

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 （課題番号：22KD1002）
 令和4-6年度総括総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトに対する予測性や外挿性に課題がある。動物試験の 3Rs 原則の観点からも、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験、カテゴリーアプローチ等を用いた *in silico* 予測の活用が期待される。2023年に発表された OECD の発達神経毒性（DNT）*in vitro* testing battery（DNT-IVB）ガイダンスには 17 種類の *in vitro* 試験法がリストされている。その一つにラット神経細胞を用いた多点電極アレイ（MEA）システムによる評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクス の反映、ヒトの予測性が課題である。また DNT-IVB の段階的なアプローチにおいて Tier0 に *computational approach* が記載されているが、具体的な *in silico* 手法は検証されていない。従って、ヒトにおける化学物質のハザードやリスク評価には、化学物質の構造情報とヒト細胞により DNT を統合的に評価する必要がある。

本研究では、キネティクスを考慮した神経毒性評価のため、血液脳関門（BBB）と神経細胞をマイクロ流路により連結した生体模倣システムを新たに構築し、灌流下で MEA 計測が可能であることを明らかにした。MEA のエンドポイントに関して、独自の MEA パラメータを用いた AI モデルにより精度良く神経毒性予測を行えること、神経毒性の作用機序ごとのグループ分けが可能であることを見出した。実験の再現性を確保するため、神経細胞画像からの特徴量抽出手法を確立し、AI モデル構築へ向け MEA パラメータと関連する特徴量を見出した。より生理的なモデルとしてヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドについても検討を行い、高密度電極 MEA により長期に安定したネットワーク活動計測が行えることを明らかにした。

化学構造情報を用いた *in silico* 手法に関しては、分子記述子によるクラスタリングで神経毒性を示す物質がグループ化されることを見出した。またリードアクロスにおいて、比較する類似物質数や類似度の閾値の適切な設定、構造類似度による陽性・陰性情報の重みづけ、*in silico* 生物活性予測の活用により予測性を向上できることが示唆された。

さらに *in vitro* と *in vivo* の橋渡しを考慮するうえで、フッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドのラット DNT 試験を実施した。海馬における神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性上昇が発達神経毒性を引き起こすメカニズムが示唆され、このような毒性をメカニズムベースに検出する *in vitro* 試験系の重要性が示唆された。

これらの成果は欧米やアジアの動物実験代替法関連学会、OECD の DNT ワークショップなど関連学会・会議で発表した。また、OECD の *in vitro* DNT ガイダンスの意見募集に対しコメントを提出し OECD・DNT 専門家会議などで DNT-IVB ガイダンスの作成や改訂に向けて意見交換を実施した。

以上のように、班全体で連携しながら統合的に DNT を評価可能なシステムの開発を進め、DNT 専門家会議や国内外の関連団体との連携のもと、新規 *in vitro* および *in silico* 手法の検証を行い、国際発信を行った。

研究分担者：諫田 泰成
 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

研究分担者：松永 民秀
 名古屋市立大学医薬学総合研究院（薬学）教授

研究分担者：鈴木 郁郎
 東北工業大学 大学院工学研究科 電気工学専攻・教授

研究分担者：加藤 竜司
 名古屋大学大学院 創薬科学研究科 准教授

研究分担者：渋谷 淳
 国立大学法人東京農工大学 大学院・農学研究院・教授

研究分担者：吉成 浩一
 静岡県立大学 薬学部 教授

研究分担者：小島 肇
 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における 3Rs の観点からも、オルガノイド等ヒト生体環境に近い in vitro 評価系や、コンピューターを活用した in silico 予測手法の開発が望まれる。

OECD の発達神経毒性 in vitro testing battery (DNT-IVB) ガイダンスに培養神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる評価法が記載されているが、ヒトの予測性や実験の再現性、キネティクスの反映が課題である。また DNT-IVB の段階的アプローチにおいて Tier 0 に computational approach が記載されているが、具体的な in silico 手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造に基づく in silico 予測と in vitro 神経毒性を統合的に評価する必要がある。

本研究は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞および脳オルガノイドを用いた精度の高い in vitro 毒性評価法の開発、及び in vitro と in silico 手法の統合による in vivo 神経毒性予測の精度向上を目的とする。

この目的のため、in vitro 評価系の開発として、血液脳関門 (BBB) を統合した MEA システムの開発、細胞画像の AI 解析による in vitro 系の品質評価法、MEA データの AI モデルによる解析手法、ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドを用いた神経毒性評価系樹立のための MEA 計測手法を進めた。

また in silico 手法として分子記述子による化学物質のグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性予測手法の開発を進めるとともに、In silico および in vitro 手法による in vivo 発達神経毒性の予測性向上のため、発達神経毒性情報が不足する物質の in vivo 毒性評価を進めた。

さらに、研究成果を国際ガイダンスとして確立することを目指し、研究成果を国際学会にて発表するとともに、試験法の行政利用に向けた国際動向調査を進めた。

B. 研究方法

(1) ヒト iPS 細胞由来神経細胞及び脳オルガノイドを用いた in vitro 発達神経毒性評価法の開発

① BBB と MEA を統合した in vitro 神経毒性試験系の開発

分担研究者の松永らが樹立したヒト iPS 細胞由来 BBB を 2 機関で培養し、経内皮電気抵抗 (TEER) 測定により機能確認しプレバリデーションを行った。BBB 機能を維持しつつ神経細胞との共培養が可能な培地の開発を進めた。

2 層灌流デバイスと MEA をマイクロ流路にて連結し

た MEA 連結型 MPS の開発を行った。この装置の評価のため、既存データが豊富なラット初代培養大脳皮質神経細胞を利用するための培養プロトコルを検討した。

② MEA のためのヒト iPS 細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた MEA 計測の標準的プロトコル作成を進めた。MEA システムとしては、多くの企業で利用されている 16 電極マルチウェル型の Maestro (米国 Axion 社)、高密度電極 MEA システムである MaxOne (スイス Maxwell 社) を使用した。細胞として、米国 NeuCyte 社のヒト iPS 細胞由来神経細胞を使用して研究を進めたが、研究期間途中にて安定供給に問題が生じ入手が不可能となったため、別メーカー (富士フィルム CDI 社) のヒト iPS 細胞由来神経細胞についても培養および MEA 計測手順の検討を行った。

③ 細胞品質評価のための画像解析 AI モデルの開発

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を培養し、MEA 測定 (Maestro システム) と画像撮影をセットで行いデータを集積した。画像撮影は BioRevo オールインワン顕微鏡 (キーエンス) を用い、3.5 μm 間隔の Z-stack 撮影とした。深層学習モデルによる学習により、コンフルエント状態の細胞画像から特徴量を抽出するアルゴリズムを開発した。画像予測 AI モデルロバスト化のための各種処理の最適化およびノイズデータ影響の検証と最適化を行った。コンフルエントな細胞画像からの特徴量抽出のために、変分オートエンコーダ (VAE) モデルについての開発環境整備と実装を行い。最適なモデル化環境とハイパーパラメータの最適化を進めた。

④ MEA データ解析 AI モデルの開発

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を MEA プレート上で培養し、培養 4-5 週目に自発活動および薬剤累積投与後の細胞外電位を取得した。得られた急性毒性の MEA データを解析し、15 の神経活動関連パラメータを算出した。得られた MEA パラメータを用いて、毒性予測 AI モデルを作成し、陰性対照化合物に対する毒性スコアの標準偏差を基準とした毒性判定閾値を決定した。次に、未学習データおよび未学習化合物に対して、作成した AI による毒性判定を実施し、精度検証を実施した。

⑤ 脳オルガノイドを用いた MEA による神経毒性評価

ヒト iPS 細胞 RIKEN-1A から、培養液キット StemDiff cerebral organoid kit (米国 STEMCELL Technologies 社) を用いて脳オルガノイドの樹立を行った。脳オルガノイド神経ネットワーク活動の検出には高密度電極の MaxOne システムを使用した。脳オルガノイドを電極チップ 1 基あたり 1-2 個播種し、週に 2 回の培養液交換、週に 1 回の MEA 計測を実施した。

MEAデータからのネットワーク活動関連パラメータの算出はScopeソフトウェア（スイスMaxwell社）により行った。

（２）化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

In silico毒性予測手法開発のための物質データベースとして、発達神経毒性に関する総説(Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015)に記載された361の化学物質、また食品安全委員会が構築している農薬評価書のラット反復投与毒性試験（90日間、2年間）の結果を約1000のエンドポイント（EP）として整理した独自のデータベース（DB）から、90日間試験の結果がある350の農薬を利用した。alvaDescソフトウェア（Alvascience、ver 2.0.12）により分子記述子を計算し、データベース物質の中での最大値が1、最小値が0となるように標準化し、物質相互間のユークリッド距離をRソフトウェアにより算出した。物質間距離は理論上の最大距離（使用した分子記述子数の平方根）で除して相対距離に変換し、物質間の類似性の指標とした。また約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアを使用し、生物活性予測値を算出して利用した。

評価対象のエンドポイントとして、CE01（脳コリンエステラーゼ（ChE）活性低下、赤血球ChE活性低下、血中ChE活性低下、の3つをまとめたChE関連所見）、NV01（神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたもの）の2グループを設定した。

リードアクロスは、350農薬から1物質を予測対象物質（ターゲット物質）として選択し、残りの物質を類似物質（ソース物質）の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。毒性判定では、ソース物質の陽性率がDB全体の陽性率を上回った場合を陽性予測とし、最終的に350物質全体の感度、特異度、balanced accuracy（BA）を予測精度の指標として算出した。

（３）in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目し、OECD発達神経毒性試験ガイドライン(TG426)に従いラット発達期ばく露を行った。児動物脳について、免疫組織学的検索、遺伝子発現解析を実施した。またTG426に従い行動試験を行った。

（４）試験法の行政利用に向けた国際動向調査

JacVAM資料編纂委員会の協力のもとOECD in vitro DNTのガイダンス初稿に対する意見募集に対応（意見集約と提出）を行った。さらに、DNT専門家会

議やワークショップなどでガイダンス改訂に向けて議論を行っている。またOECDの拡張世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画した。

米国、韓国等の動物実験代替法関連学会に参加し、ここまでの成果を発表して海外規制機関の関係者とのディスカッションを行う等、国内外の関連学会に参加し情報収集を行った。

（倫理面の配慮）

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いが生じていない。

また動物実験については、実験を実施した国立大学法人 東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。投与方法は飲水投与を主体として動物の苦痛を最小限に留め、動物はすべてCO₂/O₂深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し動物に与える苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

（１）ヒトiPS細胞由来神経細胞及びオルガノイドを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

①BBBとMEAを統合したin vitro神経毒性試験系の開発

ヒトiPS細胞由来BBBの輸送安定性やバリア機能に関するプレバリデーションを行い、良好なバリア機能を得られる培養のプロトコルを確立した。培地成分の検討を行った結果、神経細胞の発火、BBBのバリア機能をともに保つことができる培地の候補を見出した。

MaxOneシステムにおいてラット神経細胞は、培養2週間で安定したネットワーク活動を示した。これをもとに、BBBを培養する灌流装置とラット神経細胞を播種したMEA装置をマイクロ流路により連結し、培養液の灌流下でMEA計測が可能であることを明らかにした。MEAデータに培養液の灌流に伴うと考えられるノイズが観察されたが、培養液を灌流するチューブの改良により、ノイズを軽減することができた。

②MEAのためのヒトiPS細胞由来神経細胞培養手順の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養により、培養開始後4～5週間でネットワークバーストが観察されたものの、多くのウェルで強い凝集が観察された。培養手順を検討し、細胞解凍の際、神経細胞を顕微鏡下ですべて単一細胞として観察できるまでピペッティングにより分散させるようにしたところ、凝集はほぼ見られなくなった。これらの情報をSOPとしてまとめる予定である。

③細胞品質評価のための画像解析AIモデルの開発

化学物質神経毒性試験にMEAを活用するにあたり、

培養した細胞の品質を担保する客観的な指標が必要である。非侵襲的かつ簡便に細胞品質をモニタリングするため、MEAデータと細胞画像特徴量の相関をAIにより解析する手法の検討を進めた。その結果、模様関連特徴量であるmean-homogeneity、変動パターン関連特徴量であるSD-bias frequencyが、異なる実験間やプレート間でも共通してMEAパラメータとの相関を示した。MEAデータでは電極間で想像以上に大きな変動(CV>0.4)が生じ、経時的に増大することが確認された。ガウス分布による最尤推定、階層ベイズモデルによる逸脱スパイク数データの定量化により、ノイズデータをin silicoで削減することによって、より安定なMEA解析が可能になることが示唆された。一方、撮影データの増加にしたがって、画像中の輝度ノイズや細胞形態の変化が大きく、特定の画像処理アルゴリズムだけでは安定した数値化ができない問題にも直面した。このため、深層学習技術の一つである変分オートエンコーダ(VAE)を用いて画像全体に共通する特徴量を潜在特徴量としてのモデル化する技術の開発を行った。この結果、これまでの解析アルゴリズムでは、細胞種やデータが変更された際に大きく解析パイプラインを変更する必要があった処理の一部が、安定して共通化できることが見出された。

④MEAデータ解析AIモデルの開発

MEAを用いた神経毒性評価はDNT-IVBにも記載されているが、用いるパラメータ等の具体的手法や毒性判定のクライテリアは明確になっていない。MEAパラメータを用いた主成分分析により、神経毒性判定の閾値設定を行うことができた。12種の農薬について急性毒性データの主成分分析を行った結果、MEAパラメータの変動パターンを各農薬の神経作用機序ごとにグループ分けできることを見出した。また、MEAデータ9パラメータの機械学習により構築したAIモデルにより、12種類の農薬について主成分分析で得られるのと同様の神経毒性判定の閾値が得られた。

さらに、独自に最大発火周波数を計算し、最大発火周波数と関連する新規パラメータ4つを算出して、Maestro標準の11パラメータと合わせてAIモデルによる予測精度を検証した。未学習データおよび未学習化合物に対する毒性スコア予測を行ったところ、陰性対照化合物では、濃度に関わらず低い毒性スコアを維持した。試験化合物では、未学習データおよび未学習化合物いずれにおいても濃度依存的に毒性スコアが上昇する傾向が観察された。

⑤脳オルガノイドを用いたMEAによる神経毒性評価

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドに着目されているが、化学物質影響の解析のための手法

やエンドポイントは確立されていない。ヒトiPS細胞より樹立された脳オルガノイドは直径数mmと大きく、Maestroシステムで用いられる電極(1mm四方の範囲に16電極)では十分にカバーできなかったことから、本研究では26400電極により4mm x 3mmの範囲をカバーできる高密度電極MEAシステムであるMaxOneシステムを用いた。オルガノイド作製プロトコルの改良を進めた結果、3週間にわたり安定したネットワークバーストを得ることに成功した。

(2) 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

構造記述子により化学構造や物性の類似した物質をグループ化できるクラスタリング手法を開発した。その結果、in vivo発達神経毒性が陽性の物質や類似した構造を持つ物質が集積したクラスターが得られ、開発したクラスタリング手法が適切であることが示唆された。リードアクロスにおいて、比較する物質数や類似度に適切な閾値を設けることで、神経毒性の予測性を向上させられることが示唆された。

構造的に類似する物質の毒性スコアを構造的類似度で重みづけして合計する手法により、農薬の毒性を良好な制度で予測することができた。またin silico生物活性予測値の活用により予測性が改善することが示唆された。

(3) in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

In silico手法との統合に有用なin vitro実験を見出す方法として、毒性メカニズムが不明な化学物質のin vivo実験によるメカニズム情報の集積が考えられる。発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目し、in vivo発達神経毒性評価を実施した結果、海馬歯状回において神経幹細胞の増殖抑制や神経炎症が生じていることを見出した。化学物質曝露が海馬において神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性を上昇させ、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすメカニズムが示唆された。このような毒性メカニズムを検出するin vitro評価系の重要性が示唆された。

(4) 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

OECDのin vitro DNTガイドランスの意見募集に対し、神経細胞分化や神経突起伸長といったエンドポイントの生物学的な意味づけ、またin vivoでの行動異常との対応づけについてのコメントを提出した。またOECDの拡張世代生殖発生毒性試験ガイドライン(TG443)の改訂に参画し、発達神経毒性試験に関する改訂はほぼ無かったものの、内容の確認を行った。

欧米、アジアの動物実験代替法関連学会に参加し、MEAデータによる神経毒性予測や化学構造に基づくin silico毒性予測とin vitro評価の統合等の成果を報告した。また、OECDのDNTワークショップにおいて日本におけるDNT-IVBに関する取り組みについての講演も行い、海外規制機関の関係者とのディスカッションと情報収集を行った。

D. 考察

OECDのDNT-IVBガイダンスにラット神経細胞を用いたMEAシステムによる評価法が記載されているが、in vivo神経毒性の予測性については課題が残されている。DNT-IVBガイダンスでも指摘されているように、化学物質の中枢神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要である。また、ヒト細胞としてヒトiPS細胞由来神経細胞の利用も期待されている。本研究では、ヒトiPS細胞由来BBBの培養について施設間プレバリデーションを行った上で、BBBの培養を行う灌流培養装置と神経細胞のMEA装置を灌流培養装置により連結し、培養液灌流下でのMEA計測を行えることを明らかにした。これによりMEAとBBBを統合した新たな生体模倣システムの完成に大きく前進したと考えられる。今後、適切な化学物質を用いて本システムの有用性を検証する必要がある。

ヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。株間差、ラットとヒトの種差はExcitatory neuronとInhibitory neuronの比率(E/Iバランス)の違いだけでは説明できていないことから、株間差を克服できる評価指標の選定が必要と考えられる。本研究により、ヒトiPS細胞由来神経細胞の培養において、解凍した細胞を単一細胞まで分散させる操作が凝集防止に重要であることを見出した。これは細胞供給元のプロトコルには記載のない工程であり、実験データの再現性に重要であると考えられる。今後、本研究で得られた知見をもとに標準的プロトコルの作成を目指す。

同一のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている(ALTEX, 37:121-135, 2020)。本研究ではAI画像解析による細胞状態のモニタリング手法の開発を進めてきた。本研究によりMEAデータと関連の強い画像特徴量の抽出、解析のロバスト化のためのノイズデータ除去や深層学習モデルの導入を行った。これらの開発の結果、実験データごとに安定した細胞画像の定量化を行うことができる可能性が示唆された。

MEAデータを用いたAIモデルによる毒性予測について、MEAシステム標準のパラメータに加え、独自に算出したパラメータを加えることで高い予測性が得ら

れることを見出した。パラメータAIは入力パラメータの数値情報となるため、MEAデータに限らず、その他の評価系による解析値をパラメータとして追加することが可能であり、MEAデータによる神経機能情報に加えて、その他評価系による情報を含有した統合的な毒性評価が可能となり、評価対象とできる化合物範囲が非常に広くなることが推測できる。今後、慢性毒性MEAデータに関してもAIのアプローチが期待されており、EPAでも同様のモデルを構築していることから、引き続き連携して取り組む必要がある。

近年、より生理的なモデルとして脳オルガノイドの活用が期待されているが、化学物質影響の解析のための手法は確立されていない。脳オルガノイドのMEA計測においては、測定ごとにデータの変動が大きく、試験のためのタイムウィンドウを見出すことが課題であった。本研究にて、オルガノイド作製プロトコルの最適化を進めた結果、長期に安定したネットワークバーストが見られるオルガノイドを得ることに成功した。今後、今回の作製手順やオルガノイドのデータをふまえ、標準的なプロトコルの検討や満たすべき項目の選定などを進める。

化学物質の構造情報の活用によって、in vivo発達神経毒性の予測性の向上が期待されることから、OECDにおける発達神経毒性評価の段階的アプローチでも、Tier 0としてin silico手法の活用が議論されている。しかし具体的なアプローチの検討は未だなされていないことから、本研究では分子記述子を用いたリードアクロス手法を開発した。類似性評価及び毒性判定に関する条件検討を行い、ソース物質数の設定が予測精度に与える影響を検討したが、評価する毒性エンドポイントにより予測精度には差が見られた。コリンエステラーゼ阻害などメカニズムの明らかな毒性に比べ、外観や行動などメカニズムが多様と考えられるエンドポイントでは、構造情報からの予測精度が低くなることが示唆された。今後は、化学構造情報から生物活性を予測するソフトウェアを利用してDB内の物質について各種生物活性の予測値を算出し、それらを利用した類似性評価に基づくソース物質の選択により、リードアクロスの精度向上が可能かを検討する。DNT専門家会議でも議論されているが、引き続き、in vivoのデータについても収集を進めながら検討する必要がある。

本研究により、海馬における神経炎症と酸化ストレス、またストレスに対する感受性の上昇が、成体期における多動的行動と進行性の神経新生抑制を引き起こすメカニズムが存在することが示唆された。DNT-IVBガイドラインには神経の分化、軸索伸長、ネットワーク形成等をカバーする17の実験系が記載されており、一つの試験系でもヒットすればハザードとして用いる

ことになっている。神経毒性の作用点に関する知見の蓄積をもとに、in vitro試験法の改良など、DNT-IVBに貢献することが期待される。

以上のように、研究班全体で連携して神経毒性評価法の開発を進め、成果を上げた。今後、これらの成果をもとに、OECD 発達神経毒性の専門家会議や国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法として国際発信を目指す。

E. 結論

本研究において、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を行った。これにより、キネティクスを反映した新たなin vitro試験法の構築が期待される。MEAを用いた神経ネットワーク解析法のAIによる予測モデルを構築した。これによりin vitro神経毒性評価

の予測性向上が期待される。さらに、化学構造に基づくin silico予測とin vitroデータを統合的に活用することにより、in vivo発達神経毒性の予測性が向上することが期待される。

F. 研究発表

各分担研究者の報告にある通り、多数の論文発表および学会発表を行った。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし