

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18406013  
 研究課題名（和文） 内臓リーシュマニア症の早期発見・早期治療のための基礎的応用的研究  
 研究課題名（英文） Basic and applied studies for early diagnosis and early treatment of visceral leishmaniasis

## 研究代表者

伊藤 誠 (ITO MAKOTO)  
 愛知医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：90137117

## 研究成果の概要：

(1) 内臓リーシュマニア症 (VL 症) の早期発見のための診断法を開発した。尿を用いた免疫診断法と、原虫由来 DNA を検出する遺伝子診断法 (LAMP 法) である。バングラデシュ・マメンシン地区の 4,800 人の調査から、この地区では年間約 7% の住民が *Leishmania* 原虫の感染を受け、その約半数が VL 症を発症すると推定できた。(2) VL 症を媒介するサンチョウバエの種を、これまでの形態学的な方法に代わり、遺伝子によって同定する方法を確立した。原虫の有無を調べる遺伝子検査法と組み合わせることで、広範囲にわたる流行地のサンチョウバエ調査を効率的に行うことができた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
平成19年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成20年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

## 研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：内臓リーシュマニア症、診断、尿、バングラデシュ、LAMP、国際研究者交流

## 1. 研究開始当初の背景

内臓リーシュマニア症 (以下VL症) は、サンチョウバエによって媒介される致死率の高い原虫疾患である。Neglected Tropical Diseasesの代表的な伝染性疾患で、主にバングラデシュ、インド、ネパールの貧困層で流行が見られ、毎年50万人が感染し、6万人が死亡していると推定されている。治療しないと高い致死率を示す。治療薬はあるものの、強い副作用が常に問題となっている。簡便で感度

の高い診断法の開発が遅れていることもあり、報告されている患者とはいっても主に有症者であり、実際の感染者の数はさらに多いと考えられている。これら3カ国の政府はWHO主導のもと、2015年までにこの地域からVL症を人口1万人に対し1名の発症頻度まで減らす計画を進行中である。患者の早期発見と早期治療、原虫キャリアーの発見、そのための診断法の開発が急務となっている。

## 2. 研究の目的

本研究は、VL症に対して我々が開発した簡便で高感度な診断法を使って、患者の早期発見・早期治療に貢献すること、発症の要因を明らかとすることを目的とする。本症の流行地であるバングラデシュ国内の2地域を調査・研究対象として、①我々の開発した内臓リーシュマニア症のための尿診断法を、住民検診ならびに有症者の診断に応用し、その有効性を確かめる。②感染しても（抗体が陽性となっても）発症する人とならない人がいる。これをコントロールしている要因を明らかとする。

本症の治療には副作用が強いアンチモン剤を3-6週間、入院措置をとって投与しなくてはならない。そのため治療開始前には必ず確定診断が行われる。確定診断には骨髄や脾臓からの生検材料中に原虫を検出するが、設備の整った病院でしかできず、患者の負担も大きい。

本研究では、VL症の確定診断法として血液中に存在する原虫DNAを高感度に検出するLAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法の開発を目指す。この方法は、従来のPCR(Polymerase Chain Reaction)法と異なり、①等温で遺伝子が増幅でき、②6つの領域を認識する4種類のプライマーを用いるため特異性が高く、③増幅効率が高いので短時間に増幅可能であり、④肉眼で増幅を確認できる、⑤従って高価な機器を必要としない、など流行地での診断に有利な点を備えている。この方法の開発により、患者に負担をかけない迅速で正確な確定診断が可能となる。

本症はサシチョウバエによって媒介される。従って流行地におけるサシチョウバエの発消長・原虫感染率の年次推移は調べることは本症の対策上重要である。採集したサシチョウバエの種は形態学的に、また感染している原虫は培養してその種の同定を行なわれているが、手間がかかるために処理できるサシチョウバエの数に限界があった。最近開発されたPCR-PFLP法を利用し、リーシュマニア症の流行地で採集されたサシチョウバエの種の同定法を確立し、さらに感染の有無を確認する。

## 3. 研究の方法

(1)尿ELISAのVL症早期発見の有効性の調査

① マメンシン地区において4,000人規模の住民検診を行い、抗リーシュマニア抗体保有状況を、尿ELISAで調べる。同時に、血清中の抗体をrK39 Dipstickで調べる。

② 1年後に追跡調査し、再度抗体検査、VL症の発症の有無についての調査を行う。ラジシャヒ地区において確認された、尿中の抗体検出法のVL症早期発見に対する有効性を確認する。また発症の要因についても調べる。

③ VL症治後の抗体の変化を調べ、治癒判定に尿診断法が使えるかどうか検討する。

(2)確定診断法としてのLAMP法の確立  
nestedPCRと比較しながら、高感度で特異性の高いLAMP法のための、プライマーを設計する。確定診断された患者50人より治療前、治療中、治療後に得た血液（血液1mlまたは100 $\mu$ lをFTAろ紙に採取したもの）を研究材料に用いて、nestedPCR、LAMP法を実施し、LAMP法の確定診断法としての有効性、治療効果判定の可能性、ならびに最適な検体採取法を確認する。

(3)サシチョウバエの調査

① マイクロタイタープレートを用いたマスキング PCR-PFLP法による、VL症の流行地であるマメンシン地区のサシチョウバエの種の同定法を開発する。

② マメンシン地区においてサシチョウバエを採取し、開発された同定法を使って種の同定を行い、生息しているサシチョウバエについて調査する。また、採取されたサシチョウバエの原虫保有率を求めるために、同様なマスキング法により *L. donovani* 原虫DNAの検出を試みる。

## 4. 研究成果

(1)尿診断法の有効性

2006年度にマメンシン地区で、これまでにVL症の既往のない4,818人より尿検体の採取とrK39ディップスティックによる検査を行った。尿中のリコンビナント抗原rKRP42に対するIgG抗体はELISA法で測定した。ROC curveから得られたcutoff値(18.5 unit: 感度95%、特異性96%)を用いた場合、333人(7.1%)が陽性となった。現地で診断に用いられている、血清中の抗体を検出するrK39ディップスティックの結果(346人=7.3%が陽性)と、ほぼ同じであった。しかし、両検査とも陽性のものは、それぞれの陽性例の約半数で、残りは一致しなかった。rK39ディップスティックに用いられている抗原(*Leishmania chagasi* からクローニングされた)と、我々の作成したrKRP42(*L. donovani* からクローニングした)には98.7%の相同性が認められることから抗原性の違いはほとんどないと考えられる。血清と尿という検体の違い、あるいはELISAとイムノクロマト法という方法の違いによるものと考えられるが、さらに調査が必要である。

一年後(2007年度)に1,572人が尿ELISAで追跡調査できた。2006年度の抗体陽性者(血清あるいは尿中の抗体陽性)398人のうち150人がVL症を発症していた。このうち尿ELISAでは110人(73.3%)が陽性と判定されていた。一方rK39ディップスティック

では発症者のうち 147 人 (98%) が陽性と判定されていた。この結果より、発症者を正確に予測するには、一回の尿 ELISA による検査では不十分であり、簡単に採取できると言う利点を生かし、検査の回数を増やす必要があることがわかった。

2007 年度に追跡調査できた、2006 年度尿 ELISA 陰性の住民 1,174 人中、91 人(7.8%)で抗体が陽性となった。

本研究により、(1) 調査地区では新たな感染が継続していること、(2) 抗体陽性者の約半数が発症していることから、年間発症者は住民の 4%前後になることが推定された。発症の要因については研究を継続中である。

脾臓生検により確定診断のついた VL 症患者 50 人より治療前、後に採取した尿中の抗体価の推移を尿 ELISA 法と、我々の開発した AbcDAT 法 (着色した *Leishmania* 原虫を用いた尿中の抗体を検出する簡便法) を用いて調べた。治療前は 50 人全員が尿中抗体陽性であった。治療後も多くの抗体価は陰転せず 4 週後でわずか 1 人が、2 ヶ月後には尿 ELISA 法で 5 人 (10%)、AbcDAT 法で 2 人 (5%) が陰転したのみであったが、50 人中 28 人で、治療前も含めて 6 回の測定の内、最も低い抗体価を示した。抗体の変化と再発や PLDL の発症との関係は現在追跡調査中である。

## (2) LAMP 法の確立

新たな DNA 増幅法としての loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を応用して、*Leishmania* 原虫由来 DNA を検出する方法を確立した。

LAMP 法は 6 つの領域を認識する 4 つのプライマーを用いるために非特異的な増幅産物は極めて低く、一定温度で反応が進むため簡便なヒートブロックや恒温槽しか必要としないため手軽に実施することができる。また、用いる *Bst* DNA polymerase は増幅効率が非常に高く大量に出来た増幅副産物ピロリン酸が溶液中のマグネシウムイオンと結合し白い沈殿が生じるため、増幅の有無を目視で判定できる (図 1)。このため LAMP 法による診断は反応開始後 1 時間で判定までできる迅速かつ非常に特異性の高い手法である。

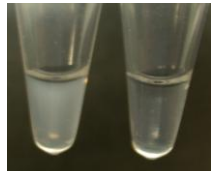


図 1. 左が陽性、右が陰性

## ①プライマーの設計

LAMP 法の開発において最も重要なのがプライマーの設計場所である。我々はこれまで報告のある内臓リーシュマニア症診断用 PCR 法のターゲット遺伝子からキネトプラストミニ環状 DNA (GenBank accession no.

Y11401) を候補とし、プライマーを設計した。図 2 に示すように内臓リーシュマニア症診断用 LAMP 法の増幅領域として 3 カ所が候補として設定できたのでそれぞれのプライマーを合成し、感度・特異性の検討を行った。なお、既に報告されている同じキネトプラストミニ環状 DNA をターゲットとした一般的な PCR 法、および nested PCR 法を対照として比較した。

## ②感度

リーシュマニア原虫を検出する感度を検出するため、培養した *Leishmania donovani* strain DD8 の promastigote から精製したゲノム DNA を用い、それぞれのプライマーセットでの LAMP 法及び PCR 法との比較を行った (図 3)。それぞれ、100pg から 1fg まで 10 倍希釈したゲノム DNA を反応溶液中に入れ、反応を行った。LAMP 法についてはプライマーセット #1 が 10fg まで検出できたのに対し、プライマーセット #2、3 はいずれも 1 fg まで検出することができた。一般的な PCR では 10fg まで、nested PCR では 1fg まで検出できることからプライマーセット #2、3 は少なくともネステッド PCR と同等の感度があることが示された。

## ③特異性

内臓リーシュマニア症を引き起こす *leishmania donovani* を特異的に検出できるかどうかを検討するため、*L.(L.) donovani* (MHOM/IN/80/DD8)、*L.(L.) infantum* (MHOM/TN/80/I-PT1)、*L.(L.) major* (MHOM/SU/73/5ASKH) *L.(L.) mexicana*

### Primers #1

```

1 GAATTCGGCGAAAAATGACGGAAAAATGGGCCAAAAACCCAACTTTTCTGGCTCCGGG
#1 F3 #1 F2
61 TAGGGGGCTTCGCGAAAAACGAAAAATGGGTCGCAAAATCCCGTTCAAAAAATAGCCAA
#1 F1
121 AAATGCCAAAAATGGCTCCGAGGGGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAAAAATAGGTCGGGT
#1 B1
181 GGAGGGGAAATTCGGGGCTCGGACCTGTGTGGATATGGCTGGGTGGGACTTTGGAGTC
#1 B2
241 GGTTCCTACTGTATGGGGTTTGGACCTGGCTTGGGGTTTGGGGGTTGGTGTGGGAAGG
#1 B3

```

```

#1-FIP 5'-CGGGATTTCTGCACCCATTTTTC-AACTTTTCTGGCTCCCG-3'
#1-BIP 5'-GGAAACTGGGGTTGGTGA-ATATCCACACACGTCGGA-3'
#1-F3 5'-CGAAAAATGGGCCAAAAAC-3'
#1-B3 5'-CAACCCACTCCAAGTCC-3'

```

### Primers #2

```

301 GGTGGCGCTATTGGAGTGACGTGGCTCTTTTGATAATTGATATTGTTTAAACTGG
#2 F2
361 ATGGTTCGGCTGGATATACGTTGGTGGGTGGATTGGATTGGATTGATTGAT
#2 F3 #2 F2
421 GGGGTGGAGGCTGATTTGGGGTTGAGGAGTTTGGGGATAGTTTGGAGTATGAT
#2 B1 #2 B1

```

```

AGTGGGGCTGTGCATTAGTTTGTTCACG
#2 B2
TACTATATTATCGTAGTATAATCATAAG
CTC-GGGTGGATTGGATTGGA-3'
ATGTTA-GAACAACTAATGCAACAGC-3'
3'
3'

```

```

GGTGCAGAAATCCCTTTTAAAAATAGCCAA
#3 F3 #3 F2
AACTGGGGTTGGT #3 F2 #3 F2
GGTGGGT

```

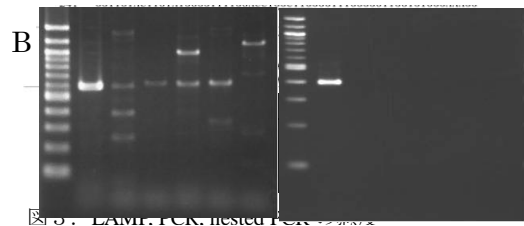


図 4. LAMP, PCR, nested PCR の特異性  
A: LAMP(#3 primer), B: PCR, C: nested PCR  
レーン 1 は分子量マーカー、2-7 はそれぞれ *L. donovani* *L. infantum*, *L. major*, *L. Mexicana*, *L. tropica*, *L. braziliensis* の promastigote DNA

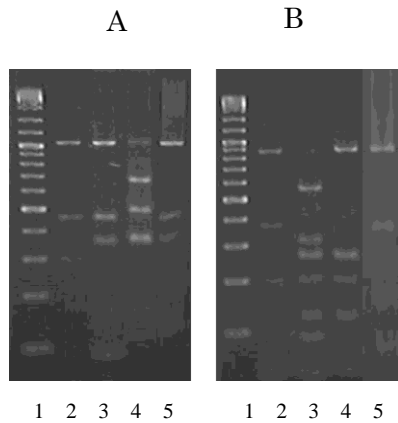


図 5. PCR-PFLP 法によるサシチョウバエの種の同定. A: *AfaI*, B: *HinfI*, それぞれレーン 1: 分子量マーカー、2: *Phlebotomus argentipes*, 3: *Sergentomyia* spp type A, 4: *Sergentomyia* spp type B として 5: *P. papatasi*

(MNYC/BZ/62/M379)、*L. (L.) tropica* (MHOM/SI/74/K-27)、*L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) の promastigote からゲノム DNA を精製し反応を行った (図 4)。プライマーセット 3 を用いた LAMP 法では *L. donovani* 以外、増幅産物は確認されなかった。この結果は nested PCR 法でも同じ結果であった。しかし、プライマーセット #2 を用いた LAMP 法及び一般的な PCR 法では *L. (L.) donovani* 以外の反応溶液中に増幅産物が確認された。また、全てのプライマーセットを用いた LAMP 法及び nested PCR 法では熱帯熱マラリア原虫やヒトのゲノム DNA から非特異的な増幅産物は確認されなかった。このことからプライマーセット #1、3 を用いた LAMP 法は nested PCR 法と同等の特異性を示すことがわかった。これまでの結果からプライマーセット #3 が内蔵リーシュマニア症診断用 LAMP 法を行うのに最も適していることがわかった。

#### ④LAMP 法の応用

脾臓生検でリーシュマニア原虫が確認された内臓リーシュマニア症患者 50 人より、治療前、治療後に採取された血液検体を用い、LAMP 法、nested PCR 法による原虫 DNA の検出をおこなった。その結果、LAMP では 50 人中 44 人 (88%) の治療前血液検体から原虫 DNA を検出することが出来た。これは nested PCR と同じ感度であった。

#### ⑤FTA ろ紙による採血の検討

予備実験では、FTA ろ紙採血された VL 症患者の血液から LAMP 法による原虫 DNA の検出が可能であった。しかし今回内臓リーシュマニア症患者 50 人より FTA ろ紙に採取された血液検体からは、全てにおいて原虫 DNA

は検出されなかった。FTA ろ紙の状態から、採血後に十分乾燥されなかったことが原因として考えられた。現地の高温多湿な気候下では自然乾燥は難しいため、原虫 DNA を壊さない温和な条件での確実な乾燥方法を検討する必要がある。

(3) サシチョウバエの調査 (山口大学農学部 の加藤大智准教授の全面的な協力のもとで行われた)

#### ①PCR-PFLP 法による同定法の開発

Terayama ら(2008)のマスクリーニング法でサシチョウバエの種の同定を試みた。増幅ターゲットは、18S rRNA 中の *Lutzomyia* 属によく保存されている部位である。増幅産物を制限酵素、*AfaI*、*HinfI* を用いることにより、図 5 で示すように、バングラデシュ、マメンシン地区で採取された 3 種のサシチョウバエ、*Phlebotomus argentipes*、*Sergentomyia* spp type A、*Sergentomyia* spp type B として *P. papatasi* の同定が可能となった。

#### ②マメンシン地区で採取されたサシチョウバエの種の同定と *Leishmania* 原虫検出

マメンシン地区で採取された 1,342 匹の雌のサシチョウバエの個々の種の同定と、*Leishmania* 原虫の検出を試みた。原虫の検出は Kato ら(2008)の方法を用い、*Leishmania* 原虫に特異的なキネトプラストミニ環状 DNA を標的に設計された primer を用いた。

その結果、1,342 匹中、347 匹 (25.9%) が現地でベクターとされている *Phlebotomus argentipes* と同定された。*Sergentomyia* spp が 708 匹 (52.8%) で、残りは同定できなかった。また、*Leishmania* 原虫を持ったサシチョウバエは発見できなかった。

家屋内、付属した家畜部屋など人の生活空間で採取されたサシチョウバエの半数が、*Leishmania* 原虫を媒介しないとされている *Sergentomyia* spp であった。今回調べた限りでは *Leishmania* 原虫が検出されなかったため、*Sergentomyia* spp の媒介者としての可能性を論じることは出来ないが、今回開発された PCR-PFLP を用いた、サシチョウバエのマスクリーニング法を用い、さらに調査を継続する必要がある。

#### (4) まとめ

① *Leishmania* 原虫の感染状況の把握、VL 症の発生予測、VL 症の早期発見に、尿 ELISA 法による流行地住民のマスクリーニングが有効であることを明らかとした。

② VL 症の確定診断法として、流行地での診断に適した高感度な LAMP 法を開発した。世界的に注目され、共同研究の提案も受けてい

る。

③PCR-PFLP 法によるマイクロプレートを用いるマスキング法で、マメンシン地区の VL 症の媒介昆虫であるサンショウバエの種の同定法を確立し、広範囲にわたる流行地のサンショウバエの種の同定、感染の有無の調査を効率的に行うことを可能とした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ①Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram AR, Hashiguchi Y, Noiri E, Kimura E. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; Oct;81(4):578-82, 査読あり
- ②Wagatsuma Y., Alam Md. S., Fukushima M., Islam Md. Z., Itoh M., Mondel D. and Haque R. Neem extract as a control tool for vector-born diseases: an example of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Biopesticides International*, 2009; 5(2): 134-140, 査読あり
- ③Islam MZ, Itoh M, Takagi H, Islam AU, Ekram ARMS, Rahman A, Takesue A, Hashiguchi Y, Kimura E. Enzyme-linked Immunosorbent Assay to Direct Urinary Antibody Against Recombinant rKRP42 Antigen Made from *Leishmania donovani* for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(4):599-604, 査読あり
- ④Terayama Y, Kato H, Gomez EA, Uezato H, Calvopiña M, Iwata H, Hashiguchi Y. Molecular Typing of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Areas Endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S Ribosomal RNA Gene. *J. Vet. Med. Sci.* 2008; 70(9): 907-913, 査読あり
- ⑤Kato H, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Uezato H, Marco JD, Barroso PA, Iwata H, Hashiguchi Y. Short Report: Molecular Mass Screening to Incriminate Sand Fly Vectors of Andean-type Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008;79(5), 719-721, 査読あり
- ⑥E Kato H, Uezato H, Gomez EA, Terayama Y, Calvopiña M, Iwata H, Hashiguchi Y. Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly Vectors for *Leishmania* Infection by Molecular Biological Methods *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(2), 324-329, 査読あり

⑦Takagi H, Islam MZ, Itoh M, Islam AU, Saifuddin Ekram AR, Hussain SM, Hashiguchi Y, Kimura E. Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.*, 2007 May;76(5):902-5, 査読あり

⑧Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, Amann J, Wahed MA, Wagatsuma Y, Breiman RF, Williamson J, Secor WE, Maguire JH. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 May;76(5):909-14, 査読あり

[学会発表] (計 19 件)

- ①Kazi M. Jamil, Abu Toha Bhuiyan, Gulam M. Khan, Mohammad S. Alam, Rashidul Haque, Makoto Itoh, Eisei Noiri, Stephen P. Luby. Evaluation of new tests for early diagnosis of visceral leishmaniasis and its complications at the 'Point-of-Care'. 58th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2009, 11. Washington DC, U.S.A.
- ②伊藤 誠, Kazi M. Jamil, 高木秀和, Shafiqul M. Alam, Rashidul Haque, Zahidul M. Islam, Sohel M. Samad, 野入英世, 木村英作. LAMP 法と尿診断法による内臓リーシュマニア症患者の治療後の経過観察. 第 50 回日本熱帯医学会 2009 年 10 月 22-23 日 沖縄
- ③Noiri E, Sugaya T, Itoh M, Kimura E, Negishi K, Doi K, Matsumoto Y, Toba, Alam MS, Jha T.K., Jamil KM. Observational study of urinary indicators in kala-azar. 4th World Congress on Leishmaniasis (WL4) 2009.2. Lucknow, India
- ④Fukushige M, Alam MS, Mondal D, Haque R, Islam MZ, Itoh M, Wagatsuma Y. Preliminary results of the two-year follow-up study using neem oil as vector control in Bangladesh. 4th World Congress on Leishmaniasis (WL4) 2009.2. Lucknow, India
- ⑤Islam MZ, Itoh M, Islam AU, Rahman A, Ekram ARM, Takagi H, Takesue A, Hashiguchi Y, Kimura E. Diurnal fluctuation of anti-rKRP42 IgG in urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. 第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2008 年 11 月 神戸
- ⑥Islam MZ, Itoh M, Islam MAU, Rahman MA, Ekram ARMS, Takagi H, Hashiguchi Y, Kimura E. Early diagnosis of visceral leishmaniasis and prediction of clinical cases by rKRP42 urine ELISA. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria.

2008.10 Jeju

- ⑦高木秀和、伊藤誠、Islam MZ、木村英作.  
FTA 保存血を用いた LAMP 法による内蔵リーシュマニア症の診断. 第 77 回日本寄生虫学会. 2008 年 4 月 長崎
- ⑧Islam MZ, Itoh M, Islam MAU, Ekram ARMS, Takagi H, Hashiguchi Y, Kimura E. Prediction of clinical visceral leishmaniasis cases in its early stages by rKRP42 urine-based ELISA. 第 48 回日本熱帯医学会大会. 2007 年 10 月 大分
- ⑨高木秀和、伊藤誠、Islam MZ、木村英作.  
LAMP 法を用いたリーシュマニア症診断法の開発. 第 76 回日本寄生虫学会大会. 2007 年 3 月 大阪

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 誠 (ITO MAKOTO)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90137117

### (2)研究分担者

木村 英作 (KIMURA EISAKU)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70153187

橋口 義久 (2006-7 年度)

(HASHIGUCHI YOSHIHISA)

高知大学・医学部・名誉教授

研究者番号：70153187

我妻 ゆき子 (2006-7 年度)

(WAGATSUMA YUKIKO)

筑波大学・人間総合科学研究科・教授

研究者番号：40400676

### (3)連携研究者

橋口 義久 (2008 年度)

(HASHIGUCHI YOSHIHISA)

高知大学・医学部・名誉教授

研究者番号：70153187

我妻 ゆき子 (2008 年度)

(WAGATSUMA YUKIKO)

筑波大学・人間総合科学研究科・教授

研究者番号：40400676