

高親和性ウサギモノクローナル抗体の創製 (高感度エストラジオール測定系への応用)

松 葉 隆 雄
三 苦 惠 民
田 中 千 代
井 上 益 男

Preparation of Super-High Affinity Rabbit Monoclonal Antibodies Against Estradiol.
: Application to Highly Sensitive Estradiol Measurement.

Takao MATSUBA
Yasutami MITOMA
Chiyo TANAKA
Masuo INOUE

High-affinity monoclonal antibodies with high specificity against low-molecular compounds, e.g. steroid hormones, have been known to be very difficult to prepare. We have devised a novel method to isolate rabbit anti-estradiol monoclonal antibody that comprises antigen immunization to rabbits, lymphocyte fusion with mouse myeloma cells containing rabbit genes, rapid selection of hetero hybridoma cells prior to the gene loss, rapid isolation of the antibody gene, and expression in animal cells. A rabbit monoclonal antibody (U16A-14) was thus prepared successfully, and it showed extremely high affinity (KD: 2.1×10^{-14} M) and specificity.

A proto-type immunoassay reagent, prepared using the antibody U16A-14, was shown to have a sensitivity and specificity superior to the commercially available immunoassay reagent AIA-PACK E2 (Tosoh Corporation, marketed for the fully automated enzyme immunoassay instruments including AIA-360, AIA-600II, AIA-1800 and AIA-2000).

The method described here is expected to be quite useful as a preparation process for high-performance monoclonal antibodies, which were hardly to be isolated by the conventional methods.

1. 緒 言

モノクローナル抗体はその特異性と親和性の高さから、ある特定の物質を検出するための実験用試薬としてだけでなく、がん治療用医薬品、免疫診断薬の中核材料として広く利用されている。免疫診断薬に関しては、近年高感度化が要求されており、免疫診断薬の中核材料としてのモノクローナル抗体の高親和性化が要求されている。

今回我々は、女性ホルモンの一種で卵巣機能の観察の目的などで測定されており、高感度化が要求されているエストラジオール(E2)に着目した。E2は分子量272.39の低分子ホルモンであるため競合法で測定されている。現在東ソー株式会社が上市している体外診断薬(AIA-PACK E2:ポリクローナル抗体を使用)と同等以上の性能を得るためには、少なくとも 10^{-11} Mから 10^{-12} M以上の解離定数(KD)を持つモノクローナル抗体が必要であると計算された。しかし、このよ

うな高親和性を持つモノクローナル抗体は、たんぱく質抗原を含めても報告例が非常に少ない。さらに免疫診断薬用の抗体として考えた場合、エストラジオールには類似体が多いことから高い特異性も要求される。

当初マウスおよびラットを用いて高親和性抗E2抗体の単離を試みた。モノクローナル抗体単離における各種要因(動物の系統、週齢、性別、免疫場所、固体差、免疫量、キャリアータンパク質、アジュバント、免疫回数など)を最適化することで、一匹の動物から単離される抗体数は最適化前の100倍以上に増加し、得られる抗体の親和性も向上した。しかし、目標とする親和性を持つモノクローナル抗体は得られなかった。

われわれは、当時入手可能であった各種モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体に関する評価を行った結果、動物の体が大きくなるに従いポリクローナル抗体の性能が向上し、それらの動物から得られるモノクローナル抗体の親和性も高いこと。抗体の親和性が高くなるに従い、高感度な測定系が構築できる等の知見を得た。さらに現在のAIA試薬ではウサギのポリクローナル抗体を使用していることから、ウサギモノクローナル抗体を単離できれば、目的親和性に到達できると判断し、ウサギモノクローナル抗体の開発に着手した。

