

(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
2015 年 7 月 30 日(30.07.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/111700 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/20 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61K 31/201 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/051843
- (22) 国際出願日: 2015 年 1 月 23 日(23.01.2015)
- (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 2014-011871 2014 年 1 月 24 日(24.01.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP). 日東薬品工業株式会社 (NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6170006 京都府向日市上植野町南開 3 5 - 3 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 小川 順(OGAWA, Jun); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 岸野 重信(KISHINO, Shigenobu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本

町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 河田 照雄(KAWADA, Teruo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 高橋 信之(TAKAHASHI, Nobuyuki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 後藤 剛(GOTO, Tsuyoshi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 米島 靖記(YONEJIMA, Yasunori); 〒6170006 京都府向日市上植野町南開 3 5 - 3 日東薬品工業株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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,

[続葉有]

(54) Title: METABOLISM-IMPROVING AGENT COMPRISING RARE FATTY ACID

(54) 発明の名称: 希少脂肪酸を含む代謝改善剤

[図 1]			
	AA	BB	CC
No.	由来脂肪酸	略記	構造式
1	Linoleic acid	13-OH LA	
2		13-OXO LA	
3		10,13-OH LA	
4	Alpha-linolenic acid	13-OH ALA	
5		13-OXO ALA	
6		10,13-OH ALA	
7	Gamma-linolenic acid	13-OH GLA	
8		13-OXO GLA	
9		10,13-OH GLA	
10	Arachidonic acid	15-OH AA	

AA Original fatty acid
BB Abbreviation
CC Structural formula

(57) Abstract: Provided are: a metabolism-improving agent that comprises a rare fatty acid such as a hydroxylated fatty acid or an oxo fatty acid; and a food, a drug, etc., comprising the aforesaid metabolism-improving agent.

(57) 要約: 本発明は、水酸化脂肪酸、オキシ脂肪酸等の希少脂肪酸を含む代謝改善剤、さらに、当該代謝改善剤を含む食品、医薬品等を提供する。



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))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：希少脂肪酸を含む代謝改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、希少脂肪酸を含む代謝改善剤に関する。より詳細には、オキソ脂肪酸、水酸化脂肪酸等の希少脂肪酸の生理機能、例えば、脂質、糖、エネルギーの代謝改善作用を利用した代謝改善剤に関する。本発明は当該剤を含む食品、医薬品、飼料等にも関する。

背景技術

[0002] 近年、過食・運動不足等による肥満、特に内臓脂肪の蓄積を伴う生活習慣病が社会的問題となっている。メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満により、高血糖、高血圧、脂質異常症のうち2つ以上を合併し、動脈硬化が引き起こされやすくなった状態のことをいう。40～74才の日本人、男性では2人に1人、女性では5人に1人が、メタボリックシンドローム及びその予備軍と推計されている。そのため、メタボリックシンドロームにおける脂質蓄積の進行防止・解消を目的に、食事療法により摂取カロリーの適正化を図ることの重要性が提唱されている。

[0003] 食事において、脂質代謝改善作用や糖尿病改善作用等を有することが報告されている、共役リノール酸等の共役脂肪酸（非特許文献1）、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等の ω 3系多価不飽和脂肪酸（特許文献1）、中鎖脂肪酸（特許文献2）等を含む機能性脂質を摂取することに高い関心が寄せられている。

[0004] 加えて、トマトに含有される9-オキソ-オクタデカジエン酸や13-オキソ-オクタデカジエン酸等、一部のオキソ脂肪酸に、脂質代謝改善等の生活習慣病を改善する活性が報告されたことから（特許文献3、非特許文献2、3）、オキソ脂肪酸や水酸化脂肪酸等の希少脂肪酸の生理機能に対する注目も集まっている。

[0005] オキソ脂肪酸や水酸化脂肪酸等の希少脂肪酸の生産に関しては、発明者ら

が見いだした乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来の水和脱水酵素を用いる炭素数18のC10位水酸化脂肪酸ならびにC10位オキソ脂肪酸の生産法が報告されている（特許文献4）。また、これらのC10位水酸化脂肪酸ならびにC10位オキソ脂肪酸に関する代謝改善作用（特許文献5）、腸管保護作用（特許文献6）も報告されているが、炭素数18以外の水酸化脂肪酸・オキソ脂肪酸あるいはC10位以外に水酸基、カルボニル基を有する水酸化脂肪酸・オキソ脂肪酸に関する適当な生産法に関する報告はなかった。また、これらの希少脂肪酸誘導体の生理機能も不明であった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表2006-521368号公報

特許文献2：再表2009/096570号公報

特許文献3：特開2011-184411号公報

特許文献4：W02013/168310

特許文献5：W02014/069227

特許文献6：W02014/129384

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nagao K, (2005), J. Biosci. Bioeng., vol.100, no.2, p.152-157

非特許文献2：Kim Y-I, (2011), Mol. Nutr. Food Res., vol.55, p.585-593

非特許文献3：Kim Y-I, (2012), PLoS ONE, vol.7, no.2, e31317

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、希少脂肪酸を含む、脂質及び／又は糖等の代謝を改善する新規な代謝改善剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意研究を行なった結果、水酸化脂肪酸、

例えば、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、または、オキソ脂肪酸、例えば、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸が従来知られていない生理機能である、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（以下、「PPAR」ともいう）活性化作用を有することを見出した。

[0010] 以上の知見に基づき、本発明が完成された。

即ち、本発明は下記のとおりである：

[1] 以下の脂肪酸を含む、代謝改善剤：

- (1) 13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸、
- (2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、
- (3) 12位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、または
- (4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の脂肪酸；

[2] 以下の脂肪酸を含む、[1]に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸；

[3] 以下の脂肪酸を含む、[2]に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または

(2) 15位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸；

[4] 以下の脂肪酸を含む、[2]に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-オクタデカン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジオキソ-オクタデカン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸または13-オキソ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-11-エイコセン酸、15-ヒドロキシ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-11-エイコセン酸、15-オキソ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコ

サトリエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸または15-オキソ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、12-ヒドロキシ-シス-14-エイコセン酸、12-ヒドロキシ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、12-オキソ-シス-14-エイコセン酸、12-オキソ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、または12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸が、10-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸または10-オキソ-ヘキサデカン酸；

[5] 以下の脂肪酸を含む、[3]に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、または13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸；

[6] 肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から

選択される少なくとも 1 種の予防又は改善に使用される [1] – [5] のいずれか 1 つに記載の剤；

[7] 食品もしくは食品添加物である、[1] – [5] のいずれか 1 つに記載の剤；

[8] 医薬品である、[1] – [5] のいずれか 1 つに記載の剤；

[9] 飼料もしくは飼料添加物である、[1] – [5] のいずれか 1 つに記載の剤；

[10] 以下の脂肪酸を含む、PPAR活性促進剤：

- (1) 13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸、
- (2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、
- (3) 12位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、または
- (4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の脂肪酸；

[11] 以下の脂肪酸を含む、[10] に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも 1 つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも 1 つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも 1 つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸；

[12] 以下の脂肪酸を含む、[11] に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも 1 つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または

(2) 15位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも 1 つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸；

[1 3] 以下の脂肪酸を含む、[1 1] に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-オクタデカン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジオキソ-オクタデカン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸または13-オキソ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-11-エイコセン酸、15-ヒドロキシ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-11-エイコセン酸、15-オキソ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-

8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸または15-オキソ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、12-ヒドロキシ-シス-14-エイコセン酸、12-ヒドロキシ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、12-オキソ-シス-14-エイコセン酸、12-オキソ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、または12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸が、10-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸または10-オキソ-ヘキサデカン酸；

[14] 以下の脂肪酸を含む、[12]に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、または13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸；

〔15〕PPARがPPAR α またはPPAR γ である、〔10〕—「14」のいずれか1つに記載の剤；

〔16〕〔1〕—〔5〕のいずれか1つに記載の脂肪酸の有効量を患者に投与することを含む、代謝に関わる疾患の予防または治療方法；

〔17〕代謝に関わる疾患が肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、〔16〕に記載の方法；

〔18〕代謝に関わる疾患の予防または治療に使用するための、〔1〕—〔5〕のいずれか1つに記載の脂肪酸；

〔19〕代謝に関わる疾患が肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、〔18〕に記載の脂肪酸；

〔20〕代謝に関わる疾患の予防または治療剤を製造するための、〔1〕—〔5〕のいずれか1つに記載の脂肪酸の使用；

〔21〕代謝に関わる疾患が肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、〔20〕に記載の使用。

発明の効果

[0011] 本発明において、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸又は13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸のような水酸化脂肪酸又はオキソ脂肪酸（以下、水酸化脂肪酸等ともいう）が、従来知られていなかった生理機能であるPPAR活性化作用を有することを見出した。

本発明は、当該機能に基づき、前記の水酸化脂肪酸等の希少脂肪酸を含む代謝改善剤を提供する。当該剤は、医薬品、食品、飼料等、様々な分野において使用し得ることからも、本発明は、産業上極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]PPAR α / γ アゴニスト活性を測定した水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸の構造式を示す。

[図2]水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸のPPAR α アゴニスト活性の結果を示す。EtOHは陰性対照（エタノール添加）、GW7647は陽性対照（PPAR α アゴニスト添加）を示す。縦軸は、相対的なルシフェラーゼ活性を示す。

[図3]水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸のPPAR γ アゴニスト活性の結果を示す。EtOHは陰性対照（エタノール添加）、Troは陽性対照（PPAR γ アゴニスト添加）を示す。縦軸は、相対的なルシフェラーゼ活性を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の詳細を説明する。

[0014] 本発明において、「代謝改善」とは、脂質及び／又は糖及び／又はエネルギーの代謝が改善されることをいう。具体的には、例えば、脂質代謝改善とは、体組織、血中、又はリンパ組織中に存在する脂質の分解を促進する、脂質の合成を抑制する、脂肪組織等の体組織に脂質が蓄積することを予防及び／又は抑制する、若しくは、体組織等に蓄積した脂質を減少させることをいう。「脂質」とは、トリグリセリド、及び／又は、コレステロールをいい、脂肪酸を含む。

糖代謝改善とは、血中に存在する糖、及び／又は、糖化ヘモグロビン（HbA1c）の上昇を抑制する、空腹時血糖値を低下させる、若しくは、食事後の糖代謝を促進することをいう。さらに、糖代謝改善には、耐糖能異常（正常型と糖尿病型のいずれにも含まれない、糖尿病予備軍ともいえる病態）が改善されることも含まれる。「糖」とは、単糖、二糖または多糖をいう。

エネルギー代謝改善とは、摂取エネルギー量及び放出エネルギー量のバランスが、異常又は正常に調節できない状態を、正常な状態にする、又は近付けることをいう。

[0015] 前記代謝改善の指標として、PPAR活性を測定することができる。PPARには、少なくとも3種類のサブタイプPPAR α 、PPAR δ （ β と同一）、PPAR γ が存在することが知られている。PPAR α は主に肝臓、心臓、腎臓、骨格筋、褐色脂肪細胞等で発現し、脂肪酸の β 酸化に関与する多くの遺伝子の調整に関与している。PPAR δ は、比較的全身（脳、脂肪組織、皮膚等）に発現している

。PPAR γ には、少なくとも3種類のアイソフォームが存在し、主に白色脂肪細胞やマクロファージで発現し、脂肪細胞分化等に関与している。これらPPARのうち、少なくとも1種以上のPPARに対し、リガンド（アゴニスト、アンタゴニスト）活性の有無を確認し、アゴニスト活性を示す場合、代謝改善効果を有する可能性が高い、又は代謝改善効果を有すると判断する。一例として、FEBS Letters 514 (2002) p.315-322に記載のPPARレポーターアッセイを行うことができるが、当該方法に限定されない。

[0016] または、代謝改善の指標として、肥満・糖尿病モデル動物に、本発明の希少脂肪酸を投与し、体重、臓器重量、血糖値、中性脂肪値、酸素消費量、直腸温度等を測定し、その変化の有無を確認することができる。肥満・糖尿病モデル動物としては、当該性質を示す動物であれば限定されない。例えば、前記モデル動物として、市販のKKAyマウス、NODマウス、NSYマウス、TSODマウス、ZDF/Crl-Lepr^{fa}ラット、SDT/Jclラット等が挙げられる。体重、臓器重量、血糖値、中性脂肪値、酸素消費量、直腸温度等は、公知の方法で測定することができる。これらを指標に、体重又は臓器重量、若しくは血糖値、中性脂肪値の減少が認められる場合、あるいは、酸素消費量又は直腸温度の増加が認められる場合、代謝改善効果を有する可能性が高い、又は代謝改善効果を有すると判断する。

[0017] あるいは、代謝改善の指標として、LXRアゴニストにより誘導される脂質合成促進作用が、本発明の希少脂肪酸の添加により、抑制されるか否かを確認することができる。その手法は、例えば、Journal of Lipid Research 47, (2006) 2712-2717を参考に行うことができるが、当該方法に限定されない。前記文献に記載の手法としては、LXRアゴニストを添加し、脂質合成関連因子、例えば、(1)SREBP-1c、成熟型及び未成熟型のSREBP-1、SCD-1、FAS、ACC1及び/又はACC2のmRNA及び/又はタンパク質の発現量を測定する、(2)細胞内トリアシルグリセロール量を測定する、若しくは、(3)ルシフェラーゼアッセイを行うことができる。LXRアゴニストとしては、T0901317、22 (R) -ヒドロキシコレステロール、24 (S) -ヒドロキシコレステロール等が挙げられるが、こ

れらに限定されない。脂質合成関連因子のmRNA及び/又はタンパク質の発現量が低下する場合、脂質合成が抑制されたとし、代謝改善効果を有する可能性が高い、又は代謝改善効果を有すると判断する。

[0018] 本発明において、13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸とは、13位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸（以下、「13-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）、又は13位にカルボニル基を有する炭素数18のオキソ脂肪酸（以下、「13-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）をいう。ここで、10位及び13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸（以下、「10,13-dihydroxy脂肪酸」または「10,13-dioxo脂肪酸」と略記する場合がある）、あるいは、13位に水酸基および10位にカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸（以下、「10-oxo-13-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）も、「13-hydroxy脂肪酸」または「13-oxo脂肪酸」の一態様として包含される。また、13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸は、飽和脂肪酸であっても不飽和脂肪酸であってもよい。不飽和脂肪酸である場合は、6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が好ましい。

また、本発明において、15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸とは、15位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸（以下、「15-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）、又は15位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸（以下、「15-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）をいう。また、15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸は、飽和脂肪酸であっても不飽和脂肪酸であってもよい。不飽和脂肪酸である場合は、5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が好ましい。

また、本発明において、12位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸とは、12位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸（以下、「12-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）、又は12位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸（以下、「12-oxo脂肪酸」と略記する場合がある

）をいう。また、12位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸は、飽和脂肪酸であっても不飽和脂肪酸であってもよい。不飽和脂肪酸である場合は、5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が好ましい。

また、本発明において、10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の脂肪酸とは、10位に水酸基を有する炭素数16の水酸化脂肪酸（以下、「10-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）、又は10位にカルボニル基を有する炭素数16のオキソ脂肪酸（以下、「10-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）をいう。また、10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の脂肪酸は、飽和脂肪酸であっても不飽和脂肪酸であってもよい。

より具体的には、13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸としては、とくに限定されないが、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-オクタデカン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジオキソ-オクタデカン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸または13-オキソ-

トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸等が挙げられ、より好ましくは、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、または13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸が挙げられる。

また、15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸としては、とくに限定されないが、15-ヒドロキシ-シス-11-エイコセン酸、15-ヒドロキシ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-11-エイコセン酸、15-オキソ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸または15-オキソ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸等が挙げられ、より好ましくは、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸が挙げられる。

また、12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸としては、とくに限定されないが、12-ヒドロキシ-シス-14-エイコセン酸、12-ヒドロキシ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、12-オキソ-

シス-14-エイコセン酸、12-オキソ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、または12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

また、10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸としては、とくに限定されないが、10-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸または10-オキソ-ヘキサデカン酸等が挙げられる。

[0019] 本発明で使用するオキソ脂肪酸又は水酸化脂肪酸等の希少脂肪酸は、新規脂肪酸水和酵素（FA-HY）によって、炭素数16、18、20の不飽和脂肪酸から水酸化脂肪酸に製造し、さらに該水酸化脂肪酸の水酸基を酵素反応又は化学反応によりオキソ化することによってオキソ脂肪酸を製造することができる。具体的には、下記の手法により調製することができる。

[0020] 前記の新規脂肪酸水和酵素「FA-HY」は、

（a）配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質、

（b）配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失及び／又は置換及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質が有する酵素活性を有するタンパク質、あるいは

（c）配列番号1に示される塩基配列の相補鎖配列からなる核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によってコードされ、かつ配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質が有する酵素活性を有するタンパク質である。

[0021] 上記（b）に関し、より具体的には、（i）配列番号2に示されるアミノ酸配列中の1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（iii）配列番号2に示

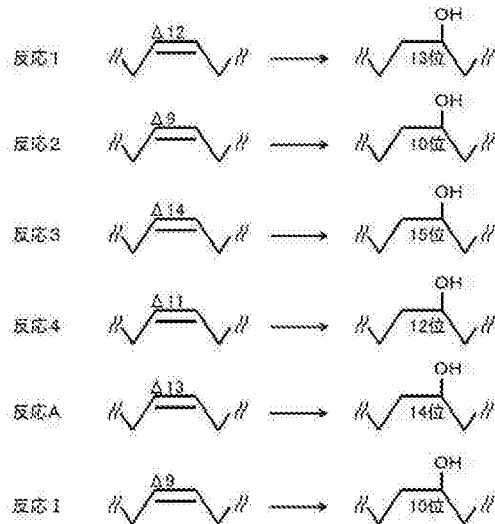
されるアミノ酸配列に1~20個、好ましくは1~10個、より好ましくは1~数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、（iv）配列番号2に示されるアミノ酸配列中の1~20個、好ましくは1~10個、より好ましくは1~数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、又は（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。性質の似たアミノ酸（例えば、グリシンとアラニン、バリンとロイシンとイソロイシン、セリンとトレオニン、アスパラギン酸とグルタミン酸、アスパラギンとグルタミン、リシンとアルギニン、システインとメチオニン、フェニルアラニンとチロシン等）同士の置換等であれば、さらに多くの個数の置換等がありうる。

上記のようにアミノ酸が欠失、置換又は挿入されている場合、その欠失、置換、挿入の位置は、上記酵素活性が保持される限り、特に限定されない。

[0022] 上記（c）において「ストリンジेंटな条件」とは、同一性が高いヌクレオチド配列同士、例えば70、80、90、95又は99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列同士がハイブリダイズし、それより同一性が低いヌクレオチド配列同士がハイブリダイズしない条件、具体的には通常のサザンハイブリダイゼーションの洗浄条件である60℃、1xSSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1xSSC、0.1%SDS、さらに好ましくは、68℃、0.1xSSC、0.1%SDSに相当する塩濃度及び温度で、1回、より好ましくは2~3回洗浄する条件等が挙げられる。

[0023]

[化1]



[0024] 上記（b）または（c）に関し、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質が有する酵素活性としては、（1）12位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸（以下、「cis-12不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、13位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸（13-hydroxy脂肪酸）に変換し得る酵素活性（反応1）、（2）9位にシス型二重結合を有する炭素数16の不飽和脂肪酸（以下、「cis-9不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、10位に水酸基を有する炭素数16の水酸化脂肪酸（10-hydroxy脂肪酸）に変換し得る酵素活性（反応2）、（3）14位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸（以下、「cis-14不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、15位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸（15-hydroxy脂肪酸）に変換し得る酵素活性（反応3）、（4）11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸（以下、「cis-11不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、12位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸（12-hydroxy脂肪酸）に変換し得る酵素活性（反応4）、シス-4,シス-7,シス-10,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサヘキサエン酸（DHA）を14-ヒドロキシシス-4,シス-7,シス-10,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸に変換しうる酵素活性（反応A）、およびシス-9-テトラデセン酸（ミリストレイン酸）を10-ヒドロ

キシ-テトラデカン酸に変換しうる酵素活性（反応I）の少なくとも1つ、好ましくは全てを有していれば特に制限はない。

上記の「cis-12不飽和脂肪酸」、「cis-9不飽和脂肪酸」、「cis-14不飽和脂肪酸」、「cis-11不飽和脂肪酸」としては、それぞれ、12位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸、9位にシス型二重結合を有する炭素数16の不飽和脂肪酸、14位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸、11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸であれば特に制限されず、例えば一価不飽和脂肪酸、二価不飽和脂肪酸、三価不飽和脂肪酸、四価不飽和脂肪酸、五価不飽和脂肪酸などが挙げられる。尚、本明細書において「脂肪酸」という場合、遊離の酸のみならず、エステル体、塩基性化合物との塩等をも包含する。「DHA」および「ミリストレイン酸」についても、遊離の酸のみならず、エステル体、塩基性化合物との塩等をも包含する。

[0025] 前記のFA-HYは、例えば、ラクトバチルス・アシドフィルスの菌体や培養液から、自体公知のタンパク質分離精製技術により単離することができる。または、FA-HYは、FA-HYを含むラクトバチルス・アシドフィルスの菌体自体またはその菌体破碎物として用いてもよい。FA-HYを含むラクトバチルス・アシドフィルスの菌体としては、前記のFA-HYを含む限り特に制限はないが、例えば、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NPMD）に2014年1月17日に寄託したNITE BP-01788などが挙げられる。あるいは、FA-HYをコードする遺伝子を単離し、適当なベクターにサブクローニングし、大腸菌などの適当な宿主に導入して培養し、組換えタンパク質として製造することもできる。FA-HYは精製されたものであっても、粗精製されたものであってもよい。あるいは、大腸菌等の菌体に発現させ、その菌体自体を用いても、培養液を用いてもよい。さらには、該酵素は遊離型のものでもよく、各種担体によって固定化されたものでもよい。

[0026] 前記のFA-HYをコードする核酸を含むベクターは、目的（例えば、タンパク質の発現）に応じて、ベクターを導入する宿主細胞に適したものを適宜選択し、使用することができる。発現ベクターである場合、適切なプロモーター

に機能可能に連結された本発明の核酸を含み、好ましくは本発明の核酸の下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含む。さらに、形質転換体を選択するための選択マーカー遺伝子（薬剤耐性遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）も含むこともできる。また、発現したタンパク質の分離・精製に有用なタグ配列をコードする配列等を含んでもよい。また、ベクターは、対象宿主細胞のゲノムに組み込まれるものであってもよい。そして、本発明のベクターは、コンピテント細胞法、プロトプラスト法、リン酸カルシウム共沈法等、自体公知の形質転換法で、対象宿主細胞内に導入することができる。

[0027] 本明細書において「宿主細胞」は、前記のFA-HYをコードする核酸を含むベクターを発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌及び高等真核細胞等が挙げられる。細菌の例としては、バチルス又はストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。FA-HYをコードする核酸を含むベクターが導入された組換え細胞は、宿主細胞に適した自体公知の方法により培養することができる。

[0028] 前記のFA-HYの「精製」は、自体公知の方法、例えば、遠心分離等で集菌した菌体を、超音波又はガラスビーズ等で摩砕した後、遠心分離等により細胞片等の固形物を除き、粗酵素液を調製し、さらに、硫酸、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフ法、ゲル電気泳動法等を用いることができる。

[0029] 前記のFA-HYは、上記の通り、cis-12不飽和脂肪酸、cis-9不飽和脂肪酸、cis-14不飽和脂肪酸、cis-11不飽和脂肪酸、DHA、ミリストレイン酸を基質として利用し、13-hydroxy脂肪酸、10-hydroxy脂肪酸、15-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸、14-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸、10-ヒドロキシ-テトラデカン酸にそれぞれ変換し得る酵素活性を有する。従って、[1] cis-12不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、13-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法1）、[2] c

is-9不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、10-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法2）、[3] cis-14不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、15-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法3）、[4] cis-11不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、12-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法4）、[A] DHAから、前記のFA-HYを用いた水和反応により、14-ヒドロキシ-シス-4,シス-7,シス-10,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸を製造する方法（製法A）、[I] ミリストレイン酸から、本発明のFA-HYを用いた水和反応により、10-ヒドロキシ-テトラデカン酸を製造する方法（製法I）がそれぞれ提供される。

前記の製法1の「cis-12不飽和脂肪酸」としては、例えば、シス-9,シス-12-オクタデカジエン酸（リノール酸）、シス-6,シス-9,シス-12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸）、シス-9,シス-12,シス-15-オクタデカトリエン酸（ α -リノレン酸）、シス-6,シス-9,シス-12,シス-15-オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）の他、W02013/168310で製造可能となった10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸、10-ヒドロキシ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸、10-ヒドロキシ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸、10-ヒドロキシ-シス-6,シス-12,シス-15-オクタデカトリエン酸、10-オキソ-シス-12-オクタデセン酸、10-オキソ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸、10-オキソ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-シス-6,シス-12,シス-15-オクタデカトリエン酸、シス-5,シス-9,シス-12-オクタデカトリエン酸（ピノレン酸）、トランス-5,シス-9,シス-12-オクタデカトリエン酸（コルンビン酸）等が挙げられる。もちろん、当該基質はW02013/168310以外の方法により得られたものであってもよい。

前記の製法1によって製造される「13-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、シス-9,シス-12-オクタデカジエン酸（リノール酸）から誘導される13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、シス-6,シス-9,シス-12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸）から誘導される13-ヒドロキシ-シス-6,シス-9-オクタデカジエン酸、シス-9,シス-12,シス-15-オクタデカトリエン酸（ α -リノ

レン酸) から誘導される13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、シス-6, シス-9, シス-12, シス-15-オクタデカテトラエン酸 (ステアリドン酸) から誘導される13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸から誘導される10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10-ヒドロキシ-シス-6, シス-12-オクタデカジエン酸から誘導される10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-ヒドロキシ-シス-12, シス-15-オクタデカジエン酸から誘導される10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-ヒドロキシ-シス-6, シス-12, シス-15-オクタデカトリエン酸から誘導される10, 13-ジヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-シス-12-オクタデセン酸から誘導される10-オキソ-13-ヒドロキシ-オクタデカン酸、10-オキソ-シス-6, シス-12-オクタデカジエン酸から誘導される10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-オキソ-シス-12, シス-15-オクタデカジエン酸から誘導される10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-オキソ-シス-6, シス-12, シス-15-オクタデカトリエン酸から誘導される10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、シス-5, シス-9, シス-12-オクタデカトリエン酸 (ピノレン酸) から誘導される13-ヒドロキシ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、トランス-5, シス-9, シス-12-オクタデカトリエン酸 (コルンビン酸) から誘導される13-ヒドロキシ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸等が挙げられる。

前記の製法2の「cis-9不飽和脂肪酸」としては、例えば、シス-9-ヘキサデセン酸 (パルミトレイン酸) 等が挙げられる。

前記の製法2によって製造される「10-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、シス-9-ヘキサデセン酸 (パルミトレイン酸) から誘導される10-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸等が挙げられる。

前記の製法3の「cis-14不飽和脂肪酸」としては、例えば、シス-11, シス-14-エイコサジエン酸、シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、シス-8, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸 (ジホモ- γ -リノレン酸)、シス-5

, シス-8, シス-11, シス-14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）、シス-8, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸、シス-5, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（シアドン酸）、シス-5, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸（ジュニペロン酸）等が挙げられる。

前記の製法3によって製造される「15-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、シス-11, シス-14-エイコサジエン酸から誘導される15-ヒドロキシ-シス-11-エイコセン酸、シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸から誘導される15-ヒドロキシ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、シス-8, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）から誘導される15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、シス-5, シス-8, シス-11, シス-14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）から誘導される15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、シス-8, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸から誘導される15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、シス-5, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（シアドン酸）から誘導される15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、シス-5, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸（ジュニペロン酸）から誘導される15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

前記の製法4の「cis-11不飽和脂肪酸」としては、例えば、シス-11, シス-14-エイコサジエン酸、シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、シス-8, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）、シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸（ミード酸）、シス-8, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸、シス-5, シス-8, シス-11, シス-14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）等が挙げられる。

前記の製法4によって製造される「12-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、シス-11, シス-14-エイコサジエン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-14-エイコセン酸、シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、シス-8, シス-11, シス

-14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）から誘導される12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸（ミード酸）から誘導される12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、シス-8, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、シス-5, シス-8, シス-11, シス-14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）から誘導される12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

[0030] 水和反応は、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液等）中で、基質である不飽和脂肪酸と前記のFA-HYとを適当な濃度で混合し、インキュベートすることにより行われ得る。基質濃度は、例えば1～1000g/L、好ましくは10～500g/L、より好ましくは20～250g/Lである。前記のFA-HYの添加量は、例えば、0.001～10mg/mL、好ましくは0.1～5mg/mL、より好ましくは0.2～2mg/mLである。

[0031] 水和反応（反応1～4、反応Aまたは反応I）には「補因子」を用いてよく、例えば、FAD等を用いることができる。その添加濃度は水和反応が効率良く進む濃度であればよい。好ましくは0.001～20mM、より好ましくは0.01～10mMである。

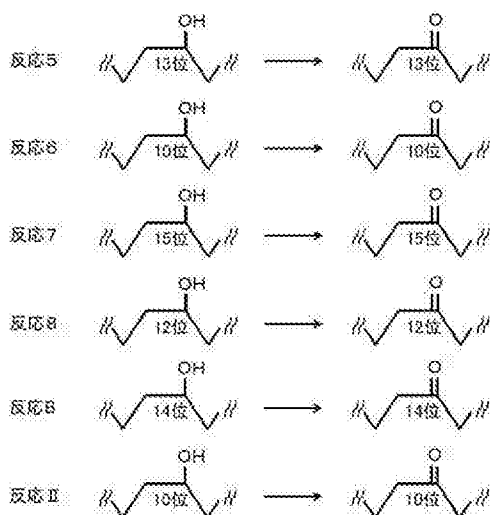
さらに、水和反応に「活性化剤」を用いてよく、例えば、NADH、NADPHからなる群から選ばれる1又は2の化合物が挙げられる。その添加濃度は水和反応が効率良く進む濃度であればよい。好ましくは0.1～20mM、より好ましくは1～10mMである。

[0032] 水和反応は、前記のFA-HYの好適温度、好適pHの範囲内で行うことが望ましい。例えば、反応温度は5～50℃、好ましくは20～45℃である。また、反応液のpHとしては、例えば、pH4～10、好ましくはpH5～9である。反応時間も特に制限はないが、例えば10分～72時間、好ましくは30分～36時間である。

[0033] 本発明の好ましい一実施態様においては、前記のFA-HYは、それをコードす

る核酸を含む発現ベクターが導入された組換え細胞（例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等）の形態で反応系に提供される。この場合、当該細胞の培養に適した液体培地に、基質及び必要に応じて補因子や活性化剤を添加して、当該細胞を培養することにより、水和反応を行うこともできる。

[0034] [化2]



[0035] 更に、脱水素反応もしくはクロム酸を用いた化学的酸化により、前記の製法1～4、製法A、製法Iで得られた13-hydroxy脂肪酸から13位にカルボニル基を有する炭素数18のオキソ脂肪酸（以下、「13-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）（反応5）、10-hydroxy脂肪酸から10位にカルボニル基を有する炭素数16のオキソ脂肪酸（以下「10-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）（反応6）、15-hydroxy脂肪酸から15位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸（以下、「15-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）（反応7）、12-hydroxy脂肪酸から12位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸（以下、「12-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）（反応8）、14-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸から14-オキソ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸（反応B）、10-ヒドロキシ-テトラデカン酸から10-オキソ-テトラデカン酸（反応II）がそれぞれ生成される。

[0036] 従って、[5] cis-12不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、13-hydroxy脂肪酸を誘導し、該13-hydroxy脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、13-oxo脂肪酸を製造する方法（製法5）、[6] cis-9不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、10-hydroxy脂肪酸を誘導し、該10-hydroxy脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、10-oxo脂肪酸を製造する方法（製法6）、[7] cis-14不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、15-hydroxy脂肪酸を誘導し、該15-hydroxy脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、15-oxo脂肪酸を製造する方法（製法7）、[8] cis-11不飽和脂肪酸から、前記のFA-HYを用いた水和反応により、12-hydroxy脂肪酸を誘導し、該12-hydroxy脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、12-oxo脂肪酸を製造する方法（製法8）、[B] DHAから、本発明のFA-HYを用いた水和反応により、14-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸を誘導し、該14-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、14-オキソ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸を製造する方法（製法B）、[II] ミリストレイン酸から、本発明のFA-HYを用いた水和反応により、10-ヒドロキシ-テトラデカン酸を誘導し、該10-ヒドロキシ-テトラデカン酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、10-オキソ-テトラデカン酸を製造する方法（製法II）がそれぞれ提供される。

前記の製法5～8の「cis-12不飽和脂肪酸」、「cis-9不飽和脂肪酸」、「cis-14不飽和脂肪酸」、「cis-11不飽和脂肪酸」としては、上記の製法1～4に記載の基質と同様である。

前記の製法5によって製造される「13-oxo脂肪酸」としては、例えば、シス-9, シス-12-オクタデカジエン酸（リノール酸）から誘導される13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、シス-6, シス-9, シス-12-オクタデカトリエン酸（ γ -リノレン酸）から誘導される13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、シス-9, シス-12, シス-15-オクタデカトリエン酸（ α -リノレン酸）から誘

