

今後、
欠失マウスにおいて記憶異常が報告されるRARシグナル及び概日リズムと、ER α シグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される

65

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担報告書

発生-発達期ビスフェノール類の暴露による遅発行動影響と中枢解析

研究代表者 種村健太郎

東北大学大学院農学研究科 准教授

【研究要旨】

化学物質の早期暴露による遅発中枢影響をスコア化する目的でエストロゲン受容体遺伝子改変マウスの行動様式を解析した。その結果、異常の基準値設定としての有用性を見いだした。また発生-発達期におけるビスフェノール類暴露による遅発中枢影響を明らかにする目的で、マウスに交配から離乳期まで飲水投与（妊娠期は経胎盤暴露、授乳期は経母乳暴露）し、成熟後に行動解析、遺伝子発現解析を行った。その結果、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。また網羅的遺伝子発現解析から、GABA受容体シグナル影響が推測された。

A. 研究目的

先行研究において、胎生期及び幼若期マウスへの神経作動性化学物質の投与が、従来の成熟マウスへの投与による神経毒性試験法（所謂、FOB:機能観察総合評価）からは想定困難な遅発性の情動認知行動異常を誘発することを明らかにし、加えて対応する神経科学的物証、及びその分子メカニズムの一端を捉えた。

この神経系の発生-発達期における神経伝達物質受容体を介した神経シグナルかく乱について特筆されるのは、直接的な細胞障害を惹起しないレベルの神経作動性化学物質暴露が、微細な脳構造形成不全や神経回路構築異常を誘発し、成長後に情動認知行動異常として顕在化する事である。

そこで本研究では、上記の遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコルの確立、及

び客観的評価指標の提案を目指す。

そのため、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等を普遍的な基準点と位置付け、情動認知行動及びこれに対応する神経科学的物証項目（微細形態、タンパク発現・遺伝子発現、神経回路機能等）の異常所見をスコア化し、神経作動性化学物質による異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法の提案を目的とする。

具体的には、複数のエストロゲン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスの呈する行動様式を基準点とし、NACsとしては、ER結合性化学物質として理解されているジエチルスチルベストロール（DES）、ビスフェノールA（BPA）、及びビスフェノールAF（BPAF）を取り上げる。本年度は、エストロゲン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスを用いた行動解析と、特にBPAFについての周産期暴露による遅発中枢影響解析を行う。

B. 研究方法

エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスとして、雄 ER α KO マウス、及び雄 ER β KO マウスを用いた。生後 12 週齢から 13 週齢 (約生後 3 ヶ月齢) にかけて、オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験を組み合わせたバッテリー式行動解析を行い、同腹の野生型雄マウスの示す行動様式からの逸脱度は t-test によって検定した。

C57BL/6NcrSlc マウス (日本エスエルシー) を実験に用いた。BPAF の投与は、交配から離乳時 (4 週齢時) まで飲水投与とし、遮光プラスチック製給水ビンを使用した。給水ビンは週 2 回 (月木または火金曜日) 交換した。BPAF 投与液の作製にあたっては、まず BPA のエタノール溶解液を作製し、これを水道水中にエタノールの最終濃度が 0.01% となるように添加した。BPAF の用量は 0、10、100ppm に設定した。離乳時に雄のみをランダムに選別し、1 ケージに 4 匹ずつ群飼いとし、生後 12 週齢から 13 週齢にかけて、オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験を行った。生後 15 週齢時に、大脳、及び海馬について、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 (パーセローム法による) を行い、Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った。また、特に神経細胞突起について形態解析を行った

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

エストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスの行動解析の結果、①雄 ER α KO (+/-) マウスは、行動様式異常は認められなかったが、②雄 ER α KO

(-/-) マウスにおいては、オープンフィールド試験における総移動量の低下、明暗往来試験における明所滞在時間及び明暗往来数の減少、高架式十字迷路試験における開放部滞在時間の減少とともに、条件付け学習記憶試験における学習記憶異常が認められた。一方で、③雄 ER β KO マウス (+/-) では、明暗往来試験における明暗往来数の減少とともに、条件付け学習記憶試験における記憶異常が認められ、④雄 ER β KO マウス (-/-) においても同様の行動異常が認められた (t-test、 $p < 0.05$)。

周産期 BPAF 暴露マウス (雄) の行動解析の結果、10 ppm 暴露群に、行動異常は認められなかったが、100ppm 暴露群に、オープンフィールド試験における総移動量の増加とともに、中央部滞在時間の減少傾向が認められた。また明暗往来試験からは暗所滞在時間の延長傾向が認められた。さらに条件付け学習記憶試験から、海馬依存性の高いとされる、場所連想記憶の異常が明らかとなった (t-test、 $p < 0.05$)。BPAF 暴露マウスの大脳及び海馬の網羅的遺伝子発現解析からは、BPA 暴露群 (昨年度施行) にて顕著であった遺伝子発現抑制傾向 ($p < 0.01$ 、ratio > 1.1) は特に認められないものの、100ppm 暴露群の大脳において、GABA 受容体シグナル影響が生じていることが示唆された。

D. 考察

神経作動性化学物質による遅発性の行動異常を基準点との「スコア差」として客観的に記述し評価する方法として、遺伝子改変マウスの利用が期待できることが示された。今後、遺伝子改変マウスのみならず、行動異常誘発化学物質の利用によって、基準点を増やすことによって、「スコア」としての頑強性の向上が望まれる。

行動解析結果から、BPAF 暴露による遅発神経影響として、不安関連行動の逸脱を伴う学習記憶異常が生じていることが示唆された。これは、「不安が大きい」状態を包括している可能性が高く、遺伝子発現

様式との整合性を示すと考えられた。今後、形態解析およびタンパク発現解析等による神経科学的補強が必要である。

E. 結論

BPAFの周産期暴露による遅発神経影響の実体として行動異常とそれに伴う遺伝子発現様式を捉えることに成功した。今後、その異常度を検討し、毒性学的な位置づけを明瞭化する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし。

2) 雑誌

1: Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. *Zygote*. 2013 Jan 18:1-6.

2: Ohashi Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Distribution of protein disulfide isomerase during maturation of pig oocytes. *Anim Sci J*. 2013 Jan;84(1):15-22.

3: Macchiarelli G, Palmerini MG, Nottola SA, Cecconi S, Tanemura K, Sato E. Restoration of corpus luteum angiogenesis in immature hypothyroid rats after thyroxine treatment:

morphologic and molecular evidence.

Theriogenology. 2013 Jan 1;79(1):116-26.

4: Sakurai M, Sato Y, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Tanemura K, Hoshino Y, Matsumoto H, Sato E. Distribution of fibulointerstitial nephritis antigen-like 1 and structural matrix proteins in mouse embryos during preimplantation development in vivo and in vitro. *Zygote*. 2012 Oct 1:1-7.

5: Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence. *J Toxicol Sci*. 2012;37(2):3380.

2. 学会発表

種村 健太郎、古川 佑介、大塚 まき、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、佐藤 英明、菅野 純
発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析-幼若期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について- [第39回日本毒性学会学術年会]2012年7月

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金
 (化学物質リスク研究事業)
 中間評価ヒアリングの報告

研究課題名

神経系発生-発達期の化学物質暴露による
 遅発中枢影響解析に基づく
 統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究

研究代表者

東北大学大学院
 動物生殖科学分野
 種村健太郎

1

本研究班の狙い

先行研究による成果を踏まえ、特に胎児や子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮した、

「標準プロトコールの確立」及び「客観的評価指標の提案」を目指す。

具体的には、神経系発生-発達期において重要な役割を演じている受容体である、エストロゲン受容体(ER)に焦点を合わせて、その遺伝子改変マウスから評価指標を設定し、ER結合性が高いとされる被験化学物質を用い、

- ①.情動認知行動解析、
- ②.神経科学的物証の収集を元に
- ③.「情動認知行動スコア」と「神経科学物証スコア」の作成するとともに
- ④.情動認知行動異常発現メカニズム解明を行い、

標準プロトコールの確立を目指す。

2

研究遂行における指針



ER遺伝子改変マウス
野生型マウス

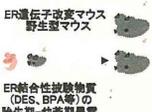
ER結合性拮抗物質
(DES, BPA等)の
胎生期-幼若期暴露

神経系発生-発達期における化学物質投与によるエストロゲン受容体(ER)シグナルかく乱を起点とした、遅発中枢影響の実態を究明し、その性質と強度を**毒性学的に客観的に**判断する。

- ① **情動認知行動解析**
山田(理研脳センター)、種村(東北大学)
- ② **神経科学的物証の収集**
富永(徳島文理大)、岩野(酪農学園大)、種村(東北大学)
- ③ **「情動認知行動スコア」と「神経科学物証スコア」の作成**
五十嵐(国立衛生研)、種村(東北大学)
- ④ **情動認知行動異常発現メカニズム解明**
中島(奈良先端大)、五十嵐(国立衛生研)、北嶋(国立衛生研)

3

本研究遂行における指針



ER遺伝子改変マウス
野生型マウス

ER結合性拮抗物質
(DES, BPA等)の
胎生期-幼若期暴露

神経系発生-発達期における化学物質投与によるエストロゲン受容体(ER)シグナルかく乱を起点とした、遅発中枢影響の実態を究明し、その性質と強度を**毒性学的に客観的に**判断する。

① 情動認知行動解析



相互検証による対応付け

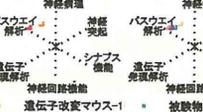
③ 「情動認知行動スコア」と「神経科学物証スコア」の作成

情動認知行動スコア



社会性行動 探索行動 不安行動
情報処理 適応行動 学習記憶

神経科学物証スコア



神経病理 神経突起
バスウェイ解析 神経突起
シナプス伝達 遺伝子発現解析
神経回路機能 神経回路機能

④ 情動認知行動異常発現メカニズム解明



Persephone
ヒトへの外挿
高い安全性の確保へ...

4

97

2

本研究の進捗状況

ビスフェノールAのような、評価が難しいとされてきた化学物質について

早期暴露による遅発影響があるのか？

毒性学的に、どのような位置づけになるのか？

を科学的な指標を用いて評価可能とすることを目標とした。

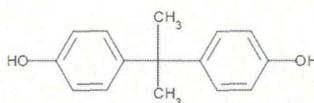
そこで、**低用量ビスフェノールA(BPA)として、**
0ppm、0.06ppm、1ppm、15ppmの濃度にて、
 交配から、産仔マウスの離乳まで飲水に混合投与し、
 成長後(12-14週齢)の雄産仔マウスについて、
 遅発中枢影響を検討した。

【BPAのTDI :0.05mg/kg/day】

5

本研究の進捗状況

ビスフェノールA(BPA)



体重の約1/5~1/10を一日の飲水量とすると、

0.06 ppm → 0.003~0.006mg/kg/day

1 ppm → 0.05~0.1mg/kg/day

15 ppm → 0.75~1.5mg/kg/day

【BPAのTDI :0.05mg/kg/day】

6

トピック1

本研究の進捗状況

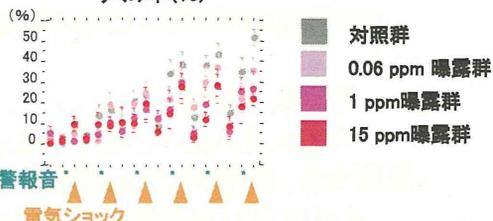
神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウスに軽度の学習異常が生じる。

条件付け学習記憶試験



警報音と電気ショックにより、
学習記憶能を測定する。

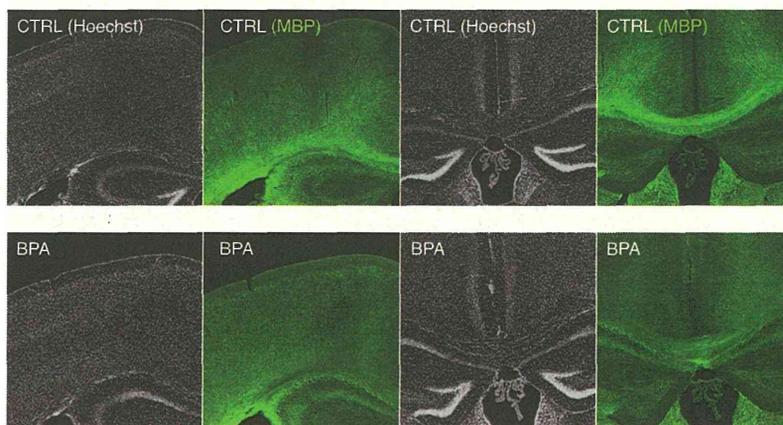
短期記憶形成過程の
すくみ率(%)



トピック2-1

本研究の進捗状況

神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウス終脳に形態異常が認められる。



トピック2-2

本研究の進捗状況

**神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウス大脳に層構造異常が認められる。**

9

トピック3

本研究の進捗状況

**神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウス海馬に遺伝子発現抑制傾向が生じる。**

Percollome

**遺伝子発現
増加/抑制
($p < 0.01$, ratio > 1.2)**

0.06 ppm 曝露群	46/116
1 ppm 曝露群	53/166
15 ppm 曝露群	28/507

INGENUITY SYSTEMS

神経軸索機能不全が疑われる。

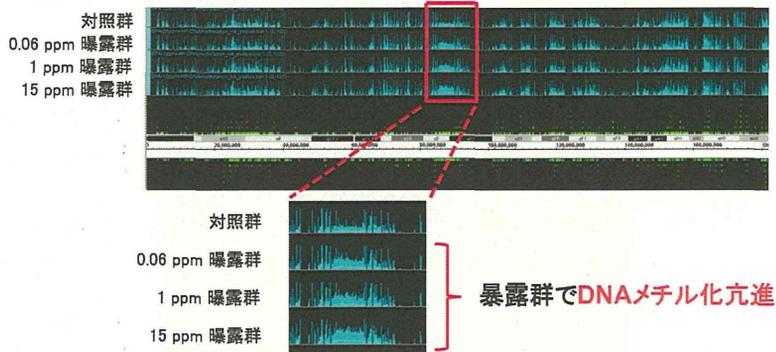
10

トピック4

本研究の進捗状況

神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウス海馬にエピゲノム影響が生じる。

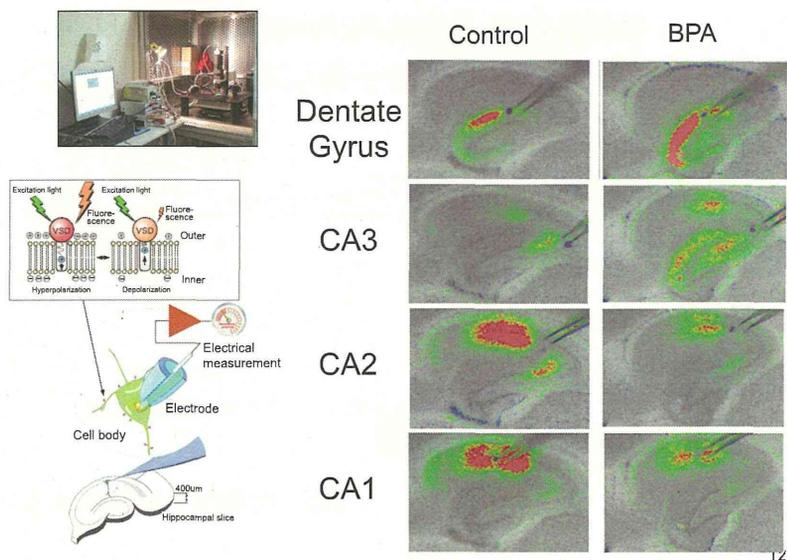
Chr2 DNAメチル化変化解析: MBD2-IP and promoter array



11

トピック5

光計測法による海馬神経回路解析



12

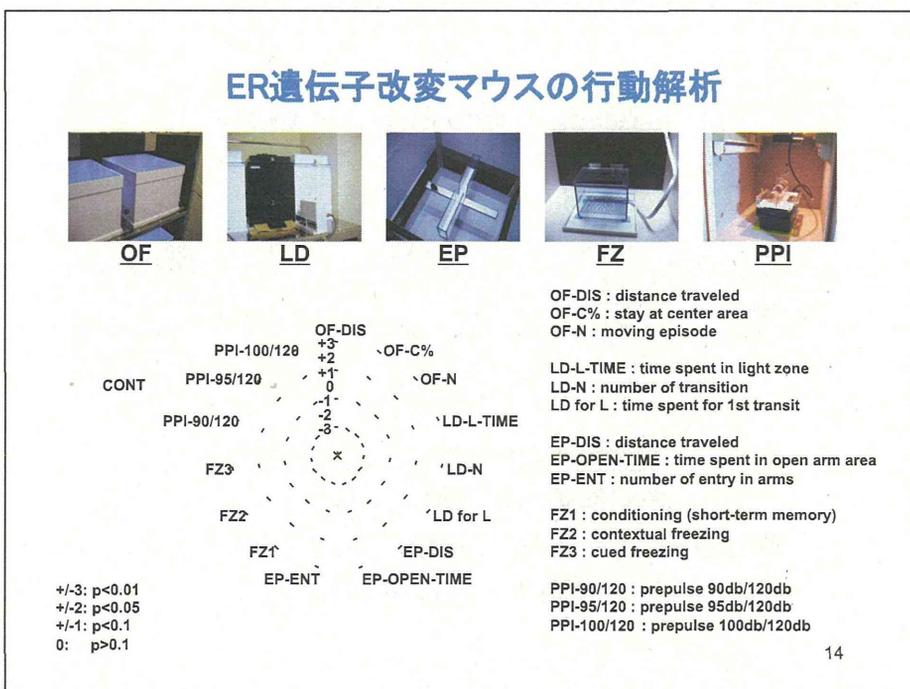
以上のように、
 ビスフェノールAのような、評価が難しいとされてきた化学物質についても、
**早期暴露による遅発影響の検出が可能であり、
 そのメカニズムについても解明が期待できる。**

それでは、こうした早期暴露による遅発影響が
毒性学的に、どのような位置づけになるのか？

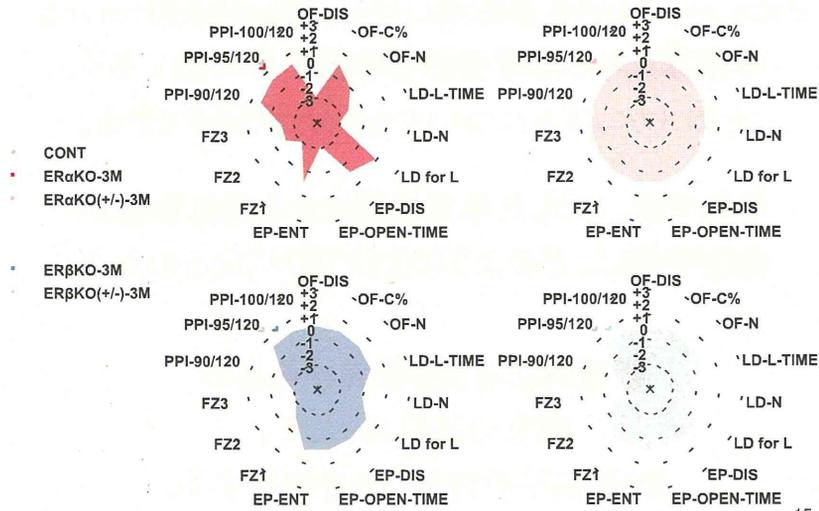
↓

**客観的な指標を設定する為の
 異常の基準点として、
 ER遺伝子改変マウスを使用する。**

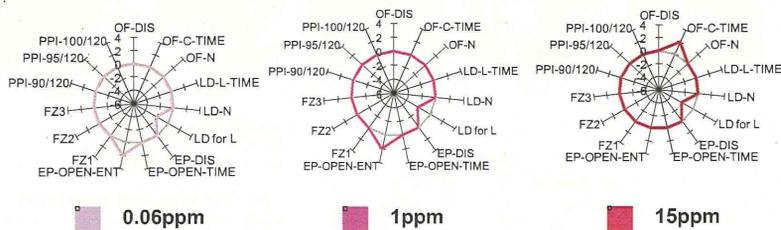
13



ER遺伝子改変マウスの行動解析



周産期BPA暴露マウスの行動解析



周産期におけるBPA暴露の結果、
不安関連行動異常が誘発される。
認知行動については、ER遺伝子改変マウスに比べ、
逸脱レベルは小さい。

次年度、**ER α ノックダウンマウス**を使用し、
標的タンパクの完全欠損のみならず、
その減少による異常を基準設定に加える。
さらに、神経科学的な指標を設定する。

これによって
スコア化を、より高精度にすることが期待でき、
化学物質の早期暴露による遅発影響について
毒性学的に評価することが可能となる。

17

本研究の進捗状況(その他)

- 1) BPA周産期暴露による産仔の行動影響解析点の早期化
→発達過程の未成熟個体での行動異常を捉えつつある。
- 2) BPA代謝機構に着目した、飼料成分の最適化
→飼料中の葉酸量によって、異常検出の高精度化が期待できる。
- 3) BPA類似化学物質: BPAFの使用。
→同投与条件にて、成熟後の空間連想記憶異常を検出した。
(現在、海馬遺伝子発現解析中)

18

期待される成果

従来法では検出が困難であった遅発性の情動認知行動異常の
高精度のリスク評価が、普遍性を持って実施可能となり、
行政対応に必須のバリデーションに耐えるガイドラインの作成が期待できる。

行動様式のプロファイリングによって精神疾患と結びつけるのではなく、
スクリーニングに適した行動試験条件を絞り込むとともに、
形態・機能についての検討事項についても集約することで、
BPAのような評価が難しいと考えられている化学物質をも評価できる
シンプルで高精度な評価システムの構築が可能となる。

19

ヒアリングで受けた意見等

どうやって、普遍化するのか？



異常行動を呈する疾患モデルマウスの利用と、
メカニズム解明研究によって対応していく。

基準点はどこに置くか？

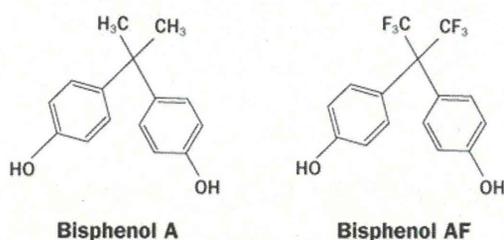


野生型マウスを基準とした逸脱度をもって、スコア化するが、
例えば、ドーモイ酸等の記憶異常を誘発する化学物質を使用した、
異常点を加えることによる、頑強性の向上も検討している。

20

発生-発達期ビスフェノール類暴露による
遅発行動影響と中枢解析

21



**ビスフェノールAF(BPAF)として、
0ppm、10ppm、100ppmの濃度にて、
交配から、産仔マウスの離乳まで飲水に混合投与し、
成長後(12-14週齢)の雄産仔マウスについて、
遅発中枢影響を検討した。**

22

行動解析



23

行動解析



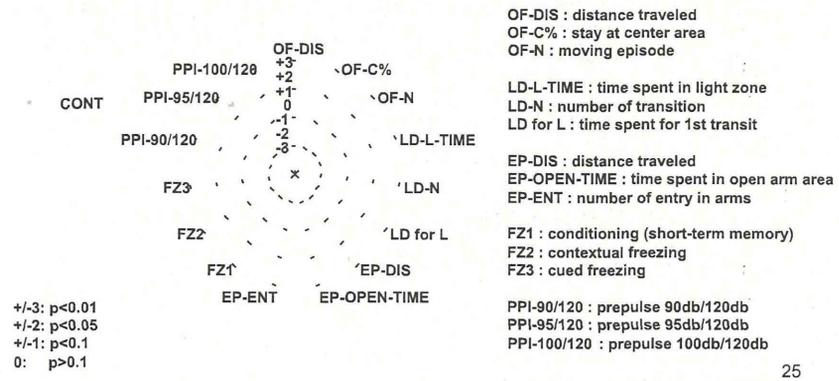
条件付け学習記憶試験については、
BPA暴露実験時に準じて、
電気ショックを弱め、ショック回数を増やした。



特に短期記憶形成過程への影響評価の
高度化を期待できる。

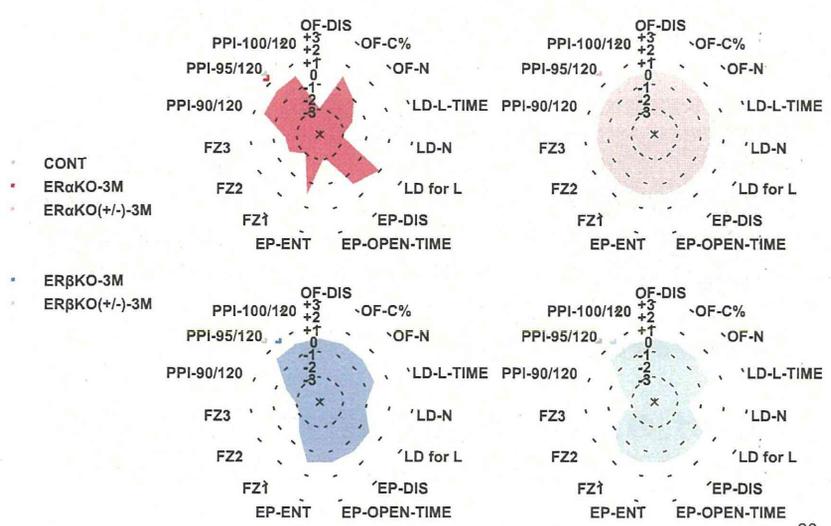
24

ER遺伝子改変マウスの行動解析



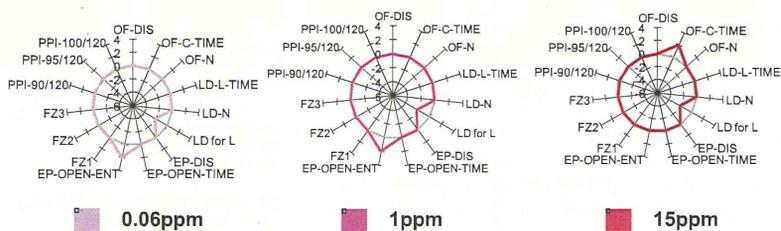
25

ER遺伝子改変マウスの行動解析



26

周産期BPA暴露マウスの行動解析



ER遺伝子改変マウスとして、ER α ノックダウンマウスを加えることで、スコアとしての頑強性を高める。

27

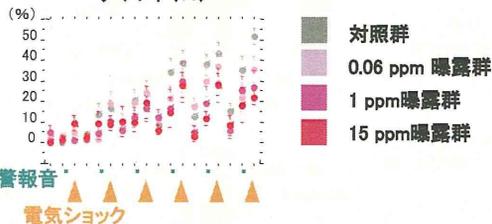
神経系発生-発達期のBPA暴露により、成長後のマウスに軽度の学習異常が生じる。

条件付け学習記憶試験



警報音と電気ショックにより、学習記憶能を測定する。

短期記憶形成過程のすくみ率(%)



「条件付け」の、さらなる最適化を検討するべきかもしれない。記憶喪失性貝毒、ドーモイ酸を使用した条件設定を予定

28

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担報告書

神経活動イメージングによる中枢作動性物質の神経回路毒性解析
発生-発達期のビスフェノールA等暴露による神経回路応答変化の機能解析

研究分担者 富永 貴志
徳島文理大学 准教授

研究要旨（200字位）神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を計測する手段として膜電位感受性色素（VSD）を用いて網羅的な評価を可能にする手法を開発する。ビスフェノールA暴露の影響を調べることを目的とするが、はじめに行動実験において明確な結果の得られているバルプロ酸の遅発毒性の神経回路機構を詳細に検証した。ビスフェノールAは急性効果が見られないことからバルプロ酸の場合と同様に発達後の行動異常を手がかりに機構解析をする必要が考えられた。網羅的機能探索のための新規共焦点顕微鏡の開発、新規パターン刺激イメージング顕微鏡の開発、膜電位感受性蛍光タンパクを用いた解析、単離脳での匂い自然刺激解析など新規のより網羅的で非侵襲的な解析手法の開発を行なっている。

A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、ex vivo 実験系（スライス標本）でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

(1) 遺伝子改変マウスの神経回路機能評価(MIT 利根川研究室との共同研究)

内側嗅内野から CA1 野へ投射する貫通線維のシナプスで細胞特異的にテタヌス毒 (TetX) を発現させた遺伝子改変マウスを用い、その貫通線維に電子刺激を加えた時の応答を光計測法により定量的に比較した。この研究の発展として嗅内野内の神経活動伝達、特に CA2 への活動伝播について検討を加えている。

(2) バルプロ酸による遅発性神経回路改変(中島、種村、五十嵐らとの共同研究)

海馬中の代表的な神経回路としてシャーファー側枝刺激に対応する回路(Sch)、苔状線維刺激に対応する回路(Msy)、貫通線維刺激(PP)に対応する回路の3つに分けて光計測を行った。また、ランニングホイールを使って形質がレスキュー出来るかどうかについても検討した。

(3) ビスフェノールA投与による神経回路の急性応答
上記の3つの神経回路の応答について、ビスフェノールAを還流時の応答を検討した。

(4) より鋭敏な光計測装置開発

(4)-1 新規共焦点顕微鏡の開発

結果に記載

(4)-2 新規パターン刺激イメージング顕微鏡

結果に記載

(4)-3 膜電位感受性蛍光タンパク質 (voltage sensitive fluorescent protein; VSFP) による神経回路解析 (理研トーマスクヌッフエルとの共同研究)

理化学研究所脳科学総合研究センタートーマス・クヌッフエルの研究室にて、子宮内エレクトロポレーションにより膜電位感受性蛍光タンパク質を導入し、2-4 週令まで育ったマウスを徳島文理大学に搬入し、1 日以内にスライス標本を作成し、光計測に供した。また、遺伝子導入によりこの蛋白質を発現させた動物での実験について準備を行なっている。

(4)-4 単離脳標本を用いた匂い自然刺激への神経応答の光計測 (東北大学 飯島研究室との共同研究)

モルモットより嗅球がついた状態で単離した脳標本の嗅球に匂い刺激を加え、その応答を光計測により測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、徳島文理大学における「徳島文理大学における動物実験と動物の飼養及び保管等に関する規程」にのっとり、あらかじめ実験計画書を同大学実験動物委員会、倫理委員会へ提出し、承認を受けたいうえで実施した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子改変マウスの神経回路機能評価 (MIT 利根川研究室との共同研究)

内側嗅内野第 3 層 (MECIII) から CA1 野へ投射する貫通線維のシナプスで細胞特異的にテタヌス毒 (TetX) を発現させた遺伝子改変マウスを用い、その貫通線維に電子刺激を加えた時の応答を光計測法により定量的に比較した。

光計測法を用いることにより、通常は刺激部位の同定

などが困難な海馬 CA1 野への側頭葉-アンモン角経路 (temporal ammonic pathway; T経路) での神経伝達が遺伝子改変マウスでは有効に阻害されることが示された。

このマウスでは、事象の前後関係を結びつける学習行動に異常があることが示され、エピソード記憶の神経回路機構として、光計測で示された神経活動が必須であることが示された。

(2) バルプロ酸による遅発性神経回路改変 (中島、種村、五十嵐らとの共同研究)

行動実験、遺伝子発現、組織学的な遅発性異常が確認されているバルプロ酸投与マウスに関して光計測による機能的神経回路改変の検証を行った。

バルプロ酸の薬理作用から考えて抑制性神経系への効果が最も疑われたので、抑制性神経回路の作用を抽出することにした。また、海馬中の代表的な神経回路としてシャーファー側枝刺激に対応する回路 (Sch)、苔状線維刺激に対応する回路 (M_{sy})、貫通線維刺激 (PP) に対応する回路の 3 つに分けて検定を行うこととした。

その結果、どの神経回路でもコントロール条件での反応は、コントロールマウスとバルプロ酸投与マウスで差が見られなかった。一方、GABA_A 受容体の阻害剤であるピクロトキシンを還流すると、コントロールマウスの Sch, M_{sy} 回路で顕著な反応の増大が見られる一方、バルプロ酸投与マウスでは増大が見られなかった。つまり、コントロールマウスでは通常は抑制性の神経回路で神経回路が調節されある一定の活動を示しているのに対して、バルプロ酸投与マウスでは神経回路はいつでも抑制による調節の余地なく目一杯に働いていると考えられる。別の言い方をすると、バルプロ酸の投与によって神経回路の活動の修飾の余地がなくなってしまったといえる。

さらにランニングホイールで運動が、上記の神経回路活動の改変を抑制することを明らかにした。

このような抑制性神経回路の改変を示すには、膜電位感受性色素によるイメージングは極めて有効であるといえる。