

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06333

研究課題名(和文) 恐怖条件付けにおける小脳の役割の解明

研究課題名(英文) The analysis of the function of cerebellar neural circuitry in fear conditioning

研究代表者

清水 貴史 (Shimizu, Takashi)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：50324760

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)：本研究では、ゼブラフィッシュをモデル動物として小脳神経回路の恐怖条件づけにおける役割の解明を試みた。ゼブラフィッシュ成魚は電気ショックなどの恐怖を伴う刺激(無条件刺激)とライトの点灯などの無害な刺激(条件刺激)を繰り返し与えると両者の関連を学習し、条件刺激のみで逃避行動(能動的回避学習)をとる。小脳神経回路を阻害した魚においてこの学習が著しく低下していたことから、自由遊泳下の恐怖条件付けに小脳が重要な働きをしていることが明らかとなった。また、小脳神経回路阻害魚において社会性行動に異常が観察された。以上のことから、小脳は恐怖条件付け、回避学習や社会性行動に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ゼブラフィッシュを用いて小脳神経回路が恐怖条件付けや回避学習に関与していることを明らかとした。自由遊泳下では恐怖応答に関与する連合学習に小脳神経回路が重要な役割を果たしていると考えられた。さらにゼブラフィッシュにおいても社会性行動に小脳神経回路が関与しており、社会性行動の神経基盤は魚類から哺乳類に到るまで保存されている可能性が示唆された。また、これらの結果は自閉症などの神経疾患の原因解明に有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we attempted to elucidate the role of cerebellar neural circuits in fear conditioning using zebrafish as a model animal. When adult zebrafish are repeatedly exposed to fearful stimuli such as electric shocks (unconditioned stimuli) and harmless stimuli such as lights (conditioned stimuli), they learn the relationship between the two stimuli and show escape behavior when only conditioned stimuli are given. In fish whose cerebellar neural circuits were inhibited, this learning was significantly reduced, indicating that the cerebellum plays an important role in fear conditioning. In addition, social behaviors of the fish with inhibited cerebellar neural circuits were observed to be impaired. These results suggest that the cerebellum is involved not only in motor learning but also in fear conditioning and social behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 恐怖条件付 神経回路 ゼブラフィッシュ 社会性行動 回避学習

1. 研究開始当初の背景

哺乳類においては、過去に経験した恐怖に対する行動は、扁桃体や海馬などの大脳辺縁系が関与している。特に扁桃体が、恐怖情動に関連した記憶に重要な役割をしている。一方、魚類においても扁桃体と発生学的、形態学的に相同な領域が終脳に存在する。恐怖体験に関連した記憶は、恐怖条件付けという実験手法を用いて研究されてきた。この実験は、音や光などの本来無害な刺激（条件刺激;CS）と電気ショックなど恐怖を伴う刺激（無条件刺激;US）を対にして繰り返し提示することによって、条件刺激に対してすくみや心拍の変化など恐怖反応が誘発され、条件付けが成立するものである。また、古典的恐怖条件付けとオペラント条件付けの要素を含む回避学習にも、これらの神経回路が関与している。回避学習とは、条件刺激と無条件刺激を対にして提示した後、条件刺激のみで回避行動をとるようになる学習である。哺乳類だけではなく、魚類における扁桃体相同領域の破壊実験によって条件付け回避学習の阻害が見られることから、哺乳類と同様の恐怖応答に関与する神経回路が存在すると考えられている (J Neurosci.24 3335,2004)。さらに、近年の研究で扁桃体以外にも、小脳が恐怖情動による適応運動にも関与していることが明らかにされた。以前より、小脳は感覚情報と運動に連動した二つの入力情報を統合することにより、円滑な運動の制御や運動学習に必須の役割を果たしていると考えられていた。運動学習における小脳パーセプトロン仮説では、苔状線維刺激が多数存在する顆粒細胞(GC)に分散表現される。多数の平行線維(PF)からプルキンエ細胞(PC)樹状突起へのシナプス荷重が、1本の登上線維の刺激を教師信号としてそれぞれの入力に応じて変化し、学習が行われると考えられる。登上線維と苔状線維からの同時刺激により、平行線維-プルキンエ細胞間シナプス長期抑圧(LTD)が発見され、この仮説が支持された (Nat Rev Neurosci.9 304,2008)。プルキンエ細胞で統合された情報は小脳核(魚類では、広樹状突起細胞;EC)に伝えられ、さらに小脳外へと出力される。小脳による運動学習は、条件付け瞬目反射や前庭動眼反射などの実験で解析され、記憶の獲得、維持には小脳核が重要であり、一方プルキンエ細胞は記憶の発現に関与していることが報告されている(図1、Neurosci.162 723,2009)。これまでのゼブラフィッシュを用いた研究で、小脳が恐怖条件付けに関与し、条件付け中に顆粒細胞の活性が変化することを見出した。これは、顆粒細胞におけるコーディングの変化が恐怖学習に重要であることを示唆する新規の知見である。さらに小脳顆粒細胞の一部を阻害することによって、条件反応(徐脈、図2)からの回復が遅れた。しかし、恐怖条件付けにおける小脳の記憶形成機構の詳細はよくわかっていない。また、恐怖情動に対する反応における小脳の普遍的な役割は不明であり、恐怖応答における小脳と扁桃体との関係も明らかではない。また、社会性行動と小脳神経回路の関係が示唆される知見が得られてきた。自閉症のモデルとして社会性行動に異常をきたすマウスには、小脳神経回路における異常を示すものが存在する。小脳と他の脳部位の機能的な接続に異常をきたし、結果として社会性行動に変化が観察される (Nature Neurosci.20 1744,2017)。ゼブラフィッシュが、社会性行動解析に有用であることが報告 (Disease Models&Mechanisms12,2019)されているので、小脳と自閉症の関連を解析するモデルとなりうると考えられた。

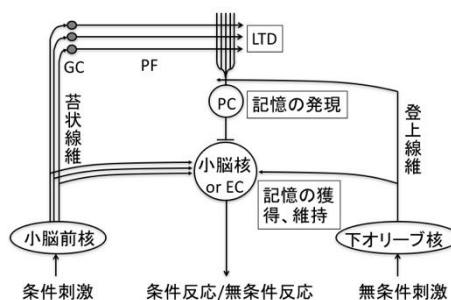


図1. 条件付け学習の小脳核神経回路

小脳による運動学習は、条件付け瞬目反射や前庭動眼反射などの実験で解析され、記憶の獲得、維持には小脳核が重要であり、一方プルキンエ細胞は記憶の発現に関与していることが報告されている(図1、Neurosci.162 723,2009)。

これまでのゼブラフィッシュを用いた研究で、小脳が恐怖条件付けに関与し、条件付け中に顆粒細胞の活性が変化することを見出した。これは、顆粒細胞におけるコーディングの変化が恐怖学習に重要であることを示唆する新規の知見である。さらに小脳顆粒細胞の一部を阻害することによって、条件反応(徐脈、図2)からの回復が遅れた。しかし、恐怖条件付けにおける小脳の記憶形成機構の詳細はよくわかっていない。また、恐怖情動に対する反応における小脳の普遍的な役割は不明であり、恐怖応答における小脳と扁桃体との関係も明らかではない。

