

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591725

研究課題名 (和文) 慢性電気刺激により誘導される中枢神経系の可塑的变化に関する組織学的検討

研究課題名 (英文) Chronological morphological changes in central nervous system induced by chronic electrical sensorimotor cortex stimulation in rats

研究代表者

大島 秀規 (OSHIMA HIDEKI)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：20328735

研究成果の概要 (和文)：ラットの正常脳の見覚運動野を慢性的に電気刺激することにより中枢神経系のアストロサイトとニューロンの両方ともに活動ないしは活性が亢進する変化が確認された。その変化は8週間後にまで及んだ。アストロサイトの平均面積は、対照個体に比較して有意 ($p < 0.05$) に増加していた。また、 $100 \mu\text{m}^2$ 以上の巨大な活性化アストロサイトの出現も少数ながら認められた。これらの結果は、ラットにおける見覚運動野の慢性電気刺激が脳の可塑性を引き起こすことを示唆している。ヒトの臨床における大脳皮質運動野刺激もの効果発現には、本実験結果に示されたような可塑的な変化が関わっている可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：Motor cortex stimulation (MCS) has been utilized as a treatment option for various disorders such as medically refractory pain, poststroke hemiplegia, and movement disorders. However, the precise mechanisms underlying its effects remain unknown. In this study, the effects of long-term chronic MCS were investigated by observing the changes in astrocytes. A quadripolar stimulation electrode was implanted on the dura over the sensorimotor cortex of adult rats, and the cortex was continuously stimulated for three hours, one week, four weeks, and eight weeks. Immunohistochemical staining of microglia (ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) immunoreactive staining) and astrocytes (glial fibrillary acidic protein (GFAP) -immunoreactive staining), and neuronal degeneration histochemistry (Fluoro-Jade B (FJB) staining) were carried out to investigate the morphological changes following long-term chronic MCS. Iba1 staining and FJB staining showed no evidence of Iba1-positive microglial changes or neurodegeneration. Following continuous MCS, GFAP-positive astrocytes were enlarged and their number increased in the cortex and the thalamus of the stimulated hemisphere. These findings indicate that chronic electrical stimulation can continuously activate astrocytes and result in morphological and quantitative changes. These changes may contribute to the mechanisms underlying the neuroplasticity effect induced by MCS.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：細胞・組織・脳・神経・神経刺激

1. 研究開始当初の背景

慢性的な神経電気刺激は、既に不随意運動や神経因性疼痛などの機能的な神経障害に対する治療法として広く臨床応用されている。しかしながら、その効果発現メカニズムの詳細は、今日に至っても明らかではない。従来、神経刺激の臨床効果発現の主なメカニズムは、傷害により発生した神経の異常な電氣的活動の電氣的抑制、ないしはパルスの整流化や促通作用と理解されてきた。今日では、従来の電氣的な活動を単純に変更するというメカニズムだけでは説明困難な臨床的知見が集積しており、それらの多くに慢性刺激により誘導される可塑的变化が関与していると推測される（大島, ペインクリニック 27:1537-1545, 2006; Cacatto RB, *Funct Neurol* 2007）。しかしながら、従来の電気刺激による中枢神経系の可塑的变化に関する研究は、“短期刺激”による急性の電気生理学的な実験が主である。また、ごく少数のサルによる慢性実験を除いては、“長期刺激”による慢性実験は、ヒトにおける PET などを用いたニューロ・イメージングによるものがほとんどであり、組織学的なアプローチによる検討は極めて少ないのが現状である。その大きな理由として、比較的安価な実験対象小動物（げっ歯類など）での慢性実験に使用可能な耐久性のある刺激電極が開発されていないことがあげられる。

2. 研究の目的

本研究は、小動物における慢性実験で必須の耐久性を有する刺激電極を用いて、慢性電気刺激による神経系の可塑的变化、ならびにそれを促進するメカニズムの解明を組織学的手法によりアプローチし、電気生理学ならびにニューロ・イメージングの知見との癒合を図り慢性的な神経電気刺激のメカニズムを解明する足懸かりとするものである。

3. 研究の方法

(1) 手術方法および慢性刺激

本実験では体重 300-500 g の Wistar 種のラットを用いた。Halothane (Fluothane, Takeda Chemical Industries, Tokyo, Japan) を用いた吸入麻酔にて入眠させたところで、腹腔内に ペントバルビタール (ソムノペンチル, Sankyo Seiyaku, Tokyo, Japan; 20 mg/kg body weight) 投与し、麻酔が十分かかったことを確認した後、ラット用の頭部固定手術台 (SRS-5, Narishige Group, Tokyo, Japan) に固定した。ラットの頭部正中線上に約 1 cm ほどの皮切を置き、ラットの感覚運動野上に電極を留置すべく頭蓋の左冠状縫合をまたぐように正中から 3.5 mm 側方

前後 3 mm 程度のバーホールを作成した。

実験で使用された硬膜外留置用の電極として、当研究室で開発した 4 連電極 (Unique Medical, Tokyo, Japan) を用いた。頭部に電極を留置した後、皮下に延長ケーブルを通して背部にバッテリー (Soletora Model 7426 IPG, Medtronic Inc., Minneapolis, Minn) を埋め込んだ。感覚運動野上に電極を留置していることを確認するため、術後に試験刺激によって下肢に筋収縮が起こることを確認した。手術後、麻酔から醒めた状態でラットは自由に動きまわることができる状態とした。電気刺激には陽極刺激を用い、頻度は 25 Hz とした。刺激強度は 2-3 V で、刺激幅は 200 msec とし、強度は筋収縮が起こる閾値の 80 % 未満とした。これらの刺激条件は臨床で用いられる MCS の刺激条件と同様のものであり、バッテリーもヒトの体内に埋め込むものと同様のものを用いている。手術終了より 24 時間後に筋収縮の閾値を再度測定し、痙攣が起きないことを再確認した。刺激は 3 時間、1 週間、4 週間、そして 8 週間持続的に行われた。それぞれの条件で、刺激二個体に比較対象のラットを一個体ずつ作成した。対照群のラットは刺激モデルのラットと同様の手術を行い電極と電池を体内に留置するものの、電源は入れないまま刺激をしないで観察するためのものとした。

(2) 灌流固定

刺激後、ラットは pentobarbital (60 mg/kg) を腹腔内投与したのち、ヘパリンを加えた生理食塩水 (1 単位/ml) で脱血し、その後、4 % paraformaldehyde を 0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer; PB), pH 7.4 中に溶解した液にて経心的に灌流固定を行った。灌流後、脳を取りだした時点で、肉眼的に出血などの脳損傷がないことを確認した。固定後、脳を vertical zero point (VZP) より 5 mm 前方周辺で 40 μ m の厚さにスライスした。VZP とは脳皮質表面の最も高い部位であり、スライス部位は感覚運動野と一致させた。組織切片の作成は脳ブロックを O.C.T. コンパウンドにてマウントし、脳を凍結させた状態で sliding microtome を用いて行った。

(3) 免疫組織化学染色を用いた c-Fos 陽性細胞の同定

本研究では細胞活性のマーカーとして c-Fos タンパク質を用いた。c-fos 遺伝子は immediate early genes の一つとして知られ、外部からの刺激に反応して一過性にかつ迅速に細胞に発現することが知られている。神経系において、c-fos の発現はてんか

んによって惹起される他、神経外傷や短時間の電気刺激によっても引き起こされることが知られており、ニューロン活性（代謝）の指標として用いられる。本研究では慢性電気刺激による脳内での神経活性部位を調べる上で、c-fos 遺伝子の転写産物である c-Fos タンパク質に対する免疫組織化学染色を用いた。

c-Fos 陽性細胞の種類や新生を起している細胞 (BrdU 陽性細胞) の種類の同定には蛍光抗体法を用いた二重染色を用いた。また、アストロサイトの大きさの定量と BrdU 陽性細胞数の定量化には酵素抗体法を用いた。

ラットの感覚運動野の慢性電気刺激によって c-Fos が持続的に発現することは我々の先行研究 (Sijyo et al., Neuro modulation 11:187-19, 2008) によって明らかとされているが、本研究では c-Fos 陽性を呈する細胞の種類を同定するため、c-Fos との二重染色をアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)、ニューロンのマーカーである microtubule-associated protein 2 (MAP2)、そしてミクログリア/マクロファージのマーカーである ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) を用いて行った。

前述したラットの脳の切片はまず 内在性ペルオキシターゼの酵素活性を除去し、組織への抗体の浸透を促進するため、0.3 % 過酸化水素水をメタノールに溶解した液体で前処置を施した。二次抗体の非特異的反応を阻止するために正常ヤギ血清もしくは正常ウマ血清を 10% Fish Gelatin を Phosphate Buffer (FG-PB) 液に溶解した液体中に静置した。その次に、切片を一次抗体である anti-c-Fos goat antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 最終希釈濃度 1:250) と Iba1 rabbit antibody (Wako, Osaka, Japan; 最終希釈濃度 1:250)/anti-GFAP rabbit antibody (Sigma, St. Louis, MO; 最終希釈濃度 1:100)/anti-MAP2 mouse antibody (Sigma ; 最終希釈濃度 1:1,000) を FG-PB 中にそれぞれ混合した液体中で 48 時間 4 °C にて常時震盪しながら反応させた。その後、PB で洗浄して切片を蛍光標識二次抗体と反応させた。GFAP/c-Fos と Iba1/c-Fos の二重染色では Alexa-labeled anti-rabbit IgG goat antibody (Alexa Fluor, Invitrogen, Carlsbad, CA; 最終希釈濃度 1:200) を GFAP と Iba1 の染色に、FITC-labeled anti-goat IgG donkey antibody (Chemicon, Billerica, MA; 最終希釈濃度 1:200) を c-Fos の染色にそれぞれ用いた。MAP2/c-fos の二重染色においては、rhodamine-labeled

anti-mouse IgG horse antibody (Vector, Burlingame, CA; 最終希釈濃度 1:200) を MAP2 の染色に、FITC-labeled anti-goat IgG donkey antibody (Chemicon, Billerica, MA; 最終希釈濃度 1:200) を c-fos の染色にそれぞれ用いた。

(4) c-Fos 陽性細胞数の定量化

標本を 蛍光顕微鏡 ECLIPSE (Nikon, Tokyo, Japan) に接続した coolscope charge coupled device (CCD) camera (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察し撮影した。それらの写真をもとに c-Fos と Iba1、c-Fos と GFAP、そして c-Fos と MAP2 がそれぞれ二重に陽性になっている細胞数を数えた。観察した部位は刺激部位直下の感覚運動野 (sensorimotor cortex (SMC); 面積 225,000 μm^2)、SMC と直接の連絡のある視床 (thalamus (TH); 面積 225,000 μm^2)、そして刺激部位とは離れた皮質である帯状回 (cingulate gyrus (CG); 面積 675,000 μm^2) と海馬歯状回 (dentate gyrus (DG); 面積 675,000 μm^2) とした。

視床については、視床の中でも運動野との連絡のある外側部を観察した。Shijo らの研究でも、c-Fos の発現が増加していることが報告されており、かつ、難治性疼痛患者において疼痛誘発時に同側の帯状回の血流が落ちていることが指摘されるなど、ヒトにおいて疼痛の発現に関与すると考えられていることから、直接刺激を受けていない皮質として帯状回を選んだ。また、大人の哺乳類の海馬歯状回においては神経新生が起きることが知られており、脳深部刺激によってこの部位での神経新生が促進されることが報告されている。このことから海馬歯状回における細胞の活性化を観察することとした。細胞数を数えるにあたり、毛細血管の壁に存在する c-Fos 陽性細胞の数は除外した。以上の方法によって、電気刺激によって c-Fos を発現している細胞のタイプおよびその陽性細胞数を調べた。また、刺激期間によって c-Fos の陽性細胞数がどのように変化するかについても調べた。

(5) アストロサイトの面積の測定

電気刺激によってアストロサイトは活性化され、活性化したアストロサイトは他のアストロサイトに比べサイズが大きくなることが知られている。MCS を受けた難治性疼痛患者における PET の研究において、電気刺激時に脳血流の増加が帯状回で認められている。さらに、帯状回はラットの脳において広い領域で観察が比較的容易であることから、アストロサイトにおける形態変化を調べるために本実験では帯状回におけるアストロサイトの大きさを測定した。

一次抗体には anti-GFAP rabbit antibody (Sigma; 1:100) のみを用いた。前述した全処理の後、48 時間の間一次抗体と切片を反応させた後、切片を洗浄し ベクター社

(Vector Laboratories, Burlingame, CA) のベクタスタイン *elite* ABC キットのビオチン化二次抗体で 12 時間反応させた。その後、十分 PB で洗浄し ABC キットの ABC 液と 30 分反応させた。この切片はトリス緩衝液で洗浄したところで DAB-Tris 混合タブレット 1 錠 (Merck) を蒸留水 10 ml 中に溶解させたもの (DAB 最終濃度 30 mg/ml) と 30 分間反応させたところに 0.1 % 過酸化水素水を 50 μ l/1 ml を加えて酵素抗体反応を利用して染色を行った。切片が均一に染色されたところでこの切片をリン酸緩衝液で洗浄し、反応を止め、切片をスライドガラスに乗せ乾燥させた。脱水、透徹を行ったのち、カバーガラスを乗せて封入し、標本を作成した。

アストロサイトの面積は、Neurolucida (MicroBrightField, Williston, VT) を用いて測定した。染色画像を白黒二値化し、黒くなった部分を陽性であると同定し、陽性部位の面積を測定した。ただし、重なっている部分の切り出しや、核を含む細胞のみを選択することは目視でチェックし、面積を測定する領域を選定した。

(6) 神経新生 (Neurogenesis)

本研究では、神経新生が慢性電気刺激によって引き起こされるかについても bromodeoxyuridine (BrdU) を用いて実験した。ヒトを含む哺乳類においては、生涯を通じて神経新生が起きていることが知られている。特に、哺乳類の成熟脳においては subventricular zone (SVZ) と海馬の subgranular zone (SGZ) の二か所が神経新生の旺盛な部位として知られている。本研究では、慢性 MCS により、海馬歯状回 SGZ における神経新生が促進されるかどうか、促進効果があった場合、継続して刺激を行っても神経新生促進効果が継続するかどうかについても観察した。

本研究では、慢性刺激によって持続的な神経新生が起こるか否かを検討するため、灌流固定する 7 日前より 24 時間毎に 5 日間、BrdU 100 mg/kg を腹腔内投与した。神経新生を観察する実験では 3 時間刺激の個体は作らず、1 週間と 4 週間慢性刺激を行ったモデルを二頭ずつ作成した。刺激デバイスを埋め込むのみで刺激を行っていない個体をコントロールとした。

本実験で神経新生を観察するために酵素抗体法による NeuN と BrdU の二重染色を

行った。一次抗体には anti-NeuN mouse antibody (1:1000, Chemicon) と anti-BrdU mouse antibody (1:500, Chemicon) を用いて二重染色を行った。上述と同様の ABC 法を用いて NeuN 陽性細胞を染色した後、NeuN は DAB 単独で、BrdU はニッケル増感した DAB による発色を行った。上述の二重染色と同様に顕微鏡を用いて標本の撮影と観察を行った。海馬 SGZ において慢性電気刺激を行った脳/コントロールの脳、もしくは刺激側/対側での BrdU 陽性細胞数を数え、比較することで神経新生にそれぞれの群間に差があるかを調べた。この実験には各刺激時間に対して 2 頭ずつのモデル動物を用いた。細胞数のカウントには Neurolucida (MicroBrightField) を用いて SGZ の境界線を引き、境界線内部における BrdU 陽性細胞数の数を数えた (図 1)。



さらに、一次抗体に anti-NeuN mouse antibody (1:1000, Chemicon)、anti-DCX goat antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology)、そして anti-BrdU mouse antibody (1:500, Chemicon) を用いて三重染色を行った。二次抗体として BrdU の染色には FITC-labeled anti-mouse IgG horse antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いた。また、DCX と NeuN の染色にはそれぞれ Texas Red-labeled anti-goat IgG donkey antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) と AMCA-labeled anti-mouse IgG horse antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) をそれぞれ用いた。これらの二次抗体は 200 倍に希釈して用いた。染色の過程は前述の二重染色と同様である。上述の蛍光二重染色と同様に蛍光顕微鏡を用いて標本の撮影と観察を行い、慢性電気刺激を行った脳/コントロールの脳、もしくは刺激側/反対側で神経新生に差があるかについて観察した。

(7) 統計学的解析

本研究では以下の事項について刺激個体とコントロールとの間で比較検討を行った：1) c-Fos と GFAP 両者が陽性である細胞の数、2) c-Fos と MAP2 両者が陽性である細胞の数、3) GFAP 陽性細胞の面積、4) BrdU 陽性細胞の数。c-Fos と GFAP および c-Fos と MAP2 が二重に陽性の細胞の数と BrdU 陽性細胞の数においては、”刺激群と非刺激群では陽性細胞の数に差はない”という帰無仮説を基に統計を行った。比較する刺激群と非刺激群はそれぞれ独立した群であるため、それぞれの陽性細胞数における比較については student's t-test を用いた。Student's t-test は独立した二群の母平均の間に差があるかどうかを検定するために用いられる。なお、GFAP 陽性細胞の面積については刺激個体における脳の左右差（刺激側と非刺激側）と刺激期間という二つの要因について差があるかどうかを調べるため、二元配置分散分析法による統計を行った。この統計方法は二つの要因によって分類された各群からのデータが複数であり、データに対応が認められない場合に、要因ごとに群の間に差があるかどうかを検定するのに用いられる。なお、統計処理には SAS Enterprise Guide 4.1 (SAS Institute, Cary, NC) を使用した。

4. 研究成果

(1) c-fos 陽性細胞数

電極を埋め込んだが電気刺激を行わなかった対照群では、ほとんど c-Fos 陽性細胞が認められなかったのに対し、慢性電気刺激を行った群では c-Fos/GFAP および c-Fos/MAP2 で二重染色された細胞は全ての期間において有意に数が多かった ($p < 0.05$)。c-Fos と GFAP 両者が陽性の細胞はどの部位においても刺激開始後 1 週間で最も多く存在し、その後徐々に少なくなっていく傾向にあった (表 1)。c-Fos と MAP2 両者が陽性の細胞はどの刺激期間においても対照群に比べ優位に陽性細胞数は多いものの、刺激期間による差異は認められなかった。また、c-Fos/GFAP および c-Fos/MAP2 の組み合わせでは、二重に陽性の細胞の数において脳の左右半球間での差は見られなかった ($p > 0.05$)。なお、c-Fos と Iba1 の双方が両性の細胞は対照群と刺激の両群においてほとんど認められなかった。

(2) アストロサイトの面積

GFAP 陽性細胞の数は一週間の刺激モデルにおいて最も多かった (表 1)。

| Area (μm^2) | 3h-stim | 3h- contra | 1w- stim | 1w- contra | 4w- stim | 4w- contra | 8w- stim | 8w- contra | control | control |
|--------------------------|---------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|---------|---------|
| < 10 | 87 | 129 | 136 | 142 | 68 | 74 | 69 | 59 | 83 | 73 |
| 10-20 | 29 | 42 | 44 | 34 | 48 | 52 | 28 | 28 | 37 | 30 |
| 20-30 | 7 | 4 | 18 | 6 | 28 | 14 | 6 | 4 | 3 | 3 |
| 30-40 | 6 | 2 | 6 | 2 | 14 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 40-50 | 5 | 0 | 2 | 0 | 6 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 50-60 | 1 | 0 | 4 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 60-70 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 70-80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 80-90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 \leq | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| N | 135 | 177 | 212 | 184 | 173 | 156 | 109 | 92 | 123 | 106 |
| 平均 | 12.34 | 7.95 | 12.83 | 10.21 | 15.35 | 12.8 | 12.06 | 10.43 | 8.29 | 8.83 |

表 1. 帯状回における GFAP 陽性細胞の数と面積

上表には、各個体における GFAP 陽性細胞が面積ごとにいくつあったかが示されている。アストロサイトの数は一週間の刺激モデルにおいて最も多かった。二元配置分散分析法による解析の結果、どの個体においてもアストロサイトの面積は刺激側で有意に大きく ($p < 0.05$)、平均面積は一か月の刺激モデルで最も大きかった ($p < 0.05$)。h = hours (時間)、w = week(s) (週間)、stim = 刺激側、contra = 対側 (非刺激側)

二元配置分散分析法による検定の結果、脳の左右差と刺激期間という二つの要因の間に交互作用は認められなかった。どの刺激期間においてもアストロサイトの面積は刺激側で有意に大きく ($p < 0.05$)、細胞の平均面積については 4 週間の刺激モデルにおいて最も大きい ($p < 0.05$) というデータが得られた。また、4 週間や 8 週間の刺激モデルにおいては少数ながら面積が $100 \mu\text{m}^2$ 以上の巨大アストロサイトが認められた。(図 2)

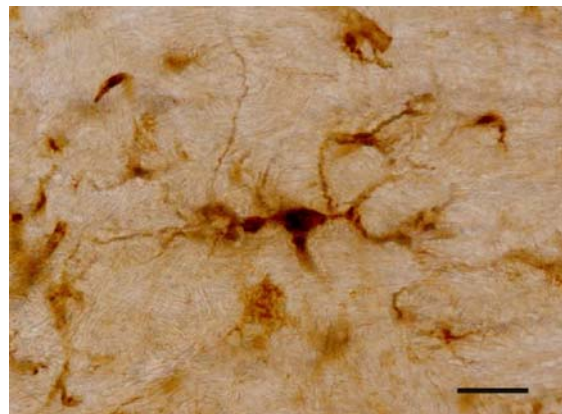


図 2. 8 週間刺激モデルにおける巨大アストロサイト。図中央にあるアストロサイトは $100 \mu\text{m}^2$ を超える巨大なものであり、図右下の黒い棒線は $50 \mu\text{m}$ の長さを示している。

(3) 神経新生 (Neurogenesis)

BrdU 陽性細胞数は、1 週間刺激および 4 週間刺激のいずれの個体群でも対照群に比

較して有意に多かった ($p < 0.05$)。しかしながら、刺激群における脳の左右半球間での統計学的有意差は認められなかった。BrdU と DCX、そして NeuN との三重染色では、DCX 陽性細胞の一部に BrdU との共陽性を認め、BrdU および NeuN 共陽性のニューロンは認められなかった。4 週間の刺激モデルにおいても BrdU 陽性細胞が DCX を発現しており、刺激慢性期においても慢性的に神経新生が促進されていることが示された。

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 1 件)

- ① Morishita T, Yamashita A, Katayama Y, Oshima H, Fukaya C, et al、Chronological changes in astrocytes induced by chronic electrical sensorimotor cortex stimulation in rats, *Neurol Med Chir*、査読有、印刷中

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森下登史、ラット大脳の感覚運動野慢性電気刺激がアストロサイトとニューロンに与える影響、第 50 回日本定位・機能神経外科学会、2011. 1. 22、広島
- ② 大島秀規、ラット感覚・運動皮質に対する慢性電気刺激がアストロサイトとニューロンに与える影響、第 499 回日大医学会例会、2010. 9. 25、東京
- ③ 四條克倫、ラット sensorimotor cortex に対する長期慢性電気刺激：c-Fos 蛋白を用いた検討、第 39 回日本慢性疼痛学会、2010. 2. 26、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 秀規 (OSHIMA HIDEKI)
日本大学・医学部・講師
研究者番号：20328735

(2) 研究分担者

山下 晶子 (YAMASHITA AKIKO)
日本大学・医学部・講師
研究者番号：30246889

深谷 親 (FUKAYA CHIKASHI)

日本大学・医学部・准教授
研究者番号：50287637

片山 容一 (KATAYAMA YOICHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：00125048

越永 守道 (KOSHINAGA MORIMICHI)
日本大学・医学部・兼任講師
研究者番号：30267067

(3) 連携研究者
なし