

アクリルアミドゲルへのフィブリノゲンの吸着挙動

日大生産工(院) ○曾根 正浩

日大生産工 高橋 大輔, 日大生産工 和泉 剛

1. 緒言

止血は、救急措置および野外での外傷の看護において重要な工程である。過去 2000 年間、救急措置において止血させる利用可能な物質および方法（ガーゼ、包帯、直接圧迫および止血帯）は大幅には変化していない¹⁾。これらの方法において止血は、一般人には困難であり、さらなる出血または致命的な出血になる可能性がある。止血に重要な役割を果たしている血中タンパク質はフィブリノゲン(Fbg)である。Fbg は血中および組織液に分布する分子量 340000 の巨大糖タンパク質であり、等電点が 5.5 の酸性タンパク質である。また、この巨大糖タンパク質は血液凝固因子 I と呼ばれ、13 以上の因子を含む大変複雑な血液凝固カスケードを経て最終段階で Thrombin の作用によってゲル化し Fibrin となる²⁾。この血液凝固因子 I であるタンパク質を外傷部表面に固定することにより素早い止血に寄与することができると考えられる。しかし、血中には様々なタンパク質が存在しているため、Fbg のみを認識する必要がある。分子認識の方法として、分子インプリント法がある。分子インプリント法は

認識させたいターゲット分子の形だけでなく静電氣的相互作用等を利用し、結合部位を高分子内に構築して特定の分子だけを認識する鑄型を形成させる方法である³⁾。この手法を用いることにより、Fbg をポリマー上に吸着させ、止血用ポリマーを調製することが出来ると考えられる。そこで、本研究ではアクリルアミドゲルに Fbg をターゲット分子とした分子インプリントポリマー(MIP)を導入したアクリルアミドゲルを用いて Fbg の認識能を評価した。

2. 実験方法

2-1. 機能性モノマー導入アクリルアミドゲルの調製

目的タンパク質としてフィブリノゲン(Fbg) 4.82×10^{-8} mol, モノマーにアクリルアミド(AAm) 1.77×10^{-2} mol, (3-アクリルアミドプロピル)トリメチルアンモニウムクロリド(APTMAC) 1.68×10^{-3} mol, 架橋剤に *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(Bis) 6.49×10^{-4} mol を Tris/HCl (50mM pH 7.4)緩衝溶液 9cm³に加えた。その後、重合促進剤に *N, N, N', N'*-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED) 0.5 cm³, 重合開

Adsorption Behavior of Fibrinogen to Acrylamide Gel

Masahiro SONE, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

始剤に 5% (wt/wt) 過硫酸アンモニウムを (APS) 0.5 cm^3 加えてゲルを重合した。重合した後、4% (wt/wt) 水酸化ナトリウム水溶液に 2 時間浸漬させた。浸漬させたゲルを純水で漱いだ。そのゲルを HCl/Tris 緩衝溶液に浸漬させ分光光度計を用いて吸光度(280 nm)を測定し、溶出除去の確認をおこない、APTMAC-MIP を調製した。また、Fbg を導入しない APTMAC-NIP も同様に調製した。

2-2. NIP の調製

モノマーに AAm $1.94 \times 10^{-2} \text{ mol}$, 架橋剤にド Bis $6.49 \times 10^{-4} \text{ mol}$ を Tris/HCl (50mM pH 7.4) 緩衝溶液 9 cm^3 に加えた。その後、重合促進剤に TEMED 0.5 cm^3 , 重合開始剤に 5% (wt/wt) APS を 0.5 cm^3 加えてゲルを重合した。重合した後、HCl/Tris 緩衝溶液に浸漬させ分光光度計を用いて吸光度(280 nm)を測定し、溶出除去の確認をおこない、NIP を調製した。

2-3. Fbg 認識能をもつアクリルアミドゲルを評価

HCl/Tris 緩衝溶液 20 cm^3 に Fbg を溶解した溶液($1.09 \times 10^{-7} \text{ M}$)に調製したアクリルアミドゲルを浸漬させ、分光光度計を用いて各時間における溶液の吸光度 (280 nm) を測定した。吸光度の変化量を検討し、Fbg 認識能をもつアクリルアミドゲルを評価した。

3. 実験結果および考察

Fig.1 にアクリルアミドゲルへの Fbg の吸着量を示す。その結果、APTMAC 含有ゲルに対して Fbg は吸着したが、NIP への吸着は見られなかった。これは、APTMAC の四級アンモニ

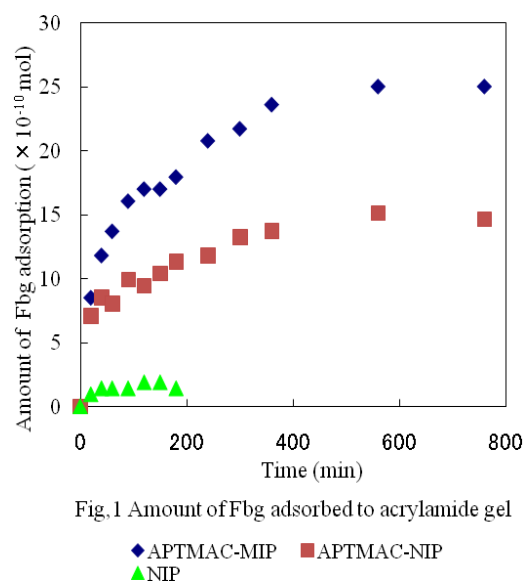


Fig.1 Amount of Fbg adsorbed to acrylamide gel

ウム基に対して Fbg の酸性アミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸の解離したカルボキシル基が静電的相互作用によって吸着したと考えられる。また、APTMAC-MIP と APTMAC-NIP では APTMAC-MIP のほうが多く Fbg を吸着した。

4. まとめ

アクリルアミドゲルへの Fbg 認識能を評価した結果、以下のことが分かった。

- ・ APTMAC 含有ゲルは Fbg を静電的相互作用によって吸着した。
- ・ 鑄型が Fbg の認識能を向上させた。

参考文献

- 1) Zimmerman L, Veith I. *Great Ideas in the History of Surgery*. (1993)
- 2) 松田道生, 鈴木宏治編集, 止血・血栓・線溶, 174-180. (1994)
- 3) Dilek Çimen, Esma Akbulut, Gökhan Demirel, Molecularly imprinted hydrogels for fibrinogen-recognition , *Reactive and Functional Polymers*, **69**, No. 9, 655-659, (2009)