

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量NMR (EC-qNMR) の
高度化及び標準化に関する研究

令和 3 年度 総括研究報告書

研究代表者 西崎 雄三 国立医薬品食品衛生研究所

令和 4 (2022) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量NMR (EC-qNMR) の高度化及び標準化に関する研究	1
西崎雄三	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	15

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書（令和3年度）

食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量NMR（EC-qNMR）の
高度化及び標準化に関する研究

研究代表者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨 外部標準法定量¹H-NMR（EC-qNMR）の完全自動化スクリプトの開発を検討した。著者らが開発した試作版のスクリプトでは、90°パルス幅（pw90）校正時に、pw連続測定から得られる、アレイデータの描く正弦波が歪む（**問題1**）、正弦波の位相が反転する（**問題2**）といったpw90校正に関連する二つの問題が散見されていた。本研究では**問題1**及び**問題2**が発生する原因について調査し、スクリプトの改良を試みた。改良版の自動測定スクリプトでは、オペレータが任意のピークをpw連続測定の照射中心に設定できるように改良した。また、アレイデータの描く正弦波に対して、分光計側が規定された手順に基づき、特定のピークに対してカーブフィッティング（CF）を行うように改良した。本研究で改良した自動測定スクリプトを用いることにより、試験機関間で統一した手順、パラメータでEC-qNMRを実施できるようになり、EC-qNMRの高度化及び標準化に資する新しい知見が得られると期待される。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

A. 研究目的

NMRの応答は相反定理に従う。すなわち、チューニングとマッチング（T&M）により、NMRの検出コイル（プローブ）が測定対象核の共鳴周波数に同調するとき、「90°パルス幅（pw90）×ピーク面線／プロトン数／モル濃度」の値、すなわちQ値は試料間で一定となる。塩濃度の高い試料の場合、ピーク面積は小さくなるが、その分pw90は長くなるので、Q値は一定のままである。Q値を表す式のうち、pw90に注目したい。EC-qNMRを高精度に実施するには試料毎にpw90の校正が必要となる。例えば、200 mM NaClを含有する試料ではNaClを含まない試料と比べてpw90が約1.1倍長くなる¹⁾。

もし、pw90を校正しないまま両試料を分析した場合、定量計算に10%の誤差が生じることとなる。このことから、EC-qNMRの正確性の担保にpw90校正が重要であることがわかる。EC-qNMRの測定手順として以下が推奨されている：①試料投入、②温度安定化、③シム調整、④T&M、⑤pw90校正、⑥qNMR測定。なお、シム調整とT&Mの順番は逆になっても良い¹⁾。

上述の①～⑥の測定手順に従う場合、オペレータは試料毎にpw90を校正して、この校正したpw90の値を次のqNMR測定に反映させる必要がある。この間、オペレータはNMR装置の前に拘束されることになるため、EC-qNMRを通常の研究業務に導入することができない。この状況を改善するために、著者らは先行研究においてEC-qNMR自動測定スクリプトの試作版を開発した²⁾。このスクリプトは、オペレータが予め設定したパラメータに従って、④T&M～⑤pw90校正～⑥qNMR測定が自動的に行われるように設計されている。NMRでは照射中心

のピーク強度をパルス幅 (pw) に応じてプロットすると、減衰する正弦波が描かれる³⁾。この特性を利用して、スクリプトの pw90 校正は分光計が自動計算できるカーブフィッティング (CF) 法を採用した。この方法は pw10~pw450 の範囲で pw を変化させる連続測定を行い、このアレイデータに対して、減衰する正弦波を描くモデル関数を適用して、CF から pw90 を算出する方法である⁴⁾。pw を変化させる連続測定条件は pw90 校正を精度良く実施するためにオペレータが任意に設定できるように設計した (図 1 : pw90 校正関連パラメータ)。pw 連続測定の照射中心は、連続測定の前に積算 1 回の ¹H 測定を行い (scout_scan)、スペクトル上で最も高いピークが選択されるように設計した。なお、pw90 校正に最適な連続測定条件は、プローブに記録されている pw90 を基準にして初期値 : pw10, 終了値 : pw450, 間隔 : pw40, 遅延時間 60 秒である。

開発した試作版の自動測定スクリプトを国立衛研の NMR 装置 4 台にインストールして、EC-qNMR の精度を確認した。その結果、全ての NMR 装置で誤差 1%以内という優れた分析結果が得られた (図 2)。しかしながら、この精度確認では使用していなかった試料において、**問題 1 : アレイデータの描く正弦波が歪み pw90 を正しく校正できない**、**問題 2 : アレイデータの描く正弦波の位相が反転して pw90 を正しく校正できない**という pw90 校正に関連した 2 つの問題が確認された。これらの問題は EC-qNMR を標準化及び普及させるにあたって改善すべき問題である。そこで、本研究では**問題 1**及び**問題 2**が発生する原因について調査し、その対策の提案を目的とした。

問題 1 及び**問題 2** の詳細を下に示した。

問題 1 : アレイデータの描く正弦波が歪む (図 3)

Cyanidin 3-glucoside 塩化物を CD₃OD/TFA-d (9:1) に溶解したものを試料とした。scout_scan で得られたスペクトル上の最も強度の高い水のピークが照射中心に設定されて、

pw の連続測定が行われた。このアレイデータに対する CF の結果は、n2 番目のスライスデータ中の水のピークを基準として、pw90 = 12.57096 [μs]となり、この pw90 の値が qNMR 測定条件に反映されていた。ただし、アレイデータの描く正弦波を確認したところ、正弦波は歪んでいて、pw90 が正しく校正されているのか疑問が生じた。正弦波の歪みは pw 連続測定中の遅延時間が短い場合に頻発するが¹⁾³⁾、今回の連続測定の遅延時間は 60 秒と十分な時間が設けられている。したがってアレイデータの描く正弦波の歪みは別の要因と考えられる。

問題 2 : アレイデータの描く正弦波の位相が反転する (図 4)

ジメチルスルホンを Acetone-d₆に溶解したものを試料とした。scout_scan で得られたスペクトル上の最も強度の高いジメチルスルホンのピークが照射中心に設定されて、pw 連続測定が行われた。しかしながら、アレイデータの描く正弦波の位相は反転していた。ジメチルスルホンを基準にした CF の結果は pw90 = 10.59092 [μs]であった。一方で、qNMR 測定条件に反映されていた pw90 は 11.32646 [μs]であった。正弦波の位相が反転する問題に加えて、分光計がどのピークを基準にして CF を行っているかが不明であった。

B. 研究方法

本研究で扱う自動測定スクリプトは日本電子製の NMR かつ Delta ソフトウェア上で機能する。

B-1) 装置

多核 SuperCOOL プローブ付き JNM-ECZ600R/S1 (日本電子製、¹H 共鳴周波数 599.67231 MHz, 当所装置管理 No. 8) を使用した。Delta NMR ソフトウェア v 6.1 を用いて NMR 装置を制御した。

B-2) スクリプトの作成

(株) JEOL RESONANCE で作成した。スクリプトファイル (.jaf), experiment ファイル

(.jxp), process_list (.list) を分光計にインストールしてスクリプトを実行させた。

C. 結果及び考察

C-1) 問題 1 : アレイデータの描く正弦波が歪む原因について

問題 1 で使用した試料における pw 連続測定 of 照射中心は水である。アレイデータの全スライスデータを確認したところ、水のピークの化学シフトが連続測定中に変化していた (図 5)。この化学シフトの変化により正弦波に歪みが生じ、正しく pw90 を校正できていないことが判明した。

C-2) 問題 1 : アレイデータの描く正弦波が歪む対策について

問題 1 の対策として、pw 連続測定 of 照射中心は化学シフトに堅牢なピークを選択することが望ましいと分かった。具体的には測定溶媒の溶媒ピークが望ましい (NMR はこのピークをロックして、磁場を補正しているため)。そこで、オペレータが任意のピークを pw 連続測定 of 照射中心に設定できるようにスクリプトを改良することにした。試作版 of スクリプトは scout_scan で得られたスペクトルの全範囲から最も強度の強いピークを pw 連続測定 of 照射中心に設定するため、溶媒ピーク以外のピークが選択されることがある。改良版はピークを探す範囲として、search_offset_90 及び search_sweep_90 のパラメータを設けることにした (図 6)。

C-3) 問題 2 : アレイデータの描く正弦波の位相が反転する原因について

NMR では照射中心のピーク強度を pw に応じてプロットすると、減衰する正弦波が描かれる。具体的にはアレイデータの全スライスデータに対して統一した位相補正を行えば、pw0 ~ pw180 の範囲でピーク強度は正、pw180 ~ pw360 の範囲でピーク強度は負となる。この時の統一した位相補正のパラメータ (Φ_0, Φ_1, Φ_p)

は、全スライスデータのうち pw0 ~ pw180 の正の強度を示すスライスデータを基準として設定する必要がある。しかし、もし pw180 ~ pw360 のスライスデータを基準にして位相補正のパラメータ (Φ_0, Φ_1, Φ_p) を設定した場合、本来は正の強度となるスライスデータは負となり、本来は負の強度となるスライスデータは正となる。すなわち、正弦波の位相は反転する (図 7)。そこで日本電子に、分光計がアレイデータの全スライスデータから何番目のスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定しているのか問い合わせたところ、「奇数番目のスライスデータのうち、符号関係なく強度が最大となるピークを持ったスライスデータを抽出し、このスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定する」との回答があった。

さて、問題 2 で使用した試料のアレイデータを確認したい。まず全スライスデータのうち、符号関係なく強度が最大となるピークは、n2 番目のスライスデータである (図 8)。このスライスデータは本来、正の強度を示すスライスデータであるが、奇数番目の制約があるため、奇数番目のスライスデータから強度が最大となるピークを探したところ、n7 番目に確認された。このスライスデータは本来、負の強度を示すデータである。この n7 番目のスライスデータを基準にした位相補正が全スライスデータに対して行われたため、アレイデータの描く正弦波が反転したことが判明した (図 8)。

また、問題 2 で使用した試料では pw90 校正の結果が 10.59092 [μ s], qNMR 測定 of pw90 が 11.32646 [μ s] であり、pw90 校正結果が次の qNMR 測定に反映されていなかった。そこで、分光計側で CF の基準となるピークをどのように選択しているのか確認したところ、スライスデータの観測範囲の中で、正の強度を示す、最も強度の強いピーク、すなわち 2.933ppm のピークを選択していることが分かった (図 9)。なお、問題 1 から推測されたことだが、仮に pw 連続測定中に化学シフトが変化する場合は、n2 番

目のスライスデータにおける最も強度の強いピークがCFの基準となるようだ(図3)。pw連続測定中の化学シフトは不変となるように対策を行ったので(C-2)問題1:アレイデータの描く正弦波が歪む対策について),オペレータは気にする必要はないが,記録として本報告書に記載しておく。

C-4)問題2:アレイデータの描く正弦波の位相が反転する対策について

アレイデータの描く正弦波は減衰する正弦波であるため,通常,pw90付近をプロットしておけば,このスライスデータが全スライスデータにおける最も強度の強いピークを持つスライスデータとなるはずである。このスライスデータが,アレイデータの全スライスデータに対する位相補正の基準となるようにするため,以下の対策を行う。分光計側の基本設定である奇数番目の制約を外し,全スライスデータから最も強度の強いピークを持つスライスデータを探すように改良した。これによりアレイデータの描く正弦波が反転する可能性はほとんどなくなる。

また,CFの基準となるピークはpw連続測定照射中心ピークであることが望ましい。問題1の対策として,オペレータが任意のピークを照射中心に設定できるように改良したが,試料によっては,照射中心に設定したピークの近傍に強度の高いピークが共存する場合がある。そこで,CFの基準とするピークは,スライスデータの観測幅の中で最も強度の強いピークではなく,先にオペレータが設定したsearch_offset_90及びsearch_sweep_90の範囲内で探すように改良した。さらに,アレイデータの描く正弦波が反転する場合も考慮して,CFの基準となるピークは符号関係なく,強度の高いピークを選択するように改良した。すなわち,改良前は強度の低いピークがCFの基準として選択されていたが(図9の2.933 ppm),改良後は符号関係なく強度の強いピークがCFの基準となる(図4の2.936 ppm)。これにより,アレイデータの描く正弦波が反転しても,反転した

正弦波としてpw90校正が進むようになった。

D. 結論

EC-qNMR自動測定スクリプトの改良を行った。

1. search_offset_90及びsearch_sweep_90のパラメータを新たに設けることで,オペレータが任意のピークをpw連続測定照射中心に設定できるようにした。具体的には,pw連続測定中で化学シフトに堅牢なピーク,例えば溶媒ピークが選択できるように改良した。
2. pw90校正におけるアレイデータに対する位相補正の基準となるスライスデータは,全スライスデータから符号関係なく,最も強度の高いピークを持つスライスデータを選択するように改良した。
3. CFの基準となるピークは,search_offset_90及びsearch_sweep_90の範囲内で,符号関係なく,最も強度の高いピークとなるように改良した。改良したスクリプトを使うことにより,試験機間で統一した手順,パラメータでEC-qNMRを実施することが可能になった。今後は共同試験を行うことで,EC-qNMRの高度化及び標準化が期待される。

E. 参考文献

- 1) Nishizaki Y, Lankin D.C, Chen SN, Pauli G.F: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 93(5), 2733–2741 (2021).
- 2) 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業),既存添加物の品質向上に資する研究(20KA1008),令和2年度研究分担報告書,試験法及び分析法の開発～外部標準法定量NMRの自動化スクリプトの作成～。
- 3) Keifer P.A: 90° Pulse width calibrations: How to read a pulse width array. *Concepts Magn. Reason.*, 11(3), 165–180 (1999).

- 4) Kurimoto T, Asakura K, Yamasaki C, Nemoto N: MUSASHI: NMR pulse width determination method by nonlinear least square curve fitting. *Chem. Lett.*, 34(4), 540–541 (2005).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 西崎雄三：外部標準法定量NMR (EC-qNMR) の紹介. Japan Analytical Instruments Active users Network (JAIAN) (2021年5月26日)
- 2) 西崎雄三：外部標準法定量NMRのすすめ. 国立衛研例会 (2022年1月25日)
- 3) 西崎雄三, 建部千絵, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子：外部標準法定量NMR (EC-qNMR) によるアントシアニン市販試薬の純度測定. 日本農芸化学会2022年度大会 (2022年3月17日)

2. 論文発表等

- 1) Giancaspro G, Adams K.M, Bhavaraju S, Corbett C, Diehl B, Freudenberger J.C, Fritsch K, Krishnamurthy K, Laatikainen P, Martos G, Miura T, Nam J, Niemitz M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Obkircher M, Phansalkar R, Ray G.J, Saito T, Sørensen D, Urbas A, Napolitano J.G, Tadjimukhamedov F, Bzhelyansky A, Liu Y, Pauli G.F: The qNMR Summit 5.0: Proceedings and Status of qNMR Technology, *Analytical Chemistry*, 93(36), 12162–12169 (2021).

G. 知的財産権の出願. 登録状況

特になし

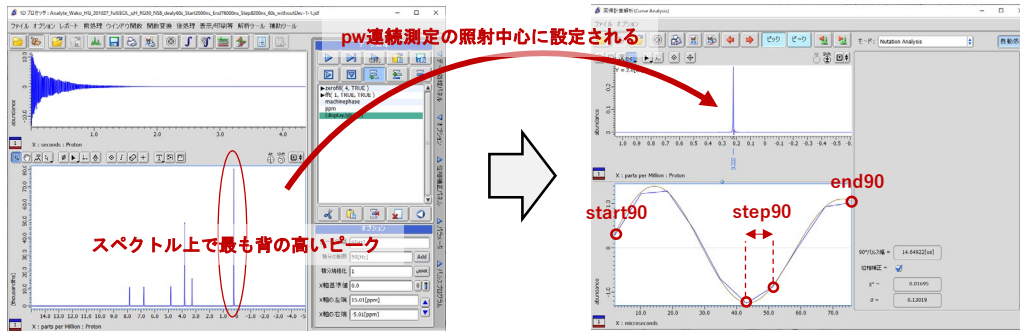
EC-qNMR測定手順

①試料投入 → ②温度安定化 → ③シム調整 → ④T&M → ⑤pw90校正 → ⑥qNMR測定

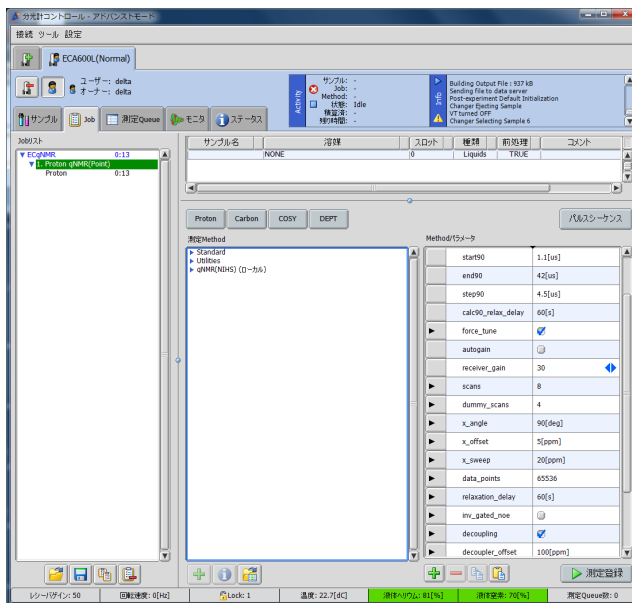
CF法によるpw90校正

pw連続測定の照射中心を決めるためのscout_scan

pw連続測定



EC-qNMR自動測定スクリプトのMethodパラメータ



start90	2[us]
end90	76[us]
step90	8.2[us]
calc90_relax_delay	60[s]
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
autogain	<input type="checkbox"/>
receiver_gain	30
scans	32
dummy_scans	4
x_angle	90[deg]
x_offset	5[ppm]
x_sweep	20[ppm]
data_points	65536
relaxation_delay	60[s]
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
decoupler_offset	70[ppm]
decoupler_modulation	MPF8

pw90校正関連
パラメータ

qNMR測定関連
パラメータ

図 1 : EC-qNMR 自動測定スクリプト (試作版) の詳細

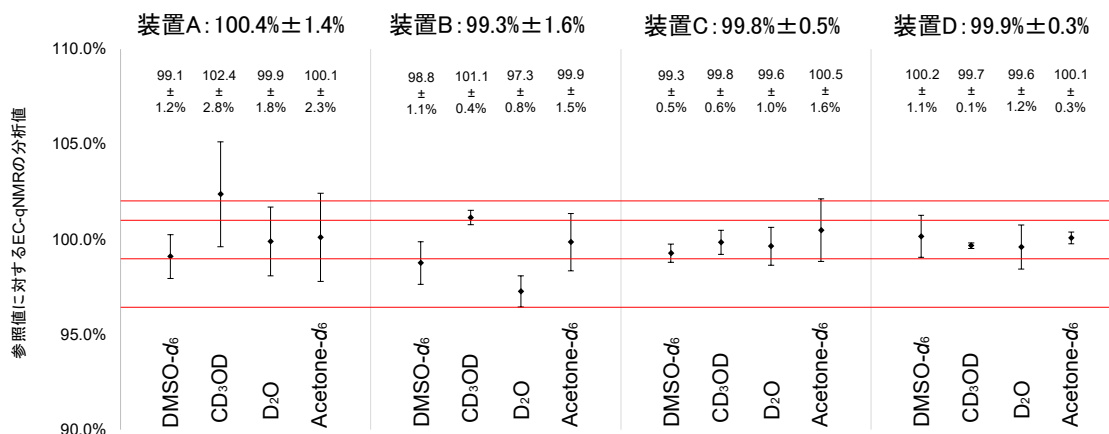


図 2 : EC-qNMR 自動測定スクリプト (試作版) を使用して実施した EC-qNMR の精度
 分析種に認証標準物質マレイン酸, 外部標準に 3 濃度の認証標準物質ジメチルスルホンを用いて, DMSO-d₆, CD₃OD, D₂O, Acetone-d₆ の 4 溶媒で EC-qNMR を実施した. NMR 装置は A~D の 4 台の磁場強度 600 MHz (¹H) で実施した. マレイン酸の認証値に対する EC-qNMR の分析値をプロットしている.

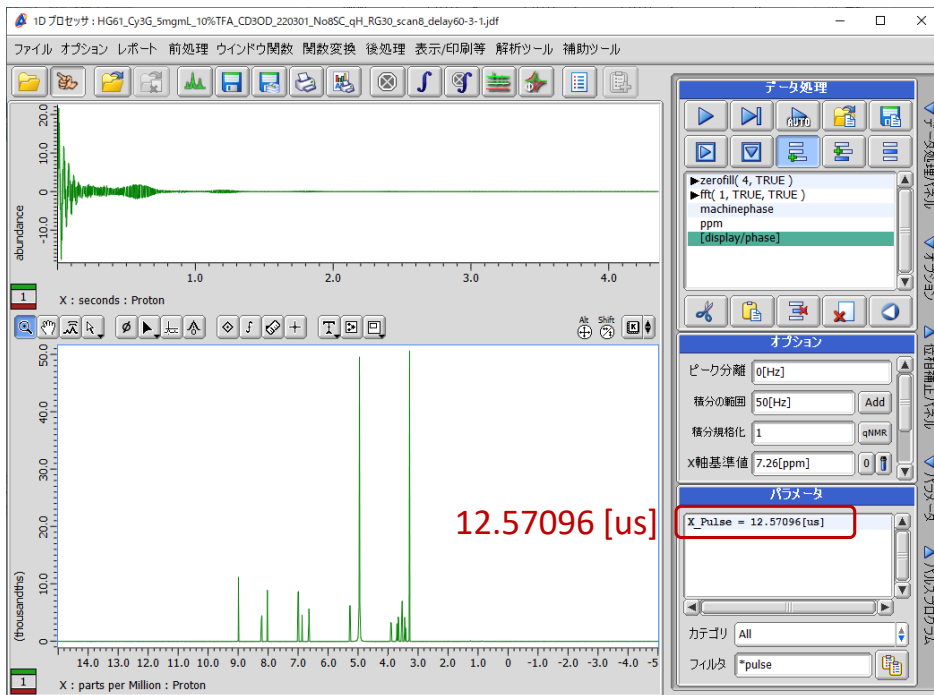
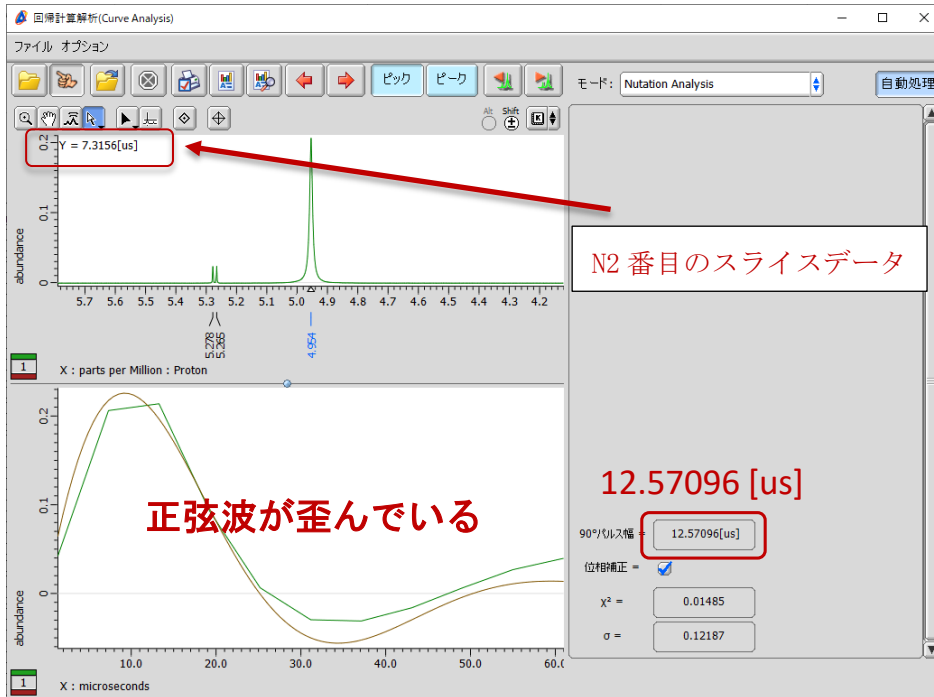


図3：問題1の詳細。

上はアレイデータ，下は qNMR 測定データ。

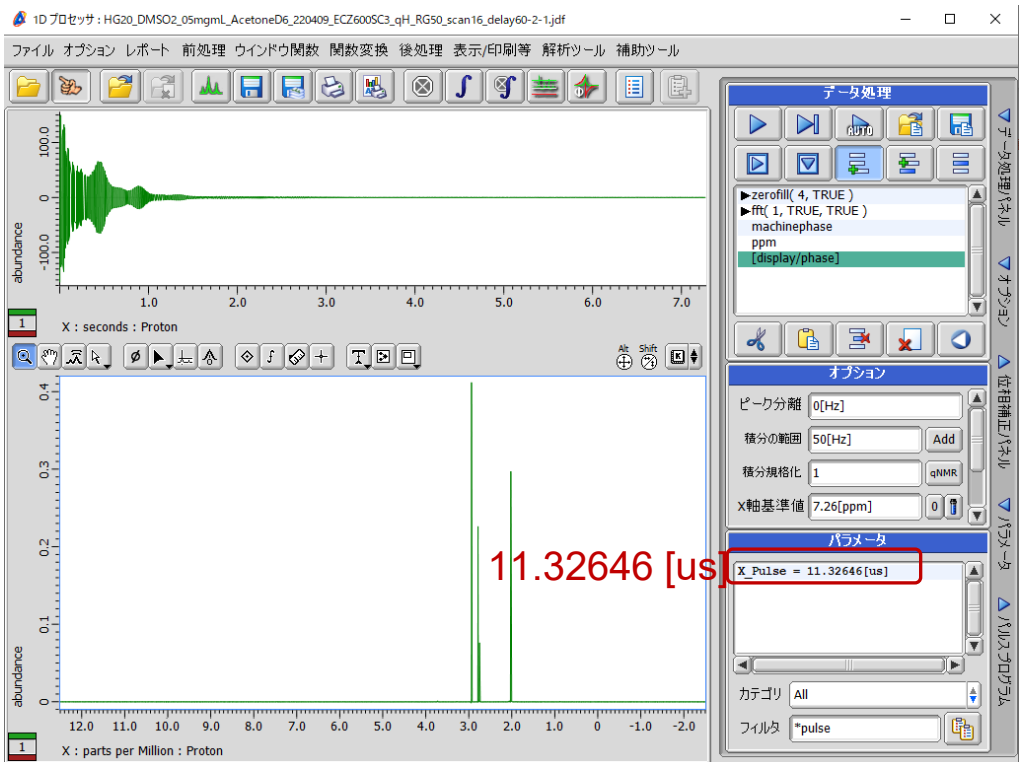
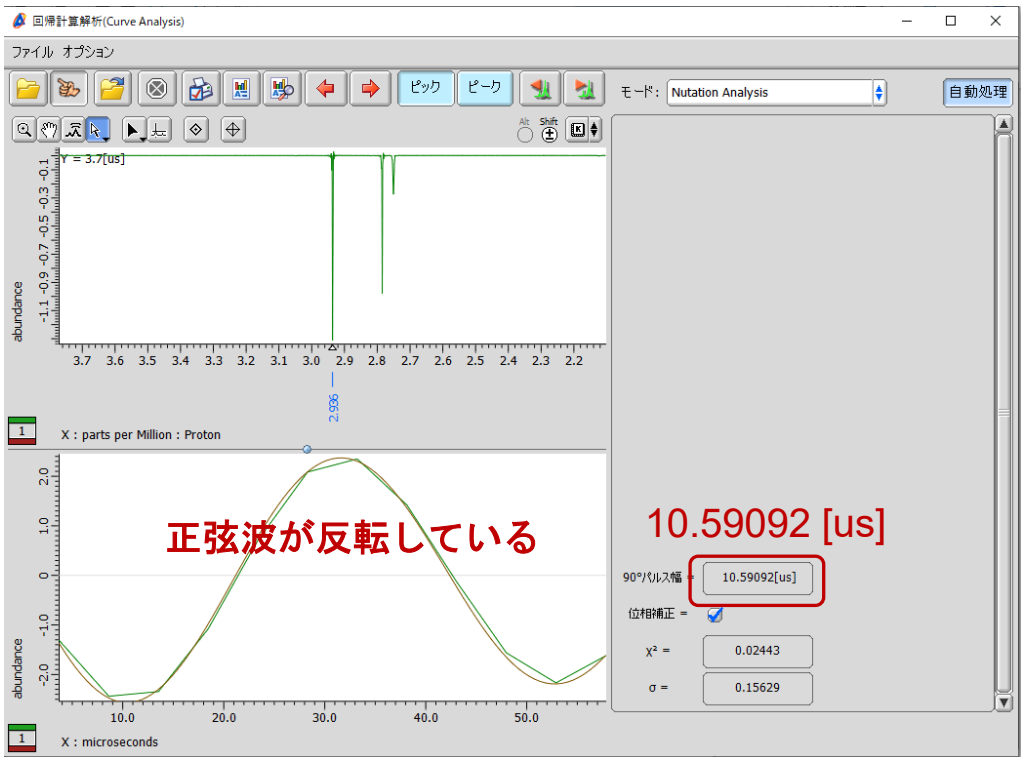


図4：問題2の詳細。

上はアレイデータ，下は qNMR 測定データ。

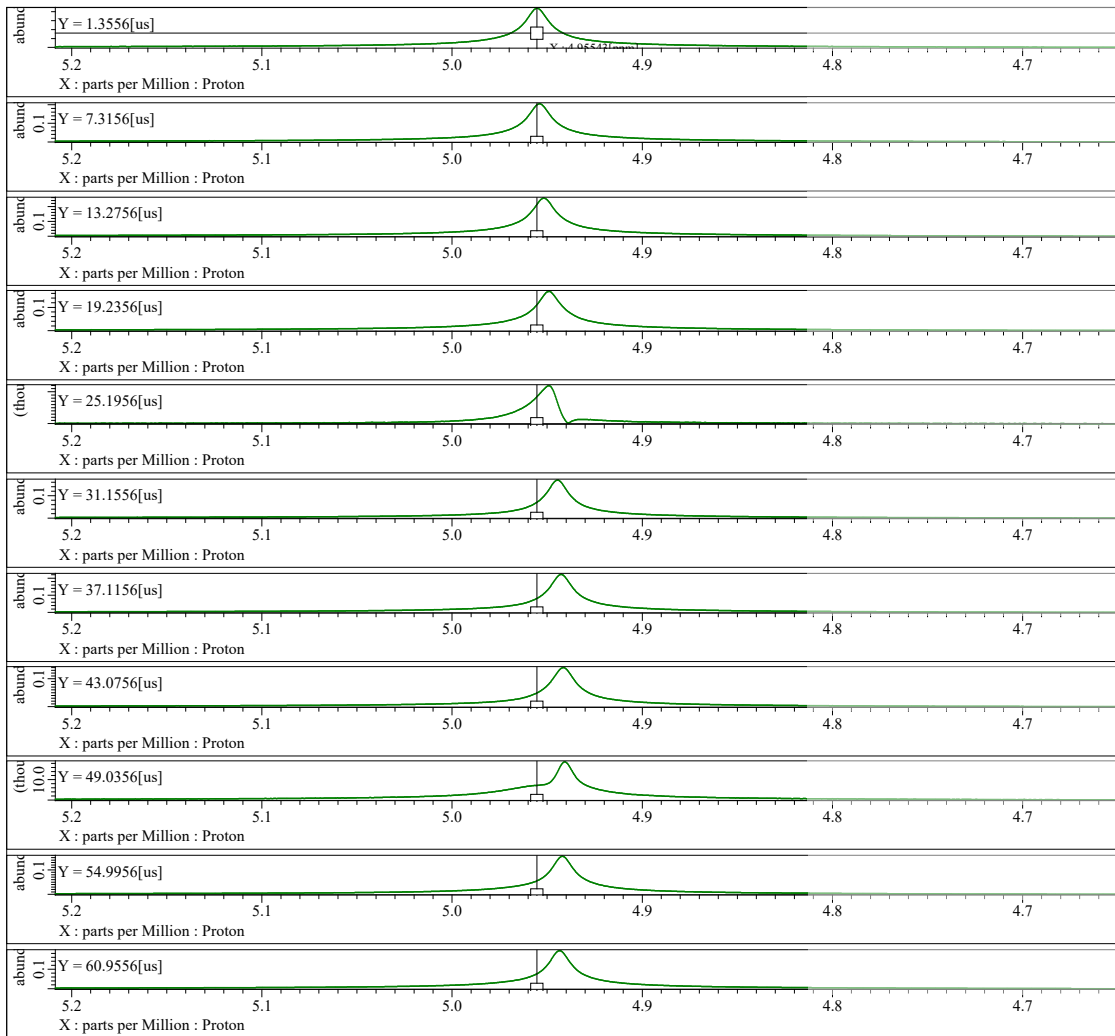


図 5 : pw 連続測定中に化学シフトが変化する水のピーク




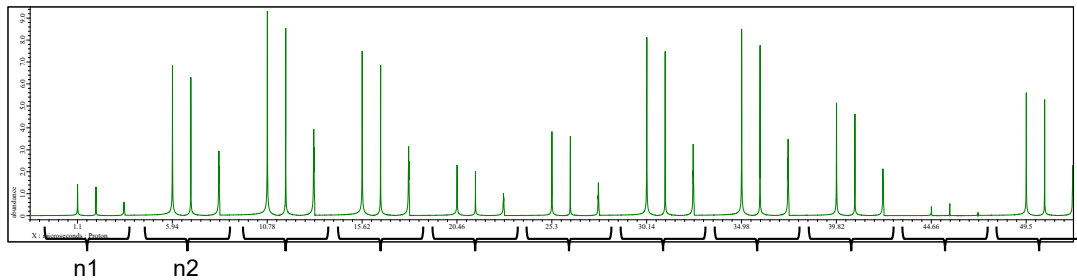
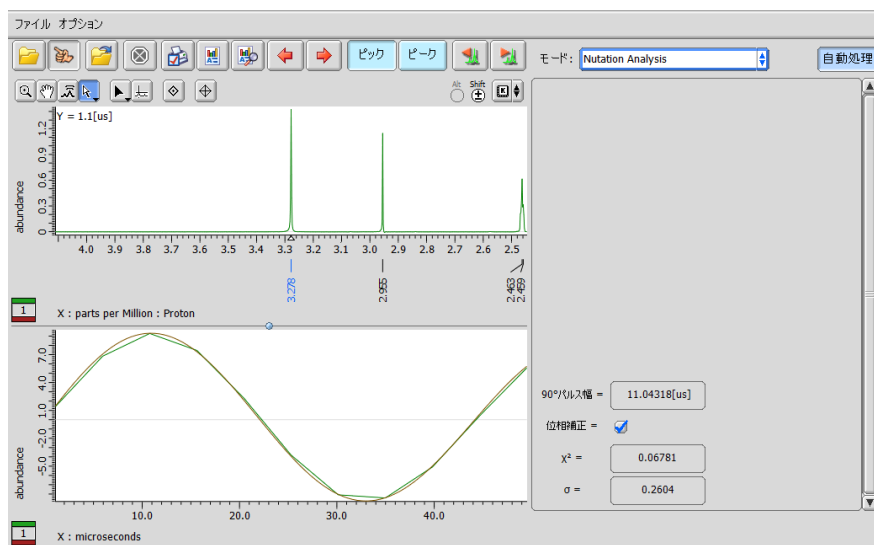
▶	return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	filename_part2	pw360_DMSOd6
▶	calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	search_offset_90	2.462[ppm]
▶	search_sweep_90	0.2[ppm]
	start90	41.65232[us]
	end90	45.6523[us]
	step90	0.2[us]
	calc90_relax_delay	30[s]
▶	force_tune	<input type="checkbox"/>
	autogain	<input type="checkbox"/>
	receiver_gain	40 
▶	scans	1
▶	dummy_scans	0
▶	x_angle	90[deg]
▶	x_offset	5[ppm]
▶	x_sweep	15[ppm]
▶	data_points	65536
▶	relaxation_delay	60[s]
▶	inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
▶	decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	decoupler_offset	70[ppm]
▶	decoupler_modulation	MPF8 
	spinner_frequency	15[Hz]
	spinner_state	SPIN OFF 
▶	turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>

図 6 : search_offset_90 及び search_sweep_90 のパラメータを加えたスクリプトの Method パラメータ

全スライスデータのリニアライズ（絶対値表示）



N3のスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定したとき、アレイデータの描く正弦波



N7のスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定したとき、アレイデータの描く正弦波

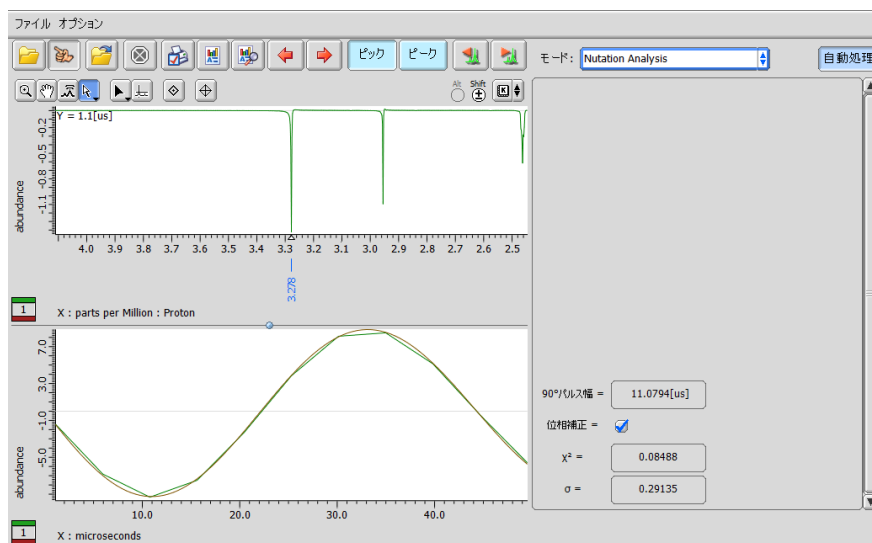
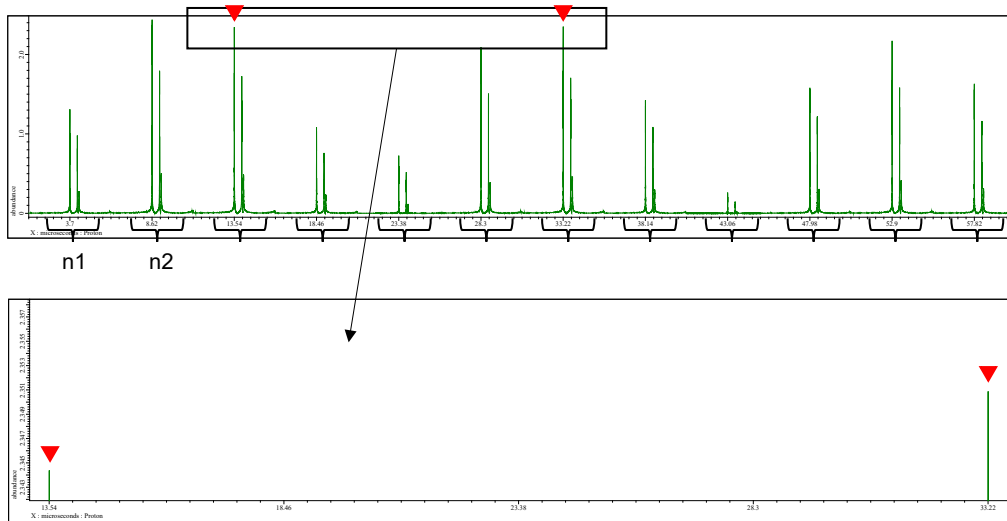


図7：分光計側のアレイデータの全スライスデータに対して行う位相補正（n3とn7のスライスデータを位相補正の基準にした場合）。

全スライスデータのリニアライズ（絶対値表示）



N7のスライスデータを基準にして位相補正のパラメータを設定したとき、アレイデータの描く正弦波

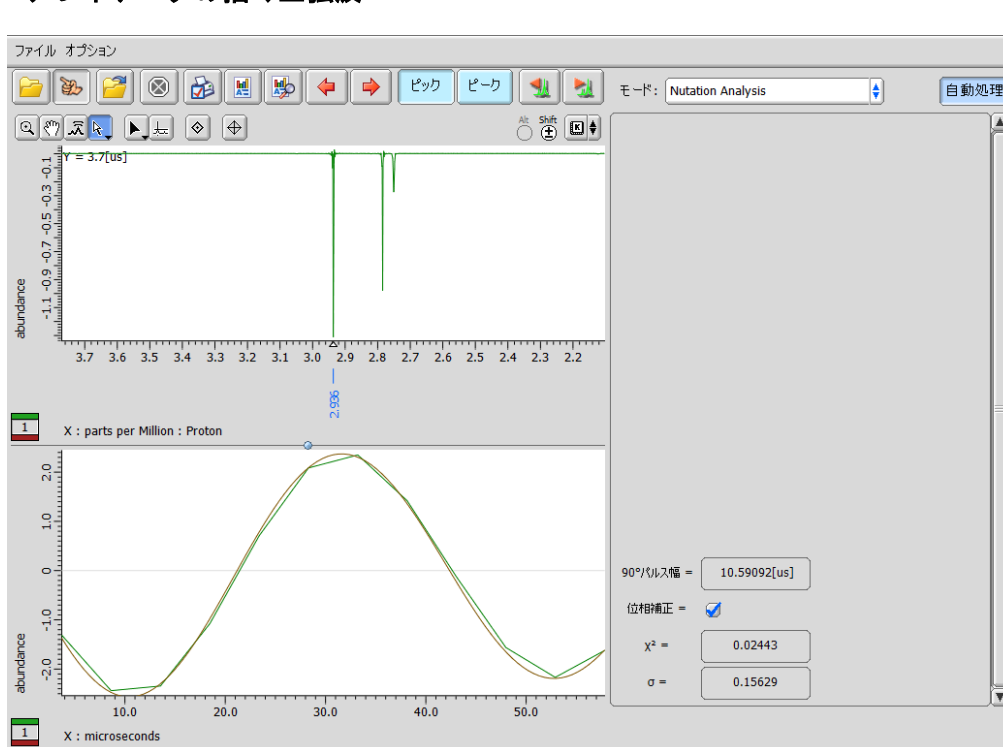


図 8 : 問題 2 で使用した試料において、アレイデータの描く正弦波が反転した原因
 このときの pw 連続測定条件は、プローブに記録されている pw90 を基準にして初期
 値 : pw30, 終了値 : pw470, 間隔 : pw40, 遅延時間 60 秒である。

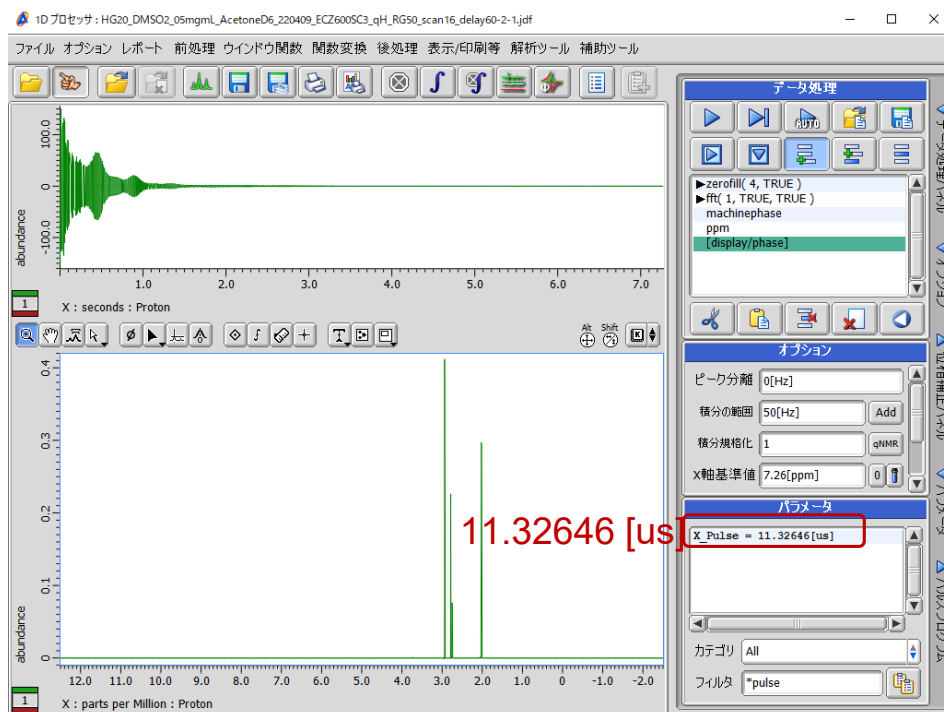
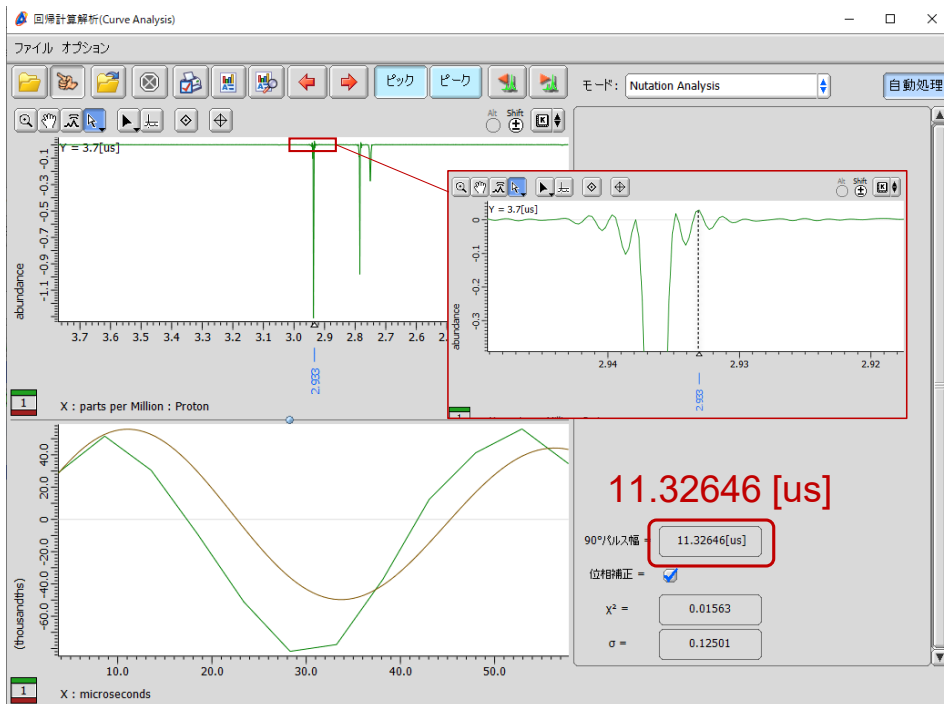


図9：CFの基準となるピークの選定

上はアレイデータ，下はqNMR測定データ．

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Giancaspro G, Adams K.M, Bhavaraju S, Corbett C, Diehl B, Freudenberg J.C, Fritsch K, Krishnamurthy K, Laatikainen P, Martos G, Miura T, Nam J, Niemitz M, <u>Nishizaki Y</u> , Sugimoto N, Obkircher M, Phansalkar R, Ray G.J, Saito T, Sørensen D, Urbas A, Napolitano J.G, Tadjimukhamedov F, Bzhelyansky A, Liu Y, Pauli G.F	The qNMR Summit 5.0: Proceedings and Status of qNMR Technology	<i>Analytical Chemistry</i>	93 (6)	12162-12169	2021

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Giancaspro G, Adams K, M, Bhavaraju S, Corbett C, Diehl B, Freudenberger J.C, Fritsch K, Krishnamurthy K, Laatikainen P, Martos G, Miura T, Nam J, Niemitz M, <u>Nishizaki Y</u> , Sugimoto N, Obkircher M, Phansalkar R, Ray G.J, Saito T, Sørensen D, Urbas A, Napolitano J.G, Tadjimukhamedov F, Bzhelyansky A, Liu Y, Pauli G.F	The qNMR Summit 5.0: Proceedings and Status of qNMR Technology	<i>Analytical Chemistry</i>	93 (6)	12162-12169	2021

令和4年 3月 31日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品分析の信頼性確保に資する外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) の高度化及び標準化に関する研究 (21KA3008)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 西崎 雄三 (ニシザキ ユウゾウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
			審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。