



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 9/96, C12Q 1/37, 1/56</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/01631</p> <p>(43) 国際公開日 1997年1月16日(16.01.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01738</p> <p>(22) 国際出願日 1996年6月24日(24.06.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/159330 1995年6月26日(26.06.95) JP 特願平7/159331 1995年6月26日(26.06.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 矢後弘和(YAGO, Hirokazu)[JP/JP] 遠見真理(EMMI, Mari)[JP/JP] 〒301 茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化学薬品株式会社 つくば工場技術開発センター内 Ibaraki, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: STABLE PLASMIN SOLUTION</p> <p>(54)発明の名称 安定なプラスミン溶液</p> <p>(57) Abstract A plasmin solution which contains: (A) plasmin; and (B) a component selected from among (B-1), (B-2) and (B-3) as will be specified below: (B-1) an oligopeptide composed of at least two amino acids bonded to each other which are selected from among lysine, arginine, glycine, alanine, aspartic acid and methionine; (B-2) at least two amino acids selected from among lysine, arginine, glycine, alanine, aspartic acid and methionine; and (B-3) an amino acid selected from among lysine, arginine, glycine, alanine, aspartic acid and methionine and a polyhydric alcohol. Even when stored for a long time, the solution remains stable without suffering any reduction in the plasmin activity or the activity of binding to α2PI. Thus it is useful as a reagent for assaying α2PI, etc.</p>		

(57) 要約

本発明は、(A) プラスミン；並びに

(B) 次の (B-1)、(B-2) 又は (B-3)、

(B-1) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2個以上が結合してなるオリゴペプチド、

(B-2) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2種以上、又は

(B-3) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の1種と多価アルコール、

を含有するプラスミン溶液に関する。この溶液は、長期間保存してもプラスミン活性及び $\alpha 2 P I$ との結合活性が低下することなく、安定に維持され、 $\alpha 2 P I$ の測定試薬等として有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド		ヴァニア共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	韓国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム

明 細 書

安定なプラスミン溶液

技術分野

本発明は、血液凝固線溶因子の測定試薬等に有用な安定なプラスミン溶液に関する。

背景技術

生体内における酵素反応は、その活性化物質やその反応を阻害する物質により制御・調整され、機能の調節が図られている。例えば、血液凝固機構においては、血管損傷部位以外での血液凝固反応や、過度の凝固亢進・線溶亢進を阻害する酵素阻害物質が存在し、これにより血液凝固・線溶の制御・調節が行われている。血栓形成の進展状態を検査する血液学的検査においては、酵素阻害物質の測定は重要であり、凝固・線溶の状態を示す良い指標となることから、アンチトロンビンIII (ATIII)、 $\alpha 2$ -プラスミンインヒビター ($\alpha 2$ PI) などの酵素阻害物質の測定が行われている。

これらのうち、 $\alpha 2$ PIは、血液の線維素溶解現象を調節する線溶阻止因子の中でも最も重要な因子であることが明らかにされ、生体内の線溶亢進状態を知るための指標として注目されている。また、その血液中レベルは汎発性血管内血液凝固症 (DIC)、肝疾患で顕著に低下するなど、種々の疾患、症状により変動するため、これら疾患のスクリーニング、病体解析、予後判定及び線溶療法時の薬効判定の指標となっている。

従来、このような酵素阻害物質の測定法としては、測定対象である酵素阻害物質と過剰量の酵素とを反応させ、残存する酵素を測定することにより酵素阻害物質を測定することが行われている。例えば、生体試料 (検体) 中の $\alpha 2$ PI量を測定する場合には、 $\alpha 2$ PIが酵素プラスミンを阻害することを利用して、一定量のプラスミンを検体中の $\alpha 2$ PIと反応させた後、残存するプラスミンの活性を測定することにより、 $\alpha 2$ PI量を求めることが行われている。そして、この

場合に、プラスミンの活性は、発色性合成基質の加水分解速度を吸光度変化をもって測定する方法などにより求められている。

しかし、このような酵素阻害物質の多くはセリンプロテアーゼインヒビターであり、このような酵素阻害物質を測定するための酵素はセリンプロテアーゼである。セリンプロテアーゼ等のプロテアーゼの多くは、自己の分子内に自己の基質となる部位が存在するため、溶液中で速やかに分解を起こし、プロテアーゼ活性あるいはプロテアーゼインヒビターとの結合活性の低下が認められることがある。例えば、 $\alpha 2PI$ の測定に用いられるプラスミンは、ヒト由来のものでは、 $37^{\circ}C$ に1時間放置するとプロテアーゼ活性の72%が失活し、H鎖、L鎖共に分解が生じる(K. N. N. Reddy, Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 1016-1022 (1980))。

一方、プラスミンのプロテアーゼ活性は、フィブリノーゲン、 ϵ -アミノカプロン酸、高イオン強度、グリセロールの添加(J. Jespersen, Thromb. Res., 37, 395-404 (1986))、更に、 ϵ -アミノカプロン酸やリジンの添加(K. N. N. Reddy, Progress in Fibrinolysis, 374-379 (1981))等により、安定性が向上することが知られている。

しかしながら、これらの方法では極めて短時間の安定化が図れるのみであり、例えば $37^{\circ}C$ で1時間放置すると、活性は著しく低下してしまう。また、50%グリセロールのように、プロテアーゼ活性の安定性が比較的保てるものであっても、プロテアーゼインヒビターとの結合活性が低下するなどの問題があった(M. Shimokawa, Analytical Science, 10, 533-536 (1994))。

このため、このような酵素阻害物質の測定試薬は、プラスミンを溶液状態で保存できないことから、凍結乾燥品として製造されており、測定の際には用時調製が必要であり、経済性や操作性、迅速性などの点で問題があった。

また、従来用いられているプラスミン溶液では、粘性が高いことや、プラスミン活性及びプラスミンの $\alpha 2PI$ 結合活性が著しく低下するため、 $\alpha 2PI$ の測定試薬として自動分析機器に応用することは困難であった。

従って、本発明の目的は、プラスミンを溶液状態で保存してもプラスミン活性及びプラスミンの $\alpha 2 P I$ との結合活性が、長期間安定に維持できるプラスミンの安定化方法及び安定なプラスミン溶液を提供することにある。

図面の簡単な説明

図1は、実施例5において、検量線性を検討したときの、 $\alpha 2 P I$ 濃度と測定値 ($\Delta A b s / m i n$) の関係を示す図である。

発明の開示

かかる実情において、本発明者らは鋭意研究を行った結果、特定のアミノ酸又はそれらが結合してなるオリゴペプチドを用いれば、プラスミンが長期間安定で、 $\alpha 2 P I$ 測定用試薬等として有用なプラスミン溶液が得られることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

(A) プラスミン；並びに

(B) 次の (B-1)、(B-2) 又は (B-3)、

(B-1) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2個以上が結合してなるオリゴペプチド、

(B-2) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2種以上、又は

(B-3) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の1種と多価アルコール、

を含有するプラスミン溶液を提供するものである。

また、本発明は、プラスミン溶液に、

(B-1) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2個以上が結合してなるオリゴペプチド、

(B-2) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及び

メチオニンから選ばれるアミノ酸の2種以上、又は
(B-3) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及び
メチオニンから選ばれるアミノ酸の1種と多価アルコール、
を添加することを特徴とするプラスミンの安定化方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、用いられるプラスミンとしては、メチオニル型（そのN末端がメチオニンである）、グルタミル型（そのN末端がグルタミン酸である）、リジル型（そのN末端がリジンである）などのいずれでも良く、例えばクロモジェニックス社などから市販されているものを使用することができる。これらのプラスミンは単独又は混合物として用いることができ、活性として0.1~10 nkat/ml、特に0.3~5 nkat/mlとなるような範囲で用いるのが好ましい。なお、1 nkatは、1秒間に1 nmolのプラスミン合成基質（S-2251）を分解するプラスミン量をいう。

本発明において、成分（B-1）として用いられるオリゴペプチドとしては、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の1種又は2種以上を組合わせたジペプチド、トリペプチド等が挙げられる。これらのうち、1種のアミノ酸からなるジペプチド又はトリペプチドが好ましく、特にグリシルグリシン、グリシルグリシルグリシン、アラニルアラニンが好ましい。

これらのオリゴペプチドは、1種又は2種以上を組合わけて用いることができる。オリゴペプチドは、全組成中に1~20重量%（以下、単に%で示す）、特に5~20%配合するのが好ましい。また、溶液中のプラスミンに対して1~2000 mg/nkat、特に10~700 mg/nkatの範囲で配合するのが好ましい。

本発明において、成分（B-2）として2種以上のアミノ酸を組合わけて用いる場合のアミノ酸は、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるものであり、これらのうち、特にリジンとグリシン、リジンとアラニンの組合わせが好ましい。

これらのアミノ酸は、2種以上の合計が全組成中に1~20%、特に5~20

%となるように配合するのが好ましい。また、2種以上のアミノ酸の合計が、溶液中のプラスミンに対して1~2000mg/nkat、特に10~700mg/nkatとなる範囲で配合するのが好ましい。

本発明において、成分(B-3)としては、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の1種と多価アルコールが用いられる。

ここで用いるアミノ酸としては、特にリジンが好ましい。

これらのアミノ酸は、全組成中に1~20%、特に5~20%配合するのが好ましい。また、溶液中のプラスミンに対して1~2000mg/nkat、特に10~700mg/nkatの範囲で配合するのが好ましい。

また、ここで用いられる多価アルコールとしては、グリセロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコール等が好ましい。これらの多価アルコールは、全組成中に1~50%、特に5~30%配合するのが好ましい。

本発明において(B)成分として(B-1)オリゴペプチド又は(B-2)2種以上のアミノ酸を用いた場合、更に多価アルコールを配合することができ、より安定なプラスミン溶液を得ることができる。ここで、多価アルコールとしては、グリセロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコール等が挙げられる。これらの多価アルコールを配合する場合には、全組成中に1~50%、特に5~30%配合するのが好ましい。

また、本発明において(B)成分として(B-1)オリゴペプチドを用いる場合、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれる1種又は2種以上のアミノ酸を組合わせて用いることができ、より安定なプラスミン溶液を得ることができる。この場合には、これらのアミノ酸は全組成中に1~20%、特に5~20%配合するのが好ましい。

本発明のプラスミン溶液において、成分(B)として(B-1)オリゴペプチドを用い、更に1種又は2種以上のアミノ酸を配合した場合には、さらに多価アルコールを配合することができ、より安定なプラスミン溶液を得ることができる。ここで、多価アルコールとしては、グリセロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコール等が好ましい。これらの多価アルコールを配合する場合には、

全組成中に1～50%、特に5～30%配合するのが好ましい。

本発明のプラスミン溶液は、 $\alpha 2PI$ の測定試薬、プラスミンの標準液等として有用なものである。測定試薬とする場合には、通常用いられる発色性合成基質を使用することにより、検体中の $\alpha 2PI$ を精度良く定量することができる。発色性合成基質としては、特に制限されず、例えばクロモジェニック社製のS-2251 (H-D-Val-Lys-パラニトロアニリン)、S-2403 (Glu-Phe-Lys-パラニトロアニリン)などを好適に使用することができる。

実施例

次に、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1

下記組成の第1試薬250 μ lに、正常血漿検体(所定量の $\alpha 2PI$ を含む)又は生理食塩液をそれぞれ3 μ l加え、37°Cで5分間反応させ、次いで下記組成の第2試薬100 μ lを添加した後、波長405nmでの吸光度の1分間当たりの変化量を測定した。生理食塩液を用いた時の吸光度の変化量はプラスミン活性を示し、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力価を示している。また、生理食塩液のプラスミン活性から正常血漿検体を反応させた時のプラスミンの残存活性を減じた値がプラスミンの $\alpha 2PI$ 結合活性を示している。

なお、第2試薬のそれぞれのプラスミン溶解液は、表1に示す添加物を添加した20%グリセロール溶液を用いた。これら溶液は水酸化ナトリウム又は塩酸でpH7.4に調整し、プラスミンを溶解した後、半分を用いて作成当日に測定を行い、残り半分は密閉して37°Cで4日間放置した後測定を行った。なお、比較として、50%グリセロール及び20%グリセロールを用いた。結果を表1に示す。

第1試薬:

H-D-バリル-L-ロイシル-L-リジル-p-ニトロアニリン
 (クロモジェニック社製; S-2251) 1. 2mM
 25mM トリス緩衝液 (pH7.4)

第2試薬：

プラスミン

3 nKat/ml

それぞれのプラスミン溶液 (pH 7.4)

*: 1 nkatは1秒間に1 nmolのS-2251を分解するプラスミン量をいう。

表 1

No.	添加物	初期値		37°C、4日後測定値		割合(%)	
		活性	結合活性	活性	結合活性	活性	結合活性
1	50%グリセロール	3517	646	3520	514	100	80
2	20%グリセロール	2722	620	293	83	3	3
3	10%リジン	3017	416	2960	377	98	91
4	10%アルギニン	2916	570	2678	388	92	68
5	10%アラニン	2969	660	1974	501	66	76
6	10%グリシン	2853	604	1945	457	68	76
7	10%グリシルグリシン	2668	416	2655	352	100	85

- (1) No. 3-7 は、20%グリセロール溶液に溶解。
- (2) 初期値及び37°C、4日後の測定値の単位は、 Δ Abs/min。
- (3) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力価を示す。
- (4) 結合活性は、プラスミンの α 2PIとの結合能力を示し、プラスミンの活性値から正常血漿検体を反応させた時の残存プラスミン活性を減じた時の値を示す。
- (5) 割合は、初期値の活性及び結合活性を100%とした時の37°C、4日後の測定値の割合を示す。

表1の結果から明らかなように、本発明のプラスミン溶液は、プラスミン活性及び α 2PI結合活性が低下することなく、安定に維持された。また、プラスミン溶液の粘性も低いものであった。

実施例2

表2に示す組成の各種プラスミン溶液を用い、実施例1と同様にして、製造時及び37°Cで2日間保存した後のプラスミン活性及びプラスミンの α 2PI結合活性を測定した。結果を表2に示す。

表 2

No.	添加物	初期値		37°C、2日後測定値		割合(%)	
		活性	結合活性	活性	結合活性	活性	結合活性
1	50%グリセロール	3666	674	3689	593	101	88
2	10%Lys	2915	430	2221	345	76	80
3	10%Lys + 2%Ala	2894	412	2456	405	85	98
4	10%Lys + 2%Gly	2873	426	2475	389	86	91
5	10%Gly-Gly	2766	469	2527	419	91	89
6	10%Gly-Gly + 2%Ala	2722	461	2589	425	95	92
7	10%Gly-Gly + 2%Gly	2705	447	2572	428	95	96

- (1) No. 3-7は、20%グリセロール溶液に溶解。
- (2) 初期値及び37°C、2日後の測定値の単位は、 Δ Abs/min。
- (3) 活性は、プラスミンの合成基質(S-225I)を加水分解する力価を示す。
- (4) 結合活性は、プラスミンの α 2PIとの結合能力を示し、プラスミンの活性値から正常血漿検体を反応させた時の残存プラスミン活性を減じた時の値を示す。
- (5) 割合は、初期値の活性及び結合活性を100%とした時の37°C、2日後の測定値の割合を示す。
- (6) Gly-Gly:グリシルグリシン, Ala:アラニン, Gly:グリシン, Lys:リジンを示す。

表2の結果から明らかなように、本発明のプラスミン溶液は、プラスミン活性及び $\alpha 2PI$ 結合活性が低下することなく、安定に維持された。

また、No. 3の10%リジン及び2%アラニンを含むプラスミン溶液の粘度は、VISCOMATE（ヤマイチ電機工業社製）を用いて25℃において測定したときに、1.40 cpであり、表2中のNo. 3の10%リジン及び20%グリセロールを含むプラスミン溶液の粘度は2.47 cpであった。これに対し、50%グリセロールを含むプラスミン溶液の粘度は6.98 cpであった。このように、本発明のプラスミン溶液は粘性の低いものであり、自動分析機器にも使用可能である。

実施例3

表3に示す組成の各種プラスミン溶液を用い、実施例1と同様にして、製造時及び37℃で25日間保存した後のプラスミン活性及びプラスミンの $\alpha 2PI$ 結合活性を測定した。なお、生理食塩液及び正常血漿検体の液量は5 μ l とした。結果を表3に示す。

表 3

No.	添加物	初期値		37°C、25日後測定値		割合(%)	
		活性	結合活性	活性	結合活性	活性	結合活性
1	50%グリセロール	3115	976	2917	704	94	72
2	Gly-Gly, Glycerol, L, A, G	2233	475	2240	515	100	108
3	Gly-Gly, Glycerol, L, A	2206	463	2109	478	96	103
4	Gly-Gly, Glycerol, L, G	2221	461	2168	457	98	99
5	Gly-Gly, Glycerol, A, G	2297	536	2228	538	97	101
6	Gly-Gly, Glycerol, L	2166	457	2050	468	95	102
7	Gly-Gly, Glycerol, A	2261	518	2185	523	97	101
8	Gly-Gly, Glycerol, G	2236	510	2150	517	96	101
9	Gly-Gly, Glycerol	2288	557	2100	541	92	97

- (1) 初期値及び37°C、25日後の測定値の単位は、 Δ Abs/min。
- (2) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力価を示す。
- (3) 結合活性は、プラスミンの α 2PIとの結合能力を示し、プラスミンの活性値から正常血漿検体を反応させた時の残存プラスミン活性を減じた時の値を示す。
- (4) 割合は、初期値の活性及び結合活性を100%とした時の37°C、25日後の測定値の割合を示す。
- (5) Gly-Gly:10%グリシルグリシン, L:2%リジン, A:2%アラニン, G:2%グリシン, Glycerol:10%グリセロールを示す。

表3の結果から明らかなように、本発明のプラスミン溶液は、プラスミン活性及び $\alpha 2 P I$ 結合活性が低下することなく、安定に維持された。また、プラスミン溶液の粘性も低いものであった。

実施例4

表4に示す組成の各種プラスミン溶液を用い、実施例1と同様にして、製造時及び37℃で9日間保存した後のプラスミン活性及びプラスミン $\alpha 2 P I$ 結合活性を測定した。なお、生理食塩液及び正常血漿液検体の液量は5 μ lとした。結果を表4に示す。

表 4

No.	添 加 物	初 期 値		37°C、9日後測定値		割 合 (%)	
		活 性	結 合 活 性	活 性	結 合 活 性	活 性	結 合 活 性
1	10%Gly-Gly	2675	607	2048	492	77	81
2	10%Gly-Gly + 10%Glycerol	2842	572	2686	580	95	101
3	10%Gly-Gly + 10%EtGlycol	2921	582	2645	561	91	96

- (1) 初期値及び37°C、9日後の測定値の単位は、 Δ Abs/min。
- (2) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力価を示す。
- (3) 結合活性は、プラスミンの α 2PIとの結合能力を示し、プラスミンの活性値から正常血漿検体を反応させた時の残存プラスミン活性を減じた時の値を示す。
- (4) 割合は、初期値の活性及び結合活性を100%とした時の37°C、9日後の測定値の割合を示す。
- (5) Gly-Gly:グリシルグリシン, Glycerol:グリセロール, EtGlycol:エチレンジグリコールを示す。

表4の結果から明らかなように、グリシルグリシンを含有する本発明のプラスミン溶液は、プラスミン活性及び $\alpha 2 P I$ 結合活性が低下することなく、安定に維持された。

また、No. 2の10%グリシルグリシン及び10%グリセロールを含有するプラスミン溶液の粘度は、VISCOMATE（ヤマイチ電機工業社製）を用いて25℃において測定したときに1.89cpであった。これに対し、50%グリセロールを含有するプラスミン溶液の25℃における粘度は6.98cpであった。本発明のプラスミン溶液は粘性も低いものであり、自動分析機器にも使用可能である。

実施例5

10%グリセロールを含む10%グリシルグリシンのプラスミン溶液を用い、実施例1と同様にして、0~200%濃度の $\alpha 2 P I$ 検体（n=2測定）及び50又は100%濃度の $\alpha 2 P I$ 検体（n=10測定）の活性測定を行い、検量線性及び再現性の検討をした。なお、検量線性の検討では、正常血漿検体の原液を200%濃度に $\alpha 2 P I$ として設定したため、検体量は10 μ lとした。また、再現性の検討では、正常血漿検体の原液を100%濃度の $\alpha 2 P I$ として設定したため、検体量は5 μ lとした。その結果を図1及び表5に示す。

表 5

濃度(%)		平均	SD	CV
50%	52 55 54 55 57 54 57 57 60 58	56	2.33	4.17
100%	106 105 105 106 107 99 104 102 105 107	105	2.46	2.35

図1の結果より、検量線性は良好であり、表6の結果より、再現性も良好であった。

産業上の利用可能性

本発明のプラスミン溶液は、長期間保存してもプラスミン活性及び $\alpha 2 P I$ との結合活性が低下することなく、安定に維持され、 $\alpha 2 P I$ の測定試薬等として有用である。また、溶液の状態で安定に保存することができるため、測定時にそのまま使用することができ、経済性及び操作性に優れ、簡便かつ迅速に測定を行

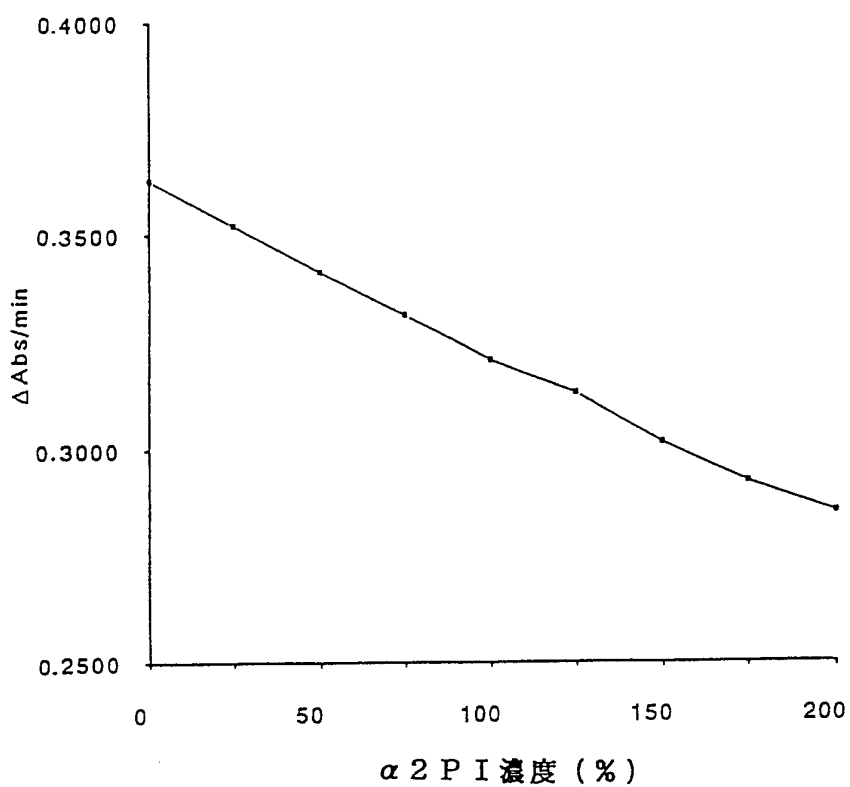
うことができる。更に、粘性が低いため、自動分析機器にも好適に使用することができる。

請 求 の 範 囲

1. (A) プラスミン；並びに
(B) 次の (B-1)、(B-2) 又は (B-3)、
(B-1) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸
及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2個以上が結合してなるオリ
ゴペプチド、
(B-2) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸
及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2種以上、又は
(B-3) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸
及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の1種と多価アルコール、
を含有するプラスミン溶液。
2. 成分 (B) が (B-1) 又は (B-2) であり、更に多価アルコールを含有
する請求項1記載のプラスミン溶液。
3. 成分 (B) が (B-1) であり、更にリジン、アルギニン、グリシン、アラ
ニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれる1種以上のアミノ酸を含有
する請求項1記載のプラスミン溶液。
4. 更に多価アルコールを含有する請求項3記載のプラスミン溶液。
5. プラスミン溶液に、
(B-1) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸
及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2個以上が結合してなるオリ
ゴペプチド、
(B-2) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸
及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の2種以上、又は
(B-3) リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸
及びメチオニンから選ばれるアミノ酸の1種と多価アルコール、
を添加することを特徴とするプラスミンの安定化方法。
6. 添加剤が (B-1) 又は (B-2) であり、更に多価アルコールを添加する
ものである請求項5記載の安定化方法。

7. 添加剤が(B-1)であり、更にリジン、アルギニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸及びメチオニンから選ばれる1種以上のアミノ酸を添加するものである請求項5記載の安定化方法。
8. 更に多価アルコールを添加するものである請求項7記載の安定化方法。

図 1




INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01738

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl⁶ C12N9/96; C12Q1/37, 1/56 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl⁶ C12N9/96; C12Q1/37, 1/56 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST File on Science and Technology</p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>JP, 3-66292, B2 (BEHRINGWERKE AG.), October 16, 1991 (16. 10. 91) & EP, B, 65256 & US, A, 442213</td> <td>1-2, 5-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP, 62-36502, B2 (The Green Cross Corp.), August 7, 1987 (07. 08. 87) & GB, B, 2068002</td> <td>1 - 8</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	JP, 3-66292, B2 (BEHRINGWERKE AG.), October 16, 1991 (16. 10. 91) & EP, B, 65256 & US, A, 442213	1-2, 5-6	A	JP, 62-36502, B2 (The Green Cross Corp.), August 7, 1987 (07. 08. 87) & GB, B, 2068002	1 - 8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	JP, 3-66292, B2 (BEHRINGWERKE AG.), October 16, 1991 (16. 10. 91) & EP, B, 65256 & US, A, 442213	1-2, 5-6									
A	JP, 62-36502, B2 (The Green Cross Corp.), August 7, 1987 (07. 08. 87) & GB, B, 2068002	1 - 8									
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>											
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>											
<p>Date of the actual completion of the international search July 15, 1996 (15. 07. 96)</p>		<p>Date of mailing of the international search report July 30, 1996 (30. 07. 96)</p>									
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.</p>		<p>Authorized officer Telephone No.</p>									

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁹ C12N9/96; C12Q1/37, 1/56		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁹ C12N9/96; C12Q1/37, 1/56		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICST科学技術文献ファイル		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 3-66292, B2(BEHRINGWERKE AG), 16. 10. 1991 (16. 10. 91) & EP, B, 65256 & US, A, 442213	1-2, 5-6
A	JP, 62-36502, B2(株式会社ミドリ十字), 7. 8月. 1987 (07. 08. 87) & GB, B, 2068002	1-8
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	15. 07. 96	国際調査報告の発送日
		30.07.96
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B 6807
日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	伊藤 明	 電話番号 03-3581-1101 内線 3448