

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460597

研究課題名(和文)生物由来界面活性剤の粘膜アジュバント効果に関する研究

研究課題名(英文)Study of biosurfactants as mucosal adjuvant

研究代表者

吉野 直人 (Yoshino, Naoto)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Bacillus subtilis*が産生するサーファクチンに粘膜アジュバント作用があることを明らかにした。マウスに抗原として卵白アルブミン(OVA)とサーファクチンを経鼻免疫したところ、血漿中および粘膜分泌液中でのOVA特異抗体価が増強された。サーファクチンのアジュバント活性には肥満細胞の活性化が関与していた。その効果は臨界ミセル濃度以上で投与することが必要であった。本研究はサーファクチンのアジュバント効果を発見したのみならず、アジュバント効果と臨界ミセル濃度との関連を示し、「投与量と効果」ではなく「投与濃度と効果」という独創的な知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Surfactin (SF) is a potent biosurfactant isolated from *Bacillus subtilis*. Following intranasal immunization with ovalbumin (OVA) with or without SF, we observed increased levels of OVA-specific antibodies in mucosal secretions and plasma. SF activated mast cells, which subsequently released chemical mediators and upregulated cytokine mRNA. Further, by increasing of SF concentration in SF-OVA-saline system, critical micellar concentration (cmc) was observed. These suggested that SF-OVA complexes were formed. When mice were intranasally immunized with OVA plus SF of which concentration was above cmc, significantly enhanced immune responses evoked in both mucosal and systemic compartments as compared OVA alone. At above cmc, the particle diameter of SF-OVA complex were larger than that of OVA. Thus, our study demonstrated that the adjuvanticity of SF was conferred by additive or synergistic effects on mast cell activation and enlarged particle sizes.

研究分野：免疫学

キーワード：アジュバント 粘膜免疫 ワクチン 界面活性剤

1. 研究開始当初の背景

多くの病原体は、口腔、鼻腔、消化管、気管、泌尿生殖器などの粘膜面を介して感染していく。これら粘膜組織には、全身性の免疫機構とは異なる特徴を有した免疫系（粘膜免疫）が存在する。言うなれば、粘膜免疫は病原体の侵入門戸であると同時に生体防御の最前線を担っている。粘膜面の防御免疫能を高めることは病原体の侵入を水際で防ぐことになり、近年粘膜ワクチン開発のための研究が世界的に盛んに行われるようになった。

粘膜に効果的な防御免疫を誘導するためにはワクチン抗原とともに粘膜アジュバントを接種する必要がある。アジュバントの歴史は1926年のアラムの発見にまで遡る。2016年現在、国内外でアジュバントはアラムを含めて4種類がヒトに使用されている。アラムは注射型ワクチンでは有効なアジュバントであるが経粘膜接種を行っても粘膜免疫を増強することは出来ず、粘膜ワクチン開発のため粘膜アジュバント作用を有する新規アジュバントの研究が世界的に行われている。コレラ毒素などのエンテロトキシンは、有効な粘膜アジュバントとして研究され臨床試験は最も先行していた。しかし、2004年に天然型トキシンで、2009年に弱毒化変異型トキシンとともに顔面神経麻痺といった重篤な副反応が報告され開発中止となった。粘膜アジュバントの開発は国内外で多くの研究がなされているが、製品化に至ったものは開発されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、界面活性剤に着目した新規粘膜アジュバントの基礎研究である。これまでの研究で界面活性作用を有するポリミキシンと抗原を経鼻免疫することにより、血漿中および粘膜分泌液中に抗原特異的抗体が誘導されることを示した。また、ポリミキシンは親水性の環状ペプチドと疎水性の炭素鎖を持ち、炭素鎖を切断したペプチドのみではアジュバント効果が著しく低下することを明らかにしている。本研究では、微生物由来界面活性剤の中で最も界面活性が高い物質の1つで *Bacillus subtilis* が産生するサーファクチン (Fig. 1) の粘膜アジュバント効果を評価することを目的とした。

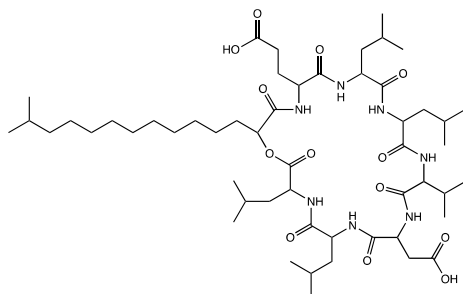


Fig. 1 サーファクチンの化学構造

3. 研究の方法

動物実験は、岩手医科大学動物実験委員会の承認後動物実験規定を遵守して実施した。マウスは、飼育室の環境に馴化させるために、特定病原体除去下で7日間の飼育後に実験を開始した。人道的エンドポイントとして、被毛の汚れ、立毛、異常姿勢、うずくまり姿勢などの外観が見られた場合と設定し、動物福祉に配慮した動物実験を行った。

1) 経鼻免疫

本研究では将来的な界面活性剤アジュバントの初期研究であり、界面活性剤による粘膜免疫誘導の基礎的知見を得るためのものである。そのため、マウスを用いた基礎検討では抗原として繁用されている卵白アルブミン (OVA) を用いることとした。

5週齢の雌の C57BL/6Njcl マウスを用いた。ケタミンを腹腔内投与して浅麻酔を行った後、様々な濃度のサーファクチンと 100 μ g の OVA を混合した溶液を片鼻 2.5 μ l ずつ (計 5 μ l) 投与した。経鼻投与は常法に従い窒息を回避するため、5分の投与間隔を設けた。免疫スケジュールは多くの研究で用いられているもので、1週間間隔で合計3回経鼻免疫を行った。

2) 免疫応答に関して

血中及び粘膜分泌液で特異抗体を測定し、また粘膜関連組織における特異抗体産生細胞数を計測することにより界面活性剤アジュバントの液性免疫を評価した。

3) 作用機序に関して

肥満細胞欠損マウス (*WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl}/Slc*) を用い、動物レベルで評価した。

培養細胞を用い、*in vitro* において界面活性剤の作用を分子レベルで解析した。

4) 臨界ミセル濃度とアジュバント作用に関して

表面張力を毛管上昇方式表面張力計で測定し、臨界ミセル濃度を求めた。

5) 安全性に関して

免疫増強による副反応を検討するため、血中 IgE 抗体量の測定を行った。

4. 研究成果

マウスを用いて経鼻免疫を行い、最終免疫から1週で糞便抽出液中の OVA 特異的 IgA 抗体は、サーファクチンの投与量が 0.005 μ g/mouse では8匹中2匹で検出され、用量依存的に抗体価の上昇が認められた。また、鼻腔洗浄液と唾液における OVA 特異的 IgA 抗体は、それぞれ 0.5 μ g/mouse、0.05 μ g/mouse で検出され、これらも用量依存的に抗体価の上昇が見られた。腔洗浄液は4匹のマウスより同体積の腔洗浄液を集め、一つの検体にしたものを使用したが、500 μ g/mouse のサーファクチン投与量で OVA 単独群に比べ有意 ($p < 0.005$) に高い抗体価が得られた。血漿中の OVA 特異的 IgA 抗体は、OVA 単独群では糞便抽出液、鼻腔洗浄液、唾液と同様に検出限

界未満であったが、サーファクチンの添加により OVA 特異的 IgA 抗体が検出された。血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は 5 μ g/mouse の投与量までは上昇が見られたが、5 μ g/mouse から 500 μ g/mouse の投与量では抗体価は横ばいだった (Fig. 2)。

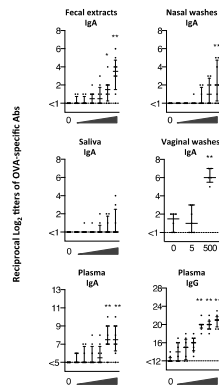


Fig. 2 粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的抗体価

実際に粘膜組織に OVA 特異的抗体産生細胞が誘導されているか確認するため、各組織における OVA 特異的抗体産生細胞数を測定した。粘膜関連組織 (n-LP、NALT、i-LP、MLNs、SMGs、SMLNs) および脾臓では、OVA 特異的抗体産生細胞が OVA とサーファクチンの併用で経鼻免疫したマウスで誘導されていた。特に、経鼻免疫での誘導組織である NALT やその所属リンパ組織である SMLNs、および実行組織である n-LP と i-LP、全身免疫に関わる組織の脾臓で OVA 単独群と比べ有意に OVA 特異的抗体産生細胞数が高かった。また、糞便抽出液や鼻腔洗浄液では、OVA 特異的 IgA 抗体価は用量依存的に推移しており、OVA 特異的 IgA 抗体産生細胞数も 5 μ g/mouse 群に比べ 500 μ g/mouse 群では有意に高かった。一方、血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は 5 μ g/mouse 群と 500 μ g/mouse 群ではほぼ同等であり、脾臓における OVA 特異的 IgG 抗体産生細胞数にも有意差は認められなかった (Fig. 3)。

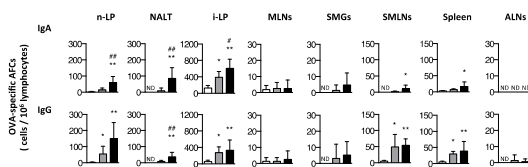


Fig. 3 OVA 特異的抗体産生細胞数 (n-LP; 鼻腔粘膜固有層, NALT; 鼻咽頭関連リンパ組織, i-LP; 小腸粘膜固有層, MLNs; 腸管膜リンパ節, SMGs; 唾液腺, SMLNs; 下顎リンパ節, SP; 脾臓, ALNs; 腋窩リンパ節)

上述のように、アジュバント候補物質であ

るサーファクチンと抗原として OVA をマウスに経鼻投与した結果、OVA 特異的 IgA 抗体価や血漿中の OVA 特異的 IgG および IgA 抗体価の上昇が認められた。また、粘膜関連組織および脾臓において OVA 特異的抗体産生細胞は誘導された。粘膜免疫は接種部位の粘膜組織のみならず遠隔の粘膜組織にも特異免疫を誘導出来ることが知られているが、本研究においても鼻腔粘膜のみならず、腸管や唾液腺あるいは腔粘膜にも抗体産生細胞が誘導されていた。以上より、サーファクチンはアジュバントとして経鼻免疫することで、抗原特異的な粘膜免疫および全身免疫応答を高めることが明らかになった。これらの知見から、サーファクチン添加経鼻ワクチンが呼吸器感染症のみならず、腸管感染症や性行為感染症に対するワクチンを開発できる可能性があることが示唆された。

血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は、サーファクチンの投与量が 5 μ g/mouse では $2^{19.9 \pm 1.1}$ で、500 μ g/mouse では $2^{20.8 \pm 1.4}$ でほぼ同等となった。これは、脾臓における OVA 特異的 IgG 抗体産生細胞数も 5 μ g/mouse 群と 500 μ g/mouse 群で有意差は認められなかったことから裏付けられるが、何故サーファクチンの用量依存的に抗体価が上昇しなかったのかは本研究では明らかになっていない。マウスの抗体産生能力の限界が考えられるが、コレラ毒素と OVA で同様に経鼻免疫した同系マウスにおいて、血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は $2^{24.3 \pm 2.5}$ (範囲: 2^{22} - 2^{29}) であった。即ち、動物としての抗体産生の限界ではなく他の機序が存在するものと思われる。

Bacillus 属の産生するポリミキシン B には粘膜アジュバント活性があることが先行研究で明らかになっている。サーファクチンの 500 μ g/mouse 群とポリミキシン B の 500 μ g/mouse 群を比較すると、血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価はそれぞれ $2^{20.9 \pm 1.4}$ と $2^{21.1 \pm 1.6}$ であり有意差は存在しなかったが、サーファクチンの 5 μ g/mouse 群と PMB の 5 μ g/mouse 群を比較すると、IgG 抗体価はそれぞれ $2^{19.9 \pm 1.1}$ と $2^{13.9 \pm 2.6}$ であり有意にサーファクチン群の方が抗体値は高かった ($p < 0.0005$)。サーファクチンナトリウムの分子量は 1,058.33 g/mol であり、ポリミキシン B 硫酸塩の平均分子量は 1,301.56 g/mol である。投与モル数はサーファクチンで 4.7nmol/mouse、ポリミキシン B で 3.8nmol/mouse となる。投与モル数はサーファクチンの方がわずかに多いが、抗体価で 64 倍の差が生じるとは考えにくい。両者の化学構造は疎水基と親水基をもち界面活性作用を有する構造であるが、ポリミキシン B1 の疎水基である炭素直鎖は 7 つの炭素原子であるのに対しサーファクチンでは 12 個の炭素原子から炭素直鎖が出来ている。これらの違いは界面活性に大きな差をもたらすことが予想され、本研究では界面化学的解析も行った (後述)。

サーファクチンの作用機序を検討するため、肥満細胞に対するサーファクチンの作用を検討した。まず、サーファクチンによる脱顆粒反応を確認するために β -hexosaminidase 放出試験を *in vitro* で行った。その結果、サーファクチンの濃度依存的に β -hexosaminidase の上昇が認められ、肥満細胞からの脱顆粒反応が確認された。さらに、肥満細胞が放出するケミカルメディエーターであるヒスタミン、 LTB_4 、 PGD_2 の培養上清中の濃度を測定したところ、いずれもサーファクチンの濃度依存的に検出された (Fig. 4)。図中の破線は、サーファクチン未刺激での MC9 培養上清中の各ケミカルメディエーターの濃度である。

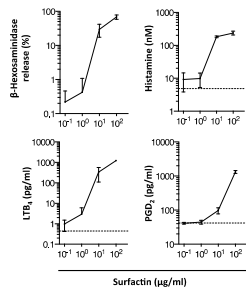


Fig. 4 MC9 からの β -hexosaminidase およびケミカルメディエーターの放出

肥満細胞と他の免疫細胞の関係性を確認するため、肥満細胞が産生し獲得免疫の増強に与える TNF- α 、IL-4、CCL5 の遺伝子発現レベルを測定した。すべてのサイトカイン遺伝子は、未刺激細胞に比べて 10-3mg/ml 濃度のサーファクチン処理を行った細胞で有意に高い発現を示した。また、サーファクチン処理による TNF- α 遺伝子の発現量は濃度依存性を示し、10-4mg/ml 濃度のサーファクチン処理に比べ 10-3mg/ml 濃度のサーファクチン処理では、IL-4 および CCL5 遺伝子が有意差はないが高い発現を示した (Fig. 5)。

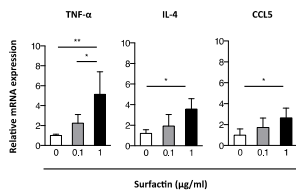


Fig. 5 MC9 からのサイトカインの放出

MC9 を用いた *in vitro* の解析でサーファクチンに肥満細胞活性化作用が認められたため、肥満細胞欠損マウスを用い、動物レベルでサーファクチンの作用機序を検討した。OVA 特異的抗体価を測定したところ、血漿中 IgG 抗体、糞便抽出液、鼻腔洗浄液、唾液中

IgA 抗体いずれも有意に肥満細胞欠損マウスで低かった (Fig. 6)。

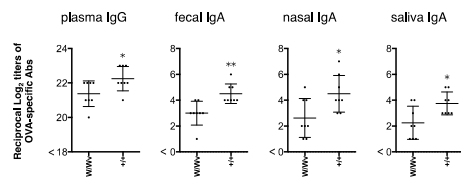


Fig. 6 肥満細胞欠損マウスでの粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的抗体価

サーファクチンの作用機序を検討したところ、サーファクチンは自然免疫に与える肥満細胞を活性化、脱顆粒させることが明らかになった。*In vitro* の検討では、培養上清中にヒスタミンが検出された。肥満細胞から脱顆粒により放出されるヒスタミンは、樹状細胞に作用すると、樹状細胞の分化成熟、抗原取り込みの促進、未熟樹状細胞に対する細胞遊走、MHC class II や共刺激分子の発現増強を行う。一方、T 細胞に対してはナイーブ T 細胞を Th2 型細胞へ分化させる作用をもつ。さらに、サーファクチンの刺激で肥満細胞から LTB_4 や PGD_2 が放出されることが確認された。これらのケミカルメディエーターは、好中球、単球、好酸球を遊走させ局所における自然免疫を活性化させる。本研究では、サーファクチン刺激による肥満細胞でのサイトカイン遺伝子の発現も解析し、検討した TNF- α 、IL-4、CCL5 のいずれでも遺伝子発現は上昇していた。TNF- α は樹状細胞の遊走や活性化に作用し、IL-4 はマクロファージに作用し、活性化および細胞内細菌能を増強させる効果がある。一方、ケモカインである CCL5 は T 細胞の局所への遊走に与える。以上より、サーファクチンによって活性化された肥満細胞から産生されたケミカルメディエーターやサイトカインが、自然免疫細胞やリンパ球に作用することでアジュバント作用が発現しているものと考えられた。

ワクチンアジュバントの副反応の検討として、血中総 IgE 抗体量の測定を行った。最終免疫後第 1 週で血漿中の総 IgE 抗体の濃度を測定したところ、サーファクチンの投与量が 500 μ g/mouse の群で 76.9ng/ml、5 μ g/mouse の群で 78.5ng/ml であった。OVA 単独接種群での総 IgE 抗体濃度は 68.3ng/ml で、サーファクチンによる有意な IgE 抗体の上昇は認められなかった。一方、強力な粘膜アジュバントであるコレラ毒素 (投与量 0.5 μ g/mouse) と OVA で経鼻免疫したところ、総 IgE 抗体濃度は 1,165.2 ng/ml であった。

サーファクチンは粘膜吸収性の低い物質であり、マウスの LD₅₀ は静脈投与により 5.40mg/kg であるのに対して、経口投与では >500mg/kg である。本研究で用いたサーファクチンの最大投与量は 500 μ g/mouse であり、

マウス一匹あたりの体重を約 20g として計算すると 25mg/kg に相当する。500 μ g/mouse 群と 5 μ g/mouse 群での血漿中 IgG 抗体価がほぼ同じことから、5 μ g/mouse の投与量で計算すると、経口投与時 LD₅₀ と比べて約 1/2,000 以下の投与量である。ワクチンの副反応としての IgE 抗体へのクラススイッチやそれによるアナフィラキシーショックを考慮しなければならない。サーファクチン投与群のマウスでは血漿中の総 IgE 抗体価の顕著な上昇は見られず、コレラ毒素のような粘膜アジュバントと比べて安全性の高い候補アジュバントであると考えられる。

サーファクチンは代表的な微生物由来界面活性剤であるため、界面活性の指標となる臨界ミセル濃度を測定した。サーファクチン-OVA-生理食塩水系での臨界ミセル濃度は 0.328 mg/ml だった (Fig. 7)。

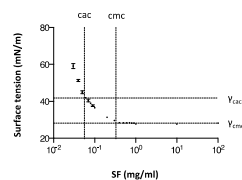


Fig. 7 サーファクチン-OVA-生理食塩水系での表面張力

マウスへの経鼻免疫でアジュバント効果が見られたのはサーファクチンの投与量が 5 μ g/mouse 以上であった。このときの経鼻接種溶液のサーファクチンの濃度は 1 mg/ml で臨界ミセル濃度よりも高かった。臨界ミセル濃度がサーファクチンのアジュバント活性に関わるのか Fig. 8A の 3 つの免疫レジメを用いて検討した。その結果、マウスへのサーファクチンの投与量が同一でも、投与時の接種溶液が臨界ミセル濃度以下の場合、OVA 特異的抗体価は臨界ミセル濃度以上での接種に比較して有意に低かった (Fig. 8B)。

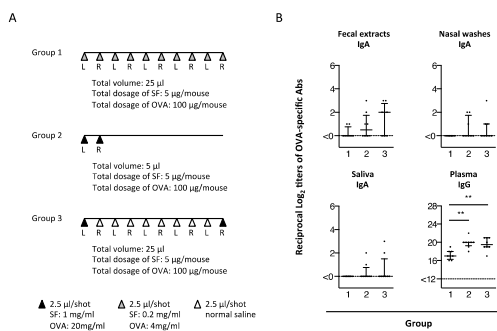


Fig. 8 臨界ミセル濃度とアジュバント活性

本研究はサーファクチンのアジュバント効果を見出したのみならず、アジュバント効果と臨界ミセル濃度との関連を示し、これま

での医薬品で考えられるような「投与量と効果」ではなく「投与濃度と効果」という独創的な知見をもたらした。

界面活性剤はタンパク質と複合体を形成するため、サーファクチン-OVA-生理食塩水系での粒子径を測定した。臨界ミセル濃度以上では OVA-サーファクチン複合体を形成し、100 mg/ml のサーファクチン濃度では約 200 nm の複合体が存在した。一方、OVA のみの溶液中の粒子の直径は約 30 nm で有意にサーファクチンにより粒子径が増大していた。Fig. 8A の Group 1 の条件では粒子径は 30 nm であつた (Table 1)。

SF (mg/ml)	OVA (mg/ml)	Mean peak diameter ¹ (nm)	Range ² (nm)	Intensity (%)	pH
100	20	195.1 ± 19.6	122.4 - 255.0	86.6 ± 1.7	6.9
1	20	57.7 ± 0.9	43.8 - 68.1	98.3 ± 2.9	6.6
0.2	4	29.2 ± 5.5	15.7 - 37.8	100.0	6.6
100	0	7.3 ± 0.7	4.2 - 15.7	91.8 ± 9.5	7.0
0	20	30.3 ± 8.8	24.4 - 43.8	7.1 ± 8.6	6.6

¹ The values of peak diameter are shown as the mean ± SD from 3-5 independent experiments.
² The ranges are shown as the minimum and maximum diameter of all experiments in each concentration.

Table 1 サーファクチン-OVA-生理食塩水系での粒子径

複合体は臨界ミセル濃度以上で形成されると考えられ、さらに抗体応答には 100-500 nm の粒子サイズが適しているとされる。そのため、100 mg/ml のサーファクチン濃度での経鼻免疫でサーファクチンのアジュバント効果が得られたと考えられた。

不活化ワクチンは、アジュバントの併用により免疫応答を増強することで生体に安全且つ効果的な防御免疫を誘導する手段として感染症防御に有用であると考えられる。粘膜ワクチンとしては、ポリオウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルスに対するワクチンが既に開発されているが、これらはいずれも弱毒生ワクチンである。弱毒生ワクチンは不活化ワクチンより効率的に免疫誘導をすることがわかっているが、ワクチン株の二次感染や強毒性変異など安全面では不活化ワクチンには劣る。即ち、より安全な不活化ワクチンをいかにしてより効率的に免疫を誘導するかが今後のワクチン開発の課題である。今回、候補アジュバントとしてサーファクチンを用いた研究で、自然免疫の活性化と特異抗体の産生増強を証明し、IgE 抗体産生も低値であることを動物レベルで確認した。以上より、安全で効果的な新規粘膜ワクチンとしてサーファクチンの可能性が示された。

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 2 件)

1. 竹下亮輔、吉野直人、佐々木裕、松川直美、利部正裕、佐藤成大、杉山徹：経鼻免疫によるサーファクチンのアジュバント効果の検討．岩手医学雑誌 66(1), 23-35, 2014. 査読あり
2. Yoshino N, Endo M, Kanno H, Matsukawa N, Tsutsumi R, Takeshita R, Sato S. Polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses in mice. PLoS One. 2013 11;8(4):e61643. 査読あり DOI: 10.1371/journal.pone.0061643

〔学会発表〕(計7件)

1. 川村花恵、吉野直人、佐々木裕、利部正裕、杉山徹、村木靖：粘膜アジュバント作用を有する界面活性剤の最適化学構造の網羅的探索 .第9回次世代アジュバント研究会 (2016.1 大阪)
2. 川村花恵、吉野直人、佐々木裕、杉山育美、佐塚泰之、利部正裕、杉山徹、村木靖 .糖型非イオン性界面活性剤の粘膜アジュバントとしての効果の検討 . 第19回日本ワクチン学会 (2015.11 犬山)
3. 川村花恵、吉野直人、佐々木裕、利部正裕、杉山徹、村木靖 .界面活性剤の分子構造と粘膜アジュバント効果の検討 .第69回日本細菌学会東北支部会 (2015.8 郡山)
4. 川村花恵、吉野直人、村上一行、佐々木裕、杉山育美、佐塚泰之、利部正裕、村木靖、杉山徹 .粘膜免疫を増強する界面活性剤型アジュバントの研究 . 第656回岩手医学会 (2015.3 盛岡)
5. 竹下亮輔、吉野直人、佐々木裕、杉山育美、佐藤成大：マウス経鼻免疫に粘膜ワクチンアジュバントとしてサーファクチンを用いた効果および作用機序の検討 . 第7回次世代アジュバント研究会 (2014.1 大阪)
6. 竹下亮輔、吉野直人、佐藤成大：経鼻免

疫によるサーファクチンのアジュバント効果の検討 . 第17回日本ワクチン学会 (2013.11 津)

7. 竹下亮輔、吉野直人、遠藤正宏、松川直美、三浦雄吉、佐々木裕、利部正裕、杉山徹、佐藤成大：粘膜アジュバントとしてのサーファクチンとポリミキシンの比較 . 第67回日本細菌学会東北支部会 (2013.8 仙台)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
吉野直人 (YOSHINO NAOTO)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20372881

(2)研究分担者

(3)連携研究者
佐藤成大 (SATO SHIGEHIRO)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：20112592
佐々木裕 (SASAKI YUTAKA)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：80526062
中込治 (NAKAGOMI OSAMU)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：70143047

菅野祐幸 (KANNO HIROYUKI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：40252663
佐塚泰之 (SADZUKA YASUYUKI)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：90162403
杉山育美 (SUGIYAMA IKUMI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：80509050

(4)研究協力者
竹下亮輔 (TAKESHITA RYOSUKE)
岩手医科大学・医学部・大学院生