

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510171

研究課題名(和文) ラボディスクによるハイスループット単一細胞遺伝子発現解析

研究課題名(英文) High throughput Analysis of Gene Expression in single cells utilizing Lab-disc

研究代表者

久保 いづみ (Kubo, Izumi)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：40214986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光顕微鏡で細胞が単離されたラボディスクのチャンバーの蛍光を測定することによってRT-PCRに伴う蛍光強度変化の正確な測定ができた。発現量の比較を β -actinで標準化して比較するために各プライマーの濃度を0.2 μ M、 β -actinのTAMRAプローブ濃度と発現量を比較する遺伝子のFAMプローブの濃度比は1:2が適切だった。この条件でGAPDHでは蛍光強度比が最大3.8、 β -actinで最大3.7とGAPDHと β -actinがより近い値になった。CD95, IL-2, p65について相対蛍光強度比はそれぞれ最大3.4, 3.8, 2.3であり、発現量の違いを評価できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accurate measurement of fluorescent increase of each microchamber entrapping single cell was performed on the lab disc using fluorescent microscope before and after Hot cell-direct RT-PCR. In order to compare gene expression fluorescence increase of RT-PCR product of the gene was normalized by that of β -actin. It was optimized by setting the ratio of TAMRA probe for β -actin and FAM probe for the gene to 2 and concentration of primers were set to 0.2 μ M. Fluorescent ratio before to after PCR of GAPDH expression was largest at the concentration of FAM probe 0.4mM and TAMRA probe 0.8mM and the fluorescent ratio was 3.8, which was almost same as that of β -actin. As for CD95, IL-2 and p65, the largest fluorescent ratio was 3.4, 3.8 and 2.3 respectively. These results suggest that the gene expression difference in an individual cell can be evaluated by the proposed method.

研究分野：生体情報工学

キーワード：単一細胞 発現遺伝子 ラボディスク Hot cell-direct RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

細胞試料の分析をする際、細胞の存在を認識するには、一定数(通常、100万個程度)の細胞が必要である。これを解析する際、得られた細胞集団を全体として分析してしまうと、平均的な情報しか得られないが、単一に分離することで、個々の細胞の解析が可能となる。また、ほぼ同じ条件下に存在していた細胞集団であっても、異なる特性の細胞が混在している場合があることが報告されるようになっていた。

我々は迅速かつ簡単に細胞懸濁液中の細胞を単離するために、Compact Disc (CD)型の細胞単離用マイクロ流路ディスク(ラボディスク)の開発を行った。このディスク上では、細胞懸濁液を流路に注入し、30秒程度回転させるだけで、流路上のマイクロチャンバーに細胞を単離できるため、単離後の細胞を個別に解析できれば、単一細胞解析が容易にできるようになる。この細胞単離用マイクロ流路ディスクで細胞を単離後、個々の細胞の特徴を解析する方法として、細胞内で発現している遺伝子を単離したマイクロチャンバーから移動せずにその場で検出する方法として、Hot Cell-direct RT-PCRを考案した。この方法では単離する前に、細胞をRT-PCRの反応液に懸濁しておき、これを細胞とともにマイクロチャンバーに単離する。細胞単離後、加熱処理のみで細胞を溶解し、細胞内のm-RNAがRT-PCR反応液中に出る。ここで逆転写反応し、得られたc-DNAをPCRで増幅する。Taqmanプローブを用いて、この増幅産物を蛍光検出するという方法である。

すでに、われわれは、ヒト白血病T細胞株Jurkat Cellをラボディスクで単離後、この細胞中で発現しているGAPDH遺伝子を蛍光検出できることを報告していた。これにより、期待される細胞数に応じた、GAPDH発現が計測され、この方法で他の遺伝子の解析が行えるのではないかと考えられた。

一方、GAPDHの検出では各チャンバーの蛍光検出をイメージアナライザーで行ってきた。そのため、必ずしもそれぞれのチャンバーの蛍光強度を正確に測定できていないことが問題で、個々のチャンバーで計測される蛍光強度の違いが、細胞の特性の違いを反映しているとは言えない状況であった。

2. 研究の目的

そこで本研究計画では、単に、発現している遺伝子を検出するだけでなく、ラボディスクを用いて複数の遺伝子の発現を検出し、遺伝子による発現量の違いをハイスループッ

トに検出する方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

ラボディスクは直径10cmのシリコンウェハーにDEEP=RIEにより流路およびマイクロチャンバーを加工し、これを陽極接合により、注入口(inlet)と排出口(vent)を加工したガラスと張り合わせることで作製した。1枚の細胞単離ディスク上に24本の流路が放射状に設けられ、各流路に313個の半楕円状(幅300 μ m x 深さ200 μ m x 厚さ30-40 μ m)のマイクロチャンバーが等間隔に配置された。

この流路を疎水化処理したのち、細胞単離に使用した。

本研究では細胞としては、Jurkat Cellを培養して使用した。培養後、培地成分を遠心により洗浄し、200-1000 cells/mlの濃度になるように、RT-PCR用試薬と混合した。

RT-PCR用試薬中で、逆転写反応にはTth DNA polymeraseを使用した。この酵素は耐熱性があり、またMnイオン存在下で、逆転写活性を示すことが知られているからである。試薬中には、dNTP、それぞれの遺伝子に対応した、primerセットおよびTaqman probeが適宜含まれるように調製した。

この細胞懸濁液を1流路に1 μ l注入し、ラボディスクを3000-5000 rpmで30秒、spin coaterを用いて回転させて、細胞を単離したのち、inletとventを塞いで、RT-PCRを行った。

遺伝子による発現量の違いを検出するためには、より正確なPCR前後のマイクロチャンバーの蛍光強度測定を行う必要がある。このためRT-PCR前後の各チャンバーの観察および蛍光強度測定には、蛍光顕微鏡を使用した。蛍光顕微鏡では、プローブの蛍光標識物質であるFAMおよびTAMRAの蛍光を、蛍光画像から測定した。RT-PCR前の観察画像から、各チャンバーに細胞が単離されているか、また何個の細胞が1チャンバーに捕捉されているかを確認した。さらにRT-PCR前後の蛍光画像から蛍光強度を測定し、この前後での蛍光強度比を算出して、各チャンバーの測定結果とした。

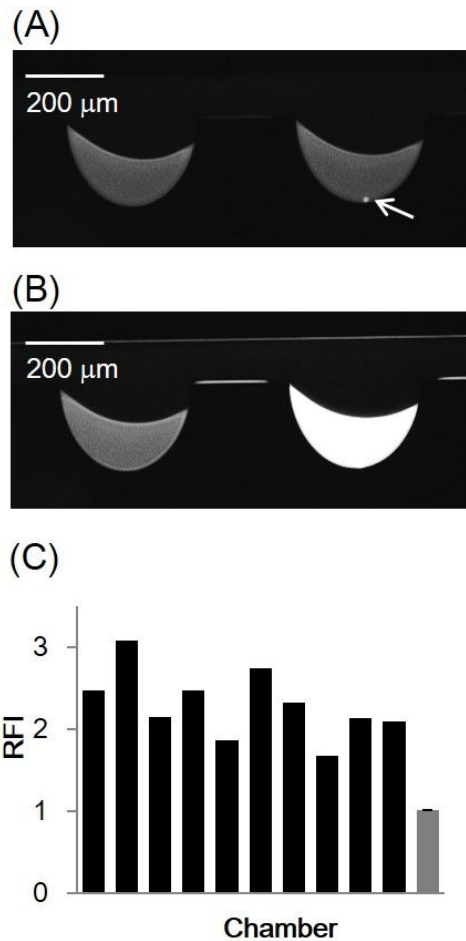
4. 研究成果

まず、蛍光顕微鏡での測定法を評価するために、比較として最初にラボディスク上のhot cell-direct RT-PCR後の蛍光強度を蛍光イメージアナライザーで測定した。RT-PCR前にマイクロチャンバーに分離された細胞の確認はイメージアナライザーではできない

が、RT-PCR 後には多くのチャンパーでは蛍光強度は増加しておらず、ほとんどのチャンパーでは蛍光強度比が 1.0 であったが、いくつかのチャンパーにおいて 1.2 程度の高い蛍光強度比を確認できた。イメージアナライザーでは解像度の低さから細胞を確認できないため、蛍光強度の増加したチャンパーで細胞が入っているとみなした。イメージアナライザーで測定した蛍光強度比において、1.2 以上を示したマイクロチャンパーで細胞が入っているとみなした。統計的に、蛍光強度が増加していたチャンパー数は以前の論文で示したポアソン分布による細胞の分離効率とほぼ一致した。次に、同じ条件で蛍光顕微鏡でもマイクロチャンパーの蛍光強度を測定した。蛍光顕微鏡では全てのマイクロチャンパーから細胞の入っているマイクロチャンパーを区別することが可能であった。その後サーマルサイクラーを用いて RT-PCR を行い、蛍光強度の検出を行った。その結果、単一細胞が確認されたマイクロチャンパーにおいて、高い蛍光強度比 (2.4 以上) を確認することが可能であった。

イメージアナライザーの場合、上述したように単一細胞の画像は確認できなかった。一方、蛍光顕微鏡では RT-PCR 前の画像において、単一細胞がチャンパーに捕捉されている様子を確認することができた。(図 1A) 細胞の直径は約 $10\ \mu\text{m}$ とチャンパーの大きさに比べて小さいが、の図 1A の右側のチャンパーに単離されていることが明確に確認された。この観察で、チャンパー中の細胞の有無ははっきりと確認できる。200 cells/ μL の Jurkat Cell を分離した場合、約 10% のマイクロチャンパーにおいて単一細胞分離が確認され、幾つかのチャンパーでは 2 個以上の細胞が確認された。この研究において、マイクロチャンパー中の細胞の個数を確認後、単一細胞の発現遺伝子を検出することが可能であった。図 1B は RT-PCR 後のマイクロチャンパーの蛍光画像であり、細胞の入っていないチャンパーではほとんど蛍光強度は増加していなかったが、単一細胞の入っているチャンパーでは明確な蛍光強度の増加が確認された。図 1C は細胞の有無での蛍光強度比(RFI)を示している。単一細胞が入った 10 個のマイクロチャンパー中での GAPDH の RFI は $1.7\sim 3.1$ (2.30 ± 0.41) であった。一方、細胞の入らなかったマイクロチャンパー (図 1C 灰色) では、ほとんど増加していなかった。また、細胞が 2 個入っていたマイクロチャンパーでの、40 サイクルの PCR 後には蛍光強度が飽和

していたため、RFI は $3.2\sim 3.6$ であった。同様の実験を β -actin でも行ったところ、単一細胞が入った 10 個のマイクロチャンパー中での β -actin の RFI は $1.2\sim 3.3$ (2.63 ± 0.70) であった。一方、細胞の入らなかったマイクロチャンパーでは、ほとんど増加していなかった。この結果は、個々の細胞において遺伝子の発現レベルは GAPDH や β -actin のようなハウスキーピング遺伝子でも異なっていることを示している。私たちの他にも、遺伝的に同一の細胞群においてこの細胞で遺伝子の発現量にばらつきがあると報告している研究者もいる。この遺伝子発現の揺らぎは、異なる細胞種や細胞周期によって起こっていると考えられている。それゆえ、我々の結果は、細胞周期の差によって起こっているも



のだと考えられる。

図 1 GAPDHに対するHot cell-direct RT-PCRの蛍光顕微鏡での測定

(A) Hot cell-direct RT-PCR前の蛍光画像
(B) Hot cell-direct RT-PCR後の蛍光画像
(C) 単一細胞が入ったチャンパーのRFI (黒色)と細胞が入っていないチャンパー10個の平均RFI (灰色)

イメージアナライザーと蛍光顕微鏡による測定について比較したところ、単一細胞が入っているマイクロチャンバーの蛍光強度比はイメージアナライザーによる測定では、細胞の無い場合に比べ1.25倍になっており、蛍光顕微鏡による測定では2倍以上になっていた。単一細胞の入っていたチャンバーでの蛍光強度比の標準偏差の増加は、イメージアナライザーでは確認できなかった。結果的に、各チャンバーの蛍光強度比の標準偏差は細胞の有無にかかわらず同程度であった。一方、蛍光顕微鏡での細胞の入っていないチャンバーの蛍光強度比の標準偏差は非常に小さく5%以下で、蛍光強度を正確に測定できていることが確認された。蛍光顕微鏡で測定した単一細胞の入ったマイクロチャンバーでの蛍光強度比はイメージアナライザーで測定した値よりも大きかった。従って、蛍光強度比が正確に RT-PCR 産物の量を反映していることがわかる。細胞の入っているチャンバーでの蛍光強度比の標準偏差の大きさは、細胞毎の遺伝子発現量の違いを示していると考えられる。以上の結果から、蛍光顕微鏡を使用して測定することによって、正確に RT-PCR に伴う蛍光強度変化の測定が可能であった。

理論的には、ハウスキーピング遺伝子と特異遺伝子を同時に発現遺伝子検出することによって、遺伝子定量は可能となると考えられた。そこでハウスキーピング遺伝子である *-actin* 発現遺伝子の検出には蛍光プローブとして、TAMRA プローブを用い、発現量の差異を検出するため、*-actin* 発現を基準とすることにした。個々の細胞の *-actin* 発現量と他の遺伝子の発現量を同時に検出できるようにするため、用いるプローブは異なる蛍光色素で標識し、複数の遺伝子を同時検出できるようにした。

-actin を基準として比較したところ、GAPDH では細胞ごとのばらつきは小さく、ハウスキーピング遺伝子ではない *ICD95* では差が大きいのことがわかり、この方法で発現量の差異を検出できることが示唆された。

そこで、Jurkat cell で発現しているハウスキーピング遺伝子 GAPDH と非ハウスキーピング遺伝子 (*CD95*, *IL-2*, *p65*) の発現量の違いを、*アクチン* 遺伝子で標準化したの比較を行った。発現量の指標である蛍光強度比のばらつきは、*アクチン* で標準化したのちには、相対標準偏差が GAPDH で 8%、非ハウスキーピング遺伝子では 20%

前後となり、非ハウスキーピング遺伝子での細胞ごとの発現量の違いが大きいのことが示された。

さらに *IL-2* の発現量を上昇させるといわれる phorbol myristate ester (PMA) を用いて、細胞毎の発現量の影響を評価した。PMA は終濃度 0.2 および 2 $\mu\text{g/ml}$ になるように細胞培養液に添加し、negative control として PMA を加えずに、2 時間培養した細胞を用いて *IL-2* の発現量を比較した。リアルタイム PCR での比較では、PMA による発現量の上昇が確認された。単一細胞を含むチャンバーについて比較したところ、PMA 非添加と 2 $\mu\text{g/ml}$ の添加については、蛍光強度比 2 倍を超える細胞も 1 つ存在していたが、PMA 非添加では蛍光強度比の範囲は 1.05-1.34、2 $\mu\text{g/ml}$ の添加では 0.93-1.38 と大きな差は見られなかった。0.2 $\mu\text{g/ml}$ の添加では 1.13-1.79 と蛍光強度比の差が見られた。

一方、これまでの研究で、TAMRA プローブを用いた β -actin の検出における細胞を含むチャンバーの蛍光強度が FAM に比べて低い結果が確認された。濃度条件について検討したところ、各プライマーの終濃度 0.2 μM 、FAM プローブの終濃度 0.2 μM 、TAMRA プローブの終濃度 0.4 μM の条件において、 β -actin の相対蛍光強度比の平均が増加していることが確認された。

さらに、疎水化処理後に細胞懸濁液を流して細胞単離をすると、流路入り口近くに細胞を含まないチャンバーの蛍光強度が増加する現象が見られた。この原因として RT-PCR の酵素試薬中に含まれる TritonX-100 が影響していると考えられ、0.2 units/ μl の酵素とともに 1.0 units/ μl の酵素および、この酵素液に含まれる量の TritonX-100 を添加した際の蛍光強度を比較した。細胞を含まないチャンバーにおいて蛍光強度比が 1.5 倍以上増加したチャンバーの数は、0.2 units/ μl で 21、1.0 units/ μl で 104 であるのに対して、TritonX-100 を追加した場合には 91 であった。この結果から TritonX-100 が原因の 1 つであることが示唆された。

酵素が無い場合の検証を行ったところ、細胞を含まないチャンバーにおいて蛍光強度が 1.5 倍以上増加したチャンバーの数は 20 であった。また、単一細胞を含むチャンバーについても相対蛍光強度比の増加しているチャンバーが複数ヶ所で確認された。

