

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791025

研究課題名(和文)新規バクテリオファージゲノム由来ヌクレオシドの抗ウイルス活性の可能性検討

研究課題名(英文)Examination of anti-viral activity of novel phage-derived nucleosides

## 研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染症に対する化学療法では、ヌクレオシドの構造をベースにした核酸類似体を使用されている。一部のバクテリオファージ(ファージ)は、ユニークなゲノムDNAを有している。本研究では、抗ウイルス薬の創薬基盤となりうる新規核酸をファージゲノムDNAから搜索した。LC-MSを使用しファージゲノムDNAを分析した結果、ほとんどのファージは、通常のゲノムDNAであった。一方、黄色ブドウ球菌ファージS6では、チミンがウラシルに完全置換されたゲノムDNAを有することは明らかとなったが、抗ウイルス薬の創薬基盤となりうる新規核酸の発見には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Nucleic acid analogs, which the structure of the nucleoside is based, is used in chemotherapy against viral infections. Some of the bacteriophages (phages) have unique genomic DNAs. In this study, we searched novel nucleic acids from phage genomic DNA, which can become drug discovery platform for anti-viral drugs.

The phage genomic DNAs were analyzed using LC-MS. As a result, most of the phages were revealed to have normal genomic DNAs. On the other hand, Staphylococcus aureus phage S6 DNA was revealed to contain uracil in place of thymine as a nucleic acid base. Unfortunately, it did not lead to the discovery of novel nucleic acids that can be drug discovery platform for anti-viral drugs in the present study.

研究分野：細菌学

キーワード：ファージ 感染症 核酸 ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

現在、ウイルス感染症に対する化学療法には、ヌクレオシド類似体と称するヌクレオシドの構造を大幅に改変しない程度の改変がなされた化合物が高頻度で使用されている。今日、HIV などのレトロウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、肝炎ウイルスなどのウイルス感染症に対して使用されている。しかしながら、既に使用されているヌクレオシド類似体に対しては抵抗性を示すウイルスが報告されている。また、これまでのヌクレオシド類似体は、既知のヌクレオシドを化学的に改変しているため、有効なヌクレオシド類似体の作製には限界がある。さらに、中南米やアフリカなどの発展途上国独自のハープ類抽出成分から新規抗ウイルス薬の研究開発が行われているが、国家間の知的所有権の問題が生じているため、今後、開発は極めて難航すると予想される。それゆえ、新規抗ウイルス薬を開発するためには、新しいヌクレオシド類似体を独自に探索・検討することが有効である。

近年のファージ研究により、ファージは地球上最も豊富な生命体で、遺伝的にも極めて多様性に富んでいることが明らかにされた。ゲノム核酸においても、その核酸構造に多様性を有する。大腸菌に感染するファージ T4 の DNA では、ゲノム核酸塩基のシトシンをヒドロキシメチル化、さらに、グルコースを複数付加した極めて特異的な構造をしている。また、*Pseudomonas acidovorans* ファージ W-14 は、*-putrescinyllthymine* を有することが明らかにされている。さらに、枯草菌ファージ SP01 は、ゲノム核酸は、ヒドロキシメチル化したデオキシウリジンが存在している。このように、一部のファージにおいて核酸分析が行われ、そのユニークな核酸の保有が示唆されている。以上から、ファージ核酸は、新規核酸誘導体またはその基盤物質が存在している極めて優れたリソースであると期待される。

## 2. 研究の目的

以上から、ファージゲノム核酸には、抗ウイルス薬の基盤となるヌクレオシド中間体が取得できる可能性が期待される。本研究では、新規ファージの分離を行い、抗ウイルス薬の基盤分子候補となりうるゲノム核酸由来の新規ヌクレオシド存在の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1)ファージの分離とファージゲノム核酸調製環境中からファージの分離を行った。宿主菌には、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、腸球菌、セラチア菌に対するファージの分離 2 重寒天法により行った。

ファージを宿主菌と培養し、大量培養した。遠心法により菌残渣除去後、ファージ液を濃縮した。濃縮したファージ液を CsCl 密度勾

配超遠心法により精製ファージを調製した。ファージ形態観察、核酸の精製は精製ファージから行った。

はじめに、透過型電子顕微鏡でファージの形態観察を行った。次に、精製ファージより取得したゲノム核酸の塩基配列を次世代シーケンサーで解読した。これらのデータをもとに、ファージの分類を行い、核酸分析に適切なファージの選定を行った。

## (2)核酸分析

標準核酸をクロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS) により分析を行い、標準データの収集を行った (カラム内の保持時間、面積値とモル比、実際の分子量 等)。LC-MS は、精密質量分析器 (Thermo Fisher Scientific 社 Exactive) に UV 検出器 (資生堂 Nanospace SI-2; UV 吸光度 254 nm) を連結した機器を使用した。

標準核酸として、adenosine、thymidine、guanosine、cytidine、2-deoxyuridine を使用した。LC-MS には、精密質量分析器 (Thermo Fisher Scientific 社 Exactive) を使用した。また、ファージゲノム核酸を酵素処理 (Zymo Research 社 DNA

Degradase) によりヌクレオシドへ分解した。ファージヌクレオシドを上記 LC-MS を使用し分析を行い、核酸の同定を行った。コントロールとしてファージ を使用した。

## 4. 研究成果

### (1)ファージの分離

下水より黄色ブドウ球菌ファージ 50 種、緑膿菌ファージ 20 種、腸球菌ファージ 20 種、セラチア菌ファージ 20 種を分離した。これらのファージの形態観察を行った。この形態観察のスクリーニング、またゲノム核酸の抽出により、黄色ブドウ球菌ファージ K、腸球菌ファージ EF24C、黄色ブドウ球菌ファージ S6 を選定し、これらのファージのヌクレオシド分析を行った。

### (2)ファージゲノム核酸の分析

標準ヌクレオシドで、ヌクレオシド測定条件の決定を行った。コントロールとして、非常に性状が明らかにされているファージのゲノム DNA 由来ヌクレオシドの分析を行った。その結果、adenosine、thymidine、guanosine、cytidine が検出された。これにより、酵素で分解したゲノム DNA からヌクレオシド分析が可能であることが証明された (図 1)。

引き続き、ファージ EF24C、ファージ K、ファージ S6 ゲノム DNA をヌクレオシドへ分解し、LC-MS での解析を行った (図 1)。その結果、ファージ EF24C や K では、ファージ同様に adenosine、thymidine、guanosine、cytidine が検出された。それゆえ、これらのファージでは、通常ゲノム DNA が検出された。一方、ファージ S6 では、adenosine、guanosine、

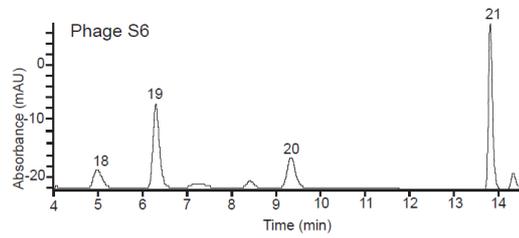
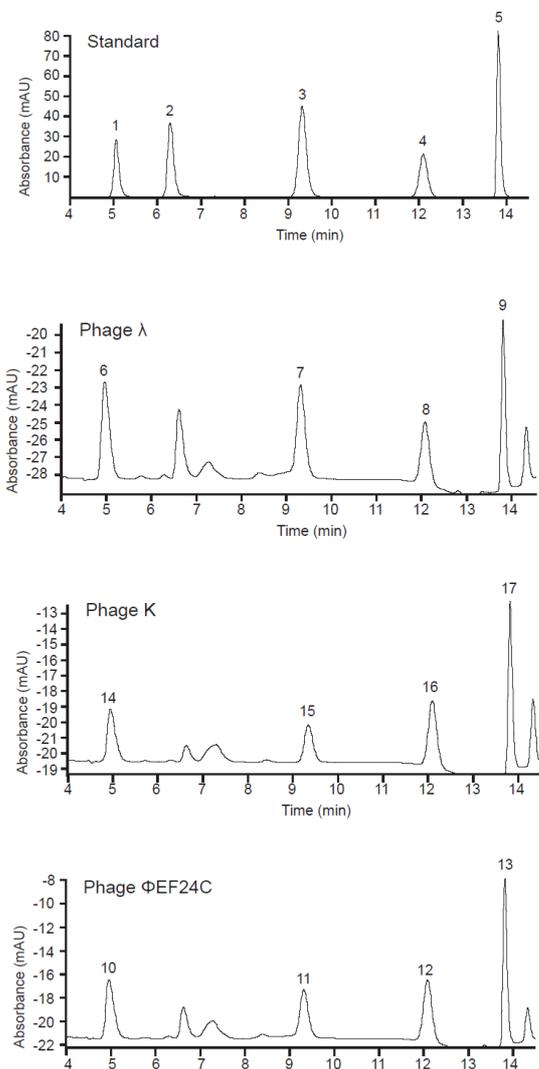
cytidine、2-deoxyuridine を検出した。この結果より、ファージ S6 は、チミンの代わりにウラシルを核酸ベースとして有するゲノム DNA を有していることが明らかにされた。以上から、本研究の研究成果では、特殊なヌクレオシドの発見には至らなかった。

### (3) 本研究成果の意義

本研究の遂行によりウラシルを有する核酸ベースとして有するゲノム DNA を有するファージを発見した。このようなユニークなゲノム DNA を有するウイルスの発見は、生物学上極めて重要であると考えられる。

このようなユニークなゲノム核酸を有する生物の DNA・RNA 合成システムの研究は、本研究で目指している抗ウイルス薬の基盤となるようなヌクレオシドや核酸中間体の発見につながる可能性が期待される。今後、ファージ S6 のゲノム解読にチャレンジし、DNA・RNA 合成システムに関して研究を遂行したい。

### (A)



### (B)

ピーク番号*	解析サンプル	同定したヌクレオシド†	保持時間(分)	理論 m/z	計測 m/z	Δm/z
1		Deoxycytidine	5.11	228.101	228.09769	0.00331
2		Deoxyuridine	6.4	229.085	229.0818	0.0032
3		Deoxyguanosine	9.39	268.107	268.10371	0.00329
4		Thymidine	12.14	243.107	243.09735	0.00963
5		Deoxyadenosine	13.88	252.112	252.10884	0.00316
6	λ	Deoxycytidine	5.12	228.101	228.09784	0.00316
7	λ	Deoxyguanosine	9.39	268.107	268.10384	0.00306
8	λ	Thymidine	12.14	243.107	243.09756	0.00944
9	λ	Deoxyadenosine	13.91	252.112	252.10904	0.00296
10	ΦEF24C	Deoxycytidine	5.08	228.101	228.09795	0.00305
11	ΦEF24C	Deoxyguanosine	9.39	268.107	268.1041	0.0029
12	ΦEF24C	Thymidine	12.15	243.107	243.09756	0.00944
13	ΦEF24C	Deoxyadenosine	13.88	252.112	252.10902	0.00296
14	K	Deoxycytidine	5.01	228.101	228.09781	0.00319
15	K	Deoxyguanosine	9.43	268.107	268.10406	0.00294
16	K	Thymidine	12.18	243.107	243.09755	0.00943
17	K	Deoxyadenosine	13.91	252.112	252.10902	0.00296
18	S6	Deoxycytidine	5.11	228.101	228.09782	0.00318
19	S6	Deoxyuridine	6.40	229.085	229.08181	0.00309
20	S6	Deoxyguanosine	9.39	268.107	268.10381	0.00309
21	S6	Deoxyadenosine	13.88	252.112	252.10912	0.00288

\*ピーク番号は、上表Aに併記している。  
† Deoxycytidine, C8H14N2O4; Deoxyuridine, C8H13N2O5; Deoxyguanosine, C10H14N2O5; thymidine, C10H14N2O3; deoxyadenosine, C10H14N2O5.  
‡ 理論m/zは、H = 1.008, C = 12, O = 15.995, and N = 14.003から算出した。

図 1. LC-MS によるファージゲノム核酸由来ヌクレオシドの解析。(A) LC クロマトグラフ。上から標準コントロール、ファージ λ、ファージ EF24C、ファージ K、ファージ S6 ゲノム核酸由来ヌクレオシド。ESI-MS で測定を行い、ヌクレオシドと同定されたピークに対して番号を付けている。(B) ESI-MS によるヌクレオシド解析結果。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Daibata M. The age of the phage. *Nature*, 査読有, 509, S9, 2014. DOI:10.1038/509S9a

Yamaguchi K, Miyata R, Shigehisa R, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Ujihara T, Sakaguchi Y, Daibata M, Matsuzaki S. Complete genome sequence of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP23 belonging to family Siphoviridae. *Genome Announcements*, 査読有, 2(3), pii: e00233-14, 2014. DOI:10.1128/genomeA.00233-14

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 Research*, 査読有, 189, 43-46, 2014. DOI:

10.1016/j.virusres.2014.04.019

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 and Infection*, 査読有, 16(6), 512-517, 2014, DOI:10.1016/j.micinf.2014.02.011

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*, 査読有, 8, 1949-1952, 2014. DOI: 10.1038/ismej.2014.29

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*, 査読有, 3(2), 257-270, 2014, DOI:10.1002/mbo3.166

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, *Genome Announcements*, 査読有, 2(1), pii: e01010-13, 2014, DOI:10.1128/genomeA.01010-13

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Kato S, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Genomic and phylogenetic traits of *Staphylococcus* phages S25-3 and S25-4 (family Myoviridae, genus Twort-like viruses), *Annals of Microbiology*, 査読有, 64, 1453-1456, 2014, DOI:10.1007/s13213-013-0762-2

内山淳平, 松井秀仁, 内山(竹村)伊代, 渡辺茂, 花木秀明, 松崎茂展. ファージ吸着分子を利用した簡易迅速細菌検出技術. *化学工業*, 査読無, 65(8), 588-595, 2014

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 Microbiology Letters*, 査読有, 347(1),

52-60, 2013, DOI:10.1111/1574-6968.12220

Uchiyama J, Takeuchi H, Kato SI, Gamoh K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, 79(10), 3176-3184, 2013, DOI:10.1128/AEM.03530-12

Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Satoh M, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Synergistic bacteriolysis by bacteriophage  $\phi$ EF24C endolysin ORF9 and lantibiotic nisin, and its application to pulsed-field gel electrophoretic analysis of *Enterococcus faecalis*, *Annals of Microbiology*, 査読有, 63(3), 1209-1211, 2013, DOI:10.1007/s13213-012-0556-y

竹内啓晃, 内山淳平, 松崎茂展, 森本徳仁, 杉浦哲郎. *Helicobacter pylori* のファージに関する基礎研究, *Helicobacter Research*, 査読無, 17(5), 400-405, 2013

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*, 査読無, 30(2), 47-53, 2013

Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato S, Morita T, Muraoka A, Sumi T, Matsuzaki S, Daibata M, Fukushima A. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration. 査読有, *PLoS One*, 7(10), e47742, 2012, DOI:10.1371/journal.pone.0047742

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. *Journal of Virology*, 査読有, 86(20), 11400-11401, 2012

Uchiyama J, Maeda Y, Takemura I, Gamoh K, Matsuzaki S, Daibata M. Analysis of deoxynucleosides in bacteriophages  $\phi$ EF24C and K and the frequency of a specific restriction site in the genomes of bacteriophage subfamily Spounavirinae. *Archive of Virology*, 査読有, 2012, 157(8), 1587-1592, DOI:10.1007/s00705-011-1324-9

Uchiyama J, Rashed M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Matsuzaki S, Daibata M. Genetic characterization of Pseudomonas aeruginosa bacteriophage KPP10. Archive of Virology, 査読有, 157(4), 733-738, 2012, DOI:10.1007/s00705-011-1210-x

[学会発表](計 62 件)

特別講義 [国際] 1 件

Uchiyama J. Bacteriophage research for human health. Mahidol's Day memorial lecture, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand, 24 September 2014. (招待講演)

セミナー [国際] 1 件

Uchiyama J. Bacteriophage in human health and diseases. Mahidol's Day memorial seminar, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 25 September 2014. (招待講演)

ワークショップ [国際] 1 件

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

パネルセッション [国際] 1 件

van der Mee-Marquet N, Girard M, Uchiyama J, Corvaglia A, Bertrand X, Kluytmans J, Donnio PY, Quentin R, Matsuzaki S, Francois P. Staphylococcus aureus CC398 increasingly causing invasive infections in humans: the consequence of the acquisition of a phage of bovine origin?. 10<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10), Panel session, Institut Pasteur, Paris, France, 2-5 October 2013.

一般演題 [国際] 7 件

Jumpei Uchiyama, Iyo Takemura-Uchiyama, Yoshihiko Sakaguchi, Shin-ichiro Kato, Keiji Gamoh, Naoaki Misawa, Masanori Daibata, Shigenobu Matsuzaki. Generalized transduction in vitro among Staphylococcus spp., using a novel phage S6. IUMS (International Union of Microbiological Societies Congress) 2014, Montreal, Canada, 27 July-1 August, 2014.

Iyo Takemura-Uchiyama, Jumpei Uchiyama, Hiroaki Takeuchi, Keiji Gamoh,

Yoshihiko Sakaguchi, Shin-ichiro Kato, Takako Ujihara, Masanori Daibata, Shigenobu Matsuzaki. KHP30-like phages among clinical isolates of Helicobacter pylori. IUMS (International Union of Microbiological Societies Congress) 2014, Montreal, Canada, 27 July-1 August, 2014.

Yoshihiko Sakaguchi, Jumpei Uchiyama, Tomonori Suzuki, Yumiko Yamamoto, Koji Hosomi, Tomoko Kohda, Shigenobu Matsuzaki, Tetsuya Hayashi, Masafumi Mukamoto, Keiji Oguma. Analysis of botulinum neurotoxin type G gene-encoding plasmid in Clostridium argentinense strain 2740. IUMS (International Union of Microbiological Societies Congress) 2014, Montreal, Canada, 27 July-1 August, 2014.

Uchiyama J, Takeuchi H, Sakaguchi Y, Gamoh K, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. A novel type of spherical bacteriophage, Helicobacter pylori bacteriophage KHP30. The 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, 21-25 July 2013.

Sakaguchi Y, Uchiyama J, Suzuki T, Yamamoto Y, Ogura Y, Sakaguchi M, Tsuda C, Matsuzaki S, Hayashi T, Oguma K. Analysis of botulinum neurotoxin type G gene-encoding plasmid in of Clostridium argentinense. The 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, 21-25 July 2013.

Uchiyama J, Uchiyama-Takemura I, Watanabe S, Daibata M, Sakaguchi Y, Matsuzaki S. Bacterial detection system for Staphylococcus aureus based on bacteriophage tail adsorption protein. The 28<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy and Infection (Incorporating the 14<sup>th</sup> Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection), Yokohama, Japan, 5-8 June 2013.

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 12<sup>th</sup> Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM),

Tokyo, Japan, 24-25 March 2014.

#### シンポジウム [国内] 1件

松崎茂展, 内山淳平, 内山伊代, 村上雅尚, 大畑雅典. バクテリオファージ療法の現状と可能性. 2014年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀県, ホテルグランデはがくれ 2014年9月18-19日. (招待講演)

#### 招待講演 [国内] 8件

内山淳平. 黄色ブドウ球菌感染症迅速診断キットを目指したファージクマトグラフ法の開発. 第2回 A-step 発 新技術説明会, JST本部・東京都, 2014年11月20日.

内山淳平. ヒトの健康に関するファージ応用・基礎研究, 京都大学大学院医学研究科微生物感染症学分野セミナー, 京都大学・京都府, 2014年10月17日.

内山淳平. ファージ分子を利用した細菌検出技術の開発. JST発 新技術説明会, JST本部・東京都, 2014年3月11日.

内山淳平. バクテリオファージの応用研究と基礎研究. 第37回アカデミアセミナー in 高知. 高知大学, 高知県, 2014年3月4日.

内山淳平. バクテリオファージのヒト細菌感染症への応用研究、及び、病原細菌学におけるファージ研究. 平成25年度高知信用金庫・高知安心友の会学術賞受賞講演会. 高知県, 2013年11月21日.

松崎茂展, 内山淳平, 内山(竹村)伊代, 大畑雅典. バクテリオファージ研究の現状と展望. 第4回「愛媛微生物学ネットワーク」フォーラム, 愛媛県, 愛媛大学総合研究棟, 2013年11月2日.

内山淳平. バクテリオファージ尾部タンパク質を利用した細菌検出方法. 四国地区5大学発 新技術説明会, JST本部・東京都, 2013年6月21日.

松崎茂展, 内山淳平, 内山(竹村)伊代, 大畑雅典. バクテリオファージの尾部リガンド分子を利用する細菌同定法, 国際医薬品原料・中間体展 2012 (CPhI JAPAN 2012), 東京都, 東京ビッグサイト, 2012年3月21-23日.

#### ワークショップ [国内] 3件

内山淳平, 松崎茂展. ファージセラピーの現状と課題. ファージセラピー臨床応用研究会, 北海道酪農学園大学, 2014年7月19日.

内山淳平. これまでの研究紹介と今後の研究. ファージセラピー臨床応用研究会, 北海道酪農学園大学, 2014年7月19日.

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, 福岡県, 福岡国際会議場, 2012年12月11-14日.

#### 一般演題 [国内] 39件 (省略)

#### [図書] (計2件)

竹崎由佳, 内山淳平, 宗景匡哉, 北川博之, 並川努, 花崎和弘. 膵癌に対する化学療法: 新規治療法はあるのか?. 膵癌療法 up-to-date 2015. 編集者: 海野倫明, 土田明彦. 428 (185-190), 医学図書出版株式会社, 2014年12月5日.

Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Daibata M. Chapter 10. Phage Therapy: Experiments using Animal Infection models. Phage Therapy: Current Research and Applications. Editors: Jan Borysowski, Ryszard Międzybrodzki, Andrzej Górski. 378 (237-256), Caister Academic Press, April 2014.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (2) 研究協力者

蒲生 啓司 (GAMOH, Keiji)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 90204817