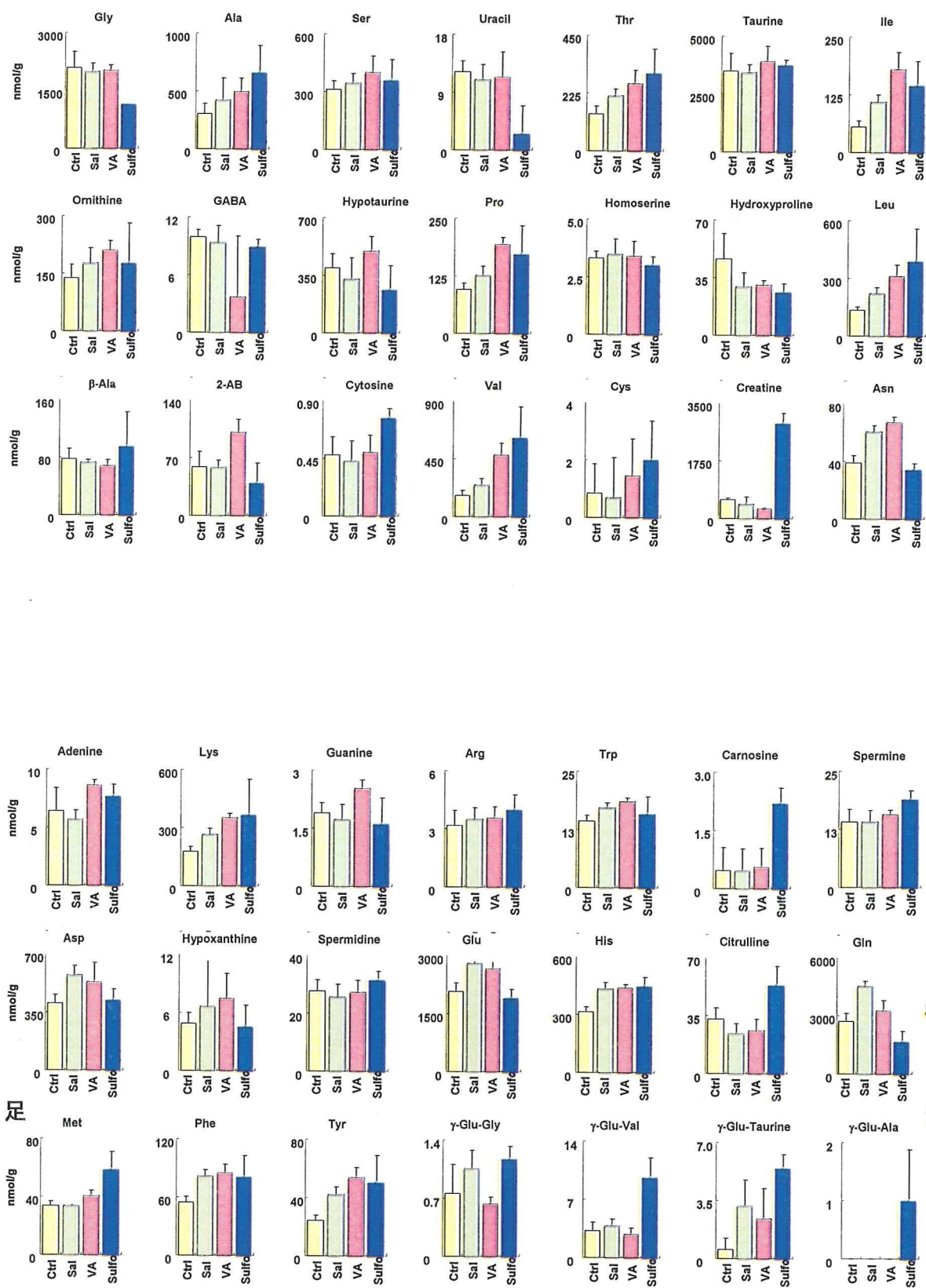
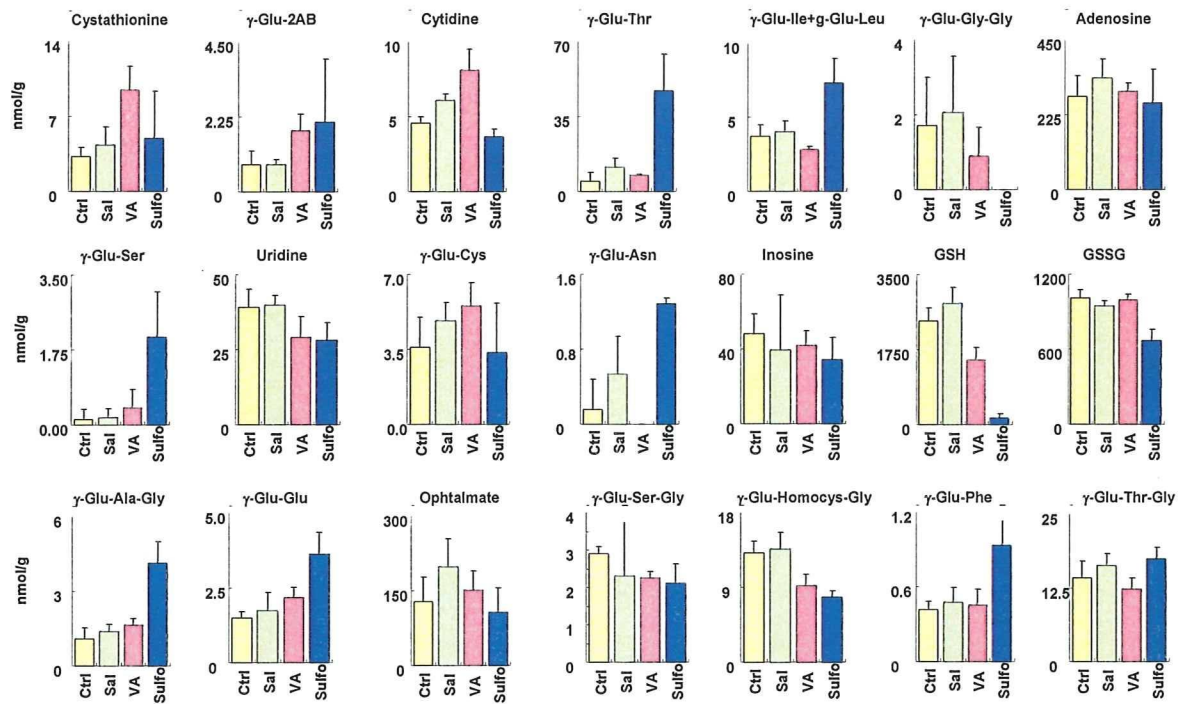


補足資料



料図 1-1 何も投与しないマウス、Saline, Sulphoraphane、Valproic acid 投与マウスの肝臓の各代謝物質の定量結果



補足資料図 1-2 何も投与しないマウス、Saline, Sulphoraphane、Valproic acid 投与マウスの肝臓の各代謝物質の定量結果

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の
有害性評価手法の開発に関する研究

平成 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義 (慶應義塾大学環境情報学部)

平成 21 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の有害
性評価手法の開発に関する研究 41

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 94

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

メタボローム解析およびバイオマーカーを用いた化学物質の
有害性評価手法の開発に関する研究

主任研究者 曾我朋義 慶應義塾大学 環境情報学部 先端生命科学研究所 教授

研究要旨

これまでに本研究で開発してきたキャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）を用いたメタボローム解析法によって肝臓の解毒の主役であるグルタチオンの枯渇を示すバイオマーカーを発見した。このバイオマーカーを測定することにより、マウスに投与した親水性および疎水性の化学物質あるいはその代謝で生じた物質が毒性の高い親電子物質であることを評価するシステムを開発した。

A. 研究目的

化学物質は人類に多くの恩恵を提供するが、一部は予期せぬ被害をもたらす。ヒトの健康を傷害する原因には、生物的要因（細菌、ウイルス等）、物理的要因（放射線、熱、振動等）、化学的要因（各種化学物質）および社会心理的要因がある。従来化学的要因は軽視される傾向にあったが、近年の化学工業の発展に伴い、各種化学物質の主体に及ぼす様々な影響が重要視されるようになってきた。

化学物質の構造情報から毒性を予想する方法として定量的構造活性相関(QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship)手法が開発された。QSAR手法は、化学物質の構造と薬学的あるいは毒性学的活性との間に相関関係があることを利用して、計算化学を用いて構造的に類似した化合物の薬効や毒性を予測するものであり大変有用である。しかし、化学物質は生体内で代謝されて別の構造に順次変換されるため、代謝されたすべての代謝物質の構造を把握できない限り

QSAR 手法では代謝物の毒性を予測することはできない。

体内に取り込まれた化学物質の多くは肝臓で解毒的に代謝され、易溶性の代謝物となって排泄される。しかし、数万種類ともいわれる化学物質およびそれらの代謝物の毒性を確認できる評価手法は未だ確立されておらず、そのリスク評価システムの早急な構築が望まれる。

本研究では、化学物質の中で酸化活性毒性を持つ化合物を探索するリスク評価システムを開発する。化学物質自体あるいは代謝で生じた物質が親電子物質である場合は生体に酸化活性毒性を示す。しかし、親電子物質が少量であれば、肝臓等の組織に高濃度に存在するグルタチオン(GSH)の抱合によって、解毒、排泄される。しかし親電子物質が大量の場合はグルタチオンが枯渇し、親電子物質が細胞内に蓄積してタンパク質等の生体高分子と反応する。その結果、細胞の機能が攪乱され、薬剤性肝炎などの病態を惹起

することが知られている。

主任研究者らは、世界に先駆けてキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) によるメタボローム測定法を開発し、細胞内に存在する数百から数千種類の低分子代謝物の一斉分析に成功した。これまでに、マウスに解熱鎮痛薬アセトアミノフェン (APAP) を過剰に投与すると、肝臓内の代謝で生じた親電子物質 N-アセチルベンゾキノニンイミン (NAQPI) を解毒するグルタチオンが消費されること、グルタチオンが枯渇すると肝炎が惹起されること、グルタチオンの枯渇に反比例して肝臓および血中のオフタルミン酸が急増することを発見した (Soga, T. et al., *J. Biol. Chem.* 281, 16768-16776, 2006)。

その機序は以下の通りである。図 1 に示すようにグルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) とオフタルミン酸 (γ -Glu-2AB-Gly) は同じ酵素 γ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成

酵素によって生合成されるトリペプチドであり、基質がシステイン (Cys) か 2-アミノ酪酸 (2AB) の違いである。通常の還元状態では肝臓内にはグルタチオンが大量に存在し、最初の酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素がフィードバック阻害されている (図 1A)。したがって、オフタルミン酸はほとんど生合成されない。しかし、図 1B に示すように親電子物質 (NAQPI) が存在すると解毒のためにグルタチオンが消費される。グルタチオンの減少と共にフィードバック阻害が解除され、 γ -グルタミルシステイン合成酵素が活性化し、グルタチオンとオフタルミン酸が生合成される。グルタチオンは解毒のために消費されるが、オフタルミン酸は肝臓内に蓄積する。このように親電子物質が存在すると肝臓や血液のオフタルミン酸が増加するため、オフタルミン酸は親電子物質の存在を示すバイオマーカーとなる。

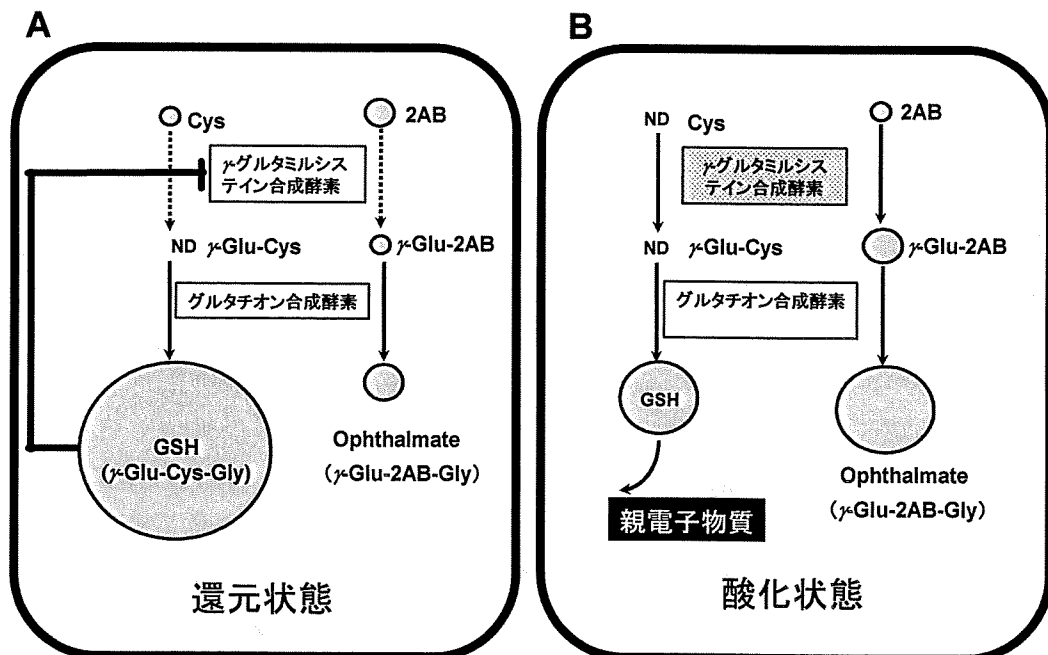


図1 親電子性の物質によって肝臓のオフタルミン酸が生合成されるメカニズム

平成 19 年度の本研究課題によって、親電子物質の解毒ためにグルタチオンが消費される際に、オフタルミン酸 (γ -Glu-2-Aminobutyl-Gly) のみならず、多くのアミノ酸 (X) から、グルタチオンを生合成する酵素 γ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素によって γ -Glu-X、 γ -Glu-X-Gly (X: アミノ酸) 等ペプチド類が肝臓内で生合成されること、ま

た生成された γ -Glu-X、 γ -Glu-X-Gly (X: アミノ酸) 等ペプチド類は MRP2、MRP3、MRP4 などの ABC トランスポーターによって血中に排出されることを発見した (図 2)。以上の結果からオフタルミン酸 (γ -Glu-2-Aminobutyl-Gly) を含めた γ -Glu ペプチド類は、投与物質あるいはその代謝物が親電子毒性を持つことを示すバイオマーカーになることを見出した。

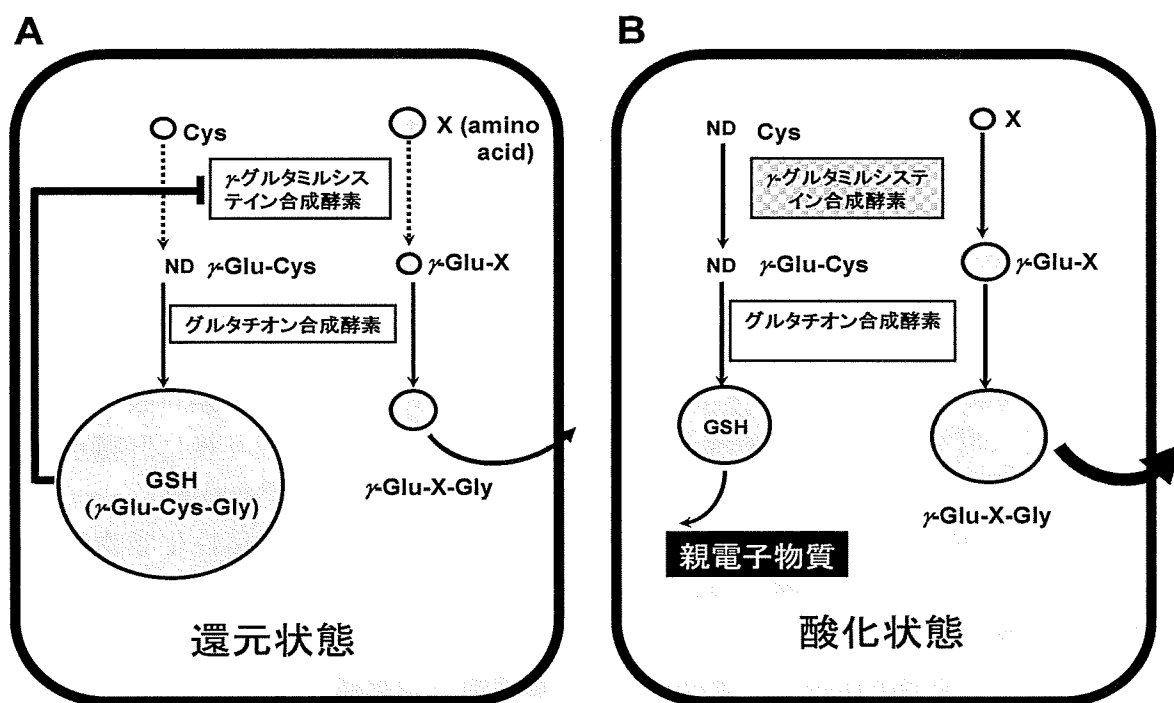


図2 親電子性の物質によって γ -Glu-Xペプチド類が生合成されるメカニズム

親水性の化学物質である acetaminophen (APAP)、diethylmalate (DEM), suforaphane 等に関しては腹腔内投与によって、肝臓内の γ -Glu ペプチド類の濃度が有意に増加し、このバイオマーカーによって親電子毒性を持つ物質を測定できることを立証した。

しかし、脂溶性化合物に関しては、溶媒である DMSO のみの投与で GOT、GPT などの肝機能の生化学値が上昇し肝毒性を示すことが判明した。

現在投与されている医薬品の多くは、脂溶性化合物であるため、平成 20 年度は、脂溶性物質自体あるいは代謝で生

じた物質が親電子性毒性であることを示す方法論の開発を行った。現在、数万種類存在するといわれる化学物質の毒性を確認できる評価手法は未だ確立されておらず、様々な毒性物質に対して、バイオマーカーによる正確で迅速な評価法を開発し、化学物質の毒性情報を提供すれば、国民の健康と環境への被害を未然に防ぐことが可能になる。

B. 研究方法

1) 培養細胞と γ -Glu ペプチドバイオマーカーを用いた化学物質の親電子毒性評価法の開発

平成 19 年度は、saline に溶解しない化学物質の溶媒として DMSO を用いたが、DMSO のみの投与でも何匹かのマウスが死亡した。マウスの血清の GPT

(glutamate pyruvate transaminase) も、DMSO の注入により 10 倍上昇したため、DMSO によって肝毒性が惹起されることが示唆された。そこで、平成 20 年度は、HepG2 (ヒト肝臓がん) の培養細胞を用いて、APAP を投与し、GSH の減少およびオフタルミン酸などの γ -Glu ペプチドバイオマーカーによる親水性および脂溶性化学物質の簡便な親電子毒性の探索法の基礎検討を行った。

HepG2 細胞を 10^5 個以上になるまで培養後、親水性化学物質は純水に、脂溶性化学物質は少量の DMSO に溶解し培地に添加した。一定時間後に細胞から代謝物質を抽出し CE-TOFMS で一斉分析した。まず、代謝物が親電子物質になる APAP を各種濃度で投与し、1-2 時間後にグルタチオンの減少、オフタル

ミン酸などの γ -Glu ペプチド類が有意に増加すれば、培養細胞のグルタチオン生合成経路がマウスの肝臓同様に働いていること、親電子物質によって γ -Glu ペプチド類が生合成されることが確認される。その後、種々の条件を検討し、培養細胞に親電子毒性を持つ各種の化学物質を投与し、グルタチオン、 γ -Glu ペプチド類の変動から投与物質の親電子毒性を評価する方法の開発を試みた。

2) 経口投与法および γ -Glu ペプチドバイオマーカーによる脂溶性化学物質の親電子毒性評価システムの確立

経口投与法を用いて、化学物質をマウスに投与し、メタボローム測定を行い、 γ -Gluペプチドなどの濃度の増減から、投与した化学物質あるいは代謝で生じた物質が親電子物質であるか予測する方法を検討した。経口投与する化学物質の量、経口投与後に肝臓から代謝物を抽出する時間を検討し、 γ -Gluペプチドなどによる脂溶性化学物質の親電子毒性の測定法を検討した。

倫理面への配慮

慶應義塾大学医学部動物実験委員会ですら定めた実験動物の愛護管理・実験プロトコールに関する指針に従い、実験マウスへの倫理的配慮は十分行う。水はいつでも飲めるようにする。マウスに苦痛を与えないように、化学物質の腹腔内注射や肝臓の摘出は麻酔後に行う。また、実験担当者へ化学物質が飛散、付着する危険を最小限に抑えるため、化学物質の使用量および実験回数は必要最小限に抑える。

C. 研究結果

1) 培養細胞と γ -Glu ペプチドバイオマーカーを用いた化学物質の親電子毒性評価法の開発

まず、DMEM で HepG2 細胞を 5×10^5 個まで培養後、APAP を 0 (コントロール)、0.003、0.03、0.3、3、30mM (IC_{50} 値) の各濃度を添加し、0、3、6、9、12 時間後の生細胞数の変化、およびグルタチオン、オ

フタルミン酸の変動を CE-TOFMS で測定した。しかし APAP を 30mM 添加しても、生細胞数 (図 3) やグルタチオン、オフタルミン酸の有意な変化は観察されず (補足資料図 1)、親電子物質を探索することができなかった。

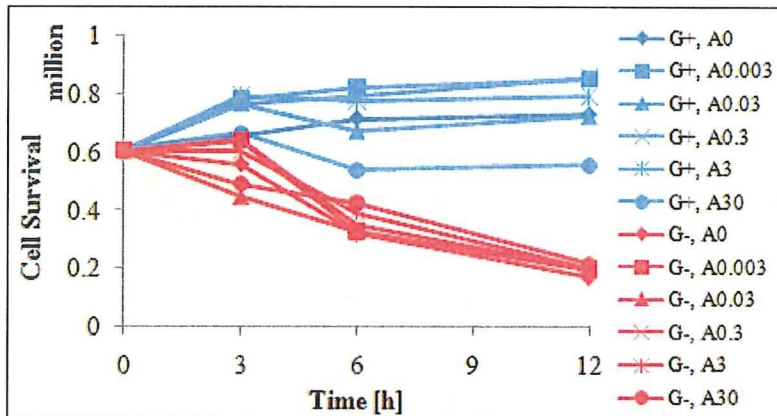
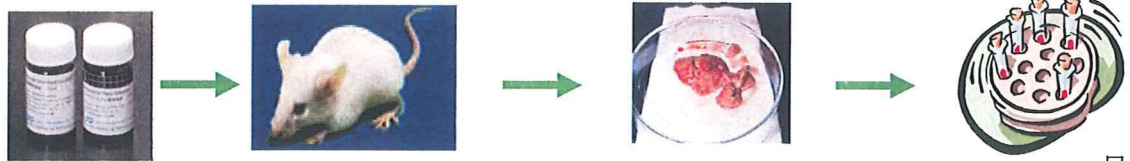


図 3 HepG2 細胞へ APAP を投与した時の生細胞数の経時変化

グルコース存在下 (G+) と非存在下 (G-) で 0-30mM の APAP (A0-A30) を培地に加えた。グルコース存在下では、若干の増殖阻害が見られたが、非存在下では細胞数への影響は見られなかった。

2) 経口投与法および γ -Glu ペプチドバイオマーカーによる脂溶性化学物質の親電子毒性評価システムの確立

溶解し、かつ肝毒性を示さない腹腔内投与を可能にする溶媒を見い出すことができなかった。そこで脂溶性化学物質を分散させて経



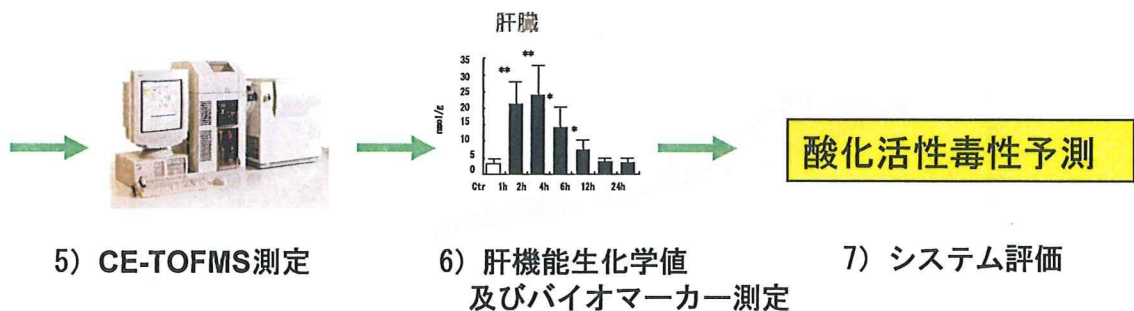
1) 化学物質
脂溶性物質を

2) 0.5% methylcelluloseに
分散し経口投与 (LD₅₀相当)

3) 肝臓摘出

4) 代謝物抽出
投与

する方法を検討した(図4)。



5) CE-TOFMS測定

6) 肝機能生化学値
及びバイオマーカー測定

7) システム評価

図4 経口投与法による親電子性の毒性評価システム

代謝物質が親電子物質になる Sulfamethoxazole, Metronidazole, Clozapine, 5-Amino-salicylic acid, APAP, それ自身が親電子物質である Sulforaphene, 肝毒性を示す Diclofenac に対して, 分散剤に使われるベニ花油、20% Hydroxypropyl β -cyclodextrin, 0.5% Methylcellulose 400 を用いて、各化学物質が溶解あるいは分散するか確かめた。その結果、0.5% Methylcellulose (MC) 400 のみが、全ての化学物質を溶解あるいは分散したため、この試薬を分散溶媒に用いることに決定した。

次に①0.5% MC400 水溶液(control)、②300mg/ml APAP-0.5%MC400 水溶液、③480 mg/ml- Metronidazole-0.5%MC400 水溶液、④12mg/ml Diclofenac-0.5% MC400 水溶液をマウスに経口投与後、1, 2, 4, 8 時間後に肝臓中の γ -Glu ペプチド類を含む90種類の代謝物質を研究代表者らが開発した最新のキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) で一斉に測定した(図5)。この方法の再現性を測定するため同様の実験を行ったが、結果は図5とほぼ同じであった。

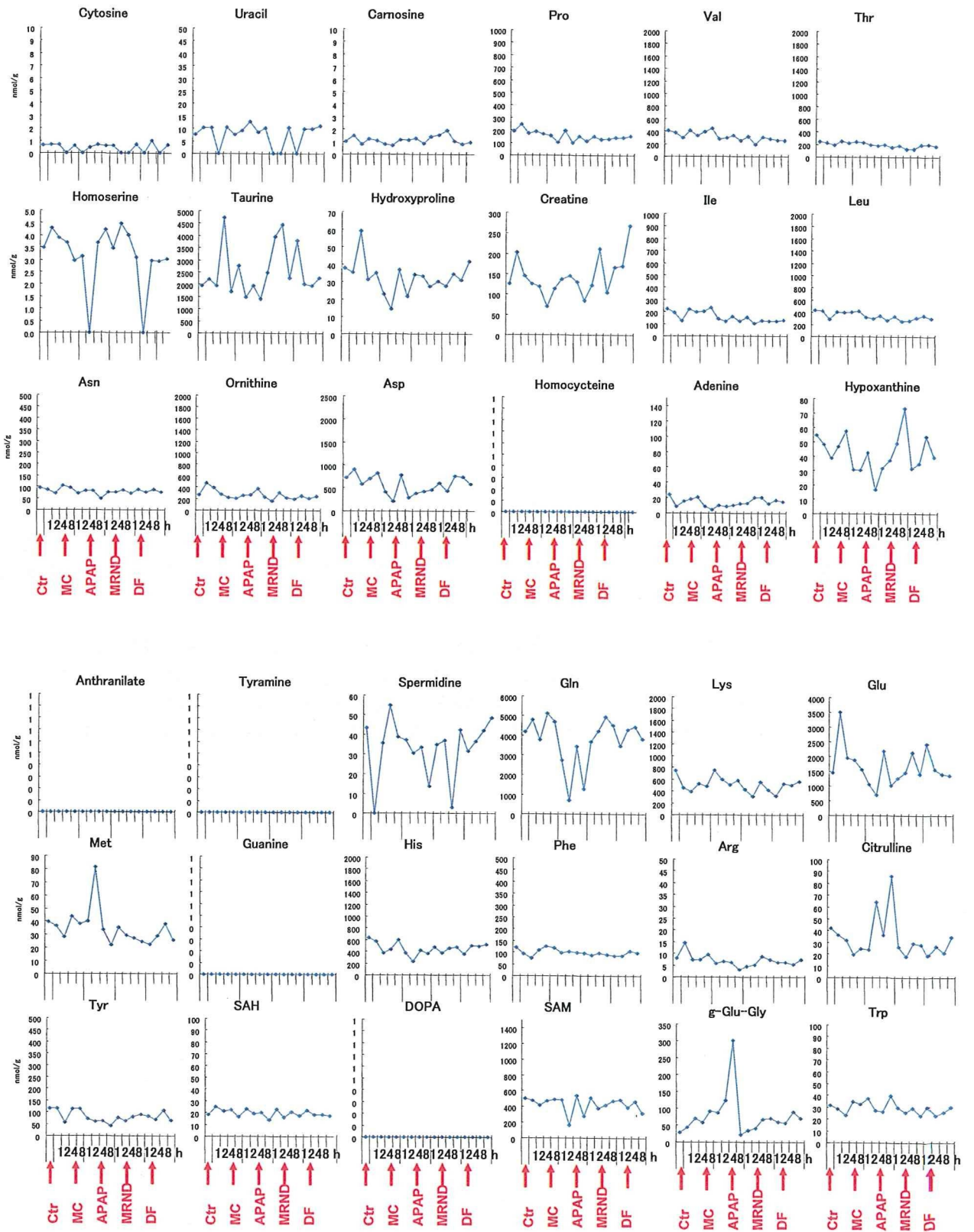


図5-2 各種化学物質をマウスに経口投与した時の肝臓内の各代謝物質の経時変化

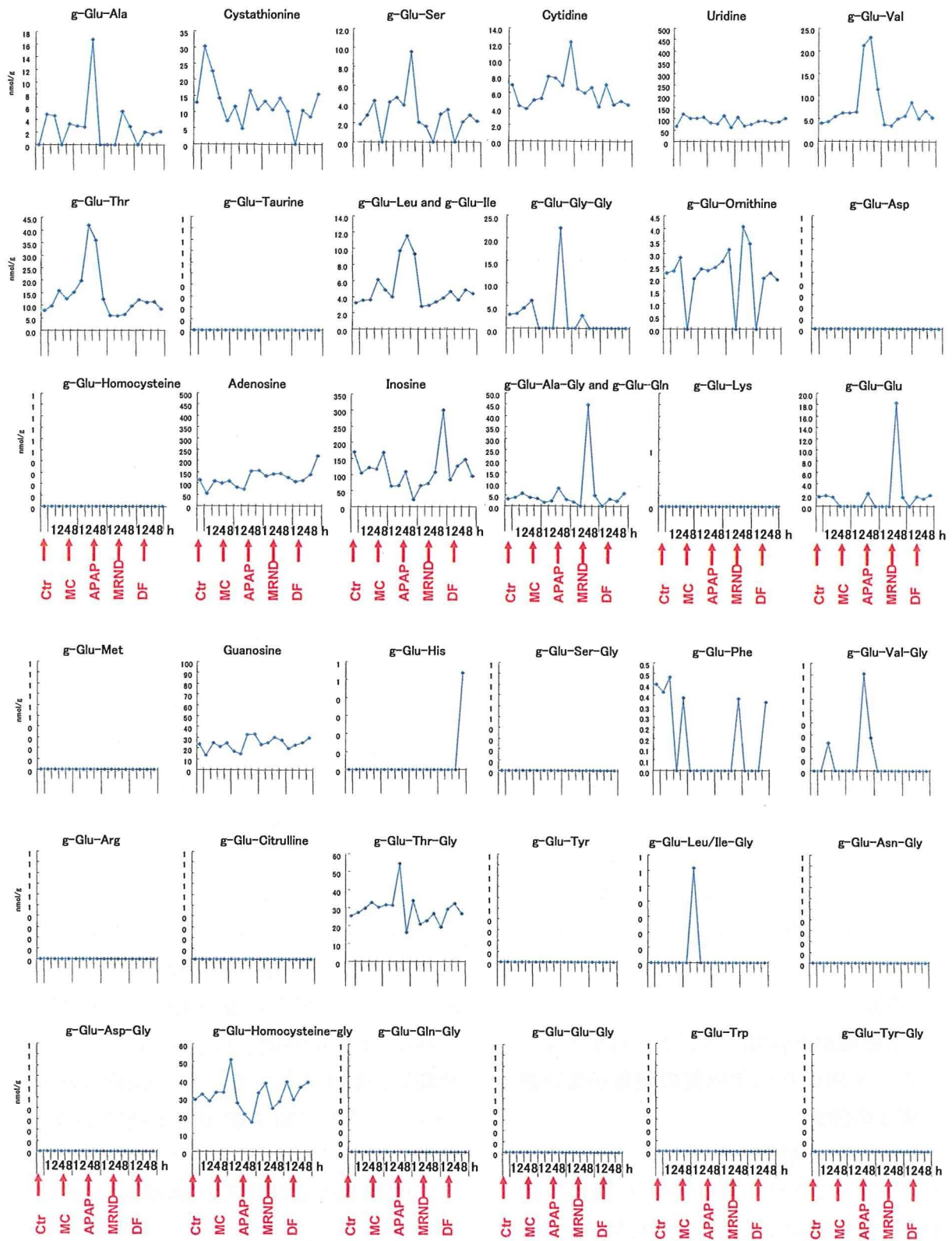


図5-3 各種化学物質をマウスに経口投与した時の肝臓内の各代謝物質の経時変化

図5に示したようにAPAP投与マウスは、肝障害を示す血液中の生化学値のGPT、GOTが2時間後に急増した。 γ -GTPは変動が観察されなかった。 γ -Gluペプチド類は、Ophthalmate(γ -Glu-2AB-Gly), γ -Glu-Gly, γ -Glu-Ala, γ -Glu-Ser, γ -Glu-Val, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Leu/Ile, γ -Glu-Gly-Gly, γ -Glu-Val-Gly, γ -Glu-Leu/Ile-Glyなどが2,4時間後に急増した。これらの γ -Gluペプチド類はAPAPの代謝で生じた親電子性物質によって惹起された肝障害時にグルタチオンの枯渇によって生合成されたと推察された。これらは、親電子物質を探索するための有力なバイオマーカー候補である。

一方、Metronidazole投与マウスは、肝障害を示す生化学値GOT、GPT、 γ -GTPの変動は観測されなかったが、Ophthalmate, γ -Glu-Ala-Gly/ γ -Glu-Gln, γ -Glu-Gluなどの γ -Gluペプチド類が4時間後に急増した。

しかし、Diclofenacに関しては、害を示す生化学値GOT、GPT、 γ -GTP及び γ -Gluペプチド類の変化は観察されなかった。

D. 考察

1) 培養細胞と γ -Gluペプチドバイオマーカーを用いた化学物質の親電子毒性評価法の開発

培養細胞と親電子物質検出マーカーである γ -Gluペプチド類を用いた簡便な親電子物質の探索システムの開発を試みた。しかし、HepG2細胞では文献等で示されているIC₅₀相当の高濃度のAPAPを培地に投与しても、生細胞数の急激な減少やグルタチオン、オフタルミン酸の有意な

増加は観察されなかった。

がん細胞は薬剤排泄能力が高いなど、代謝酵素やトランスポーターの働きが正常細胞とは異なっていることが知られており、グルタチオン、オフタルミン酸の定量値が変化しなかった原因は、使用した細胞がHepG2(肝臓がん細胞)であったことではないかと考えられる。最近、肝臓の正常細胞が入手できるようになった様子なので、平成21年度は肝臓の正常細胞を用いて本手法による親電子物質毒性の評価法が有用か試す予定である。

2) 経口投与方法および γ -Gluペプチドバイオマーカーによる脂溶性化学物質の親電子毒性評価システムの確立

脂溶性化学物質を経口投与するための分散剤としては、0.5%MC400水溶液が適していること、また化学物質の投与量は、マウスの経口の半数致死量であるLD₅₀値が多くて物質で最適であることが判明した。

また、APAPとMetronidazoleで示されたようにマウスに投与する化学物質の種類によって、親電子物質検出マーカーである γ -Gluペプチド類の増加する時間

(APAPは2-4時間、Metronidazoleは4時間)と種類が異なることが観察された。 γ -Gluペプチド類が増加する時間が異なる点に関しては、投与した化学物質によって代謝される経路や代謝酵素の種類が異なる結果、グルタチオンが枯渇する時間も差異が生じたのではないかと考えられる。実際に、グルタチオンの枯渇は、APAPは1-2時間、Metronidazoleは4時間に観察されており、この結果は、 γ -Glu

ペプチド類が増加する時間にそれぞれ相当している。

また増加する γ -Glu ペプチド類の種類が異なることに関しては、正しい理由は不明であるが、図5でわかるように、投与された化学物質によって γ -Glu ペプチド類の基質となる幾つかのアミノ酸や他の代謝物の肝臓内の濃度も変化している。このことは投与された化学物質の種類によって全体の代謝が変動していることが示唆され、この影響により投与された化学物質の種類によって増加する γ -Glu ペプチド類の種類が異なるのかもしれない。今後この現象の機序を解明したい。

E. 結論

平成20年度は、親水性のみならず脂溶性化学物質が、あるいはこれらの物質からの代謝物が親電子性毒性を示すことを、迅速に探索する評価システムの開発に取り組んだ。システムは未だ開発途中であるが、親水性および脂溶性化学物質を0.5% MC400 水溶液に分散させ、それをマウスに経口投与し、2-4時間後に肝臓中の γ -Glu ペプチド類が有意に増加すれば、投与した化学物質が親電子性毒性であることを示すシステムの基盤技術は、確立

することができた。最終年度にこのシステムを多くの化学物質に応用し、親電子性の毒性を測定するシステムの完成を目指す。

また副次的な成果として、本研究で発見された親電子物質検出（グルタチオン枯渇）マーカーである γ -Glu ペプチド類が、薬剤性肝炎を発症したヒトの血液中で有意に増加することが臨床検体で判明した（特許出願中）。薬剤肝障害は、臨床上の大きな問題の一つであるにもかかわらず、迅速な診断法が未だ確立されていない。薬剤肝障害は、重篤可し、死に至ることもあるため、早期に発見し、症状を的確に把握する診断法が望まれている。本研究で発見された γ -Glu ペプチド類は、薬剤肝障害の診断に有用であるばかりでなく、創薬開発においても、肝障害を誘発しうる薬剤を早期に発見し、治験の失敗を低減できる。また臨床においても、薬剤治療のリスクが把握でき、投与量や薬剤の変更など治療上取れるオプションを広げることが可能になり、安心して安全な医療の実現に貢献すると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shintani, T., Iwabuchi, T., **Soga, T.**, Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Yitagawa, Y., Kajiyama, M., Matsumoto, K., Suematsu, M., "Cystathionine β -synthase as a Carbon Monoxide-sensitive Regulator of Bile Excretion" *Hepatology* 49, 141-150, 2009.

Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., **Soga, T.**, Yoshimoto, H., "Developing Bottom-fermenting Yeast Strains That Produce High SO₂ Levels by Integrated Metabolome and Transcriptome Analysis", *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2787-2796, 2008.

Sato, S., Arita, M., **Soga, T.**, Nishioka, T., Tomita, M., "Time-resolved Metabolomics Reveals Metabolic Modulation in Rice Foliage", *BMC Systems Biology* doi:10.1186/1752-0509-2-51, 2, 51, 2008.

Ohashi, Y., Hirayama, A., Ishikawa, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Ueno, Y., Tomita, M., **Soga, T.**, "Depiction of Metabolome Changes in Histidine-starved *Escherichia coli* by

CE-TOFMS", *Mol. BioSyst.* 4, 135-147, 2008.

曾我朋義、「CE-MSによるメタボローム解析」*生物物理化学誌*, 52, 91-94, 2008.

紙健次郎、冨塚江利子、冨田勝、北潔、江角浩安、**曾我朋義**：メタボローム解析による癌微小環境のエネルギー代謝の解明、「癌と微小環境」*実験医学増刊* Vol27(2) pp.215-221, 羊土社, 2009.

曾我朋義：最新のメタボローム測定法の開発と生命科学への応用、「新しい地平をひらく分析手法の最前線」pp.21-29, 化学同人, 2009.

曾我朋義：CE-MSによるメタボローム測定法と生命科学への応用、「メタボローム特集」*臨床化学* Vol37(4) pp.341-346, 日本臨床化学会, 2008.

紙健次郎、冨塚江利子、北潔、冨田勝、**曾我朋義**、江角浩安：がんメタボロームによるエネルギー代謝の解析とがんの微小環境を標的とした治療薬の開発に向けて、「メタボローム特集」*臨床化学* Vol37(4) pp.361-367, 日本臨床化学会, 2008.

石井伸佳、**曾我朋義**、冨田勝：細菌のマルチオミクス（各種網羅的測定データ）解析の最先端、「化学と生物」Vol46(4) pp.228-229, 学会出版センター, 2008.

2. 学会発表

Soga, T., “Biomarker Discovery by CE-MS Metabolomics” CE in the Biotechnology & Pharmaceutical Industries 10th Symposium (CE Pharm 2008), The Hotel Nikko, San Francisco, Oct 14, 2008.

Soga, T., “CE-MS for Metabolomics” CE in the Biotechnology & Pharmaceutical Industries 10th Symposium (CE Pharm 2008), The Hotel Nikko, San Francisco, Oct 13, 2008.

Soga, T., “Metabolomics by CE-MS for Biomarker Discovery” 5th International Conference on Plant Metabolomics, Pacifico Yokohama, July 15-18, 2008.

曾我朋義. メタボロミクスが解き明かす微生物の生存戦略. 第 82 回日本細菌学会総会、細菌のプロテオミクス、メタボロミクス、名古屋国際会議場、2009 年 3 月 13 日

曾我朋義. メタボロミクスについて最近の研究から. 第 22 期 CAMM フォーラム 2 月例会、虎ノ門パストラル、2009 年 2 月 6 日

曾我朋義. メタボローム解析によるバイオマーカー探索. BMB2008、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 11 日

曾我朋義. メタボロームミクス：トラン

スポーター研究の新手法. トランスポーターワークショップ in 鶴岡—トランスポーター研究のパラダイムシフト：今後の方向性の模索と新たな病態解析法の融合を目指して—, トランスポーター研究会、東北公益大ホール、2008 年 11 月 15 日-11 月 16 日

曾我朋義. CE-MS 法によるメタボローム解析法と医薬への応用. 第 3 回メタボロームシンポジウム、慶應義塾大学先端生命科学研究所、2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日

曾我朋義. メタボローム解析によるバイオマーカー探索. 第 33 回日本医用マスペクトル学会年会、東京大学医学部鉄門記念講堂、2008 年 9 月 25-26 日

曾我朋義. メタボロームが解き明かす生命のシステム. 第 5 回慶應義塾大学薬学部ハイテクリサーチシンポジウム、芝共立キャンパス、2008 年 9 月 5 日

曾我朋義. CE-MS によるメタボローム測定法と生命科学への応用. 第 48 回臨床化学学会年会、静岡文化芸術大学、浜松、2008 年 8 月 29-30 日

曾我朋義. CE-MS を用いたメタボロミクスによるバイオマーカーの探索. 第 35 回 BMS コンファレンス、裏磐梯ロイヤルホテル、2008 年 7 月 6-9 日

曾我朋義. CE-MS によるメタボローム測定法と生命科学への応用. 第 19 回東海北陸質量分析合同談話会、金沢医科大

学、2008年6月28日

特願 2008-322262.

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願

曾我朋義「シースフロー方式のキャピラリー電気泳動・質量分析計法による陰イオン性化合物の測定装置」特願 2009-056132、2009.

曾我朋義、末松誠、本間雅、山本武人、鈴木洋史「薬剤性肝炎マーカー、並びに、それらの利用方法」特願 2008-328133.

本間雅、鈴木洋史、山本武人、千葉厚、辻省次、曾我朋義「肝疾患予防治療剤」

阿部高明、曾我朋義「ヒト OATP-R 遺伝子導入モデル非ヒト動物」特願 2008-264674

辻彰、加藤将生、久保義行、金子周一、加賀谷尚史、曾我朋義「エルゴチオネインを利用したクローン病の診断および治療」特願 2008-033588.

登録

富田勝、伊藤文、曾我朋義「遺伝子産物の機能同定方法および結合物質同定法」特許第 4114075、2008.

補足資料