠ラット胎盤と一致した発現変化を示す遺伝子に着目し、この分子の胎盤細胞における機能を明らかにしていく。

(3)胎盤特異的な遺伝子破壊モデル系を用いた有害物質の評価

妊娠動物および培養細胞を用いて機能が明らかになった分子について、胎盤特異的に特定の遺伝子を破壊したモデル系を作成し、有害物質の曝露を行う。胎盤の前駆細胞より樹立された TS (trophoblast stem cell)細胞は、遺伝子破壊動物を作成するのに広く用いられている ES 細胞と同様に、特定遺伝子を相同組換えにより破壊し、それを初期胚へもどすことが可能である。但し、TS 細胞は、胎盤の細胞系列にのみ分化するため、胎仔には組み込まれない。従って、特定の遺伝子が破壊された TS 細胞を用いた場合、胎盤特異的な遺伝子破壊動物となる。この動物に有害物質を曝露することによって、有害物質が胎盤特異的に作用しているのか、或いは胎仔に直接作用しているのかを検討することが可能である。

③研究の目標

平成 12 年度

妊娠ラットへの有害物質の投与を行う。胎仔の生存率、奇形の観察、重量、および、胎盤組織の重量測定、組織レベルでの観察を行うことによって、基礎データを収集する。一部の胎盤は、RNA の抽出を行い、ノーザンブロット或いは定量的 RT-PCR 法により遺伝子の発現量を調べる。また、二次元電気泳動法を用いて新たなマーカー遺伝子の探索も行う。胎盤において発現量が増加している遺伝子は、次に Rcho-1 細胞への曝露実験を行い発現の変化を確認する。

平成 13 年度

投与量や投与時期について修正を加えつつ、12 年度に引き続き、投与実験を行う。また、Rcho-1 細胞を用いて有害物質を曝露し、細胞の分化等に与える影響について調べる。妊娠ラット胎盤と一致した発現変化を示す遺伝子について Rcho-1 細胞で詳細に機能を調べていく。

平成 14 年度

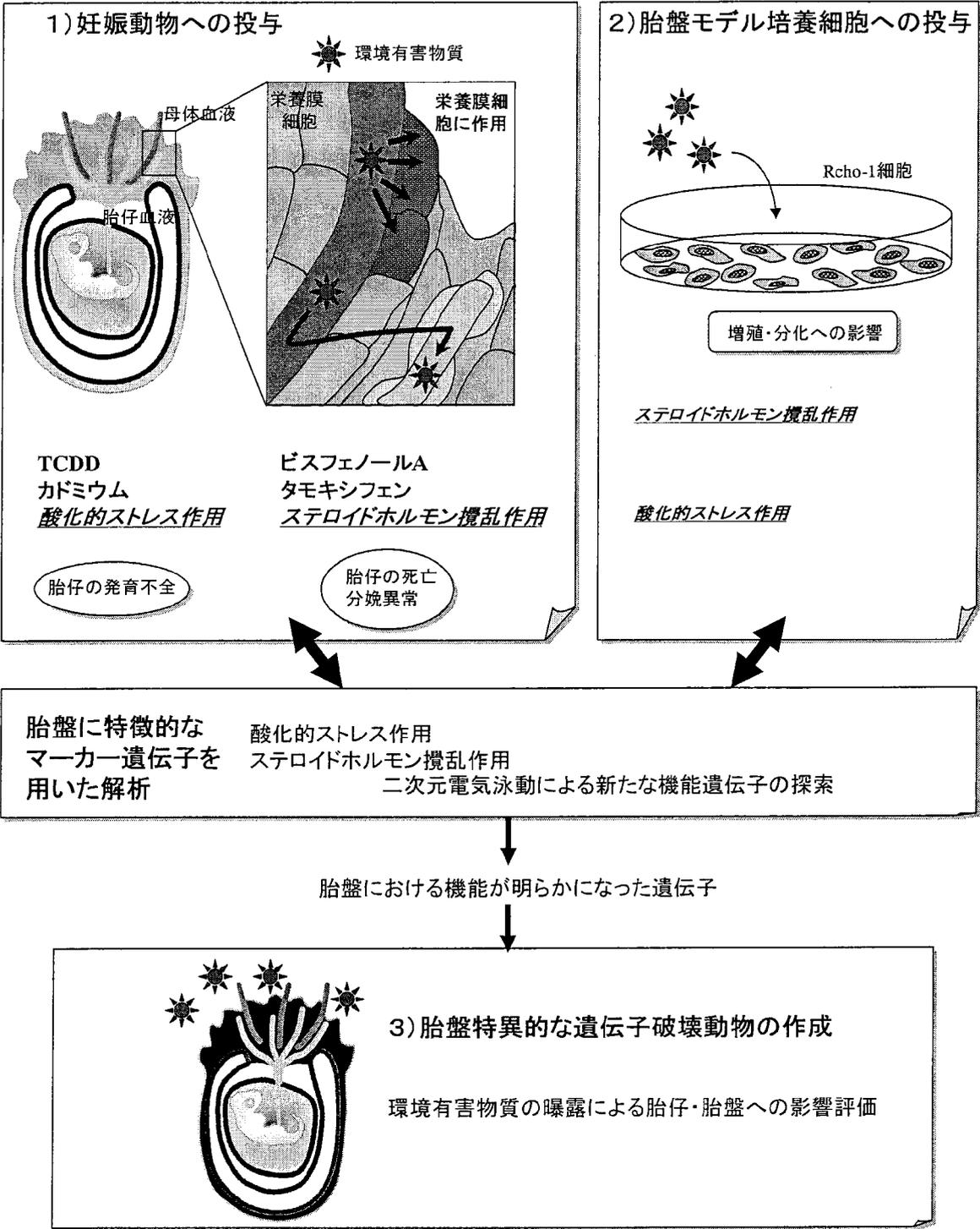
投与量や投与時期について修正を加えつつ、12 年度に引き続き、投与実験を行う。Rcho-1 細胞を用いた実験を、平成 13 年度に引き続き行う。

平成 15 年度

また、有害物質によって胎盤細胞で発現量が増加し機能が明らかになった遺伝子について、遺伝子破壊に必要なターゲティングベクターの構築を行う。ターゲティングベクターを TS 細胞に導入し、胎盤特異的な遺伝子破壊動物を作成する。この動物に有害物質を曝露し、胎仔・胎盤の解析を行う。

④ポーチ絵(研究概要)

胎盤機能異常に着目した環境有害物質による胎仔発育阻害メカニズムの解明
-酸化ストレス作用及びステロイド攪乱作用に焦点を当てて-



3. 所要経費の推移

課 題 名 :胎盤の機能異常に着目した環境有害物質による胎仔の発育阻害メカニズムの解明

研 究 機 関 名 :独立行政法人 国立環境研究所

任期付研究員氏名:石村 隆太

(単位:百万円)

12年度	13年度	14年度	合計
15	14	10	38

(四捨五入の関係で、合計額が合わないことがある。)

4. 研究成果

課 題 名 :胎盤の機能異常に着目した環境有害物質による胎仔の発育阻害メカニズムの解明

研究機関名 :独立行政法人 国立環境研究所

任期付研究員氏名:石村 隆太

① 研究成果

酸化ストレス作用の研究

我々は先ず、酸化ストレス作用を有すると考えられる TCDD を妊娠ラットに曝露させ、胎盤におきる変化を解析し、胎仔死亡との関連性について詳しく調べた。

まず胎仔の死亡が観察される 1.6ug/kg の TCDD を妊娠 15 日に曝露し、胎盤におきる組織学および生化学的な変化を観察した。組織学的な検証を行ったところ母体 TCDD 投与により、妊娠後半になって胎盤のグリコーゲン細胞とグリコーゲン細胞によって囲まれる塩基性物質で満たされたシスト (GC-EM) が対照群に比べ多くなることが観察された。次に胎盤のグリコーゲン量を測定したところ、TCDD 投与群では対照群に比べグリコーゲン量が増加することが明らかとなった。更に母体血中からのグルコース取り込みを担っているグルコーストランスポーター (GLUT) のうち、GLUT1 には変化がなかったが GLUT3 の発現量が TCDD に曝露された胎盤において増加することを明らかにした。これらのことから我々は胎仔が死亡する TCDD 用量の曝露により胎盤のグルコース動態に変化がおきることを初めて明らかにした。

興味深いことにラットやマウスを用いた他の疾患モデルにおいて TCDD 曝露と類似した胎盤の変化を示すことが既に報告されていた。妊娠ラットにストレプトゾトシンを投与し、母体の血糖値を上昇させた糖尿病モデルでは、胎仔の発育不全がおき、胎盤では GC-EM が多くなることが知られている。さらに、この糖尿病モデルの胎盤ではグリコーゲン量が増加すること、および GLUT1 mRNA の発現量には変化がないが GLUT3 mRNA の発現量が上昇するが報告されており、TCDD 曝露モデルと極めて類似した変化がおきる事が明らかとなった。従って TCDD に曝露された胎盤と、糖尿病モデルの胎盤とは、同一のメカニズムが働いて、グルコース動態の変化がおきている可能性が考えられた。同結果を 2002 年の *Toxicology and Applied Pharmacology* に誌上発表した。

糖尿病モデルの胎盤では、妊娠後期に胎盤・胎仔に供給される子宮動脈血流量が低下することが知られており、それに伴い胎盤・胎仔が低酸素状態になっていることが示唆されている。この低酸素状態は、胎仔発育不全や死亡をひきおこす要因の一つとして重要であると考えられている。そこで我々は糖尿病モデルとの比較から、TCDD に曝露した胎盤では低酸素状態になっている可能性を考え実験を行った。先ず TCDD 曝露により胎盤で変動する遺伝子を明らかにする目的で、二次元電気泳動 (2D/E) による解析を試みた。ホルツマンラット GD15 に TCDD を曝露し、GD16 および GD20 に回収した。胎盤および対照群の胎盤の 15,000 x g の上清画分を 2D/E で展開した。また胎盤の低酸素状態の指標遺伝子を探索する試みとして、GD15 に子宮動脈の腔側を結紮した動物を作出し、同様に 15,000 x g の上清を精製し 2D/E で解析した。2D/E で明らかにした目的のタンパク質をゲルから回収してアミノ酸配列分析にかけ同定を行った。TCDD 曝露胎盤を解析した結果、TCDD に曝露された胎盤では、曝露の 1 日後から熱ショックタンパク 27 (Hsp27) とトロポミオシンベータ鎖が発現上昇傾向を示した。GD20 になるとこれらの遺伝子とともにグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現量が上昇してくることが明らかとなった。次に、GD15 に子宮動脈結紮モデルを解析したところ、GAPDH の発現量のみが上昇していることが明らかとなった。GAPDH は遺伝子のプロモーター領域に低酸素応答領域 (HRE) を有しており低酸素状態で発現量が上昇する遺伝子として知られている。これらの結果は、TCDD 曝露胎盤が妊娠末期に低酸素状態になっていることを示唆しており、TCDD 曝露胎盤では低酸素状態がおき胎仔の死亡率の上昇がおきている可能性が提起された。同結果を本年度新たに *Toxicology and Applied Pharmacology* に投稿し受理された。

ステロイドホルモン攪乱作用の研究

2001年にステロイドホルモン様作用を有する化学物質が胎盤細胞の機能に及ぼす重要な論文が発表された。ジエチルstilbestロール(DES)はこれまでエストロゲン受容体(ER)とのみ相互作用すると考えられていたが、オーファン受容体であるERRに結合し、胎盤細胞の分化を変調させることが明らかとなった(Genes Dev. 2001 Apr 1;15(7):833-8.)。かつて流産防止薬としても使用されたDESは、実際は流産の増加を促していることが発覚し使用中止となった経緯をもつが、この流産増加の原因がオーファン受容体を活性化して胎盤細胞の分化を異常化したことが明らかになったのである。この報告以来、国内外を問わず化合物と新たな核内受容体との相互作用の研究が開始されたと予想される。我々は、本研究課題に即し、スピーディーに対応するため、Rcho-1細胞を用いて内分泌攪乱作用を有する環境有害物質の曝露実験を行った。先ずRcho-1細胞にERが存在するかどうかについて検討した。RT-PCR法を用いてERの発現量を検討したところ、Rcho-1細胞には発現していないことが明らかとなった。また、0.1 nMから10 mMまでのエストラジオール(E2)をRcho-1細胞に曝露し、形態変化およびプロラクチンファミリーに属する胎盤性ラクタジェン(PL-I)の発現量を指標に、分化に与える影響を評価した。いずれの濃度のE2でも形態的な変化は認められず、また分化とともに発現量が増加するPL-Iの発現量も変化しなかった。これらのことからRcho-1細胞はERが存在せずE2に不応答性であることが明らかとなった。次に、従来エストロゲン作用を有すると考えられている数種の化合物を用いてRcho-1細胞の分化に対する影響を検討した。化合物として、DES、ICI182,780 (ICI)、ビスフェノール A(BisA)、タモキシフェン(TAM)、ノニルフェノール(NP)、オクチルフェノール(OP)、ジブチルフタレート(DBP)を試験的に用いた。未分化Rcho-1にこれらの化合物を4日間曝露し、形態レベルを指標に、分化に与える影響を調べた。DES、ICI、NP、OPは分化を促進させる影響が認められた。一方、BisAは分化を抑制する影響が認められた。次に、PL-Iの発現量をリアルタイムRT-PCRで測定したところ、形態変化とほぼ一致した発現パターンを得ることができた。これらの実験を通し、従来エストロゲン作用を有すると考えられている化合物が、新たな核内受容体を介して作用することが明らかとなった。現在、リポーターシステムを用いて同様の結果の再現性について検討している。

