

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21681010

研究課題名（和文） 化学物質浄化能を有する水生植物—根圏微生物共生系による新規水質浄化システムの開発

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF NOVEL WATER QUALITY CONSERVATION SYSTEM BY USING SYMBIOSIS BETWEEN AQUATIC PLANTS AND RHIZOBACTERIA

研究代表者

清 和成 (SEI KAZUNARI)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80324177

研究成果の概要（和文）：水生植物—根圏微生物共生系を利用した、各種化学物質汚染水の浄化技術開発に向けた基礎検討を行った。フェノール分解菌を選択的かつ高密度に根圏に集積できるウキクサの根分泌物が、複数種のフェノール性物質から構成されており、暴露される化学物質の種類によって特に微量成分が変化すること、ウキクサやヨシの根圏で、多様な芳香族化合物の分解促進作用が認められたこと、世界初となる 4-*tert*-ブチルフェノール分解菌の分離に成功し、その分解経路と分解促進メカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：The basic investigations on symbiosis between aquatic plants and rhizobacteria were performed to evaluate the possibility of the low-carbon and environmentally-friendly water quality conservation system against aromatic compounds contamination. The root exudate of *Spirodela polyrrhiza*, a duckweed, was revealed to be composed of several phenolic components, and the trace components of the root exudate were varied depending on the chemicals to which *S. polyrrhiza* was exposed. The accelerated degradation of various aromatic compounds were confirmed in the rhizosphere of *Phragmites australis*, a reed, as well as *S. polyrrhiza*. In addition, 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP) degrading bacteria were isolated from their rhizosphere for the first time, and their 4-*t*-BP degradation pathway and mechanism of accelerated 4-*t*-BP degradation could be clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：植生浄化法、水生植物、根圏微生物、微量汚染化学物質

1. 研究開始当初の背景

水生植物を用いた水質浄化法（植生浄化法）は、外部から人為的にエネルギー源や炭素源を供給する必要がないことから、極めて経済的な技術であると同時に、環境適合性を持った省資源・省エネルギーの21世紀型水質浄化・保全技術といえる。実際、経済産業

省が提示している「技術戦略マップ」には、バイオテクノロジー活用による環境対応として環境中有害物質の除去が掲げられており、ここでは、2010年から2025年にかけて、一般環境中の重金属と化学物質等による汚染に対して、植物と微生物を組み合わせた「ハイブリッドバイオレメディエーション

システムの確立と実用化」が謳われている。現状では、植生浄化法は主として窒素やリンなどの栄養塩類の除去を目的として、下排水二次処理水の仕上げ処理や、汚濁河川・湖沼などの直接浄化に用いられているが、近年、水環境を取り巻く新たな汚染としてクロロゾアブアップされている微量化学物質等の難分解性化学物質の分解・除去については、世界を見渡してもほとんど取り組まれてこなかった。研究開始当初、アメリカの企業研究者がアオウキクサとガマの根圏で界面活性剤の分解が促進されたことを報告してはいたが、そのメカニズムは明らかにされていなかった。植物根圏では、植物の光合成によって生成された酸素や、植物の根から分泌される糖、アミノ酸、ビタミンや二次代謝物質などの供給により、微生物が高密度に集積され、活性化されることが知られているが（根圏効果）、これらの一般的な根圏効果では、界面活性剤等の化学物質の分解促進を説明できないことから、本研究で目標とする水生植物と根圏微生物の組み合わせによる汚染水域の合理的かつ効果的な浄化を達成するためには、水生植物と根圏微生物間の相互作用のメカニズムを明らかにしておく必要がある。

一方、研究代表者らはこれまでの研究で、世界中で広く水質浄化に利用されてきた浮遊性植物のウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) やボタンウキクサ (*Pistia stratiotes* L.) などの根圏において、界面活性剤や芳香族化合物の分解が促進されること、芳香族化合物分解能を有する微生物が選択的に集積されていることなどを明らかにしてきた。また、特にフェノール、アニリン、2,4-ジクロロフェノールの3種類の芳香族化合物の分解促進が、物質の種類によって異なることを示すとともに、抽水性植物のヨシ根圏ではフェナンスレンやピレンなどの多感芳香族化合物の分解促進効果が得られることを予備的に明らかにしてきた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、