以上の結果から、マイクロ流体ディスク中の発現遺伝子検出には、さらに RT-PCR 試薬の条件検討が必要であることが示唆され

た。

発現量の比較を β -actin で標準化して比較するためには、各プライマーの濃度を 0.2 μ M、 β -actin の TAMRA プローブ濃度と発現量を比較する各遺伝子に対する FAM プローブの濃度比を 1 : 2 にするとよいことが確認されたため、FAM プローブ濃度を 0.2, 0.4 μ M TAMRA プローブ濃度 0.4, 0.8 μ M の条件でそれぞれの発現遺伝子について比較をした。GAPDH については FAM プローブ 0.2 μ M、TAMRA プローブ 0.4 μ M と比べて、FAM プローブ 0.4 μ M、TAMRA プローブ 0.8 μ M で蛍光強度比が最大 3.8 倍、 β -actin で最大 3.7 倍と GAPDH と β -actin の相対蛍光強度比がより近い値になることが示された。細胞を含まないチャンパーの相対蛍光強度比も GAPDH では多少ばらついているものの平均では 1 程度であった。CD95 については FAM プローブ 0.2 μ M、TAMRA プローブ 0.4 μ M で、それぞれの相対蛍光強度比は最大 3.4 倍であった。IL-2 については、相対蛍光強度比は最大 3.8 倍であった。FAM プローブ 0.4 μ M、TAMRA プローブ 0.8 μ M で最大 5.6 倍と相対蛍光強度比が濃度に依存して著しく増加していた。また、FAM プローブの濃度を濃くすると細胞を捕捉したチャンパーの相対蛍光強度比も著しく増加し、チャンパー毎に大きくばらついていることを確認した。P65 については、相対蛍光強度比は最大 2.3 倍であった。これらの結果から 0.4 μ M FAM プローブ、0.8 μ M TAMRA プローブの条件では一個以上の細胞が捕捉されたチャンパーの相対蛍光強度比を増加させることが可能であった。

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 7 件)

1. S. Furutani, H. Nagai , Y. Takamura , Y. Aoyama, I. Kubo, Detection of expressed gene in isolated single cells in microchambers by a novel hot cell-direct RTPCR method
Analyst, 137 (2012) 2951-2959 査読有
DOI:10.1039/c2an15866c
2. I. Kubo, N. Yokota, Y. Fuchiwaki and Y. Nakane, Characteristics of Molecularly Imprinted Polymer Thin Layer for Bisphenol A and Response of the MIP-Modified Sensor
ISRN Materials Science, 2012(2012) 6pages 査読有

doi:10.5402/2012/861643

3. T. Saito, S. Furutani, I. Kubo
Study on ELISA Condition to detect AFP Using Microfluidic Disc
Chemical Sensors, 29, Suppl. A, (2013) 141-143
査読無
4. I. Kubo, T. Eguchi, Y. Hoshino, M. Liu, H. Abe and Y. Ito, "Peroxidase Activity of G-Quadruplex Hemin-Binding DNA Aptamers Determined by Electrochemical Measurement.", *ECS Transactions*, 査読有, 50 (28) 1-7, doi: 10.1149/05028.0001, 2013
5. Y. Nakane and I. Kubo, "Fluorescence Sensing of the Interaction between Biomembranes with Different Lipid Composition and Endocrine Disrupting Chemicals.", 査読有, *Materials* 2014, 7, 170-179; doi:10.3390/ma7010170, 201
6. I. Kubo, T. Kanamatsu, S Furutani, "Microfluidic Devices for Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Its Application to Bisphenol A Sensing.", *Sensors and Materials*, 査読有, 26(8), 615-621, 2014
7. S. Furutani, N. Shozen, H. Nagai, Y. Aoyama, I. Kubo, "Development of a Detection System for Expressed Genes in Isolated Single Cells.", *Sensors and Materials*, 査読有, 26(8), 623-625, 2014

[学会発表] (26 件)

1. M. Kajiyama, S. Furutani, N. Shozen, H. Nagai, and I. Kubo, "Rapid detection of *Salmonella enterica* in chicken by PCR on a Compact disc (CD)-shaped microfluidic device", Bio4Apps2014 Conference, Shanghai (China), 2014. 11
2. Izumi Kubo, "Gene detection based on direct PCR of the gene in isolated single cells on a microfluidic device", EMN Summer Seminar, Cancun (Mexico), June, 2014
3. 鍛冶屋光俊, 古谷 俊介, 聖前 直樹, 永井秀典, 久保 いづみ, 「CD 型マイクロデバイス中での PCR 法による食品中のサルモネラ菌の迅速検出」, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山, 2014 年 9 月
4. 聖前 直樹, 古谷 俊介, 青山 由利, 久保 いづみ, 「マイクロ流体ディスクを用いて単離した Jurkat cell の発現遺伝子解析」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月
5. Izumi Kubo, Naoki Shozen, Mitsutoshi Kajiyama and Shunsuke Furutani, "Development of gene sensing system of isolated cells and its

application to the detection of food poisoning bacteria.”, International Meeting on Chemical Sensors (IMCS15), Buenos Aires, 2014.3.

6. Naoki Shozen, Shunsuke Furutani, Yuri Aoyama, and Izumi Kubo, “Detection of Expressed Genes in Single Jurkat Cells by Hot Cell-direct RT-PCR.”, The 10th Asian Conference on Chemical Sensors, Chiang Mai (Thailand), 2013.11

7. Izumi Kubo, Shunsuke Furutani, and Naoki Shozen, “Gene Detection and Sensing System in Isolated Single Cells on a Microfluidic Device.”, The 10th Asian Conference on Chemical Sensors, Chiang Mai (Thailand), 2013.11

8. Naoki Shozen, Shunsuke Furutani, Yuri Aoyama, and Izumi Kubo, “Analysis of gene expression using a microfluidic disc for single cell isolation”, Bio4Apps2013 Conference, Tokyo, 2013.10

9. Izumi Kubo, Naoki Shozen, Yuri Aoyama and, Shunsuke Furutani, “Hot Cell-Direct PCR of Isolated Single Cells on a Microfluidic Device for the Genomic Quantification.”, Bio4Apps2013 Conference, Tokyo, 2013.10

10. 聖前 直樹, 古谷 俊介, 青山 由利, 久保 いづみ, 「細離ディスクを用いた単一細胞の発現遺伝子の評価」, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013 年 9 月

11. Izumi Kubo, Shunsuke Furutani, Naoki Shozen, and Yuri Aoyama, “Detection system for expressed gene in isolated single cells on a microfluidic device.” International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2013 (ISMM 2013), Xiamen (China), 2013.5

12. 古谷 俊介, 聖前 直樹, 永井 秀典, 青山 由利, 久保 いづみ, 「細胞単離ディスク上での単一細胞発現遺伝子検出システムの開発」, 電気化学会第 80 回大会, 仙台, 2013 年 3 月

13. 聖前 直樹, 古谷 俊介, 青山 由利, 久保 いづみ, 「Hot cell-direct RT-PCR 法による単一細胞発現遺伝子検出法の検討」, 日本化学会第 93 春季年会, 京都, 2013 年 3 月

14. 聖前 直樹, 古谷 俊介, 青山 由利, 久保 いづみ, 「マイクロ流体ディスクを用いた Jurkat cell の単一細胞発現遺伝子の検出」, 日本化学会第 93 春季年会, 京都, 2013 年 3 月

15. Shunsuke Furutani, Naoki Shozen, Hidenori Nagai, Yuri Aoyama, and Izumi Kubo, “Development of the detection system for

expressed gene in isolated single cells on Compact Disk (CD)-shaped device.”, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo, 2012.11

16. Izumi Kubo, “Direct PCR of isolated single cells on a microfluidic device for the Genomic quantification”, Genomic research Asia 2012, Daejeon (Korea), 2012.11

17. Izumi Kubo, Yoichiro Hoshino, Mingzhe Liu, Hiroshi Abe, and Yoshihiro Ito, “Peroxidase Activity of G-Quadruplex hemin-binding DNA Aptamers determined by electrochemical measurement.”, PRiME 2012, Honolulu (U.S.A.), 2012.10

18. 久保 いづみ, 古谷 俊介, 永井 秀典, 青山 由利, 「Hot Cell-Direct RT-PCR による単一分離細胞の発現遺伝子検出システムの開発」, 分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月

19. 古谷 俊介, 永井 秀典, 青山 由利, 久保 いづみ, 「CD 型細胞単離デバイス上での単一細胞発現遺伝子検出システムの開発」, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 北海道, 2012 年 9 月
他 7 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 「薄膜の評価技術ハンドブック」, 自己組織化膜, 久保 いづみ (分担執筆), テクノシステム, 648 頁, 2013 年

2. 「先端医療に関する医療ニーズ」 診断用バイオチップの開発動向, 久保 いづみ (分担執筆), 技術情報協会, 515 頁, 2012 年

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 いづみ (KUBO IZUMI)

創価大学・工学部・教授

研究者番号: 40214986

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し