

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25460541
 研究課題名(和文) C型とD型ボツリヌス毒素変換ファージの尾部吸着タンパク質と宿主菌レセプターの解析

 研究課題名(英文) Analysis of tail adsorbed protein of Clostridium botulinum types C and D neurotoxin-converting phage and its host bacterial receptors

 研究代表者
 阪口 義彦 (Sakaguchi, Yoshihiko)

 北里大学・医学部・助教

 研究者番号：70403491

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：C型とD型ボツリヌス菌は、家畜にボツリヌス症を引き起こす。その結果、食品・畜産業界へ大きな損失を与える。その原因となるC型とD型毒素遺伝子は、バクテリオファージのゲノム上にコードされているため、ファージによる毒素遺伝子の水平伝播を阻害させることがボツリヌス症の感染制御法として考えられる。本研究では、C型毒素変換ファージ、c-stファージの感染に第一義的に重要である吸着に関して遺伝学的に研究を行った。はじめに、C型毒素変換ファージゲノムの比較、c-stファージのピリオン遺伝子の同定を行った。これらの情報をもとに、いくつかの吸着に関する遺伝子を予想している。現在、本研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：Because Clostridium botulinum types C and D produce botulinum neurotoxin, causing serious symptom botulism, they are recognized as severe pathogen you should prevent spreading in food and animal industries. The botulinum neurotoxin genes are coded on the prophage genomes, and so inhibition of lateral gene transfer mediated by bacteriophage (phage) can be one of the preventions for the disease. Thus, we investigated the adsorption mechanism of C. botulinum type C neurotoxin-converting phage, phage c-st on the genetic point. Based on the comparative genomics and identification of phage virion genes, we got at a speculation that several genes associated with phage adsorption. We are in advanced studies of the findings.

研究分野：病原細菌学

キーワード：ボツリヌス菌 人畜共通感染症 ボツリヌス毒素遺伝子 バクテリオファージ 水平伝播 ファージ変換 ゲノム解析 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)は、神経毒素(ボツリヌス毒素)を産生し、ボツリヌス症を引き起こす。本菌は、産生する毒素の抗原性の違いにより、A~G型の7型に分類されている。C型とD型ボツリヌス菌は、家畜に致死的な感染症を引き起こし、畜産・食品業界に甚大な被害をもたらす。従って、本菌の感染制御法の確立は極めて重要である。原因となるC型とD型毒素遺伝子は、バクテリオファージ(毒素変換ファージ)により主に近縁種間で伝達されている。

2. 研究の目的

拡大するボツリヌス症の被害を抑制する有効な感染制御法として、C型とD型毒素変換ファージによるボツリヌス毒素遺伝子の伝播阻止が有効であると考えられた。そのためには、本ファージの宿主菌への吸着メカニズムを解明し、その本体を十分に理解することが重要である。本研究では、まず、ボツリヌス毒素変換ファージの宿主認識分子の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) C型毒素変換ファージの全塩基配列の決定とゲノム構造の比較解析

DNAの調製

ボツリヌス毒素産生株をクックド・ミート培地で、37℃、一夜、嫌気培養した。集菌後、DNA精製キットを用いて、DNAを調整した。ファージゲノムの全塩基配列決定は、精製したDNAを次世代シーケンサー(イルミナ、MiSeqなど)を用いて行った。得られた配列情報をDNAシーケンスアセンブルソフトウェア(Gene Codes)により編集し、多数の配列断片をアセンブラで結合編集した。ギャップ領域についてはPCRを行い、得られたPCR産物のダイレクトシーケンス法またはランダムショットガンシーケンシング法により解析した。

ゲノム構造の比較

ゲノム上のそれぞれの遺伝子(*orf*)を推定した。分子生物学・配列解析ソフトウェア(インシリコモレキュラークローニング)を使用して、ファージゲノム情報の核酸・推定タンパク質配列の比較を

行った。また、近縁ファージゲノム情報は、公共のデータベース(Genbank)を利用した。

(2) c-stファージのビリオンタンパク質の解析

N末端アミノ酸分析と質量分析

c-stファージを宿主菌(ファージ非保有株)に感染させ、大量培養を行った。ファージをポリエチレングリコールで濃縮し、CsCl密度勾配超遠心法を用いてファージを精製した。精製ファージのタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、N末端アミノ酸分析器および質量分析器を用いて、ファージのビリオンタンパク質を解析した。質量分析で使用するタンパク質データベースは、独自に構築した。イムノゴールド染色

