

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年10月12日 (12.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/107093 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/46 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/307272
- (22) 国際出願日: 2006年3月30日 (30.03.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-105506 2005年3月31日 (31.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
鹿児島TLO (KABUSHIKIKAISHA KAGOSHIMA
TLO) [JP/JP]; 〒8900065 鹿児島県鹿児島市郡元1丁
目21番40号 鹿児島大学地域共同研究センター
1階 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 内木場 哲也
(UCHIKOBA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒8910201 鹿児島県鹿
児島市喜入瀬々串町4253-2 Kagoshima (JP). 米澤
弘夫 (YONEZAWA, Hiroo) [JP/JP]; 〒8900083 鹿児島
県鹿児島市西紫原町13-3 Kagoshima (JP). 有馬一
成 (ARIMA, Kazunari) [JP/JP]; 〒8900024 鹿児島県鹿
児島市明和4丁目14番9号-33 Kagoshima (JP).
金田 信 (KANEDA, Makoto) [JP/JP]; 〒8995651 鹿児
- 島県始良郡始良町脇元956-1-301 Kagoshima
(JP).
- (74) 代理人: 田中 正治 (TANAKA, Masaharu); 〒1000014
東京都千代田区永田町2丁目4番7号 秀和永田町
レジデンス502号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FIBRINOLYTIC AGENT, METHOD OF PRODUCING THE SAME AND METHOD OF USING CUCURBITACEOUS FRUIT

(54) 発明の名称: 線維素溶解剤及びその製法並びにウリ科植物の果実の用法

(57) Abstract: A fibrinolytic agent, which is highly useful as a remedy for thrombosis and can be easily and economically provided, comprising a protease being purified from a cucurbitaceous fruit and having a fibrinolytic activity, or comprising a fruit juice being prepared from a cucurbitaceous fruit and containing a protease having a fibrinolytic activity. A method of using a cucurbitaceous fruit, which enables the treatment of thrombosis over a wide range, comprising using the cucurbitaceous fruit per se or its fruit juice as a fibrinolytic agent.

(57) 要約: 血栓治療薬として高い有用性を有し、容易、廉価に提供することができる線維素溶解剤であって、ウリ科植物の果実から精製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤である、またはウリ科植物から調製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁である、というものである。また、広く血栓治療を行うことができるウリ科植物の果実の用法であって、ウリ科植物の果実自体乃至その果汁自体を、線維素溶解剤として用いる、というものである。



WO 2006/107093 A1

明 細 書

線維素溶解剤及びその製法並びにウリ科植物の果実の用法

技術分野

- 5 本発明は、脳血栓などの血栓の成分であるフィブリン (fibrin) で形成されている線維素を溶解する、血栓治療薬として用いることができる線維素溶解剤、及びその製法、並びにウリ科植物の果実の用法に関する。

背景技術

- 10 従来、特開昭61-162184号公報に、人に広く食されている納豆に、プロテアーゼ (protease) であるナットウキナーゼが含まれ、そのナットウキナーゼが、脳血栓などの血栓の成分であるフィブリンで形成されている線維素 (以下、簡単のため、単に線維素と称す) を溶解する活性 (以下、簡単のため線維素溶解活性と称す) を有することの知見から、納豆を水溶液中でホモジナイズし、その上清液を濃縮し、その濃縮液を透析する、
- 15 という工程を経て、納豆から線維素溶解活性を有するナットウキナーゼを含有している剤を精製し、その精製された線維素溶解活性を有するナットウキナーゼを含有している剤を線維素溶解剤とすることが提案されている。従って、従来、納豆から精製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼであるナットウキナーゼを含有している剤でなる線維素溶解剤 (以下、簡単のため、納豆由来の線維素溶解剤と称す) が提案されている。
- 20 従来提案されている納豆由来の線維素溶解剤によれば、それが、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤であり、また、その納豆由来の線維素溶解剤が、字句通り、人に広く食されている納豆由来の線維素溶解剤であることから、その納豆由来の線維素溶解剤を人体内に経口投与してもその人体にほとんど悪影響を及ぼさないものとして得ることができる、ということから、血栓治療薬として高い有用性を有する。

発明の開示

従来提案されている納豆由来の線維素溶解剤の場合、上述したところから明らかなように、納豆から、線維素溶解剤としての、線維素溶解活性を有するプロテアーゼであるナットウキナーゼを含有している剤を精製するのに、工程が少なくて済むといえるものでない
5 とともに、その工程に困難を伴わないとはいえるものでもなく、また、納豆には、プロテアーゼであるナットウキナーゼがごく微量でしか含まれていないことから、線維素溶解活性を有するプロテアーゼであるナットウキナーゼを含有している剤を、納豆からきわめて低い収率でしか精製できず、さらに、納豆自体、それを廉価に入手し得るというものでもない
10 という欠点を有していた。

よって、本発明は、上述した欠点を伴わない、新規な線維素溶解剤、及びその製法、並びにウリ科植物の果実の用法を提案せんとするものである。

本発明者等は、上述した欠点のない線維素溶解剤を提供すべく種々の実験を重ねたところ、ウリ科植物の果実自体に、線維素溶解活性を有するプロテアーゼが、納豆の場合と同
15 様に、しかしながら納豆の場合と同じ量で納豆の場合に比し格段的に多量に、含まれていること、従って、ウリ科植物の果実自体、またはウリ科植物の果実からその果汁を調製して得たそのウリ科植物の果汁自体を、線維素溶解剤とすることもでき、そこに、困難を伴う
20 というものでもなく、また、ウリ科植物の果実から、それに含まれている線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を、線維素溶解剤として、納豆の場合に比し格段的に高い収率で精製することができ、そこに、納豆からそれに含まれているプロテアーゼを含有している剤を精製する場合に比し多くのまたは大きな困難を伴うものである
25 といえないこと、さらに、ウリ科植物の果実自体、それが納豆の原料である豆に相当していることから、それを、納豆の場合に比し廉価に入手することができることを確認するに到った。

本願第1番目の発明による線維素溶解剤は、上述した確認に基づき提案されたもので、

ウリ科植物の果実から精製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤でなる、というものである。

本願第1番目の発明による線維素溶解剤によれば、それが、納豆由来の線維素溶解剤の場合と同様の線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤でなり、また、その
5 線維素溶解剤が、ウリ科植物由来の線維素溶解剤であることから、納豆由来の線維素溶解剤の場合と同様に、その線維素溶解剤を人体内に経口投与してもその人体にほとんど悪影響を及ぼさないものとして得ることができることから、納豆由来の線維素溶解剤の場合と同様に、血栓治療薬として高い有用性を有する。

しかしながら、本願第1番目の発明による線維素溶解剤の場合、その線維素溶解剤として
10 ての線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤をウリ科植物の果実から精製するのは、納豆由来の線維素溶解剤としての線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を納豆から精製する場合に比し困難であるとはいえず、また、ウリ科植物の果実から線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を、納豆から線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を精製する場合に比し格段的に高い収率で精製
15 することができ、さらに、ウリ科植物の果実自体、それが納豆の原料である豆に相当していることから、それを、納豆の場合に比し廉価に入手することができるので、線維素溶解剤を、納豆由来の線維素溶解剤の場合に比し、容易、廉価に提供することができる。

本願第2番目の発明による線維素溶解剤の製法も、上述した確認に基づき提案されたもので、ウリ科植物の果実から、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を、
20 線維素溶解剤として精製する、というものである。

この場合、果実からの精製は、果実から、その果汁を得、その果実についてクロマトグラフィを行い、それによってプロテアーゼを溶解している溶液を溶出させ、その溶液を透析し、凍結乾燥して目的とする剤を得る、というものとするのを可とする。

本願第2番目の発明による線維素溶解剤の製法によれば、上述した特徴を有する本願第
25 1番目の発明による線維素溶解剤を、容易に製造することができる。

本願第3番目の発明による線維素溶解剤も、上述した確認に基づき提案されたもので、ウリ科植物の果実から調製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁でなる、というものである。

5 本願第3番目の発明による線維素溶解剤によれば、それが、ウリ科植物の果実から調製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁でなることから、本願第1番目の発明による線維素溶解剤の場合と同様に、その線維素溶解剤を人体内に経口投与してもその人体にほとんど悪影響を及ぼさないものとして得ることができ、よって、本願第1番目の発明による線維素溶解剤の場合と同様に、血栓治療薬として高い有用性を有する。

10 また、本願第3番目の発明による線維素溶解剤の場合、ウリ科植物の果実から線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁を調製するのは、きわめて容易であり、また、ウリ科植物の果実から線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁を高い収率で調製することができることは明らかであり、さらに、ウリ科植物の果実自体、本願第1番目の発明による線維素溶解剤の場合で述べたように、廉価に入手することができるので、線維素溶解剤を、本願第1番目の発明による線維素溶解剤の場合と同様に、容易、廉価に提供することができる。

本願第4番目の発明による線維素溶解剤の製法も、上述した確認に基づき提案されたもので、ウリ科植物の果実から、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁を、線維素溶解剤として調製する、というものである。

20 この場合、果実からの調製は、果実について、冷凍を行って後、解凍し、細胞の破壊された果実を得、その細胞の破壊された果実を圧搾して果汁を得る、というものとするのを可とする。

本願第4番目の発明による線維素溶解剤の製法によれば、上述した特徴を有する本願第3番目の発明による線維素溶解剤を、容易に製造することができる。

25 本願第5番目の発明によるウリ科植物の果実の用法も、上述した確認に基づき提案され

たもので、ウリ科植物の果実自体またはその果汁自体を、線維素溶解剤として用いる、というものである。

本願第5番目の発明によるウリ科植物の果実の用法によれば、それによって、人体にほとんど悪影響を及ぼすことなしに、血栓治療を容易に行うことができ、そこに、ウリ科植物の果実から線維素溶解剤を精製したりする必要がない。

ここで、上述した本願第1～第5番目の発明に用いるウリ科植物の果実としては、それを、プリンスメロン、マスクメロン、ハニデュメロン、アンデスメロン、リュウキュウトウガン、トウガンなどの食用ウリ、または、カラスウリ、オオカラスウリ、キカラスウリなどの野生ウリとし得る。

10

発明を実施するための最良の形態

本発明による線維素溶解剤及びその製法並びにウリ科植物の果実の用法は、ウリ科植物の果実を用いて構成されている。

15 実施例1

次に、本発明による線維素溶解剤の第1の実施例を、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例とともに述べよう。

本発明による線維素溶解剤の第1の実施例は、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例によって製造された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤である、というものである。

このことから、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例を述べれば、次のとおりである。

すなわち、

(1)まず、ウリ科植物をプリンスメロンとし、そのウリ科植物としてのプリンスメロンの果実の1.5Kgについて、蒸留水で洗浄してから、 -20°C の温度で冷凍し、次いで 4°C の

25

温度で解凍し、それによって、細胞の破碎されたプリンスメロンの果実を得、その細胞の破碎されたプリンスメロンの果実を、綿布製袋に入れて圧搾し、それによって、清澄なプリンスメロンの果実の果汁を得、

(2)次で、その清澄なプリンスメロンの果実の果汁について、pH5.0 の 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (50mM の酢酸水溶液と 50mM の水酸化ナトリウム水溶液との混液でなる) で平衡化した DEAE(ジエチルアミノエチル)-セルロースカラム (陰イオン交換樹脂カラムの一種) を用いたクロマトグラフィーを行い、それにより、その DEAE-セルロースカラムから、それを通過した溶液を得、次いで、その DEAE-セルロースカラムを通過した溶液について、pH5.0 の 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液で平衡化した CM(カルボキシルメチル)-セファロースカラム (陽イオン交換樹脂カラムの一種) を用いたクロマトグラフィーを行い、それにより、その CM-セファロースカラムに、プリンスメロンの果実の果汁の成分を吸着させ、

(3)次で、そのプリンスメロンの果実の果汁の成分を吸着させている CM-セファロースカラムに、pH5.0 の 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液を、それに、0.3M 塩化ナトリウム水溶液によって当該 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液中の塩化ナトリウム濃度が時間とともに直線的に高くなるリニアグラジエントを施して、流し、それによって、その CM-セファロースカラムから、プロテアーゼを溶解している溶液を溶出させ、

(4)次で、その CM-セファロースカラムから溶出されたプロテアーゼを溶解している溶液について透析を行い、それによって、透析されたプロテアーゼを溶解している溶液を得、

(5)次いで、その透析されたプロテアーゼを溶解している溶液に、凍結乾燥処理を施し、それによって得られた凍結乾燥処理の施された剤を、目的とする線維素溶解活性を有するプロテアーゼでなる剤として得た。

以上のようにして、プリンスメロンの果実の 1.5kg から、41%の収率で、360mg の凍結乾燥処理の施された剤を、目的とする線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤として得た。

以上が、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例であるが、いま、その本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例によって線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤として得た凍結乾燥処理の施された剤が、線維素溶解活性を有することについて述べれば、次のとおりである。

- 5 (1)線維素が、[背景技術] で述べているようにフィブリンで形成されていることから、フィブリノーゲン (fibrinogen) を用い、そのフィブリノーゲンの 100mg を、pH7.4 の 0.9% 塩化ナトリウムを含む 67mM リン酸ナトリウム-カリウム緩衝液の 10ml に溶かし、
- (2)次で、その溶液に対し、遠心分離 (5000×g、5 分間) を施し、それによって、フィブリノーゲンを溶解しているフィブリノーゲン溶解上清液を得、
- 10 (3)次で、そのフィブリノーゲン溶解上清液を、それに 0.5mg/ml メチルオレンジの 1ml とトロンビン (thrombin) の 2.2mg とを加えて攪拌後、24 穴マイクロプレート (溶液を保持する穴の 24 個を設けている透光性板) の穴に、1 穴あたり 100 μ l の量で、注入し、
- (4)次で、その 24 穴マイクロプレートを、室温の温度に、1 時間保ち、それによって、その 24 穴マイクロプレートの穴内に、それに注入されたフィブリノーゲン溶解上清液に
- 15 よる、フィブリンのゲルを得、
- (5)次いで、その 24 穴マイクロプレートの穴内のフィブリンのゲル内に、上述した本発明による線維素溶解剤の製法の実施例によって得た凍結乾燥処理の施された剤の溶液を、24 穴マイクロプレートの 1 穴あたり 100 μ l の量で、注入し、
- (6)次いで、24 穴マイクロプレートを室温で 30 分間放置し、プロテアーゼでなる剤の溶
- 20 液中のプロテアーゼによってフィブリンのゲルを構成しているフィブリンを溶解をさせる状態にし、
- (7)次で、その状態で、24 穴マイクロプレートに対応のマイクロプレートリーダー (マイクロプレートの穴に保持されている溶液の吸光度を測定する装置) を用いて、24 穴マイクロプレートの穴内のプロテアーゼを含有している剤の溶液の注入されたフィブリンのゲ
- 25 ルの、波長 520nm の光の吸光度を、測定した。

しかるところ、波長 520nm の光の吸光度が、10 分間に 0.05 の割合で減少する測定結果が得られた。

以上のことから、上述した本発明による線維素溶解剤の製法の第 1 の実施例によって線維素溶解活性を有するプロテアーゼとして得た凍結乾燥処理の施された剤が、線維素溶解
5 活性を有することを確認した。

なお、上述した本発明による線維素溶解剤の製法の第 1 の実施例によって線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤として得た凍結乾燥処理の施された剤について、
SDS-ポリアクリルアミドゲル (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel) の溶液を用いた電気泳動上のバンドを観測したところ、その電気泳動上のバンドが単一で得られた
10 ことから、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤として得た凍結乾燥処理の施された剤が、高い純度を有することを確認した。

以上で、本発明による線維素溶解剤の第 1 の実施例、及びそれを製造する本発明による線維素溶解剤の製法の第 1 の実施例の具体例が明らかになった。

本発明による線維素溶解剤の第 1 の実施例は、本発明による線維素溶解剤の製法の第 1
15 の実施例によって製造された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを有する剤でなるというものであるが、ウリ科植物としてのプリンスメロンの果実から精製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを有する剤でなる、というものである。

このような本発明による線維素溶解剤の第 1 の実施例によれば、それが、納豆由来の線維素溶解剤の場合と同様の線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤であり、
20 また、その線維素溶解剤が、プリンスメロン由来の線維素溶解剤であることから、納豆由来の線維素溶解剤の場合と同様に、その線維素溶解剤を人体内に経口投与してもその人体にほとんど悪影響を及ぼさないものとして得ることができることから、納豆由来の線維素溶解剤の場合と同様に、血栓治療薬として高い有用性を有する。

しかしながら、本発明による線維素溶解剤の第 1 の実施例の場合、その線維素溶解剤と
25 しての線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤をウリ科植物であるプリン

スメロンの果実から精製するのは、本発明による線維素溶解剤の第1の実施例を製造する、上述した本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例から明らかなように、納豆由来の線維素溶解剤としての線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を納豆から精製する場合に比し困難であるとはいえず、また、ウリ科植物であるプリンスメロンの果実から線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を、納豆から線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を精製する場合に比し格段的に高い収率で精製することができ、さらに、ウリ科植物であるプリンスメロンの果実自体、それが納豆の原料である豆に相当していることから、それを、納豆の場合に比し廉価に入手することができるので、線維素溶解剤を、納豆由来の線維素溶解剤の場合に比し、容易、廉価に提供することができる。

また、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例は、上述したところであるが、ウリ科植物としてのプリンスメロンの果実から、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を、線維素溶解剤として精製する、というものである。

このような本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例によれば、上述した特徴を有する本発明による線維素溶解剤の第1の実施例を、容易に製造することができる。

実施例2

次に、本発明による線維素溶解剤の第2の実施例を、本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例とともに述べよう。

本発明による線維素溶解剤の第2の実施例は、本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例によって製造された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁でなる、というものである。

このことから、本発明による線維素溶解剤の第2の実施例を述べれば、次のとおりである。

すなわち、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例の場合と同様に、ウリ科植

物をプリンスメロンとし、そして、本発明による線維素溶解剤の製法の第1の実施例の第4段落中の(1)に記載していると同様に、プリンスメロンの果実の1.5Kgについて、蒸留水で洗浄してから、 -20°C の温度で冷凍し、次いで 4°C の温度で解凍し、それによって、細胞の破碎されたプリンスメロンを得、その細胞の破碎されたプリンスメロンを綿布製袋
5 に入れて圧搾し、それによって、清澄なプリンスメロンの果汁を得、その果汁を、目的とする線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁として得た。

以上が、本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例であるが、その本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例によって線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁として得たプリンスメロンの果実の果汁によれば、それが種々の試験の結果、
10 線維素溶解活性を有することを確認した。

以上で、本発明による線維素溶解剤の第2の実施例、及びそれを製造する本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例の具体例が明らかになった。

本発明による線維素溶解剤の第2の実施例は、本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例によって製造された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを有する果汁でなる
15 というものであるが、ウリ科植物としてのプリンスメロンの果実から調製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを有する果汁でなる、というものである。

このような本発明による線維素溶解剤の第2の実施例によれば、詳細説明は省略するが、本発明による線維素溶解剤の第1の実施例の場合に準じた優れた特徴を有することは明らかである。

20 また、本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例は、上述したところであるが、ウリ科植物としてのプリンスメロンの果実から、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁を、線維素溶解剤として調製する、というものである。

このような本発明による線維素溶解剤の製法の第2の実施例によれば、本発明による線維素溶解剤の第1の実施例に準じた優れた特徴を有する本発明による線維素溶解剤の第2
25 の実施例を、容易に製造することができる。

実施例 3

次に、本発明によるウリ科植物の果実の用法の実施例を述べよう。

- 本発明によるウリ科植物の果実の用法の実施例は、ウリ科植物をプリンスメロンとし、
- 5 そのウリ科植物としてのプリンスメロンの果実自体乃至その果汁自体を、線維素溶解剤として用いる、というものである。

このような本発明によるウリ科植物の果実の用法の実施例によれば、それによって、人体にほとんど悪影響を及ぼすことなしに、血栓治療を容易に行うことができ、そこにウリ科植物としてのプリンスメロンの果実から線維素溶解剤の精製をしたりする必要がない。

- 10 上述した実施例においては、ウリ科植物を食用ウリであるプリンスメロンとした場合の実施例を述べたものであるが、ウリ科植物を、プリンスメロン以外のマスクメロン、ハニデュメロン、アンデスメロン、リュウキュウトウガン、またはトウガンでなる食用ウリ、または、カラスウリ、オオカラスウリ、またはキカラスウリでなる野生ウリとすることもでき、その他、本発明の精神を脱することなしに種々の変型、変更をなし得るであろう。

15

産業上の利用可能性

本発明による線維素溶解剤、及びその製法は、血栓治療に用い得る線維素溶解剤、及びその製法として広く使用することができ、また、本発明によるウリ科植物の果実の用法は、血栓治療を広く行うことができる。

20

請 求 の 範 囲

1. ウリ科植物の果実から精製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤であることを特徴とする線維素溶解剤。
2. ウリ科植物の果実から、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している剤を、線維素溶解剤として精製することを特徴とする線維素溶解剤の製法。
3. ウリ科植物の果実から調製された、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁であることを特徴とする線維素溶解剤。
4. ウリ科植物の果実から、線維素溶解活性を有するプロテアーゼを含有している果汁を、線維素溶解剤として調製することを特徴とする線維素溶解剤の製法。
5. ウリ科植物の果実自体乃至その果汁自体を、線維素溶解剤として用いることを特徴とするウリ科植物の果実の用法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/46(2006.01), **A61K36/00**(2006.01), **A61P7/02**(2006.01)

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)

A61K38/46, A61K36/00, A61P7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mitsugu FUJITA et al., Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.197, No.3, 1993, pages 1340 to 1347	1-4
Y	Hiroshi YAMAGATA et al., Cucumisin, a Serine Protease from Melon Fruits, Shares Structural Homology with Subtilisin and Is Generated from a Large Precursor, The Journal of Biological Chemistry, Vol.269, No.52, 1994, pages 32726 to 32781	1-4

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 20 April, 2006 (20.04.06)	Date of mailing of the international search report 02 May, 2006 (02.05.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307272

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Makoto KANEDA et al., Amino Acid Sequence around the Reactive Serine of Cucumisin from Melon Fruit, J.Biochem., Vol.95, 1984, pages 825 to 829	1-4
Y	Hiroshi YAMAGATA et al., TGTCACA Motif Is a Novel cis-Regulatory Enhancer Element Involved in Fruit-specific Expression of the cucumisin Gene, The Journal of Biological Chemistry, Vol.277, No.13, 2002, pages 11582 to 11590	1-4
A	JP 6-284890 A (Ajinomoto Co., Inc.), 11 October, 1994 (11.10.94), Full text (Family: none)	1-4
A	JP 2-79973 A (Seitetsu Kagaku Kogyo Co., Ltd.), 20 March, 1990 (20.03.90), Full text (Family: none)	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307272

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 5 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. **A61K38/46**(2006.01), **A61K36/00**(2006.01), **A61P7/02**(2006.01)

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. A61K38/46, A61K36/00, A61P7/02

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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2006年
 日本国実用新案登録公報 1996-2006年
 日本国登録実用新案公報 1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2)

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
Y	Mitsugu FUJITA et al., Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.197, No.3, 1993, p.1340-1347	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。 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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 20.04.2006	国際調査報告の発送日 02.05.2006
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 八原 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3451	4C	9261
---	---	----	------

C (続き) . 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
Y	Hiroshi Yamagata et al., Cucumisin, a Serine Protease from Melon Fruits, Shares Structural Homology with Subtilisin and Is Generated from a Large Precursor, The Journal of Biological Chemistry, Vol.269, No.52, 1994, p.32726-32781	1-4
Y	Makoto KANEDA et al., Amino Acid Sequence around the Reactive Serine of Cucumisin from Melon Fruit, J. Biochem., Vol.95, 1984, p.825-829	1-4
Y	Hiroshi Yamagata et al., TGTCACA Motif Is a Novel cis-Regulatory Enhancer Element Involved in Fruit-specific Expression of the cucumisin Gene, The Journal of Biological Chemistry, Vol.277, No.13, 2002, p.11582-11590	1-4
A	J P 6-284890 A (味の素株式会社) 1994.10.11, 全文 (ファミリーなし)	1-4
A	J P 2-79973 A (製鉄化学工業株式会社) 1990.03.20, 全文 (ファミリーなし)	1-4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ 5 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲5は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。