

病原真菌研究部門 真菌資源開発分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Fungal Resources and Development)

教授：福島和貴

○学内委員 施設整備委員会亥鼻地区専門部会委員，海洋バイオシステム研究センター運営委員会委員，保健管理センター運営委員会委員，環境保全委員会委員，有害廃棄物処理施設運営委員会委員，有害廃棄物処理施設運用委員会委員，医学薬学府・薬学研究院総合研究棟建設検討委員会委員，病原真菌研究部門の危害防止主任者

○学外委員 日本菌学会理事，日本菌学会名誉会員選考委員会委員，日米菌学会合同大会（2005年）準備委員会委員，日本菌学会創立50周年記念事業委員会委員，日本医真菌学会評議員，日本医真菌学会規約検討委員会委員

○センター内委員 運営協議会委員，教員会議委員，総務委員会委員，有害廃棄物委員会委員長，自己点検・評価委員会委員

助教授：横山耕治

○学外委員 日本医真菌学会評議員，日本微生物資源学会理事，第10回国際微生物保存会議実行委員

○センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共用備品委員会委員，微生物委員会委員，広報委員会委員，自己点検・評価委員会委員，実験動物W・G委員，個人評価W・G委員

非常勤講師：前林行雄（東京情報大学 教授）

研究機関研究員：近森 稔

研究補助員：遠藤成朗（2004年5月まで）

大学院自然科学研究科 博士前期課程：橋爪藤子（4月より）

研究概要

1. 真菌由来の新規二次代謝産物に関する研究

本研究では特に抗真菌作用を有する二次代謝産物の研究を行っており，以下に記す新規物質を見出した。

ブラジル由来の未同定真菌 IFM 52672 より見出した新規 nonadride 物質，dihydroepihevadride についてその

化学構造，抗真菌活性を明らかにし，また同時に単離された deoxoepihevadride の X 線結晶解析によりこれら nonadrides の絶対構造についても明らかにすることができ，公表した。

Eupenicillium javanicum IFM 52670 より，数種の compactin 誘導体とともに新規の decalin 化合物である eujavanoic acid A, B を発見し，これらの化学構造を明らかにした。同時に，化学構造と抗真菌活性の相関性についても明らかにすることができ，公表した。

また，*Talaromyces flavus* IFM 52668 の培養体の抽出液から抗 *Aspergillus fumigatus* 作用を示す新規物質の 9, 14-epoxy-11-deoxyfunicone の構造解析についても公表した（福島和貴，滝澤香代子，近森 稔，河合賢一，細江智夫，板橋武史，野沢幸平，Campos Takaki GM, Okada K）。

2. 病原性黒色真菌ならびに関連菌の分子同定・系統分類に関する研究

黒色真菌症原因菌の PCR による高精度，迅速同定法の開発研究を系統・化学分野との共同研究で行っている。*Hortaea werneckii*, *Fonsecaea* 属菌に続き，本年度は chromoblastomycosis の原因菌となる *Cladophialophora carrionii* について，ITS 領域の塩基配列情報をもとに PCR 法による同定法を開発したので公表した。またリアルタイム PCR による同定のための TaqMan プローブも開発できた。

標題の病原性黒色真菌ならびに関連菌の同定に関する研究では，rDNA の D1/D2 領域が極めて有用であることも見出し，公表した。同時にこれら菌類の D1/D2 領域の塩基配列に基づく系統関係についても公表した。さらに本年は *Phialophora* 属菌について約 40 菌種を対象に，ユビキノンを解析をまじえた研究を行い極めて興味深い結果が得られつつある。*Phialophora* 属菌では基準種の *P. verrucosa* と *P. americana* について同一種説と異種説があるが，本研究では rDNA の NTS 領域（約 3.5 kb）の全塩基配列を解析し，同一種説を支持する見解を学会で発表し

た（福島和貴，滝澤香代子，Paride Abliz，橋爪藤子，近森 稔，西村和子）。

3. 病原真菌の新規遺伝子のクローニングとプロテオミクス

本課題は前年度に継続して行われており，病原酵母 *Cryptococcus neoformans* の銅，亜鉛などの金属に関わる遺伝子のスクリーニングで，新規遺伝子 *CnHXT1* がクローニングされ，本遺伝子が hexose transporter, *CnHXT1* をコードすることを先ず明らかにした。ついで全アミノ酸配列，10箇所の膜貫通ドメインの存在，他菌類の HXT プロテインを対象とした系統解析を明らかにした。さらに遺伝子破壊株を作製し，野生株との間における糖輸送能，細胞発育，細胞形態，莢膜形成，抗真菌剤に対する感受性，メラニン生成などについて比較した。その結果，糖輸送機能で両株に差異が認められ，莢膜形成にも違いが認められたが，他の機能面での両株における差異はさほど大きくないことが見出された（近森 稔，福島和貴）。

4. 真菌症の疫学研究

近年，本邦で *Trichophyton tonsurans* による皮膚真菌症がブレイクアウトしている。本研究では菌株識別法の確立を目指した。原因菌である *T. tonsurans* は本来国外に由来すると考えられることから，特にブラジル，中国，イタリアなどの国外由来株を対象に rDNA の NTS 領域による PCR-RFLP を検討した。その結果 *DbeI* により 4 種の株タイピングが可能であることを明らかにしたので公表した（Paride Abliz，福島和貴，滝澤香代子，Motta CS，Vidotto V，席 麗艶，西村和子）。

ブラジルの HIV 感染患者の口腔内 *Candida* flora について公表した。本研究の結果，*Candida albicans* の分離頻度（57.7%，n=173）は健常人（83.8%，n=31）に比べ低下し，いわゆる non-*albicans* *Candida* の増加がみとめられ，その中には *C. norvegensis*，*C. intermedia* といった分離が希な菌種も同定された（Melo NR，田口英昭，福島和貴，西村和子，宮治 誠）。

5. 稀な臨床分離株の同定

系統・化学分野との共同研究で，中国広州の外傷性眼炎患者の患部から中国で最初，アジアで 2 例目となる *Arthrographis kalrae* を原因菌と同定し，公表した（席 麗艶，福島和貴，滝澤香代子，西村和子）。

6. 接合菌の生化学，酵素学的研究

接合菌 *Cunninghamella elegans* におけるポリリン酸の生成，蓄積に及ぼすリン酸の効果，また *Mucor circinelloides* のキチン合成に対する各種培地成分，培養時間の影響について公表した（Campos-Takaki GM，福島和貴）。

7. 病原真菌ならびに関連菌の国際的収集，および DDBJ への遺伝情報の登録

ブラジル，イタリア，スペイン，トルコ，フランス，中国などから *C. neoformans*，*Candida dubliniensis* および *Candida* spp.，*Penicillium marneffei*，dermatophytes，dematiaceous fungi など約 80 株が収集された。DDBJ へは rDNA の ITS，D1/D2 領域の塩基配列 82 を登録した（福島和貴，滝澤香代子，Paride Abliz，橋爪藤子）。

8. ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子を基にした病原真菌ならびに関連菌の同定・系統解析，真菌症診断に関する研究

ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子の一部塩基配列（約 400bp）を解析しこの配列が種に特異的であり，種内変異も解析できることを明らかにした。このプロジェクトでは，既に 13 報（1998-2004）の論文を発表している。現在投稿準備中の菌は，*Penicillium* 属，*Trichosporon* 属，*Malassezia* 属であり，解析を終了し論文作成中の菌は，*Fusarium* 属，*Histoplasma* 属，*Sporothrix* 属，皮膚糸状菌などがある。迅速同定法として深在性輸入真菌症の原因菌ペニシリウム・マルネッフェイ（*Penicillium marneffei*）を特異的に検出することができる核酸を提供する特許を千葉大から申請中である（横山耕治，遠藤成朗，小森隆嗣，S.K. Biswas，王 麗，西村和子）。

9. *Candida albicans* の病原性，形態変換能（二形性）に関する研究

Candida albicans は，病原真菌の中で高頻度に分離される酵母で，二形性を示しその形態変換能が病原性を示すと考えられる。この様な形態変換メカニズムの解明は生物学的な興味だけではなく，医療に役立つと考えている。DNA 阻害剤，m-RNA 合成阻害剤，タンパク質合成阻害剤を作用させ発芽に関与するメカニズムを検討中であり，DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析を試みている（横山耕治，遠藤成朗，今西由巳，西村和子）。

10. 真菌資源の長期安定保存法の開発

菌糸形細胞は、酵母形や分生子と異なり乾燥保存には耐えにくく、保存中に死滅する場合が多い、特に分生子を作らない株や作りにくい種においては、従来のL-乾燥保存には耐えられない、そこで、乾燥前の処理に工夫を凝らし、分散媒や乾燥保護剤を検討してL-乾燥で保存できる方法を開発中で、生存率の改善が見られた。このテーマで（財）発酵研究所から研究助成を受けている（横山耕治、遠藤成朗、伊藤純子）。

