

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：37112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05657

研究課題名(和文) DNAの分子情報で無機ナノシートを操る

研究課題名(英文) Manipulation of inorganic nanosheets by molecular information of DNA

研究代表者

宮元 展義 (Nobuyoshi, Miyamoto)

福岡工業大学・工学部・准教授

研究者番号：80391267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ssDNA修飾ナノシートの合成では、末端に蛍光分子をラベリングしたssDNAの修飾を試みた。蛍光顕微鏡観察の結果、修飾処理をした場合のみ蛍光像が観察され、DNAの固定化が確認された。さらに、消光分子を末端に持つ相補的塩基配列のssDNAを加えたところ、添加後15分で完全に消光した。これはナノシート表面という、特異な反応場においても効率よくハイブリダイゼーションが起きた事を意味している。DNA/ナノシート混合コロイドの検討もおこなった。液晶性を示していない粘土鉱物ナノシートコロイドに僅かなDNAを添加すると、強い液晶性が誘起されるという、当初の予想と異なる興味深い結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Next, we tried to modify the nanosheet surface with ssDNA labeled with a fluorescence molecule. In the fluorescence microscopy observation, fluorescence image was obtained only when the chemical modification was conducted, indicating the fixation of the DNA on the nanosheet. When we added ssDNA, which has complementary base sequence and the quencher molecule, the fluorescence was quenched in 15 min. This indicates that the hybridization reaction between the ssDNAs effectively takes place even at the anomalous nanospace on the nanosheet. DNA/nanosheet colloid system was also investigated. When we added a small amount of DNA to clay nanosheet colloids in isotropic phase, strong liquid crystal phase was obtained.

研究分野：無機材料化学

キーワード：ナノシート DNA

## 1. 研究開始当初の背景

DNA をリンカーとしたコロイド粒子の機能化と組織化が近年報告されている。例えば 1 本鎖 DNA(ssDNA)が修飾されたコロイド粒子に、特定塩基配列の ssDNA を両端に持つリンカーを加えると、両端での 2 重鎖形成によって粒子が橋かけされ、コロイド粒子が集積したコロイド結晶がえられる。ssDNA の塩基配列は自在に設計できるので、修飾する ssDNA やリンカーに用いる塩基配列によってコロイド結晶の構造や格子定数を精密に制御できる。これらの報告では、球状粒子のみが用いられてきたが、異方性粒子を利用することでさらなる多様な構造の形成や応用が期待できる。

一方ナノシートは無機層状物質を水溶液中で剥離・分散することで得られ、厚さ 1nm、横幅最大数百  $\mu\text{m}$  と異方的な形状を有している。ssDNA によるナノシートの機能化と組織化は数例報告されており、刺激応答性ゲル化剤<sup>3</sup>、ナノコンテナ<sup>4</sup>、バイオセンサ<sup>5</sup>への応用が提案されている。しかし、いずれもナノシートの表面に ssDNA を物理的に吸着したものであり、構築した複合体の安定性も不十分である。またナノシートコロイドは、複屈折および構造色を有する液晶相を形成するが、DNA による光学特性の制御は報告されていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、溶媒に分散した無機ナノシート表面に一本鎖 DNA(ssDNA)を化学修飾することで、入力分子(相補の ssDNA など)や他の ssDNA 修飾ナノシートを特異的に認識する系を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)DNA/ナノシート混合コロイド

DNA とナノシートの複合系についての基礎的知見を得るため、DNA とナノシートを単純混合した系について、検討した。ナノシートとして、粘土鉱物の一種である天然バイデライト(SBId-1)および天然モンモリロナイト(Kunipia-F)を精製して用いた。DNA には魚由来の分子量の大きいもの( $10^4$  b.p.程度)、小さいもの(300 b.p.程度)を用いた。これらを様々な比率で混合した水溶液を作成し、クロスニコルによる観察と小角 X 線散乱測定(SAXS)を行った。また、紫外可視分光によって、粘土鉱物への DNA の吸着挙動を検討した。

### (2)ssDNA 修飾ナノシートの合成

N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に、凍結乾燥した六ニオブ酸塩ナノシートコロイド、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、トリエチルアミンを加え、130  $^{\circ}\text{C}$ で 1 日攪拌し、アミノ基末端ナノシートを合成した。また

DMF 中にアミノ基末端六ニオブ酸塩ナノシート、トリエチルアミン、無水コハク酸を加え、室温で 8 時間攪拌し、カルボキシル基末端ニオブ酸塩ナノシートを得た。最後にカルボキシル基末端ニオブ酸塩ナノシート、FITC(蛍光色素)をラベリングしたアミノ基末端 DNA、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボイミド塩酸塩、N-ヒドロキシスルホスクイミドナトリウムを MES バッファー(pH7.0)に加え、室温で 6 時間攪拌し、ssDNA 修飾六ニオブ酸塩ナノシートを得た。また FITC-ssDNA 修飾ナノシート分散液に消光分子をもつ相補的な ssDNA を加え共焦点顕微鏡で(CLSM)観察した。

### (3)有機溶媒中でのオクトシリケートの剥離

(2)では六ニオブ酸ナノシートを用いた検討を行ったが、OH 基の反応性や光活性などが異なるナノシートを用いる事で、さらに幅広い応用展開が期待される。そこで、層状ケイ酸塩の一種であるオクトシリケートをその候補として、まず剥離によりナノシートを得るための検討を行った。トルエンに、水熱法で合成したオクトシリケート粉末(oct)、ジデシルジメチルアンモニウムブロミド(C10-2)またはジドデシルジメチルアンモニウムブロミド(C12-2)を加え、60 $^{\circ}\text{C}$ で 3 週間攪拌し、その後超音波照射を 5h 行った。

## 4. 研究成果

### (1)DNA/ナノシート混合コロイド

バイデライト単独のコロイドは 11.2 g/L 以上の濃度で液晶示したが、DNA 単独の溶液は今回の実験で用いた数 g/L 以下では液晶性を示さなかった。しかし、液晶性を示していないバイデライトコロイド(8 g/L)に僅かな DNA(0.2 g/L)を添加すると、強い液晶性が誘起された。一方、バイデライト単独のコロイドの SAXS 測定では、ナノシート間平均距離が 160 nm であったが、DNA を添加すると、加えた DNA の量に依らず約 40 nm のナノシート間平均距離となった。バイデライトへの DNA の吸着等温線を作成したところ、DNA はバイデライトに強く吸着することが分かった。分子量の異なる DNA を用いた場合や、粘土鉱物モンモリロナイトを用いた場合でも、全般的に、ほぼ同様の傾向が確認された。

DNA とナノシートは、共に、水中で負電荷を有する。したがって、当初の予想としては、これらを混合した場合に系は反発力支配となり、主に枯渇相互作用によるマイクロ相分離で液晶相のわずかな構造変化が起こると考えていた。しかし検討の結果、上述のように、DNA と粘土鉱物ナノシート間には引力が作用していた。これは、ナノシートの辺縁部の水酸基と DNA のリン酸部位の間の水素結合によるものと考えられた。この結果、DNA がナノシ

ートを弱く橋かけし、液晶相形成を著しく促進したものと考えられた。

## (2) ssDNA 修飾ナノシートの合成

末端に蛍光分子(FITC)を有するssDNAをナノシート表面に修飾し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。後方散乱モードでは、未修飾ナノシート、ssDNA修飾ナノシートともに、数 $\mu\text{m}$ の大きさのナノシートが観察された。一方蛍光モードでは、ssDNA修飾処理をした後でのみ、像が得られたことから、ナノシートへのDNA修飾が示唆された。一方、合成に用いたssDNAの末端のアミノ基がプラスに帯電して、アニオン性の六ニオブ酸塩ナノシート表面に静電的に吸着している可能性も考えられた。そこで比較として、未修飾の六ニオブ酸塩ナノシートコロイドにssDNAを加えて攪拌し、ろ過して再分散したものを観察した。しかしこの場合ではほとんど蛍光は観察されなかった。これらのことよりssDNAは六ニオブ酸塩ナノシートの表面に共有結合を介して修飾されていることが強く示唆された。合成の各ステップでの赤外分光測定からも、共有結合によってssDNAがナノシートに修飾されていることが示唆された。

さらに、合成した FITC-ssDNA 修飾ナノシートに消光分子をもつ相補的な塩基配列のssDNAを加え、ハイブリダイゼーションによる消光が起こるかの確認を行なった。添加前では蛍光が点在していたが、ssDNAを添加後時間が経過するにつれ蛍光が消光し、15分経過すると完全に消光している。このことより消光-ssDNAがFITC-ssDNA修飾ナノシートにハイブリダイゼーションしていると考えられた。ナノシート表面という、特異な反応場においてもハイブリダイゼーションが確認されたことは、今後の応用研究に向けての重要なステップである。

## (3)有機溶媒中でのオクトシリケートの剥離

トルエン中で剥離処理した各試料を原子間力顕微鏡(AFM)で観察したところ、(C10-2)-octでは単層剥離した厚さ1nm程のナノシートが観察された。(C12-2)-octでは厚さ1nmだけでなく3nm程度の積層ナノシートも観察された。クロスニコル観察では、両系とも流動複屈折が観察された。これらの結果より、オクトシリケートの単層剥離に概ね成功した。今後は、このオクトシリケートを用いて、ssDNAによる表面修飾などを検討する予定である。

## 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24件、全て査読付)

1. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, "Swelling Inhibition of Liquid Crystalline Colloidal Montmorillonite and Beidellite Clays by DNA" Yamguchi, N.; Anraku, S.; Paineau, E.; Safinya, C. R.; Davidson, P.; Michot, L. J.; Miyamoto, N.
2. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 3022-3028, "Massive hydration-driven swelling of layered perovskite niobate crystals in aqueous solutions of organo-ammonium bases" Song, Y.; Iyi, N.; Hoshide, T.; Ozawa, T. C.; Ebina, Y.; Ma, R.; Yamamoto, S.; Miyamoto, N.; Sasaki, T.
3. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 2957-2961, "Anisotropic self-oscillating reaction in liquid crystalline nanosheets hydrogels" Shintate, M.; Inadomi, T.; Yamamoto, S.; Kuboyama, Y.; Ohseido, Y.; Arimura, T.; Nakazumi, T.; Hara, Y.; Miyamoto, N.
4. *Electrochimica Acta* **2017**, *247*, 288-295, "NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-decorated porous carbon nanosheets for high-performance supercapacitors" Veeramani, V.; Madhu, R.; Chen, S.-M.; Sivakumar, M.; Hung, C.-T.; Miyamoto, N.; Liu, S.-B.
5. *Ionics* **2017**, *23*, 2193-2200, "A facile low-temperature synthesis of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> flakes for electrochemical detection of hydrogen peroxide sensor" Sivakumar, M.; Sakthivel, M.; Chen, S.-M.; Veeramani, V.; Chen, W.-L.; Bharath, G.; Madhu, R.; Miyamoto, N.
6. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 280-286, "A Facile Synthesis of Cd(OH)<sub>2</sub>-rGO Nanocomposites for the Practical Electrochemical Detection of Acetaminophen" Sakthivel, M.; Sivakumar, M.; Chen, S.-M.; Hou, Y.-S.; Veeramani, V.; Madhu, R.; Miyamoto, N.
7. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 41686-41692, "Thixotropic stiff hydrogels from a new class of oleoyl-D-glucamine-based low-molecular-weight gelators" Ohseido, Y.; Oono, M.; Saruhashi, K.; Watanabe, H.; Miyamoto, N.
8. *Royal Society Open Science* **2017**, *4*, "New composite thixotropic hydrogel composed of a polymer hydrogelator and a nanosheet" Ohseido, Y.; Oono, M.; Saruhashi, K.; Watanabe, H.; Miyamoto, N.
9. *科学と工業* **2017**, *91*, 85-95, "無機ナノシートの多彩な機能と応用" Miyamoto, N.; Kato, R.
10. *高分子論文集* **2016**, *73*, 262-280, "無機ナノシート液晶:二次元無機高分子が自発形成する組織化構造" 宮元展義; 山本伸也.
11. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 5906-5910, "A facile electrochemical synthesis strategy for Cu<sub>2</sub>O (cubes, sheets and flowers) microstructured materials for sensitive detection of 4-nitrophenol" Veeramani, V.; Sivakumar, M.; Chen, S.-M.; Madhu, R.; Dai, Z.-C.; Miyamoto, N.

12. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 17024–17028, "Low-Temperature Chemical Synthesis of CoWO<sub>4</sub> Nanospheres for Sensitive Nonenzymatic Glucose Sensor" Sivakumar, M.; Madhu, R.; Chen, S.-M.; Veeramani, V.; Manikandan, A.; Hung, W. H.; Miyamoto, N.; Chueh, Y.-L.
  13. *Chem. Select* **2016**, *4*, 877 – 878, "A Belousov–Zhabotinsky Oscillator Driven by a Water-Soluble Metalloporphyrin" Mukai, M.; Do, J.-H.; Miyamoto, N.; Arimura, T.
  14. *Kobunshi Ronbunshu* **2016**, *73*, 262-280, "Inorganic Nanosheet Liquid Crystals: Self-Assembled Structures in Dispersions of Two-Dimensional Inorganic Polymers (in Japanese)" Miyamoto, N.; Yamamoto, S.
  15. *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* **2016**, *8*, 355-359, "Recent Developments in Hybrid Hydrogels Containing Inorganic Nanomaterials" Malgras, V.; Kamachi, Y.; Nakato, T.; Yamauchi, Y.; Miyamoto, N.
  16. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 16466-75, "Functional porous carbon-ZnO nanocomposites for high-performance biosensors and energy storage applications" Madhu, R.; Veeramani, V.; Chen, S. M.; Veerakumar, P.; Liu, S. B.; Miyamoto, N.
  17. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 16466-16475, "Functional porous carbon-ZnO nanocomposites for high-performance biosensors and energy storage applications" Madhu, R.; Veeramani, V.; Chen, S.-M.; Veerakumar, P.; Liu, S.-B.; Miyamoto, N.
  18. *Mater. Lett.* **2016**, *168*, 176-179, "Thermo-Responsive Hydrogels Containing Mesoporous Silica toward Controlled and Sustainable Releases" Kamachi, Y.; Bastakoti, B. P.; Miyamoto, N.; Nakato, T.; Yamauchi, Y.
  19. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1594 - 1597, "Sandwich organization of non-ionic surfactant liquid crystalline phases as induced by large inorganic K<sub>4</sub>Nb<sub>6</sub>O<sub>17</sub> nanosheets" Guégan, R.; Sueyoshi, K.; Anraku, S.; Yamamoto, S.; Miyamoto, N.
  20. *Clay Sci.* **2015**, *19*, 73-77, "Cultivation of Cellulose-Producing Bacteria in the Nanosheet Liquid Crystal of Na-fluorohectorite" Yamamoto, S.; Ohsedo, Y.; Yamada, E.; Sonoda, K.; Mita, H.; Miyamoto, N.
  21. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17068-71, "Accordion-like swelling of layered perovskite crystals via massive permeation of aqueous solutions into 2D oxide galleries" Song, Y.; Iyi, N.; Hoshide, T.; Ozawa, T. C.; Ebina, Y.; Ma, R.; Miyamoto, N.; Sasaki, T.
  22. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11558–11561, "Surfactant-Directed Synthesis of Mesoporous Pd Films with Perpendicular Mesochannels as Efficient Electrocatalysts" Li, C.; Jiang, B.; Miyamoto, N.; Kim, J. H.; Malgras, V.; Yamauchi, Y.
  23. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1230-1233, "In situ observation of the evaporation-induced self-assembling process of PS-*b*-PEO diblock copolymers for the fabrication of titania films by confocal laser scanning microscopy" Kimura, T.; Shintate, M.; Miyamoto, N.
  24. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4222-5, "Polymeric micelle assembly with inorganic nanosheets for construction of mesoporous architectures with crystallized walls" Bastakoti, B. P.; Li, Y.; Imura, M.; Miyamoto, N.; Nakato, T.; Sasaki, T.; Yamauchi, Y.
- [学会発表] (計 136 件)
1. 宮元展義, 安樂信哉, 山口直哉, Cyrus R. Safinya, Laurent J. Michot<sup>3</sup>, Erwan Paineau<sup>4</sup>, Patrick Davidson<sup>4</sup> "DNA/粘土鉱物ナノシート混合系でのメソスケール構造形成" 高分子基礎研究会 2017, 敦賀, 招待講演
  2. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystal phase of Inorganic nanosheet colloid and their applications" US-Japan Workshop 2018 on Functional Soft-Materials and Nano-Composites, February 2018, Colorado Boulder Univ, USA, 招待講演
  3. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline inorganic nanosheets meet with exotic biomatters" Invited seminar at Columbia University, March 2018, Columbia Univ., USA, 招待講演
  4. 山本伸也, 宮元展義 "構造色を持つナノシート液晶" 平成 29 年度物理化学インターカレッジセミナー 兼 油化学界面科学部会九州地区講演会, January 2018, 由布院, 招待講演
  5. 宮元展義 "無機ナノシートソフトマテリアル: 液晶と構造色とゲル" 信州大学セミナー, 2017 年 10 月, 上田, 招待講演
  6. 宮元展義, 稲富巧, 浦山健二 "電場により巨視的に配向した無機ナノシート液晶と複合化された pNIPA ゲル" 高分子学会討論会, Sept. 2017, 愛媛, 招待講演
  7. Nobuyoshi Miyamoto "Structural colors of inorganic nanosheet liquid crystals" France-Japan Workshop 2017 on Nanomaterials and Soft Materials, July 2017, Paris, France, 招待講演
  8. Nobuyoshi Miyamoto "Séminaire, Bayreuth University, July 2017, Bayreuth, Germany, 招待講演
  9. Nobuyoshi Miyamoto "Soft inorganic materials: the liquid crystalline colloids of inorganic nanosheets with ultra-high aspect ratio" Séminaire, Institut de Physique de Rennes, July 2017, Rennes, France, 招待講演
  10. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline colloids of inorganic nanosheets"

- Séminaires Matière Molle, LPS, Univerasié Paris Sud, July 2017, Paris, France, 招待講演
11. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystal phase of inorganic nanosheet colloids and their applications" The 2nd Japan-Taiwan Joint Workshop on Nanospace Materials, Dec. 2016, NIMS, Japan, 招待講演
  12. 山本伸也、宮元展義 "粘土鉱物コロイドの構造色" 第60回粘土科学討論会, 2016年9月, 九大, 招待講演
  13. 宮元展義 "液晶性粘土コロイドを利用した新しい粘土/ポリマー複合体の合成" 第60回粘土科学討論会, 2016年9月, 九大, 招待講演
  14. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystal phase of inorganic nanosheet colloids and their applications" RIKEN CEMS Topical Meeting 2016 "Nanoparticles / Nanotubes / Nanosheets", 2016年9月, RIKEN, Saitama, Japan, 招待講演
  15. Nobuyoshi Miyamoto "Inorganic nanosheet liquid crystals and their applications" SPIE2016, Aug. 2016, San Diego, USA, 招待講演
  16. Nobuyoshi Miyamoto "Photothermal responsive gel of nanosheet-polymer composite" Workshop on smart polymers, Aug. 2016, Hulunbuir, China, 招待講演
  17. "Nobuyoshi Miyamoto ""Functional soft materials fabricated with inorganic nanosheets"" Workshop on smart polymers, Aug. 2016, Beijing Forestry University, China, 招待講演"
  18. Nobuyoshi Miyamoto "Liquid crystalline nanosheets and composite gel" The 1st FIT-ME Symposium, May 2016, Fukuoka, Japan, 招待講演
  19. 宮元展義 "無機ナノシート液晶の異方的な構造を活用した新材料合成" 日本化学会第96春季年会, Mar. 2016, 同志社大学 (京田辺市), 招待講演
  20. R. Guégan, N. Miyamoto "Liquid crystal mixtures made of nanosheets and nonionic surfactants"" EMN Meeting on Liquid Crystal, Feb. 2016, Orlando (USA), 招待講演
  21. "Nobuyoshi Miyamoto ""Liquid crystal phase of inorganic nanosheet dispersions and their applications"" 2016 Kumamoto Symposium on Two Dimensional Nanomaterials, Feb. 2016, Kumamoto Univ., 招待講演
  22. "宮元展義 ""レーザー共焦点顕微鏡および小角 X 線散乱による無機ナノシートコロイド 液晶の構造解析"" 信州コロイド&界面科学研究会
  23. 第1回研究討論会, 2015年10月, 信州大学, 招待講演"
  24. Nobuyoshi Miyamoto "Inorganic nanosheet

- liquid crystals: towards novel polymer composites, chemical actuators, electro-optical devices, and color materials" KOLLOQUIUM DES SFB 840, Oct. 2015, Bayreuth Univ., Germany, 招待講演
25. Nobuyoshi Miyamoto "Recent progress in liquid crystalline colloidal nanosheet systems: applications for chemical actuators and electro-optical devices" Seminar at Université Paris Sud, Sept. 2015, Université Paris Sud (France), 招待講演
  26. 宮元展義 "電場による液晶性粘土鉱物コロイドの配向とその固定化" 第59回粘土科学討論会, 2015年9月, 山口大, 招待講演
  27. Nobuyoshi Miyamoto, Takumi Inadomi "Anisotropic Poly(N-isopropylacrylamide) gel hybridized with liquid crystalline clay nanosheets aligned by alternative electric field" IMNC2015, June, 2015, National Taiwan University (Taiwan), 招待講演
  28. Régis Guégan, Denis Morineau, Samuel Guillot, Pascal Andrezza, and Nobuyoshi Miyamoto "Confinement effects induced by well-organized mesopores to liquid crystalline phases" IMNC2015, June, 2015, National Taiwan University (Taiwan), 招待講演
- その他 107 件

[図書] (計 4 件)

1. 中戸晃之; 宮元展義, 13章: 無機ナノシート液晶. In *CSJカレントレビュー25「二次元物質の科学」*, 日本化学会, Ed. 化学同人: 2017; pp 133-139.
2. Nakato, T.; Miyamoto, N., Chapter 13: Inorganic Nanosheet Liquid Crystals (in Japanese). In *CSJ current review*, Kagaku Dojin: 2017; pp 133-139.
3. Miyamoto, N.; Yamamoto, S., Chapter 7: Functional Layered Compounds for Nanoarchitectonics. In *Supramolecular Nanoarchitectonics*, Ariga, K.; Aono, M., Eds. Elsevier: 2017; pp 173-192.
4. Miyamoto, N.; Ohsedo, Y.; Nakato, T., Chapter 8: Colloidal nanosheets. In *Inorganic Nanosheets and Nanosheet-Based Materials*, Nakato, T.; Kawamata, J.; Takagi, S., Eds. Springer: 2017; pp 201-260.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fit.ac.jp/~miyamoto>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮元 展義 (Nobuyoshi Miyamoto)

福岡工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 80391267

### (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

浅沼 浩之 (Hiroyuki Asanuma)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：20282577

(4)研究協力者

なし