

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560384

研究課題名(和文) 光吸収層を持つ新規圧電体の開発とレーザー誘起衝撃波・電界パルスによる遺伝子導入

研究課題名(英文) Development of novel piezoelectric materials with optical absorber and its application to gene transfer by combination of laser induced shock wave and pulsed electric field

研究代表者

會澤 康治 (Aizawa, Koji)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号：40222450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー誘起衝撃波(LISW)は光吸収材中を超音速で伝搬する衝撃波である。我々は、この衝撃波から圧電効果により高パルス電界を発生させる素子構造を提案した。この電界パルスは遺伝子導入においてエレクトロポレーションのような効果を与える。本研究ではLISWによる電界パルスの発生条件を明らかにした。また厚さ0.05mmの黒色ターゲットを用いた閉じ込め構造において0.4 J/cm<sup>2</sup>程度の低いレーザーフルエンスでも衝撃波が発生することを実験的に示した。さらに薄膜黒色ゴムターゲット(厚0.07mm)による衝撃波を用いて細胞種ごとの導入効率を実験的に検証し、導入効率の向上が期待できるレーザー照射条件を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Laser induced shock wave (LISW) is used for gene transfer into cells. LISW is a shock wave because its propagation velocity is higher than the sound speed. A proposed device structure can generate high pulsed electric field due to piezoelectricity when LISW propagates in this structure. We consider that this pulsed electric field is also effective on gene transfection. In this study, we clarified the experimental conditions of pulsed electric field generation by LISW irradiation, and experimentally showed the shock wave formation in the confined structure using 0.05 mm-thick black rubber target even when the laser fluence is as low as 0.4 J/cm<sup>2</sup>. We also investigated the transfection efficiency of FITC dextran to several cell species when an LISW generated by thin black rubber target (0.07 mm in thickness) was irradiated to their cells, and clarified the experimental conditions in order to improve the transfection efficiency.

研究分野：固体電子工学

キーワード：圧電体 レーザ 衝撃波 電界 遺伝子導入

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療への期待とともに、細胞内への遺伝子導入法の研究は従来にも増して重要視されている。遺伝子導入法には、ウイルスベクター法で代表される生物的的手法とエレクトロポレーションや超音波穿孔法（ソノポレーション）といった物理的手法があるが、臨床応用上重要な高い導入効率と導入細胞の安全性を両立する導入法は未だ確立されていない。

エレクトロポレーションとは、細胞にパルス上の外部高電圧を印加し、細胞膜の電気的な破壊によって小孔を形成し、拡散あるいは電界効果により遺伝子を細胞内に導入する手法であり、細胞膜に形成された小孔は導入後自己修復する。この方法は、パルスパターンや電圧値、電圧印加時間などを制御することで 90% 以上の高い導入効率を実現できるが、導入効率を高くするほど修復不能な損傷を生じる細胞数も増加し細胞の生存率が減少する問題を持っている[1]。

物理的遺伝子導入法の中でレーザー誘起衝撃波法はあらゆる細胞に遺伝子を導入可能といった物理的遺伝子導入法の利点の他に標的細胞に効率よく同時に遺伝子を導入できる「空間特異性に優れる」特徴を持っている[2,3]。しかし、細胞膜に対する力学的作用と遺伝子導入のメカニズムには未解明な部分が多く、導入効率も数%程度とまだ低い。

我々は、透明カバー層と黒色ゴムからなるレーザー誘起衝撃波素子を作製し、Nd:YAG レーザの第二次高調波（波長 532nm）のナノ秒高強度パルス光をレンズで集光し透明カバー層から黒色ゴムに照射して発生させた衝撃波（インパルス）を用いることで、衝撃力と細胞生存率との間には相関関係があること明らかにしている[4]。しかし、類似研究の結果も踏まえると従来素子では導入効率の改善には限界がある。

### 2. 研究の目的

この問題の解決には、図 1 に示すようなレーザー誘起衝撃波と電界パルスが同期して発生する「レーザー誘起衝撃波・電界パルス発生素子」が有効であると我々は考えた。提案するレーザー誘起衝撃波・電界パルス発生素子は、レーザー光を吸収し衝撃波を発生させる「光吸収層」と衝撃波による応力から圧電効果により高電界パルスを生じさせる「圧電体」を一体化した材料を用いる。本研究では、提案する素子に適した材料を開発するため、まずレーザー照射によって発生する衝撃波と電界パルスの生成条件や効率よく衝撃波を発生できる光吸収材の構造パラメータを明らかにする。

高い細胞生存率と高い遺伝子導入効率の実現は臨床応用上重要である。本研究では、細胞の種類（接着細胞や浮遊細胞）ごとの細胞生存率と導入効率を実験的に検証し、電界パルスの効果を検証する上での基礎データとなるレーザー照射条件等を明らかにする。

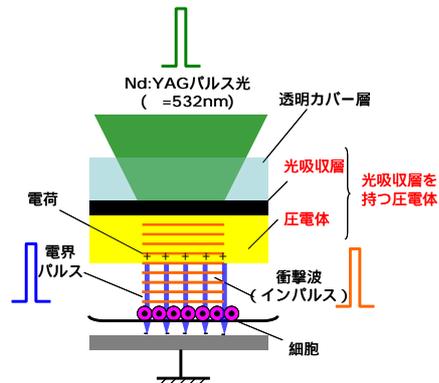


図 1 レーザ誘起衝撃波・電界パルス発生素子の概念図

### 3. 研究の方法

本研究では、提案する「レーザー誘起衝撃波・電界パルス発生素子」の基礎特性を評価する。また接着細胞や浮遊細胞などに対する細胞生存率や導入効率を評価する。具体的には、圧電体と光吸収材（ターゲット）との組み合わせとレーザー誘起衝撃波(laser induced shock wave: LISW)および電界パルスの測定を通して「光吸収層を持つ圧電体」に要求される条件を把握する。また LISW による高い導入効率を実現できる素子構造や実験条件を調べる。

実験の測定系を図 2 に示す。実験ではランブ励起 Q スイッチ Nd:YAG 光源 (Spectra Physics, LAB130, 最大パルスエネルギー: 0.2 J/pulse @ 10Hz) から出力される第 2 次高調波の単一パルス (波長 532nm, パルス幅 10ns) を照射する。レーザー光源からのパルス光は、ターゲット上で所望のレーザーフルエンスとなるように枠付吸収型固定式 ND フィルタ (シグマ光機, MAN 型) や本研究費で購入したバリアブルアッテネータ (日本オプテル, VAR532) を用いて減衰してから、レンズ (焦点距離 200mm) によってターゲット上に集光する。なおレンズとターゲット間距離は 140mm である。ターゲット上でのレーザーフルエンスは、ターゲット上と同じ位置に置いたレーザーパワーメータ (Newport, 842-PE) で測定したレーザーエネルギーから、ND フィルタの透過率とターゲット照射後のレーザー面積 (直径約 2.3mm) より算出する。光吸収材にあたり発生した LISW ポリフッ化ビニリデン (PVDF, 厚さ 200 μm) トランスデューサ (Measurement Specialties 製銀電極付きピエゾフィルム, 厚さ約 0.11mm) で電圧信号に変換し、レーザー光の制御電源から出力されるトリガ信号に同期して検出する。PVDF トランスデューサからの電圧信号は帯域幅 1.5GHz のデジタルオシロスコープ (LeCroy, LC684DXL) で測定し、GPIB ケーブルを介して PC に転送し保存する。

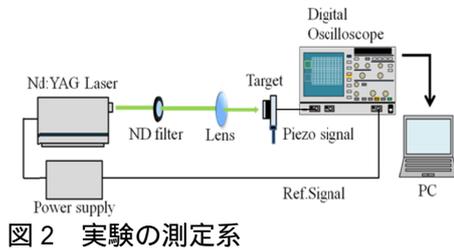


図2 実験の測定系

#### 4. 研究成果

##### 4.1 LISW と電界パルス発生

##### 4.1.1 高分子強誘電体を用いた素子構造

LISW の圧力を高分子強誘電体(KUREHA, KF ピエゾフィルム)に加え, 圧電効果によってパルス電界を発生させる. 図3は高分子強誘電体と光吸収材を用いた素子構造図である. 「従来の応力波素子構造」はターゲットを指す.