- ①水生植物—根圏微生物共生系によって分解促進可能な化学物質の体系化：どのような物質で水生植物による分解促進効果が期待できるのか？
- ②水生植物種による化学物質分解促進効果の比較検討：どのような水生植物で化学物質の分解促進作用が期待できるのか？
- ③水生植物根圏における特定微生物の集積作用の解明：なぜ根圏に特定の微生物が選択的に集積されるのか？
- ④水生植物の化学物質暴露に対する応答と根圏微生物へ与える影響の解明：各種化学物質に暴露されることで、水生植物がどのような応答を示し、それが根圏微生物にどのよう

な影響を与えているのか？

の4点を明らかにすることで、水生植物と根圏微生物の組み合わせによる化学物質汚染水域の合理的かつ効果的な浄化手法の確立に向けた基礎的な知見を集積すること、また、これらの知見を活用して、化学物質汚染浄化に資する根圏浄化法の構築のための課題を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ウキクサ根分泌物の解析

滅菌した Hoagland 培養液、あるいはこれにフェノール、4-*tert*-ブチルフェノール (4-*t*-BP) を 5 mg/L となるよう加えた培養液 200 mL に、予め洗浄しておいた無菌ウキクサ 20 株を植え付け、人工気象器内 (28°C, 8000 lux, 16 時間明/8 時間暗) で 3 日間静置培養した。その後、滅菌超純水 200 mL に、それぞれの培養液で培養した無菌ウキクサ 20 株を植え付け、回転振盪 (120 rpm, 3 分間) し、ウキクサの根に付着している根分泌物を洗浄した。続いて、新たな滅菌超純水 50 mL にウキクサ全株を植え付け、人工気象器内で静置 (1 日) した。その後、ウキクサの根に付着している根分泌物を根付着画分、滅菌超純水中に溶解している根分泌物を水溶画分としてそれぞれ回収した。根付着画分は、系内のウキクサ全株の根を切断、回収して試験管に移し、滅菌超純水 50 mL とともに超音波破砕処理 (20 KHz, 5 秒間隔, 3 分) とボルテックス処理 (1 分) を交互に 3 回行った後、Isopore Membrane Filter (孔径 10 μm) を用いて濾過処理を行い、この濾液を根付着画分とした。

回収された根付着画分 25 mL と水溶画分 25 mL を 1:1 の比率で混合し、根分泌物成分液 50 mL とした。1 M 塩酸を用いて pH 3 に調整した後、Oasis HLB カートリッジを用いた固相抽出により濃縮、乾固させ、元の 100 倍濃度になるようにアセトニトリルに転溶後、HPLC を用いて分析、比較した。

また、上記の方法で回収した根付着画分と水溶画分のそれぞれについて、TOC 濃度とフェノール性物質濃度を測定した。フェノール性物質濃度は、4-アミノアンチピリン吸光度法で測定した。

(2) 水生植物—根圏微生物共生系による各種芳香族化合物の分解

国内の河川、湖沼等から採取した環境水に、フェノール、アニリン、2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP)、ノニルフェノール (NP)、ナフタレン、ビスフェノール A (BPA) を 5 mg/L あるいは 10 mg/L となるよう添加し、ウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) を 30 株植栽した系 (系 A)、無菌ウキクサを 30 株植栽した系 (系 B)、30 株のウキクサから回収した根

圏微生物を添加した系（系 C）、環境水のみ
の系（系 D）、フィルター滅菌した環境水に無
菌ウキクサを 30 株植栽した系（系 E）の各実
験系を作成して、それぞれの芳香族化合物の
分解を HPLC 分析によって、経時的に評価し
た。なお、4-*t*-BP（5 mg/L）については、系 A
と系 D による分解実験を実施した。

（3）水生植物根圏の微生物群集解析

各種環境水でウキクサを 1 週間馴致した後、
環境水 10 mL から既報に従って全 DNA を抽
出し、これを水相画分とした。また、ウキク
サを回収して滅菌トリポリリン酸ナトリウ
ム水溶液（5 mg/L）で洗浄した後、根を切除
してこれを（1）に示すように超音波処理、
ボルテックス処理した上でここから DNA を
抽出し、これを根圏画分とした。それぞれの
画分について、16S rRNA 遺伝子を標的とし
た PCR を実施した後、T-RFLP 法によって、
画分ごとの微生物群集構造を比較した。また、
上述の環境水にフェノールを 10 mg/L となる
ように添加した系も同時に作成し、フェノ
ール分解後の各画分の微生物群集構造も同様
に比較した。

（4）水生植物根圏からの 4-*t*-BP 分解菌の分離、特徴づけと 4-*t*-BP 分解メカニズムの推定

（2）の実験において、ウキクサ-根圏微
生物共生系で 4-*t*-BP の分解が認められたこ
とから、この実験系から 4-*t*-BP 分解菌の分離を
試みた。実験系の水サンプル 10 mL に、ウキ
クサ 15 株分の根を切断したものを添加して
超音波破碎に供した後、90 mL の 0.17 mM
4-*t*-BP 含有無機塩培地と混合し
（4-*t*-BP-MSM(0.17 mM)）、300 mL 容の三角フ
ラスコにて、4-*t*-BP 分解菌の集積培養を行っ
た（28°C、120 rpm）。約 1 週間ごとに、集積
培養液の 1% を新鮮な 4-*t*-BP-MSM(0.17 mM) に
植え継ぐ操作を数回繰り返した後、
4-*t*-BP-MSM(0.5 mM) 寒天平板に塗布して 28°C
で培養することにより、コロニーを形成させ
て、その 4-*t*-BP 分解能を 4-*t*-BP-MSM(1.0 mM)
液体培地での菌体増殖と HPLC による 4-*t*-BP
濃度測定によって確認した。得られた 4-*t*-BP
分解菌は、Cowan と Steel の一次鑑別表レ
ベルでの特徴づけと 16S rRNA 遺伝子配列に基
づいた系統分類を実施するとともに、
4-*t*-BP-MSM(1.0 mM) 液体培地による 4-*t*-BP の
分解過程での中間代謝物測定（GC/MS）を通
じて、4-*t*-BP 分解メカニズムを推定した。

（5）ウキクサ根分泌物による 4-*t*-BP 分解促進作用の評価

ウキクサを植栽することによって、多様な
芳香族化合物の分解が促進され、根分泌物が
その鍵を握っていることが推測されたこと
から、特にこれまでに生物分解の報告がなく、

水生植物-根圏微生物共生系の効果が確認
された 4-*t*-BP に焦点をあて、根分泌物が
4-*t*-BP 分解菌に与える影響を評価した。（1）
で作成したウキクサ根分泌物について、TOC
の終濃度が 100 mg/L となるように
4-*t*-BP-MSM(0.5, 1.5, 2.0 mM) 液体培地に添加
した系と非添加の系を 50 mL 容のバイアル瓶
中に全量が 20 mL となるようそれぞれ作成し、
ここに 4-*t*-BP 分解菌を OD₆₀₀ = 0.02 となるよ
う添加して、各系の 4-*t*-BP 濃度を経時的に測
定することによって、ウキクサ根分泌物が
4-*t*-BP 分解に与える効果を評価した。

4. 研究成果

（1）ウキクサ根分泌物の解析

化学物質に曝露していないウキクサから
回収した根分泌物の HPLC クロマトグラムに
は 3 つの主要なピークが確認された。フェノ
ールおよび 4-*t*-BP に曝露したウキクサの根分
泌物にもこれらのピークは共通して主要な
ピークとして確認され、ウキクサの根分泌物
の主要成分は、化学物質に曝露しても大きく
変化しないことが示された。一方で、フェノ
ールおよび 4-*t*-BP に曝露したものでは、さら
に 3 つの小さなピークが確認され、化学物質
への曝露によって根分泌物の微量成分が変
化することが示された。

根分泌物の TOC 濃度は、化学物質に曝露
していない場合に比べ、フェノールおよび
4-*t*-BP に曝露した場合には、約 1.4 倍に増加
していた。また、水溶画分と根付着画分の分
配比は、フェノールおよび 4-*t*-BP に曝露した
場合、いずれも根付着画分では大きな差は認
められなかったのに対し、水溶画分が 2.5 倍
以上に増えており、化学物質に曝露すること
によって水溶性の高い成分が根分泌物とし
て放出されたものと考えられる。一方、根分
泌物中のフェノール性物質に着目してみると、
化学物質への曝露の有無に関係なく、い
ずれの場合も根付着画分が水溶性画分より
多いことが示された。なお、化学物質に曝露
していない場合、その比が約 2 倍であったが、
フェノールに曝露した場合には約 1.8 倍、
4-*t*-BP に曝露した場合には約 1.4 倍であり、
フェノール性物質についても、化学物質に曝
露することで、水溶性成分の分泌が増加す
ることが示された。

（2）水生植物-根圏微生物共生系による各種芳香族化合物の分解

研究の方法に記載した 7 種類の芳香族化
合物のうち、BPA を除く 6 種について、ウキク
サ植栽による分解促進効果が確認された。こ
のうち、フェノールについては根圏微生物が、
アニリンについてはウキクサの根圏微生物
活性化作用が、2,4-DCP についてはウキクサ

自身による分解除去作用が、NP についてはウキクサへの吸着作用がそれぞれ大きく影響していることが示唆された。なお、ナフタレンについては、一部の実験系を喪失したため、メカニズム解明には至らなかった。ここで、4-*t*-BP について、これまでに世界でも報告がなかった生分解を確認することができ、水生植物-根圏微生物を利用することによって、これまでに対応できなかった化学物質の分解による水質浄化の可能性が示されたものと考えられた。

(3) 水生植物根圏の微生物群集解析

微生物群集を T-RFLP にて比較した結果を主成分分析 (Principal Component Analysis : PCA) に供した結果を図 1 に示す。

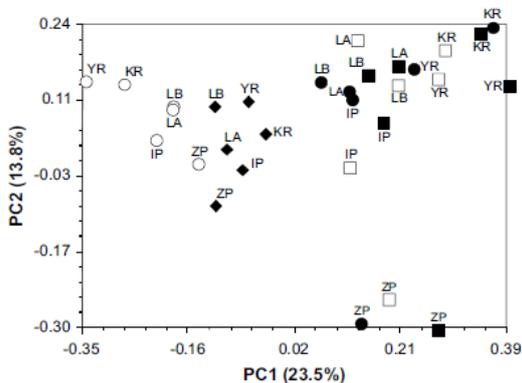


図 1 6 種類の環境水中の微生物群集 (○)、6 種類の環境水で栽培したウキクサ根圏微生物群集 (□)、ウキクサ植生系のフェノール分解後の水相画分の微生物群集 (●)、根圏画分の微生物群集 (■)、およびウキクサ非植生系のフェノール分解後の水相画分の微生物群集 (◆) の PCA 分析結果 (記号は採水地略称)

図 1 から明らかなように、水相画分の微生物群集 (○) とウキクサ根圏画分の微生物群集 (□) は、主成分 1 で明確に分画された。これより、ウキクサの根圏には、周囲の環境水中とは異なる微生物が選択的に集積されていることが分かる。また、ウキクサ植生系では、フェノール分解後の水相画分の微生物群集 (●) は、もともとのウキクサ根圏画分の微生物群集 (□) に近いものとなった一方、ウキクサ非植生系の場合は、同様のフェノール分解後の微生物群集 (◆) はもともとの環境水中の微生物群集 (○) に近いものとなった。さらに、フェノール分解前後のウキクサ根圏画分の微生物群集 (□、■) は大きく変化しなかったことから、ウキクサの存在により、その根圏に選択的に集積された根圏微生物がフェノール分解に大きく寄与していること、その理由の一つとして、ウキクサの根分泌物にフェノール性物質が豊富に含まれて

いることが考えられた。

(4) 水生植物根圏からの 4-*t*-BP 分解菌の分離、特徴づけと 4-*t*-BP 分解促進メカニズムの推定

4-*t*-BP の有意な分解が確認できた集積系の培養液をプレーティングした結果、1 種類の微生物コロニーを得ることができた。この微生物株について、4-*t*-BP-MSM(1.0 mM) 平板培地で数回培養を繰り返した後、純化されたことを確認し、OMI 株と命名した。OMI 株は、16S rRNA 遺伝子配列の相同性から *Sphingobium fuliginis* と同定された。OMI 株は増殖を伴いながら 1 mM (150 mg/L) までの 4-*t*-BP であればほぼ 18 時間以内に検出限界以下まで分解する能力を有しており、1.5 mM (225 mg/L) の 4-*t*-BP では、36 時間程度のラグ期の後、約 18 時間で検出限界以下まで分解できることが明らかとなった (図 2)。

