



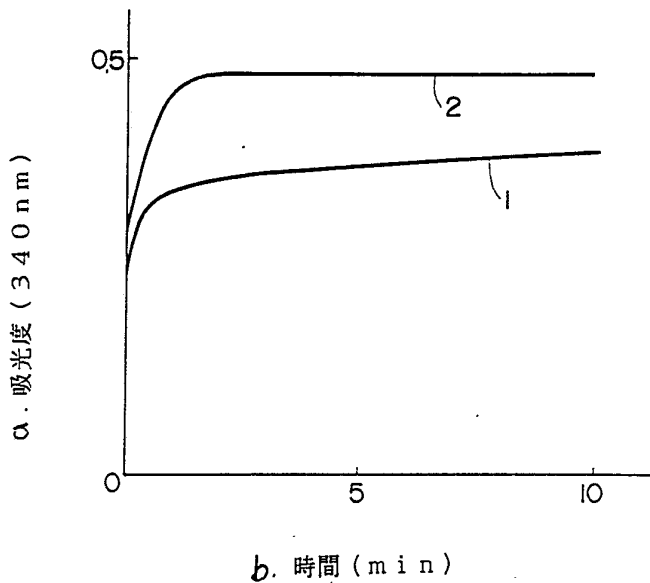
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12Q 1/32, 1/40, 1/44 C12Q 1/48, 1/50, 1/54</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 91/13168</p> <p>(43) 国際公開日 1991年9月5日 (05. 09. 1991)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00204 (22) 国際出願日 1991年2月19日 (19. 02. 91)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平 2/39324 1990年2月20日 (20. 02. 90) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヤترون (IATRON LABORATORIES, INC.) [JP/JP] 〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4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) 西館和由 (NISHIDATE, Kazuyoshi) [JP/JP] 鈴木葉子 (SUZUKI, Yoko) [JP/JP] 稲葉 聡 (INABA, Satoshi) [JP/JP] 〒276 千葉県八千代市大和田新田1144番地 株式会社ヤترون 八千代工場内 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 森田憲一 (MORITA, Kenichi) 〒174 東京都板橋区志村2丁目14番18号 秀和志村城山レジデンス 204号 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p>	<p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: METHOD OF DETERMINING GLUCOSE-6-PHOSPHATE AND COMPOSITION THEREFOR

(54) 発明の名称 グルコース-6-リン酸の測定方法および測定用組成物

a ... absorbance
b ... time



(57) Abstract

A method of determining glucose-6-phosphate including the step of dehydrogenating glucose-6-phosphate and NAD or NADP in the presence of a glucose-6-phosphate dehydrogenase to yield 6-phosphogluconic acid and NADH or NADPH, characterized by the presence of 6-phosphogluconolactonase; and a composition for use in determining glucose-6-phosphate which comprises 6-phosphogluconolactonase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and NAD or NADP.

(57) 要約

グルコース-6-リン酸とNADまたはNADPとをグルコース-6-リン酸脱水素酵素の存在下で脱水素して6-ホスホグルコン酸とNADHまたはNADPHとを生じさせる工程を含むグルコース-6-リン酸の測定方法において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることを特徴とする、前記の測定方法、および6-ホスホグルコノラクトナーゼと、グルコース-6-リン酸脱水素酵素と、NADまたはNADPとを含むことを特徴とする、グルコース-6-リン酸の測定用組成物。

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のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャド
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

明 細 書

グルコースー6ーリン酸の測定方法および測定用組成物

技術分野

本発明は、グルコースー6ーリン酸の測定方法および測定用組成物に関する。

本明細書において、核酸、ヌクレオチド、糖質または酵素などに関して用いる略号は、生化学命名委員会（CBN）の勧告によるかあるいは当該分野の慣用に従うものとし、具体的には以下のとおりである。

ADP：アデノシン二リン酸

AMY：アミラーゼ

ATP：アデノシン三リン酸

CR：クレアチン

CK：クレアチンキナーゼ

CMS：カルボキシメチルスターチ

CP：クレアチンリン酸

GA：グルコアミラーゼ

Glc：グルコース

Glc k：グルコキナーゼ

G6P：グルコースー6ーリン酸

G6PDH：グルコースー6ーリン酸脱水素酵素

HK：ヘキソキナーゼ

NAD：酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADH：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADP：酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ

酸

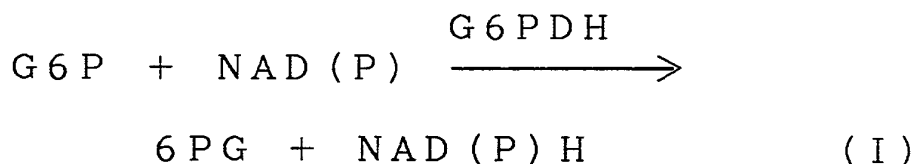
NADPH：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ
ン酸

6PG：6-ホスホグルコン酸

6PG- δ -L：6-ホスホ-D-グルコノ- δ -ラクトン

背景技術

ヒト血清等の生体液体試料中に含まれている各種の酵素や生理活性物質を、酵素反応の特異性に基づいて分析し、疾病診断や臨床検査に利用する測定技術が広く実施されている。その測定技術において、各種の検査対象・生理活性物質からグルコース-6-リン酸（G6P）を定量的に誘導し、以下の反応式（I）



に示す様に、そのグルコース-6-リン酸（G6P）をグルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PDH）およびNADまたはNADPの存在下で脱水素化して6-ホスホグルコン酸（6PG）を生成させ、それと同時に生成されるNADH量またはNADPH量を吸光度から測定して、前記の検査対象・生理活性物質を定量する方法も周知である。

G6Pに誘導して定量することのできる検査対象・生理活性物質としては、例えば、心筋梗塞や筋ジストロフィーなどの診

断指標となるクレアチンキナーゼ（CK）、膵疾患や肝疾患等の診断指標となるアミラーゼ（AMY）、または糖尿病などの診断指標となるグルコース（Glc）を挙げることができる。定量的に誘導されたG6Pから前記式（I）の反応でNAD（P）Hを生成させ、その増加を、例えば波長340nmにおける吸光度変化から測定し、その測定値から、前記の生理活性物質のレベルを分析し、疾病診断や臨床検査を行うことができる。

しかしながら、従来の測定系においては、試料中の生理活性物質含有量が一定量を越えると、所定の試薬組成および反応時間内においてNAD（P）Hの生成量が定量的には増加せず、生理活性物質含有量を正確に測定することができないことがあった。従って、最初の測定で試料中の生理活性物質含有量が多いことがわかった場合には、その試料を適当に希釈して再検査する必要があった。

本発明の目的は、従来法において正確な測定が不可能であった高濃度域においても、正確な測定を行うことができる手段を提供することにある。

発明の開示

前記の目的は、本発明により、グルコース-6-リン酸とNADまたはNADPとをグルコース-6-リン酸脱水素酵素の存在下で脱水素して6-ホスホグルコン酸とNADHまたはNADPHとを生じさせる工程を含むグルコース-6-リン酸の測定方法において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることを特徴とする、前記の測

定方法によって達成することができる。

また、本発明は、

6-ホスホグルコノラクトナーゼと、グルコース-6-リン酸脱水素酵素と、NADまたはNADPとを含むことを特徴とする、グルコース-6-リン酸の測定用組成物にも関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の6-ホスホグルコノラクトナーゼの存在下（曲線2）および不在下（曲線1）における、グルコース-6-リン酸の消費量の差を示すグラフである。

第2図は、本発明の6-ホスホグルコノラクトナーゼの存在下（曲線4）および不在下（曲線3）における、クレアチン消費量の差を示すグラフである。

第3図は、本発明の6-ホスホグルコノラクトナーゼの存在下および不在下における、グルコース消費量の差を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の測定方法および測定用組成物は、従来のG6P測定系に、新たに6-ホスホグルコノラクトナーゼを共存させることからなる。

従って、本発明で用いるG6Pは、任意の公知の反応系から誘導したものでよい。例えば、クレアチンキナーゼ（CK）、アミラーゼ（AMY）、またはグルコース（Glc）の測定で誘導されたものであることができる。また、G6PDHとしても、従来法で使用されている任意の酵素（例えば、市販酵素）

を用いることができる。

本発明において新たに加える6-ホスホグルコノラクトナーゼは公知の酵素であり、後述するように6-ホスホ-D-グルコノ- δ -ラクトン(6PG- δ -L)を6-ホスホグルコン酸(6PG)に変える活性を有し、例えば、J. Research Natl. Bur. Standards, 48, 163 (1952); または、生化学, 37, 788 (1965)に記載されている。6-ホスホグルコノラクトナーゼは、例えば、シュードモナス属(*Pseudomonas*)もしくはロイコノストック属(*Leuconostoc*)に属する微生物、または酵母から得ることができる。6-ホスホグルコノラクトナーゼの添加量には特に制限はなく、前記の6PG- δ -Lから6PGへの反応を進行させるのに十分な量で存在させればよい。

本発明の分析用組成物は、6-ホスホグルコノラクトナーゼ0.01~50U/ml、好ましくは0.01~10U/mlと、グルコース-6-リン酸脱水素酵素0.5~20U/ml、好ましくは1~5U/mlと、NADまたはNADP0.2~20mM、好ましくは0.5~5mMとを含有する。

本発明においては、測定系を酸性ないし弱アルカリ性(特に、pH約5.5~約8.5)に調整することのできる任意の緩衝液、例えば、イミダゾール緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、またはグッド緩衝液を用いることができる。

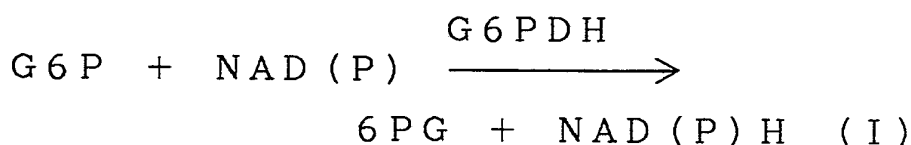
本発明においては、種々の反応系によって検査対象・生理活性物質から誘導されたG6Pに対して、G6PDH、NAD(P)および6-ホスホグルコノラクトナーゼを含む試薬組成

物を加え（または、G 6 Pを誘導する反応系に最初から前記組成物を共存させ）、反応によって生成するNAD（P）Hの量を波長340 nm付近における吸光度によって測定し、その測定値から目的とする検査対象・生理活性物質の活性を測定することができる。

本発明を用いて、水性液体、特に生物学的水性液体、例えば、血液または血液から誘導した液体（特に血清、または血漿）、あるいは尿または組織抽出液中に含まれているクレアチンキナーゼ（CK）、アミラーゼ（AMY）またはグルコース（Glc）を測定することができる。以下、それらの生理活性物質の測定方法について順に説明する。

クレアチンキナーゼ（CK）

従来から公知のCK測定法の反応経路の一例を示せば、以下のとおりである。

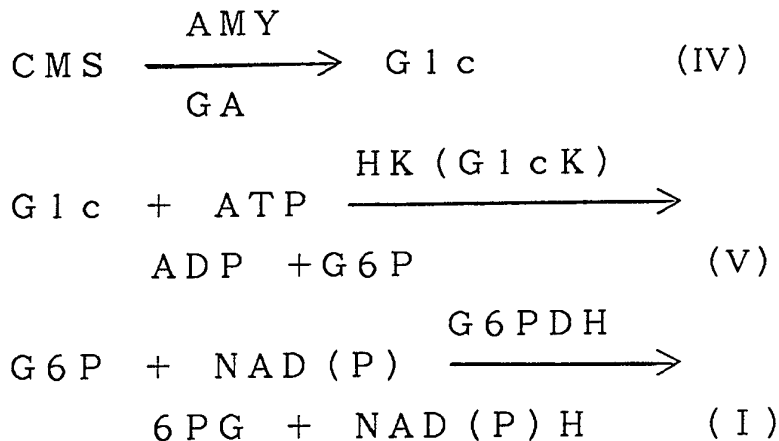


本発明によれば、前記式（I）の脱水素反応において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させる。本発明は、前記式（II）、式（III）および式（I）からなる全反応系を1工程または多工程で実施するいずれの方法においても用いることがで

きる。従って、6-ホスホグルコノラクトナーゼを全反応系の最初から存在させても、後から添加してもよい。このCK測定法の被検試料としては、CKを含む可能性のある試料であれば特に制限されないが、特には血液または血液から誘導した液体（特に血清、または血漿）、あるいは尿または組織抽出液を挙げることができる。

アミラーゼ (AMY)

従来から公知のAMY測定法の反応経路の一例を示せば、以下のとおりである。

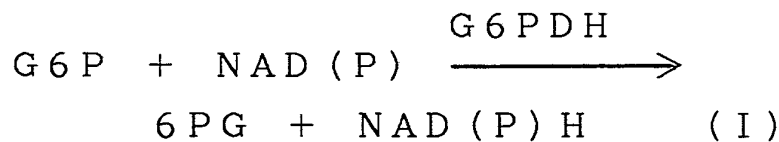
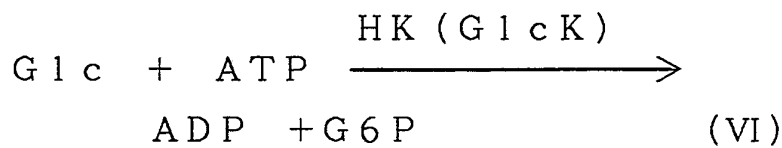


本発明によれば、前記式 (I) の脱水素反応において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させる。本発明は、前記式 (IV)、式 (V) および式 (I) からなる全反応系を1工程または多工程で実施するいずれの方法においても用いることができる。従って、6-ホスホグルコノラクトナーゼを全反応系の最初から存在させても、後から添加してもよい。このAMY測定法の被検試料としては、AMYを含む可能性のある試料であれば特に制限されないが、特には血液または血液から誘導した

液体（特に血清、または血漿）、あるいは尿または組織抽出液を挙げることができる。

グルコース (G1c)

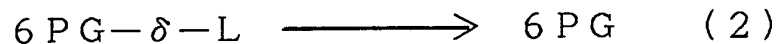
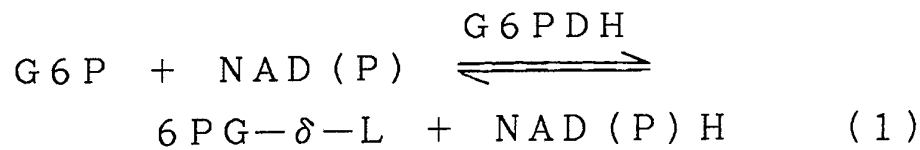
従来から公知のG1c測定法の反応経路の一例を示せば、以下のとおりである。



