

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19130

研究課題名(和文) 魚類コラーゲン製軟骨再生材料の開発：再生医工学研究のパラダイムシフトをめざして

研究課題名(英文) Development of scaffolds for cartilage tissue engineering using marine collagen: beyond the paradigm

研究代表者

都木 靖彰 (TAKAGI, Yasuaki)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：10212002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：チョウザメ脊索から得られる Ⅱ型コラーゲン(NC)の高い原線維径性能に着目して、NC原線維が一方向に配列した薄膜上のゲルを細胞培養用カバースリップ表面にコーティングする技術の開発に成功した。加えて、NC原線維コート上でマウス軟骨前駆細胞ATDC5を培養し、NC原線維の軟骨細胞分化誘導活性が極めて高いことを証明した。また、NC原線維からなるハイドロゲルの安定した形成技術を開発し、今後の機能検証を可能とした。これらの技術をさらに発展させ、たとえばコンドロイチン硫酸などの機能性分子を導入したハイブリッド型ゲルを合成すれば、さらに機能性の高い軟骨組織工学用足場が実現することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では哺乳類やトリ由来 Ⅱ型コラーゲンでは実現し得なかった、Ⅱ型コラーゲン原線維からなる軟骨組織工学用材料の開発に成功した。たとえばNC原線維を生体適合性が低い人工高分子を用いた軟骨組織工学用人工足場材料表面にコートすれば、力学強度と生体適合性、強い軟骨細胞分化活性を合わせ持つ新規材料の合成が可能になる。加えて、光学的透過性が高いNC原線維コートはタイムラプスビデオ観察等が応用でき、Ⅱ型コラーゲン原線維に対する軟骨細胞の反応を詳細に調べるための研究ツールとしても類を見ないものである。これらの成果は魚類加工残渣由来コラーゲンの医療利用に大きく一歩を踏み出すための基盤的成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study challenged the realization of the medical application of fish collagen obtained from wastes. Using the type II atelocollagen purified from the sturgeon notochord (NC), a novel method to coat cell-culture coverslips with highly aligned collagen fibrils was developed. The NC fibrils strongly accelerated the differentiation of ATDC5 pre-chondrocytes to mature chondrocytes and induced the cells to secrete cartilage extracellular matrices actively. Moreover, the high transparency of the coating enabled the time-lapse video study, which will be a powerful tool for understanding the reactions of chondrocytes to type-II collagen fibrils. The coating could be applicable to the scaffolds made of artificial materials for cartilage tissue engineering (CTE) to enhance their biocompatibility. In addition, A novel method to fabricate a hydrogel made of NC type II collagen was developed. The hydrogel's functionality as CTE scaffolds awaits to be clarified.

研究分野：水産学

キーワード：魚類 Ⅱ型コラーゲン 細胞足場 軟骨組織工学 水産廃棄物利用

1. 研究開始当初の背景

魚類加工残渣に多量に含まれるコラーゲンの産業利用は我が国でも進んでいるものの、その大部分は価格の観点から輸入原料由来であり、従来の研究は当初目標である国産の魚類加工残渣物の有効活用と廃棄物量減少につながっていない。しかし、安価な魚類コラーゲンを生産する中国・東南アジア諸国等と比較し、高度に衛生的な水産物取り扱い技術を持つ我が国においては、厳密な衛生管理のもとで魚類コラーゲンを生産できるため、微生物由来のエンドトキシン(体内に入ると高熱を引き起こし、医療用材料では厳密な管理が必要)の混入を防いだ医療用コラーゲン生産で有利であると考え、国産魚類コラーゲンの医療利用を着想した。

本課題で研究対象とするⅠ型コラーゲンは市場流通量が圧倒的に少ない貴重なコラーゲンである。研究開始当初、ニワトリ軟骨由来の健康機能性を謳う商品が我が国の市場に流通していたほか、ウシやニワトリⅡ型コラーゲン溶液が試験研究用にわずかに販売されている程度であった。その理由として、骨と皮に多量に含まれるⅠ型と比べⅡ型は組織量が少ない軟骨だけに含まれているうえ、抽出効率がⅠ型コラーゲンよりも低いことが挙げられる。軟骨魚類やチョウザメの背骨軟骨・鼻軟骨、チョウザメの脊索、サケの鼻軟骨など軟骨もしくは軟骨と由来を同じくする組織である脊索が、その加工残渣から豊富に得られる魚類は、哺乳類に替わるⅡ型コラーゲンの主要な供給源となり得るが、魚類Ⅱ型コラーゲンの市場流通は研究開始当時は健康食品用のものしか確認できず、魚類Ⅱ型コラーゲンを細胞培養や軟骨再生用細胞足場材料合成に用いることを目的とした商品はもとより、その試験研究すら著者らが知る限り存在しなかった。

そこで、これまで我々の研究室でも未着手であったチョウザメ脊索由来Ⅰ型コラーゲン(NC)を軟骨再生用足場材料開発に利用する研究を構想し、これまでに研究成果を蓄積してきたチョウザメ浮袋由来Ⅱ型コラーゲン(SBC)を用いた骨再生用足場材料の成果とあわせて、哺乳類コラーゲンでは到達不可能な、魚類コラーゲンの特長を活かした医療用材料開発の未踏の新展開を図る本課題の着想に至った。

なお、本課題の研究開始時点で、NCの脊索からの抽出・精製技術とその生化学的・材料化学的特性も解明を完了していた(Meng et al., 2019)。また、SBCを用いた研究では、著者らはⅡ型コラーゲンSBCの生化学的・材料化学的特性解析や(Meng et al., 2019, 2020; Zhang et al., 2014, 2016, 2019)、SBCを用いたマテリアル研究(Moroi et al., 2019; Mredha et al., 2015, 2017; Nonoyama et al., 2016)の成果を挙げていたほか、2019年度採択の挑戦的萌芽研究による成果(課題番号19K22322 研究成果報告書参照)を世界に先駆けて挙げていた。具体的には、申請者らSBCやNCが、哺乳類コラーゲンよりも迅速に生体コラーゲン線維レベルの太い線維を形成する能力を持つことを発見した。SBCは骨型コラーゲン、NCは軟骨型コラーゲンであるため、それぞれ骨再生用材料、軟骨再生用材料として優れている。そこで、まずSBCを用いて哺乳類コラーゲンでは不可能な、生体コラーゲン原線維と同等の太さのⅠ型コラーゲン原線維を細胞培養ウェル底面にコートする技術を開発(Moroi et al., 2019; 図1)、コート上で骨芽細胞の分化が強力に誘起されることを証明した。これらの成果を参考としつつ、Ⅰ型コラーゲンNCに関する研究を進めることが可能であった。

なお、本構想ではチョウザメ浮袋や脊索と言った特殊な材料を用いる計画になっていたが、北海道大学では美深町にある北海道最大のチョウザメ養殖場と連携しており、研究に十分な量の原料を仕入れるすべを持っていた。

2. 研究の目的

次の目標として、本研究の目的を『NC(Ⅰ型コラーゲン)を用いた軟骨組織工学用足場材料を開発すること』におき、SBC(Ⅱ型)を用いた骨組織工学用足場材料とあわせて、哺乳類コラーゲンでは到達不可能な再生医療用材料開発の未踏の新展開を図る。

3. 研究の方法

1. NCを用いたⅠ型コラーゲン原線維コート技術の開発

SBCを用いた原線維コート技術を基盤として、NCを用いたⅠ型コラーゲン原線維コート技術を開発に挑戦した。加えて、Ⅰ型コラーゲン原線維コート上でマウス軟骨前駆細胞ATDC5を培養し、増殖と分化をCCK8キット、細胞形態、軟骨基質検出(アルシアンブルー染色、免疫組織化学)と軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現定量(qPCR)で明らかにする。生体適合性が高いNC原線維コート技術は、コラーゲンと比べて力学的強度が高い一方で生体適合性が低い生分解性人工高分子を用いた軟骨再生用人工足場材料表面へのコート技術として応用可能である。

2. NCを用いた3次元足場ゲルの開発

軟骨の主成分得あるⅠ型コラーゲンは、軟骨組織工学用の足場材料として最適であると考え

られるが、Ⅱ型コラーゲンの原線維形成不全でゲル化しない、強度が不十分、軟骨細胞分化能が不十分でサイトカインの添加を必要とする、などの課題を有する。本研究ではこれらを、NCが持つ高い原線維形成能力の活用、NC線維間への化学架橋導入による強度増大、軟骨由来酸性多糖（コンドロイチン硫酸、CS）添加による電荷刺激の導入による細胞分化刺激等により解決を図る。具体的には、NCコラーゲン原線維形成促進バッファの濃度、pH、架橋剤の種類、濃度、架橋時間、ゲルへの細胞播種濃度（細胞間の接触程度が軟骨細胞分化に重要）、CS添加濃度（負電荷導入が分化を促進する）等を最適化し、実用に近い材料の開発に挑戦した。

3. SBC もしくは NC を用いた軟骨細胞 spheroid 作成技術の開発

軟骨組織工学では、足場材料を用いずに軟骨細胞塊を軟骨用組織に成長させる方法（pellet 法、アガロースを用いた平板塊形成法）も研究が進んでいる。しかし、細胞塊の大きさに限界があり（大きくなると内部が壊死）、再生医療への実用は困難である。この改善法として、本小課題では ATDC5 を用いて小型球状細胞塊（spheroid）を形成させて軟骨用組織に成長させ、移植時に多数の spheroid を薄層平板状に結着させて大型化するとともに栄養成分供給を確保する技術の開発に挑戦した。課題は spheroid 形成と spheroid 間の結着であるが、これには SBC もしくは NC を用いる。我々の研究室のこれまでの予備試験で、既報の方法では spheroid を形成しないマウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 同士を SBC 添加により結着させ、spheroid を形成させることに成功している（図 2、ブタコラーゲンでは spheroid は形成されない、未発表）。spheroid 間の結着にも、SBC もしくは NC が細胞間結着を誘起するものと予想される。SBC は化学架橋なしでは 37°C、24 時間で分解し、spheroid は足場材料のない状態なることも確認している（未発表）。

4. 研究成果

1. NC を用いたⅡ型コラーゲン原線維コート技術の開発

NC を用い、細胞培養用プラスチック製カバースリップ表面にⅡ型コラーゲン原線維をコーティングする技術を開発した。コーティングに用いるコラーゲン溶液の濃度、カバースリップに添加するコラーゲン溶液量、原線維形成を促すリン酸バッファ濃度、原線維形成時間、原線維形成温度、原線維形成後の架橋条件を最適化した結果、図 1 に見られるようなⅡ型コラーゲン原線維からなる薄膜上ゲルのコーティングに成功した。Ⅱ型コラーゲン原線維の直径の平均値は 140 nm、範囲は約 50 nm ~ 400 nm であり、ヒト生体軟骨におけるⅡ型コラーゲン原線維の直径の範囲内であった。

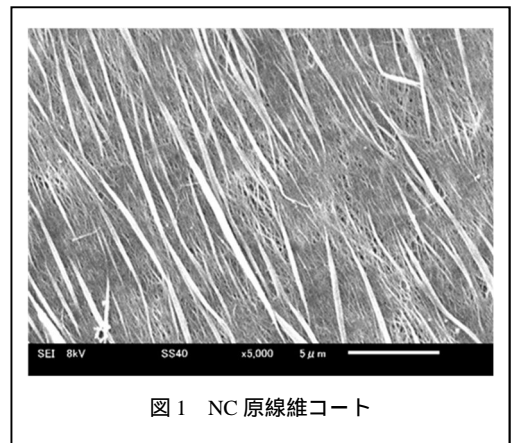


図 1 NC 原線維コート

次に、NC 原線維コート上に ATDC5 を播種し、NC 分子コート上に播種した場合と比較することで、その優位性を検証した。

1) 播種直後の細胞の行動（タイムラプス観察）

NC 原線維コート、NC 分子コートどちらに播種した場合においても、ATDC5 細胞は 6 時間後までに接着し、複数の糸状仮足を伸展した。しかし、仮足の伸長・収縮運動は原線維コート上で不活発であった。さらに、細胞の形態も両コートで異なっており、分子コート上の細胞が様々な多角形状を示したのに対し、原線維コート上では両端が細長く伸長した形態を示し、全体的に細胞が小さくて細胞高が高かった。播種 24 時間後に培養液を分化培地に交換したところ、糸状仮足の動きが両群で活発化し、原線維コート上では細い糸状仮足の伸長・収縮運動が繰り返され細胞遊走は不活発であったのに対し、分子コート上では様々な形態の糸状仮足が観察され、細胞遊走が活発であった。このように、分子コートと比べて原線維コート上では糸状仮足の運動は活発なものの細胞遊走は不活発で、細胞がより強固に細胞外基質に結合していることが予想された。

