

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06506

研究課題名(和文) LC/MS分析の利便性を大幅に向上にさせる多機能誘導体化試薬の開発と実用性評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of multifunctional derivatization reagents that greatly improve the convenience of LC/MS analysis

研究代表者

小川 祥二郎 (Ogawa, Shoujiro)

福山大学・薬学部・准教授

研究者番号：30546271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内微量生理活性物質の解析手法として、特異性と夾雑物質との分離の観点から、液体クロマトグラフィー-質量分析法は好適と考えられ、広く利用されている。一方で本法では測定対象のイオン化効率にその検出感度が大きく左右されることから、『検出感度の改善』が第一の課題となる。その為に高感度化を目的とした誘導体化試薬が活用されているが、LC/ESI-MS/MSにはその他にも解決すべき問題点が存在する。そこで本課題を通じて申請者は誘導体化試薬のアナログやアイソトポログの試薬をデザイン・合成し、誘導体化試薬に機能を付加させることでLC/ESI-MS/MSをさらに活用しやすくするためのソフト面の改善策を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

誘導体化試薬は従来、主目的は検出感度を向上させることにあるのは言うまでもなく、その用途として利用される事には疑う余地もない。しかしながら、分析のハード面は進化しているものの、そこに依存する事には限界があり、ハード面での進化とは別に誘導体化試薬という化学的ソフトも進化が必要であることから、LC/ESI-MS/MSの欠点を克服するべく、本研究では誘導体化試薬にアナログやアイソトポログなどの機能を付加させた試薬ラインナップを準備し、MSの持つ『重さで化合物を弁別』する機能を最大限活用して分析スループットの向上などを達成できた。開発した試薬を用いる事で多検体を扱う臨床検査の現場でも活用が見込める。

研究成果の概要(英文)：Liquid chromatography-mass spectrometry is considered to be a suitable analytical method for trace biologically active substances in the body from the standpoint of specificity and separation of impurities, and is widely used. However, with this method, the detection sensitivity depends on the ionization efficiency of the object being measured itself, so "improving detection sensitivity" is the first challenge. For this reason, derivatization reagents are used to increase sensitivity, but LC/ESI-MS/MS has other issues that need to be resolved. Therefore, through this project, the applicant designed and synthesized analogs and isotopologues of the derivatization reagents, and by adding functions to the derivatization reagents, provided software improvements to make LC/ESI-MS/MS even easier to use.

研究分野：薬系分析

キーワード：誘導体化 LC/ESI-MS/MS ステロイド 誘導体化試薬アナログ 誘導体化試薬アイソトポログ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の微量生理活性物質の量的変化の精密捕捉は、疾病の診断や治療効果追跡において、また医薬品の体内動態解析などにも極めて重要である。現在、その手法として高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化-タンデム質量分析 (LC/ESI-MS/MS) が汎用されるが、本手法にて超微量成分の分析を行う場合はその成否は測定対象化合物自身のイオン化効率に大きく左右される。これに対し、高感度化を目的とした誘導体化の導入は効果的だが、そればかりでは十分でなく、この使い勝手の悪さが誘導体化を LC/MS に組み合わせた分析法が広く使われていないことの要因の一つではないかと考えられる。申請者は高感度化に加えて別の機能も併せもち、LC/MS 装置や分離器材の欠点を補完する、すなわち LC/MS ユーザーの切望する機能をカスタマイズさせた高い実用性を有する種々タイプのスマート試薬の開発を企てた。

