

血清タンパク質存在下でのアクリルアミド/アクリル酸 共重合ゲルへのクレアチニンの吸着

日大院生産工 ○三須 智志 高橋 大輔 和泉 剛

1 緒論

腎臓の最終代謝物であるクレアチニン (CRE) は、尿毒症関連の有毒物質として知られている。一般に腎機能の衰えた患者に対して、CRE を除去する方法として人工透析が用いられている。しかし人工透析では、CRE だけではなく血中に必要な物質も除去される問題点がある。そこで本研究では、選択的に CRE を認識する方法として分子インプリント法¹⁾に着目した。CRE を選択的に吸着するアクリル酸 / アクリルアミド共重合ゲル (CRE-MIP(AAc)) を調製した。CRE-MIP (AAc) の機能性モノマー (FM) であるアクリル酸 (AAc) と CRE の相互作用を示した。また、血中条件における CRE-MIP(AAc) への CRE の選択的な吸着を検討した。

2 実験方法および測定方法

2-1 試料

CRE-MIP(AAc) の調製には、FM として AAc, モノマーとしてアクリルアミド (AAm), 架橋剤として *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (BIS), 重合促進剤として *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED), 重合開始剤として過硫酸アンモニウム (APS) を用いた。目的物質として CRE を用いた。MIP の調製方法の概念図を Fig. 1 に示す。

2-2 種々の AAc 濃度における CRE-MIP の調製

Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.40, *I* = 0.05) に AAc および 0.20 mmol の CRE を混合し、複合体溶液を調製した。複合体溶液に AAm, 0.875 mmol の BIS, TEMED および APS を添加した。Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.40, *I* = 0.05) を用いて全量を 10.0 cm³ に定容し、25.0℃で 6 時間重合した。重合したゲルの AAm および AAc の総量が 5.50 mmol となるように複合体溶液を調製した。

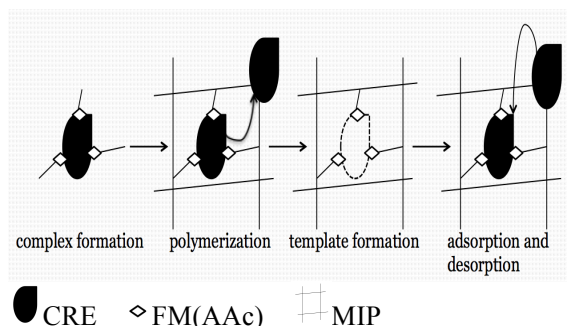


Figure 1. Preparation scheme of MIPs

重合後、直径 2.0 mm、高さ 2.0 mm の円柱状に成型した。蒸留水を用いて成型したゲル中の CRE と未反応モノマーを除去した。その後、凍結乾燥によりドライの CRE-MIP (AAc) を得た。
2-3 CRE-MIP(AAc) への CRE の吸着実験

0.1000 g の CRE-MIP(AAc) を 5.0 cm³ の Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.40, *I* = 0.05) で膨潤させた。膨潤した CRE-MIP(AAc) に CRE 溶液を 5.0 cm³ 添加し、25℃で一定時間毎に吸光度 (波長 260 nm) を測定した。吸着開始時と吸着平衡時の吸光度差から CRE-MIP(AAc) への CRE の吸着量 (q_e) を (1) 式より算出した²⁾。

$$q_e = (C_0 - C_e) \cdot V / m \quad (1)$$

C_0 : 吸着開始時濃度 (mg/cm³)

C_e : 吸着平衡時濃度 (mg/cm³)

V : クレアチニン溶液の体積 (cm³)

m : CRE-MIP(AAc) の質量 (g)

同様の操作で、種々の pH における CRE-MIP(AAc) への CRE の q_e 値を算出した。

また、血清タンパク質として、ヒト血清アルブミン (HSA)、ヒト由来のフィブリノーゲン (Fbg) およびヒト由来のヘモグロビン (Hb) を用い、調製した CRE-MIP(AAc) への q_e 値を同様に

Adsorption of creatinine to acryl acid-co-acryl amide gels in serum protein presence

Satoshi MISU, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

算出し、CRE-MIP(AAc)のCREの選択性を検討した。

3 実験結果および考察

種々の AAc 濃度で調製した CRE-MIP(AAc) への CRE の q_e 値を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 より 2.0 mmol の AAc のモル数の CRE-MIP(AAc)は、CRE を最も吸着した。AAc 増加における CRE-MIP(AAc)の CRE 鑄型内の空間の増加によって吸着量が増加したと考えられる。そのため、CRE の吸着において AAc 2.0 mmol の CRE-MIP(AAc)が至適組成であると決定した。

種々の pH における CRE-MIP(AAc)の CRE の q_e 値および AAc の解離度 α を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 より、pH の上昇に対して、CRE-MIP(AAc) への CRE の q_e 値は増加した。また、pH 7.4 および pH 9.0 の q_e 値は、変化が見られなかった。AAc の pK_a は 4.25 であり、pH の上昇に対して、AAc は解離していき pH 6.0 付近で AAc は完全解離する。そのため、種々 pH における CRE-MIP(AAc)の CRE の q_e 値は、pH の上昇によって、CRE-MIP(AAc) 内の AAc の負電荷が増加することで、増加したと考えられる。したがって、CRE-MIP(AAc) への CRE の吸着は、AAc の負電荷による相互作用である。

CRE-MIP(AAc)への HSA, Fbg および Hb の q_e 値を Table1 に示す。

Table1 より CRE-MIP(AAc)への HSA, Fbg および Hb の q_e 値は、CRE の q_e 値に比べ低い値を示した。HSA, Fbg および Hb は、pH 7.4 では負電荷に帯電しているため CRE-MIP(AAc)内の AAc の負電荷と反発し、吸着量が低下したと考えられる。また、CRE と HSA, Fbg および Hb の分子の大きさの違いにより、CRE-MIP(AAc)の CRE 鑄型内に吸着しなかったと考えられる。

この結果より CRE-MIP(AAc) は血清タンパク質を吸着しないことが明らかとなった。

4 まとめ

CRE-MIP(AAc)を調製した結果、以下のことが明らかとなった。

1. CRE の吸着において CRE-MIP(AAc)の至適組成を決定した。
2. CRE-MIP(AAc) への CRE の吸着は、AAc の負電荷による相互作用である。
3. CRE-MIP(AAc) は血清タンパク質を吸着しない。

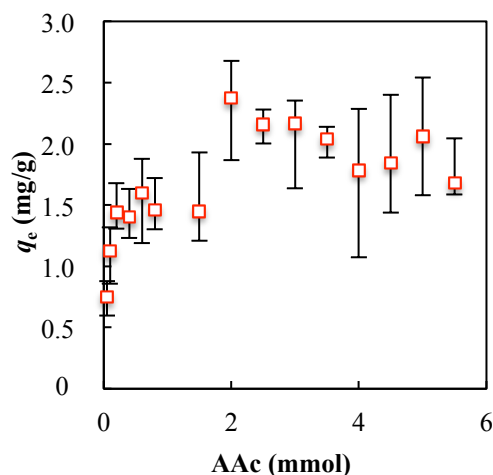


Figure 2. Amount of adsorbed CRE to CRE-MIPs (AAc) with various AAc concentration : pH 7.4 , $I = 0.05$, 25.0°C

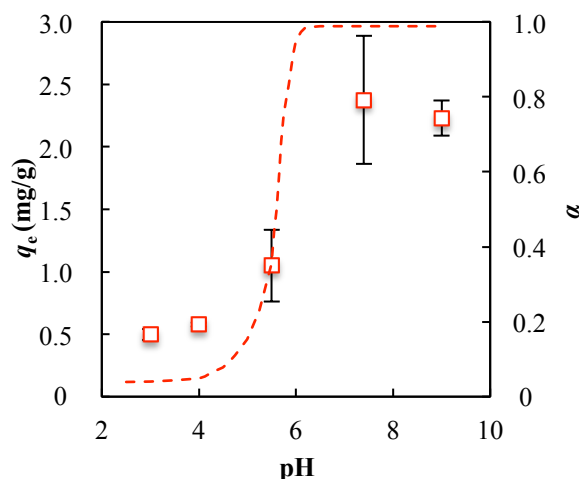


Figure 3. Effect of pH value on adsorption of CRE by CRE-MIPs (AAc) and dissociation degree of AAc : AAc 2.0 mmol , $I = 0.05$, 25.0°C

Table 1. Amount of adsorbed HSA, Fbg, Hb to CRE-MIPs (AAc)

	q_e (mg/g)	q_e (μ mol/g)
CRE	2.306	20.385
HSA	0.774	0.012
Fbg	0.613	0.002
Hb	0.911	0.014

「参考文献」

- 1) 軽部征夫, バイオセンサ・ケミカルセンサ辞典 第1版, テクノシステム, (2007) 63-69
- 2) Guoqi Fu *et al.*, *Reactive & Functional polymer*, 67(2007) 442-450