

平成31年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「尿による認知症重症度が判断可能な検査キットの開発」

研究開発成果等報告書

令和2年5月

担当局 関東経済産業局

補助事業者 公益財団法人千葉県産業振興センター

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	7
1-3 成果概要	8
1-4 当該研究開発の連絡窓口	10
第2章 本論	11
序論	11
1. 認知症尿中バイオマーカーに特異的な抗体の作製における課題への対応	13
2. 尿夾雑物の影響を排除する ELISA 測定法の確立における課題への対応	16
3. 分子レベルのバイオマーカーの有効性解析と測定キットの検証における課題への対応	18
最終章 全体総括	22
3-1 研究開発の成果	22
3-2 事業期間終了後の課題	23
3-3 事業化に向けた今後の展開	23
補足資料	
参考文献	26
特許	27

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

研究開発の背景・研究目的

高齢化社会となり、認知症による徘徊や事故に対する家族の責任の範囲の問題もクローズアップされている。一方、認知症の診断については、病院などで、医師が MRI (magnetic resonance imaging) などの検査を含めた客観的な判断を行うが、診断も容易でなく高い専門知識や時間を要する。そのため、診断前に認知症を簡便に、低コストで、客観的判断が可能な測定キットの開発が課題となっている。

アミンファーマ研究所では、最初に、認知症の血中バイオマーカーの開発を試み、老人斑のマーカーであるアミロイドベーター ($A\beta$) のペプチドの長さの異なる2種の比、すなわち $A\beta_{40/42}$ と最も強力な細胞障害因子である PC-Acro (protein-conjugated acrolein) を測定し、年齢を加味した結果、認知症のリスク値 (0~1) が下記のように、認知機能障害定量値 (MMSE, mini-mental state examination, 1~30) と良く相関 ($P < 0.001$) する事を見出した (参考文献: J Alzheimers Dis. 32, 33-41, 2012¹⁾)。

認知症血中バイオマーカーの研究結果 (J Alzheimers Dis. 32, 33-41, 2012¹⁾ から引用)

アルツハイマー病 (AD)	軽度認知症 (MCI)	認知症予備群 ※ (nd-WMH)	健常者
0.99	0.98	0.74	0.14

数値は認知症リスク値 (0~1)

※ 脳に白質病変が認められる

しかし、これらのバイオマーカーでは認知症予備群を感度良く見つける事は可能であるが、アルツハイマー病の人と軽度認知症の人を区別する事が難しく、区別を可能とする新規バイオマーカーの開発を目指した。表 1 に被験者の統計的情報を示した。

表 1 被験者群の統計的情報

	Control	nd-WMH	MCI	AD
人数	33	68	50	70
MMSE	29.5 ± 1.0	29.0 ± 2.0	23.0 ± 2.5***	18.0 ± 3.0***
年齢	64.0 ± 10.3	75.5 ± 6.3**	79.5 ± 5.8***	81.0 ± 4.5***
性別 (女性 %)	48.5	58.8	48.0	72.9*
WMH grade (PVH+DSWMH)	0 ± 0	3.0 ± 1.0***	3.0 ± 1.0***	3.0 ± 2.0***
高血圧 (%)	18.2	48.5**	58.0***	44.3*
高脂血症 (%)	24.2	27.9	20.0	21.4
高血糖 (%)	15.2	11.8	20.0	15.7

Control, 健常者
nd-WMH, 大脳白質病変を有する非認知症者
MCI, 軽度認知障害者
AD, アルツハイマー病患者

その結果、世界初の尿中認知症バイオマーカーを見出した。後述の〈新技術の原理〉で概略を説

明したが、尿中の3-HPMA (3-hydroxypropyl mercapturic acid) と尿中AC-Acro (amino acid-conjugated acrolein) を測定することで、健常者〔含認知症予備群、nd-WMH (non-demented subjects with white matter hyperintensity)〕と認知症患者[MCI (mild cognitive impairment) +AD (Alzheimer's disease)]を区別できるだけでなく、軽度認知症とアルツハイマー病も区別できることが明らかとなった。

図1のように、尿中バイオマーカー〔3-HPMA/Cre (creatinine)〕による軽度認知症(MCI)とアルツハイマー病(AD)と区別する可能性を示した。個々の値の差はあまり大きくないが、AC-Acroを組み合わせ、ニューラルネットワークで数値を解析することで、軽度認知症とアルツハイマー病を明確に区別することが可能になる。

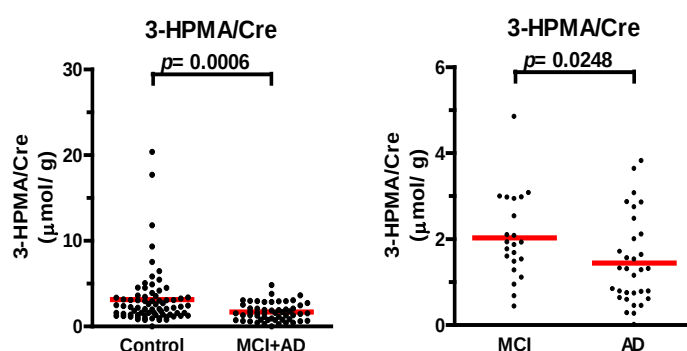


図1：尿中バイオマーカー 3-HPMA の健常者(Control)、軽度認知症(MCI)、アルツハイマー病(AD)における値：質量分析器で測定した値。各点は各被験者の値を示し、赤線は各群の中央値を示す。p値が0.05未満の場合、有意差があるとみなされる。

(参考文献：Clin Chim Acta, 441, 115-121, 2015²⁾)

発見当時は、3-HPMA は質量分析器を用いて測定していた。しかし、この方法では大量のサンプル測定は難しく、費用面においても事業化は難しかった。一方、3-HPMA に対する抗体は、抗原となる3-HPMA が低分子であることから取得が難しかったが、ウサギポリクローナル抗体作製法を改良し、2015年にアミンファーマ研究所で抗体作製に成功し、より簡便なELISA法を構築することが可能となった。(※)

※ 3-HPMA に対するモノクローナル抗体が得られれば、品質管理など容易になるが、抗原に当たる3-HPMA が低分子であることからその取得が難しく、新法を含めたこれまでのマウスやニワトリでの検討ではモノクローナル抗体を取得できなかった。

以上より、尿中認知症リスクバイオマーカーと血中認知症リスクマーカーを組合せることで、より詳細なリスク判定が可能になる。すなわち、血中認知症リスクマーカーとして老人斑のマーカーであるアミロイドベーター ($A\beta$) の2種の比、すなわち $A\beta_{40/42}$ 、およびアクロレイン ($CH_2=CH-CHO$) が蛋白質に結合したもの(PC-Acro)を測定し、尿中バイオマーカーを加え、ニューラルネットワークにより「ローリスク(低値)」「境界値」「ハイリスク(高値)」を設定し、認知症重症度診断をより詳細に分析することを実現する。

従来技術と新技術

アクロレインは、活性酸素より強い細胞毒性を示す生体内産生物質であり、脳梗塞、認知症、うつ病、腎不全、自己免疫疾患、リウマチなどに強く関与している³⁾。アミンファーマ研究所は、「アクロレイン」と脳梗塞との研究開発から既に血液によるニューラルネットワークを用いた「脳梗塞リスク評価」⁴⁾サービス事業を平成22年に開始し、全国200ヶ所以上の医療機関並びに複数の健康保険組合等で導入され、平成28年には約18,000人の受診者があり、これ迄に90,000人以上の方が受診されている。この「脳梗塞リスク評価」を実施している人間ドック、健診、病院、検査会社等からは、「脳梗塞リスク評価」だけでなく、社会的に重要さが増してきた「認知症」のリスク評価も出来ないか、更に血液に加えて採取が容易な尿で測定が出来ないかという要望が寄せられていた。

アミンファーマ研究所と千葉大学との「脳梗塞リスク評価」の研究と並行して、認知症患者のアクロレインの代謝物（体内で解毒化され尿中に排出される物質）である3-HPMA（3-ヒドロキシプロピルメルカプトツール酸）とAC-Acroという物質の量を測定することで、客観的な認知症評価が出来る可能性およびバイオマーカーとして使える可能性を見出した（特許^{1,2)}および学術論文発表⁵⁾）。

この成果を発展させ、認知症患者の尿中バイオマーカーを測定することで、認知症重症度が判断可能となり、実用化レベルで尿による検査キット作製への実現性が高まった。

【従来技術での課題】

アミンファーマ研究所に於いて、尿中認知症バイオマーカーとして3-HPMAを見出し、尿中3-HPMAの抗体によるELISA測定に成功したが、感度が低く、測定時間がかかるもので実験室レベルの性能であった。

これらにより、従来技術では以下の通りの課題が残っていた。

- (1) 質量分析法は高額な検査機器と熟練した技術を要し、一度に1サンプルしか測定できない
- (2) 認知症の診断は軽度なほど難しく、高い抗体の感度が求められる
- (3) 認知症尿中バイオマーカーの測定キットとしてヒト尿サンプルを用いた有用性検証が必要

【新技術について】

以下の3つの課題を解決するために、後に記述する様にサブテーマを設定し課題解決を図ることとした。

- 【1】感度の高い抗体を用いることで、短時間で、安価に多くのサンプルを測定
- 【2】尿夾雑物の影響を排除するELISA測定法の確立により尿で軽度認知症から判定可能
- 【3】分子レベルのバイオマーカーの有効性解析により有用性を確定

＜新技術の原理＞

細胞障害時に発生するアクロレインは細胞を障害するが、生体内で代謝（解毒化）され、その代

謝物 3-HPMA や AC-Acro が排泄される。本事業では、3-HPMA を測定することにより、発生したアクロレインの程度を推定する（図2）。

認知症との相関性については、血中のアクロレインが蛋白質に結合したもの（PC-Acro）では認知機能障害の程度とよく相関し、認知症予備軍を感度良く見つけることは可能であるが、重要な点であるアルツハイマー病と軽度認知症とを区別をすることが難しい。一方、尿中の 3-HPMA と AC-Acro では、健常者、認知症予備群と認知症患者を区別できるだけでなく、軽度認知症とアルツハイマー病も区別できることをこれまでの研究で明らかにしている。

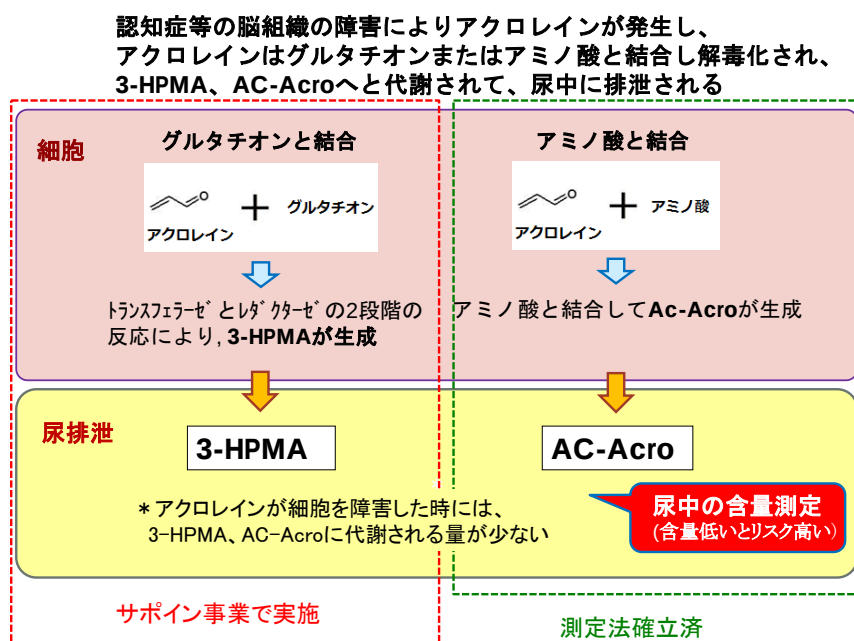


図2 尿中バイオマーカーによる認知症判定の原理

研究目標

1. 認知症尿中バイオマーカーに特異的な抗体の作製における課題への対応

尿中のバイオマーカー測定法を開発するために、3-HPMA に対する特異性の高い高性能抗体を取得する。純度の高い3-HPMA の製造法確立とその合成を行う。ウサギポリクローナル抗体は、抗原提示方法の工夫により 3-HPMA に対する抗体を更に特異的かつ高感度なものにする。アフィニティ精製法を組み合わせ、感度の良い精製抗体とする。精製抗体を用いて、認知症患者尿中のバイオマーカーを測定するキットを試作する。

【1-1】抗体作製のための化合物等の合成

抗体作製用の3-HPMA 並びに抗体特異性検証用の3-HPMA 類縁化合物の合成を行う(純度95%以上)。

【1-2】低分子バイオマーカー検出のための特異性の高い抗体の作製

・**抗体の取得**：特異性の高い抗体は必須であるが、3-HPMA のような低分子(分子量 221)に対する抗体を得ることは難しい。そこで、3-HPMA のキャリア分子選択等[アルブミン, KLH (keyhole limpet hemocyanin) 等] により、感度を 10 倍向上させた抗体の取得を図る。これらは、アミンファーマ研究所のノウハウを用いた方法により解決可能である。

・**抗体の精製**：抗体の精製は、プロテイン A を用いたウサギ抗体のアフィニティ精製と 3-HPMA を用いたアフィニティ精製を組み合わせ純度の高い抗体を得る。

【1－3】バイオマーカー測定法の最適化

・**特異性の検証**：合成した 3-HPMA およびその類縁化合物（千葉大学合成化合物）を使用し、尿中 3-HPMA に対する抗体を用いて構築した ELISA 測定法により、3-HPMA 並びにその類縁化合物に対する抗体の反応性を検討し、蛍光法あるいは発色法の検討と最適化を実施し、体外診断用医薬品認可に必要な基準まで精度を上げる(1～5 μ M で直線性を示す)。

・3-HPMA を固定化する技術（図3）、及び 3-HPMA の構造に基づく最適 ELISA 反应用試薬の開発（従来の手作業による測定に比較して、4 倍のスループットを実現）。

・以上により、本バイオマーカー測定法を使用することで、画像診断の 1/3 のコストで測定可能とする。

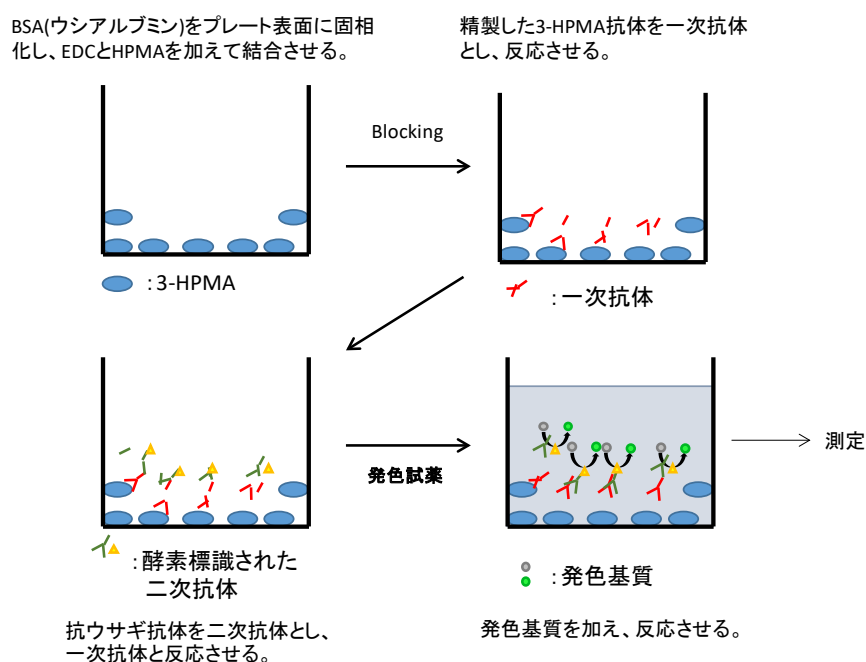


図3 直接吸着法による3-HPMAのELISA測定方法

2. 尿夾雑物の影響を排除するELISA測定法の確立における課題への対応

尿中低分子を測定する方法は一般化されていないので、ELISA 測定に対応した尿の前処理法を確立する。特異性検証用に使用する種々の類縁化合物を合成し、それら化合物と抗体との相互作用に関するデータ取得を行う。また、試作した測定キットおよび尿中バイオマーカーの信頼性を確認する

ため、健常者並びに認知症患者の尿サンプル並びに血液サンプルを得て検証を行う。得られた複数項目の測定値と被験者の情報から、ニューラルネットワーク手法により統計学的に有意な変化を与える値を得て、その値に基づき認知症を検出可能とする。

【2-1】尿の前処理法確立とバイオマーカー測定の精度検証

・尿の前処理法の確立：ELISA 測定に耐えられるように、ヒト尿を用いてその採取後の保存条件の検討、尿の前処理として蛋白変性処理、沈殿夾雑物の遠心などによる除去、pH 調製法の検討などを検討し、精度よく測定可能な前処理方法を確認する。イオン強度の高い尿サンプルに対する処理用試薬開発も行う。標準物質として【1-1】で合成した 3-HPMA を使用する。

・ヒト尿サンプルにおける検証：開発する「尿中バイオマーカー測定キット」のヒト尿サンプルへの精度を確認するため、健常者および認知症患者の尿サンプルを、近隣の病院などから毎年 100～150 名程度分を取得して、尿中バイオマーカー測定キットの精度を確認する。

【2-2】尿中バイオマーカー値の補正と検証

・尿中バイオマーカー値の補正と認知症重症度：ELISA キットを用い、尿中のクレアチニン([Cre])含有量に対比した AC-Acro 及び 3-HPMA 含有量の測定による認知症重症度判断の有効性を検証する。 $[AC-Acro]/[Cre]$ 並びに $[3-HPMA]/[Cre]$ が、健常者>認知症予備群>軽度認知症(MCI)>アルツハイマー病(AD)となることを明確にする。

・血液バイオマーカーとの比較と検証：本研究所が既に保有する血液のバイオマーカーと同時に測定した場合、尿中バイオマーカー測定キットの精度比較、両者を併用したときの精度の検証を行い、相補的な数値の使用による信頼性を確保する。

【2-3】認知症判断用マーカーとしての有用性の検証

・ヒト尿サンプルを用いた有用性の検証：試作した認知症尿中バイオマーカー測定用 ELISA キットを用いて、認知症患者などの尿サンプルでの評価を実施し、実際に判定可能かどうか有用性を検証する。また、ニューラルネットワークの手法を用いて、尿中 3-HPMA、尿中 AC-Acro、血中 $A\beta$ 40/42 などのバイオマーカーの分析結果と被験者のデータから数学的な統計解析を行い、「ローリスク（低値）」「境界値」「ハイリスク（高値）」を設定し、判定精度最適化を図る。

3. 分子レベルのバイオマーカーの有効性解析と測定キットの検証における課題への対応

バイオマーカーの有効性解析のために、動物実験や細胞培養系を用いて、アクロレインの細胞機能障害機序解析を実施し、科学的証明に対応した技術開発と機序の分子レベルでの解明を行い、バイオマーカー測定の有用性と科学的根拠を取得する。

【3-1】有効性解析のための化合物等の合成

アクロレインスカベンジャーである N-アセチルシステイン並びにその類縁化合物の合成、およびアクロレインスカベンジャーとして最も有効な N-アセチルシステイン誘導体の大量合成を行い評価用として提供する（純度 98%以上、3 種類以上、大量合成 1 g 以上）。

【3-2】認知症モデルマウスおよび培養細胞を用いた分子レベルの有効性解析

- ・認知症モデルマウス（脳梗塞モデルマウスなど）並びに細胞培養系（マウスまたはヒト由来神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2a など）を用いたアクロレインの細胞機能障害機序解析を実施し、科学的証明に対応した技術開発と機序解明を行う。
- ・アクロレインが活性酸素より毒性が強いこと、並びにアクロレインの標的分子と、細胞障害を確認し、認知症モデルマウス並びに細胞培養系を用いて、アクロレイン及びアクロレインスカベンジャーを投与又は添加し、分子レベルで解析する。
- ・アクロレインと標的分子との相互作用に関するデータを取得し、バイオマーカーの有効性を検証する。

1-2 研究体制

研究実施機関

- ・株式会社アミンファーマ研究所
- ・学校法人加計学園・千葉科学大学
- ・国立大学法人千葉大学

総括研究開発者（PL）

五十嵐 一衛（株）アミンファーマ研究所 代表取締役社長）

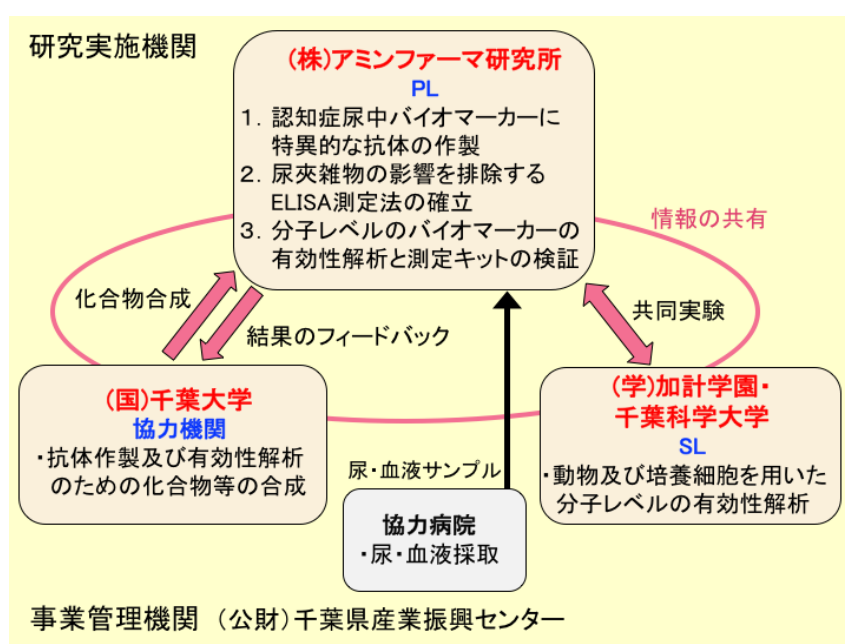
副総括研究開発者（SL）

柏木 敬子（学）加計学園・千葉科学大学 薬学部 教授）

協力研究者

北島 満里子（（国）千葉大学大学院薬学研究院 准教授）

役割分担



アドバイザー

神崎 哲人（(国)千葉大学 大学院薬学研究院 医薬品情報学 教授）

伊藤 大智（(医)IMS(イムス)グループ 予防医学部門 管理部 施設管理部）

石澤 克彦（(株)江東微生物研究所 第一営業本部 副本部長）

富岡 登（(公財)千葉市産業振興財団 千葉大玄鼻イノベーション・ラボラトリー イノベーション・マネージャー）

1-3 成果概要

1. 認知症尿中バイオマーカーに特異的な抗体の作製における課題への対応

【1-1】抗体作製のための化合物等の合成

3-HPMA および類似化合物 CEMA(carboxyethyl mercapturic acid)を合成し、純度 95%以上の目標値を達成した。

【1-2】低分子バイオマーカー検出のための特異性の高い抗体の作製

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製のため 3-HPMA の抗原を作製し、外注により抗体を作製した。ポリクローナル抗体については、ウサギから血漿分画を得て、3-HPMA に対する抗体を精製した。取得したポリクローナル抗体については、精製することにより、ELISA 測定に使用する事が可能になった。感度は 3-HPMA 1~10 μ M で直線性を示し、抗体の特異性を検討した。事業化については、均一の特性を持つモノクローナル抗体が望ましいが、検討結果から、ポリクローナル抗体でも、精製により精度および感度は十分であることが明らかとなり、事業化に向けてポリクローナル抗体も使用可能となった。

モノクローナル抗体作製については、ポリクローナル抗体が得られた段階で、さらに抗体価を上げるため、ウサギの数を増やした。モノクローナル抗体作製のためのウサギ抗血清は 3-HPMA への抗体活性を示し、直線性を示した。現在、活性の高いモノクローナル抗体の細胞の大量培養を依頼し、精製して抗体の感度が十分かどうかを検討している。その結果から、測定キットの最終仕様は、ポリクローナル抗体かモノクローナル抗体かを決定して事業化へ向かう。

【1-3】バイオマーカー測定法の最適化

抗体の精製度に対応する ELISA 測定キット作製の種々条件の検討を行った。ポリクローナル抗体を用いて ELISA 測定の最適化条件を検討したが、発色法に比較して蛍光法で良い結果が得られた。精製抗体を用いると、再現性は 85%以上で、尿の夾雑物存在下での再現性の検討を行った。尿中の夾雑物の影響を排除する条件も設定でき、ポリクローナル抗体を用いて再現性の良い 3-HPMA の ELISA 測定キットが完成した。ロット内再現性、ロット間再現性、日差再現性の変動係数 CV が 15~20%以下である。また、80 検体/5hrs より早い測定スループットが可能である。認知症検査サービスは、画像診断のコストに比較するとコスト 1/3 は十分に達成

できる。ポリクローナル抗体についてはウサギを用いた作製に着手し、モノクローナル抗体と並行して追加を行っている。

2. 尿夾雑物の影響を排除する ELISA 測定法の確立における課題への対応

【2-1】尿の前処理法確立とバイオマーカー測定の精度検証

尿中の夾雑物の影響を除去する方法の検討を行った。尿を酸性でアルブミンに結合させると、感度、特異度共に 90%以上の精度で測定することが出来た。さらに良い条件があるかどうかの検討は継続していく。

認知症患者の人には、脳に小さい無症候性脳梗塞や大脳白質病変が認められる為、これ迄に取得済みであった脳梗塞患者の尿を用いて、この ELISA 測定キットの検討を行ったところ、脳梗塞患者の尿中 3-HPMA に著しい低下が認められた。【1-3】に記したように感度の良い抗体を用いて、3-HPMA の ELISA キットによる測定の最終確認を行い測定法を完成させる。

【2-2】尿中バイオマーカー値の補正と検証

Cre も、認知症患者群で上昇傾向が認められたので、3-HPMA/Creの方が3-HPMAに比べ、認知症重症度と相関する事が明らかとなった。従って、実際に事業化する場合は、3-HPMA/Cre をマーカーとする事とした。3-HPMA と同様なアクロレイン代謝物である AC-Acro も、認知症で低下する事が明らかとなった。従って、バイオマーカーとして 3-HPMA と AC-Acro を併用すると、認知症重症度評価の精度が上昇すると考えられた。

【2-3】認知症判断用マーカーとしての有用性の検証

確立した尿の前処理方法を用いて、尿中バイオマーカーで、健常者、認知症予備群、軽度認知症患者、アルツハイマー病患者の比較が可能かどうか検証した。ヒトサンプルの収集については、複数の施設にお願いし、最終的にサンプルの取得は 240 となり、順調に進んだ。認知症重症度を識別できるレベルであり、事業化に向けての研究開発でさらにサンプルの有効利用を行う。

3. 分子レベルのバイオマーカーの有効性解析と測定キットの検証における課題への対応

【3-1】有効性解析のための化合物等の合成

N-アセチルシステイン類縁化合物として、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ベンジル誘導体5種（1 g 以上）の合成を完了し、目標の純度 98%以上を達成した。バイオマーカーの有効性解析において、これらの類縁化合物を脳機能障害の回復度検討のために用いた。

【3-2】認知症モデルマウスおよび培養細胞を用いた分子レベルの有効性解析

培養細胞レベルで、手持ちの化合物を用いてアクロレインによる細胞障害抑制の基礎データを取得し、化合物の有効性を確認した。化合物が如何にしてアクロレインの毒性を除去するか、そ

の機序を解析した。アクロレインによる細胞の形態学的変化の結果を解析したところ、神経突起の伸長がアクロレインにより阻害されることが分かった。

認知症患者の80%以上に小さい無症候性脳梗塞が認めらるので、N-アセチルシステイン誘導体の脳梗塞縮小効果を検討した。縮小効果はN-アセチルシステイン ベンジルエステル>N-アセチルシステイン エチルエステル>N-アセチルシステインの順であり、PC-Acro 量も脳梗塞巣の縮小効果と相関して減少した。そのメカニズムとして、N-アセチルシステイン誘導体が、グルタチオン S-トランスフェラーゼを安定化し、グルタチオンとアクロレインとの反応を速やかに行うためであることを見出した。従って、N-アセチルシステイン誘導体はバイオマーカーの有効性解析に有用であるだけでなく、長期間服用可能な抗認知症薬としても非常に有望である。

