

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20593

研究課題名（和文）組織内水のケミカルイメージングから迫る脳の生理学

研究課題名（英文）Physiology of the brain approached by chemical imaging of water inside tissues

研究代表者

塗谷 睦生（Nuriya, Mutsuo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：60453544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：脳の機能は、脳組織内における分子やイオンの伝達により支えられており、それら全ての動きはそれを溶かす脳内の水の動きにより制御されていると考えられます。よって、脳機能の理解には脳組織内の水の動きを見て理解することが必要となりますが、これまでの方法では可視化研究することが困難でした。本研究では、このような技術的な困難を、誘導ラマン散乱という顕微鏡技術を開発・応用することで乗り越え、脳組織の中の水の流れを細胞レベルで初めて可視化し記述することに成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の意義は、手法の開発とその応用から得られた知見の二つにある。まず、手法という観点からは、本研究にて、これまで生命科学では用いられることがほとんどなかった誘導ラマン散乱顕微鏡を脳科学研究用に開発し、応用した。これまで用いられてきた蛍光・発光顕微鏡とは異なる情報を可視化できるものとして、脳科学全般の推進に貢献できるものと期待される。また、脳内水動態に関しては、病気との関連が示唆されながらこれまで解析できなかった。今回の知見から水の特殊な性質が明らかになり、今後の生理学・病態生理学・薬理学などの発展に独自の観点から貢献することができるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The functions of the brain are supported by the transmission of molecules and ions within brain tissue, and it is believed that their dynamics are regulated by the movement of water inside the brain. Therefore, understanding brain function requires observing and comprehending the movement of water within brain tissues. However, conventional methods can hardly achieve this goal. In this study, we successfully overcame such technical difficulties by developing and applying a microscopy technique called stimulated Raman scattering (SRS) microscopy, which enabled us to visualize and describe the flow of water within brain tissue at the cellular level for the first time.

研究分野：薬理学

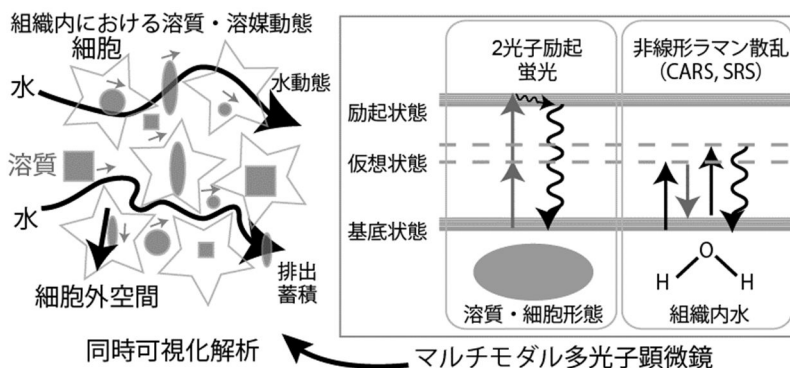
キーワード：組織内水 脳 ケミカルイメージング 分子動態

1. 研究開始当初の背景

「生理活性を規定する分子の動態・挙動」というとき、これまでは専ら個々の溶質分子についての研究がなされてきた。しかし、全ての溶質の組織内における時空間的な分布は、その流入・排出を司る細胞内外の水の流れに規定されている。つまり、それら溶質分子群の挙動は組織内水分子の動態の支配下にある。よって、組織内における生理活性物質、病態関連因子、そして薬剤など、その全ての挙動、そしてその活性の理解には、それらの分子自体の性質の理解では不十分であり、組織内の水の動態の理解が必要不可欠である(図1)。実際、近年、脳組織内における水動態が脳の生理・病態生理機能に重要な役割を果たすという仮説が提唱され、大きな注目を集めている。しかしそのような重要性にもかかわらず、水分子の動態は観測の困難さからこれまで検証できず、解析法の開発とその応用による解析が渴望されてきた。

