

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3761925号
(P3761925)

(45) 発行日 平成18年3月29日(2006.3.29)

(24) 登録日 平成18年1月20日(2006.1.20)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 Q	1/56	(2006.01)	C 12 Q	1/56
C 12 N	9/68	(2006.01)	C 12 N	9/68
C 12 N	9/96	(2006.01)	C 12 N	9/96

請求項の数 4 (全 11 頁)

(21) 出願番号

特願平7-159330

(22) 出願日

平成7年6月26日(1995.6.26)

(65) 公開番号

特開平9-9997

(43) 公開日

平成9年1月14日(1997.1.14)

審査請求日

平成14年4月23日(2002.4.23)

(73) 特許権者 390037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸

(74) 代理人 100077562

弁理士 高野 登志雄

(74) 代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74) 代理人 100101317

弁理士 的場 ひろみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定なプラスミン溶液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プラスミン、グリシルグリシン及び多価アルコール(全組成中に5~30%)を含有するプラスミン溶液。

【請求項2】

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。

【請求項3】

プラスミン溶液に、グリシルグリシン及び多価アルコール(全組成中に5~30%)を添加することを特徴とするプラスミン溶液の安定化方法。 10

【請求項4】

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請求項3記載のプラスミン溶液の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

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。

【0002】

【従来の技術】

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阻害物質により制御・

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(A T III)、2 - プラスミンインヒビター(2 P I)などの酵素阻害物質の測定が行われている。

【 0 0 0 3 】

これらのうち、2 P I 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(D I C)、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。

10

【 0 0 0 4 】

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 2 P I 量を測定する場合には、2 P I 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 2 P I 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、2 P I 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。

20

【 0 0 0 5 】

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、2 P I 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))。

30

【 0 0 0 6 】

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、-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、-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))。

40

【 0 0 0 7 】

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 2 P I 結合活性が著しく低下するため、2 P I 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。

【 0 0 0 8 】

【 発明が解決しようとする課題 】

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

50

ミンの 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溶液を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

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、プラスミンが基質を切断することにより生じる特定のアミノ酸から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、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。

【0010】

すなわち、本発明は、プラスミン、グリシルグリシン及び多価アルコール（全組成中に 10
5 ~ 30 %）を含有するプラスミン溶液を提供するものである。

【0011】

本発明で用いられるプラスミンとしては、メチオニル型（そのN末がメチオニンである）、グルタミル型（そのN末がグルタミン酸である）、リジル型（そのN末がリジンである）などのいずれでも良く、クロモジエ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。

【0012】

本発明で用いられるアミノ酸の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。

【0013】

これらのオリゴペプチドは、1 種又は 2 種以上を組合せ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。

【0014】

また、これらのオリゴペプチドと、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。

【0015】

本発明のプラスミン溶液には、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好ましい。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。

【0016】

本発明のプラスミン溶液は、2 P I 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 2 P I 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、例えばクロモジエニックス社製の S - 2251 (H - D - V a l - L e u - L y s - パラニトロアニリン)、S - 2403 (G l u - P h e - L y s - 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。

【0017】

【発明の効果】

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 2 P I との結合活性

10

20

30

40

50

が低下することなく、安定に維持され、2PI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。

【0018】

【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。

【0019】

実施例 1

10

下記組成の第1試薬250μlに、正常血漿検体（所定量の2PIを含む）又は生理食塩液をそれぞれ3μl加え、37℃で5分間反応させ、次いで下記組成の第2試薬100μl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）を加水分解する力値を示している。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2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℃

20

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2に示す。

【0020】

【表1】

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 (S-2251)

1. 2mM

25mM トリス緩衝液 (pH7.4)

30

第2試薬：

プラスミン

3nKat/ml

それぞれのプラスミン溶液 (pH7.4)

【0021】

【表2】

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%グリシルグリシン	2668	416	2655	352	100	85

- (1) №3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、 $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ 。
 (3) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力値を示す。
 (4) 結合活性は、 $\alpha_2\text{PI}$ 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。

【0022】

表2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 $\alpha_2\text{PI}$ 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。

【0023】

実施例2

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度で2日間保存した後のプラスミン活性及びプラスミンの $\alpha_2\text{PI}$ 結合活性を測定した。結果を表3に示す。

【0024】

【表3】

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%Gly-Gly	2766	469	2527	419	91	89
4	10%Gly-Gly + 2%Ala	2722	461	2589	425	95	92
5	10%Gly-Gly + 2%Gly	2705	447	2572	428	95	96

- (1) 初期値及び37°C、2日後の測定値の単位は、 $\Delta \text{Abs}/\text{min}$
 (2) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力値を示す。
 (3) 結合活性は、プラスミンの $\alpha_2\text{PI}$ 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、2日後の測定値の割合を示す。
 (5) 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。

【0025】

表3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 $\alpha_2\text{PI}$ 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。

【0026】

実施例3

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度25日間保存した後のプラスミン活性及びプラスミンの $\alpha_2\text{PI}$ 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5μlとした。結果を表4に示す。

【0027】

【表4】

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、 $\Delta \text{Abs}/\text{min}$
 (2) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力値を示す。
 (3) 結合活性は、プラスミンの $\alpha_2\text{PI}$ との結合能を示し、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。

【0028】

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 $\alpha_2\text{PI}$ 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。

【0029】

実施例4

表5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 $\alpha_2\text{PI}$ 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5μlとした。結果を表5に示す。

【0030】

【表5】

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、 $\Delta \text{Abs}/\text{min}$
 (2) 活性は、プラスミンの合成基質(S-2251)を加水分解する力値を示す。
 (3) 結合活性は、プラスミンの $\alpha_2\text{PI}$ との結合能を示す。
 (4) 検体を反応させた時の残存プラスミン活性を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:エチレングリコールを示す。

【0031】

表5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 $\alpha_2\text{PI}$ 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。

【0032】

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 $\alpha_2\text{PI}$ 検体($n=2$ 測定)及び50又は100%濃度の $\alpha_2\text{PI}$ 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%濃度の $\alpha_2\text{PI}$ として設定し

たため、検体量は $10 \mu\text{l}$ 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 2 P I として設定したため、検体量は $5 \mu\text{l}$ とした。結果を図 1 及び表 6 に示す。

【0033】

【表 6】

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

10

20

30

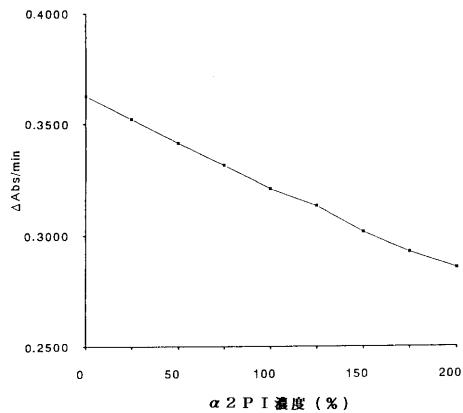
【0034】

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。

【図面の簡単な説明】

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

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 矢後 弘和

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

(72)発明者 遠見 真理

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

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 米国特許第03950513(US,A)

Alkjaersig et al., J. Biol. Chem., 1958年, 233, 81-85

Shimokawa & Kinoshita, Analytical Sciences, 1994年, 10, 533-536

Jespersen et al., Thromb. Res., 1986年, 37, 395-404

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00

JICSTファイル(JOIS)

PubMed