研究成果

1. 原著

英文

- 1) Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K: Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domains sequence analysis. FEMS Immun Med Microbiol 40: 41-49, 2004.
- 2) Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K: Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. J Clin Microbiol 42: 404-407, 2004.
- 3) Abliz P, Souza Motta CM, Deng S, Magalao OM, Xi L, Vidotto V, Takizawa K, Nishimura K, Fukushima K: Molecular typing of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP of the ribosomal DNA nontranscribed spacer region. J Dermatol Sci 36: 125-127, 2004.
- 4) Melo NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M: Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 99: 425-431, 2004.
- 5) Xi L, Fukushima K, Lu C, Takizawa K, Liao R, Nishimura K: First case of *Arthrographis kalrae* ethmoid sinusitis and ophthalmitis in the People's Republic of China. J Clin Microbiol 42: 4828-4831, 2004.
- 6) Komai S, Hosoe T, Itabashi T, Nozawa K, Okada K, Campos Takaki GM, Chikamori M, Yaguchi T, Fukushima K, Miyaji M, Kawai K: A new funicone derivative isolated from *Talaromyces flavus* IFM 52668. Mycotoxins 54: 15-19, 2004.
- 7) Hosoe T, Fukushima K, Itabashi T, Nozawa K, Takizawa K, Okada K, Campos Takaki GM, Kawai K: A new nonadride derivative, dihydroepihevadride, as characteristic antifungal agent against filamentous fungi, isolated unidentified fungus IFM 52672. J Antibiot 57: 573-578, 2004.
- 8) Hosoe T, Fukushima K, Itabashi T, Nozawa K, Takizawa K, Kawai K: The absolute structures of dihydroepihevadride, as characteristic antifungal agent against filamentous fungi, and its related compounds from unidentified fungus IFM 52672. Heterocycles 63: 2581-2589, 2004.
- 9) Okamoto S, Hosoe T, Itabashi T, Nozawa K, Okada K, Campos Takaki GM, Chikamori M, Yaguchi T, Fukushima K, Miyaji M, Kawai K: New decalin derivatives, eujavanoic acids A and B, from *Eupenicillium javanicum*. J Nat Prod 67: 1580-1583, 2004.
- 10) Andrade VS, Barros Neto B, Fukushima K, Campos Takaki GM: Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – a factory study. Revista Iberoamericana de Micologia 20: 149-153, 2003.
- 11) Lima MAB, Nascimento AE, Campos Takaki GM, Sousa W, Fukushima K: Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. Brazilian J Microbiol 34: 363-372, 2003.
- 12) Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Otori A, Kamei K, Franco M, Miyaji M, Nishimura K: Detection of *gp43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett 234: 93-97, 2004.
- 13) Imanishi Y, Yokoyama K, Nishimura K: Induction of germ tube and hyphal formations are controlled by mRNA synthesis inhibitor in *Candida albicans*. Jpn J Med Mycol 45: 113-119, 2004.
- 14) Ichikawa T, Sugita T, Wang L, Yokoyama K, Nishimura K, Nishikawa A: Phenotypic switching and β -N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. Microbiol Immunol 48: 237-242, 2004.

2. 学会・シンポジウム等における招待講演

- 1) 横山耕治: 第25回関東医真菌懇話会 病原真菌の分類と命名 アスペルギルス属. 第25回関東医真菌懇話会, 講演抄録 p.27, 東京, 2004.
- 2) 横山耕治: マラセチアの基礎と臨床 *Malassezia* の多遺伝子解析による系統分類と同定の新展開 ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1) 56: 2004.

3. 一般発表

国際

- 1) Vidotto V, Pugliese A, Itokuwa S, Nakamura K, Aoki S, Melhem M, Fukushima K: Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* isolated from AIDS patients in different countries. 10th Congress of the European Confederation of Medical Mycology. Abstracts p86, June 17- 20, Wroclaw, Poland, 2004.
- 2) Zeng J, Fukushima K, Zeng Y, Takizawa K, Kamei K, and Nishimura K: Comparison among inoculum forms of *Pseudallescheria boydii* isolates on *in vitro* antifungal susceptibility to three azole agents. IXth International Congress of Dermatology, Abstracts p. 321, May 19-22, Beijing, China, 2004.
- 3) Yokoyama K, Biswas SK, Wang L, Endo S, Komori T, Nishimura K: Phylogenetic relationships among basidiomycetous yeasts based on mitochondrial cytochrome *b* gene. 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10), Proceedings of the ICC-10, p. 569, Tsukuba, Japan, 2004.
- 4) Wang L, Yokoyama K, Biswas SK, Endo S, Nishimura K: Application of mitochondrial cytochrome *b* gene in phylogeny, classification and identification of clinical isolates of *Fusarium*. 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10), Proceedings of the ICC-10, p. 569, Tsukuba, Japan, 2004.

国内

- 1) 堀江義一, Paride Abliz, 福島和貴, Kaoru Okada, Campos Takaki GM: ブラジルにおけるコーヒーの ochratoxin 生産菌の自然汚染と汚染菌の伝播. 第55回マイコトキシン研究会学術講演会, 講演要旨集, 東京, 2004.
- 2) Paride Abliz, 福島和貴, 滝澤香代子, 西村和子: LSUrDNA の D1/D2 領域の塩基配列による病原性黒色真菌の同定. 東北真菌懇話会第15回例会記録 p.4, 仙台, 2004.
- 3) 堀江義一, Paride Abliz, 福島和貴, Kaoru Okada, Campos Takaki GM: ブラジルのコーヒー豆における ochratoxin 生産菌の自然汚染と伝播. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p.69, 長崎, 2004.
- 4) 埋橋志穂美, 今津道夫, 福島和貴, 滝澤香代子: 長野県下の高冷地耕作土壌から分離された *Phytium* 属菌について. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p.41, 長崎, 2004.
- 5) 滝澤香代子, 曾 敬思, 福島和貴, 西村和子: *Pseudallescheria boydii* (anamorph: *Scedosporium apiospermum*) 同定指標としての D1/D2 領域の塩基配列および IGS の RFLP による種内多型. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p.91, 長崎, 2004.
- 6) 福島和貴, 滝澤香代子, Paride Abliz, 西村和子: 皮膚糸状菌 *Trichophyton tonsurans* の intergenic spacer (IGS) の RFLP による種内多型解析. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p.91, 長崎, 2004.
- 7) 近森 稜, Valerio Vidotto, 福島和貴: *Cryptococcus neoformans* 由来の新規トランスポーター遺伝子のクローニング. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p.92, 長崎, 2004.
- 8) 福島和貴, 滝澤香代子, Paride Abliz, 西村和子: *Trichophyton tonsurans* の intergenic spacer (IGS) の RFLP による種内多型解析. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 76, 2004.
- 9) 田口英昭, 亀井克彦, 渡辺 哲, 佐藤綾香, 福島和貴: BioCell Tracer によるヒト血清中 micafungin の *Aspergillus fumigatus* 菌糸に対する薬効評価に関する基礎的研究. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 84, 2004.
- 10) 近森 稜, 滝澤香代子, 橋爪藤子, 西村和子, 福島和貴: 病原性黒色真菌 *Phialophora verrucosa* および *Phialophora americana* の IGS の塩基配列解析: 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 92, 2004.
- 11) 滝澤香代子, 曾 敬思, 福島和貴, 西村和子: *Pseudallescheria boydii* (anamorph: *Scedosporium apiospermum*) の同定指標としての D1/D2 領域の評価および IGS

のRFLPによる種内多型解析. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 92, 2004.

- 12) 橋爪藤子, 滝澤香代子, 西村和子, 福島和貴: LSUrDNAのD1/D2領域の塩基配列による *Phialophora* 属菌の同定と分子系統. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 93, 2004.
- 13) 細江智夫, 福島和貴, 板橋武史, 野沢幸平, 滝澤香代子, 河合賢一: 未同定真菌 IFM52672 からの抗真菌物質の分離と構造決定. 第46回天然物討論会, 講演要旨集 p. 695, 広島, 2004.
- 14) 駒井信一郎, 細江智夫, 板橋武史, 野沢幸平, 矢口貴志, 福島和貴, 河合賢一: *Eupenicillium brefeldianum* IFM 52667 株の成分検索. 第124回日本薬学会, 講演要旨集 p. 135, 大阪, 2004.
- 15) 若菜大悟, 野沢幸平, 細江智夫, 板橋武史, 矢口貴志, 福島和貴, 河合賢一: ブラジル土壌から単離した *Penicillium citrinum* 13H105 株の成分検索. 第124回日本薬学会, 講演要旨集 p. 136, 大阪, 2004.
- 16) 細江智夫, 板橋武史, 野沢幸平, 福島和貴, 滝澤香代子, 近森 穰, 宮治 誠, 河合賢一: 未同定真菌 IFM 52672 株から分離した抗真菌活性物質について. 第124回年会日本薬学会, 講演要旨集 p. 158, 大阪, 2004.
- 17) 細江智夫, 福島和貴, 滝澤香代子, 近森 穰, 宮治 誠, 河合賢一: ブラジル土壌からの分離真菌 IFM 52673 株から単離された dihydroveadride の構造とその活性について. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 90, 2003.
- 18) 遠藤成朗, 小森隆嗣, 横山耕治, Biswas SK, 王 麗, 西村和子: チトクローム *b* 遺伝子による *Malassezia* 属菌同定用DNAチップの開発. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 90, 2004.
- 19) 横山耕治, 王 麗, Biswas SK, 遠藤成朗, 西村和子: 輸入真菌症原因菌 *Penicillium marneffei* の迅速同定と *Penicillium* 属菌の系統関係について. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1): 92, 2004.
- 20) 村山琮明, 横山耕治, 遠藤成朗, 西村和子, 渋谷和俊: *In situ* hybridization (ISH) 法による組織内 *Aspergillus flavus* の特異的検出. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (増1号): 83, 2004.