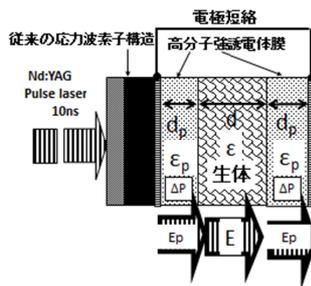


図3 高分子強誘電体とターゲットを用いた素子構造

図3に示す構造で厚さ  $d_p$ , 比誘電率  $\epsilon_p$  の高分子強誘電体に生じる分極を  $\Delta P$  と置き, 電極間を短絡させた場合の電束密度  $\Delta D$  は(4-1)式になる. ここで厚さ  $d$  の生体に印加される電界を  $E$ , 生体の比誘電率を  $\epsilon$  とする.

$$\Delta D = \epsilon_p \epsilon_0 E_p + \Delta P = \epsilon \epsilon_0 E \quad \dots\dots(4-1)$$

ここで  $\epsilon_0$  は真空の誘電率である. 素子構造中の電極間を短絡すると電位差がゼロになる.

$$2E_p d_p + E d = 0 \quad \dots\dots(4-2)$$

これらから電界  $E$  は(4-3)式のように与えられる.

$$E = \frac{2\Delta P}{(2\epsilon + \frac{d}{d_p}\epsilon_p)\epsilon_0} \quad \dots\dots(4-3)$$

我々の測定において KF ピエゾフィルムの比誘電率は周波数 1kHz において  $14 \pm 1$  であった. これを(4-3)式に代入して得られる電界  $E$  は最大で 3.0MV/m であり, 同程度の電界が生体に印加できると予測される. この電界強度は他の研究機関においてナノ秒パルスを用いるエレクトロレーションで報告されている値 (5.3 ~ 12.5MV/m) よりはるかに大きい

[5-7].

##### 4.1.2 パルス電界の測定

実験に使用した素子構造を図4に示す. 電極(1)と電極(2)の間の電圧波形をデジタルオシロスコープで測定する. また電極(3)と(4)間の接続を Short か Open とする. なおこの実験系では生体のかわり(疑似生体)にポリエチレンテレフタレート(PET)板(アクリサンデー, PG-1 型, 厚さ 1mm)を用いた. 実験では電極の接続 (Short と Open) の違いで得られる波形を観察し, 発生するパルス電界を得る.

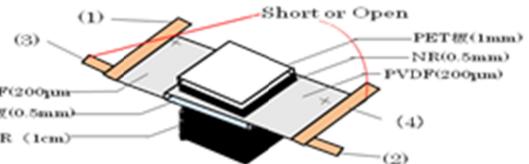


図4 測定に使用した素子構造

##### 4.1.3 パルス電界の測定結果

図5は Short 接続した時の素子構造 (PVDF:200  $\mu$ m) で得られた acoustic signature, 図6は Open 接続した時の素子構造 (PVDF:200  $\mu$ m) で得られた acoustic signature の一例を示す. 図7では約 30 V と約 40V の2つの電圧ピークが見られた. この場合の PET シートに印加される電界強度は最大で 84 kV/m であった. また Open 接続の場合, short 接続よりも低い 17 V ほどの電圧が発生した. この場合, 理論上, パルス電界は  $E=0$  になるはずであるが, これは構造内部の蓄積電荷が原因と考えている.

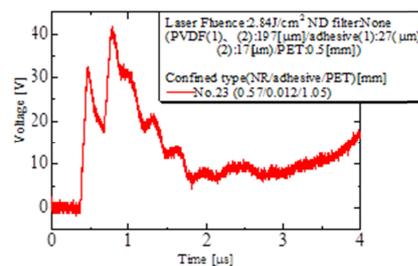


図5 Short 接続した時の acoustic signature

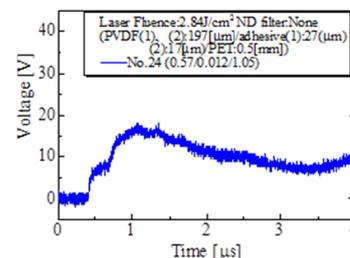


図6 Open 接続した時の acoustic signature

#### 4.2 薄膜ターゲットによる LISW

##### 4.2.1 ターゲット構造

LISW は透明高分子膜とターゲット間の厚さ 20 $\mu\text{m}$  程度の接着層内においてパルスレーザー光と断熱的表面光吸収材との非線形相互作用により発生する超音速の衝撃波パルスであり、我々は、閉じ込め構造において発生する LISW が音速を超えてターゲット中を伝搬することを実験的に確かめている[8, 9]。しかし LISW の強度はターゲットを伝搬中に急激に減衰することもわかっている[10]。減衰が少ない薄膜黒色ゴムを用いた閉じ込め構造は波動エネルギーを効率よく細胞に作用させる上で有効であると考えている。

ターゲットには、スライス加工により作製された厚さ約 0.05mm の黒色エチレン・プロピレン(EPDM)ゴム(ダイコーゴム)を用いた。作製したターゲットは 10mm 角に切断した EPDM ゴムに厚さ約 1mm の透明な PET 板(アクリサンデー, PG-1 型)をエポキシ樹脂接着剤(セメダイン, ハイスーパー5)で貼り合わせた confined ターゲットである。実験に用いた EPDM ゴム厚, PET 厚および接着層厚の測定結果を表 1 に示す。なお実験では比較のために厚さが約 0.5mm の黒色天然ゴム(NR, ベストサウンドラボ, NR-3 型)を用いた従来型のターゲットも使用した。

表 1 ターゲットに用いた各材料の厚さ

材料	厚さ
PET	1.048 $\pm$ 0.001 mm
接着層	16 ~ 32 $\mu\text{m}$ (平均: 25 $\mu\text{m}$ )
EPDM	0.052 $\pm$ 0.001 mm

#### 4.2.2 confined ターゲットの実験結果

EPDM ゴムと NR ゴムを用いた confined ターゲットにおける LISW の acoustic signature (レーザーフルエンスが 3.7 J/cm<sup>2</sup>) を図 7 に示す。図中で見られる波形の dip (矢印) はトランスシューサ境界と接着層境界間での反射パルスと考えられる。

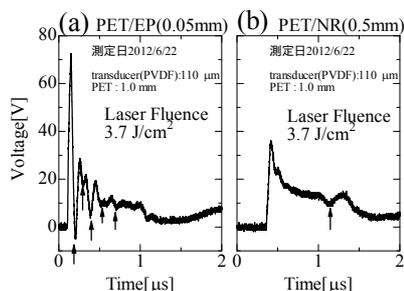


図 7 (a) EPDM(0.05mm) および (b) NR(0.5mm)を用いた confined ターゲットの acoustic signature (サンプリング間隔は 0.5ns)

これらの結果から、薄膜化によって従来構造よりも 2 倍近く高いピーク強度の LISW がターゲット裏面で得られることがわかった。一方でゴム厚が 10 倍異なるにも係わらずプラスト波の持続時間はおよそ 1 $\mu\text{s}$  と変わらなかった。

EPDM ゴムを用いたターゲットにおけるピ

ーク強度のレーザーフルエンス依存性を図 8 に示す。この結果から、ピーク電圧は 0.4J/cm<sup>2</sup> という低いレーザーフルエンスからでもレーザーフルエンスの 0.7 乗に比例して増加した。

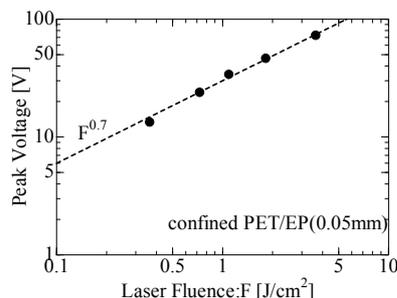


図 8 EPDM(0.05mm)を用いた confined ターゲットの acoustic signature におけるピーク強度のレーザーフルエンス依存性

EPDM(0.05mm)を用いた confined ターゲットの acoustic signature からレーザーフルエンスごとに算出した最大値(ピーク電圧)やピーク電圧の 10~90%に至るまでにかかる時間(立ち上がり時間), 波形の半値全幅(FWHM), および波形の時間積分値などの波形パラメータを表 2 に示す。

表 2 EPDM(0.05mm)を用いた confined ターゲットにおける波形パラメータ

Laser fluence [J/cm <sup>2</sup> ]	Peak voltage [V]	Rise time [ns]	FWHM M [ns]	積分値 $\zeta$ [ $\mu\text{Vs}$ ]
3.7	73	33	50	3.5
1.8	46	32	52	2.4
1.1	34	34	54	1.7
0.73	24	33	59	1.3
0.37	13	34	57	0.71

積分値:  $\zeta = \int_{t_1}^{t_2} V(t)dt$ , 積分範囲:

$t_2 - t_1 = 1\mu\text{s}$ ,  $t_1$  は波形が立ち上がる時間 (rising-edge) とした。

これらの結果から以下のことが分かった。

- 1) 厚さ 0.5mm の NR ゴムを用いた confined ターゲットの結果と同じく立ち上がり時間はレーザーフルエンスにあまり依存しないが, 立ち上がり時間は厚さ 0.5mm の NR ゴムを用いた confined ターゲットの結果と比べて最大で 10ns 程度速い。
- 2) FWHM はレーザーフルエンスの増加に対してやや減少し, 厚さ 0.5mm の NR ゴムを用いた confined ターゲットの結果(およそ 150ns)と比べて狭い(およそ 1/3)。
- 3) インパルス運動量(力積)の目安となる波形の時間積分値 $\zeta$ はレーザーフルエンス

に依存するが、厚さ 0.5mm の NR ゴムを用いた confined ターゲットの結果(およそ  $8 \mu\text{Vs}@1.4 \text{ J}/\text{cm}^2$ )と比べて小さい(およそ  $2.4 \mu\text{Vs}@1.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ )。

今回、厚さ 0.05mm の黒色ゴムターゲットを用いた Confined ターゲットでは、ターゲット表面付近のプラズマが接着層内に閉じ込められるため、 $0.4 \text{ J}/\text{cm}^2$  程度の低いレーザーフルエンスからでもプラズマ膨張による LISW が発生することがわかった。

#### 4.3 LISW による異なる細胞種の導入効率

遺伝子導入効率は、細胞の大きさ、細胞膜の強さ、接着タンパク質の存在等により細胞種ごとに大きく異なることが知られている。そこで LIESW による物質導入の導入効率を接着細胞：2 種と浮遊細胞：2 種を用いて評価した。

##### 4.3.1 実験方法

本実験に用いた細胞は、ヒト子宮頸がん由来の HeLa (JCRB9004)、アフリカミドリザル腎臓上皮由来の Vero (JCRB0111)、急性骨髄性白血病由来の HL60 (RCB0041)、ヒト B リンパ球由来の Ramos (JCRB9119) の 4 種類である。細胞はガラスベースディッシュ(IWAKI, 3961-035)で培養し、HeLa, Vero は接着状態で、HL60 と Ramos は浮遊状態で LIESW 処理を行った。図 9 にそれぞれの細胞を示す。外来導入物質は 4 kDa の FITC-dextran(終濃度  $100 \mu\text{M}$ )を用いた。LIESW 処理直後に蛍光顕微鏡(Nicon, ECLIPSE,80i)、フィルター Green Excite (494 nm)を用いて細胞を観察した。FITC 導入効率は、ガラスベースディッシュの培養領域をランダムに 10 画像(1 画像： $15 \times 11 \text{ pixel}$ )撮影し、10 画像の全細胞数に対する蛍光細胞数を陽性細胞率とした。なお、実験はすべて triplicate で行った。

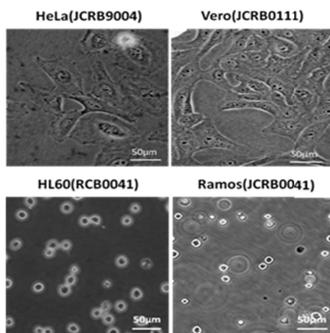


図 9 実験に用いた細胞

##### 4.3.2 レーザ照射条件

本実験では Nd:YAG レーザの第二次高調波の 532nm を用いた。固体素子は光吸収材に EPDM(エチレンプロピレンゴム：0.07mm)、透明材料に PET(ポリエチレンテレフタレート：

1.0mm)を用い、培養器の底面に貼り付けてレーザーを照射した(図 10)。

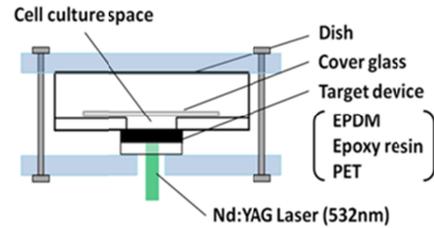


図 10 レーザ照射部位

##### 4.3.3 結果

全ての細胞種で LIESW により FITC-dextran の導入がみられたが、接着細胞の導入効率が HeLa： $av \pm SD$  ( $23.1 \pm 2.5 \%$ )、Vero： $av \pm SD$  ( $25.0 \pm 4.0 \%$ )であるのに対して、浮遊細胞の導入効率は HL60： $av \pm SD$  ( $2.3 \pm 1.0 \%$ )、Ramos： $av \pm SD$  ( $7.1 \pm 0.5 \%$ )であった。浮遊細胞の導入効率が接着細胞と比べて著しく低い(図 11)。接着と浮遊の状態によってそれぞれの細胞が受ける LIESW の物理的作用が異なると考えられ、接着細胞に加わる LIESW の物理的作用は、衝撃波によって加わる圧力だけでなく、衝撃波により引き起こされる水流によるせん断応力等が接着細胞の接着面に加わり、導入効率を高くしていると考えられる。

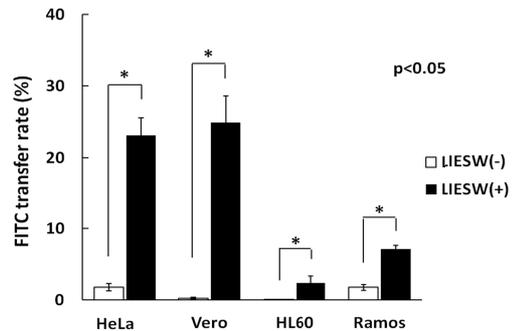


図 11 FITC 導入効率

#### <参考文献>

- [1] J. C. Weaver et al., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **41**, pp. 135-160 (1996).
- [2] A. G. Doukas et al., *Ultrasound Med. Biol.*, **22**, pp. 151-164 (1996).
- [3] M. Terakawa et al., *Opt. Lett.*, **29**, pp. 1227-1229 (2004).
- [4] 北村祐士 他, 平成 23 年度電気関係学会北陸支部連合大会, G-19, (2011).
- [5] K. H. Schoenbach et al., *J. Bioelectromagnetics*, **2**, p. 440 (2001).
- [6] N. Chen et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **317**, p. 421 (2004).
- [7] J. Zhang et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **471**, p. 240 (2008).
- [8] Y. Tokunaga et al., *IEICE Technical Report, US2012-68*, pp. 23-28 (2012-10) [in Japanese].

- [9] K. Aizawa et al., *Proc. Symp. Ultrason. Electron.* **33**, 1P1-7, pp. 31-32 (2012-11).  
 [10] S. Yoshida et al., *IEICE Technical Report, US2012-15*, pp. 11-16 (2012-6) [in Japanese].

#### 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5件)

- [1] Koji Aizawa and Yoshiaki Tokunaga, “Pressure and pressure gradient of laser-induced emergent stress waves using 0.07-mm-thick black rubber target”, 査読有, *Acoust. Sci. & Tech.*, **36**(2), pp. 155-157 (2015).  
 [2] Yoshiaki Tokunaga, Motoaki Nishiwaki, Masatoshi Yoshimura, and Koji Aizawa, “Simple and effective method of using low-cost substrate for estimation of thermal diffusivity of transparent polymer film”, 査読有, *Acoust. Sci. & Tech.*, **33**(2), pp.109-110 (2012).

〔学会発表〕(計37件)

- [1] 小木美恵子, 柳澤隆康, 會澤康治, “細胞の状態によるレーザー誘起創発的応力波を用いた遺伝子導入の効果”, 信学技報, US2014-59, pp.7-10 (2014.11.13, 金沢工大)  
 [2] 小木美恵子, 柳澤隆康, 西村駿, 杉山尚玖, 杉本貴弘, 會澤康治, 得永嘉昭, “細胞種を問わないLIESW(レーザー誘起創発的応力波)による遺伝子導入の開発”, 第13回日本再生医療学会総会 プログラム・抄録, 再生医療 増刊号, vol. 13 suppl. no.P-2-193, p.358 (2014.3.5, 国立京都国際会館)  
 [3] 會澤康治, 富永惇司, 折坂駿介, 小木美恵子, 得永嘉昭, “レーザー誘起創発的応力波の伝搬に関する実験的検討とヒト培養細胞に与える影響”, 信学技報, US2013-54, pp.5-10 (2013.11.11, 金沢工大)  
 [4] 小木美恵子, 杉山尚玖, 柳澤隆康, 西村駿, 會澤康治, 得永嘉昭, “浮遊細胞におけるレーザー誘起創発的応力波による遺伝子導入の実験的検討”, 信学技報, US2013-55, pp.11-14 (2013.11.11, 金沢工大)  
 [5] 會澤康治, 富永惇司, 得永嘉昭, “薄いレーザーターゲットで創発された水中インパルス超音波”第74回応用物理学会秋季学術講演会 講演予稿集(CD-ROM), 17a-P8-3, p. 01-116 (2013.9.17 同志社大)  
 [6] 會澤康治, 富永惇司, 得永嘉昭, “レーザー誘起応力波で創発された水中インパルス超音波の特性評価”第60回応用物理学会春季学術講演会, 28p-B5-11

(2013.3.28 神奈川工科大)

- [7] 小木美恵子, 竹内光恵, 會澤康治, 得永嘉昭, “レーザー誘起応力波を用いた遺伝子導入およびDDSへの開発”第12回日本再生医療学会総会 プログラム・抄録, 再生医療 増刊号, vol. 12 suppl. M-5-3, p.303 (2013.3.22, 横浜)  
 [8] 會澤康治, 吉田翔一, 牧野友哉, 得永嘉昭, “閉じ込め構造中において高強度ナノ秒レーザーパルス照射で発生するレーザー誘起創発的応力波の伝搬”, 第33回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム(Proc. Symp. Ultrason. Electron. Vol.33), 1P1-7, pp. 31-32 (2012.11.13, 千葉大)  
 [9] 小木美恵子, 會澤康治, 西村駿, 竹内光恵, 西脇基晃, 得永嘉昭, “レーザー誘起応力波による遺伝子導入の最適条件”, 第33回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム(Proc. Symp. Ultrason. Electron. Vol.33), 1P5-4, pp. 99-100 (2012.11.13, 千葉大)  
 [10] 會澤康治, 中善弘, 富永惇司, 得永嘉昭, “レーザーと複合構造基板との相互作用によるパルス応力波の創発—薄膜黒色ターゲットを用いた閉じ込め構造の検討—”, 信学技報, US2012-67, pp.17-21 (2012.10.22, 金沢工大)  
 [11] 會澤康治, 吉田翔一, 牧野友哉, 得永嘉昭, “ナノ秒高強度パルスレーザー光を用いた創発的応力波の研究”, 信学技報, US2012-15, pp.11-16 (2012.6.21, 東大生研)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kitnet10.kanazawa-it.ac.jp/researcherdb/researcher/RAFABJ.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

會澤康治 (AIZAWA, Koji)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号: 40222450

(2)研究分担者

小木美恵子 (KOGI, Mieko)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号: 50410288

(3)連携研究者

得永嘉昭 (TOKUNAGA, Yoshiaki)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号: 00072174