

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860101

研究課題名(和文) 乱用薬の市場変化に対応する新規薬物スクリーニング法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of the DNA aptamer-based test detecting recreational drugs

研究代表者

光本 明日香(貝崎明日香)(Kaizaki-Mitsumoto, Asuka)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：70407443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：危険ドラッグは大きな社会問題となっており、化学構造を包括的に規制しているものの、現在の機器分析に頼る手法では規制当局に過大な負担がかかるため、著しい市場変化に対応できる簡便なスクリーニング法の開発が急務である。DNAアプタマーは、低分子化合物を高親和性で認識でき、抗体と比べて短時間かつ安定的に産生可能である。本研究では、DNAアプタマーをスクリーニング法に応用することを目指して検討を行った。得られた合成カンナビノイドと結合するDNAアプタマーは、典型的な構造認識モチーフを持つことが明らかになった。今後は、捜査現場において利用可能な薬物検出キット開発に向け検討を進めたい。

研究成果の概要(英文)：Wide spread use of recreational drugs has become a serious problem in our society. Although novel psychoactive drugs are being regulated comprehensively by Japanese government recently, current GC or LC-MS-based analytical method, may take an excessive burden for the regulatory authority. Thus, it is urgently necessary to develop a test useful for newly marketed drugs. DNA aptamer can detect a low molecular compound with high affinity and be produced stable in a short time compared with antibodies. The present study is aiming at applying DNA aptamer to a test of abused drugs. DNA aptamers that recognizes synthetic cannabinoids are generated by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) methods. After ten rounds of SELEX, some DNA aptamers were successfully obtained and analyzed those sequences. On-site testing for drugs of abuse would be developed by using these DNA aptamers.

研究分野：毒性学

キーワード：危険ドラッグ アプタマー スクリーニング SELEX JWH-018

1. 研究開始当初の背景

(1)覚醒剤、大麻や麻薬など乱用を目的とした薬物は、製造、輸入、所持、譲渡や譲受などがそれぞれ対応する法律で禁じられている。しかし近年、これらの規制対象薬物の化学構造を一部変化させた化合物、いわゆるデザイナーズドラッグが流通するようになり、販売者は“脱法(合法)ドラッグ”などとして違法性を秘匿している。さらに、実際には乱用目的であるにも拘らず、「ハーブ」や「バスソルト」などと称して人体に適用しない旨の注意書きを添えてインターネット上や自販機を含む街中で販売され、覚せい剤などに比べ入手が容易であることから、特に若年層におけるゲートウェイドラッグとなっている。また、最近ではこれらの違法ドラッグを使用した者が、重大な交通事故を起こしたり自ら健康被害を被ったりするなどの事例が相次いで報告されており、大きな社会問題となっている。

しかし、新たな化合物の法規制には、化合物の構造決定、動物実験や流通実態把握など多くの作業工程が必要であり、規制までには年単位の時間が必要となる。このため、市場で流通している新規化合物の規制が決まった時には、わずかに構造を修飾した違法ドラッグが新たに流通しているといった現状もある。このように、違法ドラッグの流通と規制は、“イタチごっこ”であり、このような現状を打破するために、“包括規制”の必要性が叫ばれている。しかし、包括規制として化学構造を規定したのち、実際にどのような方法で対処していくかについては方向性が必ずしも定まっていない。その背景として、化学構造を定性的に決定するためには質量分析や NMR 等の機器分析が必要であるが、これらの分析には時間がかかり、大量に出現する薬物を捌ききれないことが挙げられる。

(2)すでに平成 24 年度において、違法ドラッグを含有する“ハーブ”、“パウダー”および“リキッド”約 130 銘柄を GC-MS により分析し、現時点での流通実態を一定程度把握している。その結果、従来は“ハーブ”には主に合成カンナビノイド類、“パウダー”および“リキッド”にはカチノン等フェネチラミン類が含有されることが一般的であったが、最近では“ハーブ”の多くに複数の合成カンナビノイドが認められ、さらにフェネチラミン類が入っているものも出現し始めていることが判明した。合成カンナビノイドは、従来から流通している JWH-018 の誘導体および最近になり流通し始めた UR-144 の誘導体が多く認められた。また、フェネチラミン類では -PVP 誘導体が多く認められた。

2. 研究の目的

(1)研究開始当初の背景(1)に示した状況を解決する策のひとつとして、抗体等を用いたスクリーニング法によりふるいにかけた後に

機器分析を用いるという、2段階の選別方法が考えられる。しかしながら、ドラッグ市場の回転の速さに基本化学構造を特異的に認識する抗体の作成が追いつかないことが容易に予想できたため、申請者は抗体と同等以上の特異性で物質を認識することができ、その取得が抗体と比べて極めて短時間で入行、かつ安定的に産生可能である核酸アプタマーを違法ドラッグのスクリーニングに応用することを考えた。違法ドラッグの基本構造が変化しても、アプタマーであれば迅速に対応して新しいスクリーニング法に移行することが可能である。また、包括規制の対象化学構造がどのようになっても、それを認識するアプタマーは理論上作成可能であり、抗体作成の様にやってみなければ良いものが取れるかどうかわからないという場当たり的ではない。従って、違法ドラッグの基本骨格を認識するアプタマーを用いたスクリーニング法の開発は包括規制に大いに寄与できると考える。

(2) 研究開始当初の背景(2)に示した背景があったので、本申請研究では JWH-018、UR-144 および -PVP に対する核酸アプタマーの選択を行い、標的物質やその誘導体および関連物質との親和性を明らかにする。さらに、得られたアプタマーを用いて、違法ドラッグの現場スクリーニングに耐える簡易試験法の実用化を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ランダム DNA ライブラリの作製と選択

低分子への結合性が良いとされる塩基数(60-100塩基)になるように、2種類の ssDNA ライブラリを作成した。

5末端および3末端のプライマー領域は、各々18塩基とした。プライマー領域に挟まれるランダム配列領域は40塩基(N40)または60塩基(N60)とした。(N40を含むものは76塩基、N60を含むものは96塩基の ssDNA ライブラリとなる。)

薬物のアルキル側鎖末端にアミノ基またはカルボキシル基を導入した誘導体を合成し、これらと、磁気ビーズである Dynabeads M-270 Amine または Dynabeads M-270 Epoxy とを結合させた。

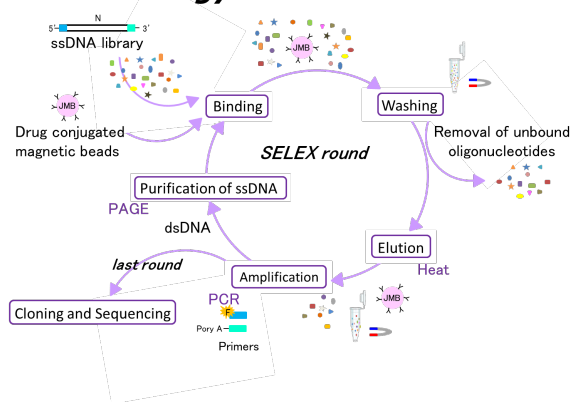
各違法ドラッグを結合した磁気ビーズを用いて、SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)法により ssDNA の選択を行った。

(2)クローニングとシーケンス解析

SELEX 法のラウンドを繰り返し、得られた ssDNA ライブラリをベクターに組み込んだ。これを用いて、*E. coli* DH5 α を形質転換した。アンピシリンを含む LB 培地に播種し、コロニーを形成させた。各コロニーからプラスミド DNA を抽出した。得られた DNA をシーケンス解析にかけ、各違法ドラッグを認識する

か確認を行った。

SELEX strategy



(3)表面プラズモン共鳴測定装置 (Biacore T100) を用いた結合性の解析
上記(2)の検討を行った結果、各違法ドラッグを認識することが確認出来た ssDNA 配列に対して、本検討を行った。
各違法ドラッグ誘導体を Biacore センサーチップに結合させた。クローン化した ssDNA を Biacore T100 に流入し、結合性を定量的に解析した。

