

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 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：18K05693  
研究課題名(和文) 体細胞初期化技術による遺伝資源の保全に対応したユニバーサル卵子の作出と評価研究

研究課題名(英文) Production and evaluation research of universal eggs corresponding to the conservation of genetic resources by somatic cell reprogramming technology

研究代表者  
安齋 政幸 (Anzai, Masayuki)  
近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号：30454630  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物は、医学および基礎生物学の分野の研究に使用される可能性がある。しかし、生息域の縮小により遺伝資源の枯渇化が危惧されている。本申請では、老化マウスやアカネズミ由来線維芽細胞を除核卵母細胞と融合させ遺伝資源の保全に対応したユニバーサル卵子の作出と評価研究を構築した。再構築された卵子は、低メチル化状態をさらにサポートするために卵細胞質でのドナー細胞の長時間露光とドナー細胞のVCによる前処理を調査し、卵細胞質での3時間の曝露が、いくつかの発生能力を高める可能性があることを発見しました。これらの結果は、体細胞核移植技術を介した、エピジェネティックな遺伝資源保全研究へ応用できることが示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、小分子の培地への添加によりマウス核移植胚の発生率を劇的に向上させる方法を開発した。この新規核移植法を用いて、従来法では初期化が困難であった野生マウス細胞の初期化を誘導する種々の条件検討を行った結果、トリコスタチンA (TSA) およびビタミンC (VC) と脱イオンウシ血清アルブミン (d-BSA) で処理した胚の免疫細胞化学的染色により、H3K9トリメチル化の減少を示し細胞分裂の再開を誘起することが可能であった。これらの手法は、現存する動物組織からの遺伝的評価が可能であることを示すと共に新たな遺伝資源保存法を提示すると共に、最終的に、絶滅動物のゲノムを保存・増幅する手法開発が期待できる。

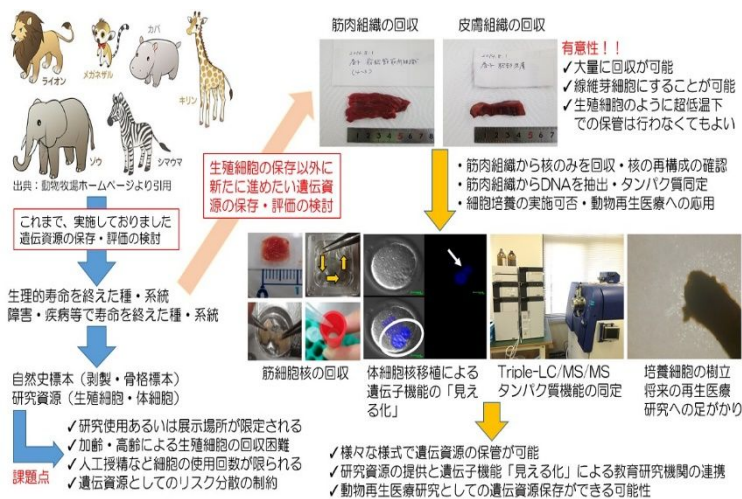
研究成果の概要(英文)：Wild animals may be used for research in the fields of medicine and basic biology. However, there is concern that genetic resources will be depleted due to the shrinking habitat. In this study, we constructed a universal ovum production and evaluation study corresponding to the conservation of genetic resources, it used the aged mouse and Apodemus speciosus-derived fibroblasts to fusion enucleated oocytes. Reconstructed oocytes were investigated for long exposure of donor cells in the egg cytoplasm and pretreatment with VC of the donor cells to further support the hypomethylated state, and 3 hours of exposure in the egg cytoplasm was the embryo. We have discovered that it may increase the developmental potential of some of the. It was suggested that these results can be applied to epigenetic genetic resource conservation research through somatic cell nuclear transfer technology.

