

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06176

研究課題名(和文) 誘電泳動による選択的細胞分離技術の新展開

研究課題名(英文) Development of novel selective cell-separation technology using dielectrophoresis

研究代表者

多田 茂 (TADA, SHIGERU)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・教授

研究者番号：70251650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多量の細胞試料の高速・高精度な分離を可能にする方法として、デバイス流路内全域に3次元不均一交流電場を生成可能な誘電泳動(DEP)デバイスを提案した。提案デバイスのプロトタイプを製作し、ヒト乳腺上皮細胞の正常細胞と癌細胞を用いた実験を行うことで細胞分離能力の評価を行った。その結果、最大90%以上の分離効率を得ることが出来た。一方で、DEP細胞分離技術において重要となる、細胞のDEP特性の量的評価は未だ不十分である。そこで、細胞のDEP特性を正確に評価出来るCreek-gap電極デバイスを開発した。その結果、細胞のDEP特性の測定においては十分な測定精度が得られることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多量かつ多種多様の細胞を含むサンプル溶液中にわずかに含まれる特定の希少細胞を、損傷させることなく短時間で正確に分離する技術の確立が先進医療分野で急務とされている。本研究では、多量の細胞試料の高速・高精度な分離を可能にする方法として、デバイス流路内全域に3次元不均一交流電場を生成可能な誘電泳動(DEP)デバイスを提案し、ヒト乳腺上皮細胞の正常細胞と癌細胞を用いた実験を行うことで提案デバイスの細胞分離能力の評価を行った。その結果、最大90%以上の分離効率を得ることが出来た。本研究で提案した技術を発展させることで、従来は困難である同種細胞の生/死細胞、正常/異常(癌)細胞の判別・分離が可能になる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, a dielectrophoretic (DEP) cell-separation device was proposed. The proposed device consisting of a planar electrode on the top and an interdigitated-pair electrode array at the bottom could generate a nonuniform AC electric field throughout the volume of the device. The performance of the device was evaluated using normal and cancer human epithelial breast cells. Cells were separated with a separation ratio (>90%) with the appropriately tuned frequency and voltage. In the past, many of cell-separation devices utilizing the DEP have been developed. However, their performance are still limited by the lack of quantitative characterization of dielectrophoretic properties of cells. In order to address this limitation, the Creek-gap electrode device being capable of accurately quantifying cell's response to the electric field was proposed. Results demonstrated that the proposed device was applicable to the determination of the dielectrophoretic properties of cells.

研究分野：生体流体力学

キーワード：細胞分離 誘電泳動 Clausius-mossotti因子 Creek-gap電極 対向式櫛形電極 マイクロ温度場解析 LIF法 ヒト乳腺上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多種の細胞を高濃度に含む試料から特定の細胞を分離する方法として、不均一交流電場による誘電泳動(Dielectrophoresis; 以下 DEP とする)の原理を応用した技術が注目を集めている。DEP とは、不均一電場に晒された溶液中の細胞などの誘電体微粒子が、電気力学的作用(DEP 力)により、電場のこう配に沿って移動する現象である。

印加電場が交流である場合、細胞に作用する DEP 力の向きと大きさは周波数依存的に変化する。従って、適切な周波数を選択することにより、細胞を電気的特性の違いに応じて素早く正確に分離出来るため、効率性の高い臨床検査技術の確立が期待出来る。その反面、ある一定以上の印加電圧では細胞が損傷してしまうため、印加電圧強度には制約がある(～10V)。このため、DEP 力の作用範囲は電極面から数十 μm 程度に留まり、電極を流路下面に設置した従来タイプのマイクロ流路型 DEP デバイスでは、流路高さをあまり高く出来ない(～300 μm)という難点がある。また、細胞には致命的な Joule 発熱を抑えなければならないため、低い流路高さとの兼ね合いで電極面積を広く取ることが困難である。既存の DEP 技術ではデバイスの大型化が容易ではなく、臨床応用を前提とした多量の細胞試料の分離技術への適用に対し課題が残る。

一方、急務とされるのが、多量の細胞試料の中にわずかに含まれる特定の細胞を、損傷させることなく短時間で正確に分離する技術の確立である。この技術は、例えば、転移性がん患者の末梢血中に現れる血中循環癌細胞の検出、白血病などの難治性疾患の治療に用いられる造血幹細胞の骨髄細胞からの分離、iPS 細胞における強い癌性を持つ未分化細胞の分化細胞群からの分離など、がんの超早期診断、細胞移植や再生医療といった最先端医療分野で強く開発・実用化が望まれている。しかしながら、いずれの希少細胞においても存在頻度は 0.01% 未満という極めて低い値であり、分離・抽出が極めて困難である。このような希少細胞を分離するには、現在の技術では検出精度の関係上、試料の前処理に多大な時間と手間、費用を要する。

2. 研究の目的

DEP を用いた多量の細胞試料の高効率分離を実現することが出来れば、上述した状況は一変する。元々 DEP による検出感度は極めて高いため、希少細胞の選択的分離に適している。それに加え、抗体などで細胞を標識する必要もないため、検査の手間やコストの大幅な低減が期待出来る。まさに時代の要請に応えた画期的な臨床検査技術の確立が期待出来る。

以上に鑑み、本研究では細胞分離の処理能力を既存技術に比べ、最大で 100 倍程度に飛躍させる DEP デバイスの開発を目指す。そのため、多量の細胞試料の高速・高精度な分離を可能にする方法として

これまで開発を進めてきた、流路全域に 3 次元の不均一電場を生成させる技術を用いてマイクロ流路型 DEP 細胞分離デバイスを作製する。

DEP を用いた細胞分離に必要な、細胞の誘電泳動特性を精度よく解析可能なデバイスを開発する。

の 2 つの項目について研究を進める。さらに、開発したデバイスの機能を最適化させることで、将来の臨床応用を目指した、新しい細胞分離デバイスの基本デザインを提示する。

3. 研究の方法

本研究課題で提案する DEP デバイスのプロトタイプを作製し、細胞分離の実験と、細胞分離過程の詳細を把握するために MD(分子動力学)法による細胞分離の数値シミュレーションを行い、デバイスの最適な動作条件を見出し、高速・高精度の細胞分離に必要な技術を確立する。さらに、従来、研究対象としてあまり目を向けられることのなかった電場・Joule 発熱による細胞損傷の程度について調べるため、細胞生物学的な手法による細胞生理機能の定量化と、可視化実験による DEP デバイスの温度場解析を行い、臨床支援機器としての有効性・信頼性を検証する。

(1) 細胞試料

細胞試料にはヒト乳腺上皮細胞の正常細胞(MCF10A)と 2 種の癌細胞(MCF7, MDA-MB-231)を用いた。それぞれの細胞は専用培地を用い、CO₂ インキュベーター(37℃, 5%CO₂)内で約 2 日間培養して継代し、実験には第 10～15 継代目の細胞を使用した。

(2) マイクロ流路型 DEP 細胞分離デバイスの設計・作製

流路全域に 3 次元不均一電場を生成させるマイクロ流路型細胞分離デバイスを作製した。デバイスの流路上面には、接地した厚さ 0.7mm、大きさ 90mm×50mm の ITO 膜付きガラス板の電極を配置し、流路下面には、厚さ 300nm のアルミニウム薄膜製の対向式櫛型電極パターンをプリントしたガラス製電極板を配置した。対向式櫛形電極は、素線幅 50 μm のスリット状電極が 50 μm 間隔に 100 対、流れ方向に対向して配置されているもので、電極は一つおきに交流電源の高電圧側と接地側に接続されている。

(3) 細胞分離の実験装置および方法

実験装置概略を図 1 に示す。装置は作製したマイクロ流路型 DEP 細胞分離デバイスと、波形発生装置、シリンジポンプ、倒立顕微鏡により構成される。流路高さはシリコンゴム・スペーサーを上下の電極板に挟んで 0.5mm とした。非電解質の 300mM マンニトール等張溶液に、正常細

胞と癌細胞を 1:1 の割合で懸濁させた試料溶液の流量を 7.5ml/h に設定し、端子電圧 $V=20.0V_{pp}$ 、周波数 $f=40, 60, 80kHz$ の交流電圧をデバイスに印加して細胞分離を行った。細胞の識別用として、MCF10A のみ $20\mu M$ Calcein で蛍光標識した。また、細胞の生死判定には、両種の細胞を $40\mu M$ Propidium Iodide (PI) で蛍光標識した。細胞分離率と細胞致死率はデバイス下流から排出される細胞試料を捕集し、フローサイトメーターにより励起波長 $488nm$ 、蛍光波長 $520nm$ (Calcein)、 $540nm$ (PI)の条件で測定し、専用ソフトで解析を行って求めた。

(4) 細胞分離の数値シミュレーション

細胞を質量 m 、直径 d 、密度 ρ_c の均質な誘電体球と仮定する。細胞 i に誘起される双極子が、細胞 j の双極子により生じる電場から力を受けるとき、細胞 i の運動は細胞総数を N 、位置ベクトルを r_i とすれば運動方程式

$$m \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i - S_i + \frac{4}{3} \pi (\rho_c - \rho_f) \left(\frac{d}{2} \right)^3 g \quad (i = 1, \dots, N) \quad [1]$$

により記述される。ただし、 ρ_f は溶液の密度、 F_i, S_i は細胞 i に作用する電気力と粘性力であり、 g は重力加速度ベクトルである。デバイス内の細胞には DEP 力、細胞同士に作用する双極子-双極子相互作用、流体力学的抵抗、重力が作用する。これらの力のバランスを適切に制御することで、電場強度の好スポットに効率よく標的細胞を集められる。そのため、力のバランスの決定因子である電場周波数を変化させた MD 法による数値シミュレーションを行った。

計算領域は図 2 に示すようにマイクロ流路の一部を対象とし、 0.5 (高さ) \times 0.2 (幅) \times 5.0 (長さ) mm の直方体単位セルとした。単位セルの上・下流端面および側面には周期境界条件を適用し、双極子-双極子相互作用および DEP 力の力場のカットオフ半径は $6d$ とした。このカットオフ半径は DEP 力がおよそ 10^{-8} 倍に減衰する距離である。細胞同士や細胞と固体壁との衝突・反射についてはソフトコアポテンシャルを仮定した。電場については計算格子の格子幅を細胞半径 ($d/2$) に取り y - z 面のみ Laplace 方程式を反復法で解いて求め x 方向には一様な分布を与えた。対象とする細胞の直径は $d=15.0\mu m$ 、密度は $\rho_c=1.04 g/cm^3$ とした。溶液の粘性係数 η 、密度 ρ_f の値は常温の水の値を用いた。数値解析のアルゴリズムは改訂 BBK 法を採用し、さらにプログラムの並列化を行った。計算の時間刻み幅 Δt は最大値 $\Delta t_{max}=2 \times 10^{-6} s$ を定め、細胞の衝突の前後で Δt を小さく取る可変式とし、計算効率を高めた。計算は防衛大学の共同利用設備である超並列クラスターシステムを用いて行った。

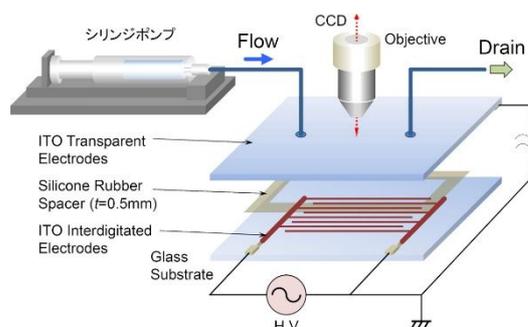


図 1 実験装置の概略

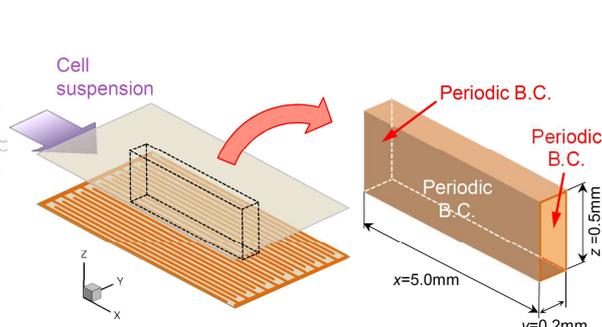


図 2 細胞分離の数値シミュレーションモデル

(5) Creek-gap 電極デバイスの動作原理

不均一交流電場中の細胞に生じる DEP 力 (F_{DEP}) の大きさと方向は周波数依存的に変化する Clausius-Mossotti 因子 β の実数部 $Re(\beta)$ によって決まり、さらに $Re(\beta)$ の周波数特性は、細胞種や細胞の状態 (生・死など) によって異なる。細胞の $Re(\beta)$ を正確に知ることが出来れば、適切な周波数の選択により目的細胞を素早く高精度に分離することが可能である。

本研究では、高効率細胞分離法の要素技術として、細胞の $Re(\beta)$ を実験的に精度良く求めることが出来る Creek-gap 電極デバイスを提案した。Creek-gap 電極の動作概念を図 3 に示す。図のような一対の扇形状電極で構成される Creek-gap 電極に交流電圧を印加することで、電極間流路に沿って E^2 がほぼ一定となる電場が生じる。周波数 f が一定の場合、溶液の誘電率を ϵ_f 、細胞直径を d とすると、細胞には一定の大きさの誘電泳動力

$$F_{DEP} = \pi \epsilon_f \left(\frac{d}{2} \right)^3 Re(\beta) \nabla E^2 \quad [2]$$

が流路方向に作用し、細胞は一定速度 v で流路に沿って運動する。このとき F_{DEP} は、細胞に作用する流体力学的抵抗 $F_d (=kv)$ と、細胞と床面との間で生じる動摩擦力 F_f との和と釣り合うことから、式 [2] を変形して得られる関係式

$$Re(\beta) = \frac{kv + F_f}{\pi \epsilon_f \left(\frac{d}{2} \right)^3 \nabla E^2} \quad [3]$$

より、 E^2 を既知として、 d, v と動摩擦係数 μ を測定することで $Re(\beta)$ を求めることが出来る。

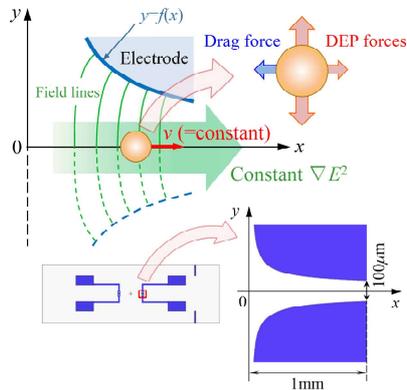


図3 Creek-gap 電極デバイスの動作原理概略

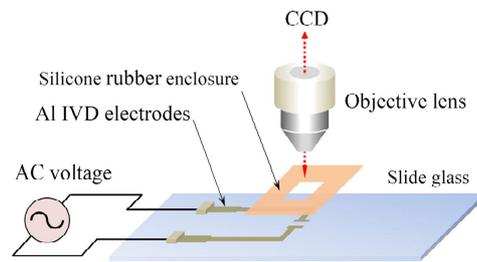


図4 Creek-gap 電極の実験装置概略

(6) Creek-gap 電極デバイスを用いた細胞の誘電泳動特性の解析

実験装置概略を図4に示す。装置はCreek-gap電極デバイス、波形発生装置、倒立顕微鏡、CCDカメラにより構成される。細胞の分散媒には300mM マンニトール等張溶液を用い、溶液の導電率を $\sigma_f=40$ mS/mに調整した。印加電圧は $V=20.0V_{pp}$ とし、周波数を $f=15\sim 50kHz$ の範囲で変化させ、撮影した動画を解析して d, v を求めた。また、Joule発熱が細胞に及ぼす影響を調べるため、レーザー誘起蛍光(LIF)法を用いて温度場解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞分離実験の結果

