

病原体検出マニュアル

ウイルス性肝炎

(E 型肝炎及び A 型肝炎を除く)

第 1 版

2020 年 9 月

ウイルス性肝炎（E型肝炎及びA型肝炎を除く）

主に血液を介して感染する肝炎にはB型肝炎、C型肝炎、D型肝炎がある。以下、それぞれの肝炎の特徴、診断法について述べる。測定方法の実際については各試薬メーカーの指示に従っていただきたい。一部、重要な検査については詳細に解説している。

1. C型肝炎

HCV遺伝子のゲノム RNAは約9500塩基で、9030塩基以上の一つの大きなopen reading frame (ORF)を有し、3010アミノ酸からなる前駆体蛋白質をコードしている。この前駆体蛋白質から、細胞由来のシグナラーゼとウイルス由来のプロテアーゼによって、ウイルス粒子を形成する構造蛋白のコア蛋白(C)、エンベロープ蛋白(E1、E2、p7)とウイルス粒子に含まれない非構造蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)が産生される。HCVマーカーは(1)HCVに感染した宿主が産生するHCV抗体を測定する抗体診断、(2)コア抗原を測定する抗原診断、(3)HCV RNAを測定する核酸診断の3系統に分けられる。

C型急性肝炎は、血清でのHCV抗体陰性、かつHCV RNAまたはHCVコア抗原が陽性であることによって診断される。これは、HCV抗体は急性期に検出されるのは50%以下であり、発症後3ヶ月目に90%、6ヶ月目にはほぼ100%陽性となるためである。一方、RT-PCR法によりHCV RNAを検出することは発症初期でも100%検出されるので、急性肝炎では抗体検査と遺伝子検査を組み合わせる必要がある。

1-1. HCV抗体検査

C型肝炎のスクリーニング・診断にはまず HCV抗体を検査する。HCVのコア領域、NS3・4領域および NS5A領域の3つの領域の遺伝子組換え発現蛋白を抗原エпитープとして用いた方法がスクリーニング検査に広く用いられるようになった。その測定には凝集法(PHA法、PA法)、酵素抗体法(EIA法)、化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法)があり、近年では高感度で迅速な測定が可能な化学発光法が一般に用いられている。

1-1-1. 凝集法 (PHA法、PA法)

原理：被検血清中に HCV抗体が存在すると、動物血球(PHA)あるいはゼラチン粒子(PA)の表面に吸着している HCVの抗原と免疫反応がおこり、その結果、凝集が生ずる。

特徴：簡便で、感度も高く、迅速に半定量が可能で、大量検体のスクリーニングに適している。中等度の HCV抗体価(25~212PHA価/25~211PA価)を示した場合には、キャリアと感染既往者を区別できないので、RT-PCR法により HCV RNAの有無を判別することが必要である。

1-1-2. 酵素抗体法 (enzyme-immunoassay; EIA法)

原理：被検血清中の HCV抗体と HCV抗原を吸着させたビーズを反応させ、酵素標識抗ヒト IgG抗体でサンドイッチを形成した後に、酵素基質液を加えて発色させ吸光度を測定する。
特徴：簡便で、最も普及している HCV抗体の定性的検査法であるが、低値陽性例ではキャリアか感染既往者か否かの判断を RT-PCR法により行う。

1-1-3. 化学発光酵素免疫測定法(chemiluminescent enzyme immunoassay;CLEIA法) : Lumipulse

原理：HCVリコンビナント抗原を結合させた抗原結合粒子に検体中の HCV抗体を反応させる。酵素標識抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG抗体）を加えて反応させると、検体中の HCV抗体を介した 3者のサンドイッチ複合体が形成される。未反応の酵素標識抗体を分離後、化学発光基質(AMPPD)を加えて酵素反応を行う。抗原結合粒子に結合した検体中の HCV抗体は、AMPPDの分解に伴う発光量に反映される。

特徴：測定レンジの長い測定系（ルミパルス）を用いると、この測定系で得られる測定値が 10未満の場合は HCV抗体価は 2 6PHA価/2 5PA価未満に相当し、50以上の場合が 2 13PHA価/2 12PA価以上に相当することが、判明している。従って、ルミパルスで 10～50の測定値が得られた場合においてのみ以下に述べる遺伝子検査(RT-PCR)によるHCV RNAの検出を行うとよい。

1-2. 抗原検査

HCVコア抗原測定によって、現在の感染の有無を確定し、治療法の選択のための情報が得られる。

原理：1) EIA法、RIA法、及び CLEIA法があるが、いずれもサンドイッチ法を用いる。

特徴：コンタミネーションの危険が低く、定量性にも優れている。一般的に用いられているCLEIA法は、検体の前処理を強力に行い、HCVのエンベロープ、コア粒子を最小のペプチド単位まで切断して被検血清中に存在する HCVのコア抗体も抗体活性がなくなるまで破壊する、HCVコアペプチドの N末端と C末端に反応する 2種類のモノクローナル抗体を使用する、化学発光により定量する、ことなどにより、RNAでなくタンパクで測定できるため保存血清での測定も可能で、大量検体の処理に適しており、検出感度が高く、定量域も広く、遺伝子を対象とするアンプリコアHCV RNA定量法に近づいてきた。

1-3. 遺伝子検査

1-3-1. 定性的検査

HCV RNA定性法の臨床で最も重要な点は、既感染であるのか、現在も感染状態であるのかという鑑別である。HCV RNAが陰性であれば、既往感染の可能性が高い。また、急性C型肝炎

炎においてもHCV抗体の陽性化には感染後通常1～3カ月を要するため（ウインドウ期）、この時期にはHCV RNA定性検査が有用である。また、治療効果の判定の際にも利用されている。HCV RNA定性検査にはアンプリコアHCV RNA定性法およびnested RT-PCR法があるが、現在ではnested RT-PCR法が用いられている。

1-3-1-1. アンプリコア HCV RNA定性法

原理：被検血清よりHCV RNA抽出を行い、逆転写反応によりHCV RNAから cDNAの合成を行う。PCR法によるcDNAの増幅を行い、DNAプローブと増幅DNAとのハイブリダイゼーションを行う。発色反応を行い、吸光度を測定し、増幅DNAの検出を行う。

特徴：現在最も繁用されているHCV RNA定性法は、 $10^2 \sim 10^3$ copies/mlと高い感度を有するが、定量性はない。このRT-PCR法は逆転写反応とPCR反応を同一のチューブ内で行う方法で、迅速かつ簡便でコンタミネーションの危険が少ない。また、抗ウイルス療法の治療中および治療後のモニタリングとしても臨床的有用性が認められている。

1-3-1-2. nested RT-PCR法

原理：被検血清よりRNA抽出を行い、逆転写反応によりcDNAの合成を行う。HCV RNAの増幅したい遺伝子領域を挟むようにプライマーの設定を行って、通常、30～40サイクルの増幅を行う。血清中のHCV RNA量がきわめて微量である場合には、十分なPCR産物を得るために、1stPCRのプライマーの位置の内側の配列に、2nd PCRのプライマーを設定し、さらに 30～40サイクルの増幅を行うnested PCR法を行う。また、プライマーは、各遺伝子型で最も保存性の高い領域である5非翻訳領域（5-untranslated region; UTR）に設定する。

特徴：nested RT-PCR法は最も高感度なHCV RNA測定系であるため、抗ウイルス療法によるHCV RNAのモニターや治療の効果判定など低ウイルス量において特に有用であるが、定量性に乏しい。

（1）試薬と器具

Sepa Gene RV-R（エーディア）

クロロフォルム（特級）

イソプロパノール（特級）

エタノール（特級）

75%エタノール／25% TE

逆転写酵素（SUPERScript II, 5 X buffer付き。Invitrogen）

DTT（dithiothreitol. SUPERScript IIに附属）

Ribonuclease inhibitor（TAKARA）

Taq DNA polymerase（TAKARA, 10X buffer, dNTP付き）

ddH₂O

分子量マーカー
電気泳動用アガロース
マイクロ冷却遠心器
インキュベーター
サーマルサイクラー
電気泳動装置UV照射写真撮影装置

(2) RNAの抽出

被検血清より市販のSepa Gene RV-Rを用いて HCV RNAを抽出する方法を述べる。RNA抽出キットはその他にもあるが、Sepa Gene RV-Rは非フェノール性の試薬のため安全性が高く、RNA共沈剤が添加されており、HCV-RNAの存在に関わらず、必ず青色ペレットの沈殿物が目視でき、サンプルの損失がない、という長所がある。

- 1)滅菌済み1.5mlマイクロチューブに試薬 1 を300 μ l分注する。
- 2)血清サンプル100 μ lを1)にサンプリングし、ボルテックスで攪拌後軽く遠沈する。
- 3)試薬 2 300 μ lと試薬 3 600 μ lを加え、マイクロチューブのキャップをしっかりと閉めて上下に激しく往復振盪させ、均一な乳化状態になるまで懸濁する。
- 4)-20°C、5~10分間冷却する。
- 5)12,000rpm (11,750 \times g)、4°C、15分間遠心する。
- 6)別の 1.5mlマイクロチューブに 600 μ lのイソプロピルアルコールを分注する。7) 5)の上層(水層)を分取し、6)に加え、ボルテックスで十分攪拌後、-80°C 8分間冷却する。
- 8)12,000rpm (11,750 \times g)、4°C、15分間遠心する。
- 9)青色ペレットに注意して、アスピレーターまたはピペットで上清を除去する。10)青色ペレットを壊さないように 70%エタノール約 1 mlを静かに加える。11)12,000rpm (11,750 \times g)、4°C、10分間遠心する。
- 12) アスピレーターまたはピペットで上清を完全に除去する。
- 13) 上清をピペットマンで丁寧に除き、沈澱を10 μ lの1 mM DTT (1/100容量のRNase inhibitorを含む)に溶かす。

(3) RT-PCR

用いるプライマーを以下に示す。逆転写反応にはランダムプライマーを用いることも可能であるが、本稿ではHCV特異的プライマー (#36AS) を用いる方法を示す。

#32S : 5 CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT 3 (nt 45 —64)

#36AS : 5 AAC ACTACT CGG CTA GCA GT 3 (nt 265 —246)

#33S : 5 TTC ACG CAG AAA GCGTCT AG3 (nt 63 —82)

#48AS : 5 GTT GAT CCA AGA AAG GAC CC 3 (nt 207 —188)

1)逆転写反応

RNA(前述)5.0 μ l

#36AS (1 μ M) 1.0 μ l

2.5 mM dNTP 0.5 μ l

DW 4.5 μ l

以上をミックスし 65°C、5分間インキュベートする。氷上に移し、

5x buffer 4.0 μ l

0.1 M DTT 2.0 μ l

RNase inhibitor (Takara) 0.5 μ l

を加え 42°C、2分間インキュベートする。続いて1 μ lの SUPERSCRIP^TIIを加え丁寧にピペッティングする。42°C、50分間で逆転写反応を行った後、70°C、15分間インキュベートして不活性化する。

2)1st PCR

cDNA 5.0 μ l

#36AS (10 μ M) 1.0 μ l

#32S (10 μ M) 1.0 μ l

10x buffer 5.0 μ l

2.5 mM dNTP 5.0 μ l

DW 32.5 μ l

TaKaRa Taq 0.5 μ l

Total volume 50.0 μ l

94 ° C, 3.5 min で 熱変性を行った後、

94 ° C, 1min → 55 ° C, 1.5min → 72 ° C, 2min (35サイクル)

更に 72 ° C, 10 min で 伸長反応を行う。

3) 2nd PCR

上記反応液 2 μ l を用いて 2nd PCR を行う。

1st PCR DNA 2.0 μ l

#48AS (10 μ M) 1.0 μ l

#33S (10 μ M) 1.0 μ l

10x buffer 5.0 μ l

2.5 mM dNTP 5.0 μ l

DW 35.5 μ l

TaKaRa Taq 0.5 μ l

Total volume 50.0 μ l

94 ° C, 3.5 min で 熱変性を行った後、

94 ° C, 1min → 55 ° C, 1.5min → 72 ° C, 2min (35サイクル)

更に 72 ° C, 10 min で 伸長反応を行う。

4) アガロースゲル電気泳動

10 μ lの PCR反応液を電気泳動する。エチジウムブロマイド染色により、2ndPCRで 145bp のバンドが検出される。また、検体中の HCV量が多い場合、1stPCR後のサンプルで 221 bp のバンドが検出されることがある。

技術的に注意すべき点：

HCV RNAは実験者の唾液や汗に存在しているRNaseによってさえ容易に分解されてしまうので、取り扱いには十分な注意を要する。また、血清の凍結融解の繰り返しによっても HCV RNAの検出効率が大きく低下するので、保存は必要なだけ分注しておくのが望ましい。また、PCR法の大きな問題にコンタミネーションがある。PCR産物が極くわずかであっても測定系に混入すると陰性検体も陽性になってしまうため、PCR法による検査を行っている実験室では検体調製と PCR産物の検出を別の部屋で行うなどの工夫が必要である。

1-3-2. 定量的検査

HCV RNAの定性検査は分岐DNAプローブ (bDNA) 法、アンプリコア定量法 (モニター法)、real-time PCR法で行い、ウイルス血症の程度 (増殖状態) を評価する。現在では、real-time PCR法が用いられている。また、抗ウイルス療法の治療中および治療後のモニタリングや効果判定、経過観察などの臨床的有用性が認められている。

1-3-2-1. 分岐DNAプローブ (bDNA) 法

原理：被検血清より RNAを抽出した後、マイクロプレートに固相化された相補 DNAプローブとハイブリダイズさせることで HCV RNAを捕らえる。次に分枝鎖標識 DNAプローブと反応させ化学発光の相対強度を測定し、定量化する。

特徴：PCRを用いないため測定が簡便迅速であり、高ウイルス量での定量性に優れているが、感度が低く 105.5copies/ml以上ないと検出されないため、現在ではあまり用いられていない。

1-3-2-2. アンプリコア HCV RNA定量法

原理：被検血清より HCV RNA及び標準 RNA抽出を行い、逆転写反応によりHCV RNAと標準 RNAから cDNAの合成を行う。PCR法によるcDNAの増幅を行い、DNAプローブと増幅 DNAとのハイブリダイゼーションを行う。発色反応を行い、吸光度を測定し、定量標準と比較することにより増幅 DNAを定量する。

特徴：比較的高感度で、測定範囲は 0.5~850KIU/mlである。このRT-PCR法は逆転写反応と PCR反応を同一のチューブ内で行う方法で、迅速かつ簡便でコンタミネーションの危険が少ない。

1-3-2-3. real-time PCR法 (コバスTaqMan HCVオート)

原理：検出したい HCV RNAの遺伝子領域の特異的プライマーと 2本鎖 DNA(dsDNA)に結合する発行色素を用いたPCR法である。あらかじめ、濃度既知のHCV RNAの cDNA断片が組み込まれたプラスミドと一緒にPCR反応を行い、増幅されているPCR産物に結合した蛍光強度を測定することにより検量線が算出され、未知の検体の HCV RNA量を絶対的、相対的に定量する。

特徴：PCR産物の増幅がリアルタイム、オンラインで同時にモニターが可能である高感度の定量系で、エチジウムブロマイド染色と比較して、感度、特異性が高い。「コバスTaqMan HCVオート」として、保健認可されており、アンプリコアHCV RNA定量法に比較して高感度で測定範囲も広く、ウイルス量の動態など治療効果の予測、治療方針の決定などに有用である。

2. B 型肝炎

B型急性肝炎は、発症初期にHBs抗原陽性、IgM-HBc抗体陽性（高力価）の証明により確定診断される。重症、劇症肝炎ではHBs抗原がすでに血中から消失している場合があるので、IgM-HBc抗体測定は不可欠である。IgM-HBc抗体は、B型慢性肝炎の急性増悪時にも検出し得るが、急性肝炎時より抗体価は低値であり鑑別はほぼ可能である。本診断上、最も重要な点は、HBV持続感染、あるいはキャリアの急性増悪との鑑別である。B型急性肝炎では、HBs抗原が経過中に血中から消失し、肝炎は鎮静化し、HBc抗体、HBs抗体が陽転化し臨床的治癒となる。しかし肝細胞内には、HBV遺伝子が残存していることが最近明らかとなった。

HBV感染によりキャリア化した場合には（多くは母児間、幼少児期のHBV感染）、いずれもHBe抗原陽性となり、多くは無症候性キャリアとなって経過し、20代から30代にかけてHBe抗原からHBe抗体へのseroconversionがみられ、肝炎の活動性が低下する。HBVキャリアではHBc抗体がほとんどの場合で高力価のまま持続するが、数少ないHBs抗原消失例では低力価であることが多い。HBV遺伝子は4つのopen reading frame (ORF)からなっており、preS/S遺伝子はHBs抗原蛋白質をコードし、preC/C遺伝子はHBc抗原蛋白質とHBe抗原蛋白質をコードし、P遺伝子はDNAポリメラーゼをコードし、X遺伝子はHBx抗原蛋白質をコードしている。HBVマーカーは、それぞれの蛋白に対して、(1) HBs抗原/抗体、HBc抗原/抗体、などを測定する血清学的診断と(2) HBV-DNAを測定する遺伝子診断に分けられる。主なHBVマーカーは図1のごとく推移することが知られており、それぞれのマーカーの意義については表1に示した。

