

学位論文の要旨

氏名

中山 浩

学位論文題目

合成カンナビノイド誘導体に対するモノクローナル抗体の作製および、それを用いた検出法に関する研究

本論文は、社会問題である危険ドラッグの一つである合成カンナビノイド、特に社会的に注目されている3-ナフトイルインドール誘導体を簡単に検出するための検出方法を開発することを目的にしたものである。この目的を達成するために、ハイブリドーマ法を用いて高感度なマウスモノクローナル抗体の作製を検討した。また、ファージディスプレイ法を用いてVHH抗体の作製についても検討した。さらには、作製したモノクローナル抗体及びVHH抗体の特性を評価すると共にそれを用いて、3-ナフトイルインドール誘導体の検出方法について検討した。

第1章は、社会問題となっている危険ドラッグの特徴について記載すると共に、現状の検出方法及びその長短所について記載した。

第2章は、ハイブリドーマ法を用いた3-ナフトイルインドール誘導体特異的マウスモノクローナル抗体の作製及びその特性評価について記載した。免疫原である3-ナフトイルインドール誘導体結合KLH (keyhole limpet hemocyanine) を免疫したマウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマ法により作製に成功した2種の抗原特異的モノクローナル抗体の特性評価 (結合親和性及び交差反応性) について記載した。

第3章は、ファージディスプレイ法を用いた3-ナフトイルインドール誘導体特異的VHH抗体の単離とその特性評価について記載した。既報および公開データベース情報からVHH抗体遺伝子の重鎖 (VHH) を増幅するプライマーを設計し、これらプライマ

ーを用いて免疫原である3-ナフトイルインドール誘導体結合KLHを免疫したアルパカの血中リンパ球から抽出した全RNAを材料として、作製したファージライブラリについて記載する。さらに、そのファージライブラリからファージパニングによって単離された2種の抗原特異的VHH抗体のアミノ酸配列比較、結合特異性、結合親和性について記載した。

第4章は、マウスモノクローナル抗体を用いた2種類の簡易検出方法（免疫クロマトデバイス技術、蛍光増強阻害法）について検討した結果について記載した。免疫クロマトデバイス技術については、ターゲットとなる3-ナフトイルインドール誘導体を検出することができた。一方、蛍光増強阻害法については、蛍光色素を標識した3-ナフトイルインドール誘導体を合成し、上記で作製した2種類のモノクローナル抗体と反応させた結果、結合特性は示すものの蛍光強度に変化が無く測定方法として利用できないことが判明した。

第5章は、本論文の総括を記載する。3-ナフトイルインドール誘導体抗原免疫によるハイブリドーマ法によるマウスモノクローナル抗体及びアルパカを用いたファージライブラリの作製、ライブラリからのVHH抗体の単離、作製したモノクローナル抗体及びVHH抗体の特性解析、その抗体を用いた検出法の検討といった一連の研究結果を踏まえ、危険ドラッグ検出デバイスへの開発に向けた有用性について考察した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Study on development of synthetic cannabinoid derivatives-specific antibodies and sensing method using its antibodies

Name: Nakayama, Hiroshi

This thesis comprises the investigation to the availability of a method for easily detecting a 3-naphtoylindole derivatives which is one of the dangerous drugs. In order to achieve this objective, the highly sensitive mouse monoclonal antibodies were prepared using the hybridoma method. We also investigated the production of VHH antibody using the phage display method. Furthermore, the properties of the produced monoclonal antibody and VHH antibody were evaluated and the method for detecting synthetic cannabinoid was examined using its antibodies.

Chapter 1 describes characteristics of dangerous drugs that are a social problem and describes the current detection methods.

Chapter 2 described the preparation and characterization of 3-naphtoylindole derivatives specific mouse monoclonal antibodies using the hybridoma method. We describe the preparation using spleen cells of mouse immunized with KLH (keyhole limpet hemocyanine) with modified synthetic cannabinoid derivative as an immunogen. Furthermore, the binding affinity and cross-reactivity of the two antigen-specific monoclonal antibodies produced was investigated.

Chapter 3 described the isolation and characterization of 3-naphtoylindole derivatives specific VHH antibodies using phage display technique. Primers were designed based on information in public databases to amplify the single heavy chain (VHH) of alpaca antibody. A phage library was constructed using these primers from the lymphocytes in blood of alpaca immunized with KLH modified with 3-naphtoylindole derivatives as antigen. By panning from the phage library, two antigen specific VHHs were isolated. The sequence analysis of VHHs and the estimation of the binding specificity/affinity were performed.

Chapter 4 described the results of investigation on various simple detection methods using the mouse monoclonal antibodies are described.

Chapter 5 summarized the results of this study and discussed the usefulness of the produced antibodies for detective device of illegal drug.