2) 細胞増殖

CCK8 キットは細胞呼吸量を指標に細胞数を推測するキットである。本キットで定量された細胞増殖は分子コート上で速く、位相差顕微鏡観察では分化培地に変更して 3 日後にはほぼコンフルエント状態に達した。一方、原線維コート上では細胞増殖が遅く、14 日後でもコンフルエントに達しなかった。一般に分化期の細胞は増殖しなくなることから、原線維上では細胞分化が進行している可能性が示された。

3) アルシアンブルー（AB）染色による細胞外基質産生の定性的分析

AB は軟骨細胞が分泌するプロテオグリカン（主にアグリカン）に結合する酸性糖鎖（主にコンドロイチン硫酸）を染色する。よって、細胞培養試験において、AB 染色は軟骨基質が分泌されたことの間接的証明として頻用される実験手法である。分子コート上では、分化培地に交換後 14 日で AB 染色陽性となり、軟骨基質の分泌がはじまったことが示唆された。しかしその後培養 28 日まで染色が強陽性になることはなく、軟骨基質産生活性は高くないことが示された。一方で、原線維コート上でも培養 14 日後に AB 染色陽性となり、28 日後には強陽性となった。このことから、分子コートと比べて原線維コート上で軟骨基質産生が活性化していることが予想された。

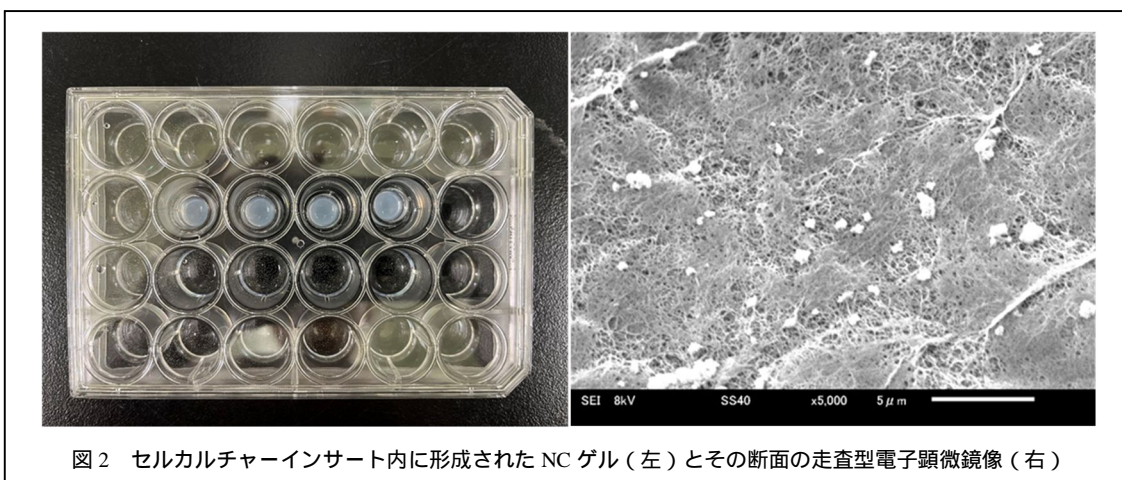
4) 軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現定量（qPCR）

軟骨細胞分化マーカーとして、本研究では Sox9 (*Sox9*)、アグリカン (*Acan*)、Ⅱ型コラーゲン (*Col2a1*) mRNA 発現量を定量した。Sox9 は軟骨細胞が発現する様々な遺伝子の発現調節を司る転写因子である。アグリカン、Ⅱ型コラーゲンはどちらも軟骨細胞が生産し、アグリカンは軟骨基質の主要なプロテオグリカン、Ⅱ型コラーゲンは軟骨基質の主要なコラーゲンである。qPCR 解析の結果、これらはすべて、分化培地に交換後 21 日において分子コート上に比べて原線維コート上で発現量が高く (分子コート群と比べた原線維コート群の発現量は、*Sox9* は約 5 倍、*Acan* は約 20 倍、*Col2a1* は約 5 倍)、原線維上では軟骨細胞分化が活性化されて軟骨基質産生が活発に起こることが示された。

以上のように、本小課題では NC を用い、細胞培養用プラスチック製カバースリップ表面にⅡ型コラーゲン原線維をコーティングする技術を開発し、Ⅱ型コラーゲン原線維がⅡ型コラーゲン分子に比べてマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 細胞の軟骨細胞への分化を効率よく誘導し、活発に軟骨基質を産生させる機能をもつことを明らかにした。

2. NC を用いた 3 次元足場ゲルの開発

SBC 溶液に比べ NC 溶液は同じ濃度でも粘性が高い。これを利用してセルカルチャーインサートを用いて NC ゲルを作成する技術を開発した (図 2)。セルカルチャーインサート底面はポアサイズ一定のメンブレンで、底面を通してバッファがインサート内のコラーゲン溶液に浸透する一方、粘性が高い NC コラーゲン溶液は底面から漏れ出すことなく、原線維形成 (=ゲル形成) が進行する。図 2 (左) は、0.8% の NC ゲル溶液を用いて 21°C で 48 時間原線維形成を促した際に形成されたゲルの写真である。ゲルは白濁しており、原線維形成が十分に進行したことを予想させる。ゲルの断面を走査型電子顕微鏡で観察すると (図 2 右)、ゲルは原線維からなることが証明された。



現在、このゲルを用いた細胞培養を計画している。ゲル表面に細胞をコンフルエントになるよう培養した後に、もう一つのゲルで細胞をサンドイッチするなど、特殊な培養法が必要であるものと予想している。CS 添加実験は時間的に実現できなかった。

3. SBC もしくは NC を用いた軟骨細胞 spheroid 作成技術の開発

まず SBC とマウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いて、spheroid 形成条件を詳細に検討した。培養ウェルには低細胞接着性の U 字底 96 ウェルプレートを用い、MC3T3-E1 播種 24 時間後に spheroid 形成の有無を判定した。その結果、MC3T3-E1 は、SBC 濃度 0.01% ~ 0.08% で spheroid を形成し、0.04% で最も形成率が高く 80% 以上の形成率を示した。この値は Metzger et al. (2011) が報告したスフェロイド形成率 60% よりも大きく、形成効率が高いと言える。また、spheroid の直径は SBC 濃度により変化せず約 300 μm で一定であったが、SBC 濃度 0.04% の時に直径の変動係数が最も小さかった (0.056)。Morimoto and Kunii (2019) は、LASCol と名付けられた特殊なブタⅡ型コラーゲン由来の細胞低接着性コラーゲンをコートした表面で細胞を培養することで、3つの線維芽細胞系株化細胞 (マウス胚由来 NIH/3T3、マウス胚由来 MEF、ヒト真皮由来 NHDF) が spheroid を形成することを示した。この方法では、一つのウェル中に多数の spheroid が形成され、それらがディッシュ表面のコラーゲン基材に弱く接着する。しかしその spheroid は直径の平均が 41 μm 程度と小さく、その変動係数は 0.23 と大きかった。本研究で開発した技術は、安定して同じ大きさの大型 spheroid が形成される点で、既報にはない新技術であると言える。なお、同濃度のブタ真皮由来Ⅱ型コラーゲンを加えた場合には spheroid 形成は全く起こらなかったことから、spheroid 形成は SBC に特異的な機能であると考えられる。

次に、同じ技術を用いて ATDC5 細胞の spheroid 形成実験をおこなった。しかしながら、培養期間を 120 時間まで伸ばして観察したが、SBC 濃度 0.01% ~ 0.08% で ATDC5 の spheroid が形成されることはなく、本課題の挑戦は不成功に終わった。

以上のように、本課題では魚類加工残渣から採取できるコラーゲンの高付加価値な医療利用を実現し、これまで食利用が中心であった魚類副生物利用の方向性を大きく転換することに挑戦した。具体的には、チョウザメ脊索から得られるⅠ型コラーゲン (NC) の高い原線維径性能に着目して、NC 原線維が一方向に配列した薄膜上のゲルを細胞培養用カバースリップ表面にコーティングする技術の開発に成功した。生体適合性が高いと考えられる NC 原線維コート技術は、コラーゲンと比べて力学的強度が高い一方で生体適合性が低い生分解性人工高分子を用いた軟骨組織工学用人工足場材料表面へのコート技術として応用可能である。これにより、力学強度と生体適合性、そして強い軟骨細胞分化活性を合わせ持つ新規材料の合成が可能になるものと考えられる。加えて、NC 原線維コートは光学的透過性に優れるため、細胞培養用顕微鏡観察が可能で、本研究でも示したようにタイムラプスビデオ観察等が応用できるため、Ⅰ型コラーゲン原線維に対する軟骨細胞の反応を詳細に調べるための研究ツールとして類を見ないものである。また、NC 原線維からなるハイドロゲルの安定した形成技術を開発し、今後の機能検証を可能とした。これらの技術をさらに発展させ、たとえばコンドロイチン硫酸などの機能性分子を導入したハイブリッド型ゲルを合成すれば、さらに機能性の高い軟骨組織工学用足場が実現することが期待される。本課題の成果は、魚類加工残渣由来コラーゲンのバイオメディカル分野への利用に大きく一歩を踏み出すための基盤的成果であると考えられる。

