

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10159

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧症治療薬の心機能への影響 ヒトiPS細胞を用いた機能評価

研究課題名(英文) Effects of therapeutic agents for pulmonary arterial hypertension on cardiac function - Evaluation using human iPS cells

研究代表者

赤尾 見春 (Akao, Miharu)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60350112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)に対する薬物治療は小児科領域においても盛んに行われるようになったが、薬剤の心臓への影響に関する基礎研究はほとんど行われていない。本研究ではヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いてPAH治療薬の心筋への影響を電気生理学に検討した。作製したヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて多電極アレイ法、パッチクランプ法の手法を用いてPAH治療薬の影響を電気生理学的に検討した。検討したPAH治療薬は3つの経路、エンドセリン経路、一酸化窒素経路、プロスタサイクリン経路の薬剤である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全を伴うPAH患者に対するシルデナフィルの効果には運動能力を高めるという従来の報告に異議を唱える報告もある(Redfield et al, JAMA, 2013; Borlaug BA et al, Cir Heart Fail, 2015)。ヒト心筋細胞を用いた申請者らの基礎研究はこれら臨床データを解釈する上で非常に重要な情報をもたらし、さらに使用するPAH治療薬の注意すべき使用量を示すこともでき、臨床に大いなる恩恵をもたらすことができるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Although drug treatment for pulmonary arterial hypertension (PAH) has become popular in the pediatric field, there have been few basic studies on the effects of drugs on the heart. In this study, we investigated the effect of PAH therapeutic agents on myocardium using human iPS cell-derived cardiomyocytes in electrophysiology. Using the prepared human iPS cell-derived cardiomyocytes, the effects of PAH therapeutic agents were investigated electrophysiologically by the multi-electrode array method and patch clamp method. The PAH therapeutic agents examined are agents of three routes, (1) endothelin pathway, (2) nitric oxide pathway, and (3) prostacyclin pathway.

研究分野：小児循環器学

キーワード：ヒトiPS細胞 肺動脈性肺高血圧症 心筋細胞 電気生理学 PAH治療薬

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は肺血管抵抗の上昇により肺高血圧、右室肥大さらには右心不全から死に至る疾患である。薬物治療の基本的戦略として主としてエンドセリン経路、一酸化窒素経路ならびにプロスタサイクリン経路の3つの経路を介する血管拡張薬が広く用いられており、その有用性が報告されている。これら薬剤は成人例の PAH 患者に限らず慢性肺疾患の新生児医療から先天性心疾患手術後の患者まで積極的に用いられている。これら薬剤は肺高血圧による右心不全に対しては後負荷軽減によりその効果が期待できるが、肺高血圧を伴う左心不全患者には果たして安全に使用できるのか、どの程度の血中濃度以上になれば注意をしないとけないのか報告されている基礎データはない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでラットを用いて PAH 治療薬の心筋イオンチャネルに関する研究を行ってきた。本研究はこれまでの研究をさらに発展させ、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて PAH 治療薬の心筋イオンチャネルへの影響を調べることを目的とする。PAH 治療薬のヒト心筋細胞への影響を検討した基礎研究は国内外を通じて検討されておらず、本研究の成果は PAH 治療の現場に非常に大切な情報を提供できるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血から不死化 B 細胞を調製

ヒト iPS 細胞作製の研究に関しては、東京女子医科大学における倫理委員会から承認を得て実施した。ヘパリン採血により抗凝固処理した末梢血約 7.5mL を遠心管に入れ 2500rpm、5 分間の遠心後、上清の血漿 (約 2.5ml) を除いた。残った赤血球、リンパ球などを含む血液に低張液を 5 倍量 (20ml) 加え、穏やかに 2 分間転倒混和し赤血球を破裂させた。1000rpm、5 分間の遠心後、上清を除き、10ml PBS で一回洗浄した。1000rpm、5 分間の遠心後、リンパ球を含むペレットに B 細胞用培地と Epstein-Barr ウィルス懸濁液、各 2.5ml を加え、懸濁し、培養用プレートに播種した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37 °C) により、B 細胞用培地を用いて 80 日間浮遊培養した。得られた増殖性の細胞を、セルバンカー (Takara) を用いて、-135 °C 並びに液体窒素下、凍結保存した。

(2) 不死化 B 細胞から iPS 細胞を誘導

ヒト末梢血由来の凍結保存不死化 B 細胞株を急速解凍し、10% FBS を含む GIT 培地を用いて CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37 °C) 内で 1~2 週間培養し、増殖の盛んな状態とした。この不死化 B 細胞を 1x TrypLE (ThermoFisher) を用いて剥離し、Opti-MEM で 2-3 回洗浄し、Opti-MEM に再懸濁した (1x10⁶ cells/0.1 mL/キュベット)。山中因子を含む 6 種類の遺伝子、ヒト OCT3/4、SOX2、KLF-4、c-MYC、LIN28、マウス p53DD (c-terminal dominant negative) を含むエピソーマルプラスミド 10 µg を電気穿孔法により不死化 B 細胞に導入した。ラミニン 511 コートした接着培養用プレートを用い、コンプリート StemFit AK02N 培地 (以下、SF 培地) を用いて、遺伝子を導入した B 細胞を CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37 °C) 内で培養した。2-3 週間で複数の iPS 細胞様のコロニーが出現したので、0.5x TrypLE により剥離し、ラミニンコートした培養用 well に移し、SF 培地 (+10 µM Y-27632) により培養を継続した。翌日、Y-27632 を含まない SF 培地に交換した。基本的に毎日培地を交換し、継代の際、一部の細胞を StemCell Banker (Takara) を用いて -80 °C 凍結保存した。

(3) iPS 細胞の多分化能の検定

多分化能マーカーの発現：樹立した iPS 細胞様のコロニーについて、多分化能マーカー (SSEA4, OCT4) の発現を免疫蛍光染色により検討した。iPS 細胞様コロニーを PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (Wako) により固定し、0.2% Triton-X 100/PBS により透過処理、3% BSA/TBST を用いてブロッキングを行った。一次抗体として、抗 SSEA4 マウス IgG モノクローナル抗体 (ab16287, Abcam), 抗 OCT4 ウサギ抗体 (ab19857, Abcam) を用い、二次抗体として、Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体 (A21202, Invitrogen), Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体 (A21206, Invitrogen) を用い、糸状 (filamentous) アクチン染色のために Rhodamine Phalloidin (Cytoskeleton)、核染色のために 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。

テラトーマ形成能：動物実験は、東京女子医科大学実験動物委員会の承認を得て実施した。免疫不全マウス（SCID マウス、CB-17/lcr-scid/scid）の精巣に iPS 細胞を移植してテラトーマを形成させ、三胚葉への分化能を確認した。麻酔を施した免疫不全マウスの精巣の一つに、およそ 1×10^6 のヒト iPS 細胞を注入した。およそ 80 日後、マウスを麻酔下安楽死させ、テラトーマ塊を摘出した。4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（Wako）を用いて固定し、パラフィン包埋試料の切片（ $5 \mu\text{m}$ ）を脱パラフィン後 HE 染色し、三胚葉への分化を顕微鏡下観察した。

（4） iPS 細胞から心筋細胞を接着法により分化誘導

Day -3：ヒト iPS 細胞を 0.5x TrypLE を用いて剥離・単細胞化し、ラミニン 511 コートした 12 ウェルプレートに、 1.0×10^6 cells/well の密度で、2 mL SF 培地（ $5 \mu\text{M}$ Y27632, $1 \mu\text{M}$ CHIR99021）を用いて播種し、CO₂ インキュベーター（5% CO₂, 37 °C）内で培養した。

Day 0：コンプリート RPMI（マイナス insulin）培地（B27 supplement, minus insulin, 1x GlutaMAX, 50 $\mu\text{g/mL}$ L-Ascorbic acid）2 mL/well に培地交換し、CO₂ インキュベーター（5% CO₂, 37 °C）に 1 時間静置した。その後、6 ~ 14 μM CHIR99021 を含むコンプリート RPMI1640（マイナス insulin）2 mL/well に培地交換した。

Day 1：コンプリート RPMI（マイナス insulin）培地 2 mL/well に培地交換した。

Day 3：各ウェルから 1 mL の培地を回収し、等量のコンプリート RPMI（マイナス insulin）培地と混和し、IWP4（最終濃度 $1 \mu\text{M}$ ）を加え、2 mL/well とした。

Day 5：コンプリート RPMI（マイナス insulin）培地 2 mL/well に培地交換した。

Day 7：室温のコンプリート RPMI1640（+B27 insulin 入り）2 mL/well に培地交換した。以降、一日おきに、培地を交換した。Day 8 に、自発的な収縮運動が始まった。

Day 14 又は 15 ~ Day 17 又は 18：乳酸ナトリウム（マイナスグルコース、マイナスグルタミン）DMEM 培地 2 mL/well に毎日交換し、心筋細胞以外の細胞を減らす処理を 3 日間実施した。

Day 17 又は 18：MED 測定用培地（DMEM-Ham's F12, 10% FBS, 1x penicillin-streptomycin, 1x MEM non-essential amino acids (FUJIFILM Wako Chemical, 139-15651), 1x GlutaMAX, 50 $\mu\text{g/mL}$ Ascorbic acid）2 mL/well に交換し、その後一日おきに培地交換した。

Day 24 ~ 30：拍動中の接着細胞を 0.5x TrypLE で剥離し、MACS（PSC-derived cardiomyocyte isolation kit, Milteny Biotec）を用いた心筋細胞の濃縮を行い、MED 64 プロープに播種した。

（5） ReproCardio2 MED プロープの作製

リプロカルディオ 2（リプロセル）は、市販のヒト（健常者）iPS 細胞由来心筋細胞である（以下、R-iPSC-CM と略称）。推奨法に従い、浮遊用 96 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well で播種培養して細胞小塊とし、各 MED64 プロープに複数個播種して、MED64 システムによる機能解析に用いた。

（6） ヒト iPS-CM の MED64 システムによる機能解析

MED64 システム（アルファメッドサイエンティフィック株式会社）は、微小電極アレイ（Micro-Electrode Array, MED プロープ）を用いた細胞外電位（Field potential: FP）計測システムである。MED プロープを 10 cm ディッシュに入れ、ディッシュ内の湿度を保つため精製水をプロープの周囲に撒いた。ピトロネクチン液 2.5 μL 用いて、MED プロープの平面微小電極部分を 37 °C 2 時間程度コートした。1x TrypLE を用いて iPS-CM を単細胞化し、MED 測定用培地に懸濁したプロープの平面微小電極部分からコート液を除き、iPS-CM 3×10^4 cells/ $3 \mu\text{L}$ で播種した。CO₂ インキュベーター内で 2 時間程度静置し、細胞が接着したところで、2 mL の心筋細胞用培地を穏やかに添加し培養を継続した。さらに細胞がよく接着し安定した拍動が始まるまで数日間、CO₂ インキュベーター内で培養した。又、一部の MED64 実験では、健常者 iPS 細胞から分化誘導した市販の心筋細胞である R-iPSC-CM を説明書に従って MED プロープに播種した。MED64 システムにより、MED プロープの平面微小電極部分に接着拍動している iPS-CM の FP 波形を記録し、拍動間隔と QT 間隔に相当する FP 持続時間（FP duration: FPD）を求め、FPDcF（FP 持続時間を Fridericia 補正式、 $QTcF = QT/3 \sqrt{RR}$ により補正）を算出した。

4. 研究成果

(1) 健常者不死化 B 細胞から iPS 細胞を樹立

山中因子を含む 6 種類の遺伝子を導入した不死化 B 細胞からおよそ 3 週間で iPS 細胞の形状を示す細胞群が観察された。これらの細胞は、胚性幹細胞のマーカー (SSEA4, Oct4) に陽性であった。

免疫不全マウスの精巣に iPS 細胞を移植したところ、およそ 3 ヶ月でテラトーマが形成され、三胚葉へ分化することを確認した。これらの結果から、不死化 B 細胞から iPS 細胞が樹立できたと考えられた。

