

## A121

## アフィニティー吸着膜を用いたネコ尿中タンパク質の除去

(千葉大)○(学)松野 伸哉・梅野 太輔・(正)斎藤 恭一\*・(岩手大) 山下 哲郎

(日本全薬工業) 伊藤 綾子・鈴木 靖幸

1. 緒言 腎臓病を発病すると、尿に血清タンパク質などの血中成分が混入する。ヒトの腎臓病は、尿試験紙を用いて尿中の血清タンパク質を検出し、簡便に診断できる。しかしながら、ネコでは健康な状態で腎臓から *carboxylesterase* 活性をもつ *carboxylesterase-like urinary excreted protein* (cauxin, 70 kDa) を尿中へ高濃度 (約 0.5 mg/mL) に分泌するため<sup>1)</sup>、尿試験紙を用いて腎臓病を診断するには、尿中から cauxin を特異的に除去する必要がある。

本研究では、アフィニティーリガンドとして *carboxylesterase* 阻害剤である trifluoroketone (TFK)<sup>2)</sup> を固定した多孔性膜を作製し、ネコ尿からの cauxin 除去性能を評価した。

## 2. 実験 1) アフィニティー吸着膜の作製

アフィニティー吸着膜の作製経路を Fig. 1 に示す。まず、ポリエチレン製多孔性中空糸膜 (PE 膜) に電子線を照射して、glycidyl methacrylate (GMA) をグラフト重合し、GMA 膜を作製した。つぎに、1,2-ethanedithiol (C2DT) および 3-bromo-trifluoropropane-2-one (TFA) を反応させて、1,1,1-trifluoro-3-(2-sulfanyl-ethylsulfanyl)propane-2-one (C2TFK) 溶液を調製した。そして、この溶液に GMA 膜を浸漬して、エポキシ基を C2TFK 基に転化した。その後、残存エポキシ基に水を付加して、diol 基に転化した。得られた膜を C2TFK-diol 膜と呼ぶ。

2) アフィニティー吸着膜の評価 ネコ尿の懸濁物を除去したのち、人工尿で3倍希釈した。その後、ウシ血清アルブミン (BSA) を添加して、供給液とした。供給液を C2TFK-diol 膜の内面から外面へ 10 mL/h で透過した。膜からの流出液に含まれるタンパク質を定量して、破過曲線を作成した。また、流出液に含まれるタンパク質の分布を、非還元条件での SDS-PAGE によって評価した。

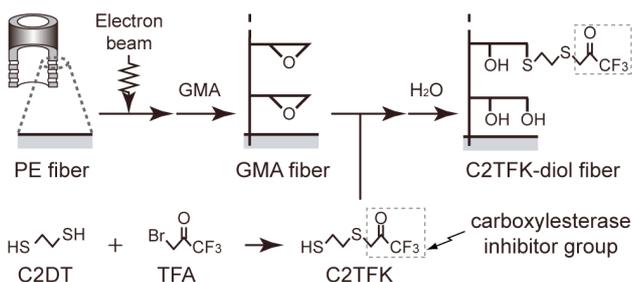


Fig. 1 Preparation scheme of trifluoroketone-immobilized hollow-fiber membrane.

3. 結果と考察 中空部分を含む膜体積あたりの C2TFK 基密度が 90  $\mu\text{mol/mL}$  の C2TFK-diol 膜を作製できた。C2TFK-diol 膜の供給液中のタンパク質に対する破過曲線を Fig. 2 に示す。破過曲線の縦軸には、供給液中のタンパク質濃度 (C) を流出液中のそれ ( $C_0$ ) で割った値をとった。供給液中のタンパク質は透過直後に破過した。その後、BSA 濃度に相当する  $C/C_0 = 0.2$  まで上昇して、0.24~0.68 mL で一定となった。C2TFK-diol 膜からの流出液中のタンパク質の分布を Fig. 3 に示す。流出液中の cauxin のバンドは、8 フラクション目 (0.68 mL) 以降で現れた。一方で、BSA のバンドはすべてのフラクションで現れた。

SDS-PAGE の結果から、C2TFK-diol 膜は cauxin を特異的に除去できることがわかった。また、cauxin を特異的に除去できた 8 フラクション目までの膜体積あたりの cauxin 吸着容量は 0.66 mg/mL であった。これは、試験紙での評価に必要な 0.1 mL のネコ尿を処理するのに十分な吸着容量である。また、供給液 0.68 mL の処理に要した時間は 4 分であった。試験紙を用いたネコの腎臓病診断を可能にする cauxin 迅速除去材料を開発できた。

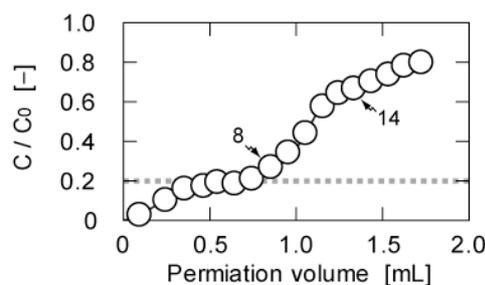


Fig. 2 Breakthrough curve of C2TFK-diol fiber for urine proteins and BSA. Broken line corresponds to BSA added to feed.

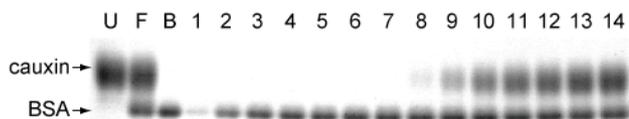


Fig. 3 SDS-PAGE analysis throughout the removal procedures for cauxin. Lanes U, F, and B correspond to cat urine, feed, and BSA solution, respectively. Lanes 1~14 correspond to a series of fractions of effluent from C2TFK-diol fiber.

[引用文献] 1) M. Miyazaki *et al.*, *Biochem. J.*, **370** (2003) 101-110. 2) C. E. Wheelock *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, **14** (2001) 1563-1572.

\*Corresponding author, E-mail: marukyo@faculty.chiba-u.jp