

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02008/149542**

発行日 平成22年8月19日 (2010.8.19)

(43) 国際公開日 **平成20年12月11日 (2008.12.11)**

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 9/00 (2006.01)</b>	C 1 2 P 9/00	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

出願番号	特願2009-517720 (P2009-517720)	(71) 出願人	504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/001394		
(22) 国際出願日	平成20年6月3日 (2008.6.3)	(71) 出願人	503259406 株式会社ロム 北海道札幌市北区新川794-7
(31) 優先権主張番号	特願2007-148398 (P2007-148398)	(74) 代理人	100110766 弁理士 佐川 慎悟
(32) 優先日	平成19年6月4日 (2007.6.4)	(74) 代理人	100133260 弁理士 小林 基子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100145126 弁理士 金丸 清隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物発酵によるDHA含有リン脂質の製造方法

## (57) 【要約】

微生物を用いた、 3系不飽和脂肪酸特にDHAを構成脂質とするDHAリン脂質をより簡便に製造する方法を提供する。

本発明は、炭素源を含む培地で 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を増殖させる工程、及び増殖させた前記微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養する工程を含む、 3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の製造方法。本発明の方法によれば、 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を用いて、 3系不飽和脂肪酸を構成脂質とする高付加価値のリン脂質を大量に生産することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

炭素源を含む培地で 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を増殖させる工程、及び増殖させた前記微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養する工程を含む、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の製造方法。

**【請求項 2】**

3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物がラビリンチュラ類微生物又はトロウストチトリアレ類微生物である、請求項 1 に記載の製造方法

**【請求項 3】**

ラビリンチュラ類微生物がラビリンチュラ 1 2 B 株である、請求項 2 に記載の製造方法

10

**【請求項 4】**

ラビリンチュラ類微生物が、ラビリンチュラ属微生物、トラウストキトリウム属微生物、及びシゾキトリウム属微生物よりなる群から選ばれる、請求項 2 に記載の製造方法。

**【請求項 5】**

ラビリンチュラ類微生物がラビリンチュラ属 S 3 - 2 株又はシゾキトリウム属 S R 2 1 株である、請求項 4 に記載の製造方法。

**【請求項 6】**

3系不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の製造方法。

20

**【請求項 7】**

強制通気を行いながら炭素源を含まない培地での培養を行う、請求項 1 ~ 6 の何れかに記載の製造方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、高付加価値を有するリン脂質を製造する方法に関する。より詳細には、本発明は、3系不飽和脂肪酸の生産能を有する微生物を用いた、3系不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸(DHA)を構成脂質とするリン脂質の製造方法に関する。

**【背景技術】**

30

**【0002】**

3系不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)は、血中脂質低下作用、脳視覚機能の改善などの生理効果を示すことから、機能性脂質と言われている。いずれもヒトに不可欠の栄養分であるが、食品からの摂取が不足しがちであるために、必要摂取量を補うためのEPAやDHAを含む健康食品素材あるいはサプリメントが広く市販されている。また、EPAについては、高純度のEPAエチルエステルが脂質低下剤などの医薬としても利用されている。さらに、EPAとDHAを成分とする健康食品が厚生労働省により特定健康用食品として2004年に認可されて以来、EPAやDHAを初めとする3系不飽和脂肪酸の利用と市場は、より一層拡大するものと予想されている。

40

**【0003】**

一方、脂肪酸そのものではなく、脂肪酸を構成脂質とするリン脂質についても、種々の有用な生理活性を有することが数多く報告されている。例えば、ホスファチジルセリン(PS)の脳機能改善効果(非特許文献1)、ホスファチジルコリン(PC)の動脈硬化症や神経機能障害の改善効果が、それぞれ報告されている。さらに最近は、健康補助食品への利用を目的として、PSやPCにとどまらず、ホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むリン脂質全般が注目を集めている。

**【0004】**

このような背景の下、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質、例えばDHAを構成脂質とするPCやPE(それぞれをDHA-PC、DHA-PEといい、以下、DHA

50

を構成脂質とするリン脂質全体をDHAリン脂質という)の抗腫瘍性や抗酸化性などの生理機能が、培養細胞を使った系にとどまらず、動物生体を使った系でも明らかになってきている。

【0005】

例えば、Kafrawyら(非特許文献2)によれば、DHA-PC、特にPC1分子中に2分子のDHAをもつもの(DHA/DHA-PC)が癌化した動物細胞(マウス白血病細胞)に選択的毒性を示すことを報告している。したがって、3系不飽和脂肪酸、特にDHAを構成脂質とするリン脂質に対する需要は今後さらに高まっていくと期待される。

【0006】

3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の代表的な例であるDHAリン脂質の主な供給源は、イカ(特にムラサキイカの皮)や魚油、あるいはこれらの魚油の給餌により得られる鶏卵(特許文献1)などである。ムラサキイカは、リン脂質を多く含む上、そのリン脂質の50%を占めるホスファチジルコリン(PC)の構成脂質の50%がDHAであり、脂質中のDHAリン脂質の含有比率は高いという特徴を有している。

【0007】

しかし、DHAリン脂質の工業的な生産を考えた場合、ムラサキイカや魚油等の海産物をDHAリン脂質の供給源とすることは、漁獲高に依存した供給量の不安定性、季節や気候の変化を原因とする品質の不均一性、海洋汚染を原因とする安全性などの他に、魚油独自の臭気(いわゆる魚臭さ)による最終製品の品質や価値の低下、各種の構造類似の長鎖高度不飽和脂肪酸が魚油中に含まれることによる高い精製コスト等の多くの問題を抱えることになる。また鶏卵は、卵黄脂質の30%がリン脂質であり、リン脂質の含有比率は高いが、総脂質量は低く、また卵黄のエタノール抽出物中のDHA含量は12%程度に過ぎない。

【0008】

上記の魚油や鶏卵の利用とは異なる3系不飽和脂肪酸の供給源としては、3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物、特にDHA生産能を有する微生物が知られている。微生物を用いたDHAの製造方法は、アメリカ合衆国等では実用化されており、DHA含有脂質の原料や、高DHA含有飼料等が製品化されている。具体的には、例えば、トラウストキトリウム属、シゾキトリウム属の生育技術(特許文献2)、トロウストチトリアレ類から抽出される3系不飽和脂肪酸の利用技術(特許文献3)等が挙げられる。

【0009】

日本国内においても、ラビリンチュラ類をDHAの供給源として用いる技術は種々開発されている。具体的には、例えば、ラビリンチュラ属の微生物であるS3-2株を利用する技術(特許文献4~特許文献6)、シゾキトリウム属の微生物であるSR21株およびその利用技術(特許文献7~特許文献9)等が挙げられる。

【0010】

しかし、上記の微生物を用いた方法で製造されるDHAは、いずれもリン脂質の構成脂質ではなく、単なる脂肪(トリグリセリド)の構成脂質としてのDHAであり、DHAリン脂質を構成するものではない。

【0011】

本発明者らは、非光合成性の単細胞微生物であるラビリンチュラ類に属する新規微生物12B株を単離し、これがDHAリン脂質を製造することを見だし、特許出願を行った(特許文献10)。しかしながら、この微生物は、微生物の全脂肪に対して40%を超えるDHAを蓄積するが、DHAリン脂質の含有量は、微生物の全脂肪に対して12~13%程度に過ぎない。

【0012】

また、生物材料から調製されるDHAリン脂質のほとんどは、リン脂質分子中に1分子のDHAを持つだけであり、構成脂質としてのDHAの含有量が50%を超える、生物材料由来のリン脂質はほとんど報告されていない。従って、リン脂質中のDHA含量を高め

10

20

30

40

50

ることは、機能性食品の他に、医薬としての利用価値も高めることができる、重要な課題である。

【0013】

【非特許文献1】酒井正士ら、「ホスファチジルセリンと脳機能」、2002年、オレオサイエンス、第2巻、第2号、第23-28頁

【非特許文献2】Kafrawy Oら、Cancer Lett.、1998年、第132巻(1-2)、第23-29頁

【特許文献1】特開昭59-39258号公報

【特許文献2】特表平8-202405号公報

【特許文献3】特表平8-509355号公報

【特許文献4】特開2001-275656号公報

【特許文献5】特開2004-298798号公報

【特許文献6】特開2003-000292号公報

【特許文献7】特開平9-000284号公報

【特許文献8】特開平10-072590号公報

【特許文献9】特開平10-310556号公報

【特許文献10】特開2006-230403号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、魚油や鶏卵を原料とせず、微生物を用いた3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質、特にDHAを構成脂質とするDHALリン脂質をより簡便に製造す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】

【0015】

本発明者らは、ラビリンチュラ類12B株に代表される3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を、炭素源を含む通常の培地で培養するだけでなく、この様な培地で増殖させた微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養することによって、脂質全体におけるDHALリン脂質の含有量ひいてはDHALリン脂質の生産量自体も高めることができることを見だし、下記の各発明を完成した。

【0016】

(1)炭素源を含む培地で3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を増殖させる工程、及び増殖させた前記微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養する工程を含む、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の製造方法。

【0017】

(2)3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物がラビリンチュラ類微生物又はトロウストチトリアレ類微生物である、(1)に記載の製造方法

【0018】

(3)ラビリンチュラ類微生物がラビリンチュラ12B株である、(2)に記載の製造方法。

【0019】

(4)ラビリンチュラ類微生物が、ラビリンチュラ属微生物、トラウストキトリウム属微生物、及びシゾキトリウム属微生物よりなる群から選ばれる、(2)に記載の製造方法。

【0020】

(5)ラビリンチュラ類微生物がラビリンチュラ属S3-2株又はシゾキトリウム属SR21株である、(4)に記載の製造方法。

【0021】

(6)3系不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、(1)~(5)の何れかに記載の製造方法。

【0022】

10

20

30

40

50

(7) 強制通気を行いながら炭素源を含まない培地での培養を行う、(1)~(6)の何れかに記載の製造方法。

【発明の効果】

【0023】

本発明の方法によれば、3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を用いて、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とする高付加価値のリン脂質を大量に生産することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明にいう3系不飽和脂肪酸としては、リノレン酸、オクタデカテトラエン酸、エイコサテトラエン酸、EPA、DHA酸を挙げることができるが、本発明で好ましい3系不飽和脂肪酸は、EPA又はDHAであり、特に好ましくはDHAである。

10

【0025】

3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物としては、*Mortierella alpina*などのモルティエレラ(*Mortierella*)属微生物、*Desmarestia acculeata*などのデスマレスティア(*Desmarestia*)属微生物、*Cryptocodium cohnii*等の渦鞭毛藻、ラビリンチュラ(*Labyrinthula*)類微生物等を挙げることができる。ラビリンチュラ類微生物の具体例としては、ラビリンチュラ科のラビリンチュラ(*Labyrinthula*)属、例えばラビリンチュラ属S3-2株(受託番号FERM BP-7090)、ヤブレッツボカビ科のラビリンチュロイド(*Labyrinthuloides*)属、コラロキトリウム(*Corallochytrium*)属、アプラノキトリウム(*Aplanochytrium*)属、アルトルニア(*Althornia*)属、ジャポノキトリウム(*Japonochytrium*)属、ウルケニア(*Ulkenia*)属、トラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属、およびシゾキトリウム(*Schizochytrium*)属、例えばシゾキトリウム属SR21株(受託番号FERM BP-5034)等を挙げることができる。

20

【0026】

また、本発明者らが単離し、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8に所在する、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)に平成17年1月24日に受託番号NITE P-68として寄託した、ラビリンチュラ類微生物であるラビリンチュラ12B株を挙げることができる。本発明の製造方法において特に好ましい微生物は、このラビリンチュラ12B株である。ラビリンチュラ12B株の詳細な性状は、特許文献(特開2006-230403)に記載されている。

30

【0027】

本発明の製造方法は、炭素源を含む培地で3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養する工程を含む。この工程における培養は、特別な条件下で行う培養ではなく、利用する3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物にとって、その細胞数を増加させ、菌体内にトリグリセリドや脂肪酸、リン脂質その他の脂肪を蓄積させることのできる、糖その他の炭素源を含む培地を用いた標準的な条件で行われる培養である。従って、使用する微生物毎に報告されている当該微生物が良好に増殖する培養条件、例えば温度、培地組成、培地のpH、酸素濃度、光、振蕩速度、培養時間等に従い、当該微生物の増殖に好適な炭素源を含む培地を適宜選択して使用すればよい。

40

【0028】

培地の例としては、ラビリンチュラ科微生物に対してはPY培地(約50%の塩濃度をもつ人工海水1L当りポリペプトン1g、酵母抽出物0.5g、Kumonら、*Appl. Microbiol. Biotechnol.*、2002年、第60巻、第275-280頁)等を、ヤブレッツボカビ科微生物に対しては酵母抽出物 ペプトン ブドウ糖 海水培地(水1L当りそれぞれ10g、10g、80g、500mL)等を、また渦鞭毛藻に対しては酵母抽出物 ブドウ糖 海水塩培地(水1L当りそれぞれ2g、9g、25g)等を利用することができる。培地は、液体、固形、または形状保持性を有する半固形の

50

何れかの形状を有していればよい。また、上記培養工程では、培地の形状が固形である場合に、当該培地に添加する水分量の下限を45% (v/w)以上とすることが好ましく、水分量の上限を60% (v/w)以下とすることが好ましい。特に好ましくは45~50%の範囲内が好ましい。

【0029】

炭素源は、上記の培地に予め添加する、及び/又は培養と共に培地に炭素源を添加することができる。また炭素源の量は、使用する微生物の細胞数が培養時間と共に増加し、菌体内にトリグリセリドや脂肪酸、リン脂質その他の脂肪を蓄積するに十分な量であればよい。また、上記培養工程では、静置培養または振盪培養の何れかを適宜選択することができる。

10

【0030】

本発明の製造方法は、上記工程によって増殖させた微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養する工程を含む。以下の推察に拘束されるものではないが、炭素源を含む培地で良好に生育し、3系不飽和脂肪酸を含む多くの脂肪を菌体に蓄えた3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を、炭素源を含まない培地で更に培養することによって、菌体に蓄積された脂肪を3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質へと生物変換させ、リン脂質全体における3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の含有量ひいては3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の生産量自体も高めることができるものと推察される。

20

【0031】

本発明にいう「炭素源を含まない培地」とは、グルコースやデンプンに代表される糖類だけでなく、米糠やふすま、酢酸やエタノールなどを含め、本発明で使用される微生物が菌体内に蓄積された脂肪に先んじて利用を優先するような炭素源を含まない培地を意味する。また、本発明にいう「炭素源を含まない培地」とは、字句通りに炭素源を全く含まない培地のみを意味するものではなく、微生物をして菌体内に蓄積された脂肪を利用して増殖を行わせ、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質を生成させることができる限りにおいて、少量の炭素源が含まれる培地も意味するものである。例えば、「炭素源を含む培地」で増殖させた微生物を回収してそのまま利用する際の、いわゆる前培養からの持ち込みとしての炭素源、あるいは培地を構成するペプトンその他の成分に混在する微量の炭素源などを含む培地は、本発明にいう「炭素源を含まない培地」に該当する。

30

【0032】

上記の意味における炭素源を含まないことの他は、本発明にいう「炭素源を含まない培地」は、微生物の増殖にとって必要あるいは良好な栄養素を含む培地であることが好ましく、その様な培地、培養条件及びそれらの例は、前記の「炭素源を含む」培地と、これを用いて微生物を培養して菌体に脂肪を蓄積させるときの培養条件と同じであってよい。また、炭素源を除くその他の培地を構成する成分、組成などは、使用する微生物に応じて、当該微生物に好適な成分や組成を採用して用いられればよい。

【0033】

本発明で特に好ましい態様は、微生物としてラビリンチュラ12B株を利用したDHAリン脂質の製造方法である。ラビリンチュラ12B株は、炭素源としてグルコースを含む培地を用いて30で培養すると、約15g/Lもの脂質(脂肪酸として)を細胞内に蓄積させることから、炭素源を含まない培地で増殖させる際に、炭素源として利用可能な脂肪(トリグリセリド)を豊富に含んでいる点で有利である。また、炭素源を含む培地で増殖させたラビリンチュラ12B株に蓄積される脂肪酸の40%以上がDHAであり、当該DHAを利用してDHAリン脂質へと変換する上でも、好適な微生物である。

40

【0034】

またラビリンチュラ12B株は、比較的単純な組成からなる培地、例えば50%海水、1%ペプトン、1%酵母エキス、8%グルコースを含む培地(以下、F培地と表す)においても良好に増殖し、製造コストを抑制することができる点でも、本発明において有利な微生物である。

50

## 【 0 0 3 5 】

ラビリンチュラ 1 2 B 株を利用した D H A リン脂質の製造方法において、上記の F 培地は「炭素源を含む培地」の好適な例として使用することができる。また「炭素源を含まない培地」としては、上記の F 培地からグルコースを抜き、他に米糠などの炭素源として利用可能な成分を含まない培地（以下、Z 1 培地と表す）を好適な例として使用することができる。

## 【 0 0 3 6 】

ラビリンチュラ 1 2 B 株を利用した D H A リン脂質の製造方法としては、適当量の F 培地にラビリンチュラ 1 2 B 株細胞を接種し、30 で 2 4 時間 ~ 7 2 時間、振蕩培養を行ってラビリンチュラ 1 2 B 株を増殖させた後、この培養液の一部を、あるいは培養液から遠心分離等で回収した細胞を適当量の Z 1 培地に加え、さらに 30 で 2 4 時間 ~ 7 2 時間培養を行うことを例示することができる。この方法により、F 培地で培養を終了した時点に比べて、ラビリンチュラ 1 2 B 株の細胞内に D H A リン脂質をより多く含ませることができる。特に、「炭素源を含まない培地」における培養工程は、強制通気を行いながら培養することが好ましい。

10

## 【 0 0 3 7 】

本発明の製造方法は、上記の工程で得られた 3 系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質を菌体から抽出ないし回収する工程、さらに必要に応じて当該リン脂質を精製する工程を含んでもよい。微生物菌体内に蓄積したリン脂質の回収並びに精製は、例えば B l i g h t ( C a n . J . B i o c h e m . P h y s i o l . , 1 9 5 9 年、第 3 7 巻、第 9 1 1 - 9 1 7 頁) に記載の方法に従って行うことができる。

20

## 【 0 0 3 8 】

また、本発明によって製造される 3 系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質は、そのまま食品、食品添加物、飼料用添加物、医薬品等として用いることができ、また食品、サプリメント、飼料、医薬品又はこれらの原料に添加して利用してもよい。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 3 9 】

本発明について、実施例を示してさらに詳しく説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではなく、当業者は本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更、修正、および改変を行うことができる。なお、以下の実施例では、重量%は単に「%」と記載する。

30

## 【 0 0 4 0 】

## &lt; 実施例 1 &gt;

B y + 培地 ( 0 . 1 % ペプトン、0 . 1 % 酵母エキス、0 . 5 % ブドウ糖、5 0 % 海水、1 . 0 % 寒天) を含む寒天平板培地で保存しているラビリンチュラ 1 2 B 株細胞の 1 白金耳 ( 約 1 m g ) を、1 0 m L の F 培地 ( 5 0 % 海水、1 % ペプトン、1 % 酵母エキス、8 % グルコース) に接種し、30 で 7 2 時間培養した。培養後の培養液の濁度 ( O D <sub>600</sub> ) は約 3 . 6 であった。この培養液 4 m L を、Z 1 培地 ( F 培地からグルコースを除いた培地) 2 5 m L に接種し、30 で 4 8 時間、培養を行った。培養中は経時的に培養液の O D <sub>600</sub> を測定し、また培養終了後の細胞の乾燥重量、乾燥細胞から抽出した全脂質量、全脂質中の T G の量、リンの量、リンの量から算出されるリン脂質量と全脂質に対する比、及び全脂質脂肪酸中の D H A の含量を求めた ( 表 1 ) 。

40

## 【 0 0 4 1 】

1 白金耳のラビリンチュラ 1 2 B 株細胞は、乾燥重量に換算して約 0 . 5 m g の菌体重量に相当する。この菌体を 1 0 m L の F 培地に接種し、7 2 時間培養した場合の菌体の乾燥重量は、O D 値から換算して 2 4 6 m g となる。一方、1 白金耳のラビリンチュラ 1 2 B 株細胞を 1 0 m L の Z 1 培地へ直接接種して 7 2 時間 30 で培養したが、培養終了時の O D 値から換算した細胞の乾燥重量は 1 6 . 3 m g であり、F 培地で培養した場合の 7 % であった。このことから、Z 1 培地を用いて直接培養を行ったときのラビリンチュラ 1 2 B 株の増殖性は極めて低いと考えられる。

50

## 【0042】

一方、F培地で72時間培養した培地4mLに含まれるラビリンチュラ12B株細胞の乾燥重量(換算値)は90.6mgであるが、これを接種したZ1培地で48時間培養して最終的に得られるラビリンチュラ12B株細胞の乾燥重量(換算値)は235mgと、2.6倍に増加していた。また、Z1培地を用いた48時間の培養において、細胞から抽出される全脂質量は38.8mgから22.0mgへと約43%減少し、全脂質中のTG(脂肪酸量として)は66.8%から5.4%へと減少していた。

## 【0043】

これらの結果は、炭素源を含まないZ1培地における培養によって、ラビリンチュラ12B株細胞に蓄積されていた内在性脂質、特にTGが、ラビリンチュラ12B株の増殖のために消費されたことを示唆していると考えられる。

10

## 【0044】

その一方、Z1培地で48時間培養後のラビリンチュラ12B株細胞の細胞内全脂質中のリン脂質量(リンの量からの換算値)は、5.0mgから14.8mgへと約3倍増加し、全脂質中のリン脂質量は12.9%から67.3%へと約5倍増加した。また、全脂質中のDHAの含量は、F培地で培養した細胞では44.7%であるのに対して、Z1培地で培養した細胞では培養時間に応じて増加し、48時間培養した場合は約57%であり、ラビリンチュラ12B株細胞において、リン脂質の構成脂質としてのDHA含量の上昇したことを示す。

## 【0045】

20

## &lt;実施例2&gt;

実施例1と同様にラビリンチュラ12B株細胞を培養したF培地の培養液4mLを、Z1培地のペプトンと酵母エキスを2%としたZ2培地、及びZ1培地のペプトンと酵母エキスを4%としたZ4培地各25mLに接種し、30℃で48時間培養した。培養後の濁度、回収された細胞の乾燥重量、乾燥細胞から抽出した全脂質量、全脂質中のリン量、リン量から算出されるリン脂質量とそれらの比及びDHA含量を求めた(表1)。リン脂質の定量はホスファチジルセリン(シグマ)を標準品として無機リン量を定量することにより求めた。

## 【0046】

その結果、ペプトン、酵母エキスの含量を高めることでラビリンチュラ12B株細胞の細胞収量は増加し(Z1培地で235mg、Z2培地で243mg、Z4培地で339mg)、Z4培地では、接種時(F培地で培養した培養液4mL中の細胞乾燥重量90.6mg)の約4倍となった。また、全培養終了後の細胞から回収される全脂質量は、Z2培地とZ4培地でそれぞれ28.5mgと40.0mgであった。

30

## 【0047】

また、Z2培地、Z4培地で培養したラビリンチュラ12B株の細胞全脂質中のリン脂質量はそれぞれ14.9mg、20.8mgであり、Z1培地で培養した場合の14.8mgよりも増加したが、割合はZ2培地、Z4培地でそれぞれ52.3%及び52.0%であり、Z1培地の場合の67.3%より低下した。また、全脂質に占めるTGの割合もZ培地のペプトンや酵母エキスの濃度が上昇するにつれて増加した。

40

## 【0048】

すなわち、Z培地のペプトンや酵母エキス濃度を上げることは、全脂質に対するリン脂質の割合は低下させるが、細胞の増殖量の増加によってリン脂質の生産量を高めることが確認された。

## 【0049】

## &lt;実施例3&gt;

Z1培地に、1mM  $K_2PO_4$ 、1mM  $K_2PO_4$ と1mMセリン、1mM  $K_2PO_4$ と1mMエタノールアミンをそれぞれ添加した培地(以下、それぞれZ1p、Z1ps、Z1paと表す)を用意し、実施例1と同様の培養を行って、培養後の濁度、回収された細胞の乾燥重量、乾燥細胞から抽出した全脂質量、全脂質中のリン量、リン量から算

50



出されるリン脂質量とそれらの比及びDHA含量を求めた。

【0050】

その結果、Z1psにおいてリン脂質量の増加(15.2mg)が認められた。この結果は培地に無機リン及びアミノ酸を添加することにより、リン脂質の生産量を増加させることができることが確認された。

【0051】

上記実施例1～3における分析結果を表1に示す。

【0052】

【表 1】

ラビリンチュラ 1 2 B株の増殖、リン脂質含量、及びDHA含量に対する培地組成及び培養時間の影響

	培地								
	F	Z1	Z1	Z1	Z2	Z4	Z1	Z1	Z1
ブドウ糖	+ <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
エタノールアミン							-	+	-
セリン	-	-	-	-	-	-	-	-	+
培養時間 (h)	72	8	24	48	48	48	48	48	48
培養液の濁度 (600 nm) 0 タイム/培養終了時	0.2 <sup>b</sup> / 36.7	4.87 / 27.2 <sup>c</sup>	5.20 / 21.7 <sup>c</sup>	4.9 / 22.0 <sup>c</sup>	4.8 / 19.3 <sup>c</sup>	5.0 / 22.6 <sup>c</sup>	5.4 / 22.7 <sup>c</sup>	4.81 / 19.5 <sup>c</sup>	4.75 / 23.0 <sup>c</sup>
F 培地での培養終了時の細胞乾燥重量 (mg / 4 ml)	90.6								
Z 培地での培養終了時の細胞乾燥重量 ( mg / 29 ml)		140	249	235	243	339	205	172	233
細胞密度 (mg/ml)	22.7	4.8	8.6	8.1	8.4	11.7	7.1	5.9	8.0
乾燥菌体に由来する全脂質量 (mg)	38.8	32.0	39.7	22.0	28.5	40.0	22.2	18.6	25.5
全脂質に由来する TG <sup>d</sup> (mg)	25.9	ND <sup>e</sup>	12.5	1.2	6.2	13.9	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
TG / 全脂質 (%)	66.8	ND <sup>e</sup>	48.6	5.4	21.8	34.8	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
全脂質に由来するリン脂質 <sup>f</sup> (mg)	5.0	8.7	11.3	14.8	14.9	20.8	10.5	11.1	15.2
リン脂質 / 全脂質 (%)	12.9	27.2	28.5	67.3	52.3	52.0	47.3	59.7	59.6
リン脂質 / 細胞の乾燥重量 (%)	5.5	6.2	4.5	6.3	6.1	6.1	6.5	6.5	6.5
DHA / 全脂質脂肪酸 (%)	44.7	47.2	53.3	56.5	55.3	55.4	ND	ND	ND

a : + ; 含まれている、- ; 含まれていない。

b : 一白金耳相当の細胞を 10 mL の F 培地に懸濁した際の OD<sub>600</sub> の値。

c : 一部の細胞が凝集しているため正確な OD<sub>600</sub> は得られない。凡その値を示している。

d : 全脂質を TLC により一次展開して TG のスポットをメタノリシスした。TG の量は脂肪酸として定量した。

e : ND ; 分析していない。

f : 全脂質中のリン量を定量し、リン脂質量に換算した。

## 【 0 0 5 3 】

## &lt; 実施例 4 &gt;

1 ) B Y + 培地の寒天プレートに保存しているラビリンチュラ 1 2 B 株の細胞の 1 白金耳

10

20

30

40

50

分を500 mLフラスコ中の200 mLのF培地に接種し、30℃、3日間前培養を行った。この前培養液100 mLを、625 mLのZ1培地/2.5 L容積のジャーファーマンター（JF：東京理科器械社製）に加え、JFの上部空間（ヘッドスペース）に対して通気（1000 mL/分）しながら、30℃、攪拌速度300 rpmで24時間培養した。この培養条件によって、消泡剤を使用することなく培養液の発泡による損失を抑制することができる。培養液30 mLを回収し、細胞の乾燥重量、全脂質量、全リン脂質量を求め、全培養液当りに換算した。DHA含量の含量は、全脂質をメタノリシス後、GCにより求めた。また、容器をフラスコとし、通気を行わずに培養時間を48時間とした以外は上記と条件で培養したフラスコ培養を対照として用意した。

【0054】

上記の培養条件において、培養後の培養液の細胞濃度は5.7 mg/mLとなり、時間当りのリン脂質量は565 µg/mL/24時間であった。この値は、対照（フラスコ培養：225 µg/mL/24時間）の約2倍であった。

【0055】

2) JFの攪拌速度を500 rpmとした他は上記1)と同じ条件で培養を行ったところ、培養後の培養液の細胞濃度は6.9 mg/mLに達し、時間当りのリン脂質量は642 µg/mL/24時間となった。

【0056】

3) JFの上部空間（ヘッドスペース）に加えて、培地中にも通気（110 mL/分）を行った他は、上記1)と同じ条件で培養を行ったところ、培養後の培養液の細胞濃度は7.7 mg/mLとなり、リン脂質量の生成速度は755 µg/mL/24時間（対照であるフラスコ培養の約3倍）に上昇した。

【0057】

上記1)、2)、3)の結果を表2に示す。

【0058】

【表2】

	J F			
	対照	培養1)	培養2)	培養3)
細胞濃度(mg/mL)	8.1	5.7	6.9	7.7
全脂質/細胞重量 (%)	9.3	12.8	16.2	17.6
全リン脂質/全脂質 (%)	67.3	77.8	57.2	66.9
全リン脂質/細胞重量 (%)	6.3	10	9.3	11.5
全リン脂質(µg/ml培養液/24時間)	225	565	642	755
全脂肪酸当りのDHA量	56	52	45	49

【0059】

<分析方法>

上記の実施例における各種の分析は、次に示すとおりに行った。

【0060】

1) 全脂質の抽出

乾燥菌体よりクロロホルム-メタノールを用いた定法（非特許文献11）によって抽出される脂質を全脂質とした。全脂質中の脂肪と極性脂質を分離するために、全脂質サンプル100 µgを、シリカゲルプレート（メルク社製シリカゲルG60）を用いて1次元薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。展開溶媒の組成はヘキサン-エーテル-酢酸（50:50:1、体積比）である。展開後、プリムリンをプレートに噴霧し、UV照射下でスポットの位置を確認した。TGの同定は標準物質とRf値の比較により行った。

【0061】

2) リン脂質の同定

全脂質（1 mg）を、クロロホルム-メタノール-水（65:25:4、体積比）を展

10

20

30

40

50

開溶媒 A として 1 次元展開、次いでクロロホルム - アセトン - メタノール - 酢酸 - 水 ( 50 : 20 : 10 : 10 : 1 , 体積比 ) を展開溶媒 B として 2 次元展開による二次元 T L C を行い、極性基に特異的な試薬を吹きつけた。対象となるスポットをプレートからかきとり、クロロホルム - メタノール混液を用いてリン脂質を抽出した。リン脂質の同定は、T L C プレート上での検出試薬との反応性、及び抽出物とリン脂質標準物質との異なる 3 種類の展開溶媒 ( 展開溶媒 A、B 及びクロロホルム - メタノール - アンモニア水 ( 50 : 20 : 10、体積比 ) からなる溶媒 C ) を用いた 1 次元 T L C における R f の比較により行った。

【 0 0 6 2 】

F 培地で 30、72 時間培養後、及び Z 1 培地で 30、48 時間培養後のラビリンチュラ 1 2 B から抽出した全脂質の 1 次元 T L C の結果を、図 1 に示す。スポット 1 が T G、スポット 2 が遊離脂肪酸である。原点 ( スポット 3 ) が極性脂質である。T G、遊離脂肪酸、極性脂質、及びそれ以外の中性脂質の脂肪酸量を基にした割合を表 2 に示す。

【 0 0 6 3 】

【表 3】

F 培地及び各種 Z 培地で培養したラビリンチュラ 1 2 B 株細胞の脂質組成と D H A 含量

培地	全脂質中の割合 <sup>a</sup> 、% (DHA の割合、%)			
	F	Z × 1	Z × 2	Z × 4
T G	88.4 (40.8)	12.7 (52.6)	34.7 (58.8)	38.8 (42.5)
遊離脂肪酸	0 <sup>b</sup>	9.3 (28.8)	12.6 (29.7)	5.5 (40.6)
極性脂質 <sup>c</sup>	8.1 (56.4)	72.6 (56.6)	47.4 (57.1)	50.5 (51.5)
その他の脂質	3.5 (32.7)	5.4 (31.7)	5.4 (29.3)	5.2 (36.9)

a : 全脂質は一次元薄層クロマトグラフィにより分離し、それぞれの脂質クラスの量は脂肪酸の量として相対的に表した。

b : 検出されなかった

c : 薄層クロマトグラフィで原点から移動しなかった脂質を極性脂質とした。

【 0 0 6 4 】

F 培地から Z 培地への移行により T G が減少し、遊離脂肪酸と極性脂質の割合が増加した。Z 2 培地、Z 4 培地で培養した場合も Z 1 培地で培養した場合と同様、T G の減少、極性脂質の増加の傾向を示したが、Z 1 培地の場合ほど顕著ではなかった。Z 2 培地を用いて培養した細胞の場合を除いて極性脂質の D H A 含量は T G の D H A 含量を上回っていた。

【 0 0 6 5 】

全脂質の 2 次元 T L C の結果を図 2 に示す。図 2 a はプレートに蛍光物質 ( プリムリン ) を噴霧した後に紫外線照射下で撮影したものであり、図 2 b は図 2 a を模式的に図示したものである。各スポットには図 2 b に示すように番号を付した。各スポットを与える脂質の検出試薬に対する反応性を調べた。脂質 1、2、3、4、6、7、8、9 は D i t t m e r 試薬に陽性であり、リン脂質であることがわかった。これらの脂質の他の検出試薬に対する反応性から、脂質 2 はホスファチジルイノシトール ( P I )、脂質 3 と 4 はホスファチジルコリン ( P C 1 と P C 2 )、脂質 6 と 7 はホスファチジルエタノールアミン ( P E 1 と P E 2 ) と同定された。この結果は、それぞれの標準物質との R f 値の比較によって確認された。P C、P E とともに 2 つのスポットを与えるのは、構成する脂肪酸 ( 特に D H A の含量 ) が異なるためであると考えられる。他のリン脂質を含む極性脂質は未同定である。0 は原点をあらわし、スポット 5 と番号のないスポットは D i t t m e r 試薬に対して陰性の脂質である。

【 0 0 6 6 】

3) リン脂質の組成と D H A 含量

Z 1 培地で 30 48 時間培養後のラビリンチュラ 1 2 B 株細胞から抽出した全脂質に対して二次元 T L C を行った後、Z 1 培地由来の脂質の全スポットをかきとり、I s t o

10

20

30

40

50

k o v i c sらの方法 ( C a n . J . M i c r o b i o l . , 1 9 8 8 年、第 4 4 巻、第 1 0 5 1 - 1 0 5 9 頁 ) に従ってリンを定量した。全リン脂質中、P C は 6 1 . 3 %、P E は 1 1 . 9 %、P I は 1 2 . 5 %、その他が 1 4 . 6 %であった。P C と P E について脂肪酸量を基にした場合、P C 1 と P C 2 はそれぞれ 4 6 . 0 %、5 4 . 0 %であり、P E 1 と P E 2 はそれぞれ 4 6 . 7 %、5 3 . 3 %であった。

【 0 0 6 7 】

さらに、既知量 ( 2 0 0 μ g ) の内部標準物質となる h e n e i c o s a n o i c a c i d とともに定法によってメタノリシスし、脂肪酸メチルエステルを G C により分析した。P C 1 と P C 2 は全脂肪酸の 3 9 . 2 % 及び 6 6 . 8 % が D H A、P E 1 と P E 2 は全脂肪酸の 2 3 . 0 %、3 3 . 3 % が D H A であった。P I の D H A 含量は 2 0 . 9 % であつた。このことから D H A が P C、特に P C 2 の構成脂質であることが分かつた。計算で求めた全 P C、全 P E の D H A 含量はそれぞれ 5 4 . 0 % と 2 8 . 4 % であつた。以上の結果を表 3 に示す。なお、表 3 のリン脂質の D H A 含量の値は、Z 1 培地で培養した細胞に由来する全脂質の D H A 含量 5 6 . 5 % ( 表 1 ) や極性脂質の D H A 含量 5 6 . 6 %、T G の D H A 含量 ( 5 2 . 6 % ) に比べると低いが、これは T L C あるいは G C の過程で多価不飽和脂肪酸の分解が起きているためである。

10

【 0 0 6 8 】

【 表 4 】

Z 1 培地で 4 8 時間培養したラビリンチュラ 1 2 B 株細胞のリン脂質組成と D H A 含量及び収量

20

	全脂質に対する割合 <sup>a</sup> (%)	全リン脂質に対する割合 <sup>b</sup> (%)	各脂質クラス中での割合 <sup>c</sup> (%)	D H A の含量 (%)	収量 (mg/全培養液(29 ml))
全リン脂質	67.0				14.8
全 P C		61.0	(100)	54 <sup>e</sup>	10.8
P C 1			46.0	39.2	5.4
P C 2			54.0	66.8	5.4
全 P E		11.9	(100)	28.4 <sup>f</sup>	2.0
P E 1			46.7	23.0	1.0
P E 2			53.3	33.3	1.0
全 P I <sup>d</sup>		12.5		20.9	
その他のリン脂質		14.6			

30

a : 全脂質中のリン量を測定してリン脂質量に換算した。

b : 二次元薄層クロマトグラフィにより P C は P C 1 と P C 2、P E は P E 1 と P E 2 の 2 成分 (サブクラス) に不完全に分離する。リンの定量の際にサブクラスの区別はしていない。

c : P C と P E のサブクラスをそれぞれ任意に区別して、サブクラスごとの脂肪酸を分析した。P C 1 と P C 2 及び P E 1 と P E 2 の量比は脂肪酸量を元に計算した。

40

d : P I は、リンの定量、脂肪酸の分析とも単一の脂質クラスとして行った。

e、f : それぞれ P C 1 及び P C 2、P E 1 及び P E 2 の D H A 含量 (%) を元にして計算により求めた D H A 含量を示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 9 】

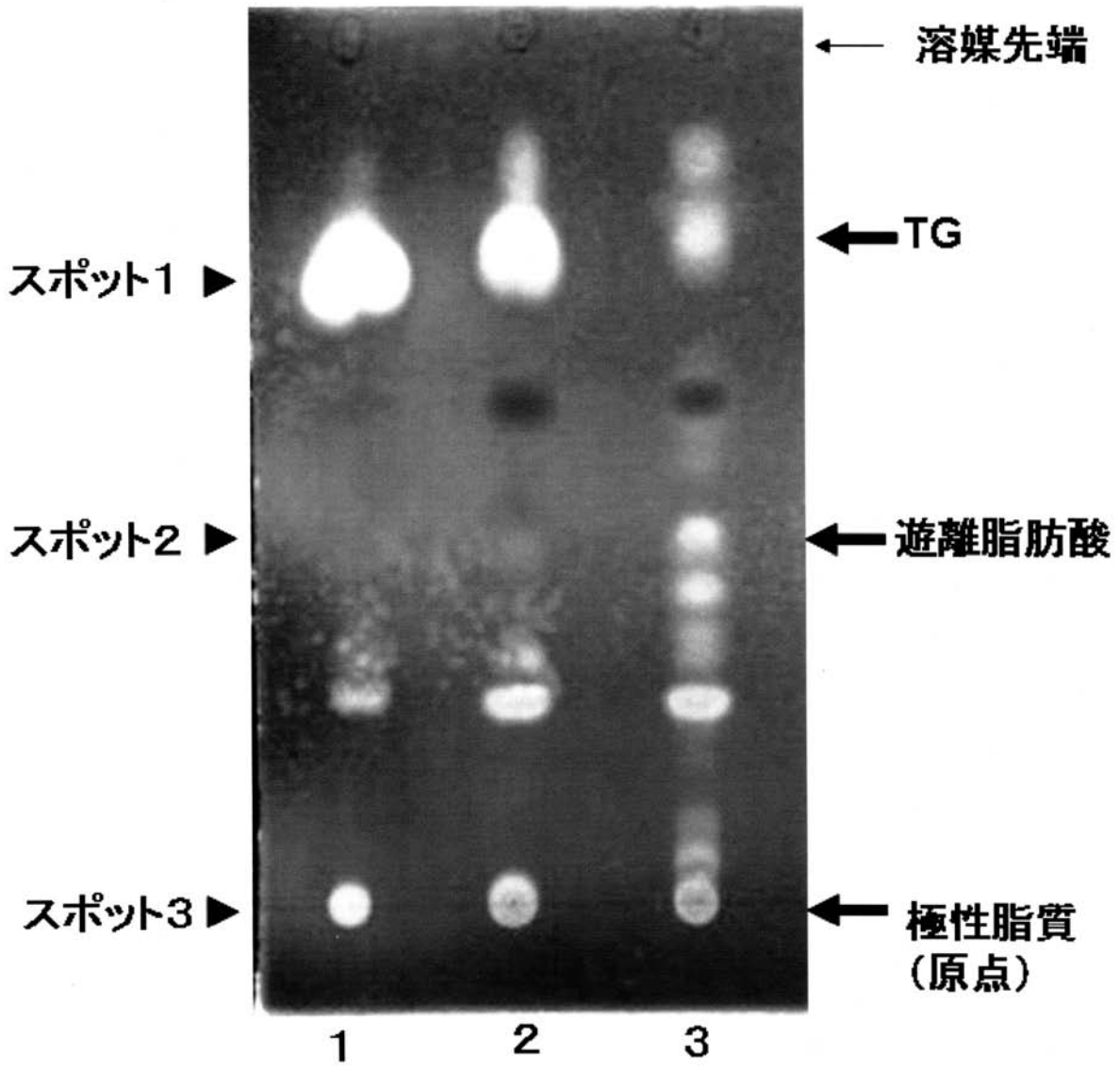
【 図 1 】 F 培地及び Z 1 培地で培養したラビリンチュラ 1 2 B 株細胞の全脂質の 1 次元 T L C のクロマトグラムを示す。レーン 1 : F 培地で 3 0、7 2 時間後の全脂質 ( 2 5 0 μ g )、レーン 2 : Z 1 培地で 3 0、2 4 時間培養後の全脂質 ( 2 5 0 μ g )、レーン 3 : Z 1 培地で 3 0、4 8 時間培養後の全脂質 ( 2 5 0 μ g )。

50

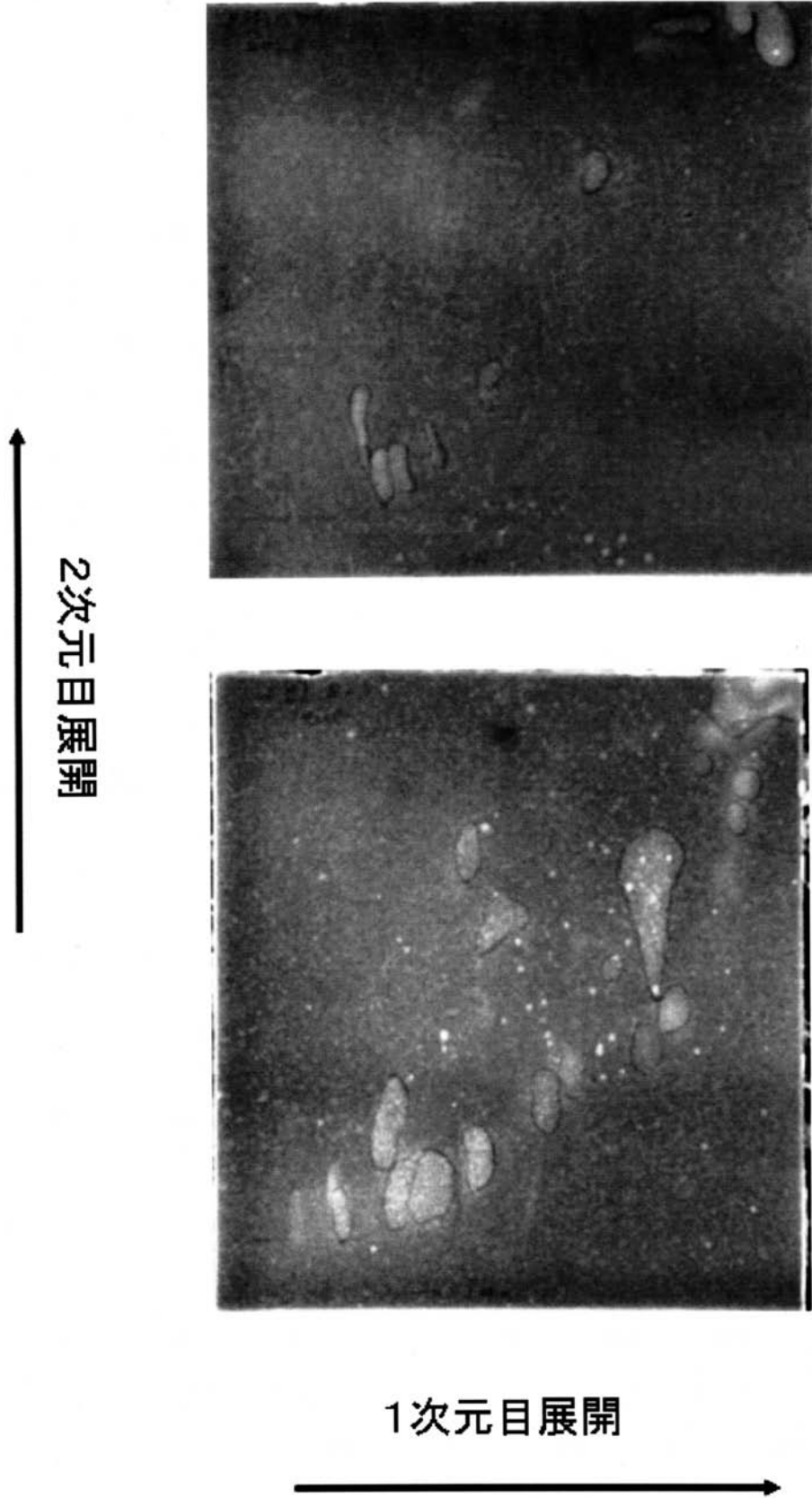
【図 2 a】F 培地及び Z 1 培地で培養したラビリンチュラ 1 2 B 株細胞の全脂質の 2 次元 T L C のクロマトグラム（プリムリンを噴霧後、U V 照射下で撮影）を示す。パネル上：F 培地で 3 0 、 7 2 時間培養後の全脂質（1 m g）、パネル下：Z 1 培地で 3 0 、 4 8 時間培養後の全脂質（1 m g）。

【図 2 b】図 2 a に示すクロマトグラムを模式的に記したものを示す。スポット 1 から 9 がリン脂質である。パネル上：F 培地で 3 0 、 7 2 時間培養後の全脂質、パネル下：Z 1 培地で 3 0 、 4 8 時間培養後の全脂質。

【図1】

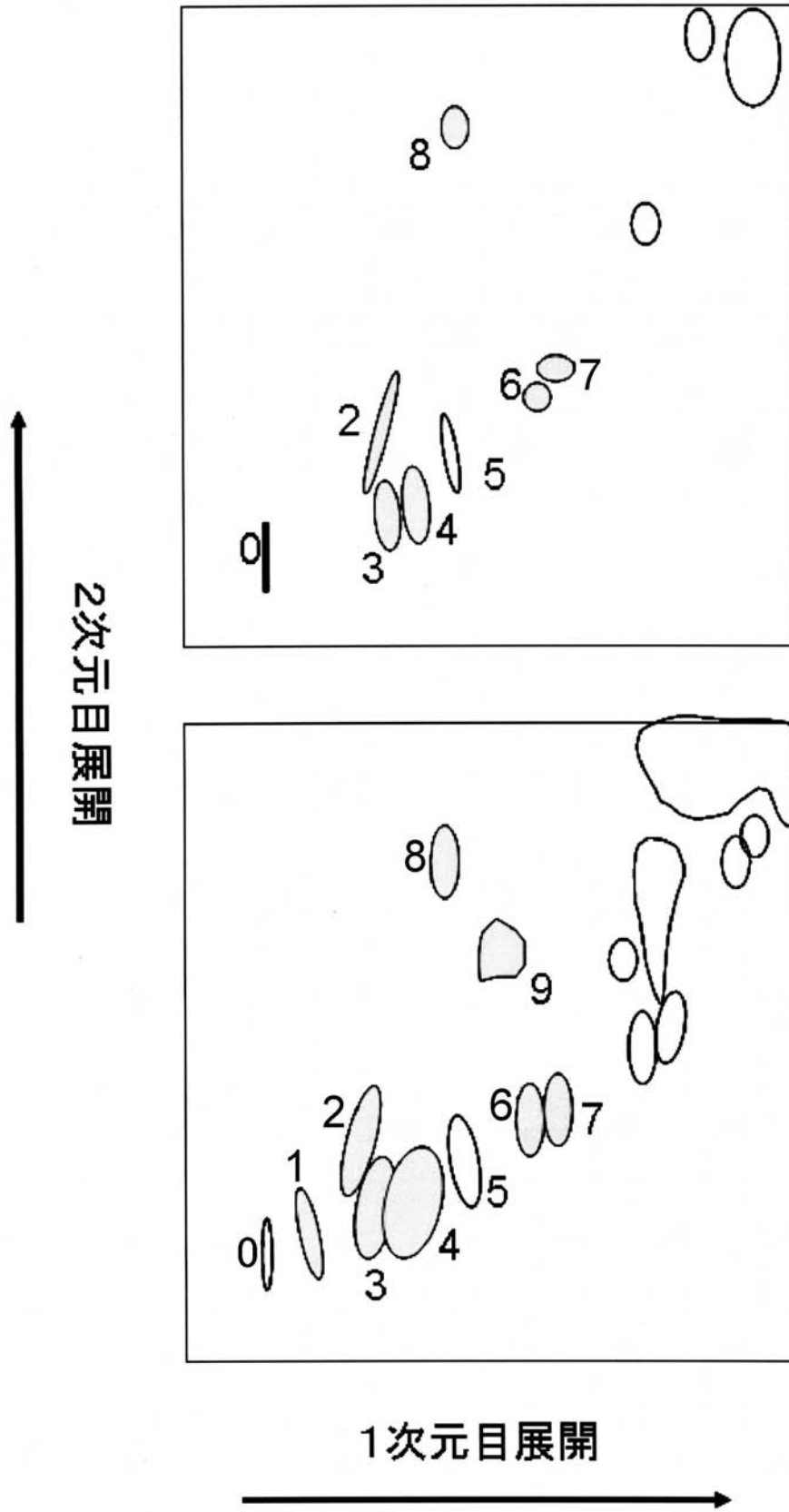


【 図 2 a 】





【 図 2 b 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/001394
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P9/00(2006.01) i		
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) C12P9/00		
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/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), Igaku-Yakugaku Yokoshu Zenbun Database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Taichi GOYA et al., "Shinki Kodo Fuhowa Shibosan Seisankin no Tansaku Oyobi Baiyo Joken no Kento", Dai 36 Kai Abstracts of the Meeting on Oil Chemistry, 1997, page 160 (Koen Bango: 2E13)	1-7
A	JP 2001-309779 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 06 November, 2001 (06.11.01), Full text & JP 3502903 B2	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 02 July, 2008 (02.07.08)		Date of mailing of the international search report 15 July, 2008 (15.07.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/001394

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-102680 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 21 April, 2005 (21.04.05), Full text & US 2004/0161831 A1 & US 7259006 B2	1-7
A	JP 2004-121019 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology et al.), 22 April, 2004 (22.04.04), Full text (Family: none)	1-7
A	JP 2006-230403 A (National University Corporation Hokkaido University et al.), 07 September, 2006 (07.09.06), Full text & JP 4047354 B2	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/001394	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P9/00(2006.01)i			
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. C12P9/00			
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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	合谷太一 他, 新規高度不飽和脂肪酸生産菌の探索及び培養条件の検討, 第36回油化学討論会 講演要旨集, 1997, p.160(講演番号:2E13)	1-7	
A	JP 2001-309779 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001.11.06, 全文 & JP 3502903 B2	1-7	
A	JP 2005-102680 A (富士写真フイルム株式会社) 2005.04.21, 全文 & US 2004/0161831 A1 & US 7259006 B2	1-7	
<input checked="" 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		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 02.07.2008		国際調査報告の発送日 15.07.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 清水 晋治	4B 3535
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/001394

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
A	JP 2004-121019 A (独立行政法人産業技術総合研究所、外1名) 2004.04.22, 全文(ファミリーなし)	1-7
A	JP 2006-230403 A (国立大学法人 北海道大学、外1名) 2006.09.07, 全文 & JP 4047354 B2	1-7

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 奥山 英登志  
北海道札幌市北区北10条西5丁目 国立大学法人 北海道大学 大学  
院地球環境科学研究院内

(72)発明者 折笠 善丈  
北海道札幌市北区北10条西5丁目 国立大学法人 北海道大学 大学  
院地球環境科学研究院内

(72)発明者 西田 孝伸  
北海道札幌市北区北10条西5丁目 国立大学法人 北海道大学 大学  
院地球環境科学研究院内

Fターム(参考) 4B064 AE63 CA05 CC03 CC06 CD02 CD09 CD12 CD13 CD20 CD21

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。