

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32657

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660257

研究課題名(和文) マウス受精卵に対する人工染色体ベクター組換えDNAの新しい導入法に関する研究

研究課題名(英文) Study on new methods of transferring large transgenes recombined with artificial chromosome vector into murine zygotes

研究代表者

宮脇 富士夫 (Miyawaki, Fujio)

東京電機大学・理工学部・教授

研究者番号：50174222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：2つの新しい遺伝子導入法のうち、前核間細胞質マイクロインジェクション法(IPCM；2個の前核の間の狭い細胞質に遺伝子を注入する方法であり、致命的な核引きの無い利点がある)は良好な結果が出た。300 kbのBAC DNAを4段階の濃度(2、5、7.5、10 ng/uL)に調整し、総計1,914個のマウス受精卵でIPCMを試した。レポーター遺伝子発現胚盤胞の総処理卵数に対する比率は2と5 ng/uL群も比較的良好であったが、それらよりも7.5と10 ng/uL群は有意に高いばかりでなく、それぞれ35.8%と39.9%と高い値を示し、IPCMは高い遺伝子改変効率が期待できる有用な導入法と結論した。

研究成果の概要(英文)：Out of two new gene-transferring methods, Inter-pronuclear Cytoplasmic Microinjection (IPCM) showed good results. IPCM delivers a solution containing a high concentration of large transgene into a narrow space between two pronuclei and thereby never causes such a fatal event that a micropipette pulls out pronuclear components. We made solutions of 300-kb BAC DNA with tdTomato at 4 concentrations of 2, 5, 7.5 and 10 ng/uL, and tested their respective effects in 1,914 murine zygotes. The rates of embryos developing to the blastocyst stage were 79.7 (392/492), 64.3 (261/406), 72.9 (291/399) and 54.0% (333/617) as the concentration increased, but the 7.5- and 10-ng/uL groups not only showed significantly better rates of blastocysts expressing tdTomato than the others, but also attained the rates as high as 35.8 (143/399) and 39.9% (246/617), respectively. These results suggest that IPCM is a promising gene transfer that can be expected to achieve a high efficiency of genetic modification.

研究分野：医用工学

キーワード：バイオテクノロジー 前核間細胞質マイクロインジェクション 遺伝子 人工染色体ベクター 高濃度
生存率 発現率 振動型マイクロインジェクション法

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome: BAC) などの人工染色体ベクターは搭載できる遺伝子サイズが大きいため、複数の遺伝子群をあたかも1つのカセットのように搭載できる利点がある。したがって、単一の遺伝子の改変ではなく遺伝子群の改変が可能になるため、その有用性は高い。

しかし、期待されるほど普及しているとは言いがたい。まず、分子サイズが大きい (分子鎖が長い) ため、切断されやすい欠点があるばかりでなく、前核マイクロインジェクションでなければ効率的な遺伝子導入が達成できないとされている。また、この場合でも、プラスミドベクターなどで使用される通常の濃度 (2 ng/μL) では粘稠度が高くなるため、0.5 ng/μL という低濃度の使用が推奨されており、注入分子数が減少せざるを得ず、遺伝子改変効率が危惧される。さらに、前核内に導入遺伝子溶液を注入し終えてマイクロピペット (インジェクション針) を抜去する際に前核内の RNA や DNA を引きずり出す (核引き) 頻度は分子サイズの小さい導入遺伝子の場合よりもはるかに高い (未発表データ)。以上、人工染色体ベクターによる遺伝子導入にはまだ解決すべき問題がある。

(2) 振動型マイクロインジェクション・システム (Vibratory Microinjection System: VMS)

研究代表者らが開発した振動型マイクロインジェクション・システム (図1) はマイクロピペットに縦振動を加えつつ細胞に刺入し遺伝子を注入する遺伝子導入システムである。振動子に付与する振動数は 1 Hz~100 kHz の中から任意の振動数を選択でき、振動子に付加する電圧によって縦振動の振幅が微調整できる。第二世代の VMS は通常は無振動のマイクロインジェクションよりも細胞膜や前核膜を容易に貫くことができ^①、核引き頻度も低い^②特長があり、これらの特長には統計学的な有意差が認められている。

第三世代である現在の VMS の振動子は人

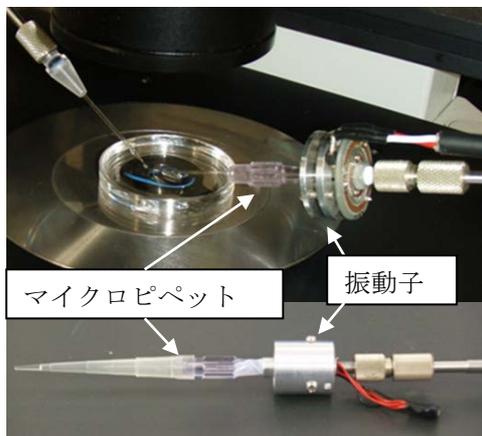


図1 マイクロピペットに装着した振動子
上: 第二世代振動子、下: 第三世代振動子

工染色体ベクター組換え DNA 注入用に設計しており、先端内径 0.2~0.7 μm のマイクロピペット (Femtotip®, Eppendorf) の先端を折らずとも、300 kb 以上の BAC DNA を 5 ng/μL 以上の高濃度にも拘わらず、インジェクション圧ゼロで前核はもとより、注入がより困難な細胞質にも注入できる特長がある。

しかし、このように有用性の高い VMS でも、人工染色体ベクター組換え DNA を前核内に注入する際の核引き頻度は比較的高く、受精卵を死に至らしめる割合は低い。

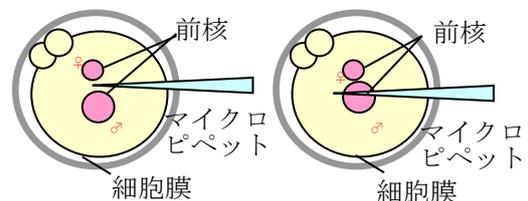
2. 研究の目的

以上から、2つの新しい遺伝子導入法を考案した。一方は核引きの可能性が無く、他方は少ないと考えられ、これらの有効性および有用性を検討することが研究目的である。

3. 研究の方法

(1) 新しい遺伝子導入法

①前核間細胞質マイクロインジェクション法 (Inter-pronuclear Cytoplasmic Microinjection: IPCM) は受精卵の2つの前核が接近した時点で、前核間の狭い細胞質に高濃度の DNA 溶液を多量に注入する方法 (図2a) であり、まず核引きを起こさない利点がある。さらに、単なる細胞質マイクロインジェクションとは異なり、前核融合時には前核膜が消失するため、その近傍に高濃度多量に注入された BAC DNA は融合後の細胞核に取り込まれ易い利点があるのではないかと考えて、本法を考案した。



(a) IPCM (b) CPSM
図2 2つの新しい遺伝子導入法

②細胞質・前核順次マイクロインジェクション法 (Cytoplasmic and Pronuclear Sequential Microinjection: CPSM) は前核を串刺しにし後方の細胞質に注入しつつ、ピペット抜去の際に前核にも注入する方法 (図2b) で、前核膜後方に開けた大きな孔によって DNA の前核内注入に伴う内圧上昇をできるだけ減少させる方法である。これにより、核引きの頻度を減少できるのではないかと考えて考案した。

(2) 実験方法

①実験計画の変更

研究申請段階では無作為管理下実験になるように実験計画を立てたが、実際に何度か行ってみると、その実験計画は良くないことが判明した。すなわち、当初想定した実験方法では、2種類の新しい遺伝子導入法と従来

からの前核マイクロインジェクション法を無作為管理下で比較するために、同じマイクロピペットで3種類のインジェクション法を行う計画であった。マイクロピペット先端径の個体差を重視した訳であったが、さらに先端径の誤差の少ない Femtotip® (Eppendorf) を使用することで無作為管理下実験が成立するものと思っていた。しかし、何度かの予備実験を行った結果、同一マイクロピペットで3種類の導入法を行うことは互いに影響し合う結果になり、各導入法の効果を独立に判定できないことが判明した。すなわち、CPSM あるいは通常の前核マイクロインジェクションを行うと、核引きが避けられず、ピペット先端の汚れやゴミの付着が次の IPCM の結果に影響する。特に IPCM は核引きを避けるために考案した遺伝子導入法であるため、核引きによるピペット先端の汚れが IPCM の結果に影響を及ぼすことは研究の趣旨に反する。さらに、高濃度の BAC DNA を使用するとマイクロピペット先端の内腔が徐々に狭くなり、最終的には閉塞しやすく、途中で先端を折らざるを得ないか、あるいは新規のマイクロピペットに交換せざるを得ず、結局マイクロピペットの個体差による影響を除外できないことも多かったからである。

そこで、各導入法はそれぞれ別のマイクロピペットで行う方針に切替えた。しかし、マイクロピペットの個体差は無視できないため、各導入法のサンプル数を多くすることによって、マイクロピペットの個体差による影響を少なくする方針とした。

②マウス過排卵処理・受精卵の採取

毎週 1 回の割合で実験を行い、8 週齢の BDF1 雌マウス 3 頭に通常の過排卵処理を施し（血清性性腺刺激ホルモンおよび胎盤性性腺刺激ホルモンの注射）、BDF1 雄マウスと交尾させ受精卵を採取した。

③導入遺伝子

tdTomato をレポーター遺伝子とする マウス Rosa26 BAC クローンを使用した (tdTomato BAC DNA と略する)。この組換え DNA 片は当初は 110~120 kb と想定されていたが大腸菌内で想定外の組換えが起こり、現在所有しているロットは少なくとも 300 kb 以上であることが確認されている。

精製した tdTomato BAC DNA をポリアミンバッファーで与えられた濃度に調整した。BAC DNA は分子量が大きいため粘稠度が高くなりすぎないように通常は 0.5 ng/μL で使用するよう推奨されている。しかし、0.5 ng/μL という低濃度では、分子量が大きい分だけ細胞に注入される分子数は少なくなる。さらに、BAC DNA は断片化しやすいため、注入過程での tdTomato BAC DNA の断片化も想定される。以上の理由から、IPCM の評価実験では 2 ng/μL 以上の濃度に調整した。

④インジェクション時の培養液と温度

インジェクション用の培養液として M2 を使用した。倒立顕微鏡 (IX70、オリンパス) のステージにサーモプレートを設置し、インジェクション中の培養液の温度を一定に保った。tdTomato BAC DNA は分子鎖が長いいため、温度を室温ではなく 37°C にし、粘稠度が増さないように配慮した。

⑤使用マイクロピペットとインジェクションの仕方

マイクロピペットは先端径が品質管理されている Femtotip® (Eppendorf) を使用し、その先端に tdTomato BAC DNA 溶液を充填した。

シャーレの底に約 20 μl の M2 ドロップを作り、ミネラルオイルで封じ込め、無作為に抽出された採取卵を 15~20 個程度ドロップ中に入れて 1 セットのマイクロインジェクションを行った。1 実験日に行えるマイクロインジェクション数はその日に採取された受精卵数に依存するが、全てのマイクロインジェクションを 1 本のマイクロピペットで行うことを目標とした。この目標設定によって、或る導入法を恣意的に良い条件下で（例えば、常に良好なマイクロピペットを使用するために頻繁に交換するなど）評価していないことを間接的にではあるが示すためである。

⑥マイクロインジェクタ

マイクロインジェクタは空気圧制御可能な FemtoJet® (Eppendorf) を使用する予定であったが、表示通りの圧が安定的にかかっていない可能性が判明したので、自動制御機構の無い加圧装置を特注して作製した (図 3)。この装置は高圧回路と低圧回路の 2 系統からなり、マイクロピペットの先詰まり解消のための高圧回路は最大負荷圧を 7,000 hPa とし、維持圧を負荷するための低圧回路は 40~500 hPa の圧範囲に設計した。さらに、両回路の空気圧をリアルタイムに計測できるようにもした。因みに、維持圧とは毛細管現象によって培養液がマイクロピペットの先端から内部に浸入しないように付加する圧のことであり、インジェクションの際にかかるインジェクション圧とは異なる。本研究では、維持圧を 50 hPa に設定し、インジェクション圧は使用しない方針とした。