②波及効果、発展方向、改善点等

酸化ストレス作用の研究

妊娠ラットにTCDDを曝露した実験系では、上述の通り、胎仔の死亡がおき、胎盤のグルコース動態が変化すること、および胎盤が低酸素状態になっているという知見を世界で初めて得ることができた。これらの研究を通して明らかになったことは、TCDDが胎盤に作用し、胎盤の血管形成および血流量に変化が生じることによって低酸素状態が引き起こされ、結果的に胎仔が窒息状態になって死亡するという概念である。これまで、胎仔の死亡に関しては、遺伝的な欠陥等による胎仔そのものの問題や、胎仔には問題ないが母体に変調がおこり妊娠維持が困難になる問題、あるいは生体外由来の毒性物質の影響に関しては胎仔への直接影響の問題が考えられるなど、諸説が入り乱れており、そのため、TCDDによる胎仔の死亡のメカニズム解析も困難が予想され、研究が不十分であった。本研究は、TCDDによる死亡についてのメカニズムについて初めて言及したことになり、今後多くの研究者が参入し展開することを期待する。

興味深いことに、我々が観察した胎盤の形態変化は、糖尿病の胎盤の変化と類似しているだけでなく、カドミウムに曝露した時やあるいはアルコールを飲んだときに現れる胎盤の変化と酷似していることが明らかとなっている。これらの疾患モデルにおいても胎盤が酸化ストレス状態になって低酸素状態になっている可能性が示唆されている。胎盤が何かしらの原因で酸化ストレス状態になり、その結果低酸素状態になっていくメカニズムは、胎仔の発育異常がおきる過程で最も普遍的におきている現象なのかもしれない。我々の研究は、TCDDの胎仔毒性にとどまらず、産婦人科の基礎医学へ貢献するという波及効果

が期待される。

この TCDD 曝露実験を通して、胎盤機能の異常が胎仔の死亡を招くという新たな概念を設立することができ、本研究の趣旨は概ね遂行したことになる。但し、何故酸化ストレス状態がおきるのか、そして如何なる機構で低酸素状態になっていくのかをより詳細に明らかにすることが、本研究の今後の発展方向として重要性を帯びてきた。従って、胎盤特異的な遺伝子破壊動物を作出するほうが良いのか、それとも別のアプローチを行ったほうが良いのか、現時点では未だ決定することはできないが、最終年度(平成 15 年)に、改善案として後者を選択する可能性も考えている。

ステロイドホルモン攪乱作用の研究

ステロイドホルモン攪乱作用の研究では、当初妊娠動物に投与して解析する系も考えていたが、従来考えられていた核内受容体との結合に根本的な誤りがあるという報告がなされたため、培養細胞系を用いてより分子レベルで解析を進めていくほうが賢明であることが考えられた。そこで、Rcho-1 培養細胞を用い、様々な種類の有害物質を用い、細胞の分化に影響を与える有害物質の特定を行い、新規核内受容体との親和性を解析していくことを行っている。本方針は、本研究の趣旨から外れてはいない。ここで明らかになされた化学物質は、かならず胎盤細胞に変調をきたす事になる。今後妊娠動物に投与する実験を行い、生体レベルでの影響について解析する予定である。

5. 研究成果公表等の状況

課 題 名 :胎盤の機能異常に着目した環境有害物質による胎仔の発育阻害メカニズムの解明
 研 究 機 関 名 :独立行政法人 国立環境研究所
 任期付研究員氏名:石村 隆太

1. 研究発表等

(1)研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国内	0	2	4	6
国外	2	2	3	7
合計	2	4	7	13

注)件数は既発表分及び投稿中のものを合計した数を記入

(2)原著論文による発表の内訳

1)国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 0 件)

1.

2)国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 2 件)

1. Altered protein profile and possible hypoxia in the placenta of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposed rats. Ishimura R, Ohsako S, Kawakami T, Sakaue M, Aoki Y, Tohyama C. Toxicol Appl pharmacol. 2002 Accepted
2. Increased glycogen content and glucose transporter 3 (GLUT3) mRNA level in the placenta of Holtzman rats after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Ishimura R, Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Kawakami T, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C. Toxicol Appl pharmacol. 2002 Feb;178:161-171.

(3)原著論文以外による発表の内訳

1)国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 2 件)

1. [Health risk assessment of endocrine disrupting chemicals]. Tohyama C, Ohsako S, Ishimura R. Nippon Rinsho. 2000 Dec;58(12):2393-400. Review. Japanese.
2. [Health risk assessment for endocrine disruptors]. Ishimura R, Ohsako S, Tohyama C. BIO Clinica. 2000 Feb;15(2):43-48. Review. Japanese.

2) 国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 2 件)

1. Proteomics analysis of placentas after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. Ishimura R, Ohsako S, Kawakami T, Aoki Y, Tohyama C. Organohalogen Compounds. 2002;55:441-443
2. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects glucose kinetics in rat placenta. Ishimura R, Kawakami T, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C, Ohsako S. Organohalogen Compounds. 2001;53:300-302

2. 特許出願等[件名、出願者氏名、出願年月日、特許番号 等]

(計 0 件)

3. 受賞等[件名、受賞者氏名、受賞年月日 等]

(計 0 件)