本発明によれば、前記式 (I) の脱水素反応において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させる。本発明は、前記式 (VI) および式 (I) からなる全反応系を1工程または多工程で実施するいずれの方法においても用いることができる。従って、6-ホスホグルコノラクトナーゼを全反応系の最初から存在させても、後から添加してもよい。このG1c測定法の被検試料としては、G1cを含む可能性のある試料であれば特に制限されないが、特には血液または血液から誘導した液体（特に血清、または血漿）、あるいは尿または組織抽出液を挙げることができる。

次に、本発明の測定原理を説明するが、本発明は以下の記載によって限定されるものではない。

前記式 (I) の反応を素反応に分けると以下のとおりである。



即ち、グルコース-6-リン酸 (G6P) をグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の存在下で脱水素化すると、まず6-ホスホ-D-グルコノ-δ-ラクトン (6PG-δ-L) が生成し、続いて6-ホスホグルコン酸 (6PG) が生成する。

ここで、式 (1) の反応は可逆反応であり、式 (2) の反応は不可逆反応であるものと思われる。式 (1) の左方向反応 (6PG-δ-L から G6P への反応) の速度と比較して式 (2) の反応速度が速ければ、式 (1) の反応生成物・6PG-δ-L がすぐに式 (2) によって 6PG に変化していくので、式 (1) の反応は右方向 (G6P から 6PG-δ-L) へ進行し、反応系中の NAD(P)H 量が増大する。逆に、式 (2) の反応速度が遅いと、式 (1) の反応生成物・6PG-δ-L は、式 (1) の可逆反応によって G6P に戻り、その際に NAD(P)H を消費するので、反応系中の NAD(P)H 量の増加を抑える方向へ働く。

従来、式 (2) の反応は、特に酵素を必要とせず、例えば加水分解などにより速やかに進行するものと考えられていた。

しかしながら、本発明者が見出したところによれば、本発明による6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させない場合、pH 8.5 以上では式 (2) の反応が比較的速やかに進行する

pH 8.5以上では式(2)の反応が比較的速やかに進行するのに対し、pH 8.5以下では式(2)の反応進行速度は極めて遅いことがわかった。

従って、pH 8.5以下において、本発明による6-ホスホグルコノラクトナーゼの不存在下で、前記式(I)、即ち式(1)および式(2)の反応を行うと、通常の測定時間内では反応が完了せず、得られる結果も不正確なものとなる。例えば、クレアチンキナーゼ(CK)の場合、活性測定至適pHは一般に約6.5であるので、前記の現象は重大な影響を与える。

本発明は、前記のように、前記式(I)の脱水素反応工程に特定の酵素を存在させることにより、式(2)の反応を促進させて、短時間内に反応を完結させ、迅速で、正確で、高精度の測定結果が得られることを可能にするものである。

なお、本発明は、pH 8.5以下での測定に利用するのが特に好ましいが、pH 8.5以上での測定に用いて、一層迅速で、正確で、高精度の測定結果を得ることもできる。

実施例

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

G6PDH(ベーリンガー・マンハイム社製)2U/mlとNADP(オリエンタル酵母社製)2.5mMとを含有する100mMイミダゾール酢酸緩衝液(pH6.7)[以下、A液と称する]3mlに、G6P(オリエンタル酵母社製)8mMを含有する100mMイミダゾール緩衝液(pH6.7)

30 μ l を加え、37°C で反応させ、NADPH 量の増加を示す、波長 340 nm における吸光度変化を経時的に 10 分間測定した。結果を第 1 図の曲線 1 に示す。

次に、前記 A 液の代わりに、6-ホスホグルコノラクトナーゼ（後記参考例で調製したもの）0.2 U/ml を A 液に添加して調製した液 3 ml を使用すること以外は前記と同様に操作して、NADPH 量の増加を 10 分間測定した。結果を第 1 図の曲線 2 に示す。

実施例 2

ヒトプール血清に、CK（ウサギ筋肉由来：ベーリング・マンハイム社）を 5000 U/リットルの濃度で加えてから、精製水で希釈し、10 種（500 U/リットル、1000 U/リットル、1500 U/リットル、2000 U/リットル、2500 U/リットル、3000 U/リットル、3500 U/リットル、4000 U/リットル、4500 U/リットル、および 5000 U/リットル）の希釈系列を調製した。

次に、グルコキナーゼ（ユニチカ社製）4 U/ml と、グルコース 25 mM と、ADP 2 mM と、G6PDH（ベーリング・マンハイム社製）1.5 U/ml と NADP（オリエンタル酵母社製）2.8 mM とを含有する 100 mM イミダゾール-酢酸緩衝液（pH 6.7）〔以下、B 液と称する〕320 μ l、およびクレアチンリン酸 125 mM と酢酸マグネシウム 50 mM とを含有する 25 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.5）80 μ l を前記の各希釈系列 8 μ l に加え、37°C で反応させ、反応開始後、3 分～5 分間にかけて、吸光度変化を波長 340 nm において測定し、単位時間当たりの吸光度変化

量 ($\Delta \text{Abs} / \text{min}$) を求めた。結果を第2図において○ (線3) で示す。

次に、前記B液の代わりに、6-ホスホグルコノラクトナーゼ (後記参考例で調製したもの) $0.2 \text{ U} / \text{ml}$ をB液に添加して調製した液 $320 \mu\text{l}$ を使用すること以外は前記と同様に操作して、NADPH量を測定した。結果を第2図において● (線4) で示す。

実施例3

グルコースを精製水で希釈し、 $400 \text{ mg} / \text{dl}$ 、 $700 \text{ mg} / \text{dl}$ および $1000 \text{ mg} / \text{dl}$ の濃度の希釈溶液を調製した。

次に、グルコキナーゼ (ユニチカ社製) $4 \text{ U} / \text{ml}$ と G6PDH (ベーリンガー・マンハイム社製) $1.5 \text{ U} / \text{ml}$ と NADP (オリエンタル酵母社製) 2.8 mM とを含有する 100 mM イミダゾール-酢酸緩衝液 ($\text{pH} 6.5$) [以下、C液と称する] 2.0 ml に、ATP (ベーリンガー・マンハイム社製) 8.5 mM を含有する 100 mM イミダゾール-酢酸緩衝液 ($\text{pH} 6.5$) 0.50 ml を混合した後、前記の各グルコース希釈溶液 $20 \mu\text{l}$ を加え、 37°C で反応させ、反応開始後10分間の吸光度変化を波長 340 nm において測定した。

次に、前記C液の代わりに、6-ホスホグルコノラクトナーゼ (後記参考例で調製したもの) を $0.09 \text{ U} / \text{ml}$ の濃度となるようにC液に添加して調製した液を使用すること以外は前記と同様に操作して、NADPH量を測定した。

前記の結果を第3図に示す。第3図において、曲線5Cはグルコース $400 \text{ mg} / \text{dl}$ 希釈溶液に6-ホスホグルコノラク

トナーゼを加えなかった場合、曲線5Eはグルコース400 mg/dl希釈溶液に6-ホスホグルコノラクトナーゼを加えた場合、曲線6Cはグルコース700 mg/dl希釈溶液に6-ホスホグルコノラクトナーゼを加えなかった場合、曲線6Eはグルコース700 mg/dl希釈溶液に6-ホスホグルコノラクトナーゼを加えた場合、曲線7Cはグルコース1000 mg/dl希釈溶液に6-ホスホグルコノラクトナーゼを加えなかった場合、曲線7Eはグルコース1000 mg/dl希釈溶液に6-ホスホグルコノラクトナーゼを加えた場合の結果を示し、そして曲線8はグルコースを含まない精製水に6-ホスホグルコノラクトナーゼを加えた場合の結果を示す。

参考例：6-ホスホグルコノラクトナーゼの調製

(1) ペナッセイ (Penassay) ブロス (Difco社製) を用いてシュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*: RIMD1615005; 大阪大学微生物病研究所より入手) を30°Cで1日間前培養した。この培養物を、更にハート・インフュージョン培地で30°Cにて1日間培養した。得られた培養液を遠心して集菌した。食塩水で洗浄後、トリス緩衝液中にて超音波で細胞を破壊し、更に遠心処理した。上清をpH7.5で硫酸分画し、硫酸30~70%飽和で沈殿するタンパク質分を遠心して集めた。このタンパク質分をトリス緩衝液に溶解させ、透析した後、DEAE-セルロースカラムで粗精製した。得られた粗精製物をHPLC [カラム充填剤: ZORBAX GF-250 (デュボン社)] によって更に精製し、分子量3万~5万に流出する単一ピーク分として目的の6-ホスホグルコノラクトナーゼを分取

した。

(2) 分取した6-ホスホグルコノラクトナーゼの活性は以下の試験によって規定した。

使用溶液：

D液：NADPが0.85mMおよびG6Pが0.08mMとなるように、10mM塩化マグネシウムを含む100mMイミダゾール-酢酸緩衝液(pH6.5)で調製した。

E液：6-ホスホグルコノラクトナーゼを含まないG6PDHを200U/mlとなるように精製水に溶解して調製した。

F液：6-PGDH硫酸懸濁液(120U/ml：ベーリンガー・マンハイム社)。

操作方法：

E液10 μ lにD液3mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで2分間反応させた。参考例(1)で調製した6-ホスホグルコノラクトナーゼ液20 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで2分間放置した後、F液5 μ lを加えた。F液を添加してから2~4分後の波長340nmにおける吸光度変化を測定した。

この際、2~4分間の吸光度が0.06Abs.を越えた場合、また2分までの吸光度が0.8Abs.を越えた場合は、6-ホスホグルコノラクトナーゼ液を精製水で希釈して、再度測定を行った。

同様に、6-ホスホグルコノラクトナーゼ液のかわりに精製水を用いて空試験を行った。

活性の計算は以下の式によって行った。

6-ホスホグルコノラクトナーゼ活性 (U/ml) =

$$\frac{\Delta E / T}{\epsilon \times d} \times \frac{V}{v} \times DF$$

前記の式で、 ΔE は吸光度変化、 T は反応時間 (min)、 ϵ はNADPHの吸光係数 ($6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$)、 d はセル長 (cm)、 V は最終液料 (ml)、 v は6-ホスホグルコノラクトナーゼ含有液の液料 (ml)、そして DF は6-ホスホグルコノラクトナーゼ含有液の希釈倍率である。

産業上の利用可能性

本発明は、グルコース-6-リン酸 (G6P) から6-ホスホグルコン酸 (6PG) を生成する脱水素反応工程に6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることにより、G6Pから6PGへの反応を促進させて、迅速で、正確で、高精度の測定を可能にするものである。

従って、各種の生体試料に含まれている生理活性物質、例えば、心筋梗塞や筋ジストロフィーなどの診断指標となるクレアチンキナーゼ (CK)、膵疾患や肝疾患等の診断指標となるアミラーゼ (AMY)、または糖尿病などの診断指標となるグルコース (Glc) からG6Pを定量的に誘導し、更にNAD(P)Hを生成させ、その量を測定することにより、前記の生理活性物質のレベルを迅速、正確、そして高精度に分析し、疾病診断や臨床検査を行うことができる。

請求の範囲

1. グルコース-6-リン酸とNADまたはNADPとをグルコース-6-リン酸脱水素酵素の存在下で脱水素して6-ホスホグルコン酸とNADHまたはNADPHとを生じさせる工程を含むグルコース-6-リン酸の測定方法において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることを特徴とする、前記の測定方法。
2. 被検試料を、クレアチンリン酸、グルコース、ヘキソキナーゼ、ADP、NADまたはNADP、そしてグルコース-6-リン酸脱水素酵素と接触させる工程を含むクレアチンキナーゼの測定方法において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることを特徴とする、前記の測定方法。
3. 被検試料を、スターチ、グルコアミラーゼ、ヘキソキナーゼ、ATP、NADまたはNADP、そしてグルコース-6-リン酸脱水素酵素と接触させる工程を含むアミラーゼの測定方法において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることを特徴とする、前記の測定方法。
4. 被検試料を、ヘキソキナーゼ、ATP、NADまたはNADP、そしてグルコース-6-リン酸脱水素酵素と接触させる工程を含むグルコースの測定方法において、6-ホスホグルコノラクトナーゼを存在させることを特徴とする、前記の測定方法。
5. 6-ホスホグルコノラクトナーゼと、グルコース-6-リン酸脱水素酵素と、NADまたはNADPとを含むことを特徴とする、グルコース-6-リン酸の測定用組成物。

6. 6-ホスホグルコノラクトナーゼ0.01~50U/ml
と、グルコース-6-リン酸脱水素酵素0.5~20U/ml
と、NADまたはNADP0.2~20mMとを含む、請求の
範囲5に記載の組成物。