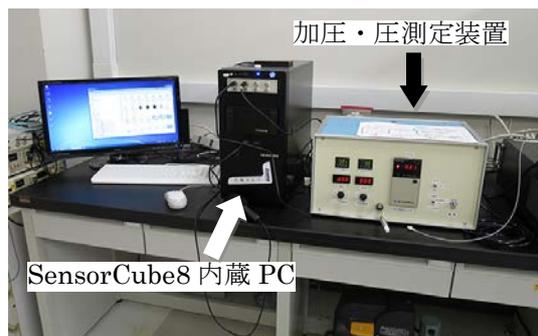


図 3 実験で使用した周辺機器

⑦インジェクション操作時のデータ取得
インジェクション操作時の動画撮影と前記の加圧回路の空気圧計測を SensorCube8 (LRH2500XE-1、デジモ) で行った。

倒立顕微鏡 (IX70、オリンパス) のサイドポートに高速度ビデオカメラ (VCC-H2500C、デジモ) を取り付け、PC にフルハイビジョン動画像を取り込んだ。動画撮影ソフトはモーションシンクロロガー (デジモ) を用い、映像を毎秒 30 コマで撮影した。この際、2 系統の加圧回路の空気圧も 50 kHz の頻度 (20 μ s 間隔) で計測した。

⑧操作卵の培養観察

インジェクション後の卵を通常の CO₂ インキュベータ (空気+5% CO₂) 内で培養液 M16 にて培養し、培養胚の 4 日後の発生をデジタル蛍光顕微鏡 (EVOS FL、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で静止画撮影し、SensorCube8 でフルハイビジョン動画撮影した。さらに、インジェクション操作を受けた胚は発生が遅れることがあるので、その後 2 日間にわたりリアルタイム培養細胞観察システム (CCM-1.4Z、ASTEC) で経時的に胚の画像データを取得し、その後の発生も検討した。

⑨振動型マイクロインジェクション・システム (VMS) の必要性

研究申請時の予備実験では、非常に高濃度の BAC DNA 溶液を使用していたので、研究申請書には「本研究を実現可能性の高い研究にするためには VMS は不可欠である。」と記載していたが、比較的低濃度の BAC DNA を使用した場合や意図的にマイクロピペットの先端を折って実験をした場合には、必ずしも VMS が不可欠ではないことが判明した。このような場合には新しい本導入法の普及を促進するために、あえて VMS を使用せずに実験を遂行した。

(3) 前核間細胞質マイクロインジェクション法 (IPCM)

約半年程度の学習期間の後に、評価実験を開始した。この学習過程において、採卵後 3~5 時間でマイクロインジェクションする場合、2 個の前核間には安全にマイクロピペットを刺入できるスペースが無いことにしばしば気付いた。そこで、受精卵を回転させて 2 個の前核の位置が上下に微妙にずれるように配置して刺入する方法 (ズラシ IPCM) を考案した (図 4; 黄色の球は受精卵を、オレンジ色と緑色の球が 2 個の前核を表わす)。

本法の効果を 4 段階の tdTomato BAC DNA 濃度で足掛け 3 年間かけて比較検討した。合計 108 頭の雌 BDF-1 から得られた 1,914 個の受精卵を濃度別に以下の 4 群に割り当てた: 2 ng/ μ L 投与群 (492 個)、5 ng/ μ L 投与群 (406 個)、7.5 ng/ μ L 投与群 (399 個)、10 ng/ μ L 投与群 (617 個)。

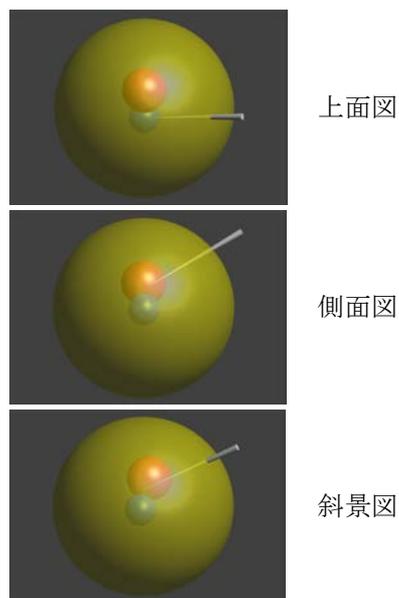


図 4 ズラシ IPCM

(4) 細胞質・前核順次マイクロインジェクション法 (CPSM) および前核マイクロインジェクション法

これらの遺伝子導入法はまだ検討中であるため、途中経過を結果の項目に示す。

4. 研究成果

(1) 前核間細胞質マイクロインジェクション法 (IPCM)

①平成 25~26 年度の成果

IPCM に対する学習期間が長くなるにつれ、知識や技量も向上し、その方法にも若干の変更を加えることになったので、その切っ掛けとなった比較的初期の成果を一部示す。

12 実験日で採取された 615 個の受精卵を 7.5 ng/ μ L 群 (399 個) と 2 ng/ μ L 群 (216 個) に二分して実験を行った。図 5 に、4 日後に撮影された 7.5 ng/ μ L 群の胚盤胞 6 個 (追跡観察が容易になるように小分けして培養している) の通常写真と蛍光写真を示す。程度の差はあるものの全ての胚盤胞でレポーター遺伝子である tdTomato が発現している。

インジェクション直後の生存率は 7.5 ng/ μ L 群で 77.7% (310/399)、2 ng/ μ L 群で 79.6% (172/216) であった (NS、Fisher 直接確率検定)。胚盤胞に到達した割合 (胚盤胞到達率) はそれぞれ 72.9% (291/399)、79.6% (172/216) であり、統計学的有意差は認められなかったが (P=0.0778)、2 ng/ μ L 群が高い傾向を示した。tdTomato を発現した胚盤胞 (図 5) の比率 (発現胚盤胞率) は 7.5 ng/ μ L 群 35.8% (143/399)、2 ng/ μ L 群 6.0% (13/216) であり、7.5 ng/ μ L 群が有意に高かった (P < 0.0001)。tdTomato 発現胚盤胞の割合は胚盤胞数を分母とすると、7.5 ng/ μ L 群で 49.1% に、2 ng/ μ L 群で 7.6% になり、差が際立つ。

12 実験日の全てにおいて、1 本のマイクロピペットで全てのインジェクションが終了できたが (平均 58 個)、合計 12 本のマイク

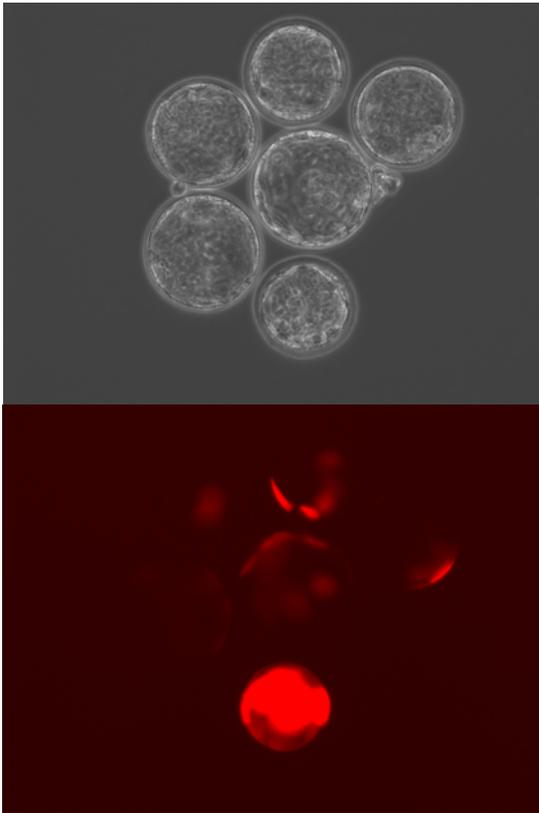


図5 tdTomato 発現胚盤胞

ロピペットのうち折らずにマイクロインジェクションが完遂できたのは2本のみであった。残りの9本は途中で閉塞したため意図的に先端を折り、もう1本は先端が意図せずに折れ、結局12本中10本が折損によって途中で先端径が明確に変わる結果になった。このため、これ以降の IPCM 実験ではあらかじめ Femtotip の先端を折り、適度な先端径と思われるものを使用することにした。

