

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03922

研究課題名(和文)ブドウ球菌の皮膚感染成立に關与する細菌-宿主間相互作用の解明と予防戦略

研究課題名(英文) Investigation of host-bacterial interactions in staphylococcal cutaneous infection and development of its prevention strategies

研究代表者

西藤 公司 (NISHIFUJI, Koji)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20365422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではバリア機能が低下した皮膚をブドウ球菌が通過し、皮膚感染症が成立するまでのメカニズムを解明するために以下の研究を行った。

1. 表皮角質層の細胞間脂質となるスフィンゴ脂質の合成酵素遺伝子sptlc2を、重層扁平上皮で欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作出した。その結果、同マウスでは角質細胞においてsptlc2遺伝子の欠失が認められた。
2. 黄色ブドウ球菌が表皮内に侵入するために、特定の細胞壁成分や外毒素が必要となるかを解析した。その結果、protein Aや塩基性リン脂質合成酵素を欠損させたRN4220株を塗布した皮膚では、表皮への好中球遊走が抑制傾向にあることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、皮膚バリア機能に關連するスフィンゴ脂質の合成酵素を重層扁平上皮特異的に欠損したマウスを作出した。イヌ膿皮症やイヌアトピー性皮膚炎では、角質層においてスフィンゴ脂質の発現量が低下していることが知られている。したがってこのマウスは、イヌの再発性膿皮症やアトピー性皮膚炎における病態学的発症機序を解明する目的で有用になると考えられた。また本研究では、黄色ブドウ球菌が有する特定の細胞壁分子が好中球の表皮内浸潤に影響する可能性を示唆した。黄色ブドウ球菌は好中球により形成された表皮細胞間を通過することから、本研究の成果は黄色ブドウ球菌の経皮侵入機構の一部を説明できるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate how staphylococci invade to the epidermis through the stratum corneum of barrier-disrupted skin.

1. A conditional knockout mouse line in which sptlc2 gene that is involved in production of sphingolipids is deleted in the stratified squamous epithelia. We revealed that sptlc2 gene is effectively deleted in the mouse line 2-3 weeks after induction of gene-recombination by tamoxifen.
2. We also aimed to identify cell-wall molecules or exotoxins involved in intra-epidermal invasion of staphylococcus aureus. We revealed that mutant *S. aureus* RN4220 strain in which either protein A or basic phospholipids are deleted tended to decrease neutrophilic migration to the epidermis than wild-type RN4220.

研究分野：獣医学

キーワード：皮膚 ブドウ球菌 好中球

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌による皮膚感染症は哺乳動物に共通して発症する。本症における皮膚感染の成立機構として、ブドウ球菌の角層定着性や浸透性、ならびに表皮への侵入性に関与するとされる複数の病原因子が既報告において示されていた<sup>1</sup>。しかしながら既報告のほとんどが *in vitro* における研究成果に基づいたものであり、*in vivo* におけるブドウ球菌の皮膚感染成立機序については不明な点が多かった。

研究代表者および研究分担者は、まず *S. aureus* ならびに *S. pseudintermedius* が産生し、膿痂疹の病因となる表皮剥脱毒素 (ET) が、デスモソームおよびコルネオデスモソームの接着蛋白であるデスモグレイン 1 を特異的に消化する外毒素であることを証明した<sup>2</sup>。またマウス皮膚より角層の一部を粘着テープで除去し、ET 産生能を有する *S. aureus* を同部位に塗布することで膿痂疹の表現型を再現できるが、好中球が浸潤しない表皮では菌の表皮内侵入が認められないことを証明した<sup>3</sup>。さらに再発性膿皮症に罹患したイヌの角層では、脂質バリアの主要因子であるセラミドの発現量が健常群よりも低下していることを証明した (未発表)。

以上の成果を元に、我々はブドウ球菌による皮膚感染の成立機構について、①角層細胞間脂質量の低下によりバリア機能が傷害されると細菌が定着・浸透しやすい環境となり、②菌側の病原因子により菌が角層へと定着して増殖・浸透し、③菌が顆粒細胞に接すると好中球が表皮内へと侵入して細胞間接着を離解させ、さらに④菌が好中球よりも数的または機能的に優位な状態となると菌が表皮内へと侵入して皮膚感染症が成立するのではないかという仮説を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では角層における脂質バリア機能異常が膿皮症の原因となるかを解明するため、スフィンゴ脂質合成酵素である Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2 (Sptlc2) をコードする遺伝子を重層扁平上皮特異的に欠損したコンディショナルノックアウト (Sptlc2 CKO) マウスを作出し、同マウスにおける皮膚バリア機能を解析するとともに、同マウスの皮膚におけるブドウ球菌易感染性の有無について解析した。また黄色ブドウ球菌が発現する ET や細胞壁分子の一部が角層通過や表皮への好中球の遊走に関与するかを証明するために、ET 産生株と非産生株、または野生型株と細胞壁分子欠損株との間で比較解析を行った。

## 3. 研究の方法

### 3-1. Sptlc2 CKO マウスの作出

サイトケラチン 5 (K5) プロモーターの下流に *CreER<sup>T2</sup>* 遺伝子が挿入された B6N.129S6(Cg)-Krt5<sup>tm1.1(cre/ERT2)Blh/J</sup> マウス (K5-*CreER<sup>T2</sup>* マウス) は、The Jackson Laboratory (Bar harbor, USA) より入手した<sup>4</sup>。また、スフィンゴ脂質生合成経路の律速酵素、セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) のサブユニット構成蛋白をコードする *Sptlc2* 遺伝子を挟んで 2 つの *loxP* 配列が挿入された B6;129(FVB)-*Sptlc2*<<sup>tm1</sup>Y<sup>hir</sup>>マウス (*Sptlc2<sup>lox</sup>* マウス) は、理化学研究所バイオリソースセンターより入手した<sup>5</sup>。本研究で実施した動物実験および遺伝子組換えマウスを用いた実験については、いずれも本学動物実験小委員会および本学特定生物安全管理委員会の承認をそれぞれ得た上で実施した。

### 3-2. PCR 法による *Sptlc2* 遺伝子欠損の有無と経時的変化の確認

尾組織の DNA により *Sptlc2* と *Cre* の遺伝子型を判定済みの K5-*CreER<sup>T2</sup>*/*Sptlc2<sup>lox</sup>* マウス合計 27 頭を用いた。全てのマウスは本実験の後、*Sptlc2* ノックアウトによる表現型の変化の確認実験

に供された。供試マウスには、タモキシフェンを投与した *K5-CreER<sup>T2</sup>/Sptlc2<sup>fllox</sup>* マウスを用いた。また対照マウスには、コーンオイルのみを投与した *K5-CreER<sup>T2</sup>/Sptlc2<sup>fllox</sup>* マウス、またはタモキシフェンを投与した *Sptlc2<sup>fllox</sup>* マウスを用いた。投与前、投与後 1 週、2 週、3 週、4 週にテープストリップ法による角層の採取を行い、前述の方法で DNA 抽出を行った。*Sptlc2* 野生型遺伝子 (174 bp), *Sptlc2<sup>fllox</sup>* 遺伝子 (380 bp), および *Sptlc2* 遺伝子欠損により生じる *null* 遺伝子 (260bp) の遺伝子断片の分離を試みた。

### 3-3. *Sptlc2* CKO マウスにおける皮膚バリア機能の評価

角質層における脂質量の解析を行うため、本マウスの皮膚にテープストリップ法を施して角質層を採取した。テープをヘキサンに 10 分間浸漬した後、テープより抽出した角層より常法に基づき脂質を溶解した。10  $\mu$ l の脂質抽出物を、HPTLC プレート(Merck, Darmstadt, Germany) にスポットして HPTLC 法を実施した。HPTLC プレート上に描出されたバンドを撮影し、バンド強度と面積から得られる積算値解析して脂質量を定量した。

TEWL の測定には VAPO SCAN AS-VT100RS (株式会社アサヒテクノラボ, 神奈川) を用いた。測定時にはチャンバーの開口部を耳介に押し当て、被験部位を 5 回ずつ測定しその平均値として算出した (単位:  $\text{g/m}^2 \cdot \text{h}$ )。

### 3-5. 黄色ブドウ球菌の角層通過能に対する ET の関与の解析

角質細胞の周辺帯に構造異常が生じた結果、皮膚バリア機能に異常が認められるマウス (*Sox9-Cre/Adam17<sup>fllox</sup>*) を本研究に供した<sup>6</sup>。

*etb* 遺伝子を保有する *S. aureus* 3 株、ならびに既知の *et* 遺伝子 (*eta, etb, etd*) を保有していない *S. aureus* 3 株を本研究に用いた。

6 週齢、メスの BALB/cCrSlc マウスの左右耳介内側にテープストリッピング法を施すことにより角質層を部分除去した。角質層を除去した右耳介内側には、 $2.0 \times 10^8$  CFU の *S. aureus* 株を含む調整菌液を塗布したガーゼ (1 $\times$ 1 cm) を貼付した。貼付から 1, 2, 4, 6, 12, 24 時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、左右耳介を採取して病理組織学的解析に用いた。

### 3-6. 黄色ブドウ球菌の好中球誘導に関与する菌細胞壁分子の解析

黄色ブドウ球菌 RN4220 株、ならびに同株から各種細胞壁分子を欠損させた 16 種の変異黄色ブドウ球菌株を本研究に供した。変異株の内訳は、Protein A をコードする *spa* 遺伝子欠損株 (M0107), 壁タイコ酸 (WTA) 合成酵素 TagO をコードする *tagO* 遺伝子欠損株 (T174), WTA の D-alanine 修飾蛋白をコードする *dltA* 遺伝子欠損株 (M0793), 糖脂質合成酵素をコードする *yprP* 遺伝子欠損株 (M0875), リン脂質合成酵素である lysylphosphatidylglycerol の合成酵素をコードする *mprF* 遺伝子欠損株 (NI-1), 細胞壁修飾酵素 SrtA をコードする *srtA* 遺伝子欠損株 (M2316), リポタイコ酸合成酵素をコードする *ltaS* 遺伝子欠損株 (M0674/pM101), M0674/pM101 株に *ltaS* 遺伝子プラスミドを相補した株 (M0674/pM101-*ltaS*), ペプチドグリカンの *o*-アセチル化に必要な蛋白をコードする *oatA* 遺伝子欠損株 (T002), リポ蛋白の脂質修飾酵素をコードする *lgt* 遺伝子欠損株 (T013), ペプチドグリカン加水分解酵素 Sle1 をコードする *sle1* 遺伝子欠損株 (NI-43), ペプチドグリカン加水分解酵素 Atl をコードする *atl* 遺伝子欠損株 (JT1304), マンガン結合性リポプロテイン SitC をコードする *sitC* 遺伝子欠損株 (M0587), WTA の  $\alpha$ -GlcNAc 修飾酵素をコードする *tarM* 遺伝子ならびに *spa* 遺伝子の同時欠損株 (T790), WTA の  $\beta$ -GlcNAc 修飾酵素をコードする *tarS* 遺伝子ならびに *spa* 遺伝子の同時欠損株 (T803), *tarM, tarS* ならびに *spa* 遺伝子同時

欠損株 (T807)であった。

メスの BALB/cCrSlc マウスの左右耳介内側にテープストリッピング法を施して角質層を部分除去し、 $2.0 \times 10^8$  CFU の *S. aureus* 株を含む調整菌液を塗布したガーゼ (1×1 cm) を貼付した。貼付から 6 時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、左右耳介を採取して後述の解析に用いた。*S. aureus* 1 株につき 3 頭のマウスを使用し、1 耳介につき 10 切片を作製して好中球の表皮内浸潤が認められた切片数を算出した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. PCR による *Sptlc2* 遺伝子欠損の有無と経時的変化の確認

(ア) 角層における *Sptlc2* 遺伝子欠損細胞の出現

尾組織の DNA により遺伝子型判定を行った *K5-CreER<sup>T2</sup>/Sptlc2<sup>fl/fl</sup>* マウス (14 頭) にタモキシフェンを投与したところ、13 頭 (92.9%) で *Sptlc2* 遺伝子欠損を示す *null* 遺伝子断片 (260 bp) が分離された (図 2)。一方で陰性対照マウス 13 頭では、いずれのマウスからも *null* 遺伝子断片は分離されなかった。

