

令和元年5月16日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08953

研究課題名(和文) 覚せいアミン類のオンサイト検出を目的とする新規イムノアッセイシステムの開発

研究課題名(英文) Development of new immunoassay systems for on-site analysis targeting stimulant amines

研究代表者

森田 いずみ (MORITA, IZUMI)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20299085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不正薬物を取り締まるうえで、現場で高感度に検出するオンサイト免疫測定法が有用であるが、実用的な抗体の入手は困難である。そこで、覚せいアミンであるアンフェタミン(AP)、メタンフェタミン(MAP)およびその尿中代謝物p-ヒドロキシメタンフェタミンサルフェート(MAPOH-S)に対する新規モノクローナル抗体(Mab)の調製を試みた。覚せいアミン類は分子量が小さく、高親和力抗体の調製が極めて難しいが、AP、MAPについてはシリル化体を、MAPOH-Sについてはそれ自体を認識するMabを樹立することに成功した。今回得られたMabにより、実用的なオンサイト分析法が確立できるものと期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

覚せいアミン類の分析には、現在、可搬性に乏しい大型機器を用いる機器分離分析が多用されているが、複雑な試料の前処理が必須で多大の時間と労力を要する。簡便・迅速で高感度な現場分析を可能にすることは、覚せい剤乱用に係る社会的問題の大きさを鑑みれば極めて意義が大きい。今回、特に分子量が小さく高親和力抗体の調製が難しい覚せいアミン類について、誘導體化も含めた免疫原の工夫により、実用的な親和力を持つモノクローナル抗体を樹立することができた。本研究の基盤となった戦略と技術は、他の規制薬物、環境汚染物質、臨床バイオマーカーなど、低分子量物質のオンサイト免疫測定法の確立にも広く適用が可能と期待される。

研究成果の概要(英文)： For law enforcement against illicit use of stimulant amines, i.e., amphetamine (AP) and methamphetamine (MAP), rapid and feasible on-site assays are required. Although immunochemical approach with specific antibodies is promising, practical antibodies for these stimulant amines are not available now, and difficult to generate because of their small molecular weight. In this study, we generated novel monoclonal antibodies that enable detection of AP, MAP, and the urinary MAP metabolite, p-hydroxy-MAP sulfate (MAPOH-S), by immunizing mice with newly designed immunogenic conjugates. For detecting AP and MAP, antibodies were elicited against silyl derivatives of AP and MAP that show more favorable immunogenicity due to enlarged molecular mass, whereas antibodies recognizing MAPOH-S itself (without modification) were obtained. We expect that these antibodies may allow us to develop practical on-site analytical systems, e.g., immunochromatographies, targeting AP, MAP, and MAPOH-S.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体 覚せいアミン

1. 研究開始当初の背景

麻薬、覚せい剤、脱法ドラッグなど、いわゆる不正薬物の乱用に係わる問題が、近年、ますます深刻になっている。そのなかでも、覚せい剤による検挙件数は、全薬物検挙数のうち85%を占めており、大きな社会問題である。税関における密輸の取り締まりや、被疑者確保の現場における使用歴の証明などのために、現在では、マルキス試薬などによる1次スクリーニングとGC/MSやHPLC/MSなどの大型機器を用いた分析法が併用されている。しかし、呈色試験は不正薬物以外の物質にも陽性を示す場合があり、またGC/MSなどの大型機器での分析には多くの時間を要するため、操作が簡便で、迅速に結果が得られる不正薬物のオンサイト微量分析法が強く求められる。抗原抗体反応を利用する免疫測定法は、超高感度で特異性が高く、試料の直接測定が可能で、簡便性、迅速性に優れており、複雑なマトリックス中に混在する極微量物質のスクリーニングにとりわけ威力を発揮する。そのため、不正薬物のスクリーニング検査として、この原理が用いられたイムノクロマト法が開発され、すでにKITがいくつか販売されている。しかし、アンフェタミン(AP)、メタンフェタミン(MAP)などの覚醒アミン類は分子量が小さいうえ、その化学構造上の特徴であるアミノ基を活かした形の免疫原(ハプテンキャリアー結合体)を調製することが困難なため、親和力の高い抗体を得るのが難しい。申請者が所属する研究グループは、多年にわたり抗体作製が困難であるとされる低分子化合物(ハプテン)を対象に、抗体の遺伝子操作(抗体工学)による抗ハプテン抗体の改良について検討を重ね、問題点を抽出してその克服に努め、最近、世界的にも注目される成績を挙げるに至っている。これまでに培ってきた様々な手法を組み合わせることで、今回のターゲット低分子であるAP、MAPなどの覚醒アミン類についても超高感度な抗体の作製を目指す。

