

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12089

研究課題名(和文)メソポーラスシリカナノ粒子を用いたがんワクチン創出に関する研究

研究課題名(英文)Development of Cancer Vaccine Using Mesoporous Silica Nanoparticles

研究代表者

後藤 浩一 (GOTO, Koichi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：30279377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メソポーラスシリカナノ粒子(MSN)に抗原ペプチドを封入したワクチンを調製し、がん特異的免疫の誘導機能を検討した。マウスの樹状細胞(DC2.4細胞)を用いたin vitro実験では、MSNが抗原提示細胞に取り込まれることが明らかになった。鶏卵白アルブミン(OVA)をがん抗原のモデルとするin vivo実験では、がん細胞(E.G7-OVA細胞)を移植したマウスの延命効果、脾臓細胞における細胞傷害性細胞の活性化とE.G7-OVA細胞に対する細胞傷害活性が観測され、MSNワクチンによる獲得免疫の誘導が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSNは、化学的安定性に優れた多孔質微粒子であり、触媒材料や吸着剤材料等の工学分野における研究が世界中で行われている。ナノメディシン分野では、がん等の疾患細胞へ治療薬や診断薬を運ぶDDS研究の対象になっているが、免疫細胞をターゲットとする研究はほとんど報告されていない。一方、がんの免疫治療として、患者自身の免疫細胞を用いる細胞療法があるが、治療効果は不安定であり、高度な設備を要する高額な個人療法となっている。そこで、ペプチド抗原を封入したMSNワクチンの免疫誘導機能を明らかにした本研究の結果は、今後、大量供給可能なワクチン製剤の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the induction effects of MSN including cancer antigens on the cancer immunotherapy. The flow cytometric measurement and the confocal laser scanning microscopy showed that FITC labeled MSN accumulated into the mouse dendritic cells (DC2.4 cells) in vitro. The vaccination effects of MSN including antigen peptides (OVA257-264, OVA265-280) on the C57BL/6 mice with implanted lymphoma cells (E.G7-OVA cells) were examined, and the prolonged survival was observed in the mice inoculated with MSN vaccines as compared with the control in vivo. Furthermore, IFN-gamma ELISPOT assay indicated the activity of CD8+ cells in the splenocytes from the mice and the splenocytes had a tendency to increase the cytotoxicity to E.G7-OVA cells. These results suggested that MSN vaccines could be a novel nanovaccine for the cancer immunotherapy.

研究分野：生体関連化学

キーワード：メソポーラスシリカナノ粒子 がんワクチン ペプチド抗原 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

1980年代末にがん抗原の存在が明らかにされて以来、腫瘍免疫学の研究が急速な発展を遂げている。とくに、免疫機能を人為的に高めてがんの治療に応用するがん免疫療法の研究が注目されている。がん抗原の多くは、がん細胞のタンパク質に由来するペプチド断片であり、貪食細胞系のマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell, APC) に取り込まれた後、がん免疫の実行細胞である細胞傷害性 T 細胞 (キラー T 細胞) を刺激してがん特異的免疫 (獲得免疫) を誘導する。現在、外部よりがん抗原を生体に導入し、キラー T 細胞を活性化するがんワクチンの研究が進められているが、治療効果は十分得られていない。複雑な生体に対してどの様にかん抗原を投与し、APC の抗原提示機能とキラー T 細胞のがん細胞傷害活性を発現させるか、その方法論が模索されている。

一方、ナノサイズ (nm サイズ) の微小な粒子を薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) に用いるナノメディシン研究が注目されている。多孔質の内空をもつメソポーラスシリカナノ粒子 (Mesoporous Silica Nanoparticle, MSN) もその一つである。現在、MSN の孔空内に治療薬や診断薬を封入し、疾患細胞へ運ぶデリバリー担体としての研究が行われているが、免疫細胞をターゲットとするがんワクチンへの応用はほとんど報告されていない。がん免疫用のワクチン抗原として、ペプチド、タンパク質、核酸、不活性化したがん細胞やその成分など種々の形態のものが研究対象となっている。いずれの場合も、がん抗原を APC に送り込んだ後、T リンパ細胞の一種である CD8⁺ T 細胞を刺激し、がん細胞にアポトーシス細胞死を導く細胞傷害性 T 細胞へ分化誘導することが主目的となっている。とくに、人体に投与可能な GMP グレードのものの供給が比較的容易な抗原ペプチドからなるワクチンが開発されれば、多数の医療の現場に提供でき、その意義は大きいと思われる。しかしながら、抗原ペプチドを投与した場合は、生体内で分散・分解してしまい、免疫系への作用が弱く、十分なワクチン効果を得ることは難しい。そこで、ワクチン創製に MSN を応用する試みとして、抗原ペプチドを封入した MSN ワクチンのがん免疫誘導について検討した。

2. 研究の目的

本研究では、MSN を用いた新しいがんワクチンの創製を目的とし、抗原ペプチドを封入した MSN によるがん特異的免疫 (獲得免疫) の誘導機能を細胞レベルおよび動物レベルで検討した。まず、MSN と樹状細胞との相互作用を *in vitro* で観測し、MSN のワクチンキャリアーとして可能性について検討した。次に、鶏卵白アルブミン (OVA) をがん抗原のモデルとする実験系を用い、抗原ペプチドを封入した MSN のワクチンサンプルをマウスに接種し、移植がん細胞に対する免疫誘導効果を *in vivo* で観測した。また、マウスの脾臓細胞を用い、MSN ワクチンによる抗原特異的な免疫誘導機構について検討した。さらに、MSN の安全性について検討するために、正常マウスに対する毒性試験を行った。

3. 研究の方法

(1) メソポーラスシリカナノ粒子 (MSN) は、市販品 (Sigma-Aldrich) を超純水に懸濁し、バス型超音波洗浄機 (VELVO、Vs-N300s) を用いて懸濁後、光散乱光度計 (大塚電子、ELSZ-0) で粒径分布を測定して用いた。本研究では、単分散で平均粒径約 300 nm の粒径分布を持つ MSN を使用した。樹状細胞として、C57BL/6 マウス由来の樹状細胞 (DC2.4 細胞¹⁾) を使用した。DC2.4 細胞は、10% FBS 含有 RPMI-1640 に 2 mM L-グルタミン、100 mM MEM 非必須アミノ酸溶液、50 μM 2-メルカプトエタノール、100 U/mL ペニシリン・100 μg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用い、37 °C、5 % CO₂ の条件で培養して使用した。DC2.4 細胞に対する MSN の毒性評価を酵素活性測定法 WST-8 アッセイで行った。DC2.4 細胞を 96 ウェルマルチプレートに播種し、24 h 前培養後、MSN 懸濁液を加えた。24 h 培養後、Cell Counting kit-8 (同仁化学研究所) を添加し、2 h 後、攪拌、遠心 (室温、4000 rpm、10 min) して上澄み液を分取し、96 ウェルマルチプレートに移した。マイクロプレートリーダー (MOLECULER DEVICE、VERSA max) を用い、波長 450 nm の吸光度を測定した。DC2.4 細胞による MSN の取り込みは、蛍光剤で標識した MSN を用いてフローサイトメーター (FCM) (Beckman Coulter、CytoFLEX) および共焦点レーザー顕微鏡 (Leica、TCS SP) で観測した。プロピルアミン修飾メソポーラスシリカナノ粒子 (MSN-PrNH₂) (Sigma-Aldrich) の PBS (-) 懸濁液に Fluorescein isothiocyanate isomer-I

(FITC-I)(同仁化学研究所)のDMSO溶液を添加し、遮光して室温で1h攪拌した。超純水とDMSOで洗浄後、蛍光分光光度計(日立、F-2000)を用いて励起光488nmで蛍光スペクトルを確認した。FCMを用いたMSNのDC2.4細胞への蓄積の測定は、DC2.4細胞を6ウェルマルチプレートに播種し、24h前培養後、FITC-MSNのPBS(-)懸濁液を添加した。所定の時間培養後、冷HBSS(-)で洗浄し、トリプシン処理してDC2.4細胞を回収した。回収した細胞をPBS(-)で洗浄・懸濁し、70 μ mセルストレーナーで濾過後、テストチューブに移し、フローサイトメーターを用いてArレーザー(488nm)で励起し、525/40フィルターで検出した(細胞カウント数:10000個)。また、DC2.4細胞によるMSNの取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。DC2.4細胞を35mmガラスボトムディッシュに播種し、24h前培養後、FITC-MSNのPBS(-)懸濁液を添加した。所定の時間培養後、上澄みを除き、冷HBSS(+)で洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン液を加え、室温で30min固定化処理を行った。冷HBSS(+)で洗浄後、0.1%Triton X-100を加え、室温で2min浸透化処理した後、冷HBSS(+)で洗浄し、TO-PRO-3(Invitrogen)を加え、遮光して室温で処理した。冷HBSS(+)で洗浄後、HBSS(+)を加え、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)によりDC2.4細胞の培養液中のサイトカイン(IL-1 β 、IL-18)の分析を行った。DC2.4細胞を96ウェルマルチプレートに播種し、24h前培養後、MSN懸濁液を加えた。所定の時間培養後、遠心処理(4000rpm、室温、10min)して上澄みを回収し、ELISAキット(IL-1 β :eBioscience、Mouse IL-1 beta Ready-SET-GO!、IL-18:eBioscience、Mouse IL-18 Platinum ELISA!)を用いて、プロトコルに従いサイトカインの濃度を測定した。

(2)MSNのワクチンサンプルは、マウスCD8⁺T細胞のMHCクラスI(H-2K^b)のOVAエピトープH-Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu-OH(OVA₂₅₇₋₂₆₄)(Eurofins Genomics)とマウスCD4⁺T細胞のMHCクラスII(I-A^b)のOVAエピトープH-Thr-Glu-Trp-Thr-Ser-Ser-Asn-Val-Met-Glu-Glu-Arg-Lys-Ile-Lys-Val-OH(OVA₂₆₅₋₂₈₀)(Eurofins Genomics)を抗原ペプチドとして用いた。MSNを1.5mlチューブに分取し、OVA₂₅₇₋₂₆₄とOVA₂₆₅₋₂₈₀の水溶液を添加後、遠心式濃縮機(TAITEC、VC-15SP)を用いて室温で約8h減圧濃縮した。氷冷した超純水でサンプルを洗浄し、洗浄液中に回収された抗原ペプチドをHPLCで定量したところ、90%以上の抗原ペプチドがMSNに封入されていた。サンプルは、グリセロールを加えて懸濁後、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

実験に使用したC57BL/6マウス(6週齢、雌)(日本クレア)は、室温24 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度55 \pm 10%の環境で飼育し、水および餌はオートクレーブにより滅菌したものを自由に摂取させた。がん細胞は、鶏卵白オボアルブミン(OVA)を外来性に発現しているC57BL/6マウスのリンパ腫由来E.G7-OVA細胞(ATCC)を使用した。E.G7-OVA細胞は、10%FBS含有RPMI-1640(ATCC Modification)に、50 μ M 2-メルカプトエタノール、100 U/mL ペニシリン・100 μ g/mL ストレプトマイシン、400 μ g/ml G418を添加した培地で、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件で培養して使用した。

C57BL/6マウスをコントロール群とサンプル投与群に群分けし、フロイント不完全アジュバント(FIA)に懸濁したサンプルを1週間隔で3回皮下投与した。最終投与から1週間後、PBS(-)で懸濁したE.G7-OVA細胞5.0 \times 10⁶ cells/bodyを腹腔内に移植した。移植後、目視による状態観察や体重測定を行った。さらに、ワクチン成分としてToll様受容体の一つであるToll-like receptor 9(TLR9)のリガンドであるクラスB CpG オリゴヌクレオチド(ODN1826)(AdipoGen)の効果、投与回数、投与量、免疫誘導期間等の投与条件の検討を行った。

(3)MSNワクチンの免疫誘導機構について、サンプルを投与したマウスより脾臓細胞を回収し、IFN- γ Enzyme-linked ImmunoSpot (ELISPOT) アッセイによる細胞傷害性T細胞の検出とマウスリンパ腫細胞と共培養による細胞傷害活性試験を行った。IFN- γ ELISPOT アッセイでは、群分けしたマウスにサンプルを皮下投与し、投与から3週間後、マウスの脾臓を摘出した。2%FBS含有HBSS(-)中で細胞を分散し、70 μ mセルストレーナーでろ過した。遠心処理(400g、4 $^{\circ}$ C、5min)後、1 \times RBC Lysis Buffer(eBioscience)を加え、室温で5min処理し、PBS(-)で洗浄した。回収した脾臓細胞は、オートセルカウンター(Digital Bio、ADAM-MC)を用いて細胞数をカウントした。脾臓細胞を96ウェルマルチプレートに移し、培地(ネガティブコントロール)あるいはOVA₂₅₇₋₂₆₄溶液を添加後、24h培養し、IFN- γ のスポットを測定した。また、細胞傷害活性試験では、10%FBS含有RPMI1640に50 μ M 2-メルカプトエタノール、100 U/mL ペニシリン・100 μ g/mL ストレプトマイシン、10 ng/ml マウスIL-2を添加した培地で脾細胞を懸濁し、

オートセルカウンターでカウントした。一方、E.G7-OVA 細胞の培養液にマイトマイシン C (ナカライテスク) を加え、30 min 処理した。脾臓細胞の懸濁液にマイトマイシン C 処理した E.G7-OVA 細胞の懸濁液を加え、培養フラスコ中で 5 d 共培養して脾臓細胞を再刺激した。脾臓細胞 (Effector 細胞) を PBS (-) で洗浄後、10 %FBS 含有フェノールレッド非含有 RPMI1640 に 100 U/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用いて脾細胞の懸濁液を調製した。がん細胞は、E.G7-OVA 細胞と、マウスリンパ腫由来の EL4 細胞 (ATCC) を使用した。EL4 細胞は、10 % FBS 含有 RPMI-1640 に 50 µM 2-メルカプトエタノール、100 U/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地で培養して使用した。EL4 細胞と E.G7-OVA 細胞 (Target 細胞) は、PBS (-) で洗浄後、PBS (-) を用いて Target 細胞の懸濁液を調製した。カルセイン-AM (ナカライテスク) の DMSO 溶液で細胞懸濁液を 30 min 処理後、Effector 細胞と同じ培地で洗浄し、懸濁液を調製した。V 字型 96 ウェルマルチプレートに Target 細胞の懸濁液と Target 細胞の懸濁液を加え (E/T = 50/1) 遠心処理 (250 g、室温、5 min) 後、共培養した。4 h 後、遠心処理 (1000 rpm、室温、5 min) 後、上澄みを平底 96 ウェルマルチプレートに分取し、自動蛍光測定装置 (Thermo Labsystems、Fluoroskan Ascent CF) を用いて 527 nm の蛍光強度 (励起光 485 nm) を測定した。また、マウス血清中の OVA 特異的 IgG 抗体の測定を行った。サンプル投与マウスの腹大静脈から採血した血液を血清分離剤入り真空採血管 (テルモ、ペノジェクト II) に移し、遠心分離 (3000 rpm、室温、10 min) して血清を回収した。Mouse Anti-OVA IgG Antibody Assay Kit (Chondrex) を用い、キットのプロトコルに従い血清サンプル中の OVA 特異的 IgG 量の測定を行った。また、MSN ワクチンを投与した正常マウスより血液を採血し、血液検査、血液生化学検査を行った。マウスにサンプルを皮下投与し、1 w 後、マウスを約 12 h 絶食させた後、腹大静脈から採血した。採血した血液は、全自動血球計算器 (日本光電工業、Celltacα MEK-6400) を使用し、白血球数、赤血球数、血小板数、ヘモグロビン濃度を測定した。また、血液を血清分離剤入り真空採血管に移し、遠心分離して血清を回収した。生化学自動分析装置 (富士フィルム、富士ドライケム 3500V) にて、ブドウ糖、アルブミン、アルカリホスファターゼ活性、活性総ビリルビンを測定した。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞に対する MSN の影響として、マウスの樹状細胞の DC2.4 細胞の培養液に MSN を添加し、WST-8 アッセイで生細胞数を測定した。DC2.4 細胞の生細胞数は、MSN の濃度依存的に低下し、MSN 濃度 250 µg/ml 以上では、経時的な細胞数の増殖はほとんど見られず、MSN は、DC2.4 細胞に対して細胞増殖抑制を示すことが明らかとなった。DC2.4 細胞による MSN の取り込みについて、FITC で蛍光標識した MSN (FITC-MSN) を合成し、DC2.4 細胞の培養液に添加してフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡観察により観測した。フローサイトメトリーでは、培養 24 h 後、FITC-MSN 濃度 10 µg/ml と 100 µg/ml の両方で DC2.4 細胞の蛍光量が増大し、50 µg/ml で蛍光量が高く、濃度依存的な DC2.4 細胞への蓄積が示された。DC2.4 細胞による FITC-MSN の取り込みの共焦点レーザー顕微鏡観察の結果を図 1 に示した。培養時間 24 h 後、FITC の蛍光が DC2.4 細胞内、とくに細胞質で観察され、FITC-MSN の取り込みが明らかになり、抗原提示細胞内に抗原物質を運ぶキャリアーとしての有用性が示された。また、MSN を添加した DC2.4 細胞の培養液中のサイトカイン濃度を ELISA 法で分析したところ、IL-18 には変化がほとんど見られなかったが、IL-1β の濃度が増大する傾向が見られ、IL-1β の産生を誘導する可能性が示された。

(2) MSN を用いたワクチンサンプルを調製し、鶏卵白アルブミン (OVA) をがん抗原のモデルとする実験系を用いて MSN ワクチンによるがん免疫の誘導効果を検討した。サンプル 100 µl (MSN 500 µg、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 5.6 µg、OVA₂₆₅₋₂₈₀ 12 µg) を 1 w 間隔でマウスの皮下に 3 回投与し、

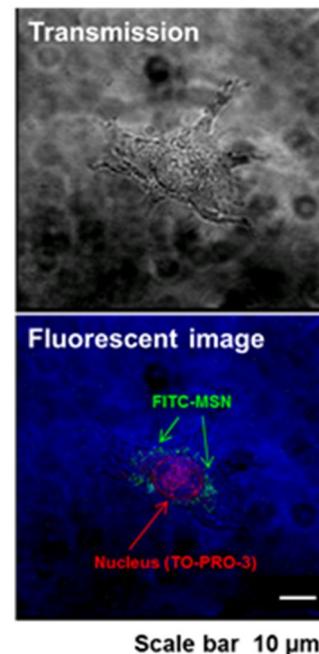


図 1 FITC-MSN 処理した DC2.4 細胞の共焦点レーザー顕微鏡写真

最終投与から 1 w 後、E.G7-OVA 細胞 5.0×10^6 cells/body を腹腔内に移植した。マウスの平均生存日数は、コントロール群 24.8 d、MSN のみを投与した MSN 群 25.4 d、抗原ペプチドのみ投与した PEP 群 29.0 d、抗原ペプチドを封入した MSN を投与した PEP/MSN 群 32.8 d となった。コントロール群に対し、PEP/MSN 群が 132% となり、延命効果が示唆された。さらに、マウスの Toll 様受容体の一つである Toll-like

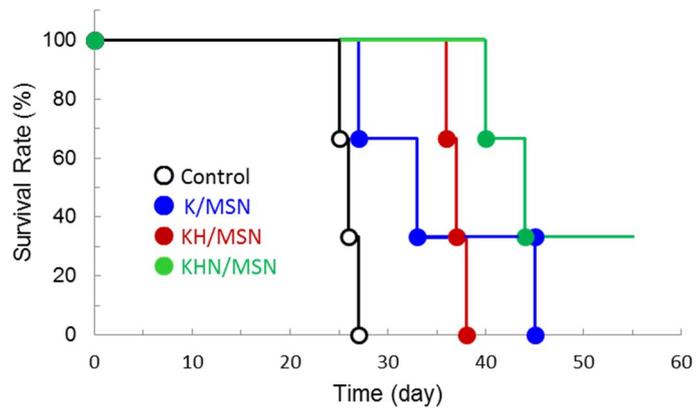


図2 E.G7-OVA細胞移植マウスにおけるMSNワクチン成分の効果

receptor 9 (TLR9) のリガンドであるクラス B CpG オリゴヌクレオチド (ODN1826) をワクチン成分としてサンプルに加え、サンプル 10 μ l (MSN 400 μ g、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 4.0 μ g、OVA₂₆₅₋₂₈₀ 8.0 μ g、ODN1826 2.0 μ g) を同様の条件でマウスに 1 回投与し、E.G7-OVA 細胞を移植した。生存曲線の結果を図 2 に示した。マウスの平均生存日数は、コントロール群 26.0 d、OVA₂₅₇₋₂₆₄ のみ封入した K/MSN 投与群 35.0 d、OVA₂₅₇₋₂₆₄ と OVA₂₆₅₋₂₈₀ を封入した KH/MSN 投与群 37.0 d、OVA₂₅₇₋₂₆₄、OVA₂₆₅₋₂₈₀ および ODN1826 を封入した KHN/MSN 投与群 46.3 d となった。コントロール群に対し、KHN/MSN 投与群が 178% となり延命効果が増大した。キラーおよびヘルパー T 細胞の抗原ペプチドに加え、CpG オリゴヌクレオチドをワクチン成分として使用したことにより、樹状細胞の成熟化、抗原提示機能が促進され、免疫誘導が向上した可能性が考えられる。KHN/MSN サンプルでは、1 回の投与で効果があり、コントロール群に比べ、投与後 2~3 w のがん細胞移植で生存日数の増大が観測された。また、投与量は、MSN 10 μ g (OVA₂₅₇₋₂₆₄ 0.10 μ g、OVA₂₆₅₋₂₈₀ 0.20 μ g、ODN1826 0.50 μ g) でも平均生存日数は増大し、サンプル投与液としては、FIA だけでなく、グリセロールでも延命効果が観測された。

(3) MSN ワクチンによる免疫誘導について、サンプルを投与したマウスより脾臓細胞を回収し、IFN- γ ELISPOT アッセイによる細胞傷害性 T 細胞の検出、マウスリンパ腫細胞との共培養による細胞傷害活性試験を行った。サンプル 3 μ l (MSN 10 μ g、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 0.10 μ g、OVA₂₆₅₋₂₈₀ 0.20 μ g、ODN1826 0.50 μ g) をマウスの皮下に 1 回投与し、1 w 後、マウスより脾臓細胞を回収し、IFN- γ ELISPOT アッセイを行った。コントロールマウスの脾臓細胞と比較し、MSN ワクチンを投与したマウスの脾細胞では、OVA₂₅₇₋₂₆₄ の添加により IFN- γ のスポットが多数観測され、MSN ワクチンにより OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されたことが示された。また、同様の条件で得られたマウスの脾臓細胞をマウスリンパ腫 EL4 細胞あるいは OVA 発現 E.G7-OVA 細胞と共培養して細胞傷害活性を測定したところ、EL4 細胞ではほとんど変化は見られなかったが、E.G7-OVA 細胞に対して細胞傷害活性が増大する傾向が観測された。これらのことより、MSN ワクチンは、獲得免疫として、抗原特異的 T 細胞による細胞性免疫を誘導していることが示唆された。一方、MSN ワクチン投与マウスの血液を採取し、OVA に対する IgG を ELISA 法により測定したが、血中 IgG の増加は検出されず、液性免疫の誘導は観測されなかった。さらに、MSN ワクチンの安全性について検討したところ、サンプル投与部位に小さな硬結様の反応が観察される個体があったが、サンプル投与後の体重変化はコントロールマウスとほぼ同じであり、状態観察にも異常は認められなかった。また、MSN ワクチンを投与した正常マウスより血液を採血し、血液検査、血液生化学検査を行った。コントロールマウスと比較して、血液検査における白血球数、赤血球数、血小板数、ヘモグロビン濃度、また、血液生化学検査におけるブドウ糖、アルブミン、アルカリホスファターゼ活性、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性、総ビリルビンなどの測定値に大きな差はなく、MSN ワクチンの安全性が示唆された。

<引用文献>

[1] Z. Shen, G. Reznikoff, G. Dranoff, K. L. Rock, *J. Immunol.*, **158**, 272 (1997).

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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichi Goto, Yoko Matsumoto
2. 発表標題 MSN Vaccines for Immunotherapy toward Cancer
3. 学会等名 12th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
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
---------	---------