

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590577

研究課題名（和文）

新規核酸増幅法 LAMP 法によるヒトヘルペスウイルス迅速診断法の確立

研究課題名（英文）

Development of a novel DNA amplification methods by loop-mediated isothermal amplification in human herpesvirus infections.

研究代表者

井平 勝（藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授）

研究者番号：10290165

研究成果の概要（和文）：

本研究において HHV-8 LAMP 法による迅速診断法の確立を果たし、すべてのヘルペスウイルスについて LAMP 法による迅速診断法を確立した。また、検体を直接 LAMP 法に用いることができることを明らかにしさらなる迅速化を可能にした。VZV 野生株とワクチン株の識別や HHV-6 variant 特異的 LAMP 法など相同性の高い領域を特異的に増幅可能なことを証明した。LAMP 法による定量の試みとしてグアニン消光現象を用いた Qprobe を用いて検討した。

研究成果の概要（英文）：

We constructed the rapid diagnostic methods using LAMP were developed for all 8 human herpesvirus infections. Viral DNA was detected in serum without DNA extraction by using LAMP. Furthermore, we developed type specific LAMP methods, which could discriminate between VZV vaccine strain and wild-type strain or between HHV-6 variant A and variant B. Qprobe is expected to become a new method for quantification of viral DNA by the LAMP method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

我が国で開発された新規遺伝子増幅法である LAMP 法は、優れた核酸増幅効率を持ち、等温増幅であるためサーマルサイクラーのような機器を必要としない。さらに増幅産物を濁度（目視）によって判定可能で、これまで分子生物学的診断法にはない優れた面がある。さらに、迅速性、特異性の面でも PCR 法と同等もしくはそれ以上であり、これらの点はベッドサイドでの迅速診断を行う上で極めて大きなアドバンテージとなる。国産技術でもあり、研究開始時の方法論についての主要な論文は本邦の研究者より発表されていた。また、その応用範囲も医療分野にとど

まらず畜産、食品衛生など多岐にわたっている。医療分野も含めその研究の多くは、LAMP 法の迅速性と操作の簡便性を生かした定性的核酸検出方法の確立がほとんどを占めている。一方、現在の病原体遺伝子検出法はリアルタイム PCR 法による定量的な評価が主流で、我々がターゲットとしているヘルペスウイルス感染症の分野でも同様である。本分野において LAMP 法の特徴である迅速、簡便な点を生かした標的遺伝子の定量評価法としての報告は非常に少ない。

2. 研究の目的

ヒトに感染するすべてのヘルペスウイルス感染症について、LAMP 法による迅速診断法を

開発する。これまで構築したヘルペスウイルス迅速診断法構築の経験をもとに、direct LAMP 法(DNA 抽出省略)など LAMP 法を基とした有用なアプリケーションの開発などの適応拡大について検討する。さらに最終的な目標としては LAMP 法をもちいた、標的遺伝子の定量評価法を確立することにある。

3. 研究の方法

まずヒトに感染するすべてのヘルペスウイルス感染症の迅速診断ツールとしての LAMP 法を構築するため、残る HHV-8 についての LAMP 法の確立を行った。続いてこれまで構築した LAMP 法の適応範囲をさらに広げるために、サンプル(血清)から抽出過程を省略した direct LAMP 法の基礎検討、臨床検討を含めた解析を行った。(咽頭ぬぐい液、皮膚ぬぐい液についてはすでに報告済)。さらに複数の primer で標的領域を認識する LAMP 法は、他の遺伝子増幅法と比較しても高い特異性を有している。この性質を利用した LAMP 法の応用を目的に以下の三つを検討した。

- ①HHV-6 サブタイプ特異的 LAMP 法の構築
- ②VZV ワクチン株、野生株の LAMP 法による識別
- ③最終目標として LAMP 法をリアルタイム PCR 法に代わるグローバルスタンダードにすることも目標に定量性の獲得を目的にする。LAMP 法も DNA の合成副産物であるピロリン酸 Mg の濁度を測定することで DNA 定量の可能性が示されているが、いまだ充分な方法となっていない。そこで本研究では、われわれが既に確立したヘルペスウイルス LAMP 法を基に、プライマー設計からブラッシュアップし LAMP 法の唯一の弱点である定量性獲得について検討した。

4. 研究成果

(1) LAMP 法による HHV-8 DNA の迅速検出

①はじめに

HHV-8 はカポジ肉腫の組織から発見されたため、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)とも呼ばれる。AIDS に合併するカポジ肉腫、primary effusion lymphoma、あるいは Castleman 病の発症に HHV-8 が関与している。HHV-8 LAMP 法は、初期検討として感度、特異性について確認後、臨床応用として 17 名の Kaposi' s sarcoma 組織、2 つの primary effusion lymphoma (PEL) cell line から抽出した検体を用いて評価した。

②方法と結果

標的領域は HHV-8 ORF26 とし、LAMP primer を設計した。HHV-8 LAMP 法の特異性を確認するためにヒトに感染する 8 種類のヘルペスウイルス DNA を HHV-8 LAMP 法によって増幅し、HHV-8 DNA においてのみ濁度上昇と LAMP 反応に特徴的なラダーパターンを確認した。標的

領域をサブクローニング、コピー数を決定した後 10 段階希釈した。濁度上昇、ラダーパターンを認めた最大希釈倍率をもって HHV-8 LAMP 法感度とした。HHV-8 LAMP 法の感度は、濁度による判定と電気泳動によるラダーパターン確認の両者とも 100 コピー/反応であった。テンプレートに含まれる Plasmid コピー数と濁度が 0.1 に達するまでの時間(Tt 値)の関係は、100 から 1000000 コピー/反応において slope=84.079、y-intercept 1936、両者の相関係数は 0.942 であった。(図 1)

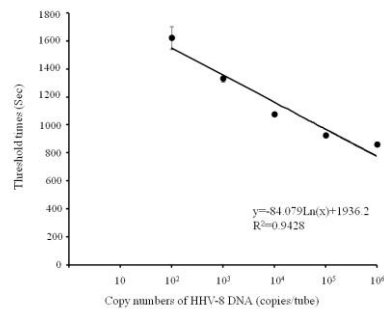


図 1: HHV-8 plasmid コピー数と Threshold time (Tt 値) の関係

領域より得られた Kaposi' s sarcoma 組織から抽出した検体、2 つの primary effusion lymphoma cell line の合計 19 検体より得られた DNA について HHV-8 LAMP を行い、real-time PCR (Lallemant et al. 2000) と比較した。その結果を Table 1 に示す。Real-time PCR と HHV-8 LAMP の結果は、非常によく一致していた。定量的な評価について real-time PCR により決定された反応あたりのコピー数と Tt 値を比較した。両者の相関係数は $R^2=0.4846$ であった。

Table 1. Comparison between HHV-8 LAMP and the previously established real-time PCR

No. of samples	materials	real time PCR (copies/tube)	results of LAMP (second =)
1	KS*	0	- (2700<)
2	KS*	0	- (2700<)
3	KS*	0	- (2700<)
4	KS	138	+ (2208)
5	KS*	353	+ (1122)
6	KS*	380	+ (1302)
7	KS	1640	+ (1923)
8	KS*	2730	+ (1968)
9	KS	2980	+ (1638)
10	KS	4570	+ (930)
11	KS	7560	+ (1074)
12	KS*	13402	+ (984)
13	KS	28483	+ (1023)
14	KS	51161	+ (996)
15	KS	52199	+ (1098)
16	KS	157878	+ (876)
17	KS	177798	+ (978)
18	PEL cell line	946765	+ (774)
19	PEL cell line	16594820	+ (720)

KS: Kaposi' s sarcoma, PEL: primary effusion lymphoma, *paraffin embedded sample
#Time required for the turbidity to exceed the cut-off value (0.1)

③小括

今回構築した HHV-8 LAMP 法は優れた特異性を持つことが証明された。また、HHV-8 LAMP 法の感度は濁度上昇による判定、アガロース電気泳動による判定の両者において 100 コピー/反応であった。臨床検体による検討では、定性的な結果において real-time PCR と LAMP 法の結果は完全に一致していた。定量的な評価としては real-time PCR 法と LAMP 法

の相関係数は十分とは言えなかった。これは、real-time PCR 法と LAMP 法は標的領域が異なることが原因の一つかもしれない。定量性についてはさらに検討が必要であると考えられた。

(2)LAMP 法による VZV ワクチン株、野生株に迅速鑑別法の確立

①はじめに

岡株水痘ワクチンは安全且つ免疫源性の強い優れたワクチンである。しかし、ワクチン接種後に帯状疱疹を含む水疱性皮膚病変を生じた場合、その原因がワクチン株によるものか野生株によるものか迅速に判別する必要が生じる。そこで本研究では、LAMP 法による Varicella-zoster virus (VZV) ワクチン株と野生株の判別法の確立を目指した。

②方法と結果

VZV ワクチン株と野生株間で遺伝子変異が多く認められている ORF 62 の中に標的領域を 2 箇所設定 (VR-1、VR-2) し、VZV 型判別 LAMP 用プライマーを設計した。初期検討としてヒトに感染する他のヘルペスウイルスを感染させた細胞より DNA を抽出 VR-1、VR-2LAMP 法で増幅しそれぞれの特異性が十分であることを確認した。

また、VR-1、VR-2 の標的領域をサブクローニング、コピー数を決定後、10 倍段階希釈し、アガロース電気泳動にてラダーパターンを認める最小コピー数を LAMP 反応の感度とすると、VR-1、VR-2 の感度はともに反応あたり 100 コピーであることが確認された。増幅の確認は LA-200 による濁度上昇、アガロースゲル電気泳動法の両方法で確認いずれの方法も一致した。標準株として Kawaguchi 株、Oka 親株、Oka ワクチン株の DNA をそれぞれの LAMP 法で増幅後、両者を鑑別するため LAMP 産物を *Sac* II (VR-1) そして *Sma* I (VR-2) で消化、電気泳動によって得られるバンドサイズが予想と一致することを確認した (図 2)。また、それぞれの LAMP 増幅産物が予想される塩基配列を持っていることもダイレクトシーケンスで確認した。

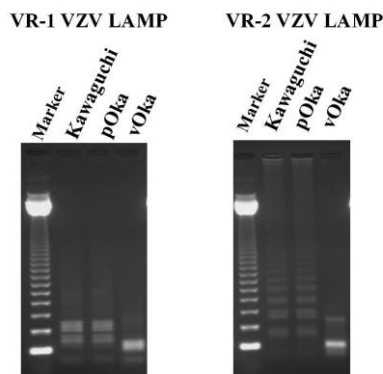


図 2: 制限酵素による VR-1、VR-2LAMP 産物消化

臨床応用の可能性を検討するため水痘を疑われた患児の皮膚ぬぐい液 (DNA 抽出を省略) を LAMP 法に用いた。20 症例すべてにおいて VR-1、VR-2LAMP 法ともに濁度上昇が確認された。それぞれの LAMP 産物をそれぞれ *Sac* II そして *Sma* I で切断し型判別を試みた結果、すべての消化パターンは野生株パターンと一致、ダイレクトシーケンスによる判定とも一致した。

③小括

設計したプライマーは、VZV に対して優れた特異性を示し、その感度は、100 コピー/反応であった。VR-1、VR-2LAMP 法ともにワクチン株、野生株共に効率良くウイルス遺伝子を増幅することも確認し、得られた LAMP 産物を適切な制限酵素により切断することにより、簡便に Oka ワクチン株と野生株 VZV との判別が可能であることを証明した。今回構築した LAMP 法ではワクチン株と野生株の識別に制限酵素処理が必要であるが、この点についてもさらに検討を進め、特異的 primer の選択などにより制限酵素処理を行わなくても識別可能な方法を開発して行きたい。

(3)HHV-6LAMP 法による血清中ウイルス DNA の direct 検出

①はじめに

HHV-6 の初感染像は、乳児期後半に好発する突発疹である。有熱期には特異的な臨床所見が無く、他の熱性疾患との鑑別は困難である。今回は、迅速診断のため遺伝子増幅検査法が必要とされる DNA 抽出過程を省略、LAMP 法により直接ウイルス DNA を増幅することにした。

②方法と結果

標的領域をサブクローニング、コピー数を決定後、HHV-6 抗体陰性の血清を用いて plasmid を段階希釈した。感度を向上させるために熱変性過程を加えた結果、熱変性過程がない場合では 1000 コピー/反応であった感度が 10 コピー/反応まで向上した (図 3)。

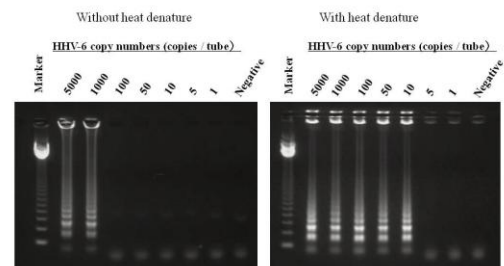


図 3: 熱変性による感度上昇
検体として DNA を用いて熱変性を行った場合、

その感度は 5 コピー/反応まで上昇した。臨床的有用性を検討するため発熱を主訴に小児科を受診した患児 300 名を対象とし、同意を得た上で約 2 ml のヘパリン加血を採取した。末梢血単核球からウイルス分離を実施、血清からは LAMP 法により直接 ウイルス DNA 増幅を行い両者について比較検討した。300 名中ウイルス分離が陽性だった患児は 132 名であった。そのうち direct LAMP 法が陽性であった患児は 126 名であった。ウイルス分離が陰性であったのは 168 名で、そのうち 8 名からは LAMP 法で血清中ウイルス DNA が検出された。ウイルス分離を基準とした場合、HHV-6 direct LAMP 法の感度、特異度、陽性予測率、陰性予測率はそれぞれ 95.5%、95.2%、94%、96.4%であった。ウイルス分離が陽性で direct LAMP 法陰性の 6 検体のうち、DNA 抽出によって 4 名は陽性となった。

③小括

細胞成分を含まない血漿中のウイルス DNA の存在は、HHV-6 活動性感染の良い指標になることが知られている。我々が確立したシステムは、血漿を熱変性後に直接 LAMP 反応を行うことで工程を簡略化し、全工程が約 45 分で終了する。熱変性による感度上昇と抽出過程の省略は、LAMP 法の適応範囲を拡大する簡易法として有用である。今後移植後のウイルス感染モニタリング法としての有用性も検討したい。

(4) LAMP 法を用いた HHV-6variant A と B の識別

①はじめに

我が国での造血幹細胞移植後の HHV-6 感染症のほとんどが HHV-6 variant B であるが、欧米では variant A による重症感染症の報告もある。よって、variant 特異的な迅速診断法確立は重要である。我々は血清から直接ウイルス DNA の増幅が可能であることを示し、迅速診断法としての有用性を報告した。本研究ではそれに加え、HHV-6 variant 特異的 LAMP 法を構築、HSCT 後の HHV-6 感染モニタリングとして有用か検討した。

②方法と結果

それぞれの標的領域 (HHV-6 U86 領域) をサブクローニング後、HHV-6 抗体陰性血清でプラスミドの希釈系列を作成して各 LAMP 法の感度を決定した。Variant A LAMP 法が 10 コピー/反応、variant B LAMP 法が 100 コピー/反応であった。さらに、他のヒトヘルペスウイルスの DNA を用い特異性を確認した結果、variant 特異的な LAMP 法において交差反応を認めないことが確認された (図 4)。

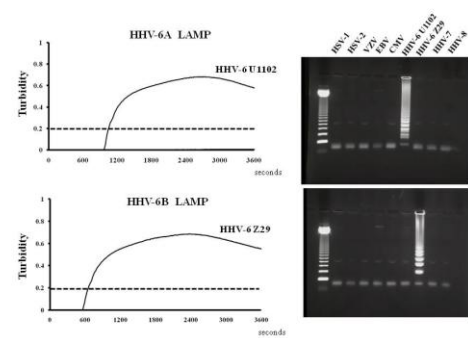


図 4 : HHV-6 variant 特異的 LAMP 法特異性

HSCT を受けた患児 24 名から採取された血液 148 検体を用い、血清から DNA を抽出、real-time PCR 法 (variant 共通) によるウイルス量測定と血清を用いた variant A と variant B それぞれの特異的 LAMP 法を行い、両者を比較した。148 検体中 15 検体で real-time PCR 法によってウイルス DNA が検出されこのうち 12 例で variant B LAMP 法が陽性となった。したがって real-time PCR 法を基準とした時の特異度、陽性予測率、陰性予測率はそれぞれ 80.0%、100%、100%、97.8%であった。Variant A LAMP 法が陽性となった検体はなかった。定量性検討のため、血清を用いた direct LAMP 法によってえられた Tt 値と real-time PCR 法によるコピー数を比較したが高い相関係数は得られなかった ($R^2=0.342$)。これは抽出 DNA を用いて検討した場合でも同様であった ($R^2=0.4019$)。

③ 小括

我々は以前に LAMP 産物を制限酵素で消化することにより variant A と variant B の識別ができることを報告したが、本研究による variant 特異的な LAMP 法により制限酵素処理を必要とせずに簡易、迅速に識別できることを証明した。血清中のウイルス DNA の検出は活動性感染の優れた指標となることは証明されており、血清中から DNA 抽出を省略して検出することは移植後の HHV-6 モニタリングとしての有用性は高い。Variant A LAMP 法は、陽性検体がなく臨床応用について評価ができなかった。

(5) Quenching probe による定量的 LAMP 法の開発

① はじめに

単純ヘルペスウイルス (HSV) は、皮膚粘膜疾患をはじめ中枢神経疾患、母子感染など様々な臨床像と関連する重要なウイルスである。今回は HSV LAMP 法と、近年開発されたグアニン消光現象を利用した Qprobe 法を組み合わせた HSV DNA 迅速定量法開発を目的

とした。

②方法と結果

HSV-1、HSV-2 に特異的な遺伝子配列部位に各 primer を設定した。標的領域をサブクローニング後、抽出したプラスミドのコピー数を決定し段階希釈してキャリブレーション系列とした。各定量的 LAMP 法の mixture として、12.5 μ l の Loopamp 増幅試薬キット (栄研化学) に HSV-1 または HSV-2 特異的 primer mix (40pmol FIP, BIP 20pmol LPB, LPF 10pmol F3, B3) を 1.4 μ l、1 μ l の Qprobe (4pmol)、8U *Bst* polymerase を加え全量 20 μ l とした。テンプレートを 5 μ l 加えた後、63 度・30 分間 StepOne (ABI) を用いて連続的に蛍光強度変化を測定した。Ct 値の決定は QP-PCR データ解析ツール (J-Bio21) を用いた。HSV-1、HSV-2 特異的定量的 LAMP 法の感度は、両者とも 100 コピー/反応で、 10^2 - 10^6 コピー/tube の間で良好な直線関係をみとめた (図 5)。

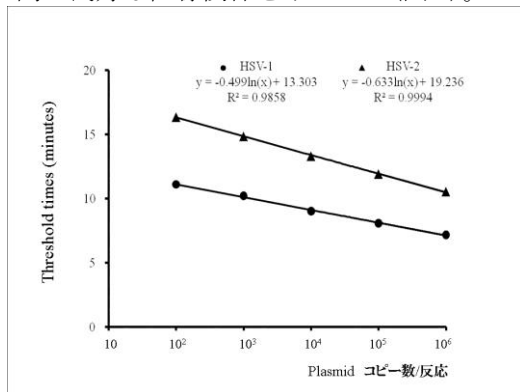


図 5 : HSV 定量的 LAMP 法の標準曲線

日差再現性について検討した結果、HSV-1 特異的定量的 LAMP 法で $r^2=0.99$ 、SD は 0.4-0.7、HSV-2 特異的定量的 LAMP 法では $r^2=0.97$ 、SD は 0.3-0.8 であった。

同時再現性の検討では、HSV-1 特異的定量的 LAMP 法で $r^2=0.99$ 、CV は 0.8-5.8% であった。また、HSV-2 特異的定量的 LAMP 法で $r^2=0.99$ 、CV は 0.4-7.4% であった。臨床検体の検討では HSV-1 陽性検体のみであったため、HSV-1 特異的 real-time PCR 法と定量的 LAMP 法の比較のみ可能であったが、 r^2 は 0.82 であった。

③ 小括

今回の定量的 LAMP 法は、日差再現性、同時再現性ともに良好で信頼性の高いウイルス DNA 定量的評価法と考えられた。本法は LAMP 法の迅速性を保ちつつ (HSV-1 15 分、HSV-2 20 分)、ウイルス DNA 量の測定が可能で臨床的有用性は高いと思われる。臨床検討でも real-time PCR 法と定量的 HSV-1 LAMP 法に良好な相関がみられたが、LAMP 法の感度以下 (100 コピー以下) の検体も存在し測定レンジからはずれているのが問題であった。テン