(イ) 角層に出現する *Sptlc2* 遺伝子欠損細胞の経時的変化

*Sptlc2* 遺伝子欠損により生じる *null* 遺伝子断片は、タモキシフェン投与後 1 週より出現した。出現率は投与後 2 週と 3 週で特に高かった (図 2)。また *null* 遺伝子断片が分離された PCR 反応においては、全例で *Sptlc2<sup>fllox</sup>* 遺伝子断片も同時に分離された。

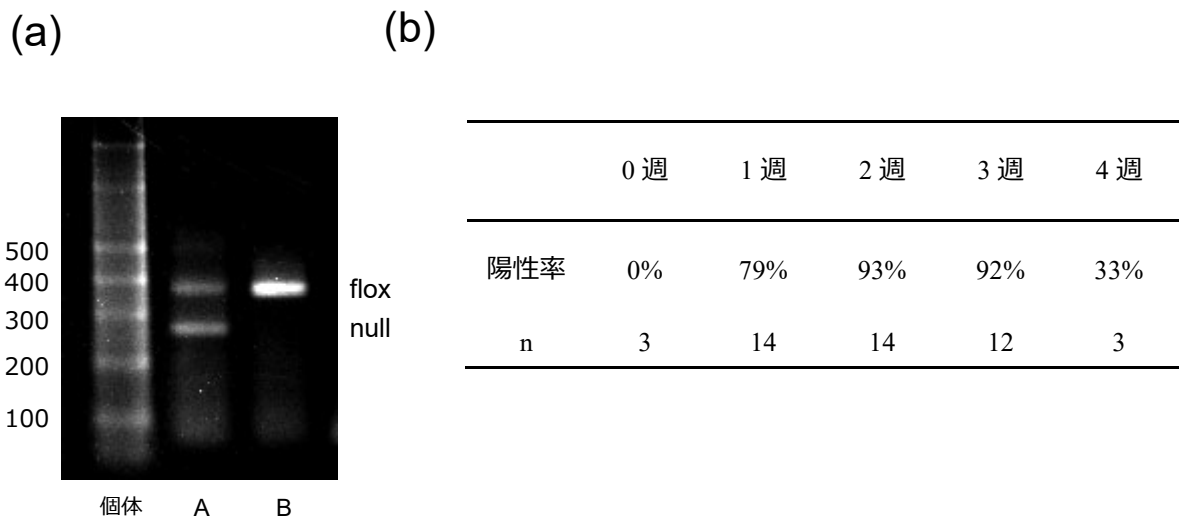


図 2 (a) タモキシフェン (A) またはコーンオイル (B) を投与した *K5CreER<sup>T2</sup>/Sptlc2<sup>fl/fl</sup>* マウスにおける角層 DNA の PCR 結果。各物質を投与後 12 週目に角層 DNA を抽出して PCR 法に供した。(b) *K5CreER<sup>T2</sup>/Sptlc2<sup>fl/fl</sup>* マウスにタモキシフェンを投与した後の *null* 遺伝子陽性率の推移。投与後 2 週目と 3 週目では同遺伝子の陽性率が高い。

##### 4-3. *Sptlc2* CKO マウスにおける皮膚バリア機能解析

HPTLC 解析では、総セラミド量および各セラミド分画の相対量のいずれも、タモキシフェン投与前から投与後 4 週までの間、いずれの時期においても発現量の有意な低下は認められなかった ( $p > 0.05$ )。また TEWL に関しても、タモキシフェン投与前から投与後 4 週までの間、いずれの時期においても有意な上昇は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

#### 4-4. 黄色ブドウ球菌の角層通過能および膿疱形成に対する ET の関与の解析

*etb* 遺伝子保有株および非保有株ともに、塗布後 6 時間より真皮に好中球浸潤が認められ、塗布後 24 時間で表皮内膿疱が形成された。しかしながらいずれの時間においても、*etb* 遺伝子保有株と非保有株との間で、膿疱が認められた切片の数に有意差は認められなかった。

#### 4-5. 黄色ブドウ球菌の好中球誘導に關与する菌細胞壁分子の解析

紫外線照射した RN4220 株を塗布した耳介と、紫外線照射していない RN4220 株を塗布した耳介との間で、膿疱形成数に差は認められなかった ( $p>0.05$ )。そこで本研究では、紫外線照射により滅菌した菌体成分を今後の実験に用いた。

変異型 RN4220 株のうち、M0107 株および NI-1 株と塗布した耳介では、膿疱を有する切片数が他の株を塗布した耳介よりも少ない傾向にあった。以上の結果から、黄色ブドウ球菌の細胞壁および細胞膜に存在する Protein A およびリン脂質が、表皮への好中球遊走に關与する可能性が示唆された (図 3)。

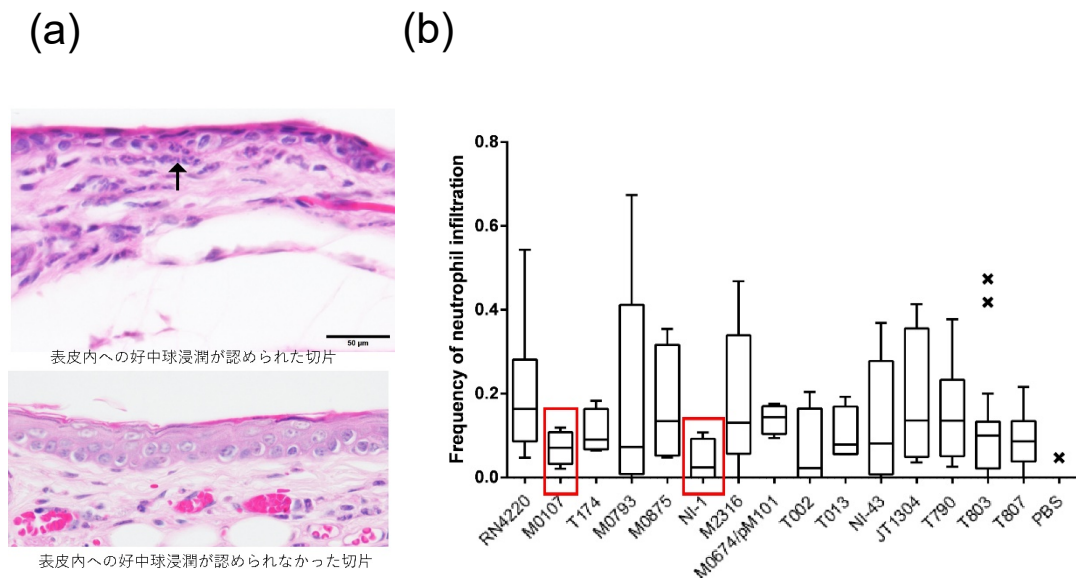


図 3 (a) 上: 好中球の表皮内浸潤, 下: 好中球が認められなかった切片。 (b) 各遺伝子欠損株を塗布した耳介における膿疱数の比較。

#### 参考文献

1. Merts PM, Cardenas TCP, Snyder RV et al. Arch Dermatol 143:1259-1263, 2007.
2. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. J Dermatol Sci 49: 21-31, 2008.
3. Imanishi I, Hattori S, Hisatsune J et al. Vet Dermatol 28: 126-e27, 2017.
4. Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M et al. Nature 479: 189-193, 2011.
5. Ohta E, Ohira T, Matsue K et al. Exp Anim. 58:515-524, 2008.
6. Kobayashi T, Glatz M, Horiuchi K et al. Immunity 42: 756-766, 2015.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uchiyama J, Shigehisa R, Nasukawa T, Mizukami K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Murakami H, Imanishi I, Nishifuji K, Sakaguchi M, Matsuzaki S	4. 巻 163
2. 論文標題 Piperacillin and ceftazidime produce the strongest synergistic phage antibiotic effect in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1941-1948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-018-3811-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitashima DY, Kobayashi T, Woodring T, Idouchi K, Doebei T, Voisin B, Adachi T, Takahashi H, Nishifuji K, Kaplan DH, Clausen BE, Amagai M, Nagao K	4. 巻 27
2. 論文標題 Langrhan cells prevent autoimmunity via expansion of keratinocyte antigen-specific regulatory T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 293-303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2017.12.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Imanishi I, Nicolas A, Caetano AB, Castro TLP, Tartaglia NR, Mariutti R, Guedon E, Even S, Berkova N, Arni RK, Seyffert N, Azevedo V, Nishifuji K, Le Loir Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Exfoliative Toxin E, a New <i>Staphylococcus Aureus</i> Virulence Factor With Host-Specific Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52777-	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Imanishi I, Uchiyama J, Tsukui T, Hisatsune J, Ide K, Matsuzaki S, Sugai M, Nishifuji K	4. 巻 11
2. 論文標題 Therapeutic Potential of an Endolysin Derived From Kayvirus S25-3 for Staphylococcal Impetigo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v11090769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoon JS, Nishifuji K, Iwasaki T.	4. 巻 130
2. 論文標題 Development of an in Vitro Submerged Culture System to Synthesize Epidermal Ceramides in Canine Keratinocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 48-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2020.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Nishifuji K
2. 発表標題 Cutaneous barrier function and ecosystem - Part II: Cutaneous ecosystem, immunity and diseases
3. 学会等名 31th North American Veterinary Dermatology Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishifuji K
2. 発表標題 Cutaneous barrier function and ecosystem - Part I: Barrier abnormalities and diseases
3. 学会等名 31th North American Veterinary Dermatology Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今西市朗, 内山淳平, 井手香織, 菅井基行, 西藤公司
2. 発表標題 バクテリオファージS25-3に由来する組換えendolysinの皮膚常在菌に対する溶菌特異性の解析
3. 学会等名 第7回ファージ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imanishi I, Uchiyama J, Mizutani A, Ide K, Sugai M, Nishifuji K
2. 発表標題 Recombinant endolysin of bacteriophage S25-3 preferentially targets Staphylococcus aureus and prevents pustule formation in a mouse model of bullous impetigo
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今西市朗, 内山淳平, 水谷歩実, 井手香織, 西藤公司
2. 発表標題 バクテリオファージS25-3に由来するendolysin組換え酵素は膿痂疹モデルマウスにおける膿疱形成を抑制する
3. 学会等名 MRSAフォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Imanishi I, Hattori S, Hisatsune J, Ide K, Uchiyama J, Sugai M, Nishifuji K
2. 発表標題 Intra-epidermal neutrophilic migration is crucial for invasion of Staphylococcus aureus to the living epidermis in a mouse model of bullous impetigo
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nishifuji K
2. 発表標題 Canine pyoderma; from laboratory to clinic
3. 学会等名 5th Asian Meetings of Animal Medicine Specialties (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Nishifuji K
2. 発表標題 Staphylococcal exfoliative toxin -A dark side of the Force
3. 学会等名 MRC-KHIDI workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大隅尊史、篠宮佑季、今西市朗、井手香織、西藤公司
2. 発表標題 イヌ表在性膿皮症症例の膿疱より分離されたブドウ球菌の遺伝子学的相同性
3. 学会等名 第64回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今西市朗、内山淳平、津久井利広、久恒順三、井手香織、松崎茂展、菅井基行、西藤公司
2. 発表標題 Kayvirus型endolysinエンドリシンの溶菌活性と膿痂疹モデルマウスに対する治療効果の解析
3. 学会等名 MRSAフォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishifuji K
2. 発表標題 Canine atopic dermatitis - complex pathogenesis
3. 学会等名 6th Asian Meetings of Animal Medicine Specialties (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西藤公司
2. 発表標題 哺乳動物の細胞接着を壊すブドウ球菌の外毒素：表皮剥脱毒素
3. 学会等名 第23回日本獣医皮膚科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mariutti RB, Tartaglia NR, Seyffert N, de Castro TL, Arni RK, Azevedo VA, Loir YL, Nishifuji K	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Intech	5. 総ページ数 206
3. 書名 Immunology and Microbiology "The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京農工大学 農学研究院 動物生命科学部門 准教授 西藤公司  <a href="http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/15/0001474/profile.html?lang=ja#ronbun">http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/15/0001474/profile.html?lang=ja#ronbun</a>  <a href="http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/15/0001474/profile.html">http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/15/0001474/profile.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋山 真志  (AKIYAMA Masashi)  (60222551)	名古屋大学・医学系研究科・教授    (13901)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高島 康弘 (TAKASHIMA Yasuhiro) (20333552)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授  (13701)	
研究分担者	菅井 基行 (SUGAI Motoyuki) (10201568)	広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授  (15401)	
連携研究者	黒川 健児 (KUROKAWA Kenji) (80304963)	長崎国際大学・薬学部・准教授  (37303)	