マウスモノクローナル抗体は次の方法で作製されている。まず、抗原を免疫したマウスの脾臓細胞(抗体産生細胞)をマウスミエローマ細胞(骨髄腫細胞)と細胞融合することで、無限増殖能を持ち目的抗体を産生するハイブリドーマを作製する。その後、本細胞を培養することで分泌する抗体を精製する。しかし、ウサギモノクローナル抗体は同様な方法では作製できない。それは、ウサギミエローマ細胞¹⁾が一般には流通していないからである。また、ウサギ脾臓細胞をマウスミエローマ細胞と融合することも考えられるが、異種動物間の融合であるため融合効率が低く、ハイブリドーマが得られても、細胞が不安定なため短期間のうちに抗体を発現しなくなることはよく知られている^{2,3)}。また、ウサギ血清存在下で培養すると抗体生産能が維持できるとの報告もあるが、生産されたモノクローナル抗体の精製が困難になることや、長期間の抗体生産性については不明である⁴⁾。以上のことから、ウサギモノクローナル抗体は、ウサギミエローマ細胞を有した特定の機関でのみ取り扱うことが可能な材料であった。

今回我々は、ウサギの遺伝子が含まれた特殊なマウスミエローマ細胞⁵⁾と抗原を免疫したウサギ脾臓細胞

とを融合させヘテロハイブリドーマを作製後、ヘテロハイブリドーマが抗体を産生しているうちに抗体遺伝子を単離し、遺伝子組み換え抗体として発現させることを試み、遺伝子組み換えウサギモノクローナル抗体の発現に成功した。さらに得られたウサギモノクローナル抗体の性能は極めて高く、その抗体を用いることで高感度なE2測定試薬を構築できたので、以下に報告する。

2. 実 験

[1] 免疫抗原の作製と動物への免疫

(1) 免疫抗原およびスクリーニング抗原の作製

E2・BSA (Sigma社製)を免疫抗原として使用した。またELISAでのスクリーニング用抗原は、E2の6位をN-ヒドロキシスクシイミドで活性化した活性エステルとBCP (Blue Carrier Protein: Pierce社製)を反応させてE2・BCPを作製し使用した。

(2) 動物と抗原免疫方法

免疫動物はウサギ(日本白色種)の12週齢メスを使用した。初回免疫はフロイント完全アジュバント、2次免疫以降はフロイントの不完全アジュバントを用い、抗原と等量混合後エマルジョンを作製した後に2週間間隔で免疫した。免疫抗原量は初回500マイクログラムで2次免疫以降は250マイクログラムを免疫に使用した。

[2] 細胞融合とスクリーニング

(1) 細胞融合

ELISAで抗体価を測定し、十分な抗体価の上昇を確認した後に脾臓を摘出し、定法に従って脾臓細胞を調製した。今回ウサギ脾臓細胞と細胞融合するのに用いた細胞(2-3A)は、ミエローマ細胞の遺伝子にウサギの染色体が一部組み込まれており⁵⁾、ウサギ脾臓細胞と融合させた場合、ハイブリドーマの出現率が通常のマウスミエローマ細胞よりも高い細胞である。細胞融合方法は定法(PEG法)に従い、2-3Aとウサギ脾臓細胞を融合させた。融合後の細胞浮遊液は10% FCS、1×HAT、を含むGIT培地(日水製薬社製)で懸濁し、マイクロタイタープレートで培養した。

(2) ELISA

培養上清中の抗E2抗体は下記の方法で検出した。

E2・BCP (0.5 ug/ml)をELISAプレートに固定化した後、1%スキムミルクでブロッキングした。その後、細胞融合後の培養上清を反応させた。E2に結合した抗E2ウサギモノクローナル抗体は、アルカリホスフ

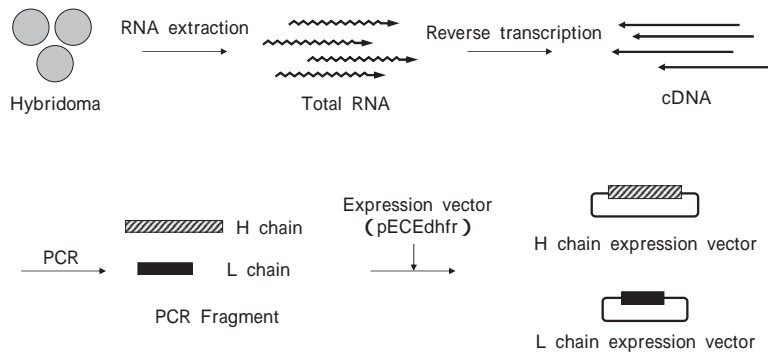


Fig. 1 A scheme of the expression vector construction

アターゼ標識抗ウサギIgGを結合させ、未反応の酵素標識抗体をB/F分離後、酵素基質である4-メチルウンベリフェリルリン酸(4-MUP)を分注し、蛍光強度を測定することで検出した。