研究分野：動物資源保全学

キーワード：遺伝資源保全 体細胞核移植 マウス 実験動物 動物園動物 野生動物

### 1. 研究開始当初の背景

現在、世界中で絶滅の危機に瀕している動植物は既に2万種を超えている。これらの種を保護するために本邦においても、生息地における生息数の確保を目的とした「域内保全事業」及び飼育下繁殖技術を活かして、動物園や水族館等の「域外保全事業」が行なわれている(大沼、2014)。また、動物を飼育下で継続的に維持するには、遺伝的多様性を確保することが重要である。しかし、飼育施設や環境が限られるために大規模に実施するには難しい。そのため、域外保全事業の一環として、生殖細胞や培養細胞等の遺伝資源保存が展開されている(村田、2014)。これら遺伝資源の保存は、現存する動物種が生きた状態または生理的寿命を終えて死後もまもない状態に限られる(Cetinkaya *et al.*, 2014)。さらに、近年、動物園や水族館等の展示動物においては個体の高齢化が深刻化しており、繁殖能の低下に伴い生殖細胞の回収は難しくなることが挙げられ、遺伝的多様性の保全は急務とされている。しかし、死亡した動物個体は、剥製標本や骨格標本として博物館での展示や大学等の研究機関に譲渡され研究材料として活用されるのはごく一部であり、細胞が生理機能を保持した状態で保存することは難しく、廃棄物となることが現状である(遠藤、2001)。



これまで死亡個体に関する個体復元及び遺伝資源の保存に関する研究は、-20 で16年間冷凍保存されたマウス個体の体細胞核から、体細胞核移植技術によりクローンマウスを作出した(Wakayama *et al.*, 2008)。また、凍結保護剤を使用せずに-80 で10年間冷凍保存された種雄牛の精巣から培養細胞を樹立しクローン個体を作成した(Hoshino *et al.*, 2009)。

申請者も、野生マウス由来組織から線維芽細胞を樹立し体細胞核移植技術により再構築胚の作出に成功した(安齋ら、2014)。さらに、死亡した動物園動物由来組織を真空乾燥し保存した体細胞核を体細胞核移植により再構築卵子の作出に成功した(梶本ら、2016)。これらの成果報告は、個体を構成する体細胞核や体細胞が凍結保護剤を用いずに保存された組織内で生理学的機能を有していることを示唆している。一方で卵子を得ることが困難であるこれらの動物種においては、近縁種の卵子を使用する技術が必須となる。しかし、再構築卵子の作出例はほとんどなく、申請者が、これまでに蓄積したノウハウを積極的に推進することは極めて効率的であり唯一の手法となる(安齋ら、2017)。

### 2. 研究の目的

本研究では、野生動物種由来の遺伝情報を有する次世代クローン技術の開発を最終目標として、ユニバーサルな卵子作出と評価系から、下記の3項目について重点的に検討することを目的とした。(1) Trichostatin A (TSA)及びVitamin C (VC)の培地中への連続添加によってマウス体細胞核移植胚の発生改善の検討を行なう。さらに、(2)この新規体細胞核移植法を用いた高齢個体由来培養細胞を用いた体細胞核由来個体作出の検討を行ない、高齢動物園動物への研究資源の活性化を目標とする。(3)野生マウス由来体細胞を用いた体細胞核移植技術により発生再開に導くヒストン動態の定量化を検討する。特に生理的寿命を終えた個体から回収される体細胞核を用いて高度な熟練技術と十分な経験が必要とされる体細胞核移植技術を通じて、クローン胚の作出と発生メカニズムを検証する。

これらの新手法を用いて、高齢動物や動物園動物由来の遺伝情報を有する細胞の増殖を最終目標とする。また、希少動物や絶滅危惧種の遺伝資源保全研究における体細胞の評価を確立することで、環境破壊により種多様性損失が危惧される折、新手法の理解が深まり、先進的な遺伝資源保存法の一助が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、各研究目的を踏まえて、5項目について実施した。なお、本実験に関する動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規程に準じて実施した。

(1) Trichostatin A (TSA)及びVitamin C (VC)の培地中への連続添加によってマウス体細胞核移植胚の発生改善の検討

体細胞核移植時に使用する TSA および VC について、野生マウスへ使用する場合への適用時間濃度の検討を実施した（研究の方法(3)）。

(2) 新規体細胞核移植法による高齢個体由来培養細胞を用いた体細胞核由来個体作出の検討

若齢および老齢動物の筋組織から樹立した線維芽細胞を用いて細胞評価マーカーの検討を試みた。マウス線維芽細胞は、11.5 日齢の胎子および 48 ヶ月齢に達した老化マウス皮膚組織から樹立した。それぞれ樹立した各線維芽細胞は、核型解析による継代への影響を確認した。また Senescence Detection Kit を用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼ(SA- $\beta$ -Gal)の活性を測定することで老化細胞を組織化学的に検出した。体細胞核移植後発生した再構築卵子は受容雌へ移植後産子への発生を確認した。

(3) 野生マウス由来体細胞を用いた体細胞核移植技術により発生再開に導くヒストン動態の定量化

アカネズミ由来線維芽細胞を用いた核移植において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を含む活性化処理後の再構築卵子がヒストンメチル化への影響を検討した。ドナー細胞の調整には、富山市ファミリーパークから分与されたアカネズミ(*Apodemus speciosus*)尾部組織を用いて樹立した初代培養細胞を供試した。B6D2F1:Slc(*Mus musculus*)由来卵細胞を用いて除核操作後、HVJ-Envelope を用いて細胞融合操作を実施した。融合操作 1 時間後、早期染色体凝集を形成した卵細胞は、50nM TSA 含有培地を用いて活性化処理をおこなった。活性化処理後、前核構造の形成を確認した。続いて前核期卵細胞は、10 $\mu$ g/mL VC 含有培地にて 7 時間培養後、2 細胞期への発生を観察した。さらに、再構築した前核期卵細胞および 2 細胞期胚は、免疫細胞染色操作による H3K9me3 および H3K4me3 の局在解析および蛍光輝度を測定した。

4. 研究成果

本研究において、新たに得られた知見をまとめると以下の通りである。

(1) Trichostatin A (TSA) 及び Vitamin C (VC) の培地中への連続添加によってマウス体細胞核移植胚の発生改善の検討

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理は、SCNT 胚のヒストンマークを変更することで再プログラミングを加速する。また、ヒストン修飾剤として機能 VC は、H3K9 のトリメチル減少させることが知られており、この低分子化合物の添加時期の特性と脱イオン化 BSA の共添加による再構築卵細胞の発生を検討した。その結果、TSA と VC の組み合わせが、dBSA とともに、SCNT 胚の発達を劇的に増強することを確認された。その、タイムスケジュールを見出すことに成功した。この方法は、簡単な手順で実用的なレベルで再構築卵細胞の作出とクローンマウスを高効率で作出することを可能にすると考えている。したがって、これらの成果は、希少動物の遺伝資源を保存し、核の再プログラミングと初期胚発生の分子メカニズムを理解するために、体細胞核移植技術をさらに改善する効果がある事も示唆した。

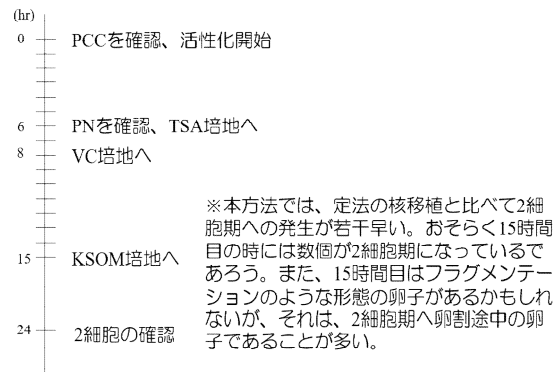


図1. 融合操作後の培養スケジュール

したがって、これらの成果は、希少動物の遺伝資源を保存し、核の再プログラミングと初期胚発生の分子メカニズムを理解するために、体細胞核移植技術をさらに改善する効果がある事も示唆した。

(2) 新規体細胞核移植法による高齢個体由来培養細胞を用いた体細胞核由来個体作出の検討

マウス線維芽細胞を用いた核型解析の結果、60%以上が正常の核型(n=40)を保持していた。また、細胞透過性 SA- $\beta$ -Gal 基質として、対数増殖能を認められた各線維芽細胞を用いて SA- $\beta$ -Gal 活性を測定した結果、マウス線維芽細胞では 48 ヶ月齢マウス由来線維芽細胞において、SA- $\beta$ -Gal 活性が陽性傾向を示した。次に、これら樹立した線維芽細胞を用いた体細胞核移植を行った。

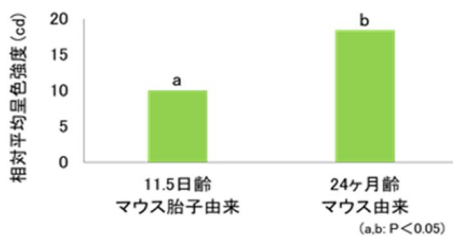


図2. 24か月齢に達した高齢マウス由来培養細胞の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定による老化評価

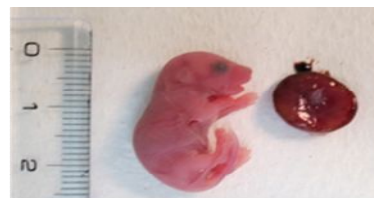


図3. 24か月齢に達した高齢マウス由来培養細胞から作出したクローンマウス

得られた再構築胚を移植した結果、77% (41/75)の卵子が再構築卵子へと発生し 98% (41/41)が2細胞期胚へ発生した。また、一部の胚を受容雌へ移植したところ、正常に個体へ発生することを確認した。

### (3) 野生マウス由来体細胞を用いた体細胞核移植技術により発生再開に導くヒストン動態の定量化

アカネズミドナー細胞を用いて HVJ-E による細胞融合によって作製された融合卵子は、93% (93/100) の卵子が早期染色体凝集を形成した。Kishigami らの方法にて活性化処理を行なった結果、78% (78/93) の卵子が前核構造の形成を認め、TSA と VC そして dBSA の添加された培地内では 92% (44/48) が 2細胞期胚へ発生した。

核移植後の前核期卵子および2細胞期胚を免疫細胞染色した結果、H3K9me3の蛍光輝度は、TSA, VC 未処理区と比較して、前核期卵子では有意に上昇し、2細胞期へ発生した場合では有意に低下することを確認した(図4.5)。これらの結果、アカネズミドナー細胞は低メチル化状態にある事が示唆された。さらに、2細胞期胚内における H3K4me3 の蛍光輝度は、TSA, VC 未処理区と比較して低下することを確認し(図6.7) 同様に低メチル化状態を指示する結果が示された。

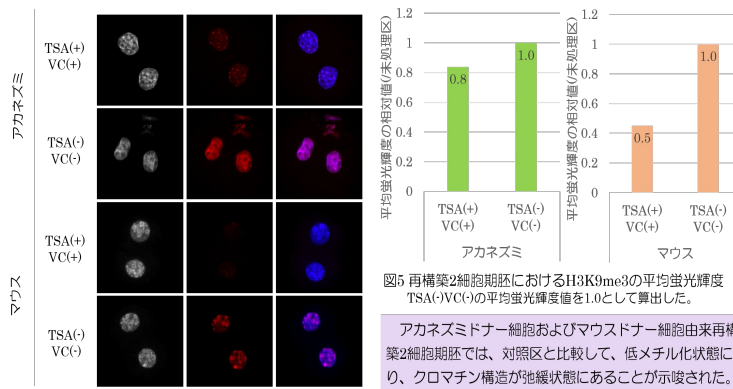


図4. 再構築2細胞期胚におけるH3K9me3の免疫染色像

図5 再構築2細胞期胚におけるH3K9me3の平均蛍光輝度 TSA(-)VC(-)の平均蛍光輝度値を1.0として算出した。

アカネズミドナー細胞およびマウスドナー細胞由来再構築2細胞期胚では、対照区と比較して、低メチル化状態があり、クロマチン構造が弛緩状態にあることが示唆された。

マウスにおいて、H3K9me3の脱メチル化は、哺乳類の胚発生中のエピジェネティックな変化に影響を与え、発生停止を回避する(Liu *et al.*, 2016)。アカネズミドナー体細胞として作製した再構築胚内では、TSAおよびVC処理が、再構築2細胞期における H3K9me3 の脱メチル化を生じさせた。さらに、H3K4me3 は低メチル化にあり、遺伝子発現促進型にあることが明らかとなった。

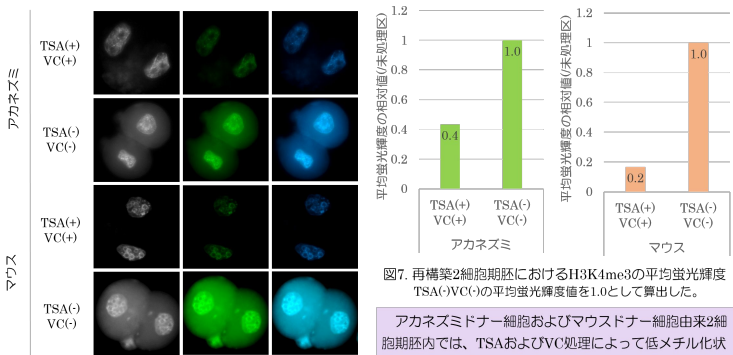


図6. 再構築2細胞期胚におけるH3K4me3の免疫染色像

図7. 再構築2細胞期胚におけるH3K4me3の平均蛍光輝度 TSA(-)VC(-)の平均蛍光輝度値を1.0として算出した。

アカネズミドナー細胞およびマウスドナー細胞由来2細胞期胚内では、TSAおよびVC処理によって低メチル化状態にあることがわかった。

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 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Rika Azuma, Yuki Hatanaka, Seung-Wook Shin, Hitoshi Murai, Minoru Miyashita, Masayuki Anzai, Kazuya Matsumoto.	4. 巻 66
2. 論文標題 Developmental competence of interspecies cloned embryos produced using cells from large Japanese field mice ( <i>Apodemus speciosus</i> ) and oocytes from laboratory mice ( <i>Mus musculus domesticus</i> ).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of reproduction and development	6. 最初と最後の頁 255-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-167	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 安齋政幸	4. 巻 81
2. 論文標題 動物園動物への遺伝資源保全に向けた橋渡し研究とマンモス (古生物) への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LAB1021	6. 最初と最後の頁 27-30
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 TSUJIMOTO Yasunori, FUJIKI Kana, ALAM MD Emtiaj, TSUKAMOTO Masaya, AZUMA Rika, KANEKI Ryoji, ANZAI Masayuki, INABA Toshio, SUGIURA Kikuya, HATOYA Shingo	4. 巻 65
2. 論文標題 Development of feline embryos produced by Piezo-actuated intracytoplasmic sperm injection of elongated spermatids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 245 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-119	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 Yamagata Kazuo, Nagai Kouhei, Miyamoto Hiroshi, Anzai Masayuki, Kato Hiromi, Miyamoto Kei, et al	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 4050
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 Azuma Rika, Miyamoto Kei, Oikawa Mami, Yamada Masayasu, Anzai Masayuki	4. 巻 134
2. 論文標題 Combinational Treatment of Trichostatin A and Vitamin C Improves the Efficiency of Cloning Mice by Somatic Cell Nuclear Transfer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57036	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 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

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nao Fujino, Masayuki Anzai, Kazuya Matsumoto
2. 発表標題 Expression analysis of Dedd gene required for uterine in mice during early pregnancy for serum
3. 学会等名 MBSJ2020 Online 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安齋政幸, 堀光一郎, 掛井友輝央, 山鹿優真, 山崎脩杜, 藤野奈央, 松本和也
2. 発表標題 マウス血清を用いた初期の妊娠維持に必須なDedd遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安齋政幸
2. 発表標題 マウスを中心とした生殖工学技術を振り返る
3. 学会等名 実験動物技術者協会関東支部REG部会第20回特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安齋政幸
2. 発表標題 動物園動物への遺伝資源保存に対応した橋渡し研究とその応用
3. 学会等名 AWS動物学院 秋季特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安齋政幸, 野田義博, 石渡俊行, 大澤郁朗, 東 里香, 山鹿優真, 山崎脩杜, 佐藤翔太, 斎藤勝彦, 尾崎美樹, 安達那央子
2. 発表標題 キングペンギン( <i>Aptenodytes patagonicus</i> )由来精液を用いたグリセロール不含有凍結保存法の評価～凍結融解後の精子形態の一考～
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安齋政幸, 野田義博, 東里香, 山鹿優真, 佐藤翔太, 斎藤勝彦, 尾崎美樹, 安達那央子
2. 発表標題 キングペンギン( <i>Aptenodytes patagonicus</i> )由来精液のグリセロール不含有凍結保存法の開発～凍結融解精子の形態学的考察～
3. 学会等名 第3回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田義博, 小西優以, 細野雅之, 尾崎美樹, 永井匡, 東里香, 大澤郁郎, 石渡敏行, 安齋政幸
2. 発表標題 バンドウイルカ( <i>Tursiops truncatus</i> )非保存液下条件による冷蔵輸送および生存精子形態の観察の一例
3. 学会等名 第3回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西優以, 安齋政幸, 野田義博, 永井匡, 尾崎美樹, 清水智子, 細野雅之
2. 発表標題 バンドウイルカ ( <i>Tursiops truncatus</i> ) 射出精液を用いた簡便な凍結保存操作 および精液量、精子数の変動
3. 学会等名 第3回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東里香, 村井仁志, 宮下実, 松本和也, 安齋政幸
2. 発表標題 細胞培養下へのVitamin C添加が異種間核移植胚の発生に与える影響
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東里香, 野田義博, 松本和也, 安齋政幸
2. 発表標題 老齢個体由来線維芽細胞の遺伝資源保存への有用性
3. 学会等名 第52回日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 安齋政幸、西村愛美、東里香、中川隆生、松本和也
2. 発表標題 マトリゲル包埋による成熟マウス由来初期二次卵胞を用いた体外発育操作と評価
3. 学会等名 第52回日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東里香、村井仁志、宮下実、松本和也、安齋政幸
2. 発表標題 ヒストンメチル化状態がアカネズミ - マウス異属間核移植由来胚の発生に与える影響
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安齋政幸
2. 発表標題 生殖工学技術を応用した生息域外保全への橋渡し研究
3. 学会等名 関西実験動物研究会第139回研究会日本実験動物技術者協会関西支部合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安齋政幸
2. 発表標題 研究室における安全管理について～これまでの経験から～
3. 学会等名 第24回日本野生動物医学会大会シンポジウム 動物管理の現場における安全確保（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東里香、永井匡、安達那央子、佐藤翔太、齋藤勝彦、尾崎美樹、安齋政幸
2. 発表標題 キングペンギン由来射出精液の評価および凍結保存技術の開発
3. 学会等名 第24回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東里香、永井匡、安達那央子、佐藤翔太、齋藤勝彦、尾崎美樹、安齋政幸
2. 発表標題 キングペンギン( <i>Aptenodytes patagonicus</i> )由来精液のグリセロール不含有凍結保存法の開発
3. 学会等名 第2回野生動物保全繁殖研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安齋政幸、永井匡、小西優以、細野雅之、東里香、石川誠、尾崎美樹
2. 発表標題 バンドウイルカ( <i>Tursiops truncatus</i> )射出精液を用いた簡便な凍結保存操作の構築
3. 学会等名 第2回野生動物保全繁殖研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東里香、村井仁志、宮下実、松本淳希、森脇奈央、細井美彦、安齋政幸
2. 発表標題 異属間核移植胚内における抑制型ヒストン修飾の解析
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村愛美、小木曾力、東里香、中川隆生、安齋政幸
2. 発表標題 体外成熟培養中のL-carnitineが胚発生時の脂肪酸代謝遺伝子の活性を促進する
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本淳希、東里香、野田義博、鷲津朱理、森脇奈央、細井美彦、安齋政幸
2. 発表標題 高齢マウスから樹立した耳介組織由来線維芽細胞の評価
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森脇奈央、西村愛美、東里香、松本淳希、中川隆生、細井美彦、安齋政幸
2. 発表標題 脱イオン化AIubMAX添加培地がマウス体外成熟由来卵子への胚発生に与える効果
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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