

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08465

研究課題名(和文) ヒト乳がん組織に対するヒ素化合物とテトランドリン併用の抗腫瘍活性に関する基盤研究

研究課題名(英文) Antitumor activity of the combination of arsenic compound and tetrandrine against human breast cancer

研究代表者

袁 博 (Yuan, Bo)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：10328552

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)：本研究は、新たな乳がん薬物治療法の開発を目的とし、ヒト乳がん組織に対するヒ素化合物とテトランドリンの単独および併用効果を検討した。両薬物の処理によって組織生存と組織からIL-6とIL-10の分泌が抑制される傾向が観察された一方、IL-17AとTNFの分泌が促進される傾向が見受けられた。また、両薬物に誘導される乳がん細胞(MDA-MB-231、MCF-7、T47D)の増殖抑制に細胞死、細胞周期アレストおよび分化誘導が関与することを明らかにした。本研究から得られた新しい知見に基づいて、両薬物の乳がん治療実用化に向けて、乳がん患者由来腫瘍移植マウスモデルを用いたさらなる研究が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期発見・診断および分子標的治療が進んだ今でも、乳がんで死亡する女性の割合が年々増加する傾向にあると報告され、加えて臨床上的薬物耐性、副作用が依然として大きな問題となっており、効果的な新規治療法の開発が望まれている。本研究は、臨床的に白血病に対する優れた治療効果を有するヒ素化合物に着目し、抗がん剤の治療効果を高めるとともにその副作用を軽減することが期待できるテトランドリンとの併用に注目した。外科的に切除されたヒト乳がん組織、および遺伝学的な違いのある三種類の乳がん細胞に対する両薬物の単独および併用効果を検討することにより、改めて両薬物の併用は乳がん治療に対する有望な治療法であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The effects of arsenic compounds (As) and tetrandrine (Tetra), alone or in combination, against human breast cancer tissue were conducted in order to develop new therapeutic strategies to combat breast cancer. Treatment with As combined with Tetra appeared to reduce the viability of cancer tissues, along with the downregulation of the secretion of IL-6 and IL-10, and upregulation of the secretion of IL-17A and TNF, respectively. Moreover, exposure of the combined treatment to different types of breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7 and T-47D) resulted in proliferation inhibition, which appeared to be associated with cell death, cell cycle arrest and differentiation induction. These findings thus suggest that the combination can probably serve as promising candidates for the development of novel therapeutic approaches for different types of breast cancer. Further investigation into the effects of the combined regimen on patient-derived breast cancer xenografts should be warranted.

研究分野：がん関連

キーワード：乳がん ヒ素化合物 テトランドリン オートファージ 細胞周期 MAPK 細胞死 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんを患う日本人女性は、現在 11 人に 1 人と言われ、女性の罹るがんの中で突出して 1 位である。乳がんで死亡する女性の割合も年々増加の傾向にあると報告されている。従来型の抗がん剤のほかに、タモキシフェン（エストロゲン受容体 (ER) 調節薬）、トラスツズマブ（ヒト化抗 HER2 抗体）などの分子標的薬が乳がん治療に用いられるが、临床上における薬物耐性、副作用が依然として大きな問題となっており、効果的な新規治療法の開発が望まれている。

ヒ素化合物 (As_2O_3 , As_2S_2) が急性前骨髄球性白血病と骨髄異形成症候群に優れた治療効果を示すことが報告された。研究代表者はかねてより、ヒ素化合物の治療を受けた患者におけるヒ素体内動態の詳細な解析を行ってきた。また、酸化的ストレスおよび分化誘導がヒ素化合物のがん細胞抑制効果に關与することを明らかにした。さらに、薬物耐性および薬物相互作用において重要な役割を果たす薬物トランスポーターである aquaporin 9 (AQP9)、multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) が、ヒ素化合物の臨床効果と密接に關係し、特に AQP9 がその治療効果を予測するためのバイオマーカーの一つになり得ることを提唱した。近年、血液がん優れた治療効果を有するヒ素化合物が、難治性固形がんを含む種々のがん細胞に殺細胞作用を示すことが報告されたことから、乳がん治療へのヒ素化合物の応用が考えられた。