また、抗E2抗体の競合性能は、上記測定系で培養上清を反応させる際に、E2(500 pg/ml)を共存させる実験をおこなった。

特異性は、培養上清を反応させる際に各種ステロイド(エストロン:E1、エストリオール:E3、エチニルE2:EtE2、テストステロン:TS、各500 pg/ml)を共存させておくことで評価した。

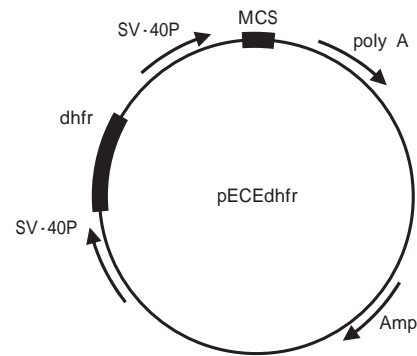


Fig. 2 Plasmid vector, pECEdhfr, used for the production of antibody

MCS, multi cloning site; SV-40P, virus promoter; dhfr, dihydrofolate reductase; poly A, polyadenylate attachment signal; Amp, β -lactamase

[3] 遺伝子組み換え抗体の発現

(1) 抗体遺伝子の単離と発現ベクターの作製

抗体遺伝子の単離から発現ベクター作製までの一連の流れは図1に示した。

細胞からのRNAの抽出には、Ambion社のMagMax™-96 Total RNA Isolation kitを、逆転写反応はGE Healthcare社のReady-To-Go You-Prime First-Strand Beadsを用いた。その後ウサギ抗体遺伝子に特異的なプライマー(H鎖およびL鎖用)を用いPhusion High-Fidelity DNA polymerase(第一化学薬品社製)で、抗体遺伝子を増幅させた。得られたそれぞれのPCRフラグメントは、動物細胞用発現ベクター⁶⁾(pECEdhfr:図2)に導入し、H鎖、L鎖用の発現ベクターを調製した。

(2) 遺伝子組み換え抗体の発現(COS細胞による一過性発現)と精製

COS細胞での遺伝子組み換え抗体の生産をおこなった^{7,8)}。96ウェルプレート上で対数増殖期にあるCOS細胞に、H鎖発現ベクターとL鎖発現ベクター各200 ngを、リポフェクトアミン2000(インビトロジェン社)で導入した。遺伝子導入時の培地は、Opti-MEM(インビトロジェン社)を使用した。遺伝子導入から3日後に培養上清を回収し、ELISAで抗体の存在を確認

した。抗原結合能が確認された抗体遺伝子ペアは、スケールアップして一過性発現を行なった。その後、定法に従い得られた培養上清からProtein Gカラムで抗E2抗体を精製した。

[4] 発現抗体の親和性測定

BIAcore T-100(ピアコア株式会社製)を用いて、マウス由来モノクローナル抗体(4種類:M-01、M-02、M-03、M-04)、ラット由来モノクローナル抗体(1種類:F1-33)、ヒツジ由来モノクローナル抗体(1種類:5A11)、今回単離したウサギ由来モノクローナル抗体(3種類:U12-2、U16A-2、U16A-14)の全9種類の抗体の親和性を下記に示す方法で測定した。

E2誘導体(E2の6位にアミノ基を導入したもの)をアミンカップリング法で、センサーチップ(CM5)上に固定化し、ランニング緩衝液:HBS-EP、反応温度:25℃、流速30 ul/min、結合時間:1分、解離時間:10分の条件で抗体の結合と解離を測定した。また得られたデータは、解析ソフト(BIAcore T100 Evaluation Software, version. 1.1)を用い、bivalentモデルで解析し、 k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_d (s^{-1})、 KD (M)の

値を算出した。

[5] AIA試薬形態でのモノクローナル抗体の評価

精製したウサギ由来モノクローナル抗体(U16A-14)を用いて、プロトタイプ形のAIA用の免疫診断薬を作製し、現在上市されている免疫診断薬(AIA-PACK E2)と性能を比較した。

3. 結果および考察

[1] 単離目標の抗体の親和性を見積もり

モノクローナル抗体の親和性の違いによる競合法の検量線形状を理論的に計算した結果を図3に示した。

グラフ中細線は、モノクローナル抗体の親和性が変化したときの検量線を示し、太線は現在のAIA試薬の検量線を示す。このグラフから、現在のAIA試薬より高感度な測定系を構築するためには(検量線が左側にシフトするほど高感度測定系)、少なくとも $1 \times 10^{-11}M$ 以上の解離定数を持つ抗体が必要であることがわかった。マウスモノクローナル抗体の解離定数は $1 \times 10^{-9}M$ から $1 \times 10^{-10}M$ 程度のもが多いが、少なくとも10倍から100倍高い親和性が必要なことがわかった。

[2] 細胞融合とヘテロハイブリドーマの安定性

マウスミエローマ細胞とウサギ脾臓細胞とを融合して得られるハイブリドーマ数は、マウス脾臓細胞と融合して得られるハイブリドーマ数の約10~20分の1であったが、今回使用した2-3Aは、マウスミエローマ細胞をマウス脾臓細胞と融合して得られるハイブリドーマ数と同程度であった。本細胞は染色体上にウサギ

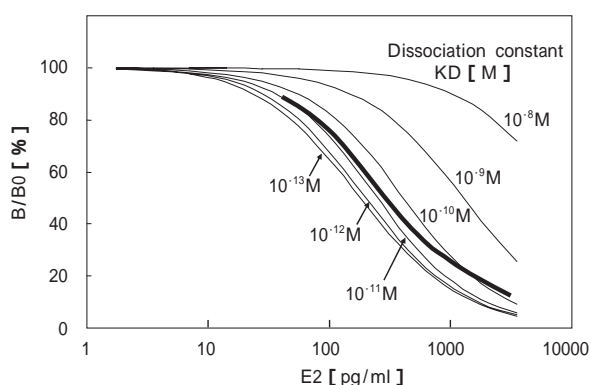


Fig. 3 Theoretical competitive inhibition calibration curve and AIA reagent calibration curve

Thick line shows the calibration curve of current AIA reagent. Theoretical calibration curves of competitive inhibition assay (thin lines) were drawn follows condition. (Estradiol alkaline-phosphatase conjugate : 2 nM, anti-E2 antibody : 0.2 nM). The value in the figure shows the dissociation constant of monoclonal antibody.

の遺伝子が組み込まれていることが確認されており⁵⁾、その遺伝子の影響で細胞融合効率が向上していると推測される。

スクリーニングの結果、ウサギモノクローナル抗体を安定に生産し続けるハイブリドーマも得ることは出来たが、ほとんどのハイブリドーマは培養を継続すると抗体産生能が消失した。高性能抗体を単離するためには、数多くの候補抗体の中から優れた抗体を絞り込む必要がある。そこで、今回はヘテロハイブリドーマの抗体産生能が消失する前に、高性能抗体を生産しているハイブリドーマを探し出し、その細胞から抗体遺伝子を単離し、遺伝子組み換え抗体として発現させる方法をとった。

[3] 抗体遺伝子を単離する細胞のスクリーニング

数百から数千種類の細胞から抗体遺伝子を単離し、遺伝子組み換え細胞を樹立し、抗体性能を評価することは、現実的に不可能である。つまり、何らかの方法で高性能な抗体を発現しているハイブリドーマを選別する必要がある。今回は、反応性、特異性、競合特性の3つの要因についてELISAで一度に評価する系を構築することで、高性能抗体を発現しているハイブリドーマを選別することが可能となった。

図4は、各クローンの競合特性(縦軸)、特異性(横軸)、反応性(プロットの大きさ)を一枚の図で示したものである。この図中黒丸の細胞が生産する抗体

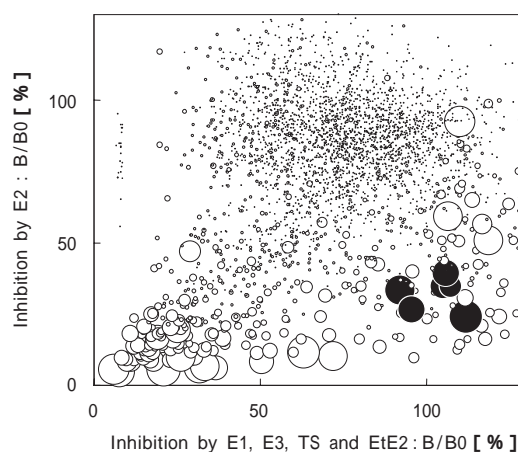


Fig. 4 Typical screening result of anti-E2 monoclonal antibodies.

The circle size show the maximum amount of the E2-ALP conjugate that the antibody can bind in the absence of free E2 (B0). Horizontal and Vertical %B/B0 (% Bound / Maximum Bound) were calculated in the following equations. Horizontal: rate of the ELISA value (500 pg/ml of free E1: Estrone, E3: Estrinol, TS: testosterone and EtE2: Ethynyl Estradiol) to that of maximum binding (B0). Vertical: rate of the ELISA value (500 pg/ml of free E2) to that of maximum binding (B0). Black circle monoclonal antibodies have high reactivity, high inhibition performance and high specificity. Antibody genes were isolated from these clones.

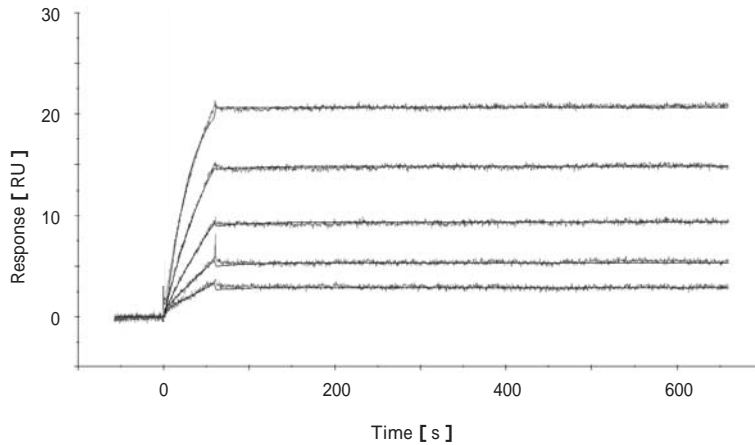


Fig. 5 Representative Biacore sensorgrams obtained for the binding of monoclonal antibody.

For association, rabbit monoclonal antibody (16A-14) were injected at 5 different concentrations (12.5, 6.25, 3.13, 1.56 and 0.78 nM; top to bottom) between t = 0 and 60s.

は、競合特性も高く、特異性が高く、反応性も高いクローンであることがわかる。このグラフは約4,000クローンの培養上清の評価結果をまとめたものであるが、本スクリーニング方法により、高性能の抗体を生産しているハイブリドーマの選別が可能となった。次に、本スクリーニング方法で選んだ細胞から抗体遺伝子を単離した。

[4] 抗体遺伝子の単離と遺伝子組み換え抗体の発現

今回は遺伝子抽出に使用できる細胞数が少ないことが予想されたため、少ない細胞から効率よくRNAを抽出できるキットを使用した。また抗体遺伝子をPCRで増幅させる際に変異が入らないように正確性の高いDNAポリメラーゼを選択した。

ウサギ抗体の場合、H遺伝子は80%以上がVH1遺伝子を、L遺伝子はほとんどが鎖であることが報告されている^{9,10}。抗体遺伝子を増幅する場合、可変領域部位を増幅するミックスプライマーよりも、定常領域に特異的に結合するプライマーセットの方が増幅効率が高い。今回は、出発細胞数が少なく鋳型となるRNAの量が限られるため、ウサギ抗体遺伝子に特異的なプライマーセットで抗体遺伝子を増幅させる方法を取った。先行論文¹¹⁻¹⁴およびGeneBankデータベースを参考に、ウサギ抗体遺伝子のH鎖およびL鎖の全長を増幅できるようにプライマーを設計した。

その結果、スクリーニングで選別した細胞から、80%以上の確率で抗体遺伝子を増幅できた。

[5] 単離した抗体の親和性と性能の比較

各種動物由来の抗E2モノクローナル抗体(マウス

由来:4種類、ラット由来:1種類、ヒツジ由来:1種類)と今回単離したウサギ由来モノクローナル抗体(3種類)の親和性をBIAcore T-100で解析した。図5は、代表例としてU16A-14を解析した際のセンサーグラムを示し、このグラフから k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_d (s^{-1})、 KD (M)値を計算した。9種類の抗体を解析し、縦軸 k_d (s^{-1})、横軸 k_a ($M^{-1}s^{-1}$)でプロットした結果を図6に示した。なお図6中の、左下がりの座標軸は KD (M)値を示す。このグラフから、今回単離したウサギモノクローナル抗体の親和性は通常のマウスモノクローナル抗体と比較して極めて高親和性であることがわかる。また、抗体の解離定数(KD)に与える影響は、 k_a の値よりも k_d の値の寄与が大きいことが

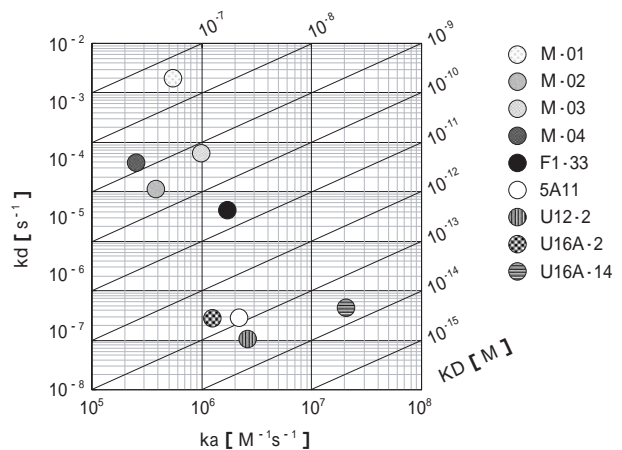


Fig. 6 Kinetic interaction between Estradiol and nine monoclonal antibodies from four kinds of animals

Horizontal and vertical axis show the association rate constant (k_a) and dissociation rate constant (k_d), respectively. $KD = k_d / k_a$: dissociation constant. Mouse monoclonal antibodies: M-01, M-02, M-03, M-04, Rat monoclonal antibody: F1-33, sheep monoclonal antibody: 5A11, Rabbit monoclonal antibodies: U12-2, U16A-2, U16A-14.

わかる。

また、解離定数 (KD) を横軸に、縦軸に競合性能をとると、親和性の高い抗体ほど競合性能も高く、高感度な測定系を構築できることがわかる (図7)。M-02およびF1-33もマウスおよびラット由来の抗体としては高親和性であるが、ウサギモノクローナル抗体の親和性には及ばないため、高感度測定系を構築することが出来ないことがわかる。

[6] AIAでの評価結果

今回単離したU16A-14を用いたAIA試薬と現在のAIA試薬の検量線を図8に示した。このグラフからも明らかのように、従来のAIA試薬より高感度な測定系

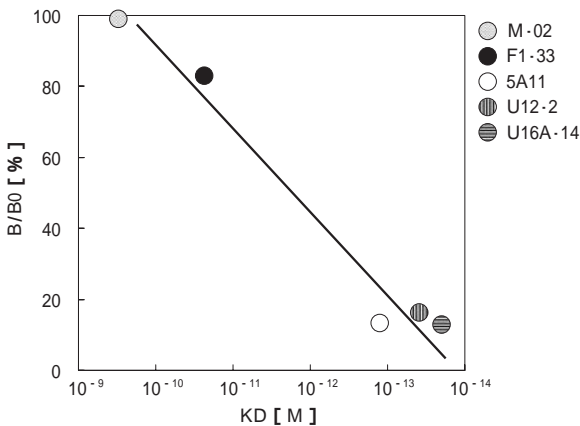


Fig. 7 Five monoclonal antibodies correlation between dissociation constant (KD) and competitive inhibition assay performance

