

価を行った。酵素誘導については現在までに約 200 品目の製品の評価を行った。その結果、程度に差はあるものの約 40% の商品に誘導が認められた。また、約 20% の製品において細胞増殖抑制が観察された。ヒト iPS 細胞の肝・腸管上皮細胞への分化については、薬物代謝活性を有する肝細胞への分化に成功した。さらに、小腸の細胞（腸管上皮細胞）に近い機能を有する細胞への分化にも世界で初めて成功した。また、本研究結果の公開するためのデータベース化の基礎構築が完了した。

F. 研究発表

(1) 国内 4 件

「永田 清」

1. 坂口修平、高橋昌吾、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしての TNF- α 誘導肝細胞死と酸化ストレス - シグナル伝達機構からのアプローチ- 日本エンドトキシン・自然免疫研究会、筒井ひろこ、小谷穰治、横地高志、エンドトキシン・自然免疫研究 15 - 飛躍する自然免疫研究-、医学図書出版、東京、53-57, 2013
2. 永田 清、化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学 - 健康と環境- 第5版、(平塚明、姫野誠一郎、長沼章、編集) 広川書店、349-355、2012
3. 永田 清、薬物相互作用、薬害・副作用学 第1版、(川西正祐、小野秀樹、賀川義之 編集) 南山堂、2012
4. Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S, Nagata K. TNF- α /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury. *J Tohoku Pharm Univ.* 59, 69-74 (2012)

(2) 海外 12 件

「永田 清」

1. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).
 2. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Chemical Stabilizer, CoCl₂ and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).
 3. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 in press
- 「松永民秀」
5. Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T. Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28: 38-43 (2013).
 6. Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S. Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analyses of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. *Biol Pharm Bull.* 36, 292-298 (2012).
 7. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S. Evaluation of

human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 598-604 (2012).

8. Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S. Lower expression of HNF4 α and PGC1 α might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 430-438, 2012.

「細川正清」

9. Suzaki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohda A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K. The effect of carboxylesterase 1 (CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 21-30 (2013).
10. Suzaki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K. Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase 1 gene in an Asian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 735-736 (2012).

「頭金正博」

11. Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y. Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 447-450 (2012).

H. 学会発表 (22 件)

1. 佐々木崇光、沼田 喜弘、成田 昌

代、高橋 昌悟、田中 大、松永 民秀、永田 清：肝特異的転写因子 HNF-6 による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化 iPS 細胞樹立への応用、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。

2. 熊谷 健、中澤 洋一、野崎 智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。
3. Iwao T, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).
4. Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Sasaki T, Matsunaga T, Nagata K. Enhanced expression of Cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).
5. Ishii Y, Koba H, Oizaki T, Iwamoto Y, Ikushiro S, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Alteration in the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by Cytochrome P450 3A4: Different susceptibility of UGT isoforms and UGT1A7 variants, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).

6. Miyauchi Y, Ishii Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 1A9 suppress Cytochrome P450 3A4 function: Evidence for the involvement of the cytosolic tail of UGT in the suppression, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).
7. 小西麻美子、奥崎 恭子、北畠 知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原 明美、鈴木 匡、松永 民秀、頭金 正博、細川 正清、大森 栄、永田 清：健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルフォーマシーシンポジウム 2012 年 7 月 (福岡)。
8. 齋藤詩奈子、高橋 昌悟、角間 元美、榊 聡美、伏見 彩、佐々木崇光、永田 清：健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
9. 齋藤 雄大、笠原 彩、中澤 洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
10. 沼田 喜弘、佐々木崇光、千葉 文博、菅野 高弘、高橋 里菜、吉田美都里、松永 民秀、永田 清：HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
11. 菅野 高弘、佐々木崇光、沼田 喜弘、千葉 文博、吉田美都里、高橋 里菜、松永 民秀、永田 清：microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
12. Miyauchi Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Post-translational regulation of cytochrome P450 3A4 activity through protrin-protein interactions with UDP-glucuronosyltransferase 2B7 and 1A9: The UGT domain(s) contributing to the interaction, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
13. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
14. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaori S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
15. Nakamura T, Miyauchi Y, Takeda T, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Yuji Ishii Y. Cytochrome P450 3A1 alters the function of UDP-glucuronosyltransferase 2B3 which lacks potential glycosylation sites, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
16. Kinoshita K, Koba H, Miyauchi Y, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Yuji Ishii Y. Cytochrome P450 3A4 alters the affinity of UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms toward UDP-glucuronic acid, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
17. Sasaki T, Numata Y, Kanno T, Chiba

- F, Takahashi R, Yoshida M, Matsunaga T, Nagata K. MicroRNA enhances the expression of *CYP* genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
18. Numata Y, Sasaki T, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Kanno S, Nagata K. Identification of a novel transactivation mechanism of the *MRP3* gene, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
19. Sasaki T, Numata Y, Takahashi S, Kumagai T, Matsunaga T, Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development, International Symposium for Neurosciences 2013, 2013年2月(仙台).
20. 宮内 優、石井祐次、永田 清、山添 康、マッケンジー・ピーター、山田英之：Cytochrome P450 3A4 活性の UDP-glucurinosyltransferase (UGT) 2B7 による抑制：UGT2B7 と calnexin の C 末端 cytosolic tail 置換による抑制作用の消失、日本薬学会第133年会、2013年3月(横浜)。
21. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- α 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と

H0-1 の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 (横浜)。

22. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清：健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 (横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 発明の名称：人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋、近藤祐樹、吉橋幸美

出願番号：特願 2012-247010

出願日：2012 年 11 月 19 日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 発明の名称：人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋

出願番号：特願 2013-036434

出願日：2013 年 2 月 26 日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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）

研究課題： いわゆる「健康食品」と医薬品との併用に関わる 安全性評価に関する研究

研究分担報告書

肝分化 iPS 細胞への肝特異的転写因子の薬物代謝酵素発現に対する影響

研究代表者 永田 清

東北薬科大学 薬学部 教授

研究協力者 高橋 昌悟

東北薬科大学 薬学部 博士後期課程 3 年

研究要旨：ヒト肝細胞は、医薬品開発における薬物動態試験等を行う上で必要不可欠なツールである。しかしながら、十分な細胞数を確保することは困難であり、近年、樹立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、新規肝細胞リソースとして期待されている。昨年度、我々は肝分化 iPS 細胞へ HNF6 を導入することにより、CYP3A4 を高発現させることに成功した。そこで、他の肝特異的転写因子 (LETf) を HNF6 と共に導入し、薬物代謝酵素発現量の変化を測定した結果、HNF6 と他の LETf の組み合わせにより、多くの CYP 分子種で発現量の増加が認められた。本研究により、LETf の協調作用は、iPS 細胞の肝分化誘導に重要であることが示され、さらに、HNF6 および HNF4 α の同時導入では CYP1A2 および CYP3A4 発現量の相乗的な上昇を初めて明らかにした。

A. 研究目的

我々は、iPS 細胞を胎児肝細胞類似の遺伝子発現パターンを示す細胞まで分化させることに成功した。加えて、HNF6 発現アデノウイルスベクターを用いた分化法により、医薬品代謝に極めて重要な酵素である CYP3A4 を高発現した細胞への分化が可能となった。しかしながら、未だヒト肝細胞と比較して薬物代謝酵素群の発現は低く、その酵素活性も認められなかった。そこで、Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) および CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) ファミリーに代表される肝特異的転写因子 (LETf) に注目した。中でも、HNF6、HNF1 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 、HNF4 α および C/EBP α は、互いに協調し合いながら肝細胞において重要な役割を担っている。そこで、本研究では、これらを同時導入することにより、薬物代謝評価系にも応用可能な肝細胞への分

化を目指した。

B. 研究方法

ヒト胎児肝細胞 (HFL 細胞) を用いた LETf 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定

HFL 細胞を 1.0×10^5 cell/well (collagen-coated 24-well plate) で播種し、24 時間後に LETf 発現アデノウイルス (Ad-LETf) を感染させた。72 時間後、細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いたりアルタイム PCR 法により、各遺伝子の発現量を測定した。

肝分化 iPS 細胞を用いた LETf 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定および CYP3A4 活性測定

ヒト iPS 細胞を既に確立した肝分化プロトコールに従い、肝分化 iPS 細胞を作製した。この肝分化誘導中の day 9, day 12, day 15 に各 Ad-LETF を感染させ、day 20 に細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix EX Taq (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR 法によりアルブミン (ALB) および P450 発現量の変化を測定した (分化肝細胞における ALB および CYP3A4 の発現量を 1 としたときの相対値を黒から赤のヒートマップで示した)。また、day 19 に Ad-LETF を感染させ、72 時間後に、CYP3A4 の代表的基質であるテストステロン (300 μ M) を暴露させ、6 時間後の代謝物 (6 β -ヒドロキシテストステロン) の濃度を測定した。

C. 研究結果および考察

HFL 細胞を用いた LETF 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定

HFL 細胞を用いて、肝細胞マーカーである ALB および CYP3A4 に対する LETF の影響について検討した (図 2.)。ALB においては、HNF1 α と HNF6、HNF1 α と C/EBP α 、HNF3 γ と HNF6、HNF3 γ と C/EBP α 、HNF4 α と HNF6 および HNF6 と C/EBP α の組み合わせにより、それぞれ約 11 倍、11 倍、15 倍、31 倍、15 倍および 119 倍の発現量の上昇が認められた。次に、CYP3A4 について検討したところ、HNF1 α および C/EBP α の単一感染、HNF1 α と HNF6、HNF3 γ と C/EBP α および HNF4 α と HNF6 の組み合わせ導入により、それぞれ、18 倍、26 倍、54 倍、57 倍および 67 倍の発現量の上昇が認められた。以上、本研究により LETF の 2 種同時導入により、ALB および CYP3A4 発現量を上昇させることが明らかとなった。特に、ALB における HNF6 および C/EBP α 同時導入、CYP3A4 に対する HNF4 α および HNF6 の同時導入においては、他の組み合わせと比較しても、著しい発現上

昇効果であり、この発現上昇効果は初めて明らかとなった。これらから、HNF6 は、LETF の相互作用の中でも中心的な役割を担っていることが示唆された。

肝分化 iPS 細胞を用いた LETF 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定および CYP3A4 活性測定

iPS 細胞の肝分化過程に Ad-LETF を感染させ、ALB および CYP3A4 への影響を検討した (図 3)。その結果、day 12 おける LETF 導入が、ALB 発現量を上昇させる傾向が認められた。特に、HNF6 および C/EBP α の同時導入において、コントロールと比較して約 100 倍の発現量の上昇が認められた。この 2 因子による肝分化 iPS 細胞における ALB の相乗的な上昇は、本研究により得られた初めての知見である。また、HNF1 α および HNF6 の同時導入においても顕著な増加が認められた。これらの結果から、HNF6 は他の LETF との同時導入により、肝分化を促進させる可能性が示唆された。続いて、同様に CYP3A4 発現量においても検討した。CYP3A4 においても、感染時期により、LETF による影響が異なることが示唆された。特に、day 9、day 12 における HNF1 α 、HNF3 β の同時導入により、11 倍および 23 倍の著しい発現上昇が認められた。また、胎児肝細胞期である Day 15 においては、HNF4 α および HNF6 の同時導入により、12 倍の発現量の相乗的な上昇が認められた。この知見も、本研究により初めて明らかとなった。そこで、HNF4 α および HNF6 同時導入により CYP3A4 発現量の顕著な増加が認められたことから、肝分化 iPS 細胞における CYP3A4 酵素活性を測定した (図 4)。2 因子同時感染において、ヒト肝細胞の約 2% の CYP3A4 活性を示した。また、データは示せないが肝特異的な発現を示す CYP1A2 の

発現量は1000倍の上昇が認められた。肝分化 iPS 細胞は、薬物代謝能を有さないことが大きな問題となっているが、HNF4 α およびHNF6の導入により、薬物代謝能を有する細胞へ分化促進できたと考えている。これらの結果からも、HNF6は、薬物代謝能を有する肝細胞への分化に重要である可能性が示唆された。

D. 結論

HNF6と他のLETfの協調作用は、薬物代謝酵素や肝細胞マーカーの発現調節に寄与している可能性が、HFL細胞と肝分化iPS細胞を用いた検討から明らかとなった。また、HNF4 α とHNF6の胎児肝細胞期の肝分化iPS細胞へ導入させることで、CYP3A4酵素活性を有する細胞へ分化することに成功した。今後は、HNF6と他のLETf導入の感染時期や3種以上の組み合わせを含めた更なる検討により、薬物代謝能を十分に有した分化肝細胞の確立を目指す。

F. 研究発表

(1) 国内 1 件

1. Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S, Nagata K. TNF- α /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury. *J Tohoku Pharm Univ.* 59, 69-74 (2012)

(2) 海外 3 件

「永田 清」

2. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.

Drug Metab Pharmacokinet. 2013 in press

3. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).
4. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Chemical Stabilizer, CoCl₂ and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).

2. 著書 3 件

1. 永田 清、化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学 - 健康と環境 - 第5版、(平塚明、姫野誠一郎、長沼章、編集) 広川書店、349-355、2012
2. 永田 清、薬物相互作用、薬害・副作用学 第1版、(川西正祐、小野秀樹、賀川義之 編集) 南山堂、2012
3. 坂口修平、高橋昌悟、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしてのTNF- α 誘導肝細胞死と酸化ストレス、エンドトキシン・自然免疫研究15 - 飛躍する自然免疫研究 -、(筒井ひろこ、小谷穰治、谷 徹、横地高志 編集)、医学図書出版、東京、53-57、2013.

3. 学会発表 22 件

1. 佐々木崇光、沼田 喜弘、成田 昌代、高橋 昌悟、田中 大、松永 民秀、永田 清：肝特異的転写因子HNF-6による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化iPS細胞樹立への応用、平成24年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012年5月

- (仙台).
2. 熊谷 健、中澤 洋一、野崎 智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台).
 3. Iwao T、Nagata K、Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 4. Takahashi S、Numata Y、Narita M、Tanaka Y、Sasaki T、Matsunaga T、Nagata K. Enhanced expression of Cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 5. Ishii Y、Koba H、Oizaki T、Iwamoto Y、Ikushiro S、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. Alteration in the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by Cytochrome P450 3A4: Different susceptibility of UGT isoforms and UGT1A7 variants、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 6. Miyauchi Y、Ishii Y、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 1A9 suppress Cytochrome P450 3A4 function: Evidence for the involvement of the cytosolic tail of UGT in the suppression、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 7. 小西麻美子、奥崎 恭子、北島 知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原 明美、鈴木 匡、松永 民秀、頭金 正博、細川 正清、大森 栄、永田 清：健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルフォーマシーシンポジウム 2012 年 7 月 (福岡).
 8. 齋藤詩奈子、高橋 昌悟、角間 元美、榊 聡美、伏見 彩、佐々木崇光、永田 清：健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 9. 齋藤 雄大、笠原 彩、中澤 洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 10. 沼田 喜弘、佐々木崇光、千葉 文博、菅野 高弘、高橋 里菜、吉田美都里、松永 民秀、永田 清：HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 11. 菅野 高弘、佐々木崇光、沼田 喜弘、千葉 文博、吉田美都里、高橋 里菜、松永 民秀、永田 清：microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 12. Miyauchi Y、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. Post-translational regulation of cytochrome P450 3A4 activity through pro-trin-protein interactions with UDP-glucuronosyltransferase 2B7

- and 1A9: The UGT domain(s) contributing to the interaction, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
13. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 14. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaori S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 15. Nakamura T, Miyauchi Y, Takeda T, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Cytochrome P450 3A1 alters the function of UDP-glucuronosyltransferase 2B3 which lacks potential glycosylation sites, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 16. Kinoshita K, Koba H, Miyauchi Y, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Cytochrome P450 3A4 alters the affinity of UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms toward UDP-glucuronic acid, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 17. Sasaki T, Numata Y, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Matsunaga T, Nagata K. MicroRNA enhances the expression of *CYP* genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 18. Numata Y, Sasaki T, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Kanno S, Nagata K. Identification of a novel transactivation mechanism of the *MRP3* gene, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 19. Sasaki T, Numata Y, Takahashi S, Kumagai T, Matsunaga T, Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development, International Symposium for Neurosciences 2013, 2013年2月(仙台).
 20. 宮内 優、石井祐次、永田 清、山添 康、マッケンジー・ピーター、山田英之: Cytochrome P450 3A4 活性の UDP-glucurinosyltransferase (UGT) 2B7 による抑制: UGT2B7 と calnexin の C 末端 cytosolic tail 置換による抑制作用の消失、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜).
 21. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清: HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- α 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と HO-1 の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜).
 22. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清: 健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他

該当なし

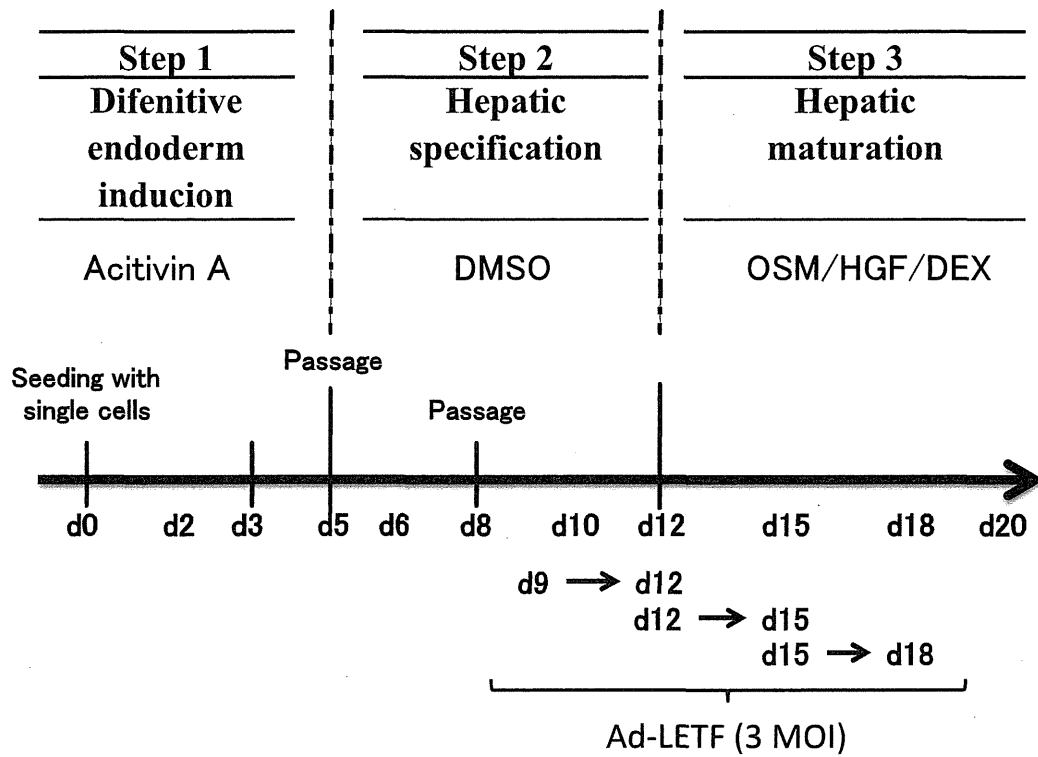


図1. iPS細胞の肝分化誘導およびAd-LETf感染プロトコール

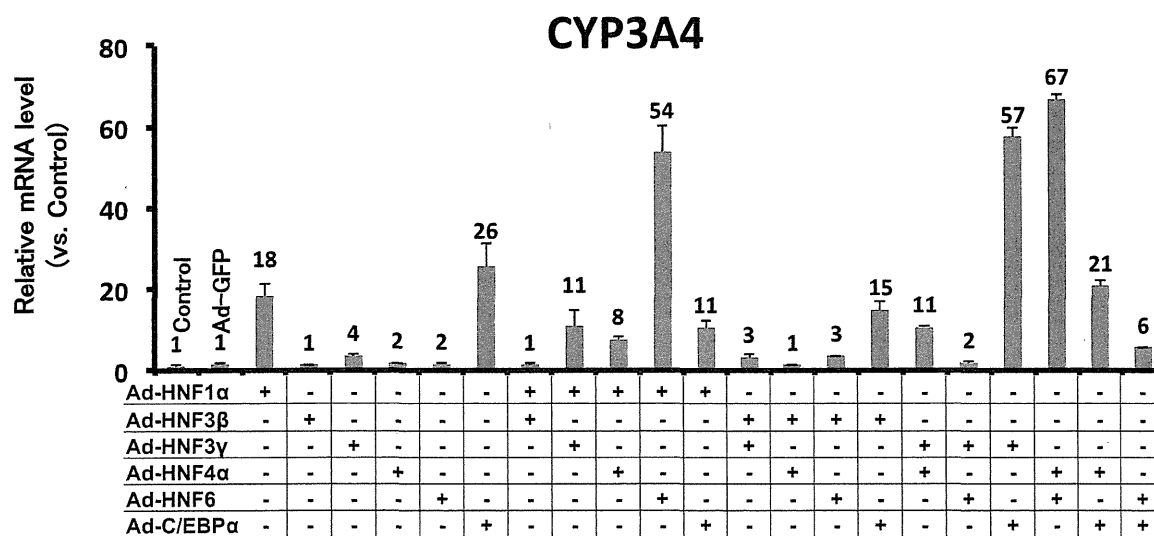
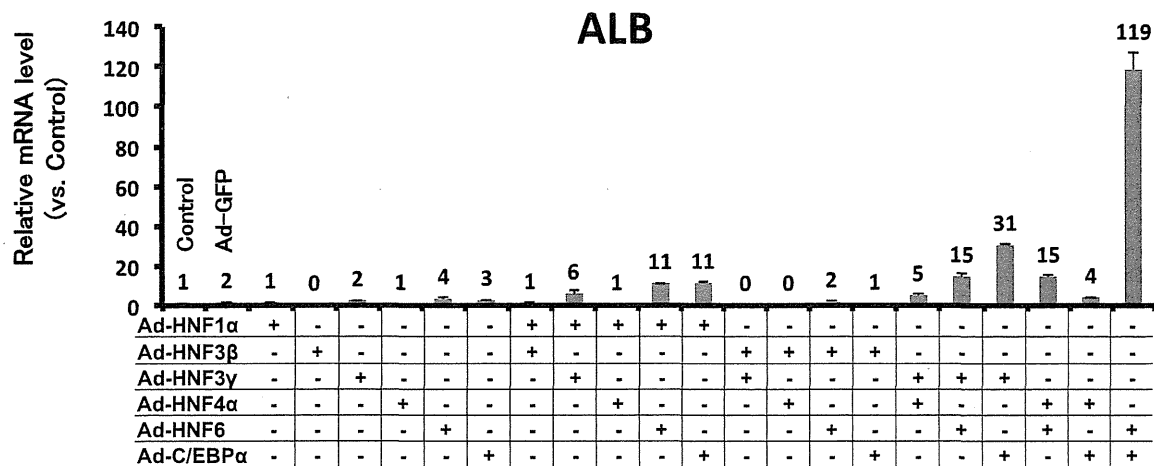


図2. HFL細胞におけるLETf導入によるALBおよびCYP3A4への影響

ALB

アデノウイルス感染時期
day 9→12 12→15 15→18

	day 9→12	12→15	15→18	
0.0	0.0	0.0	iPS細胞	
1.0	1.0	1.0	分化肝細胞	
3.7	3.2	0.7	GFP	
5.0	17	0.8	HNF1α	
0.9	2.7	1.7	HNF3β	
2.8	5.5	1.0	HNF3γ	
6.0	6.0	0.8	HNF4α	
4.0	26	0.9	HNF6	
4.2	28	2.4	C/EBPα	
0.4	14	0.0	HNF1α + HNF3β	
1.4	19	1.6	HNF1α + HNF3γ	
1.5	24	1.3	HNF1α + HNF4α	
0.4	33	1.6	HNF1α + HNF6	
5.0	58	2.9	HNF1α + C/EBPα	
1.5	0.9	1.4	HNF3β + HNF3γ	
1.7	1.7	6.8	HNF3β + HNF4α	
0.6	9.5	8.9	HNF3β + HNF6	
0.4	22	37	HNF3β + C/EBPα	
1.5	4.1	0.8	HNF3γ + HNF4α	
0.2	26	0.7	HNF3γ + HNF6	
1.4	26	3.1	HNF3γ + C/EBPα	
1.4	37	0.9	HNF4α + HNF6	
1.4	7.9	2.7	HNF4α + C/EBPα	
1.2	98	3.4	HNF6 + C/EBPα	

1 10

CYP3A4

アデノウイルス感染時期
day 9→12 12→15 15→18

	day 9→12	12→15	15→18	
0.0	0.2	0.1	iPS細胞	
1.0	1.0	1.0	分化肝細胞	
0.5	0.7	0.6	GFP	
5.3	2.4	2.6	HNF1α	
5.5	3.0	1.4	HNF3β	
2.2	2.2	0.9	HNF3γ	
1.7	1.9	1.5	HNF4α	
2.0	1.6	1.8	HNF6	
3.6	3.5	3.0	C/EBPα	
11	23	3.5	HNF1α + HNF3β	
5.0	6.9	2.4	HNF1α + HNF3γ	
3.0	2.3	3.3	HNF1α + HNF4α	
2.9	7.9	3.5	HNF1α + HNF6	
5.1	2.9	2.9	HNF1α + C/EBPα	
2.0	4.1	1.2	HNF3β + HNF3γ	
2.3	2.6	1.3	HNF3β + HNF4α	
1.9	5.3	2.0	HNF3β + HNF6	
7.2	6.1	3.0	HNF3β + C/EBPα	
1.4	1.3	1.1	HNF3γ + HNF4α	
2.0	3.5	1.6	HNF3γ + HNF6	
5.5	6.7	2.1	HNF3γ + C/EBPα	
1.8	1.3	1.2	HNF4α + HNF6	
5.1	4.2	7.0	HNF4α + C/EBPα	
3.0	3.5	2.7	HNF6 + C/EBPα	

1 10

図3. 肝分化iPS細胞におけるLETf導入によるALBおよびCYP3A4への影響

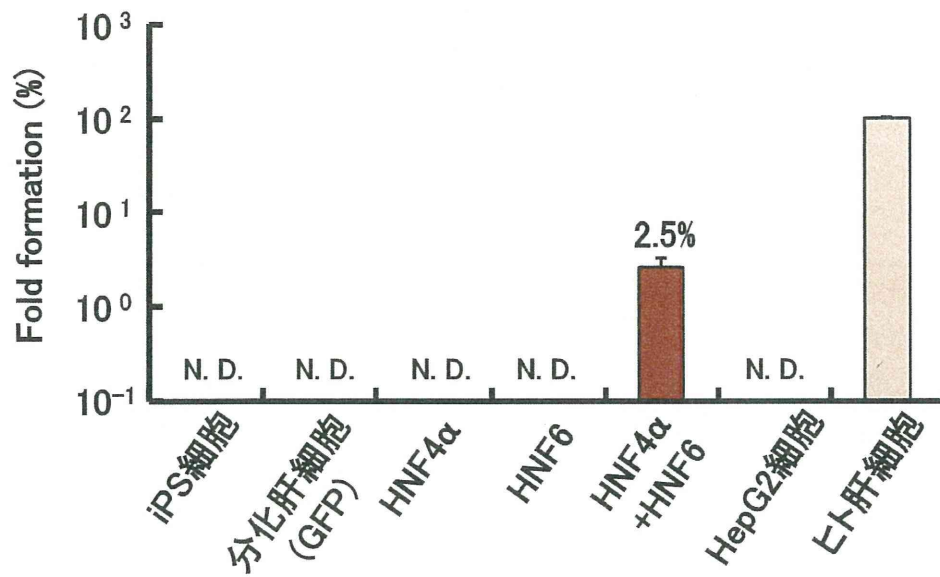


図4. 肝分化iPS細胞におけるLETf導入によるCYP3A4酵素活性への影響

研究分担報告書

健康食品使用実態調査で使用が確認された健康食品による酵素誘導調査

研究代表者 永田 清 東北薬科大学・教授

研究協力者 熊谷 健 東北薬科大学・講師

研究要旨：本研究では、健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目的に調剤薬局を対象に行った「健康食品使用実態アンケート調査」の結果から、使用が確認された健康食品のヒトにおける主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 に対する誘導能を検討した。健康食品 176 製品について CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、44 製品について製品間で差はあるもののレポーター活性の上昇が認められた（陽性率：25%）。特にダイエット系健康食品やウコン含有健康食品においてレポーター活性の顕著な上昇が認められた。また、176 健康食品中 35 製品について細胞数の減少が観察された。これらの結果より、ダイエット系健康食品やウコン含有健康食品の使用は、医薬品間との相互作用を惹起する可能性が示唆された。

A. 研究目的

いわゆる「健康食品」には法的な規制が無く、食品扱いであるため安全性や有効性が明確でない。中でも、健康食品の服用による医薬品との相互作用の可能性が強ク危惧されている。薬物相互作用は薬理的相互作用と薬物動態学的相互作用に大別されるが、薬物代謝酵素が関与する薬物相互作用の多くは薬物動態学的相互作用であり、中でもシトクロム P450 (CYP) をはじめとする薬物代謝酵素による代謝反応を介したものが多い。従って健康食品と医薬品との相互作用を予測し回避するためには、健康食品による薬物代謝酵素活性への影響評価を行うことが求められている。しかしながら、現在日本国内で入手可能な健康食品は相当数に上っていることから、これら健康食品の薬物代謝酵素活性への影響評価を行うにはまず健康食品の使用実態の把握が重要となる。このことから健康食品と医薬品における相互作用解明を目的に調剤薬局の来局患者を対象とした健康食品の使用実態に関するアンケート調査を行い、得られた約

1000 件のアンケート結果から約 243 製品の健康食品の使用が確認された。そこで本研究では、健康食品の使用実態アンケート調査で使用が確認された健康食品についてヒトにおける主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 に対する酵素誘導評価を行った。

B. 研究方法

実験材料

健康食品は、1日推奨使用量を 10 mL の H₂O 又は 70%EtOH 中で 37°C、2h 抽出後、遠心を行い、上清画分を健康食品抽出試料として用いた。細胞は、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞および CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (3-1-10 細胞) を用いた。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼ活性測定は Luciferase Assay System (プロメガ) を用いて測定を行った。すなわち、3-1-10 細胞を 48-well プレートに播種し、10% FBS-DMEM 中、37°C、5% CO₂ 存在

下で 24 時間培養後、健康食品抽出試料含有培地に交換、さらに 48 時間培養を行った。培養後、細胞を PBS で洗浄し、passive lysis buffer (PLB) を添加して細胞を溶解した。溶解液を遠心 (2,000 rpm、10 min、4°C) 後、上清 (20 μ l) を 96-well white plate に移し、各 well に luciferase assay reagent を加え Glomax⁹⁶ Microplate Luminometer (プロメガ) により測定を行った。測定値は細胞タンパク質量により補正し、結果は、薬物未処理群に対する薬物処理群の割合で示した。また評価は CYP3A4 を誘導することが知られている rifampicin (RIF) の 1 μ M 処理時におけるレポーター活性を 100% とした時の相対活性値を算出し、健康食品抽出試料の添加量に依存的で RIF 1 μ M 処理時のレポーター活性の 30%以上のレポーター活性を示した健康食品を CYP3A4 誘導活性有り と判定した。

細胞増殖への影響

細胞毒性は、健康食品添加培地で 48 時間後、光学顕微鏡下で形態観察を行い、細胞数の減少が観察された健康食品について影響有りと評価した。

C. 研究結果および考察

健康食品による CYP3A4 誘導能

健康食品の使用実態アンケート調査で使用が確認された健康食品 176 製品について CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、44 製品について製品間で差はあるもののレポーター活性の上昇が認められた (陽性率: 25%)。中でもすでに CYP3A4 を誘導することが知られているセントジョーンズワートの他、ダイエット系健康食品やウコン含有健康食品において臨床で使用されている医薬品で CYP3A4 を強く誘導することが明らかとなっている RIF (1 μ M) と同程度またはそれ以上の強いレポーター活性を示す製品が認められた (図 1) (図の中の ND は、細胞増殖抑制のために活性の測定ができなかった)。従って、市販されているこれら健康食品の服

用は、CYP3A4 を誘導し、薬物間相互作用を引き起こす可能性が示唆された。またマルチビタミン製品については、同様の効果を示す各社健康食品間でレポーター活性の上昇に差が認められたことから (図 2)、各社のマルチビタミン製品に含有される成分の種類や含有量などがレポーター活性の上昇に関与していることが考えられた。さらに抽出溶媒によるレポーター活性への影響を検討した結果、レポーター活性の上昇を示したほとんどの健康食品において 70% EtOH 抽出群の方が H₂O 抽出群に比べ強いレポーター活性を示したことから、健康食品に含有される CYP3A4 誘導成分の多くが脂溶性である可能性が考えられた。

以上の結果より、多くの健康食品が CYP3A4 を誘導することが示唆された。また健康食品による CYP3A4 誘導には、健康食品に含有する複数の成分が関与している可能性が示唆された。

健康食品による細胞増殖への影響

健康食品の細胞増殖への影響を顕微鏡下における形態学的観察で検討した結果、検討した 176 健康食品中 35 製品について細胞数の減少が観察された。

D. 結論

本研究の結果から、新たに CYP3A4 遺伝子発現を誘導する健康食品が認められ、特にダイエット系健康食品やウコン含有健康食品は CYP3A4 に対する強い誘導活性を示したことから、これら健康食品の使用によって医薬品間との相互作用を惹起する可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of *CYP3A4* in

hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.

Drug Metab. Pharmacokinet. In press.

2. 著書

1. 坂口修平、高橋昌悟、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしての TNF- α 誘導肝細胞死と酸化ストレス、エンドトキシン・自然免疫研究 15- 飛躍する自然免疫研究-、(筒井ひろこ、小谷穰治、谷 徹、横地高志 編集)、医学図書出版、東京、53-57、2012.

3. 学会発表

1. 熊谷 健、中澤洋一、野崎智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台) .

2. 小西麻美子、奥崎恭子、北畠知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原明美、鈴木 匡、松永民秀、頭金正博、細川正清、大森 栄、永田 清：健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2012 年 7 月 (福岡) .

3. 齋藤雄大、笠原 彩、中澤洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012 年 10 月 (青森) .

4. Sasaki T、Numata Y、Takahashi S、Kumagai T、Matsunaga T、Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development . International Symposium for Neurosciences 2013、February 2013 (仙台) .

5. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- α 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と HO-1 の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 (横浜) .

6. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清：健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 (横浜) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

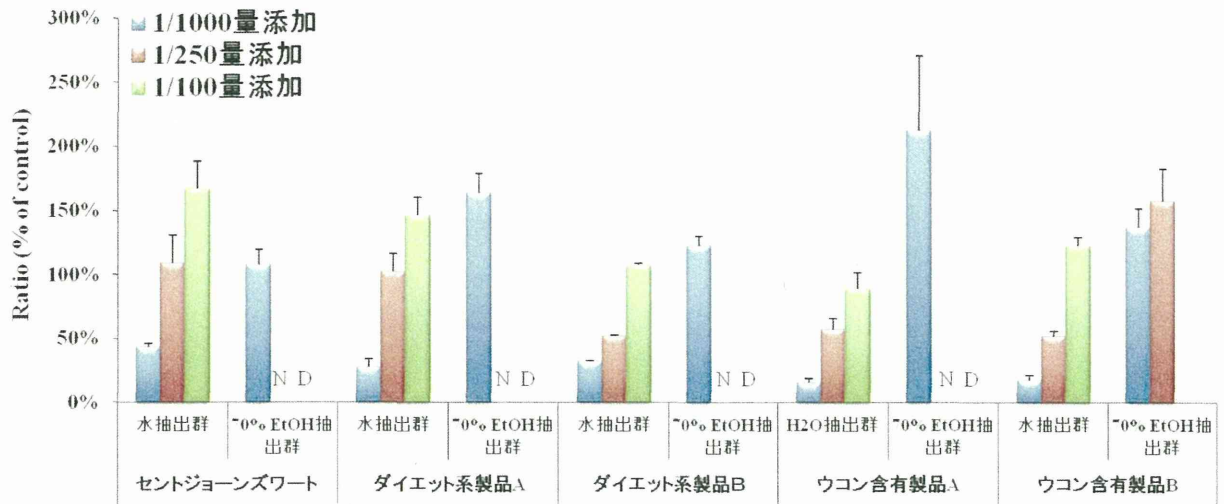


図1 RIF 1 μM と同程度の誘導活性を示した健康食品. 各健康食品抽出物添加群の結果は、RIF 1 μM 処理時のレポーター活性を 100%とした時の相対活性値として評価した.

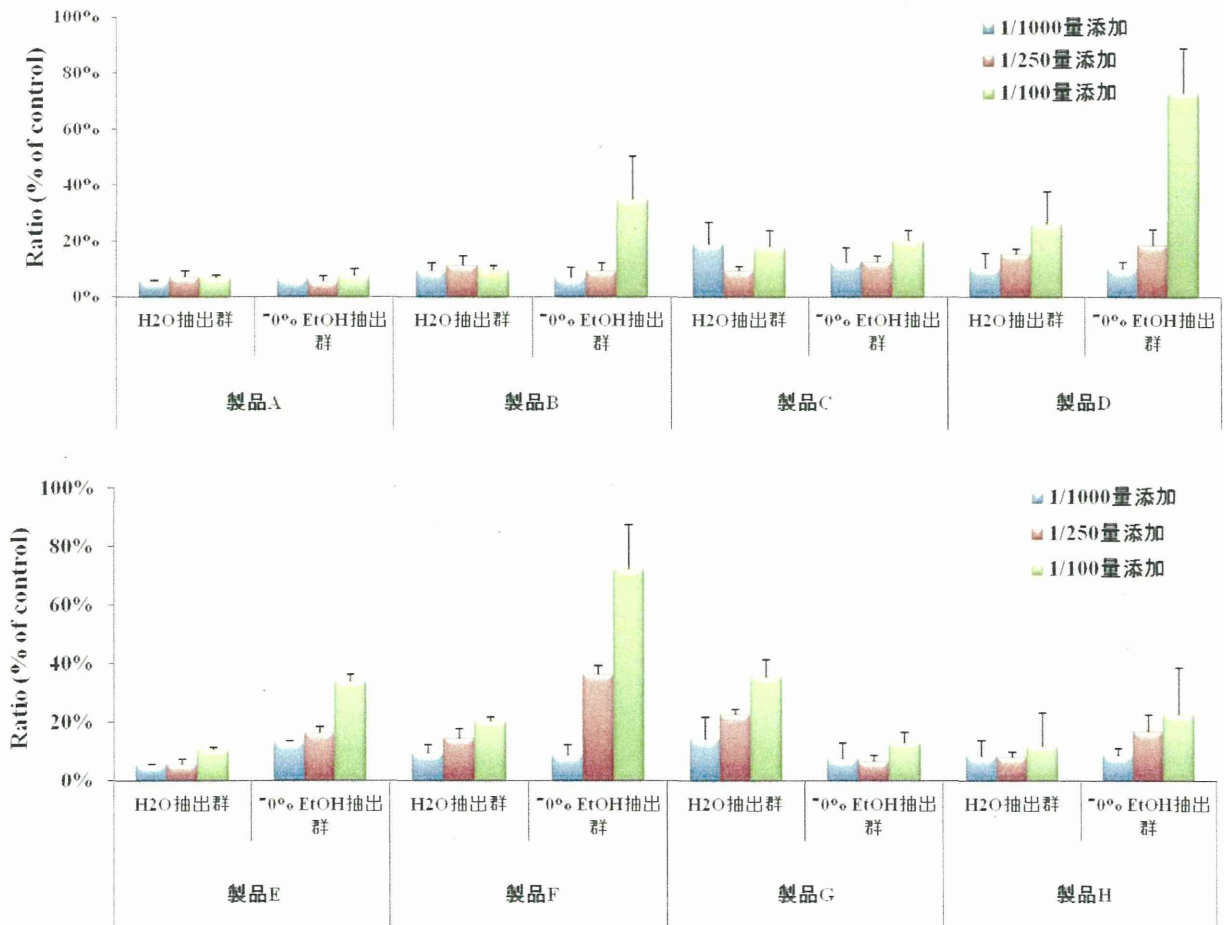


図2 マルチビタミン製品間による CYP3A4 誘導能の比較. 各健康食品抽出物添加群の結果は、RIF 1 μM 処理時のレポーター活性を 100%とした時の相対活性値として評価した.

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）

研究課題： いわゆる「健康食品」と医薬品との併用に関わる 安全性評価に関する研究

研究分担報告書

薬物代謝酵素誘導を介した薬物相互作用の評価

研究分担者 細川正清 千葉科学大学薬学部薬物動態学研究室

研究要旨：本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、昨年度は標準的なプロトコルの作成を行った。本年度はこの標準的なプロトコルに基づいて、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-10 細胞）に関しては、24 穴プレートに各々 1×10^5 cells/well で、CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞株）に関しては、24 穴プレートに各々 5×10^4 cells/well になるように播種し、24 時間後に健康食品を添加した。健康食品添加 48 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

A. 研究目的

本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、酵素誘導の標準的なプロトコルの作成を目的として検討を行うとともに、市販のサプリメントを用いて酵素誘導の有無を調べた。

B. 研究方法

細胞：本実験に用いた細胞は、東北薬科大学薬学部永田清教授より提供された CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-10 細胞）および、CYP1A1/1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞株）を用いた。

ルシフェラーゼアッセイ (CYP3A4)

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-10 細胞）を用いた場合、ルシフェラーゼアッセイは次のように行った。

3-1-10 細胞を 1×10^5 cells/well になる

よう 10%FBS-DMEM 中 (NEAA, pen-st) で調製し、24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。播種 24 時間後に、薬物の入った培地に交換することで、誘導剤および健康食品抽出液の曝露を開始した。薬物曝露 48 時間後に、培地を除去後 PBS で 2 回洗浄を行った後、1 xPBL を 0.1 mL/well それぞれ添加した。室温でプレートを 160 rpm で 30 分間振とうした後、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 x g、2 分間遠心を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20 μL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 μL を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turter designs, Sunnyvale, CA, USA) により測定した。

ルシフェラーゼアッセイ (CYP1A1)

CYP1A1/1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞）を用いた場合、ルシフェラーゼアッセイは次のように行った。

5-1 細胞を 5×10^4 cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中 (NEAA, pen-st) で調整し、24 穴プレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。播種 24 時間後に、薬物の入った培地に交換することで、誘導剤および健康食品抽出液の曝露を開始した。薬物曝露 48 時間後に、培地を除去後 PBS で 2 回洗浄を行った後、1 xPBL を 0.1 mL/well それぞれ添加した。室温でプレートを 160 rpm で 30 分間振とうした後、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 x g、2 分間遠心を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20 μL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 μL を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turter designs, Sunnyvale, CA, USA) により測定した。

タンパク定量法

タンパク定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとし、DC protein assay kit II (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。マイクロプレートに sample protein 5 μl 、A 試薬 25 μl 、B 試薬 200 μl を添加し室温で 15 分間静置した後、750 nm の吸光度を *Multispectro Microplate Reader VARIOSKAN* (Thermo Electron Corporation) を用いて測定した。

C. 研究結果および考察

1) 市販の健康食品を用いた酵素誘導の検討 (3-1-10 細胞)

ヒト CYP3A4 の応答配列を組み込んだ 3-1-10 細胞を用いて健康食品による酵素誘導を調べた結果、表 1 に示したように、51 種類の健康食品の中で酵素誘導効果が 2 倍以上のものは、36 種類あった。これは使用した健康食品の 70% となった。また、リファンピシンの酵素誘導を基準にして、酵

素誘導が 10 倍以上のものは、13 品種であり、これらの健康食品はリファンピシンと同様に薬物相互作用に注意する必要があると考えられた。

2) 市販の健康食品を用いた酵素誘導の検討 (5-1 細胞)

ヒト CYP1A1/1A2 の応答配列を組み込んだ 5-1 細胞を用いて健康食品に取る酵素誘導を調べた結果、表 2 に示したように、51 種類の健康食品の中で酵素誘導効果が 2 倍以上のものは、34 種類あった。これは使用した健康食品の 66.6% であった。また、オメプラゾールの酵素誘導を基準にして、酵素誘導が 8 倍以上のものは、9 品種であり、これらの健康食品は薬物相互作用を引き起こす可能性が示唆された。また、1) の結果と合わせて、4 種は、CYP3A4 と CYP1A1/1A2 を同時に誘導する可能性が示唆されており、薬物相互作用に注意が必要である。

E. 結論

本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、酵素誘導の標準的なプロトコールの作成を検討した結果、CYP3A4 と CYP1A1/1A2 の酵素誘導に関しては、標準的なプロトコールが完成した。この完成したプロトコールを用いて、市販の健康食品の中から、使用頻度が高いものを抽出し、酵素誘導を調べた結果、予想よりも多くの健康食品で酵素誘導が認められ、中にはセントジューズワートよりも酵素誘導能が高いものも認められた。これらの結果を踏まえて、今後は特に強く誘導された健康食品の成分の中で、酵素誘導の原因の成分を特定する必要があるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohda A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K. The effect of carboxylesterase 1 (CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 69、21-30 (2013)

2. Suzuki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K. Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase1 gene in an Asian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 735-736 (2013)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし