

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18913

研究課題名(和文) 実験動物を使用しない迅速かつ簡便な新規危険ドラッグ乱用性評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the rapid and handy measurement system for designer drug abuse

研究代表者

山下 琢矢 (Yamashita, Takuya)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10645203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は実験動物を使用した行動薬理試験に代わる、危険ドラッグをはじめとした乱用薬物の薬物依存性を迅速かつ簡便に評価可能な試験法の確立を目的としている。ヒト神経細胞モデルにフェネチルアミン類、カチノン類、トリプタミン類、およびカンナビノイド類を曝露させ、培養上清中プロテオームを比較解析した。その結果、特に期待する薬物依存性バイオマーカー候補分子としてLatexin(LXN)を見出し、その検出系を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this research, it aims to establish the novel rapid and handy measurement system for designer drug abuse in vitro. Differential proteome analysis was performed to distinguish between phenethylamines, cathinones, tryptamine and cannabinoids treated human neuronal cell models. As a result, we identified latexin(LXN) protein as a candidate of drug abuse biomarker. Furthermore, we established LXN measurement system in vitro.

研究分野：毒性学

キーワード：危険ドラッグ プロテオミクス バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

覚せい剤や麻薬などの類似作用を狙い、基本骨格のうち側鎖を変化させた、「危険ドラッグ(植物片、リキッド等を含む)」の乱用によって死亡事故や殺人事件が頻発しており、より一層、法規制ならびに蔓延防止策の整備が社会的に求められている。それに呼応する形で、化学構造が類似していれば一括して規制することができる「包括指定」が2013年3月から実施された。しかし、規制逃れのために包括指定外の危険ドラッグが次々と製造され、蔓延防止まで至っていないのが現状である。今後さらに包括指定範囲の拡大が予想されるものの、闇雲に指定しては医療応用が期待される化合物も取り締まり対象となり得ることから医療、研究分野への影響が懸念される。従って、包括指定を最大限有効活用するには“いかに迅速かつ簡便に化合物の乱用性を確度高く見極めること”が重要である。現在、化合物の薬物依存性は実験動物を使用した行動薬理試験で評価されている。この手法は確度高く化合物の薬物依存性を評価できるものの、専門施設で熟練者が数か月から一年という長期間かけて実施するものであり、次々と生み出される危険ドラッグに対応できる迅速性・簡便性を有していない。

2. 研究の目的

本研究は実験動物を使用した行動薬理試験に代わる、危険ドラッグをはじめとした乱用薬物の薬物依存性を迅速かつ簡便に評価可能な試験法の確立を目的としている。申請者は平成 25-26 年度文部科学省 科学研究費助成事業 若手研究 B 「覚せい剤類似化合物の構造と精神依存性・神経毒性の関連評価」を実施していた。この研究で申請者は覚せい剤、麻薬、指定薬物および危険ドラッグに 1 週間連続暴露したマウスの脳組織で、共通して発現減少する蛋白質を 13 種見出した。これらは依存性薬物の臨床症状である、多幸感、高熱、神経脱落などを反映する蛋白質であった。さらに、

見出した蛋白質の一部はヒト神経細胞においても同様に発現減少していた。本結果は薬物依存性バイオマーカー蛋白質の存在を予見するものであり、申請者は培養神経細胞から産生された複数の薬物依存バイオマーカー蛋白質を抗体で検出できれば、診断確度高く、かつハイスループットに候補化合物の薬物依存性を評価可能になると考えた。本申請研究は、現状の薬物依存性評価を飛躍的に迅速化し、“適切な危険ドラッグの包括指定範囲を決定する画期的な方法論”の構築に繋がる可能性があるため、社会的意義が非常に高い。

3. 研究の方法

使用した乱用薬物

本研究では麻薬、および指定薬物として規制されているフェネチルアミン類(4-MeO-AP, 4-MeO-MA)、カチノン類(α -PNP)、トリプタミン類(5-MeO-DIPT, 5-MeO-DALT)、カンナビノイド類(AM-1220, JWH-250)を使用した。

細胞傷害試験

ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y をレチノイン酸とホルボールエステルで神経細胞様に分化させた(ヒト神経細胞モデル)後、各化合物を添加して、その生存性を WST-8 法で評価した。

プロテオーム解析

細胞死を誘導しない、最大濃度で各化合物を 24 時間曝露させた後の培養上清を回収し、プロテオーム解析を妨害するアルブミンやグロブリンを除去した。さらに、TCA-アセトン沈殿法で蛋白質を精製して二次元電気泳動展開した。変動蛋白質スポットは、オートゲルピッカーにより切り出し、トリプシン処理することでペプチド断片化した。抽出したペプチド断片を回収し、MALDI-TOF-MS/MS により解析することで変動蛋白質を同定した。

サンドイッチ ELISA 測定系の構築とその有用性の検証

ターゲット蛋白質の認識部位が異なる 2 種類の抗体を使用したサンドイッチ ELISA 測定系を用いた。1 つ目の抗体を 96well プレートに固相化し、ブロッキング処理をした。そして各培養上清を添加して 1 時間インキュベーションした。0.05% tween 20 含有 PBS で洗浄後、もう一方の抗体を添加して 1 時間インキュベーションした。さらに洗浄後 HRP 標識 2 次抗体を添加して 1 時間インキュベーションした。最後に、TMB 試薬を用いて発色させて 450 nm における吸光度を測定した。

4. 研究成果

細胞傷害試験

ヒト神経細胞モデルに各濃度(1 nM ~ 1 mM) のフェネチルアミン類 (4-MeO-AP, 4-MeO-MA)、カチノン類(a-PNP)、トリプタミン類(5-MeO-DIPT, 5-MeO-DALT)、カンナビノイド類(AM-1220, JWH-250)を 24 時間作用させたところ、すべての化合物において 10 uM 以下では細胞毒性が認められなかった。

プロテオーム解析

各化合物を 10 uM の濃度で曝露させたヒト神経細胞モデルの培養上清中プロテオームを比較したところ、すべての化合物で共通して発現減少する蛋白質を 5 種類同定した。中でも特に期待する薬物依存性バイオマーカー候補分子として Latexin(LXN)を見出した。LXN は前研究(平成 25-26 年度文部科学省 科学研究費助成事業 若手研究 B 代表「覚せい剤類似化合物の構造と精神依存性・神経毒性の関連評価」)でも見出した細胞内蛋白質であり、乱用薬物を作用させることで発現減少することが明らかになっている。

Latexin(LXN)サンドイッチ ELISA 測定系の構築とその有用性の検証

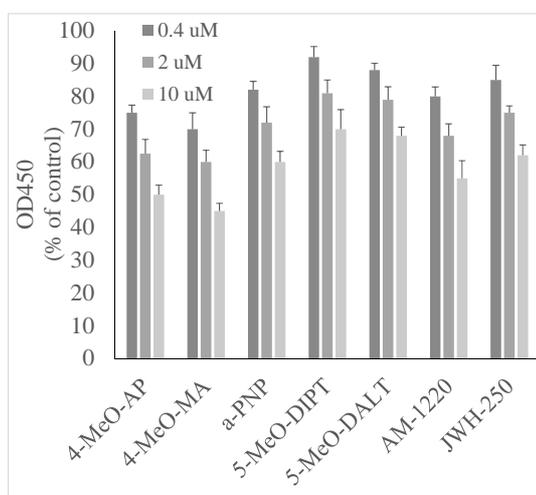


図 1 乱用薬物曝露による培養上清中 Latexin の減少

リコンビナント LXN を用いて構築した ELISA 系の定量性を評価したところ、その検量線は決定係数が 0.99 であり、良好な定量性を持つことが確認できた。そこで、フェネチルアミン類、カチノン類、トリプタミン類、およびカンナビノイド類を添加・培養した上清中の LXN 濃度を検討した。その結果、すべての薬物でコントロールと比較して LXN 濃度が低下し、中でもフェネチルアミン類が最も LXN 濃度が低下する可能性が示された(図 1)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Inoue H, Negishi S, Nakazono Y, Iwata YT, Tsujikawa K, Ohtsuru O, Miyamoto K, Yamashita T, Kasuya F. Differentiation of ring-substituted bromoamphetamine analogs by gas chromatography-tandem mass spectrometry., *Forensic Toxicol.*, 34:125-132, 2016.

[学会発表](計 2 件)

1. 山下 琢矢, 宮本 和奈 柳本 龍耶, 荒川 奈美, 辻川 健治, 岩田 祐子, 井上 博之, 糟谷 史代: ハロゲン基を有するフェネチルアミン類の神経毒性評価., 日本法中毒学会第 34 年会.,

- 福岡 (博多), 2015 年 6 月.【国内会議】
2. 井上 博之, 根岸 祥子, 中園 裕紀子,
岩田 祐子, 辻川 健治, 大津留 修,
宮本 和奈, 山下 琢矢, 糟谷 史
代:GC-MS/MS によるプロモアンフェタ
ミン類の位置異性体識別., 日本薬学
会第 136 年会., 神奈川(横浜), 2016
年 3 月.【国内会議】

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山下 琢矢 (Yamashita Takuya)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号 : 10645203