プレート増量、primer 改良、反応条件検討などが必要と考えられた。また 2 検体では、real-time PCR では検出、LAMP 法では陰性であった。

(6) 総括

本研究期間中に HHV-8 LAMP 法を構築したことで、ヒトに感染する全てのヘルペスウイルス DNA を迅速に検出するための LAMP 法の基礎検討とその臨床的有用性を証明し終えた。また、LAMP 法の応用として DNA 抽出を省略できる事を証明したことは迅速検査法として大きなアドバンテージといえる。また非常に相同性の高い HHV-6 variant A と B をそれぞれ特異的な LAMP 法により増幅可能であることを証明したことは、さらなる LAMP 法適応拡大につながる。研究目的の最終年度に検討予定であった定量的 LAMP 法の開発については、十分な成果を上げることができなかった。当初、LAMP 産物検出法に濁度上昇に代えて SYBR Green を使用したが特に低いコピー数の再現性が十分ではなかった。しかし、これらの問題についても Quenching probe を用いる事で測定時間を real-time PCR の半分以下、再現性の問題について解決できる可能性が示唆された。今後検討を継続することにより real-time PCR に代わるグローバルスタンダードとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Ihira M, Sugiyama H, Enomoto Y, Higashimoto Y, Sugata K, Asano Y, Yoshikawa T. 2010 Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by variant specific loop-mediated isothermal amplification in hematopoietic stem cell transplant recipients. J Virol Methods. 査読有, 167(1):103-106
- 2) Yoshikawa T, Ohashi M, Miyake F, Fujita A, Usui C, Sugata K, Suga S, Hashimoto S, Asano Y. 2009 Exanthem subitum-associated encephalitis: nationwide survey in Japan. Pediatr Neurol. 査読有, 41(5):353-8
- 3) Ihira M, Ohta A, Sugata K, Suga S, Asano Y, Yoshikawa T. 2008 Loop-mediated isothermal amplification for discriminating between human herpesvirus 6A and B. J Virol Methods. 査読有, 154(1-2):223-225.
- 4) Fujita A, Ihira M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Sugata K, Suga S, Asano Y, Yagasaki H, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. 2008 Elevated serum

- cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. J. Infect. 査読有, 57(3):241-248.
- 5) Higashimoto Y, Ihira M, Ohta A, Inoue S, Usui C, Asano Y, Yoshikawa T. 2008 Discriminating between varicella-zoster virus vaccine and wild-type strains by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 査読有, 46(8):2665-2670.
- 6) Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T. 2008 Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. Liver Transpl. 査読有, 14(1):100-109.
- 7) Kuhara T, Yoshikawa T, Ihira M, Watanabe D, Tamada Y, Katano H, Asano Y, Matsumoto Y. 2007 Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 査読有, 144(1-2):79-85.
- 8) Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Fujita A, Sugata K, Suga S, Ohashi M, Nishimura N, Ozaki T, Asano Y, Yoshikawa T. 2007 Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Virol. 査読有, 39(1):22-26.
- [学会発表] (計 8 件)
- 1) 井平 勝 Qprobe を用いた定量的 HSV LAMP 法の開発 第2回 LAMP 研究会 2010年3月6日 東京
- 2) Yoshikawa T Factors in Association with Three Important Herpesviruses (CMV, HHV-6, and EBV) Infection after Hematopoietic Stem Cell Transplantation 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections 2009 October 6 Japan Kobe
- 3) Sugiyama H Direct detection of EBV DNA in serum by loop mediated isothermal amplification in patients with infectious mononucleosis. 34th Annual International Herpesvirus Workshop 2009 July 29 USA Ithaca
- 4) Ihira M Direct detection of HHV-6 DNA in serum by variant specific loop mediated isothermal amplification in hematopoietic stem cell transplant recipients. 34th Annual International Herpesvirus Workshop 2009 July 27 USA Ithaca
- 5) 井平 勝 Variant 特異的 HHV-6 LAMP 法による造血幹細胞移植後 HHV-6 感染モニタリング第1回 LAMP 研究会 2009年3月7日 東京
- 6) 井平 勝 Variant 特異的 HHV-6 LAMP 法による造血幹細胞移植後 HHV-6 感染モニタリング 日本ウイルス学会 2008年10月27日、岡山
- 7) Ihira M Direct detection of HHV-6 DNA from serum by variant specific Loop mediated isothermal amplification method (LAMP) after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). 6th International Conference on HHV-6&7 2008 June 20 USA Baltimore
- 8) Ihira M Monitoring of human herpesvirus load in peripheral blood of hematopoietic stem cell transplant recipients. IDSA 2007 October 6 USA San Diego
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
井平 勝 (IHIRA MASARU)
藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授
研究者番号: 10290165
- (2) 研究分担者
杉山 博子 (SUGIYAMA HIROKO)
藤田保健衛生大学・医学研究科・研究員
研究者番号: 10387714
榎本 喜彦 (ENOMOTO YOSHIHIKO)
藤田保健衛生大学・医学研究科・研究員
研究者番号: 00387713
吉川 哲史 (YOSHIKAWA TETSUSHI)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号: 80288472
浅野 喜造 (ASANO YOSHIZO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 40131180