がん治療の代替薬となり得る漢方薬を含む天然由来物質は、正常細胞に及ぼす影響が少なく、がん治療薬の効果を維持・増強しつつ、投与量の減量による副作用の軽減をもたらすことが期待される。テトランドリン (Tetra) は漢方薬である粉防己由来のアルカロイドであり、その注射剤が中国で抗炎症薬、肺がん治療補助薬として临床上で使用されている。

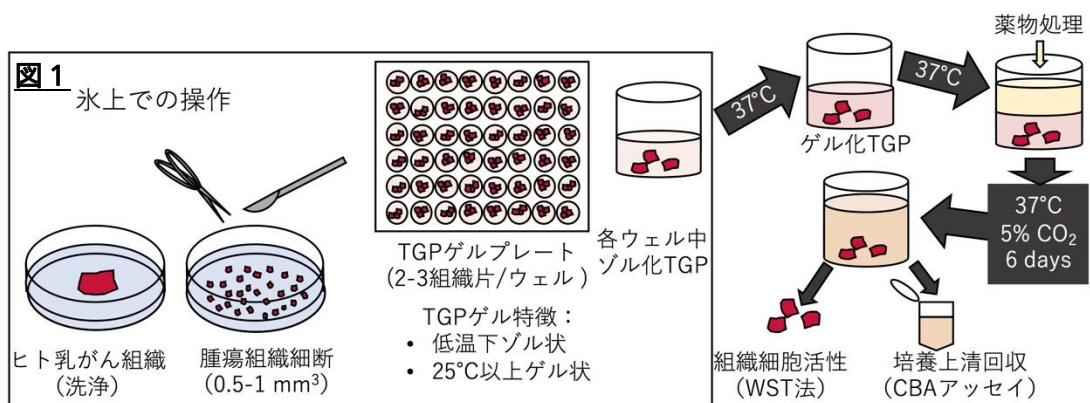
2. 研究の目的

研究代表者は、ヒ素化合物と Tetra がそれぞれ濃度依存的に乳がん細胞 MCF-7 (ER ポジティブ) と MDA-MB-231 (トリプルネガティブ) の細胞増殖を抑制し、併用することによりその増殖抑制効果が増強する傾向を明らかにした。そして、増殖抑制効果の増強に細胞周期アレストやオートファジー細胞死の誘導などが寄与することを示唆した。また、ヒ素化合物単独処理と比べ、両薬物の併用ががん細胞における細胞内ヒ素蓄積量を増加させることを見出した。さらに、両薬物の MDA-MB-231 担がんモデルマウス腹腔内への投与により、腫瘍増殖に対する抑制効果が観察されるとともに、投与群と非投与群の動物体重に明らかな変化はなかった。これらの結果から、両薬物の併用は乳がん治療に対する有望な治療法であることが示唆された。そこで、本研究は外科的に摘出したヒト乳がん組織に対するヒ素化合物と Tetra 単独および併用の抗腫瘍活性を検討するとともに、乳がん細胞株である MCF-7、T47D および MDA-MB-231 に対する両薬物の効果をより詳細に検討し、新たな乳がん薬物治療法開発に有意義な知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳がん組織生存率の検討

図 1 に示したように、外科的に切除された乳がん組織を培地で数回洗浄し、脂肪などを取り除いたのち、 $0.5-1\text{ mm}^3$ になるように細切した。細切された組織片を熱可逆性ハイドロゲル (TGP) にて 3 次元培養し、より生体内に近い条件で乳がん組織に対するヒ素化合物 ($arsenite(As^{III})$, As_2S_2) と Tetra の単独および併用効果を WST-1 法より、組織細胞の生存率を評価した。また、positive control として既知の抗がん剤 (ドキシソルピシン (DXR)、ダウノルピシン (DNR)、パクリタキセル (PTX) とシクロホスファミド (CPA)) の効果も合わせて検討した。



(2) Cytometric Bead Array (CBA アッセイ)

上記方法 (1) の WST-1 アッセイの直前に、乳がん組織の培養上清を回収し、フローサイトメーターおよび BD Cytometric Bead Array (CBA) キットを用いて、培養上清中における乳がん組織から分泌されたサイトカイン (IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN- および TGF-) の量的変動を検討した。

(3) ヒト乳がん由来腫瘍組織の担がんマウス (PDX) の作製

5週齢のBALB/cヌードマウス()を大学の動物施設に数日間に適応させた。上記(1)で細切された組織片をマウスの右腋窩に移植手術を行った。約12週間に渡って腫瘍組織の増殖を観察した。

(4) MDA-MB-231 担がんマウスの作製および担がんマウスに対する両薬物の併用効果

5週齢のBALB/cヌードマウス()を大学の動物施設に数日間に適応させた。1×10⁷個MDA-MB-231細胞を0.1ml生理食塩水に懸濁し、マウスの右腋窩に接種し、担がんマウスを作製した。約1週間後に腫瘍が明らかに確認された時点から、腹腔内にAs₂O₃(2mg/kg/day)および/またはTetra(20mg/kg/day)を1日1回、10週間投与し、経時的に動物体重・腫瘍体積を計量した。投与期間終了時に、三種混合麻酔液(塩酸メドミジン、ミタゾラム、酒石酸ブトルファンール)を腹腔内に投与し、解剖を行った。摘出された腫瘍組織の重量を計り、免疫組織染色およびウェスタンブロット解析用のためのサンプルを調製した。

(5) がん細胞分化誘導の検討

コンフルエントになった乳がん細胞をハーベストし、1×10⁵ cells/mlに調製し、所定の培養容器に一晩培養させた後、As^{III}とTetra単独および併用で処理し、フローサイトメーター(FACS)を用いて、細胞表面における乳腺上皮細胞の分化マーカーであるICAM-1発現の変動を評価した。

(6) がん細胞とPBMCs生存率、およびPBMCs中の制御性T細胞(Treg)量的変動の検討

XTT法を用いて、As^{III}とTetra単独および併用で処理したがん細胞とPBMCsの生存率を評価した。また、薬物処理後のPBMCs中のTreg量的変動をFACSにより検討した。

(7) 細胞周期アッセイおよびAnnexin V/PIアッセイ

As^{III}とTetra単独および併用により処理された乳がん細胞をハーベストし、PBSで洗浄した後、1%PFA/PBSを用いて30分間氷上で固定した。次いで、PBSで2回洗浄した後、70%冷エタノールで懸濁し、-20℃、4時間静置した。PBSで洗浄した後、0.25% Triton-X 100で5分間氷上にてインキュベーションした。次いで、PBS洗浄後Propidium Iodide (PI)/RNase/PBSで、暗所室温で30分間インキュベーションした後、フローサイトメーターを用いて細胞周期の変動を測定した。また、The TACS™ Annexin V-FITCキットを用いて、アポトーシスおよびネクロトーシス誘導の有無について検討を行った。

(8) 細胞障害性アッセイ(乳酸脱水素酵素(LDH)活性)

As^{III}とTetra単独および併用により処理された乳がん細胞の培養上清を回収し、LDH-細胞障害性検出キットを用いて、下記の式に則って細胞障害性を測定した：

$$\text{LDH leakage (\%)} = (\text{Sup} - \text{NC}) / (\text{P} - \text{NCT}) \times 100\%$$

Sup: 培養上清; NC: ネガティブコントロール; P: ポジティブコントロール; NCT: 0.2% Tweenを含む培地

(9) ウェスタンブロット解析

Laemmli サンプルバッファーを用いて、As^{III}とTetra単独および併用により処理された乳がん細胞、および担がんマウスから摘出された腫瘍組織からタンパク質を調製した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法でタンパク質を分離し、PVDF膜への転写を行った。次いで、一次/二次抗体を用い、化学発光法にて抗体陽性バンドの検出を行い、目的タンパク質発現の量的変化を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト乳がん組織に対するヒ素化合物(As^{III}、As₂S₂)とTetraによる増殖抑制作用

TGPを用いた3次元培養条件下で、薬物単独(As^{III}、As₂S₂、Tetra)および薬物併用(As^{III}+Tetra、As₂S₂+Tetra)または既知の抗がん剤それぞれの単独(ドキソルピシン(DXR)、ダウノルピシン(DNR)、パクリタキセル(PTX)とシクロホスファミド(CPA))で乳がん組織を6日間処理したところ、高濃度(mMオーダー)の既知抗がん剤は、がん組織の生存を顕著に抑制したが、低濃度(nMオーダー)の場合はむしろがん組織の生存を助けた結果となった。一方、コントロール群と比較して統計的な有意差がなかったものの、ヒ素化合物とTetraの単独、および併用が乳がん組織の生存を抑制する傾向が観察された。

また、本実験を実施した際に、下記の問題点が判明され、今後の研究を進める上で考慮しなければならないと思われる。乳がん組織自身の活性：病院から実験室までの運搬方法、かかる時間が組織活性に顕著な影響を与えた。いくつかの方法を検討した結果、低温でTGP中に浸っている状態で運搬した方が良い。切除された組織を、病院内の実験施設で検討できたらより安定した結果が得られるかもしれない。

(2) 乳がん組織から分泌されるサイトカインに対するヒ素化合物(As^{III}、As₂S₂)とTetraの

影響

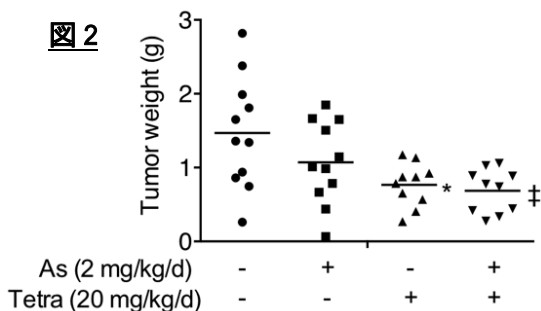
TGPを用いた3次元培養条件下で、乳がん組織を上記(1)で示した薬物で6日間処理したのち、培養上清中のサイトカインの量的変動を検討した。乳がん発生に密接に関係しているIL-6は量的に多く分泌され、薬物の処理とりわけ(4 μM As^{III}+4 μg/ml Tetra)の併用処理により抑制される傾向があった。同様な抑制傾向が免疫抑制に関係するIL-10においても観察された。一方、IL-17AとTNFの分泌は薬物の処理により促進された傾向があった。また、IFN- γ およびTGF- β の分泌はわずかしか検出できなかった。

(3) ヒト乳がん由来腫瘍組織の担がんマウス(PDX)の作製

PDX作製に先立って、腫瘍組織をBALB/cヌードマウスに移植するための手技およびプロトコルの確立に努めた。ヒト乳がん細胞MDA-MB-231を用いて作製したMDA-MB-231担がんモデルマウスの腫瘍組織の一部をBALB/cヌードマウスに移植し、腫瘍の増殖を観察したところ、移植された腫瘍が順調に育てたことが確認された。確立されたプロトコルに則って、ヒト乳がん組織をヌードマウスに移植し、PDXの作成を試みた。試行錯誤した結果、BALB/cヌードマウスを用いたPDXの作成の成功に至らなかった。その原因として、前述のようにヒト乳がん組織自身の活性の低下、より免疫能力を持っていない高度免疫不全マウスを使用する必要があるかもしれない、と考えられた。