Fig. 1

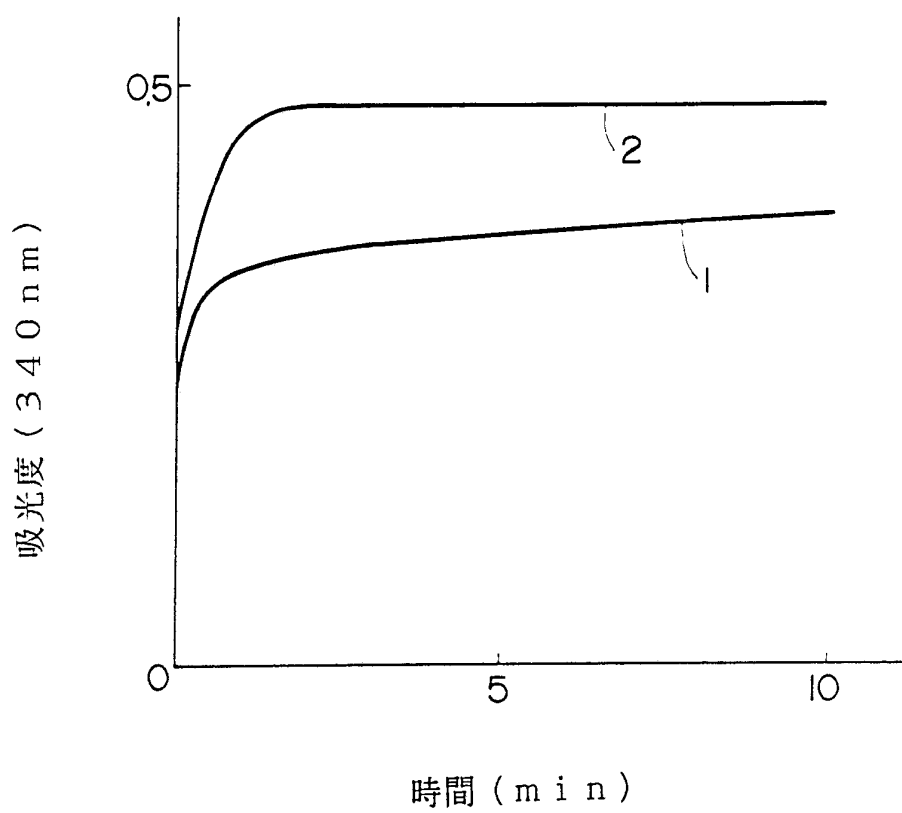


Fig. 2

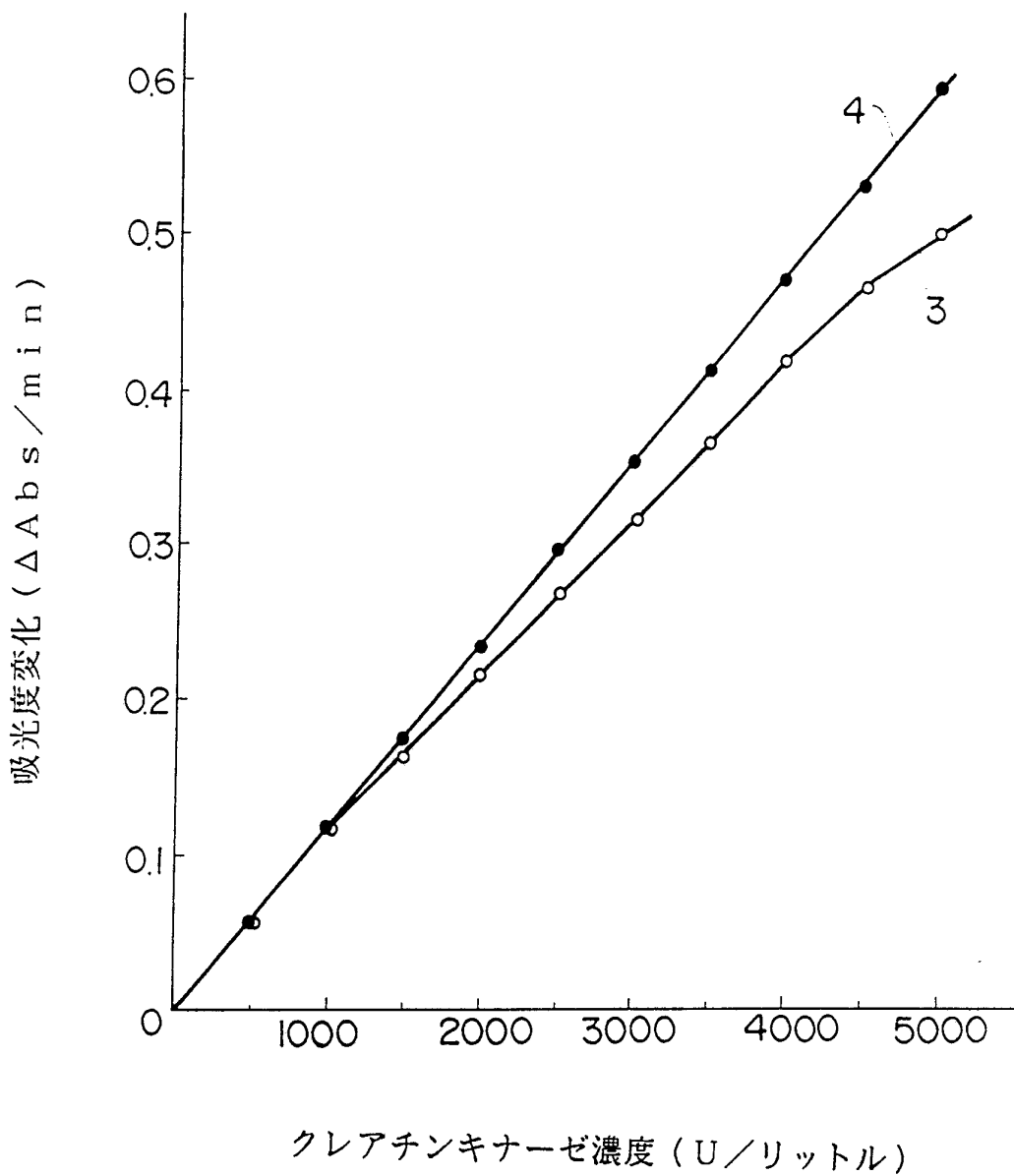
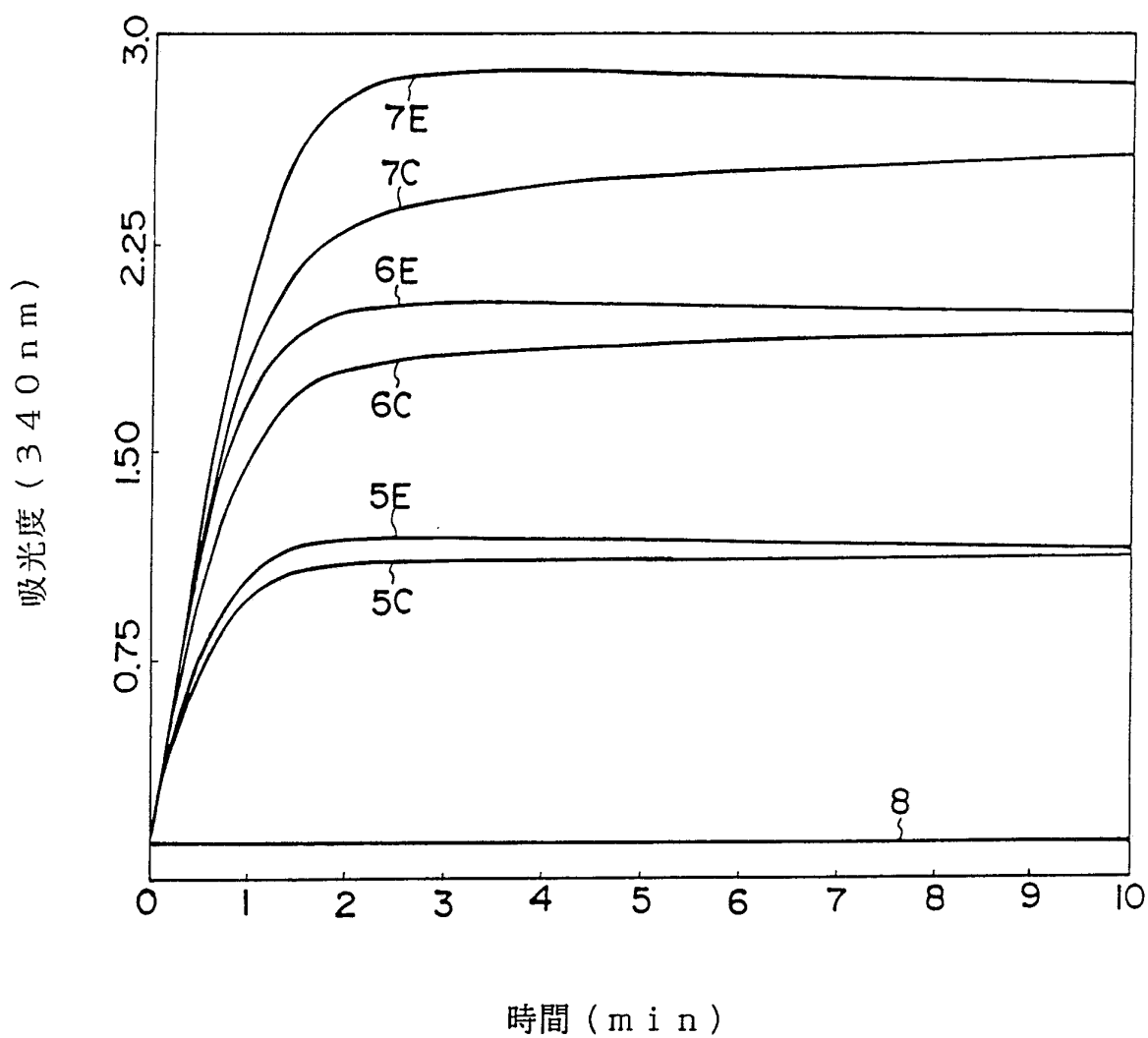


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00204

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl ⁵ C12Q1/32, 1/40, 1/44, 1/48, 1/50, 1/54				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁷				
Classification System :	Classification Symbols			
IPC	C12Q1/32, 1/40, 1/44, 1/48, 1/50, 1/54			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸				
JICST Data Base Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹				
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³		
A	JP, B2, 01-55880 (Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.), November 28, 1989 (28. 11. 89), (Family: none)	1-6		
A	Bunji Maruo, Nobuo Tamiya (supervisions) "Enzyme Handbook", December 1, 1982 (01. 12. 82), Asakura Shoten (Tokyo) p. 427	1-6		
A	J. Lab. Clin. Med. 107 (6), p. 502-507 (1986)			
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
April 2, 1991 (02. 04. 91)	April 15, 1991 (15. 04. 91)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
Japanese Patent Office				

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 91/ 00204

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁵ C12Q1/32, 1/40, 1/44, 1/48, 1/50, 1/54		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12Q1/32, 1/40, 1/44, 1/48, 1/50, 1/54	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
JICST Data Base Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
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	請求の範囲の番号
A	JP, B2, 01-55880 (三菱油化株式会社), 28. 11月. 1989 (28. 11. 89), (ファミリーなし)	1-6
A	丸尾文治, 田宮信雄 監修「酵素ハンドブック」, 1. 12月. 1982 (01. 12. 82), 朝倉書店 (東京) p. 427	1-6
A	J. Lab. Clin. Med. 107 (6) p. 502-507 (1986)	1-6
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の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の文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 02. 04. 91	国際調査報告の発送日 15.04.91	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 伊 藤 明 ㊟	4 B 6 8 0 7