図5はヒト乳腺上皮細胞のMCF10AとMDA-MB-231の割合を示すヒストグラムであり、左が細胞分離前、右が細胞分離後である。横軸は蛍光強度の相対値を、縦軸はイベント(細胞)数を示す。それぞれの図に現れる2つの大きな山のうち、向かって左側の山は弱い自家蛍光により捉えられたMDA-MB-231の分布であり、右側の山はCalceinによる強い蛍光により捉えられたMCF10Aの分布である。分離前後でMCF10Aのイベント数が大きく減少し、細胞混合試料からMCF10Aの分離が行われたことを示している。

図6は交流周波数と細胞分離率との関係を示し、周波数 $f=40, 60, 80kHz$ の場合につき、3~5回行った分離実験の平均値 \pm 標準誤差 $\times 2$ (MEAN $\pm 2SE$)を表している。図よりMCF10AとMDA-MB-231の分離率は周波数 $f=40kHz$ のときに79.7 \pm 5.7%となり最も高くなった。分離前後での細胞致死率の変化については、分離後の細胞致死率が分離前に比べ約59%増加することがわかり、電場への曝露で死滅する細胞が存在することが示唆された。

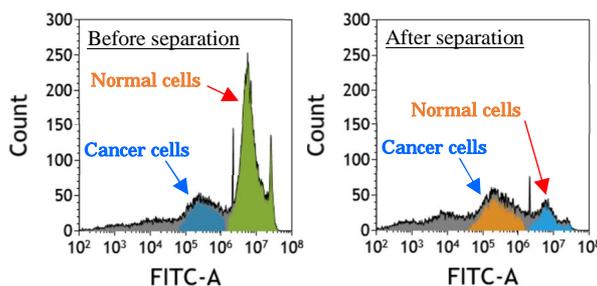


図5 細胞分離前後の細胞のヒストグラム

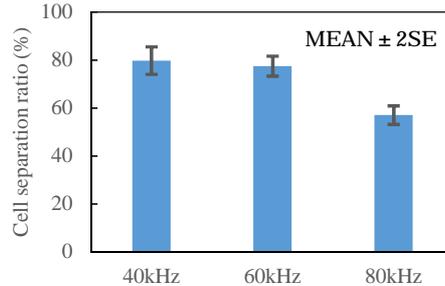


図6 交流周波数と細胞分離率との関係

(2) 細胞分離実験の数値シミュレーション

生/死細胞の分離の数値シミュレーション結果を図7に示す。印加電圧を $V=20V_{pp}$ とし、それぞれの細胞の $Re(\beta)$ の値は印加電圧の周波数域を $f=10\sim 50kHz$ と想定し、生細胞で $Re(\beta)=-0.5$ 、死細胞で $Re(\beta)=1.0$ とした。図は緑丸が生細胞を、赤丸が死細胞をそれぞれ示し、計算で用いた総細胞数は約1000個である。電場印加直後の $t=0s$ では、細胞の生死状態に関わりなく細胞はランダムに流れている。電場印加開始から120s後には、楕円電極の端部に沿って死細胞が吸着する一方で、生細胞はマイクロ流路底面から浮上した状態で下流に流され、本研究で提案した細胞分離デバイスにより、細胞分離が効率よく行われる様子がわかる。

(3) Creek-gap 電極デバイスによる細胞の誘電泳動特性の解析結果

交流周波数 $f=15\sim 50kHz$ の範囲において細胞の移動速度 v の測定を行い、細胞の誘電泳動特性の解析を行った。

図8に3種類の細胞について得られた周波数 f と $Re(\beta)$ との関係を示す。 $Re(\beta)$ の値については、3種類の細胞全てについてCreek-gap電極デバイスを用いて得られた値が理論式⁽¹⁾と良く一致した。ただし、理論式のモデルパラメーターである細胞誘電率 ϵ_c と細胞導電率 σ_c については、それぞれの標準値 $\epsilon_c=5.3\times 10^{-10}F/m$ 、 $\sigma_c=1.0\times 10^{-3}mS/m$ を用いた。

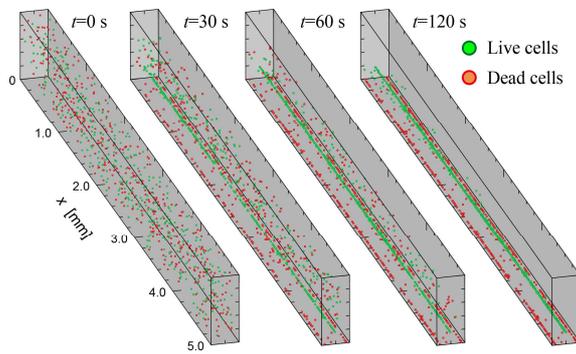


図7 細胞分離の数値シミュレーション

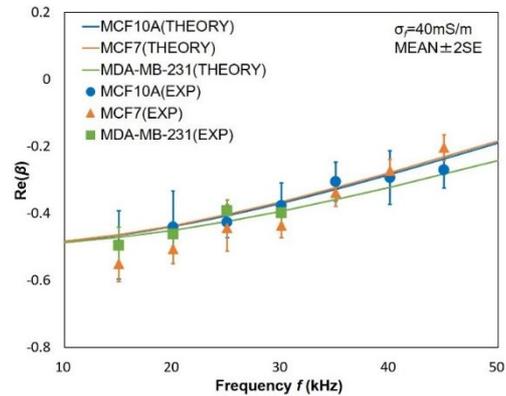


図8 交流周波数 f と $Re(\beta)$ との関係

次に、各細胞について得られた誘電泳動特性，すなわち f と $Re(\beta)$ との関係に対し理論式を用いた非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行うことで、各細胞の細胞膜のキャパシタンス C_m の値を推定した．その結果を表 1 に示す．3 種類の細胞それぞれについての細胞膜のキャパシタンス C_m の推定値は、いずれの場合においても過去の文献値⁽²⁾と相対誤差 1.9% 以下の精度で一致した．

表 1 各細胞における細胞膜のキャパシタンス C_m

細胞の種類	$C_m (\times 10^{-2} \text{ F/m}^2)$		
	解析結果	文献値	相対誤差(%)
MCF10A	1.93	1.94	0.52
MCF7	1.84	1.86	1.08
MDA-MB-231	1.66	1.63	1.84

- (1) Cottet, J. et al., Biophysical Journal, Vo.116, pp.12-18 (2019)
- (2) Wang, X. B., et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol.1193, pp.330-344 (1994).

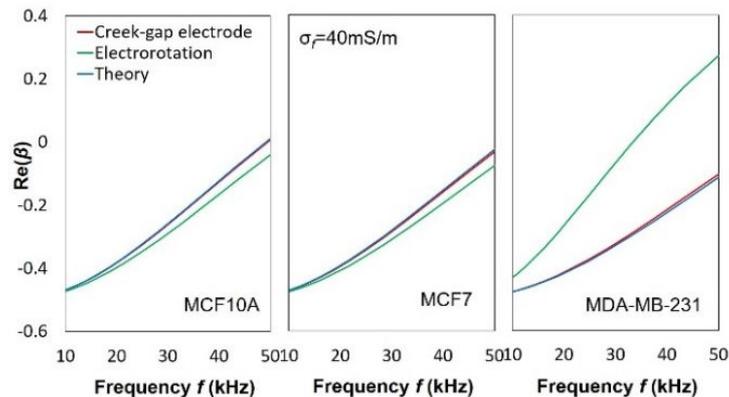


図9 交流周波数 f と $Re(\beta)$ との関係

Creek-gap 電極デバイスによる誘電泳動特性の解析精度を評価するため、得られた C_m の値を用いて周波数 f と $Re(\beta)$ との関係を求め、その得られた関係を、従来の方法である電場回転法によって得られた関係、文献の C_m 値を用いて得られた関係と比較した．結果を図 9 に示す．周波数 f と $Re(\beta)$ との関係の導出には理論式を用い、 C_m 以外のモデルパラメーターである各細胞の直径 d と細胞質の誘電率 ϵ_c 、細胞質の導電率 σ_c の値は全て文献の同じ値を用い、それぞれ $d=18.50\mu\text{m}$ (MCF10A), $18.20\mu\text{m}$ (MCF7), $17.86\mu\text{m}$ (MDA-MB-231), $\epsilon_c=5.3\times 10^{-10}\text{F/m}$, $\sigma_c=1.0\times 10^{-3}\text{mS/m}$ とした． f と $Re(\beta)$ との関係は、いずれの細胞においても文献値で得られた f と $Re(\beta)$ との関係によく一致している．一方、電場回転法で得られた f と $Re(\beta)$ との関係については、MCF10A と MCF7 では文献値で得られた f と $Re(\beta)$ との関係と比較的良好に一致しているが、MDA-MB231 ではかなり異なる結果となった．温度場解析では、Creek-gap 電極縁部での温度上昇が顕著であった．このことから、Joule 発熱による温度上昇は電気力線が集中する部位で極度に大きくなるのが分かる．一方、細胞の移動速度を測定する流路部分での溶液の温度上昇はほとんど見られなかった．従って、Creek-gap 電極デバイスを用いた誘電泳動特性の解析を行う上で、温度上昇による熱対流の影響や細胞への影響はほとんど考慮する必要がないことがわかった．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigeru Tada, Masako Hayashi, Masanori Eguchi, Akira Tsukamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 High-throughput Separation of Cells by Dielectrophoresis Enhanced with 3D Gradient AC Electric Field	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 064110-1, 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5007003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigeru Tada, Yui Omi, Masanori Eguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of the dielectrophoretic properties of cells using the isomotive AC electric field	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 044103-1, 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5031054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tada Shigeru, Eguchi Masanori, Okano Kohei	4. 巻 40
2. 論文標題 Insulator based dielectrophoresis combined with the isomotive AC electric field and applied to single cell analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ELECTROPHORESIS	6. 最初と最後の頁 1494, 1497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elps.201800380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigeru Tada, Yan Shen, Zhiyong Qiu	4. 巻 38
2. 論文標題 Modeling and Simulation of Dielectrophoretic Collective Dynamics in a Suspension of Polarizable Particles Under the Action of a Gradient AC Electric Field	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 1434, 1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elps.201600572.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shigeru Tada, Yui Omi, Masanori Eguchi, Noriko Nakai, Akira Tsukamoto
2. 発表標題 Analysis of Dielectrophoretic Properties of Cells by the Use of the Uniform Field Gradient
3. 学会等名 World Automation Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤紀子, 多田 茂, 江口正徳
2. 発表標題 Creek-gap電極デバイスによる細胞の誘電泳動特性の測定
3. 学会等名 日本機械学会第 31 回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤紀子, 多田茂, 江口正徳
2. 発表標題 一様な誘電泳動力作用下での細胞の誘電泳動特性の解析
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Sato, Shigeru Tada, Masanori Eguchi
2. 発表標題 Estimation of Electric Properties of Mammalian Cells Using the Creek-gap Dielectrophoretic Electrode
3. 学会等名 The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤紀子, 多田茂, 江口正徳
2. 発表標題 Creek-gap電極を用いた細胞の誘電泳動特性の解析
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田茂, 林雅子, 逢見優衣, 塚本哲
2. 発表標題 三次元不均一電場での誘電泳動による細胞分離
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江口 正徳 (Eguchi Masanori) (60613594)	一般財団法人ファジィシステム研究所・研究部・主任研究員 (77103)	
研究分担者	塚本 哲 (Tsukamoto Akira) (90511460)	防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・准教授 (82723)	