

機関番号：17501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19360376
 研究課題名(和文) リウマチ治療を目的とした TNF- α に対する「スーパー抗体酵素」の開発
 研究課題名(英文) Development of “super catalytic antibody” against TNF- α as a new drug for rheumatoid arthritis.
 研究代表者
 一三 恵美 (HIFUMI EMI)
 大分大学・全学研究推進機構・教授
 研究者番号：90254606

研究成果の概要(和文)：TNF- α は炎症性サイトカインの一種で、慢性関節リウマチを引き起こす主要な因子である。リウマチ治療薬としては、TNF- α や受容体に対する中和抗体が開発されて一定の効果を得ているものの、生理的な機能の抑制による副作用が問題となっている。本研究では、既存のリウマチ治療薬の問題点を克服する新機能性分子の開発を目指して TNF- α を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」の作製に取り組み、その取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Tumor necrosis factor- α TNF- α is an inflammatory cytokine and causes several autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, chronic obstructive pulmonary disease etc. Neutralizing antibodies against TNF- α and its receptor have been developed as drugs for rheumatoid arthritis. However, it is noted that bad by-effects such as suppression of physiological function in life have been observed. Therefore, in this study, we challenged to make a highly functional molecule, “super catalytic antibody”, which can overcome the drawback of the above drugs. As the result, we successfully produced the “super catalytic antibody” capable of enzymatically destroying the human TNF- α .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学, 生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗体酵素, 慢性関節リウマチ, TNF- α

1. 研究開始当初の背景

(1)スーパー抗体酵素

酵素は基質を他の化学物質に変換出来るが、我々が利用出来る酵素の数は無数ではない。一方、抗体は酵素のように抗原を化学変換することは出来ないが、どのような抗原に対しても作製出来る。申請者らは、この両者の性能を合わせ持つ“夢のような抗体軽鎖分子”を手中にした。エイズウイルスがヒト細胞

に感染する際に重要な役割を果たす外膜タンパク gp41 の不変領域ペプチドを免疫原として作製したモノクローナル抗体の軽鎖が、抗原ペプチドのみならず標的タンパク質である gp41 分子をも酵素的に完全に分解したのである。これは抗体鎖が高分子化合物であるタンパク抗原を特異的に破壊した世界最初の例となったことから「スーパー抗体酵素」と名付けた。

新たな「スーパー抗体酵素」の取得と、設計思想に基づいた作製方法の確立を目指し、各種抗体から調整した抗体軽鎖の酵素活性と分子モデリングによって予測した立体構造との関連、および抗体遺伝子の特徴を詳細に解析し、酵素活性を持つ抗体軽鎖について以下の仮説を立てた。「ゲノム上に存在する V germline gene の中には触媒三ツ組残基様の配列情報をコードするものがあり、この特徴的な遺伝子を発現している B リンパ球が産生する抗体軽鎖は、他の場合と比較して酵素活性を持つ割合が高い」というものである。この考え方に基づけば、マウスに抗原を免疫してモノクローナル抗体を作製して配列を解析し、着目する germline gene に由来するクローンを抽出することで、より効率的に「スーパー抗体酵素」を取得することが出来る。

(2)抗体酵素の国内外の研究状況

1989 年の Paul らによるペプチドを加水分解する自己抗体の発見に端を発し、欧米の研究者によって自己免疫疾患の患者血清や尿から Nuclease 活性や Peptidase 活性などの酵素活性を有するいくつかの天然型抗体酵素が報告されている (S. Paul et al, Science, Vol.244, 1989, G.V.Gololobov et al, Science, Vol.256, 1992, S. Lacroix-Desmazes et al, Nature Med., 5, 1999 など)。これらの研究と申請者らの取り組みの根本的な違いは、標的タンパクを特異的に分解するモノクローナル型の抗体酵素の作製を積極的に進めている点にある。天然型抗体酵素をクローン化した形で取得するという独自の手法は、世界的にも注目を集めている。

(3)慢性関節リウマチ

慢性関節リウマチは 40 才代の女性に多発する自己免疫性疾患で、慢性化した滑膜炎の炎症により関節破壊が起こる。病変部位では炎症性細胞の浸潤により種々のサイトカインの産生が亢進して炎症の悪化や持続を起こすことが知られており、その主因となるのが TNF- α である。

リウマチ治療には古くから免疫抑制剤が用いられてきたが、効果を発揮するまでに時間を要し、劇的な症状の改善は望めない。これに変わるリウマチ薬として TNF- α (あるいは TNF- α 受容体) の機能を消失させる中和抗体が開発されていて一定の効果は認められるものの、抑制効果が強く、生理的作用の阻害による副作用や、患者への経済的な負担が大きいなどの問題を抱えている。

2. 研究の目的

TNF- α に対する中和抗体によるリウマチ治療の問題は、TNF- α に対する抑制効果が強すぎて、生理的に必要な機能まで損なわれてしまうことにある。「スーパー抗体酵素」は、抗原に対する特異性は完全抗体と同等であ

るのに対して抗原親和性は完全抗体より低く、酵素の基質親和性と同等であるという特徴を持つ。また、完全抗体と比較して血中半減期が短いことから、過剰な TNF- α の抑制を避けることが出来る。さらに、抗体と異なり 1 分子で複数の TNF- α に作用するため、投与量を数十分の 1 に抑えることが出来る。これは患者の経済的負担の軽減に繋がる。

つまり、「スーパー抗体酵素」は中和抗体の問題点を克服することの出来る唯一の機能性分子として位置付けることが出来る。そこで、申請者が開発した独創的技術を駆使して、TNF- α を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」の作製と、その有用性の検討を目的として本研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

申請当初はヒト TNF- α に対するモノクローナル抗体の作製から開始する計画であったが、研究開始に先立ち着手した。研究開始時には 17 種類の抗ヒト TNF- α 抗体産生ハイブリドーマ(ETNF1~17)のクローニングをほぼ終えていたので、抗体のキャラクタリゼーションから開始した。

1) 抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体(ETNF1~17 抗体)のキャラクタリゼーション

①免疫学的性質

17 株の抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を回収し、アイソタイピングキット (TOYOBO) を用いてアイソタイプを決定した。

免疫学的反応特異性は、固相化抗原として TNF- α , TNF- β , 各種免疫グロブリンなど 8 種類のヒト由来タンパク質を用いるサンドイッチ型酵素免疫測定法によって調べた。

抗体のエピトープは、TNF- α の配列全体をカバー出来る様に 20 mer のペプチドを 10 種類合成し、酵素免疫測定法により検討した。

②シーケンス解析と分子モデリングによる立体構造解析

ハイブリドーマを培養して mRNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA に変換した。これを Template とする PCR によって重鎖、軽鎖それぞれの可変領域遺伝子を増幅後、pGEM-T vector に組み込んだ。続いて大腸菌 DH5 α を形質転換して培養し、プラスミドを抽出して insert 部分の塩基配列を解析した。

決定した塩基配列からアミノ酸配列を推定し、AbM (Oxford molecular Ltd., UK)で可変領域の三次元構造を構築し、続いて Discover (Molecular Simulations Inc., USA)でエネルギーを最小化した。

(2)ETNF-6 抗体の酵素活性

①抗体鎖の調製

ハイブリドーマを投与して得た腹水から

アフィニティー精製した抗体を 0.2 M の β -ME で還元 (15°C, 3 hr) 後、0.3 M の iodoacetamide でアシル化 (15°C, 15 min) した。続いて 6 M グアニジンを用いる変性条件下のサイズ排除 HPLC(TSKgel G3000SW column, TOSOH)で重鎖画分と軽鎖画分に分離し、PBS に対する透析により refolding した。

②Peptidase 活性の検討

基質には Peptidase 活性評価のスクリーニングに用いている TP41-1 peptide (TPRGP DRPEGIEEEGGGERDED)を使用した。このペプチド 120 μ M と、0.4 μ M の重鎖または 0.8 μ M の軽鎖を 25°C で無菌的に反応させ、ペプチドの濃度変化を逆相 HPLC(Puresil C18 column, Waters)で分析した。

③ヒト TNF- α の分解

予め TP41-1 peptide を分解して活性状態にある 0.1 μ M の ETNF-6 抗体重鎖または 0.2 μ M の軽鎖と、6.6 μ M のヒト TNF- α を 25°C、15 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) で反応させ、ヒト TNF- α の経時的な変化を SDS-PAGE で分析した。また、24 時間の反応液を限外濾過濃縮 (Amicon Ultra-4, 5000MWCO) して電気泳動後、Immobilon-P 膜 (Millipore) に転写して N 末端アミノ酸配列解析を実施した。

(3)IgM 株の酵素活性

①抗体および抗体鎖の調製

ETNF-11, -12, -13 抗体産生ハイブリドーマをマウスに投与して得た腹水から、Hi Trap IgY purification kit (GE Healthcare)を用いて一次精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによる二次精製を行って高純度の IgM 抗体を得た。抗体鎖の調製は、ETNF-6 と同じ方法で実施した。

②Amidase 活性の検討

基質には Peptidyl-MCA 基質(ペプチド研究所)を用いた。200 μ M の Peptidyl-MCA 基質または数種類の Peptidyl-MCA 基質の混合液と、50 nM の完全抗体または 50 nM の抗体鎖(重鎖または軽鎖)を、蛍光測定用 96 穴マイクロプレート (Nunc) を用いて 37°C で反応させた。この時の緩衝液には 0.02% NaN_3 を添加した。MCA 基質の加水分解は、分解産物である AMC の生成を蛍光測定 ($E_m=360$ nm, $E_x=465$ nm) して分析した。

③ヒト TNF- α の分解

ETNF-6 抗体と同じ方法に加え、ビオチン化標識したヒト TNF- α を用いる系でも検討

した。ヒト TNF- α のビオチン標識には EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (PIERCE)を用いた。分解試験での TNF- α および分解断片の経時的変化は、Streptavidin-POD Conjugate (Roche)を用いる Western blotting によって検出した。

4. 研究成果

(1) 抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体のキャラクタリゼーション

ETNF-1~ETNF-17 抗体のアイソタイプを調べると、表 1 に示す様に重鎖は 10 株が IgG₁、6 株が IgM で IgG_{2b} か IgM かの判定が出来ないものが 1 株あった。軽鎖については、 κ 鎖が 15 株、 λ 鎖が 2 株であった。これらの株のエピトープは、10 種類の TNF- α 部分ペプチドを用いる酵素免疫測定法では決定することが出来なかった。免疫には TNF- α の部分ペプチドではなく TNF- α そのものを用いていることと、部分ペプチドとの反応を全く検出なかったことから、得られた抗体は TNF- α の立体構造を認識していると推察された。

免疫学的反応特異性の検討結果は、図 1 に示した。全ての株で human IgG に対する反応が認められているが、陰性コントロールの培地でも同じ傾向が認められることから、標識二次抗体の交差反応と判断出来、ETNF-1~14、および 16 は良好な特異性を示すと言える。ETNF-15 は交差反応が認められ、ETNF-17 についてはスクリーニング段階と比べて TNF- α に対する反応性が著しく低下していたことから、この 2 株は以後の検討からは除外した。また、これまで酵素活性を示したマウス型軽鎖は全て κ 鎖であったことから、 κ 型軽鎖を持つ 13 株を中心に以後の検討を進めることとした。

これら 13 株の可変領域配列を解析し、軽鎖の V germline gene と可変領域の立体構造を推定すると、触媒三ツ組残基様構造を持つと

表 1 ETNF 抗体のアイソタイプと触媒三ツ組残基様構造の有無

株名	アイソタイプ	触媒三ツ組残基		株名	アイソタイプ	触媒三ツ組残基	
		H鎖	L鎖			H鎖	L鎖
ETNF-1	IgG ₁ (κ)	○	○	ETNF-9	IgG ₁ (κ)	○	○
ETNF-2	IgG ₁ (κ)	X	○	ETNF-10	IgG ₁ (κ)	X	X
ETNF-3	IgG ₁ (λ)	○	○	ETNF-11	IgM (κ)	X	○
ETNF-4	IgG ₁ (κ)	○	○	ETNF-12	IgM (κ)	X	○
ETNF-5	IgG ₁ (λ)	○	○	ETNF-13	IgM (κ)	X	○
ETNF-6	IgG ₁ (κ)	○	○	ETNF-14	IgM (κ)	X	X
ETNF-7	IgG ₁ (κ)	○	○	ETNF-15	IgM (κ)	○	○
ETNF-8	IgG _{2b} IgM	○	X	ETNF-16	IgG ₁ (κ)	X	○
				ETNF-17	IgM (κ)	○	○

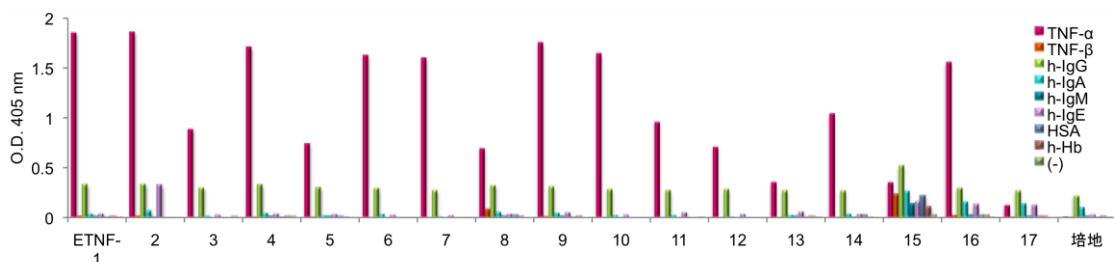


図 1 ETNF 抗体の免疫学的反応特異性

考えられる抗体は 10 株であった (表 1)。これらの中から、腹水採取料や腹水中の抗体含量を考慮して、まずは ETNF-6 抗体の酵素活性から検討を進めた。

(2) ETNF-6 抗体の酵素活性

ETNF-6 抗体の重鎖、軽鎖は、分子モデリングによる立体構造解析での予測結果と一致して、Peptidase 活性を示した。その反応プロフィールは、誘導期と活性基の二相性を取る「スーパー抗体酵素」の典型的なものであった (図 2)。

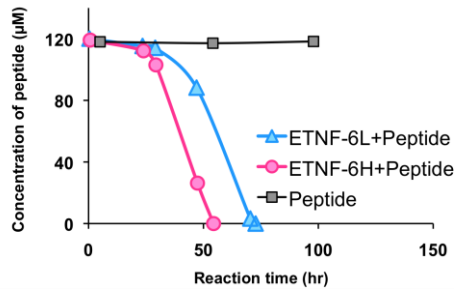


図 2 ETNF-6 抗体鎖の peptidase 活性

ヒト TNF α (hTNF- α) に対する分解実験では、17 kDa に泳動される recombinant を用いた。ロットによって泳動パターンに若干の差があり、重鎖による分解反応に用いたものでは 33.6 kDa の dimer の他、19.0 kDa と 20.0 kDa にもバンドが検出された (19.0 kDa と 20.0 kDa の成分は、N 末端がブロックされていて N 末端アミノ酸配列解析でも配列を同定することが出来なかった。isomer か微量の不純物だと思われる)。

活性化した ETNF-6 抗体重鎖 (ETNF-6H) との反応では、反応開始から 8 時間から 15.0 kDa と 13.0 kDa に分解断片を検出した。この後、反応時間を 94 時間まで延長しても、13.0 kDa の断片の含有量が少しずつ増加するだけで、これ以上の分解を示唆する低分子のバンドは検出しなかった (図 3)。

24 時間の反応液を用いて実施した N 末端アミノ酸配列解析では、17.0 kDa の成分から R2-S3 間、S4-S5 間、S5-R6 間、15.0 kDa の成分から Q21-A22 間、13.0 kDa の成分から L36-L37 間、N39-G40 間のそれぞれが切断された断片を検出した。切断部位の構造上の配

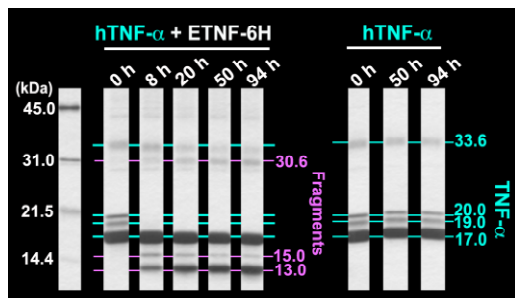


図 3 ETNF-6 抗体重鎖による hTNF- α の分解

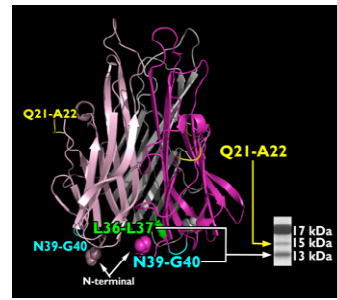


図 4 ETNF-6 抗体重鎖による hTNF- α の切断部位

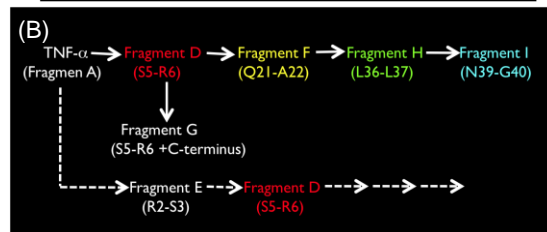
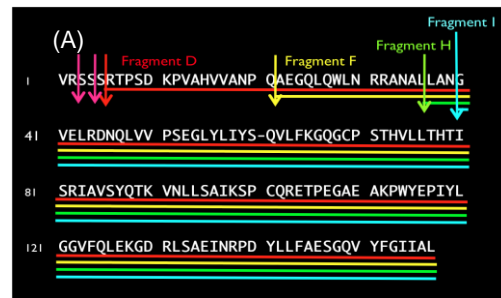


図 5 ETNF-6 抗体重鎖による hTNF- α 分解経路

(A) hTNF- α 配列上の切断部位

(B) 推定された切断経路

置を見ると、図 4 に示す様に (TNF- α は 3 量体を形成している)、切断部位は全て分子表面に存在していた。切断部位と分解断片量から分解反応の経路を推定すると (図 5)、最初に Fragment D に分解され、ここから Fragment F と H を経て Fragment I まで分解が進む経路が主であり、これ以外にも一部が Fragment E など R6 よりも N 末端側の分解を経るルートを取ると推定された。

一方、活性化した軽鎖と hTNF- α の反応では、図 6 に示した様に (1)、(2) の 2 本の分解断片を検出した。(1) は、N 末端アミノ酸配列解析の結果から、R2-S3 間が切断された断片であることが分かった。(2) については分解パターンと分子量から ETNF-6H による分解で検出された Fragment I であろうと推定している。

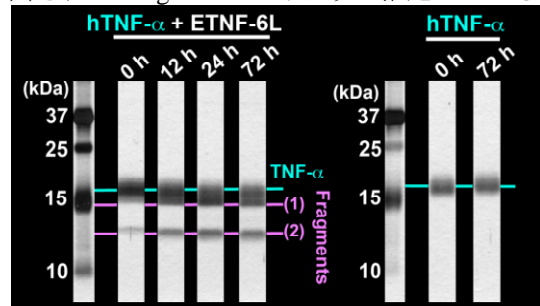


図 6 ETNF-6 抗体軽鎖による hTNF- α の切断

以上の様に、予想通りに ETNF-6 抗体の重鎖、軽鎖ともに hTNF- α を分解した。これらの抗体鎖は BSA や Myoglobin などの他のタンパク質は分解しなかったことから、hTNF- α を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」とあると言える。

(3) IgM 抗体の酵素活性

酵素活性を備えた完全抗体が報告される中、酵素活性を示す抗体の割合は 5 種類の isotype の中で IgM 抗体が高いことが明らかになってきた (DR Ivanen et al, Med Sci Monit, Vol.10, 2004, S. Planque et al, J Biol Chem, Vol.279, 2004 など)。IgM は免疫応答によって最初に分泌される抗体であり、その後のクラススイッチで産生される他の isotype と比較して体細胞変異の割合が低いために germline gene との相同性が高く、抗原親和性も一般に他の isotype よりも低いと言われている。つまり、IgM 抗体は他の isotype と比較して未熟な抗体であると言い換えることが出来る。Germline gene により近い IgM (完全) 抗体に酵素活性を示すものの割合が高いという事実は、germline gene に着目することで酵素活性を持つ抗体鎖を効率的に抽出することが出来るという申請者らの知見を支持している。

ETNF シリーズには免疫学的特異性が高く、軽鎖上に触媒三ツ組残基様の構造を持つと推定される IgM 抗体が 3 株 (ETNF-11, -12, -13) 含まれていたことから、これらの酵素活性について検討した (表 1, 図 7)。

Peptidyl-MCA 基質を用いて Amidase 活性の有無を検討したところ、ETNF-12 および-13 抗体が C 末端に Arg を持つ peptidyl-MCA 基質を加水分解し、Serine protease 様の酵素活性を示した (図 8)。次に、ETNF-13 抗体の重鎖

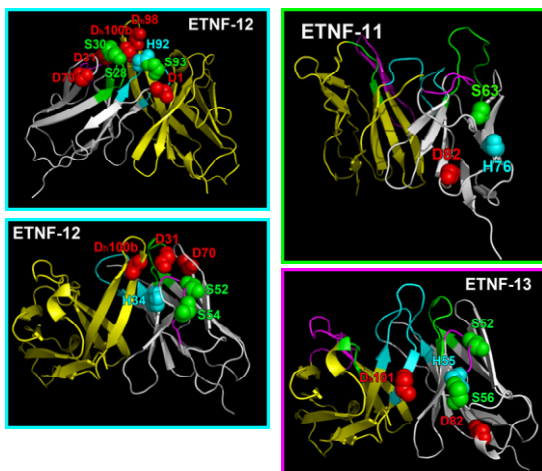


図 7 IgM 株 (ETNF-11, -12, -13 抗体) 可変領域の予測された立体構造

白が軽鎖、黄が重鎖を表しており、触媒三ツ組残基様構造を構築すると考えられたアミノ酸残基を spacefill で示している

と軽鎖を調製し、完全抗体と共に QAR-MCA 基質に対する分解活性を調べると (図 9)、触媒三ツ組残基様構造を持たないと推定した重鎖単独では QAR を全く分解しないことが分かった。完全抗体と軽鎖を比較すると、完全抗体がより高い分解活性を示しているものの、IgM 抗体には抗原結合サイトが 10 カ所存在していることから、抗原結合サイトあたりに換算して整理すると、完全抗体よりも軽鎖の方が高い活性を有していることが分かる。

これまで申請者らが作製してきた「スーパー抗体酵素」は全て IgG 由来の「抗体鎖」であり、完全抗体では酵素活性を示していない。先に示した ETNF-6 抗体も、これに該当する。Germline gene に酵素活性サイトがコードされていること、この特徴的な遺伝子を使って産生された軽鎖が酵素活性を示し、この軽鎖を使って構築された IgM 抗体では酵素活性を示すことがあっても IgG 抗体ではその割合が極端に低くなるという事実は、抗体の分子進化の過程を考察する上で意義深い。

hTNF- α に対する分解活性は、Amidase 活性を示した ETNF-12 および ETNF-13 完全抗体について実施した。その結果、ETNF-12 抗体で R2-S3 間が切断された断片を検出したが、これ以上の分解は進行せず、分解速度も

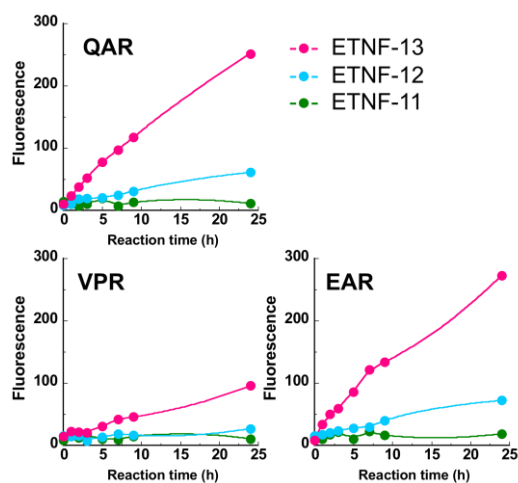


図 8 IgM 株 (ETNF-11, -12, -13) 鎖による Peptidyl-MCA 基質の分解

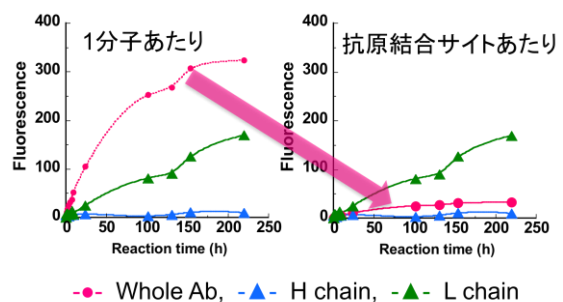


図 9 ETNF-13 抗体および抗体鎖による QAR-MCA 基質の分解

ETNF-6H や ETNF-6L と比較して低いものであった。また、ETNF-12 よりも高い分解活性が期待された ETNF-13 では、hTNF- α の分解活性はさらに低く、R2-S3 間の切断を示唆する傾向は認められたものの、断片は同定出来なかった。Peptidyl-MCA 基質に対する分解活性と、抗原タンパクに対する分解活性との関連については、他の「スーパー抗体酵素」でも検討を進めており、両者に相関関係が成立しない例が認められている。

(4)まとめ

hTNF- α を抗原として作製した 17 種類のモノクローナル抗体から、分子モデリングによる立体構造解析や抗体遺伝子の特徴に着目する申請者独自の方法によって、hTNF- α に対する分解活性を有する 3 種類の抗体を見出し、中で最も強い分解活性を示したのは ETNF-6 抗体の重鎖であった。TNF- α は全世界的に着目されている分子であり、これを標的とする「スーパー抗体酵素」の作製は、高く評価されている。

本研究では、マウス型「スーパー抗体酵素」の取得を進めて来たが、僅か 17 種類の抗体に少なくとも 3 種類の「スーパー抗体酵素」が含まれていた点は着目すべき事実である。慢性関節リウマチは自己免疫疾患であり、TNF- α の産生が亢進している病態であることから、取得したスーパー抗体酵素のヒト型化と並行して、慢性関節リウマチ患者のリンパ球から抗体をクローン化することで、完全ヒト型の TNF- α に対する「スーパー抗体酵素」の取得を進めて行く。

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)

Emi Hifumi, Kyohei Higashi, Taizo Uda, Catalytic digestion of human tumor necrosis factor-alpha by antibody heavy chain, FEBS J., 査読有, Vol. 277, 2010, pp.3823-3832

[学会発表] (計 9 件)

- ① Emi Hifumi, Kyohei Higashi, Taizo Uda, Super catalytic antibody cleaving human TNF- α , PacifiChem 2010, 2010 年 12 月 16 日, Honolulu
- ② 一二三恵美, 東教平, 宇田泰三, TNF- α に対する抗体酵素 ETNF-12 および-13 の検討, 平成 22 年度生物工学会, 2010 年 10 月 29 日, 宮崎シーガイア
- ③ 一二三恵美, 東教平, 宇田泰三, TNF- α に対する抗体酵素の基礎的研究, 第 47 回化学関連支部共同九州大会, 2010 年 7 月 10 日, 北九州国際会議場
- ④ 東教平, 西頭恵梨, 一二三恵美, 宇田泰三,

TNF- α に対する ETNF series の酵素活性, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 近畿大学

- ⑤ 東教平, 一二三恵美, 宇田泰三, TNF- α に対する IgM モノクローナル抗体の免疫学的性質と酵素的性質, 第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 九州大学
- ⑥ 一二三恵美, 完全ヒト型スーパー抗体酵素の作製に向けて, 第 19 バイオ高分子シンポジウム, 2009 年 7 月 30 日, 東京大学先端科学研究センター
- ⑦ 東教平, 一二三恵美, 宇田泰三, TNF- α に対する IgM モノクローナル抗体の免疫学的性質と酵素活性, 第 46 回化学関連支部共同九州大会, 2009 年 7 月 11 日, 北九州国際会議場
- ⑧ 東教平, 一二三恵美, 宇田泰三, TNF- α に対する IgM モノクローナル抗体 ETNF series の酵素活性の検討, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 28 日, 日本大学船橋キャンパス
- ⑨ 東教平, 一二三恵美, 宇田泰三, 酵素活性の視点から見た IgM 抗体の意味～サイトカイン TNF- α に対する天然型抗体酵素の探索～, 第 3 回バイオ関連合同シンポジウム, 2008 年 9 月 20 日, 東京工業大学すずかけ台キャンパス

[特許] (計 1 件)

一二三恵美, 岡村好子, 宇田泰三, ヒト TNF- α に対する抗体酵素およびその利用 (PCT/JP2007/51418) (関連特許)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一二三 恵美 (HIFUMI EMI)
大分大学・全学研究推進機構・教授
研究者番号：90254606

(2) 研究分担者

宇田泰三 (UDA TAIZO) (2007 年度)
大分大学・工学部・教授
研究者番号：20232837

(3) 連携研究者

宇田泰三 (UDA TAIZO)
(2008 年度~2010 年度)
大分大学・工学部・教授
研究者番号：20232837