



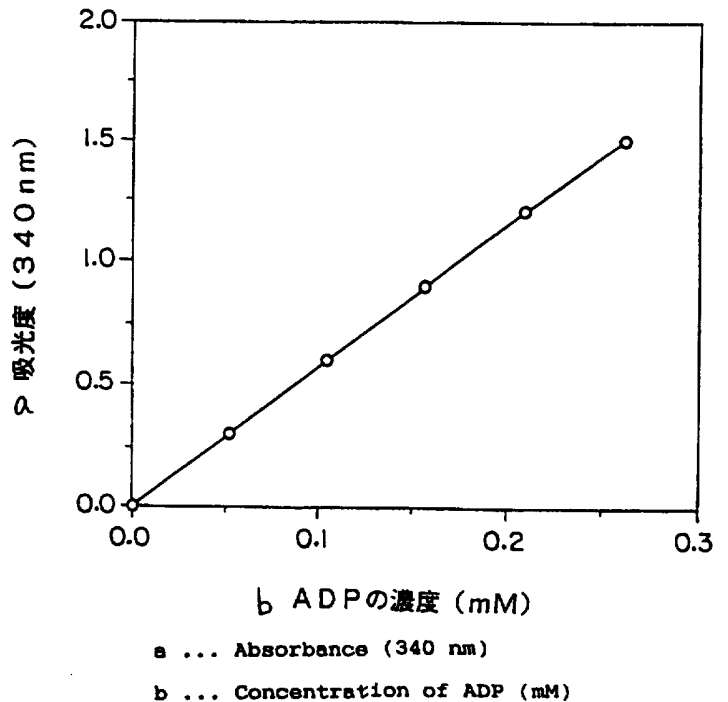
<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/54</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/24456</p> <p>(43) 国際公開日 1997年7月10日(10.07.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03577</p> <p>(22) 国際出願日 1996年12月6日(06.12.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/340482 1995年12月27日(27.12.95) JP 特願平8/30352 1996年2月19日(19.02.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 古賀晋治(KOGA, Shinji)[JP/JP] 〒410-21 静岡県田方郡菰山町四日町274-1 Shizuoka, (JP) 酒瀬川信一(SAKASEGAWA, Shinichi)[JP/JP] 〒410-23 静岡県田方郡大仁町三福883 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 小林和憲(KOBAYASHI, Kazunori) 〒170 東京都豊島区北大塚2丁目25番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 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>	

(54) Title: METHOD FOR ASSAYING VITAL SAMPLE

(54) 発明の名称 生体試料を測定する方法

(57) Abstract

A method for determining ADP contained in a liquid sample by means of an enzymatic reaction, which comprises reacting the sample at 15 to 45 °C at least in the presence of glucose, ADP-dependent hexokinase, and oxidized NAD(P), a glucose-6-phosphate anhydrase, and one or more salts releasing ions selected among magnesium, cobalt, and manganese ions and then determining the ADP contained in the sample together with the AMP resulting from the reaction based on the amount of the reduced NAD(P) yielded. This method has advantages in that the limit of determination is high because ADP is determined based on the amount of the reduced NAD(P) yielded, and that since the reduced NAD(P) has a definite molecular extinction coefficient, the found value is highly reliable and uninfluenced by the reducing substances, etc., contained in the sample.



(57) 要約

酵素反応を用いて被検液中のADPを測定する方法において、被検液を少なくともグルコース、ADP依存性ヘキソキナーゼ、酸化型NAD(P)類、グルコース-6-リン酸脱水酵素およびマグネシウムイオン、コバルトイオンおよびマンガンイオンからなる群より選ばれた1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15~45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD(P)類の生成量に基づいて測定する方法であり、還元型NAD(P)類の生成量に基づいてADPを測定するので測定限界が高く、また分子吸光係数が明確になっている還元型NAD(P)類を測定するので、測定値の信頼性が高く、被検液中の還元物質などの影響を受けないという利点を有する

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

明 細 書

生体試料を測定する方法

産業上の利用分野

本発明は酵素反応を用いて被検液中のADPを測定する方法において、被検液を少なくともグルコース、ADP依存性ヘキソキナーゼ（ADP-HK）、酸化型NAD（P）〔酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（リン酸）〕類、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PDH）およびマグネシウムイオン、コバルトイオンおよびマンガンイオンからなる群より選ばれた1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15～45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD（P）〔還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（リン酸）〕類の生成量に基づいて測定する方法に関し、また酵素反応を用いて被検液中のADPを生成する酵素またはその基質の一方を測定する方法において、ADPを生成する酵素またはその基質の一方を含有する被検液を少なくともADPを生成する酵素とその基質に基づく反応に関与する成分の反応試薬、ATP、グルコース、ADP-HK、酸化型NAD（P）類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンのいずれか1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15～45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを生成する酵素またはその基質を反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD（P）類の生成量に基づいて測定する方法に関し、臨床検査などの分野で用いられ、血清、血漿、尿、髄液などの被検液中のADPを還元型NAD（P）類の生成・増加量として簡便かつ正確に測定する目的である。

従来の技術

従来、生体試料中に存在するADPや生体試料中のADPを生成する酵素またはその基質を測定する方法としては酵素反応による基質の反応生成物に作用す

る他の脱水素酵素または酸化酵素と組み合わせて測定する方法（例えば、グリセロールとグリセロールキナーゼの場合、グリセロールにATPの存在下、グリセロールキナーゼを作用させてADPおよびグリセロールリン酸を生成せしめ、このグリセロールリン酸をグリセロールリン酸脱水素酵素またはグリセロールリン酸オキシダーゼを用いて測定する方法）や酵素反応によって生成するADPを種々の方法で測定する方法が知られている。

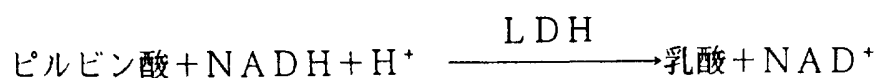
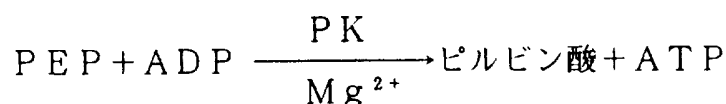
しかし、他の脱水素酵素や酸化酵素と組み合わせて、測定する方法はADPを生成する酵素によって、それぞれ、組み合わせの酵素を変えなければならず、汎用性に欠け、また、測定しようとする基質や酵素によっては組み合わせの酵素が存在しない場合もある。

また、酵素反応によって生成するADPを測定する方法としては液体クロマトグラフィーを用いて測定する方法が知られているが液体クロマトグラフィー法は操作性が煩雑であるという欠点を有している。

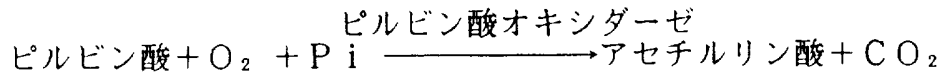
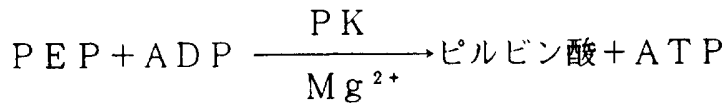
さらに、操作性に優れるADP測定酵素法としてピルビン酸キナーゼ〔PK (EC 2. 7. 1. 40)〕と乳酸脱水素酵素〔LDH (EC 1. 2. 3. 3)〕を用いた還元型NAD (NADH+H⁺)の減少法（反応式1）、ピルビン酸キナーゼとピルビン酸オキシダーゼを用いたオキシダーゼ法（反応式2）やピルビン酸キナーゼとピルビン酸脱炭酸酵素とアルデヒド脱水素酵素を用いた還元型NAD (P) (NAD (P) H+H⁺)の増加法（反応式3）が知られている（特開平7-8297号公報）。

これらの反応式を以下に示す。下記式中のPEPはホスホエノールピルビン酸、Piはリン酸、PDCはピルビン酸脱炭酸酵素、ALDHはアルデヒド脱水素酵素、TPPはチアミンピロリン酸を意味する。

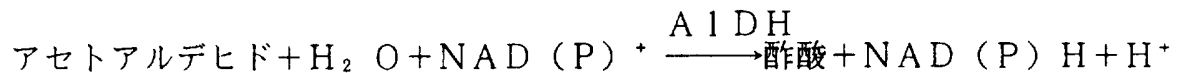
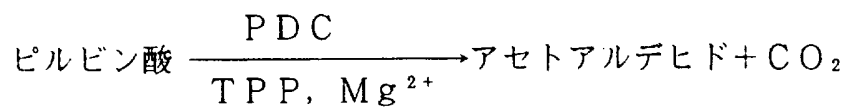
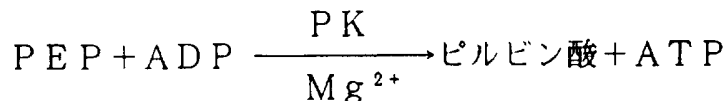
（反応式1）



(反応式 2)



(反応式 3)



しかしながら、反応式 1 に示す還元型 NAD (NADH + H⁺) の減少法においては、前もって所定量の還元型 NAD を反応液内に存在させ、反応の終了後、反応液内に残存する還元型 NAD の量を測定する減少法であるために、

(1) 測定対象の成分が少ない場合には測定値が不正確である。

(2) 測定できる成分の上限値が定量前に反応液内に存在させる還元型 NAD の量により制限される。

(3) 還元型 NAD の量の測定に使用する分光光度計の機種に応じて、定量前に反応液内に存在させる還元型 NAD の量を変える必要がある。

(4) 分析用試薬中に含有される還元型 NAD が不安定である。

等の問題点がある。

また、反応式 2 に示すピルビン酸キナーゼとピルビン酸オキシダーゼを用いて生ずる過酸化水素の発色指示薬系を用いて測定するピルビン酸の定量法が広く利用されているが、(5) この方法は生体試料中の干渉物質 (還元物質) (尿酸、アスコルビン酸等) や着色物質 (ビリルビン、ヘモグロビン等) の影響を受けるので測定値の正確さにおいて必ずしも十分満足できる方法とはいえない。

また、反応式 3 に示すピルビン酸キナーゼとピルビン酸脱炭酸酵素とアルデヒド脱水素酵素を用いた還元型 NAD (P) の増加法は、ピルビン酸キナーゼの逆反応を利用するもので、(6) この逆反応における至適 pH が pH 7. 5 であり、またピルビン酸脱炭酸酵素の至適 pH が pH 6. 0 ~ 6. 4 であり、さらにアルデヒド脱水素酵素の至適 pH が pH 9. 0 であり、使用する三種類の酵素の至適 pH が異なるために反応式 3 における反応の至適 pH を決定することが困難であり、(7) またピルビン酸脱炭酸酵素のピルビン酸に対する K_m 値が 3. 6 ~ 30 mM とかなり大きな値であることから、基質である高価なホスホエノールピルビン酸を多く使用してピルビン酸を多く生成せしめる必要性があるととも、(8) 反応全体を短時間に終了させるためには非常に多くの酵素量を必要とする繁雑な手法にすぎなかった。

また、本発明に使用される ADP 依存性ヘキソキナーゼとしては、超高度好熱菌ピロコッカス・フリオサス・DSM 3638 (*Pyrococcus furiosus* DSM 3638) 菌株の菌体内に存在することが報告されている (J. Biol. Chem., 269, 17537-17541 (1994)、オランダ国特許公開番号第 9400836 号公報) が、その理化学的性質の記載はほとんどなく、酵素も精製、単離されたものではなく、また該菌株の生育温度が 90°C ~ 105°C であるため、その由来する酵素の至適温度が 90°C 以上であり、活性測定に用いている G6PDH は酵母由来でその熱安定性を考慮して、活性測定を 50°C で行っているもので、ADP-HK の至適温度と異なる温度条件にて活性測定を行ったものにすぎず、ADP-HK の至適温度に照らして一般の生体成分の臨床診断の温度条件とは全く異なる測定条件であった。また、50°C の反応温度で測定を行うことに関して、臨床診断の分野では反応温度として 50°C で行くと (6) 組み合わせの酵素の失活によって正確に測定できない。(7) 検体となる生体成分の熱変性がおこり、にごりが生じる。などの問題点があり正確な測定が不可能であった。

発明が解決しようとする課題

まず、本発明者らはピロコッカス・フリオサス・DSM 3638 菌株を培養し、ADP-HKを精製し、該酵素の反応の至適温度を調べた結果、至適温度は80～100℃であった。さらに、37℃における相対活性は100℃の10%程度であり、一般的にこのような性質の酵素を用いて37℃で酵素反応を行わせると正確な定量反応を行うことは不可能であると思われた。しかしながら、全く意外にも本発明者らは37℃で該酵素反応を用いた定量実験を実施して、該酵素反応37℃を含む生体成分の一般的定量における通常の反応温度条件である15～45℃の温度条件にて生体成分などの被検液中のADPを還元型NAD(P)類の生成・増加量として簡便かつ高精度に測定することが可能であることを発見した。

さらに、本発明者らは、下記酵素反応(反応式4、5)を用いて生体試料中に存在するADP、または生体試料中のADPを生成する酵素またはその基質を測定する方法において、例えば生体試料がADPを生成する酵素の活性測定を目的とする被検液の場合にはその酵素の基質とATPの存在下にADPを生成する酵素とその基質に基づく反応に関与する成分の反応試薬を用いて、または生体試料が基質の量の測定を目的とする被検液の場合にはその基質に作用してADPを生成する酵素とATPの存在下にADPを生成する酵素とその基質に基づく反応に関与する成分の反応試薬を用いて、グルコース、ADP-HKおよび酸化型NAD(P)類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンに基づく反応により、ADPをAMPを生成せしめるとともに酸化型NAD(P)類を還元型NAD(P)類に還元する反応を行い、還元型NAD(P)類の生成量に基づいた生体中のADPを生成する酵素またはその基質の定量方法が極めて有用であり、かかる反応が生体試料中のADPを生成する酵素またはその基質に普遍的に利用できる酵素反応であることを見い出して、本発明を完成した。

即ち、本発明は生体試料中のADPをグルコース、ADP-HKおよび酸化型NAD(P)類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンまた

はマンガンイオンを用いてADPを還元型NAD(P)類の生成・増加量として測定できる方法を提供することを目的とする。

更に本発明は、被検液としての生体試料中のADPを生成する酵素またはその基質を、ADPを生成する酵素とその基質に基づく反応に関与する反応試薬を用いるとともに、ATP、グルコース、ADP-HKおよび酸化型NAD(P)類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンの存在下に反応せしめて簡便かつ高精度に測定することのできる方法を提供することを目的とする。

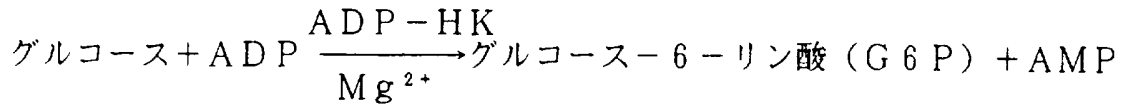
課題を解決するための手段

本発明は上記知見に基づいて完成されたもので、酵素反応を用いて被検液中のADPを測定する方法において、被検液を少なくともグルコース、ADP-HK、酸化型NAD(P)類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンおよびマンガンイオンからなる群より選ばれた1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15～45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD(P)類の生成量に基づいて測定する方法に関し、また本発明は、酵素反応を用いて被検液中のADPを生成する酵素またはその基質の一方を測定する方法において、ADPを生成する酵素またはその基質の一方を含有する被検液を少なくともADPを生成する酵素とその基質に基づく反応に関与する成分の反応試薬、ATP、グルコース、ADP-HK、酸化型NAD(P)類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンのいずれか1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15～45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを生成する酵素またはその基質を反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD(P)類の生成量に基づいて測定する方法である。

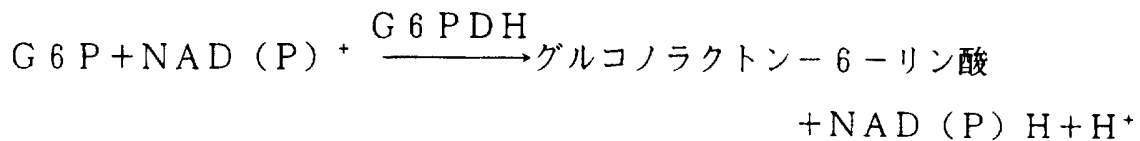
本発明で用いられる、グルコース、ADP-HKおよび酸化型NAD(P)類、G6PDHおよびマグネシウムイオン、コバルトイオンおよびマンガンイオンからなる群より選ばれた1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、酸

化型NAD(P)類から還元型NAD(P)類を生成する酵素反応は下記反応式4及び5で示される。

(反応式4)



(反応式5)



以下、本発明をより詳細に説明する。

本発明におけるADP-HKとしては、上記反応式4で示される少なくともグルコースを基質とし、ADPを消費してグルコース-6-リン酸およびAMPを生成するADP-HKであれば何ら限定されるものではなく、例えばADP-HKの生産菌としては超高度好熱菌ピロコッカス・フリオサス・DSM3638菌株がドイッチェ・ザンムルグ・フォン・マイクロオルガニズメン・ウント・チェルクツルレン・GmbH(DSM)に基準培養物として寄託され、DSMカタログ(1993)に記載されており、何人も入手可能であり、本菌株から得られた高度好熱性ADP-HKが好ましい。

また、上記反応式5で示される酵素反応に用いられるG6PDHは市販されており(ベーリンガーマンハイム社: *Leuconostoc mesenteroides*由来、シグマ社: パン酵母、*Bacillus stearothermophilus*、*Leuconostoc mesenteroides*由来)、容易に入手可能である。

上記ADP-HKが触媒する酵素反応(反応式4)に使用するイオン放出性塩類であるマグネシウムイオンの代わりにコバルトイオンまたはマンガンイオンを放出し得るいずれか1種または2種以上のイオン放出性塩類を用いればよく、その塩類としては塩化物、硫酸化物などが包含され、好適には塩化マグネシウム