2. 研究の目的

最近、測定対象ではなく誘導体化試薬に安定同位体を導入し (誘導体化試薬のアイソトポログ)、これを利用することによって精密な定量を達成する安定同位体標識 (ICD) が注目を集めている。質量分析法は測定対象と質量が違う試薬で標識化することで別の重さを持つ化合物として分けて測定することができる。すなわち、「高感度検出」に ICD の試薬を利用することで「一度に複数検体を同時定量」することが可能になり、多くの検体を処理しないといけない臨床の現場で検体処理速度を改善させる強力なツールとなり得ると考えられた。そこで申請者はこの 2 つを一気に成し遂げるアイソトポログ試薬の系統的開発が有効であると考えた。さらには試薬に比較的簡便に重水素を標識させる数や位置には制限があることから、アイソトポログのみならず、誘導体化試薬のアナログも活用して検体数増加に寄与できるように試薬をデザイン・合成した。本申請課題では、カルボニル用の試薬として誘導体化試薬のアナログ・アイソトポログラインナップの合成と、生体試料分析における実用性評価を行うことを目的とした。一方で、測定対象が持つ固有の構造に対し、多点認識に基づく超高選択的検出用の機能性誘導体化試薬の開発として、共役ジエンと特異的に反応する新規 Cookson 型試薬の開発と尿中ビタミン D 代謝物の定量への応用も行った。

3. 研究の方法

(1) 計画初年度である2021年度に申請者は先ず、カルボニルに対する感度向上用のESI-MS/MS用試薬として知られるGirard試薬を基盤として、Girard試薬TとPの重水素標識体 (*d*-GT, *d*-GP) の合成を行った (図 1)。

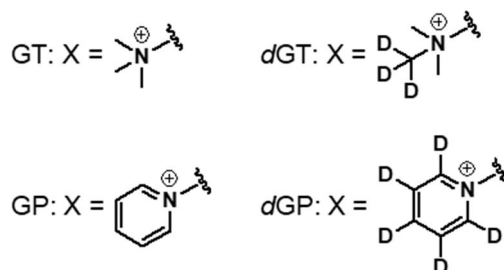


図 1. GT, GP 及びこれらのアイソトポログ (*d*-GT, *d*-GP) の構造

男性ホルモン (アンドロゲン) であるテストステロン (TS) とデヒドロエピアンドロステロン-3-サルフェート (DHEAS) をモデル化合物として試薬の性能を詳細に評価したところ、酢酸-メタノール溶液中、80°C、15分で定量的に反応が進行することが判明した。反応性は

アイソトポログ試薬でも変わらないことも明らかにしている。さらに興味深い特徴として、LC/ESI-MS/MSでは硫酸基を持つDHEASは負イオン検出が適用されるが、Girard試薬で誘導体化すると正イオンでも感度が損なわれず測定することができることが明らかになった。すなわち、これら4種の試薬を用いて4種のGirard試薬アナログ・アイソトポログによる誘導体化を行うことで4種の異なる質量で標識化できる(4検体が1度に分析できる)可能性が見いだされた。次いでGTとGPIによるアンドロゲンのLC/ESI-MS/MS挙動を検討したところ、誘導体時点では定量下限がTSの場合は0.40 ng/mL、DHEASの場合は0.25 µg/mLと、実試料測定に用いる上でも十分であることが確認され、4種の誘導体化による誘導体は5分以内に溶出されることも分かった。調製した4種のGirard試薬アナログ・アイソトポログを用いた血中TS、DHEASの4検体同時法開発を行うためLC/ESI-MS/MSを用いた検量線の作成を行った。その結果、TSの場合は0.40 ~ 16 ng/mL、DHEASの場合は0.25 ~ 10 µg/mLの範囲に入ることが確認され、この濃度範囲で異なる血液マトリックスを用いて検量線を作成したところ、検量線の傾きはいずれも0.995以上の良好な直線性を示し、5回の繰り返しで測定された濃度の誤差は、TS(≤12.1%)とDHEAS(≤11.8%)の両方で20%を下回った。さらに、この4種の誘導体化試薬を用いた4検体一括分析法は従来の1検体ずつのLC/ESI-MS/MS測定法よりも血液由来のマトリックスが4倍になることから、マトリックス効果により感度の変動することが懸念されたが、マトリックス効果は1検体ずつの時と比較して4種の誘導体化試薬により得られた4種の誘導体のTSとDHEASのピーク面積がそれぞれ約5%と10%減少したのみであり、実用上問題ないことも確認できた。詳細は省くが、精度・正確度の試験も十分な結果を与えた。以上のバリデーション試験が確認できたことから健常人血清プールサンプルをランダムに10バッチに分け、開発した方法で分析した。測定された濃度は2.17 ~ 6.75 ng/mL (3.42 ± 0.95 ng/mL)および1.04 ~ 3.75 µg/mL (1.99±0.65 µg/mL)であった。これらの値は、文献の濃度とよく一致していた。