< 引用文献 >

- Meng D, Li W, Ura K, and Takagi Y (2020) Effects of phosphate ion concentration on *in-vitro* fibrillogenesis of sturgeon type I collagen. *Int. J. Biol. Macromol.*, 148: 182-191. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.128
- Meng D, Tanaka H, Kobayashi T, Hatayama H, Zhang X, Ura K, Yunoki S and Takagi Y (2019) The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products. *Int. J. Biol. Macromol.*, 131: 572-580. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.091
- Metzger W, Sossong D, Bächle A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, and Oberringer M (2011) The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytherapy* 13, 1000–1012. doi: 10.3109/14653249.2011.583233
- Morimoto K and Kunii S (2019) Latent nature of collagen in promoting three-dimensional adherent spheroid formation of fibroblasts. *Materialia* 8, 100450. doi: 10.1016/j.mtla.2019.100450
- Moroi S, Miura T, Tamura T, Zhang X, Ura K, and Takagi Y (2019) Self-assembled collagen fibrils from the swim bladder of Bester sturgeon enable alignment of MC3T3-E1 cells and enhance osteogenic differentiation. *Mater. Sci. Engineer. C*, 104: 109925. doi: 10.1016/j.msec.2019.109925
- Mredha MdTI, Kitamura N, Nonoyama T, Wada S, Goto K, Zhang X, Nakajima T, Kurokawa T, Takagi Y, Yasuda K and Gong JP (2017) Anisotropic tough double network hydrogel from fish collagen and its spontaneous *in vivo* bonding to bone. *Biomaterials*, 132: 85-95. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.005
- Mredha MdTI, Zhang X, Nonoyama T, Nakajima T, Kurokawa T, Takagi Y, and Gong JP (2015) Swim bladder collagen forms hydrogel with macroscopic superstructure by diffusion induced fast gelation. *J. Mater. Chem. B*, 3: 7658-7666, doi: 10.1039/C5TB00877H
- Nonoyama T, Wada S, Kiyama R, Kitamura N, Mredha Md TI, Zhang X, Kurokawa T, Nakajima T, Takagi Y, Yasuda K, and Gong JP (2016) Double-network hydrogels strongly bondable to bones by spontaneous osteogenesis penetration. *Adv. Mater.*, 28: 6740–6745, doi: 10.1002/adma.201601030
- Zhang X, Adachi S, Ura K, and Takagi Y (2019) Properties of collagen extracted from Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* and assessment of collagen fibrils *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 137: 809-820. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.021
- Zhang X, Azuma N, Hagihara S, Ura K, Adachi S, and Takagi Y (2016) Characterization of type I and II procollagen $\alpha 1$ chain in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) and comparison of their gene expression. *Gene*, 579: 8-16, doi:10.1016/j.gene.2015.12.038
- Zhang X, Ookawa M, Tan Y, Ura K, Adachi S, and Takagi Y (2014) Biochemical characterization and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*. *Food Chem.*, 160: 305-312, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.075
- Zhang X, Zhang H, Toriumi S, Ura K, and Takagi Y (2020) Feasibility of collagens obtained from bester sturgeon *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* for industrial use. *Aquaculture*, 529, 735641. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735641

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Linyan SHI, Kazuhiro URA, Yasuaki TAKAGI
2. 発表標題 Effect of self-assembled type II collagen fibrils on morphology and growth of pre-chondrogenic ATDC5 cells
3. 学会等名 The 8th international symposium of East Asia Fisheries Technologists Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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	浦 和寛 (URA Kazuhiro) (90360940)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	

	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
研究協力者	石 林艶 (Shi Linyan)		大学院博士後期課程学生

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