水分子の動態の観測が困難であるのは、水分子のサイズが小さいため、通常生命科学研究で行われる、蛍光色素による標識とその後の蛍光顕微鏡による可視化という戦略をとることができないことが理由であった。ここで、蛍光検

図1：細胞内外の水の流れによる溶質動態制御とその可視化解析の概念図



出以外の可視化方法として、ラマン散乱を利用したラマン散乱顕微鏡がある。ラマン散乱顕微鏡は、分子内に存在する官能基の振動数に応じたラマン散乱を検出する顕微鏡法であり、よってサイズの大きな標識を要さない(図1)。生体内では多くの生理活性物質が官能基を共有するため、特定の分子の検出・可視化は困難であるが、水分子が生体組織の70%ほどの重量を占め、よって生体に存在する水酸基の圧倒的多数を占めることから、生体試料のO-Hラマン散乱シグナルの可視化により水分子を特異的に検出できることが我々の研究から明らかとなっていた(Nuriya et al. JPCA, 2019)。更に、ラマン散乱が官能基の振動数の可視化法であることを鑑みると、化学的性質が類似しながら質量数の異なる同位体の導入により官能基の振動数が変わるため、同位体の導入を「ラマン標識」と捉え、特異的な検出も可能となると期待される。実際その利用により、重水(D₂O)と軽水(H₂O)を区別し、その動きを培養細胞で捉えることができることが我々の研究室から報告されている(Ibata et al. Biophys. J. 2011)。これらの研究を実現したのは、シグナル強度が非常に低いというラマン散乱顕微鏡の問題の克服を実現した、近赤外光の多光子現象を用いる非線形ラマン散乱顕微鏡であった(図1)。重要なことに、このような近赤外光の多光子現象を利用した顕微鏡は、脳科学研究の発展に大きく寄与した2光子励起蛍光顕微鏡と同じく、高い組織透過性と3次元空間分解能、そして低侵襲性といった、組織観察に最適な長所を持つと期待された。つまり、この解析系を脳組織に応用することで、脳組織内での水の可視化が可能となると期待された。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本課題では組織透過性の高い近赤外光を用いた多光子顕微鏡技術であり、分子同定能を持つラマン散乱の欠点であった感度の低さを克服した非線形ラマン散乱顕微鏡によるケミカルイメージングを用いることで、組織における水の状態と動態の初の可視化解析を行うことを目的とした。更に、非線形ラマン散乱と同時に蛍光分子の多光子励起を起こすことで、これまで主に用いられてきた溶質分子の動態を同時に可視化し、新たな手技による新たな知見をこれまでの手法・知見と対比して検討することを試みた(図1)。

これまでの研究から、非線形ラマン散乱顕微鏡を用いることで、生きた細胞での水動態の可視化が可能であることが示されたが、生きた脳組織内での可視化は行われていない。本研究では、生きた脳組織における非線形光学顕微鏡を用いたイメージング解析を行ってきた実績に基づき、非線形ラマン散乱顕微鏡を脳組織深部における水動態の解析に応用することを試みた。非線形ラマン散乱顕微鏡としては、既に導入されていたコヒーレントアンチストークスラマン散乱(Coherent anti-Stokes Raman scattering: CARS)に加え、誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering: SRS)の導入と応用を試み、最適な手技をもって脳組織内の水と溶質の可視化を試みることとした。

このようにして解析を試みる脳内水動は、そこに溶ける生理活性物質全ての動態を制御し、各生理活性物質それぞれが持つ物理化学的性質と組み合わせることで、脳の生理・病態生理・薬理

学的な性質を規定することとなると考えられる。ここで、生理活性物質は低分子量のものが多く、中でも薬剤は過半数が分子量 500 以下であり、これらは水分子同様、蛍光ラベルによる可視化解析が適用できず、動態の多くが謎に包まれている。水の可視化にて開発と応用を試みる非線形ラマン散乱顕微鏡はこれらの可視化にも応用できると考えられた。つまり、蛍光標識ではなく、重水がそうであったように、重水素などの導入により特異的なラマン散乱を持たせることで、このような低分子量生理活性物質の可視化も可能になると期待された。そこで本研究の最後に、「重水素ラマンタグ」を持つ、蛍光色素の標識ができない低分子量生理活性物質の可視化研究を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、培養細胞レベルで行ってきた CARS 顕微鏡による水動態観察系 (Nuriya et al., JPCA, 2019) を脳組織の観測系へと応用・展開し、脳組織における細胞内外水の挙動を、溶質の動態と共に可視化し、その細胞生物学的機序と制御に関する解析を行う。研究にはマウス大脳皮質より調製する急性脳スライスを用いる。これを非線形ラマン散乱顕微鏡に設置のチャンバーに移し、37°C を維持した条件下で非線形光学顕微鏡を用い、水分子を非線形ラマン散乱により、細胞構造と溶質を 2 光子励起蛍光により、同時に可視化する。静的な観測による水の分布に関する知見に合わせ、多光子顕微鏡の長時間観測能を活かし、組織内における水の動態の観測を行う。このため、通常の水素原子 (H) を重水素 (D) に変換することで、水の分子振動に大きな変化を起し、ラマンシグナルの変化として水分子の変化を捉える。高時空間分解能でライブイメージングを行い、O-H、または O-D 振動モードでの観測によるシグナル変化から組織内水動態のケミカルイメージングによる解析を行う。

可視化に用いる非線形ラマン散乱顕微鏡としては、既に設置・稼働していた CARS 顕微鏡装置に加え、その改変により、SRS 顕微鏡システムを導入し、用いた。どちらにおいても、ピコ秒超短パルスレーザーを基に、OPO (Optical Parametric Oscillator) でレーザー出力の一部の波長を変換し、これらのエネルギーの差が丁度 O-D または O-H 振動モードのエネルギーに対応するように調整した。これらのレーザー光を同期させて顕微鏡に導入し、試料に照射の上、これを走査して SRS シグナル、CARS 光、そして同時に発生する 2 光子励起蛍光シグナルを選択的バンドパスフィルターで取得し、組織深部における高時空間分解能での観測を実現した。まず、2 - 4 週齢の動物から調製する通常の急性脳スライスを用いて可視化法を最適化し、基本的な水動態の解析を行った。その後、更に幼若な動物 (10 日齢程度) から調整した脳スライス、或いは脳虚血モデルとして、通常動物から調製した脳スライスを酸素・グルコースを欠如した細胞外液内に保持したものを、色素と水の動態の変化を解析した。

最後に、同じ観測システムを用いて、ラマンタグされた他の生理活性物質の可視化を試みた。最初の対象として、重水素置換された麻酔薬プロポフォールを選定し、用いた。これを分散培養した初代培養ラット海馬神経細胞に投与し、細胞内における局在の直接的な可視化を試みた。

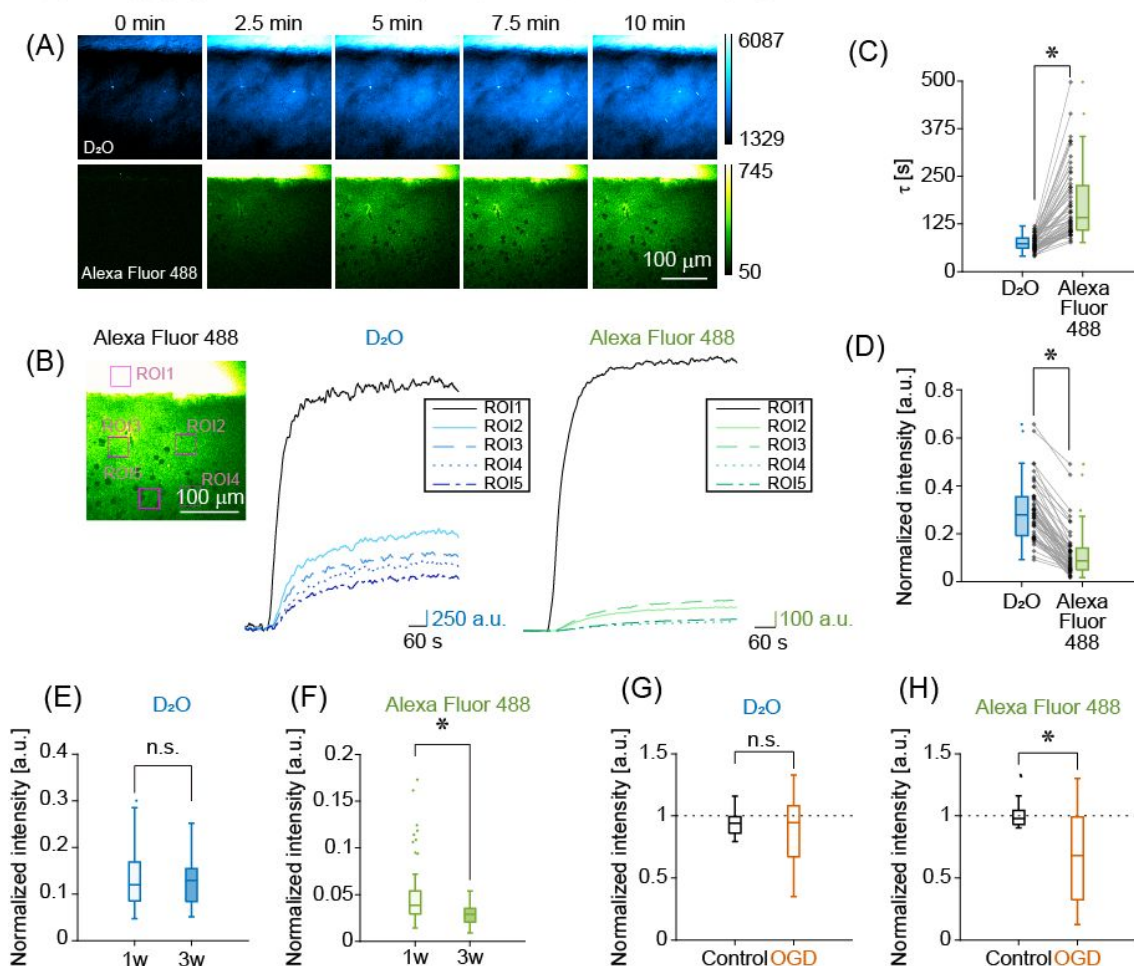
4. 研究成果

最初に、水の可視化を実現するコヒーレントラマン散乱顕微鏡の開発を進めた。既存の CARS 顕微鏡システムを用いて脳組織内における水の可視化を試みたところ、実際に脳組織深部において、O-H 振動の可視化により水分子の可視化ができることが明らかとなった。更に、用いる脳組織をアストロサイトを選択的に染色する色素 (sulforhodamine 101: SR101) で染色したところ、CARS に用いるピコ秒超短パルスレーザー照射により、SR101 を励起し、その蛍光シグナルを CARS シグナルと同時に可視化できることが明らかとなった。一方、SR101 の蛍光シグナルのスペクトルが幅広く O-H の CARS シグナルと一部被ってしまうことから、これらを完全に切り離しての計測が困難であることが明らかとなった。そこで次に、蛍光と同様に特定の波長の光を検出する CARS とは異なり、ラマン散乱発生による励起光の変化を捉えることでラマン散乱シグナルを検出する SRS の導入を行った。東京大学小関泰之教授との共同研究により CARS システムを SRS に改変し、SRS による水の観察ができることを確認した。更に、SRS と同時に蛍光色素の 2 光子励起を起し、そのシグナルを検出する、マルチモダル多光子顕微鏡システムの開発に成功した。これを利用することにより、マウスから調製した大脳皮質の急性脳スライスにおいて、水の SRS シグナルと共に、細胞の形態および溶質としての蛍光色素の蛍光シグナルを独立かつ同時に検出することに成功した。ラマン散乱と蛍光のシグナルの夾雑を回避でき定量的な検証をより安全に行うことができるため、本研究では、この SRS マルチモダル多光子顕微鏡システムを用いて水および他のラマンタグ分子の可視化を行うこととした。

このマルチモダル多光子顕微鏡システムを用い、脳スライス内での水と溶質の挙動の解析を試みた (Shinotsuka et al., Cell Reports Methods, 2023)。まず、このシステムを用いることにより、SRS により水を脳組織深部において高い空間分解能で検出でき、同時に脳組織に導入した蛍光色素を 2 光子励起し蛍光シグナルを検出できること、更に重水と軽水を SRS により容易に区別

できることも確認した。そこで、灌流液を介して脳組織に重水と蛍光色素を導入し、それを経時的に観察することで、脳組織内への水と蛍光色素の拡散を捉え比較することを試みた。これにより、水分子 (D_2O) および蛍光色素 (Alexa Fluor 488) が脳組織の外から組織内へと浸透して行く様子を捉えることに成功した (図 2 A)。タイムラプスイメージングで得たシグナル強度の経時的な変化を、脳組織内の様々な部位において解析し、定量的な評価を試みた (図 2 B)。すると、水分子は蛍光色素に対して有意に早く、そしてより多く浸透して行くことが明らかとなった (図 2 C, D)。更なる詳細の解析から、蛍光色素が細胞内には入れずに細胞外空間のみを通過して脳組織に浸透して行くのに対し、数十秒という今回の計測の速度においては、水分子は細胞内外を問わず均一に浸透して行く、という水分子独自の脳内動態が明らかとなった。

図 2：脳組織内への水と色素の流入の違いの可視化解析

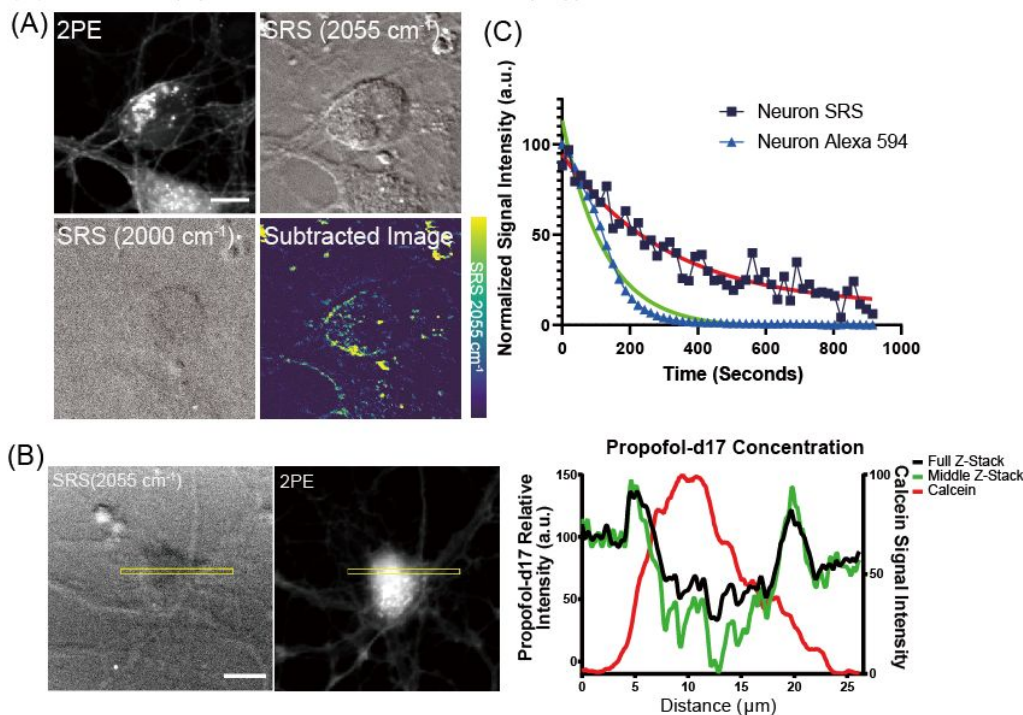


通常の脳組織における水の動態の可視化解析に成功した後、脳組織の変化が起こる状況が水動態へ及ぼす影響についての検証を試みた。脳の発達段階において、脳の細胞外空間が狭くなることが知られており、実際、3週齢 (3w) では1週齢 (1w) に比べて色素の流入が減弱していることが確認された (図 2 F)。一方、その条件下でも水の流入には変化が無いことが分かった (図 2 E)。更に、虚血モデル (oxygen glucose deprivation: OGD) 条件下において、やはり、蛍光色素の流入が大幅に減弱するのに対し (図 2 H)、水は変化なく流入することが明らかとなった (図 2 G)。以上の結果は、脳組織内における水の動態は変化に対して非常に安定なものであり、色素とは全く異なる特徴を持つものであることを示している。これらの結果は、近年注目を集めている脳内における水動態の理解のためには、これまで用いられてきたような蛍光色素による間接的な観測からの類推は必ずしも適当ではなく、水を直接見ることが必要不可欠であることを示唆するものとなった。

上記のようにして明らかとなってきた脳内の水動態は、そこに溶けて運ばれる溶質である生理活性物質の動態を制御すると考えられる。そこで本研究の更なる展開として、生理活性物質の直接の可視化を試みた。多くの生理活性物質は分子量が小さく、蛍光標識による蛍光観察が適用できないが、水分子と同様に、ラマン散乱で特異的に検出できるラマンタグと非線形ラマン散乱顕微鏡を用いることで可視化できる可能性がある。そこで、臨床的に非常に重要な麻酔薬であるプロポフォールに着目し、重水素置換されたプロポフォールの可視化を試みた (Oda et al. iScience,

2022, Zhong et al. STAR Protocols, 2023) 分散培養海馬神経細胞を形態マーカーとなるカルセインで染色し、そこに重水素置換プロポフォルを投与し、それを上記のマルチモダル多光子顕微鏡装置にて観察した。すると、2光子蛍光励起(2PE)により可視化された神経細胞の細胞膜から特異的なラマン散乱シグナル、つまり重水素置換プロポフォルを検出することに成功した(図3A)。この分布は細胞膜全般にわたるもので(図3B)分子標的とされるGABA_A受容体特異的ではないことから、薬剤はまず細胞膜に分布し、その中における動きの中で標的分子に結合して作用を発すると予想された。更に、重水素置換プロポフォルで染色した神経細胞の細胞外液をプロポフォル無しの灌流液の灌流により洗い流し、その過程を継時観察し、SRSシグナル強度の変化を解析したところ、プロポフォルが速やかに細胞から遊離して行く薬剤分布の経時変化の観察に成功した(図3C)。これらの結果は、プロポフォルの微視的薬物動態の一端を明らかにするとともに、この戦略を用いることで分子量の小さな他の生理活性物質の細胞・組織内での分子動態の解析に用いることができることを期待させるものとなった。

図3：重水素化プロポフォルの可視化解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura K, Karasawa K, Yasui M, Nuriya M	4. 巻 94(35)
2. 論文標題 Probing the spatiotemporal dynamics of oxytocin in brain tissue using a simple peptide alkyne-tagging approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 11990-11998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.2c00452	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 Zhong W, Oda R, Ozeki Y, Yasui M, Nuriya M	4. 巻 4(2)
2. 論文標題 Protocol to image deuterated propofol in living rat neurons using multimodal stimulated Raman scattering microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102221	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 塗谷睦生	4. 巻 157
2. 論文標題 見たいものを見る化する非線形ラマン散乱顕微鏡の薬理学研究への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 371-375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.22060	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 塗谷睦生	4. 巻 54(13)
2. 論文標題 ラマン散乱を用いた細胞水イメージング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 8-11
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 塗谷睦生	4. 巻 63(1)
2. 論文標題 非線形光学顕微鏡による生細胞イメージング	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 33-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.33	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 塗谷睦生	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 非線形光学顕微鏡の脳科学研究への応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 フォトニクスニュース	6. 最初と最後の頁 131-135
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 Julia Ramadhanti, Tomoko Yamada, Masato Yasui, Mutsuo Nuriya	4. 巻 146(1)
2. 論文標題 Differentially regulated pools of aquaporin-4 (AQP4) proteins in the cerebral cortex revealed by biochemical fractionation analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 58-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.03.003	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 Robert Oda, Jingwen Shou, Wenying Zhong, Yasuyuki Ozeki, Masato Yasui, Mutsuo Nuriya	4. 巻 25(3)
2. 論文標題 Direct visualization of general anesthetic propofol on neurons by stimulated Raman scattering microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103936	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 Takanori Shinotsuka, Tsuyoshi Miyazawa, Keiko Karasawa, Yasuyuki Ozeki, Masato Yasui, Mutsuo Nuriya	4. 巻 3
2. 論文標題 Stimulated Raman scattering microscopy reveals a unique and steady nature of brain water dynamics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100519 ~ 100519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2023.100519	査読の有無 無
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 9件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 塗谷陸生
2. 発表標題 非線形光学顕微鏡を用いた細胞・組織内分子動態の解析
3. 学会等名 超高速光エレクトロニクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塗谷陸生
2. 発表標題 脳組織内水動態の可視化解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塗谷陸生
2. 発表標題 非線形光学と非蛍光標識を用いた生理活性物質の可視化解析
3. 学会等名 東京大学IRC光学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠塚崇徳、宮澤剛史、唐澤啓子、小関泰之、安井正人、塗谷睦生
2. 発表標題 多光子マルチモダルイメージングを使った脳組織内の水動態の可視化
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 マルチモダル多光子顕微鏡を用いた生理活性物質の可視化解析
3. 学会等名 2021年度日本分光学会生細胞分光部会研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 微視的薬物動態の解析手段としての非線形光学顕微鏡
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 非線形光学イメージングの生命科学研究への応用
3. 学会等名 第42回レーザー学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 新規プローブの開発と応用による低分子量生体分子の可視化解析
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーキング学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 非線形光学顕微鏡 ~SHG 顕微鏡~
3. 学会等名 日本分光学会 第56 回 秋期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 多光子現象を駆使した脳内化学情報伝達の可視化解析
3. 学会等名 学術変革(B)革新ラマン領域会議（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Robert Oda, Jingwen Shou, Keiko Karasawa, Mutsuo Nuriya, Masato Yasui, Yasuyuki Ozeki
2. 発表標題 High-speed super-multiplex imaging of brain tissue
3. 学会等名 SPIE BiOS, 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塗谷睦生
2. 発表標題 脳組織内における水の流れの可視化解析
3. 学会等名 日本分光学会生細胞分光部会研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 篠塚崇徳、宮澤剛史、唐澤啓子、小関泰之、安井正人、塗谷睦生
2. 発表標題 マルチモダルな多光子顕微鏡による脳組織の水動態の可視化
3. 学会等名 日本神経科学学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠塚崇徳、宮澤剛史、唐澤啓子、小関泰之、安井正人、塗谷睦生
2. 発表標題 篠塚崇徳、宮澤剛史、唐澤啓子、小関泰之、安井正人、塗谷睦生
3. 学会等名 日本流体力学学会年会2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

塗谷グループホームページ
<http://user.keio.ac.jp/~aa606547/homepage.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
---------	---------