図1. HBV感染の経過

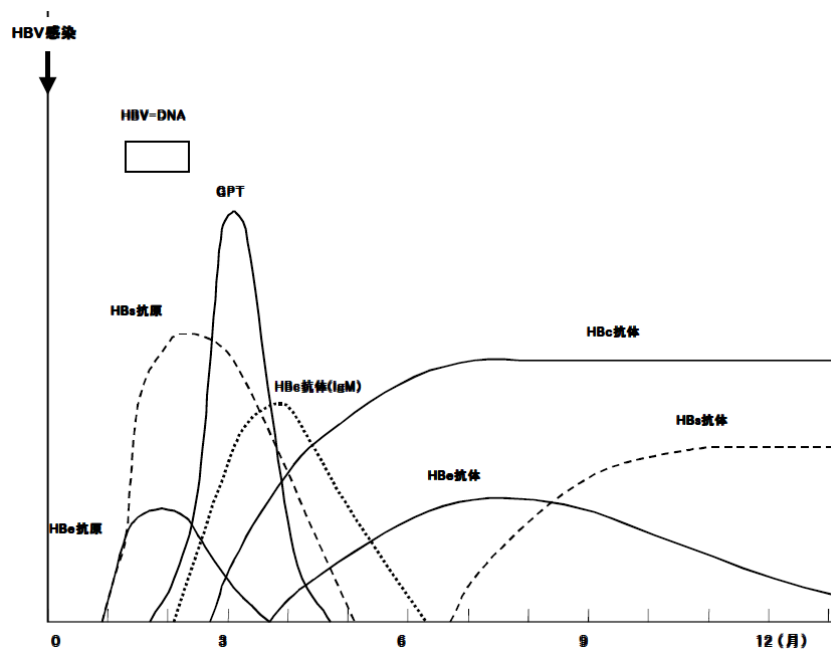


表 1. 血中HBV マーカーとその意義

-
1. 現在のHBV 感染状態の有無：HBs抗原、HBV-DNA
 - a) 急性肝炎：IgM-HBc抗体
 - b) HBVキャリア：HBc抗体高力価
 2. HBV感染既往の有無：HBs抗体、HBc抗体
 3. HBV増殖状態：HBe抗原、HBe抗体、HBV-DNA
-

2-1. 血清学的検査

HBV感染の検出に用いられるHBVマーカーとしてはHBs抗原が有用である。免疫血清学的検査法としては、EIA法、化学発光法、イムノクロマト法等があり、それぞれ検出キットが数多く市販されているが、近年では高感度で迅速な測定が可能な化学発光法が一般に用いられる。また簡便でかつ迅速な抗原、抗体測定法としてイムノクロマト法も開発されている。

HBs抗原を検出する主な検査法の特徴は以下のとおりである。

2-1-1. 酵素抗体法(enzyme-immunoassay; EIA 法)

原理：被検血清中のHBs 抗原とHBs 特異抗体を吸着させた固相(ビーズ)上のHBs抗体（一次抗体）とを反応させ、酵素標識HBs 抗体（二次抗体）でサンドイッチを形成した後に、基質と発色剤を加えて一定時間発色反応を行い、その吸光度を測定する。

特徴：特異性が高く、測定系が迅速であるが、化学発光法に比べて測定範囲が狭いものが多い。

2-1-2. 化学発光法

(chemiluminescent Enzyme Immunoassay; CLEIA 法、Chemiluminescent Immuno Assay; CLIA 法など)

原理：一例としてCLEIA法の原理について示す。被検血清中のHBs 抗原と固相の抗HBs 抗体結合フェイライト粒子とを反応させ、酵素標識抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗HBs抗体）でサンドイッチ複合体を形成した後に、未反応の酵素標識抗体を分離後、化学発光基質 (AMPPD) を加えて酵素反応を行う。抗体結合粒子に結合した被検血清中のHBs 抗原は、AMPPD の分解に伴う発光量に反映される。

特徴：専用の大型機器とキットを用いた測定法であり、血清もしくは血漿から迅速に全自動で測定が可能である。近年、高感度型のHBs抗原測定系が報告され、従来の方法よりも10倍以上鋭敏に検出できるようになってきている。

2-1-3. イムノクロマト法

原理：抗原抗体反応と毛細管現象を利用したクロマトグラフィを併用した定性反応である。

特徴：全血を検体として使用でき、特殊な器具を必要としないため、緊急的検査や検査器具などが不足している発展途上国などにおいても非常に有用な検査法である。近年、化学発光法に匹敵する検出感度を持つキットが発売されている。

2-2. 遺伝子検査

HBV-DNAは、患者中でのHBVの増殖状態を直接反映するもっとも信頼性の高い方法であり、病態や治療効果の判定、薬剤耐性株出現の把握等に用いられている。現在、HBV-DNA定量法としてReal-Time PCR法が利用可能である。これは高い感度と特異性をもってHBV-DNAを検出する方法であるが、コンタミネーションや温度変化の影響を受けるため、検体の取扱いには十分な注意が必要である。自動核酸抽出装置との組み合わせるとほぼ全自動で測定が行われる。HBV-DNAは 20 IU/mL 程度から検出可能であり、測定範囲も広く設定されている。測定方法の実際については各試薬メーカーの指示に従っていただきたい。

3. D型肝炎

D型肝炎ウイルス（HDV）は増殖にHBVを必要とする不完全ウイルスである。HBVとの同時感染、重複感染ともに、3～20週間の潜伏期間を置いて発症する。いずれの感染でも急激に悪化して、重症～劇症肝炎となることが多く致死率が高い。日本ではD型肝炎は非常に稀で、HBs抗原陽性者の1%未満と報告されている。しかし長崎県や沖縄県の一部の地域では、10%近い陽性率も報告されている。診断に際しては、まずHBs抗原やHBV-DNAを測定することによりB型肝炎の診断を行う。HDVが増殖する時期には、HBVの増殖は抑制されるため、HBV陽性者への重複感染ではHBe抗原が陰性となることが多い。HDV感染の診断には抗体検査および核酸検出検査が用いられるが一般化された検査法は無い。

3-1. 抗体検査

D型肝炎の診断には、HDV抗原、抗HDV抗体の免疫血清学的検査法とHDV-RNA検査法が用いられる。感染の診断には、主に抗HDV抗体の測定が用いられている。抗HDV抗体は中和抗体ではなく、高抗体価であれば現在の感染を、低抗体価であれば過去の感染を表している。現在、抗HDV抗体IgG、IgMを検出するキットについては国内では販売されていない。

3-2. 核酸検出検査

D型肝炎の確定診断はHDV RNAを検出することで行われる。HDVはRNAウイルスであるため、ゲノムは多様性に富み、高い変異率を有することが報告されている。これまでに8種類の遺伝子型が報告されており、日本では主に遺伝子型IとIIが報告されているが、その検出頻度は高くない。また、各遺伝子型間でそのゲノムに30-40%程度の違いがあることが報告されており、すべての遺伝子型株のゲノムを同じプライマーセットで検出することは難しい。これまでに多くの遺伝子型株の検出が可能とされている方法がいくつか報告されており、以下にその1例を示す。

3-2-1. 被検検体からのRNA抽出

検体の取り扱い、バイオセーフティーレベル(BSL)2で行い、市販のウイルスRNA抽出キットを用いてRNA抽出を行う。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 52904) 等が使用可能である。抽出方法についてはキットの説明書を参照していただきたい。抽出されたRNAは不安定なためRNaseの混入防止に細心の注意を払う。すぐに検出を行わない場合には-80度で保管することが望ましい。またRT-PCRにより増幅された核酸はコンタミネーションの原因となるため、ウイルスのRNA抽出とRT-PCRはそれぞれ異なった場所で行うことが望ましい。

3-2-2. リアルタイム one-step RT-PCR方によるHDVゲノムの検出

one-step RT-PCR法が可能な試薬を用いてHDVゲノムの検出を行う。QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN, Cat. No. 204443) 等が使用可能である。下記のプライマーとプローブのセットを用いて以下の条件で反応を行う。

・プライマーとプローブの配列

PAN-HDVF qRT-PCR forward primer; TCT CCC TTW GCC ATC MGA G

PAN-HDVR qRT-PCR reverse primer; TCC TCT TCG GGT CGG

PAN-HDVP qRT-PCR probe; CYC GCG GTC CGW CCT GGG C

・反応液組成 (QuantiTect Probe RT-PCR kit)

2× Master mix	12.5 μL
Forward primer (10 μ M)	1.5 μL
Reverse primer (10 μ M)	1.5 μL
TaqMan probe (5 μ M)	1.0 μL
Quantitect RT mix	0.25 μL
DDW	3.25 μL
<u>Template RNA</u>	<u>5.0 μL</u>
Total	25.0 μL

・反応条件

45°C, 10 min.

↓

94°C, 10 min.

↓

95°C, 30 sec.

60°C, 60 sec.(Data Collection) × 45 cycles

・参考文献

One-step real-time PCR assay for detection and quantitation of hepatitis D virus RNA.
(Kodani M., et al., Journal of Virological Methods. 193: 531-535, 2013).

執筆者一覧

国立感染症研究所ウイルス第二部

相崎英樹

鈴木亮介

加藤孝宣

村松正道