

フルオレセインの自己消光を利用したヘパリンセンサーの開発

○江川 祐哉¹, 林田 亮輔², 関 俊暢¹, 安斉 順一²(¹城西大薬, ²東北大院薬)

【目的】複数のフルオレセイン分子が数 nm の距離に近づくと、フルオレセインの蛍光強度が減少する。この現象はフルオレセインの自己消光と呼ばれる。本研究では、この自己消光を検出メカニズムとしたヘパリンセンサーの開発を試みた。ヘパリンは血液凝固阻止剤として用いられ、過量投与で出血傾向を招く。そのため、簡便なヘパリン定量法の開発が求められている。ヘパリンと強く静電的相互作用するプロタミンをヘパリン認識部位、自己消光能を持つフルオレセインを信号発信部位として組み合わせ、ヘパリンセンサーとして機能するか評価した。

【方法】プロタミンとフルオレセインイソチオシアネートを反応させ、フルオレセイン修飾プロタミン (F-Pro) を得た。F-Pro 溶液中にヘパリン溶液を混合したときの蛍光強度変化を観察した。

【結果および考察】F-Pro には平均で 0.8 個のフルオレセインが結合していることを確認した。F-Pro 溶液 (5.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の蛍光強度は、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヘパリンの共存により 87% 減少した。蛍光強度の変化はヘパリン濃度依存的であり、治療濃度のヘパリンを定量することが可能であった。F-Pro とヘパリンの結合比を調査したところ、複数の F-Pro 分子が一つのヘパリン分子に結合していることが明らかになった。この結果は、複数のフルオレセインがヘパリン上で集積されていることを意味し、蛍光強度減少のメカニズムがフルオレセインの自己消光であることを支持する。中性領域ではアルブミンが妨害物質となったが、測定溶液を酸性にすることで、アルブミンの妨害を除去することができた。F-Pro は血漿中のヘパリンを定量することも可能であり、実用化に適したヘパリンセンサーと言える。