

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15663

研究課題名(和文) 脂肪酸酸化異常症代謝プロファイル解析による高精度診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a diagnostic method for fatty acid oxidation disorders by analysis of metabolic profiles.

研究代表者

湯浅 光織 (YUASA, MIORI)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：80792100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸酸化異常症・カルニチンサイクル異常症5疾患の患者検体を用いて脂肪酸酸化能検査を実施し、有用な診断指標と脂肪酸酸化能の評価法を見出した。疾患によっては本検査が酵素活性よりも遺伝子解析結果を支持する有用な確定診断法であることを証明した。酵素活性測定が1段階の酵素反応を評価するのに対し、本検査では脂肪酸酸化の各段階の酵素反応を総合的に評価することができるため、より臨床的重症度を反映すると推測されるが、発作の発症予測を評価するためにはさらなる長期的な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪酸酸化異常症・カルニチンサイクル異常症は、一部が新生児マススクリーニングの対象疾患に位置づけられている。重症例を見逃さないことを主眼に発展してきたスクリーニングであるが、その反面偽陽性例や未発症軽症例の急増が課題となっている。通常本疾患群は酵素活性測定や遺伝子解析により確定診断がなされるが、問題点も多い。我々の開発した脂肪酸酸化能検査は簡便・迅速な診断法であり、疾患によっては酵素活性測定よりも診断精度が高い。さらに、様々な臨床的重症度を示す本疾患群において、急性代謝不全の発症予測に利用できる可能性があり、過不足のない診療につなげることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed the fatty acid oxidation test for the patients with fatty acid oxidation disorders and carnitine cycle disorders, and identified diagnostic indices and -oxidation ability for these disorders. For some diseases, this test proved to be a useful definitive diagnostic method that favors genetic analysis results rather than enzyme activity. Our test is presumed to reflect the clinical severity of these disorders, because it makes comprehensive evaluation of fatty acid -oxidation, while the enzyme activity measurement evaluates only one-step in enzymatic reactions. However, further long-term prospective studies are required to evaluate the predictivity of the acute metabolic failure.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：脂肪酸酸化異常症 カルニチンサイクル異常症 新生児マススクリーニング アシルカルニチン分析 末梢血単核球 安定同位体標識脂肪酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸酸化異常症・カルニチンサイクル異常症は、ミトコンドリア内の脂肪酸酸化に關与する極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD)、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD)、ミトコンドリア三頭酵素 (TFP)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT)1、CPT2 などの酵素の先天的な欠損・活性低下によってエネルギー産生障害を生じる疾患群である。脂肪酸は飢餓時に細胞内で長鎖アシル-CoA となり、ミトコンドリアに輸送され、炭素数に応じた酵素により酸化が行われ、エネルギー産生に利用されている。当該疾患群の重症型 (新生児発症型) では感染症罹患や長時間の飢餓などを契機として、低血糖を生じ、嘔吐、意識障害、痙攣などの急性脳症に類似した症状を呈する。一旦発症すると死亡率が高く、救命されてもしばしば神経学的後遺症を残すとされ、いわゆる乳幼児突然死症候群 (SIDS) の原因疾患としても重要視されている。早期診断により代謝不全の発症を予防できるため、スクリーニングの効果が最も発揮される疾患であり、新生児マススクリーニングの一次対象疾患となっている。

新生児マススクリーニング (濾紙血タンデムマス分析) 陽性例は、化学診断ののち酵素活性測定や遺伝子解析により確定診断がなされている。しかしこの過程には、スクリーニング偽陽性が多いこと、確定診断に時間を要することなどの問題がある。診断精度を上げるためには、前述の方法以外に各疾患の代謝機能障害を精度よく評価できる診断法が求められている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた安定同位体標識脂肪酸負荷による脂肪酸酸化能検査法を開発し、患者検体の分析を行ってきた。この方法では細胞内脂肪酸酸化の流れをアシルカルニチンプロファイルとして観察することができ、酵素障害部位を *in vitro* で評価できる。通常酵素活性測定が 1 段階の酵素反応を評価するのに対し、この方法では脂肪酸酸化の各段階の酵素反応を評価することができると考えられる。末梢血を用いるため患者負担は少なく、短時間で正確な評価が得られる。またトレーサー実験であり、細胞内の代謝機能の評価する点で非常に有効と言える。本研究の目的は、患者検体の分析をもとに各疾患の診断指標を設定し、重症度評価に応用できるかどうかを明らかにすることである。

また、MCAD 欠損症では、アシルカルニチン分析で C8 (炭素数 8) アシルカルニチンが蓄積して ACADM 遺伝子変異も確認できるものの、C8-アシル-CoA を基質とした酵素活性が正常レベルを示す一群がすでに確認されている。「軽症例」と推測されるこれらの群について、過去に行った本検査結果を解析し、低活性例との中鎖脂肪酸代謝能の違いを確認する。蓄積した C6-C10 アシル-CoA からはアシルカルニチンのみならずアシルグリシンが生成され、本症では尿中ヘキサノイルグリシン排泄増多を診断補助所見とすることがある。我々はこれまでに、LC-MS/MS (液体クロマトグラフィタンデム質量分析法計) を用いた血中アシルグリシン分析法の開発に成功している。前述の脂肪酸酸化能のみならず、LC-MS/MS による血中アシルグリシンのプロファイルを明らかにすることにより、アシルカルニチンプロファイルと組み合わせ、代謝障害の実態をより詳細に解明する。このように代謝物分析による化学診断の結果と酵素活性の測定結果との解離は、他の脂肪酸酸化異常症においても多数経験しており、患者の見逃しや重症度判定の誤りにつながっている。本研究では、末梢血単核球を用いて本疾患群における脂肪酸酸化能の障害部位を高感度に分析してその病態を解明し、診断精度の向上に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

新生児マススクリーニングで陽性となり、従来の酵素活性測定または遺伝子診断で本疾患群患者と診断された患者

(2) 末梢血単核球を用いた脂肪酸酸化能検査

1. 全血検体より比重遠心法を用いて単核球を分離する。
2. 分離した単核球層を、L-カルニチンを添加した PBS に浮遊する。
3. 重水素標識パルミチン酸を 2 に添加し培養する (トレーサー実験)。
4. 培養後の細胞を破碎し、細胞内のアシルカルニチンプロファイルをタンデムマス法にて分析する。

(3) 酵素活性測定と原因遺伝子変異の同定

1. 酵素活性測定: CPT2 欠損症、VLCAD 欠損症、MCAD 欠損症において、リンパ球破碎液と C16 アシル-CoA/C8 アシル-CoA・人工電子受容体を反応させ、HPLC で C16 アシル-CoA/C16:1 アシル-CoA/C8:1 アシル-CoA の生成量を定量する。
2. 遺伝子解析: 白血球 からゲノム DNA を抽出し、責任遺伝子の各エクソンを PCR 増幅直接シーケンス法で解析する。

(4) 脂肪酸酸化能検査結果と酵素活性、遺伝子変異との関係の解析

まず過去に実施した本検査の結果を解析する。酵素活性低下で予測されるアシルカルニチン代謝産物よりも短い炭素鎖のアシルカルニチン代謝物の増減を評価し、診断指標を設定する。また、本検査・酵素活性・遺伝子解析結果の関連性を検討する。並行して上記の方法で新規患者の

分析を行う。

4. 研究成果

(1) 2008-2017年に実施した本検査の解析結果

(1)-1 CPT1欠損症、CPT2欠損症、VLCAD欠損症、TFP欠損症について

2008-2017年に、遺伝子解析で診断確定された患者17例(CPT1欠損症3例、CPT2欠損症6例、VLCAD欠損症5例、TFP欠損症3例、年齢0-32歳、中央値5歳)に実施した本検査の結果を解析した。各酵素機能に基づいて、酵素活性を反映すると推定されるアシルカルニチン比を設定し、診断指標として有用かを検討した。また、酸化の各段階で産生されるd1-アセチルCoAの総量を評価する指標としてd1-C2/d31-C16比を検討した。なお、CPT1欠損症では長鎖脂肪酸からのアシルカルニチン生成が行われないためCPT1欠損と細胞生存率低下を区別できない。このため細胞生存率の確認のため、CPT1を介さずに細胞内に取り込まれる重水素標識オクタン酸(d15-オクタン酸)を使用している。

CPT1欠損症では2者(d31-ヘキサデカン酸・d15-オクタン酸)負荷時のd7-C4/d31-C16比を1者(d31-ヘキサデカン酸)負荷時のd7-C4/d31-C16比で除した値を求めると、この比は患者で有意に高値を示した(図1)。CPT2欠損症ではd27-C14から下流のアシルカルニチンが、VLCAD欠損症ではd23-C12から下流のアシルカルニチンが低下した。これを反映しCPT2欠損症ではd27-C14/d31-C16比が低下し、VLCAD欠損症ではd27-C14/d31-C16比は上昇し、d23-C12/d27-C14比は低下した(図2)。d23-C12/d31-C16比はCPT-2欠損症とVLCAD欠損症では低下したが、TFP欠損症では低下しなかった(図2)。TFP欠損症ではd29-C16-OHの蓄積を反映し、d29-C16-OH/d31-C16比が上昇した。同比はCPT-2欠損症、VLCAD欠損症、健常対照間で差は見られなかった(図3)。d1-C2/d31-C16比はCPT2欠損症、VLCAD欠損症、TFP欠損症患者のすべてで低下した(図4)。

この解析で上記4疾患の診断指標を設定することができた(Disease Markers, 2019など)。

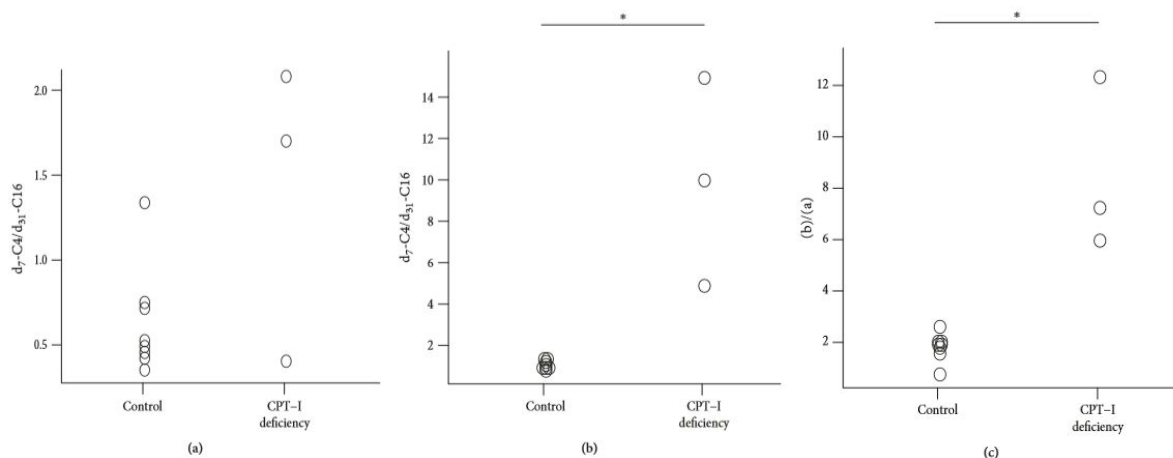


図1 CPT1欠損症における診断指標比

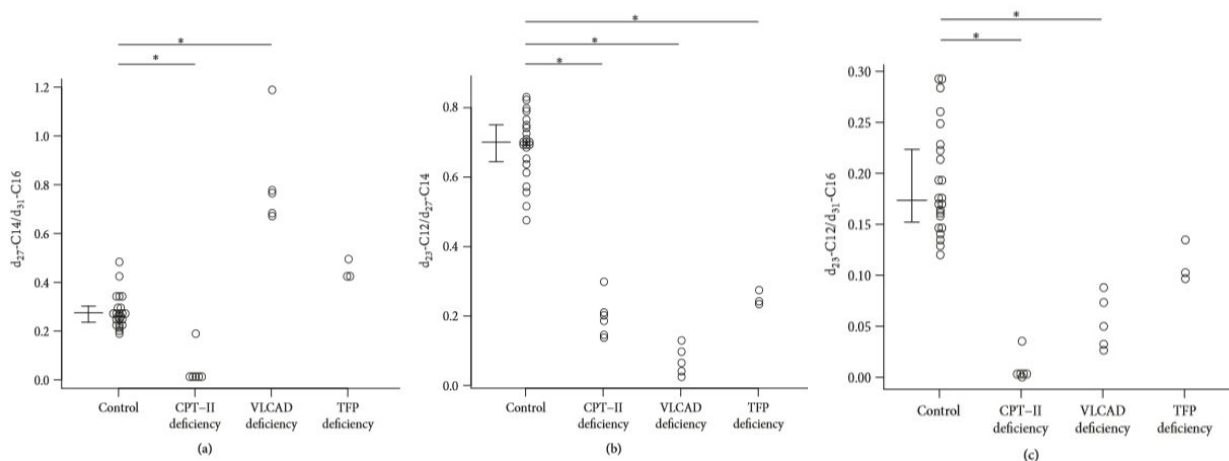


図2 CPT2欠損症・VLCAD欠損症・TFP欠損症における診断指標比

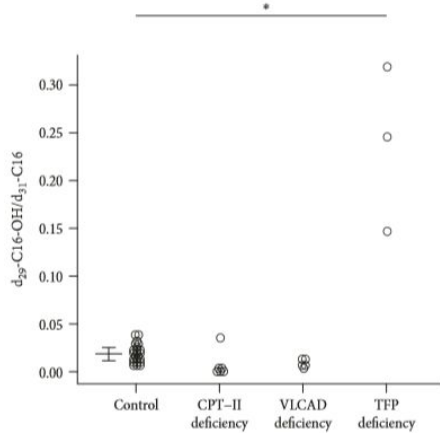


図3 TFP欠損症における診断指標比

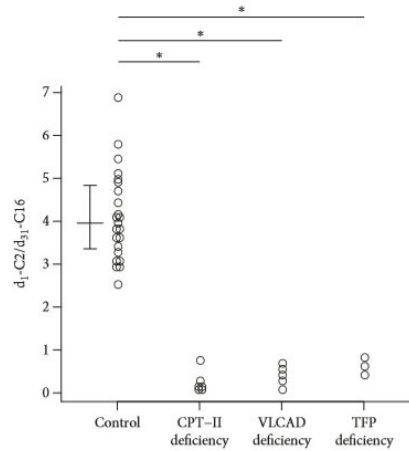


図4 酸化能指標の比較

(1)-2 MCAD欠損症について

まず2017年にMCAD欠損症患者10例に実施した本検査結果を解析した。アシルカルニチン分析でC8(炭素数8)アシルカルニチンが蓄積してACADM遺伝子変異も確認できるものの、C8-アシル-CoAを基質とした酵素活性が正常レベルを示す症例8例と、低活性例2例について、中鎖脂肪酸の代謝機能を評価できると考えられるd7-C4/d11-C6比、d11-C6/d15-C8比、d7-C4/d15-C8比を比較検討した。低活性例が3つの比すべてが著明に低下しているのに対し、活性が保たれる例はd7-C4/d11-C6比、d7-C4/d15-C8比で正常対照より低下するものの分布は幅広く、d11-C6/d15-C8比については正常対照とのオーバーラップが見られた(図5)。

この解析で本疾患の診断指標を設定することができ、「軽症例」と予想される一群はC8からC6への反応はある程度保たれるものの、C6からC4への反応が低下していることが示唆された(SSiEM, 2018など)。

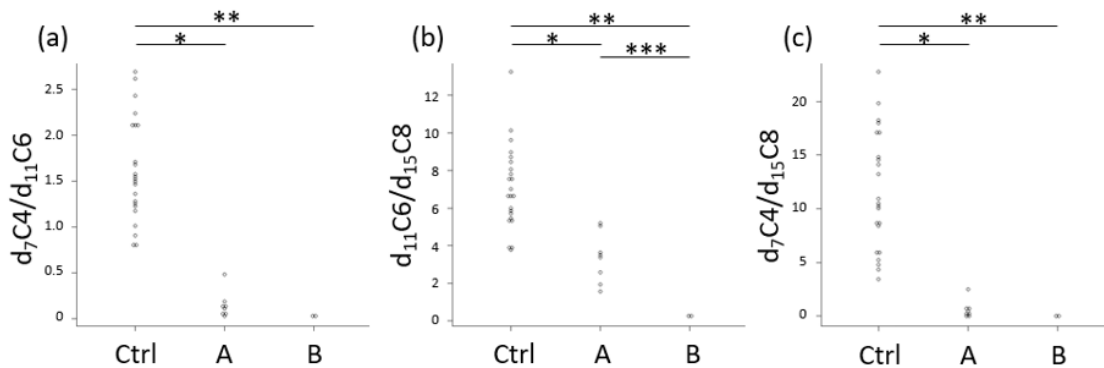


図5 MCAD欠損症における診断指標比の比較

※A = 活性が比較的保たれる例、B = 低活性例

(2) 2018-2020年度に新たに実施した本検査件数の概要

本研究期間3年間に新規に検査を実施し、上記の成果を踏まえて解析した。検査件数は表1の通りである。なお、このうち2020年のVLCAD欠損症20例は本研究とは別に新しい標識脂肪酸を用いた検討をメインに行っており(表1のカッコ内の件数)、今回の解析からは省いた。本検査の他、末梢血リンパ球を用いた酵素活性測定、遺伝子解析をすべて実施できた症例はCPT1欠損症0例、CPT2欠損症9例、VLCAD欠損症4例、MCAD欠損症4例であった。

	検査件数	疑い疾患の内訳			
		CPT1欠損症	CPT2欠損症	VLCAD欠損症	MCAD欠損症
2018年度	16	0	8	6	2
2019年度	17	1	12	2	3
2020年度	25	1	2	(20)	2
計	58	2	22	8(28)	7
本検査で患者と診断した例	38	1	9	2(21)	6
3検査※を実施し得た例	32	0	9	4(17)	4

表1 検査実施件数

※3検査：本検査・末梢血リンパ球を用いた酵素活性測定・遺伝子解析

(2)-1 CPT2 欠損症の解析

3 検査を実施し得た 9 例のうち、3 例は全ての検査で罹患者と診断された。残り 6 例は本検査が遺伝子解析結果を支持し、酵素活性結果と解離した(表 2)。本検査で罹患者と診断した 9 例のうち、少なくとも 2 歳まで臨床経過を確認できたのは 6 例(発症例 4 例、未発症例 2 例)であった。酸化能指標 dC2/dC16 は発症例 0.30-1.64、未発症例 0.07, 0.26 とむしろ発症例で高い(正常に近い)結果であった。

本疾患に関しては、酵素活性よりも本検査の診断精度が上回る可能性があるが、発作の発症予測に利用できる可能性は低いかもしれない。

(2)-2 VLCAD 欠損症の解析

3 検査を実施し得た 4 例のうち、1 例は全ての検査で罹患者と診断された。残り 3 例のうち、2 例は本検査が、1 例は酵素活性が遺伝子解析結果を支持した(表 3)。この結果(本検査偽陽性)を受け、より代謝過程を詳細に観察して正確な診断に活かすために、飽和脂肪酸だけでなく不飽和脂肪酸を負荷する新しい検査法を開発中である。

	酸化能検査	酵素活性	遺伝子解析
1	患者レベル	保因者相当	両アレルに変異あり
2	患者レベル	保因者下限	両アレルに変異あり
3	患者レベル	保因者下限	両アレルに変異あり
4	正常	保因者相当	変異なし
5	正常	保因者相当	変異なし
6	正常	患者レベル	変異なし

表2 CPT2欠損症で3検査の結果が解離した6例

	酸化能検査	酵素活性	遺伝子解析
1	患者レベル	正常	変異なし
2	保因者レベル	患者レベル	片アレルに変異あり
3	正常	患者レベル	片アレルに変異あり

表3 VLCAD欠損症で3検査の結果が解離した例

(2)-2 MCAD 欠損症の解析

3 検査を実施し得た 4 例とも、全ての検査で罹患者と診断された。

上記(1)-2 と今回の 4 例をあわせ、計 14 例(いずれも遺伝子解析で確定)を解析した。C8 アシル CoA を基質とする MCAD 酵素活性と、C8 から C6 への代謝を評価する d11-C6/d15-C8 比は相関傾向がみられた(図 6)。しかし同活性と、総合的な中鎖脂肪酸酸化能を示すと推測される d7-C4/d15-C8 比は相関しなかった(図 6)。前述のように酵素活性測定が 1 段階の酵素反応を評価するのに対し、この方法では脂肪酸 酸化の各段階の酵素反応を総合的に評価することができるため、より臨床的重症度を反映すると推測される。

今回解析した過去の 10 例、新規の 4 例について、十分な臨床経過を収集できなかったこと、スクリーニング陽性例が多く患者がまだ低年齢であることから、発作予測の評価には至らなかった。今後検討を続けていく予定である。

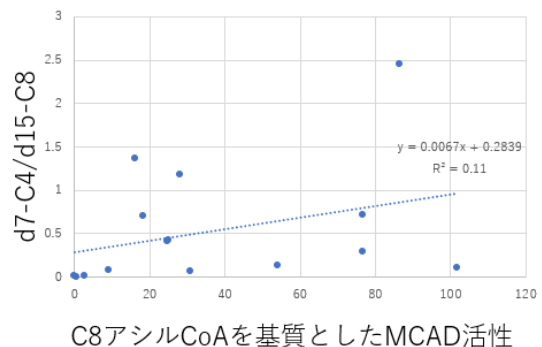
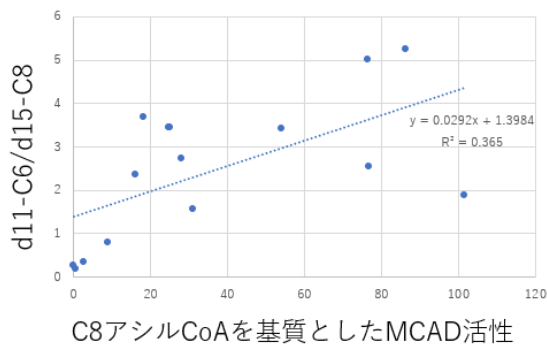


図6 MCAD欠損症におけるMCAD活性と酸化能指標の相関

(3) アシルグリシンの検討

MCAD 欠損症について上記の結果を得たため、アシルグリシンについての検討は優先されないと判断し、本検討は行わなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miori Yuasa, Ikue Hata, Keiichi Sugihara, Yuko Isozaki, Yusei Ohshima, Keiichi Hara, Go Tajima, Yosuke Shigematsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of Metabolic Defects in Fatty Acid Oxidation Using Peripheral Blood Mononuclear Cells Loaded with Deuterium-Labeled Fatty Acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Disease Markers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/2984747	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 李知子、山本和宏、起塚 庸、山田健治、小林弘典、湯浅光織、重松陽介、原 圭一、但馬 剛、竹島泰弘	4. 巻 28
2. 論文標題 新生児スクリーニングで異常を認めず、横紋筋融解症を機にカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2(CPT2)欠損症と診断された幼児例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本マススクリーニング学会誌	6. 最初と最後の頁 63-70
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 Go Tajima, Keiichi Hara, Miori Yuasa	4. 巻 64
2. 論文標題 Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: with a focus on newborn screening	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 87-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-018-0530-z	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15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 湯浅 光織, 畑 郁江, 杉原 啓一, 磯崎 由宇子, 重松 陽介, 大嶋 勇成, 津村 弥来, 香川 礼子, 岡田 賢, 原 圭一, 但馬 剛
2. 発表標題 標識脂肪酸負荷末梢血単核球中のアシルカルニチン比による脂肪酸代謝異常症の診断
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 但馬剛、原圭一、香川礼子、宇都宮朱里、津村弥来、岡田賢、湯浅光織、畑郁江、重松陽介、山口清次
2. 発表標題 全国施行が実現したCPT2欠損症マスキングの現状報告
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀江潤、牛田英里、奥村陽介、水谷健佑、伊藤雄彦、小林舞、櫻井直人、山口佳子、大森雄介、西森久史、太田穂高、杉山謙二、湯浅光織、重松陽介
2. 発表標題 部活動後の横紋筋融解症を契機に診断した筋型カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII (CPT2)欠損症の一例
3. 学会等名 第55回中部日本小児科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松陽介、湯浅光織
2. 発表標題 脂肪酸酸化能異常症患者末梢単核細胞を用いた代謝トレーサー研究
3. 学会等名 第44回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigematsu Y, Yuasa M, Sugihara K, Ikue Hata, Tajima G
2. 発表標題 A Simple Diagnostic Test for CPT1 (Carnitine-palmitoyltransferase I) Deficiency using Tandem Mass Spectrometer
3. 学会等名 10th ISNS International Symposium-11th Asia Pacific Regional Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Yuasa M, Hata I, Shigematsu Y, Yamaguchi S
2. 発表標題 Findings from the nationwide neonatal screening for CPT II deficiency in Japan
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会 第17回アジア先天代謝異常症シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤好充、小林弘典、原圭一、山田健治、長谷川有紀、相崎潤子、湯浅光織、畑郁江、岡田賢、重松陽介、但馬剛、山口清次、竹谷健
2. 発表標題 タンデムマス・スクリーニング導入前後におけるVLCAD欠損症患者の遺伝子型に関する検討
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会 第17回アジア先天代謝異常症シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原圭一、但馬剛、岡田賢、湯浅光織、畑郁江、重松陽介、山口清次
2. 発表標題 マススクリーニング陽性者のCPT2遺伝子診断
3. 学会等名 第46回マススクリーニング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 但馬剛、原圭一、香川礼子、津村弥来、岡田賢、湯浅光織、畑郁江、重松陽介、山口清次
2. 発表標題 CPT2欠損症スクリーニング新指標の有用性：最近の診断例を加えた検討
3. 学会等名 第45回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李知子、山本和宏、山田健治、小林弘典、湯浅光織、重松陽介、但馬剛、竹島泰弘
2. 発表標題 新生児タンデムマススクリーニングで異常指摘されず、横紋筋融解症を機にCPT2欠損症と診断された幼児例
3. 学会等名 第45回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miori Yuasa, Ikue Hata, Keiichi Sugihara, Yuko Isozaki, Yosuke Shigematsu, Yusei Ohshima, Reiko Kagawa, Satoshi Okada, Keiichi Hara, Go Tajima
2. 発表標題 Investigation of beta oxidation process in MCAD-deficient patients who showed normal enzyme activity
3. 学会等名 Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Go Tajima, Keiichi Hara, Miyuki Tsumura, Reiko Kagawa, Satoshi Okada, Miori Yuasa, Ikue Hata, Yosuke Shigematsu, Seiji Yamaguchi
2. 発表標題 Newborn screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency in Japan using (C16+C18:1)/C2 and C14/C2
3. 学会等名 Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Go Tajima, Keiichi Hara, Miyuki Tsumura, Reiko Kagawa, Satoshi Okada, Miori Yuasa, Ikue Hata, Yosuke Shigematsu, Seiji Yamaguchi
2. 発表標題 Newborn screening for CPT2 deficiency in Japan using (C16+C18:1)/C2 and C14/C3
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会 (併催: 第16回アジア先天代謝異常症シンポジウム)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miori Yuasa, Ikue Hata, Keiichi Sugihara, Yuko Isozaki, Yosuke Shigematsu, Yusei Ohshima, Reiko Kagawa, Satoshi Okada, Keiichi Hara, Go Tajima
2. 発表標題 Investigation of beta oxidation process in MCAD-deficient patients who showed normal enzyme activity
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会 (併催: 第16回アジア先天代謝異常症シンポジウム)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李知子、山本和宏、山田健治、小林弘典、湯浅光織、重松陽介、原圭一、但馬剛、竹島泰弘
2. 発表標題 新生児タンデムマススクリーニングで異常を認めず、横紋筋融解症を機にCPT2欠損症と診断された幼児例
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会 (併催: 第16回アジア先天代謝異常症シンポジウム)
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