(2) 健常者 iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導

ヒト iPS 細胞を接着培養型の分化法により、中胚葉を経て、心筋細胞へ分化誘導した。分化開始後 8 日頃に接着細胞の自発運動が始まった。分化開始後 2 週間に、乳酸ナトリウムを含む、グルコース・グルタミンを含まない DMEM 培地で 3 日間培養し、心筋細胞以外に細胞を死滅させ、心筋細胞を純化した。MED 測定用培地に交換すると、翌日には自発運動が再開した。さらに 1 週間の培養後、Stem cell derived cardiomyocyte enrichment kit を用いた MACS 分離により心筋細胞を選別し再び接着培養を行うと、長期間安定して拍動する細胞集団が得られた。分化開始後 2 ヶ月でもこれらの細胞は拍動を継続しており、心筋細胞マーカーであるトロポニン T や心筋細胞分化後期マーカーである α -アクチニンが発現しており、強拡大すると、横紋筋構造が観察された。これらの証拠から、ヒト不死化 B 細胞由来の iPS 細胞から心筋細胞が分化誘導されたと考えられた (以下、iPSC-CM と略称)。

(3) MED64 システムを用いた iPSC-CM における 5 種肺高血圧薬 (Tadalafil, Sildenafil, Beraprost, NS-304, Bosentan) による機能変動の解析

R-iPSC-CM を用いた検討

R-iPSC-CM 小塊は MED 64 プローブに接着し、次第に塊がほぐれ細胞がプローブ上に拡がり、自発収縮拡張運動を継続するようになった。この R-iPSC-CM MED プローブを用いて、ホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) 阻害剤の Tadalafil (0, 1, 5, 10, 20, 30 μ M, N=7) と検討薬剤の溶剤として用いたジメチルスルホキシド (DMSO, 0, 0.05, 0.1, 0.2, 1, 2%, R-iPSC-CM N=2, iPSC-CM N=1) の機能に与える影響を調べた。MED64 システムにより記録された Tadalafil 添加時の FP (Field potential) 波形は、30 μ M に至ってもほとんど変化しなかったが、同時に記録した拍動間隔 (BPM) は、薬剤濃度 0 の値に比べて 43% 低下した。QT 間隔に相当する FPD は、20 μ M で 14% 低下し、Fridericia 式により補正した FPDcF は、40% 低下した。なお、DMSO による R-iPSC-CM 機能への影響は、DMSO 濃度 1% 以上において FPDcF が 90% 以下に低下したことから、本研究では、薬剤添加時の DMSO 濃度が 1% を超えないように留意して実施した。

R-iPSC-CM と iPSC-CM の基底状態の比較

R-iPSC-CM と東京女子医科大学循環器小児科研究室で作製された健常者 iPSC-CM の MED システムにおける基底状態 (薬剤無添加) の FPDcF を比較したところ、両側 t 検定値は、0.354 であり、有意水準 0.05 を上まわり、両群に差は無かった。

iPSC-CM を用いた検討

健常者 iPSC-CM MED プローブを用いて、PDE5 阻害剤 Sildenafil (0, 1, 10, 20, 30, 40 μ M, N=3) の影響を検討したところ、薬剤濃度 0 の値に比べて、BPM は 40 μ M で 70% 増加し、FPD は 26% 低下し、FPDcF は、11% 低下した。

血管を拡張し血流を改善するプロスタサイクリン (PGI₂) 誘導体の Beraprost (0, 1, 5, 10, 30, 50 μ M, N=3) の影響を検討したところ、薬剤濃度 0 の値に比べて、BPM は 50 μ M で 16% 増加し、FPD は 23% 低下し、FPDcF では、20% 低下した。

プロスタサイクリン受容体作動薬の NS-304 (0, 1, 10, 20, 30, 40 μ M, N=5) の影響を検討したところ、薬剤濃度 0 の値に比べて、BPM は 40 μ M で 5% 低下し、FPD は 10% 低下し、FPDcF では、10% 低下した。

エンドセリン受容体拮抗剤である Bosentan (0, 1, 10, 20, 30, 40 μ M, N=3) の影響を検討したところ、薬剤濃度 0 の値に比べて、BPM は 40 μ M で 6% 増加し、FPD は 10% 低下し、

FPDcF では、8%低下した。

さらに、LQT 症状をもたらす HERG チャネル阻害薬の E4031 (0, 5, 15, 30, 60, 100 nM, N=3) と心拍を増やす 作動薬の Isoproterenol (0, 1, 10, 100, 200, 400 nM, N=3) の影響を検討した。なお、E4031 と Isoproterenol の溶解には、水を用いた。E4031 は、濃度 0 の値に比べて、BPM は 100 nM で 8%低下したが、FPD は 27%増加し、FPDcF として、24%増加した。Isoproterenol は、濃度 0 の値に比べて、BPM は 400 nM で 20%増加し、FPD も 26%増加し、FPDcF は 33%増加した。

図 1 に今回検討した 5 種肺高血圧薬と E4031, isoproterenol の薬剤濃度に対する BPM, FPD, FPDcF を総括した。検討した薬剤濃度範囲において、BPM を最も増加させた薬剤は、Sildenafil であり、Isoproterenol, Beraprost で 20%程度増加した。Tadalafil が BPM を最も低下させた。FPD 値は、E4031 と Isoproterenol で 25%以上増加したが、5 種肺高血圧薬ではいずれも低下し、Beraprost と Sildenafil では 25%程度低下した。拍動間隔で補正した FPDcF においても、E4031 と Isoproterenol では 20%以上の増加を示した。5 種肺高血圧薬の FPDcF はいずれも低下し、Tadalafil により低下が顕著であり、Beraprost, Sildenafil, NS-304, Bosentan の順に低下が軽減した。

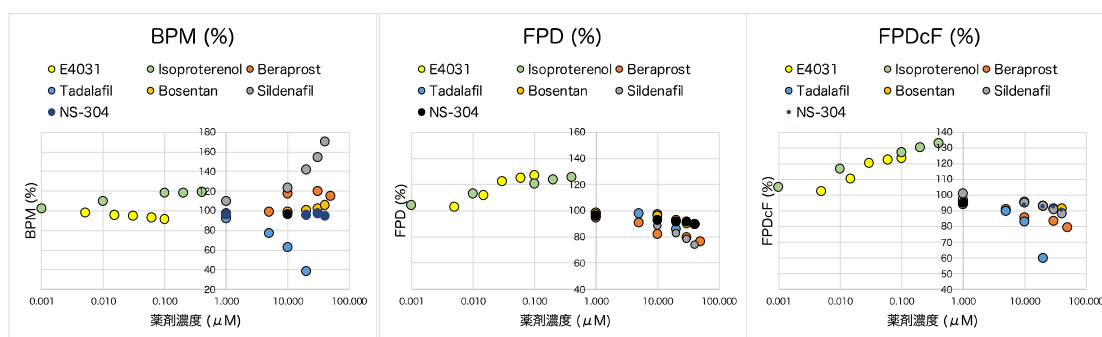


図 1 : iPSC-CM 機能への薬剤の影響 (総括)

表 1 に本研究で検討した 5 種肺高血圧薬の Cmax に相当する、MED 実験における BPM と FPDcF の変動について総括した。Tadalafil の Cmax (1.77 μM) に近い本研究で用いた薬剤濃度 (1 μM, 5 μM) では、BPM は 7%, 23%低下し、FPDcF は 4%, 10%低下した。臨床と *in vitro* 実験を一概に関連づけることは難しいが、この結果から、Cmax での心拍数の低下と QTcF の短縮の可能性が考えられた。Sildenafil の Cmax (0.17 μM) に近い本研究で用いた薬剤濃度 (1 μM) では、BPM は 10%増加し、FPDcF は 1%増加した。この結果から、Cmax では心拍数の増加の可能性が考えられた。Bosentan の Cmax (2.13 μM) に近い本研究で用いた薬剤濃度 (1 μM, 10 μM) では、BPM は 3%, 1%低下し、FPDcF は 3%, 4%低下した。この結果から、Cmax での心拍数のわずかな低下と QTcF のわずかな短縮の可能性が考えられた。Beraprost と NS-304 は、臨床に用いる薬剤濃度が低いため、Cmax における BPM と FPDcF の変化はないと考えられた。

表 1 肺高血圧薬 Cmax と iPSC-CM を用いた MED 実験結果 (関係 BPM, FPDcF) の関係

| 名称 | 作用機序 | 市販薬名 | 用量 (成人) | Cmax情報 | Cmax (μg/mL) | MW | 1 μM相当 μg/mL | Cmax (μM) | 本研究薬剤濃度 (μM) | Cmax濃度における BPM変化 | Cmax濃度における FPDcF変化 |
|------------|-------------------------|-----------------|---|--------------------------|--------------|-------|--------------|-----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Tadalafil | 選択的ホスホジエステラーゼ5阻害薬 | アドシルカ錠 (20mg) | 40 mg/日 | 40 mgx10日 →688 μg/L | 0.688 | 389.4 | 0.389 | 1.77 | 0, 1, 5, 10, 20, 30 | 1 μM, 5 μMで 7%, 23%低下 | 1 μM, 5 μMで 4%, 10%低下 |
| Sildenafil | ホスホジエステラーゼ5阻害薬 | レバチオ錠 (20mg) | 60mg/日 (20 mg/回 x3) | 62.5 mgx1日 →82.3ng/mL | 0.0823 | 474.6 | 0.475 | 0.17 | 0, 1, 10, 20, 30, 40 | 1 μMで 10%増加 | 1 μMで 1%増加 |
| Beraprost | 血流改善・血管拡張促進プロスタサイクリン誘導体 | ベラプロストナトリウム | 60-120 μg/日 最大 180 μg/日 | 40 μgx1日 →305 pg/mL | 3E-05 | 398.5 | 0.399 | 0.000077 | 0, 1, 5, 10, 20, 50 | 変化なし | 変化なし |
| NS-304 | プロスタサイクリン受容体作動薬 | セレキシバグ | 0.4mg/日 (0.2 mg/回 x2) 次第に増量、最大1.6 mg/回 | 0.6 mgx1日 →10.7 ng/L | 1E-05 | 496.6 | 0.497 | 0.000022 | 0, 1, 10, 20, 30, 40 | 変化なし | 変化なし |
| Bosentan | エンドセリン受容体拮抗剤 | トラクリア錠 (62.5mg) | 62.5 - 125mg/日 最大 250 mg/日 | 62.5 mgx1日 →1177 μg/L | 1.177 | 551.6 | 0.552 | 2.13 | 0, 1, 10, 20, 30, 40 | 1 μM, 10 μMで 3%, 1%低下 | 1 μM, 10 μMで 3%, 4%低下 |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 羽山恵美子、古谷喜幸、川口奈奈子、勝部康弘、島田光世、大路栄子、松岡留美子、稲井慶、中西敏雄 |
| 2. 発表標題 尿中細胞からiPS細胞を調製 |
| 3. 学会等名 第54回日本小児循環器学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 勝部康弘、大路栄子、羽山恵美子、古谷喜幸、中西敏雄、朴仁三、赤尾見春、築野香苗、橋本佳亮、上砂光裕、深澤隆治 |
| 2. 発表標題 肺高血圧症治療薬のiPS細胞由来心筋細胞Ca ²⁺ 電流に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第53回日本小児循環器学会・学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 羽山 恵美子, 古谷 喜幸, 島田 光世, 川口 奈奈子, 大路 栄子, 松岡 留美子, 稲井 慶, 中西 敏雄, 朴 仁三 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いた心筋細胞分化における新生児型Naチャンネルの発現 |
| 3. 学会等名 第53回日本小児循環器学会・学術総会 |
| 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 | 羽山 恵美子 (Hayama Emiko) (00349698) | 東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 古谷 喜幸 (Furutani Yoshiyuki) (10424673) | 東京女子医科大学・医学部・研究生 (32653) | |
| 研究分担者 | 勝部 康弘 (Katsube Yasuhiro) (20246523) | 日本医科大学・医学部・准教授 (32666) | |
| 研究分担者 | 中西 敏雄 (Nakanishi Toshio) (90120013) | 公益財団法人日本心臓血圧研究振興会（臨床研究施設・研究部門）・榊原記念クリニック・その他 (82684) | |