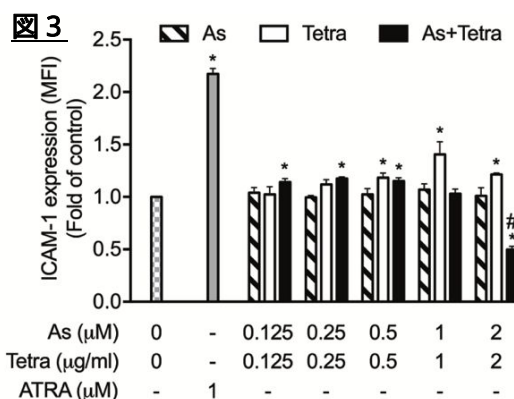
(4) in vivoにおけるAs^{III}とTetraの抗腫瘍効果

MDA-MB-231担がんマウス腹腔内に両薬物投与し、腫瘍増殖に対する両薬物の効果を検討したところ、いずれの投与群においても明らかな毒性を認めることなく、腫瘍増殖抑制効果が確認された(図2:腫瘍重量の変化;*p<0.05, †p<0.01 vs. control (PBS投与). As, As^{III})。

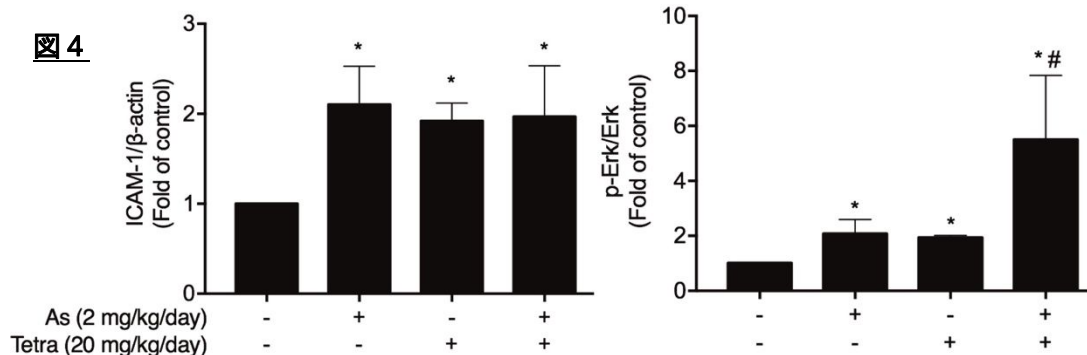


(5) As^{III}とTetraによる乳がん細胞株MDA-MB-231、MCF-7およびT47Dの分化誘導

エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2)発現の違いのある三種類の乳がん細胞【MDA-MB-231(トリプルネガティブ、ER-PR-HER2-)、MCF-7(ER+PR-HER2-)およびT47D(ER+PR+HER2-)】を用いた。臨床に達成可能な薬物濃度(As^{III}: ~2 μM; Tetra: ~2 μg/ml)で、上記三種類の乳がん細胞を96時間処理したところ、いずれの細胞における分化マーカーであるICAM-1の発現誘導が観察されたとともに、Her2の発現がダウンレギュレーションされ、両薬物の併用による乳がん細胞の分化誘導が示唆された。とりわけ、0.25 μM As^{III}+0.25 μg/ml TetraでもMDA-MB-231細胞の分化を誘導することが観察され、分化誘導に対するMDA-MB-231の感受性が一番高かったことが明らかとなった(図3: MDA-MB-231におけるICAM-1の発現;*、P<0.05 vs. control; #、P<0.05 vs. each alone. As, As^{III}; ATRA, all-*trans* retinoic acid.)。



また、細胞の分化誘導に伴うERKの活性化、およびERKインヒビターPD98059が分化誘導を抑制したことから、ERKが両薬物に誘導される乳がん細胞の分化にポジティブな働きをすることが示唆された。興味深いことに、両薬物の投与を受けた担がんマウスから得られた腫瘍組織におけるICAM-1の発現誘導とERKの活性化も観察された(図4: *p<0.05 vs. control (PBS投与); #p<0.05 vs. each alone.)。