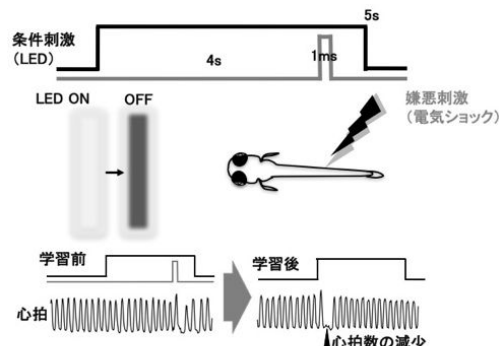


図2. 心拍の変化を用いた遅延恐怖条件付け

また、社会性行動と小脳神経回路の関係が示唆される知見が得られてきた。自閉症のモデルとして社会性行動に異常をきたすマウスには、小脳神経回路における異常を示すものが存在する。小脳と他の脳部位の機能的な接続に異常をきたし、結果として社会性行動に変化が観察される (Nature Neurosci.20 1744,2017)。ゼブラフィッシュが、社会性行動解析に有用であることが報告 (Disease Models&Mechanisms12,2019)されているので、小脳と自閉症の関連を解析するモデルとなりうると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでにあまり解析されていなかった古典的恐怖条件付けや恐怖刺激に対する回避学習における小脳の役割を解析することを目的とした。恐怖条件付けにおける小脳の役割については知見が少なく、恐怖条件付けの研究と小脳神経回路形成機構の研究を統合することによって、記憶のメカニズムについて新たな知見が得られると考えられた。さらに、回避学習は恐怖に対する応答に加え、オペラント条件付けの要素も含んでおり、古典的恐怖条件付けとは異なる神経回路が関与している可能性がある。また、社会性行動と小脳神経回路の関係が示唆される知見が得られてきたことから、ゼブラフィッシュにおける社会性行動と小脳機能の関連を解析することを試みた。

3. 研究の方法

(A) 実験に使用する遺伝子改変 Tg の作成

各種の小脳ニューロン活性をモニターあるいは改変する遺伝子を発現する Tg を作成した。

(a) 小脳ニューロン特異的 Tg 系統 (以前の研究で作成済み)

全脳ニューロン; 1 系統 (*elav3* プロモーター)、プルキンエ細胞; 1 系統 (*aldoca* プロモーター)、顆粒細胞; 2 系統 (小脳の領域特異的 Gal4 系統、152B、*cb1n12* プロモーター)。

(b) ニューロンの活性をモニターあるいは改変する遺伝子の導入

以下の遺伝子を小脳ニューロン特異的エンハンサーあるいは Gal4-UAS システムによって発現する Tg を作成する。BoTxBLC-GFP(ボツリヌス毒素): シナプス伝達阻害、GCaMP7a(Ca²⁺インジケーター): 神経活動をモニター、GCaMP6s(Ca²⁺インジケーター): 神経活動をモニター、Voltron(電位センサー): 神経活動をモニター、ChRWR (改良型チャンネルロドプシン): 青色光照射でニューロンを活性化、GtCCR4(チャンネルロドプシン): 青色光照射でニューロンを活性化、GtACR2(アニオンチャンネル): 青色光照射でニューロンを抑制、NTR-TagRFPT : メトロニダゾール(MTZ)処理によって細胞死を起こすニトロレダクターゼをプルキンエ細胞に発現する系統。

(B) 記憶に関与するニューロンの同定 (心拍の変化を条件反応とした古典的恐怖条件付け)

アガロースに拘束したゼブラフィッシュ仔魚に対して、白色 LED あるいは赤色 LED の消灯を条件刺激として、体表への電気ショックを無条件刺激として提示した。条件反応として心拍の低下 (徐脈) を測定した (図 2)。生後 7 日目から 20 日目の仔魚を用いて条件付け学習を測定して、どの発達段階で記憶を獲得する能力を得るのか調べる。以前の研究では、小脳体の一部の顆粒細胞をボツリヌス毒素で阻害した Tg で恐怖条件付けを行い、応答反応の持続が観察された。全プルキンエ細胞や全顆粒細胞、小脳体以外の顆粒細胞にボツリヌス毒素を発現する Tg で恐怖条件付けパラダイムを行い、小脳のどの領域のどのようなニューロンが関与しているかを解析した。また、光遺伝学的手法を用いて恐怖条件付け中のニューロンの活性を変えることによる影響を解析した。ChRWR や GtACR をプルキンエ細胞や様々な小脳領域の顆粒細胞に発現させる。条件付けパラダイムのうち学習中あるいは学習後にそれぞれの細胞に領域特異的に光を照射して活性を変化させた後、記憶形成や消失がどのように変化するかを検討する。

(C) 能動的回避学習

狭い通路を通じて往来できる 2 つのコンパートメントに分割された水槽に魚を入れる。魚のいる方のコンパートメントに緑色 LED (CS) を 15 秒間点灯し、LED が点灯している間に他のコンパートメントに移動しなければ点灯開始から 10 秒後に US (電気ショック) を与える試行を繰り返す。このような試行を繰り返すと魚は CS に反応して反対側のコンパートメントへの回避行動をとることが知られている。回避学習の成立の条件は、CS と US をセットで与えるトレーニングセッションを 3 回、その後 CS のみを与えるテストセッションを行った。トレーニングセッションにおいて連続した 10 回のうち 8 回、回避行動を行った場合に次のセッションに進み、テストセッションで成功した個体を学習個体とした。このような能動的回避学習を各種小脳ニューロン阻害魚で行った。各種小脳ニューロン阻害 Tg において古典的恐怖条件付けと能動的回避学習に反応の違いがあるのかを調べる。これらの比較から、恐怖情動に対する応答における小脳の普遍的役割を解明する。

(D) 変異体における恐怖条件付けの解析

CRISPR/Cas9 法によって小脳ニューロンに発現している遺伝子の変異体を作成した。*aldoca*、*ca8(carbonic anhydrase VIII)*、*grid2(glutamate receptor, ionotropic, delta2)* 変異体を作成した。

(E) 恐怖条件付けにおける小脳と扁桃体相同領域の関係

恐怖条件付けにおける小脳と扁桃体を含む終脳領域の神経活動の関係を調べる目的で以下の実験を行う。全脳ニューロンに GCaMP を発現する Tg 系統を用いて、恐怖条件付けにおける小脳と終脳の同時 Ca²⁺イメージングを行う。さらに終脳の領域特異的神経阻害 Tg や領域特異的 GCaMP 系統を用いてイメージングして、終脳のどの領域がいつ、どのように関与するのか明らかとする。また、扁桃体領域を光遺伝学的に活性化した時の小脳の活性変化、あるいは小脳を活性化した時の終脳の反応を解析する。

(F) 同調行動

機能性液晶フィルムで隔てた互いに見えない 2 つの水槽に魚を一匹ずつ入れ、馴化させた後 5 分間動画を撮影した (図 3)。その後、互いの魚が見えるようにしてさらに 5 分間動画を撮影した。撮影した動画から魚をトラッキングして滞在場所と頭の向きを算出し、同調行動をしている時間を求めた。同調行動の指標は、仕切の近傍 (仕切側 25%) を泳いでいる時間 (ROI 滞在率) と魚が仕切に対して 22.5~67.5 度の角度を向いてお互いを見ている時間 (同調角度率) とした。野生型同士、小脳ニューロン阻害魚同士でこのようなテストを行い比較する。また、阻害魚と野生型のペアでも同調行動を調べた。



図3. 同調行動テスト

4. 研究成果

能動的回避学習における小脳神経回路の役割

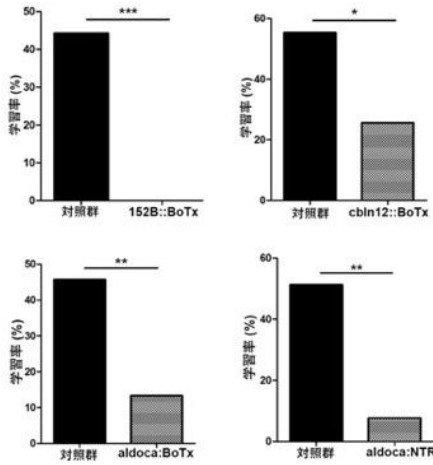


図4. 小脳ニューロン阻害魚における能動的回避学習異常

た。これらの阻害魚では神経伝達が幼少期から阻害されていることから、成魚において回路の再構成が起きている可能性が考えられた。そこで、成魚において小脳ニューロンの後天的破壊をニトロレダクターゼとその基質である MTZ を用いて行った。ニトロレダクターゼをプルキンエ細胞特異的に発現する Tg に MTZ を処理することによって大部分のプルキンエ細胞が破壊されることが明らかとなった。このプルキンエ細胞破壊魚では運動能力が低下していたが、電気刺激に対する反応は正常であった。そこで、この魚で回避学習を調べたところ、学習効率が低下していた(図 4、5)。これまでのアガロースに固定した状態での古典的条件付けの研究で、顆粒細胞阻害魚において恐怖条件付けの学習効率が変化がなかった。しかしながら、自由泳下における遊泳速度の変化を条件反応として古典的恐怖条件付けを行ったところ、小脳機能阻害魚において学習効率が低下していた。これらの結果は、自由泳下においては CS と US の連合学習に小脳が関与していると考えられた。以上の結果は、拘束下と自由泳下の古典的恐怖条件付けや能動的回避学習の間で小脳神経回路の役割が異なっている可能性を示唆するものである。

社会性行動における小脳の役割

ゼブラフィッシュにおいて社会性行動と小脳機能に関連があるのではないかと考え、社会性行動テストを行った。(図 3)。通常ゼブラフィッシュは群れで行動し、互いの行動を真似る『同調行動』と呼ばれる遊泳をする。二匹の魚が互いに見えるようになると同調行動を示す指標である ROI 滞在率、同調角度率が上昇する(図 6)。一方、小脳ニューロン阻害魚において、このような同調行動に異常が見られた(図 7)。この結果は、ゼブラフィッシュにおいても小脳が社会性行動に重要な役割を果たしていると考えられた。

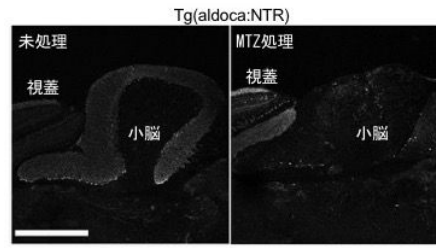


図5 NTR/MTZによるプルキンエ細胞除去

学習を獲得した。一方、ボツリヌス毒素によって小脳ニューロンにおける伝達を阻害したところ、能動的回避学習テストの学習効率が著しく低下した(図 4)。これらの小脳ニューロン阻害魚において、運動能力に大きな相違はなかった。以上のことから、小脳神経回路が回避学習に関与していることが明らかとなった。

ゼブラフィッシュ成魚を用いて能動的回避学習テストを行った。51.2%の野生型成魚(4~12ヶ月齢)で回避

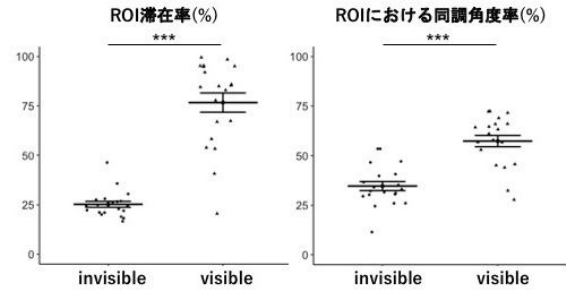


図6 野生型個体における同調行動

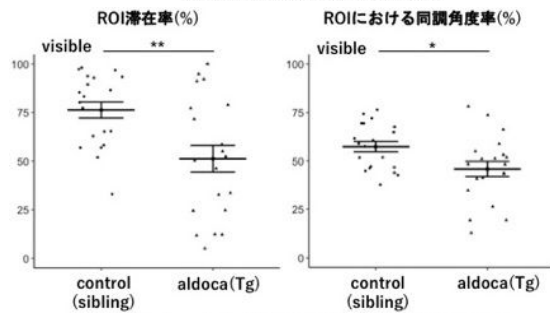


図7 プルキンエ細胞を機能阻害すると同調行動が低下する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nimura T, Itoh T, Hagio H, Hayashi T, Di Donato V, Takeuchi M, Itoh T, Inoguchi F, Sato Y, Yamamoto N, Katsuyama Y, Del Bene F, Shimizu T, Hibi M.	4. 巻 455
2. 論文標題 Role of Reelin in cell positioning in the cerebellum and the cerebellum-like structure in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 393-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2019.07.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Dohaku R, Yamaguchi M, Yamamoto N, Shimizu T, Osakada F, Hibi M	4. 巻 13
2. 論文標題 Tracing of Afferent Connections in the Zebrafish Cerebellum Using Recombinant Rabies Virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2019.00030. eCollection 2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Tsubasa, Inoue Shinsuke, Sun Xiaoding, Kusuda Ryo, Hibi Masahiko, Shimizu Takashi	4. 巻 inpress
2. 論文標題 Cfdp1 controls the cell cycle and neural differentiation in the zebrafish cerebellum and retina	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 inpress
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koyama Wataru, Hosomi Ryo, Matsuda Koji, Kawakami Koichi, Hibi Masahiko, Shimizu Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of cerebellar neural circuits in active avoidance conditioning in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0507-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0507-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Shimizu T, Inoue S, Xiaodoing Sun, Hibi M.
2. 発表標題 Cfdp1 regulates cell cycle and differentiation of granule cells in the zebrafish cerebellum.
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yura S, Itoh T, Shimizu T, Hibi M.
2. 発表標題 Roles of transcription regulators Foxp1b/Foxp4 and Skor1b/Skor2 in differentiation of Purkinje cells in zebrafish cerebellum.
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Itoh T, Takeuchi M, Sakagami M, Shimizu T, Hibi M.
2. 発表標題 Molecular mechanisms for differentiation of the inferior olivary nucleus neurons in zebrafish.
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hagio H, Matsuda K, Shimizu T, Nagata T, Koyanagi M, Terakita A, Hibi M.
2. 発表標題 Generation of novel optogenetic tools controlling intracellular second messengers in neurons.
3. 学会等名 第25回小型魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu T, Matsuda K, Hibi M.
2. 発表標題 Optogenetic manipulation of zebrafish neural circuits toward understanding higher order function of the cerebellum.
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hibi M, Itoh T, Yura S, Matsuda K, Shimizu T.
2. 発表標題 Transcriptional regulators controlling formation of the cerebellar neural circuits.
3. 学会等名 5th Imaging Structure and Function in the Zebrafish Brain Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hibi M, Nimura T, Itoh T, Hayashi T, Takeuchi M, Di Donata V, Del Bene F, Shimizu T.
2. 発表標題 Involvement of axonal transport of Reelin in the layer and the neural circuit formation of the cerebellum and the optic tectum.
3. 学会等名 13th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuda K, Yoshida M, Hosomi R, Tanabe H, Kawakami K, Hibi M, Shimizu T.
2. 発表標題 The cerebellar neural circuits differentially regulate freezing and active avoidance responses in the classical fear conditioning.
3. 学会等名 13th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Matsuda K, Yoshida M, Hosomi R, Tanabe H, Kawakami K, Hibi M, Shimizu T
2 . 発表標題 Roles of cerebellar neural circuits in active avoidance conditioning and classical fear conditioning in zebrafish.
3 . 学会等名 第24回小型魚類研究会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hagio H, Koyama W, Hosaka S, Narantsatsral J, Matsuda K, Shimizu T, Koyanagi M, Hosohima S, Tsunoda SP, Terakita A, Kandori H, Hibi M.
2 . 発表標題 Investigations of effectivity of novel optogenetic tools controlling intracellular second messengers in neurons and the heart muscle.
3 . 学会等名 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Itoh T, Yura S, Nakanishi A, Uehara M, Shimizu T, Hibi M
2 . 発表標題 Molecular mechanisms that control differentiation of Purkinje cells in zebrafish
3 . 学会等名 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Koyama W, Hosomi R, Matsuda K, Kawakami K, Hibi M, Shimizu T
2 . 発表標題 Role of cerebellar neural circuitry in active avoidance conditioning in zebrafish
3 . 学会等名 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 貴史、萩尾 華子、Janchiv Narantsatsral、松田 光司、小柳 光正、寺北 明久、細島 頌子、角田 聡、神取 秀樹、日比 正彦
2. 発表標題 細胞内二次メッセンジャーの光操作開発
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山 航、細見 椋、松田 光司、川上 浩一、日比 正彦、清水 貴史
2. 発表標題 能動的回避学習におけるゼブラフィッシュの小脳の役割
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日比正彦、清水貴史、橋本寿史、井原邦夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 8
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド 第17章実験に必要な手続き	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻動物器官機能学グループ ホームページ http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~junkei/new/index.html http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~junkei/new/index.html

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

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