

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24360339

研究課題名(和文)抗体医薬をめざした最先端ハイブリドーマテクノロジーの開発と応用

研究課題名(英文)Advanced hybridoma technology for generating next generation of therapeutic medicines

研究代表者

富田 昌弘(Tomita, Masahiro)

三重大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20183494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：取得したい抗体を発現するB細胞をその抗体に対する抗原を発現させたミエローマ細胞で選択し、両細胞を電気パルスによって選択融合を行い、膜受容体の立体構造を認識することのできる高親和性抗体を産生するハイブリドーマを作製することができた。また、誘電泳動による細胞の操作技術を用いて、迅速で簡便に異なる種類の細胞をマイクロウェルアレイ電極内に導入し、1対1の異種細胞ペアを作製できた。約1分で10万個以上の異種細胞ペアを作製できた。さらに、この細胞ペアに電気パルスを印加すると細胞融合によりハイブリッド細胞を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：B cells harboring aimed specific antigen-receptors were captured by antigen-expressing myeloma cells and selectively fused by electrical pulses to generate hybridoma cells secreting stereospecific monoclonal antibodies. By using this method, hybridoma cells can be fabricated to produce the stereospecific structure of the specific receptors on the cell membrane. Cell manipulation technique based on the dielectrophoresis was utilized to introduce the cells to the microwell array electrode and form single cell pairs with different types of cells rapidly and simply. Thus, the use of the present dielectrophoretic manipulation allows large numbers of cell pairs (over 100,000 pairs) to be produced within only 1 min.

研究分野：抗体工学

キーワード：B細胞 抗原発現細胞 ハイブリドーマ 立体構造特異的抗体 誘電泳動 細胞配列 免疫捕捉 細胞分離

1. 研究開始当初の背景

「抗体医薬」は、高特異性、長い生体内半減期、少ない副作用から、絶対的な治療法の確立されていないガン、自己免疫疾患等への次世代の医薬品として期待されている。細胞膜表面タンパク質（特に、抗体医薬として重要な受容体）に対する抗体は、そのタンパク質が細胞膜に組み込まれた状態における細胞外部位の立体構造を特異的に認識できることが極めて重要である。

抗体は、免疫化マウスの脾臓から採取した B 細胞とマウスミエローム細胞を融合したハイブリドームにより作製されている。ハイブリドームは、抗体産生能と自己複製能を兼ね備えた永久に抗体を産生できる。しかし、膜タンパク質を抗原とした免疫により、膜タンパク質のあらゆる部位を認識する抗体を産生する B 細胞が生成されるため、免疫化マウスの脾臓に含まれる目的部位を認識する抗体（膜埋め込み型タンパク質の細胞外部）を産生する B 細胞の割合は多くとも 1% である。また、立体構造認識能を有する高親和性抗体を産生する B 細胞の存在割合はさらに少ない。この雑多な B 細胞群とミエローム細胞を混合し、B 細胞 - ミエローム細胞複合体（ペアリング）および細胞融合を経てハイブリドームが得られる。よって、わずかに存在する高親和性抗体産生 B 細胞の選択、細胞ペアの形成および形成された細胞ペアの融合を高効率で迅速に達成できる技術の開発が必要である。

我々は、これまでに抗原による目的の B 細胞選択と電気パルスを用いた B 細胞ターゲティング法を開発した。この手法により、従来のポリエチレングリコール(PEG)法と比較して 40 倍の高い融合効率を実現できる優位性を実証した（特許出願済：富田ら 国際特開 WO2004/078964, 国際特願 PCT/JP2004/006298, USA 特願 10/547,810; Tomita et al. Hybridoma 2006）。

誘電泳動（DEP）は、不均一交流電場下で粒子および粒子 - 溶液界面が不均一に分極することによって起こる粒子の移動現象のことである。これまで、数多くの粒子や細胞の誘電特性が評価され、細胞のパターニング、濃縮、捕捉、輸送、分離、溶解、細胞融合、環境変化に対する応答評価に応用されてきた。これまで、我々は DEP を用いて細胞や微粒子を配列化する手法の開発を行ってきた。近年では、粒子配列化技術と生体認識反応を組み合わせ、迅速で簡便な免疫測定法を開発を行った。さらに、この手法を細胞の表面抗原識別へと応用展開している。ここでは、配列パターンの変換に免疫反応を組み込むことにより、免疫捕捉される特定の表面抗原を発現する細胞と未発現細胞を極めて迅速に分離している。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子組換え技術を用いて立

体構造を保持した抗原を発現するミエローム細胞を作製し、そのミエローム細胞を用いて目的の B 細胞を選択する。また、高い親和性を有する立体構造認識型抗体を産生するハイブリドームを作製するために、誘電泳動法を用いて高効率で迅速に細胞のマイクロウェルアレイへの配列、異種細胞ペアリング、電気パルス融合によるハイブリッド細胞の形成技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 誘電泳動を用いた特定の抗原を発現する細胞の識別

インジウム - スズ酸化物 (ITO) の透明導電性薄膜を有する基板に交互くし型マイクロバンドアレイ (IDA) 電極を作製した。この ITO-IDA 電極のギャップ領域に化学架橋法を利用して抗 CD33 抗体を固定化した。下面に ITO-IDA 電極 (電極 a および b), 上面に ITO 電極を組み込んだマイクロ流路型 DEP デバイスを作製した。HL-60 細胞 (CD33 陽性) 懸濁液 (400 mS m^{-1}) を流路に導入し、下面の ITO-IDA 電極に交流電圧 (20 V_{pp} , 100 kHz) を印加して誘電泳動力を発生させた。この際、上面の ITO 電極は接地した。この状態を 1 分間保持し、IDA 電極の電極 b に印加していた電圧をゼロに変換し、基板上に固定化した抗体と反応しない未反応細胞を除去した。

(2) 誘電泳動を用いた迅速な細胞アレイの作製と細胞ペアリング

ITO 電極上に絶縁性のネガティブフォトレジストでマイクロポールアレイを作製し、ポールに囲まれた部分をマイクロウェルとして利用した。ポール間を利用することによりアスペクト比の高いウェルを作製可能となる。ここでは、幅が単一細胞サイズ ($14 \mu\text{m}$), 深さが 2 細胞サイズ ($25 \mu\text{m}$) のウェル (500×500) を作製した。このマイクロウェルアレイ電極上に、厚さ $30 \mu\text{m}$ のスペーサを介して ITO 電極を設置し誘電泳動デバイスを作製した。上下電極基板間に形成された流路に細胞懸濁液を導入し、電極間に p-DEP の作用する交流電圧 (10 V_{pp} , 1.0 MHz) を印加して細胞をウェル内へと誘導した。この操作を繰り返し、異なる種類の細胞ペアを作製した。

(3) 立体構造特異的ターゲティング (Stereospecific targeting : SST) 法

EphA2 発現プラスミドを用いてマウスの DNA 免疫を行った後、無菌的に脾臓を取り出し懸濁液を調製した。脾細胞中に含まれる目的の感作 B 細胞を EphA2 発現ミエローム細胞によって選択した。このステップにおいて選択される B 細胞は、立体構造特異的モノクローナル抗体を産生している可能性が高い。その理由は、ミエローム細胞上の EphA2 が、立体構造を保持しているからである。B 細胞 - ミエローム細胞複合体を電気パルスによって選択融合して、目的の立体構造特異的モ

ノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。

4. 研究成果

(1) 誘電泳動における印加交流電圧の電圧強度、周波数および位相を制御することにより、デバイス内の電場パターンを変更し配列パターンを変換できる。このパターンの変換工程に、抗体による認識反応を組み込み膜表面に抗原を発現する細胞を識別した。図1に、HL-60細胞懸濁液をデバイスに導入し、交流電圧を印加した際の電場パターンの概念図と印加5秒後の光学顕微鏡写真を示す。下面のITO-IDA電極aと電極bに同位相の交流電圧を印加し、上面のITO電極は接地した(図1A)。交流電圧を印加するとランダムに分散していた細胞は、n-DEPにより5秒以内にバンド電極間ギャップへと移動した(図1C)。これは、上下電極間に強電場が形成され、バンド電極間ギャップに弱電場領域が形成されるためである。ここで、電極bに印加していた電圧を0V_{pp}に変換すると(図1B)、ほとんどすべての細胞が電極b上へと移動し10秒以内に異なる配列体を形成した(図1D)。これは、電極bと上面ITO電極間に形成されていた電場が消失するためである。よって、印加電圧を制御することにより簡便に異なる細胞パターンを作製できることが示された。図1EおよびFにデジタルシミュレーションにより得られたデバイス内に形成される電場の断面図を示す。電極aおよびbに同位相の交流電圧を印加すると、両バンド電極上に強電場が形成され、下面ITO-IDA電極のギャップ領域に弱電場が形成されることがわかる。よって、n-DEPによりこの領域に細胞は集積化される。一方、電極bの電圧をゼロにすると、弱電場領域は電極bの上の中央に現れる。よって、バンド間ギャップに集積化されていた細胞は、電極b上へと移動する。シミュレーションにより得られた電場パターンは、細胞の配列化の結果を支持しており、n-DEPを用いてデバイス内で異なる細胞配列体を形成できることを示した。

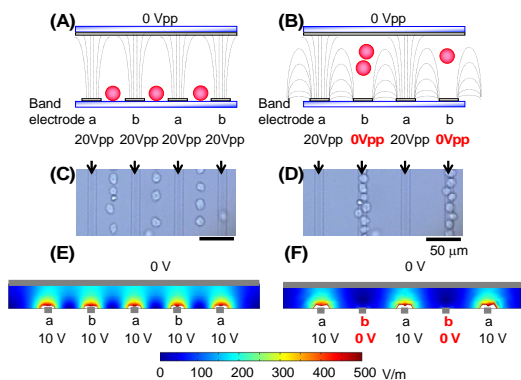


図1. 細胞に作用するCM因子の実部の周波数依存性. 溶液の導電率: (a) 2×10^{-4} , (b) 1×10^{-3} , (c) 1×10^{-2} , (d) 1×10^{-1} , (e) 2×10^{-1} , (f) 4×10^{-1} , (g) 5×10^{-1} , and (h) 1.0 S m^{-1} .

そこで、下面のITO-IDA電極表面を抗体で修飾し特定の表面抗原を発現した細胞の捕捉を行った。図2Aに、抗CD33抗体を固定化したギャップ領域にn-DEPを用いて配列化させたHL-60細胞を示す。この状態を60秒間保持した後、電極bの電圧をゼロに変換した。いくつかの細胞は電極b上へと移動したが、その他の細胞はギャップ領域に残った(図2B)。一方、特異的に反応しない抗体(マウスIgG抗体)を固定化した電極基板を用いると、ほとんどすべての細胞は電極b上へと移動した(図2C)。また、CD33を発現していないCCRF-CEM細胞を用いた場合にも、ほとんどすべての細胞が電極b上へと移動した。すなわち、CD33抗原を発現する細胞は、ギャップ領域における抗原-抗体反応により捕捉されることがわかった。よって、特定の表面抗原を発現する細胞を細胞母集団の中から識別し分離できることを示した。ギャップ領域に捕捉されない細胞は、20秒程度で電極b上へと移動した。印加電圧および電圧印加時間の最適化を行ったところ、20V_{pp}で60秒間細胞をギャップ領域に集積化すると約70%の免疫反応による細胞捕捉率を得ることができた。さらに、ギャップ領域に細胞を集積化中に、バンド電極への印加電圧を周期的に制御して配列化細胞位置をわずかにシフトさせることにより細胞捕捉率を約85%に向上させることができた。特筆すべき点は、細胞識別に要する時間である。ギャップ領域への配列化と免疫反応に60秒、未反応の細胞をバンドB上への排除に30秒と極めて迅速に細胞識別が可能である。また、この手法は、細胞への蛍光標識等のラベリングを一切必要としない簡便な方法である。

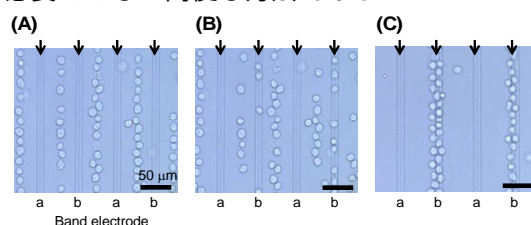


図2. n-DEPによって配列化された細胞の顕微鏡写真。(A) Figure 5Aの電場パターンにより形成された細胞パターン。(B)および(C) (A)のパターンを形成し、バンドBへの印加電圧をゼロに変換してから30秒後の顕微鏡写真。(B)下面ITO-IDA電極を抗CD33抗体で修飾した場合。(C)下面ITO-IDA電極を抗マウスIgG抗体で修飾した場合。

(2) p-DEPを用いて、マイクロウェル内への細胞誘導による迅速な細胞アレイの作製とマイクロウェル内における異種細胞ペアリングを行った。上下電極間に交流電圧を印加すると分散状態の細胞(図3A)はマイクロウェルアレイ内へと瞬時(1秒以内)に誘導された(図3B)。ここでは、緑色に蛍光染色したマウスミエローマ細胞の誘導を行っている。光学顕微鏡写真からも、個々の細胞

がマイクロポール間に形成されたマイクロウェル内に捕捉されていることがわかる(図3C)。個々のウェル内に捕捉されている細胞数は蛍光強度から評価でき、マイクロウェルアレイへの単一細胞捕捉率は65-85%であった。

この単一細胞アレイを形成した誘電泳動デバイスに異なる種類の細胞を導入し、再度p-DEPを利用してマイクロウェル内へと細胞導入すると異種細胞ペアリングを行った。青色に蛍光染色したミエローマ細胞を緑色ミエローマ細胞の捕捉されたウェル内に誘導した。図3Dおよび3Eに、マイクロウェルに捕捉されたミエローマ細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。第一ステップでウェル内に捕捉されたミエローマ細胞を示す緑色蛍光と第二ステップで捕捉された細胞を示す青色蛍光の両方が観測された。図3Dおよび3E中の長方形で囲まれた4つのウェルに注目すると、青色と緑色の重なった水色を示すマイクロウェルが観測できた(図3Fおよび3G)。

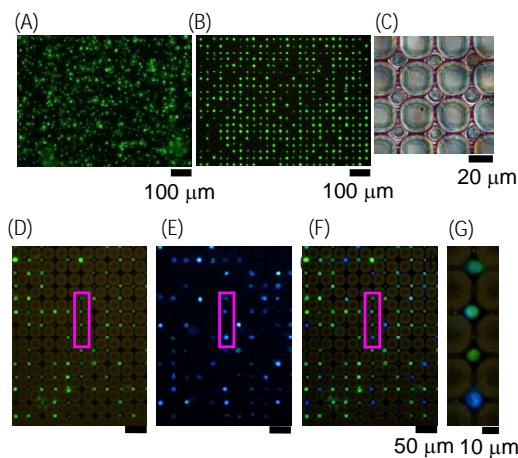


図3. p-DEPを用いた細胞アレイの作製と異種細胞ペアリング。(AおよびB)電圧印加前後の緑色蛍光染色細胞。(C)ウェルアレイに捕捉された細胞の光学顕微鏡写真。(DおよびE)ウェルに捕捉された細胞ペアの蛍光顕微鏡写真。(F)図3Dおよび3Eの合成写真。(G)図3Fの長方形で囲まれた部分の拡大。

すなわち、水色を示すウェルには、緑色および青色の両方の細胞が捕捉されていることを示す。p-DEPによる細胞の捕捉および不要な細胞の除去工程を2回繰り返して細胞ペアを得るために必要とする時間はわずか1分であり、ペア形成効率は50-60%であった。よって、このデバイスを用いると150,000以上の異種細胞ペアを迅速に作製可能となった。さらに、ウェル幅が単一細胞サイズであるため、緑染色細胞と青染色細胞は個々のマイクロウェル内で縦方向にペアを形成して捕捉された。これは、電場に沿った細胞ペア形成ができるため、異種細胞の電気パルス融合によるハイブリッド細胞作製に有利である。

(3)さらに、誘電泳動を用いない、一括融

合実験に基づく、立体構造特異的モノクローナル抗体の作製についても検討した。抗原として、がん抗原の1つであるEphA2に着目した。

SST法に基づき、DNA免疫によって感作されたB細胞をEphA2発現ミエローマ細胞で選択後、両細胞を白金電極(5mm電極幅、1.0-1.5mL容量)に入れ、電気パルスによって選択融合した(図4)。

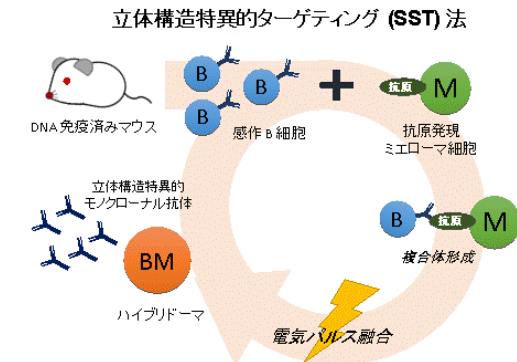


図4. SST法のフローチャート

DNA免疫によって感作されたB細胞を、抗原発現ミエローマ細胞によって選択後、電気パルスによって両細胞を選択融合して目的の立体構造特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製する。

その結果、Cell-ELISA法にて陽性の立体構造特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができた。Cell-ELISA法の特徴は、EphA2が立体構造を保持した状態で提示されることを利用して、立体構造認識モノクローナル抗体の選択的スクリーニングを可能とする。作製されたモノクローナル抗体の立体構造特異性をさらに検討する目的で、次に、可視化解析を行った(図5)。

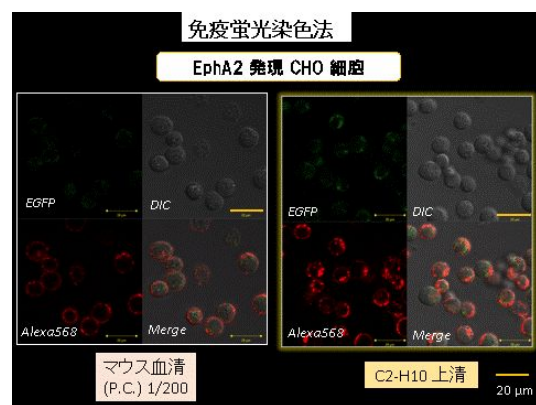


図5. 免疫蛍光染色法

マウス血清：ポジティブコントロール
C2-H10上清：立体構造特異的モノクローナル抗体

その結果、EphA2発現CHO細胞において、膜表面に目的の蛍光ラベル(赤色)を認めることができ、作製されたモノクローナル抗体が、細胞膜上でインタクトな状態で発現され

ている EphA2 を認識できることを実証することができた。

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 43 件)

T. Hattori, K. Nakanishi, T. Mori, M. Tomita, K. Tsumoto, The method used to culture host cells (Sf9 cells) can affect the qualities of baculovirus budding particles expressing recombinant proteins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2016, 80(3), 445-451, 査読有.
DOI:10.1080/09168451.2015.1101331

T. Orita, M. Tomita, K. Nakanishi, K. Kato, Immunoprecipitation of Bisphenol A by Antibody-Mesoporous Silica Composites, *J. Asian Ceram. Soc.*, 2014, 2, 275-280, 査読有.

DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jascer.2014.05.010>

Y. Yoshimura, M. Tomita, F. Mizutani, T. Yasukawa, Cell Pairing Using Microwell Array Electrodes Based on Dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, 2014, 86, 6818-6822, 査読有.
DOI: [org/10.1021/ac5015996](http://dx.doi.org/10.1021/ac5015996)

Y. Yoshimura, C. Fujii, M. Tomita, F. Mizutani, T. Yasukawa, Array of single-cell pairs on a microwell array based on positive dielectrophoresis, *Chem. Lett.*, 2014, 43(7), 980-981, 査読有.
DOI: 10.1246/cl.140195

T. Horii, M. Yamamoto, T. Yasukawa, F. Mizutani, Rapid Formation of Cell-Particle Complexes via Dielectrophoretic Manipulation for the Detection of Surface Antigens, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 61, 215-221, 査読有.
DOI: [org/10.1016/j.bios.2014.05.019](http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.019)

T. Shimizu, T. Mori, M. Tomita, K. Tsumoto, pH switching that crosses over the isoelectric point (pI) can improve the entrapment of proteins within giant liposomes by enhancing protein-membrane interaction, *Langmuir*, 2014, 30, 554-563, 査読有.
DOI: dx.doi.org/10.1021/la403361j

T. Yasukawa, J. Yamada, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Positioning of cells flowing in a fluidic channel by negative dielectrophoresis, *Sens., Actuator. B*, 2013, 186, 9-16, 査読有.
DOI: [org/10.1016/j.snb.2013.05.048](http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.048)

H. Yagami, H. Kato, K. Tsumoto, M. Tomita, Monoclonal antibodies based on hybridoma technology, *Pharm. Pat. Analyst*, 2013, 2(2), 249-263, 査読有.
DOI: 10.4155/PPA.13.2

T. Orita, M. Tomita, M. Harada, K. Kato, Binding activity of avidin to the biotin within mesoporous silica materials for bioanalytical applications, *Anal. Biochem.*, 2012, 425, 1-9, 査読有.

DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.037>

T. Yasukawa, H. Hatanaka, F. Mizutani, Simple detection of surface antigens on living cells by applying distinct cell positioning with negative dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, 2012, 84(20), 8830-8836, 査読有.

DOI: 10.1021/ac302239k

M. Yamamoto, T. Yasukawa, M. Suzuki, S. Kosuge, H. Shiku, T. Matsue, F. Mizutani, Patterning with Particles Using Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes with Negative Dielectrophoresis and Its Application to Simple Immunosensing, *Electrochim. Acta*, 2012, 82, 35-42, 査読有.
DOI: 10.1016/j.electacta.2012.02.109

[学会発表](計 219 件)

T. Yasukawa, Y. Minakuchi, H. Hatanaka, F. Mizutani, Negative dielectrophoretic separation of cells based on the expression of specific surface antigen, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 5 October 2015, Taipei, Taiwan.

Y. Yamasaki, C. Miyamae, Y. Isozaki, K. Tsumoto, M. Tomita, Stereospecific Targeting of Receptors, 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014), 6 December, 2014, 愛媛大学(愛媛県・松山市)

富田昌弘, 山崎康裕, 磯崎勇志, 宮前智帆, 湊元幹太, 立体構造認識次世代ハイブリドーマテクノロジーの開発とその可視化解析, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

M. Tomita, C. Miyamae, Y. Isozaki, Y. Yamasaki, K. Tsumoto, Strict Targeting of Receptors by Stereospecific Monoclonal Antibodies, FEBS EMBO 2014 Conference, 2 September, 2014, Paris, France.

T. Yasukawa, Discrimination of cells with specific antigen expressed on membrane

based on the dielectrophoresis, 2014 19th Annual Conference of Chemical Sensors, 17 May, 2014, Pingtung, Taiwan.

M. Tomita, K. Tsumoto, Next Generation of Hybridoma Technology for Therapeutic Monoclonal Antibodies, The 2nd ASIAN CLINICAL CONGRESS (ACC2), 5 April, 2014, 京都平安ホテル (京都府・京都市)

M. Tomita, K. Tsumoto, Next generation of therapeutic antibodies, The eighteenth International Conference on Human Antibodies & Hybridomas, 31 March, 2014, Vienna, Austria.

T. Yasukawa, Manipulation of particles and cells with dielectrophoresis for simple and rapid analysis, 10th Asian Conference on Chemical Sensors, 12 November, 2013, Chiang Mai, Thailand.

M. Tomita, K. Tsumoto, New hybridoma technology for selective production of stereospecific monoclonal antibodies, 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013), 9 November, 2013, 九州工業大学 (福岡県・北九州市)

安川智之, 迅速, 簡便, 高感度なバイオセンシングシステムの構築, 2013年電気化学秋季大会, 2013年9月27日, 東京工業大学 (東京都目黒区)

T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, F. Mizutani, Rapid and Simple Immunoassay Based on Negative Dielectrophoresis with Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes, 222nd ECS Meeting, 9 October, 2012, Honolulu, USA.

〔図書〕(計 5 件)

K. Tsumoto, Y. Isozaki, M. Tomita, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Seven Edition (authored/edited by R. Ian Freshney), 25.6 Production of Monoclonal Antibodies, 2016, 728 (p544-545).

安川智之, 水谷文雄, 株式会社エヌティエス, 誘電泳動を利用した細胞配列, 三次元ティッシュエンジニアリング技術最前線 第1編第3章第5節 2015, 149-158.

T. Yasukawa, F. Mizutani, Springer, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Chapter 5, Discrimination of Cells with Specific Antigens Expressed on a Membrane

Based on the Dielectrophoresis, 2015, 69-78.

湊元幹太, 富田昌弘, シーエムシー出版, 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線 (熊谷泉 監修) 第10章 次世代ハイブリドーマテクノロジー, 2012, 197-202.

J. Ramón-Azcón, T. Yasukawa, F. Mizutani, CRC press, Biosensors and Environment Health, "Detection of Pesticide Residues using Biosensors", 2012, 21-40.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 微生物の迅速診断を可能とする特異抗体の高効率作製法

発明者: 富田昌弘

権利者: 国立大学法人三重大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-209093

出願年月日: 平成 25 年 10 月 4 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 昌弘 (TOMITA, Masahiro)

三重大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 20183494

(2) 研究分担者

水谷 文雄 (MIZUTANI, Fumio)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・教授

研究者番号: 80118603

研究分担者

安川 智之 (YASUKAWA, Tomoyuki)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・准教授

研究者番号: 40361167