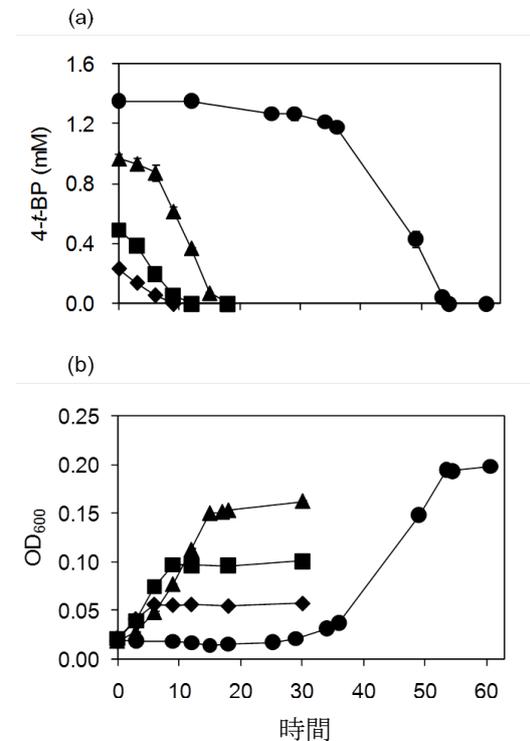


図 2 *Sphingobium fuliginis* OMI 株による 4-*t*-BP の分解 (a)、とそれに伴う菌体増殖の経時変化 (b)

OMI 株による 4-*t*-BP 分解経路を確認するために、GC-MS で 4-*t*-BP の中間代謝物を分析したところ、4-*t*-BP は 4-*t*-ブチルカテコール (4-*t*-BC) へと酸化された後、メタ位で環開裂を受けて無機化されているものと推定された (図 3)。4-*n*-BP のような、アルファ第 2 級炭素を有する中鎖のアルキル基からなるアルキルフェノール (APs) では、多くの場合 *Pseudomonas* 属微生物によって芳香環のメタ開裂経路を経て分解されることが報告さ

れており、4-ノニルフェノール (4-NP) のような、アルファ第4級炭素を有する長鎖のアルキル基からなる APs の場合、*Sphingomonas* 属類縁微生物によって、*ipso* 置換反応を経て分解されることが報告されている。これに対して、今回我々が分離した OMI 株は TIK 株とともに *Sphingomonas* 属に類縁でありながら、アルファ第2級炭素を有する中鎖のアルキル基からなる4-*t*-BP をメタ開裂経路を経て分解するという極めて興味深い特徴を有することが示された。

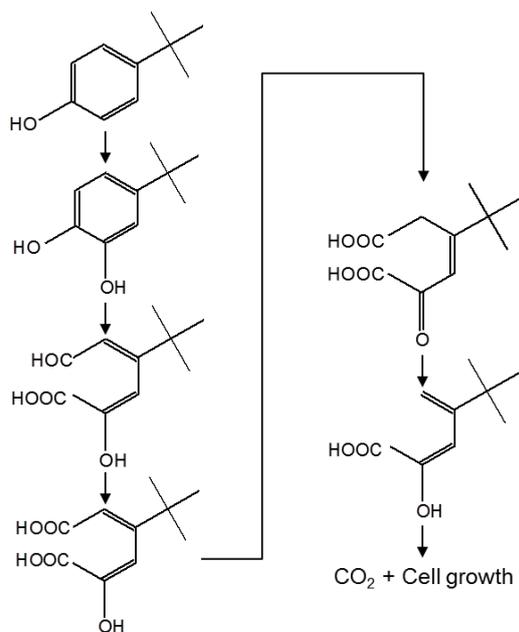


図3 *S. fuliginis* OMI 株による 4-*t*-BP の推定代謝経路

(5) ウキクサ根分泌物による 4-*t*-BP 分解促進作用の評価

4-*t*-BP が 0.5 mM の場合では、ウキクサ根分泌物の添加の有無に関わらず、すべての実験系において、ラグ期を生じることなく 4-*t*-BP を分解し、根分泌物の影響は認められなかった。OMI 株の増殖については、根分泌物非添加系は約 10h 後には定常となったのに対し、根分泌物添加系では、約 15h まで増殖し、その後定常となった。また、根分泌物添加系の方が非添加系よりも最終菌体濃度が高くなった。4-*t*-BP を 1.5 mM とすると、根分泌物添加系では非添加系に比べて、4-*t*-BP 分解ならびに菌体増殖開始までのラグ期が短くなり、最終菌体濃度も高くなった。また、4-*t*-BP に曝露したウキクサの根分泌物を添加した系では、4-*t*-BP に曝露していないウキクサの根分泌物を添加した系よりも、より分解促進効果が大きくなることが確認された。

4-*t*-BP の濃度を 2 mM とすると、根分泌物の添加効果が顕著に確認された。非添加系では、120 時間後においても約 65% (1.3mM) の 4-*t*-BP が残存し、OMI 株の増殖も小さいも

のとなった。一方、根分泌物添加系では、約 40 時間のラグの後、64 時間以内に 4-*t*-BP が完全に分解された。ここで、4-*t*-BP の分解に伴う菌体の増殖は 4-*t*-BP に曝露したウキクサの根分泌物を添加した系の方が大きくなり、その差は 1.5 mM の 4-*t*-BP を分解した際に比べて大きなものとなった。このように、4-*t*-BP が 0.5 mM 程度の低濃度の場合では、ウキクサの根分泌物の添加による影響は明確に認められなかったのに対し、4-*t*-BP の濃度が 1.5 mM あるいは 2 mM と高濃度になるに従って、その分解と菌体の増殖を促進する効果が明確に確認できたことから、ウキクサ根分泌物は特に 4-*t*-BP が高濃度の際に、OMI 株による分解ならびに増殖の阻害を緩和する効果があることが示唆された。

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 9 件)

- ① Toyama T., Murashita M., Kobayashi K., Kikuchi S., Sei K., Tanaka Y., Ike M., Mori K. (2011) Acceleration of nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria. *Environmental Science & Technology*, **45**(15), 6524-6530. 査読有.
- ② Toyama T., Furukawa T., Maeda N., Inoue D., Sei K., Mori K., Kikuchi S., Ike M. (2011) Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudate interactions. *Water Research*, **45**(4), 1629-1638. 査読有.
- ③ Toyama T., Momotani N., Ogata Y., Miyamori Y., Inoue D., Sei K., Mori K., Kikuchi S., Ike M. (2010) Isolation and characterization of 4-*tert*-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(20), 6733-6740. 査読有.
- ④ Hoang H., Yu N., Toyama T., Inoue D., Sei K., Ike M. (2010) Accelerated degradation of a variety of aromatic compounds by *Spirodela polyrrhiza*-bacterial associations and contribution of root exudates released from *S. polyrrhiza*. *Journal of Environmental Sciences*, **22**(4), 494-499. 査読有.
- ⑤ 池道彦, 井上大介, 遠山忠, 松永祐紀, 桃谷尚憲, Hoang H., 清和成, 惣田訓. (2009) ウキクサ根圏におけるノニルフェノールの微生物分解—分解菌の分離とその特徴—. *環境技術*, **38**(9), 633-641. 査読有.
- ⑥ Toyama T., Sei K., Yu N., Kumada H., Inoue

D., Hoang H., Soda S., Chang Y.-C., Kikuchi S., Fujita M., Ike M. (2009) Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: a mechanism of accelerated biodegradation of phenol. *Water Research*, **43(15)**, 3765-3776. 査読有.

〔学会発表〕(計18件)

- ① Toyama T., Sei K., Tanaka Y., Ike M., Mori K.: Accelerated degradation of nonylphenol in sediment by interactions between *Phragmites australis* and rhizosphere bacteria. *The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*. 2011年10月4日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
- ② Ogata Y., Goda S., Sei K., Toyama T., Ike M.: Novel pathway of bisphenol-A transformation by *Sphingobium fuliginis* strains capable of degrading 4-*tert*-butylphenol. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*. 2011年9月9日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- ③ 王璇、尾形有香、井上大介、清和成、惣田訓、池道彦、遠山忠: ウキクサ根分泌物による根圏微生物の芳香族化合物分解の促進効果の検証. 日本水処理生物学会第47回大会. 2010年11月18日, 筑波大学大学会館(茨城県つくば市)
- ④ 尾形有香、井上大介、遠山忠、清和成、惣田訓、池道彦: ウキクサ根圏より分離した4-*tert*-ブチルフェノール分解菌の分解特性. 第62回日本生物工学会大会. 2010年10月29日, ワールドコンベンションセンターサミット フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県宮崎市)
- ⑤ Sei K., Yu N., Toyama T., Inoue D., Soda S., Ike M.: Enhancement of biodegradation potential of various aromatic compounds by sequencing batch experiments using *Spirodela polyrrhiza*-bacterial associations. 2009年12月1日, Massey University (ニュージーランド・パーマストンノース市)
- ⑥ 清和成、桃谷尚憲、ホアン・ハイ、井上大介、遠山忠、池道彦: ウキクサ根圏より分離した4-*n*-ブチルフェノール分解菌の特徴づけ. 第61回日本生物工学会大会. 2009年9月24日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計1件)

- ① 清和成、池道彦. シーエムシー出版. 植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術—地球を救う超環境適合・自然調和型システム—. 2011年. pp151-159, 222-230.

6. 研究組織

(1)研究代表者

清 和成 (SEI KAZUNARI)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 80324177