

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09919

研究課題名(和文) アンギノース群レンサ球菌をヒト病原細菌へと変貌させる環境要因は何か？

研究課題名(英文) The environmental determinant for Anginosus group streptococci to be the human pathogen.

研究代表者

田端 厚之 (TABATA, Atsushi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：10432767

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)：本研究では、ヒト口腔内常在性の日和見病原性レンサ球菌であるアンギノース群レンサ球菌、特にペプチド溶血毒素であるストレプトリジンS(SLS)を産生するStreptococcus anginosusの溶血株を対象とし、そのヒトに対する潜在的な病原性を明らかにするための検討を行った。本研究の結果より、S. anginosusが産生するSLSはヒト血清アルブミンの存在下で溶血性や細胞傷害性が安定化されることが明らかとなり、S. anginosusの血中移行などに伴う異所性感染と病原性の発揮に関する興味深い知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、未だ不明な点が多いヒト口腔常在性の日和見レンサ球菌(S. anginosusを含むアンギノース群レンサ球菌)について、ペプチド溶血毒素であるストレプトリジンSを病原因子とし、さらに口腔病変部位や血中移行に伴う異所性感染部位での潜在的な病原性を明らかにするための重要な知見が得られた。本研究の成果は、ヒト口腔における常在細菌の適切な制御を含むオーラルケアの重要性を再確認させるものであり、歯科領域における学術的な重要性のみならず、人々の健康的な生活の維持・推進にも関連する社会的意義が大きい成果である。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus anginosus is one of the opportunistic pathogens inhabit the oral cavity of human. In this study, the potential pathogenicity of beta-hemolytic strain of S. anginosus was investigated in relation to the production of peptide hemolysin streptolysin S (SLS). From the investigation in this study, both the hemolytic activity and cytotoxicity of secreted SLS was stabilized in the presence of human serum albumin. This result is interesting and important to consider the relationship of the SLS-producing S. anginosus strains to the pathogenicity of human especially in the situation of not only the periodontal disease but also the ectopic infection of the strains into the blood stream.

研究分野：微生物学

キーワード：Streptococcus anginosus アンギノース群レンサ球菌 病原性 異所性感染 ストレプトリジンS SLS ヒト血清アルブミン 最初期遺伝子

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。

1. 研究開始当初の背景

(1) アンギノサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒト口腔内の常在細菌叢を構成するレンサ球菌の一種である。AGS に属するレンサ球菌は、一般的に「日和見病原菌」として認識されており、ヒトに対して明確な病態を引き起こすヒト病原性レンサ球菌である A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) や B 群レンサ球菌 (*S. agalactiae*)、そして肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) と比較して、その病原性や疾患との関わりは不明な点が多かった。しかしながら、近年では様々な疾患の起原菌として AGS が関連した症例報告が頻見されるようになり、AGS は臨床的にも再注目されつつある。

(2) 近年の次世代シーケンス技術の飛躍的な発展と普及に伴って、AGS のゲノム情報に基づいた再分類が行われた【引用文献①】。次世代シーケンスによるゲノム配列解析では、病原因子をコードする遺伝子をゲノム上に保有している株の存在も明らかとなり、このような病原因子遺伝子を保有する AGS のサブグループの「病原菌」としての潜在的な特性も明らかになりつつある。特に、*S. anginosus* においては、A 群レンサ球菌が産生する病原因子のホモログをコードする遺伝子を保有していることが報告されている【引用文献②】。我々も、血液寒天培地上で β 溶血性を示す *S. anginosus* の溶血因子について、A 群レンサ球菌が産生するペプチド性の溶血因子であるストレプトリジン S (SLS) のホモログであることを見出し、これまでに報告している【引用文献③、④】。

(3) 興味深いことに (宿主であるヒトにとっては厄介なことであるが)、AGS は肺炎球菌などが保有している外来遺伝子の獲得システムである *comCDE* システムを保有している。この事実は、*S. anginosus* において、*in vivo* 環境において遺伝子 (病原因子遺伝子を含む) の水平伝播を促進させ、日和見病原菌である *S. anginosus* のサブグループとして新たな病原性株の出現に関与する可能性が推測され、懸念されている。

(4) このように、*S. anginosus* は、肺炎球菌が保有する外来遺伝子獲得システム (*comCDE* システム) を備え、A 群レンサ球菌の病原因子 (SLS) のホモログを産生する株が存在することより、一般的な「日和見病原菌」としてではなく、潜在的な「ヒト病原菌」としての認識が必要な菌種であると考えている。さらに、*S. anginosus* は異所性感染の原因菌として分離されることが多いという臨床的な知見も踏まえ、*S. anginosus* のヒト病原細菌への変貌を誘発させる環境要因を特定することの重要性と必要性が認識されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、AGS を構成する 3 菌種の中で、アミノ酸配列の異なる 2 種類の SLS を産生するという特徴を有す *S. anginosus* の β 溶血株に注目し、常在部位である口腔内とは異なる異所性環境、特に血中移行を想定した環境における潜在的な病原性について検討すると共に、そのメカニズムを *in vitro* レベルで明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) 血液由来成分存在条件における被検菌の溶血特性に関する検討

本研究では、SLS を産生して β 溶血性を示す *S. anginosus* 基準株である NCTC10713^T 株、および 2 種の SLS の前駆体コード遺伝子 (*sagA1* および *sagA2*) を欠失させた NCTC10713^T 株由来の非溶血性遺伝子変異株である Δ *sagAs* を主な被検菌として検討を行った。被検菌の培養は、Brain Heart Infusion (BHI) 培地を用いて、37°C、5% CO₂ 条件にて行った。なお、培地中に添加する血液由来成分として、ある種の細菌培養時に添加成分として使用されるウマ血清、細胞培養時の添加成分として使用されるウシ胎児血清 (FBS)、さらにボランティアから採血したヒト血液 (徳島大学大学院生命科学・医学系研究倫理委員会受付番号 4092 の実験計画に基づいて実施) より調製したヒト血清を検討に使用し、非働化 (56°C、30 分) 後に培地中に 10% (v/v) 用量添加して検討に使用した。被検菌の溶血特性は、培養液を遠心して培養上清を調製後、ウマ赤血球に対する溶血活性を測定することにより評価した。

(2) 被検菌が産生する SLS の溶血活性の安定化に寄与する血液由来成分の特定

SLS の溶血活性安定化に寄与するヒト血清中の成分を特定するために、ヒト血清アルブミン、ヒト γ -グロブリン、ヒト α 1-酸性糖タンパク質を添加試料とし、上記 (1) に記載の方法に準じて検討を行った。

(3) ヒト血清アルブミン存在条件下での被検菌における遺伝子発現変動解析

終濃度 1.0% (w/v) のヒト血清アルブミン存在下および非存在下で対数増殖期まで培養した NCTC10713^T 株を遠心回収し、ビーズ破碎後に total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。なお、RNA-seq 解析とヒト血清アルブミン存在下における NCTC10713^T 株の発現変動遺伝子 (DEG) 解析は、委託解析により実施した。

(4) 被検菌培養上清を作用させたヒト由来培養細胞における遺伝子発現変動解析

ヒト由来培養細胞としてヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である HSC-2 を用い、終濃度 1.0% (w/v) のヒト血清アルブミン存在下および非存在下の条件で培養した被検菌 (NCTC10713^T 株) の培養上清を作用させた細胞より total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。なお、RNA-seq 解析とヒト血清アルブミンの有無条件下における NCTC10713^T 株の DEG 解析は、委託解析により実施した。

(5) SLS の細胞障害性に対する細胞応答反応メカニズムの解析

ヒト由来培養細胞としてヒト口腔上皮癌細胞株である HSC-2 を用い、終濃度 1.0% (w/v) のヒト血清アルブミン存在下および非存在下で培養した被検菌 (NCTC10713^T 株) の培養上清を作用させ、蛍光色素 Fura 2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度の変動を検討した。RNA-seq 解析により SLS 依存的な発現変動が示唆された遺伝子について、SLS の作用に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の増加との関連を明らかにするために、カルシウムイオンキレーターであるグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) の有無の条件で、リアルタイム PCR による遺伝子発現変動の比較定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血液由来成分存在条件下における被検菌の溶血特性

血液由来成分 (動物血清) の存在環境における被検菌 (*S. anginosus* NCTC10713^T 株) の溶血特性を検討した。その結果、培養培地中に動物血清が存在する条件下では、被検菌の培養上清の溶血活性が顕著に上昇することを確認した (表 1: 「対数期培養上清」カラムの結果を参照)。さらに、ヒト血清存在条件下では、長時間培養後でも被検菌培養上清の溶血活性が確認された (表 1: 「定常期培養上清」カラムの結果を参照)。β 溶血性を示す *S. anginosus* の溶血因子は SLS であることから【引用文献③】、*S. anginosus* が産生する SLS は血液成分存在条件において安定化されることが示唆された【引用文献⑤】。

表 1 動物血清添加条件下での被検菌培養上清の溶血活性 (n=3)

	溶血率 (%±標準偏差)	
	対数期培養上清	定常期培養上清
ウマ血清添加条件	75.0±1.0	0.4±0.5
ウシ胎児血清 (FBS) 添加条件	85.5±1.5	N.D.
ヒト血清添加条件	79.8±3.2	49.4±1.1
血清非添加条件 (コントロール)	1.2±0.7	0.6±0.1

N.D.: 検出限界未満 (<0.1%)

(2) 被検菌が産生する SLS の溶血活性の安定化に寄与する血液由来成分の特定

(1) の検討結果より、ヒト血清存在条件下では被検菌 (*S. anginosus* NCTC10713^T 株) の溶血性が効果的に維持されていることが確認されたので、続いて、SLS を安定化させる血液由来成分について検討を行った。特に、今回はタンパク質成分に注目して検討を行い、試薬として購入が可能な精製標品 [ヒト血清アルブミン fraction V (HSA-V)、γ-グロブリン (γGLB)、α1-酸性糖タンパク質 (AGP)] および組換え体 [ヒト血清アルブミン組換え体 (rHSA)] を生理的条件に近い濃度となるように添加して培養した被検菌の培養上清を調製し、溶血活性を指標として検討した。その結果、ヒト血清アルブミンが SLS の溶血活性を顕著に安定化させることを明らかにした (図 1)【引用文献⑤】。

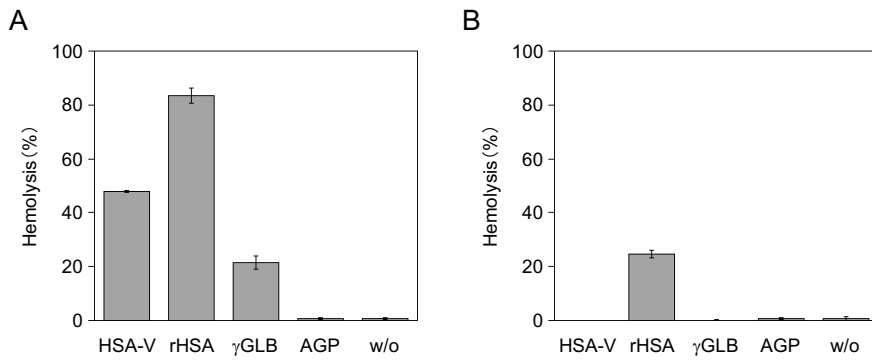


図1 ヒト血液由来タンパク質による SLS の溶血活性に対する安定化効果 (A: 対数期培養上清の溶血活性, B: 定常期培養上清の溶血活性)

(3) 被検菌培養上清を作用させたヒト由来培養細胞における遺伝子発現変動解析

ヒト血清アルブミン存在下で培養した *S. anginosus* の遺伝子発現変動について、RNA-seq により検討した。その結果、2 倍以上の発現亢進が確認されたタンパク質コード遺伝子 ($p < 0.05$) が 26 遺伝子、発現量が 1/2 未満となったタンパク質コード遺伝子 ($p < 0.05$) が 32 遺伝子、それぞれ確認された。しかしながら、*S. anginosus* における SLS の産生に関わる遺伝子群の発現変動や、被検菌の病原性との関連が示唆されるような遺伝子の発現への影響は確認されなかった。なお、SLS 前駆体のコード遺伝子である *sagA1* と *sagA2* の発現量は、ヒト血清アルブミン存在条件において増加傾向が確認された (*sagA1*: 約 1.35 倍、*sagA2*: 約 1.38 倍)【引用文献⑤】。しかしながら、ヒト血清アルブミン存在下における被検菌培養上清の顕著な溶血性と比較すると、両遺伝子発現量の増加は小さかった。よって、被検菌の SLS 依存的な β 溶血性へのヒト血清アルブミンの影響は、被検菌における SLS 前駆体コード遺伝子の発現亢進よりも、被検菌から産生された SLS の安定化に大きく寄与していることが考えられた。

(4) 被検菌培養上清を作用させたヒト由来培養細胞における遺伝子発現変動解析

ヒト血清アルブミン存在条件下で安定化された SLS によるヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 (HSC-2) の遺伝子発現変動について、RNA-seq により検討した。その結果、2 倍以上の発現亢進が確認されたタンパク質コード遺伝子 ($p < 0.05$) が 275 遺伝子、発現量が 1/2 未満となったタンパク質コード遺伝子 ($p < 0.05$) が 139 遺伝子、それぞれ確認された。これらの発現変動が確認された遺伝子群の中で、特に発現量が亢進した遺伝子に注目すると、転写因子 [Early growth response (EGR)] をコードする遺伝子の顕著な発現変動が確認された。これらの遺伝子群は「最初期遺伝子 (IEGs)」と総称され、外界環境の変化に応じて速やかに転写される遺伝子群である。よって、SLS による細胞膜傷害への対抗手段として、HSC-2 はこれらの IEGs の発現を誘導させて応答していると考えられた。さらに、代表的なケモカインや炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現量も顕著に亢進しており、この結果は *S. anginosus* が産生する SLS に関連した (依存的な) 病原性との関連で注目される。

(5) SLS の細胞障害性に対する細胞応答反応メカニズムの解析

ヒト血清アルブミンの存在条件下で安定化された SLS の HSC-2 に対する細胞障害メカニズムとその応答反応をより詳細に検討するために、IEGs の発現亢進の引き金となることが知られている細胞内カルシウムイオンの変動について検討を行った。その結果、ヒト血清アルブミン存在条件下で安定化された SLS を含む被検菌培養上清を作用させた HSC-2 において、細胞内へのカルシウムイオンの流入が確認された。さらに、カルシウムイオンキレーターである EGTA 存在条件における EGR の発現亢進をリアルタイム PCR で比較定量解析した結果、SLS の作用に伴う EGR の発現亢進はカルシウムイオンキレート条件下で有意に抑制された (表 2)。以上の結果より、HSC-2 では、ヒト血清アルブミンの存在条件下で安定化された SLS の作用に伴う細胞膜傷害を起点として、カルシウムイオンの細胞内流入に依存的に EGR などの IEGs の発現を亢進させていることを明らかにした。

表2 SLS の作用に伴う EGR 遺伝子群の発現亢進とカルシウムイオンの影響 (n=3)

	基準条件 (SLS 非存在下)	SLS 存在下 Ca ²⁺ 存在下	SLS 存在下 Ca ²⁺ 非存在下
<i>egr1</i>	2.1±0.5	101.2±12.1	42.7±3.6
<i>egr2</i>	0.9±0.02	21.4± 1.3	2.3±0.2
<i>egr3</i>	1.0±0.04	17.1± 0.5	1.3±0.1
<i>egr4</i>	0.4±0.1	13.5± 1.3	1.4±0.1

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、アンギノース群レンサ球菌である *S. anginosus* の中で、SLS を産生することによってβ溶血性を示す株 (NCTC10713^T) を主な対象として研究を実施した。レンサ球菌が産生する溶血毒素とヒト血清アルブミンとの相互作用に関しては、SLS と同様に A 群レンサ球菌が産生するもう一種の代表的なタンパク質溶血毒素であるストレプトリジン O について、その細胞傷害性や溶血活性がヒト血清アルブミンの存在条件下において阻害されるという報告がある【引用文献⑥】。一方我々は、*S. anginosus* 由来の SLS について、ヒト血清アルブミンの存在条件下では SLS 依存的な細胞傷害性が増強することを本研究で明らかにした【引用文献⑤】。さらに、このヒト血清アルブミンによる SLS の活性保護作用については、*S. anginosus* 以外の SLS 産生レンサ球菌 (A 群レンサ球菌を含む) においても確認している【引用文献⑤】。よって、ヒト血清アルブミンによる SLS の活性保護効果は、SLS を産生するヒト病原性およびヒト常在性レンサ球菌の病原性を考える上で重要であり、特に、ヒト口腔常在性のアンギノース群レンサ球菌の口腔内病変 (歯周病など) や血中移行を介した異所性感染を考えた場合に、本菌群のヒトに対する病原性発揮の重要な一環境要因となり得ると考えられる。よって、本研究により得られた成果のインパクトは基礎研究のみならず臨床的にも大きいと考える。

(7) 総括

本研究の一連の実験により得られた成果は、A 群レンサ球菌の代表的な病原因子であるペプチド溶血毒素 SLS のホモログを産生する *S. anginosus* のβ溶血株について、その異所性感染に関連した病原細菌としての特性を明らかにするために重要な知見である。今回の研究によって得られた知見に基づいて、我々は、アンギノース群レンサ球菌をヒト病原細菌へと変貌させる要因の一つを担う「異所性感染」の環境に注目し、本菌群のヒトに対する潜在的な病原性とそのメカニズムを明らかにすべく、引き続き検討を進めていく。

<引用文献>

- ① Jensen A. et al., Int J Syst Evol Microbiol. 2013. **63**(7):2506-2519.
- ② Babbar A. et al., Int J Med Microbiol. 2017. **307**(3):174-181.
- ③ Tabata A. et al., J Bacteriol. 2013. **195**(5):1090-1099.
- ④ Tabata A. et al., Microbiology. 2014. **160**(5):980-991.
- ⑤ Yokohata S. et al., Microbiol Immunol. 2023. **67**(2):58-68.
- ⑥ Vita GM. et al., Front Immunol. 2020. **11**:507092.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Tabata Atsushi, Matsumoto Airi, Fujimoto Ai, Ohkura Kazuto, Ikeda Takuya, Oda Hiroki, Yokohata Shuto, Kobayashi Miho, Tomoyasu Toshifumi, Takao Ayuko, Ohkuni Hisashi, Nagamune Hideaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Dual functions of discoidinolysin, a cholesterol-dependent cytolysin with N-terminal discoidin domain produced from Streptococcus mitis strain Nm-76	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 2105013 ~ 2105013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2022.2105013	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 Yokohata Shuto, Ohkura Kazuto, Nagamune Hideaki, Tomoyasu Toshifumi, Tabata Atsushi	4. 巻 67
2. 論文標題 Human serum albumin stabilizes streptolysin S activity secreted in the extracellular milieu by streptolysin S producing streptococci	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 58 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13042	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 Atsushi Tabata, Hideaki Nagamune	4. 巻 65
2. 論文標題 Diversity of α -hemolysins produced by the human opportunistic streptococci	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 512-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12936.	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 Tabata Atsushi, Ohkuni Hisashi, Hino Haruka, Saigo Takuya, Kodama Chihiro, Tang Qing, Tomoyasu Toshifumi, Fukunaga Yoshitaka, Itoh Yasuhiko, Nagamune Hideaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Cytotoxic property of Streptococcus mitis strain producing two different types of cholesterol-dependent cytolysins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 104483 ~ 104483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2020.104483	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19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田端厚之、白井里奈、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 レンサ球菌が産生するペプチド溶血毒素ストレプトリジンSに対するTHP-1の応答反応
3. 学会等名 第63回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Tabata, Airi Matsumoto, Ai Fujimoto, Takuya Ikeda, Kazuto Ohkura, Toshifumi Tomoyasu, Ayuko Takao, Hisashi Ohkuni, Hideaki Nagamune
2. 発表標題 Characterization of the third type of cholesterol-dependent cytolysins produced from Streptococcus mitis strains.
3. 学会等名 21st Lancefield International Symposium for Streptococci and Streptococcal Diseases (web会議) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山森優護、田端厚之、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 Streptococcus anginosusが産生するStreptolysin Sに対する細胞応答メカニズムの検討
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中四国支部総会 (web会議)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横畑修人、大倉一人、長宗秀明、友安俊文、田端 厚之
2. 発表標題 ヒト血清アルブミンによるStreptolysin Sの細胞傷害活性の安定化
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山森優護、田端厚之、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 Streptococcus anginosusが産生する Streptolysin Sに対する宿主細胞応答のメカニズム
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田端厚之
2. 発表標題 ヒト口腔常在性日和見レンサ球菌が産生する溶血毒素の構造的および機能的多様性と病原性への寄与
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横畑修人、田端厚之、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 Streptococcus phocaeが産生する 溶血因子の作用特性と病原性への寄与
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横畑修人、田端厚之、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 Streptococcus phocae由来 溶血因子の産生特性および作用特性
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井里奈, 田端厚之, 友安俊文, 長宗秀明
2. 発表標題 S. anginosusが産生するストレプトリジンSに対するTHP-1の応答反応の検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

田端厚之、溶血毒素産生性アンギノサス群レンサ球菌とその潜在的病原性、月刊『細胞』特集「細菌の逆襲 2022」、54、2022、588-591..
--

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	友安 俊文 (TOMOYASU Toshifumi) (20323404)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	長宗 秀明 (NAGAMUNE Hideaki) (40189163)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授 (16101)	

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