

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01967

研究課題名(和文) 環状ナフタレンジイミド-DNAによるカテナン構造を利用したDNAの固定化法開発

研究課題名(英文) Development of DNA immobilization method using cyclic naphthalene diimide-DNA catenane structure

研究代表者

佐藤 しのぶ (Sato, Shinobu)

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80510677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：新型コロナウイルスの流行によりPCR検査による診断が一般的になった。しかし、PCR検査ではPCRサイクル数を増加させると高感度に検出できるが、プライマーダイマーの形成に伴う擬陽性の問題が生じる。そこで、低サイクルのPCR産物を高感度に検出する方法として、環状ナフタレンジイミド固定化電極によるPCR産物の電気化学的検出法を開発した。環状ナフタレンジイミド固定化電極ではDNAの末端を電極に補足し、その後2本鎖DNAに結合するフェロセン化ナフタレンジイミドを用いて電気化学的にDNAを検出した。新型コロナウイルスをモデルターゲットとしたところPCR 10サイクルで100コピーのRNAの検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インターカレータ固定化電極でDNAをその末端で補足可能であることを明らかにすることができた。これは今後のDNAチップに様々な知見を与えるものと考えられる。また、PCR産物が簡便かつ高精度に検出できると新型コロナウイルスのような新たな感染症に対して、迅速に対応することができるため、パンデミックを防ぐことが可能になる。また、PCR検査は感染症だけではなく、様々な疾病や環境調査等に利用させているため、これらの検査を電気化学的手法で置き換えることが可能である。また、PCRだけではなくHCRやLAMP法など一定温度でDNAを増幅する手法にも適用可能であり、応用範囲は広い。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis using PCR tests has become commonplace due to the spread of the new coronavirus. However, although PCR tests can detect with high sensitivity by increasing the number of PCR cycles, there is a problem of false positives due to the formation of primer dimers. Therefore, we developed an electrochemical detection method for PCR products using a cyclic naphthalene diimide-immobilized electrode as a highly sensitive method for detecting low-cycle PCR products. A cyclic naphthalene diimide-immobilized electrode captured the end of DNA on the electrode, and then the DNA was electrochemically detected using ferrocenylnaphthalene diimide, which binds to double-stranded DNA. Using the COVID-19 as a model target, we successfully detected 100 copies of RNA after 10 cycles of PCR.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：フェロセン化ナフタレンジイミド 環状ナフタレンジイミド DNAチップ カテナン構造 PCR

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス(Covid-19)の流行により、PCR検査が一般的になったが、PCR検査の拡充はなかなか進んでいない。現在PCR検査は、リアルタイムPCRにより解析されているが、蛍光検出できるまでに、PCRが30サイクル(3-4時間)必要である。今後、新型コロナウイルス以外にも新たな

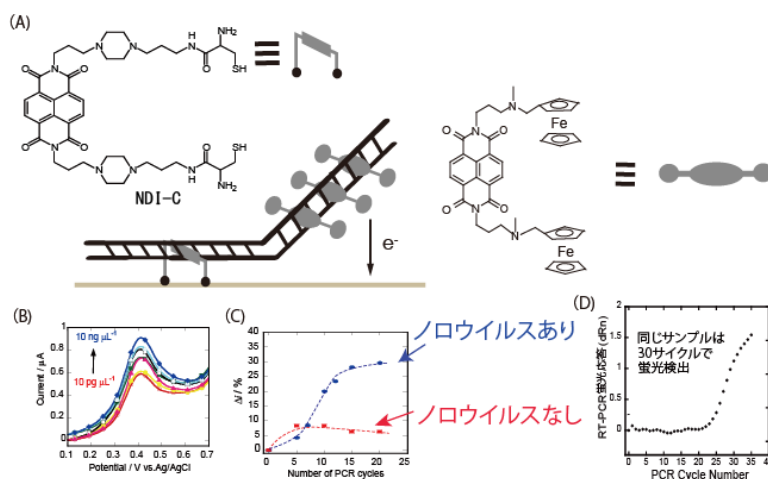


図 1. (A)NDI-C による DNA 固定化および FND による電気化学検出概念図. (B) ノロウイルスの PCR 産物を固定化したときの SWV 測定結果. (C)ノロウイルスの鑄型存在下、非存在下における PCR 産物の電気化学的検出結果. (D)(C)と同じサンプルをリアルタイム PCR 産物で検出した結果.

