

医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての 動物モデルに関する研究

研究分担者 安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨:

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール19Sと同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感作性や影響要因の詳細に関する解析を進めることにより、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

協力研究者

酒井 信夫、中村 里香、手島 玲子

(国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部)

A. 研究目的

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質あるいはその分解物が配合されているものがある。薬事法上、医薬部外品等は人体に対する作用が緩和であり、その使用による健康被害が起きた場合でも、人体に対してそれ程重大な影響は与えないと考えられてきた。しかし最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物(グルパール19S)を含有する洗顔石鹸(茶のしずく石鹸:医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となっている。この事例においては、洗顔の際に、経皮的あるいは経粘膜的(眼や鼻の粘膜を介する)に石鹸中の小麦タンパク質加水分解物が体内に吸収されて感作され、小麦を使用した食品を摂取した際に小麦に対する食物アレルギーの症状が

現れたものと考えられている。本研究では、タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因がこの経皮感作性に与える影響について解析することを目的とし、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、加水分解コラーゲンの経皮感作性、及び、グルパール19Sとは異なる調製方法であるアルカリ加水分解により調製した小麦タンパク質加水分解物の感作性について検討した。

B. 研究方法

抗原懸濁液の調製

グルパール19Sは株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma G5004)およびグルパール19S粉末を100 mg/mLとなるよう1M Tris(pH 11.4)に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製した。経皮感作には、ストック溶液をPBSで10倍希釈し、pHを8付近に調整したものを用いた。

加水分解コラーゲン9試料(A~I)は日本化粧品工業連合会を通じて入手した。試料をTable 1に示す。ウシ由来コラーゲン(BC; Sigma C9879)、

ウシ由来ゼラチン(BG; シグマアルドリッチジャパン 12-0230-5)、魚由来コラーゲン(FC; 井原水産)、魚由来ゼラチン(FG; Sigma G7041)、ウシ由来コラーゲンペプチド酸分解品(J; 和光純薬 032-15791)、及びウシ由来コラーゲンペプチド酵素分解品(K; 和光純薬 035-15801)は試薬標準品を購入した。これらの試料は終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。Fig. 1 に加水分解コラーゲンの SDS-PAGE パターンを示す。

アルカリ加水分解グルテンについては、グルテンのストック懸濁液に 1M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を約 12 に調整し、100 のヒートブロック上で、0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間加熱した。所定の時間経過後、1N 塩酸を加えて中和し加水分解を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1M 水酸化ナトリウムを予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。Fig. 2 にアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを示す。

マウスを用いた経皮感作実験

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 群中の匹数は 5-8 匹とした。8 週齢時に背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間抗原懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った(Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原懸濁液(500 μ g protein)を浸潤させて貼付した。パッチテスターの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3 日間の感作後にパッチを外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4 日間の感作後、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応

の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg/100 μ L を腹腔内投与(i.p.)して行った。i.p.後 30 分間、マウスの直腸内体温の測定を行った。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 2 の基準に従ってスコアリングした。惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

【実験 1-1/1-2】加水分解コラーゲンの経皮感作性に関する検討

感作抗原は Table 3 に、感作スケジュールは Fig. 3 に示す。加水分解コラーゲンの経皮感作性を評価するため、陽性コントロールにグルパール 19S(19S)を、陰性コントロールには PBS(V)を使用した。【実験 1-1】の感作検体には、19S、V に加え、ウシ由来コラーゲン(BC)、ウシ由来ゼラチン(BG)の試薬標準品、ウシ由来ゼラチン加水分解物 2 種(A, B)、ブタ由来ゼラチン加水分解物 2 種(C, D)を用いた。【実験 1-2】は 19S、V に加え、魚由来コラーゲン(FC)、魚由来ゼラチン(FG)の試薬標準品、ティラピア由来コラーゲン及びゼラチン加水分解物(F, G)、サケ由来加水分解物(H, I)を用いた。全ての感作検体にはラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度 0.5%で添加し、1 回の感作抗原量は 500 μ g proteinとした。1 群の設定匹数を 5 匹として経皮感作性及びアナフィラキシー誘導能を評価した。

【実験 2】アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

感作抗原は Table 3 に、感作スケジュールは Fig. 3 に示した。グルテンのアルカリ加水分解は上述のとおりに行った。加水分解時間を変化させたアルカリ加水分解グルテンに SDS を終濃度 0.5%となるように添加し、貼付抗原とした。1 群の設定匹数を 8 匹として、未分解グルテン(AIk0h)、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示した 0.5 時間加水分解グルテン(AIk0.5h)、および加水分解が進み、SDS-PAGE で 30kDa 以上のタンパク質バンドがほぼ消失している 12 時間加水分解グルテン(AIk12h)の経皮感作性を検討した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、IBM SPSS Statistics ソフトウェアを用いて V 群を基準とした Dunnett の検定および各群間の Tukey の多重検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

マウスへの経皮感作、採血においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の利用規定に従った。本実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

【実験 1-1/1-2】加水分解コラーゲンの経皮感作性に関する検討

加水分解コラーゲンの経皮感作性について検討を行った。Fig. 4-1 には、感作 4 週後のマウス血清中の抗原特異的抗体価についての検討結果を示す。A、B はそれぞれ抗原特異的 IgE 及び IgG1 についての検討結果を示している。グルパール 19S 感作群(19S)では昨年度の研究結果と同様に、血清中グルパール 19S 特異的 IgE、IgG1 が Vehicle 群 (V) と比較して有意に増加した(いずれも $p < 0.001$)。他方、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群(BC, BG, FC, FG, A~D, 及び F~I)では V 群と比較して血清中抗原特異的 IgE、IgG1 の増加は認められなかった。

Fig. 4-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー(能動的全身性アナフィラキシー)反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し(3.1 ± 2.2 、 4.2 ± 1.4)、V 群と比較して有意差が認められた(いずれも $p < 0.001$)。一方、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では体温低下は認められなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒ

スタミン濃度が大きく上昇していた。体温低下が認められなかったコラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では、ヒスタミン濃度についても上昇が認められなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果である。19S 群では平均 3.0 と高いスコアであったのに対し、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では平均 1.0 以下と低いスコアであった。

【実験 2】アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

本実験に供したアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを Fig. 2 に示す。アルカリ加水分解 0.5 時間においてグルパール 19S と同等の泳動位置に広範囲のスメアなバンドが観察された。この SDS-PAGE パターンを基に、未分解グルテン(AIk0h)、0.5 時間加水分解物(AIk0.5h)及びほぼ 30kDa 以下にまで分解されている 12 時間加水分解物(AIk12h)を検体とし、マウスに対する経皮感作性を検討した。

Fig. 5-1A には血清中抗原特異的 IgE、B には IgG1 の測定結果を示す。19S 群、Alk0h 群、Alk0.5h 群は V 群と比較して抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の有意な増加が認められた(いずれも $p < 0.001$)。一方、Alk12h 群では V 群との間に有意差は見られなかった。

Fig. 5-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー(能動的全身性アナフィラキシー)反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し(4.6 ± 1.1)、V 群と比較して有意差が認められた($p < 0.001$)。Alk0h 群及び Alk0.5h 群では、19S 群には及ばないものの、それぞれ 2.3 ± 1.6 、 3.5 ± 1.4 の体温低下が観察され、V 群と比較して有意差が認められた($p < 0.001$)。一方 Alk12h 群における体温低下は 0.6 ± 1.3 であり、V 群との間に有意差は見られなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。また Alk0h 群、

AIk0.5h 群においても同様に血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。AIk12h 群ではこのような大きな濃度上昇は見られず、V 群との間に有意差は認められなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果である。19S 群及び AIk0.5h 群は平均 3.4 と高いスコアであった。AIk0h 群では 2.0 と中程度のスコアであった。一方 AIk12h 群では 1.4 と低いスコアであった。

D. 考察

我々はこれまでに、茶のしずく石鹸の使用とコムギ摂取によるアレルギーの因果関係を検討するため、マウスを用いた経皮感作性試験を行ってきた。その結果、マウスの皮膚にグルパール 19S を浸潤させたパッチを貼付するという感作を 4 回 (4 週) 繰り返すことにより経皮感作が成立し、その後の抗原の腹腔内投与によりアレルギー症状 (アナフィラキシー) を惹起することが可能であることを示した。これらの研究結果は、食物由来タンパク質による感作が経皮的に起こりうるという他のグループの報告とも矛盾しない。

本年度は、加水分解コムギと同様に、医薬部外品・化粧品に含有されるタンパク質加水分解物のひとつであり、原材料として含有される製品の市場規模が比較的大きいと考えられる「加水分解コラーゲン」に着目し、経皮感作性の検討を行った (【実験 1-1/1-2】)。また、昨年度はアルカリ加水分解グルテンの経皮感作性について検討し、アルカリ条件下で加水分解した場合には経皮感作性を示さないことを報告したが、今年度においては念のため 1 群のマウス個体数を増やして追試を行った (【実験 2】)。

コラーゲンは皮膚 (真皮)、靭帯、腱、骨、軟骨等を構成するタンパク質の 1 種である。数種のタイプがあるが、脊椎動物で最も多く存在するのは I 型コラーゲンであり、真皮や骨に多く含まれている。生体内では分子量 10 万程度のポリペプチド 3 本がらせん構造を形成しており、不溶性の

繊維状タンパク質である。ゼラチンは、熱によりコラーゲンのらせん構造を解離させ、変性したコラーゲン分子として可溶性にしたものである。コラーゲン (ゼラチン) は食物アレルギーを引き起こすアレルゲンタンパク質であることが知られている。

【実験 1】に供した加水分解コラーゲン 9 試料 (A~I) は、日本化粧品工業連合会を通じて入手した原料 (溶液) である。Table 1 には試料添付文書に記載された分子量を示す。また Fig. 1 には SDS-PAGE パターンを示す。通常の SDS-PAGE で分子量数千 Da 程度のポリペプチドを分離・検出することは困難であるため、Table 1 に示された分子量のバンドは検出されていないが、それぞれの検体について分子量数万 Da 程度のより高分子領域の成分が検出されている。検体 B、D、F では他の検体と比較して添付文書に記載された分子量が大きい。これら 3 検体は Fig. 1 においても高分子領域に濃いスメアなバンドが確認されている。

本研究では加水分解コラーゲンの基原を「哺乳動物」と「魚類」に分け、2 つの独立した動物実験 (【実験 1-1】及び【実験 1-2】) を行った。その結果、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲンではいずれも経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーについても誘導されなかった。原因としては、コラーゲンの抗原性 (グルパール 19S の原料である小麦タンパク質と比較して弱い可能性) や皮膚透過性の違い等が考えられる。また、コラーゲンの主な抗原部位は分子の末端部分 (テロペプチド) に存在していることが知られている。酵素処理によりこのテロペプチドを切断し抗原性を低下させたものがアテロコラーゲンであり、医療用材料や化粧品等にコラーゲンが使用される際、実際にはこのアテロコラーゲンが使用されている場合がある。本研究に用いた加水分解コラーゲン検体がアテロコラーゲン由来であった場合には、感作性が見られなかったという結果は妥当なものと考えられる。更に、加水分解による低分子化の程度についても抗原性の

重要な因子であると考えられることから、今後 SDS-PAGE だけでなくゲル濾過クロマトグラフィー等で確認することが重要と考えられた。

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質の加水分解物が配合されているものがある。医薬部外品原料規格 2006 によれば加水分解コムギ末、加水分解コラーゲン末以外にも、加水分解カゼイン、加水分解コンキオリン液、加水分解シルク末、加水分解卵白等、基原となるタンパク質に抗原性があることが既に知られているもの、あるいは疑われるものも数種存在する。これらのタンパク質加水分解物の経皮・経粘膜的な感作性についても今後検討を重ねることが必要であろう。

【実験 2】においては、アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関して、1 群のマウス個体数を 8 匹に増やし、昨年度の追試を行った。

Fig. 2 の SDS-PAGE パターンでは、アルカリ加水分解 0.5 時間においてグルパール 19S と同等の泳動位置にバンドが観察され、アルカリ加水分解の進行に伴い広くスミアなバンドが低分子領域に移動しており、昨年度の結果とよく一致している。Alk0h、Alk0.5h、Alk12h の経皮感作性について検討を行った結果、Alk0.5h はグルパール 19S と同程度の経皮感作性を示し、能動的全身性アナフィラキシーの誘導実験においてもグルパール 19S と同程度の反応が見られた。Alk0h ではグルパール 19S より程度はやや弱い、感作性及びアナフィラキシー反応が見られた。一方 Alk12h では感作性、アナフィラキシー反応とも V 群との間に有意差は認められなかった。昨年度行った試験では、Alk0.5h では経皮感作性は見られず、今年度の結果と一致していないが、今年度の試験では 1 群あたりのマウス匹数を昨年度よりも多く設定しており、今年度の試験結果の方が信頼性が高い。従って、グルテンの 0.5 時間アルカリ加水分解物も、グルパール 19S や 0.5 時間酸加水分解物と同様に、経皮感作性を示すと考えてよいだろう。

タンパク質加水分解の処理方法としては一般的に酸性条件、アルカリ性条件、酵素的条件等が考えられる。これらの加水分解条件の反応機構とそれに付随する構成アミノ酸置換(脱アミド反応)が経皮感作成立に及ぼす影響について、今後更に詳細な検討を加えることが急務と考えられる。

E. 結論

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール 19S と同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感作性や影響要因の詳細に関する解析を進めることにより、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

(参考文献)

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 127 (2): 531-533.
- 2) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1067-75.
- 3) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv Mice.

Allergol Int 2006; 55: 43-48.

4) Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. J Food Sci 2007; 72(2): 103-107.

5) Bouchez-Mahiout I, Pecquet C, Kerre S, Snégaroff J, Raison-Peyron N, Laurière M. High Molecular Weight Entities in Industrial Wheat Protein Hydrolysates Are Immunoreactive with IgE from Allergic Patients. J Agric Food Chem 2010; 58: 4207-4215.

6) Laurière M, Pecquet C, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Bayrou O, Raison-Peyron N, Vigan M. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. Contact Dermatitis 2006; 54: 283-289.

7) Laurière M, Pecquet C, Boulenc É, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Choudat D, Raison-Peyron N, Vigan M, Branlard G. Genetic differences in omega-gliadins involved in two different immediate food hypersensitivities to wheat. Allergy 2007; 62: 890-896.

8) Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R, Sawada J, Maitani T. Profile Analysis and Immunoglobulin E Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. Int Arch Allergy Immunol 2006; 140: 36-42.

9) Strid J, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type 1 (Th1) to Th2-type responses. Immunology 2006; 119: 27-35

10) Strid J, Hourihane J, Kimbert I, Callrd R, Strobel S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. Clin Exp Allergy 2005; 35: 757-66.

11) Wang YH, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand and interleukin-25 in

allergic responses. Clin Exp Allergy 2009; 39: 798-806.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2013; 132; 1436-1438.

2) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. Clinical Immunology & Allergology 2013; 59, 598-602.

2) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. Clinical Immunology & Allergology 2013; 59, 598-602.

2. 学会発表

1)安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小麦タンパク質経皮感作能への酸加水分解の効果に関するマウスモデル実験系を用いた検討 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013. 5)

2)中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、小麦グルテンはトランスグルタミナーゼ処理により酸加水分解小麦と同様のIgE反応性を獲得する 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013. 5)

3)中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、齋藤嘉朗、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、酸加水分解コムギ特異的的患者血清IgEはトランスグルタミナーゼ処理小麦グルテンと交差反応する 第20回日本免疫毒性学会学術大会 (2013. 9)

4)曹永晩、安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小川久美子、BALB/cマウスにおける酸加水分解コムギタンパク質による経皮感作に関する免疫学的及び病理組織学

的解析 第 20 回日本免疫毒性学会学術大会
(2013. 9)

5) 酒井信夫、中村里香、齋島由二、福井千恵、鈴木孝昌、中村亮介、蜂須賀暁子、安達玲子、手島玲子、加水分解小麦(グルパール 19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013. 11)

6) 佐々木和実、西嶋桂子、安宅花子、酒井信夫、手島玲子、小麦グルテンの酸加水分解時間による分子量分布・脱アミド化率の変化 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 (2013. 11)

7) 中村亮介、中村政志、矢上晶子、酒井信夫、中村里香、安達玲子、齋藤嘉朗、相原道子、秀道広、千貫祐子、森田栄伸、松永佳世子、手島玲子、加水分解コムギ感作血清中 IgE の EXiLE 法による検出とその有用性評価 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013. 11)

8) 手島玲子、中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、加水分解小麦による小麦アレルギー発症の基礎的検討 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013. 11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし