

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591478

研究課題名(和文)ファージ溶菌酵素を利用する新規ピロリ菌除菌法の開発

研究課題名(英文)Development of the new Helicobacter pylori eradication method for using a phage lytic enzyme

研究代表者

松崎 茂展(Matsuzaki, Shigenobu)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：00190439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が独自に分離した新規ピロリ菌ファージ KHP30 の溶菌活性を利用するピロリ菌除菌法の開発をめざし、それに必要な本ファージの基本的な特性(形態学的特性、生理学的特性、ライフサイクル、およびゲノム塩基配列およびゲノム構造)を確定した。KHP30は、臨床分離ピロリ菌株の約65%を溶菌可能であり、広宿主域であることからファージ療法に有用なファージであると予想された。ファージKHP30のゲノム配列を解読し、相同性検索によりホリン様タンパク質の遺伝子は推定されたが、通常それに近接する溶菌酵素遺伝子は推定されず、従来のファージとは異なる独自の溶菌システムを保有すると推定された。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel eradication method of Helicobacter pylori using bacteriolytic activity of a bacteriophage (phage) KHP30, the morphological, physical, and genetic aspects and the life-cycle of KHP30 have been studied. The host-range of KHP30 was about 65%, suggesting that it is suitable for application use as antibacterial agent. The complete DNA nucleotide sequence was determined and the open reading frames (ORFs) were annotated. The genome consisted of 26 kbp including 30 ORFs. By homology search of the genome, the ORF for the holin protein, one component of general lytic system, was found, but the ORF for the lysin, the counterpart of the system was not found. Therefore, H. pylori phage KHP30 was supposed to have a unique bacteriolytic system different from those of other phages.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：バクテリオファージ ピロリ菌 ファージ療法

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、ヒトの慢性胃炎、胃潰瘍、胃癌の起因菌であることは周知である。現在、胃内にピロリ菌が確認された場合、胃癌発生予防のために除菌することが推奨されている。しかし、近年ピロリ菌の薬剤耐性化が進行し、抗菌薬投与による除菌が困難となる場合が生じている。このような状況に対処するために、我々はピロリ菌除菌のために細菌に感染し破壊するバクテリオファージ (ファージ) の溶菌活性を利用する、いわゆるファージ療法の開発を進めている。本研究では、我々が報告した新規ピロリ菌ファージ KHP30 の溶菌酵素を利用する除菌法の開発を目指した。

2. 研究の目的

我々が分離したピロリ菌ファージ KHP30 は、これまでのファージとは形態学的、遺伝学的に全く異なるファージである。そのため、溶菌酵素を利用するファージ療法の開発のためには、本ファージの詳細なライフサイクルの解明、ゲノム解析による溶菌酵素の特定などが必須である。本研究では、KHP30 保有の溶菌酵素を利用するファージ療法の開発を目指し、本ファージの詳細なライフサイクルの解明を目的とし研究を遂行した。

3. 研究の方法

ファージの分類学的研究では、精製ファージの電子顕微鏡観察および DNA サイズとファージ粒子直径の関係から、所属ウイルスグループの推定を行なった。また含有脂質は、精製ファージをクロロフォルム-メタノールで抽出後、薄相クロマトグラフィーにより展開し検出した。

吸着活性は、菌数に対する低相対ファージ数 (MOI) でファージを宿主菌と混和後、経時的にサンプルを採取し低速遠心の後、上清中のファージ数を計測した。また、潜伏時間とバーストサイズは、低 MOI でファージを菌に吸着させて後、洗浄後新鮮培地に移し、経時的にサンプルを採取しプラークカウントを行なうことで検討した。

pH 安定性は、溶菌液を各 pH で処理後、残存プラーク数の計測により行なった。

菌体内ファージの状態は、菌 DNA のパルスフィールド電気泳動後の主要ビリオンタンパク質遺伝子をプローブとしてのサザンハイブリダイゼーション法によるファージ DNA 検出を行なった。

ビリオンタンパク質の SDS-PAGE 及び質量分析による解析および KHP30 ゲノムの解析により溶菌メカニズムの予測を行なった。

4. 研究成果

(1) ファージ KHP30 の分類学的考察：精製 KHP30 ファージを陰染色し、透過型電子顕微鏡で観察すると、直径が約 70 nm の球状であり、多くのファージで見られる明確な尾部は検

出されなかった。この点をさらに明確にするために、各種ファージの DNA サイズと粒子 (頭部) 直径の関係を検討した。その結果、我々は尾部保有ファージと尾部非保有ファージで、相関関係が著しく異なることを見出した。このグラフに KHP30 をプロットすると、電子顕微鏡観察結果と一致して、本ファージが球形ファージである可能性が極めて高いことが分かった。

球形ファージは、脂質を含有する事が多いため、その可能性を薄層クロマトグラフィー法により検討した。その結果、少なくとも明瞭な 3 スポットを検出でき、KHP30 が脂質含有ファージであることを確認した。

脂質含有球形ファージとしては、family *Corticoviridae*, family *Tectiviridae* がある。し DNA サイズが、前者は約 10 kbp、後者は 15 bp であるのに対し、KHP30 は約 26 kbp で 1.7-2.6 倍大きい。*Corticoviridae*, *Tectiviridae* に属するファージのゲノム構成は、ORF は左右両方向が存在するが、KHP30 ゲノムの ORF は一方向のみである。さらに、ビリオンタンパク質のアミノ酸配列の間に相互に相同性が認められない。

以上から、KHP30 は既存のウイルス科に入らないため、新規ウイルス科に属する可能性が高いと考えられる。

(2) KHP30 の生理学的考察：KHP30 の宿主菌への吸着活性は、約 30% でありかなり低かった。これは、加えるファージ量を変更しても変わらなかった。ファージが菌に吸着してから子ファージを放出するまでの時間 (潜伏時間) は約 140 分であった。これは知られているファージの中では最も長い、菌の倍加時間が 180 分であることを考えると理解できることである。更に、KHP30 は胃内でピロリ菌に感染し、子ファージを産生・放出すると考えられ、結果的にファージ粒子が胃内の酸性環境に曝露されることになると予想される。それゆえ、菌から放出されたファージ粒子 (溶菌液) の異なる pH における安定性を検討した。その結果、pH2.5 から pH10 の広い範囲で比較的安定であることが分かった。これは、本ファージが胃内環境に適応しているためと考えられた。

(3) KHP30 の遺伝学的考察：上記のように KHP30 のゲノムサイズは 26 kbp で 30 個の ORF が存在していた。KHP30 はピロリ菌 NY43 株から自然放出されているが、本菌株のゲノムに挿入された状態で存在するのか (溶原性)、エピゾームとして共存するのか (偽溶原性) を検討した。パルスフィールド電気泳動とサザンハイブリダイゼーション法を使用し検討した。その結果、KHP30 はそのゲノムに部位特異的 DNA 組換え酵素遺伝子を保有するものの、菌ゲノムへ挿入されることがなく、エピゾームとして存在していることが明らかになった。

(4) KHP30 の溶菌メカニズムの推定：上記のように KHP30 ゲノムには、30 個の ORF が存在する。ホモロジー検索で、溶菌に関与すると予想された遺伝子は、*orf21* のみであった。ORF21 (108 アミノ酸残基) の C 末端側には Phage_holin_3 superfamily のドメインが存在することから、ホリタンパク質であると推定された。通常、本タンパク質は細菌の細胞膜に孔をあけ、この孔を通して溶菌酵素 (lysin) をペプチドグリカン層に到達させ溶菌を起こすが、KHP30 ゲノムにはライシン遺伝子は見つからなかった。多くのファージではホリン遺伝子に隣接して、ライシン遺伝子が存在するが、KHP30 ゲノムの場合、両側に存在する *orf20*, *22* 遺伝子にコードされるタンパク質の機能は推定できなかった。*orf21* に近い他の遺伝子にも、ライシンをコードすると予想されるものはなかった。これは、KHP30 が従来ファージとは異なる溶菌システムを有している可能性を示唆している。例えば、ホリンによる内膜の穿孔のみで溶菌が起る等の可能性が考えられ、今後さらに検討が必要である。

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 17 件)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Osanai M, Morimoto N, Asagiri T, Ujihara T, Daibata M, Sugiura T, Matsuzaki S: Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbes Infect.* 2014. doi: 10.1016/j.micinf.2014.02.011 (in press) (査読有)

Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Sakaguchi Y, Gamoh K, Kato SI, Daibata M, Ujihara T, Misawa N, Matsuzaki S. Intra-genus generalized transduction in *Staphylococcus* spp. by a novel giant phage. *ISME J.* 2014. doi: 10.1038/ismej.2014.29. (in press) (査読有)

Yamaguchi K, Miyata R, Shigehisa R, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Ujihara T, Sakaguchi Y, Daibata M, Matsuzaki S. Genome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage KPP23, Belonging to the Family Siphoviridae. *Genome Announc.* May 22;2(3). pii: e00233-14. 2014. (査読有)

Miyata R, Yamaguchi K, Uchiyama J, Shigehisa R, Takemura-Uchiyama I, Kato SI, Ujihara T, Sakaguchi Y, Daibata M, Matsuzaki S. Characterization of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, KPP25, of the family Podoviridae. *Virus Res.* 5;189C:4

3-46. 2014. (査読有)

Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Sato M, Ujihara T, Matsui H, Hanaki H, Daibata M, Matsuzaki S. In silico analysis of AHJD-like viruses, *Staphylococcus aureus* phages S24-1 and S13', and study of phage S24-1 adsorption. *Microbiologyopen.* 3(2):257-70. 2014. (査読有)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Daibata M. The age of the phage. *Nature* 509: Perspective S9. 2014. (査読無 invited)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Satoh M, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S: Synergistic bacteriolysis by bacteriophage EF24C endolysin ORF9 and antibiotic nisin and its application to pulsed-field gel electrophoretic analysis of *Enterococcus faecalis*. *Annals of Microbiology.* 63(3):1209-1211. 2013. (査読有)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Kato S, Inoue T, Ujihara T, Ohara N, Daibata M, Matsuzaki S: Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against *Staphylococcus aureus* infections using a silkworm larval infection model. *FEMS Microbiol Lett.* 347(1):52-60. 2013. (査読有)

Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Gamoh K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S: Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(10):3176-84. 2013. (査読有)

竹内啓晃, 内山淳平, 松崎茂展, 森本徳仁, 杉浦哲朗. *Helicobacter pylori* ファージに関する基礎的研究 *Helicobacter Research* 17:28-33. 2013. (査読無)

内山淳平, 内山(竹村)伊代, 渡辺茂, 大畑雅典, 松崎茂展: バクテリオファージ尾部吸着分子を利用した細菌検出法. *バイオインダストリー* 30(2): 47-53. 2013. (査読無)

Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato S, Morita T, Muraoka A, Sumi T, Matsuzaki S, Daibata M, Fukuhima A; *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration. *PLoS One.* 7(10):e47742. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Maeda Y, Takemura I, Gamoh K, Matsuzaki S, Daibata M: Analysis of deoxynucleosides in bacteriophages EF24C and K and the frequency of a specific restriction site in the genomes of members of the bacteriophage subfamily *Spounavirinae*. *Arch*

Virol. 157(8):1587-92. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S: Complete genome sequences of two *Helicobacter pylori* bacteriophages isolated from Japanese patients. J Virol. 86(20):11400-1. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Matsuzaki S, Daibata M: Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. Arch Virol. 157(4):733-8. 2012. (査読有)

Uchiyama J, Takemura I, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, Matsuzaki S, Daibata M. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage EF24C with a spontaneous point mutation. PLoS One. 6(10):e26648, 2011. (査読有)

松崎茂展, 内山淳平, 竹村伊代, 大畑雅典: バクテリオファージ療法研究の現状と展望 日本医事新報 4551: 48-49. 2011. (査読無)

[学会発表](計 29 件)

Sakaguchi Y, Uchiyama J, Suzuki T, Yamamoto Y, Ogura Y, Hosomi K, Matsuzaki S, Hayashi T, Kozaki S, Oguma K. Analysis of botulinum neurotoxin type G gene-encoding plasmid in *Clostridium argentinense*. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

重久立, 内山淳平, 宮田怜奈, 山口琴絵, 内山伊代, 氏原隆子, 大畑雅典, 松崎茂展. 緑膿菌ファージ KPP21, KPP22, KPP23, KPP25 の網羅的構造タンパク質解析. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

山口琴絵, 内山淳平, 宮田怜奈, 重久立, 内山伊代, 氏原隆子, 大畑雅典, 松崎茂展. 緑膿菌ファージの分離とそれらのゲノム塩基配列. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京都江戸川区, 2014 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Sakaguchi Y, Misawa N, Daibata M, Matsuzaki S. Examination of generalized transduction among *Staphylococcus* spp., using a novel phage S6. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Hiroaki Takeuchi, Takemura-Uchiyama I, Sakaguchi Y, Ujihara T, Daibata M. Estimation of *Helicobacter pylori* phage ecology. 第 87 回日本細菌学会総会, 20

14 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

宮田怜奈, 内山淳平, 山口琴絵, 重久立, 内山伊代, 氏原隆子, 大畑雅典, 松崎茂展. 緑膿菌ファージ KPP22 吸着能変異ファージの解析. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Sakaguchi Y, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Phage therapy experiment against staphylococcal lung-derived septic mouse model. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26~28 日. タワーホール船堀 (東京)

松崎茂展, 内山淳平, 竹内啓晃, 内山(竹村)伊代, 氏原隆子, 大畑雅典. *Helicobacter pylori* バクテリオファージ KHP30 およびその遊離宿主菌株の解析. 第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2013 年 10 月 12~13 日. 広島国際大学 (広島県呉市)

内山淳平, 内山(竹村)伊代, 阪口義彦, 三澤尚明, 大畑雅典, 松崎茂展. 新規ファージ S6 によるブドウ球菌間の普遍形質導入の検討. 第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会 2013 年 10 月 12~13 日. 広島国際大学 (広島県呉市)

松崎茂展, 内山淳平, 内山(竹村)伊代, 阪口義彦, 加藤伸一郎, 氏原隆子, 大畑雅典. 黄色ブドウ球菌性肺炎感染症に対するファージ療法の可能検討. 第 58 回日本ブドウ球菌研究会 2013 年 9 月 27~28 日. 東京薬科大学 (東京)

内山淳平, 内山(竹村)伊代, 蒲生恵司, 阪口義彦, 三澤尚明, 大畑雅典, 松崎茂展. 新規ファージ S6 の分離とブドウ球菌における普遍形質導入検討. 第 58 回日本ブドウ球菌研究会, 2013 年 9 月 27~28 日. 東京薬科大学 (東京)

内山淳平, 竹内啓晃, 阪口義彦, 氏原隆子, 内山伊代, 大畑雅典, 松崎茂展. ピロリ菌バクテリオファージ (ファージ) KHP30 の形態とゲノム解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日. 幕張メッセ (千葉)

阪口義彦, 内山淳平, 小椋義俊, 山本由弥子, 鈴木智典, 松崎茂展, 林哲也, 小熊 恵二. C 型ポツリヌス毒素変換ファージのコアゲノムの探索. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日. 幕張メッセ (千葉)

阪口義彦, Oliva Maria A., Martin-Galiano Antonio J., Andreu Jose M., 阪口政清, 内山淳平, 小椋義俊, 山本由弥子, 鈴木智典, 織田華絵, 津田千秋, 松崎茂展, 林 哲也, 小熊 恵二. C 型ポツリヌス毒素変換ファージのゲノム情報を基盤とした偽溶原性メカニズムの解析. 第 35 回日本分子生物学会年

- 会．2012年12月11～14日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡）
宮田怜奈，山口琴絵，重久立，内山淳平，内山伊代，氏原隆子，大畑雅典，松崎茂展．緑膿菌感染症に対するバクテリオファージ療法系の構築．第65回日本細菌学会中国・四国支部総会，2012年10月20～21日．徳島大学（徳島）
- 山口琴絵，宮田怜奈，重久立，内山淳平，内山伊代，氏原隆子，大畑雅典，松崎茂展．新規緑膿菌バクテリオファージの分離と性状解析．第65回日本細菌学会中国・四国支部総会，2012年10月20～21日．徳島大学（徳島）
- 内山淳平，内山伊代，宮田怜奈，山口琴絵，重久立，氏原隆子，大畑雅典，松崎茂展．黄色ブドウ球菌バクテリオファージ尾部吸着タンパク質と細菌側レセプターの同定．第65回日本細菌学会中国・四国支部総会，2012年10月20～21日．徳島大学（徳島）
- 内山淳平，竹内啓晃，加藤伸一郎，阪口義彦，蒲生啓司，氏原隆子，内山伊代，大畑雅典，松崎茂展．ピロリ菌バクテリオファージの分離・解析．第4回ファージ研究会，2012年9月19～20日 群馬大学（群馬）
- Uchiyama J, Sakaguchi Y, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Satoh M, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C caused by a point mutation in a tail fiber gene. 第4回ファージ研究会，2012年9月19～20日 群馬大学（群馬）
- 阪口義彦，内山淳平，小椋義俊，山本由弥子，鈴木智典，阪口政清，織田華絵，津田千秋，松崎茂展，林哲也，小熊恵二．C型ボツリヌス毒素変換ファージの構造タンパク質の解析．第4回ファージ研究会，2012年9月19～20日 群馬大学（群馬）
- 21 内山淳平，内山伊代，大畑雅典，松崎茂展．黄色ブドウ球菌ファージの尾部リガンドタンパク質を利用した細菌検出法の可能性，第六回細菌学若手コロッセウム，2012年8月8～10日，八王子セミナーハウス（東京）
- 22 内山淳平，竹村伊代，氏原隆子，松崎茂展，大畑雅典．難治性黄色ブドウ球菌感染症に対するバクテリオファージ療法の開発：治療用ファージバンクの構築，第86回日本感染症学会総会，2012年4月25～26日．長崎ブリックホール他（長崎）
- 23 内山淳平，竹村伊代，氏原隆子，松崎茂展，大畑雅典．ファージリガンド分子を利用した細菌検査法の開発，第86回日本感染症学会総会，2012年4月25～26日．長崎ブリックホール他（長崎）
- 24 Uchiyama J, Takemura I, Ujihara T, Matsuzaki S, Daibata M. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C with a point mutation. 第85回日本細菌学会総会，2012年3月27日～29日 長崎ブリックホール他（長崎）
- 25 福田 憲，内山淳平，森田珠恵，石田わか，角環，松崎茂展，大畑雅典，福島敦樹．緑膿菌臨床分離株に対するバクテリオファージ KPP12 の溶菌効果の検討．角膜カンファランス 2012年2月23～25日．ホテルニューオータニ（東京）
- 26 内山伊代，内山淳平，松崎茂展，杉浦哲朗，大畑雅典．黄色ブドウ球菌ファージの尾部リガンドタンパク質を利用した細菌検出法の開発．第8回合同地方会（第57回日本臨床検査医学会中国・四国支部総会，第152回日本臨床化学会中国支部例会・総会，第22回日本臨床化学会四国支部例会・総会），2012年2月4～5日 岡山大学（岡山）
- 27 内山淳平，竹村伊代，氏原隆子，邑岡麻子，松崎茂展，大畑雅典．緑膿菌ファージ KPP10 のゲノムDNA 解析．第64回日本細菌学会中国・四国支部総会，2011年10月22～23日，岡山大学（岡山）
- 28 内山淳平，竹村伊代，佐藤美帆，加藤伸一郎，氏原隆子，松崎茂展，大畑雅典．黄色ブドウ球菌ファージ S13' および S24-1 ゲノム比較による尾部吸着タンパク質の同定と解析．第56回日本ブドウ球菌研究会，2011年9月23～24日 高知市総合あんしんセンター高知（高知）
- 29 福田憲，石田わか，角環，森田珠恵，内山淳平，松崎茂展，大畑雅典，福島敦樹．バクテリオファージによるマウス緑膿菌角膜炎の抑制効果．第48回日本眼感染症学会，2011年7月8～9日，国立京都国際会館（京都市）
- 〔図書〕（計1件）
Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, and Daibata M: Chapter 10. Phage therapy: experiments using animal infection models. Phage Therapy. Current Research and Applications. Editors: Jan Borysowski, Ryszard Międzybrodzki, Andrzej Górski. Caister Academic Press.. 2014. 総ページ数 378
- 〔産業財産権〕
出願状況（計2件）
名称：黄色ブドウ球菌を検出する方法、黄色ブドウ球菌測定用メンブレン及び黄色ブドウ球菌測定用キット
発明者：内山淳平、内山伊代、花木秀明、松井秀仁、大畑雅典、松崎茂展

権利者：国立大学法人高知大学
学校法人北里研究所

種類：特許

番号：特願 2014-046922

出願年月日：平成 26 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

名称：黄色ブドウ球菌に結合するタンパク質及びそのタンパク質を利用した黄色ブドウ球菌の測定方法

発明者：大畑雅典、松崎茂展、内山淳平、竹村伊代、

権利者：国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：特願 2012-160613

出願年月日：平成 24 年 7 月 19 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 茂展 (MATSUZAKI SHIGENOBU)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：00190439

(2) 研究分担者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI HIROAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：90346560

内山 淳平 (UCHIYAMA JUMPEI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20574619

大畑 雅典 (DAIBATA MASANORI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50263976