国際交流

1. 共同研究

福島和貴

- 1) AIDSと真菌症に関する研究, Valerio Vidotto教授 (イタリア トリノ大学).
- 2) 中国南西地域における真菌症の疫学研究, 席 麗艶教授 (中国, 中山大学附属第二医院).
- 3) 接合菌の生化学, 酵素学的研究
Galba Maria de Campos-Takaki教授 (ブラジル ペルナンブコカソリック大学).
- 4) 病原真菌の系統保存と疫学研究
Cristina Souza Motta助教授 (ブラジル連邦立ペルナンブコカソリック大学).
- 5) Comparative genomics in search of origins of human pathogenicity in the fungal tree of life focusing on species with high morbidity and mortality in Chinese patients.
G. S. de Hoog教授 (オランダ, CBS).
- 6) ブラジルにおける土壌中のカビ毒産生菌とヒトの病原真菌の生態, 分布と種多様性
Okada K助教授 (ブラジル連邦共和国 ペルナンブコカソリック大学).
- 7) 中国西部における真菌症の疫学研究
Paride Abliz講師 (中国 新疆医科大学).

横山耕治

- 1) チトクローム *b* 遺伝子に基づく菌類の同定と系統解析
王 麗 教授 (中国 吉林大学), 2002~
- 2) チトクローム *b* 遺伝子に基づく酵母類の同定と系統解析
Swaradit Kumar Biswas博士 (アメリカ合衆国 テキサス工科大学健康科学センター), 2003~

2. 海外渡航

- 1) 福島和貴: 平成15年度在外研究員(創造開発研究): エイズ患者の真菌症に関する研究, イタリア・トリノ大学, スペイン・バスコ大学, 2004. 3. 12~30.
- 2) 福島和貴: 「イギリス菌学会年会2004」に招待を受け, 日英両菌学会間の学術交流の推進討議. ノッチンガム大学, 2004. 9. 11~18.
- 3) 福島和貴: 新疆医科大学 (共同研究討議). 2004. 8. 23-29.

学会等活動

- 1) 福島和貴:特別講演座長, 西本勝太郎「カビの生活・ヒトの生活」, 日本菌学会第48回大会, 長崎, 2004.
- 2) 福島和貴:座長, 第48回日本医真菌学会総会, 横浜, 2004.
- 3) 横山耕治: 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10), Tsukuba, Japan, 2004, 10. 10-15. 実行委員.

教育活動

学位指導 (大学院医学薬学府 博士課程)

福島和貴

Paride Abliz: Development of rapid and accurate identification methods based on the ribosomal RNA gene for pathogenic fungi.

学内授業科目

福島和貴: 普遍教育「生命科学A3」,

医学部4年次医学生命科学特論・研究 (～2003),

大学院自然科学「真菌系統論」.

横山耕治: 医学部4年次医学生命科学特論・研究 (2003).

講演など

福島和貴: Molecular identification and phylogeny of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa. トリノ大学, 2004. 3.

社会的活動

- 1) 福島和貴, 滝澤香代子, 近森 稔, 河合 清: 千葉大学オープンリサーチ発表「銀イオンの抗真菌作用に関する研究」. 2004, 9. 23.
- 2) 福島和貴, 滝澤香代子: ベンチャー企業「プロザテック」との共同研究: 抗真菌活性の検討.

特許

発明人: 横山耕治, 王 麗, S.K. Biswas, 遠藤成朗, 西村和子.

発明の名称: 「新規ポリヌクレオチド, それを用いた深在性輸入真菌症原因菌ペニシリウム・マルネツフェイ (*Penicillium marneffei*) の検出用核酸を用いたペニシリウム・マルネツフェイの検出方法およびキット」

出願日: 平成16年6月7日.

出願番号: 特願2004-197446号.

出願人: 千葉大学.

外部資金

福島和貴 (分担), 西村和子 (代表) 「ナショナルバイオリソース病原微生物」.

その他研究助成

横山耕治 (代表)・(財) 発酵研究所: 菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価, 300万円.