

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06021

研究課題名(和文) 異種間顕微授精によるトゲネズミ雄性2倍体胚由来ES細胞の樹立と配偶子形成の誘導

研究課題名(英文) Establishment of ES cells derived from androgenic diploid embryos produced by interspecific sperm injection and induction of gametogenesis

研究代表者

三谷 匡 (Mitani, Tasuku)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10322265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧動物であるトゲネズミの幹細胞の樹立を目的として、異種間顕微授精を用いた雄性2倍体胚由来ES細胞の樹立について検討した。ラットおよびモリアカネズミ精子をマウス除核卵子に顕微注入したが胚発生は停止した。そこで、マウス卵子の異種精子の受容能についてハイブリッド胚による解析を行った。その結果、モリアカネズミ精子では雄性前核の形成が遅延すること、先体酵素の除去処理により異種雄性前核の形成遅延が改善されることが明らかとなった。アマミトゲネズミ-マウス異種間体細胞核移植胚の作製とES細胞の樹立を試みた。しかし、胚盤胞への発生率は極めて低く、発生した胚盤胞からもntES細胞の樹立には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊治療で使われている顕微授精技術を用いて、マウス精子2個を核を除いたマウス卵子に注入してオスのゲノムのみからなる胚(雄性2倍体胚)を作製すると発生し、ES細胞を樹立することができる。絶滅危惧動物の保全を目的に、この方法を異種の精子に適応してES細胞の樹立を試みたが十分な成果には至らなかった。しかし、その原因究明のため異種精子の受容能を評価する目的で行ったハイブリッド胚を用いた解析は、異種精子由来雄性2倍体胚の発生能の予測の指標として有効な手法となる可能性がある。また、哺乳動物の種間の生殖隔離という生物学的な問いに関する新たな仕組みを探る手法となりうる興味深い研究成果である。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of establishing ES cells derived from androgenic diploid embryos produced by interspecific sperm injection, either rat or wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) sperm were microinjected into mouse enucleated oocytes, but embryonic development was arrested. Therefore, in order to verify the acceptance of heterologous sperm in mouse oocytes, hybrid embryos were analyzed. As a result, the formation of the male pronucleus was delayed in the wood mouse sperm, and the delay in the formation of the heterologous male pronucleus was improved by the removal of the acrosomal enzyme or the destabilization of the sperm cell membrane. Due to COVID-19, original research plan was changed to establish ES cells from the embryos of Ryukyu spiny rat using interspecific somatic cell nuclear transfer. However, its developmental ability to the blastocysts was extremely low, and ntES cells could not be established.

研究分野：生殖生物学

キーワード：雄性2倍体胚 ハイブリッド胚 ES細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南西諸島は生物多様性の宝庫であり、環境省では南西諸島の世界自然遺産登録へのロードマップを策定している(2021年5月、ユネスコの世界自然遺産に登録される見通しとなった)。南西諸島に生息するトゲネズミ(*Tokudaia*)属(1属3種)は、国の特別天然記念物であり、希少動植物種として種の保存法指定種となっている。そのうち、アマミトゲネズミとトクノシマトゲネズミは、雌雄ともにXO型という哺乳動物約4,500種の中でほとんど唯一の存在であり、また、オキナワトゲネズミもY染色体は存在するがSry遺伝子はすでに機能を失っている(Kimura et al., 2014)。このようにトゲネズミの学術的重要性は極めて高いが、絶滅危惧種であるがゆえに研究材料として容易に取り扱えるものではなく、その生殖生理も不明であり、人工繁殖技術も確立していない。野生動物や展示動物については、人工繁殖技術の延長として、また遺伝資源保存の一形態として、iPS細胞やクローン技術の取り組みが展開されているが、iPS細胞については、野生動物や展示動物では樹立条件の最適化が難しく、その成果は未だ限られている。また、異種間クローン胚からのES細胞の樹立も試みられてきたが、ほとんど成功していない。したがって、特異な性決定機構から世界的にも注目されるトゲネズミの幹細胞が開発されれば、性決定や配偶子形成機構を探索する強力なツールとなり、遺伝資源保存にも大きく貢献し、学術的、社会的インパクトは大きい。近年、創薬や遺伝学研究での有用性から、片親性半数体胚からのES細胞が開発されている(Leeb, et al., 2011, 他)が、申請者らもマウスにおいて人為的片親性2倍体胚(雌性、雄性)からのES細胞の樹立に成功している。トゲネズミ精巣は、事故死等により回収された個体より採取することが可能であることから、異種間顕微授精を用いて作製した雄性発生胚(卵子から核を取り除き精子を注入して発生させた胚)からのES細胞の樹立を着想するに至った。本研究は、新奇技術を駆使してトゲネズミの謎に迫り、科学的・文化的価値を社会に伝え啓蒙することに資する。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類でありながら“Y染色体を持たないトゲネズミ”の謎に迫るための強力なツールとなるES細胞を“異種間顕微授精による雄性2倍体胚”という新奇な発生工学的手法を駆使して開発し、異種間キメラ動物を用いてトゲネズミの性決定と配偶子形成の仕組みを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス除核卵子へのラットならびにモリアカネズミ精子の顕微注入による雄性2倍体胚の作製とES細胞の樹立

雄性2倍体胚の作製に供するレシピエント卵子はB6D2F1系統の雌マウス(*Mus musculus*)より過排卵処理により回収した。ドナー精子はラット(*Rattus norvegicus*)ならびにモリアカネズミ(*Apodemus sylvaticus*)の凍結精子を用いた。回収した卵子卵丘細胞複合体をヒアルロニターゼ処理により裸化しmCZB培地にて培養した。マウス卵子の除核操作は、サイトカラシンB(CB)で処理後、mCZB-HEPES/9%PVP下でピエゾマイクロマニピュレーターを用いて行った。凍結精子は融解後、超音波処理により頭部と尾部に分断した。精子の顕微注入はピエゾマイクロマニピュレーターを用いて行い、雄性2倍体胚を作製するため、1つの卵子に対し2個の精子頭部を注入した。胚の活性化処理は、mCZB-Ca²⁺-free+10mM SrCl₂, 5µg/mL CB培地により行い、その後、KSOM+AA培地にて体外培養した。

(2) マウス卵子における異種精子の受容能に関する検討

顕微授精に供する卵子は過排卵処理により回収した。ドナー精子はマウスならびにモリアカネズミの凍結精子を用いた。回収した卵子卵丘細胞複合体をヒアルロニターゼ処理により裸化しmCZB培地にて培養した。凍結精子は融解後、超音波処理により頭部と尾部に分断し、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いて顕微注入を行った。前核形成の促進効果について検討するため、一部の精子に対して超音波処理前に0.02% Triton X-100、1時間処理により先体除去処理を行った。卵子の活性化処理は、mCZB-Ca²⁺-free+10mM SrCl₂培地により行い、mCZB培地中で6時間体外培養した。前核の形成について、顕微注入後1時間間隔でサンプリングし、酸性タイロード処理により透明帯を除去後、固定、透過処理を行い、DAPIによる蛍光観察を行った。さらに、一部の胚は、mKSOM培地中で最長6日間培養した。異種間顕微授精胚のハイブリッドの判別は、2前核を形成し卵割を経て2細胞期に達した胚を用いて、マウスおよびモリアカネズミのGPR33遺伝子領域に対するRFLP解析により行った。

(3) 異種間顕微授精胚由来ES細胞の樹立

異種間顕微授精により胚盤胞に発生した胚を用いてES細胞の樹立を行った。酸性タイロード処理により透明帯を除去した胚盤胞をマウス胎子線維芽細胞より作製したフィーダー細胞上に播種し、Knockout-DMEM+20%KSR/LIF/2i(CHIR99021, PD0325901)培地にて培養した。胚が定着後、増殖が確認できた細胞塊を継代し、ES様細胞の形態を示す細胞株を樹立した。樹立したES様細胞株は、アルカリ性フォスファターゼ(ALP)染色、核型解析、免疫組織化学(Oct4, Nanog)により評価した。さらに、胚様体形成、神経細胞、脂肪細胞への分化能について検討した。

(4) 異種間体細胞核移植によるアマミトゲネズミ体細胞核移植胚の作製と ES 細胞の樹立

核移植に供するレシピエント卵子は、B6D2F1 系統の雌マウスより過剰排卵処理により回収した。ドナー細胞は、マウスについては B6C3F1 系統の雌マウスより回収した卵丘細胞を用いた。アマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*) については、成体尾部より調製した初代培養線維芽細胞を用いた。回収した卵子卵丘細胞複合体をヒアルロニターゼ処理により裸化し mCZB 培地にて培養した。マウス卵子の除核操作は、CB 処理後、mCZB-HEPES/9%PVP 下でピエゾマイクロマニピュレーターを用いて行った。ドナー細胞をピエゾマイクロマニピュレーターで注入後、約 1 時間培養した卵子は早期染色体凝集 (PCC) を確認し、mCZB-Ca²⁺-free+SrCl₂/CB 培地で 3 時間、mCZB-CB で 3 時間培養することにより活性化処理を行った。一部の体細胞核移植胚については、PCC 確認後、上記の処理にトリコスタチン A (TSA) 5nM を加え (Kishigami *et al.*, 2006) さらに 4 時間 mCZB-TSA 培地で培養し、以後は KSOM-AA 培地で培養した。

4. 研究成果

(1) マウス除核卵子へのラット精子異種間顕微授精によるラット雄性 2 倍体胚の作製と ES 細胞の樹立

本課題において、トゲネズミ精子を想定した異種間モデル実験としてラットの利用を計画していたが、ラット精子を用いた異種間雄性 2 倍体は前核形成ののち発生を停止した。そこで、ラットに代わる異種齧歯類としてモリアカネズミに変更した。モリアカネズミは系統的にラットよりもトゲネズミに近縁であり、ES 細胞の樹立 (Wang *et al.*, 2010) やマウス胚とのキメラ形成能 (Xiang *et al.*, 2008) も確認されていることから、異種のモデルとして適していると考えられた。

モリアカネズミ精子を除核マウス卵子に顕微注入し雄性 2 倍体胚を作製した。しかしながら、モリアカネズミの精子はマウスの精子と比較してサイズが大きく、精子頭部を 2 個注入することで卵子へのダメージがかかり、生存数が減少した。精子注入後、生存卵子では前核の形成と両前核の融合は認められたものの、すべて発生を停止した。モリアカネズミ精子頭部には鎌状のかぎのような構造があるが、これは精子が連結し、卵子までの移動を行うために形成された部位であり、マウスにはない形態である。そのため、精子注入用ピペットの先端を大きくしたことでマウス卵子への負担が増大したと考えられた。したがって、マウス卵子への負荷を軽減し精子頭部を効率よく注入する工夫が必要である。また、本実験では、従前に実証していたマウス雄性 2 倍体胚由来 ES 細胞の樹立結果を参考に、雄性 2 倍体胚の活性化処理において TSA 処理を併用しなかった。ウシの受精卵では雄性の前核が形成されてから 2 細胞期までに到達する間にエピジェネティックな機構がはたらいっており、ウシ雄性 2 倍体胚では TSA 添加はこの機構に作用することで発生率が向上したと考えられている (Zhang *et al.*, 2014)。マウスではこのような機構がみられないため TSA の効果は認められなかったが、モリアカネズミにおいては不明であるため、卵子活性化処理における TSA の併用について検討する必要がある。

(2) 異種間顕微授精によるマウス卵子における異種精子の受容能に関する検討

ラット精子、モリアカネズミ精子いずれの場合も、除核マウス卵子へ顕微注入した雄性 2 倍体胚では前核形成はみられたものの、すべて前核期で発生を停止した。このことから、種や属を超えたこれらの精子をマウス卵子が受容しない可能性が考えられた。しかしながら、自然界において種を超えた交配 (交雑) の例はたびたびみられる。また、マウスの半数体 ES 細胞とラットの半数体 ES 細胞を用いて電気融合によりハイブリッド ES 細胞を作製した例もあり (Li *et al.*, 2016) 系統樹的にはモリアカネズミよりも遠縁のラットとのハイブリッドの例がすでに実証されている。また、核移植においても異種の体細胞核を受け入れる場合、卵子側のゲノムを残すことで前核が形成され、発生が改善することが報告されている。そこで、マウス卵子がモリアカネズミ精子を受容しうるか検証するために、異種や異属間で生まれるハイブリッド個体の存在に着目し、マウス卵子の除核を行わずモリアカネズミ精子を 1 つ顕微注入したハイブリッド胚を作製し、その胚発生について検討した。