4. 研究成果

N40 または N60 を含むランダム ssDNA ライブラリ、フルオレセイン修飾をしたフォワードプライマー、ポリ A 修飾をしたリバースプライマーを作成した。
始めに、水溶性薬物である MDA 塩酸塩 (3,4-methylenedioxyamphetamine hydrochloride) に対する ssDNA の選択を行った。
MDA は MDMA 同様、覚せい剤用の幻覚作用を持つ麻薬で、MDA 類似体は現在も危険ドラッグとして流通している。
MDA-Dynabeads (Dynabeads の活性化基に MDA の側鎖を結合させたもの) を用いて、SELEX 法により、MDA に対する ssDNA の選択を行った。
SELEX 10 ラウンド終了後、60 mer の ssDNA ライブラリーから、MDA を認識する ssDNA 28 種を得た。これらの配列を特定し、立体構造の決定を行った。
28 種の ssDNA のうち、比較的親和性が高いものをクローン化した。これらの ssDNA (MDA アプタマー) の解離定数 (Kd 値) を求めた。その結果、最も優れた MDA アプタマーの Kd 値は 50.1 nM であった。(これまで報告されているエタノールアミンのアプタマーや、既に実用化されているコカインのアプタマーの Kd 値は各々 19 nM、104 nM である。) また、MDA と異なり、難水溶性の薬物である JWH-018 に対するアプタマーの選択を行った。なお、JWH-018 の基本骨格は、JWH-019、JWH-022、AM2232 などと共通である他、包括規制の対象となっている

(1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone であるため、JWH-018 のみを認識するのではなく、この基本骨格を認識するものを選択するように、SELEX 法を行うこととした。

(1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone から JWH-018 カルボン酸を合成し、JWH-018-Dynabeads (Dynabeads の活性化基に JWH-018 の側鎖を結合させたもの) を作成した。これを用いて、SELEX を行った。
10 ラウンド終了後に得られた ssDNA を T-Vector pMD20 に組み込み、*E. coli* DH5α を形質転換した。96 個のコロニーからプラスミド DNA を抽出し、シーケンス解析を行った。その結果、1 種ではあるが、典型的な核酸アプタマーの構造モチーフである G カルテット構造を取りうる配列を持つことが明らかになった。
これらの結果から、薬物の水溶性・難溶性にかかわらず、SELEX 法は乱用薬物に対するアプタマーのスクリーニング法として有用であることが明らかになった。
今後、他の乱用薬物に対するアプタマーの選択を行い、実用化 (薬物捜査現場において利用可能なオンサイト薬物検出キットの開発等) に向けた検討を進めたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kaizaki Asuka, Tanaka Sachiko, Yoshida Takemi, Numazawa Satoshi.
Maternal MDMA administration in mice leads to neonatal growth delay.
The Journal of Toxicological Sciences. 2014; 39(1):33-9. 査読有

Kaizaki Asuka, Tanaka Sachiko, Numazawa Satoshi.
New recreational drug 1-phenyl-2-(1-pyrrolidiny)-1-pentanone (alpha-PVP) activates central nervous system via dopaminergic neuron.
The Journal of Toxicological Sciences. 2014; 39(1):1-6. 査読有

[学会発表](計5件)

光本(貝崎)明日香、石下理紗子、旗岡恭子、服部夏実、沼澤 聡
合成カンナビノイドに対するアプタマー作製の試み
日本薬学会第135年会, 2015年3月, 神戸サンポーホール(神戸)
貝崎明日香、田中佐知子、沼澤 聡
新規麻薬 -PVP はドパミン神経系を刺激し、自発運動量の増加を引き起こす
第41回日本毒性学会学術年会, 2014年7月, 神戸国際展示場(神戸)
貝崎明日香、田中佐知子、沼澤 聡

新規麻薬 -PVP はドパミン遊離を引き起こす

日本薬学会第134年会，2014年3月，
熊本市総合体育館（熊本）

Kaizaki Asuka, Tanaka Sachiko, Numazawa Satoshi.

New recreational drug alpha-PVP affects dopaminergic neuron -Compared with methamphetamine and MDMA-

Neuroscience 2013，2013年11月，サンディエゴ（米国）

貝崎明日香、沼澤 聡

新規麻薬 -PVP が中枢神経に及ぼす影響

フォーラム2013：衛生薬学・環境トキシコロジー，2013年9月，九州大学医学部百年講堂（福岡）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

昭和大学校術業績リポジトリ

<http://meta.lilitory.showa-u.ac.jp/>

昭和大学薬学部生体制御機能薬学講座毒物学部門

<http://www10.showa-u.ac.jp/~toxicol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光本（貝崎）明日香（KAIZAKI-MITSUMOTO Asuka）

昭和大学・薬学部生体制御機能薬学講座・毒物学部門・助教

研究者番号：70407443