また、マイクロピペット折損後に BAC DNA の細胞質へのインジェクション量が明らかに増加した例において、その折損前後で発生を比較した。2 ng/μL 群の場合、直後に生存していた卵は全て胚盤胞に到達し、その割合は高注入量群(折損後)で 71.9% (46/64)、低注入量群(折損前)で 82.9% (126/152) であり (P = 0.0947)、低注入量群が高い傾向を示した。一方、発現胚盤胞率はそれぞれ 14.1% (9/64)、2.6% (4/152) と、高注入量群の方が有意に高かった (P = 0.0028)。

② 3年間の成果のまとめ

平成 26 年度後半から 27 年度にかけて、濃度 10 ng/μL と 5 ng/μL における IPCM を検討し、最後に 2 ng/μL 群のサンプル数が他に比べて少なかったので追加実験を行った。

3年間の IPCM の結果を表 1 にまとめた。インジェクション直後の生存率は4群間で統計学的有意差が認められ (P < 0.0001、 χ^2 検定)、ほぼ濃度の低い順に高かった (表 1)。

4~6 日後に胚盤胞に到達した割合も4群間で統計学的有意差が認められ (P < 0.0001、 χ^2 検定)、ほぼ濃度の低い順に高かった (表 1)。

tdTomato を発現する胚盤胞の比率は、処理卵数を分母とする率 (発現率 1) と胚盤胞数を分母とする率 (発現率 2) のいずれも4群間で統計学的有意差が認められ (P < 0.0001、 χ^2 検定)、濃度の高い順に高くなった。さらに Bonferroni 多重比較によって、高濃度の2群は低濃度の2群より有意に高かった。発現率 2 は、高濃度群で発現する胚盤胞の割合が際立っていることを示している。

最も発現率の低かった 2 ng/μL 投与群は、4 日後の観察では tdTomato の発現は認められず、6 日後の観察で初めて発現が認められる胚がかなり存在した。5 ng/μL 以上の高濃度投与群にはこのようなパターンは認められなかったため、濃度は発現率ばかりでなく、発現するタイミングにも影響を与えることが示唆された。

表 1 IPCM の結果

	BAC DNA 濃度 (ng/μL)			
	2	5	7.5	10
処理卵数	492	406	399	617
生存卵数	397	293	310	405
生存率(%)*	80.7	72.2	77.7	65.6
胚盤胞数	392	261	291	333
胚盤胞到達率(%)*	79.7	64.3	72.9	54.0
発現胚盤胞数	74	100	143	246
発現率 1(%)*	15.0	24.6	35.8	39.9
発現率 2(%)*	18.9	38.3	49.1	73.9

③ IPCM が容易でない例

我々のこれまでの経験から細胞質マイクロインジェクションは前核マイクロインジェクションよりも容易でないことが判っている^①。すなわち、細胞膜単独を刺入する場合(細胞質マイクロインジェクション)の方が細胞膜と前核膜を同時に刺入する場合(前核マイクロインジェクション)よりも容易でない。細胞膜の力学的挙動は固体というよりも液体に近く、細胞質もそうである。しかし、前核は大きな塊として細胞質内に存在しているため、より固体に近い挙動を示すと考えられるので、前核を狙った刺入の方が容易になると考えている。

図 6 に示すように、細胞膜はかなり陥凹しているがまだ貫けていない。細胞質内に Tear drop 状の DNA 溶液の溜りが見えるが、これ



図 6 細胞質マイクロインジェクション

はこの溜りが細胞質内ではなく細胞外にまだ存在していることを示している。

IPCMにも同様の問題があり、このような場合には、我々の開発した振動型マイクロインジェクション・システム(図1)が役立つ。

④ IPCMの有用性

IPCMは致命的な核引きを起こさず、高い発生効率や遺伝子改変効率が期待できる有用な新しい遺伝子導入法であることが判った。さらに、比較的低濃度の場合にはより多くの注入量が必要であることも判ったが、その注入量の多寡は定性的であり、注入量の定量化が今後の課題である。