導される13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、シス-6, シス-9, シス-12, シス-15-オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）から誘導される13-オキソ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸あるいは10-オキソ-シス-12-オクタデセン酸から誘導される10, 13-ジオキソ-オクタデカン酸、10-ヒドロキシ-シス-6, シス-12-オクタデカジエン酸あるいは10-オキソ-シス-6, シス-12-オクタデカジエン酸から誘導される10, 13-ジオキソ-シス-6-オクタデセン酸、10-ヒドロキシ-シス-12, シス-15-オクタデカジエン酸あるいは10-オキソ-シス-12, シス-15-オクタデカジエン酸から誘導される10, 13-ジオキソ-シス-15-オクタデセン酸、10-ヒドロキシ-シス-6, シス-12, シス-15-オクタデカトリエン酸あるいは10-オキソ-シス-6, シス-12, シス-15-オクタデカトリエン酸から誘導される10, 13-ジオキソ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、シス-5, シス-9, シス-12-オクタデカトリエン酸（ピノレン酸）から誘導される13-オキソ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、トランス-5, シス-9, シス-12-オクタデカトリエン酸（コロンビン酸）から誘導される13-オキソ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸等が挙げられる。

前記の製法6によって製造される「10-oxo脂肪酸」としては、例えば、シス-9-ヘキサデセン酸（パルミトレイン酸）から誘導される10-オキソ-ヘキサデカン酸等が挙げられる。

前記の製法7によって製造される「15-oxo脂肪酸」としては、例えば、シス-11, シス-14-エイコサジエン酸から誘導される15-オキソ-シス-11-エイコセン酸、シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸から誘導される15-オキソ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、シス-8, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）から誘導される15-オキソ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、シス-5, シス-8, シス-11, シス-14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）から誘導される15-オキソ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、シス-8, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸から誘導される15-オキソ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、

シス-5, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（シアドン酸）から誘導される15-オキソ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、シス-5, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸（ジュニペロン酸）から誘導される15-オキソ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

前記の製法8によって製造される「12-oxo脂肪酸」としては、例えば、シス-11, シス-14-エイコサジエン酸から誘導される12-オキソ-シス-14-エイコセン酸、シス-11, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸から誘導される12-オキソ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、シス-8, シス-11, シス-14-エイコサトリエン酸（ジホモ- γ -リノレン酸）から誘導される12-オキソ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸（ミード酸）から誘導される12-オキソ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、シス-8, シス-11, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸から誘導される12-オキソ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、シス-5, シス-8, シス-11, シス-14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）から誘導される12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

[0037] 前記の製法5～8、製法Bまたは製法IIで用いられる脱水素酵素としては、13-hydroxy脂肪酸、10-hydroxy脂肪酸、15-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸、14-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸、10-ヒドロキシ-テトラデカン酸を基質として利用し、13-oxo脂肪酸、10-oxo脂肪酸、15-oxo脂肪酸、12-oxo脂肪酸、14-オキソ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸、10-オキソ-テトラデカン酸にそれぞれ変換し得る酵素であれば特に制限はないが、例えば、乳酸菌由来の水酸化脂肪酸デヒドロゲナーゼ（CLA-DH）が好ましい。より好ましくは、ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）由来のCLA-DHであり、特に好ましくは、L. プランタルムFERM BP-10549菌株由来のCLA-DHである。CLA-DHは、特開2007-259712号公報に記載される方法や、W02013/168310に記載される方法により取得することができる。脱水素酵素は精製されたものであっても、粗精製されたものであってもよい。あるいは、大腸菌等の菌

体に発現させ、その菌体自体を用いても、培養液を用いてもよい。さらには、該酵素は遊離型のものでもよく、各種担体によって固定化されたものでもよい。

[0038] 脱水素反応は、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液等）中で、基質である13-hydroxy脂肪酸、10-hydroxy脂肪酸、15-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸、14-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-10, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸、10-ヒドロキシ-テトラデカン酸と脱水素酵素とを適当な濃度で混合し、インキュベートすることにより行われ得る。基質濃度は、例えば0.01~100g/L、好ましくは0.05~50g/L、より好ましくは0.1~5g/Lである。脱水素酵素の添加量は、例えば、0.001~10mg/mL、好ましくは0.005~1mg/mL、より好ましくは0.05~0.2mg/mLである。

[0039] 脱水素反応には「補因子」を用いてよく、例えば、NAD⁺やNADP⁺等を用いることができる。その添加濃度は酸化反応が効率良く進む濃度であればよい。好ましくは0.001~20mM、より好ましくは0.01~10mMである。

[0040] 脱水素反応は、脱水素酵素の好適温度、好適pHの範囲内で行うことが望ましい。例えば、反応温度は5~50℃、好ましくは20~45℃である。また、反応液のpHとしては、例えば、pH4~10、好ましくはpH5~9である。反応時間も特に制限はないが、例えば10分~72時間、好ましくは30分~36時間である。

[0041] 本発明の一実施態様においては、脱水素酵素は、それをコードする核酸を含む発現ベクターが導入された組換え細胞（例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等）の形態で反応系に提供される。この場合、当該細胞の培養に適した液体培地に、基質及び必要に応じて補因子や活性化剤を添加して、当該細胞を培養することにより、酸化反応を行うこともできる。

[0042] また脱水素反応を、クロム酸を用いた化学的酸化に置き換えることにより、化学的に酵素反応と同様のオキソ脂肪酸を得られることができる。

[0043] 化学的酸化としては、自体公知の方法、例えばクロム酸酸化、好ましくはジョーンズ酸化等が挙げられる。クロム酸としては、無水クロム酸CrO₃、クロ

ム酸 H_2CrO_4 、二クロム酸 $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ といった化合物の塩や錯体を使用することができる。具体的には、無水クロム酸2.67 gに硫酸 2.3 ml、水7.7 mlを加えた物を、アセトン90 ml加えてクロム酸溶液を作成する。三角フラスコに、2 gの水酸化脂肪酸と、40 mlのアセトンを加え、氷上にてスターラーで攪拌しながら上記のクロム酸溶液を1滴ずつ加える。溶液が青色から抹茶色になったらクロム酸溶液の滴下をやめ、イソプロピルアルコールを用いて反応を停止する。析出した沈殿をろ紙を用いて濾過し、分液ロートに入れさらにジエチルエーテルを150 ml及びミリQ水300 mlを加えてよく振り、ジエチルエーテル層を数回ミリQ水で洗浄する。洗浄後のジエチルエーテル層に硫酸ナトリウム（無水）を適量加えて攪拌し残存水分を除去する。添加した無水硫酸ナトリウムをろ紙を用いてろ過し、得られたジエチルエーテル層をロータリーエバポレーターにて濃縮し、反応産物（オキシ脂肪酸）及び未反応の基質を抽出する。

[0044] 無水クロム酸による酸化反応により得られた抽出物（基質と生成物（オキシ脂肪酸）を含む混合物）を中圧クロマトグラフィーに供し、カラムから出てきた溶液をフラクションに分けて回収する。回収した各フラクションをLC/MS及びガスクロマトグラフィーにより分析し、オキシ脂肪酸のみが含まれたフラクションを集めてロータリーエバポレーターにて濃縮する。得られた最終生成物の一部を用いてメチルエステル化した後に、ガスクロマトグラフィーにてオキシ脂肪酸の純度を評価し、純度98%以上のオキシ脂肪酸を得ることができる。

[0045] 本発明の希少脂肪酸を含む代謝改善剤は、生活習慣病の改善に適用することもできる。「生活習慣病」とは、食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣がその発症、進行に関与する疾患群をいい、成人肥満、小児肥満、栄養失調症、拒食症、胃がん、大腸がん、痛風、高血圧、動脈硬化症、腎臓結石、心筋梗塞、狭心症、胃潰瘍、腎臓病、骨粗しょう症、歯周炎、アルコール性肝炎、肝硬変、肝臓がん、肺がん、気管支炎、肺気腫、歯周病、脳卒中、脳梗塞、動脈瘤、過労死、不眠症等の病態が挙げられる。

[0046] さらに、本発明の代謝改善剤は、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病、妊婦糖尿病等）、糖尿病合併症（動脈硬化性疾患、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等）、脂質代謝異常、高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、インスリン抵抗性、脂肪肝の予防又は改善に使用することもできる。

あるいは、ヒト、又はヒト以外の動物（例えば、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ウシ、ニワトリ、インコ、九官鳥、ヤギ、ウマ、ヒツジ、サル等）に本発明の代謝改善剤を投与し、肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、インスリン抵抗性、脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種を予防又は治療するために、使用することができる。

[0047] また、本発明の希少脂肪酸は、PPAR活性の促進剤としても使用することができる。PPARには、少なくとも3種類のサブタイプPPAR α 、PPAR δ （ β と同一）、PPAR γ が存在している。後述する実施例の通り、本発明の希少脂肪酸は、PPAR α 、PPAR γ に対してアゴニスト活性を有した。従って、これらPPARのうち、少なくとも1種以上のPPAR（好ましくはPPAR α またはPPAR γ ）に対し、リガンド（アゴニスト、アンタゴニスト）活性の有無を確認し、アゴニスト活性を示す場合、代謝改善するためのPPAR活性の促進剤として使用することができる。

[0048] 本発明の希少脂肪酸を含む代謝改善剤（またはPPAR活性促進剤）は、例えば、医薬品、食品、飼料、化粧品等として、あるいはそれらに配合して使用することができる。

当該医薬品の剤型としては、散剤、顆粒剤、丸剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤、懸濁剤、座剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、粘付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製されるが、水酸化脂肪酸等は水に難溶性であるため、植物性油、動物性油等の非親水性有機溶媒に溶解するか又は、乳化剤、分散剤もしくは界面活性剤等とともに、ホモジナイザー（高圧ホモジナ

イザー)を用いて水溶液中に分散、乳化させて用いる。

[0049] 製剤化のために用いることができる添加剤には、例えば大豆油、サフラワー油、オリーブ油、胚芽油、ひまわり油、牛脂、いわし油等の動植物性油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール等の多価アルコール、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル等の界面活性剤、精製水、乳糖、デンプン、結晶セルロース、D-マンニトール、レシチン、アラビアガム、ソルビトール液、糖液等の賦形剤、甘味料、着色料、pH調整剤、香料等を挙げることができる。なお、液体製剤は、服用時に水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形であってもよい。また、錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしても良い。

[0050] 注射剤の形で投与する場合には、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経皮、関節内、滑液嚢内、胞膜内、骨膜内、舌下、口腔内等に投与することが好ましく、特に静脈内投与又は腹腔内投与が好ましい。静脈内投与は、点滴投与、ボラス投与のいずれであってもよい。

[0051] 本発明の代謝改善剤を食品もしくは食品添加物として使用する場合、当該食品は、溶液、懸濁物、粉末、固体成形物等、経口摂取可能な形態であればよく、特に限定するものではない。具体例としては、サプリメント（散剤、顆粒剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤等）、飲料（炭酸飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料、果汁飲料、野菜飲料、豆乳飲料、コーヒー飲料、茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、栄養飲料、アルコール飲料等）、菓子（グミ、ゼリー、ガム、チョコレート、クッキー、キャンデー、キャラメル、和菓子、スナック菓子等）、即席食品類（即席麺、レトルト食品、缶詰、電子レンジ食品、即席スープ・みそ汁類、フリーズドライ食品等）、油、油脂食品（マヨネーズ、ドレッシング、バター、クリーム、マーガリン等）、小麦粉製品（パン、パスタ、麺、ケーキミックス、パン粉等）、調味料（ソース、トマト加工調味料、風味調味料、調理ミックス、つゆ類等）、畜産加工品（畜肉ハム・ソーセージ等）が挙げら

れる。

[0052] 上記食品には、必要に応じて各種栄養素、各種ビタミン類（ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK等）、各種ミネラル類（マグネシウム、亜鉛、鉄、ナトリウム、カリウム、セレン等）、食物繊維、分散剤、乳化剤等の安定剤、甘味料、呈味成分（クエン酸、リンゴ酸等）、フレーバー、ローヤルゼリー、プロポリス、アガリクス等を配合することができる。

[0053] 本発明の代謝改善剤を飼料もしくは飼料添加物として使用する場合、当該飼料としては、ペットフード、畜産又は水産養殖飼料添加物等が挙げられる。

[0054] 本発明の代謝改善剤を化粧品もしくは化粧品添加物として使用する場合、当該化粧品としては、クリーム、ゲル、乳液、美容液、ローション、マイクロエマルジョンエッセンス、パック、ファンデーション、口紅、アイシャドー、シャンプー、コンディショナー、入浴剤等が挙げられ、香料等を混合してもよい。

[0055] 本発明の医薬品、食品、飼料、化粧品等に配合される水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸は、1種類のみであってもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

本発明の医薬品の投与量又は本発明の食品の摂取量は、患者又は摂取者の年齢及び体重、症状、投与時間、剤型、投与方法、薬剤の組み合わせ等に依存して適宜決定できる。例えば、本発明の医薬品を経口投与する場合、有効成分である水酸化脂肪酸等の総量として、成人1日当たり0.02~100mg/kg体重、好ましくは0.2~50mg/kg体重の範囲で、また、非経口的に投与する場合は0.002mg~50mg/kg体重、好ましくは0.02~50mg/kg体重の範囲で、一日1回もしくは数回（2~5回）に分けて投与することができる。また、食品として摂取する場合には、有効成分である水酸化脂肪酸等の総量が、成人1人1日当たり1~6000mgの範囲、好ましくは10~3000mgの範囲の摂取量となるように、食品に配合することができる。本発明の飼料の摂取量及び本発明の化粧品

の使用量についても、それぞれ上記食品の摂取量及び上記医薬品の投与量に準じて適宜決定することができる。

[0056] 以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示にすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例

[0057] 本発明で使用した(1) 13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸(「13-OH LA」と示す)、(2) 13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸(「13-OXO LA」と示す)、(3) 10,13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸(「10,13-OH LA」と示す)、(4) 13-ヒドロキシ-シス-9,シス-15-オクタデカジエン酸(「13-OH ALA」と示す)、(5) 13-オキソ-シス-9,シス-15-オクタデカジエン酸(「13-OXO ALA」と示す)、(6) 10,13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸(「10,13-OH ALA」と示す)、(7) 13-ヒドロキシ-シス-6,シス-9-オクタデカジエン酸(「13-OH GLA」と示す)、(8) 13-オキソ-シス-6,シス-9-オクタデカジエン酸(「13-OXO GLA」と示す)、(9) 10,13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸(「10,13-OH GLA」と示す)、(10) 15-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-11-エイコサトリエン酸(「15-OH AA」と示す)等の水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸等は、上記方法に基づき調製した。(1)-(10)の構造式と由来の脂肪酸について図1に示す。GW7647(PPAR α アゴニスト)、Troglitazone(PPAR γ アゴニスト)は、シグマアルドリッチから、その他の試薬は和光純薬又はナカライテスク等から購入した。

[0058] (実施例1) PPAR α 、 γ リガンド活性の測定

水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸等の機能を評価するため、PPAR α 、 γ の活性化能を測定した。当該測定はNobuyuki Takahashiら、FEBS Letters 514 (2002) p315-322、「Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes」のMaterial and methods Reporter plasmids and luciferase assaysの欄を参照して行った。詳細には、PPAR α 、 γ リガンド活性は、PPARリガンド結合領域とGAL4 DNA結合領域との融合タンパクに対する結合および標的遺伝

子活性化をルシフェラーゼの発現で評価するレポーター・アッセイにより測定した。具体的には、CV-1細胞に、PPAR α , γ リガンド結合領域とGAL4 DNA結合領域の融合タンパク質をコードするDNAを含むプラスミドと、GAL4結合DNA配列にルシフェラーゼをつないだレポータープラスミドを導入し、この細胞に、以下に記載のリガンドを添加して、インキュベートした後にルシフェラーゼ活性の検出を行った。

サンプルはエタノールを用いて濃度調整（10 μ M及び30 μ M）を行った。陰性コントロールにはエタノール、陽性対照にはPPAR α , γ リガンド剤 GW7647(10nM)、troglitazone（5 μ M）をそれぞれ用いた。結果を図2、図3に示す。

図2、3から、(1)－(10)の脂肪酸全てにおいてPPAR α 及び γ アゴニスト活性が認められた。(8)13-OXO GLAは強いPPAR α アゴニスト活性が、(5)13-OXO ALAは強いPPAR γ アゴニスト活性が認められた。

[0059] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明である。

ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明は、水酸化脂肪酸等の生理機能として、従来知られていない、脂質及び／又は糖及び／又はエネルギー代謝改善効果を有することを明らかにした。当該水酸化脂肪酸及び／又はオキソ脂肪酸等を含む脂質及び／又は糖及び／又はエネルギー代謝改善剤は、医薬品、食品、飼料等様々な分野へ適用可能であり、本発明は産業上極めて有用である。

本出願は、日本で出願された特願2014-011871（出願日：平成26年1月24日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

[0061]

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	JPO-PAS i222
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	092263

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0025
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
1-3-3	寄託の日付	2014年 01月 17日 (17.01.2014)
1-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-01788
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

請求の範囲

[請求項1]

以下の脂肪酸を含む、代謝改善剤：

- (1) 13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸、
- (2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、
- (3) 12位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、
または
- (4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の脂肪酸。

[請求項2]

以下の脂肪酸を含む、請求項1に記載の剤：

- (1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、
- (2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、
- (3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または
- (4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸。

[請求項3]

以下の脂肪酸を含む、請求項2に記載の剤：

- (1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または
- (2) 15位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸。

[請求項4]

以下の脂肪酸を含む、請求項2に記載の剤：

- (1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂

脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-オクタデカン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジオキソ-オクタデカン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸または13-オキソ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-11-エイコセン酸、15-ヒドロキシ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-11-エイコセン酸、15-オキソ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15

-オキソ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸または15-オキソ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、12-ヒドロキシ-シス-14-エイコセン酸、12-ヒドロキシ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、12-オキソ-シス-14-エイコセン酸、12-オキソ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、または12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸が、10-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸または10-オキソ-ヘキサデカン酸。

[請求項5] 以下の脂肪酸を含む、請求項3に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、または13-オキソ-シス-

9, シス-15-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸。

[請求項6] 肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種の予防又は改善に使用される請求項1-5のいずれか1項に記載の剤。

[請求項7] 食品もしくは食品添加物である、請求項1-5のいずれか1項に記載の剤。

[請求項8] 医薬品である、請求項1-5のいずれか1項に記載の剤。

[請求項9] 飼料もしくは飼料添加物である、請求項1-5のいずれか1項に記載の剤。

[請求項10] 以下の脂肪酸を含む、PPAR活性促進剤：

(1) 13位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数18の脂肪酸、
(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、
(3) 12位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の脂肪酸、
または

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の脂肪酸。

[請求項11] 以下の脂肪酸を含む、請求項10に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸。

[請求項12] 以下の脂肪酸を含む、請求項11に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸、または

(2) 15位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸。

[請求項13] 以下の脂肪酸を含む、請求項11に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-オクタデカン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、10-オキソ-13-ヒドロキシ-シス-6, シス-15-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9, シス-15-オクタデカトリエン酸、10, 13-ジオキソ-オクタデカン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-15-オクタデセン酸、10, 13-ジオキソ-シス-6, シス

-15-オクタデカジエン酸、13-オキソ-シス-5, シス-9-オクタデカジエン酸または13-オキソ-トランス-5, シス-9-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-11-エイコセン酸、15-ヒドロキシ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-11-エイコセン酸、15-オキソ-シス-11, シス-17-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-8, シス-11-エイコサジエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸または15-オキソ-シス-8, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、15-オキソ-シス-5, シス-11-エイコサジエン酸または15-オキソ-シス-5, シス-11, シス-17-エイコサトリエン酸、

(3) 12位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の飽和脂肪酸または5位、8位、14位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、12-ヒドロキシ-シス-14-エイコセン酸、12-ヒドロキシ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-ヒドロキシ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、12-オキソ-シス-14-エイコセン酸、12-オキソ-シス-14, シス-17-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-5, シス-8-エイコサジエン酸、12-オキソ-シス-8, シス-14, シス-17-エイコサトリエン酸、または12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14-エイコサトリエン酸、

(4) 10位に水酸基またはカルボニル基を有する炭素数16の飽和脂肪酸が、10-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸または10-オキソ-ヘキサデカン酸。

[請求項14] 以下の脂肪酸を含む、請求項12に記載の剤：

(1) 13位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数18の飽和脂肪酸または6位、9位、15位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、13-ヒドロキシ-シス-9-オクタデセン酸、13-ヒドロキシ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、10, 13-ジヒドロキシ-オクタデカン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-6-オクタデセン酸、10, 13-ジヒドロキシ-シス-15-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-9-オクタデセン酸、13-オキソ-シス-6, シス-9-オクタデカジエン酸、または13-オキソ-シス-9, シス-15-オクタデカジエン酸、

(2) 15位に水酸基もしくはカルボニル基を有する炭素数20の5位、8位、11位、17位に少なくとも1つのシス型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、15-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-11-エイコサトリエン酸。

[請求項15] PPARがPPAR α またはPPAR γ である、請求項10-14のいずれか1項に記載の剤。

[請求項16] 請求項1-5のいずれか1項に記載の脂肪酸の有効量を患者に投与することを含む、代謝に関わる疾患の予防または治療方法。

[請求項17] 代謝に関わる疾患が肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項16に記載の方法。

[請求項18] 代謝に関わる疾患の予防または治療に使用するための、請求項1-5のいずれか1項に記載の脂肪酸。

[請求項19] 代謝に関わる疾患が肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項18

に記載の脂肪酸。

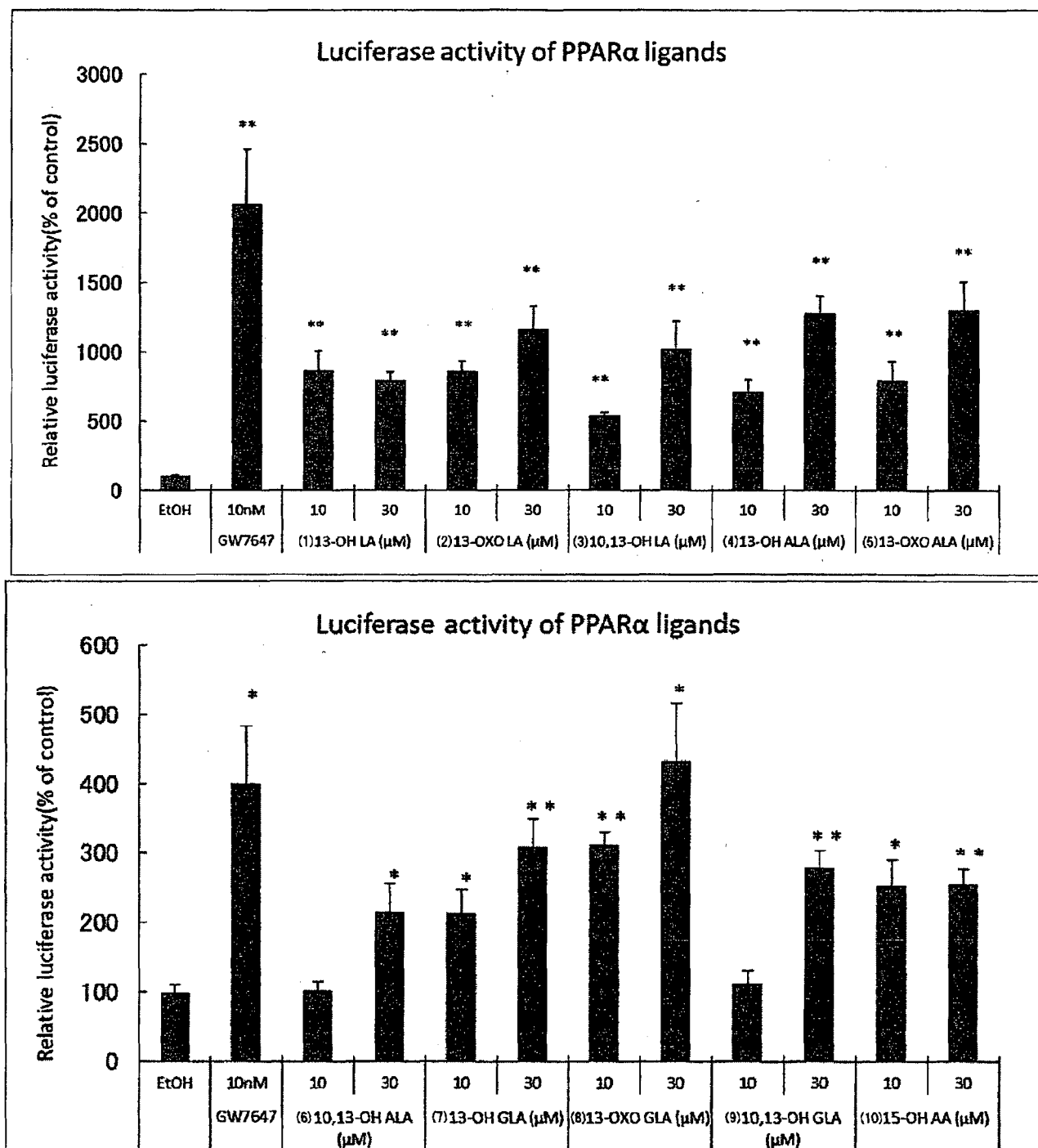
[請求項20] 代謝に関わる疾患の予防または治療剤を製造するための、請求項 1
～5 のいずれか 1 項に記載の脂肪酸の使用。

[請求項21] 代謝に関わる疾患が肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症、及び
脂肪肝からなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 20
に記載の使用。

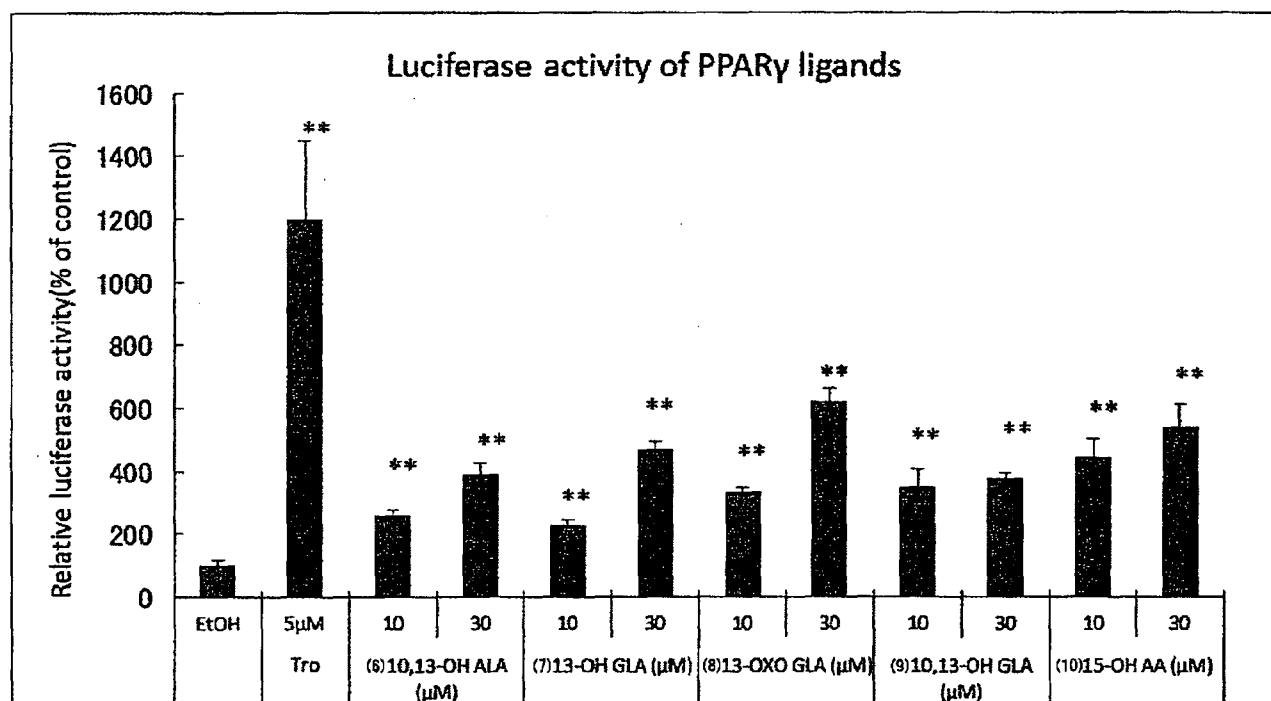
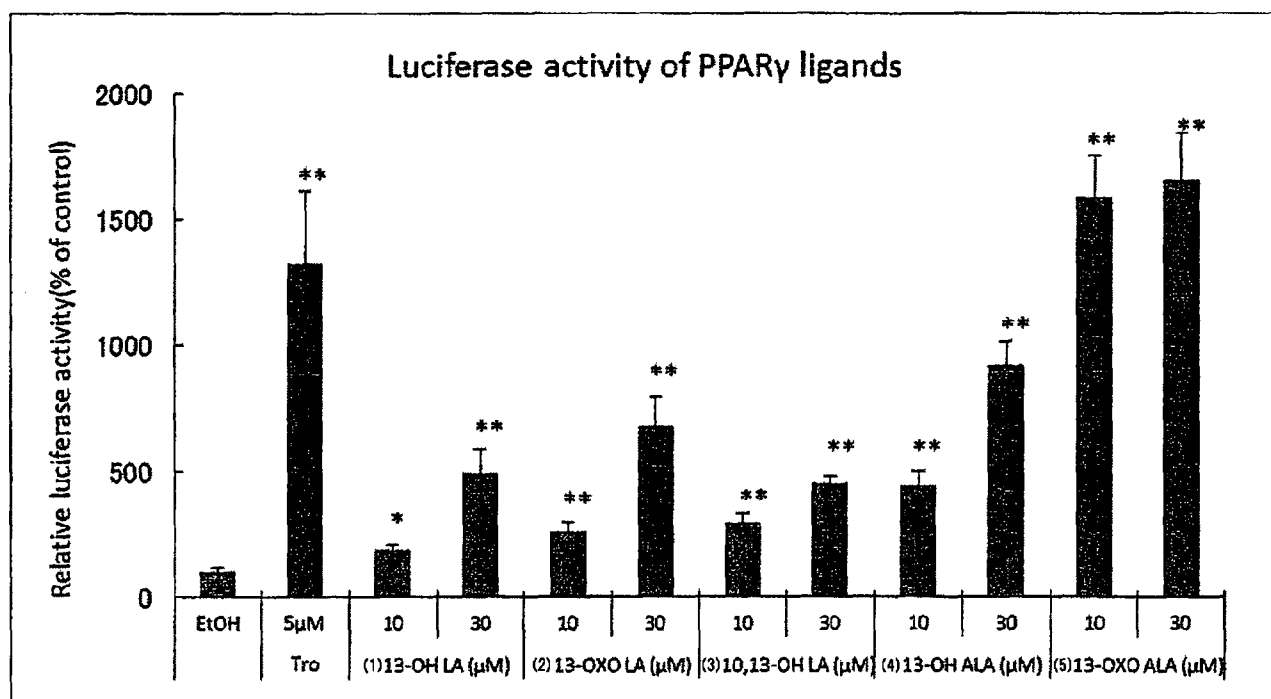
[図1]

No.	由来脂肪酸	略記	構造式
1	Linoleic acid	13-OH LA	
2		13-OXO LA	
3		10,13-OH LA	
4	Alpha-linolenic acid	13-OH ALA	
5		13-OXO ALA	
6		10,13-OH ALA	
7	Gamma-linolenic acid	13-OH GLA	
8		13-OXO GLA	
9		10,13-OH GLA	
10	Arachidonic acid	15-OH AA	

[図 2]



[図 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/051843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/20(2006.01)i, A61K31/201(2006.01)i, A61K31/202(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)n

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)

A61K31/20, A61K31/201, A61K31/202, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, C12N9/88

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2009-051732 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 12 March 2009 (12.03.2009), claims 1, 8, 9; paragraphs [0003], [0011] & WO 2007/069758 A1	1-4, 6-13, 15, <u>18-21</u> 5, 14
<u>X</u> Y	JP 2011-184411 A (Kyoto University), 22 September 2011 (22.09.2011), claims 7, 10 to 12; paragraph [0017] (Family: none)	1-3, 6-12, 15, <u>18-21</u> 4, 5, 13, 14
<u>X</u> <u>Y</u>	Kaori TANABE et al., "Nyusankin o Mochiita Unique na Hydroxy Shibosan Seisan ni Tsuite", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu, 2007, vol.2007, page 45, 2A11p13	<u>18, 19</u> 1-15, 20, 21



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 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

"I"

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
09 April 2015 (09.04.15)

Date of mailing of the international search report
21 April 2015 (21.04.15)

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/JP2015/051843

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/168310 A1 (Kyoto University), 14 November 2013 (14.11.2013), (Family: none)	1-15, 18-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/051843

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.: 16, 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims pertain to [methods for treatment of the human body by therapy].
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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（I P C））

Int.Cl. A61K31/20(2006.01)i, A61K31/201(2006.01)i, A61K31/202(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)n

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（I P C））

Int.Cl. A61K31/20, A61K31/201, A61K31/202, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, C12N9/88

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

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	JP 2009-051732 A (明治製菓株式会社) 2009.03.12, 請求項 1、8、9、【0003】【0011】 & WO 2007/069758 A1	1-4, 6-13, 15, 18-21 5, 14
X — Y	JP 2011-184411 A (国立大学法人京都大学) 2011.09.22, 請求項 7、10-12、【0017】（ファミリーなし）	1-3, 6-12, 15, 18-21 4, 5, 13, 14

☒ 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

「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

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

0 9 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

深草 亜子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

9 5 4 8

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
<u>X</u> Y	田辺香緒里他, 乳酸菌を用いたユニークなヒドロキシ脂肪酸生産について, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2007, Vol. 2007, p. 45 2A11p13	<u>18, 19</u> 1-15, 20, 21
A	WO 2013/168310 A1 (国立大学法人京都大学) 2013. 11. 14, (ファミリーなし)	1-15, 18-21

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（P C T 17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. ☒ 請求項 1 6、1 7 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、
[治療による人体の処置方法に関するもの] である。
2. ☐ 請求項 _____ 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. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 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項について作成した。
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項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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項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ため、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項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。