、塩化コバルト、塩化マンガンが挙げられるが、なんらこれらに限定されるものではない。

酵素反応式 5 に示されるように、上記 G 6 P D H が触媒する酵素反応に使用される補酵素としての酸化型 N A D (P) 類にはこの他に酸化型チオ-N A D (P)、酸化型 3 - アセチル N A D (P)、酸化型デアミノ N A D (P) などが含まれるが、なんらこれらに限定されるものではない。

本発明において、反応式 4 および 5 で示される酵素反応の A D P - H K、G 6 P D H、グルコース、酸化型 N A D (P) 類およびマグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンの使用量としては酵素反応が円滑に進行する量であればよく、測定対象となる被検液中の物質の種類、被検液中の含量、共役させる酵素反応の種類、反応時間および温度などにより適宜調整されるが、A D P - H K および G 6 P D H の濃度は例えば 0. 1 ~ 1 0 0 U / m l 程度、好ましくは 1 ~ 5 0 U / m l 程度である。グルコース、酸化型 N A D (P) 類の濃度は酵素反応を行うのに十分な濃度あればよく、グルコースは例えば 0. 5 ~ 1 0 0 m M 程度、好ましくは 1 ~ 5 0 m M 程度、酸化型 N A D (P) 類は例えば 0. 5 ~ 5 0 m M 程度、好ましくは、1 ~ 1 0 m M 程度とされ、マグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンの濃度としては例えば 0. 1 ~ 5 0 m M 程度、好ましくは 0. 5 ~ 1 0 m M 程度である。

本発明の方法は、酵素反応系に悪影響を及ぼさない適当な緩衝液（例えば、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、モノまたはジエタノールアミン緩衝液、グッド緩衝液等）を用いて行われる。また、測定手法は特に限定されず、エンドポイント法、レートアッセイ法などの手法を適宜用いることができる。測定対象となる被検液としては A D P が存在または形成された A D P を含有する生体試料が挙げられ、例えば、血清、血漿、尿、髄液などが例示される。このような被検液としては通常 5 ~ 2 0 0 μ l を用いて上記反応系によって反応を行うもので、反応温度としては例えば 1 5 ~ 4 5 $^{\circ}$ C、好ましくは 2 0 $^{\circ}$ C ~ 4 0 $^{\circ}$ C の反応温度条件で行えばよく、また、反応時間はエンドポイント法では、1 ~ 6 0 分間、好ましくは 1 ~ 1 0 分間、レートアッセイ法では反応が直線的に行われている時間内、

好ましくは、2～3分間を計って測定する。

被検液中のADP量に相当する本発明の反応は、生成されるAMPとともに還元型NAD(P)類の生成を伴い、この還元型NAD(P)類の生成量は種々の方法により測定することができるが、通常、簡便かつ高精度で測定することのできる吸光度測定法により行われる。測定波長は還元型NAD(P)類の種類によって適宜選択され、還元型NAD(P)、還元型3-アセチル-NAD(P)、還元型デアミノ-NAD(P)などの場合には340nm付近、還元型チオ-NAD(P)の場合は405nm付近の波長が選択される。また、還元型NAD(P)類の生成量の測定法として、インドニトロテトラゾニウム(INT)やニトロブルーテトラゾニウム(NTB)等のテトラゾニウム塩を用いて電子受容体としてフェナジンメトサルフェート(PMS)やジアホラーゼ(EC 1.6.4.3)の作用によりホルマザン色素を形成せしめ、このホルマザン色素の呈色を測定する方法を用いてもよい。また、還元型NAD(P)類の蛍光を測定してもよい。

本発明における生体試料である被検液としては、生体試料中に存在するADPまたは生体試料中のADPを生成する酵素の基質またはその酵素活性の一方の測定が挙げられる。特に生体試料中のADPを生成する酵素の基質またはその酵素活性の一方の測定において、ATPの存在下に、ADPを生成する酵素またはその基質を被検液とする場合、各種生体試料中のキナーゼ、シンセターゼ、ヒドロラーゼまたはカルボキシラーゼとその基質となる物質がキナーゼ、シンセターゼ、ヒドロラーゼまたはカルボキシラーゼの作用によってADPに導くことができる。従って、これらの酵素反応系と酵素反応4および5で示される酵素反応系を共役させることにより生体試料中のADPに誘導される酵素活性またはその基質の量を、還元型NAD(P)類の生成量として測定することができる。これらの例として基質と使用する酵素の関係として第1表に示し、その反応に関与する基質や酵素活性いずれか一方の測定をなし、その反応に関与する他方の成分(但し、関与する他方の成分として、ATPは包含、意味しないものとする)を反応に関与する成分の反応試薬として使用すればよい。

第1表

反応式No.	基 質	酵 素
6	尿素	ウレアアミドヒドロラーゼ (EC 3. 5. 1. 45)
7	クレアチニン	クレアチニンアミドヒドロラーゼ (EC 3. 5. 2. 10) クレアチンキナーゼ (EC 2. 7. 3. 2) クレアチンアミドヒドロラーゼ (EC 3. 5. 3. 3) ウレアアミドヒドロラーゼ (EC 3. 5. 1. 45)
8	クレアチニン	クレアチニンデイミナーゼ (EC 3. 5. 4. 21) N-メチルヒダントイナーゼ (EC 3. 5. 2. 14)
9	クレアチン	クレアチンキナーゼ (EC 2. 7. 3. 2)
10	グリセロール	グリセロールキナーゼ (EC 2. 7. 1. 30)
11	コリン	コリンキナーゼ

(第1表に続く)

(EC 2. 7. 1. 32)		
12	ヘキソース	ヘキソキナーゼ (EC 2. 7. 1. 1)
13	フルクトース	フルクトキナーゼ (EC 2. 7. 1. 4)
14	ガラクトース	ガラクトキナーゼ (EC 2. 7. 1. 6)
15	グルコサミン	グルコサミンキナーゼ (EC 2. 7. 1. 8)
16	アデノシン	アデノシンキナーゼ (EC 2. 7. 1. 20)
17	チミジン	チミジンキナーゼ (EC 2. 7. 1. 21)
18	NAD	NADキナーゼ (EC 2. 7. 1. 23)
19	リボフラビン	リボフラビンキナーゼ (EC 2. 7. 1. 26)
20	ピリドキサール	ピリドキサールキナーゼ

(第1表に続く)

		(EC 2. 7. 1. 35)
21	メバロン酸	メバロン酸キナーゼ (EC 2. 7. 1. 36)
22	蛋白	プロテインキナーゼ (EC 2. 7. 1. 37)
23	ホモセリン	ホモセリンキナーゼ (EC 2. 7. 1. 39)
24	ピルビン酸	ピルビン酸キナーゼ (EC 2. 7. 1. 40)
25	ピルビン酸	ピルビン酸カルボキシラーゼ (EC 6. 4. 1. 1)
26	酢酸	酢酸キナーゼ (EC 2. 7. 2. 1)
27	アンモニア	カルバミン酸キナーゼ (EC 2. 7. 2. 2)
28	L-アルギニン	アルギニンキナーゼ (EC 2. 7. 3. 3)
29	L-グルタミン酸	グルタミンシンセターゼ

(第1表に続く)

	アンモニア	(EC 6. 3. 1. 2)
30	L-グルタミン酸	グルタミン酸キナーゼ (EC 2. 7. 2. 11)
31	L-アスパラギン酸 アンモニア	アスパラギンシンセターゼ (EC 6. 3. 1. 4)
32	L-アスパラギン酸	アスパラギン酸キナーゼ (EC 2. 7. 2. 4)
33	ATP	ミオキナーゼ (EC 2. 7. 4. 3)
34	ATP	ATPase (EC 3. 6. 1. 4)
35	クエン酸	クエン酸キナーゼ (EC 4. 1. 3. 8)
36	L-アスパラギン酸	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT) (EC 2. 6. 1. 1) グルタミンシンセターゼ (EC 6. 3. 1. 2)
37	L-アラニン	アラニンアミノトランスフェラーゼ

(第1表に続く)

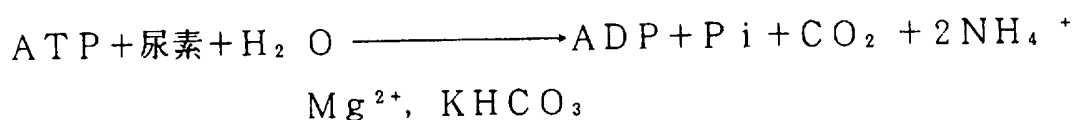
	α-ケトグルタル酸	(GPT) (EC 2. 6. 1. 2) グルタミンシンセターゼ (EC 6. 3. 1. 2)
--	-----------	---

以下にこれらの反応式を示す。

生体試料として尿素またはウレアアミドヒドロラーゼの一方を含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分としての反応試薬を使用した場合の反応式を下記に示し、酵素反応によって生成するADPを測定すればよい。なお、反応に関与する成分の反応試薬（但し、関与する他方の成分として、ATPは包含、意味しないものとする：以下同様である）としては、下記反応式中の左側および矢印下段に記載の成分を意味する（以下、同様である）もので、生体試料として尿素を測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはウレアアミドヒドロラーゼ、水分子、マグネシウムイオン（塩化マグネシウム）、炭酸水素カリウムが挙げられ、また生体試料としてウレアアミドヒドロラーゼ活性を測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としては尿素、水分子、マグネシウムイオン（塩化マグネシウム）、炭酸水素カリウムが挙げられ、但し水分子は反応媒体の分子にて代替される。

(反応式6) 尿素、ウレアアミドヒドロラーゼ

ウレアアミドヒドロラーゼ



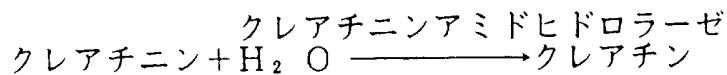
生体試料としてクレアチニンまたはクレアチニンアミドヒドロラーゼの一方を含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分を反応試薬として使用した場合の反応式を下記に示す。なお、このような逐次酵素反応の場合、反応式中の左側の成分と右側の成分とが同一の場合には逐次反応での生成成分の逐次反応物であることから反応に関与する成分であるが反応試薬として別

途に添加するものではないことは明白である（以下、同様である）。

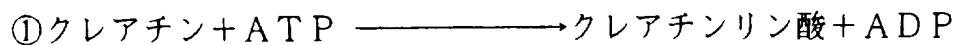
また、下記反応式における①、②について、生体試料としてクレアチニンまたはクレアチニンアミドヒドロラーゼの一方を含有してこの一方を測定する方法において、酵素反応にて生成されるクレアチンを①の反応にて生成されるADPとして測定してもよく、または酵素反応にて生成されるクレアチンを②以下の反応にて生成されるADPとして測定してもよいことを意味する。

生体試料としてクレアチニンを測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としては①の反応系ではクレアチニンアミドヒドロラーゼ、水分子、クレアチンキナーゼ（CK）、マグネシウムイオンが挙げられ、②の反応系ではクレアチニンアミドヒドロラーゼ、水分子、クレアチンアミドヒドロラーゼ、尿素、ウレイドアミドヒドロラーゼ、マグネシウムイオンが挙げられ、また生体試料としてクレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としては①の反応系ではクレアチニン、水分子、クレアチンキナーゼ、マグネシウムイオンが挙げられ、②の反応系ではクレアチニン、水分子、クレアチンアミドヒドロラーゼ、尿素、ウレイドアミドヒドロラーゼ、マグネシウムイオンが挙げられる。

（反応式7）クレアチニン、クレアチニンアミドヒドロラーゼ



CK

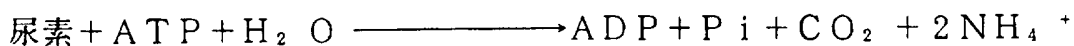


Mg^{2+}

クレアチンアミドヒドロラーゼ



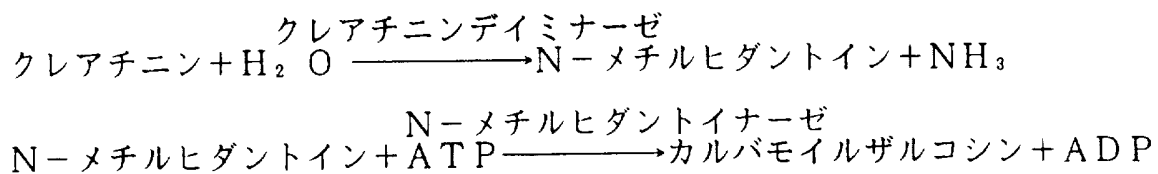
ウレイドアミドヒドロラーゼ



$\text{Mg}^{2+}, \text{KHCO}_3$

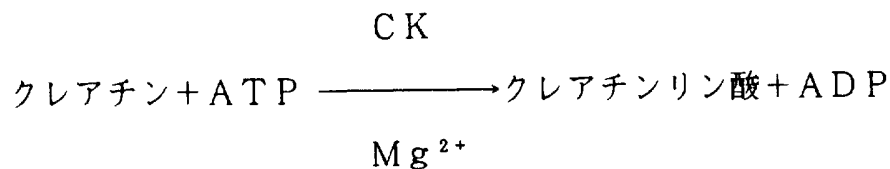
生体試料としてクレアチニンまたはクレアチニンデイミナーゼの一方を含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分を反応試薬として使用した場合の反応式を下記に示し、酵素反応によって生成するADPを測定すればよい。この場合、生体試料としてクレアチニンを測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはクレアチニンデイミナーゼ、水分子、N-メチルヒダントインナーゼが挙げられ、生体試料としてクレアチニンデイミナーゼ活性測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはクレアチニン、水分子、N-メチルヒダントインナーゼが挙げられる。

(反応式8) クレアチニン、クレアチニンデイミナーゼ



生体試料としてクレアチンまたはクレアチンキナーゼの一方を含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分を反応試薬として使用した場合の反応式を下記に示し、酵素反応によって生成するADPを測定すればよい。この場合、生体試料としてクレアチンを測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはクレアチンキナーゼ、マグネシウムイオンが挙げられ、また生体試料としてクレアチンキナーゼ活性を測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはクレアチン、マグネシウムイオンが挙げられる。

(反応式9) クレアチン、クレアチンキナーゼ

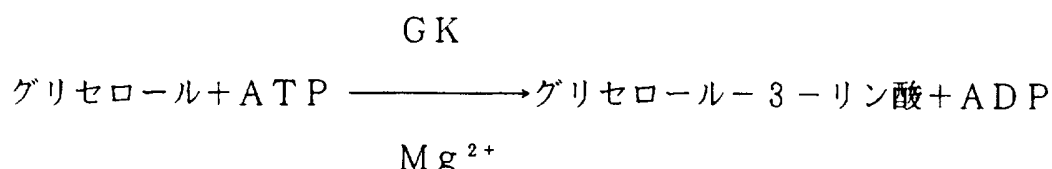


なお、反応式9のクレアチンは、上記反応式7に基づいて遊離されたクレアチンであってもよい。

生体試料としてグリセロールまたはグリセロールキナーゼ(GK)の一方を

含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分を反応試薬として使用した場合の反応式を下記に示し、酵素反応によって生成するADPを測定すればよい。この場合、生体試料としてグリセロールを測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはグリセロールキナーゼ、マグネシウムイオンが挙げられる。

(反応式10) グリセロール、グリセロキナーゼ



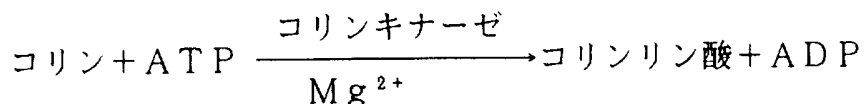
なお、グリセロールは、トリグリセリドやモノまたはジグリセリドにリパーゼや腭リパーゼ（但し、活性化剤としてC_o-リパーゼを適宜添加する）を作用せしめて遊離されたグリセロールでもよく、また、ホスファチジルグリセロールにホスホリパーゼDを作用せしめて遊離されたグリセロールでもよい。

特に、生体内成分の生化学検査項目としてのトリグリセリド定量の目的、トリグリセリドやジグリセリドを合成基質とした腭リパーゼ活性測定の目的に好適である。

例えば、生体試料としてトリグリセリド定量の目的として測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはリパーゼ、水分子、グリセロールキナーゼ、マグネシウムイオンが挙げられる。また、腭リパーゼ活性測定の目的として測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としては、トリグリセリドやジグリセリドの合成基質、水分子、グリセロールキナーゼ、マグネシウムイオン、適宜C_o-リパーゼ、合成基質の可溶化剤としての界面活性剤が挙げられる。

生体試料としてコリンまたはコリンキナーゼの一方を含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分を反応試薬として使用した場合の反応式を下記に示し、酵素反応によって生成するADPを測定すればよい。

(反応式11) コリン、コリンキナーゼ



なお、コリンはホスファチジルコリン（リン脂質成分）にホスリパーゼDを作用せしめて遊離されたコリンやコリンエステル、例えばベンゾイルコリンまたはオルトトルオイルコリンなどの合成基質にコリンエステラーゼを作用させて遊離されたコリンであってもよい。

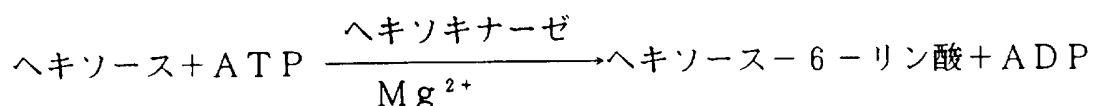
特に、生化学検査項目としてのリン脂質成分定量の目的、合成基質を用いたコリンエステラーゼ活性測定のために好適である。

このリン脂質成分定量の目的として測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としてはホスリパーゼD、水分子、マグネシウムイオンが挙げられ、またコリンエステラーゼ活性測定のために測定する場合の反応に関与する成分の反応試薬としては例えばベンゾイルコリンまたはオルトトルオイルコリンなどの合成基質、水分子、マグネシウムイオンが挙げられる。

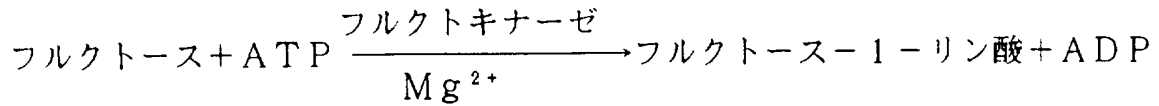
以下、同様に、生体試料として基質またはADPを生成する酵素の一方を含有してこの一方を測定する方法において、その反応に関与する成分を反応試薬として使用した場合の反応式を下記に示し、酵素反応によって生成するADPを測定すればよい。

また、本発明の測定法の完成に基づき、本発明における反応に関与する成分の反応試薬は、上記および下記の種々反応式から明白なものであり、測定すべき被検液によって適宜選択、調製が可能であることも明らかであり、さらにまたこれらの反応試薬は記載のものに何ら限定されるものではない。

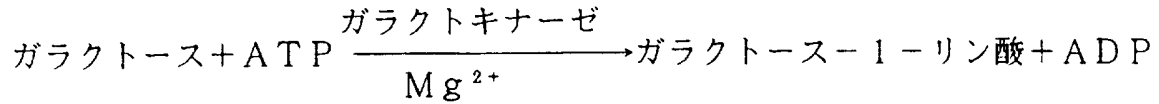
（反応式12）ヘキソース、ヘキソキナーゼ



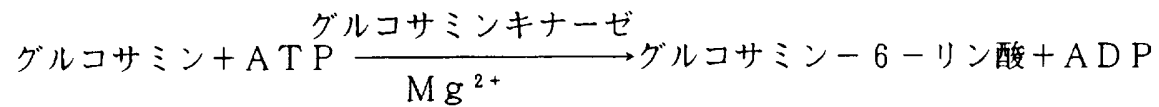
（反応式13）フルクトース、フルクトキナーゼ



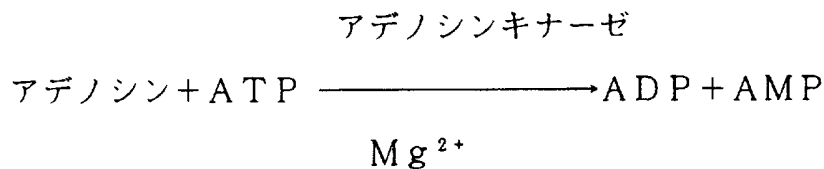
(反応式14) ガラクトース、ガラクトキナーゼ



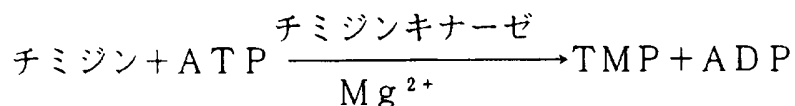
(反応式15) グルコサミン、グルコサミンキナーゼ



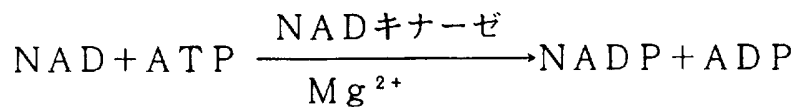
(反応式16) アデノシン、アデノシンキナーゼ



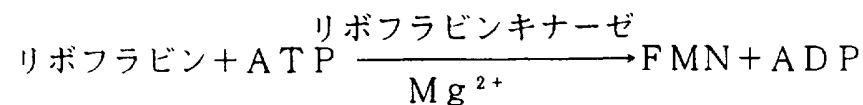
(反応式17) チミジン、チミジンキナーゼ



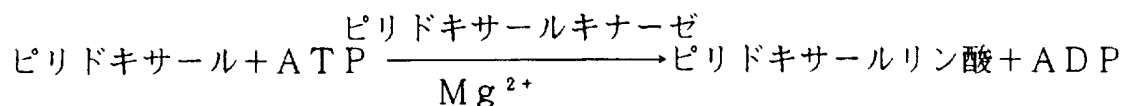
(反応式18) NAD、NADキナーゼ



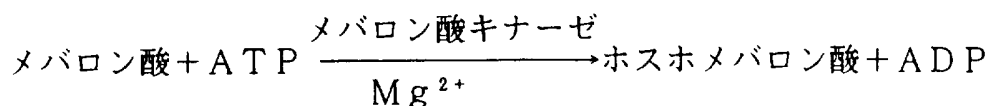
(反応式19) リボフラビン、リボフラビンキナーゼ



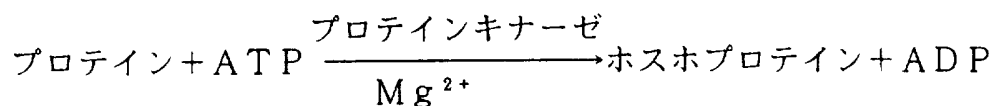
(反応式 20) ピリドキサル、ピリドキサルキナーゼ



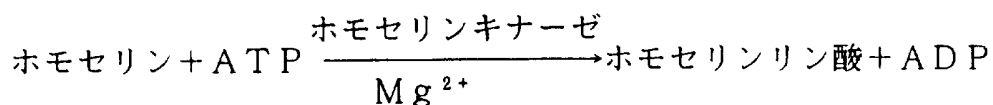
(反応式 21) メバロン酸、メバロン酸キナーゼ



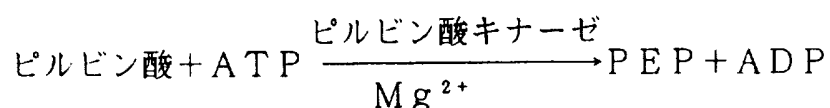
(反応式 22) プロテイン、プロテインキナーゼ



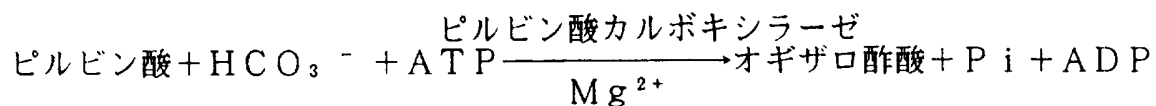
(反応式 23) ホモセリン、ホモセリンキナーゼ



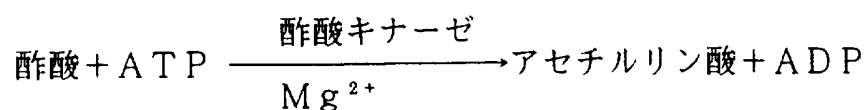
(反応式 24) ピルビン酸、ピルビン酸キナーゼ



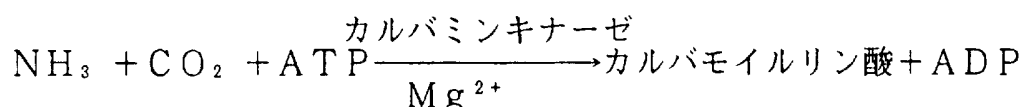
(反応式 25) ピルビン酸、ピルビン酸カルボキシラーゼ



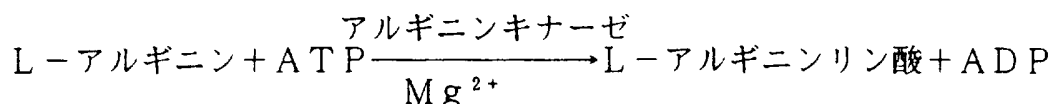
(反応式 26) 酢酸、酢酸キナーゼ



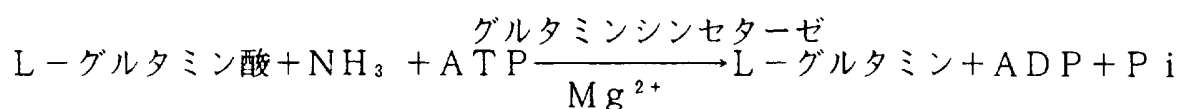
(反応式 27) アンモニア、カルバミンキナーゼ



(反応式 28) L-アルギニン、アルギニンキナーゼ

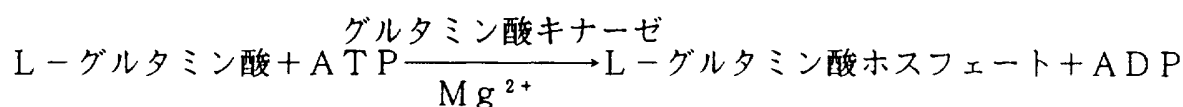


(反応式 29) L-グルタミン酸、アンモニア、グルタミンシンセターゼ

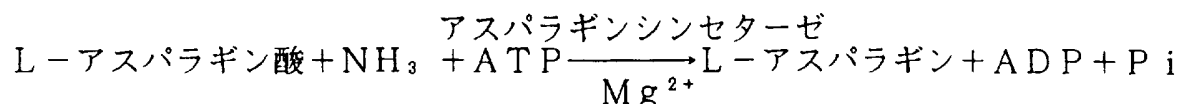


なお、上記反応式におけるアンモニアとしては、前記反応式 6 にて例示される尿素とウレアアミドヒドロラーゼとの反応によって生成されたアンモニアであってもよく、また反応式 7 にて例示される②の反応系におけるクレアチニンとクレアチンアミドヒドロラーゼとの反応によって生成されたアンモニアであってもよく、反応式 8 のクレアチニンとクレアチンデイミナーゼのための前段の反応によって生成されたアンモニアであってもよいもので、このアンモニアとしては何ら限定されるものではない。

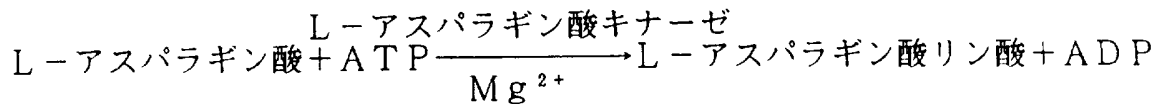
(反応式 30) L-グルタミン酸、グルタミン酸キナーゼ



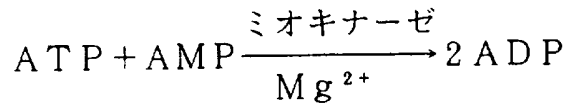
(反応式 31) L-アスパラギン酸、アンモニア、アスパラギンシンセターゼ



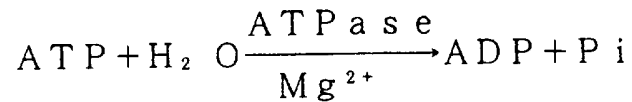
(反応式 3 2) L-アスパラギン酸、L-アスパラギン酸キナーゼ



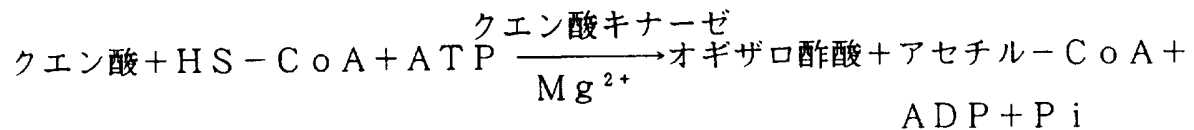
(反応式 3 3) ATP、ミオキナーゼ



(反応式 3 4) ATP、ATPase



(反応式 3 5) クエン酸、クエン酸キナーゼ

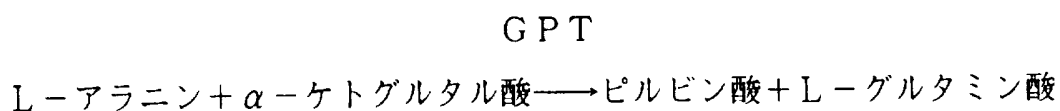


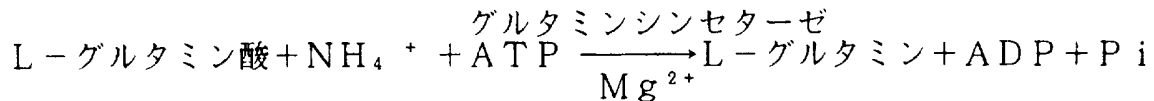
(反応式 3 6) L-アスパラギン酸、 α -ケトグルタル酸、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT)



上記反応において、特にGOT活性測定として好適である。

(反応式 3 7) L-アラニン、 α -ケトグルタル酸、アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT)





上記反応において、特にGPT活性測定として好適である。

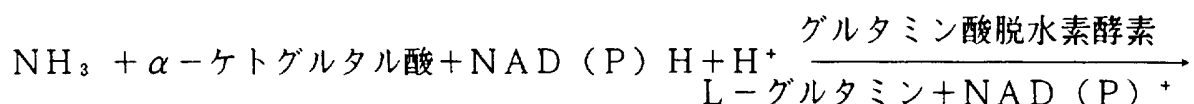
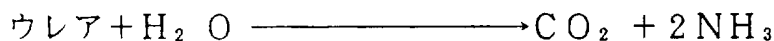
これらの反応において、添加するATPの量は例えば0.1～50mM程度、好ましくは0.5～10mM程度である。また、基質を定量する場合に、添加する酵素量は例えば1～100U/ml程度である。さらに、酵素活性を測定する場合の添加する基質は例えば1～100mM程度である。これらの基質や酵素以外の反応に参与する成分の反応試薬においては、基質と反応して消費される成分は上記基質の使用量と同量ないしその2倍量程度でよく、マグネシウムイオンの濃度としては好適には塩化マグネシウムとして例えば0.1～50mM程度、好適には0.5～10mM程度であるが、特に反応において阻害を受けない限りこれらより過剰量を使用することを除外するものではない。

またこれらの反応は、前記反応式4および5とともに同一反応系としてもよく、また別反応系としてもよいが、好ましくは同一反応系となすことである。

特に、好適な例を述べると、尿素の場合の既存測定法は、

(反応式38)

ウレアアミドヒドロラーゼ (EC 3. 5. 1. 5)



上記反応式38に示す通り、還元型NAD(P)の減少法であり、そのため、

(8) 測定対象の成分が少ない場合には測定値が不正確である。

(9) 測定できる成分の上限値が定量前に反応液内に存在させる還元型NAD(P)の量により制限される(測定レンジが狭い)。

(10) 還元型NAD(P)の量の測定に使用する分光光度計の機種に応じて、定量前に反応液内に存在させる還元型NAD(P)の量を変える必要がある。

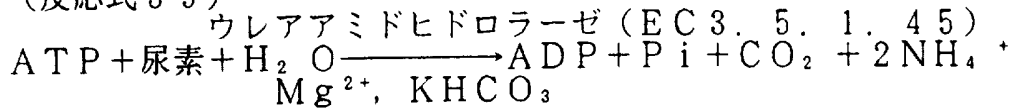
(11) 分析用試薬中に含有される還元型NAD(P)が不安定である。

(12) ドライ用試薬への対応が不可能である。等の欠点を有する。

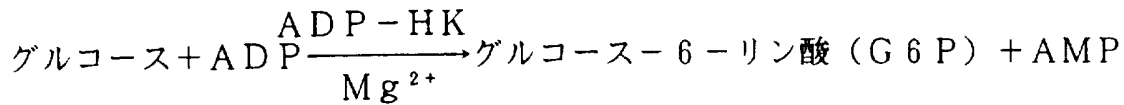
さらに、この測定法は原理的にアンモニアを測定する方法であるために、
 (13) 検体や試薬中のアンモニアを消去する必要がある。

それに対して、本発明の測定法は、

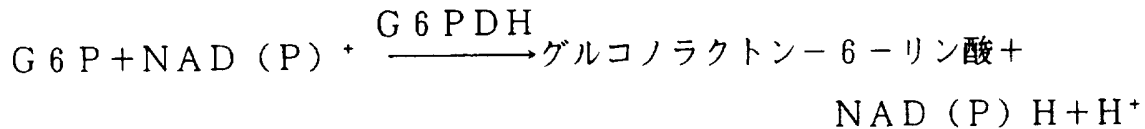
(反応式 39)



(反応式 40)



(反応式 41)

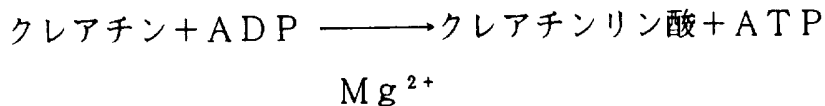


上記反応式 39、40、41 に示す通り、還元型 NAD (P) の増加法であり、減少法により生じる欠点は全く無く、さらに、アンモニアの消去も必要としない優れた測定法であった。

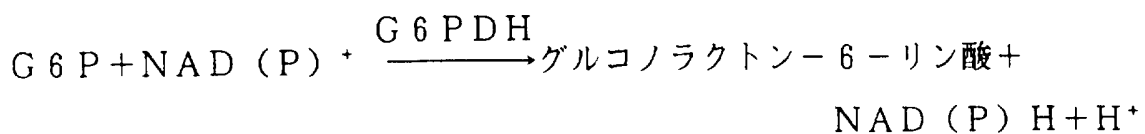
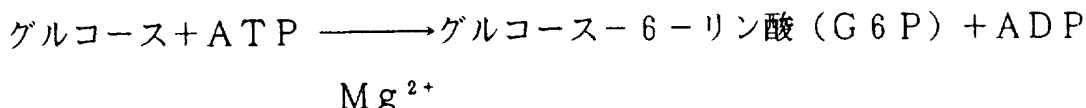
クレアチンキナーゼの場合の既存測定法は、

(反応式 42)

