

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790446  
 研究課題名（和文）抗体ファージライブラリーを用いた革新的な抗薬物抗体の作製と薬物検出法に関する研究  
 研究課題名（英文）Studies of preparing anti-drug antibodies for the detection system using phage display technology  
 研究代表者  
 笹尾 亜子（SASAO AKO）  
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教  
 研究者番号：80284751

研究成果の概要：近年、検屍や法医解剖などの現場において薬物関与の確認法として市販の免疫学的検出キットが頻用されている。しかし、これらキットで検出可能な薬物は乱用薬物など一部に限られている。そこで、より迅速に多種多様な薬物に対する抗体作成が容易となるような抗体ファージライブラリー法による抗薬物抗体の作製と薬物検出法についての研究を行った。本研究では、国内において中毒事故の多い抗精神病薬フェノチアジンについて、その誘導体を合成し、タンパクとの複合体を調製して免疫抗原の作成を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：社会医学、抗薬物抗体、法医中毒学

## 1. 研究開始当初の背景

近年のわが国における中毒事故の発生状況を見ると、「医薬品」による自殺事例の大幅な増加が認められる<sup>1)</sup>。このような状況の中、検屍や法医解剖時における薬物服用のスクリーニングは「トライエージ<sup>®</sup>」等の免疫学的手法を応用した市販の検出キットに依存している現状がある。しかし、市販のキットで検出可能な薬物は乱用薬物や一部の向精神薬に限られており、その他多くの薬物は簡易なスクリーニング法を持たない。そこで、我々は国内において中毒事例が多い薬物や、

将来的に中毒事例の増加が危惧される薬物に対する免疫学的簡易検出法の開発を検討してきた（平成 16～17 年度 基盤研究(C)「向精神薬の免疫学的簡易検出システムの開発と法医中毒学への応用」研究代表：恒成茂行）。その研究の中で、免疫学的検出を行うための必須材料であるモノクローナル抗体の作製に約半年もの長期間を要する事や、対象薬物によっては化学構造上の不安定さから免疫動物内で抗原として機能せず、結果として抗体作製に至らない場合を経験してきた。日々数多く開発される薬物に対して、迅速かつ確実に、多くの労力を必要とせず抗体を作製

し、対象薬物のスクリーニング手段を得る方法の確立は法医中毒学の分野において重要な課題であると考える。

## 2. 研究の目的

上記に述べた背景から、我々は抗体作製にかかる時間の短縮が可能で、多種多様な薬物に対する抗体の同時作製が容易なファージディスプレイライブラリー法を用いた抗薬物抗体の作製を計画した。

抗体ファージライブラリー<sup>2,3)</sup>を使ったモノクローナル抗体の作製の一連の流れとしては、まず抗体の可変領域を発現する遺伝子DNAをランダムに組み合わせたものを調製し、バクテリオファージの一本鎖DNAに導入する。これによってファージの表面に多種多様な抗原認識部位が提示され、抗体ファージライブラリーとして保管できる。これを目的とする薬物と反応させ、結合したファージを選別(パンニング)する。選別されたファージを大腸菌に感染、増幅させて再度薬物との反応性を確認する。これを繰り返すことによって、薬物と反応性の高い認識部位を提示するファージが単離・濃縮される。このファージからは、薬物認識部位のDNA配列と、薬物認識部位タンパク質が得られる事となる。得られたDNA配列は、抗体を発現する遺伝子の可変領域に挿入する事で「組み換え抗体」の調製に利用でき、また、薬物認識部位のタンパク質はそれ自体の化学的修飾等によって薬物検出のツールとなり得るものである。

この技術を用いて、我々は抗薬物抗体の作製に最適な抗体ファージライブラリーの構築を行い、それを用いた抗薬物抗体の作製と薬物検出法の確立を本研究の目的とした。なお、抗体作製を行う対象薬物としては、中毒事例が頻発しながらも簡易な検出法を持たない抗精神病薬フェノチアジン類(クロルプロマジン、レボメプロマジン等)について検討を行った。

## 3. 研究の方法

抗体ファージライブラリーの構築を行う方法としては、抗原を予め免疫したマウスから得たリンパ球等を出発材料として調製した免疫ライブラリーを用いる事が推奨されている。そこで本研究においては、まずフェノチアジン誘導体の合成を行い、これを用いた免疫抗原の作成を行った。

### (1) フェノチアジン誘導体の合成

市販のフェノチアジンをテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、氷冷しながらジメチルスルホキシド (DMSO) と THF の混液 (2:1)

に懸濁させた水素化ナトリウム (NaH) を加える。アルゴン気流下で 30 分間攪拌した後、DMSO に溶解した 1,6-ジブロモヘキサンを加え、室温下にて 4 時間攪拌する。反応液に氷水を加え、ジクロロメタンで 3 回抽出し、抽出液を硫酸ナトリウムにて脱水する。得られた油状物質をシリカゲルクロマトグラフィーにて精製した。得られた化合物 (-(10-フェノチアジニル)ブチロニトリル) のシアノ基を水素化アルミニウムリチウムにて還元処理を行って目的物 (10-(4-アミノブチル)フェノチアジン) を得た (図 1)。

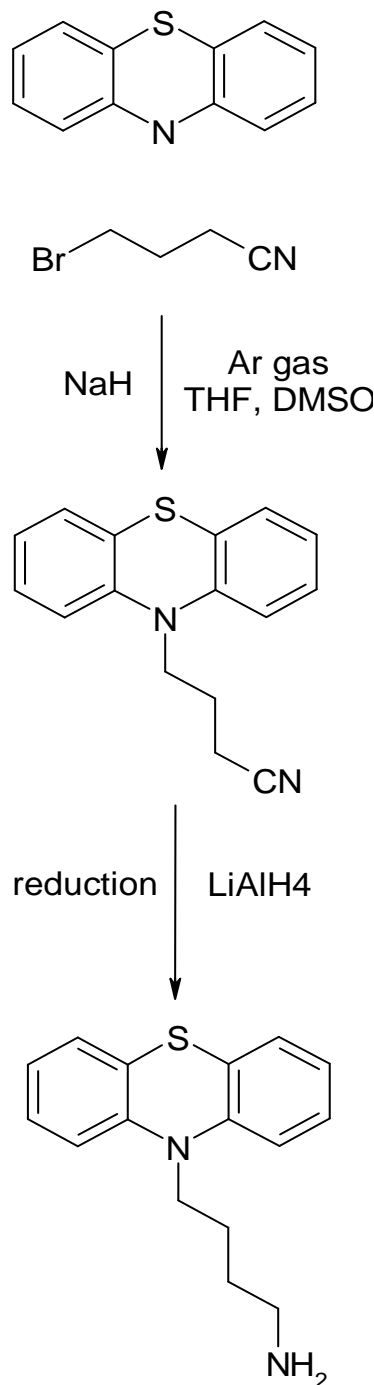


図 1 10-(4-アミノブチル)フェノチアジンの合成法

## (2) 免疫抗原の作成

10-(4-アミノブチル)フェノチアジン(図1)は分子量が小さく、タンパク質などの高分子物質とは異なりそれ自体では免疫抗原となり得ないハプテンである。そこで、これをキャリアタンパク(メルカプトサクシニル牛血清アルブミン、MS-BSA)と化学的に結合させた免疫抗原を Fujiwara らの方法<sup>4)</sup>に従って調製した(図2)。すなわち、10-(4-アミノブチル)フェノチアジンと *N*-(4-Maleimido butyryloxy) succinimide (GMBS)を混和し、攪拌しながら室温で100分間インキュベートする。次に、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で希釈したMS-BSAを加え、30分間攪拌する。未反応の低分子化合物とBSA-フェノチアジン(BSA-PTZ、目的物)を分離するため、ゲルろ過を行って分画精製した。

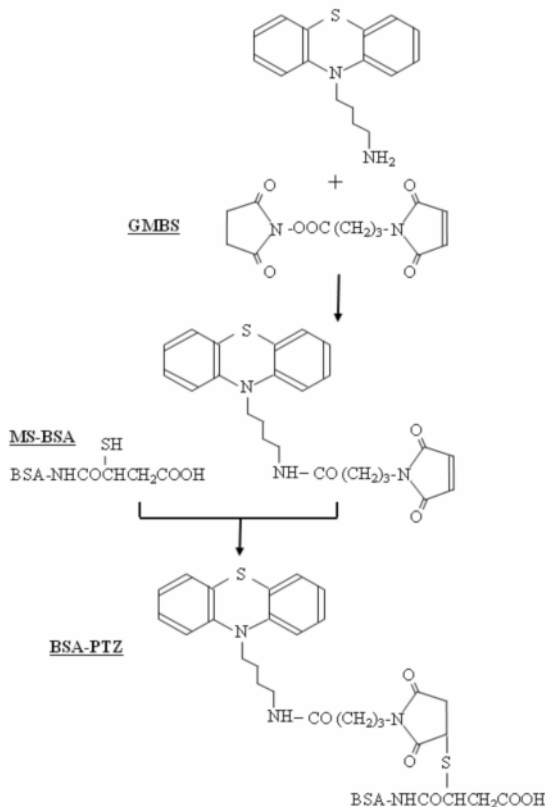


図2 免疫抗原 BSA-PTZ の合成法

## 4. 研究成果

抗体ファージライブラリーの種類としては、免疫ライブラリー、ナイーブライブラリー、合成ライブラリー<sup>3)</sup>があるが、効率良く目的薬物と反応するタンパクを発現するファージを得るには免疫ライブラリーが推奨されている。そこで、対象薬物として国内で中毒事故の頻発する抗精神病薬フェノチアジン類にターゲットを絞って本研究を実施した。

フェノチアジンを含めた多くの薬物は低分子であるため、そのままでは免疫抗原となりえないハプテンである。そのため、一般的にはタンパク質などの高分子化合物との複合体を調製し、これを免疫抗原として用いる。しかし、フェノチアジン骨格を含む市販のフェノチアジン類似物は一級アミンやカルボキシル基などの側鎖を持たず、キャリアタンパクとの化学的結合が困難であった。そこで、本研究ではフェノチアジン系抗精神病薬であるクロルプロマジンやレボメプロマジンなどに類似する化合物として10-(4-アミノブチル)フェノチアジンを合成し、MS-BSAとの複合体を合成して免疫抗原を作成した。今後は作成した免疫抗原をマウスに投与し、抗体価の上昇を確認した後にマウスの脾細胞由来のリンパ球を抗体遺伝子のソースとして用いてライブラリーを作製する予定である。

抗体ファージライブラリーを使った抗体作製の技術は、作製に要する時間短縮を可能にするだけでなく、かつて抗体作製が困難であった抗原(生体構成成分や免疫する事のできない毒物、薬物等の小分子化合物)に対する抗体の獲得を可能とした点でも画期的である。つまり、我々の目的とする抗薬物抗体の作製法として十分期待される技術である。当該分野において、免疫学的薬物検出キットは頻用される一方、その研究はほとんど為されていない。しかし、多種多様な薬物のスクリーニング法に対する需要は法医学領域のみならず、救急の現場においても今後益々高まるものと予想される。本研究は当該分野においては極めて萌芽的な研究テーマでもあり、本研究考案時の計画通りに遂行する事は困難であったが、この成果は今後も開発が続くさまざまな薬物のスクリーニング手段を確立する可能性を持つものであり、我々が最も危惧する「薬物中毒死の見逃し」を防ぐ一手段として将来的に大きな意義を持つ研究である事を確信している。

<参考文献>

- 1) 科学警察研究所．薬物による中毒事故等の発生状況，第47報，2005．
- 2) 高津聖志，他．タンパク質研究のための抗体実験マニュアル pp181-187，羊土社，2003．
- 3) 伊東祐二．BIO ベンチャー，2，51-58，2002．
- 4) Fujiwara K., et. al. Specificity and use of antisera produced against anticancer drugs . In “ Advances in immunity and cancer therapy( Vol.2 )” eds .Ray P.K. , 254-258 ,Springer-Verlag ,New York , 1986 .

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)

6．研究組織

(1)研究代表者

笹尾 亜子 ( SASAO AKO )

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：80284751

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし