

**大阪薬科大学  
共同研究成果報告書**

2015

(2015年4月～2016年3月)

共同研究課題名（研究テーマ）

1. *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明 . . . . . 1  
(研究代表者：微生物学研究室 教授 辻坊 裕)
  
2.  $\delta$ -アミノレブリン酸併用 X 線治療における  
放射線化学修飾効果の生物学的メカニズムの解明 . . . . . 4  
(研究代表者：薬品分析化学研究室 教授 三野 芳紀)
  
3. 疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究 . . . . . 8  
(研究代表者：薬品作用解析学研究室 教授 大野 行弘)
  
4. Prolyl oligopeptidase (POP) substrate selective inhibition kinetics by *in silico*  
discovered candidate inhibitors. . . . . 10  
(研究代表者：生体機能解析学研究室 准教授 坂口 実)

## 共同研究成果報告書

研究代表者 所属 微生物学研究室  
職・氏名 教授・辻坊 裕

研究テーマ：

*Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明

研究期間：

平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日

研究担当者：

### <本学>

研究代表者 辻坊 裕 (大阪薬科大学・薬学部・教授)  
研究分担者 宮本 勝城 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)  
研究分担者 土屋 孝弘 (大阪薬科大学・薬学部・講師)

### <共同研究機関>

研究代表者 舟橋 達也 (松山大学・薬学部・教授)  
研究分担者 田邊 知孝 (松山大学・薬学部・講師)

研究目的：

ヒトに感染症を起こす病原細菌は、宿主生体内で増殖するために鉄を必要とする。したがって、病原細菌の鉄取り込み機構を阻害することにより、ヒトの体内での増殖を抑制することができる。我々は、主に肝臓に基礎疾患を有するヒトに重篤な敗血症を起こす臨床分離株 *Vibrio vulnificus* M2799 株をモデル細菌として用い、本菌株が産生する鉄キレーターであるカテコール型シデロフォア(Vulnibactin)を介した鉄取り込み機構に関するタンパク質群の全容を、プロテオーム解析および変異株の作製により明らかにすることができた。すなわち、M2799 株は、強力な鉄キレーターである Vulnibactin を細胞外に分泌し、ヒトの生体内に存在するトランスフェリン、ラクトフェリンなどから  $\text{Fe}^{3+}$  を奪う。その後、Vulnibactin- $\text{Fe}^{3+}$  は、外膜レセプター VuuA を介してペリプラズム間隙に運ばれ、ペリプラズ

ム結合タンパク質である FatB と複合体を形成し、さらに細胞内膜に存在する ABC transporter を介して取り込まれることを明らかにした。しかしながら、細胞内に取り込まれた Vulnibactin-Fe<sup>3+</sup>の Fe<sup>3+</sup>がどのように還元され、利用されているかは明らかにされていない。そこで、本研究では、Fe<sup>3+</sup>を還元すると推測される種々の遺伝子欠損株を作製して、鉄欠乏下での増殖能について検討し、鉄還元酵素を特定することを目的とする。

#### 本年度の研究内容および研究成果：

*V. vulnificus* M2799 株の Vulnibactin を介する鉄取り込み機構に関与すると思われる遺伝子クラスターに鉄還元酵素と推測される VuuB (VV2\_0837) を見出した。そこで、suicide vector pDM4 を用いて遺伝子欠損株を作製し、鉄欠乏下での増殖能について検討した。その結果、野生株と比較して、遅いながらも増殖が認められたことから、代替タンパク質の存在が示唆された。

*V. vulnificus* M2799 株は、本菌が産生する Vulnibactin 以外のヒドロキサメート型シデロフォアである Aerobactin あるいは Deferoxamine を介する取り込み機構を有しており、それら遺伝子クラスターに、大腸菌のヒドロキサメート型シデロフォア鉄錯体の還元酵素である FhuF と相同性を有するタンパク質 (VV2\_1010 および VV2\_1339) を見出した。クラスターの遺伝子名から、それぞれ IutB および DesB と命名し、それら遺伝子欠損株を作製した。すなわち  $\Delta vuuB$ 、 $\Delta iutB$ 、 $\Delta vuuB\Delta iutB$ 、 $\Delta vuuB\Delta desB$ 、 $\Delta vuuB\Delta iutB\Delta desB$  株を作製し、鉄欠乏下での増殖能について検討した。なお、Vulnibactin 生合成酵素である *ics* 遺伝子欠損株をネガティブコントロールとして用いた。その結果、IutB が代替タンパク質として機能することが明らかとなった (図 1)。しかしながら、ネガティブコントロールである *ics* 遺伝子欠損株と比較して、遅いながらも増殖が認められたことから、更なる代替タンパク質が存在する可能性が示唆された。

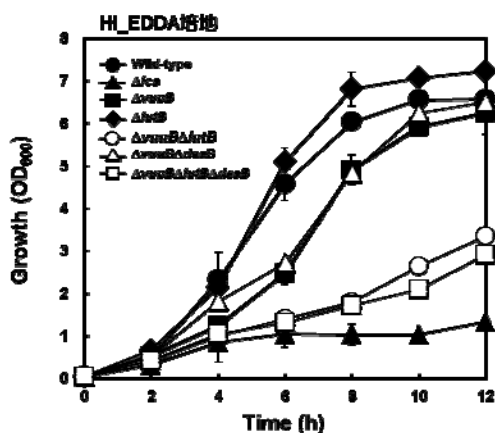


図1.  $\Delta vuuB\Delta desB\Delta iutB$ 株の鉄欠乏下における増殖能

成果発表：

<原著論文>

- ・ なし

<学会発表>

- ・ 宮本勝城、宮野菜央、友尾幸司、知名秀泰、河野広朗、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕.

*Vibrio vulnificus* M2799 株のペリプラズム結合タンパク質 VatD の構造解析  
第 89 回日本細菌学会総会 大阪 (2016 年 3 月).

- ・ 宮本勝城、河野広朗、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕.  
臨床分離株 *Vibrio vulnificus* M2799 株における Vulnibactin 分泌機構の解明.  
第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪 (2015 年 10 月).

- ・ 栗山善成、奥田峻太、成瀬香奈美、成尾侑紀、岩本遼太郎、野口恭平、品川彩、小川悟史、土屋孝弘、宮本勝城、良原栄策、辻坊 裕.

Bam 複合体を標的とした新規抗菌物質の開発.

第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪 (2015 年 10 月).

- ・ 宮本勝城、河野広朗、知名秀泰、宮野菜央、五十嵐智子、友尾幸司、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕.

*Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明.

第 27 回微生物シンポジウム 岡山 (2015 年 9 月).

<その他>

- ・ なし

以上

## 共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬品分析化学研究室  
職・氏名 教授・三野 芳紀

### 研究テーマ：

$\delta$ -アミノレブリン酸併用 X 線治療における放射線化学修飾効果の生物学的メカニズムの解明

### 研究期間：

平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日

### 研究担当者：

#### <本学>

研究代表者 三野 芳紀 (大阪薬科大学・薬学部・教授)  
研究分担者 佐藤 卓史 (大阪薬科大学・薬学部・講師)

#### <共同研究機関>

研究代表者 野々口直助 (大阪医科大学・医学部・助教)  
研究分担者 吉川 信彦 (大阪医科大学・医学部・助教)  
研究分担者 中西 豊文 (大阪医科大学・医学部・准教授)  
研究分担者 朴 陽太 (大阪医科大学・医学部・大学院生)  
研究分担者 川端 信司 (大阪医科大学・医学部・講師)  
研究分担者 梶本 宣永 (大阪医科大学・医学部・特任教授)  
研究分担者 黒岩 敏彦 (大阪医科大学・医学部・教授)

### 研究目的：

共同研究者の野々口らは、 $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) が X 線に対する化学修飾効果を有することを見出している。すなわち、ALA を予め大量に内服することで脳腫瘍細胞にポルフィリンが蓄積し、X 線を照射すると正常脳細胞より脳腫瘍細胞に対して、高感度で

ダメージを与えることができる。このポルフィリンによる化学修飾効果については、いくつかの報告はあるが、そのメカニズムについて明らかにされていない。そこで、我々はその化学修飾効果の発現機序を明らかにするため検討を行った。

#### 本年度の研究内容および研究成果：

一般に放射線照射によりヒドロキシラジカルなどの活性酸素種が生成することが推測されている（文献1）。また、ポルフィリン共存下、光（X線）照射による過酸化水素の生成が報告されている（文献2）。我々は、X線照射により生成した過酸化水素と生体内（脳細胞）の鉄イオン（鉄含有タンパク質などを含む）の反応によりヒドロキシラジカルなどの生体障害性物質が生成する可能性があると考えた。まず最初に、正常脳細胞とポルフィリンの蓄積した脳腫瘍細胞とのX線照射におけるヒドロキシラジカルの生成量について検討することとした。そこで、予備実験として、各種脳細胞のかわりに、pHの異なる3種の緩衝液について、ポルフィリンの有無でのヒドロキシラジカル生成量の相違を見つけることにした。

ヒドロキシラジカルの検出は、DMPOを用いるスピントラッピング法によりESR装置により行った。 $\text{Fe}^{2+}$  ( $3+$ )と $\text{H}_2\text{O}_2$ の系でヒドロキシラジカルを発生させ、ESRにて検出した。いずれのpHでもヒドロキシラジカルのシグナルが検出されたが、 $\text{Fe}^{3+}$ の場合は弱いシグナルしか観察できなかった（Fig. 1）。この結果は文献と合致している。なお、トリス緩衝液（pH 7.5）ではそのシグナルは観察されなかった。以後、最も安定してシグナルの観察が可能であったPBS緩衝液（pH 7.4）を使用することとした。

次に、X線照射によるヒドロキシラジカルの発生の有無について検討した。X線照射は、蛍光X線分析装置のX線発生装置を使用した。0.35M-DMPOのPBS溶液（pH 7.4）1 mLに対してX線（2500W）を1分間照射し、5分後にESRで測定した。その結果、わずかではあるが、ヒドロキシラジカルのシグナルが観察された。そこで、ヒドロキシラジカル生成に対するポルフィリンの共存の影響を調べた。その結果、ポルフィリンの有無におけるラジカル生成量に有意な差は認められなかった。従って、ポルフィリンの影響により、ヒドロキシラジカルの発生量が増加することはないと推測された。そこで、次に活性酸素の一種である過酸化水素に着目した。既に報告されているようにX線照射により過酸化水素が生成すると仮定すると、その過酸化水素と生体成分、特に鉄を含有するタンパ

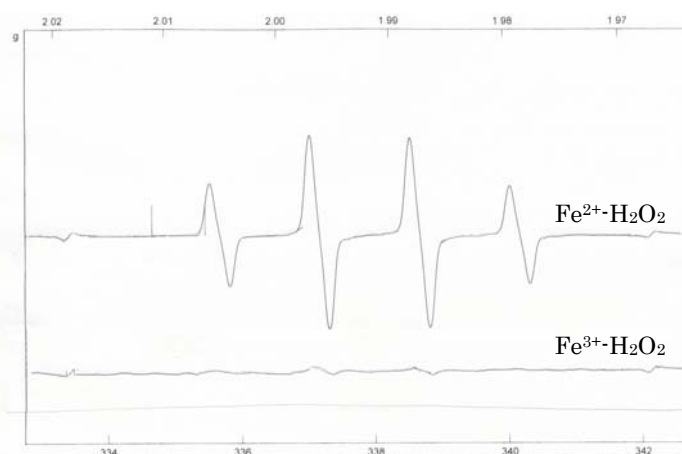


Fig. 1 ESRによるDMPO-OHラジカルの検出

に由来するタンパク質と反応すると推測される。従って、ポルフィリンの影響により、ヒドロキシラジカルの発生量が増加することはないと推測された。そこで、次に活性酸素の一種である過酸化水素に着目した。既に報告されているようにX線照射により過酸化水素が生成すると仮定すると、その過酸化水素と生体成分、特に鉄を含有するタンパ

ク質との疑似フェントン反応により新たに反応性の高い化学種が生成する可能性が考えられた。この反応性の高い物質の評価をDNAの分解能で評価することにした。実際、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素によりDNA分解が起こることが知られている。そこで、過酸化水素と鉄含有タンパク質のDNAに対する分解活性を電気泳動で検討した。ミオグロビン、フェレドキシン、フェリチン、カタラーゼおよびペルオキシダーゼについて調べた結果、カタラーゼ以外は過酸化水素の存在下、DNA分解を起こすことが明らかとなった (Fig. 2, 3)。特にミオグロビンとフェレドキシンの場合はその分解活性は顕著であった。



Fig. 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共存下における各種鉄含有タンパク質の DNA 分解活性

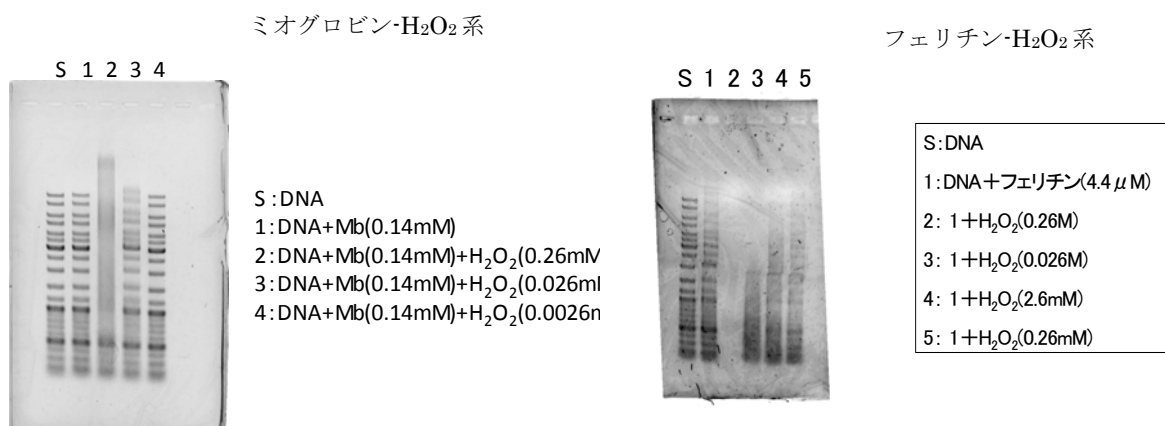


Fig. 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共存下におけるミオグロビンおよびフェリチンの DNA 分解活性

これらの結果は、X線照射により生成する過酸化水素の量がポルフィリンの存在下で増加すると考えれば、正常脳細胞とポルフィリンリッチな脳腫瘍細胞との感受性の違い、すなわちポルフィリンによる化学修飾効果の発現機序の解明に繋がる結果と考えられる。

今後、X線発生装置を利用して、ポルフィリン共存下でのX線照射による、過酸化水素量、ヒドロキシラジカル量、DNA分解活性、色素分解活性などへの影響を精査し、ポル



フィリンによる化学修飾効果の発現機序の解明に向けて、更なる詳細な検討が望まれる。

文献1 : A. J. Carmichael et al., *Radiation Research*, **100**, 222-234 (1984).

文献2 : 駒越圭子ら、日本薬学会第123年会（長崎）講演要旨集、**3**、18 (2003).

成果発表：

<原著論文>

・なし

<学会発表>

・なし

<その他>

・なし

以上

## 共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室  
職・氏名 教授・大野 行弘

### 研究テーマ：

疾患モデル動物を用いたてんかん病愛、薬理研究

### 研究期間：

平成 27 年 10 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日

### 研究担当者：

#### <本学>

研究代表者 大野 行弘 (大阪薬科大学・薬学部・教授)  
研究分担者 清水 佐紀 (大阪薬科大学・薬学部・助手)

#### <共同研究機関>

研究代表者 池田 昭夫 (京都大学・医学部附属病院・教授)

### 研究目的：

てんかんは人口の約 1%に認められる重篤な神経疾患であり、難治性てんかん患者は 20～30%にのぼる。しかし、てんかんの発症メカニズムや遺伝学的背景については未だ不明な点が多い。本研究では、種々の疾患モデル動物を用い、てんかんの病態メカニズムおよび抗てんかん薬の作用機序を解析し、新たな治療法を探索する。

### 本年度の研究内容および研究成果：

ニコチンは神経興奮症状として、振戦、けいれん発作を誘発し、ニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体はてんかんを含む種々の運動障害疾患の発症に関与することが知られている。本研究では、ニコチンにより誘発される神経興奮症状 (振戦およびけいれん) の脳内原因部位とメカニズムを探索する目的で、神経興奮マーカーである Fos 蛋白質の免疫組

組織学的解析および行動薬理的検討を行った。実験には ddY 系雄性マウスあるいは SD 系雄性ラットを用いた。まず、マウスにニコチンを腹腔内投与し、けいれん発現を行動薬理的に評価するとともに、各種 nACh 受容体拮抗薬の作用を評価した。また、ニコチン投与の 2 時間後に脳を摘出し、抗 Fos 抗体を用いた免疫組織染色を行い、各脳部位における Fos 免疫陽性細胞数を計測した。さらに、ニコチンにより Fos 発現が上昇した脳部位について、ラットを用いた電気破壊実験を行った。その結果、ニコチンは 0.5~2 mg/kg の低用量で挙尾および振戦を誘発し、4 mg/kg の投与ではに検討したほとんどの動物でけいれん発作を惹起誘した。これらニコチンによる運動興奮症状は、サブユニット非選択的 nACh 受容体拮抗薬 mecamylamine により完全に、 $\alpha 7$  nACh 受容体拮抗薬 methyllycaonitine により部分的に拮抗されが、 $\alpha 4$  nACh 受容体拮抗薬の dihydro- $\beta$ -erythroidine によってはほとんど影響を受けなかった。脳内 Fos 蛋白の発現を解析した結果、ニコチン 1 mg/kg 投与により、梨状葉皮質、内側手綱核、孤束核、下オリーブ核 (IO) において Fos 発現上昇が認められ、ニコチン 4 mg/kg 投与により、梨状葉皮質、扁桃核内側核、内側手綱核、視床、視床下部、孤束核において有意な Fos 発現の上昇が認められた。さらに、IO の電気破壊によりニコチン誘発振戦が有意に抑制され、扁桃核の電気破壊によりニコチン誘発けいれんが有意に抑制された。本研究結果より、ニコチンは、主に  $\alpha 7$  nACh 受容体を介して運動興奮症状を誘発し、IO が振戦発現、扁桃核がけいれん発現の原因核であることが示唆された。

#### 成果発表：

##### <原著論文>

なし

##### <学会発表>

1. Higor A. Iha, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Yuto Mizuguchi, Miyuki Ohtaka, Hisao Chikamochi, Yuichi Takakubo, Kentaro Tokudome, Masato Kinboshi, Yukihiko Ohno: Nicotine provokes seizures by activating amygdala neurons partly through  $\alpha 7$ -nACh receptors., 第 49 回日本てんかん学会 2015/10/30-31 長崎
2. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Yudai Atsuta, Takanori Nohara, Kento Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Yukihiko Ohno: Effects of anti-tremor agents on nicotine-induced tremor., 第 89 回日本薬理学会年会 2016, 3/9-11 横浜
3. Higor A. Iha, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Yudai Atsuta, Takanori Nohara, Keito Yoshikawa, Kentaro Tokudome and Yukihiko Ohno: Nicotine elicits limbic motor seizures primarily by activating amygdala neurons., 第 89 回日本薬理学会年会 2016, 3/9-11 横浜

以上

## 共同研究成果報告書

研究代表者 所属 生体機能解析学研究室  
職・氏名 准教授・坂口 実

研究テーマ：

Prolyl oligopeptidase (POP) substrate selective inhibition kinetics by *in silico* discovered candidate inhibitors.

研究期間：

平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 坂口 実 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)

<共同研究機関>

研究代表者 Prof. Amiram Goldblum (Molecular Modeling and Drug Design, Institute for Drug Research, The Hebrew University of Jerusalem)

研究目的：

本共同研究は、プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) をモデル酵素として、特定の基質に対する分解活性だけを阻害すると推定される化合物を、市販化合物の中から *in Silico* スクリーニングによってピックアップし、*in vitro* で酵素速度論的に解析して、基質選択的な阻害作用を実験的に証明することを目的とする。

モデル酵素として使用する POP は、30 アミノ酸残基以下のオリゴペプチドに作用して、ペプチド鎖内の Pro 残基のカルボキシ側のペプチド

Substrate	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	K <sub>m</sub> (μM)
Angiotensin III	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	0.6
TRH			pGlu	His	Pro	NH <sub>2</sub>	98
Inhibition	Designed Inhibitor						

結合を加水分解するセリンペプチダーゼであり、生体内で生理活性ペプチドのプロセシングや不活性化にかかわっていると考えられている。Pro 残基を有するヘプタペプチド Angiotensin III (Ang III) とトリペプチドである thyrotropin-releasing hormone (TRH) はどちらも POP の基質となるペプチドであるが、POP のこれらに対する Km 値はそれぞれ 0.6  $\mu\text{M}$  と 98  $\mu\text{M}$  と報告されており、基質ペプチドの鎖長によって極端に Km 値が異なる。したがって、活性部位において長鎖ペプチドの場合だけ相互作用する領域を部分的にブロックすることができれば、短鎖ペプチドの加水分解には影響を及ぼさない活性阻害薬となる可能性がある。このような基質を選択するという新しいコンセプトに基づく酵素阻害薬の開発は、酵素阻害作用を示す医薬品の副作用の軽減につながることを期待できる。

## 本年度の研究内容および研究成果：

本共同研究を開始するにあたり、本年度は ①組換え POP の大腸菌発現系の改良、② Ang III および TRH について POP による分解産物の HPLC による分離定量法の確立を行い、③ Prof. Amiram Goldblum によって、購入可能な 180 万の化合物から *in Silico* デザインによって見出された 20 の候補化合物について POP に対する阻害活性を評価した。

### ①組み換え POP の大腸菌発現系の改良

当研究室において、これまで組換えヒト POP の発現系には pET41/EK-LIC ベクター (Novagen 社) を用いてきた。本ベクターは、溶解性の高い GST 融合タンパク質として発現させることで良好な組換え POP の生産が可能であったが、GST タグの除去に用いるエンテロキナーゼでは POP が分解され、トロンビンではタグの一部が残るなどの問題があった。そこで pGEX ベクター (GE 社) による発現系に構築しなおした。その結果、不要なタグの完全除去および組換え POP の収率を上げることが可能になった。

### ②Ang III および TRH について POP による分解産物の HPLC による分離定量法の確立

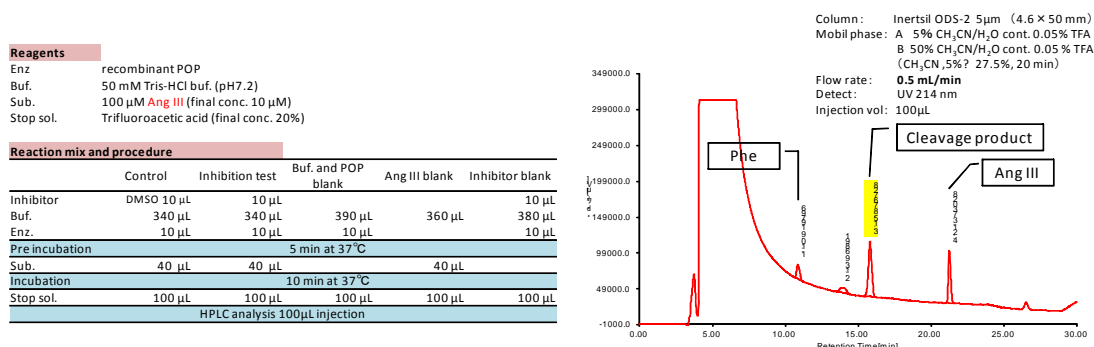


Fig. 1 Ang III と POP との反応条件および HPLC による反応産物の分離分析

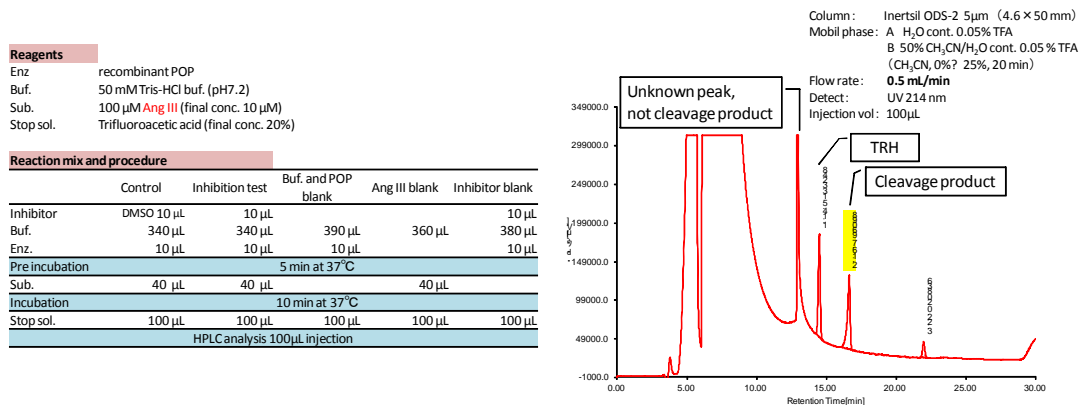


Fig. 2 TRH と POP との反応条件および HPLC による反応産物の分離分析

組換え POP による Ang III および TRH の分解産物の HPLC による定量法を確立した。(Fig. 1, 2) 組換え POP と Ang III との反応液中には, Ang III, Phe および分解物が検出され, 分解物は Ang III から C 末端の Phe が除去されたものであることをプロテインシーケンサーで確認した. また, TRH との反応液中には TRH と分解物が検出された. それぞれ, 未同定のピークが見られるが, 基質や分解産物ではなく反応液組成物由来であることが確認できた. 以上のことから, これらの条件で POP の基質分解活性に及ぼす各種化合物の影響 (阻害活性) の測定が可能であると判断した.

### ③ POP による Ang III および TRH の分解活性に及ぼす各種化合物の影響

②で確立した反応条件および HPLC による分離定量条件で, Prof. Amiram Goldblum から送付されてきた 20 種の候補化合物について, 反応液中の濃度を 100  $\mu$ M に統一して POP による Ang III および TRH の分解活性に及ぼす影響を検討した. また, 我々の研究室で POP 活性の測定に使用する蛍光基質である Suc-Gly-Pro-MCA の分解に対する各種化合物の影響についても検討した.

#### Main observations: (化合物 No. で表記)

- 1) It seems that T6816369 acted as a full inhibitor of TRH (remaining activity 0%) but only as a good inhibitor of Ang III (59%)
- 2) It seems that T5450157 is a good inhibitor of TRH (35%) but not of Ang III (97%)
- 3) It seems that T6436019 is a better inhibitor of TRH (73%) than of Ang III (89%)
- 4) It seems that T6827388 is a weak inhibitor of TRH (75%) but not of Ang III (97%)
- 5) It seems that T5727123 is a weak inhibitor of both TRH (80%) and Ang III (88%)
- 6) It seems that T7088399 is a weak inhibitor of TRH (78%) but not of Ang III (100%)

#### Additional observations:

- 1) Except for 1 out of 20 - T6669772: all others had a better inhibition of TRH than of Ang III

- 2) Except for T6816369 and T5450157: other inhibitors had a very similar effect on TRH and on Suc-Gly-Pro-MCA
- 3) The three strongest inhibitors of Suc-Gly-Pro-MCA were also the top inhibitors of TRH (T5450157, T6436019, T6816369)
- 4) Two weak inhibitors of Suc-Gly-Pro-MCA (T5638984, 88% and T6939594, 78%) did not inhibit similarly TRH or Ang III
- 5) T7088399 inhibits weakly TRH (78%) but not Suc-Gly-Pro-MCA or Ang III

以上の結果から、阻害活性が強力であった、T6816369 と T5450157 について、 $IC_{50}$  値を求めた。

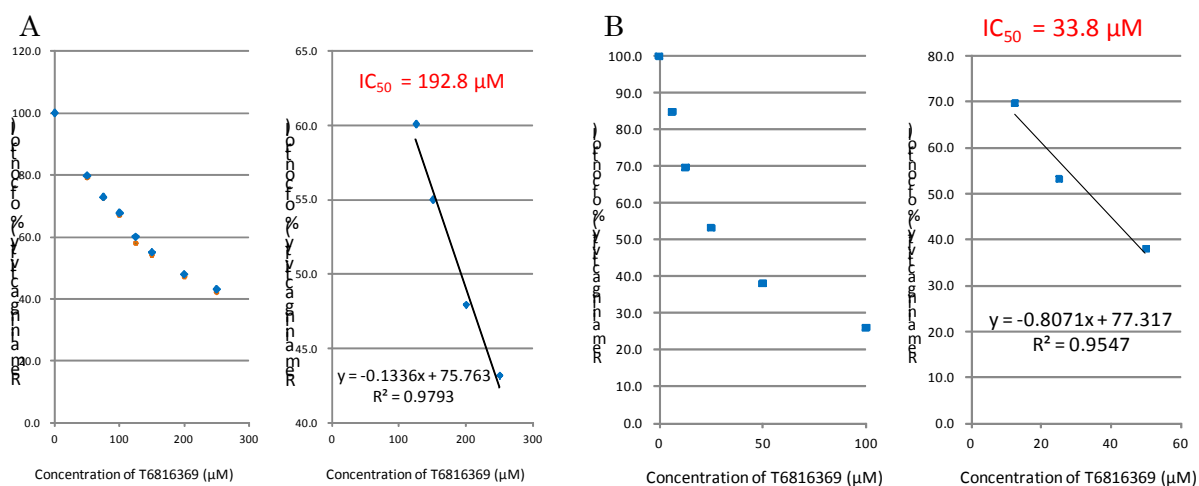


Fig. 3 POP による Ang III (A)および TRH (B)の分解活性に対する T6816369 の阻害活性

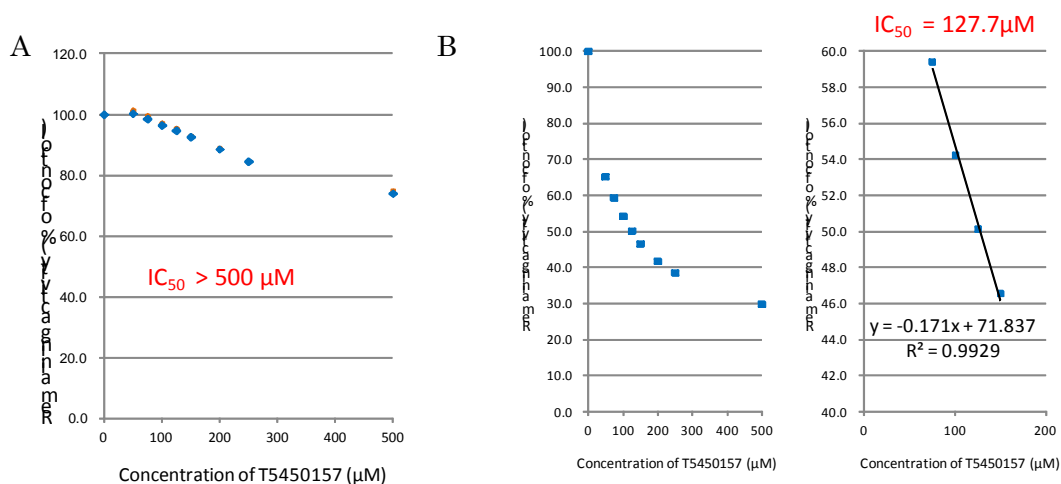


Fig. 4 POP による Ang III (A)および TRH (B)の分解活性に対する T5450157 の阻害活性

Table 1. T6816369 と T5450157 の IC<sub>50</sub> 値

IC <sub>50</sub> (μM)	Ang III	TRH
T6816369	192.8	33.8
T5450157	> 500	127.7

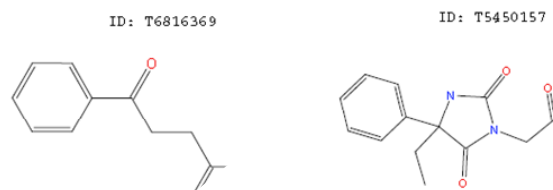


Fig. 5 T6816369 と T5450157 の構造  
(部分構造)

Fig. 3 および 4 の結果を Table 1 にまとめた. T6816369 および T5450157 とともに, POP の Ang III および TRH の分解に阻害活性を示したが, どちらの化合物も TRH に対する阻害活性の方が強力であった.

以上の結果から, 購入可能な既知化合物から *in Silico* デザインによって抽出された化合物のうち 2 つの化合物に強い阻害活性のあることが *in vitro* で確認された. これらは, Ang III と TRH を識別する基質選択的な阻害作用を示さなかったが, 目的とする基質選択的阻害薬のデザインに有益な情報が得られた. 今後も, 新たに選択された化合物について *in vitro* における阻害活性測定および反応速度論的解析を継続していく予定である.

成果発表 :

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・なし

<その他>

- ・なし

以上