(2) 細胞質・前核順次マイクロインジェクション法(CPSM)および前核マイクロインジェクション法

①CPSMは、前核マイクロインジェクションと同様に核小体を避けつつ刺入するばかりでなく、前核を串刺しにしなければならぬため、前核の中央ではなく端の方を狙わざるを得ないことが多く、結果的に単なる細胞質マイクロインジェクションに終わる場合があった。また、結果的に単なる前核マイクロインジェクションに終わる場合もあった。

まず2 ng/μLのtdTomato BAC DNA溶液を使用して連続した3実験日で行った結果、串刺しが成功した卵数は61個であり、そのうち培養6日間で胚盤胞にまで到達した数はわずか3個であり(胚盤胞到達率4.9%)、胚盤胞でtdTomatoを発現したものは1個のみ(発現胚盤胞率1.6%)であった。また、核引き率は65.6%(40/61)と高率であった。この実験において結果的に前核マイクロインジェクションに終わった卵数は21個で、胚盤胞到達率は14.3%(3/21)、発現胚盤胞率は9.5%(2/21)であった。核引き率は61.9%(13/21)とこれも高値であった。

②次に、tdTomato BAC DNA溶液濃度を0.5 ng/μLに下げ、CPSMか前核マイクロインジェクションのいずれかを狙ってインジェクションを行った。その結果、CPSMは対象となった8個すべてにおいて核引きが起こり胚盤胞に到達した胚は無かった。前核マイクロインジェクションは21個中8個が胚盤胞に到達したが(胚盤胞到達率38.1%)、tdTomatoを発現した胚盤胞は無かった。また、核引き率は33.3%(7/21)であった。

③以上のように、惨憺たる結果に終わったのでCPSMは諦めて、0.5 ng/μL tdTomato BAC DNA溶液を用いて前核マイクロインジェクションを3連続実験日で行った。前核マイクロインジェクションは107個中58個が胚盤胞に到達し(胚盤胞到達率54.2%)、胚盤胞の5個にtdTomatoの発現が認められた(発現胚盤胞率4.7%)。核引き率は21.5%(23/107)であり、CPSMよりも良好な結果

になった。この実験はCPSMを意図的に行った実験と連続して行ったため、インジェクション技量の向上という理由は考えられない。CPSMは慣れない導入法であったことと、前核を串刺しにしようとする意識が強すぎたために結果が悪くなったのかもしれない。因みにこの前核マイクロインジェクションを目標とする実験において、核小体を避けるために結果的に細胞質マイクロインジェクションに終わったと判定した26個のうち16個は胚盤胞に到達し(胚盤胞到達率61.5%)、前核マイクロインジェクションよりも高い値を示した。しかし、この16個の胚盤胞は全くtdTomatoを発現していなかった。

さらに、5 ng/μL以上の高濃度の前核マイクロインジェクションも試みたが、核引き率は低濃度に比べて高く、生存した胚も卵割があまり進まないタイプの異常胚になることが多かった。また、強烈にtdTomatoを発現し発生が停止する例も多く、5 ng/μL以上の高濃度BAC DNAは前核マイクロインジェクションに不向きであることが示された。

しかし、現在進行中の実験では、少し良好な結果の前核マイクロインジェクションやCPSM(前核マイクロインジェクションを狙った結果CPSMになった例)も得られつつあるので、それらもまとめて後日報告する。

<引用文献>

① Haremaki H, Yoshizawa T, Dilidaer K, Hasegawa J, Miyawaki F: Vibratory Microinjection System Facilitates Cytoplasmic Microinjection. Mouse Molecular Genetics 2011 P11, 2011

② Dilidaer K, Miyawaki F, Kobayashi K, Hasegawa J: Evaluation of Ultrasonic-Range Vibratory Microinjection System at a Frequency of 35 kHz Using Fertilized Mouse Eggs. Journal of Mammalian Ova Research 29(1):48-54, 2012

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

① Fujio Miyawaki: Proposal of a new method of gene transfer for large transgenes: inter-pronuclear cytoplasmic microinjection. 12th Transgenic Technology Meeting (TT2014) (2014/10/06) Edinburgh, United Kingdom

[その他]

ホームページ等

<http://www2.miyawaki-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 富士夫 (MIYAWAKI, Fujio)
東京電機大学・理工学部・教授
研究者番号: 50174222