

機関番号：13801  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20510062  
 研究課題名(和文) 甲状腺系攪乱化学物質の細胞外蛋白質への結合形態と細胞への取り込み機構の解析  
 研究課題名(英文) Analysis of extracellular distribution and cellular uptake system of thyroid-disrupting chemicals  
 研究代表者  
 山内 清志 (YAMAUCHI KIYOSHI)  
 静岡大学・理学部・教授  
 研究者番号：50201827

## 研究成果の概要(和文)：

内分泌攪乱化学物質の標的細胞での作用に影響を与える因子を探る目的で、血清蛋白質と化学物質の相互作用、並びに化学物質の取り込み機構を解析した。<sup>125</sup>I 標識 2,4,6-トリヨードフェノール(TIP)とイオキシニル(IOX)は、ニジマスやウシガエル(ニワトリ、ブタ・ラット)の血清蛋白質に強く結合した。この結合性の違いは、化学物質の細胞内取り込み量に強く影響を与えた。細胞への取り込み機構は、単環フェノール類に特異的であった。TIP や IOX の細胞内甲状腺ホルモン攪乱作用は、血清蛋白質との種特異的な相互作用と特異的な細胞内取り込み機構によって、影響を受けると考えられる。

## 研究成果の概要(英文)：

To clarify the factors that influence the biological effects of endocrine disrupting chemicals within target cells, we investigated the interaction of 2,4,6-triiodophenol (TIP) and ioxynil (IOX), potent thyroid hormone disrupting chemicals, with serum proteins from rainbow trout, bullfrog, chicken, pig, and rat. [<sup>125</sup>I]-chemicals bound weakly to proteins in trout and bullfrog serum, and strongly to proteins in chicken, pig, and rat serum samples. A weak interaction of [<sup>125</sup>I]-chemicals with tadpole serum proteins accelerated [<sup>125</sup>I]-chemical cellular uptake in vitro. The cellular uptake of [<sup>125</sup>I]-chemicals suggested the presence of phenol-specific cellular uptake system. The differences in the molecular and binding properties of chemical-binding proteins among vertebrates, and a phenol-specific cellular uptake system would affect in part the cellular actions of these chemicals.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：環境内分泌学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：甲状腺ホルモン、内分泌攪乱、化学物質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 内分泌攪乱化学物質(EDC)は、ホルモンの合成、輸送、取り込み、代謝、受容体、受容体活性化後の標的遺伝子発現制御まで様々な部位に作用して、本来のホルモン作用

に可逆的または非可逆的な影響を与えている。著者らは、甲状腺ホルモン(TH)のシグナル伝達系を攪乱する化学物質の研究を進める中で、核内受容体(TR)よりも血清及び脳脊髄液中のTH結合蛋白質(THBP)であるトラン

スサイレチン(TTR)を標的とする化学物質が多いことに気付いた。化学物質が細胞外蛋白質に結合すると、次のような生体影響が考えられる。(i)遊離の化学物質濃度が低下し、細胞へ移行する化学物質量が減少するため、標的細胞を保護する作用を持つ。(ii)化学物質を高濃度に細胞外に蓄積させるため、細胞は長期に渡って化学物質に曝露されることになる。また、化学物質結合蛋白質がTTRのようにホルモン輸送に関わる蛋白質である場合、化学物質は蛋白質に結合していたホルモンを解離させることになり、血液中のホルモンバランスに影響を与える。これらの考えは、遊離型化学物質が細胞へ取り込まれるという前提に議論されているが、その取り込みがTHのように幾つかのトランスポーターを介するのか、拡散によるのか明確ではない。一方、TTR やリポ蛋白質等の受容体が卵母細胞などの細胞表面に存在することから、蛋白質結合型の化学物質がその蛋白質受容体を介して、血清蛋白質と同時に細胞内へ取り込まれる可能性が示唆されている。この考えは、細胞膜上の受容体を発現している細胞に化学物質が特異的に蓄積することを意味し、化学物質の組織分布を考える上で重要である。哺乳類や鳥類の脳脊髄液には高濃度のTTRが存在するために、TTRを介した化学物質の脳への取り込み機構の解明は、緊急の課題である。

(2) 著者らは、化学物質がTTRのホルモン結合をどのくらい競合阻害するかを指標に、バイオアッセイ系を構築し、環境化学物質のスクリーニングを試みてきたが、TTRへの化学物質結合が生体においてどの程度甲状腺系を攪乱するのか、蛋白質結合型化学物質はその生体内蓄積にどのように関与するのかについて強い興味を持つに至った。これらの研究背景を元に、TTRなどの血清蛋白質と化学物質の相互作用、化学物質の細胞への取り込み機構に関する研究を計画した。

## 2. 研究の目的

THは脳の発達や器官形成に必須のホルモンである。野生動物やヒトの甲状腺系に、残留性の高いポリ塩化ビフェニル、難燃剤等の有機ハロゲン化合物は深刻な影響を及ぼしている。これらの化学物質の多くは、血中および脳脊髄液でTH輸送に関わるTTRに強く結合している。しかし、このような結合が化学物質の内分泌攪乱作用にどの程度に寄与しているのか、明確なデータほとんどない。そこで甲状腺系攪乱化学物質の生体影響を理解する重要なステップとして化学物質の体内輸送系に関する基本的理解が必須であると考え、環境化学物質と血清蛋白質との相互作用、および細胞内への取り込み機構を明らかにする本研究を立案した。

## 3. 研究の方法

(1) EDCの影響を個体レベルで考えた時、化学物質の体内分布、特定組織への蓄積や代謝を理解することは極めて重要である。そこで、化学物質の細胞への取り込みがどのような機構によるものなのかを検証する価値があるため、以下の研究方法を試みた。

①THのシグナル伝達系を攪乱する化学物質の中で、放射性標識が容易なトリオードフェノール(TIP)とイオキシニル(IOX)をモデル化学物質に選び、クロラミンT法で標識した。  
②血清中での甲状腺系攪乱化学物質の存在形態を明らかにする目的で、魚類(ニジマス)、両生類(ウシガエル)、鳥類(ニワトリ)、哺乳類(ブタ、ラット、マウス)の血清と標識化学物質を培養した。その後、血清中の化学物質結合蛋白質を、ゲルろ過法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、で解析し、化学物質の細胞外の存在形態を検討した。

③甲状腺系攪乱化学物質に対する血清蛋白質の結合特性をリガンド結合実験によって解析した。

④化学物質の細胞への取り込み実験を、培養細胞や赤血球で行い、取り込み機構の特性を検討した。

(2)標的細胞内のIOXによるTH攪乱活性に与える血清蛋白質の影響を、培養細胞(XL58-TRE-Luc)を用いて、ルシフェラーゼ活性で調べた。

## 4. 研究成果

(1)血清蛋白質とTIP、IOXの相互作用

①各種血清蛋白質と $[^{125}\text{I}]$ TIPの結合特性  
 $[^{125}\text{I}]$ TIPとニジマス(オス・メス)、ウシガエル(幼生、成体のオス・メス)、ニワトリ(幼鳥と成体オス・メス)、成体オスのブタとラットの血清蛋白質との結合は、血清量に依存して増加した。しかし、その結合量は生物種によって大きく異なっていた。ニジマスやウシガエルでは、血清量を $3.2\ \mu\text{l}$ まで上げても、その結合量は、加えた $[^{125}\text{I}]$ TIP量の $1/6$ であった。それに対してニワトリ、ブタ、ラットの血清では、 $0.008\text{--}0.032\ \mu\text{l}$ の血清量で同程度の結合量が得られた。また、 $5\ \mu\text{M}$ の非放射性TIP共存下で調べた非特異的結合量は、総結合量(非放射性TIP未添加群)に対してニジマスで高く(80–90%)、カエル(～20%)やニワトリ・ラット(<5%)で低かった。血清蛋白質との相互作用は、ニジマスでは非特異的であり、それ以外の生物の血清では特異的であった。このアッセイでは顕著な雌雄差は認められなかった。

②ゲルろ過法によるTIP結合蛋白質の解析  
TIP結合性の血清蛋白質のゲルクロマトグラフィーによって、TIP結合蛋白質の分子サ

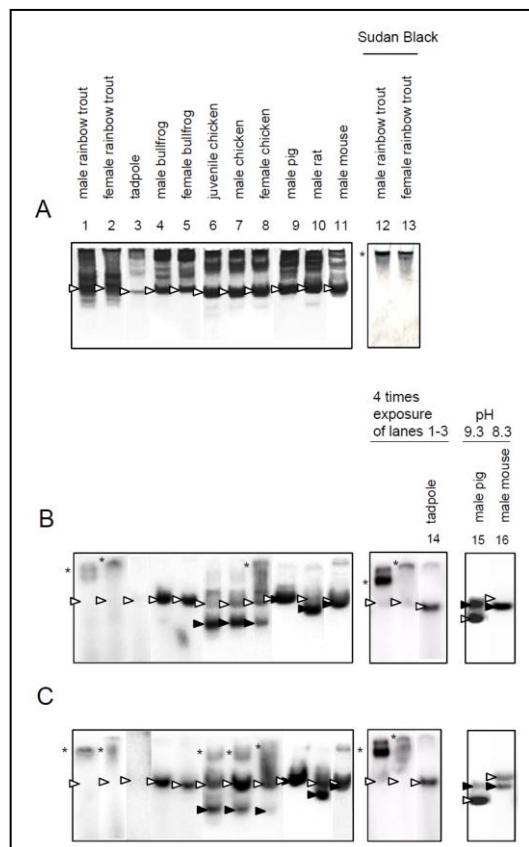


図1. TIP結合性の血清蛋白質の native PAGE

イズはニジマスのオス血清で 320 kDa メス血清で 220-280 kDa、他の生物種ではいずれも 58-68 kDa であった。

### ③ ポリアクリルアミドゲル電気泳動による TIP 結合蛋白質の解析

調べたすべての血清において TIP 結合蛋白質が検出されたが(図1)、ニジマスやウシガエル幼生のバンドの放射活性は低く、長時間の露光を必要とした(パネル B と C のレーン 12-14)。ニジマスの<sup>[125I]</sup>TIP 結合蛋白質は部分的に Sudan Black 染色で検出したリポ蛋白質のバンドに対応していた。アルブミン(Alb)への<sup>[125I]</sup>TIP 結合は検出できなかった。バンドパターンはニジマスにおいて雌雄差が見られた。ウシガエル幼生の血清は蛋白質量が他の血清より低かった(パネル A)。ウシガエルの<sup>[125I]</sup>TIP 結合蛋白質は Alb であった。ニワトリの<sup>[125I]</sup>TIP 結合蛋白質は、幼鳥と成体オスでは TTR が主要であり、Alb にも<sup>[125I]</sup>TIP の結合が見られた。しかし、成体メスでは<sup>[125I]</sup>TIP は、TTR、Alb、さらに易動度の小さい幅広いバンドに分布した。この易動度の小さいバンドは部分的にリポ蛋白質に対応していた。ブタ血清では主要な<sup>[125I]</sup>TIP 結合蛋白質は Alb と TTR であった。ラットとマウスの血清では、主要な<sup>[125I]</sup>TIP 結合蛋白質は TTR であった。これらの蛋白質に対する<sup>[125I]</sup>TIP の結合を 10 μM の非放射性 TIP で競合させると、<sup>[125I]</sup>TIP の放射活性の分布が大

きく減少したのは TTR のバンドのみであり、リポ蛋白質と思われるバンドと Alb のバンドは競合阻害されなかった(パネル C)。

TIP に暴露されると、TIP は動物体内の血液の中に入って、その生物種によって特異な蛋白質に結合して血清中を輸送される。魚類ではおそらくリポ蛋白質に、ウシガエルでは Alb、ニワトリでは TTR と Alb (メスではその他におそらくリポ蛋白質)、哺乳動物では Alb と TTR (げっ歯類では TTR) がその結合蛋白質として機能する。ニジマスの TIP 結合蛋白質がリポ蛋白質であるとすると、その分子サイズ(320 kDa と 220-280 kDa) から高密度リポ蛋白質(HDL)の可能性が考えられる。ニジマスの HDL は 180 kD であり、低密度リポ蛋白質(LDL)や超低密度リポ蛋白質(VLDL)はさらに大きな分子サイズ(～1000 kDa と 10,000-80,000 kDa)を示す。また、ビテロジェニン、440-600 kDa である。ニジマスとニワトリのメスは産卵期に血清を採取している。これらの動物の TIP 結合蛋白質に雌雄差が認められたことは、卵への脂質輸送にリポ蛋白質が関わっていることと関連があるのかもしれない。これは、ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)や 2,3,7,8-テトロクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)が血清中の VLDL やビテロジェニンを介して魚類卵に輸送されるという現象、Aroclor 1254 がハト血清中の VLDL、LDL、HDL、Alb 画分に分布するという現象とよく似ていた。同様の機構で TIP の卵への蓄積が行われる可能性を示唆するものであり、今後の TIP 結合蛋白質の同定や組織への蓄積に関する研究が必要である。

Alb は、魚類から哺乳類まで存在し、血清蛋白質の中で最も濃度が高い蛋白質であるが、魚類 Alb は TIP に対する結合性を示さず、ウシガエルの Alb の結合性もそれほど高くない。よって Alb に対する TIP の結合性も進化と共に少しずつ獲得されてきたと言える。

### (2) 哺乳動物 TTR と<sup>[125I]</sup>TIP の結合特性

結合特性を定量的に解析するために、血清 60 kDa 画分を用いて<sup>[125I]</sup>TIP 結合に及ぼす非放射性 TIP の効果を検討した。この画分には TTR と Alb が含まれる。また、同様の実験を精製した TTR を用いて行った。ニワトリの 60 kDa 画分では、<sup>[125I]</sup>TIP 結合の TIP による阻害は、3,5,3'-トリヨードチロニン(T<sub>3</sub>)やチロキシン(T<sub>4</sub>)による阻害より数十倍から 10<sup>2</sup> 倍低い濃度で観察された。ブタの試料では、TIP の阻害は T<sub>3</sub> や T<sub>4</sub> による阻害より 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> 倍低い濃度で起こるが、精製 TTR では、さらに阻害曲線が左側にシフトした。よって、ブタ 60 kDa 画分では TTR の他に Alb も TIP 結合に関与し、TTR と Alb への TIP 結合は TH 結合よりも 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> 倍強いと考えられる。ラット 60 kDa

画分と精製 TTR では、TIP による<sup>[125I]</sup>TIP 結合阻害は、同じ曲線を描き TIP 結合には TTR が主に関与することを示唆している。また、その結合は T<sub>4</sub> や T<sub>3</sub> による阻害より 10<sup>2</sup> 倍以上強いと思われる。

精製 TTR を用いた TIP の 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) 値は、ニワトリ、ブタ、ラットでそれぞれ、1.5、1.8、1.2 (nM) であった。ニワトリ、ブタ、ラットの 60 kDa 画分の TH への結合特性は、それぞれ T<sub>3</sub>>T<sub>4</sub>、T<sub>4</sub>>T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>=T<sub>3</sub> で、すでに報告されている精製 TTR の TH 結合特性によく似ていた。

これら精製 TTR に対する TIP 結合の Scatchard plot では、いずれの TTR も高親和性と低親和性の 2 クラスの結合部位が検出され、結合に negative cooperativity が存在していた。それらの K<sub>d</sub> 値はニワトリ TTR で 0.29 nM と 4.78 nM、ブタ TTR で 0.35 nM と 9.02 nM、ラット TTR で 0.22 nM と 14.90 nM であった。

### (3) TIP と IOX の細胞への取り込み

#### ① TIP と IOX の細胞への取り込みに及ぼす血清蛋白質の影響

TIP が TTR に強く結合すると、遊離型 TIP の濃度が低下し、TIP 自身の細胞内取り込みが抑制されることが予想される。それを確認するために、ウシガエル赤血球への<sup>[125I]</sup>TIP

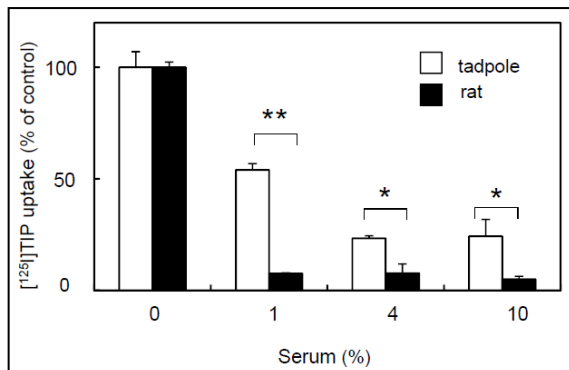


図 2. <sup>[125I]</sup>TIP のウシガエル赤血球への取り込みに及ぼす血清の影響

の取り込みにおける血清の影響を調べた (図 2)。赤血球に対する<sup>[125I]</sup>TIP の取り込みは非放射性 TIP で抑制され、培養後 2 分ですでに平衡に達していた。このような性質は、同細胞への TH 取り込みとよく似ているが、TH の場合、取り込みが平衡に達するのに少なくとも 30 分を必要とした。よって、TIP と TH は異なった取り込み機構によって細胞内に移行すると思われる。1、4、10% 血清を共存させると、細胞への TIP の取り込みは血清量に応じて低下したが、その効果はラット血清のほうがウシガエル幼生の血清より大きかった。同様の結果は<sup>[125I]</sup>IOX の細胞への取り込みにおいても観察された。

TH の細胞内取り込みにおいて、遊離ホルモン濃度が細胞内取り込み量を決定するという「遊離ホルモン説」が成り立つが、TIP の取り込みも同様であった。

#### ② IOX の細胞への取り込みに機構の解析

IOX の細胞への取り込み機構を探るために、<sup>[125I]</sup>IOX の細胞への取り込みに及ぼす物質の影響を検討した。化学物質は、有機陰イオントランスポーターの基質であるタウロコール酸 (TC) や bromosulfophtaleine (BSP)、アミノ酸トランスポーターの基質である 2-amino [2, 2, 1]heptane-2-carboxylic acid (BCH)、トリプトファン (Trp)、ロイシン (Leu)、フェニルアラニン (Phe)、外因性の単環フェノールとして TIP、ペンタクロロ

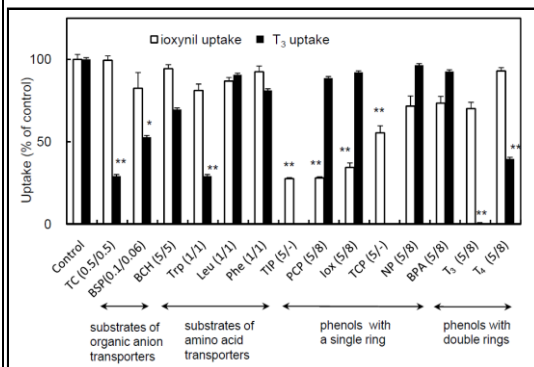


図 3. 赤血球への<sup>[125I]</sup>IOX の取り込みに及ぼすトランスポーター基質とフェノール化合物の影響

フェノール (PCP)、IOX、トリクロロフェノール (TCP)、ノニルフェノール (NP)、複環フェノールとしてビスフェノール A (BPA)、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> を用いた (図 3)。用いたトランスポーターの基質は、与えた濃度ではいずれも<sup>[125I]</sup>IOX の細胞への取り込みを阻害しなかった。一方、5 種の単環フェノールのうち 4 種は、<sup>[125I]</sup>IOX の細胞への取り込みを有意に阻害した。その程度は、TIP > PCP > IOX > TCP であった。複環フェノールは少し阻害しているようであったが、有意な効果がなかった。よって、単環フェノールの少なくとも TIP、PCP、IOX、TCP は同じ取り込み機構を介すると思われる。NP の阻害効果が低いのは、他の単環フェノールに比べてハロゲンを持たない点と大きなノニル基を持つ点で、この取り込み機構が認識しにくいものと思われる。T<sub>3</sub> の取り込みに及ぼす化学物質の影響と比較すると、T<sub>3</sub> の取り込みは、TC や BSP などの有機陰イオントランスポーターの基質およびアミノ酸 Trp で阻害されているが、単環フェノールでは阻害されない。また、T<sub>3</sub> や T<sub>4</sub> でも阻害されている。これらの結果から、TIP や IOX の細胞内取り込み機構は、TC や BSP を基質とする陰イオントランスポーター、T-システムや L-システムによるアミノ酸トランスポーターによるものではなく、単環フェノ

ール特有の取り込み機構によるものと思われる。

#### (4) IOX の細胞内 TH 攪乱作用に及ぼす血清蛋白質の影響

血清蛋白質に強く結合する化学物質は、細胞内への取り込みが抑制されることから、細胞内での化学物質の作用は減弱することが予想される。IOX は、細胞内の TH シグナル伝達系のある段階を阻害して、甲状腺系攪乱活性を TH 応答性のレポーター遺伝子をもつ XL58-TRE-Luc 細胞を用いて検討した (図 4)。この細胞では、2 nM T<sub>3</sub> によって、ルシフェラーゼ (Luc) 活性が 2.5-3.0 倍に増加した。この細胞へ 1.0 μM IOX を投与すると、Luc 活性は 76% まで低下した。そこで、細胞を血清存在下で培養し、IOX の甲状腺系攪乱活性を調べた。ウシガエル血清 1% と 4% の添加では Luc 活性は、わずかに増加したが、コントロール

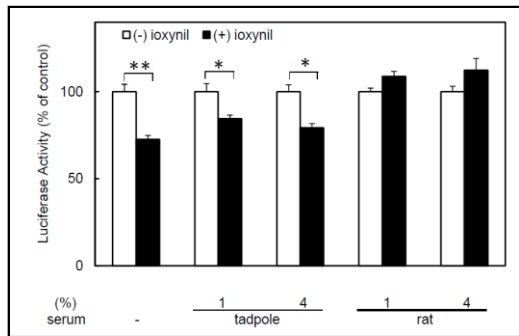


図 4. 血清によって影響される細胞内甲状腺系攪乱活性

レベル (2 nM T<sub>3</sub> 処理で IOX 未処理) に比べて有意に低かった。しかし、ラット血清 1% と 4% の添加では Luc 活性はコントロールレベルと差はなく、IOX の甲状腺系攪乱活性は完全に消失した。

ラット血清蛋白質、特にその中に含まれる TTR は、TIP や IOX に対して強い結合活性を示すため、これらの化学物質の細胞内移行が抑制される。この細胞内移行の抑制が、図 5 の培養条件では IOX の細胞への作用 (甲状腺系攪乱活性) をほぼ完全にブロックできることが明らかとなった。これは、血清蛋白質的に起こり、ウシガエル幼生の血清では、そのブロック効果は弱く、甲状腺系攪乱活性が検出された。

TIP や IOX のような化学物質は、2 通りの方法で甲状腺攪乱活性を発揮できる (図 5)。(A) TTR に結合することで、血漿中の TH ホメオスタシスを攪乱し、血中の TH レベルや TH クリアランスに影響を与える。(B) 細胞内 TH シグナル伝達系を攪乱し TH 標的遺伝子の発現を変える。しかし、これら 2 つの作用は、同時に両方に作用するのではなく、TTR の化学物質の結合性の強さに依存して、(i) が強

ければ(ii)は弱くなるように作用する。つまり、ラットでは(i)が、ウシガエル幼生では(ii)が TIP や IOX の主な作用機構と思われる。

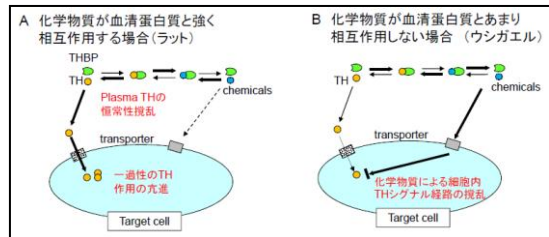


図 5. 甲状腺ホルモン攪乱活性を有するハロゲン化フェノールの作用機構

#### 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 5 件)

① Yamauchi, K., and Sai G. (2011)

Characterization of plasma triiodophenol binding proteins in vertebrates and tissue distribution of triiodophenol in *Rana catesbeiana* tadpoles.

Comp. Biochem. Physiol. C. 153 (3), 328-335.

査読有

② Rahman, F. B., and Yamauchi, K. (2010)

Characterization of iodothyronine sulfotransferase activity in the cytosol of *Rana catesbeiana* tadpole tissues. Gen. Comp.

Endocrinol. 166(2), 396-403. 査読有

③ Yamauchi, K., and Ishihara A. (2009)

Evolutionary changes to transthyretin: developmentally regulated and tissue-specific gene expression. FEBS J. 276(19), 5357-5366.

査読有

④ Ishihara, A., Rahman, F. B., Leelawatwattana,

L., Prapunpoj, P., and Yamauchi, K. (2009) In vitro thyroid hormone-disrupting activity in effluents and surface waters in Thailand. Environ.

Toxicol. Chem. 28(3), 586-594. 査読有

⑤ Eguchi, R., Ishihara, A., and Yamauchi, K.

(2008) Interaction of diethylstilbestrol and ioxynil with transthyretin in chicken serum.

Comp. Biochem. Physiol. C 147 (3), 345-350.

査読有

〔学会発表〕(計7件)

①石原顕紀・蒔田優・山内清志 (2010.11.19) 網羅的遺伝子発現解析による化学物質応答メカニズムの検討. 第35回日本比較内分泌学会大会. (静岡、グランシップ)

②山内清志・秋吉さくら・崔語旻・石原顕紀 (2010.11.19) 血清蛋白質は種特異的に化学物質の甲状腺ホルモン攪乱作用を抑制する. 第35回日本比較内分泌学会大会. (静岡、グランシップ)

③秋吉さくら・江口良二・石原顕紀・山内清志 (2010.9.25) 甲状腺系攪乱化学物質と血清蛋白質の相互作用 日本動物学会第81回大会. (東京・東京大学)

④蒔田優・石原顕紀・山内清志 (2010.9.25) 変態期アフリカツメガエル脳における甲状腺ホルモン作用に及ぼす水酸化PCBの影響 日本動物学会第81回大会. (東京・東京大学)

⑤ラハマン・ファルハナ・山内清志 (2009.9.19) ウシガエルサイトゾルにおけるヨードチロニンスルホトランスフェラーゼ活性の検討 日本動物学会第80回大会. (静岡・グランシップ)

⑥Yamauchi, K. (2008.12.9) TTR and Endocrine disruptors. Symposium Endocrine Disruption, Melbourne, RMIT university, Australia

⑦石原顕紀・山内清志 (2008.9.6) タイ王国環境水中に含まれる甲状腺攪乱活性のバイオアッセイによる検出 日本動物学会第79回大会. (福岡・福岡大学)

〔図書〕(計1件)

Yamauchi, K., and Ishihara A. (2009) TTR and Endocrine Disruptors. In: Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure and Biological Functions (S.J. Richardson and V. Cody eds.), pp. 159-171, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

〔その他〕

講演

①山内清志 (2010.10.2) 静岡大学・読売新聞連続市民講座「未来につなぐ、食と健康」第6回「環境ホルモンの影響」(静岡・ペガサート)

②山内清志 (2009.11.27) 静岡大学サイエンスカフェ 「生物学と環境科学の接点を求めて」(静岡・静岡市立高校)

③Yamauchi, K. (2009.11.25) *In vitro and in vivo* thyroid hormone-disrupting activities of environmental chemicals in *Xenopus laevis*. Germany-Japan Joint Symposium and Graduate Students Forum for the Promotion of the DDP. Pegasart, Shizuoka,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 清志 (YAMAUCHI KIYOSHI)  
静岡大学・理学部・教授  
研究者番号: 50201827

(2) 研究分担者

石原 顕紀 (ISHIHARA AKINORI)  
静岡大学・理学部・助教  
研究者番号: 70432193

(3) 連携研究者

竹内 浩昭 (TAKEUCHI HIROAKI)  
静岡大学・理学部・准教授  
研究者番号: 90216854