(2)のと同様の方法でc-stファージを精製し、一次抗体および金コロイド標識した二次抗体を反応させ、電子顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

以前に、C型毒素変換ファージc-stの全ゲノム解析を行ったが、そのゲノムの大部分の遺伝子情報は未知であった。本研究では、C型毒素変換ファージ、c-stファージの感染に第一義的に重要であるファージの宿主菌への吸着に関する遺伝学的研究を行った。はじめに、他のC型毒素変換ファージ、c-468ファージの比較ゲノム解析、c-stファージを構成するビリオンタンパク質をコードする遺伝子群の特定を行った。

(1) c-stファージのビリオンタンパク質の網羅的解析

精製c-stファージの粒子タンパク質を解析したところ、総計10個のOpen Reading Frame (ORF)が同定された。これらのORFは全てc-stファージゲノム上の98-158 kbp領域に存在することが示唆された。

(2) C型毒素変換ファージの全ゲノムと比較ゲノムの解析

まず、c-468ファージゲノムの全塩基配列の決定を行った。c-468ファージゲノムでは、43-57 kbp領域が欠損していた。次に、c-stファージの継代培養を繰り返すことで得られたファージ、c-st Mut(1と2)ファージゲノムの全塩基配列を決定した。c-st Mut(1と2)のゲノムサイズは、160 kbpと

165 kbp であった。このことから、c-st ファージゲノムが、ある頻度で縮小していることが明らかとなった。c-st ファージ、c-468 ファージ、c-st Mut (1 と 2) とのゲノムの比較解析により、約 140 kbp 領域が共通に保存されていることが明らかとなった。また、ピリオンタンパク質をコードする遺伝子群は、これらのファージ間でよく保存されていた。

- (3) 抗 c-st ファージ抗体 (一次抗体) を用いて、c-st ファージタンパク質のウエスタンブロット解析を行ったところ、2 つの位置に特異的なシグナルが得られた。そこで、これらの 2 つのタンパク質に対するウサギポリクロナール抗体 (一次抗体) をそれぞれ作製し、これらの抗体を用いてイムノゴールド染色を行い、電子顕微鏡により観察した。その結果、1 つはファージの尾 (鞘) もう一つはファージの頭を構成するタンパク質であることが明らかとなった。現在、98-158 kbp 領域の個々の ORF についても同様な手法により、ファージを構成するタンパク質の解析を行なっている。
- (4) ファージタンパク質をコードする ORF 領域で、既に公開されているデータベース上の遺伝子との相同性を調べると、2 つの遺伝子が溶菌酵素をコードしている可能性が考えられた。そこで、2 つの遺伝子を個別に発現ベクターに構築し、大腸菌発現系または枯草菌発現系を用いて、組換えタンパク質として発現させその精製を試みた。しかしながら、いずれの組換えタンパク質も発現量および精製量が少なかった。現在、培養の時間や温度などの条件を検討している。また、他の数種類の発現ベクターへの構築も行っている。

以上の結果から、C 型毒素変換ファージ、c-st ファージのピリオンタンパク質をコードする遺伝子群を明らかにした。また、c-st ファージの一部の頭部と尾部のタンパク質を同定した。これらの情報をもとに、いくつかの吸着に参与する遺伝子を予想している。現在、本研究を継続し、予想した遺伝子の機能解析を行っている。今後、解析を進めボツリヌス毒素変換ファージの宿主菌吸着メカニズムを明らかにしたい。

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 13 件)

Shigehisa, R., Uchiyama, J., Kato, S., Takemura-Uchiyama, I., Yamaguchi, K., Miyata, R., Ujihara, T., Sakaguchi, Y., Okamoto, N., Shimakura, H., Daibata, M., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family Podoviridae genus N4-like viruses isolated in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 60(1), 64–67, 2016, 査読有, DOI: 10.1111/1348-0421.12347.

阪口義彦、「シリーズ!! ボツリヌス菌による疾患(ボツリヌス症)」, 第三回 ボツリヌス症の臨床症状、58、p8、サラヤ情報誌「衛生の友」, 2016、査読無.

阪口義彦、「シリーズ!! ボツリヌス菌による疾患(ボツリヌス症)」, 第一回 ボツリヌス菌の発見の歴史と疫学、56、p8、サラヤ情報誌「衛生の友」, 2015、査読無.

阪口義彦、「シリーズ!! ボツリヌス菌による疾患(ボツリヌス症)」, 第二回 ボツリヌス菌の病原因子と作用機序、57、p8、サラヤ情報誌「衛生の友」, 2015、査読無.

Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, A., Oguma, K., Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. *Res. Microbiol.*, 166, 318–325, 2015, 査読有, DOI: 10.1016/j.resmic.2014.07.016.

Sakaguchi, Y., Hosomi, K., Uchiyama, J., Ogura, Y., Umeda, K., Sakaguchi, M., Kohda, T., Mukamoto, M., Misawa, N., Matsuzaki, S., Hayashi, T., Kozaki, S., Draft genome sequence of *Clostridium botulinum* type B strain Osaka05, isolated from an infant patient with botulism in Japan. *Genome Announc.*, 2(1), e01010–13, 2014, 査読有, DOI: 10.1128/genomeA.01010-13.

Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I., Sakaguchi, Y., Gamoh, K., Kato, S., Daibata, M., Ujihara, T., Misawa, N., Matsuzaki, S., Intragenus generalized transduction in *Staphylococcus* spp. by a novel giant phage. *ISME J.*, 8(9), 1949–1952, 2014, 査読有, DOI: 10.1038/ismej.2014.29.

Nagahama, M., Takahashi, C., Aoyanagi, K., Tashiro, R., Kobayashi, K., Sakaguchi, Y., Ishidoh, K., Sakurai, J., Intracellular trafficking of *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Toxicon*, 82, 76–82, 2014, 査読有,

DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.02.009.

Miyata, R., Yamaguchi, K., Uchiyama, J., Shigehisa, R., Takemura-Uchiyama, I., Kato, S., Ujihara, T., Sakaguchi, Y., Daibata, M., Matsuzaki, S., Characterization of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, KPP25, of the family *Podoviridae*. *Virus Res.*, 189, 43–46, 2014, 査読有, DOI: 10.1016/j.virusres.2014.04.019.

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.*, 2(3), e00233–14, 2014, 査読有, DOI: 10.1128/genomeA.00233-14.

Sakaguchi, M., Murata, H., Aoyama, Y., Hibino, T., Putranto, E. W., Ruma, I. M., Inoue, Y., Sakaguchi, Y., Yamamoto, K., Kinoshita, R., Futami, J., Kataoka, K., Iwatsuki, K., Huh, N. H., DNAX-activating protein 10 (DAP10) membrane adaptor associates with receptor for advanced glycation end products (RAGE) and modulates the RAGE-triggered signaling pathway in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 289(34), 23389–23402, 2014, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M114.573071.

Hosomi, K., Sakaguchi, Y., Kohda, T., Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Umeda, K., Iida, T., Kozaki, S., Mukamoto, M., Complete nucleotide sequence of a plasmid containing the botulinum neurotoxin gene in *Clostridium botulinum* type B strain 111 isolated from an infant patient in Japan. *Mol. Genet. Genomics*, 289(6), 1267–1274, 2014, 査読有, DOI: 10.1007/s00438-014-0887-4.

小熊恵二、阪口義彦、杉本 央、山本 由弥子、III 嫌気性菌症、破傷風とボツリヌス症、Tetanus and Botulism、医薬ジャーナル社「化学療法の領域」、特集 嫌気性菌感染症の基礎と臨床、29(10)、115–124、2013、査読無。

〔学会発表〕(計 29 件)

Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Ogura, Y., Yamamoto, Y., Matsuzaki, S., Hayashi, T., Matsushita, O., Oguma, K., Hayashi, S., The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C phage and functional analysis of gene products. 第 89 回日本細菌学会総会、大阪国際交流セン

ター、大阪府大阪市、平成 28 年 3 月 23 日–25 日。

那須川忠弥、内山淳平、鈴木仁人、宮田玲奈、山口琴絵、内山伊代、阪口義彦、柴山恵吾、阪口雅弘、松崎茂展、緑膿菌 PAO1 株とファージ KPP22 の短期間進化的軍拡競走の解析。第 89 回日本細菌学会総会、大阪国際交流センター、大阪府大阪市、平成 28 年 3 月 23 日–25 日。
横田憲治、松下 治、山本由弥子、美間健彦、後藤和義、林 俊治、阪口義彦、早期胃癌 ESD 後再発予測における *H. pylori*-J 抗原を用いた IgG サブクラスの有用性。第 89 回日本細菌学会総会、大阪国際交流センター、大阪府大阪市、平成 28 年 3 月 23 日–25 日。

Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Hosomi, K., Kohda, T., Matsuzaki, S., Ogura, Y., Hayashi, T., Hayashi, S., Kozaki, S., Mukamoto, M., Analysis of botulinum neurotoxin type B6 gene-encoding plasmid in *Clostridium botulinum* type B. 第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市、平成 27 年 3 月 26 日–28 日。

内山淳平、黒川健児、阪口義彦、内山(竹村)伊代、氏原隆子、村上雅尚、大畑雅典、松崎茂展、各種ファージに対する黄色ブドウ球菌受容体の解析。第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市、平成 27 年 3 月 26 日–28 日。
重久 立、内山淳平、宮田玲奈、山口琴絵、内山伊代、阪口義彦、氏原隆子、大畑雅典、松崎茂展、緑膿菌感染症に対するファージ療法と化学療法の併用療法の可能性検討。第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市、平成 27 年 3 月 26 日–28 日。

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、島倉秀勝、今西市朗、阪口雅弘、松崎茂展、ピロリ菌ファージの分離と解析。第 2 回ファージセラピー臨床応用検討会、東工大学、神奈川県横浜市、平成 27 年 7 月 31 日。

阪口義彦、内山淳平、Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Andreu, J. M., 小椋義俊、山本 由弥子、松崎茂展、林 哲也、小熊恵二、林 俊治、C 型ボツリヌス毒素変換ファージの生存に必要なゲノム領域の解析。平成 27 年度 AKPS 研究集会、第 18 回北里微生物アカデミー、北里大学、神奈川県相模原市、平成 27 年 8 月 6 日。

阪口義彦、内山淳平、Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Andreu, J. M., 小椋

義俊、山本 由弥子、松崎茂展、林 哲也、
小熊恵二、林 俊治、C型ボツリヌス毒
素変換ファージのゲノム比較と遺伝子
機能解析. 第98回日本細菌学会関東支
部総会、東京歯科大学、東京都千代田区、
平成27年10月29日-30日.

Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I.,
Sakaguchi, Y., Gamoh, K., Misawa, N.,
Daibata, M., Matsuzaki, S., Examination of
generalized transduction among
Staphylococcus spp. using a novel phage
S6. The 13th KMS Research meeting,
Kochi University, Nankoku City, Kochi
(Japan), 2014.2.19-20.

Takemura-Uchiyama, I., Uchiyama, J.,
Sakaguchi, Y., Ujihara, T., Daibata, M.,
Matsuzaki, S., Phage therapy experiment
against staphylococcal lung-derived septic
mouse model. The 13th KMS Research
meeting, Kochi University, Nankoku City,
Kochi (Japan), 2014.2.19-20.

Uchiyama, J., Takeuchi, H., Sakaguchi, Y.,
Takemura-Uchiyama, I., Kato, S., Gamoh,
K., Ujihara, T., Daibata, M., Matsuzaki, S.,
Estimated distribution of KHP30-like
bacteriophages in the stomach, using
clinical *Helicobacter pylori* isolates. The
12th Japan-Korea International Symposium
on Microbiology (XII-JKISM), Tower Hall
Funabori, Edogawa-Ku, Tokyo, Japan,
March 24-25, 2014.

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*. The 87th
Annual Meeting of Japanese Society for
Bacteriology, Tower Hall Funabori,
Edogawa-Ku, Tokyo, 2014.3.26-28.

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. The 87th Annual
Meeting of Japanese Society for
Bacteriology, Tower Hall Funabori,
Edogawa-Ku, Tokyo, 2014.3.26-28.

Matsuzaki, S., Uchiyama, J., Takeuchi, H.,
Takemura-Uchiyama, I., Sakaguchi, Y.,
Ujihara, T., Daibata, M., Estimation of
Helicobacter pylori phage ecology. The
87th Annual Meeting of Japanese Society
for Bacteriology, Tower Hall Funabori,
Edogawa-Ku, Tokyo, 2014.3.26-28.

Takemura-Uchiyama, I., Uchiyama, J.,

Sakaguchi, Y., Ujihara, T., Daibata, M.,
Matsuzaki, S., Phage therapy experiment
against staphylococcal lung-derived septic
mouse model. The 87th Annual Meeting of
Japanese Society for Bacteriology, Tower
Hall Funabori, Edogawa-Ku, Tokyo,
2014.3.26-28.

Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I.,
Sakaguchi, Y., Kato, S., Gamoh, K.,
Misawa, N., Murakami, M., Daibata, M.,
Matsuzaki, S., Generalized transduction
experiment in vitro among *Staphylococcus*
spp., using a novel giant phage S6. 第5回
ファージ研究会、三重大学、三重県津市、
平成26年9月4日-5日.

Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Suzuki, T.,
Yamamoto, Y., Hosomi, K., Kohda, T.,
Matsuzaki, S., Hayashi, T., Mukamoto, M.,
Oguma, K., Analysis of botulinum
neurotoxin type G gene-encoding plasmid
in *Clostridium argentinense* strain 2740.
International Union of Microbiological
Societies (IUMS), Montreal, Canada, July
27-August 1, 2014.

Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I.,
Sakaguchi, Y., Kato, S., Gamoh, K.,
Misawa, N., Daibata, M., Matsuzaki, S.,
Generalized transduction in vitro among
Staphylococcus spp., using a novel phage
S6. International Union of Microbiological
Societies (IUMS), Montreal, Canada, July
27-August 1, 2014.

Takemura-Uchiyama, I., Uchiyama, J.,
Takeuchi, H., Gamoh, K., Sakaguchi, Y.,
Kato, S., Ujihara, T., Daibata, M.,
Matsuzaki, S., KHP30-like phages among
clinical isolates of *Helicobacter pylori*.
International Union of Microbiological
Societies (IUMS), Montreal, Canada, July
27-August 1, 2014.

②① 内山淳平、内山(竹村)伊代、阪口義彦、
竹内啓晃、村上政尚、氏原隆子、大畑雅
典、松崎茂展、ピロリ菌における KHP30
様ファージの溶原性に関する研究. 第
67回日本細菌学会中国・四国支部総会、
徳島文理大学薬学部、徳島県徳島市、平
成26年10月4日-5日.

②② Uchiyama, J., Uchiyama-Takemura, I.,
Watanabe, S., Sakaguchi, Y., Daibata, M.,
Matsuzaki, S., Bacterial detection system
for *Staphylococcus aureus* based on
bacteriophage tail adsorption protein. The
28th International Congress of
Chemotherapy and Infection (ICC),
Incorporating the 14th Asia-Pacific
Congress of Clinical Microbiology and

Infection, Pacifico Yokohama, Yokohama-shi, Kanagawa, Japan, June 5-8, 2013.

⑳ Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Ogura, Y., Sakaguchi, M., Tsuda, C., Matsuzaki, S., Hayashi, T., Oguma, K., Analysis of botulinum neurotoxin-encoding plasmid in of *Clostridium argentinense*. FEMS2013, The 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013.

㉑ Uchiyama, J., Sakaguchi, Y., Takemura-Uchiyama, I., Kato, S., Ujihara, T., Daibata, M., Matsuzaki, S., Phage therapy experiment for staphylococcal lung infection. FEMS2013, The 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013.

㉒ Uchiyama, J., Takeuchi, H., Sakaguchi, Y., Gamo, K., Kato, S., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., Daibata, M., Matsuzaki, S., A novel type of spherical bacteriophage, *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. FEMS2013, The 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013.

㉓ 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、新奇ファージ S6 の分離とブドウ球菌における普遍形質導入の検討。第 58 回日本ブドウ球菌研究会、東京薬科大学、東京都八王子市、平成 25 年 9 月 27 日-28 日。

㉔ 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感染症に対するファージ療法の可能性の検討。第 58 回日本ブドウ球菌研究会、東京薬科大学、東京都八王子市、平成 25 年 9 月 27 日-28 日。

㉕ 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、広島国際大学、広島県東広島市、平成 25 年 10 月 12 日-13 日。

㉖ 細見晃司、阪口義彦、後藤和義、幸田知子、飯田哲也、小崎俊司、向本雅郁、B 型ボツリヌス菌が保有するプラスミドの芽胞形成への関与。第 66 回日本細菌学会関西支部総会、大阪大学微生物病研究所、大阪府大阪市、平成 25 年 11 月 16 日。

〔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

阪口 義彦 (SAKAGUCHI, Yoshihiko)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：70403491

(2) 研究分担者

松崎 茂展 (MATSUZAKI, Shigenobu)
高知大学・医歯学系・准教授
研究者番号：00190439

(3) 研究分担者

内山 淳平 (UCHIYAMA, Jumpei)
麻布大学・獣医学部・講師
研究者番号：20574619