次いで、申請者の考案した誘導体化試薬アナログ・アイソトポログを用いてLC/ESI-MS/MSによる分析スループットが改善するかについて検討した。分析スループット改善における本誘導体化による複数検体の一括分析の利点を実証するために、1回のLC/ESI-MS/MS実行中に1つのサンプルを分析する非誘導体化の従来型のLC/ESI-MS/MS法と比較したところ、従来型の1回ずつの測定法では、1サンプル(1回のLC/ESI-MS/MS分析)に7分かかり、40サンプルで280分を要した。一方で開発した4種の誘導体化試薬による4検体一括分析法では誘導体化に40サンプルで合計45分かかるものの、測定時間は6分×10回測定で60分となり、合計105分で完了したため、申請者の狙い通り、誘導体化試薬アナログ・アイソトポログを活用することで、分析スループットが改善されることが証明された。

(2) ついで、共役ジエンと特異的に反応する新規Cookson型試薬のデザイン・合成と尿中ビタミンD₃代謝物分析への応用を試みた。

ビタミンD代謝物は広く知られている通りでは骨形成に重要な役割を担っており、ビタミンD不足は骨粗鬆症などの原因となる。ヒトにおいて主要なものはD₃であり、現在、ビタミンD₃の供給状態は血中25-ヒドロキシビタミンD₃ [25(OH)D₃] の濃度に基づいて評価される。一方、過剰の25(OH)D₃はその大部分が24,25-ジヒドロキシビタミンD₃に代謝され、グルクロン酸抱合化の後、尿中に排泄される。そこで我々は尿中のビタミンD₃代謝物の濃度もビタミンD供給状態の指標になるものと考えた。尿中のビタミンD₃代謝物は極微量であると予想され、LC/ESI-MS/MSによる定量には高感度化が必須であると予想される。そこで、我々は

LC/ESI-MS/MSで好感度を達成させるプロトン親和性な原子団を有し、かつビタミンD₃代謝物が共通して有する共役ジエンにのみ特異的に反応し、尿中に多種多様に存在するビタミンD₃代謝物群を良好にLC/ESI-MS/MSで弁別しうる新規のCookson型の誘導体化試薬を合成する必要があると考えた。先に申請者はESIに高い応答性を有するCookson型試薬としてジメチルアミノフェニル基を感度向上の基としたDAPTADを合成した。DAPTADは尿中ビタミンD₃のグルクロン酸抱合体の分析ではC-24位に水酸基を有する代謝物ではLCによる分離を可能としたが、DAPTADではビタミンD₃の側鎖の水酸基異性体を弁別するには不十分であった。そこで、申請者は新しいCookson型試薬アナログの合成を行うことで、誘導体化でビタミンD₃の側鎖酸化代謝物弁別を可能ならしめる手法の提供を行うこととした。先ず、LC/ESI-MS/MSで高感度を示すためにプロトン親和性原子団として”Piperidinylphenyl基”を配することとした。フルオロ安息香酸メチルを原料として、ピペリジンと縮合させてからメチル基を加水分解することで原料のpiperidinylbenzoic acidを得た。DAPTADを合成した経路を参考に、4段階で4-[4-(1-piperidinyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PIPTAD) 前駆体のウラゾール体 (VII) を得た。これを用事酸化することで目的のPIPTADの酢酸エチル溶液を調製し、以下の測定に用いた。

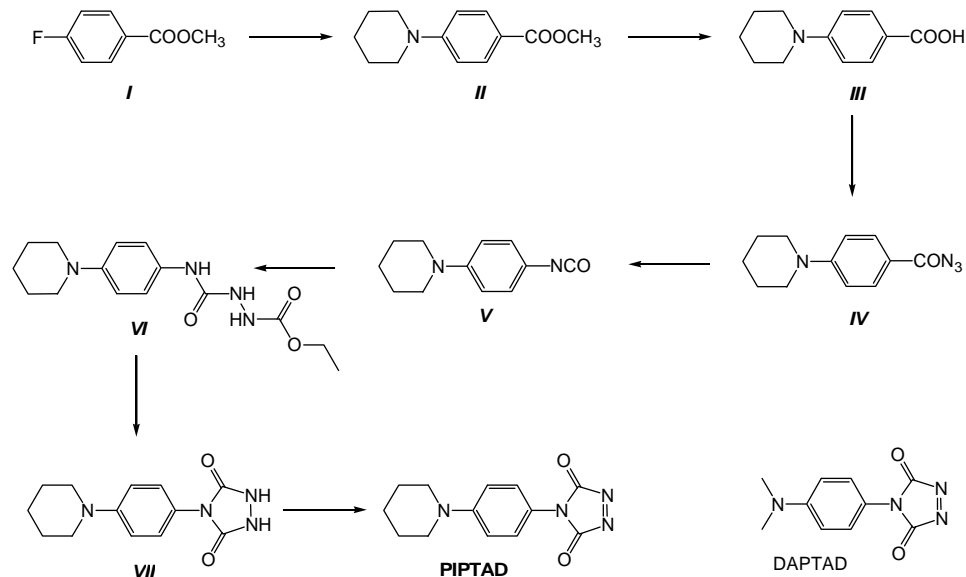


図 2. PIPTAD の合成経路

得られた PIPTAD でビタミン D₃ グルクロン酸抱合体を誘導体化して ESI-MS/MS 挙動を精査したところ、従来の DAPTAD 誘導体ではプロトン化分子イオン [M+H]⁺をプリカーサーイオンとして与え、MS/MS によりビタミン D₃ の C-6-7 結合が開裂したプロダクトイオンが共通して得られるが、グルクロン酸抱合が 3 位にされている場合、グルクロン酸抱合が MS/MS で解離しない、*m/z* 557 が有意に高強度で得られることが判明した。グルクロン酸抱合位置が側鎖水酸基に起きている場合、このプロダクトイオンは得られず、*m/z* 381 のみが生成するため、グルクロン酸抱合位置の同定が PIPTAD 誘導体化で可能となった (図 3)。先に我々が開発した DAPTAD はビタミン D₃ の尿中代謝物分析では 25(OH)D₃ のグルクロン酸抱合体、24,25(OH)D₃ のグルクロン酸抱合体分析には適用できたが、尿中のビタミン D₃ 代謝物は種々の異性体が生成する。中でも側鎖水酸基の位置異性体である 23,25(OH)D₃ では DAPTAD 誘導体に由来するピークが相互干渉してしまい、グルクロン酸抱合位置に関する情報が得られなかったが、PIPTAD では明瞭に観察することが可能になった (図 4)。

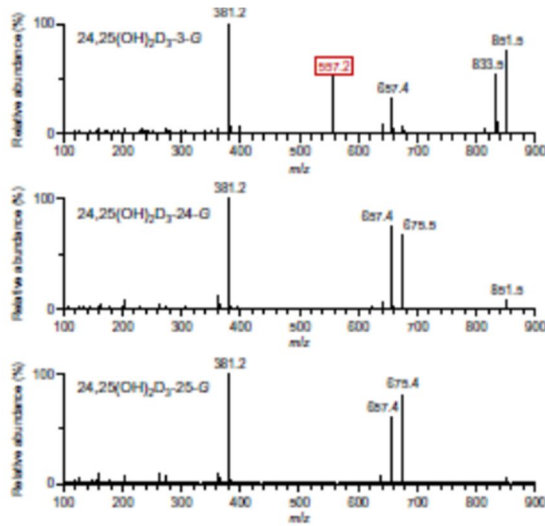


図 3. PIPTAD 誘導体化を活用した 24,25(OH)₂D₃ のグルクロン酸抱合部位の違いによる MS/MS スペクトル

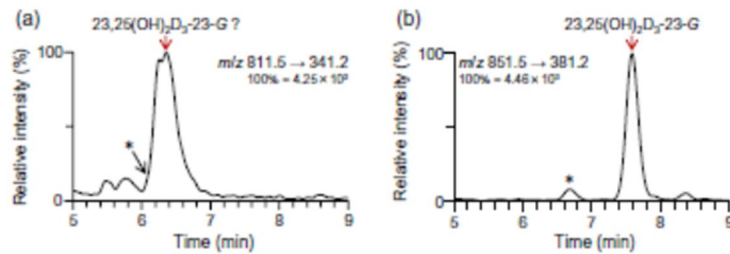


図 4. DAPTAD (左), PIPTAD 誘導体化 (右) による尿中 23,25(OH)₂D₃ グルクロン酸抱合体のクロマトグラム

PIPTAD は、尿中共存物質から誘導体化で得られた誘導体を LC で分離する点で、以前申請者が開発した試薬 DAPTAD よりも優れていた。開発されたこの方法により、23,25(OH)₂D₃-グルクロン酸の結合位置が C-23-ヒドロキシ基であることが確認され、23,25(OH)₂D₃-23-グルクロン酸がヒトの尿中代謝物として同定された。申請者の開発した機能性の誘導体化を駆使することで、MS/MS が苦手とした位置異性体の弁別が可能となった。本手法を活用することで複雑な異性体が混在する尿中のビタミン D₃ 代謝物の隠れたグルクロン酸抱合位置を検索して、血液や尿、あるいは脳脊髄液などのサンプルの種類ごとに異性体を特徴付けるのにも今後役立つものと期待される。

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 0件）

1. 著者名 熊谷 岳文, 山下 純, 榎原 奈穂子, 佐藤 英治, 木平 孝高, 藤村 よしの, 小嶋 英二郎, 小川 祥二郎, 伊達 有子, 井上 裕文	4. 巻 16
2. 論文標題 心静脈栄養用輸液に混注された6種薬剤の安定性に関する検討	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 薬局薬学	6. 最初と最後の頁 21-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32160/yakkyoku.nt.2023-0016	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 K. Takada, S. Ogawa, N. Yoshida, T. Higashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Separation and identification of monoglucuronides of vitamin D3 metabolites in urine by derivatization-assisted LC/ESI-MS/MS using a new Cookson-type reagent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 1053-1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-023-00350-4	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 T. Higashi, S. Aso, H. Horisaki, T. Ito, S. Tanaka, S. Nishimoto-Kusunose, S. Ogawa, K. Kato, H. Ide	4. 巻 538
2. 論文標題 Evaluation of thumbnail clipping as a specimen for retrospectively assessing average production of testosterone	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clin. Chim. Acta	6. 最初と最後の頁 157-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2022.11.019	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 S. Ogawa	4. 巻 38
2. 論文標題 Improvement of analysis throughput for LC/MS assay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 633-634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00089-4.	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 -

1. 著者名 A. Ohta, W. Hobo, S. Ogawa, Y. Sugiura, T. Nishikawa, K. Nishimoto, S. Nishimoto-Kusunose, T. Higash	4. 巻 207
2. 論文標題 A method for determination of aldosterone concentrations of six adrenal venous serum samples during a single LC/ESI-MS/MS run using a sextet of Girard reagents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Pharm. Biomed. Anal.	6. 最初と最後の頁 114423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2021.114423	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 S. Fujimura, T. Ito, S. Ogawa, T. Ishige, S. Nishimoto-Kusunose, T. Higashi	4. 巻 38
2. 論文標題 An LC/MS/MS method for quantifying testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in four different serum samples during a single run	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2021.114423	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 熊谷 岳文, 原 奈穂子, 佐藤 英治, 木平 孝高, 藤村 よしの, 小嶋 英二郎, 小川 祥二郎, 伊達 有子, 鶴田 泰人, 吉富 博則, 井上 裕文	4. 巻 141
2. 論文標題 中心静脈栄養用輸液に混注された6種薬剤の安定性に関する検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi,	6. 最初と最後の頁 599-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00239	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 S. Aso, S. Ogawa, S. Nishimoto-Kusunose, M. Satoh, T. Ishige, F. Nomura, T. Higashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Derivatization-based quadruplex LC/ESI-MS/MS method for high throughput quantification of serum dehydroepiandrosterone sulfate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed. Chromatogr.	6. 最初と最後の頁 e5027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bmc.5027.	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 S. Ogawa, M. Nakamura, M. Satoh, T. Ishige, F. Nomura, Y. Sugiura, T. Higashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of a method for quantification of serum dehydroepiandrosterone sulfate by stable isotope-dilution MALDI-MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med. Mass Spectrom.	6. 最初と最後の頁 22-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24508/mms.2021.06.003	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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小川祥二郎、平田結衣
2. 発表標題 新規荷電Cookson型試薬のデザイン・合成とその性能評価
3. 学会等名 第47回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川祥二郎
2. 発表標題 導体化試薬を有効活用した LC/ESI-MS/MS 分析スループット向上の試み
3. 学会等名 第62回臨床化学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 菜月, 高田 一成, 小川 祥二郎, 東 達也
2. 発表標題 新規Cookson型誘導体化試薬とLC/ESI-MS/MSを用いた, ヒト尿中23,25-ジヒドロキシビタミンD3-グルクロニドの抱合位置決定
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小川 祥二郎, 篠原 加惟, 萩原 李音, 妹尾 優月, 伊達 有子, 榎原 奈穂子, 井上 裕文, 小嶋 英二郎
2. 発表標題 遠隔含酸素官能基化を活用した内因性ステロール酸化成績体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 武井 一, 成島 聖子, 鈴木 光幸, 神保 圭佑, 佐々木 隆浩, 村井 毅, 山下ユキコ, 小川 祥二郎, 宇根 瑞穂, 入戸野 博
2. 発表標題 胆汁酸・脂肪酸胆汁酸エステルの同時測定法を用いた潰瘍性大腸炎患者の便中分析
3. 学会等名 第44回胆汁酸研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 祥二郎, 伊藤 朋哉, 田邊 志緒里, 榎原 奈穂子, 伊達 有子, 井上裕文, 小嶋 英二郎
2. 発表標題 常時正荷電 Cookson 型試薬のデザイン・合成とその評価
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 櫻子, 堀崎 寛顕, 小川 祥二郎, 井手 久満, 東 達也
2. 発表標題 中長期のテストステロン産生状態の評価試料としての爪の有用性
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 裕文, 村上 萌, 榎原 奈穂子, 山下 純, 高山 健人, 高原 千穂, 小嶋 英二郎, 小川 祥二郎, 伊達 有子
2. 発表標題 大黃甘草湯及びセンノシド Aを投与したマウス糞便中の 短鎖脂肪酸のHPLC分析
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川祥二郎、本莊旭、森近李加子、伊達有子、榎原奈穂子、井上裕文、小嶋英二郎
2. 発表標題 In situ発生ジオキシランを活用した内因性ビタミンD3水酸化体合成法の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田 有紗, 帆保 航, 水元 優花, 楠瀬 翔一, 小川 祥二郎, 杉浦 悠毅, 西本 紘嗣郎, 東 達也
2. 発表標題 6種のGirard試薬を用いた副腎静脈血清中アルドステロンの6検体一括 LC/ESI-MS/MS 定量法の開発
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 祥二郎, 末次 薫桃, 立野 李奈, 伊達 有子, 小嶋 英二郎
2. 発表標題 内因性ビタミンD3代謝物合成への遠隔含酸素官能基化の応用
3. 学会等名 日本薬学会142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川祥二郎
2. 発表標題 重水素標識化を基盤とするLC/ESI-MS/MS用多機能誘導体化試薬のデザイン・合成と微量生理活性物質分析への活用
3. 学会等名 第30回日本分析化学会中国四国支部若手セミナー（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 化合物及び誘導体化試薬、並びに化合物の合成方法	発明者 東 達也, 小川 祥二郎, 滝脇 正貴, 福沢 世傑	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-101457	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

研究代表者HP: https://www.fukuyama-u.ac.jp/pharm/pharmacy/labo-list/anachem/
--

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