

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03025

研究課題名(和文) 免疫系に積極的に働きかけるイムノセラミックスの創製とその機能発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of immunoceramics acting on immune system and their functions

研究代表者

相澤 守 (Aizawa, Mamoru)

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：10255713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで生体機能の一部あるいは全部を代替する目的で開発されている「バイオマテリアル」は人工材料であるため、免疫による拒絶がほとんど生じないことがメリットの一つであった。しかしながら、もし、材料自身が積極的に免疫系に働きかけ、免疫細胞を活性化することができれば、がん免疫療法に新機軸を提案できる。実際、我々は当該研究において免疫系に作用するいくつかのバイオセラミックス(イムノセラミックス)の創製に成功している。このイムノセラミックスとマウス由来脾臓細胞とを共存培養すると、免疫細胞中のキラーT細胞やヘルパーT細胞の比率を増加させることを明らかにしている。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyapatite (HAp) are one of the important key materials in the field of biomaterials. Recently, immunotherapy without side effects has been expected as a novel medical treatment for a cancer. In order to create the novel cell-culture substrates for enhancing the activity of immune cells, we have developed the two types "immunoceramics" on the bases of i) boron-containing apatite (BAp) with B02 groups and ii) HAp ceramics surface-modified with inositol phosphate (IP6) (hereafter, IP6-HAp ceramics). Splenocytes derived from the spleen of mouse were seeded on these immunoceramics to examine the activation ability using a flow cytometry. The results showed that the populations of splenocytes with the immunoceramics were higher than that of the splenocytes with the HAp ceramics as a control. The present two immunoceramics may be expected as key materials for next-generation immunotherapy for a cancer.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：免疫療法 イムノセラミックス ゼル-ゲル法 水酸アパタイト ホウ素含有アパタイト 免疫細胞 T細胞 フローサイトメーター

1. 研究開始当初の背景

我が国の死亡率の第1位は1980年以来、悪性新生物(がん)であり、総死亡率の30%を越えている。最近、従来のがん三大療法(外科療法・放射線療法・化学療法)に加えて、副作用がほとんどない・がんの部位を選ばない・三大療法との併用が可能などの理由から「免疫療法」が注目され、着実な成果をあげてきている。免疫療法には、患者の体に免疫賦活剤などを投与して免疫細胞を活性化させてがんを治療する「能動免疫療法」および患者自身の免疫細胞を体外(*in vitro*)で培養・活性化させてから再び患者にその免疫細胞を戻して体内の免疫細胞を活性化させてがんを治療する「受動免疫療法(養子免疫療法: 図1)」がある。

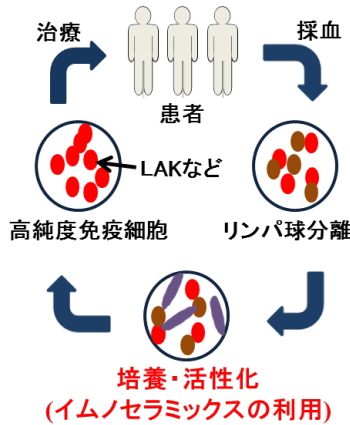


図1 養子免疫療法の概念図

養子免疫療法で利用される免疫細胞には、T細胞やナチュラルキラー細胞(NK cell)などがある。例えば、NK細胞はインターフェロンとともに先天性免疫を司る細胞のひとつであり、白血球中に1~5%存在している。その名前の通り、当初、がん細胞を傷害する活性をもつ細胞として発見された。今日では、NK細胞はウイルス、細菌、原虫の感染阻止に働くことが知られている。このNK細胞をサイトカインのひとつであるインターロイキン-2(IL-2)存在下で培養すると増殖してリンホカイン活性化キラー細胞(lymphokine activated killer cell, LAK)となる。このLAK細胞は抗腫瘍活性が増強されており、この細胞を患者に戻してがんを傷害する治療法が「LAK療法」である。

2. 研究の目的

本研究では、高額なサイトカインなどを使用せずに、材料自身が積極的に免疫系に働きかけ、免疫細胞系を活性化させる新規バイオマテリアル「免疫セラミックス」を創製し、その機能発現メカニズムを解明するとともに、医学応用を見据えて免疫細胞の効率的な増殖・活性化プロセスを構築することを目的としている。

免疫系に働きかける「バイオマテリアル」の先駆的な例として、フェニルボロン酸基を備えたポリマーがリンパ球の活性を高める

という報告がある(池谷ら, 生体材料, 14, 260-266(1996)など)。これは図2に示したように、これはフェニルボロン酸基中の「-BO₂基」が中性近傍のpHで-B(OH)₃に解離し、2つの-BOHと細胞の糖鎖部分とが相互作用する結果であると説明されている。

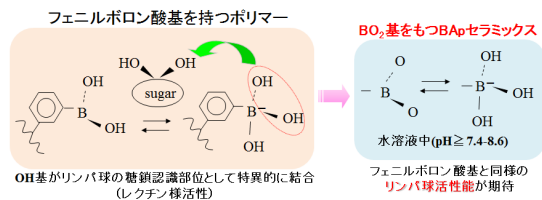


図2 BO₂基を備えたバイオマテリアルの免疫作用

この研究にインスパイアされ、我々は「科研費・基盤研究 C(H24-26)」において、生体適合性の高い「水酸アパタイト(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂; HAp)」の固溶体である「ホウ素含有アパタイト(Ca_{9.5+0.5x}{(PO₄)_{6-x}(BO₃)_x}{(BO₂)_{1-x}O_x}(0 < x < 1); BAp)」を創製し、そのアパタイト構造中のBO₂基を利用して、免疫系に働きかける新規なバイオセラミックスを創製することに成功している(The 2nd International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2013 (ISIEM 2013); Best Poster Award受賞)。また、「イノシトールリン酸(IP6)」を表面修飾したHApセラミックス(IP6-HApセラミックス)を培養基材として、マウス脾臓由来の免疫細胞を共存培養すると、養子免疫療法に有効なT細胞の比率を増加させることができることを見だし、本学から特許出願している(特願 2014-192763)。これまでIP6の免疫賦活効果は知られていたが、IP6単独よりもHApのような基材とキレート結合したIP6-HApセラミックスの方が効果的に免疫細胞を賦活できることを明らかにしている。図3に示したように、IP6は12個のOH基をもち、これらがHApのカルシウムとキレート結合して表面に固定化される。

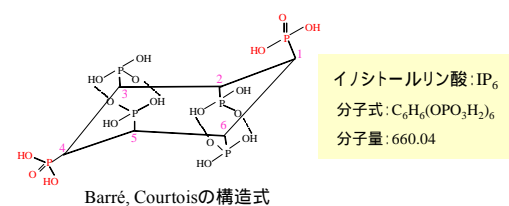


図3 イノシトールリン酸の化学構造

本研究全体の目標(構想)は、人工材料であるバイオマテリアルの表面をデザインし、材料単独で免疫賦活効果を最大限に引き出す材料および表面の設計とその機能発現メカニズム解明の調査を通して、「材料表面と免疫系細胞との相互作用」を包括的に理解することである。この免疫系に積極的に働きかけるバイオセラミックスを「免疫セラミックス」と定義する。

当該科研費の助成期間において、上記の大きな目標を達成するため、BApおよびIP6を

キーマテリアルとするイムノセラミックスを試製し、その免疫賦活効果を最大限に引き出すための「材料作製条件」を明らかにするとともに、その免疫機能発現メカニズムについて検討した。以下、「研究の方法」と「研究成果」について記載する。

3. 研究の方法

(1) ゾル-ゲル法による CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃系セラミックスの作製と免疫細胞応答性

これまでに BAp は免疫系に働きかけ、T 細胞の細胞比率を増加させることを明らかにしている。本研究では、ゾル-ゲル法により「CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃ (CPSB) 系非晶質固体」を調製し、それを結晶化させることにより BAp を主成分とする「CPSB 系セラミックス」を作製した。得られた材料の特性評価およびマウス由来脾臓細胞を用いた免疫細胞応答性を調査した。

ゾル-ゲル法により Ca/P モル比を 1.67, 2.00 および 2.50 に変化させた 3 種類の CPSB 系セラミックスを作製した。試料溶液は「表 1」にしたがい、出発物質として Ca(NO₃)₂·4H₂O, (NH₄)₂HPO₄, Si(OC₂H₅)₄, H₃BO₃, C₂H₅OH および HNO₃ を用いて調製した。この溶液をゲル化させた後、80 °C から 200 °C まで段階的に加熱した。さらに、500 °C で 1 h か焼し、粉碎、分級を経て「か焼粉体」を得た。か焼粉体を 100 MPa で一軸加圧成形し、1100 °C で 1 h 焼成することでセラミックスを得た。得られたセラミックスの材料特性評価として、粉末 X 線回折法 (XRD) による結晶相の同定およびフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) による分子構造の同定を行なった。

さらに、CPSB 系セラミックス共存下でマウス由来脾臓細胞を培養し、その免疫細胞応答性を評価した。C57BL/6N マウスから脾臓細胞を採取し、細胞密度 1×10³ cells·cm⁻³ の細胞懸濁液 1 cm³ を CPSB 系セラミックス上に播種した。その一方で、脾臓細胞を培養用ポリスチレンプレートに播種し、CPSB 系セラミックスを設置した Transwell[®] インサートを用いてセラミックスと細胞とが直接接触しない環境での培養も行なった。培養 1 日後、フローサイトメトリーにより各種免疫細胞の割合を調査した。フローサイトメトリーは、T 細胞の表面マーカーである CD3、成熟 T 細胞のヘルパーサブセットマーカーである CD4 および成熟 T 細胞の細胞障害性サブセットマーカーである CD8 について解析した。

(2) イノシトールリン酸を表面修飾した水酸アパタイトセラミックスの免疫細胞応答性に及ぼす表面粗さの影響

本課題では、(1)で前記した BAp とは異なるアプローチとして、IP6 および HAp に着目している。IP6 は抗がん作用や免疫細胞活性化効果を有することが報告がされており (A. M. Shamsuddin, I. Vucenic, K. E. Cole, *Life Science*,

表 1 サンプルの仕込み組成

試料名	CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂	B ₂ O ₃	Ca/P
	mol%	mol%	mol%	mol%	比
CPSB1.67	30.78	9.22	50.00	10.00	1.67
CPSB2.00	32.00	8.00	50.00	10.00	2.00
CPSB2.50	33.33	6.67	50.00	10.00	2.50

61, 343-354 (1997).)、また HAp は動物の骨や歯に多く含まれており、生体適合性の高い物質である。これまでに HAp セラミックスに IP6 を表面修飾させた「IP6-HAp セラミックス」を作製し、そのセラミックスが免疫賦活効果を持つことを明らかにしている (K. Yamada et al., 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics27), Bali Island, Indonesia, 27th-29th, November 2015.)). 本課題では、この IP6-HAp セラミックスの表面粗さに及ぼすマウス脾臓由来免疫細胞の細胞比率の影響について調査したので報告する。

HAp セラミックスは、太平洋化学製 HAp-100 粉体を用いて、1200 °C で 5 時間焼成して作製した (昇温速度: 10 °C·min⁻¹)。得られたセラミックスを鏡面研磨したのち、#60 および #2000 の研磨材でセラミックス表面を研磨して「表面粗さの異なる HAp セラミックス」を作製した。このセラミックスと超純水あるいは 3000 ppm の IP6 溶液 3 cm³ を 12 well plate の中に入れ、インキュベータ (37 °C, 5% CO₂) 内で 24 時間浸漬させた。3000 ppm の IP6 に浸漬させたサンプルを「IP6(+)-HAp#60」, 「IP6(+)-HAp#2000」, 超純水に浸漬させたサンプルは「IP6(-)-HAp#60」, 「IP6(-)-HAp#2000」と表記する。浸漬前後の試験片に対して、走査型電子顕微鏡法 (SEM) による表面形態の観察および X 光電子分光法 (XPS) による IP6 の存在などのキャラクタリゼーションを行なった。

ついで、1.0×10⁶ cells·cm⁻³ の C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を各セラミックス上に播種し、1 日後にフローサイトメーターを用いて、脾臓細胞中の免疫細胞 (B 細胞、ヘルパー T 細胞、キラー T 細胞) の割合 (%) を求め、「変動率 (%)」を算出した。変動率はセラミックス上で培養した細胞の割合から Control 上で培養した細胞の割合を引いた数値を Control 上で培養した細胞の割合で除し、100 を掛けたものである。なお、Control として培養用のポリスチレンプレートを使用した。抗体は、T 細胞の表面マーカーとして抗 CD3 抗体 (BD)、成熟 T 細胞のヘルパーサブセットマーカーとして抗 CD4 抗体 (BECKMAN)、成熟 T 細胞の細胞障害性サブセットマーカーとして抗 CD8 抗体 (Invitrogen) および B 細胞の表面マーカーとして抗 CD19 抗体 (BD) を使用した。

(3) 種々の免疫賦活剤を担持させた水酸アパタイトセラミックスの薬剤徐放特性とその免疫細胞応答性

免疫細胞を活性化させる一般的な免疫賦活剤として抗 CD3 抗体とコンカナバリン A (Con A) があげられる。我々はこれまでに超音波噴霧熱分解法により表面にナノ気孔を備えたリン酸カルシウム微小球 (CPMs) を合成し、血管新生抑制剤を担持させた CPMs を用いて薬物送達システム (DDS) に基づいた、新しい化学塞栓療法を提案している (M. Emoto et al., *Cancer Sci.*, **101**, 984-990 (2010)).

本課題では、その CPMs に免疫賦活剤 (抗 CD3 抗体, Con A) を担持させ、新しい免疫療法を確立することを目的としている。ここでは、水酸アパタイト (HAp) 粉体およびセラミックスに免疫賦活剤を担持させ、それらの徐放特性および免疫細胞応答性を調査したので報告する。

まず、HAp 粉体 (太平化学製 HAp-100) 約 0.01 g に対し、免疫賦活剤溶液 1.5 cm³ を加え、マイクロチューブ内で 25 °C, 48 h 振とうすることで各免疫賦活剤 (抗 CD3 抗体, Con A) を担持した。振とう後、HAp 粉体を遠心分離により溶液と分離し、上清の濃度から吸着した薬物量を決定した。その後、凍結乾燥し得られた各免疫賦活剤担持 HAp 粉体 ~0.01 g を 0.5 cm³ のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-))(pH 7.4) および酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に浸漬し、37 °C, 7 日間振とうすることで免疫賦活剤の徐放特性を調査した。徐放量は上清の濃度から積算値として算出した。さらに、吸着・リリース実験前後の粉体を凍結乾燥し、走査型電子顕微鏡法 (SEM) により粉体の粒子形態観察、BET 法により比表面積 (SSA) を調べた。

次いで、免疫賦活剤を担持した HAp セラミックスへのマウス脾臓細胞応答性を調査した。HAp-100 粉体を 50 MPa で一軸加圧成形し、1200 °C, 5 h で焼成することにより HAp セラミックス (直径 ~15 mmφ、厚さ ~2.0 mm) を作製した。その後、耐水研磨紙で鏡面研磨を行なった。研磨した試料片はエタノール中で超音波洗浄し、160 °C で 1.5 時間乾熱滅菌を行なった。得られた HAp セラミックスを濃度 1500 ppm の Con A 溶液に 48 h、抗 CD3 抗体は 5 ppm の溶液に一晚浸漬させることで免疫賦活剤担持 HAp セラミックスを得た。担持後、セラミックスに C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を播種し、1 日間培養した後フローサイトメーターを用いて活性化免疫細胞 (CD69 陽性細胞) の割合を算出し、SEM による形態観察を行なった。

4. 研究成果

(1) ゼル-ゲル法による CPSB 系セラミックスの作製とその免疫細胞応答性

CPSB1.67, CPSB2.00 および CPSB2.50 セラミックスいずれにおいても、XRD により水酸

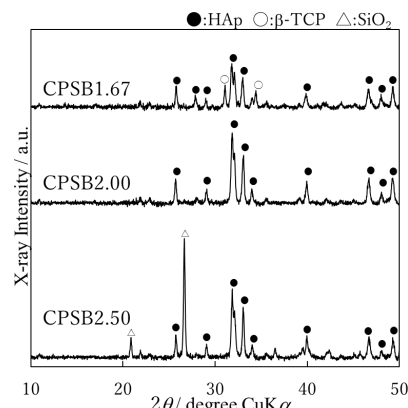


図4 XRD パターン

アパタイト (HAp) 相が確認された (図 4)。また、CPSB1.67 ではβ-リン酸三カルシウム (β-TCP)、CPSB2.50 では SiO₂ も生成していた。

さらに、FT-IR により分子構造を調べると、2000 cm⁻¹ および 1940 cm⁻¹ 付近に BO₂ 基に帰属される吸収帯が見られた (図 5)。BAp は HAp と似た XRD パターンおよび BO₂ 基に帰属される FT-IR スペクトルを持つことから、いずれのセラミックスにおいても BAp が生成していることが分かった。

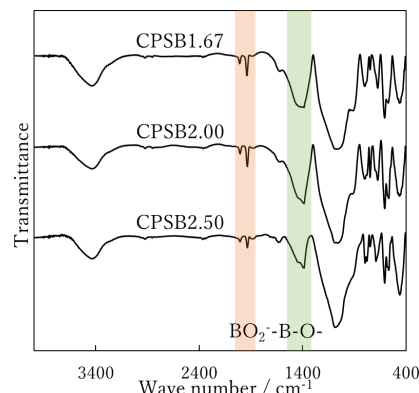


図5 FT-IR スペクトル

続いて、作製した CPSB 系セラミックスに対する免疫細胞の応答性を調査した。CPSB 系セラミックス上で培養した脾臓細胞は、T 細胞の表面マーカーである CD3 および成熟 T 細胞のヘルパーサブセットマーカーである CD4 どちらも発現している細胞、すなわちヘルパー T 細胞の割合は Control と比較して高くなっていった。さらに、CD3 および成熟 T 細胞の細胞障害性サブセットマーカーである CD8 どちらも発現している細胞、すなわちキラー T 細胞の割合も、Control と比較して CPSB 系セラミックス上で培養した細胞のほうが高くなる傾向が見られた (図 6)。

上記の結果が得られた要因として二つのことが考えられる。一つ目はセラミックスと細胞が直接接触することによって、細胞が刺激を受け取っていることである。二つ目はセラミックスが溶解することによってリリースされたイオンが、細胞に刺激を与えていることである。そこで、液性因子の影響を調べるために、セラミックスと細胞とが接触しない環境で CPSB 系セラミックス共存下での脾

臓細胞の培養を行なった。その結果、ヘルパーT細胞は Control と比較して、CPSB 系セラミックス共存下で培養してもその割合に変化は見られなかった。さらに、キラーT細胞も同様な結果であった (図 7)。

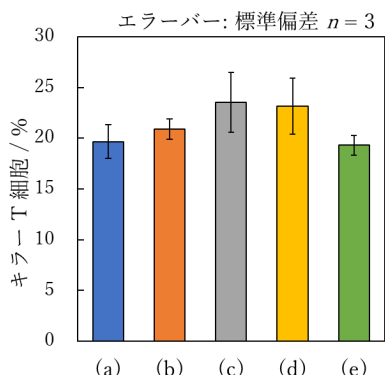


図 6 直接培養後の割合: (a) Control, (b) HAp, (c) CPSB1.67, (d) CPSB2.00, (e) CPSB2.50

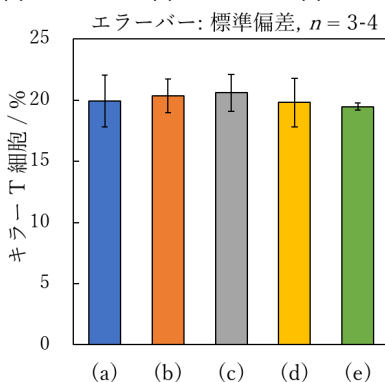


図 7 間接培養後の割合: (a) Control, (b) HAp, (c) CPSB1.67, (d) CPSB2.00, (e) CPSB2.50

これらの結果から、CPSB 系セラミックス上で培養した脾臓細胞の T 細胞比率の増加は、セラミックスの溶解による液性因子が影響していないことが分かった。したがって、セラミックスと細胞との直接的な接触が起因していることが考えられる。CPSB 系セラミックスは BAp を主成分としている。BAp はその構造内に BO_2 を有しており、 BO_2 が中性近傍で $\text{B}(\text{OH})_3$ に解離し、細胞表面の糖鎖と相互作用することによってセラミックスから T 細胞へ刺激が与えられていると考えられる。