モリアカネズミ精子頭部をマウス卵子に注入した際、マウス雌性前核の形成に対してモリアカネズミ雄性前核の形成において精子頭部の膨化に遅延がみられることが明らかとなった。Triton X-100 (TX) 処理による先体酵素の除去および精子細胞膜の不安定化が前核形成を促し胚の発生率を改善する (Zambrano *et al.*, 2016) ことが報告されていることから、同処理を施したモリアカネズミ精子の前核形成過程について検討した。その結果、TX 処理異種間顕微授精卵子において、活性化処理後 2-3 時間での精子頭部の膨化および 2 前核の形成過程が観察され、マウス同種間顕微授精卵子の雄性前核形成に近似した過程を辿ることが明らかとなった。しかしながら、既報とは異なり、TX 処理を施した顕微授精卵子の胚発生能の改善は認められなかった。次に、2 前核を形成し卵割が進行した胚がハイブリッドであることを確認するため、マウスおよびモリアカネズミの *GPR33* 遺伝子領域に対する RFLP 解析を行った結果、異種間顕微授精由来 2 細胞期胚はマウスおよびモリアカネズミの *GPR33* 遺伝子を持していることが示された。さらに、2 前核を形成した胚はマウス胚、モリアカネズミ - マウスハイブリッド胚ともに、約 30% が胚盤胞に発生した。

(3) 異種間顕微授精によるハイブリッド胚由来 ES 細胞の樹立

モリアカネズミ - マウスハイブリッド胚より ES 細胞の樹立を行った。モリアカネズミ精子をマウス卵子へ顕微注入後、ヘキスト 33342 を用いて精子頭部の形態を観察した結果、モリアカネ

ズミ精子の前核形成を認めた。前核の数については、1~3個の前核が確認された。注入後の生存卵子を体外培養したところ、2細胞期までの発生率は81%と高かったものの、4細胞期へ発生した胚は38%と低下した。しかし、その後はほとんどが胚盤胞へと発生した。胚盤胞に達した16個の胚のうち、11個はDay5もしくはDay6において得られた胚盤胞であり発生遅延がみられた。Day6で得られた胚盤胞の形態は胞胚腔が小さく、内部細胞塊の細胞量も比較的少ないものが多かったが、Day5で得られた胚盤胞の外観は標準的なDay4のマウス胚盤胞と同様であった。ハイブリッド胚盤胞をマウスフィーダー細胞上で培養することにより、14株のES様細胞が樹立された。ES様細胞株はいずれもALP染色、免疫組織化学染色(Nanog, Oct4)で陽性を示し、体外分化誘導により胚様体を形成し、心筋細胞や脂肪細胞への分化能を示した。しかしながら、核型解析(マウス:2n=40本、モリアカネズミ:2n=48本)において、ES様細胞は理論値となる44本を示さず、いずれの細胞株も40本付近に偏っていた。これらの結果から、異種間顕微授精によりハイブリッド胚を作製することは可能である一方、胚発生の際に染色体の脱落現象が生じている可能性が示された。

(4) 異種間体細胞核移植によるアマミトゲネズミ体細胞核移植胚の作製とES細胞の樹立

本研究では、異種間顕微注入により作製する雄性2倍体胚からのES細胞の樹立を目的としているが、COVID-19の影響により大幅な研究計画の変更を余儀なくされた。そこで、異種間体細胞核移植によるトゲネズミ体細胞核移植胚の作製とi-ntES細胞(interspecific nuclear transfer-derived ES cells)の樹立について試みた。アマミトゲネズミ尾部由来初代培養線維芽細胞を核型解析した結果、正常率(2n=25)は90%であった。対照区としてB6C2F1マウス卵丘細胞をドナー細胞とした体細胞核移植胚では、73.4%が2細胞期胚へと発生し、その後、桑実胚へは47.9%、胚盤胞へは28.9%が発生した。一方、アマミトゲネズミ体細胞核移植胚では、2細胞期胚へ発生したものは30.0%であったが、4細胞期胚へは2.8%と大幅に低下し、胚盤胞に発生した胚は1.0%(2個)であった。胚盤胞にまで発生した胚からi-ntES細胞の樹立を試みたが、フィーダー細胞上への内部細胞塊の接着・増殖が悪く、コロニー形成には至らなかった。以上の結果から、トゲネズミ-マウス異種間体細胞核移植胚の発生能は2~4細胞期で急激に失われること、発生した胚盤胞からのES細胞の樹立は困難であることが示された。したがって、本申請で提案するような、異種間体細胞移植に代わる新規の幹細胞の樹立技術の開発が求められる。

今後、異種精子を用いた雄性2倍体胚の発生能を獲得させるうえで、ハイブリッド胚の基礎的な研究は有効であると考えられる。本研究において、顕微注入により人為的に取り込まれた異種精子はマウス卵子内で前核形成に遅延が生じることが明らかとなったが、前核形成過程を同期化させる処理を施すことでハイブリッド胚の発生能が獲得される可能性がある。さらに、ハイブリッド胚における染色体の脱落現象の可能性が示されたが、マルチカラー染色体ペインティングによるFISH解析を行い、マウスとモリアカネズミ染色体の構成について検討する必要がある。また、種差による異種精子の適合性を測る上で、マウス近縁種である同属異種のオキナワハツカネズミ(*Mus caroli*)や亜種のアルジェリアハツカネズミ(*Mus spretus*)による比較評価は有効である。このように、ハイブリッド胚を用いた異種精子の受容能や胚発生能の評価は、異種間体細胞核移植胚や異種精子由来雄性2倍体胚の発生能の予測の指標として派生的な成果へと発展する可能性がある。また、種の分岐における生殖隔離に関する新たな仕組みを探る糸口となりうる。これらの研究は、絶滅危惧種や展示動物の幹細胞樹立の新規技術を創出し、生物多様性の保全に資する技術の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 MORITA Kohtarō, TOKORO Mikiko, HATANAKA Yuki, HIGUCHI Chika, IKEGAMI Haruka, NAGAI Kouhei, ANZAI Masayuki, KATO Hiromi, MITANI Tasuku, TAGUCHI Yoshitomo, YAMAGATA Kazuo, HOSOI Yoshihiko, MIYAMOTO Kei, MATSUMOTO Kazuya	4. 巻 64
2. 論文標題 Peroxiredoxin as a functional endogenous antioxidant enzyme in pronuclei of mouse zygotes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 161 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 TOGAWA Taisuke, ADACHI Tohru, HARADA Daijiro, MITANI Tasuku, TANAKA Daisuke, ISHIZAKI Kimitsune, KOHCHI Takayuki, YAMATO Katsuyuki T.	4. 巻 131
2. 論文標題 Cryopreservation of Marchantia polymorpha spermatozoa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 1047 ~ 1054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-018-1059-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YAMAGATA K, NAGAI K, MIYAMOTO H, ANZAI M, KATO H, MIYAMOTO K, KUROSAKA S, AZUMA R, KOLODENZNIKOV I I., PROTOPOPOV A V., PLOTNIKOV V V., KOBAYASHI H, KAWAHARA-MIKI R, KONO T, UCHIDA M, SHIBATA Y, HANDA T, KIMURA H, HOSOI Y, MITANI T, MATSUMOTO K, IRITANI A	4. 巻 9
2. 論文標題 Signs of biological activities of 28,000-year-old mammoth nuclei in mouse oocytes visualized by live-cell imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40546-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 城ヶ原貴通, 中家雅隆, 池村茂, 越本知大, 坂本信介, 橋本琢磨, 三谷匡, 黒岩麻里, 山田文雄.	4. 巻 60
2. 論文標題 トクノシマトゲネズミ(<i>Tokudaia tokunoshimensis</i>)の生息記録と2005年~2016年の分布.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 哺乳類科学	6. 最初と最後の頁 105 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 NAKANO Tatsuya, KONO Mizuki, SEGAWA Kazuki, KUROSAKA Satoshi, NAKAOKA Yoshiharu, MORIMOTO Yoshiharu, MITANI Tasuku	4. 巻 67
2. 論文標題 Effects of exposure to methylglyoxal on sperm motility and embryonic development after fertilization in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 123 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 MITANI T
2. 発表標題 Visualization of the chromosomal organization using 3D-FISH in fertilized eggs.
3. 学会等名 The 10th Japan-Korea ART Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 OKUMURA I, MINOBE K, MITANI T, KUROSAKA S.
2. 発表標題 Transcriptional activity and morphological changes of somatic cell nuclei transferred into germinal vesicle stage oocytes.
3. 学会等名 American Society for Cell Biology Annual Meeting (ASCB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野達也, 黒坂哲, 中岡義晴, 森本義晴, 三谷匡.
2. 発表標題 終末糖化産物の中間体であるメチルグリオキサールが卵子の質の低下を引き起こす.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美濃部晃平, 奥村樹, 三谷匡, 黒坂哲.
2. 発表標題 GV期卵母細胞に核移植された体細胞核の転写活性および形態変化.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 南直次郎, 三谷匡, 黒坂哲, 藤井渉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 351 (掲載頁331-339)
3. 書名 繁殖生物学 (改訂版) 第6章 5 「遺伝子改変動物」	

〔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	田辺 秀之 (TANABE Hideyuki) (50261178)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授 (12702)	
研究分担者	岡村 大治 (OKAMURA Daiji) (80393263)	近畿大学・農学部・講師 (34419)	

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
---------	---------