KD = k_d / k_a : dissociation constant. B0 (Maximum binding): maximum amount of the E2-ALP conjugate that the antibody can bind in the absence of free E2. %B/B0: (% Bound / Maximum Bound): rate of the ELISA value (1050 pg/ml of free E2) to that of maximum binding. Mouse monoclonal antibody: M-02, Rat monoclonal antibody: F1-33, sheep monoclonal antibody: 5A11, Rabbit monoclonal antibodies: U12-2, U16A-14.

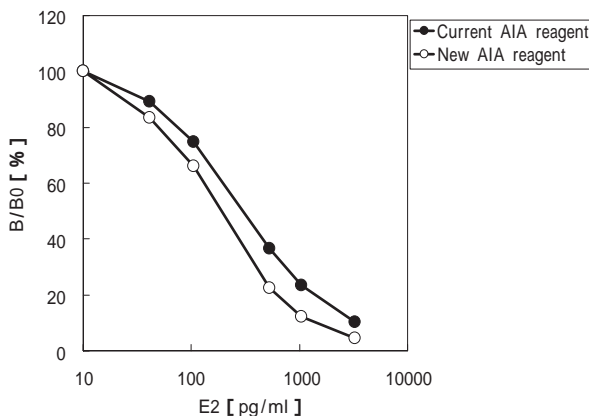


Fig. 8 Comparison of calibration curve of the current AIA reagent and new developed AIA reagent using U16A-14

Current and new AIA reagent functional sensitivity were calculated 25.2 pg/ml, 22.4 pg/ml, respectively.

が構築できることが明らかとなった (ポリクローナル抗体を使用した現行AIA試薬: 25.2 pg/ml、U16A-14を用いたAIA試薬: 22.4 pg/ml)。

また、E1 (エストロン) およびE3 (エストリオール) といった、類似ステロイドへの交差反応性 (10 ng/ml) を測定したところ、どちらのステロイド類に対する交差反応性も大幅に改善されていた。

	AIA試薬	U16A-14
E1	4.77%	0.92%
E3	4.19%	0.28%

また、145種類の実検体を用いて両測定系の相関性を見た結果を図9に示した。相関係数 $r = 0.998$ というきわめて高い相関性を示した。

4. 結 論

本研究により、一連の技術パッケージとして、高性能なウサギモノクローナル抗体の取得技術を確立した。今回構築した技術には2つのメリットがある。

まず第一点目は、同一性能のモノクローナル抗体を安定に供給できる点にある。ポリクローナル抗体は有限の材料であり、現在と同等の性能のポリクローナル抗体が得られる保証は無い。しかし、モノクローナル抗体化することで、その問題を完全に回避できる。

第二点目は、従来の抗体では検出できなかった微量成分の検出の可能性が期待できることである。今回単離したウサギモノクローナル抗体の一つは $2.1 \times 10^{-14} \text{M}$ という解離定数 (KD) を示した。この値は非共有結合の中で一番親和性が高いピオチン・アビジンの結合

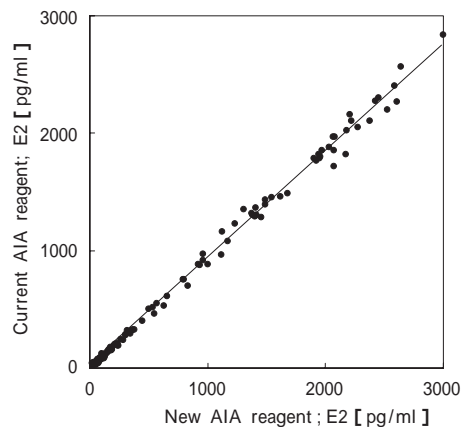


Fig. 9 Correlation between current AIA reagent and new developed AIA reagent using U16A-14

Horizontal and vertical axis show the new developed AIA reagent and current AIA reagent, respectively. Slope, 0.924; intercept, -2.387, $r = 0.998$

(KD : 1×10^{-15} M) に匹敵する値である。このように超高親和性抗体を測定系に使用することで、測定系の高感度化、あるいはこれまでは検出できなかった微量成分の検出の可能性が広がり、あらたな領域への展開も期待される。

今後は本技術を適用することで、現在抗血清を使用している測定項目のモノクローナル抗体化を推進し、AIA試薬性能向上、抗体供給の不安定性を解消してゆく予定である。

5. 謝 辞

本論文の中で使用した細胞(2-3A)は、栄研化学株式会社の増淵晴美様、橋本真様により樹立されたもので、栄研化学株式会社の好意により譲渡して頂いたものである。厚く御礼申し上げます。また、抗体遺伝子増幅用のPCRプライマー設計などの助言を頂いた、藤田保健衛生大学総合医科学研究所黒澤良和教授、伊庭善孝助手に感謝いたします。また本研究を行うに当たり種々の実験でお世話になった、宮内ゆかさん、保田涼子さん、津田歩美さん、春田千晶さん、相馬麗さん、池野佳恵さんに感謝いたします。

文 献

- 1) H. Spieker-Polet, P. Sethupathi, P. Yam, K. L. Knight, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9348 (1995)
- 2) M. C. Weiss, B. Ephrussi, *Genetics*, 54, 1095 (1966)
- 3) M. C. Weiss, H. Green, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 1104 (1967)
- 4) T. J. G. Raybould, M. Takahashi, *Science*, 240, 1788 (1988)
- 5) 増淵晴美、橋本真、公開特許公報、特開平10-262657
- 6) K. Yasukawa, T. Saito, T. Fukunaga, Y. Sekimori, Y. Koishihara, H. Fukui, Y. Ohsugi, T. Matsuda, H. Yawata, T. Hirano, T. Taga, T. Kishimoto, *J. Biochem.*, 108, 673 (1990)
- 7) Y. Iba, T. Kaneko, T. Ekida, K. Miyata, K. Inouye, Y. Kurosawa, K. Yasukawa, *Biotechnol. Lett.*, 17, 135 (1995)
- 8) K. Takagi, K. Yasukawa, Y. Iba, Y. Isobe, Y. Suketa, R. Kannagi, K. Kohda, M. Takagi, T. Imanaka, *J. Ferm. Bioeng.*, 79, 405 (1995)
- 9) C. Raman, H. Spieker-Polet, P. Yam, K. L. Knight, *J. Immunol.*, 152, 3935 (1994)
- 10) M. Popkov, R. G. Mage, C. B. Alexander, S. Thundivalappil, C. F. Barbas III, C. Rader, *J. Mol. Biol.*, 325, 325 (2003)
- 11) J. S. Babcook, K. B. Leslie, O. A. Olsen, R. A. Salmon, J. W. Scheader, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7843 (1996)
- 12) R. Ridder, R. Schmitz, F. Legay, H. Gram, *Biotechnol.*, 13, 255 (1995)
- 13) B. Mariame, M. Akimenko, F. Rougeon, *Nucl. Acids. Res.*, 15, 6171 (1987)
- 14) O. Heidmann, F. Rougeon, *Nucl. Acids. Res.*, 10, 1535 (1982)

著 者

氏名 松 葉 隆 雄
Takao MATSUBA
入社 昭和61年4月1日
所属 バイオサイエンス事業部
開発部
技術開発グループ

氏名 三 苜 恵 民
Yasutomi MITOMA
入社 昭和59年4月1日
所属 バイオサイエンス事業部
開発部
技術開発G
グループリーダー

氏名 田 中 千 代
Chiyo TANAKA
入社 昭和62年3月16日
所属 バイオサイエンス事業部
開発部
AIA試薬開発グループ

氏名 井 上 益 男
Masuo INOUE
入社 昭和59年9月16日
所属 バイオサイエンス事業部
開発部
開発部長