2. 研究の目的

抗体作製が困難であるとされるハプテンであるAP、MAPおよびその尿中代謝物である*p*-ヒドロキシMAPサルフェート(MAPOH-S)を対象に、超高感度な抗体の作製に取り組むこととした。

3. 研究の方法

AP、MAPは分子量が小さいうえ、その化学構造上の特徴であるアミノ基を活かした形の免疫原(ハプテンキャリアー結合体)を調製することが困難なため、親和力の高い抗体を得るのが難しい。そこで、本研究ではそのアミノ基を利用して免疫原性の大きな誘導体に変換することで、実用的なモノクローナル抗体を創出することを企てた。すなわち、フェノール性ヒドロキシ基を有するAPとMAPの誘導体(APOHおよびMAPOH)に市販のTEOC化試薬を反応させたのち、そのヒドロキシ基に無水グルタル酸を反応させてカルボン酸誘導体に変換した。これを*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルとしたのち、ウシ血清アルブミン(BSA)を反応させて免疫原2種を得た。一方、MAPOH-SはAP、MAPに比べて分子量が大きく、極性の大きいスルホ基を持つため、誘導体化することなしに実用的な抗体が得られる可能性が高い。そこで、市販のMAPOHにTFA-OSuを室温で反応させて、*N*-メチルアミノ基をTFA化した。得られたアミドに、4-カルボキシフェニルスルホン酸クロリドを室温で反応させた。得られた化合物を混合酸無水物法でBSAもしくはKLHに結合させたのち、 K_2CO_3 で処理してTFA基を脱保護し、目的の免疫原を得た。これらでマウスを免疫し、常法にしたがってモノクローナル抗体

の産生を行った。

4. 研究成果

得られた免疫原をそれぞれ A/J マウスおよび BALB/c マウス(各 5 匹)の背部皮下に隔週で投与し、3 回目の免疫後に試験採血を行い、その血清中の抗体価を ELISA によって評価した。特に良好な抗体の産生が認められたマウスに最終免疫を行い、その 3 日後に脾臓を摘出し、得られた脾細胞と NS1 ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールを用いて融合させた。HAT 培地で約 1 週間選択培養し、その上清を上記 ELISA に付したところ、多数の抗体産生ハイブリドーマの生成が認められたが、限界希釈法によるクローニングを経て最終的に TEOC 化 APOH について 15 種、TEOC 化 MAPOH について 5 種、MAPOH-S について 3 種の抗体産生細胞株を樹立した。今後、アッセイ系を最適化し、近縁化合物との交差反応性試験により特異性を吟味する予定である。今回得られたモノクローナル抗体により、迅速かつ実用的な感度を持つ AP、MAP および MAPOH-S のオンサイト分析法が確立できるものと期待する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Yui Kanda, Mayumi Yasuo, Aya Ito, Masahiro Toyota, Yoshinori Hayashi, Takeshi Yokoyama, Norihiro Kobayashi, Enantioselective Monoclonal Antibodies for Detecting Ketamine to Crack Down on Illicit Use, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 41(1), 2018, 123-131.
DOI : 10.1248/bpb.b17-00762

Yuki Kiguchi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Emiko Katayama, Masatoshi Fujita, Mai Narasaki, Aiko Yokoyama, Norihiro Kobayashi, Antibodies and Engineered Antibody Fragments against M13 Filamentous Phage to Facilitate Phage-Display-Based Molecular Breeding, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 41(7), 2018, 1062-1070.

DOI : 10.1248/bpb.b18-00162

Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Tomomi Morishita, Sakiko Fukushima, Yuki Nishimori, Toshifumi Niwa, Norihiro Kobayashi, A Single-Step "Breeding" Generated a Diagnostic Anti-cortisol Antibody Fragment with Over 30-Fold Enhanced Affinity, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40(12), 2017, 2191-2198.

DOI : 10.1248/bpb.b17-00633

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Mayumi Yasuo, Kazuhisa Matsuda, Kengo Katagi, Aya Ito, Hiroka Tatsuda, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, Norihiro Kobayashi, Antibody Fragments for On-Site Testing of Cannabinoids Generated via in Vitro Affinity Maturation. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40(2), 2017, 174-181.

DOI : 10.1248/bpb.b16-00669

Hitoshi Kimura, Shiho Mikawa, Chiharu Mizuguchi, Yuki Horie, Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Takashi Ohgita, Kazuchika Nishitsuji, Atsuko Takeuchi, Sissel Lund-Katz, Kenichi Akaji, Norihiro Kobayashi, H. Saito, Immunochemical Approach for Monitoring of Structural Transition of ApoA-I upon HDL Formation Using Novel Monoclonal Antibodies. *Sci. Rep.*, 査読有, 7, 2017, 2988.

DOI : 10.1038/s41598-017-03208-8

Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Erika Banzono, Kasumi Ishii, Satoshi Kubo, Yoshiro Watanabe, Anna Hirai, Chiaki Kaede, Mitsuhiko Ohta, Norihiro Kobayashi, One-Shot in Vitro Evolution Generated an Antibody Fragment for Testing Urinary Cotinine with More Than 40-Fold Enhanced Affinity, *Anal. Chem.*, 査読有, 89(1), 2017, 988-995.

DOI : 10.1021/acs.analchem.6b04332

[学会発表](計 15 件)

崎尾 奈美, 森田 いずみ, 柏原 圭佑, 横田 朝香, 大山 浩之, 吉田 武美, 上田 宏, 小林 典裕, メタンフェタミン第 相代謝物に対する特異モノクローナル抗体産生の試み, 日本薬学

会第 139 年会、2019

森田 いずみ、大山 浩之、田中 理恵、花尻 (木倉) 瑠理、小林 典裕、幻覚性キノコ成分シロシンのオンサイト分析を目的とする新規モノクローナル抗体の作製、日本法中毒学会第 37 年会、2018

大山 浩之、肥越 ひかる、小林 奈津子、田口 歩維、比嘉 ひかり、森田 いずみ、小林 典裕、抗 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール scFv の部位特異的変異導入による試験管内親和性成熟の試み、日本法中毒学会第 37 年会、2018

小林 典裕、大山 浩之、森田 いずみ、木口 裕貴、新世代の高性能イムノアッセイを目指す「抗体育種」、日本分析化学会第 67 年会、2018

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, and Norihiro Kobayashi, In vitro affinity maturation of a single-chain Fv fragment for on-site testing of cannabinoids, European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017

Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Toshifumi Niwa, and Norihiro Kobayashi, Utility of Gaussia luciferase as a fusion partner with scFvs for bioluminescent immunoassays testing clinical biomarkers, European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017

森田 いずみ、大山 浩之、神田 結、安尾 まゆみ、伊藤 綾、小林 典裕、新規モノクローナル抗ケタミン抗体の作製とその諸性質、日本法中毒学会第 36 年会、2017

森田 いずみ、黒田 裕美、伊藤 綾、池田 夏美、小山 千尋、大山 浩之、小林 典裕、オンサイト免疫測定法を目的とした Teoc 化覚せいアミンに対するモノクローナル抗体の新規調製、日本分析化学会第 65 年会、2016

大山 浩之、森田 いずみ、松田 和久、伊藤 綾、小林 典裕、大麻成分の検出を目的とする抗 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール scFv の試験管内親和性成熟、日本分析化学会第 65 年会、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 典裕

ローマ字氏名：(KOBAYASHI NORIHIRO)

所属研究機関名：神戸薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90205477

研究分担者氏名：大山 浩之

ローマ字氏名：(OYAMA HIROYUKI)

所属研究機関名：神戸薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：80572966

研究分担者氏名：上田 宏

ローマ字氏名：(UEDA HIROSHI)

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：資源科学研究所

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：60232758

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 武美

ローマ字氏名：(YOSHIDA TAKEMI)