

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750167

研究課題名(和文) 界面科学及び免疫化学的手法を基軸とした天然由来両親媒性物質の細胞膜上分子挙動解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular behavior of natural amphiphilic compounds on cell membranes based on interfacial and immunological techniques

研究代表者

坂元 政一 (SAKAMOTO, Seiichi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50610177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、健康志向や補完代替医療へ関心の高まりと共に天然物由来の健康食品や生薬原料の需要が高まっている。甘草は、漢方処方薬の70%にも含有する有用な生薬である。GCIは、甘草の主要活性成分であり、体内では腸内細菌によりGAへと変換される。本研究成果は前報と合わせてGCやそのアグリコンGAが有する膜攪乱作用をLangmuir単分子膜手法により初めて視覚的に捉えた結果である。また、GC及びGAが脂質ラフトモデルの流動性を向上させたことから、漢方薬として甘草を用いた場合、他の二次代謝産物(有効成分)の細胞内取り込みを促進させるのではないかといった興味深い知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The Langmuir monolayer technique was systematically employed to investigate the interfacial behavior of GC and GA using a lipid raft model consisting of PSM, DOPC, and CHOL. This study revealed that they regulate the size of raft domains below the monolayer to promote the formation of an LE state, which is considered to play an important role in the transport of substances via lipid rafts. The systematic monolayer study also revealed each interfacial behavior of the raft model components at high concentration of GC and GA. The results of this study indicate that the interaction of lipid rafts with GA is stronger than that with GC, which may be related to the greater biological activity of GA relative to that of GC. Since GA and its derivatives are widely used worldwide in drugs and cosmetics, the present findings provide useful information for estimating the three-dimensional interaction between a biomembrane and GA from the standpoint of health care.

研究分野：抗体工学

キーワード：ステアリルグリチルリチン ステアリルグリチルレチン酸 モノクローナル抗体 ELISA

1. 研究開始当初の背景

近年、健康志向や補完代替医療への関心の高まりと共に天然資源を原材料とした医薬品、食料品及び化粧品の需要が増加傾向にある。その中でも特にマメ科の甘草(カンゾウ; *Glycyrrhiza glabra*)は、現在、漢方処方薬の70%以上にも含有される最重要生薬の一つである。また、食品添加物、菓子類、化粧品、香り付け等にも頻用される(Plant Biotechnol., 26(2009)101)。そのため、今年度は“Medicinal plant of the year 2012”に選出された(The University of Wurzburg, WWF, TRAFFIC)。

甘草の主要成分グリチルリチン(GC)は、オレアナン型トリテルペノイドサポニンであり、肝庇護作用を始め、抗炎症作用、抗ウイルス作用と種々の興味深い薬理活性を有する(Nature, 281(1979)689; Planta Med., 57(1991)119; Lancet, 361(2003)2045)。このため、半世紀前より肝機能障害改善薬やアレルギー性疾患治療薬として医薬品分野で幅広く利用されている。また、GCはショ糖の50倍もの甘味を有する。そのため、食品加工分野においても醤油や味噌、菓子を始め多くの食品に添加物として頻用されている(Nature, 233(1971)619)。経口摂取後のGCの体内動態は、腸内細菌叢の産生する β -グルクロナダゼによる糖加水分解を経て、グリチルレチン酸(GA)へ代謝され、腸管吸収される(Chem. Pharm. Bull., 35(1987)705)。一方で静脈内投与後のGCは、直接肝細胞膜に作用し、細胞膜透過性を抑制することによる抗ウイルス作用(Biochem. J., 392(2005)191)や肝実質細胞に取り込まれることによる肝庇護作用等を発揮する(Aliment Pharmacol. Ther., 12(1998)199)。つまり、GCやGAと細胞膜との相互作用は、GCの持つ多種多様な生理活性の起点と言える。現在までに、GCの透過機構は単離肝実質細胞を用いた細胞レベルでの報告があるものの(Biol. Pharm. Bull., 16(1993)293)、細胞膜における分子間相互作用機構、更には細胞内透過機構に関しては未だ不明である。そこで、本研究では、界面科学的手法(単分子膜手法)・免疫化学的手法を駆使してGCの細胞膜における分子挙動を精査する。これにより細胞膜上分子間相互作用機構と関連する細胞内取り込み機構を分子レベルで解明する。そして、糖加水分解物GAとの比較より細胞膜における糖鎖物性を精査し、糖鎖認識を解析する。

生体膜モデルに脂質ラフトを選択した。脂質ラフトは、スフィンゴ糖脂質やコレステロールなどの構成脂質がその分子特性に基づき集積したマイクロドメインであり、刺激に応じて離散・集合を繰り返す(Nature, 387(1997)569)。更には、膜を介したシグナル伝達、細菌やウイルス感染、特異的部位への

細胞内輸送への関与が示唆され、近年、大きく注目を集めている(Cell, 115(2003)377)。

医薬品としてのGCは消化管からの吸収が悪く、その使用法は静脈内投与に限定されている。当該研究課題は、GCの細胞膜への作用機序を明らかにし、GCの分子設計に伴う膜透過性の向上、更には経口投与可能な医薬品の開発やDDSの開発への発展性も兼ね備えており、近年需要拡大の一途を辿る甘草、GC市場に大きな波及効果を持つと確信している。

2. 研究の目的

天然資源を原材料とした医薬品、食料品及び化粧品の需要は、健康志向への関心の高まりと共に増加の一途を辿っている。特に生薬甘草(カンゾウ)は、主要成分グリチルリチン(GC)を含有する付加価値の高さから一際注目を浴びている。GCの体内動態の起点(細胞膜との相互作用)は、多様な生理活性の起点であるにも関わらず、細胞内取り込み等に関する詳細な機序・知見に極めて乏しい。そこで本研究では、生体膜モデル(脂質ラフト)におけるGCとその代謝物であるグリチルレチン酸(GA)の分子挙動をシンプル且つダイナミックな界面科学的手法により体系的に精査する。加えて、抗GCモノクローナル抗体を用いた免疫化学的手法により脂質ラフトにおけるGC、GAの局在部位を視覚化する。これら複合的手法により体内動態の原点を分子レベルで切り開く。

3. 研究の方法

(1) 試薬

グリチルレチン酸(GA; $\geq 99\%$)は、長良サイエンス(Gifu, Japan)より購入した。パルミトイルスフィンゴミエリン(PSM; $> 99\%$)、ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC; $> 99\%$)は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)より購入した。また、コレステロール(CHOL; $\geq 99\%$)は、Sigma Chemical. Co. (St. Louis, MO, USA)より購入した。また、展開溶媒として用いたクロロホルム(CHCl_3 ; 99.7%)及びメタノール(MeOH; 99.8%)は、それぞれKanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)及びNacalai Tesque (Kyoto, Japan)から購入した。加えて、下相液の調製に用いたTris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)、塩化ナトリウム(NaCl)、酢酸は、nacalai tesque (Kyoto, Japan)より得た。塩化ナトリウムは、1023 Kで24時間焙焼し、有機化合物を取り除いた。本実験に用いた水は、全て三次蒸留水(72.0 mN m^{-1} (298.2 K)、 $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$)を用いた。

(2) GCの精製

Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)より購入し

た GC(98%) は、TLC により不純物の混入が認められたため COSMOSIL(nacalai tesque, Kyoto, Japan)を用いた逆相カラムクロマトグラフィー(移動相;70% MeOH)に供して精製を行った。純度の確認は、HPLC により行い、98%以上であることを確認した。

(3) 表面圧(π)-分子占有面積(A)曲線

単分子膜の表面圧は、自作自動化 Wilhelmy 膜天秤システム(AG-245、Mettler Toledo)を使用して測定した。この膜天秤の分解能は 0.01 mN m^{-1} である。表面圧測定プレートとして濾紙(Whatman 541、周囲長 4 cm)を使用した。トラフ(面積 750 cm^2)とバリアはテフロンテープで被覆したものをを使用した。PSM(1 mM)、SITO (1 mM)、SG (1 mM)及び SGP (1 mM)の試料溶液は、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (=2/1, v/v)混合溶液で調製した。試料溶液を下相液表面に展開後、15 分放置した。単分子膜の圧縮速度は、約 $0.1 \text{ nm}^2/\text{molecule} \cdot \text{min}$ に固定した。下相液は、 $0.02 \text{ M Tris} + 0.13 \text{ M NaCl}$ 水溶液を酢酸で pH 7.4 に調整したものをを用いた。本実験における表面圧と分子占有面積の標準偏差(SD)はそれぞれ、約 0.10 mN m^{-1} 、 0.01 nm^2 であった。

(4) 表面電位(ΔV)-A 曲線

単分子膜の表面電位は、電圧計(Keithley 614)で測定した。また、 ΔV -A 曲線は単分子膜の圧縮過程において、 π -A 曲線と同時に測定した。 ^{241}Am 電極は、下相液表面から 1-2 mm の位置に固定し、参照電極は下相液中に固定した。本実験における ΔV の SD は、約 5 mV であった。

(5) ブリュースター角顕微鏡(Brewster Angle Microscopy (BAM))観察

単分子膜は、膜天秤システム(KSV ミニトラフ、KSV Instruments Ltd., Finland)と連動した BAM(KSV Optrel BAM 300, KSV Instruments Ltd.)を用いて直接可視化した。20 mW He-Ne レーザーを使用し、膜表面に対して波長 634.8 nm の偏光を照射した。使用した対物レンズの倍率は、10 倍であり、その分解能は約 $2 \mu\text{m}$ である。気/水界面への入射角は、ブリュースター角(53.1° 、298.2 K)に固定した。反射光は、高性能電荷結合素子(CCD)カメラ(EHDkamPro02, EHD Imaging GmbH, Germany)により検出し、BAM 画像を静止画で保存した。

(6) 蛍光顕微鏡(Fluorescence Microscopy (FM))観察

膜天秤システム(KSV ミニトラフ)を顕微鏡

(BX51WI, Olympus, Tokyo)のステージにマウントし、FM 画像を測定した。光源は、100 W の水銀ランプ(USH-1030L)、対物レンズは 50 倍(SLMPlan50 \times 、焦点距離 15 mm)を使用した。試料溶液には、1mol%の蛍光色素(NBD-PC)を加えた。励起波長(460 nm)と蛍光極大波長(534 nm)は、ミラーユニット(U-MWIBA3)で制御した。FM 画像の解析は、Adobe Photoshop Element ver. 7.0 (Adobe Systems Incorporated, USA)で行った。画像に占める液体凝縮(LC)膜(暗コントラスト)の割合を算出した。

(7) 原子間力顕微鏡 (AFM)

LB 膜の作成は、KST ミニトラフを用いて行った。まず、マイカ表面を dimethyl polysiloxane (Fuji Systems Co., Tokyo, Japan)を用いて疎水性にし、水平付着法を用いて気/液界面の単分子膜をマイカ表面に成膜した。また、表面圧は 15 mN m^{-1} 、移動速度は 1 mm min^{-1} で下相液中に GA (CGA = 0, 0.5, and 5.0 μM)又は GC(CG = 5.0 and 50 μM)を含んだ状態で成膜を行った。本実験における LB 膜の成膜率は、1 である。また、AFM は、室温にて行った。AFM 画像はタッピングモードによる SPA 400 装置 (Seiko Instruments Co., Chiba, Japan) を用いて行った。

4. 研究成果

まず、脂質ラフトモデル PSM/DOPC/CHOL(1/1/1; by mol)の GC/GA 存在下の単分子膜挙動を検討した。表面圧(π) - 面積(A)は、Wilhelmy 法により測定し、表面電位(ΔV)は、 ^{241}Am 電極と参照電極を用いた空気イオン化電極法により測定した。また、膜の表面形態は、ブリュースター角顕微鏡(BAM; KSV Optrel BAM 300, KSV)及び蛍光顕微鏡(FM; BX51WI, Olympus)により直接観察した。下相液に GC (0, 1, 5, 10, 25, 50 μM)/GA (0, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 5.0 μM)を溶解し、表面に吸着した GC/GA と脂質ラフトモデル PSM/DOPC/CHOL (1/1/1)単分子膜との相互作用を精査した。 π -A、 ΔV -A 等温曲線の結果、 π -A 曲線は、GC と GA は共に濃度の上昇に伴い、expand し、更に膜の圧縮により気/液界面から squeeze out されることが判明した。また、両濃度の上昇に伴い単分子膜の崩壊圧が低下したことから、濃度の増加により膜の安定性が低下することが示唆されました。続いて、下相液中の GA と GC の濃度が 5 μM において比較した結果、GA の方が GC より界面活性が強いことが判明した。更に、GA は GC と比較し崩壊圧の低下、即ち、膜の安定性の低下を引き起こすことが判明した。

次に、5 μM の GA が相互作用をしている膜構成分子を特定するため一成分系単分子膜 PSM、DOPC、CHOL と GA の相互作用を精

査した。その結果、全ての膜構成分子において、圧縮に伴い GA が気/液界面より squeeze out されることが判明した。ここで、崩壊圧に着目すると PSM に関しては崩壊圧に変化がないものの DOPC と CHOL に関しては崩壊圧の低下が見られたことから、これらの分子が膜の安定性の低下に寄与していることが示唆された。このように GA は、DOPC 又は CHOL との相互作用により崩壊圧の低下を招く。一方、GC の場合は、グルクロン酸糖部がその相互作用を遮蔽するため崩壊圧に影響を与えなかったと推測される。

次に、得られた π -A 曲線より圧縮率の逆数を算出した。その結果、GC と GA は共に濃度の増加に伴い圧縮率の逆数は低下し、膜として柔らかい性質を示す液体膨張膜 (LE 膜) へと変化することが判明した。この結果は、GC/GA の添加により脂質ラフトモデルの膜の流動性が向上することを示唆している。

続いて、その形態変化を蛍光顕微鏡 (FM) 及びブリースター角顕微鏡 (BAM) により直接観察した。画像解析の結果、GC/GA の濃度依存的に脂質ラフトドメインが小さく変化した一方で、液体凝縮膜 (LC) の存在割合が一定であったことからこれらが脂質ラフトの生命現象の足掛かりとなる場を拡大する可能性が示唆された。ここで 35 mN m^{-1} の高圧部では、気/液界面における GA がほぼ squeeze out された状態にあるため、GA の影響は 25 mN m^{-1} 以下でより強く表れる。

また、下相液 $5.0 \mu\text{M}$ の GA においては、GA が液体膨張 (LE) ドメインと球状 LC ドメインとに二分し、分け隔てる様子が観察された。この現象は、 $50 \mu\text{M}$ の GC の場合においても観察されたことからサポニンやそのアグリコン特有の溶血作用に関連しているものと考えられる。一成分系 (PSM, DOPC, CHOL) 及び二成分系 (PSM/DOPC, PSM/CHOL, DOPC/CHOL) 単分子膜との相互作用を精査した結果、CHOL が両化合物と相互作用し、LE の帯状ドメインを形成することが判明した。そのため、この挙動の原因は CHOL が支配していることが示唆された。これは GC のグルクロン酸水酸基と CHOL の 3-OH による水素結合及び GC/GA と CHOL の類似骨格による疎水性相互作用が本相互作用のドライビングフォースになっているものと考えられる。

続いて、GA と GC の脂質ラフトモデルにおける形態変化を AFM により観察した。AFM からは、ドメインや分子の高さ情報を得ることができる。また、高圧部において GA や GC は、ほぼ squeeze out され、AFM 画像にそれらが反映されないことを考慮して 15 mN m^{-1} の表面圧で成膜を行った。その結果、高低差が明確に現れ、PSM-CHOL により構成される高い領域と PSM-DOPC により構成される低い領域に二分化された。ラフトドメインの表面に着目すると、細孔の存在が確認された。これは、PSM 単独の場合においても観

察されたことから PSM に由来することが示唆された。また、ラフトドメインの大きさも BAM や FM 画像と同様に GA の濃度の増加に伴い 1 から $0.5 \mu\text{m}$ と小さくなった。興味深いことに $C_{\text{GA}} = 5.0 \mu\text{M}$ では、多くの GA 分子がラフトドメインの傍らもしくは低い領域に観察された。これは、GA が squeeze out する際に CHOL や DOPC と好意的に相互作用をする π -A、 ΔV -A 等温曲線の結果を反映している。また、 15 mN m^{-1} における $C_{\text{GC}} = 5.0, 50 \mu\text{M}$ の AFM 画像結果では、GA と同様に GC の濃度の増加に伴いラフトドメインが 1 から $0.3 \mu\text{m}$ に小さくなる様子が観察された。 $C_{\text{GC}} = 5.0 \mu\text{M}$ では、GC 分子は、ラフトドメイン傍らに存在した。ラフトドメインと GA または GC 分子の高低差が同じ 0.9 nm であることを考慮すると高低差にグルクロン酸は考慮されないことが分かる。この事は、GA や GC が気/液界面で親水基が水分子に対して水平に存在していることを示唆している。

続いて、抗 GC モノクローナル抗体 (MAb5B4) のステアリルグリチルリチン (SGC) 及びステアリルグリチルレチン酸 (SGA) に対する交差反応性を ELISA により検討した。その結果、MAb 5B4 は SGC 及び SGA との交差反応がない事が判明した。そのため、SGC のグルクロン酸水酸基を EDC 法により牛血清アルブミン (BSA) とクロスリンクさせたコンジュゲートを免疫原とし、再度、SGC 及び SGA を認識する MAb の作製を行った。その結果、両化合物を特異的に認識する MAb の精製に成功した。

本研究では、GC の脂質ラフトにおける分子挙動を解明するため Langmuir 単分子膜法を駆使して、下相液中の GA と脂質ラフトモデル PSM/DOPC/CHOL (1/1/1) の相互作用を検討した。その結果、吸着平衡状態の GA の大部分は、圧縮に伴い、気/液界面から squeeze out することが判明した。また、画像解析の結果より、GA の濃度が $5.0 \mu\text{M}$ では、GA 由来の LE ドメインが LC ドメインを帯状に分け隔てる様子が観察された。この現象は、 $50 \mu\text{M}$ の GC の場合においても観察されたことからサポニンやそのアグリコン特有の溶血作用に関連しているものと考えられる。また、GA によってラフトモデルの流動性が向上したこと、更には CHOL がそのドライビングフォースになっていることから GA がラフトモデル単分子膜の下相液側から CHOL と相互作用し、膜の流動性に関連する LE ネットワークを制御することが示唆された。これらの現象は、BAM、FM、AFM 画像解析の結果からも支持された。

本成果は、2015 年 *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* 誌に掲載が受理された。

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1件)

1. Seichi Sakamoto, Takuhiro Uto, Yukihiko Shoyama, Effect of glycyrrhetic acid on lipid raft model at the air/water interface, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有り, 1848 (2), 434-443, 2015.
doi: 10.1016/j.bbamem.2014.11.014.

〔学会発表〕(計13件)

[国内学会]

1. 宇都 拓洋、坂元 政一、迫田 淳一、柴田 まり子、森永 紀、田中 宏幸、正山 征洋、抗グリチルリチンモノクローナル抗体を機軸とした応用研究～機能解析からミサイルタイプの分子育種～、第7回甘草に関するシンポジウム、九州大学(福岡)、2015年7月4日、(ポスター)P-03

2. 河野 俊享、清水 邦義、坂元 政一、田中 宏幸、森元 聡、ELISAによる霊芝トリテルペノイド ganoderic acid A の迅速かつ高感度定量法の確立、日本薬学会 第135年会、神戸学院大学他(兵庫)、2015年3月25-28日、(口頭)28F-pm04

3. 常浦 祐未、松浦 ゆりの、米永 弥生、坂元 政一、麻生 真理子、黒瀬 等、田中 宏幸、森元 聡、抗D-グルタミン酸モノクローナル抗体の作製とその特徴付け、日本薬学会 第135年会、神戸学院大学他(兵庫)、2015年3月25-28日、(ポスター)28PB-am040S

4. 坂元 政一、中原 広道、柴田 攻、Langmuir単分子膜手法による脂質ラフトモデルにおけるグリチルレチン酸の界面科学的挙動解析、第64回コロイドおよび界面化学討論会、名古屋工業大学(名古屋)、2013年9月18-20日、(ポスター)、P050

5. 坂元 政一、中原 広道、柴田 攻、スフィンゴミエリンと植物ステロール誘導体との2成分単分子膜挙動、第64回コロイドおよび界面化学討論会、名古屋工業大学(名古屋)、2013年9月18-20日、(ポスター)、P049

6. 中原 広道、山田 高義、坂元 政一、柴田 攻、新規長鎖部分フッ素化アルコール(F6H9OH, F6H11OH)と生体膜モデルDPPCとの単分子膜混和挙動、第64回コロイドおよび界面化学討論会、名古屋工業大学(名古屋)、2013年9月18-20日、(口頭)、1D15

[国際学会]

7. R. Nagamitsu, S. Sakamoto, H. Tanaka, S. Morimoto. Production of monoclonal antibodies against pyrrolizidine alkaloid, retronecine and its potential applications, The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 6), Khon Kaen, Thailand,

January 21-23, 2016 (poster) P98C.

8. S. Sakamoto, G. Yusakul, R. Nagamitsu, Y. Tsuneyura, T. Miyamoto, H. Tanaka, S. Morimoto. Production of highly specific monoclonal antibody against representative cephalotaxine alkaloids, harringtonine and its application to sensitive quantitative/qualitative analyses, The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 6), Khon Kaen, Thailand, January 21-23, 2016 (poster) P97

9. T. Kohno, S. Sakamoto, H. Tanaka, S. Morimoto. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) using highly specific monoclonal antibody against ganoderic acid A, The 1st International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM 2015), Khon Kaen, Thailand, January 28-30, 2015 (poster) P_52, Isan Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 (2015) 297

10. H. Nakahara, S. Sakamoto, Y. Kojima, A. Hasegawa, H. Akisada, O. Shibata. Solubilization capacity of a gemini surfactant of bis(tetradecyldimethylammonium)decane, 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (27th ECIS), Sofia, Bulgaria, September 1-6, 2013 (poster) T3P64

11. S. Sakamoto, H. Nakahara, O. Shibata. Miscibility behavior of sphingomyelin with phytosterol derivatives by a Langmuir monolayer approach, 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (27th ECIS), Sofia, Bulgaria, September 1-6, 2013 (poster) T1P38

12. S. Sakamoto, H. Nakahara, O. Shibata. Specific effect of glycyrrhetic acid on lipid raft model membrane: A Langmuir monolayer study, 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (27th ECIS), Sofia, Bulgaria, September 1-6, 2013 (poster) T1P39

13. S. Sakamoto, H. Nakahara, O. Shibata, Interaction of glycyrrhetic acid with lipid rafts model by a Langmuir monolayer, 13th EUROPEAN CONFERENCE on ORGANISED FILMS (ECOF13), CORK, IRELAND, July 8-12, 2013 (poster) P-14

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://seigyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂元 政一 (SAKAMOTO Seiichi)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：50610177

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

田中 宏幸 (TANAKA Hiroyuki)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：30253470

正山 征洋 (SHOYAMA Yukihiro)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：70037604

柴田 攻 (SHIBATA Osamu)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：10117129