クレアチンキナーゼ



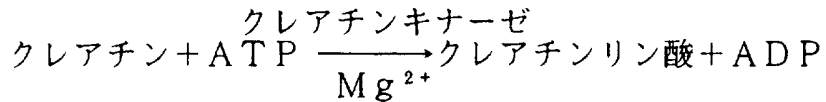
ヘキソキナーゼ



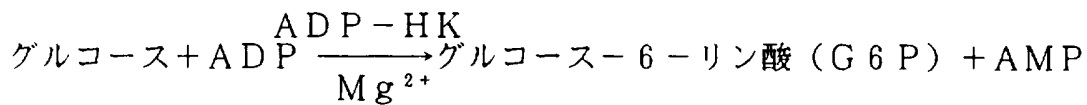
上記反応式 4 2 に示した。この反応系では基質となるクレアチンリン酸が非常に高価で測定試薬の値段が高くなる欠点があった。

それに対して、本発明の測定法は、

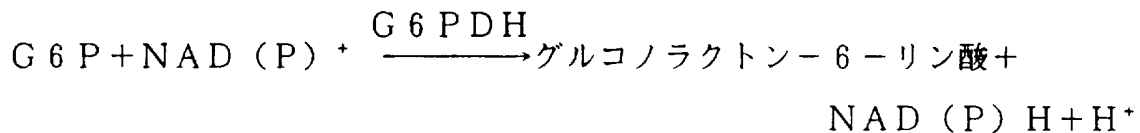
(反応式 4 3)



(反応式 4 4)



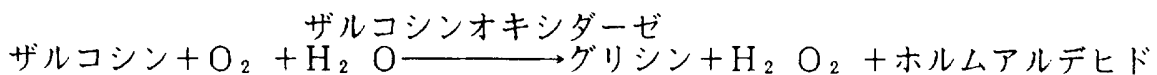
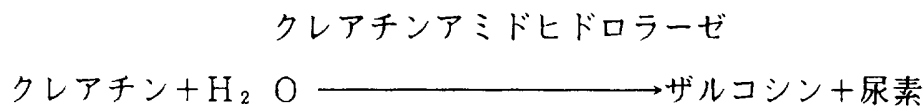
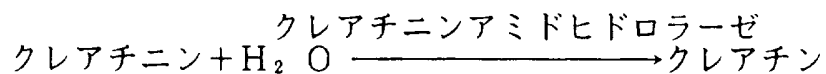
(反応式 4 5)



上記反応式 4 3、4 4、4 5 に示す通り、基質としてクレアチンを用いるため測定試薬を安価に提供することができた。

クレアチニンの場合の既存測定法は、

(反応式 4 6)

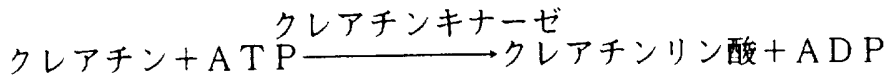
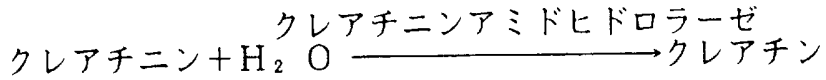


上記反応式 4 6 に示す通り、オキシダーゼ法であり、検体中の還元物質（アスコルビン酸等）の影響を受けるために測定値が不正確となり、さらにザルコシンオキシダーゼがプロリンに作用し、検体中のプロリンの影響を受ける等の欠点

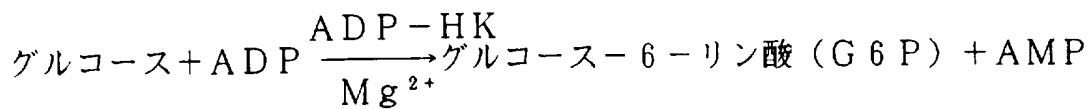
を有する。

それに対して、本発明の測定法は、

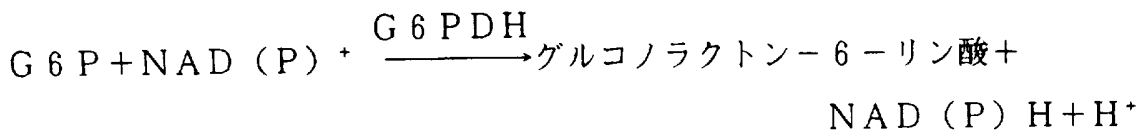
(反応式 47)



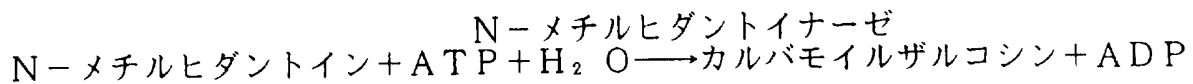
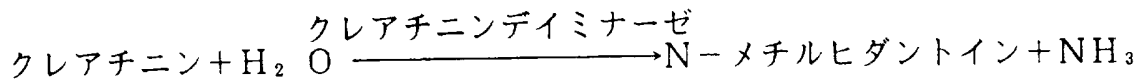
(反応式 48)



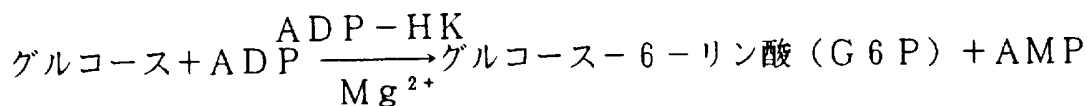
(反応式 49)



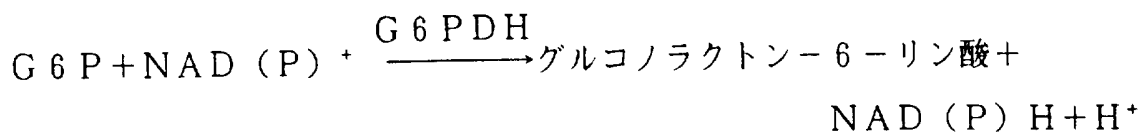
(反応式 50)



(反応式 51)



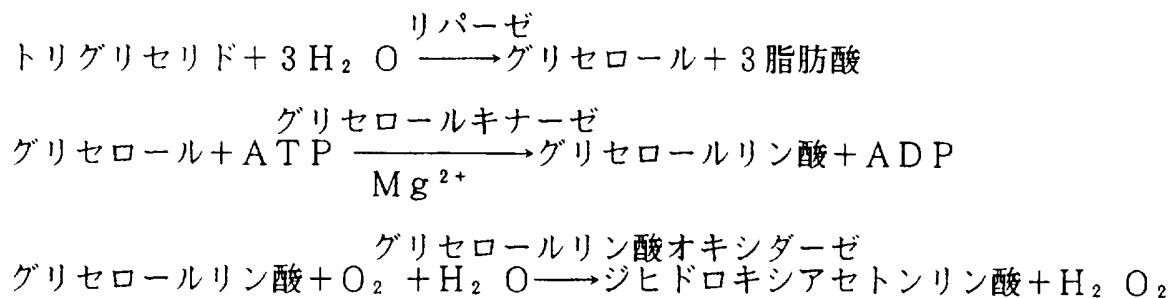
(反応式 52)



上記反応式 47、48、49 および 50、51、52 に示す通り、還元型 NAD(P) の増加法であり、検体中の還元物質（アスコルビン酸等）やプロロリンの影響を全く受けない。

トリグリセリドの場合の既存測定法は、

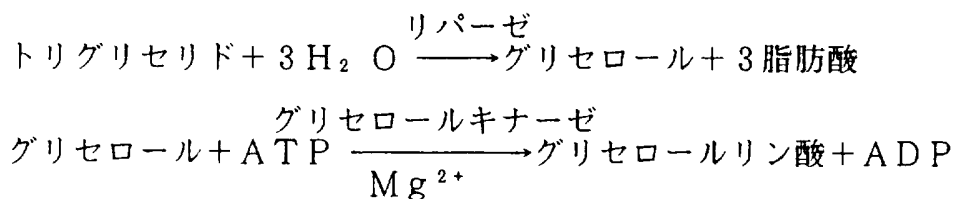
(反応式 53)



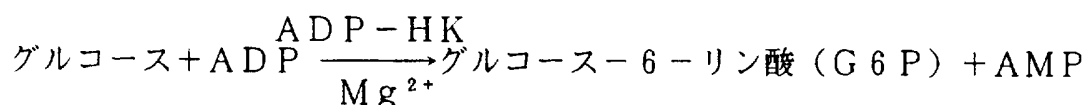
上記反応式 53 に示す通り、オキシダーゼ法であり、検体中の還元物質（アスコルビン酸等）の影響を受けるので測定値が不正確となる。

それに対して、本発明の測定法は、

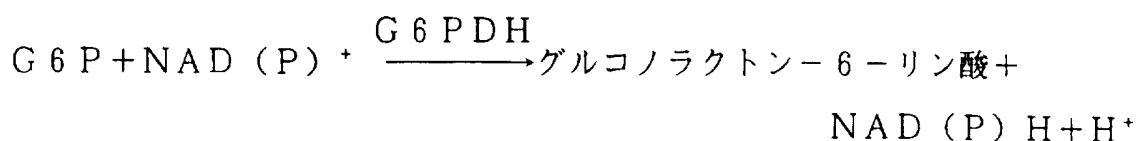
(反応式 54)



(反応式 55)



(反応式 56)

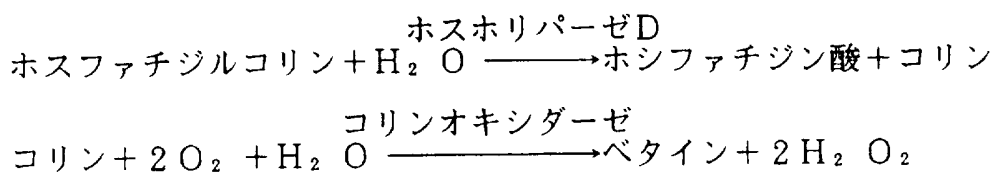


上記反応式 5 4、5 5、5 6 に示す通り、還元方 NAD (P) の増加法であり、検体中の還元物質の影響を全く受けない。

なお、上記反応式 5 4 のトリグリセリドの代わりにジグリセリドやモノグリセリド（これらの場合 2 分子または 1 分子の水分子を消費して 2 分子または 1 分子の脂肪酸を遊離する反応式となる）の場合も同様である。

ホスファチジルコリンの場合の既存測定法は、

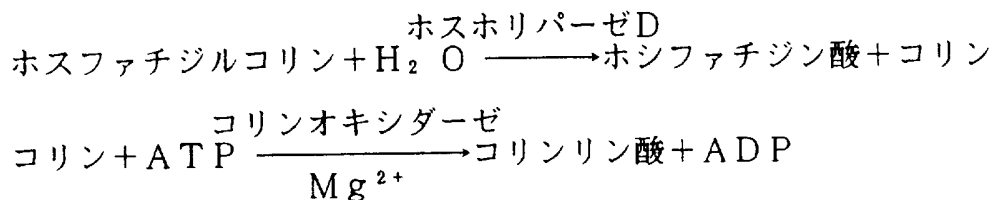
(反応式 5 7)



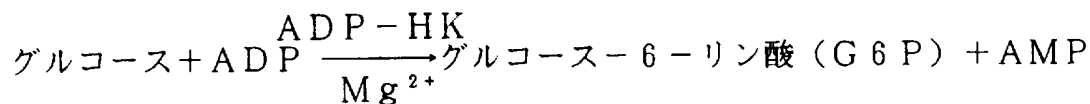
上記反応式 5 7 に示す通り、オキシダーゼ法であり検体中の還元物質（アスコルビン酸等）の影響を受けるので測定値が不正確となる。

それに対して、本発明の測定法は、

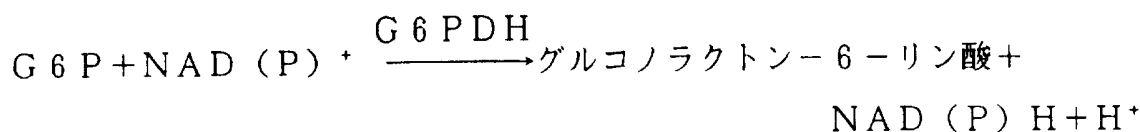
(反応式 5 8)



(反応式 5 9)

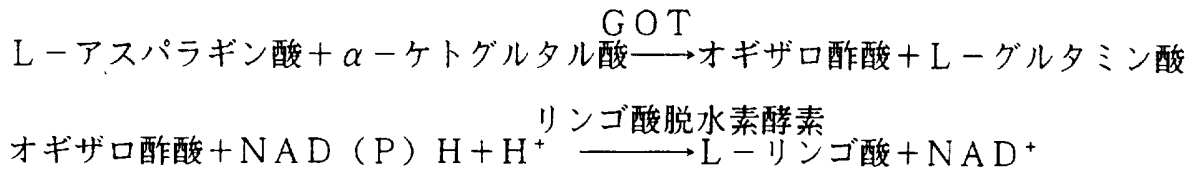


(反応式 6 0)



上記反応式 58、59、60 に示す通り、還元型 NAD (P) の増加法であり検体中の還元物質の影響を受けない。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT) の場合の既存測定法は、(反応式 61)



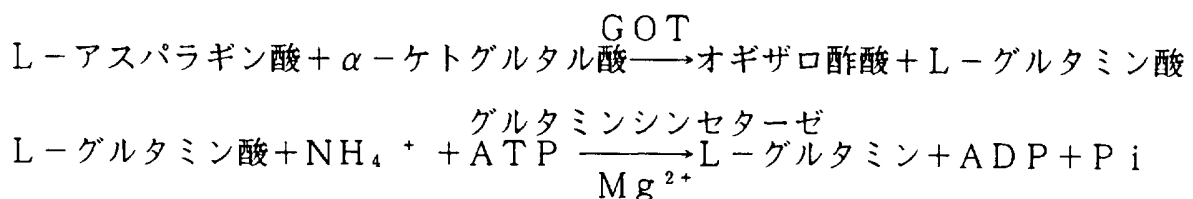
上記反応式 61 に示す通り、還元型 NAD の減少法であり、そのため、

- (14) 測定対象の成分が少ない場合には測定値が不正確である。
- (15) 測定できる成分の上限値が定量前に反応液内に存在させる還元型 NAD の量により制限される (測定レンジが狭い)。
- (16) 還元型 NAD の量の測定に使用する分光光度計の機種に応じて、定量前に反応液内に存在させる還元型 NAD の量を変える必要がある。
- (17) 分析用試薬中に含有される還元型 NAD が不安定である。
- (18) ドライ用試薬への対応が不可能である。等の欠点を有する。

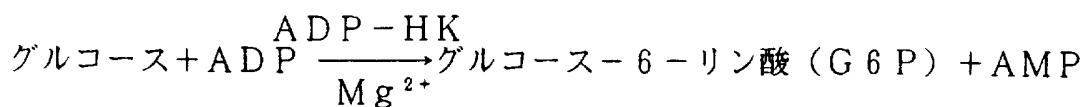
さらに、この測定法は検体中の乳酸脱水素酵素の影響を受け、正確に測定することができない方法であった。

それに対して、本発明での測定方法は、

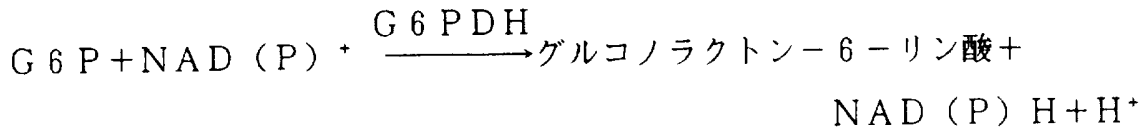
(反応式 62)



(反応式 63)



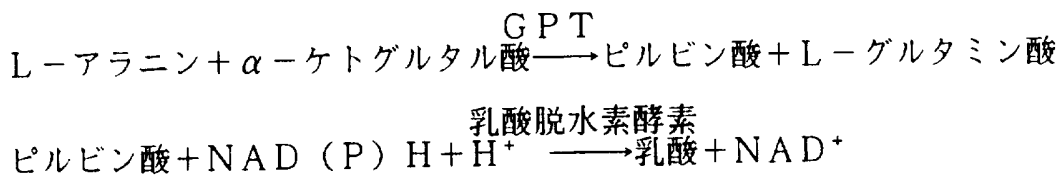
(反応式 6 4)



上記反応式 6 2、6 3、6 4 に示す通り、還元型 NAD (P) の増加法であり、減少法により生じる欠点は全く無く、さらに検体中の乳酸脱水素酵素の消去も必要としない優れた測定法であった。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (G P T) の場合の既存測定法は、

(反応式 6 5)



上記反応式 6 5 に示す通り、還元型 NAD の減少法であり、

(19) 測定対象の成分が少ない場合には測定値が不正確である。

(20) 測定できる成分の上限値が定量前に反応液内に存在させる還元型 NAD の量により制限される。(測定レンジが狭い)

(21) 還元型 NAD の量の測定に使用する分光光度計の機種に応じて、定量前に反応液内に存在させる還元型 NAD の量を変える必要がある。

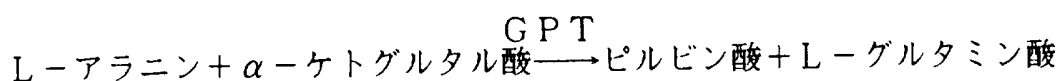
(22) 分析用試薬中に含有される還元型 NAD が不安定である。

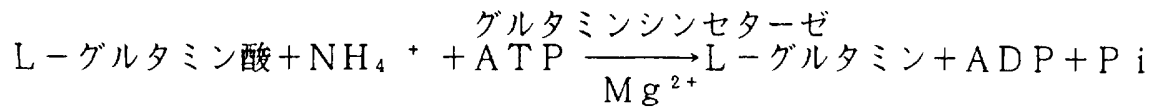
(23) ドライ用試薬への対応が不可能である。等の欠点を有する。

さらに、この測定法は検体中の乳酸脱水素酵素の影響を受け、正確に測定することができない方法であった。

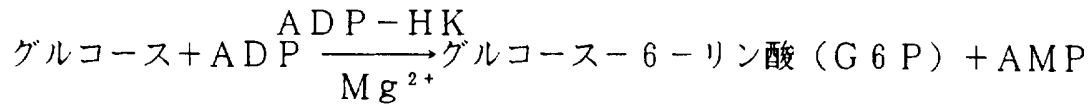
それに対して、本発明での測定法は、

(反応式 6 6)

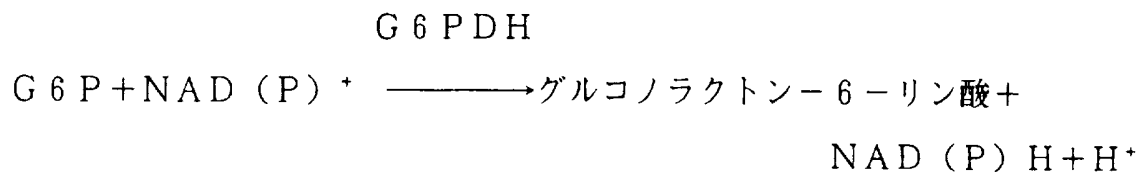




(反応式 67)



(反応式 68)



上記反応式 66、67、68に示す通り、還元型NAD(P)の増加法であり、減少法により生じる欠点は全く無く、さらに検体中の乳酸脱水素酵素の消去も必要としない優れた測定法であった。

以下、本発明の生体試料中のADPを生成する酵素またはその基質の測定方法を例をもって具体的に説明するが、本発明の方法はこれらに限定されるものではない。

図面の簡単な説明

第1図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのADP測定の検量線を示すものである。

第2図は本発明によって37℃でコバルトイオンを用いたときのADP測定の検量線を示すものである。

第3図は本発明によって37℃でマンガンイオンを用いたときのADP測定の検量線を示すものである。

第4図は本発明によって20℃でマグネシウムイオンを用いたときのADP測定の検量線を示すものである。

第5図は本発明によって40℃でマグネシウムイオンを用いたときのADP測定の見量線を示すものである。

第6図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときの尿素測定の見量線を示すものである。

第7図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのクレアチニン測定の見量線を示すものである。

第8図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのクレアチニン測定の見量線を示すものである。

第9図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのクレアチニン測定の見量線を示すものである。

第10図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのグリセロール測定の見量線を示すものである。

第11図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのコリン測定の見量線を示すものである。

第12図は本発明によって37℃でマグネシウムイオンを用いたときのグルタミン酸測定の見量線を示すものである。

第13図は本発明によって37℃でコバルトイオンを用いたときの尿素測定の見量線を示すものである。

第14図は本発明によって37℃でマンガンイオンを用いたときのクレアチニン測定の見量線を示すものである。

第15図は本発明によって20℃でマグネシウムイオンを用いたときのクレアチニン測定の見量線を示すものである。

第16図は本発明によって40℃でマグネシウムイオンを用いたときのグリセロール測定の見量線を示すものである。

第17図は本発明の代わりに50℃にて反応したときのADP測定の定量曲線を示すものである。

発明の実施の形態

以下、実施例、参考例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例、参考例によって限定されるものではない。

参考例

ADP-HKの酵素活性測定法

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
20 mM	グルコース
2 mM	ADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	G6PDH
0.025 %	NBT (ニトロテトラゾニウムブルー)
1 mM	NADP
1 %	トリトンX-100
5 U/ml	ジアホラーゼ (NADPH)

測定試薬 1 ml を 37°C で 1 分間予備加温した後、0.02 ml の酵素液を添加して 10 分間反応させる。反応後、0.1 N 塩酸を 2 ml 添加して反応を停止させ、5 分以内に層長 1.0 cm のセルを用いて、波長 550 nm における吸光度を測定する (A_s)。また盲検として酵素液のかわりに蒸留水 0.02 ml を用いて同一の操作を行って吸光度を測定する (A_b)、この酵素使用の吸光度 (A_s) と盲検の吸光度 (A_b) の吸光度差 (A_s - A_b) より酵素活性を求める。酵素活性 1 単位は 37°C で 1 分間に 1 μモルの還元型 NADP を生成させる酵素量とし、計算式は下記の通りである。

$$\text{酵素活性 (U/ml)} = (A_s - A_b) \times 0.795 \times \text{酵素の希釈倍率}$$

〔ADP-HKの取得〕

Pyrococcus furiosus DSM3638 の培養

培地組成

0. 1 %	酵母エキス
0. 5 %	トリプトン
0. 7 2 %	マルトース
2. 3 9 %	NaCl
0. 4 %	Na ₂ SO ₄
0. 0 7 %	KCl
0. 0 2 %	NaHCO ₃
0. 0 1 %	KBr
0. 0 3 %	H ₃ BO ₄
1. 0 8 %	MgCl ₂
0. 1 5 %	CaCl ₂
0. 0 0 2 5 %	SrCl ₂
0. 0 2 5 %	NH ₄ Cl
0. 0 1 4 %	K ₂ HPO ₄
0. 1 %	CH ₃ COONa
0. 0 0 1 5 %	N(COOH) ₃
0. 0 0 0 5 %	MnSO ₄
0. 0 0 1 4 %	FeSO ₄
0. 0 0 0 2 %	NiCl ₂
0. 0 0 0 1 %	CoSO ₄
0. 0 0 0 1 %	ZnSO ₄
0. 0 0 0 0 1 %	CuSO ₄
0. 0 0 0 0 0 1 %	Na ₂ WO ₄
0. 0 0 0 0 0 1 %	Na ₂ MoO ₄
0. 1 %	システイン塩酸塩

上記培地成分を含む液体培地 (pH7) 500ml を 500ml 容三角フラスコ10本に分注し、120℃、20分間、加熱滅菌した後、これに *Pyrococcus furiosus* DSM3638株の菌体懸濁液10ml を移植

し、攪拌させながら、95℃で20時間培養し、種培養液とした。上記培地成分を含む液体培地2001/3001タンクを滅菌した後、種培養液を移植し、攪拌させながら、95℃で15時間培養し、5mU/mlの培養液2001を得た。

〔ADP-HKの精製〕

得られた培養液2001を遠心分離して、得られた菌体を0.9%のNaClを含む20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で1回洗浄した。洗浄菌体を20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に懸濁して2lに調整し、クボタ社製の超音波破碎機(INSONATOR 201M)を用いて180W、30分間処理して、菌体破碎液を得た。

この破碎液を8000rpm、30分間遠心分離し、1.8l(酵素活性980U)の上清を得た。この上清を透析チューブを用いて10mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)8lに対して5℃で一夜透析した後、10mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で緩衝化したDEAE-Sephrose FF(ファルマシア社製)200ml(2.6×38cm)のカラムに通し、0~1モルのNaClのリニアグラジエントで溶出を行った。その結果、0.08~0.1モルのNaCl濃度で活性画分(950U)が溶出された。この得られた活性画分に4MとなるようにNaClを溶解し、4MのNaClで緩衝化されたPhenyl-Sephrose FF(ファルマシア社製)200ml(2.6×38cm)のカラムに通し、4~0MのNaClのリニアグラジエントにより溶出を行った。

その結果、0.02から0.07モルのNaCl濃度で活性画分(900U)が得られた。この得られた活性画分を10mMトリス-塩酸(pH7.5)8lに5℃、一夜透析した後、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で緩衝化したヒドロキシアパタイト(ペンタックス社製)100ml(2.6×19cm)のカラムに通し、0~0.5Mのリン酸緩衝液(pH7.5)のリニアグラジエントにより溶出を行った。その結果、0.02~0.03Mのリン酸緩衝液濃度で活性画分(850U)が溶出された。この酵素液を凍結乾燥して5mgの酵

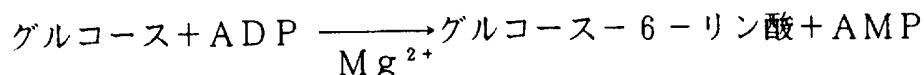
素粉末（170 U/mg）を得た。

ADP-HKの理化学的性質は以下の通りであった。

〔ADP-HKの理化学的性質〕

（1）酵素作用

基質としてグルコースを用いた酵素作用を以下に示す。



（2）分子量

トーソー社製TSK-G3000SW_{XL}（0.75×30cm）を用いたゲル濾過法により測定したADP-HKの分子量は100000±5000であった。

（3）至適pHはpH6.0～7.0（リン酸緩衝液）であった。

（4）至適温度は80～100℃であることから高度好熱性ADP-HKと認められた。

実施例1

<37℃でマグネシウムイオンを用いたときのADPの定量>

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

ADPを2.6 mM、5.2 mM、7.8 mM、10.4 mM、13 mMの水溶液に調整し、ADPサンプルを作成した。測定試薬1 mlにADPサンプル20 μl加え、37℃、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを

対照にして測定した。測定結果は第1図（横軸：最終濃度として表示）に示すようにADPが定量的に測定できた。

実施例 2

< 37°Cでコバルトイオンを用いたときのADPの定量 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	CoCl ₂
10 U/ml	ADP-HK

測定方法

ADPを2.3 mM、4.6 mM、6.9 mM、9.2 mM、11.5 mMの水溶液に調整し、ADPサンプルを作成した。測定試薬1 mlにADPサンプル20 μl加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第2図に示すようにADPが定量的に測定できた。

実施例 3

< 37°Cでマンガンイオンを用いたときのADPの定量 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MnCl ₂
10 U/ml	ADP-HK

測定方法

ADPを2.5 mM、5.0 mM、7.5 mM、10.0 mM、12.5 mMの水溶液に調整し、ADPサンプルを作成した。測定試薬1 mlにADPサンプル20 μ l加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第3図に示すようにADPが定量的に測定できた。

実施例 4

< 20°Cでマグネシウムイオンを用いたときのADPの定量 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
20 U/ml	ADP-HK

測定方法

ADPを2.8 mM、5.6 mM、8.4 mM、11.2 mM、14 mMの水溶液に調整し、ADPサンプルを作成した。測定試薬1 mlにADPサンプル20 μ l加え、20°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第4図に示すようにADPが定量的に測定できた。

実施例 5

< 40°Cでマグネシウムイオンを用いたときのADPの定量 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
20 mM	グルコース

5 U/m l	G 6 P D H
1 m M	N A D P
2 m M	M g C l ₂
5 U/m l	A D P - H K

測定方法

A D P を 2. 7 m M、5. 4 m M、8. 1 m M、1 0. 8 m M、1 3. 5 m M の水溶液に調整し、A D P サンプルを作成した。測定試薬 1 m l に A D P サンプル 2 0 μ l 加え、4 0 °C、5 分間加温後の 3 4 0 n m の吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第 5 図に示すように A D P が定量的に測定できた。

実施例 6

< 3 7 °C でマグネシウムイオンを用いたときの尿素の定量 >

測定試薬

5 0 m M	トリス-塩酸緩衝液 (p H 7. 5)
3 0 U/m l	ウレアアミドリアーゼ
2 m M	A T P
1 0 m M	K C l
8 m M	K H C O ₃
2 0 m M	グルコース
5 U/m l	G 6 P D H
1 m M	N A D P
2 m M	M g C l ₂
5 U/m l	A D P - H K

測定方法

尿素を 2. 6 m M、5. 2 m M、7. 8 m M、1 0. 4 m M、1 3 m M の水溶液に調整し、尿素サンプルを作成した。測定試薬 1 m l に尿素サンプル 2 0 μ l 加え、3 7 °C、5 分間加温後の 3 4 0 n m の吸光度を、試薬ブランクを対照に

して測定した。測定結果は第6図に示すように尿素が定量的に測定できた。

実施例7

< 37°Cでマグネシウムイオンを用いたときのクレアチニンの定量(1) >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
100 U/ml	クレアチニンアミドヒドロラーゼ
5 U/ml	クレアチンキナーゼ
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

クレアチニンを2.6 mM、5.2 mM、7.8 mM、10.4 mM、13 mMの水溶液に調整し、クレアチニンサンプルを作成した。測定試薬1 mlにクレアチニンサンプル20 μlを加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第7図に示すようにクレアチニンが定量的に測定できた。

実施例8

< 37°Cでマグネシウムイオンを用いたときのクレアチニンの定量(2) >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
10 U/ml	クレアチンデイミナーゼ
10 U/ml	N-メチルヒダントイナーゼ
2 mM	ATP

20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

クレアチニンを2.7 mM、5.3 mM、7.9 mM、10.5 mM、13 mMの水溶液に調整し、クレアチニンサンプルを作成した。測定試薬1 mlにクレアチニンサンプル20 μ lを加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第8図に示すようにクレアチニンが定量的に測定できた。

実施例 9

< 37°Cでマグネシウムイオンを用いたときのクレアチンの測定 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
5 U/ml	クレアチンキナーゼ
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

クレアチンを2.6 mM、5.2 mM、7.8 mM、10.4 mM、13 mMの水溶液に調整し、クレアチニンサンプルを作成した。測定試薬1 mlにクレアチニンサンプル20 μ lを加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第9図に示すようにクレアチン

が定量的に測定できた。

実施例 10

< 37°Cでマグネシウムイオンを用いたときのグリセロールの測定 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
5 U/ml	グリセロールキナーゼ
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

グリセロールを2.6 mM、5.2 mM、7.8 mM、10.4 mM、13 mMの水溶液に調整し、グリセロールサンプルを作成した。測定試薬1 mlにグリセロールサンプル20 μlを加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第10図に示すようにグリセロールを定量的に測定できた。また、トリグセリドにリパーゼを作用させ遊離するグリセロールやホスファチジルグリセロールにホスホリパーゼDを作用させ遊離するグリセロールも測定することができた。

実施例 11

< 37°Cでマグネシウムイオンを用いたときのコリンの測定 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
5 U/ml	コリンキナーゼ
2 mM	ATP

20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

塩化コリンを2.6 mM、5.2 mM、7.8 mM、10.4 mM、13 mMの水溶液に調整し、塩化コリンサンプルを作成した。測定試薬1 mlに塩化コリンサンプル20 μ lを加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第11図に示すようにコリンを定量的に測定できた。また、リン脂質にホスホリパーゼDを作用させ、遊離するコリンも測定することができた。

実施例 12

< 37°Cでマグネシウムイオンを用いたときのL-グルタミン酸の測定 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (PH 7.5)
10 U/ml	グルタミンシンターゼ
10 mM	NH ₄ Cl
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

L-グルタミン酸を2.6 mM、5.2 mM、7.8 mM、10.4 mM、13 mMの水溶液に調製し、L-グルタミン酸サンプルを作成した。測定試薬1

1 ml に L-グルタミン酸サンプル 20 μ l を加え、37°C、5 分間加温後の 340 nm の吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第 12 図に示すように L-グルタミン酸が定量的に測定できた。また、アスパラギン酸トランスフェラーゼ (GOT) やアラニントランスフェラーゼ (GPT) の作用によって遊離する L-グルタミン酸も測定することができた。

実施例 13

< 37°C でコバルトイオンを用いたときの尿素の定量 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
30 U/ml	ウレアアミドリアーゼ
2 mM	ATP
10 mM	KCl
8 mM	KHCO ₃
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	CoCl ₂
10 U/ml	ADP-HK

測定方法

尿素を 2.3 mM、4.6 mM、6.9 mM、9.2 mM、11.5 mM の水溶液に調整し、尿素サンプルを作成した。測定試薬 1 ml に尿素サンプル 20 μ l 加え、37°C、5 分間加温後の 340 nm の吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第 13 図に示すように尿素が定量的に測定できた。

実施例 14

< 37°C でマンガンイオンを用いたときのクレアチニンの定量 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
100 U/ml	クレアチニンアミドヒドロラーゼ
5 U/ml	クレアチンキナーゼ
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MnCl ₂
10 U/ml	ADP-HK

測定方法

クレアチニンを2.5 mM、5.0 mM、7.5 mM、10.0 mM、12.5 mMの水溶液に調整し、クレアチニンサンプルを作成した。測定試薬1 mlにクレアチニンサンプル20 μ lを加え、37°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第14図に示すようにクレアチニンが定量的に測定できた。

実施例 15

< 20°Cでマグネシウムイオンを用いたときのクレアチンの測定 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
5 U/ml	クレアチンキナーゼ
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
20 U/ml	ADP-HK

測定方法

クレアチンを2.8 mM、5.6 mM、8.4 mM、11.2 mM、14 mMの水溶液に調整し、クレアチンサンプルを作成した。測定試薬1 mlにクレアチンサンプル20 μ lを加え、20°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第15図に示すようにクレアチンが定量的に測定できた。

実施例 16

< 40°Cでマグネシウムイオンを用いたときのグリセロールの測定 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
5 U/ml	グリセロールキナーゼ
2 mM	ATP
20 mM	グルコース
5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

グリセロールを2.7 mM、5.4 mM、8.1 mM、10.8 mM、13.5 mMの水溶液に調整し、グリセロールサンプルを作成した。測定試薬1 mlにグリセロールサンプル20 μ lを加え、40°C、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第16図に示すようにグリセロールを定量的に測定できた。また、トリグセリドにリパーゼを作用させ遊離するグリセロールやホスファチジルグリセロールにホスホリパーゼDを作用させ遊離するグリセロールも測定することができた。

参考例 2

< 50°CのときのADOの定量性 >

測定試薬

50 mM	トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)
20 mM	グルコース
0.5 U/ml	G6PDH
1 mM	NADP
2 mM	MgCl ₂
5 U/ml	ADP-HK

測定方法

ADPを0、5 mM、10 mM、15 mMの水溶液に調整し、ADPサンプルを作成した。測定試薬1 mlを50℃で5分間予備加温した後、ADPサンプル20 μlを加え、50℃、5分間加温後の340 nmの吸光度を、試薬ブランクを対照にして測定した。測定結果は第17図に示すように50℃では定量的な測定はできなかった。

発明の効果

本発明の測定方法では、還元型NAD(P)類の生成量に基づいて生体物質を測定するので測定限界が高く、また分子吸光係数が明確になっている還元型NAD(P)類を測定するので、測定値の信頼性が高い。更に、本発明の測定方法は、検体中の還元物質などの影響を受けないという利点を有する。従って、本発明によれば、生体試料中に存在するADPまたは生体試料中のADPを生成する酵素とその基質を簡便にして高精度で測定することができる。

請 求 の 範 囲

1. 酵素反応を用いて被検液中のADPを測定する方法において、被検液を少なくともグルコース、ADP依存性ヘキソキナーゼ、酸化型NAD(P)類、グルコース-6-リン酸脱水素酵素およびマグネシウムイオン、コバルトイオンおよびマンガンイオンからなる群より選ばれた1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15~45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD(P)類の生成量に基づいて測定する方法。
2. ADPが、存在または形成されたADPである請求の範囲第1項に記載の測定する方法。
3. ADP依存性ヘキソキナーゼが、高度好熱性ADP依存性ヘキソキナーゼである請求の範囲第1項に記載の測定する方法。
4. 温度条件が20~40℃である請求の範囲第1項に記載の測定する方法。
5. ADP依存性ヘキソキナーゼおよびグルコース-6-リン酸脱水素酵素が0.1~100U/ml、グルコースが0.5~100mM、酸化型NAD(P)が0.5~50mM、イオン放出性塩類が0.1~50mMの濃度である請求の範囲第1項に記載の測定する方法。
6. 酵素反応を用いて被検液中のADPを生成する酵素またはその基質の一方を測定する方法において、ADPを生成する酵素またはその基質の一方を含有する被検液を少なくともADPを生成する酵素とその基質に基づく反応に関与する成分の反応試薬、ATP、グルコース、ADP依存性ヘキソキナーゼ、酸化

型NAD(P)類、グルコース-6-リン酸脱水素酵素およびマグネシウムイオン、コバルトイオンまたはマンガンイオンのいずれか1種または2種以上のイオン放出性塩類の存在下、15~45℃の温度条件にて反応させ、被検液中のADPを生成する酵素またはその基質を反応によって生成されるAMPとともに、還元型NAD(P)類の生成量に基づいて測定する方法。

7. ADPを生成する酵素がウレアアミドヒドロラーゼであり、その基質がウレアである請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

8. ADPを生成する酵素がクレアチンキナーゼであり、その基質がクレアチンである請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

9. クレアチンが、クレアチニンにクレアチニナーゼを作用させて遊離されたクレアチンである請求の範囲第8項に記載の測定する方法。

10. ADPを生成する酵素がN-メチルヒダントイナーゼであり、その基質がN-メチルヒダントインである請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

11. N-メチルヒダントインが、クレアチニンにクレアチニンデイミナーゼを作用させて遊離されたN-メチルヒダントインである請求の範囲第10項に記載の測定する方法。

12. ADPを生成する酵素がグリセロールキナーゼであり、その基質がグリセロールである請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

13. グリセロールが、リパーゼの作用によってトリグリセリド、ジグリセリドまたはモノグリセリドから遊離されたグリセロールまたはホスホリパーゼDの作用によるホスファチジルグリセロールから遊離されたグリセロールである請

求の範囲第12項に記載の測定する方法。

14. ADPを生成する酵素がコリンキナーゼであり、その基質がコリンである請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

15. コリンが、ホスホリパーゼDの作用によるホスファチジルコリンまたはコリンエステラーゼの作用によるコリンエステルから遊離されるコリンである請求の範囲第14項に記載の測定する方法。

16. ADPを生成する酵素がグルタミンシンセターゼまたはグルタミン酸キナーゼであり、その基質がL-グルタミン酸である請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

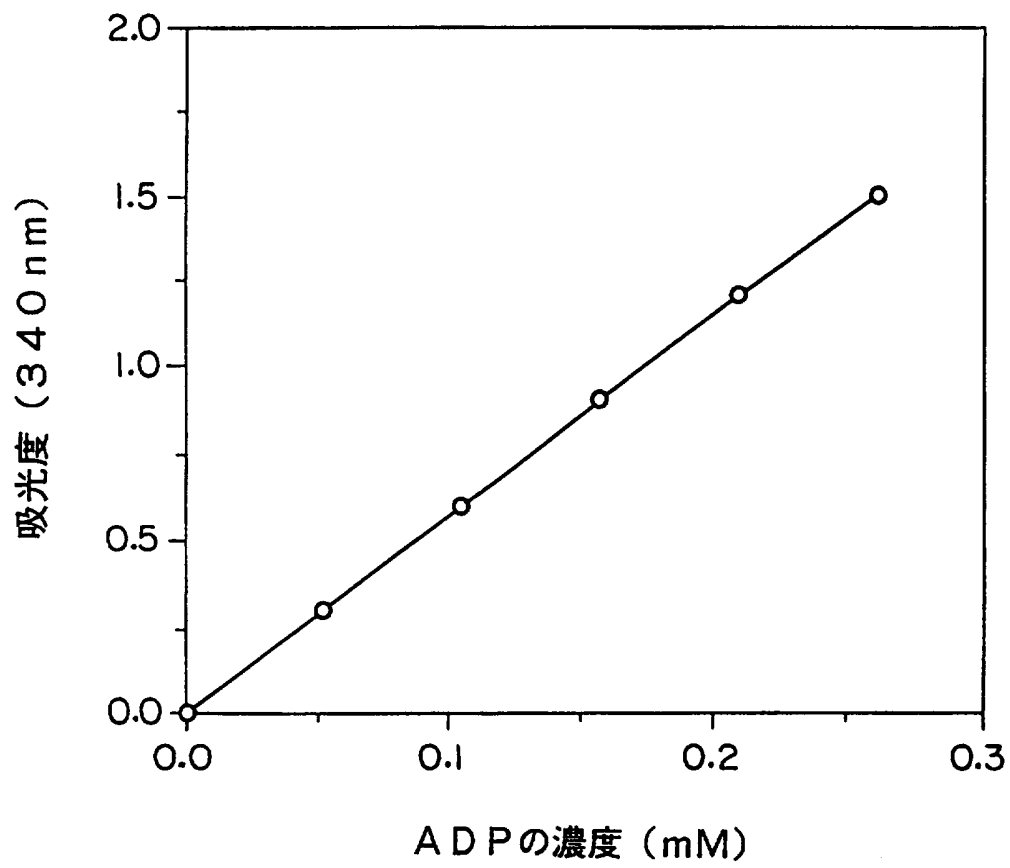
17. L-グルタミン酸が、L-アスパラギン酸及び α -ケトグルタル酸からアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの作用により形成されるL-グルタミン酸である請求の範囲第16項に記載の測定する方法。

18. L-グルタミン酸が、L-アラニン及び α -ケトグルタル酸からアラニンアミノトランスフェラーゼの作用により形成されるL-グルタミン酸である請求の範囲第16項に記載の測定する方法。

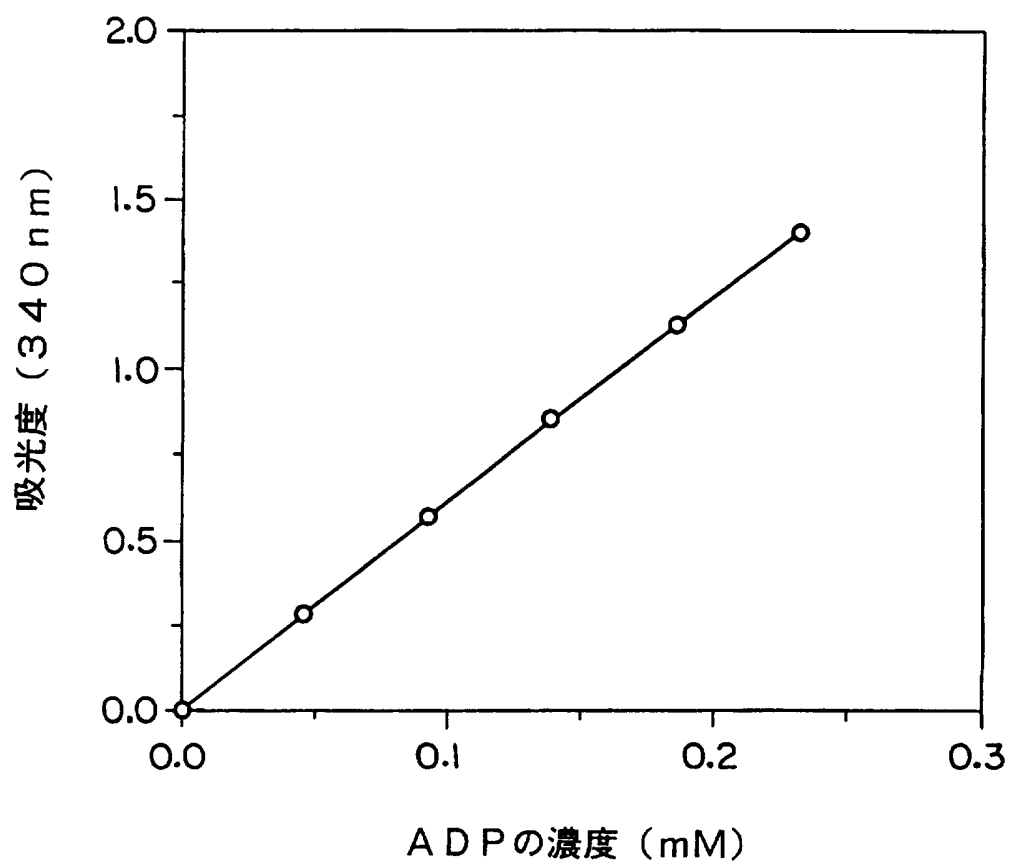
19. ADP依存性ヘキソキナーゼが、高度好熱性ADP依存性ヘキソキナーゼである請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

20. 温度条件が20~40℃である請求の範囲第6項に記載の測定する方法。

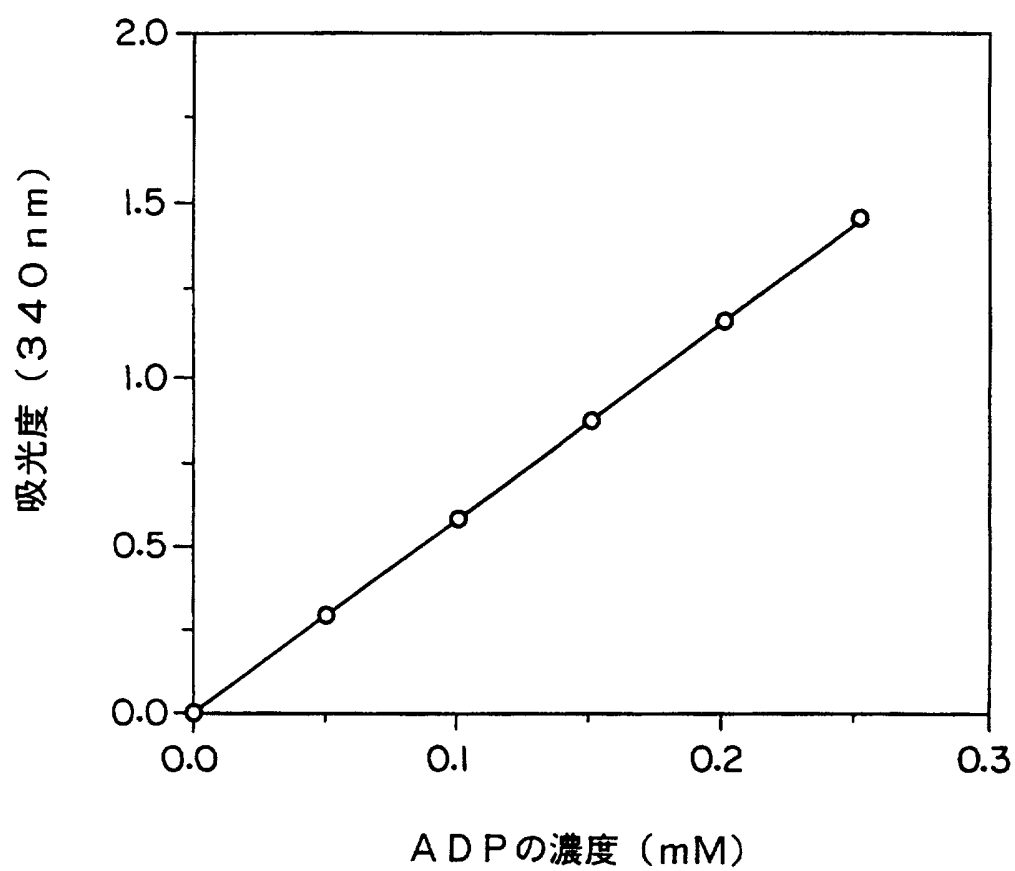
第 1 図



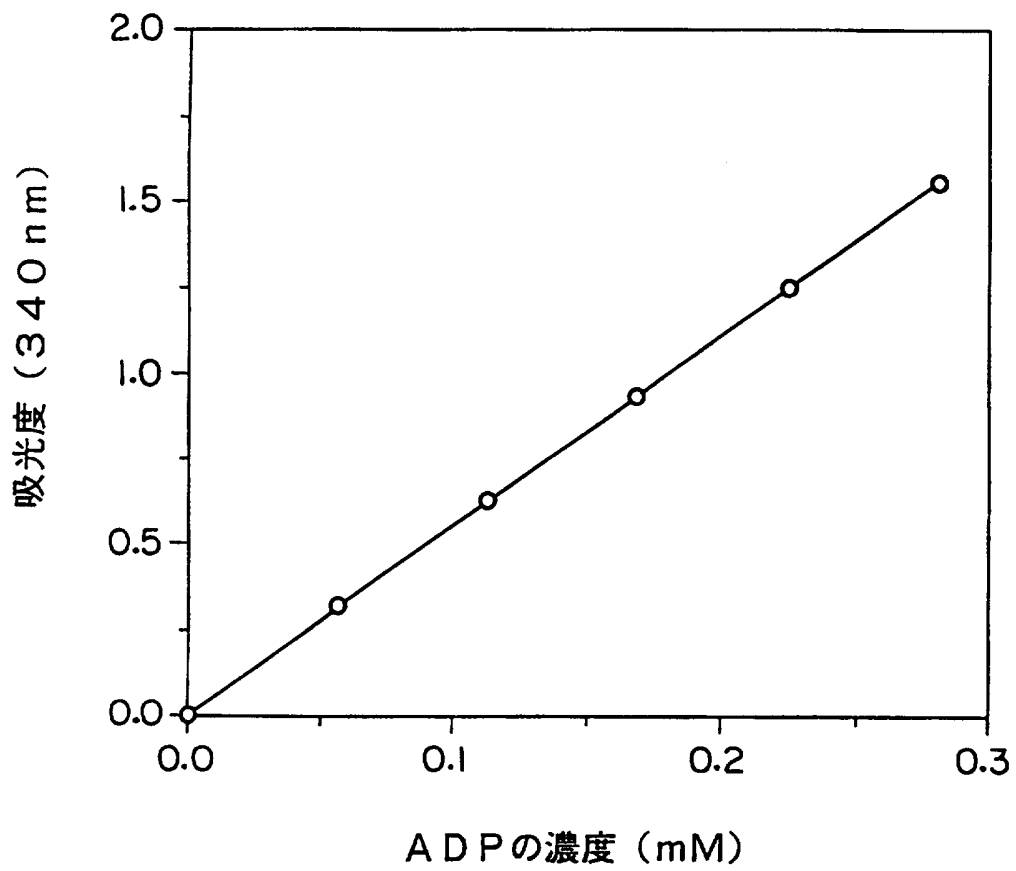
第 2 図



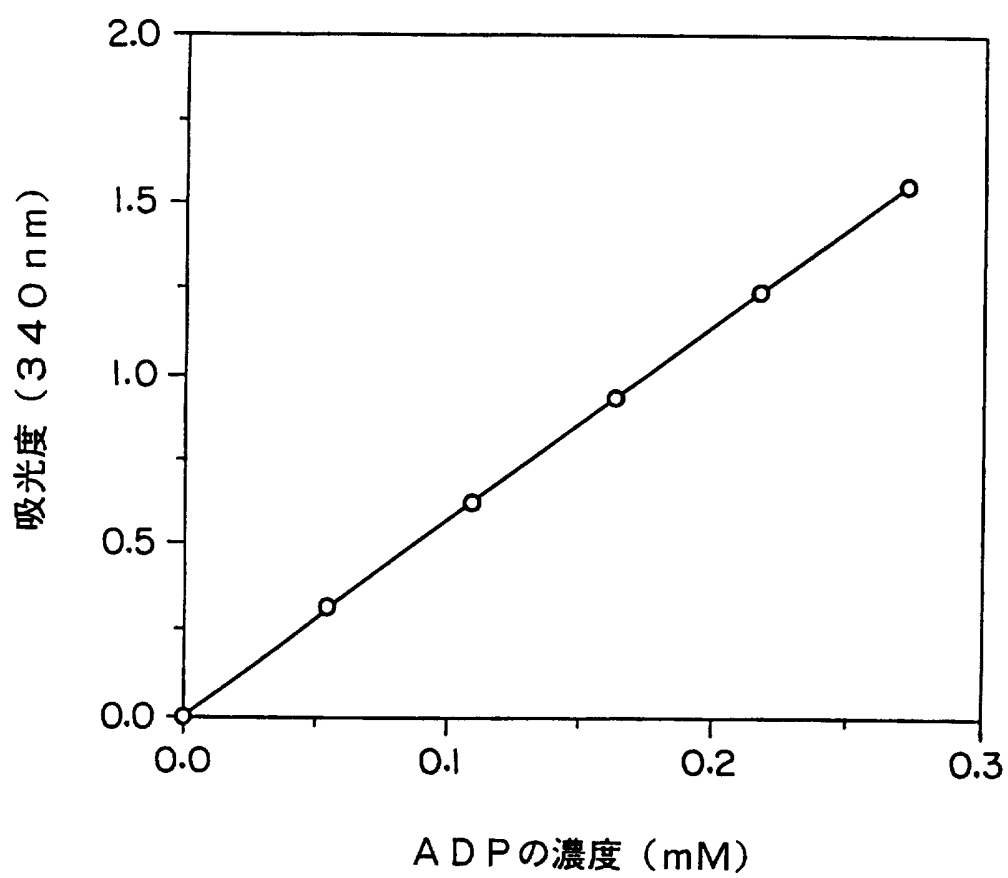
第 3 図



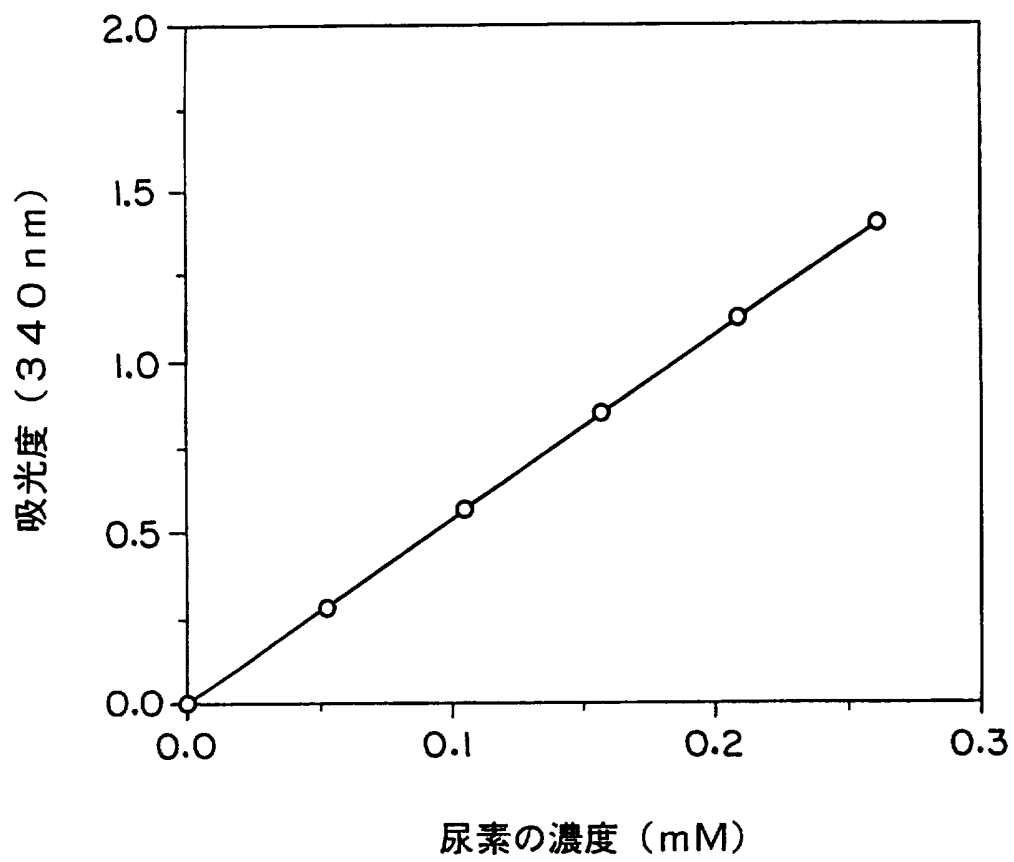
第 4 図



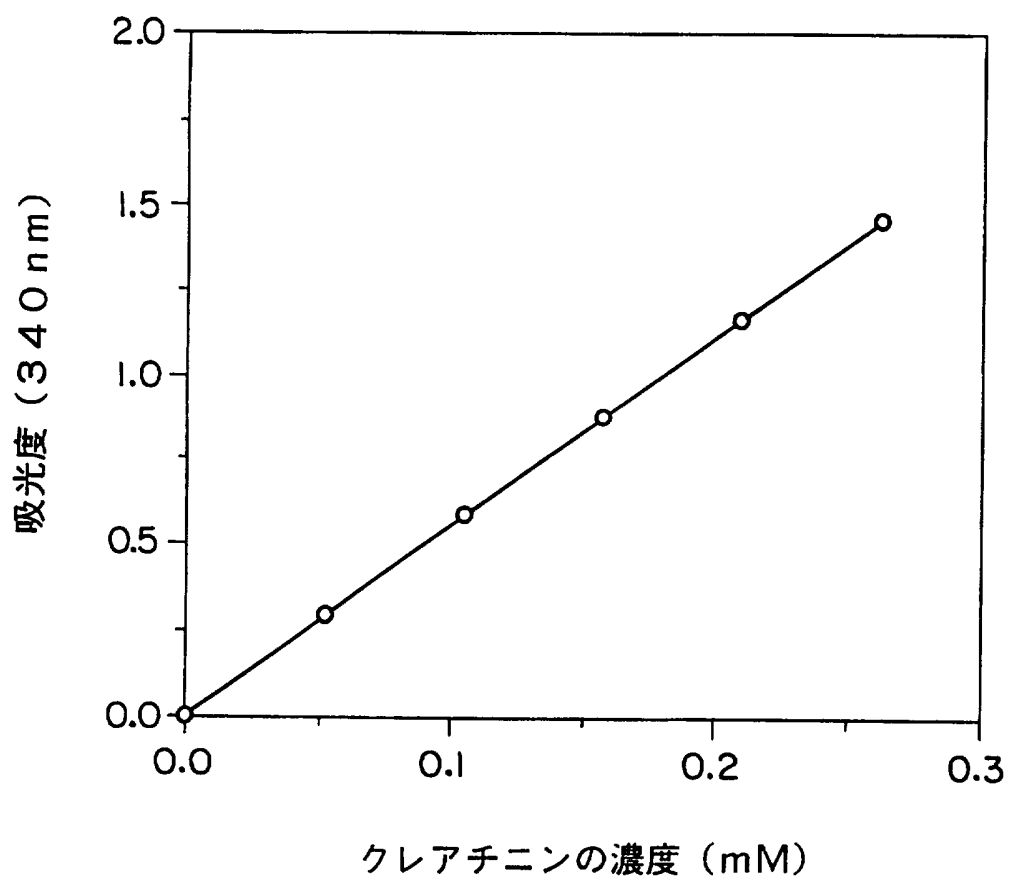
第 5 図



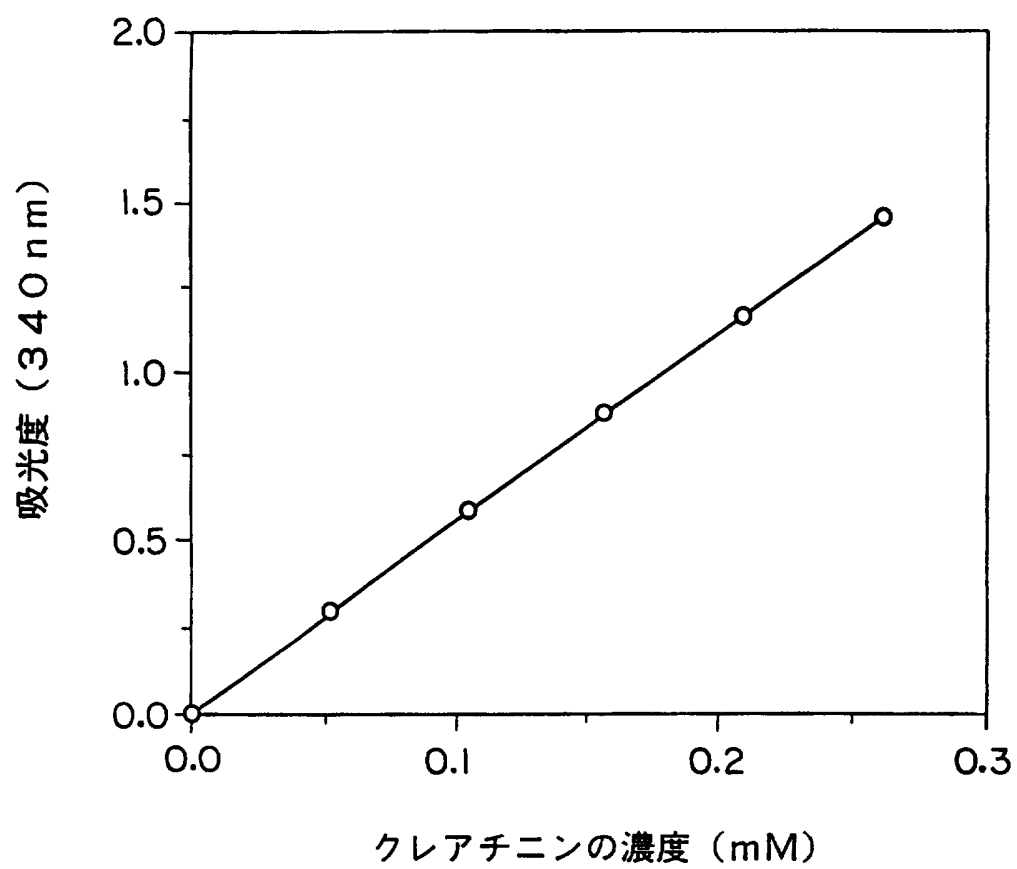
第 6 図



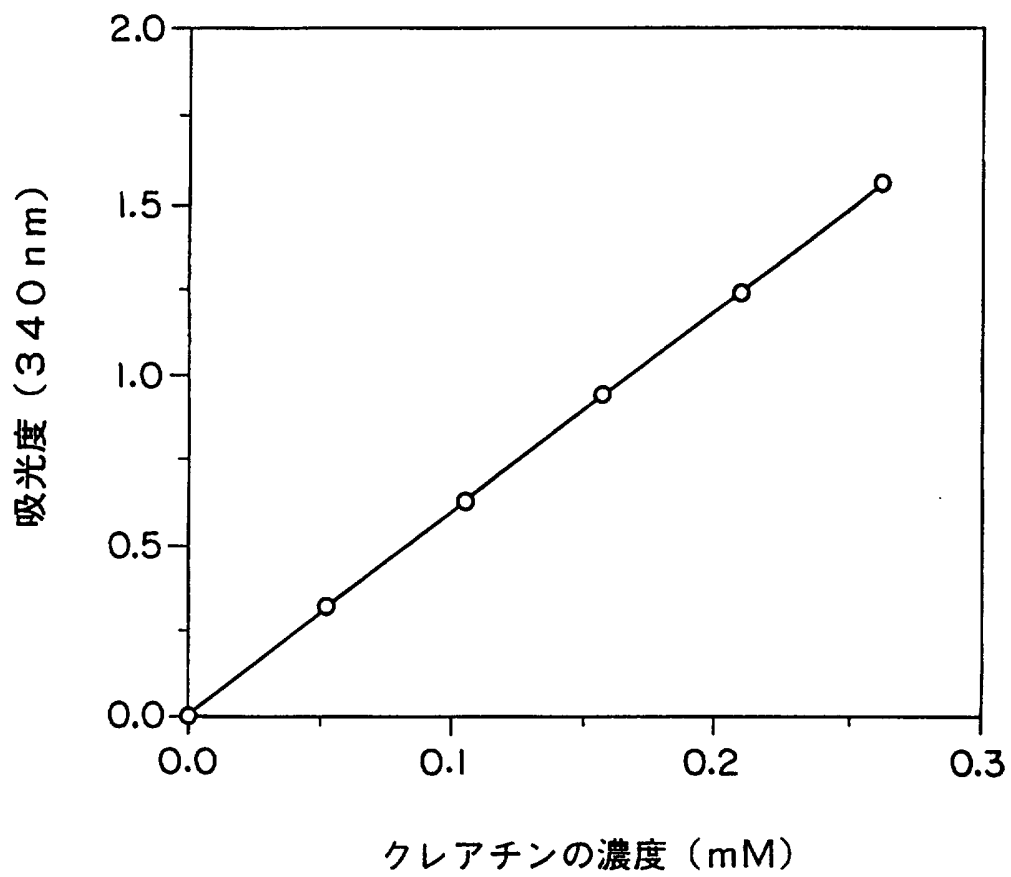
第 7 図



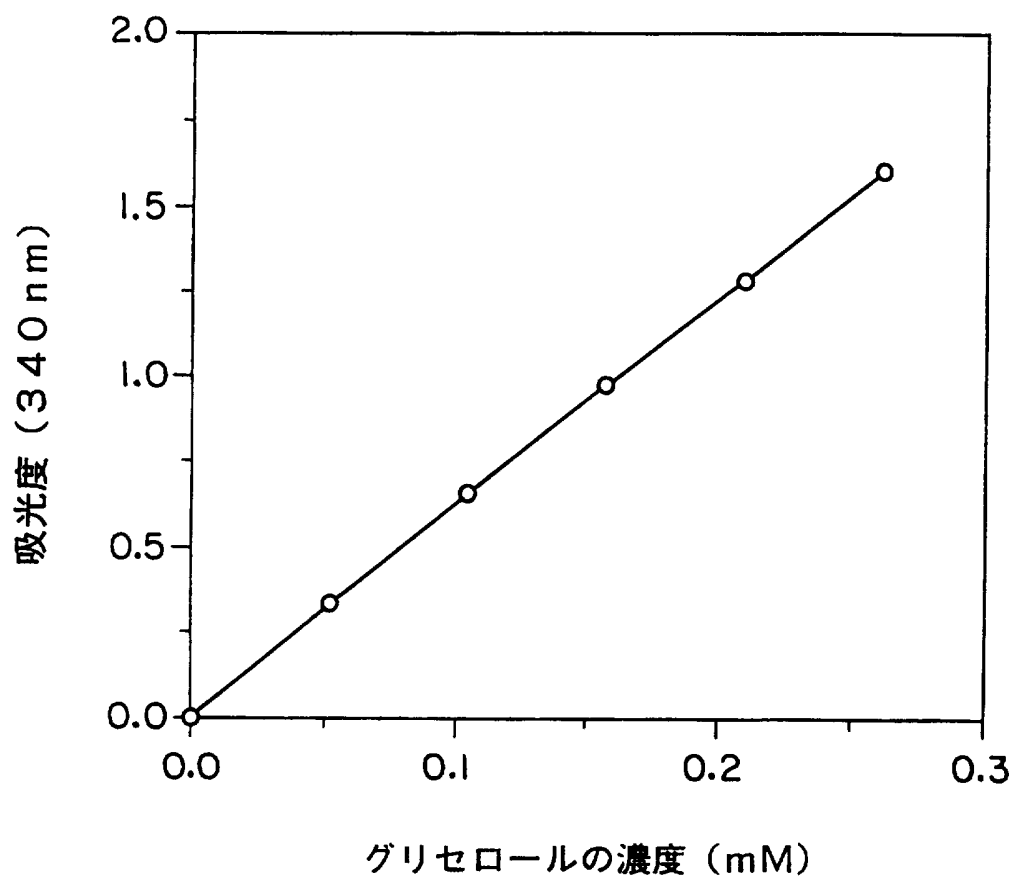
第 8 図



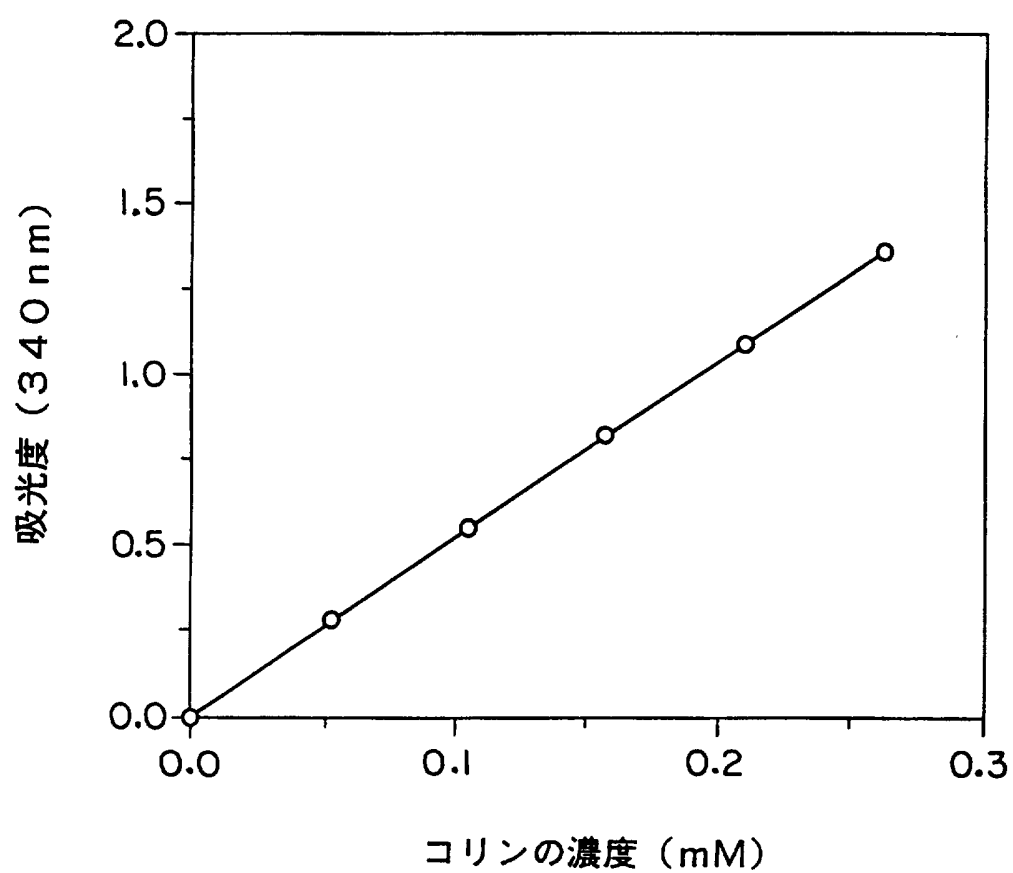
第 9 図



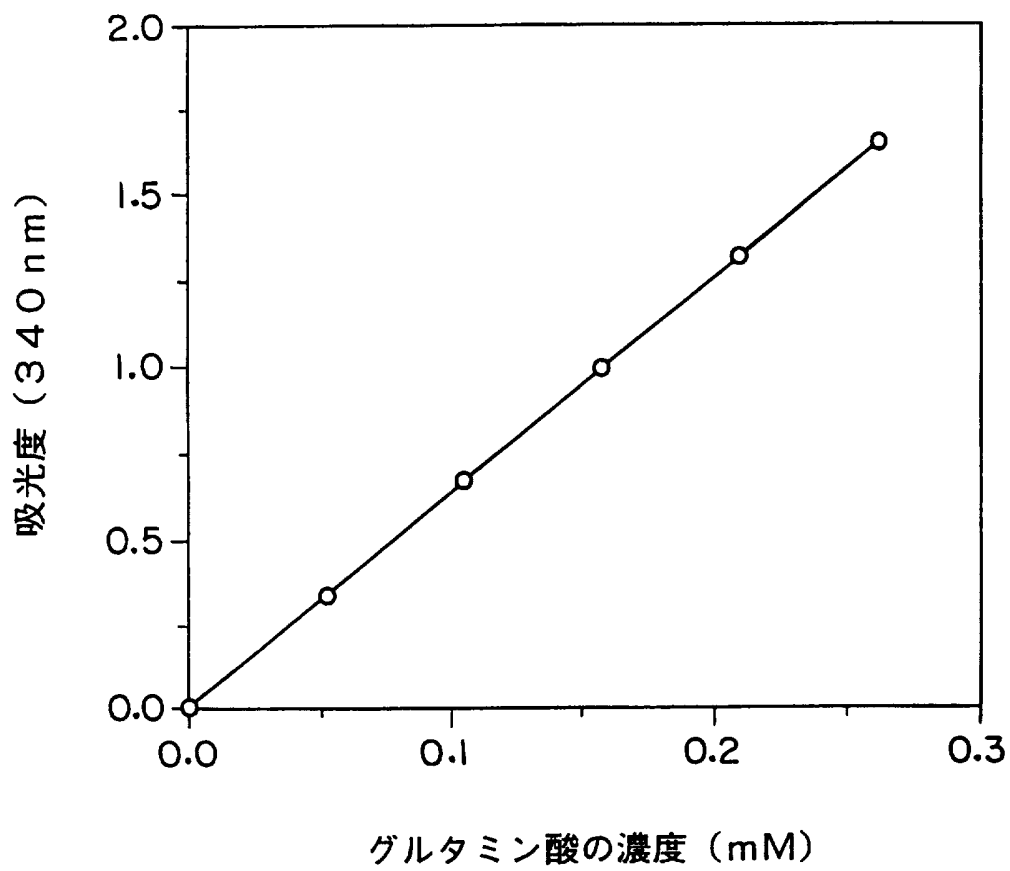
第10図



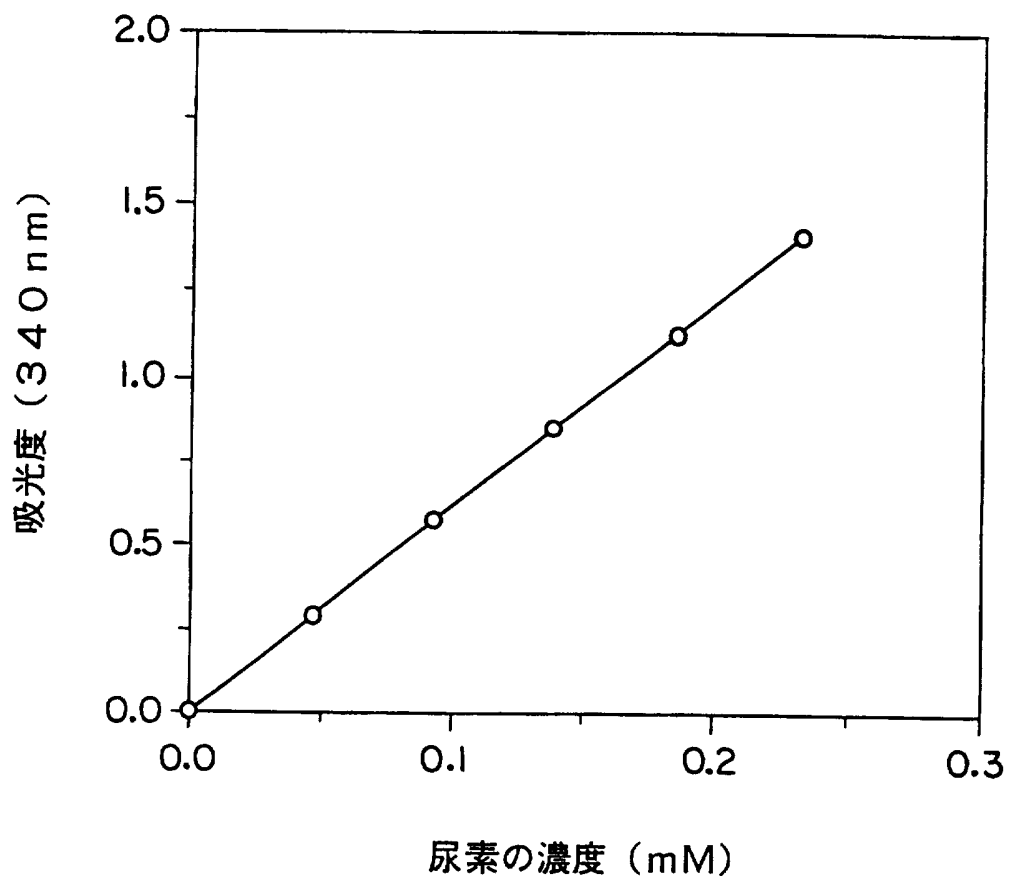
第 11 図



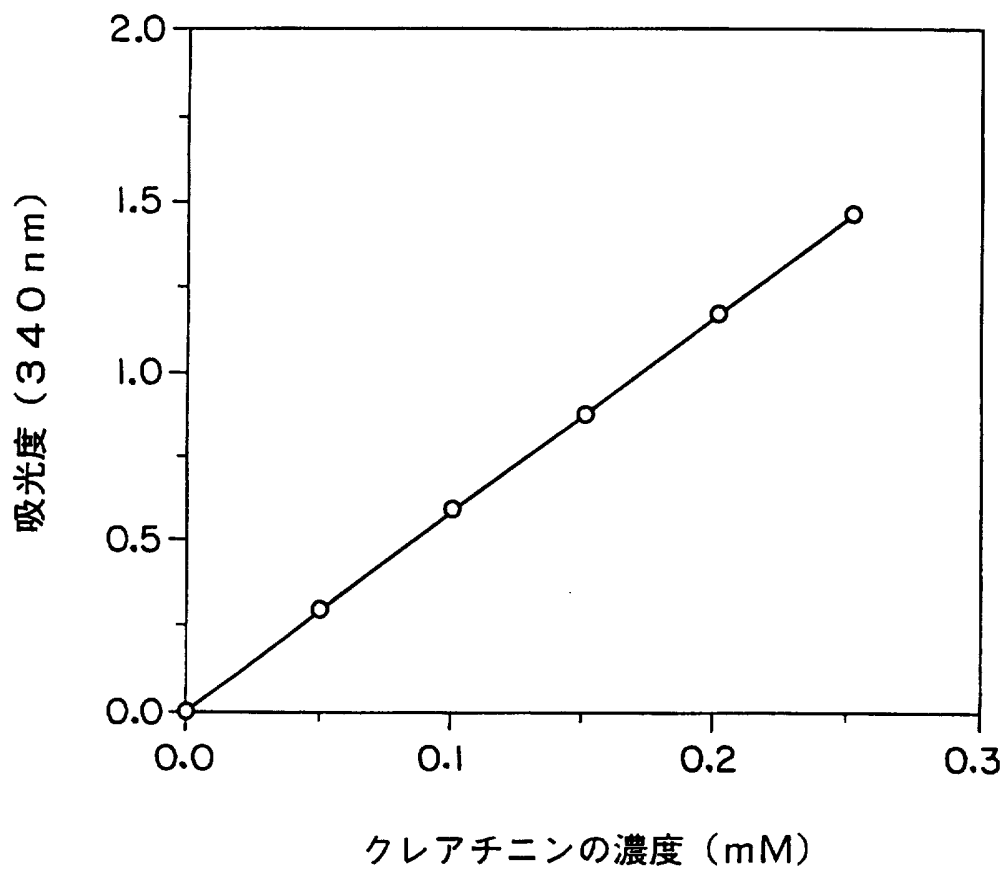
第 12 図



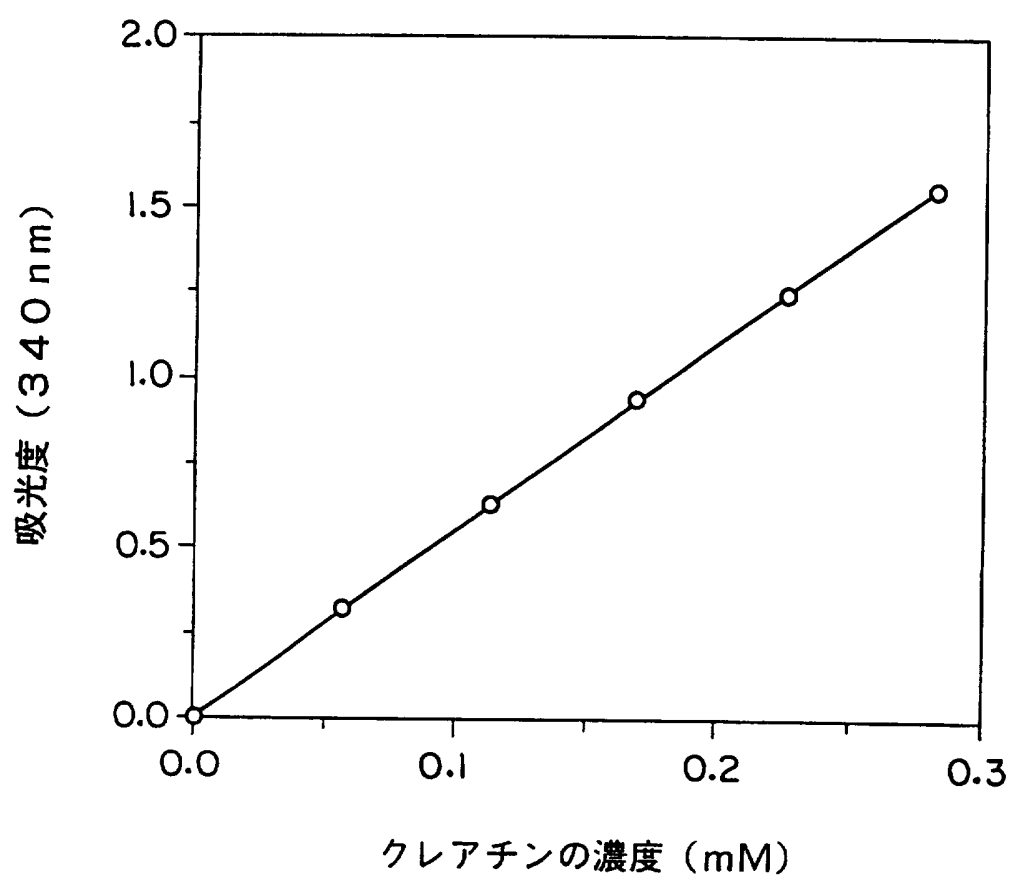
第 13 図



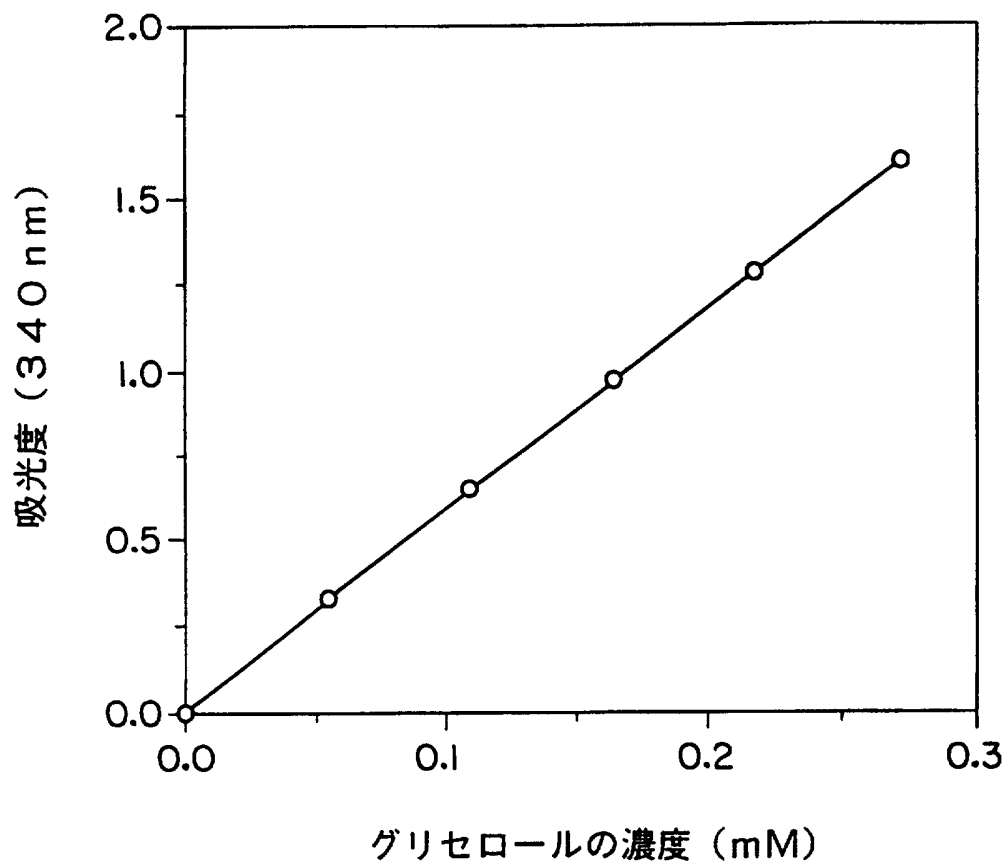
第14図



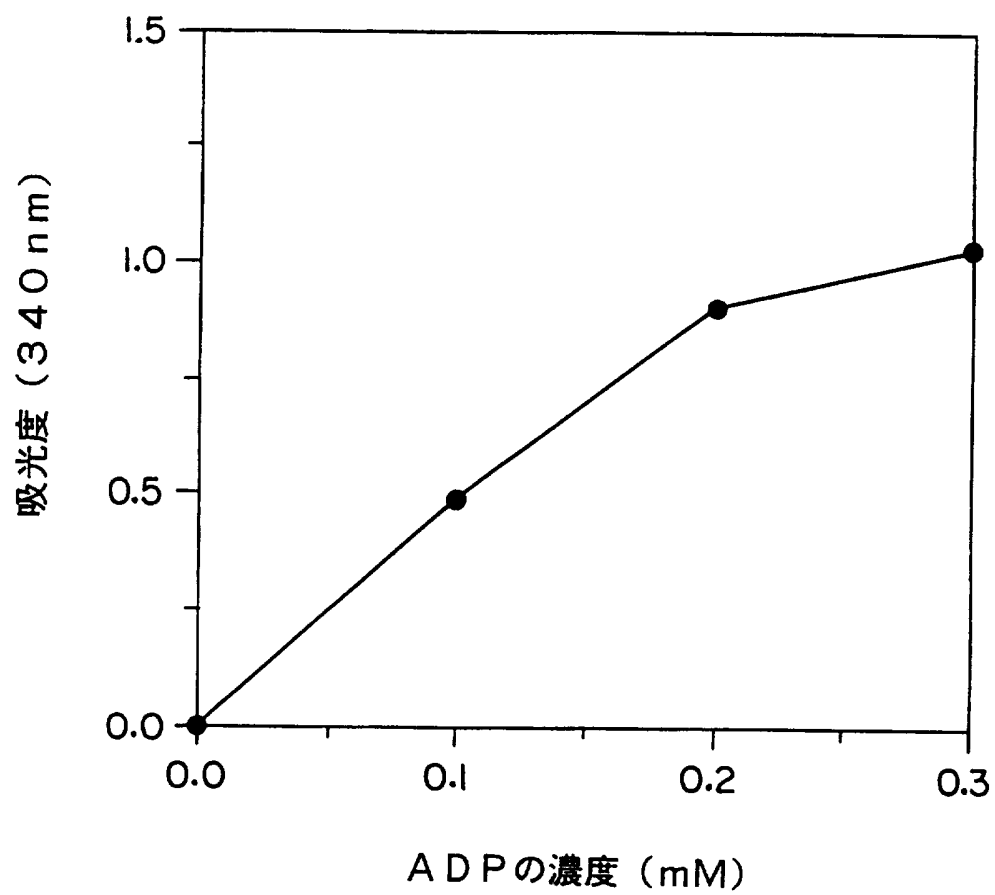
第 15 図



第 16 図



第17図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/54, C12N9/12

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)

BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, No. 51, (1995), Kengen S.W.M. et al. "Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus" p. 30453-30457	1 - 20
A	US, A, 4247633 (Case et al.), January 27, 1981 (27. 01. 81) (Family: none)	1 - 20

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* 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

Date of the actual completion of the international search

February 27, 1997 (27. 02. 97)

Date of mailing of the international search report

March 11, 1997 (11. 03. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ⁸ C12Q1/54	
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 ⁸ C12Q1/54, C12N9/12	
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、調査に使用了用語)	
BIOSIS PREVIEWS	
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
A	Journal of Biological Chemistry, 第270巻, 第51号, (1995), Kengen S. W. M. et al 「Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus」 p. 30453-30457
A	US, A, 4247633 (Case et al) 27, 1月, 1981 (27. 01. 81) (ファミリーなし)
	関連する 請求の範囲の番号
	1-20
	1-20
<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、一般的技术水準を示すもの 「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 「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	国際調査報告の発送日
27. 02. 97	11.03.97
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)
日本国特許庁 (ISA/JP)	平田 和男
郵便番号100	印
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	4B 7823
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448