

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10076

研究課題名（和文）骨石灰化における局所リン産生機構の意義 - ALPの重要性 -

研究課題名（英文）Local phosphorus production system in bone mineralization: role of alkaline phosphatase

研究代表者

窪田 拓生 (Kubota, Takuo)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40629135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：骨・軟骨石灰化におけるアルカリホスファターゼ（ALP）によるリン産生の意義は明らかではない。ヒト間葉系幹細胞やヒト低ホスファターゼ患者由来誘導骨芽細胞を用いた石灰化誘導培養実験によって、ALP活性、リン濃度、ピロリン酸濃度、リン/ピロリン酸濃度比が骨石灰化や骨芽細胞分化マーカーに影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨・軟骨石灰化におけるアルカリホスファターゼ（ALP）によるリン産生の意義は明らかではない。ヒト間葉系幹細胞やヒト低ホスファターゼ患者由来誘導骨芽細胞を用いた石灰化実験によって、ALP活性、リン濃度、ピロリン酸濃度、リン/ピロリン酸濃度比が骨石灰化や骨芽細胞分化マーカーに影響を与える可能性が示唆された。成長障害を伴う骨や軟骨の石灰化障害、骨脆弱性疾患の病態解明や新規治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Local phosphorus production system and role of alkaline phosphatase in bone and cartilage mineralization remain to be elucidated. Osteoblast-mediated mineralization study using human bone marrow derived mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells derived from patients with hypophosphatasia suggested that alkaline phosphatase activity, phosphorus levels, pyrophosphate levels and phosphorus/pyrophosphate ratio affect bone mineralization and osteoblastic differentiation markers.

研究分野：小児科学

キーワード：小児科学、小児骨代謝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格の石灰化は、骨芽細胞が分泌した I 型コラーゲンを中心とする骨基質蛋白にカルシウムとリンがハイドロキシアパタイトの形で沈着することで進行する。骨の石灰化には細胞外マトリックスに存在するリンやカルシウムとともに、石灰化阻害物質であるピロリン酸が重要な役割を果たしているが、骨の石灰化過程の調節機構は十分には明らかではない。骨・軟骨における石灰化障害を来す代表的な疾患である X 連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) やビタミン欠乏性くる病の検討からは、全身的な低リン血症に付随する骨・軟骨でのリン不足がくる病の病態の中心であると理解されている。

骨の石灰化過程において、組織非特異型アルカリホスファターゼ (ALP) はピロリン酸を分解することにより石灰化を促進していると考えられている。ALP はリン酸エステル結合を有する分子を分解して無機リン酸を供給していると想定されているが、十分には検証されておらず、くる病における血清 ALP 値上昇の意義についても明らかではない。くる病における ALP の代償的な増加が、石灰化局所のリンの需要に比べて十分ではなく、局所のリン欠乏に生体として対応できていない可能性がある。この仮説が正しければ、くる病の進行予防のためには、石灰化局所においてより多くのリン、ALP 活性が必要となる。また、くる病の治療過程においては血清 ALP 値の低下が見られる。血清 ALP 値の低下は、診療現場でくる病の改善の指標とされているが、実際には ALP 低下によるリン産生の減少は、骨・軟骨の石灰化局所へのリンの供給不足を引き起こし、くる病の改善を遅延させうる。したがって、ALP を上昇させ、骨の石灰化局所でリン濃度を増加させることができれば、石灰化が促進し、くる病の改善が早まると期待される。

低ホスファターゼ症 (HPP) は、*ALPL* 遺伝子の機能喪失変異によって発症する稀な疾患で、骨の低石灰化、くる病様変化、血清 ALP 値の低下、血清ピロリン酸濃度の増加を特徴とする。最近、骨への親和性を高めたヒト組換え ALP による酵素補充療法が開発され、顕著な治療効果が報告されている。一部には、酵素補充療法中に高リン血症を認める症例があり、ALP の投与は、ピロリン酸を分解するだけでなく、骨局所で効果的にリンを産生する治療法である可能性がある。

2. 研究の目的

骨石灰化は、骨基質にカルシウムとリンがハイドロキシアパタイトの形で沈着することによって形成されるが、その詳細は明らかではない。リンが骨石灰化に必須であり、循環血液のリン濃度が骨石灰化に影響を与えていることは明らかであるが、骨局所のリン調節機構は不明である。適切な骨石灰化のために、局所のリン濃度が調節されている可能性は十分ある。骨形成・骨石灰化を担う骨芽細胞に豊富に発現する ALP が骨石灰化局所のリン産生を担っている可能性がある。低ホスファターゼ症などの検討から石灰化阻害物質であるピロリン酸を分解することが主要な役割であると考えられているが、リン酸エステルを有するピロリン酸や他の分子を分解し、骨石灰化局所にリンを供給することも役割の一つと推定される。また、野生型 ALP と低ホスファターゼ症重症型の変異 ALP を比較することによって、ヒトの病態を反映した骨芽細胞の石灰化やリン供給を検討する。

骨石灰化に対する ALP による局所でのリン産生の重要性が、骨芽細胞、低ホスファターゼ症モデル骨芽細胞、野生型マウス、XLH モデルマウスの検討によって、評価できると予想される。この結果は、骨石灰化障害を来す XLH などの遺伝性くる病に対して、ALP 投与による骨石灰化促進療法の開発につながる可能性がある。また、XLH 患者における血清 ALP 値と血清 FGF23 濃度、くる病の重症度との関連性を検討する。以上より、骨石灰化における ALP によるリン産生の重要性を検証し、骨・軟骨石灰化障害を来す疾患に対する石灰化促進療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養、試薬：ヒト皮膚線維芽細胞は、患者もしくは代諾者に説明し同意を得た上で、*ALPL* 遺伝子の c.1559delT 病的バリエーションをホモ接合性に有する患者より採取した。健常ヒト皮膚線維芽細胞 (Thermo Fisher Scientific) を購入した。既報に従い、皮膚線維芽細胞を iPS 細胞に誘導し、さらに、神経堤細胞、間葉系幹細胞 (hiPS-MSC) に誘導した。hiPS-MSC、SaOS-2 細胞、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBM-MSC, PromoCell) は MEM と胎児ウシ血清 (FBS) を用いて培養した。分化培養として dexamethasone、L-ascorbic acid、glycerophosphate を添加した。hBM-MSC 培養時はリン酸ナトリウム (Wako)、ピロリン酸 (Wako)、ALP 阻害薬 (CAS 496014-13-2, Calbiochem) を添加した。

リアルタイム PCR 法：抽出した全 RNA から SuperScript III (Life Technologies) を用いて cDNA を作成した。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)、ABI PRISM 7900HI Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行った。参照遺伝子として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、Ct 法によって発現量を算出した。

リン酸とピロリン酸、ALP 活性の測定、ALP 染色：ホスファ C-テストワコー (Wako)、ピロリン酸アッセイキット (abcam)、ラボアッセイ ALP (Wako)、Fast™ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium tablets (Sigma) を用いた。

ゲノム編集：transcription activator-like effector nucleases (TALENs) のための標的 DNA は TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 もしくは ZiFiT Targeter Version 4.2 を用いて作成した。作成された TALENs の特異性と切断活性は single-strand annealing assay によ

て確認した。TALE リポートは Golden Gate TALEN Kit を用いて作成した。LoxP-flanked PGK-puromycin cassette は 2 つのホモロジアーーム間でクローニングした。ドナーDNA は健常者のゲノムより作成した。iSP 細胞は単細胞に分離し、増殖した iPS 細胞と TALENs、ドナーベクターを混合し、Neon Transfection System (Life Technologies) を用いて electroporation を実施した。細胞はフィーダー細胞と培養し、puromycin 耐性細胞を選択した。Cre 発現ベクターを用いて、上記の cassette を除去した。

(2) XLH 患者における血清 FGF23 と 25 水酸化ビタミン D [25(OH)D] 濃度の有用性の検討

XLH 患者における血清 FGF23 濃度およびカルシウム・リン関連マーカーを検討した。対象は XLH9 家系 12 名で(男性 2 名、女性 10 名)、中央値年齢は 1.9 歳(範囲: 0.7~36 歳)。全例、リン製剤およびビタミン D 製剤にて治療中であった。FGF-23 ELISA Kit (Kinos) を用いて血清 FGF23 濃度を測定した。

本研究は施設倫理委員会の承認を得ている。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞株 SaOS2 を用いた石灰化誘導実験において、アリザリンレッド染色によって石灰化の時期をまず検討した。培養 3 週目から明らかな石灰化を確認した。次に、qPCR によって、骨芽細胞分化マーカーの変化を検討した。ALP、COL1A1、OCN は培養 2 週目から発現上昇を認めた。ピロリン酸濃度の測定を確立した。分化培養ではピロリン酸濃度は維持培養(非分化培養)に比べて低下していた。分化培養における ALP 活性、リン濃度は、維持培養に比べて上昇していた。ALP 阻害薬による ALP 活性抑制効果は部分的であった。

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた石灰化誘導培養実験を行った。石灰化促進、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現上昇を認めた。骨芽細胞分化培養条件下では、培養液中のリン濃度、ピロリン酸濃度、リン/ピロリン酸濃度比の経時的上昇、培養細胞の ALP 活性の経時的上昇を認めた。培養液中のリン濃度を一定にするために、分化培養条件において、グリセロリン酸の代わりにリン酸ナトリウムを添加した。リン酸ナトリウムにおいて、グリセロリン酸と比較して、石灰化、ALP 活性上昇、ピロリン酸の推移、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現に明らかな差を認めなかった。ALP 阻害薬を添加すると、ALP 活性低下、リン/ピロリン酸濃度比の低下、石灰化抑制が認められた。また、分化培養条件下にピロリン酸を添加すると濃度依存的に培養液中のピロリン酸濃度は上昇し、石灰化は抑制された(図 1)。リン濃度は変化しなかった。分化培養初期の骨芽細胞分化マーカーの発現は、グリセロリン酸に比べてリン酸ナトリウム添加によって上昇したが、ピロリン酸の同時添加によってその上昇は抑制される傾向が見られた。

骨芽細胞による石灰化においてリン/ピロリン酸濃度比が重要である可能性が示唆されたが、今後、リン、ピロリン酸によって発現調節される遺伝子やその調節機構を明らかにしていく必要がある。

HPP 患者由来皮膚線維芽細胞を用いて iPS 細胞を作製した。ゲノム編集技術を用いて、HPP の原因遺伝子である *ALPL* 遺伝子病的バリエーションの片アレル修復を行った。HPP 患者(c1559delT ホモ接合性)由来 iPS 細胞では ALP 活性、ALP 染色および石灰化を認めなかったが、バリエーション修復 iPS 細胞(c1559delT ヘテロ接合性)では ALP 活性の上昇、ALP 染色の改善、石灰化の促進を認めた(図 2)。分化誘導後、骨芽細胞分化マーカーの発現も増加していた。

今後、ヒトへの間葉系幹細胞細胞移植療法に向けて、ゲノム編集の安全性や必要移植細胞数の検討、間葉系幹細胞細胞移植の *in vivo* での骨強度に対する効果の検討などを必要とする。

(2) 低リン血症性くる病患者において、リン代謝に重要なホルモンである線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) の血清濃度を測定したところ、低リン血症にもかかわらず、全例が 46.0pg/mL 以上であった。血清 25(OH)D 濃度は中央値が 19.6ng/mL (8.2~31.1) であった。ビタミン D 欠乏を併存していない患者([25(OH)D]濃度 > 15 ng/mL) の 8 名において、血清 25 水酸化ビタミン D 濃度と血清 FGF23 濃度は負の相関を認めた。今後、くる病患者の治療指標、治療の最適化、骨石灰化と FGF23 の関連性などを検討していく必要がある。

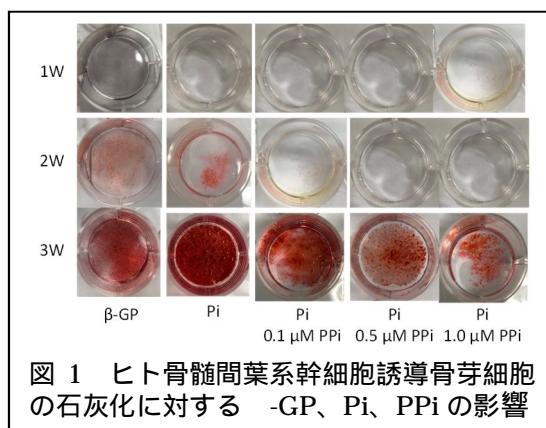


図 1 ヒト骨髄間葉系幹細胞誘導骨芽細胞の石灰化に対する -GP、Pi、PPI の影響

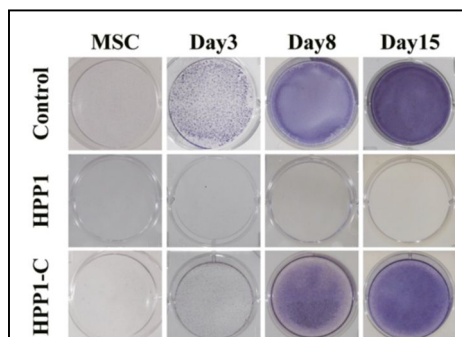


図 2 ヒト iPS 由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導培養における ALP 染色。Control: 健常人由来細胞。HPP1: 低ホスファターゼ症(HPP)患者由来細胞。HPP1-C: ゲノム編集された HPP 患者由来細胞。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okawa Rena, Kokomoto Kazuma, Kitaoka Taichi, Kubota Takuo, Watanabe Atsushi, Taketani Takeshi, Michigami Toshimi, Ozono Keiichi, Nakano Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Japanese nationwide survey of hypophosphatasia reveals prominent differences in genetic and dental findings between odonto and non-odonto types	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Michigami Toshimi, Ohata Yasuhisa, Fujiwara Makoto, Mochizuki Hiroshi, Adachi Masanori, Kitaoka Taichi, Kubota Takuo, Sawai Hideaki, Namba Noriyuki, Hasegawa Kosei, Fujiwara Ikuma, Ozono Keiichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Clinical Practice Guidelines for Hypophosphatasia*	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Endocrinology	6. 最初と最後の頁 9~24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.29.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Michigami Toshimi, Tachikawa Kanako, Yamazaki Miwa, Kawai Masanobu, Kubota Takuo, Ozono Keiichi	4. 巻 106
2. 論文標題 Hypophosphatasia in Japan: ALPL Mutation Analysis in 98 Unrelated Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 221~231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-019-00626-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohata Y., Takeyari S., Nakano Y., Kitaoka T., Nakayama H., Bizaoui V., Yamamoto K., Miyata K., Yamamoto K., Fujiwara M., Kubota T., Michigami T., Yamamoto K., Yamamoto T., Namba N., Ebina K., Yoshikawa H., Ozono K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Comprehensive genetic analyses using targeted next-generation sequencing and genotype-phenotype correlations in 53 Japanese patients with osteogenesis imperfecta	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 2333~2342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-019-05076-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Chiho, Kitabatake Yasuji, Takeyari Shinji, Ohata Yasuhisa, Kubota Takuo, Taketani Ken, Kogo Mikihiko, Ozono Keiichi.	4. 巻 127
2. 論文標題 Genetic correction of induced pluripotent stem cells mediated by transcription activator-like effector nucleases targeting ALPL recovers enzyme activity and calcification in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 158 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2019.05.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Insogna Karl L, Rauch Frank, Kamenicky Peter, Ito Nobuaki, Kubota Takuo, Nakamura Akie, Zhang Lin, Mealiffe Matt, San Martin Javier, Portale Anthony A	4. 巻 34
2. 論文標題 Burosumab Improved Histomorphometric Measures of Osteomalacia in Adults with X Linked Hypophosphatemia: A Phase 3, Single Arm, International Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 2183 ~ 2191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Portale Anthony A., Carpenter Thomas O., Brandi Maria Luisa, Briot Karine, Cheong Hae II, Cohen-Solal Martine, Crowley Rachel, Jan De Beur Suzanne, Eastell Richard, Imanishi Yasuo, Imel Erik A., Ing Steven, Ito Nobuaki, Javaid Muhammad, Kamenicky Peter, Keen Richard, Kubota Takuo, et al.	4. 巻 105
2. 論文標題 Continued Beneficial Effects of Burosumab in Adults with X-Linked Hypophosphatemia: Results from a 24-Week Treatment Continuation Period After a 24-Week Double-Blind Placebo-Controlled Period	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 271 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-019-00568-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Tomoyuki, Kubota Takuo, Ozono Keiichi, Michigami Toshimi, Kobayashi Daisuke, Takeyari Shinji, Sugiyama Yuichiro, Noda Masahiro, Harada Daisuke, Namba Noriyuki, Suzuki Atsushi, Utoyama Maiko, Kitanaka Sachiko, Uematsu Mitsugu, Mitani Yusuke, Matsunami Kunihiro, Takishima Shigeru, Ogawa Erika, Kobayashi Katsuhiko	4. 巻 125
2. 論文標題 Pyridoxal 5 -phosphate and related metabolites in hypophosphatasia: Effects of enzyme replacement therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 174 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2018.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitaoka Taichi, Tajima Toshihiro, Nagasaki Keisuke, Kikuchi Toru, Yamamoto Katsusuke, Michigami Toshimi, Okada Satoshi, Fujiwara Ikuma, Kokaji Masayuki, Mochizuki Hiroshi, Ogata Tsutomu, Tatebayashi Koji, Watanabe Atsushi, Yatsuga Shuichi, Kubota Takuo, Ozono Keiichi	4. 巻 87
2. 論文標題 Safety and efficacy of treatment with asfotase alfa in patients with hypophosphatasia: Results from a Japanese clinical trial	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 10 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.13343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中山尋文・宮田京・中野由佳子・山本賢一・武鐘真司・大幡泰久・北岡太一・窪田拓生・大園恵一・道上敏美・山本勝輔
2. 発表標題 X連鎖性低リン血症性くる病に併存するhypovitaminosis Dの検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野知帆、北畠康司、武鐘真司、大幡泰久、窪田拓生、竹谷健、古郷幹彦、大園恵一
2. 発表標題 低ホスファターゼ症患者由来iPS細胞におけるTALENを用いた遺伝子変異修復
3. 学会等名 第52回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 窪田拓生、山本景子、宮田京、武鐘真司、山本賢一、中山尋文、藤原誠、北岡太一、高桑聖、大園恵一。
2. 発表標題 X連鎖性低リン血症性くる病患者における血清FGF23濃度と関連するパラメータの検討。
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術集会。
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 くる病（小児）
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 低リン血症性疾患の病態と診断～FGF23測定の有用性～
3. 学会等名 第21回日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuo Kubota, Yasuhisa Ohata, Yasuki Ishihara, Makoto Fujiwara, Shinji Takeyari, Kenichi Yamamoto, Yukako Nakano, Kei Miyata, Hirofumi Nakayama, Taichi Kitaoka, Rena Okawa, Kazuhiko Nakano, Tomoyuki Akiyama, Keiichi Ozono.
2. 発表標題 Biochemical and genetic analysis in patients with odontohypophosphatasia in Japan
3. 学会等名 9th International Conference on Children's Bone Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohata Y, Kubota T, Takeyari S, Kitaoaka T, Nakano Y, Miyata K, Yamada C, Ozono K, Ishihara Y, Nakayama H, Yamamoto K, Fujiwara M, Yamamoto K, Michigami T, Mabe H, Yamaguchi T, Matsui K, Tamada I, Namba N, Yamamoto A, Etoh J, Kawaguchi A.
2. 発表標題 Mutation analysis of the PHEX gene and genotype-phenotype correlation in 37 Japanese patients X-linked hypophosphatemic rickets
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田拓生、藤原幾磨、道上敏美、渡邊淳、難波範行、鬼頭浩史、室月淳、杉山裕一郎、仲野和彦、笹谷晴恵、長谷川航、別所友子、澤井英明、大園恵一。
2. 発表標題 日本人低ホスファターゼ症患者52例のベースラインの検討 ALP酵素補充療法特定使用成績調査より
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田拓生、大幡泰久、石原康、藤原誠、武鍵真司、山本賢一、中野由佳子、中山尋文、北岡太一、大園恵一。
2. 発表標題 歯限局型低ホスファターゼ症の生化学的・遺伝学的検討
3. 学会等名 第34回日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田拓生
2. 発表標題 くる病の診断と治療
3. 学会等名 第51回日本小児内分泌学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	道上 敏美 (TICHIGAMI TOSHIMI) (00301804)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・環境影響部門・部長 (84408)	