ウイルスによるパンデミックが起こる可能性は高く、様々な場所でPCR検査ができるようになるためには、安価な装置と簡便な新たなシステムが必要である。ウイルス抗原をターゲットとした抗原抗体では、イムノクロマト法では30分程度で迅速に検出できるが感度が低い。ここでは、感度、特異度の高いPCRの迅速検出のために、電気化学的手法に着目した。DNAチップによる電気化学測定では、 $10^{-15}$  molのDNAの検出が可能であるが、プローブDNAの固定化、プローブとターゲット(PCR産物)のハイブリダイゼーションが必要であり、検出までに3-4時間必要である。しかしながら、図1Aに示すように、過去にチオール基を有するNDI-CとPCR産物を混合し、Au-S結合によって金電極に固定化することで、10サイクルのPCR産物(321-mer, ノロウイルス, 図1B,C)を55分で検出することができた。同じ鑄型量でリアルタイムPCR行ったところ、30サイクル以上で蛍光強度は増加し始め、鑄型DNAの存在が確認できた(図1D)。この手法では、金電極表面にDNAを固定化する。固定化系でDNAを検出することで、大幅な感度上昇に成功した。これにかかる時間は、PCR 10分, DNAの固定化と電気化学測定で45分であったが、この検出にかかる時間の大部分(44分)は、DNAを固定化するための時間である。つまりDNAを迅速に金電極に固定化する手法があれば、PCR産物の検出は、大幅に短縮することができる。

このような背景のもと、本研究では、新たな DNA 補足分子による「PCR 産物簡易検出のための DNA 固定化システムの開発」を行う。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、cNDI 固定化電極による PCR 産物検出チップの創成である。アミノ化 cNDI は金表面に修飾したジチオプロピオン酸と縮合することで図 2A に示すように cNDI 固定化チップを作成する。DNA と cNDI との結合速度は、他の cNDI 誘導体の速度論解析結果から数秒だと思われるため、cNDI 固定化チップに PCR 産物を振りかけると、わずか 1 分後には DNA がチップ上に捕捉される。DNA と cNDI は図 2B に示すようにカテナン構造で結合していると予想している。DNA の「呼吸」は、 $25^{\circ}\text{C}$  では  $1.4\text{ s}$  に 1 回起こるが、cNDI が結合するとこの呼吸は抑制される。cNDI は数塩基置きに DNA に結合するため、電極には複数の cNDI で DNA を固定化していると考えている。このため、一部の cNDI-DNA カテナン構造が解離しても、ほかの部分で

DNAは固定化されていると考えているが、これらのダイナミクスを解析できれば、薬剤等への応用が期待できる。また、DNAの「呼吸」を利用したDNA検出システムの例はなく、独創性が高い研究概念である。

### 3. 研究の方法

#### (1) cNDI-gluの合成

cNDI-gluは図3に示すスキームに従って合成した。

#### (2) cNDI-gluとdsDNAとの相互作用解析

合成オリゴヌクレオチドである12塩基対の1本鎖DNAと2本鎖DNAを用いて、測定を行った。

5.5 μM cNDI-glu, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KClに2本鎖DNAを添加したときの吸光度測定を行った。384 nmの吸光度変化からBenesi-Hildebrand plotを行い、結合定数を得た。

1.5 μM 2本鎖DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KClに0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 9.0 μMのcNDI-gluを添加したときの260 nmの吸光度の温度変化からTm値を算出した。

1.5 μM 2本鎖DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KClに0, 4.5, 9.0, 13.5 μMのcNDI-gluを添加したときの円偏光二色性スペクトルを測定した。

#### (3) cNDI固定化チップの調整

cNDI固定化チップは図2Aに示した通り、縮合反応を利用して固定化した。5 μM 2本鎖DNAを作用させたときのCV測定を行い、掃引速度依存性を評価した。

電解液は100 mM AcOK-AcOH (pH 5.5), 100 mM KCl, 10 μM FNDとした。また、12塩基の1本鎖DNA、2本鎖DNAの濃度依存性をSWV測定で評価した。cNDI固定化電極でのSWV測定の結果を $i_0$ , DNA作用後のSWV測定の結果を $i$ として、 $\Delta i(\%) = (i - i_0) / i_0 \times 100$ で得た。

#### (4) PCR産物の検出

131 merのPCR産物を調整した。cNDI固定化電極に131 merのPCR産物を添加したときのSWV測定を行った。PCR産物の濃度依存性と、PCRサイクル数依存性を評価した。

また、コロナウイルス由来のRNAから逆転写、PCRした産物をSARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ)で、キットの手順に従って用意した。鋳型RNAのコピー数依存性について、RT-PCR法と電気化学測定で評価した。電気化学測定では、これらのPCR産物はcNDI固定化チップに添加され、SWV測定を行った。NDI固定化電極でのSWV測定の結果を $i_0$ , DNA作用後のSWV測定の結果を $i$ として、 $\Delta i(\%) = (i - i_0) / i_0 \times 100$ で得た。電解液は100 mM AcOK-AcOH (pH 5.5), 100 mM KCl, 10 μM FNDとした。

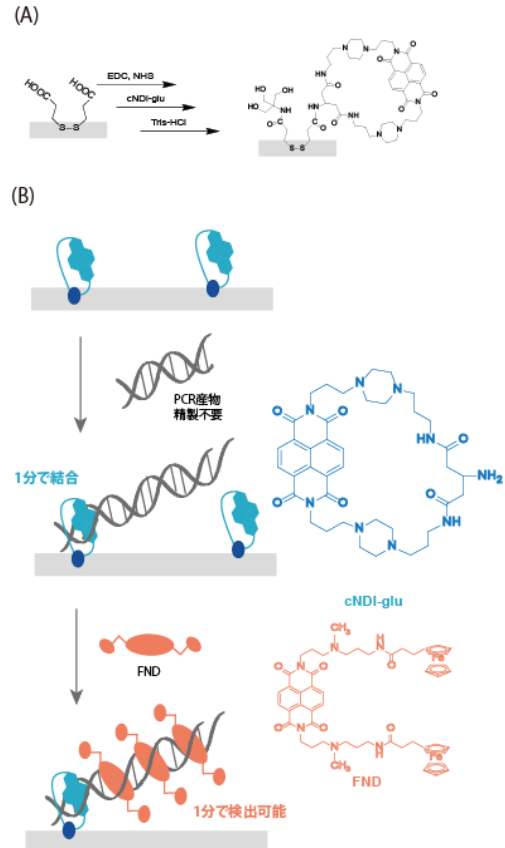


図 2. (A) cNDI-glu 固定化電極の調製方法. (B) cNDI 固定化電極による電気化学的 PCR 検出.

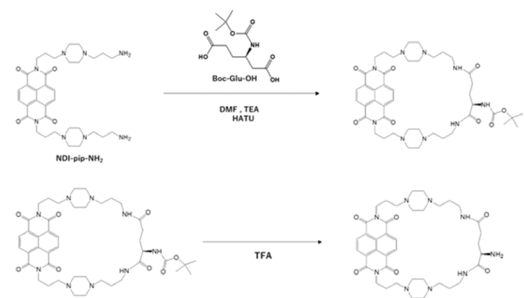


図 3. cNDI-glu の合成スキーム.

#### 4. 研究成果

##### (1) cNDI-gluの合成

cNDI-glu は HPLC, MALDI-TOF-MS,  $^1\text{H-NMR}$  で高純度に合成できたことを確認した。

##### (2) cNDI-gluとdsDNAとの相互作用解析

cNDI-glu に 2 本鎖 DNA を添加したときの吸光度測定の結果を図 4 に示す。2 本鎖 DNA の添加に伴いナフタレンジイミドに由来する 360 nm, 384 nm で 30%の淡色効果が観察された。非環状型の NDI が 2 本鎖 DNA に結合すると、50-60%の淡色効果が起こるので、cNDI-glu の 2 本鎖 DNA に対する結合量が少ないことが予想される。

次に 2 本鎖 DNA の融解温度 ( $T_m$ ) 測定を行った。2 本鎖 DNA のみでは、その  $T_m$  は 58°Cであった。2 本鎖 DNA に cNDI-glu を添加したところ、0.2-1.8 °Cの温度上昇がみられた。これより、cNDI-glu が 2 本鎖 DNA に結合していることが示唆された。

また、2 本鎖 DNA 溶液に cNDI-glu を添加したときの CD スペクトル測定を行った。その結果、cNDI-glu の添加に伴い、380 nm 付近に小さな負のコットン効果が見られた。これは、インターカレーションに特有の挙動である。

これら 3 つの実験より、cNDI-glu は 2 本鎖 DNA にインターカレート結合可能であるが、結合量が少なく、 $T_m$  上昇も小さいことから、2 本鎖 DNA の末端の結合していることが示唆された。

##### (3) cNDI固定化チップの調整

cNDI 固定化電極に 2 本鎖 DNA が固定化されるかどうかについて、CV 測定を行い評価した。その結果を図 5 に示した。

FND は電極に対して拡散しているとき、CV の酸化電位と還元電位の差は 60 mV であるが (図 5A)、電極に固定化されると 0

mV へと近づく。図 5B より、20  $\mu\text{M}$  の 2 本鎖 DNA を作用させると、還元電位の差が 3 mV へと小さくなったことから、2 本鎖 DNA が cNDI に補足されたことが示唆された。また、図 5 C, D より掃引速度を変化させたときに得られた酸化電流の対数をそれぞれプロットすると、2 本鎖 DNA を作用させることで傾きが 0.5 から 1 へと変化した。この結果も FND が電極に固定化されたことを示している。これより、cNDI 固定化電極で DNA を補足できることが確認できた。

次に、12 塩基の 1 本鎖 DNA(ss-oligo)と 2 本鎖 DNA(ds-oligo)を cNDI 固定化電極に作用させた

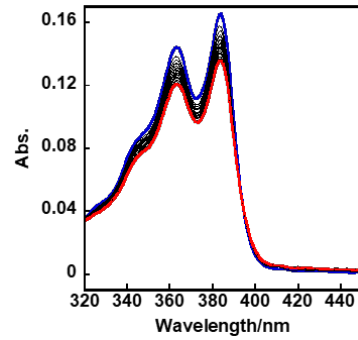


図 4. cNDI-glu に 12 塩基の 2 本鎖 DNA を添加したときの吸光度測定結果.

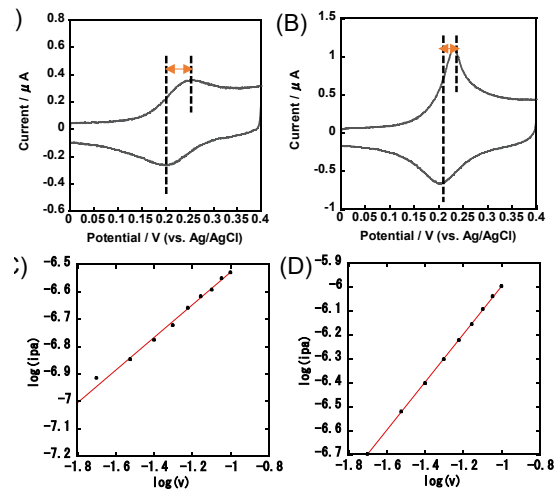


図 5. (A) cNDI 固定化電極, (B) cNDI 固定化電極に 20  $\mu\text{M}$  2 本鎖 DNA を作用させたときの CV 測定結果. (C) cNDI 固定化電極および(D) cNDI 固定化電極に 20  $\mu\text{M}$  2 本鎖 DNA を作用させたときにおける掃引速度依存性の結果.

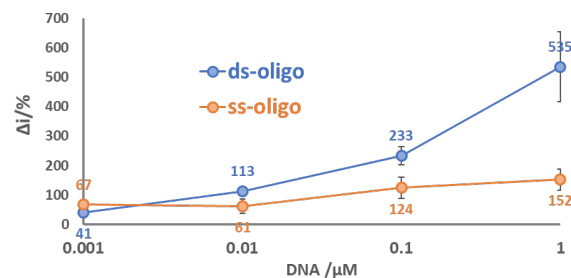


図 6. cNDI 固定化電極に 1 本鎖 DNA(ss-oligo)と 2 本鎖 DNA(ds-oligo)を作用させたときの電流増加率.

ときの電流増加率を算出した。ss-oligo は濃度を高くしても顕著な電流増加は示さなかったが、ds-oligo は濃度を高くするにつれて、電流増加率も増大した。これより cNDI 固定化電極で DNA を定量的に検出できる可能性が示された。

#### (4) PCR産物の検出

PCR 産物として、131 mer のものを準備した。PCR 産物の濃度を 0.1-20 ng/ $\mu$ L で変化させたときの SWV 測定の結果を 7 に示した。これより PCR 産物は 1 ng/ $\mu$ L 以上で明確な電流増加を示した。

つぎに 131 mer の PCR 産物について、PCR サイクル数依存性を評価した。40 pM の鋳型 DNA に対して、20 サイクル以上で定量的に電流増加率も増加した。同じサンプルをゲル電気泳動で評価したところ、ゲル電気泳動でも 20 サイクル以上でバンドが観察できたことから、ゲル電気泳動と同程度の感度を示した。

最後にコロナウイルス由来の RNA の逆転写産物を PCR したものをターゲットとした。PCR サイクルを 40 回とし、RNA 鋳型量を、0,  $10^2$ ,  $10^4$  copy で逆転写し、PCR したものを cNDI 固定化電極で検出した。その結果、それぞれ電流増加率は 750, 1800, 1600% となり、100 copy でも鋳型 RNA が存在すると大きな電流増加を示した。しかし、定量性が得られなかったため、PCR サイクルを 10 とし、RNA 鋳型量を、0, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  copy としたときの PCR 産物を準備した。この PCR 産物の電気化学測定を行ったところ、図 9 に示すように PCR 10 サイクルにおいても、RNA コピー数依存的に電流が増加することが明らかになった。

同じサンプルについて、RT-qPCR をおこなったところ、10 サイクルでは蛍光変化が見られなかったため、本手法を用いることで高感度に RNA を検出できることが明らかになった。

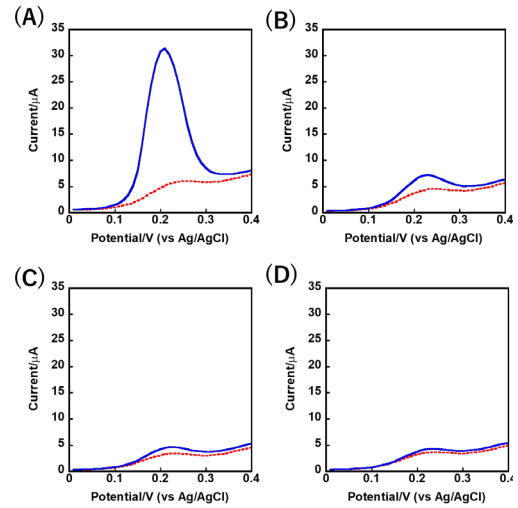


図 7. PCR 産物添加前後の SWV 測定結果 ( $i_0$ : 赤点線,  $i$ : 青実線). (A) 20 ng/ $\mu$ L, (B) 5 ng/ $\mu$ L, (C) 1 ng/ $\mu$ L, (D) 0.1 ng/ $\mu$ L M PCR 産物.

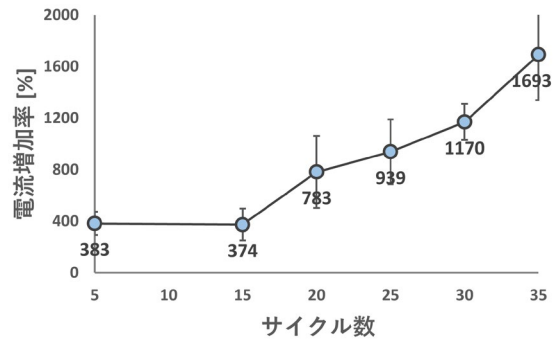


図 8. PCR サイクル数依存性評価.

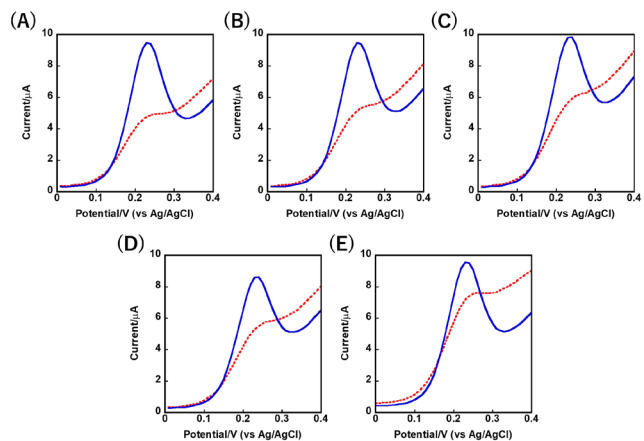


図 9. 10 サイクル PCR 産物固定化前後の SWV 測定結果 ( $i_0$ : 赤点線,  $i$ : 青実線). (A)  $10^4$  copy/ $\mu$ L, (B)  $10^3$  copy/ $\mu$ L, (C)  $10^2$  copy/ $\mu$ L, (D)  $10^1$  copy/ $\mu$ L, (E) NC 10 サイクル PCR 産物.

## 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 1件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Fukuda Hikaru, Sato Shinobu, Zou Tingting, Higashi Sen, Takahashi Osamu, Habu Manabu, Sasaguri Masaaki, Tominaga Kazuhiro, Takenaka Shigeori, Takeuchi Hiroshi      | 4. 巻<br>50                    |
| 2. 論文標題<br>Substituent effects of cyclic naphthalene diimide on G-quadruplex binding and the inhibition of cancer cell growth   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters  | 6. 最初と最後の頁<br>128323 ~ 128323 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bmcl.2021.128323  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>SATO Shinobu, NAGATA Shinichiro, SHIMAMOTO Junpei, OKINAGA Toshinori, ARIYOSHI Wataru, USUI Michihiko, NAKASHIMA Keisuke, NISHIHARA Tatsuji, TAKENAKA Shigeori      | 4. 巻<br>70                    |
| 2. 論文標題<br>An Electrochemical Protease Assay Using Ferrocenylpeptide for Screening of Periodontal Disease   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>BUNSEKI KAGAKU  | 6. 最初と最後の頁<br>199 ~ 206       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2116/bunsekikagaku.70.199  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Takahashi Shuntaro, Kotar Anita, Tateishi-Karimata Hisae, Bhowmik Sudipta, Wang Zi-Fu, Chang Ta-Chau, Sato Shinobu, Takenaka Shigeori, Plavec Janez, Sugimoto Naoki | 4. 巻<br>143                   |
| 2. 論文標題<br>Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of the American Chemical Society  | 6. 最初と最後の頁<br>16458 ~ 16469   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/jacs.1c05468  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Kaneyoshi Shuma, Eguchi Nao, Fujimoto Kazuhisa, Fujii Satoshi, Sato Shinobu, Takenaka Shigeori  | 4. 巻<br>230                   |
| 2. 論文標題<br>Cyclic ferrocenyl naphthalene diimides as a probe for electrochemical telomerase assay   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Inorganic Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>111746 ~ 111746 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jinorgbio.2022.111746   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaneyoshi Shuma, Murakami Shun, Ikeda Takumi, Fujimoto Kazuhisa, Fujii Satoshi, Sato Shinobu, Takenaka Shigeori                                       | 4. 巻<br>35               |
| 2. 論文標題<br>Cover Picture: Electrochemical Method for G quartet RNA Detection of COVID 19 Based on Cyclic Ferrocenylnaphthalene Diimide (Electroanalysis 4/2023) | 5. 発行年<br>2023年          |
| 3. 雑誌名<br>Electroanalysis   | 6. 最初と最後の頁<br>e202380401 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/elan.202380401  | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |

|  |                          |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Haraguchi Kazuya, Sato Shinobu, Habu Manabu, Yada Naomi, Hayakawa Mana, Sasaguri Masaaki, Yoshioka Izumi, Tominaga Kazuhiro, Takenaka Shigeori                                   | 4. 巻<br>35               |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of the accuracy of hTERT gene aberrant methylation using electrochemical hybridization assay and liquid based cytology in screening for oral squamous cell carcinoma | 5. 発行年<br>2023年          |
| 3. 雑誌名<br>Electroanalysis  | 6. 最初と最後の頁<br>e202200564 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/elan.202200564   | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐藤 しのが, 廣岡 雄太, 竹中 繁織                    |
| 2. 発表標題<br>環状ナフタレンジイミド固定化電極による迅速かつ簡便なPCR産物の電気化学的検出 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会 第71年会                           |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shinobu Sato, Yuta Hirooka, Shigeori Takenaka  |
| 2. 発表標題<br>Development of electrochemical detection method for PCR products using cyclic naphthalene diimide-immobilized electrodes |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Nanomedicine2022 (招待講演) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐藤 しのぶ・廣岡 雄太・竹中 繁織                           |
| 2. 発表標題<br>環状ナフタレンジイミド固定化電極を用いたCOVID-19由来のPCR産物の電気化学的検出 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会 第103春季年会(2023)                         |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐藤しのぶ, 中原拓海, 竹中 繁織          |
| 2. 発表標題<br>HCR を利用した電気化学的 miRNA 検出法の開発 |
| 3. 学会等名<br>ナノ学会19回大会                   |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣岡 雄太, 佐藤 しのぶ, 竹中 繁織                   |
| 2. 発表標題<br>環状ナフタレンジイミド固定化電極を用いた簡便なDNAの電気化学的検出法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第58回化学関連支部合同九州大会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>廣岡雄太, 佐藤しのぶ, 竹中繁織                                |
| 2. 発表標題<br>アミノ末端を有する環状ナフタレンジイミドを用いた二本鎖DNAの電極固定化と電気化学的検出法の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第70年会                                     |
| 4. 発表年<br>2021年   |



|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>佐藤しのぶ                  |
| 2. 発表標題<br>SARS-CoV-2の電気化学的検出法の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第72年会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2023年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shigeori Takenaka・Shinobu Sato・Shuma Kaneyoshi  |
| 2. 発表標題<br>Interaction of cyclic ferrocenylnaphthalene diimide with G-quadruplex RNA of SARS-CoV-2 |
| 3. 学会等名<br>ISNAC2023, 第50回国際核酸化学シンポジウム, (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>東 祐大・佐藤 しのぶ・竹中 繁織                |
| 2. 発表標題<br>ナフタレンジイミド固定化電極による電気化学的テロメラーゼ活性検出 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第104春季年会2024                |
| 4. 発表年<br>2024年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 九州工業大学竹中研究室<br><a href="http://takenaka.che.kyutech.ac.jp/index.html">http://takenaka.che.kyutech.ac.jp/index.html</a><br>九州工業大学竹中研究室<br><a href="http://takenaka.che.kyutech.ac.jp/index.html">http://takenaka.che.kyutech.ac.jp/index.html</a> |
|--|

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|