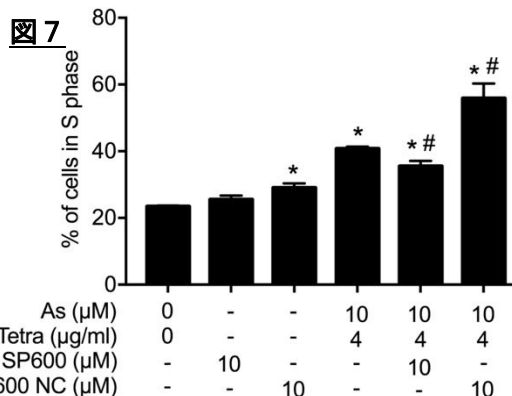
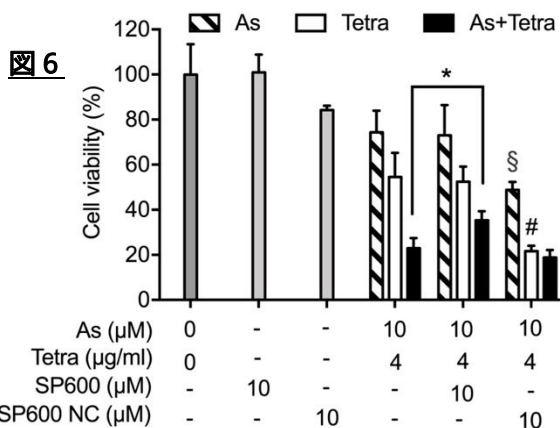
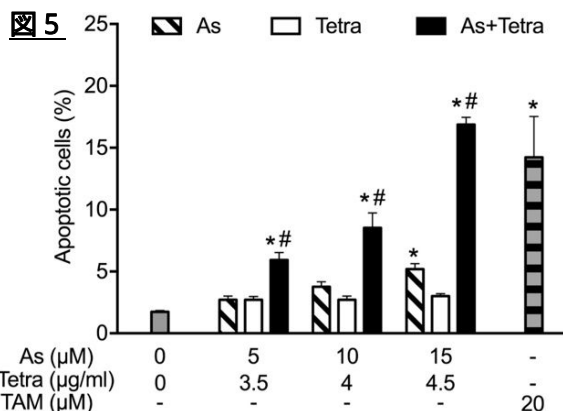
#, $P < 0.05$ vs. each alone. p-ERK, phosphorylated ERK; As, As^{III} 。これらの知見から、乳がん細胞に対する分化誘導が、両薬物の抗腫瘍効果に寄与していることが明らかとなった。

(6) JNK とオートファジーがそれぞれ独立的に As^{III} と Tetra に誘導される乳がん細胞の毒性に關与する

これまでに、研究代表者は As^{III} と Tetra が MDA-MB-231 と MCF-7 に相乗的な殺細胞作用を發揮すること、オートファジーや細胞周期アレストなどがこの殺細胞作用に寄与することを報告してきた。乳がん細胞に対する両薬物の相乗的な効果は普遍的な現象なのかを検証するために、MDA-MB-231 に加えて T47D に対する両薬物の作用をさらに詳細に検討した。

両細胞ともに両薬物による相乗的な殺細胞効果が観察されたが、T47D より MDA-MB-231 の感受性がより高かった。また、MDA-MB-231 細胞のみに両薬物による相乗的なアポトーシス誘導が観察された (図5: *, $p < 0.05$ vs. control; #, $p < 0.05$ vs. each alone; As, As^{III} ; TAM, tamoxifen)。

両薬物の処理によって、MDA-MB-231 細胞においてオートファジー、S-phase アレスト、アポトーシスおよびネクローシスの誘導に加え、MAPK (JNK, ERK と p-38) の活性化も観察された。興味深いことに、MAPKs インヒビターをそれぞれ共存させると、JNK inhibitor である SP600125 (SP600) のみが MDA-MB-231 細胞を保護するとともに (図6: *, $p < 0.01$ vs. the combination; §, $p < 0.01$, vs. As^{III} ; #, $p < 0.01$, vs. Tetra. As, As^{III} ; SP600 NC, SP600125 negative control) アポトーシスとネクローシスの誘導に影響を与えずに S-phase アレストだけを改善させた (図7: *, $p < 0.05$, vs. control; #, $p < 0.05$, vs. As^{III} +Tetra. As, As^{III} ; SP600 NC, SP600125 negative control) 同様に、オートファジーインヒビター (3-methyladenine (3-MA) と wortmannin) も S-phase アレストの改善および細胞の保護効果を有することが観察された。また、SP600125 の添加はオートファジーに影響を与えなかった。これらのことから、JNK とオートファジーがそれぞれ独立的に細胞周期への影響を与えることにより、 As^{III} と Tetra に誘導される乳がん細胞の毒性に關与するが示唆された。



以上の結果から、 As^{III} + Tetra が異なるサブタイプの乳がん細胞の増殖を効率よく抑制し、特に難治性のトリプルネガティブ MDA-MB-231 細胞に対し、比較的低濃度でも相乗的な増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。MDA-MB-231 細胞に S-phase アレスト、細胞死誘導に加え、臨床に達成可能な両薬物濃度による分化誘導も観察された。興味深いことに、MDA-MB-231 の分化誘導をもたらした両薬物は、健康者由来 PBMCs に与える細胞毒性が限定的なものであった。

また、両薬物は乳がん組織から分泌されるサイトカインの量を調節し、がん細胞を取り巻く微小環境に影響を与えることに加え、PBMCs 中の制御性 T 細胞の割合を下げることにより、抗腫瘍活性に寄与する可能性が示唆された。これらの研究成果は、両薬物の臨床応用に非常に有意義な根拠を提供できたと考えられ、新しい乳がん治療法の 1 つになり得ることを示唆した。一方、ヒト乳がん腫瘍組織から作成される PDTX における両薬物の効果について、さらに検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuan Bo, Yao Mingjiang, Wang Xiao, Sato Ai, Okazaki Ayane, Komuro Hana, Hayashi Hideki, Toyoda Hiroo, Pei Xiaohua, Hu Xiaomei, Hirano Toshihiko, Takagi Norio	4. 巻 18
2. 論文標題 Antitumor activity of arsenite in combination with tetrandrine against human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro and in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cell International	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12935-018-0613-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kikuchi Hidetomo, Yuan Bo, Hu Xiaomei, Okazaki Mari.	4. 巻 9(8)
2. 論文標題 Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1517-1535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 袁 博, 清海 杏奈, 平野 俊彦	4. 巻 45(8)
2. 論文標題 ヒ素化合物とテトランドリン併用の乳癌治療応用への可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 424-426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yu Bowen, Yuan Bo, Kiyomi Anna, Kikuchi Hidetomo, Hayashi Hideki, Hu Xiaomei, Okazaki Mari, Sugiura Munetoshi, Hirano Toshihiko, Pei Xiaohua, Takagi Norio.	4. 巻 11(12)
2. 論文標題 Differentiation induction of human breast cancer cells by arsenite in combination with tetrandrine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 7310-7323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 袁 博、岡崎 真理、平野 俊彦	4. 巻 56
2. 論文標題 ヒ素化合物の抗腫瘍活性およびその新規臨床応用の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 421 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.5_421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 袁 博、清海 杏奈、菊地 秀与、林 秀樹、杉浦 宗敏、平野 俊彦、高木 教夫、岡崎 真理
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞に対するAsIIIとテトランドリンの併用による分化誘導作用
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bowen Yu, Bo Yuan, Anna Kiyomi, Sachiko Tanaka, Hideki Hayashi, Munetoshi Sugiura, Toshihiko Hirano, XiaoHua Pei, Norio Takagi
2. 発表標題 Contributions of apoptosis induction and JNK activation to enhanced cytotoxicity of arsenite and tetrandrine in human breast cancer cell line MDA-MB-231
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bo Yuan, Mingjiang Yao, Hideki Hayashi, Toshihiko Hirano, Norio Takagi
2. 発表標題 Enhanced cytotoxic effects of the combination of arsenite with tetrandrine against breast cancer cell line MCF-7
3. 学会等名 14th Asia Pacific Oncologists Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 袁 博, 王 瀟, 姚 明江, 林 秀樹, 平野 俊彦, 高木 教夫
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞MCF-7に対するAsIIIとテトランドリンの併用による相乗的な殺細胞作用
3. 学会等名 第138回日本薬学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考