したがって、BAp を主成分とする CPSB 系セラミックスは免疫系に働きかけ、「養子免疫療法」に有用なバイオマテリアルとして期待できる。

(2) IP6-HAp セラミックスの免疫細胞応答性に及ぼす表面粗さの影響

図 8 に #60 と #2000 の研磨材でそれぞれ研磨した後のセラミックスの SEM 画像を示す。(a) では研磨痕を観察でき、(b) ではそれを観察できなかったことから、#60 で研磨した HAp セラミックスの方が表面が粗いことが確認できた。また、#2000 で研磨した HAp セラミックスの表面粗さが $0.059 \pm$

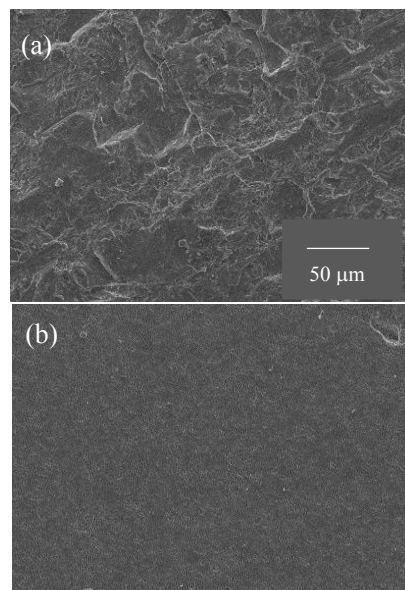


図 8 HAp セラミックス表面の SEM 像: (a) IP6(-)-HAp#60, (b) IP6(-)-HAp#2000

$0.009 \mu\text{m}$ であったのに対し、#60 で研磨したセラミックスは $2.025 \pm 0.049 \mu\text{m}$ であったため、数値上でも #60 で研磨したセラミックスの方が表面が粗いことが分かった。XPS スペクトルより、すべてのサンプルにおいて、HAp 由来である Ca, P, O のピークが確認できた。さらに、炭素由来のピークに注目したところ、IP6 による表面修飾を行なったサンプルにおいては、IP6 由来の C-O 結合に該当すると考えられるピークを確認できた。以上の結果から、IP6 を浸漬させた HAp セラミックスの表面には IP6 が存在していることが分かった。

各 IP6-HAp セラミックス上に脾臓細胞を播種した際の、Control に対する変動率を「表 2」に示す。がん治療に有効である、ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞については、いずれのサンプルにおいても Control に対する割合の増加が確認された。表面粗さをほぼ一定にした「IP6(+)-HAp#2000 と IP6(-)-HAp#2000」あるいは「IP6(+)-HAp#60 と IP6(-)-HAp#60」との比較では、IP6 に浸漬させた試験片上で培養した免疫細胞の比率が増加していることから、IP6 による免疫賦活効果が働いていると考えられる。

表 2 各セラミックス上の細胞の変動率

	IP6-HAp #2000(+)	IP6-HAp #2000(-)	IP6-HAp #60(+)	IP6-HAp #60(-)
ヘルパー T 細胞	14.09%	9.10%	23.08%	19.03%
キラー T 細胞	6.45%	3.00%	11.53%	9.51%
B 細胞	-5.53%	-0.83%	-12.92%	-12.57%

一方、表面粗さの異なる「IP6(+)-HAp#2000 と IP6(+)-HAp#60」あるいは「IP6(-)-HAp#2000 と IP6(-)-HAp#60」との比較では、IP6(+)-HAp#60 や IP6(-)-HAp#60 の方が T 細胞の割合が大きいことから、表面粗さが大

きい方ががん治療に有効な T 細胞を効率的に増加できることが分かった。

以上の結果から、表面粗さを変化させた IP6-HAp セラミックスはがん免疫療法に有用なバイオマテリアルとして期待できる。

(3) 種々の免疫賦活剤を担持させた HAp セラミックスの薬剤徐放特性とその免疫細胞応答性

吸着実験から、抗 CD3 抗体は飽和吸着に達していなかったが、Con A は仕込み濃度 1500 ppm で平衡濃度に達した。薬剤徐放特性の結果 (図 9) より、どちらの薬剤も酸性条件下の方が中性条件下よりも多くの薬剤を徐放した。また、吸着・リリース実験前後で試料粉体の表面形態および SSA を調べたところ、明らかな変化は観察されなかった。