アクロレインによる細胞障害は、現在考えられている活性酸素より10倍以上強く、以下のメカニズムで脳障害を起こすことを見出した。

- 【1】GAPDH（グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素）がアクロレイン化されると、GAPDH が細胞質から核に移行し、アポトーシスを起こす。
- 【2】MMP-9（マトリックスメタロプロテナーゼ-9）を活性化し、細胞を不活化する。
- 【3】チューブリン、ビメンチンがアクロレイン化されることに依り、細胞骨格が変化し、ニューロンの構造が大きく変化する。

これらの脳障害の機序が解明でき、アクロレインのバイオマーカーとしての有用性が検証できた。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

五十嵐 一衛（㈱アミンファーマ研究所 代表取締役社長）

TEL：043-224-7500 FAX：043-379-1050

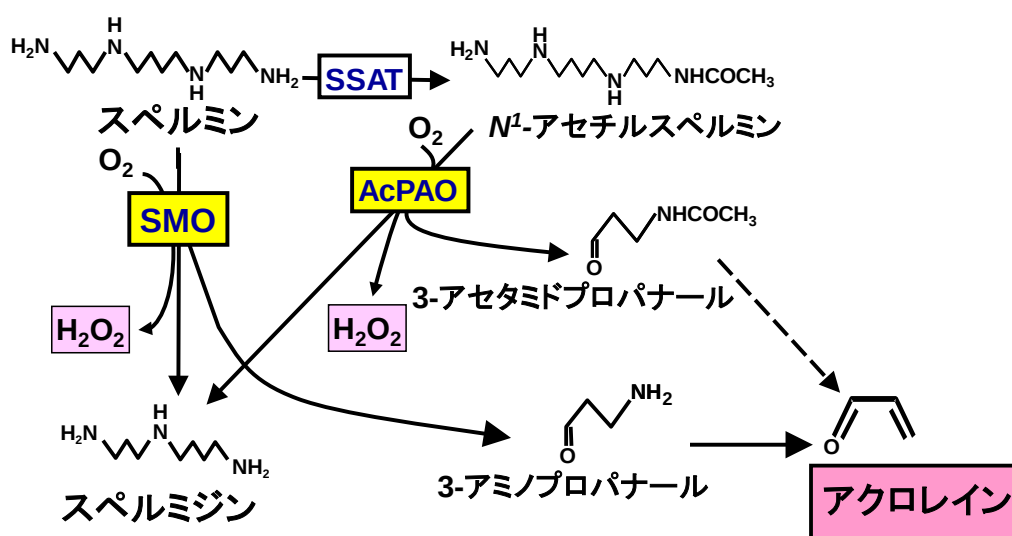
E-mail：iga16077@faculty.chiba-u.jp

第2章 本論

序論

脳梗塞、認知症、腎不全及びシェーグレン症候群で、これまで細胞障害には活性酸素が強く関わっていると考えられていたが、アミンファーマ研究所は、ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）から産生されるアクロレインの方が活性酸素より強く関与している事を見出し（図4及び図5）、「1-3 成果概要」で記したように、認知症、脳梗塞の重症度判定に有効なバイオマーカーの開発並びにアクロレインの細胞障害の分子メカニズム解析の研究を行ってきた。以下に明らかにしたことを記す。

図4に示すようにスペルミンのスペルミンオキシダーゼによる酸化により、同モル量の過酸化水素（ H_2O_2 ）とアクロレインが産生される。



SMO, スペルミンオキシダーゼ AcPAO, アセチルポリアミンオキシダーゼ
SSAT, スペルミジン/スペルミン N¹-アセチルトランスフェラーゼ

図4 ポリアミン（スペルミン及びスペルミジン）からのアクロレイン産生経路

牛血清存在下、スペルミンを培地に添加すると図5Aに示すように乳がん由来FM3A細胞の細胞増殖が阻害される。これは、牛血清中に存在するアミンオキシダーゼにより引き起こされる。そこで、活性酸素の一種である過酸化水素を分解するカタラーゼとアクロレインを分解するアルデヒド脱水素酵素を加えたところ、アルデヒド脱水素酵素を加えると細胞増殖が回復したが、カタラーゼを加えても細胞増殖が回復しなかった。そこで、過酸化水素（図5B）とアクロレイン（図5C）の毒性を調べたところ、アクロレインの方が過酸化水素より、10倍以上細胞毒性が強かった。

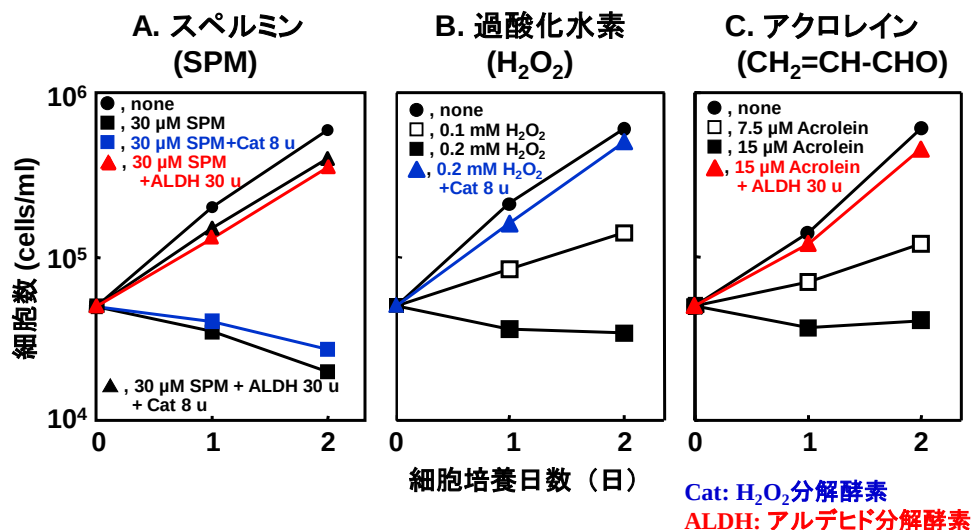


図5 スペルミン (A), 過酸化水素 (B) 及び アクロレイン (C) の細胞毒性

スペルミンは通常、蛋白質合成装置であるリボソームと相互作用して細胞中に存在し、蛋白質合成を促進する事により、細胞増殖因子として機能する。活性酸素の発生や、過剰 Ca^{2+} の細胞内流入により、リボソームが分解されるとスペルミンはリボソームから遊離し、スペルミンオキシダーゼにより分解され、アクロレインが産生される。このアクロレインは図6に示すように、種々の細胞障害を引き起こす事を明らかにしてきた。

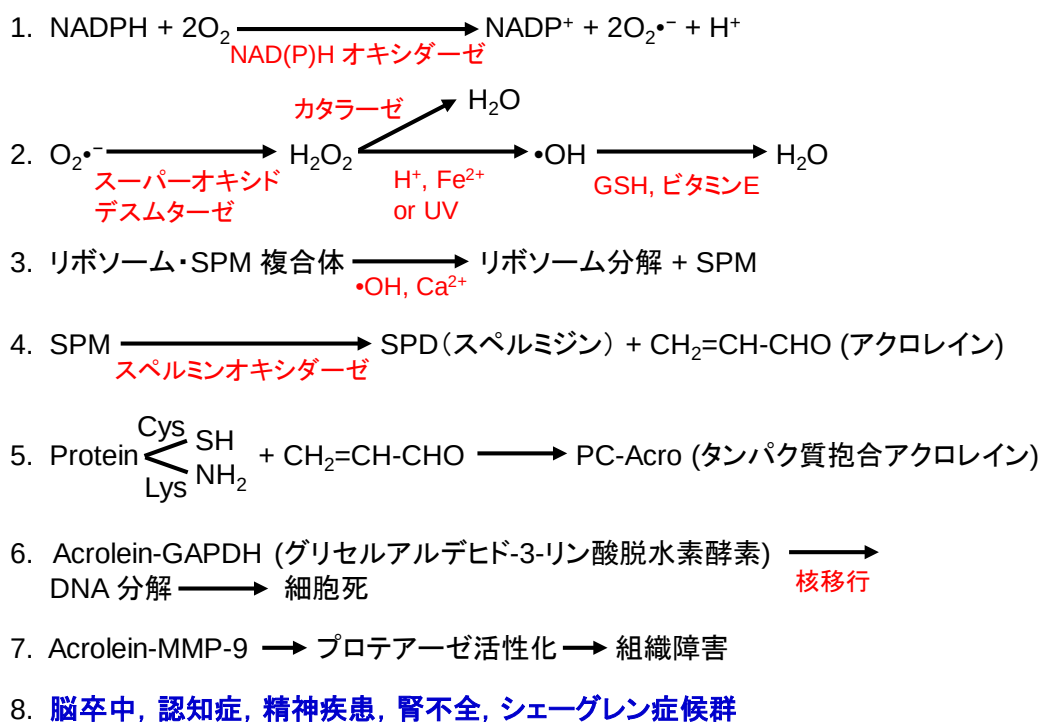


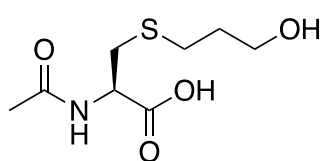
図6 スペルミン (SPM) から産生されるアクロレインによる細胞障害

1. 認知症尿中バイオマーカーに特異的な抗体の作製における課題への対応

【1-1】抗体作製のための化合物等の合成

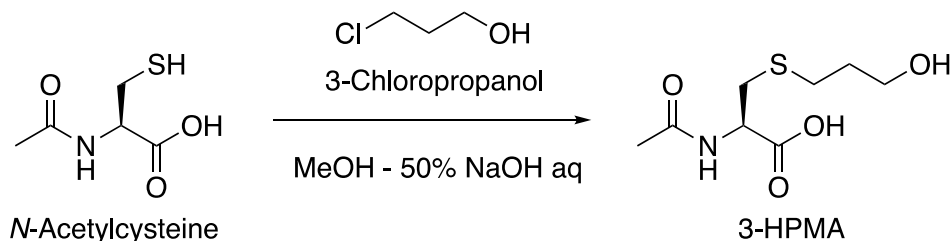
抗体作製の3-HPMAとその類縁化合物であるCEMA (carboxyethylmercapturic acid) の合成に成功した。この3-HPMAをウサギアルブミンに結合させ、抗原とし、3-HPMAに対するポリクローナル抗体並びにモノクローナル抗体作製に成功した。3-HPMAのELISA測定法がほぼ完成したので、抗体の特異性を検討する為に、CEMAが抗体に認識されない事を確認する。以下に、3-HPMAとCEMAの合成法を記す。

・3-HPMAの合成

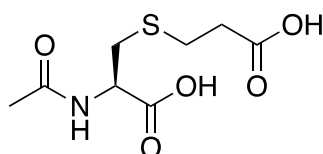


N-アセチルシステインをメタノール-50% 水酸化ナトリウム水溶液中アルゴン、加熱還流下3-クロロプロパノールと反応させた。反応の後処理後、得られた粗生成物をクロマトグラフィー（シリカゲル、DIOL）により繰り返し精製し、3-HPMAを得た。

参考文献 C. S. Perry et al., *Toxicol. in Vitro*, **9**, 21 (1995)



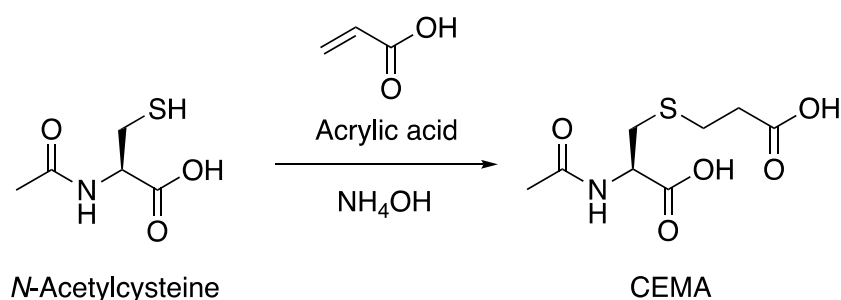
・CEMAの合成



N-アセチルシステインとアクリル酸を、アンモニア水中、アルゴン下、遮光して室温にて長時間反応させた。反応の後処理後、得られた粗生成物をクロマトグラフィー（シリカゲル、DIOL）

により精製し、CEMA を得た。

参考文献 K. Ramu et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**, 487 (1996)



【1－2】低分子バイオマーカー検出のための特異性の高い抗体の作製

初期段階で 3-HPMA が抱合する蛋白質として、アルブミンと KLH (keyhole limpet hemocyanin) を比較した。その結果、3-HPMA 抱合アルブミンの方が、3-HPMA 抱合 KLH より、抗原として有効に機能したので、現時点では 3-HPMA 抱合アルブミンを抗原として使用している。

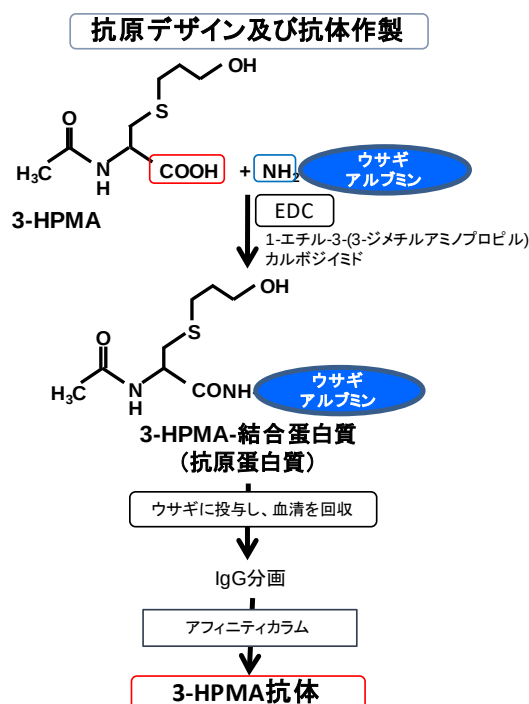


図7 3-HPMA 抗体の作製

この抗原を用いて以下のスケジュールでポリクローナル抗体を作製した。

免疫スケジュール

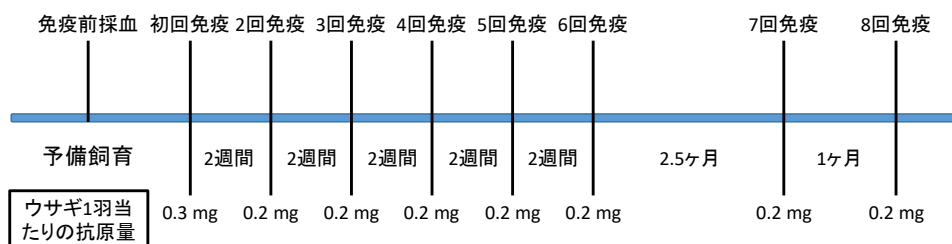


図8 3-HPMA ポリクローナル抗体作製

【1-3】バイオマーカー測定法の最適化

アミンファーマ研究所は、これまでに低分子の抗原として、蛋白質中のアクロレイン抱合リジンの ELISA 測定法の最適条件を検討した。その結果を反映して、今回 3-HPMA 測定法の至適条件を決定した（図3参照）。

この抗体では 3-HPMA 1~10 μM で直線性を示し、脳梗塞患者の尿を用いて、3-HPMA を測定したところ、有意の差で尿中 3-HPMA が減少していた（図9）。

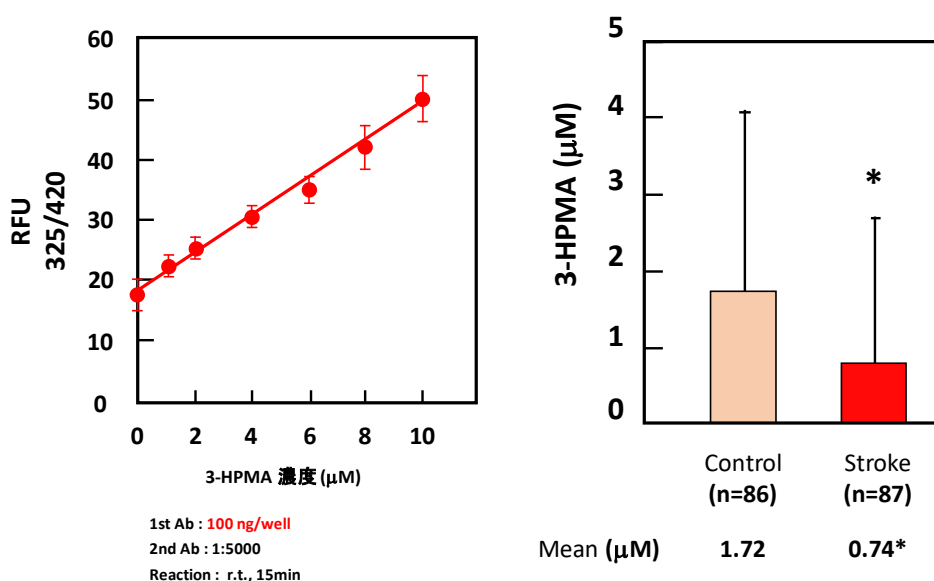


図9 3-HPMA 抗体を用いた 3-HPMA の濃度測定

また、これまでアクロレインは不飽和脂肪酸から産生されると考えられていたが、図9に示すように脳梗塞患者の尿中ではプトレスシン（PUT）の増加とスペルミン（SPM）の減少、並びに PUT/SPM 比とスペルミジン（SPD）/SPM 比の有意な上昇が認められることから、アクロレインは細胞増殖因子ポリアミン中のスペルミンから産生されることが明らかとなった。

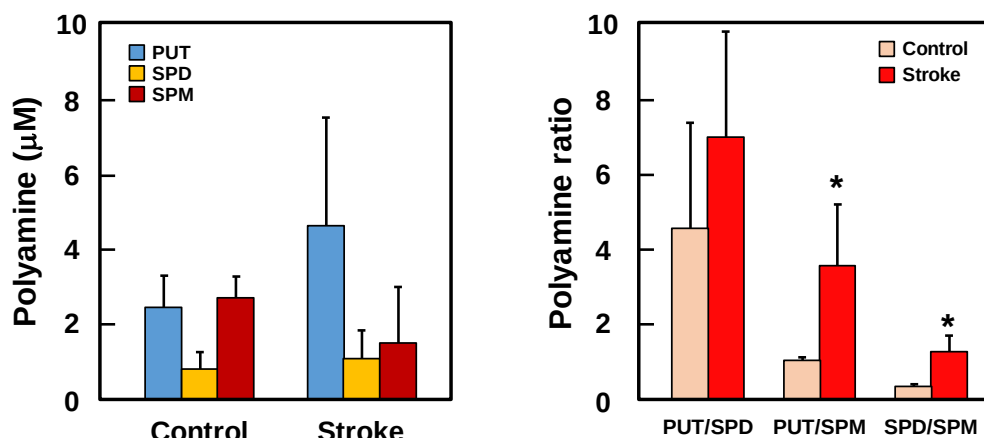


図 10 脳梗塞患者尿中ポリアミン量の比較

2. 尿夾雑物の影響を排除する ELISA 測定法の確立における課題への対応

【2-1】尿の前処理法確立とバイオマーカー測定の精度検証

尿を pH4.7 という酸性条件下、アルブミンで処理すると、3-HPMA がアルブミンに効率よく抱合し、抗体が出来やすい、3-HPMA-アルブミン抱合体の抗原を得ることが出来た。

この 3-HPMA-アルブミン抱合体を抗原として、ポリクローナル抗体並びにモノクローナル抗体の取得に成功した。現在、この 2 種の抗体の大量作製を業者に依頼している処である。この精製抗体を用い、1～2 年後に尿による認知症重症度判定の事業化を行う。

【2-2】尿中バイオマーカー値の補正と検証

尿は採取時の濃度が変化しやすい為、3-HPMA/Cre 量として測定した。Cre (クレアチニン) により補正すると、3-HPMA/ml urine より精度の高い数値が得られた。それは、Cre が、認知症、脳梗塞患者の尿で上昇傾向にあるためであった。この Cre の上昇の機序についても現在検討中である。

【2-3】認知症判断用マーカーとしての有用性の検証

アミンファーマ研究所はこれまでに、もう1種の尿中バイオマーカーであるAC-Acro量の低下が、MMSEの低下と良く相関する事を見出している(図11)。AC-AcroとMMSEの相関は、血漿中のバイオマーカーである $A\beta_{40/42}$ とMMSEの相関よりも優れていた(図11)¹⁾。3-HPMAは、同様にMMSEの低下と良く相関していた(論文作成中)。従って、2種のバイオマーカーを測定する事により、認知症重症度をよく評価できると考えている。認知症を初期の段階で見出し、治療する事により、高齢者のQOL維持に貢献したい。

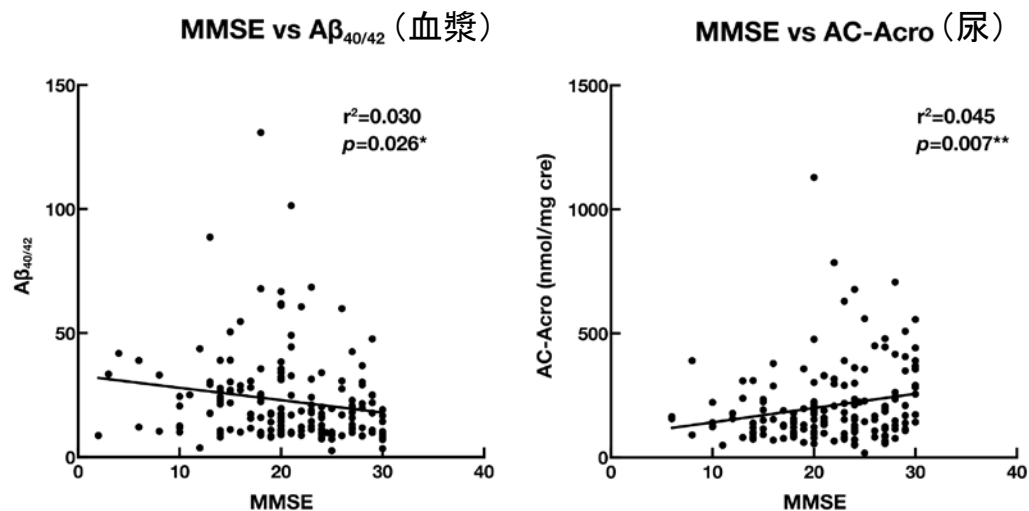


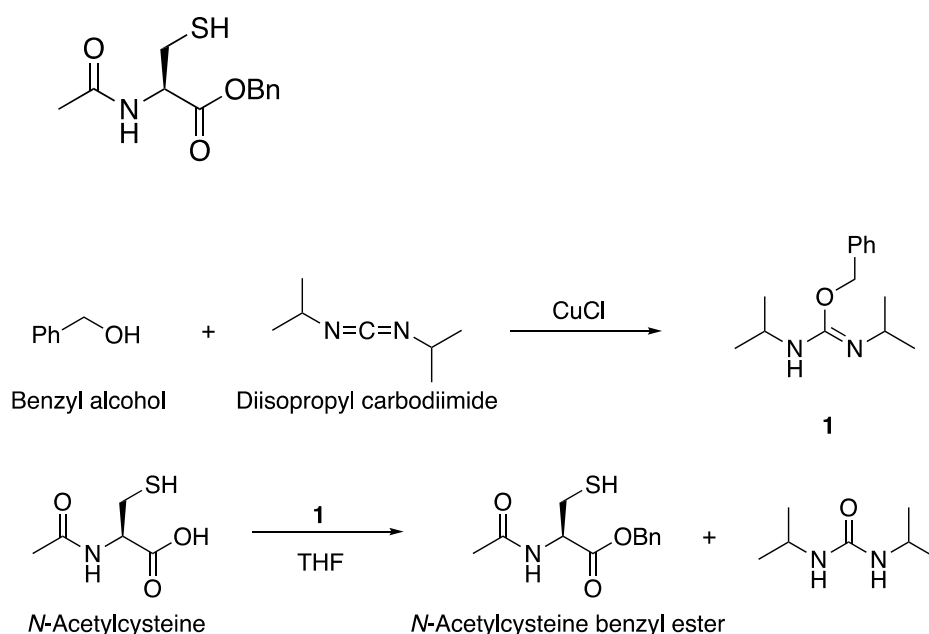
図 11 血漿中 $A\beta_{40/42}$ 及び尿中AC-AcroのMMSE (mini mental state examination) との相関

3. 分子レベルのバイオマーカーの有効性解析と測定キットの検証における課題への対応

【3-1】有効性解析のための化合物等の合成

アクロレインの毒性解除化合物として、*N*-アセチルシステインの誘導体である *N*-アセチルシステイン メチルエステル、*N*-アセチルシステイン エチルエステル、*N*-アセチルシステイン プロピルエステル、*N*-アセチルシステイン ブチルエステル、及び *N*-アセチルシステイン ベンジルエステルを合成した⁶⁾。以下に *N*-アセチルシステイン ベンジルエステルの合成法を示す。

・*N*-アセチルシステイン ベンジルエステルの合成



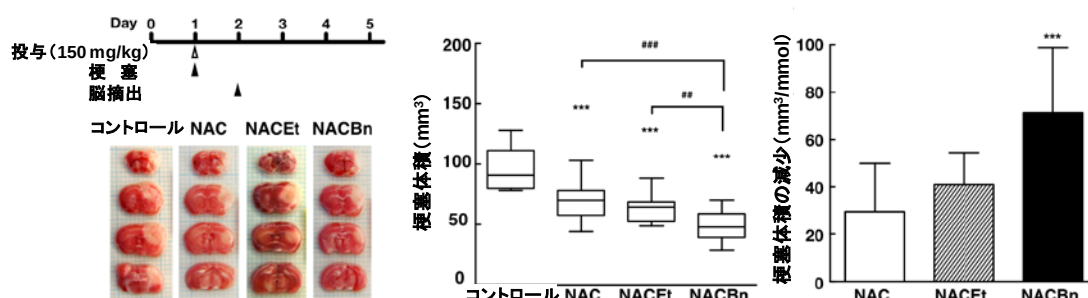
ベンジルアルコールとDIC (diisopropyl carbodiimide) を塩化銅存在下、アルゴン下、室温にて反応させ、得られた粗生成物をクロマトグラフィー(Al₂O₃)にて精製し、ベンジル化試薬 **1** を調製した。続いてベンジル化試薬 **1** を *N*-アセチルシステインの THF (tetrahydrofuran) 溶液に加え、アルゴン下、室温にて反応させた。反応の後処理後、得られた粗生成物をクロマトグラフィー (シリカゲル) により繰り返し精製してから、結晶化を行うことで、*N*-アセチルシステイン ベンジルエステルを得た。

参考文献 M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, **45**, 3131 (1980)

【3-2】認知症モデルマウスおよび培養細胞を用いた分子レベルの有効性解析

【3-1】で合成した *N*-アセチルシスチン誘導体を用いて、脳梗塞モデルマウスを用いて、脳障害抑制効果を検討した。*N*-アセチルシスチン (NAC)、*N*-アセチルシスチン エチルエステル (NACEt) 及び *N*-アセチルシスチン ベンジルエステル (NACBn) では、梗塞作製時に 150 mg/kg を同時投与すると脳梗塞縮小効果が認められ、更に、*N*-アセチルシスチン ベンジルエステル (NACBn) では、50 mg/kg を 4 日間前投与したところ、脳梗塞体積が有意に縮小し、予防効果が認められた (図 12) ⁶⁾。

A. 単回投与による脳梗塞縮小効果



B. 脳梗塞の予防効果

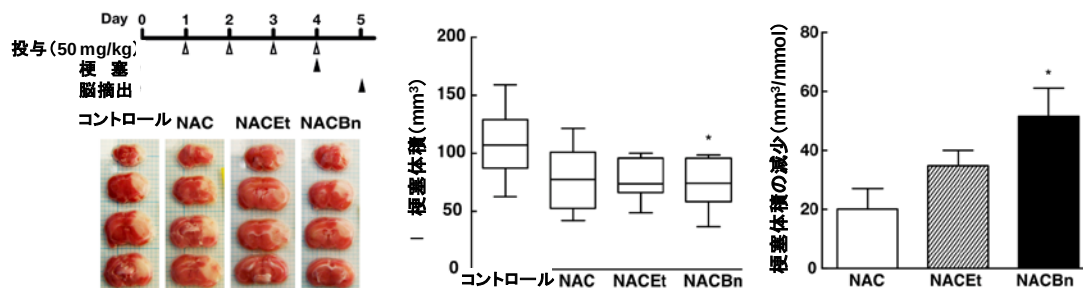


図 12 *N*-アセチルシスチン誘導体による脳梗塞縮小及び予防効果

N-アセチルシスチン ベンジルエステルが、脳に多く取り込まれ、最も強い脳障害抑制効果が認められるが細胞培養レベルで非常に弱い、副作用が認められる。

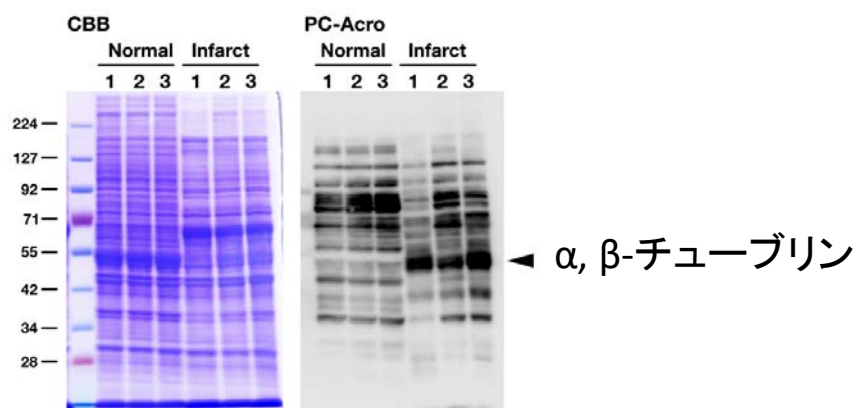
これらの脳障害抑制効果と、副作用を検討し、最も有効な *N*-アセチルシスチン誘導体をアクロレイン解毒剤として開発する。

更に *N*-アセチルシスチン誘導体のアクロレイン毒性解除能と副作用を細胞培養レベル並びに動物実験レベルで解析した。これまでの予試験では、*N*-アセチルシスチン プロピルエステルと *N*-アセチルシスチン ブチルエステルが最も有効、かつ副作用の少ないアクロレイン解毒剤であり、脳に蓄積する事が判明している (論文作成中)。

また、神経機能発現に及ぼすアクロレインの毒性について検討した ⁷⁾。神経の樹状突起伸長に關与する α , β -チューブリンが脳梗塞モデルマウスの脳梗塞巣において強くアクロレイン化された (図 13)。 α , β -チューブリンのアクロレイン化アミノ酸残基を液体クロマトグラフィー質量分析

法 (LC-MS/MS) により同定したところ、 α -チューブリンの Cys25, 295, 347, 376 及び、 β -チューブリンの Cys12, 129, 211, 239, 303, 354 の計 10 個のシステイン残基がアクロレイン化を受けた (図 13)。

A. 梗塞巣でアクロレイン化される蛋白質



B. α , β -チューブリンのアクロレイン抱合アミノ酸残基

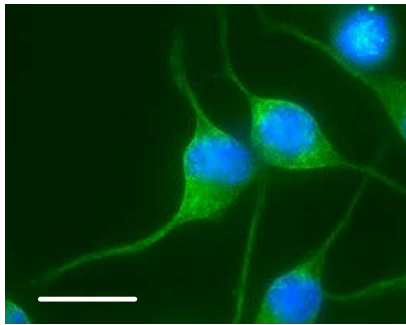
Position	Peptide sequence	Acrolein modification	Observed Mr (Charge)	Calculated Mr (Charge)
α-tubulin				
22 - 32	ELY C LEHGIQP	N-terminal	670.3207 (2+)	670.3212 (2+)
290 - 296	EITNA C F	N-terminal	418.1866 (2+)	418.1864 (2+)
345 - 366	DW C PTGFKVGINYQPPTVWPGG	N-terminal	1185.5775 (2+)	1185.5830 (2+)
367 - 385	DLAKVQRAV C MLSNTTAIA	N-terminal	681.6947 (3+)	681.6957 (3+)
β-tubulin				
3 - 19	EIVHIQAGQ C GNQIGAK	N-terminal	601.9785 (3+)	601.9772 (3+)
128 - 156	D C LQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLISKIR	N-terminal	995.8450 (3+)	995.8477 (3+)
209 - 223	D C FRTLKLTTPTYG	N-terminal	589.6441 (3+)	589.6430 (3+)
224 - 248	DLNHLVSATMSGVTT C LRFPGQLNA	N-terminal	895.1151 (3+)	895.1159 (3+)
295 - 303	DAKNMMAA C	N-terminal	992.3943 (1+)	992.3998 (1+)
327 - 354	DEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKTAV C	N-terminal	1103.5228 (3+)	1103.5287 (3+)

図 13 梗塞巣におけるアクロレイン化蛋白質とアクロレイン抱合アミノ酸の同定

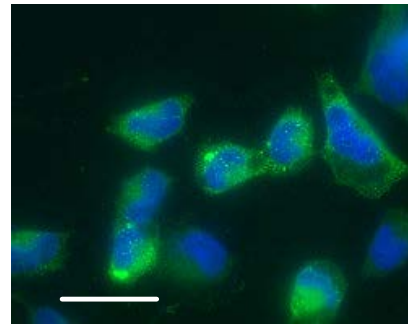
これらのアミノ酸残基は主として α -チューブリンと β -チューブリンの相互作用部位に存在しており、アクロレイン化に依り、 α -チューブリンと β -チューブリンによる微小管形成が阻害されることが明らかとなった。マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞をアクロレインで処理すると、アクロレイン添加により、神経突起形成が著しく阻害され、脳梗塞モデルマウスの脳組織でも同様の変化が観察された (図 14)。

A. Neuro2a細胞

None



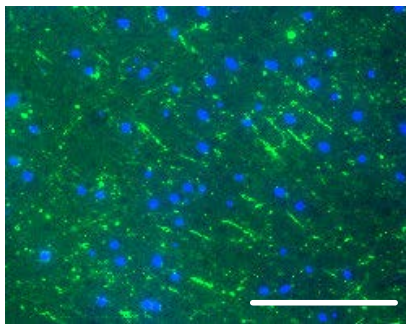
10 μ M Acrolein



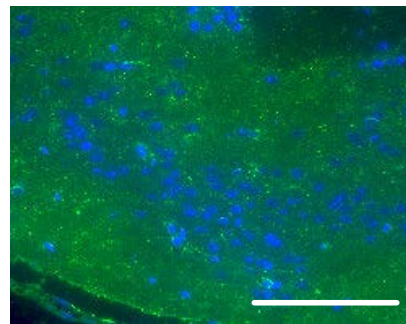
Bar = 10 μ m

B. 脳組織

正 常



梗 塞



Bar = 100 μ m

図 14 マウス Neuro2a 細胞におけるアクロレインによる微小管構造の変化 (A)
並びに脳梗塞モデルマウスの梗塞による形態変化 (B)

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

1. 認知症尿中バイオマーカーに特異的な抗体の作製における課題への対応

3HPMA に特異性の高い抗体は、研究開発終了後の事業化を考え、十分な感度と直線性を示すモノクローナル抗体を取得することを目指した。しかし、低分子化合物に対するモノクローナル抗体の取得が難しく、過去にも得られなかった経験があり、モノクローナル抗体作成と並行してポリクローナル抗体の精製などにより事業化での ELISA 測定の使用に耐える感度と直線性を示す抗体を得た。目標とする測定感度、直線性を示すモノクローナル抗体は、検討を重ねた結果、サポイン事業の最終年度で得られ、現在、活性の高いモノクローナル抗体細胞の大量培養を進め、精製して十分な抗体の感度が得られるかどうか検討できる段階に達した。

バイオマーカー測定法の最適化については、3-HPMA 抗体の反応性を検討し、蛍光法で良い結果が得られ、3-HPMA を固定化する技術も安定した結果が得られるようになった。また、ロット内再現性、ロット間再現性、日差再現性の変動係数 CV 値も目標としたレベルを達成した。さらに、測定のスループットにおいても、目標より早いスループットが可能となった。認知症検査サービスの試算も、画像診断コストの 1/3 は十分に達成できる見込みがついた。

2. 尿夾雑物の影響を排除する ELISA 測定法の確立における課題への対応

尿中には非常に夾雑物が多い為、尿の希釈率並びに ELISA 測定の為の至適 pH の検討を行い、種々条件を変化させ、ELISA 測定の最適化を検討した。その結果、抗原抗体反応を酸性で行うと、夾雑物の影響が少なくなることが分かった。そして、3-HPMA をウサギアルブミンに結合させ、抗体と反応させると、尿中の夾雑物の影響を排除することができた。精製したポリクローナル抗体では、感度良く測定が可能であり、目標値を満たす測定が可能となった。最終的に得られる感度の良い抗体を用いて、3-HPMA の ELISA キットによる測定の最終確認を行い事業化に向けた測定法を完成させる。

尿中バイオマーカー値の補正と検証については、Cre も、認知症患者群で上昇傾向が認められたので、3-HPMA/Cre の方が 3-HPMA に比べ、認知症重症度と相関する事が明らかとなり、3-HPMA/Cre をマーカーとする事とした。3-HPMA と同様なアクロレイン代謝物である AC-Acro も、認知症で低下する事が明らかとなった。従って、バイオマーカーとして 3-HPMA と AC-Acro を併用すると、認知症重症度評価の精度が上昇し、3-HPMA を 3-HPMA/Cre にすると検出精度が良くなり、同時に AC-Acro/Cre を測定するとさらに検出精度が高くなり、4 群（健常者群、認知症予備群、軽度認知症患者群、アルツハイマー病患者群）の認知症重症度が検出可能となった。

3. 分子レベルのバイオマーカーの有効性解析と測定キットの検証における課題への対応

培養細胞および動物を用いた分子レベルでのバイオマーカーの有効性解析を行い、アクロレイン毒性除去機構を解析した。解析にはリアルタイム定量 PCR 装置、生物顕微鏡等の機器を用いて多方面

からの検討を行った。培養細胞レベルでは、化合物が如何にしてアクロレインの毒性を除去するか、その機序を解析した。最初にアクロレインによる細胞の形態学的変化の結果を解析したところ、神経突起の伸長がアクロレインにより阻害されることが分かった。次に、認知症患者の80%以上に小さい無症候性脳梗塞が認めらるので、動物モデルを用いて、N-アセチルシステイン誘導体の脳梗塞縮小効果を検討したところ、縮小効果は N-アセチルシステイン ベンジルエステル>N-アセチルシステイン エチルエステル>N-アセチルシステインの順であり、PC-Acro 量も脳梗塞巣の縮小効果と相関して減少した。そのメカニズムとして、N-アセチルシステイン誘導体が、グルタチオン S-トランスフェラーゼを安定化し、グルタチオンとアクロレインとの反応を速やかに行うためであることを見出した。また、それらの詳細な検討により、アクロレインによる細胞障害は、現在考えられている活性酸素より10倍以上強く、以下のメカニズムで脳障害を起こすことを見出した。

【1】GAPDH（グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素）がアクロレイン化されると、GAPDH が細胞質から核に移行し、アポトーシスを起こす。

【2】MMP-9（マトリックスメタロプロテナーゼ-9）を活性化し、細胞を不活化する。

【3】チューブリン、ビメンチンがアクロレイン化されることに依り、細胞骨格が変化し、ニューロンの構造が大きく変化する。

これらの脳障害の機序が解明でき、アクロレインのバイオマーカーとしての有用性が検証できた。さらに、N-アセチルシステイン誘導体を用いたバイオマーカーの有効性解析を行う中で、これらのシステイン誘導体は、長期間服用可能な抗認知症薬としても非常に有望と考えている。

以上、認知症重症度診断の尿中バイオマーカーとして、尿中の3-HPMA 並びに AC-Acro の定量はこれからの高齢者のQOL（quality of life）維持にとっても役立つと考えられる。また、アクロレインの毒性機序の研究で見出した、ニューロンの軸索の縮小も、アクロレインの毒性の一端を明らかにしたもので、今後役立つと思う。

3-2 事業期間終了後の課題

AC-Acroに加え、3-HPMAの研究は、2020年以内に終了する予定である。従って、尿中バイオマーカーによる認知症のリスク評価事業を2021年から開始の予定である。

また、本事業における派生技術、認知症並びに脳梗塞予防薬としてのN-アセチルシステイン誘導体の開発は、製薬会社と共同で行い、医薬品としての認可を目指す。N-アセチルシステイン誘導体は副作用が少なく、長期間にわたり服薬が可能である。

3-3 事業化に向けた今後の展開

想定する国内、海外市場

現在日本には462万人以上の認知症患者が存在し、高齢化社会が進むにつれその数が増加し、約10年後の平成37年には700万人を超えると考えられている（認知症施策推進5か年計画（オレンジプラン））。海外の認知症患者は4,680万人で（世界アルツハイマー報告書2015）国内の約10倍と

なり患者数は増加傾向にある。そこで、認知症予備群を早期に発見し、重症化を防ぐ事は高齢者の健康寿命維持にとって非常に重要である。今回計画通りに「尿中バイオマーカー」の成果が得られると、血液バイオマーカーと併用する事により、健常者、認知症予備群、軽度認知症患者、アルツハイマー病患者を精度良く分別出来、認知症予備群が認知症患者とならないような適切な処置を行う事が可能となる。

(株)アミンファーマ研究所が既にサービスとして提供している「脳梗塞リスク評価」は、全国 200 ヶ所以上の医療機関並びに複数の健康保険組合等で導入されている。この「脳梗塞リスク評価」を実施している人間ドック、健診、病院、検査会社等からは、社会的に重要さが増してきた「認知症」のリスク評価が出来ないかという要望が寄せられている。尿を検体とすると更にベネフィットがある。

高齢化社会となり、その中にあって認知症への対応は大きな社会問題として近年クローズアップされてきている。診断も容易でなく、徘徊や事故に対する家族の責任範囲の問題も出てきている。病院などで、医師がMRIなどで客観的な判断を得る前の入り口判断のために、簡便に、低コストで客観的な測定値が得られる測定キットが強く要望されている。

認知症診断ビジネスは、国内から開始し、海外展開も実施する予定である。血漿並びに尿の取得は、臨床検査会社と共同で行う。現在行っている「脳梗塞リスク評価」事業の血漿の取得は既にいくつかの臨床検査会社が関与しているので、比較的事業化はスムーズに展開できると考えている。

「脳梗塞リスク評価」事業に関しては、ある健康保険組合で継続して測定した結果、高リスク群の減少と脳梗塞発症率の減少が認められた(表 2 及び図 15)⁸⁾。「認知症リスク評価」事業も「脳梗塞リスク評価」事業のように高齢者の QOL 維持に貢献できることを願ってやまない。

表 2 脳梗塞リスク値測定による高値の割合減少

	受診者数	高値	境界値	低値
2012年	1,371人 (100%)	240人 (17.5%)	365人 (26.6%)	766人 (55.9%)
2013年	1,493人 (100%)	90人 (6.0%)	559人 (37.5%)	844人 (56.5%)
2016年	1,084人 (100%)	56人 (5.2%)	250人 (23.1%)	778人 (71.8%)
2017年	1,139人 (100%)	64人 (5.6%)	240人 (21.1%)	835人 (73.3%)
2018年	1,233人 (100%)	69人 (5.6%)	276人 (22.4%)	888人 (72.0%)

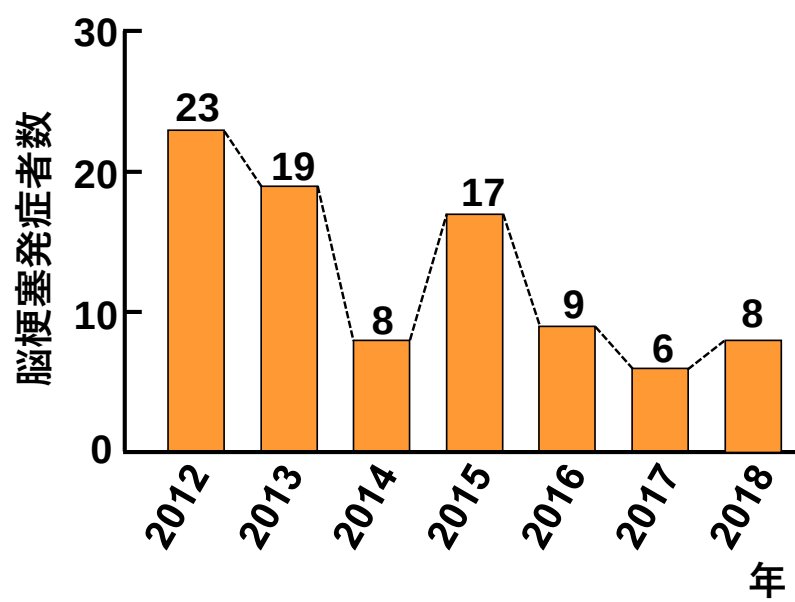


図 15 脳梗塞リスク値測定による脳梗塞発症者の減少

補足資料

<参考文献>

1. Waragai, M., Yoshida, M., Mizoi, M., Saiki, R., Kashiwagi, K., Takagi, K., Arai, H., Tashiro, J., Hashimoto, M., Iwai, N., Uemura, K., and Igarashi, K.: Increased protein-conjugated acrolein and amyloid- $\beta_{40/42}$ ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 32, 33-41 (2012)
2. Yoshida, M., Higashi, K., Kuni, K., Mizoi, M., Saiki, R., Nakamura, M., Waragai, M., Uemura, K., Toida, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Distinguishing mild cognitive impairment from Alzheimer's disease with acrolein metabolites and creatinine in urine. *Clin. Chim. Acta* 441, 115-121 (2015)
3. Igarashi, K., Uemura, T., and Kashiwagi, K.: (Invited review) Assessing acrolein for determination of the severity of brain stroke, dementia, renal failure and Sjögren's syndrome. *Amino Acids* 52 (2), 119-127 (2020)
4. Yoshida, M., Higashi, K., Kobayashi, E., Saeki, N., Wakui, K., Kusaka, T., Takizawa, H., Kashiwado, K., Suzuki, N., Fukuda, K., Nakamura, T., Watanabe, S., Tada, K., Machi, Y., Mizoi, M., Toida, T., Kanzaki, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP. *Atherosclerosis* 211, 475-479 (2010)
5. Igarashi, K., Yoshida, M., Waragai, M., and Kashiwagi, K.: (Invited review) Evaluation of dementia by acrolein, amyloid- β and creatinine. *Clin. Chim. Acta* 450, 56-63 (2015)
6. Uemura, T., Watanabe, K., Ko, K., Higashi, K., Kogure, N., Kitajima, M., Takayama, H., Takao, K., Sugita, Y., Sakamoto, A., Terui, Y., Toida, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Protective effects of brain infarction by *N*-acetylcysteine derivatives. *Stroke* 49, 1727-1733 (2018)
7. Uemura, T., Suzuki, T., Ko, K., Watanabe, K., Dohmae, N., Sakamoto, A., Terui, Y., Toida, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Inhibition of dendritic spine extension through acrolein conjugation with α -, β -tubulin proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 113, 58-66 (2019)
8. Uemura, T., Kanzaki, T., Ishizawa, K., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Decrease of patients with brain infarction through evaluation of relative risk value of brain infarction by measurement of protein-conjugated acrolein, IL-6 and CRP in plasma together with age.

＜特許＞

1. 特許登録：第 6074685 号（2017 年 1 月 20 日）. 五十嵐一衛, 柏木敬子, 吉田円, 溝井睦美, 斎木遼太郎. 3-HPMA を指標とした脳卒中及び／又は脳梗塞の判定方法
2. 特許登録：第 6478268 号（2019 年 2 月 15 日）. 五十嵐一衛, 吉田円. 尿中のアクロレイン代謝物及びクレアチンを指標とする認知機能障害の検査方法