

## 食品中の化学物質および食品中の化学物質と医薬品との相互作用による 肝毒性ならびに発生毒性の新規評価系の構築

研究代表者 中村 和昭 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部実験薬理研究室長

### 研究要旨

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、ヒトを試験対象とした食品と医薬品との相互作用に対する実験的な検討は十分に行われていない。医薬品間の相互作用は代謝過程における相互作用が重要であり、そのほとんどが薬物代謝酵素チトクロム P450 (CYP)の阻害または誘導に起因する。食品中の化学物質と医薬品との相互作用も同様の機構と考えられるが、医薬品間の相互作用は処方時に留意されるのに対し、食品と医薬品との相互作用は消費者の食生活に依るところが大きく、日常生活において予期せずに生じる可能性が高い。服用された薬物は体内へ吸収された後、その90%以上が肝臓のCYPにより代謝されることから、食品中の化学物質によるCYP発現変動は、服用する医薬品の薬物動態を変化させ、副作用を増悪させる恐れがある。従って、食品中の化学物質による健康障害の予防の観点から、食品中の化学物質による肝機能の評価系が必要である。また、医薬品の妊婦への投与に関しては、催奇形性に関する過去の痛ましい事件を教訓として、処方時に留意され、医薬品の摂取に関する妊婦の意識も高いと考えられるが、食品中の化学物質の催奇形性等の発生毒性に関しては十分な検討もなされておらず、その安全性あるいは危険性についての情報は乏しい。本研究では、肝移植手術の際に生じる摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト初代肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独および医薬品との複合摂取による肝細胞毒性試験系の確立と、食品と医薬品の飲み合わせにおける食品の安全性評価系の構築を試みた。さらに、食品中の化学物質による胎児への影響を検討するためES細胞を用いたin vitro発生毒性試験法(EST法)および肝細胞毒性試験系とEST法との組み合わせによる、食品中の化学物質単独および医薬品との相互作用による胎児発育への影響について評価可能な新規試験系の構築を試みた。本研究の成果により食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独および医薬品との複合摂取による肝細胞毒性試験系ならびに発生毒性試験系の確立が可能であると考えられる。

### A. 研究目的

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、食品中の化学物質の発がん性等に関する動物や微生物等を用いた評価は行われているものの、ヒトを試験対象とした医薬品との相互作用の観点に基づいた実験的な検討は十分に行われていない。医

薬品間の相互作用は代謝過程における相互作用が重要であり、そのほとんどが薬物代謝酵素チトクロム P450 (CYP)の阻害または誘導に起因する。食品中の化学物質と医薬品との相互作用も同様の機構と考えられ、食品と医薬品の相互作用により有害事象を引き起こす代表的な例として、グレープフルーツジュースや西洋弟切草の摂取によるCYPの阻害・誘導作用による薬物動態

への影響が挙げられる。医薬品間の相互作用は処方時に留意されるのに対し、食品と医薬品との相互作用は消費者の食生活に依るところが大きく、日常生活において予期せず生じる可能性が高い。服用された薬物は体内へ吸収された後、その90%以上が肝臓のCYPにより代謝されることから、食品中の化学物質によるCYP発現変動は、服用する医薬品の薬物動態を変化させ、服用した医薬品の薬効を増減させ、あるいは副作用を増悪させる恐れがある。従って、食品中の化学物質による健康障害の予防の観点から、食品中の化学物質によるCYP発現への影響をはじめとする肝機能の評価系が必要である。

一方、妊婦における医薬品の摂取は、胎児への催奇形性の観点から処方時に留意されているが、食品中の化学物質による妊婦・胎児への影響については実験的な検証はほとんど行われておらず、また胎児への催奇形性が認められず安全だと考えられている医薬品においても、服用の際の食品の摂取状況によっては思わぬ有害事象が生じる可能性を否定できない。

上述の観点から、本研究では、肝移植手術の際に生じる余剰摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト新鮮肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独あるいは医薬品との複合摂取による肝細胞毒性試験系を検討し、食品と医薬品の飲み合わせにおける食品の安全性評価系の構築を試みる。さらに、食品中の化学物質による胎児

への影響を検討するため、ES細胞を用いた発生毒性試験法（EST法）および肝細胞毒性試験系とEST法との組み合わせによる、食品中の化学物質単独および医薬品との相互作用による胎児発生への影響について評価可能な新規発生毒性試験系の構築を試みる。これまでにヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質の安全性を評価する系は確立されておらず、本研究は新規の食品安全評価系の提案を念頭に、肝移植時に得られる摘出肝からの細胞単離に始まり胎児の発育における食品安全性の評価に至る一連の研究を遂行するものである。

## B. 研究方法

1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存

国立成育医療研究センター・病院臓器移植センター及び臨床研究センター先端医療開発室と連携し、肝移植時の摘出肝からの肝細胞の分離・保存を行った。

書面による同意あるいは保護者による代諾を頂いた提供者より、国立成育医療研究センターにて行われる小児生体肝移植手術の際生じる摘出肝組織（ドナー余剰肝組織及びレシピエント肝組織）のうち、移植術に用いずまた病理検査においても不要な廃棄予定の余剰肝組織を提供いただき、肝細胞の採取を行った。生体肝移植手術で摘出されたドナー肝組織は、手術室で執刀医が移植に必要な部位を確保した後の余剰廃棄部分を研究用として用いた。一方、摘出されたレシピエント肝組織

においては、病理検査に必要な処理をした後の廃棄予定の組織を研究用として用いた。提供された肝組織は、一部を凍結保存あるいは組織観察用に固定し、残りは肝細胞分離に用いた。

肝細胞単離に当たっては、肝組織切断面より門脈もしくは中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入後血管周囲とともにカニューレを結索することにより固定し、灌流路を確保した後、37℃保温条件下でコラゲナーゼ液にて20分間灌流し、組織構造を消化した。コラゲナーゼ液処理後、組織を分散し、ガーゼとナイロンメッシュにて濾過することにより大型の細胞塊を除去し、細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液を低速遠心し、実質細胞（肝細胞）分画と非実質細胞分画に分離した。

2) 食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立

1) により得た肝細胞あるいは市販の凍結肝細胞を  $2 \times 10^5$  個/ウェルにて24ウェルプレートへ播種し、肝細胞培地（HMB basal medium + HCM Bullet Kit; Lonza）にて4日間培養した。培地は毎日交換した。試験化学物質を添加し、さらに2日間培養を行った。試験化学物質は、薬物動態へ影響を与え、医薬品の薬効の増減・副作用発現に影響を及ぼす食品中の化学物質のモデル物質としてセントジョーンズワート（西洋弟切草）の活性成分であるヒペルフォリンやイチョウ葉エキス成分であるピロバリド、ギンコリド A、B、C を用いた。これら化学物質への暴露後、細胞から total RNA を抽出し、逆転写

反応により cDNA を得た。得られた cDNA を用いて、プローブ法による定量 PCR 法によりヒトにおいて主要な第 I 相薬物代謝酵素である CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 の発現変化を検討した。

3) 食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の確立

1) により得た肝細胞あるいは市販の凍結肝細胞を  $3.2 \times 10^4$  個/ウェルにて96ウェルプレートへ播種し、肝細胞様培地にて4日間培養した。ヒペルフォリン、ピロバリド、ギンコリド A、B、C を添加し、さらに2日間培養を行った。WST 法（同仁化学）により薬剤非添加条件時の値を100%とし、細胞生存率を求めた。

4) 食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立

ヒペルフォリンの発生毒性をマウス ES 細胞を用いた発生毒性試験法である Embryonic Stem Cell Test (EST 法) により検討した。ES 細胞および NIH/3T3 細胞を  $3.2 \times 10^4$  個/ウェルにて96ウェルプレートへ分化誘導培地（20%ウシ胎児血清、0.1mM 2-メルカプトエタノール、1%非必須アミノ酸、2mM L-グルタミンを含む DMEM 培地）により播種した。ヒペルフォリンを添加し、10日間培養した後、CellTiter-Glo assay (Promega) にて ES 細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を100%としたときの細胞生存率を求めた。また、ヒペルフォリン暴露条件下で hanging drop 法により ES

細胞の胚様体を作成し、10日間培養した後、ES細胞を回収した。回収したES細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、内胚葉、中胚葉および外胚葉分化マーカー遺伝子発現量を定量 PCR 法にて検討した。同様に、ピロバリド、ギンコリド A および C による ES 細胞への細胞毒性と ES 細胞の分化に与える影響を WST 法並びに定量 PCR 法にて検討した。

#### 5) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験

化学物質の肝臓による代謝産物に起因する発生毒性を検討するため、従来の EST 法を改良し、セルカルチャーインサートを用いて ES 細胞とヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 細胞およびヒト繊維芽細胞株 WI-38 細胞を非接触共培養する試験法 (Hep-EST 法) を構築し、バルプロ酸 (VPA) をモデル物質として、その肝代謝産物による発生毒性を検討した。

薬物代謝を担うヒト肝細胞として肝細胞株 HepG2 細胞、対照としてヒト繊維芽細胞 WI-38 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレート (Millipore) のフィルタートレイへ  $9 \times 10^3$  個/ウェル播種した。翌日、マウス ES 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ  $1.25 \times 10^3$  個/ウェル播種し、HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞とともに培養した。培地には VPA を添加し、3日目、5日目にそれぞれ同濃度の薬物添加培地で培地交換を行い、7日目に

CellTiter-Glo assay (Promega) にて ES 細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を 100% としたときの細胞生存率を求めた。同様に成熟細胞のモデルとして NIH/3T3 細胞と HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞との共培養を VPA 添加培地にて行い、7日目の NIH/3T3 細胞の細胞生存率を求めた。

また、ES 細胞分化に与える影響を検討するため、HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイへ  $9 \times 10^3$  個/ウェル播種した。翌日、マウス ES 細胞を EZ-BindShut II (IWAKI) へ 750 個/ウェル播種し、HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞を播種したミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイと組み合わせ、培養した。培地に VPA を添加し、3日目に同濃度の薬物添加培地で培地交換を行った。ES 細胞培養開始 4 日後に HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞をミリセル 24 セルカルチャーインサートプレート (Millipore) のフィルタートレイへ  $4.8 \times 10^4$  個/ウェルを播種しておき、5日目に EZ-BindShut II での培養により形成された ES 細胞の胚様体をミリセル 24 セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ 1 ウェルあたり 1 個移し、HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞を播種しておいたミリセル 24 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイとともに 10 日目まで培養を行い、ES 細胞を回収した。回収した ES 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合

成した。得られた cDNA を用いて、内胚葉、中胚葉および外胚葉分化マーカー遺伝子発現量を定量 PCR 法にて検討した。

#### 6) 食品中の化学物質との医薬品の相互作用による発生毒性試験

食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性を検討するため、上述の 5) の方法を用いて、VPA 並びにヒペルフォリンおよびギンコリド B との複合曝露による ES 細胞に対する細胞毒性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究実施においては、対象患者個人のプライバシーをはじめとした人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセントおよびアセント)の徹底を図っている。

採取された肝組織を本研究に用いることは、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会にて承認が得られている。本研究に用いている肝組織は国立成育医療研究センター病院臓器移植センターにおいて主治医から説明を受け同意を得た後に提供されたドナー余剰肝およびレシピエント摘出肝であり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。肝組織は国立成育医療研究センター病院にて匿名化された後に国立成育医療研究センター研究所に搬送され、肝組織の一部の保存と肝細胞分離の処理を行っている。国立成育医療研究センター研究所においては、連結可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れている。本研究は、平成 10 年厚生科学審議会答申が定める

「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」にも従い遂行した。なお、本研究は国立成育医療研究センター倫理委員会にて承認を得た以下の研究課題に基づいて実施している。

「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」(受付番号 385)

「ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究」(受付番号 396)

### C. 研究結果

#### 1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存

平成 24 年度、当センターにて施行した小児肝移植症例のうち、ドナー余剰肝ならびにレシピエント肝 41 例の肝検体より、肝組織の保存及び肝細胞の分離・培養・保存を行った。平成 25 年度には、32 例の肝検体より、肝組織の保存及び肝細胞の分離・培養・保存を行った。

#### 2) 食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立

本研究により単離を行った新鮮初代肝細胞ならびに市販ヒト凍結肝細胞を用いて、肝機能評価系の構築を行った。西洋弟切草の成分であるヒペルフォリンを用いた検討から、ヒペルフォリンによる CYP3A4 発現亢進作用が認められた。また、イチヨウ葉エキスの成分であるピロバリド、ギンコリド A、B、C の評価をおこない、ギンコリド B による CYP3A4 発現亢進を認めた。

### 3) 食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の確立

本研究により単離を行った新鮮初代肝細胞ならびに市販ヒト凍結肝細胞を用いて、肝細胞毒性評価系の構築を行った。ヒペルフォリン、ビロバリド、ギンコリド A、B、C は、いずれも健常成人由来肝細胞においては肝細胞毒性を示さなかった。一方、ヒペルフォリンは小児由来肝細胞において細胞毒性を示す可能性が考えられた。

### 4) 食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立

ヒペルフォリンによる発生毒性評価を発生毒性試験法である EST 法にて行った結果、ヒペルフォリンは胎児モデルである ES 細胞および成人モデルである繊維芽細胞に対して細胞生存率を減少させたが、繊維芽細胞に対してはアポトーシスを誘導し、一方、ES 細胞に対しては細胞周期を停止させることにより細胞生存率を減少させ、細胞種によってその作用が異なると考えられた。また、組織特異的遺伝子発現解析から、ヒペルフォリンは ES 細胞の分化を抑制すると考えられた。しかし、ヒペルフォリンの *in vitro* におけるこれらの効果は、想定される西洋弟切草摂取時のヒペルフォリン血中濃度に比べて相当に高濃度のヒペルフォリン添加により認められるものであり、通常考えられる摂取用量の西洋弟切草あるいはヒペルフォリンにおいて催奇形性は極めて低いものの、過剰摂取には留意する必要があると考えられた。

一方、ビロバリド、ギンコリド A、C

による ES 細胞に対する毒性を評価した結果、ギンコリド C においては、細胞毒性は認められなかったが、ビロバリドおよびギンコリド A 曝露において細胞毒性が認められ、ビロバリドにおいてはギンコリド A よりも強い細胞毒性が認められた。しかし、いずれもヒペルフォリンによる細胞毒性と比べ、その毒性は著しく低かった。また、ビロバリドおよびギンコリド A 曝露により ES 細胞分化誘導過程において、内胚葉マーカー遺伝子である TTR (transferrin) の発現低下が認められた。

### 5) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験

VPA の肝代謝産物による細胞毒性を検討するため、HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞との共培養による VPA 添加時の ES 細胞および NIH/3T3 細胞の細胞生存率を求めた。NIH/3T3 細胞において、HepG2 細胞との共培養では WI-38 細胞との共培養に比べ VPA の細胞毒性が増悪した。ES 細胞においても、VPA 添加により、HepG2 細胞との共培養では WI-38 細胞との共培養に比べ細胞毒性が増悪した。

VPA の肝代謝産物による ES 細胞分化に対する影響を評価するため、VPA 添加による ES 細胞での種々の組織特異的分化マーカー発現を Real-time PCR にて定量した。WI-38 細胞との共培養時には、未分化マーカーである Oct3/4 および Sox2 発現は、VPA 濃度依存的に発現が上昇した。一方、HepG2 細胞との共培養時には WI-38 細胞との共培養

時に比べ VPA の未分化マーカー発現上昇が抑制された。外胚葉マーカーである Synaptophysin (Syn; 後期神経特異的マーカー) および Olig2 (オリゴデンドロサイトマーカー) 発現は、WI-38 細胞との共培養と HepG2 との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。同様に、内胚葉マーカーである GATA-binding factor 6 (GATA6) および Albumin (Alb) 発現は、WI-38 細胞との共培養と HepG2 との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。一方、中胚葉マーカーである bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) および natriuretic peptide A (ANF) 発現は、VPA 添加時に WI-38 細胞との共培養に比べ HepG2 との共培養により有意な発現の上昇が見られた。

6) 食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性試験

VPA 並びにヒペルフォリンおよびギンコリド B との複合曝露による ES 細胞に対する細胞毒性を検討した結果、ES 細胞と HepG2 細胞との共培養においては、いずれの複合曝露においても、WI-38 細胞との共培養と比べ細胞毒性の増悪は認められなかった。

#### D. 考察

本研究「2) 食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立」の成果より、ヒト初代培養肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立が見込まれ、本評価系を他の化学物質へ応用することで、食品中の化学物質による肝機能への影響

評価法の構築が可能であると考えられる。

また、本研究「3) 食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の確立」の成果より、食品中の化学物質による肝細胞毒性評価法の確立が見込まれる。本評価系を他の化学物質へ応用することで、食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の構築が可能であると考えられる。

さらに、本研究「4) 食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立」および「5) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験」の成果を進展させ、予測精度の高い発生毒性試験法の構築が可能と考えられる。

#### E. 結論

本研究の成果により食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独あるいは医薬品との併用による肝細胞毒性試験系ならびに発生毒性試験系の確立が可能であると考えられ、今後これら試験系を進展・活用・提供し、食品の安全性確保の一助としていきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living

donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. *Liver Transplantation*. 2014 20, 391-393.

(2) Nakamura K\*, Aizawa K, Yamauchi J, Tanoue A. \*; corresponding author. Hyperforin inhibits cell growth and differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 2013 46, 529-537.

(3) Nakamura K\*, Aizawa K, Nakabayashi K, Kato N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. \*; corresponding author. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLOS ONE*, 2013 8, e54036.

(4) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、山内淳司、田上昭人. 肝薬物代謝を考慮した Embryonic Stem Cell Test (EST 法) の検討. *日本小児臨床薬理学雑誌* 2012 25, 1, 77-82.

(5) 今井弘一、中村和昭、田上昭人. 代謝活性因子を含めた *in vitro* 発生毒性評価法の開発. *Journal of Bio-Integration(バイオインテグレーション学会誌)* 2012 2, 1, 91-96.

## 2. 学会発表

(1) 中村和昭、相澤和子、堀尚子、田上昭人、肝代謝活性を考慮した *in vitro* 発生毒性試験法の検討、日本動物実験代替法学会第 26 回大会(ポスター発表) 2013 年 12 月・京都

(2) 中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンのヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍活性、第 36 回日本分子生物学会年会(ポスター発表) 2013 年 12 月・神戸

(3) 中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンによるヒト肝細胞癌に対する細胞毒性、第 40 回日本毒性学会学術年会(口頭発表) 2013 年 6 月・幕張

(4) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、今井弘一、田上昭人: 細胞毒性発現機序を考慮した Embryonic Stem Cell Test (EST 法) による発生毒性評価、日本動物実験代替法学会第 25 回大会(口頭発表) 2012 年 12 月・東京

(5) 今井弘一、武田昭二、中村和昭、田上昭人、ヒト肝細胞とマウス ES 細胞のハイブリッド培養による *in vitro* 発生毒性試験法の開発、日本動物実験代替法学会第 25 回大会(口頭発表) 2012 年 12 月・東京

(6) 中村和昭、田上昭人、マウス胚性幹細胞を利用した hyperforin の発生毒性評価、第 39 回日本小児臨床薬理学会学術集会(口頭発表) 2012 年 10 月・東京

(7) Imai K, Watari F, Nakamura K, Tanoue A. Study of the C60 Fullerene on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. 24th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine. (ポスター発表) 2013 年 10 月・Fukuoka.

(8) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、



田上昭人、Hyperforin のマウス胚性幹細胞および繊維芽細胞に対する影響、日本動物学会第 83 回大阪大会( 口頭発表 )、2012 年 9 月・大阪  
(9) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、田上昭人、薬物肝代謝産物の評価が可能な Embryonic Stem Cell Test (EST 法)の検討、第 39 回日本毒性学会学術年会 ( 口頭発表 )、2012 年 7 月・仙台  
(10) 中村和昭、田上昭人、薬物肝代謝産物の評価が可能な Embryonic Stem Cell Test (EST 法)の検討、日本組織培養学会 第 85 回大会 ( 口頭発表 )

2012 年 5 月・京都

(11) 今井弘一、武田昭二、中村和昭、田上昭人、マウス ES 細胞とヒト肝細胞のハイブリッド培養による新しい in vitro 発生毒性試験システムの開発、第 59 回日本歯科理工学会( 口頭発表 )、2012 年 4 月・徳島

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし