

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年11月17日(17.11.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/181491 A1

- (51) 国際特許分類:
C11B 11/00 (2006.01) C12P 9/00 (2006.01)
C07F 9/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/063617
- (22) 国際出願日: 2015年5月12日(12.05.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 藤野 武彦(FUJINO, Takehiko) [JP/JP]; 〒8130043 福岡県福岡市東区名島5丁目3番17号 Fukuoka (JP). 馬渡 志郎(MAWATARI, Shiro) [JP/JP]; 〒8130016 福岡県福岡市東区香椎浜4-7-1-1203 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 幸田 全弘(KOHDA, Masahiro); 〒1050004 東京都港区新橋四丁目2番11号 中村ビル5階 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ETHER PHOSPHOLIPIDS

(54) 発明の名称: エーテルリン脂質の製造方法

(57) Abstract: [Problem] To provide a method for producing highly pure ether phospholipids free of plasmalogen glycerophospholipids by a simple operation. [Solution] This production method includes a step (a) for extracting the total lipids from a biological material by a mixed solution of a nonpolar organic solvent and a branched alcohol and a step (b) for decomposing the admixed diacyl phospholipids by causing phospholipase A1 to act on the total lipids obtained in step (a). This makes it possible to produce highly pure ether phospholipids free of plasmalogen glycerophospholipids by a simple operation.

(57) 要約: 【課題】 高純度のプラズマローゲン型グリセロリン脂質ないしエーテルリン脂質を、簡単な操作で製造する方法を提供する。【解決手段】 この製造方法は、生物系素材から、その総脂質を非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液で抽出する工程 (イ) ならびに前記工程 (イ) で得られた総脂質にホスホリパーゼA1を作用させて、混在するジアシルリン脂質を分解する工程 (ロ) を含む。これにより、高純度のプラズマローゲン型グリセロリン脂質ないしエーテルリン脂質を、簡単な操作で製造することができる。



WO 2016/181491 A1

明 細 書

発明の名称： エーテルリン脂質の製造方法

技術分野

- [0001] この発明は、エーテルリン脂質の製造方法に関するものである。
より詳しくは、高純度のエーテルリン脂質を、簡単な操作で製造する方法に関するものである。

背景技術

- [0002] 脂質とは、分子中に長鎖脂肪酸又は類似の炭化水素鎖を有し、生体内に存在するか、生物に由来する物質を指す。
この脂質は、単純脂質と複合脂質に分類することができる。
単純脂質は、C、HおよびOより構成され、一般にアセトンに可溶で、単純脂質のトリアシルグリセロールは、動物体では、脂肪組織にエネルギーの貯蔵体として存在する。
- [0003] 一方、複合脂質は、リン酸のPや塩基のNなどを含む脂質群である。
したがって、複合脂質は、疎水性部分（脂肪酸部分）と親水性部分（リン酸や塩基の部分）からなるもので、両親媒性を示す。
一般的には、前記単純脂質がアセトンに可溶であるのに対し、複合脂質はアセトンに不溶である。
このような複合脂質は、生体膜の構成成分となっている。
- [0004] 前記複合脂質は、以下のように大別することができる。
- 1) グリセロリン脂質；
ホスファチジルコリン（別名レシチン）、ホスファチジルエタノールアミンなどが属する。
 - 2) スフィンゴリン脂質；
スフィンゴミエリン、セラミドシリアチンなどが属する。
 - 3) スフィンゴ糖脂質；

セレブロシド、スルファチド、ガングリオシドなどが属する。

および

4) グリセロ糖脂質；

微生物や高等植物に存在するジアシルグリセロールに種々の糖が結合したものなどがある。

なお、前記2) スフィンゴリン脂質および3) のスフィンゴ糖脂質を総称して、スフィンゴ脂質と呼ばれる。

[0005] 前記グリセロリン脂質は、グリセロールを骨格に持つリン脂質の総称で、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなどがある。

このグリセロリン脂質は、非極性部分とエステル結合（アシル結合）しているものが多いが、グリセロールの1位（sn-1）に、ビニルエーテル結合（アルケニル結合）あるいはエーテル結合（アルキル結合）したものがある。

前記ビニルエーテル結合したものは、プラズマローゲンとも呼ばれている。

前記ビニルエーテル結合およびエーテル結合を持つグリセロリン脂質を合わせて、エーテルリン脂質と呼ばれている。

[0006] リン脂質は、生体膜の構成成分として重要である。

なかでもエーテルリン脂質であるプラズマローゲンは、哺乳動物の生体膜のリン脂質の約18%を占めている。

特に、脳神経、心筋、骨格筋 白血球、精子に多い。

プラズマローゲンは、ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸と多く結合している。

したがって、これらの多価不飽和脂肪酸から産生する、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの細胞間シグナルの、2次メッセンジャーの貯留所となっているだけでなく、細胞融合、イオン移送など重要な働きをしている

。

[0007] さらに、プラズマローゲンのビニルエーテル結合（アルケニル結合）が、特に酸化ストレスに敏感であるため、細胞の抗酸化の役目もしている。

哺乳動物においても、少量ではあるがアルキル結合を有するエーテルリン脂質が存在する。

特に、ラットの脳の海馬には、アルキル結合を持つホスファチジルコリン、フォスファチジルエタノラミンを確認した。

さらに、摂取されたエーテル結合（アルキル結合）を持つリン脂質は、哺乳動物ではプラズマローゲンに転化されることが知られている。

[0008] 最近、プラズマローゲン型グリセロリン脂質は、例えば、国際公開第2011/083827号（特許文献1）に示されるように、脳神経細胞新生効果を有することが報告されている。

さらに、国際公開第2012/039472号（特許文献2）や、I f u k u ら, *Journal of Neuroinflammation*, 9 : 197 (2012)（非特許文献1）に示されるように、プラズマローゲン型グリセロリン脂質は、中枢神経系炎症を引き起こす原因の一つと考えられているグリア細胞の増加を抑制し、中枢神経系炎症を改善する効果を有し、特にアルツハイマー病などの神経変性疾患の予防および治療に効果的であることが指摘されている。

[0009] さらに、前記プラズマローゲン型グリセロリン脂質は、例えば、特許文献3～5に示されるように、ニワトリ表皮、鶏ムネ肉などの鳥組織から容易にかつ大量に得られることが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第2011/083827号（請求の範囲）

特許文献2：国際公開第2012/039472号（請求の範囲）

特許文献3：特開2008-179588号公報（特許請求の範囲）

特許文献4：国際公開第2008/146942号（請求の範囲）

特許文献5：国際公開第2010/047404号（請求の範囲）

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ifuku ら, Journal of Neuroinflammation, 9: 197 (2012)

非特許文献2：Y.Yamashitaら, J Oleo Sci, 63, 423-430 (2014)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 従来、食品、動物組織などの総脂質から高純度のリン脂質を得るためには、クロロホルム／メタノール系による抽出工程に付したのち、カラムクロマトグラフィーで中性脂質とリン脂質を分離する精製法を利用することが一般的で、複雑な手順が必要であった。

[0013] 前記特許文献3～5に記載されている製造方法は、ニワトリ表皮、鶏ムネ肉などの鳥組織から、プラズマローゲン型グリセロリン脂質を、容易かつ大量に製造するものである。

しかしながら、これらの製造方法は、エーテルリン脂質ないしプラズマローゲン型グリセロリン脂質の簡単な製造方法としては満足いくものではなかった。

[0014] 前記非特許文献2に記載されている製造方法は、手順も複雑で、純度の点において不十分であった。

したがって、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病、糖尿病などのメタボリックシンドロームや、種々の感染症や免疫異常の治療および改善の効果において優れた、プラズマローゲン型グリセロリン脂質ないしエーテルリン脂質を、高純度かつ簡単な操作で製造できる方法が求められている。

[0015] この発明はかかる現状に鑑み、高純度のプラズマローゲン型グリセロリン脂質ないしエーテルリン脂質を、簡単な操作で製造する方法を提供することを目的として鋭意検討を行なった。

[0016] その結果、生物系素材を特定の工程に付すことによって、高純度のプラズ

マローゲン型グリセロリン脂質ないしエーテルリン脂質を、簡単な操作で製造することができることを見出して、この発明を完成させたものである。

課題を解決するための手段

- [0017] すなわち、この発明の請求項 1 に記載の発明は、
生物系素材から、その総脂質を非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液で抽出する工程（イ）
ならびに
前記工程（イ）で得られた総脂質にホスホリパーゼ A 1 を作用させて、混在するジアシルリン脂質を分解する工程（ロ）
を含むこと
を特徴とするエーテルリン脂質の製造方法である。
- [0018] この発明の請求項 2 に記載の発明は、
請求項 1 に記載のエーテルリン脂質の製造方法において、
前記非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液は、
ヘキサン・イソプロパノール混合液であること
を特徴とするものである。
- [0019] この発明の請求項 3 に記載の発明は、
請求項 1 又は 2 に記載のエーテルリン脂質の製造方法において、
前記工程（ロ）に付した後、精製工程に付すことにより、精製されたエーテルリン脂質を得る工程
を含むこと
を特徴とするものである。
- [0020] この発明の請求項 4 に記載の発明は、
請求項 3 に記載のエーテルリン脂質の製造方法において、
前記精製工程は、
溶液分配によるものであること
を特徴とするものである。

[0021] この発明の請求項 5 に記載の発明は、
請求項 4 に記載のエーテルリン脂質の製造方法において、
前記溶液分配は、
脂質をヘキサンに抽出して、アセトン又は水によって分配するものである
こと
を特徴とするものである。

発明の効果

[0022] この発明のエーテルリン脂質の製造方法は、生物系素材から、その総脂質を、非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液で抽出する工程（イ）ならびに前記工程（イ）で得られた総脂質にホスホリパーゼ A 1 を作用させて、混在するジアシルリン脂質を分解する工程（ロ）を含むもので、この製造方法によれば、高純度のエーテルリン脂質を簡単な操作で得ることができる。

[0023] 特に、この発明のエーテルリン脂質の製造方法においては、カラムクロマトグラフィーを使用することなく、脂質をヘキサンに抽出して、アセトン又は水によって分配するだけで、より高い純度のエーテルリン脂質を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]図 1 は、HPLCチャートであって、図 1（a）は、アサリ由来の総リン脂質のHPLCチャートを、図 1（b）は、精製されたアサリ由来のエーテルリン脂質のHPLCチャートを示す。

[図2]図 2 は、HPLCチャートであって、図 2（a）は、シジミ由来の総リン脂質のHPLCチャートを、図 2（b）は、精製されたシジミ由来のエーテルリン脂質のHPLCチャートを示す。

[図3]図 3 は、HPLCチャートであって、図 3（a）は、鶏胸肉由来の総リン脂質のHPLCチャートを、図 3（b）は、精製された鶏胸肉由来のエーテルリン脂質のHPLCチャートを示す。

[図4]図4は、HPLCチャートであって、図4(a)は、鶏胸肉由来のエーテルリン脂質の、全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸の含有率を示すHPLCチャートを、図4(b)は、アサリ由来のエーテルリン脂質の全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸の含有率を示すHPLCチャートを、図4(c)は、シジミ由来のエーテルリン脂質の全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸の含有率を示すHPLCチャートを示す。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、この発明にかかるエーテルリン脂質の製造方法の実施の形態について、具体的に説明する。

なお、この発明について、好ましい代表的な例を中心に説明するが、この発明はこのような代表例に限定されるものではない。

[0026] この発明のエーテルリン脂質の製造方法は、以下の工程を含むものである。

このような構成によって、プラズマローゲン型グリセロリン脂質ないしエーテルリン脂質を、簡単な操作で得ることができる。

[0027] 工程(i)；生物系素材から、その総脂質を非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液で抽出する工程

ならびに

工程(ii)；前記工程(i)で得られた総脂質にホスホリパーゼA1を作用させて、混在するジアシルリン脂質を分解する工程。

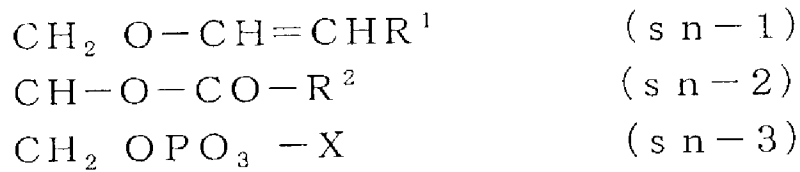
[0028] ここで、エーテルリン脂質とは、グリセロール骨格の1位(s n - 1)に、ビニルエーテル結合(アルケニル結合)あるいはエーテル結合(アルキル結合)を持つグリセロリン脂質をいう。

以下に、エーテルリン脂質の一般式を示す。

式(1)で示される化合物がアルケニルリン脂質(プラズマローゲン)で、式(2)で示される化合物がアルキルリン脂質である。

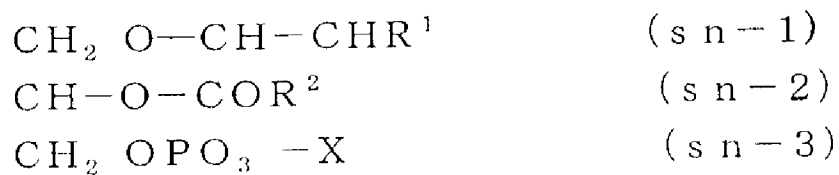
[0029]

[化1]



(1)

[0030] [化2]



(2)

[0031] 前記式中、 R^1 は脂肪族炭化水素基を示す。 R^1 は、通常、炭素数14～18の脂肪族炭化水素基である。 R^2 は、脂肪族炭化水素基で、例えば、アラキドン酸 (ARA)、ドコサヘサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) などの多価不飽和脂肪酸が結合している場合が多い。

さらに、式中、Xは極性基を示す。

Xは、好ましくはエタノールアミン、コリン、セリン、イノシトールなどである。

[0032] 特に、前記式中Xが、エタノールアミンであるエタノールアミンプラズマローゲンと、コリンであるコリンプラズマローゲンは、哺乳動物に存在するエーテルリン脂質として主要である。

摂取されたエーテル結合 (アルキル結合) をもつグリセロリン脂質は、そのまま吸収されて各組織で利用されるか、体内でアルケニル結合型リン脂質 (プラズマローゲン) に転化する。

[0033] この発明において使用する生物系素材としては、プラズマローゲン型グリ

セロリン脂質ないしエーテルリン脂質を含むものであればよく、特に制限されない。

例えば、動物及び微生物を挙げるができる。

[0034] 前記動物としては、哺乳類、鳥類および魚介類などが例示される。

前記哺乳類としては、供給安定性と安全性の両面から家畜が好適で、例えば、牛や豚の他、馬、山羊、綿羊、鹿、らくだ、ラマなどの哺乳類、さらには、鶏やアヒル、七面鳥、ダチョウなどの家禽を例示することができる。

前記哺乳類の場合において、エーテルリン脂質を含有している主な組織としては、皮膚や脳、腸、心臓、生殖器などを挙げるができる。

[0035] 前記魚介類としては、飼育、すなわち、養殖可能であるものが好適で、
クルマエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、ガザミなどの甲殻類
アワビ、サザエ、ホタテ貝、カキなどの貝類

ウニ類、ホヤ類、ヒトデ類、ナマコ類、イソギンチャク類
が例示される。

特に、アサリ、シジミ、ハマグリ、ホタテ、カキなどの二枚貝がより好適である。

前記二枚貝の場合において、エーテルリン脂質を含有している主な組織としては、内臓や性腺、筋肉などが挙げられる。

[0036] 前記微生物としては、嫌気性細菌が好適で、例えば、腸内細菌のAcidamino coccaceae科の細菌などは、特に好ましい。

なお、細菌の場合においては、「生体組織」は、細菌そのものである。

[0037] 前記工程（イ）では、生物系素材又はその組織の総脂質を得る。

なお、前記生物系素材として、その組織を用いる際には、予めミンチ化や、粉砕をしておくことが好ましい。

[0038] 前記非極性有機溶媒としては、飽和脂肪族炭化水素類が挙げられる。

好ましくは直鎖状の飽和炭化水素、さらに好ましくはヘキサンが選択される。

[0039] 前記分岐アルコールには、二級アルコールおよび三級アルコールが含まれ

、好ましくは二級アルコール、より好ましくはイソプロパノールが選択される。

[0040] 前記工程（ロ）は、前記工程（イ）で得られた、総グリセロリン脂質から混在するジアシル型グリセロリン脂質を加水分解することで、ジアシル型リン脂質を除く工程である。

[0041] 前記加水分解には、ホスホリパーゼA1（PLA1）が使用される。

このPLA1は、ジアシル型リン脂質のsn-1のアシル結合を、特異的に加水分解する。

したがって、エーテルリン脂質のsn-1はエーテル結合であるので、PLA1は作用しない。

[0042] 前記PLA1による処理によって、ジアシルグリセロリン脂質は、遊離脂肪酸とリゾリン脂質に分解される。

遊離脂肪酸とリゾリン脂質は、比較的水溶性であることなどを利用して除去することができる。

[0043] 前記PLA1については、前記効果が得られるものであれば、その由来などは特に制限されない。

前記PLA1として、例えば、アスペルギルス・オリゼ由来のPLA1が挙げられる。

かかるPLA1は、例えば、三菱化学フーズ株式会社などから購入可能である。

[0044] 前記PLA1の使用量については、前記総グリセロリン脂質の量に応じて適宜選択され得る。

好ましくは、総グリセロリン脂質1gに対して、0.15～0.45g、より好ましくは0.2～0.3gである。

[0045] 前記PLA1による酵素反応を、バッファー中で行うことができるが、このようなバッファーは、使用するPLA1に応じて適宜選択され、例えば、0.1Mクエン酸-HClバッファー（pH4.5）を用いることができる。

この場合、総グリセロリン脂質に前記バッファーを加えて溶解させてから、これにPLA1を加えればよい。

[0046] 前記バッファーの使用量については、酵素反応が進行し得るものであればよく、特に制限はないが、好ましくは総グリセロリン脂質1g当たり1~30mL、より好ましくは5~15mLである。

[0047] 反応条件については、適宜選択できる。

好ましくは温度30~70℃、より好ましくは温度45~55℃、さらに好ましくは温度50℃で攪拌させながら、好ましくは1~5時間、より好ましくは1~2時間反応させる。

その際のpHは、好ましくはpH3.5~5.5、より好ましくはpH4~5である。

[0048] この発明の製造方法においては、さらに、エーテルリン脂質を精製する工程を含めることができる。

前記精製工程を含めることによって、精製濃縮された、より優れた効果を有するエーテルリン脂質を得ることができるので、前記精製工程を含めることが好ましい。

具体的には、前記工程(ロ)で得られた、ジアシルリン脂質が分解された処理液を、さらに精製工程に付すことができる。

[0049] 前記精製は、公知の方法に従って行うことができる。

例えば、エーテルリン脂質は、ヘキサンに溶解するが、アセトンなどの水溶性ケトン系溶剤には難溶性であることから、これらの溶媒および水を適宜組み合わせて分配を行い、さらに水又は水溶液により溶液分配すること(溶媒分配法)で、リゾリン脂質を除去してエーテルリン脂質を精製することができる。

すなわち、アセトンなどの水溶性ケトン系溶媒によりリン脂質以外の中性脂質を除去でき、水系溶液分配によりエーテルリン脂質とリゾリン脂質とに分離できる。

[0050] 具体的には、前記処理液(加水分解処理液)に、5~10倍溶のヘキサン

・イソプロパノール混合液（3：2）を加えて分液ロートに移し、その約3分の2の水を加えて、2層に分け、上層（ヘキサン層）を回収することで、脂質分解産物（遊離脂肪酸、リゾリン脂質）、酵素タンパク質、酵素バッファーを除去できる。

さらに、20～25倍溶の、アセトンなどの水溶性ケトン系溶媒によりリン脂質以外の中性脂質を除去する。

[0051] この発明の製造方法によって得られるエーテルリン脂質は、主にエタノールアミンリン脂質とコリンリン脂質を含むものである。

このような脂質の構成については、前記エーテルリン脂質を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で解析・確認することができる。

[0052] かかる構成の製造方法によって得られるエーテルリン脂質は、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病、糖尿病などのメタボリックシンドローム、種々の感染症や免疫異常の治療および改善にきわめて有効である。

しかも、この発明の製造方法によれば、前記エーテルリン脂質を、高純度、特に純度80%以上で得ることができる。

[0053] 特に、二枚貝組織由来のエーテルリン脂質は、そのsn-2において、多くのドコサペンタエン酸（DHA）や、アラキドン酸（ARA）、エイコサペンタエン酸（EPA）と結合している。

すなわち、ドコサヘキサエノイル基、アラキドノイル基およびエイコサペンタエノイル基からなる群から選択される1種以上を残基として多く含むので、極めて優れた作用効果を有している。

[0054] かかるエーテルリン脂質は、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病、糖尿病などのメタボリックシンドローム、種々の感染症や免疫異常の治療および改善に有効であるので、生体内に摂取されることによって、これらの効果が発揮され得る。

[0055] 前記エーテルリン脂質を、飲食品の素材として、あるいは医薬の原料として、利用することができる。

このような飲食品および医薬は、公知の方法に従って製造すればよい。

[0056] さらに、前記エーテルリン脂質については、前述の如く、公知の又は将来開発される様々な飲食品の形態を適宜採用することができる。

この場合において、機能性食品又は特定保健用食品の形態についても、同様に採用することができる。

[0057] 様々な飲食品の製品の形態として、例えば、菓子（冷菓、ゼリー、ケーキ、キャンディー、チューインガムなど）、パン、牛乳やヨーグルトなどの乳製品などの各種製品を挙げることができる。

飲食品として使用できる調味剤や甘味剤を使用し、溶液としてドリンクの形態で使用することもできる。

[0058] なお、前記エーテルリン脂質は、使用される製品に混合して使用することが簡便であるが、前記作用を奏するに有効な量のエーテルリン脂質を含有すべきことは当然のことである。

例えば、前記エーテルリン脂質を、飲食品に、好ましくは0.01～80質量%程度、より好ましくは0.05～20質量%程度含有することができる。

実施例

[0059] 以下に、実施例を挙げて、この発明のエーテルリン脂質の製造方法を詳細に説明する。

なお、この発明は、これら実施例によって制限されるものではない。

[0060] <実施例1>

（アサリ由来エーテルリン脂質の製造）

（1）アサリ総リン脂質の抽出

貝殻を除いて得たアサリ約200gにヘキサン・イソプロパノール混合液（3：2）1,000mLを加えて、ブレンダーを用いて粉碎し、攪拌しながら室温に1時間置いた。

その後、吸引ろ過し、残渣を200mLのヘキサン・イソプロパノール混

合液（3：2）で洗い、合わせた濾液を分液ロートに移した。

分液ロートに水または硫酸ナトリウム水溶液（水150 mLに対して硫酸ナトリウム1 gを溶解させたもの）800 mLを加えて混和後、静置した。

2層に分離した下層を捨てて、上層のヘキサン層を回収した。

得られたヘキサン層を、ロータリーエバポレーターで乾固し、アサリ総リン脂質を得た。

[0061] (2) アサリ由来総リン脂質のHPLC解析

得られた総リン脂質について、下記条件でHPLCを行った。

その結果を、図1(a)に示す。

なお、図中、

DPG：ジホスホグリセリド

PE：エタノールアミンリン脂質

PC：コリンリン脂質

PS：セリンリン脂質

PI：イノシトールリン脂質

SM：スフィンゴミエリン

である。

[0062] <HPLCの条件>

使用機器：HPLC Agilent 1100 system (Agilent Technologies, Tokyo)

カラム：Lichrosphere 100 Diol (250×3 mm, 5 μm) (Agilent Technologies)

流量：0.8 ml/分

検出：ELSD (蒸発光検出器) (Agilent Technologies)

移動相：

(A) ヘキサン/イソプロパノール/酢酸 (82：17：1, v/v, 0.08% TEA*)

(B) イソプロパノール／水／酢酸（85：14：1，0.08%TEA*）

*TEA：トリエチルアミン

なお、時間帯と移動相（A）と（B）の液組成を、表1に示す。

[0063] [表1]

時間（分）	移動相（A）（%）	移動相（B）（%）
0	95	5
21	40	60
25	15	85
26	15	85
29	95	5
34	95	5

[0064] (3) 総リン脂質の酵素処理と抽出によるエーテルリン脂質の精製

得られた総リン脂質を、ホスホリパーゼA1（三菱化学フーズ（株）製）溶液（20mg/mL 0.1M クエン酸緩衝液（pH4.5））40mL中に分散させ、超音波などで、充分混和し、時々攪拌して、温度50℃、1時間反応させた。

その後、冷却し、反応を止めた。

ヘキサン／イソプロパノール（3：2）360mLを加えて、分液ロートに移し、混和後、水200mLを加えて、静置し、水層を除いた。

ヘキサン層を回収し、水200mLを加えて、混和した。

上層のヘキサン層を回収し、ロータリーエバポレーターで乾固した。

その後、残留しているコレステロールなどの中性脂質を除くため、これに、20倍溶のアセトンを加えてよく混和し、温度-30℃で2時間冷却した。

温度4℃、1000g、10分間で遠心して沈殿を回収し、精製されたアサリ由来エーテルリン脂質（純度 約80%）を得た。

[0065] (4) 精製されたアサリ由来エーテルリン脂質（エーテル型グリセロリン脂質）のHPLC解析

得られたアサリ（二枚貝）由来エーテル型グリセロリン脂質について、前記HPLC条件でHPLC解析を行った。

その結果を、図1（b）に示す。

[0066] この結果、純度 約80%の高純度アサリ由来エーテルリン脂質を得ることができた。

したがって、この発明によれば、生物系素材中に含まれているエーテルリン脂質を、高い純度で簡単な操作で製造することができることは明らかである。

[0067] <実施例2>

（シジミ由来エーテルリン脂質の製造）

（1）シジミ総リン脂質の抽出の抽出

アサリに代えてシジミを用いること以外、実施例1と同様の方法により、総リン脂質を得た。

[0068] （2）シジミ由来総リン脂質のHPLC解析

得られた総リン脂質について、実施例1と同様の条件でHPLC解析を行った。

その結果を、図2（a）に示す。

[0069] （3）総リン脂質の酵素処理と抽出によるエーテルリン脂質の精製

実施例1と同様の方法によって、総脂質からシジミ由来エーテルリン脂質を調製し、このエーテルリン脂質を精製した（純度 約90%）。

[0070] （4）精製されたシジミ由来エーテルリン脂質のHPLC解析

得られたシジミ由来エーテルリン脂質について、実施例1と同様の条件でHPLC解析を行った。

その結果を、図2（b）に示す。

[0071] この結果、純度 約90%の高純度シジミ由来エーテルリン脂質を得ることができた。

したがって、この発明によれば、生物系素材中に含まれているエーテルリン脂質を、高い純度で簡単な操作で製造することができることは明らかである

。

[0072] <実施例 3>

(鶏胸肉由来エーテルリン脂質の製造)

(1) 鶏胸肉総脂質の抽出の抽出

アサリに代えて鶏胸肉を用いること以外、実施例 1 と同様の方法により、総リン脂質を得た。

[0073] (2) 鶏胸肉由来総リン脂質の H P L C 解析

得られた総リン脂質について、実施例 1 と同様の条件で H P L C 解析を行った。

その結果を、図 3 (a) に示す。

なお、図中、

e P E : エタノールアミンエーテルリン脂質

e P C : コリンエーテルリン脂質

である。

[0074] (3) 総脂質の酵素処理と抽出によるエーテルリン脂質の精製

実施例 1 と同様の方法によって、総リン脂質から鶏胸肉由来エーテルリン脂質を調製し、このエーテルリン脂質を精製した (純度 約 9 2 %) 。

[0075] (4) 精製された鶏胸肉由来エーテルリン脂質の H P L C 解析

得られた鶏胸肉由来エーテルリン脂質について、実施例 1 と同様の条件で H P L C 解析を行った。

その結果を、図 3 (b) に示す。

[0076] この結果、純度 約 9 2 % の高純度鶏胸肉由来エーテルリン脂質を得ることができた。

したがって、この発明によれば、生物系素材中に含まれているエーテルリン脂質を、高い純度で簡単な操作で製造することができることは明らかである。

。

[0077] <実施例 4>

(エーテルリン脂質の全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸の分析)

二枚貝（アサリ、シジミ）由来のエーテルリン脂質、および鶏組織由来のエーテルリン脂質に含まれている全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸（EPA、DHAおよびARA）の割合について、下記方法に従い、HPLCを用いて、分析をした。

その結果を、表3および4、ならびに図4に示す。

[0078] （各種エーテルリン脂質の加水分解）

各種エーテルリン脂質を分取し、乾固したものを0.5規定水酸化カリウムのメタノール溶液で加水分解し、遊離脂肪酸を得た。

[0079] （各種エーテルリン脂質からの遊離脂肪酸のラベル）

上記エーテルリン脂質から加水分解で産生した、遊離脂肪酸を0.05% 9-アントレルチアゾメタン（ADAM）でラベルした。

[0080] （脂肪酸の分析）

前記ラベルした脂肪酸を、下記条件のHPLCで分析した。

[0081] [HPLCの条件]

使用機器：アジレント HPLC 1100 シリーズ（アジレント社）

カラム：Ultrasphere 100 RP-18e（メルク社）

流量：0.8 ml / 分

検出：蛍光検出器

移動相：

（A）アセトニトリル

（B）エタノール

（C）ヘキサン

なお、時間帯と移動相（A）、（B）、（C）の液組成を、表2に示す。

[0082] [表2]

時間 (分)	移動相 (A) (%)	移動相 (B) (%)	移動相 (C) (%)
0	100	0	0
16	44	32	24
16.1	100	0	0
24	100	0	0

[0083] [表3]

各種エーテルリン脂質の全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸 (%)

	アサリ アルケニル PE	シジミ アルケニル PE	鶏胸肉 アルケニル PE
EPA (20 : 5)	11.1	12.1	—
DHA (22 : 6)	31.8	23.2	14.7
ARA (20 : 4)	8.5	15.2	23.6

EPA : エイコサペンタエン酸

DHA : ドコサヘキサエン酸

ARA : アラキドン酸

[0084] [表4]

各種エーテルリン脂質の全脂肪酸中の多価不飽和脂肪酸 (%)

	アサリ アルキル PC	シジミ アルキル PC	鶏胸肉 アルケニル PC
EPA (20 : 5)	10.5	15.1	—
DHA (22 : 6)	37.4	25.5	5.6
ARA (20 : 4)	8.3	8.7	29.2

EPA : エイコサペンタエン酸

DHA : ドコサヘキサエン酸

ARA : アラキドン酸

[0085] 表3および4、ならびに図4から、二枚貝（アサリ、シジミ）由来のエーテルリン脂質は、そのsn-2において、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）およびアラキドン酸（ARA）を多量に結合していることが分かる。

一方、二枚貝由来のエーテルリン脂質と同時に同じ方法で分析した鶏胸肉由来のエーテルリン脂質では、PE、PCともにアルケニルリン脂質であって、アルキルPCは存在していない。

したがって、脂肪酸の構成を比較すると、二枚貝由来エーテルリン脂質には、EPAおよびDHAが多く含まれることが示された。

アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病、糖尿病などのメタボリックシンドローム、種々の感染症や免疫異常において、EPAおよびDHAが減少しており、食餌性の二枚貝由来のエーテルリ

ン脂質は、EPAおよびDHAを補う役目もするものである。

二枚貝由来のエーテルリン脂質には、このようにEPAおよびDHAが多数含まれているが、鶏胸肉由来のエーテルリン脂質には、EPAは含まれておらず、含まれているDHAも二枚貝由来のエーテルリン脂質よりも少量である。

よって、この発明の二枚貝由来のエーテルリン脂質は、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）およびアラキドン酸（ARA）などの高度多価不飽和脂肪酸を多く含むため、従来のエーテルリン脂質、特に鶏胸肉由来のエーテルリン脂質よりも優れた効果を奏することが期待される。

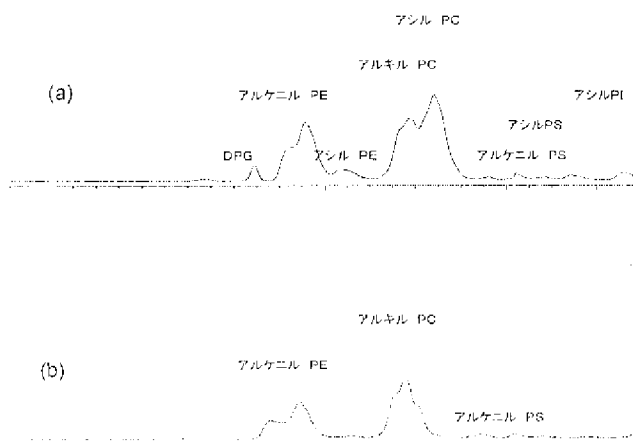
産業上の利用可能性

[0086] この発明によれば、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症などの脳神経病、糖尿病などのメタボリックシンドローム、種々の感染症や免疫異常の治療および改善に有効なエーテルリン脂質を、高純度かつ簡単な操作で製造することが可能となるので、医薬業界において幅広く利用されるものである。

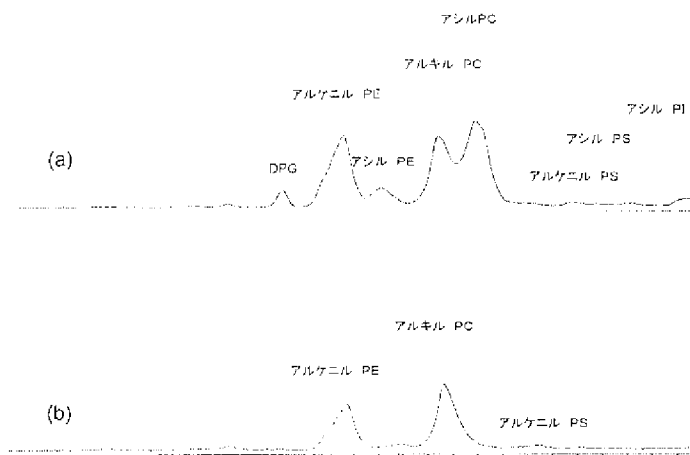
請求の範囲

- [請求項1] 生物系素材から、その総脂質を非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液で抽出する工程（イ）
ならびに
前記工程（イ）で得られた総脂質にホスホリパーゼ A 1 を作用させて、混在するジアシルリン脂質を分解する工程（ロ）
を含むこと
を特徴とするエーテルリン脂質の製造方法。
- [請求項2] 前記非極性有機溶媒・分岐アルコール混合液は、
ヘキサン・イソプロパノール混合液であること
を特徴とする請求項 1 に記載のエーテルリン脂質の製造方法。
- [請求項3] 前記工程（ロ）に付した後、精製工程に付すことにより、精製されたエーテルリン脂質を得る工程
を含むこと
を特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のエーテルリン脂質の製造方法。
- [請求項4] 前記精製工程は、
溶液分配によるものであること
を特徴とする請求項 3 に記載のエーテルリン脂質の製造方法。
- [請求項5] 前記溶液分配は、
脂質をヘキサンに抽出して、アセトン又は水によって分配するものであること
を特徴とする請求項 4 に記載のエーテルリン脂質の製造方法。

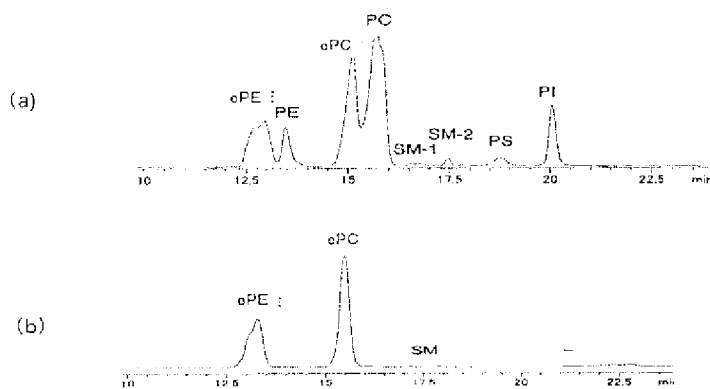
[図1]



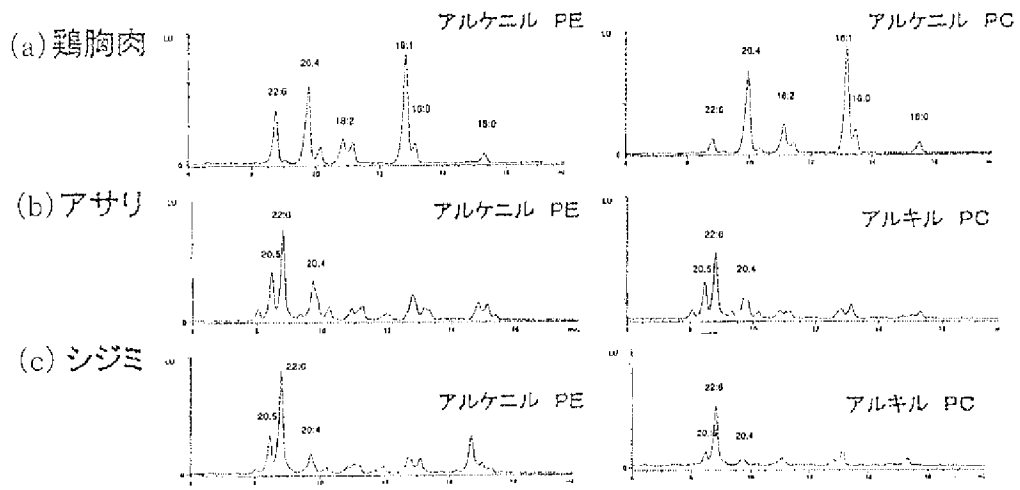
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/063617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C11B11/00(2006.01)i, C07F9/10(2006.01)i, 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) C11B11/00, C07F9/10, C12P9/00		
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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580/JSTChina (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	S.MAWATARI, et al., Simultaneous Preparation of Purified Plasmalogens and Sphingomyelin in Human Erythrocytes with Phospholipase A ₁ from <i>Aspergillus oryzae</i> , Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol.73, No.12, p.2621-2625 (2009).	1-5
Y	JP 2009-227765 A (ADEKA Corp.), 08 October 2009 (08.10.2009), claims; paragraphs [0012] to [0018], [0023]; examples (Family: none)	1-5
Y	JP 2013-53110 A (Teikyo University), 21 March 2013 (21.03.2013), claims; paragraphs [0013] to [0021]; examples (Family: none)	1-5
<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 23 June 2015 (23.06.15)		Date of mailing of the international search report 30 June 2015 (30.06.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/063617

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-53109 A (Teikyo University), 21 March 2013 (21.03.2013), claims; paragraphs [0024] to [0030]; examples (Family: none)	1-5
Y	WO 2012/039472 A1 (Boocs Medical Corp.), 29 March 2012 (29.03.2012), paragraphs [0026] to [0038] & CN 103118685 A & EP 2620154 A1 & KR 10-2013-0141493 A & US 2013/0172293 A1	1-5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C11B11/00(2006.01)i, C07F9/10(2006.01)i, 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. C11B11/00, C07F9/10, 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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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） CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580/JSTChina (JDreamIII)		
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 請求項の番号
X, Y	S. MAWATARI, et al., Simultaneous Preparation of Purified Plasmalogens and Sphingomyelin in Human Erythrocytes with Phospholipase A ₁ from Aspergillus orizae, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol.73, No.12, p.2621-2625 (2009).	1-5
<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 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 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 「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 23.06.2015	国際調査報告の発送日 30.06.2015	
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） 小久保 敦規 電話番号 03-3581-1101 内線 3480	4Z 4512

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 請求項の番号
Y	JP 2009-227765 A (株式会社 ADEKA) 2009.10.08, 特許請求の範囲, [0012]-[0018], [0023], 実施例 (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2013-53110 A (学校法人帝京大学) 2013.03.21, 特許請求の範囲, [0013]-[0021], 実施例 (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2013-53109 A (学校法人帝京大学) 2013.03.21, 特許請求の範囲, [0024]-[0030], 実施例 (ファミリーなし)	1-5
Y	WO 2012/039472 A1 (医療法人社団ブックス) 2012.03.29, [0026]-[0038] & CN 103118685 A & EP 2620154 A1 & KR 10-2013-0141493 A & US 2013/0172293 A1	1-5