

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750070

研究課題名（和文）トランジェントトラッピング法と質量分析検出による  
生体試料の高性能電気泳動分析研究課題名（英文）Application of Transient Trapping to Capillary Electrophoresis-Mass  
Spectrometry for High Performance Bioanalysis

## 研究代表者

末吉 健志（SUEYOSHI KENJI）

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70552660

研究成果の概要（和文）：キャピラリー電気泳動-質量分析法に、当研究室で開発したオンライン試料濃縮法であるトランジェントトラッピング法を組み合わせることで、生体試料の電気泳動分析における分離能の向上と高感度化を同時に実現した。

研究成果の概要（英文）：Application of on-line sample preconcentration technique named transient trapping to capillary electrophoresis-mass spectrometry improved both a resolution and sensitivity in electrophoretic analyses for biogenic compounds.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分離分析・質量分析法・オンライン試料濃縮・動電クロマトグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内に存在する種々の化合物（DNA、タンパク質、ペプチド、アミノ酸など）の分離分析法として、キャピラリー電気泳動(CE)が注目を集めてきた。また、エレクトロスプレーイオン化-質量分析法（ESI-MS）と結合されることで、未知の成分の同定や微量試料の定性分析が可能となった。しかしながら、MS 検出では不揮発性の緩衝液を使用できないことや、多量の塩が泳動液に含まれている場合には試料のイオン化効率が低減されることから、ミセル動電クロマトグラフィー

(MEKC) など CE における有用な分離モードの多くは適用が困難であり、その分離能には制限があった。また、CE 全般の問題点として、少ない試料体積や短い光路長にともなう低い濃度感度についても、その改善が望まれていた。

(2) 申請者らは CE/MCE における新規オンライン試料濃縮法として、トランジェントトラッピング (tr-tarpping) 法を開発し、ステロイド類やアミノ酸、ペプチドなどの高性能かつ高分離能な分析を実現してきた。本手法は

部分的に注入した界面活性剤ミセル溶液を利用して試料の濃縮および分離を行い、試料分子はミセル溶液ゾーンを通過後に検出部に到達することから、これを MS 検出に適用することで、CE-MS における問題点の改善が可能であると着想し、以下の検討を行った。

## 2. 研究の目的

(1) 簡便、高感度、高分離能かつ高い定性能を有する tr-trapping-MEKC-MS の開発

(2) 新規擬似固定相の適用による分離性能のさらなる向上

(3) MS 検出に適用可能な新規アフィニティ電気泳動分析技術の開発

## 3. 研究の方法

(1) 界面活性剤分子およびミセルの MS 装置へ導入による検出器の汚染を防ぐため、図 1 のような実験系を構築する。一般的な未修飾のフューズドシリカキャピラリーを用いた場合、陽極が挿入されたバイアルに浸漬されている試料導入部側から MS 装置側へと向かう電気浸透流 (EOF) が発生する。一方、部分的に注入されたミセル溶液にはアニオン性の界面活性剤が含まれており、電場中では陽極に向かって電気泳動を行う。したがって、界面活性剤分子およびミセルの電気泳動速度よりも溶液全体を押し流す EOF 速度が遅い条件下では、界面活性剤は試料導入部側へ泳動し、MS 装置側に達することは無い。その結果、MS 装置の汚染を防ぎつつ、tr-trapping 法の適用による高感度化と分離能の向上が期待できる。この条件を満たす EOF が発生する実験条件を模索し、tr-trapping-MEKC-MS の実現を目指した。

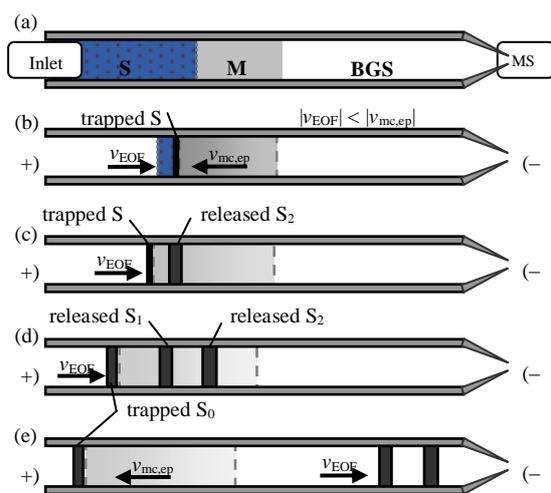


図1. tr-trapping-MEKC-MSの概略図。(a) 初期状態、(b) トラップ機構による試料濃縮、(c)、(d) リリース時間の差に基づく分離、(e) リリースされた試料を検出。 $v_{EOF}$ : 電気浸透流速度、 $v_{mic,ep}$ : ミセルの電気泳動速度。

(2) これまでに開発されてきた tr-trapping 法およびその関連技術は、ミセルと試料との疎水性相互作用を利用した試料濃縮・分離に限定されていたため、光学異性体分析等への適用は困難であった。そこで、ミセル以外の擬似固定相を用いる tr-trapping 法の開発による分離能のさらなる向上について検討した。

(3) 生体分子が有する特異的認識能 (アフィニティ) を利用する CE 分析 (アフィニティ CE, ACE) は、生体試料の CE 分析において重要な役割を占める分析法である。大きく分けて、泳動液にアフィニティリガンド (AL) を添加する手法と、キャピラリー内に AL を固定化する手法の 2 通りが報告されてきたが、前者では泳動の度に高価な AL が消費される点と CE-MS への適用が困難な点が、後者では煩雑な固定化操作が必要な上、固定化操作中にアフィニティが失活してしまうことがある点がそれぞれ懸念されてきた。そこで本研究では、簡便かつ AL の活性を維持したまま固定化する手法について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 界面活性剤として硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を選択し、その分子およびミセルの電気泳動移動度 ( $\mu_{ep,mc}$ ) を算出したところ、それぞれ  $-2.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  および  $-3.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であった。一方、未修飾のフューズドシリカキャピラリーにおいて、電圧印加時に発生する EOF は泳動液の pH に依存することが知られている。そこで、CE-MS に適用可能な揮発性緩衝液としてギ酸アンモニウム溶液を選択し、その pH を 3.5~7.0 まで変化させ、その電気浸透移動度 ( $\mu_{eo}$ ) を算出したところ、pH 3.5 において  $\mu_{eo} = 2.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  となり、汚染防止のための条件を満たすことが示唆された。そこで、この pH 条件下で実際にミセル溶液を部分的に注入した後、試料溶液を大量導入し、tr-trapping-MEKC-MS 分析を行ったところ、一般的なキャピラリーゾーン電気泳動-MS (CZE-MS) 分析では分離できなかったステロイド類の分離と濃縮が同時に達成された (図 2)。この時、アンドロステロン (AS) で最大 340 倍、プロゲステロン (PS) で 120 倍の高感度化がそれぞれ達成された。また、SDS 由来のシグナルは全く観察されなかったことから、界面活性剤分子の MS 装置への流入による装置汚染を防ぎつつ、tr-trapping の適用による高感度化と分離能の向上とを同時に達成可能であることが示された。過去の CE-MS に関する報告では、濃度感度と分離能を同時に向上させた例はほとんどなく、本手法が CE-MS 分析の問題点である濃度感度と分離モードに対する制限を解決可能な手法として与えるインパクトは大きい。今後、本手法の適用

範囲の拡大と実試料分析への応用による微量試料の高性能分析法の確立が期待される。

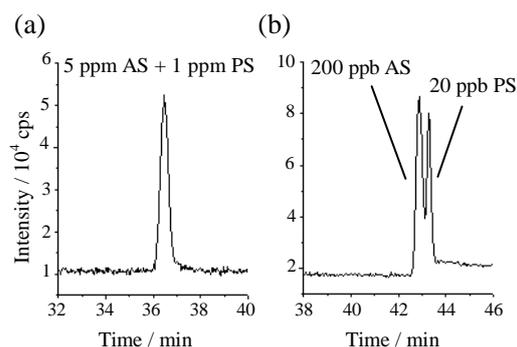


図2. CE-MSへのtr-trappingの適用による分離能の向上と高感度化。泳動液, 30 mM ギ酸アンモニウム溶液 (pH 3.5); ミセル溶液, 25 mM SDS / 10 mM ギ酸アンモニウム溶液; 試料溶液, AS, PS / 泳動液。ミセル溶液注入時間 (a) なし, (b) 1.5 psi, 20 s。試料溶液注入時間 (a) 5.0 psi, 5 s, (b) 5.0 psi, 180 s。キャピラリー全長/有効分離長, 40/30 cm。分離電圧, 30 kV。ESI 電圧, 5 kV (positive ion mode)。シース液, 水:メタノール:ギ酸 = 49:50:1。シース液流量 5.0  $\mu$ L/min。ネビュライザーガス,  $N_2$ , 20 psi。

(2) 分離能のさらなる向上を目指し, 界面活性剤ミセルとの疎水性相互作用とは異なる相互作用を示す擬似固定相の導入を検討した。本研究では光学異性体の高感度な電気泳動分析の実現を目指し, 光学認識能を有するシクロデキストリン (CD) を擬似固定相として用いる CDEKC と tr-trapping-MEKC との結合について検討を行った。その結果, 泳動液のみに硫酸化  $\beta$ -CD を添加することで, 疎水性相互作用を利用する tr-trapping による試料濃縮の後に, CDEKC に基づくキラル分離を行う tr-trapping-CDEKC が実現された。種々のラセミ体試料について開発した手法を適用したところ, それぞれ良好なキラル分離と 60~180 倍の高感度化が同時に達成された(図3)。これまでの CDEKC 分析においては, 電場増強スタッキングによるオンライン試料濃縮が多く報告されてきたものの, その濃縮効率は大きくはなく, またピークのブロードニングや有効分離長の減少による分離能の低下が問題となっていた。しかしながら, 本研究では高い分離能がある程度維持されたまま, 高効率な試料濃縮が可能であり, また界面活性剤ミセルとの疎水性相互作用も利用可能である。さらには, 添加する擬似固定相の選択によって他の相互作用に基づく分離が期待できる点に加えて, 研究成果 (1) と同様の実験条件を満たす擬似固定相の適用によって CE-MS 分析の適用範囲を拡大可能である点も非常に大きなインパクトを与えるであろう。現在, 実試料分析への適用を含めた CE-MS 分析への応用について検討を進めている。

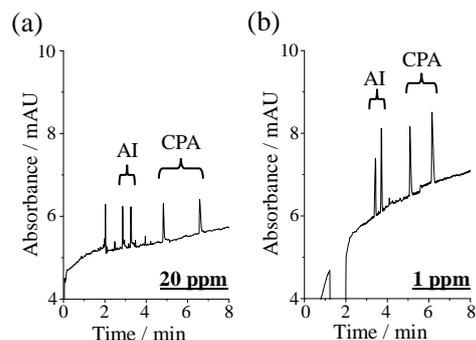


図3. 光学異性体分析へのtr-trappingの適用。(a) 一般的なCDEKC分析 (b) tr-trapping-CDEKC。泳動液, 5 mM S- $\beta$ -CD / 10 mM phosphate buffer (pH 7.0); ミセル溶液, 50 mM SDS / 15 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0); 試料溶液, 1-アミノインダン(AI), クロロフェニラミン(CPA) / 泳動液。ミセル溶液注入時間 (a) なし, (b) 0.5 psi, 10 s; 試料溶液注入時間 (a) 0.5 psi, 3 s, (b) 5.0 kV, 180 s。キャピラリー全長/有効長, 40/30 cm。分離電圧, 20 kV; 検出, UV吸収 (200 nm)。

(3) 固定化のための新規材料としてアルギン酸ナトリウムに着目した。アルギン酸ナトリウム水溶液にカルシウムイオンを添加すると, ただちにヒドロゲルを形成することが知られている。また, アルギン酸-カルシウムヒドロゲルは, 生体適合性が高く, タンパク質等の活性を維持したまま内包可能であることから, これらの特性を利用してキャピラリー内にALを固定化する手法を着想し, その電気泳動分析への適用可能性について検討した。その結果, ALとしてアビジンを含むアルギン酸ナトリウム溶液をキャピラリー内に注入後, カルシウムイオンを含む泳動液を電氣的に注入することで, キャピラリー内でアルギン酸ヒドロゲルが形成され, アビジンを固定化できることが確認された。さらに, アビジンと強固に結合するビオチンを試料として電気泳動分析を行ったところ, ビオチンはアビジンに補足され, 検出されることは無かった(図4)。

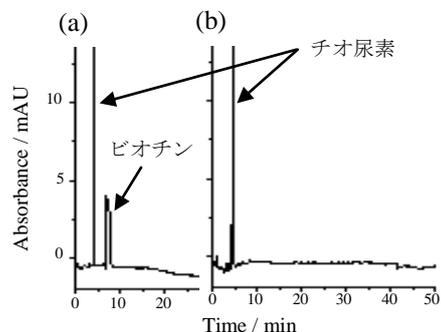


図4. ビオチンのACE分析結果。(a) アビジン未添加, (b) アビジン内包ヒドロゲルを部分的に充填。泳動液, 1 mM  $CaCl_2$  / 15 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0); 試料, 50 ppm チオ尿素, 200 ppm ビオチン / 泳動液。試料注入, 5.0 kV, 20 s; 分離電圧, 20 kV; キャピラリー全長 / 有効長, 40/30 cm。検出, UV吸収 (200 nm)。

以上の結果から、本手法によって AL の活性を維持したまま、簡便な手順でキャピラリー内に固定化可能であることが示された。本手法は、CE 装置を用いる簡便な固定化法であり、過去の固定化法と比較して安価かつ自動化が可能な点が大きな利点である。今後、CE-MS 分析との組み合わせによる生体試料分析の高性能化への展開が期待される。

#### 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 7 件)

1. Kitagawa, F.\*; Kawai, T.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K. “Recent progress of on-line sample preconcentration techniques in microchip electrophoresis”, *Analytical Science*, 査読有, 28, 2012, 85–93, 10.2116/analsci.28.85.
2. Kawai, T.\*; Watanabe, M.; Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. “Highly sensitive oligosaccharide analysis in capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump”, *Journal of Chromatography A*, 査読有, 1232, 2012, 52–58, 10.1016/j.chroma.2011.09.032.
3. Sueyoshi, K.\* “Recent progress of on-line combination of preconcentration device with microchip electrophoresis”, *Chromatography*, 査読有, 33, 2012, 25–33.
4. Sueyoshi, K.\*; Hashiba, K.; Kawai, T.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. “Hydrophobic labeling of amino acids: transient trapping–capillary micro-chip electrophoresis”, *Electrophoresis*, 査読有, 32, 2011, 1233–1240, 10.1002/elps.201000567.
5. 北川文彦\*, 末吉健志, 大塚浩二 “マイクロチップ電気泳動におけるオンライン試料濃縮技術”, *ぶんせき*, 査読有, 3, 2011, 143–149.
6. Kitagawa, F.\*; Kubota, K.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K. “One-step preparation of amino-PEG modified poly(methyl methacrylate) microchips for electrophoretic separation of biomolecules”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 査読有, 53, 2010, 1272–1277, 10.1016/j.jpba.2010.07.008.
7. Kawai, T.\*; Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. “Microchip electrophoresis of oligosaccharides using large-volume sample stacking with electroosmotic flow pump in single channel”, *Analytical Chemistry*, 査読有, 82, 2010, 6504–6511, 10.1021/ac1008145.

[学会発表] (計 27 件)

1. 末吉健志\*, 堀祐輔, 大塚浩二 “キチン修飾 PDMS 製マイクロチップを用いるタンパク質の電気泳動分析”, 口頭発表, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 慶應義塾大学

- 日吉キャンパス・矢上キャンパス, 東京.
2. Kenji Sueyoshi\*, Masahiro Ikawa, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Capillary/Microchip Gel Electrophoresis Using Alginate Hydrogel as a Sieving Medium”, ポスター発表, 27th International Symposium on Microscale Bioseparations (MSB2012), 2012 年 2 月 12-16 日, Starling Hotel and Conference Center, Geneva, Switzerland.
  3. Kenji Sueyoshi\*, Hiroshi Koino, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Transient Trapping in Enantioseparation for High-Sensitive Detection. 4”, ポスター発表 (ポスター賞受賞), 11th Asia Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2011), 2011 年 11 月 27-30 日, University of Tasmania, Tasmania, Australia.
  4. 末吉健志\* “ミクロスケール電気泳動の高機能化・高感度化に関する研究”, 口頭発表 (奨励賞受賞記念講演), 第 22 回クロマトグラフィー科学会議, 2011 年 10 月 20-22 日, 東北大学, 仙台.
  5. 井川真宏, 末吉健志\*, 北川文彦, 大塚浩二 “アルギン酸-カルシウムヒドロゲルを分離媒体として用いるマイクロチップ電気泳動分析法の開発”, 口頭発表, 第 55 回日本学術会議材料工学連合講演会, 2011 年 10 月 19-21 日, 京都教育文化センター, 京都.
  6. 井川真宏, 末吉健志\*, 北川文彦, 大塚浩二 “アルギン酸ヒドロゲルを用いたマイクロチップ電気泳動分析法の開発”, 口頭発表, 日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 14-16 日, 名古屋大学・東山キャンパス, 名古屋.
  7. Kenji Sueyoshi\*, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Rapid and sensitive analysis using transient trapping in microchip electrophoresis”, 口頭発表 (招待講演), The 14th Asian Chemical Congress (14ACC), 2011 年 9 月 5-8 日, The Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thai.
  8. Kenji Sueyoshi\*, Kana Tanigawa, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “On-line Preconcentration of Proteins in Floating Electrode-integrated Microchannel”, ポスター発表, The International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2011), 2011 年 6 月 2-4 日, Hotel Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan, Seoul, Korea
  9. Kenji Sueyoshi\*, Mariko Seno, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Nafion Modified PMMA Microchips for Rapid Electrophoretic Analysis”, ポスター発表, The International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2011), 2011 年 6 月 2-4 日, Hotel Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan, Seoul, Korea
  10. Kenji Sueyoshi\*, Hiroshi Koino, Kota Hashiba, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Rapid and sensitive electrophoretic analysis in transient trapping–micellar electrokinetic chromatography”, 口頭発表, IUPAC International Congress on

- Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), 2011 年 5 月 22-26 日, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.
11. Ryuta Tanaka, Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Transient trapping in bioanalysis for high-sensitive detection. 3”, ポスター発表, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), 2011 年 5 月 22-26 日, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.
  12. Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Mariko Seno, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka, “Stable coating using Nafion thin membrane for fast electroosmotic flow in polymer microchips”, ポスター発表, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), 2011 年 5 月 22-26 日, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.
  13. 末吉健志<sup>\*</sup>, 恋野寛嗣, 田中隆太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法によるミクロスケール電気泳動分析の高感度化(3)”, 口頭発表, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26-29 日, 神奈川大学横浜キャンパス, 横浜.
  14. Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Kota Hashiba, Ryuta Tanaka, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Rapid and sensitive analysis based on transient trapping in capillary electrophoresis”, 口頭発表, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010 年 12 月 15-20 日, Honolulu, HI, USA.
  15. Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Kota Hashiba, Ryuta Tanaka, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Rapid and sensitive analysis based on transient trapping in microchip electrophoresis”, ポスター発表, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010 年 12 月 15-20 日, Honolulu, HI, USA.
  16. 末吉健志<sup>\*</sup>, 恋野寛嗣, 田中隆太, 橋場皇太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法によるミクロスケール電気泳動分析の高感度化(2)”, 口頭発表, 第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2010 年 11 月 15-17 日, 長良川国際会議場, 岐阜.
  17. 末吉健志<sup>\*</sup>, 恋野寛嗣, 橋場皇太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法による光学異性体分析の高感度化(3)”, 口頭発表, 第 21 回クロマトグラフィー科学会議, 2010 年 10 月 21-23 日, 武庫川女子大学薬学部, 西宮.
  18. Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Fluorescence imaging analysis of transient trapping-microchip micellar electrokinetic chromatography”, ポスター発表, 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2010), 2010 年 10 月 3-7 日, Martiniplaza, Groningen, The Netherlands.
  19. 末吉健志<sup>\*</sup>, 恋野寛嗣, 橋場皇太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法による光学異性体分析の高感度化”, 口頭発表, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 15-17 日, 東北大学川内北キャンパス, 仙台.
  20. 末吉健志<sup>\*</sup>, 恋野寛嗣, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法によるミクロスケール電気泳動分析の高感度化”, 口頭発表, 東京コンファレンス 2010, 2010 年 9 月 1-3 日, 幕張メッセ国際会議場, 千葉.
  21. Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Kota Hashiba, Ryuta Tanaka, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Highly effective sample preconcentration and separation based on transient trapping in microscale electrophoresis”, ポスター発表, 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2010), 2010 年 6 月 19-24 日, The Hynes Convention Center & Sheraton Boston Hotel, Boston, MA, USA.
  22. 末吉健志<sup>\*</sup>, 橋場皇太, 田中隆太, 北川文彦, 大塚浩二 “マイクロチップ電気泳動における新規オンライン試料濃縮法: トランジェントトラッピング法の開発(7)”, ポスター発表, 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2010 年 6 月 10-11 日, 東京大学本郷キャンパス.
  23. 末吉健志<sup>\*</sup>, 寒川 隆史, 北川文彦, 大塚浩二 “磁性流体の利用によるマイクロチップ電気泳動の高機能化(5)”, ポスター発表, 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2010 年 6 月 10-11 日, 東京大学本郷キャンパス.
  24. 末吉健志<sup>\*</sup>, 橋場皇太, 田中隆太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化(17)”, 口頭発表, 第 17 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2010 年 6 月 3-5 日, 広島県情報プラザ.
  25. 末吉健志<sup>\*</sup>, 田中隆太, 橋場皇太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化(18)”, ポスター発表, 第 17 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2010 年 6 月 3-5 日, 広島県情報プラザ.
  26. Takafumi Samukawa, Kenji Sueyoshi<sup>\*</sup>, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka “Electrokinetic filtering on magnetic fluid nano-pillar for high-sensitive electrophoretic analysis”, ポスター発表, International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2010 (ISMM 2010), 2010 年 5 月 28-30 日, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China.
  27. 末吉健志<sup>\*</sup>, 橋場皇太, 田中隆太, 北川文彦, 大塚浩二 “トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化(15)”, 口頭発表, 第 71 回分析化学討論会, 2010 年 5 月 15-16 日, 島根大学, 松江キャンパス.

[その他]

ホームページ等

<http://anchem.mc.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

末吉 健志 (SUEYOSHI KENJI)  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：70552660