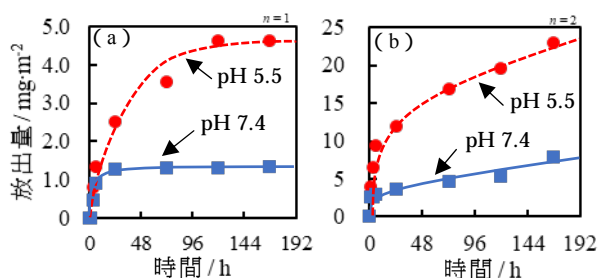


図 9 免疫賦活剤の徐放特性:
(a) 抗 CD3 抗体, (b) Con A

免疫賦活剤担持 HAp セラミックスに対する免疫細胞応答性の解析結果より、いずれの賦活剤を担持した HAp セラミックスでも活性化マーカー発現細胞の割合は増加した (図 10)。特に、抗 CD3 抗体を担持したセラミックス上で、活性化免疫細胞は高い割合を示した。

さらに、SEM による観察結果から、コントロール (スライドガラス) では、細胞が球状のまま存在しているのに対し、免疫賦活剤を担持したセラミックス上ではいずれのサンプルでも仮足を形成して基材に接着している様子が確認された。

以上の結果より、抗 CD3 抗体担持 HAp セラミックスが免疫細胞の活性化に有効であることが明らかとなった。これはセラミック

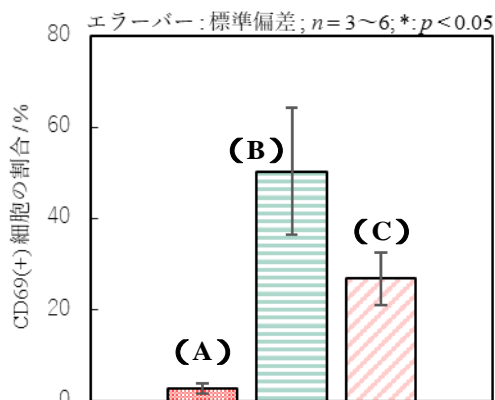


図 10 異なる免疫賦活剤による活性化マーカー発現細胞の割合: (A) HAp-PBS, (B) HAp-抗 CD3 抗体, (C) HAp-Con A

スに抗 CD3 抗体を担持させることで、抗体が整列し、抗原抗体反応が生じやすくなり、免疫細胞の活性化が効率的に行なわれたためであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

H. Funao, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, T. Tsuji, Y. Okada, S. Koyasu, Y. Toyama, M. Nakamura, M. Aizawa, M. Matsumoto, and K. Ishii, "A novel hydroxyapatite film coated with ionic silver via inositol hexaphosphate chelation prevents implant-associated infection", *Scientific Reports*, **6**: 23238 (2016). (DOI: 10.1038/srep23238) ほか

〔図書〕(計 6 件)

M. Aizawa, M. Honda, M. Emoto, "Synthesis of calcium phosphate microspheres using an ultrasonic spray-pyrolysis technique and their application as novel anti-angiogenic chemoembolization agents for cancer treatment" in "Advances in Bioinspired and Biomedical Materials (chapter 6)", ACS SYMPOSIUM SERIES 1253 (2017) p. 107-121. (10.1021/bk-2017-1253.ch006) ほか

〔学会発表〕(計 26 件)

R. Kizukuri, K. Yamada, M. Honda, S. Nagai and M. Aizawa, "Development of immunoceramics in the CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃ system and their cellular responses", *Bioceramics* 29, France, Toulouse, The International Society for Ceramics in Medicine (ISCM), October 25th to 27th, 2017 ほか

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

1) 研究代表者研究室

http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/

2) 明治大学「生命機能マテリアル」研究ク
ラスタ

http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/cluster/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 守 (AIZAWA MAMORU)
明治大学理工学部・教授
研究者番号: 10255713

(2) 研究分担者

永井重徳 (NAGAI SHIGENORI)
東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 50348801

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし