

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08816

研究課題名(和文) 効率の良い新規防疫用殺虫剤スクリーニングのための形質転換イエバエ系統の作出

研究課題名(英文) Establishment of transformed housefly strains for screening of effective insecticides for controlling medically important pest insects

研究代表者

葛西 真治 (Kasai, Shinji)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長

研究者番号：80332360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：微小昆虫や飼育が難しい昆虫の殺虫剤抵抗性遺伝子の機能解析のため、イエバエのゲノム編集技術の確立を試みた。white遺伝子をターゲットとしてイエバエの卵にガイドRNAをインジェクションした。その結果、野生型とは異なる白色眼を有する個体を得ることができ、私たちが確立したノックアウトの系がイエバエで働くことを確認することができた。次に、ピレスロイド系殺虫剤の作用点であるナトリウムチャンネルの選択的エクソン上に生じた抵抗性変異をノックアウトすることで、殺虫剤感受性が回復することを期待した新たなノックアウト試験を試みたが、卵が孵化し幼虫へと発育する過程を確認することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、イエバエのゲノム編集技術の確立を目的として行われた。イエバエの眼色(赤色)を司るwhite遺伝子のノックアウトを試みた結果、白色眼を有する個体の作出に成功し、インジェクションの系がうまく働いていることを明らかにした。イエバエは古くから飼育法が確立され、モデル昆虫あるいは実験動物として有効活用されてきた。ヒゼンダニやアタマジラミ、サンショウバエといった比較的飼育が難しかったり、微小で実験が容易ではない生物で確認された遺伝子変異について、イエバエ体内で再現して機能解析を行ったり、難飼育生物の殺虫剤抵抗性系統に有効な殺虫剤の生物検定を効率的に行う上で、大きなステップとなる成果と言える。

研究成果の概要(英文)：In order to characterize insecticide resistance genes that are detected in small insects and/or insects that are difficult to rear in the laboratory, we attempted to establish genome editing technology for house flies. Guide RNA designed from a part of white gene were injected into house fly eggs. As a result, we could obtain individuals with white eyes and thus we confirmed that the knockout system we established works in this insect species. Secondly, we attempted another knockout test with the expectation that pyrethroid susceptibility would be recovered by knocking out the resistance mutation that occurred on the alternative exon of the sodium channel gene, which is the target site of pyrethroid insecticides. Despite repeated injection of guide RNA and improvements in methods, we could not confirm any egg hatching and developing to larvae after the injections. It was suggested that the gene targeted in this study is an essential exon region for house fly survival.

研究分野：衛生昆虫学

キーワード：殺虫剤抵抗性 イエバエ ゲノム編集 CRISPR/Cas9 ノックアウト

## 1. 研究開始当初の背景

蚊やハエなど衛生害虫に用いられる防疫用殺虫剤は薬事法のもとで管理され、法律の上では医薬品に分類される。これに含まれるピレスロイド剤はイエバエや蚊、マダニ、アタマジラミ、疥癬、といった衛生害虫の殺虫剤(防疫用殺虫剤)の主翼を担っている。蚊取り線香の主成分にも用いられ、2014年のデング国内流行時にも用いられたピレスロイド剤は、光分解しやすいため環境残留性が低く、人畜毒性も低い(安全性が高い)ことから、これまで理想的な防疫剤とされてきた。国内で上市されているピレスロイド剤の種類はそれほど多くないが、試薬レベルでは30種類以上の原体が実験用に入手可能である。幸い我が国においてはゴキブリとトコジラミ、イエバエを除いた衛生害虫では抵抗性の問題は大きくなっていないが、今後の使用頻度によってはいずれ近い将来これらの殺虫剤が効果を発揮できなくなることが危惧される。事実、世界規模で見ると、すでに多くの国々の現場で抵抗性の問題が表面化しピレスロイド剤による防除が困難になりつつある。その一方で、これら防疫用殺虫剤のマーケットは日本においてはそれほど高くなく、安全性試験に膨大な時間と巨額の費用を要する新規殺虫剤の開発は製薬会社にとって行にくい状況となっている。このような状況を打開するためには、今数十種あるピレスロイド剤について、抵抗性昆虫に対する構造活性相関を明らかにして、そこから抵抗性害虫に卓越した薬効を示すのに必要な核となる構造を見出し、既存の薬剤を改良し、新たな薬剤を創製することが不可欠である。

*kdr*とはノックダウン抵抗性の略で、ピレスロイド剤の作用点である神経軸索のナトリウムチャンネル(VSSC)上に生じたアミノ酸変異が原因で強い殺虫剤抵抗性をもたらすものであり、そのような変異を有するナトリウムチャンネル遺伝子は*kdr*遺伝子と呼ばれる。イエバエからはこれまで全部で5種類の*kdr*遺伝子が報告されている。ある種の共通の化合物を有するピレスロイド剤はこれまで最強と言われたスーパー*kdr*型イエバエに対して、それ以外の一般的な*kdr*型イエバエよりもむしろ殺虫力が高いことが明らかにされ、同じピレスロイド剤でも抵抗性昆虫に対する毒性は大きく異なることが明らかになっている。

抵抗性機構の解明にはこれら5種のイエバエ由来*kdr*遺伝子を有する系統の作出が必須であるが、野外の蚊集団は*kdr*以外にも高活性化した解毒酵素を抵抗性機構として有する 경우가多く、バックグラウンドをそろえることが非常に難しい。それゆえ、それぞれの*kdr*単独の効果判定はパッチクランプを用いた複雑で時間を要する電気生理の研究を除いて不可能とされてきた。一方、近年ゲノム編集の技術が年々進歩し、いろいろな昆虫種で遺伝子改変が試みられるようになり、イエバエにおいても(正解的に報告事例はないが)実現可能な状況になってきた。

本研究では、殺虫剤感受性のイエバエとしてaabys系統を用いた。この系統は羽が突然変異によって退化し、飛翔することができないため、野外で生存することが不可能である上に、飛翔できないがために殺虫試験や電気生理学的研究に用いやすいという特徴がある。aabys系統の殺虫剤感受性レベルは極めて高く(ごく微量の殺虫剤で死亡する)、ナトリウムチャンネルに変異を有したaabys系統の変異体集団は生理的なバックグラウンドが極めて似ていることから、実験の再現性が高く、*kdr*遺伝子に特化した殺虫剤の有効性が高い精度で評価できることが期待される。野外において高度に抵抗性を発達させた集団は必ず*kdr*遺伝子を有していることから、結果として*kdr*を克服できる殺虫剤をスクリーニングすることは、抵抗性そのものを克服することにつながると予想される。

## 2. 研究の目的

殺虫剤感受性イエバエのナトリウムチャンネル遺伝子(*Vssc*)にゲノム編集技術を用いて殺虫剤抵抗性遺伝子変異を導入し、バックグラウンドが殺虫剤感受性系統で、*Vssc*のみ抵抗性型のイエバエ系統を作出することを目的とする。この技術の確立は、抵抗性イエバエに有効なピレスロイド剤が選抜されるだけでなく、抵抗性に強い殺虫剤の基本骨格を導き出す情報をもたらし、新たなピレスロイド剤の創製に結び付けられると考えられる。さらに、微小昆虫や難飼育昆虫の抵抗性型*Vssc*をイエバエの神経で発現させることで、殺虫試験が容易ではないこれらの衛生害虫に有効な薬剤のスクリーニングを、イエバエを用いて行えることが見込まれる。

## 3. 研究の方法

イエバエのゲノム編集技術を確立し*kdr*遺伝子を殺虫剤感受性系統に導入するために、以下の手順で実験を行うことを立案した。

CRISPR/CAS9の原理を用いたノックアウトの技術がイエバエに应用可能か検討する。すでに私たちの研究グループが蚊を用いて安定した成績を残しているCRISPR/CAS9法がイエバエの系に应用可能かを検討する。

CRISPR/CAS9の原理を用いて*kdr*型イエバエ系統の抵抗性の原因となっているアレルをノックアウトし、殺虫剤感受性が回復するか観察する。このアレルは*Vssc*の選択的スプライシングによるエクソン領域に含まれる。

## 4. 研究成果

眼色をつかさどる遺伝子 *white* をターゲットとして、イエバエのゲノムのノックアウトを試みた。まずはイエバエのゲノムプロジェクト情報をもとに *white* 遺伝子上にプライマーをデザインした(図1)。さまざまな組み合わせでPCRを行い、産物のクオリティーチェックを行った結果、非特定産物が確認されず、増幅効率が高かった組み合わせ(MdWhF1/MdWhR6)によるPCR産物のシーケンス解析を行った。シーケンス解析にはMdWhF3とMdWhR4プライマーを用いた。その結果、イエバエ4系統(中防、高槻、SRS、YPER)から*white*の配列を決定するとともに、コンセンサス配列を見出した(図2)。それをもとに*white*のガイドRNAをデザインし(図3)、イエバエの初期卵にCRISPR/Cas9タンパクとともにインジェクションした。私たちの研究グループはこれまで、ネッタイエカやネッタシマカの卵へのRNAインジェクションを継続的に行ってきたが、イエバエへのインジェクションは初めての試みであった。イエバエの卵殻は蚊の卵殻に比べて硬く、通常のキャピラリーでは破損しやすいことが判明した。キャピラリープラーの条件を検討することで、RNAのインジェクションが可能になることが明らかになった。その卵由来のゲノムDNAに挿入/欠失が入ったことがリアルタイムPCRの融解曲線法によって確認され、イエバエにおいてもCRISPR/Cas9の系でゲノム編集が可能であることが確認できた。そこで、インジェクションするガイドRNAの濃度やガラス管の形状などを微調整しながら、再度*white*遺伝子のノックアウトを試みた。その結果、白色眼を有する成虫を得ることに成功した(図4-6)。これにより、私たちが構築したインジェクションの系でイエバエの遺伝子のノックアウトが可能であることが明らかになった。

次に、ピレスロイド剤抵抗性イエバエ系統 Type-D を実験材料としてピレスロイド剤の作用点ナトリウムチャンネルの選択的スプライシングエクソンのノックアウトを試みた(図7)。この選択的スプライシングエクソンの存在が一部のピレスロイド剤に対する感受性を高めている仮説を検証するためである。数百個のイエバエ初期卵にインジェクションを試みたが、卵の生存率が極めて低く、稀に成長が認められた幼虫も羽化には至らなかった。インジェクションを行った卵よりゲノムDNAを抽出し、ターゲット領域をPCRで増幅後、融解曲線を得ることで挿入や欠失の有無を確認したところ、ノックアウトの形跡が伺える結果が得られた(図8)この選択的スプライシングエクソンがイエバエの生存に必須な領域である可能性が示唆された。一方で、ガイドRNAのインジェクション条件を変えることによって解決される可能性もあるため、3年間の研究計画を延長して4年目に再度条件を変えながら研究を継続した。4年目の最終年度は昨年度同様に *Vssc* の選択的スプライシングエクソン 17a をターゲットとし、ガイドRNAとCRISPR/Cas9タンパクを前年度よりも数を増やしてインジェクションしたが、前年度同様に幼虫の発育が確認されなかった。エクソン 17a は 17b と比べ、イエバエ体内での遺伝子発現量が低く、重要なエクソンではないのではないかと推測があったが、本研究の結果、実際はイエバエの発育に必須であり、ノックアウトすることが致死性の影響を及ぼした可能性が高いと考察された。



図1. イエバエ *white* 遺伝子とプライマー

イエバエのゲノムを鋳型としてMdWhF1とMdWhR6でPCRを行い、MdWhF3とMdWhR4を用いてシーケンス解析を行った。

Chubu1-4	1	ATAAAAAGCTATGGCTCTTGGCTTCGAATGAATCGGTGTCGAAAAAAGCTACTTACTCCTGGTATAAATTT	70
SRS3	1	ATAAAAAGCTATGGCTCTTGGCTTCGAATGAATCGGTGTCGAAAAAAGCTACTTACTCCTGGTATAAATTT	70
SRS4	1	ATAAAAAGCTATGGCTCTTGGCTTCGAATGAATCGGTGTCGAAAAAAGCTACTTACTCCTGGTATAAATTT	70
Takatsukil 3 4	1	ATAAAAAGCTATGGCTCTTGGCTTCGAATGAATCGGTGTCGAAAAAAGCTACTTACTCCTGGTATAAATTT	70
YPER3 4	1	ATAAAAAGCTATGGCTCTTGGCTTCGAATGAATCGGTGTCGAAAAAAGCTACTTACTCCTGGTATAAATTT	70
Chubu1-4	71	GGATGTTTTTCGGAGAAGTACATCAACCGGGGTCGAATTGGAAGCAGCTGATGAATCGAGTGAGGGGAGTG	140
SRS3	71	GGATGTTTTTCGGAGAAGTACATCAACCGGGGTCGAATTGGAAGCAGCTGATGAATCGAGTGAGGGGAGTG	140
SRS4	71	GGATGTTTTTCGGAGAAGTACATCAACCGGGGTCGAATTGGAAGCAGCTGATGAATCGAGTGAGGGGAGTG	140
Takatsukil 3 4	71	GGATGTTTTTCGGAGAAGTACATCAACCGGGGTCGAATTGGAAGCAGCTGATGAATCGAGTGAGGGGAGTG	140
YPER3 4	71	GGATGTTTTTCGGAGAAGTACATCAACCGGGGTCGAATTGGAAGCAGCTGATGAATCGAGTGAGGGGAGTG	140
Chubu1-4	141	TTCTGCAATGAGCGGCATATACCCAAACCCAGGAAGCATTAAATTAATAATGGTAAACATGATTTCCAAC	210
SRS3	141	TTCTGCAATGAGCGGCATATACCCAAACCCAGGAAGCATTAAATTAATAATGGTAAACATGATTTCCAAC	210
SRS4	141	TTCTGCAATGAGCGGCATATACCCAAACCCAGGAAGCATTAAATTAATAATGGTAAACATGATTTCCAAC	210
Takatsukil 3 4	141	TTCTGCAATGAGCGGCATATACCCAAACCCAGGAAGCATTAAATTAATAATGGTAAACATGATTTCCAAC	210
YPER3 4	141	TTCTGCAATGAGCGGCATATACCCAAACCCAGGAAGCATTAAATTAATAATGGTAAACATGATTTCCAAC	210
Chubu1-4	211	CGATTCAAGAAATAAATTTTCATTTACATTTTCCTTCCAGTCTGTGGCATTGCCATATCCGGGAGAACTA	280
SRS3	211	CGATTCAAGAAATAAATTTTCATTTACATTTTCCTTCCAGTCTGTGGCATTGCCATATCCGGGAGAACTA	280
SRS4	211	CGATTCAAGAAATAAATTTTCATTTACATTTTCCTTCCAGTCTGTGGCATTGCCATATCCGGGAGAACTA	280
Takatsukil 3 4	211	CGATTCAAGAAATAAATTTTCATTTACATTTTCCTTCCAGTCTGTGGCATTGCCATATCCGGGAGAACTA	280
YPER3 4	211	CGATTCAAGAAATAAATTTTCATTTACATTTTCCTTCCAGTCTGTGGCATTGCCATATCCGGGAGAACTA	280
Chubu1-4	281	CTAGCGGTTATGGGCAGCTCAGGAGCGGGTAAGACAACCTCTCTCAATGCCTTGGCTTTTCGTTCCGGCAC	350
SRS3	281	CTAGCGGTTATGGGCAGCTCAGGAGCGGGTAAGACAACCTCTCTCAATGCCTTGGCTTTTCGTTCCGGCAC	350
SRS4	281	CTAGCGGTTATGGGCAGCTCAGGAGCGGGTAAGACAACCTCTCTCAATGCCTTGGCTTTTCGTTCCGGCAC	350
Takatsukil 3 4	281	CTAGCGGTTATGGGCAGCTCAGGAGCGGGTAAGACAACCTCTCTCAATGCCTTGGCTTTTCGTTCCGGCAC	350
YPER3 4	281	CTAGCGGTTATGGGCAGCTCAGGAGCGGGTAAGACAACCTCTCTCAATGCCTTGGCTTTTCGTTCCGGCAC	350
Chubu1-4	351	GTGGTGAACCATCTCCCGTCCAGTATGCGTATGCTAAATGGTCTACCCGTCGATGCAAGGAAATGCA	420
SRS3	351	GTGGTGAACCATCTCCCGTCCAGTATGCGTATGCTAAATGGTCTACCCGTCGATGCAAGGAAATGCA	420
SRS4	351	GTGGTGAACCATCTCCCGTCCAGTATGCGTATGCTAAATGGTCTACCCGTCGATGCAAGGAAATGCA	420
Takatsukil 3 4	351	GTGGTGAACCATCTCCCGTCCAGTATGCGTATGCTAAATGGTCTACCCGTCGATGCAAGGAAATGCA	420
YPER3 4	351	GTGGTGAACCATCTCCCGTCCAGTATGCGTATGCTAAATGGTCTACCCGTCGATGCAAGGAAATGCA	420
Chubu1-4	421	GGCCCGCTGTGCCTATGTCCAACAGGATGATCTATTTCATTGGCTCACTGACGACACGAGAACATTTGAT	490
SRS3	421	GGCCCGCTGTGCCTATGTCCAACAGGATGATCTATTTCATTGGCTCACTGACGACACGAGAACATTTGAT	490
SRS4	421	GGCCCGCTGTGCCTATGTCCAACAGGATGATCTATTTCATTGGCTCACTGACGACACGAGAACATTTGAT	490
Takatsukil 3 4	421	GGCCCGCTGTGCCTATGTCCAACAGGATGATCTATTTCATTGGCTCACTGACGACACGAGAACATTTGAT	490
YPER3 4	421	GGCCCGCTGTGCCTATGTCCAACAGGATGATCTATTTCATTGGCTCACTGACGACACGAGAACATTTGAT	490
Chubu1-4	491	TTCCAAGCCACCGTTTCGCATGCCCGCTCCTATGAGTCAGAAACAAAAGATCCAAAGAGTCGATCAGGTTA	560
SRS3	491	TTCCAAGCCACCGTTTCGCATGCCCGCTCCTATGAGTCAGAAACAAAAGATCCAAAGAGTCGATCAGGTTA	560
SRS4	491	TTCCAAGCCACCGTTTCGCATGCCCGCTCCTATGAGTCAGAAACAAAAGATCCAAAGAGTCGATCAGGTTA	560
Takatsukil 3 4	491	TTCCAAGCCACCGTTTCGCATGCCCGCTCCTATGAGTCAGAAACAAAAGATCCAAAGAGTCGATCAGGTTA	560
YPER3 4	491	TTCCAAGCCACCGTTTCGCATGCCCGCTCCTATGAGTCAGAAACAAAAGATCCAAAGAGTCGATCAGGTTA	560
Chubu1-4	561	TACAGGATCTGCTGTTGGGTAATGTCAAATACCATTATGGTGTACCGGGTCGTGTAAGGGTTTGTG	630
SRS3	561	TACAGGATCTGCTGTTGGGTAATGTCAAATACCATTATGGTGTACCGGGTCGTGTAAGGGTTTGTG	630
SRS4	561	TACAGGATCTGCTGTTGGGTAATGTCAAATACCATTATGGTGTACCGGGTCGTGTAAGGGTTTGTG	630
Takatsukil 3 4	561	TACAGGATCTGCTGTTGGGTAATGTCAAATACCATTATGGTGTACCGGGTCGTGTAAGGGTTTGTG	630
YPER3 4	561	TACAGGATCTGCTGTTGGGTAATGTCAAATACCATTATGGTGTACCGGGTCGTGTAAGGGTTTGTG	630
Chubu1-4	631	GGTGGTGAACCTAAGCGTTTGGCTTTTGCTCGGAGCCCTAACCGATCCACCATTGCTGATATCGGAT	700
SRS3	631	GGTGGTGAACCTAAGCGTTTGGCTTTTGCTCGGAGCCCTAACCGATCCACCATTGCTGATATCGGAT	700
SRS4	631	GGTGGTGAACCTAAGCGTTTGGCTTTTGCTCGGAGCCCTAACCGATCCACCATTGCTGATATCGGAT	700
Takatsukil 3 4	631	GGTGGTGAACCTAAGCGTTTGGCTTTTGCTCGGAGCCCTAACCGATCCACCATTGCTGATATCGGAT	700
YPER3 4	631	GGTGGTGAACCTAAGCGTTTGGCTTTTGCTCGGAGCCCTAACCGATCCACCATTGCTGATATCGGAT	700
Chubu1-4	701	GAACCCACTCCGGCTCAGATTCTTTATGGCCACAGTGTGGTCCAGGTTTGAAGAAACTTTCCGCAAC	770
SRS3	701	GAACCCACTCCGGCTCAGATTCTTTATGGCCACAGTGTGGTCCAGGTTTGAAGAAACTTTCCGCAAC	770
SRS4	701	GAACCCACTCCGGCTCAGATTCTTTATGGCCACAGTGTGGTCCAGGTTTGAAGAAACTTTCCGCAAC	770
Takatsukil 3 4	701	GAACCCACTCCGGCTCAGATTCTTTATGGCCACAGTGTGGTCCAGGTTTGAAGAAACTTTCCGCAAC	770
YPER3 4	701	GAACCCACTCCGGCTCAGATTCTTTATGGCCACAGTGTGGTCCAGGTTTGAAGAAACTTTCCGCAAC	770
Chubu1-4	771	GCGGCAAGACCGTCATCCTTACCATACATCAACCTCCTCGGAGCTGTTGAGTTGTTTCGATAAAATTTCT	840
SRS3	771	GCGGCAAGACCGTCATCCTTACCATACATCAACCTCCTCGGAGCTGTTGAGTTGTTTCGATAAAATTTCT	840
SRS4	771	GCGGCAAGACCGTCATCCTTACCATACATCAACCTCCTCGGAGCTGTTGAGTTGTTTCGATAAAATTTCT	840
Takatsukil 3 4	771	GCGGCAAGACCGTCATCCTTACCATACATCAACCTCCTCGGAGCTGTTGAGTTGTTTCGATAAAATTTCT	840
YPER3 4	771	GCGGCAAGACCGTCATCCTTACCATACATCAACCTCCTCGGAGCTGTTGAGTTGTTTCGATAAAATTTCT	840
Chubu1-4	841	GCTCATGGCCGAGGGGAGAGTGGCCCTTCTTGGGCAC	876
SRS3	841	GCTCATGGCCGAGGGGAGAGTGGCCCTTCTTGGGCAC	876
SRS4	841	GCTCATGGCCGAGGGGAGAGTGGCCCTTCTTGGGCAC	876
Takatsukil 3 4	841	GCTCATGGCCGAGGGGAGAGTGGCCCTTCTTGGGCAC	876
YPER3 4	841	GCTCATGGCCGAGGGGAGAGTGGCCCTTCTTGGGCAC	876

図 2. イエバエ 4 系統の *white* 遺伝子配列の比較

# 1 CD.Cas9.BKVB9863.AA

Product	Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA, 2 nmol	Expected Ship Date
Purification	Standard Desalting	Guaranteed Yield
0.7 ODs = 2 nmol = 23.8 μgrams		
Length		
36		
Sequence	/AltR1/rGrG rGrAr rGrUr rUrGrC rUrGrC rArArU rGrArG rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	

図 3. *white* 遺伝子のノックアウト用にデザインされたガイド RNA



図4. *white* 遺伝子がノックアウトされたイエバエ (左、中) と野生型イエバエ (右)

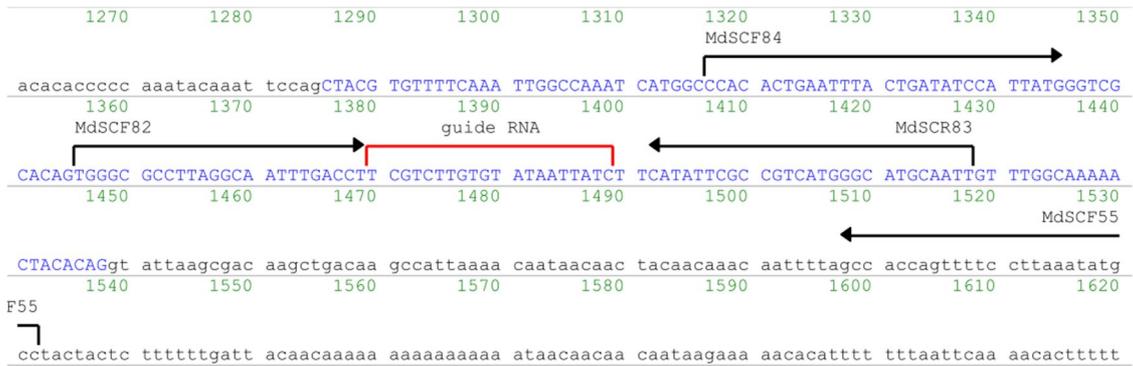


図7. イエバエのナトリウムチャンネルのエクソン 17a 上からデザインされたガイド RNA と、ノックアウトの確認用にデザインされたプライマー

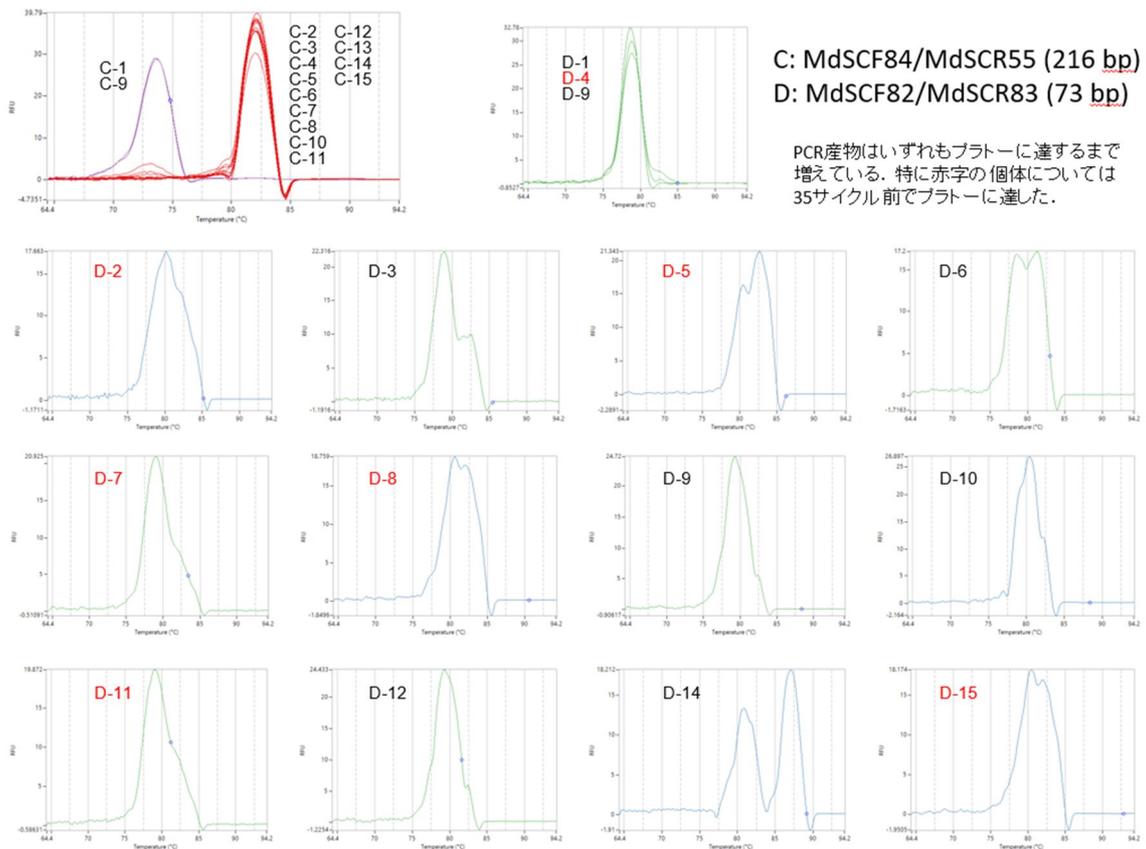


図8. ノックアウトの成否確認のために行ったりアルタイム PCR によるジェノタイピングの結果 融解曲線によりゲノム編集の有無を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富田 隆史  (Tomita Takashi)  (20180169)	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官   (82603)	
研究分担者	駒形 修  (Komagata Osamu)  (20435712)	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官   (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関