

(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
2014 年 3 月 27 日(27.03.2014)



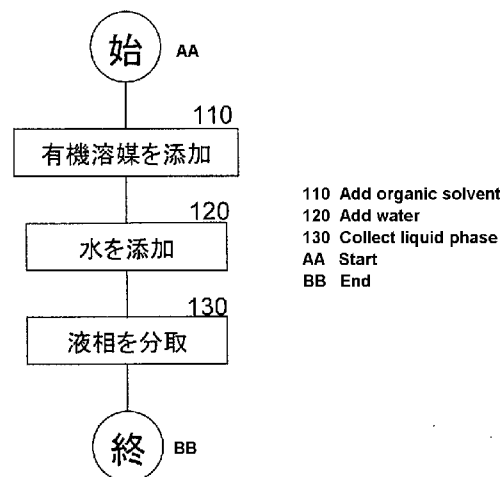
(10) 国際公開番号
WO 2014/045932 A1

- (51) 国際特許分類:
B01D 11/02 (2006.01) *G01N 1/10* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/074319
- (22) 国際出願日: 2013 年 9 月 10 日(10.09.2013)
- (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 2012-206518 2012 年 9 月 20 日(20.09.2012) JP
- (71) 出願人: ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社(HUMAN METABOLOME TECHNOLOGIES, INC.) [JP/JP]; 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上 2 4 6 番地 2 Yamagata (JP).
- (72) 発明者: 佐々木 一 謹(SASAKI, Kazunori); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上 2 4 6 番地 2 ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社内 Yamagata (JP). 佐藤 基(SATO, Hajime); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上 2 4 6 番地 2 ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社内 Yamagata (JP).
- (74) 代理人: 高矢 諭, 外(TAKAYA, Satoshi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木二丁目 1 0 番 1 2 号 南新宿ビル 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, IS, KE, KG, 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, 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, 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).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING METABOLITES

(54) 発明の名称: 代謝物の抽出方法



(57) Abstract: When extracting metabolites, a first step for adding an organic solvent (methanol (14)) which arbitrarily mixes with water and for deactivating enzymes while inhibiting oxidation is carried out first. Subsequently, a second step for dissolving hydrophilic metabolites in a liquid phase by adding water (ultrapure water (16)) is carried out, and then a third step for collecting the liquid phase is carried out. The organic solvent added in the first step may be methanol (14) or acetonitrile, and the water added in the second step may be ultra pure water (16) or pure water. As a consequence, it is possible to efficiently extract hydrophilic metabolites while quickly stopping the progression of metabolism and inhibiting oxidation by using a simple method.

(57) 要約: 代謝物の抽出に際して、まず、水と任意に混合する有機溶媒(メタノール 14)を添加して、酸化を抑制しながら酵素を失活させる第 1 ステップと、次いで、水(超純水 16)を添加することにより、親水性の代謝物を液相に溶解させる第 2 ステップと、その後、液相を分取する第 3 ステップとを行う。ここで、第 1 ステップで添加する有機溶媒を、メタノール 14 又はアセトニトリルとし、前記第 2 ステップで添加する水を超純水 16 又は純水とすることができる。これにより、簡便な方法で、酸化を抑制しつつ代謝の進行を迅速に停止させながら、親水性の代謝物を効率的に抽出することができる。

WO 2014/045932 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：代謝物の抽出方法

技術分野

[0001] 本発明は、代謝物の抽出方法に係り、特に、培養細胞や微生物中の親水性代謝物を定性・定量解析したり、生産物質を抽出する際に用いるのに好適な、酸化を抑制しながら代謝を迅速に停止させ、親水性物質を効率的に抽出することが可能な、代謝物の抽出方法に関する。

背景技術

[0002] メタボローム解析は、生体内の代謝物を網羅的に分析する手法であるが、代謝をより正確に把握するには、代謝を迅速に停止させ、且つ、酸化を抑制させ、効率的に代謝物を抽出する方法が必要である。

[0003] 細胞中の代謝物を抽出する簡便な方法としては、メタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒もしくは有機溶媒と水の混液で抽出する手法がある（非特許文献1）。

[0004] また、メタノール・水・クロロホルムの3液を用いて液液抽出を行い、代謝物を抽出する方法もある（特許文献1～3、非特許文献2）。

[0005] 更に、非特許文献3には、メタノールで抽出した後、抽出残渣に水を加えて抽出を行う2段階での抽出法が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2007-192746号公報

特許文献2：特開2008-5778号公報

特許文献3：特開2012-145398号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Dietmair S et al., Anal Biochem. 2010 Sep 15;404(2):155-64.

非特許文献2：Canelas AB et al., Anal Chem. 2009 Sep 1;81(17):7379-89.

非特許文献3: Sellick CA et al., Nat Protoc. 2011 Jul 28;6(8) :1241-9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、有機溶媒のみで抽出を行うと、ATPなど特に極性の高い親水性代謝物の抽出効率が悪い。又、有機溶媒と水の混液を最初から加えると、酵素が十分失活せず、代謝が十分に停止していない可能性がある。メタノール・水・クロロホルムの3液を用いて液液抽出を行い抽出する方法でも代謝が十分に停止していない可能性があり、酸化は抑制されず、更に操作が煩雑である。また、メタノールで抽出した後、更に抽出残渣に水を加えて抽出を行う2段階での抽出法も操作が煩雑であり細胞内の代謝物を複数定量する場合、抽出法における正確な回収率を求めることが困難となる等の問題点を有していた。

[0009] 本発明は、前記従来の問題点を解決するべくなされたもので、簡便な方法で、酸化を抑制しつつ代謝の進行を迅速に停止させながら、親水性の代謝物を効率的に抽出することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、代謝物の抽出に際して、まず、水と任意に混合する有機溶媒を添加して、酸化を抑制しつつ酵素を失活させる第1ステップと、次いで、水を添加することにより、親水性の代謝物を液相に溶解させる第2ステップと、その後、液相を分取する第3ステップとを含むことにより、前記課題を解決したものである。

[0011] なお、非特許文献3に記載された手法は、2段階の操作をするという点では本発明に類似しているが、溶媒を加えるごとに抽出を行っており、本発明のように2段階で溶媒を加えて1回で抽出するものではない。

[0012] ここで、前記第1ステップで添加する有機溶媒を、メタノール又はアセトニトリルとすることができる。

[0013] 又、前記第2ステップで添加する水を超純水又は純水とすることができる。

- [0014] 又、前記第1ステップで添加する有機溶媒を、所定割合以下の水を含む第1の溶液とすることができる。
- [0015] 又、前記第2ステップで添加する水を、所定割合以下の有機溶媒を含む第2の溶液とすることができる。
- [0016] 又、前記第2の溶液中の有機溶媒の割合を、前記第1の溶液中の有機溶媒の割合よりも小さくすることができる。
- [0017] 又、前記第1の溶液と前記第2の溶液の合計量に対する前記第1の溶液中の有機溶媒と前記第2の溶液中の有機溶媒の合計量の割合を所定値以上とすることができる。
- [0018] 又、前記第3ステップで、遠心分離した後、上澄みを限外ろ過することができる。
- [0019] 又、前記の抽出方法を用いてチオール化合物を抽出することができる。
- [0020] 又、前記の抽出方法を用いて接着細胞から代謝物を抽出することができる。

発明の効果

- [0021] 本発明によれば、まず、有機溶媒を添加するので、酸化を抑制しながら酵素を確実に失活させ、代謝の進行を迅速に停止することができる。次いで、水を添加するので、有機溶媒に溶けにくい親水性代謝物を液相に溶解して、液相を回収することができる。特に、チオール基を有する様な酸化されやすい物質やアセチルC o A、ピルビン酸において改善効果が大きい。したがって、簡便な方法で、酸化を抑制しつつ代謝の進行を迅速に停止し、親水性代謝物を効率的に抽出することが可能となり、再現性も向上する。
- [0022] 更に、液液抽出を行わないため、操作が簡便で、多数の検体が処理可能である。
- [0023] 又、接着細胞から代謝物を抽出する際は、従来方法では、まず、シャーレから細胞を剥ぎ取るという操作を加える必要があるが、本発明では剥ぎ取る必要がなくなる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]本発明の実施形態の手順を示す流れ図

[図2]本発明の実施形態を実施している様子を示す図

[図3]本発明の実施例 1 と液液抽出法における抽出量及び再現性を比較して示す図

[図4]同じく実施例 1 とメタノール水溶液抽出法における抽出量及び再現性を比較して示す図

[図5]本発明の実施例 2 と液液抽出法における抽出量及び再現性を比較して示す図

[図6]本発明の実施例 1、3 及び 4 における抽出量及び再現性を比較して示す図

発明を実施するための形態

[0025] 以下、図面を参照して、本発明の実施形態を詳細に説明する。

[0026] 図 1 は本実施形態の手順を示す流れ図である。

[0027] 細胞中の酵素は、有機溶媒により失活するため、まずステップ 110 で水と任意に混合する有機溶媒（例えばメタノール、アセトニトリルなど）（図 2 ではメタノール 14）を、図 2（A）に例示する如く、例えばシャーレ 12 中の培養細胞 10 に添加する。

[0028] 添加する有機溶媒は 100% が望ましいが、例えば 10% 程度、水が混合していてもよい。

[0029] 親水性の代謝物質は有機溶媒に溶けにくいため、その後ステップ 120 で、図 2（B）に示す如く、水、例えば超純水 16 を添加することにより、親水性の代謝物が液相に溶解し易い状態にした後、ステップ 130 で液相を分取して回収する。

[0030] ここで添加する水は 100% が望ましいが、有機溶媒が混ざっていてもよい。更に、ここで加える水は、不純物の問題が無ければ、超純水に限定されず、純水や水道水でも良い。

[0031] なお、このステップ 120 で加える有機溶媒の比率は、ステップ 110 で添加した有機溶媒の比率よりも低く抑える必要がある。

[0032] 次いで、ステップ130で液相を分取し、図2(C)に例示する如く、フィルタ18を通して、例えば限外ろ過する。ここで、限外ろ過を行うのは、キャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)による測定に際して、タンパク質を完全に除くためであり、用途によっては、通常のフィルタによるろ過でも良い。

[0033] このようにして、抽出する溶媒を2段階に分けて培養細胞に加えることにより、酸化を抑制しつつ酵素を確実に失活させ、且つ、効率的に親水性の代謝物を抽出することができる。この際、液液抽出を行わないため、操作が簡便である。

実施例 1

[0034] 例えば直径90mmシャーレ上の接着状態にある 2×10^7 個の培養細胞にメタノールを800 μ L加え、シャーレ上の培養細胞全体にメタノールを浸潤させ、酸化を抑制しながら酵素を失活させ、代謝を停止させた。

[0035] メタノールを浸潤させた後、水を550 μ L加え、メタノールと混合させながらシャーレ上の培養細胞全体に水を浸潤させ、親水性物質を抽出した。

[0036] 混合液を1mL回収し、後は従来法と同様に、遠心分離した後、上澄みを限外ろ過し、ろ液を蒸発乾固させ、例えば50 μ Lの水に溶解し、例えばCE-MSで測定を行った。

[0037] 比較のため、同じ培養細胞に対して、メタノール1000 μ L、クロロホルム1000 μ L、水を400 μ L及び超音波を用いた液液抽出を行った。

[0038] それぞれの条件で3回繰り返し実験を行い、ばらつきも評価した。

[0039] 抽出量及び再現性の液液抽出法との比較結果を図3に示す。

[0040] 液液抽出法と比較して本発明法では、酸化が進んでおらず、還元型グルタチオン、CoAなど、チオール基を有する化合物の抽出量が高い。また、本発明法ではチオール基の酸化が抑えられ、チオール基を有する化合物が酸化してできるジスルフィド化合物が減少している。すなわち、チオールからジスルフィドへの変換が抑えられている。

[0041] 本発明法と液液抽出法で差がある物質については、液液抽出法の方ではばら

つきが大きい。例えば酵素的な反応が続いていると考えられるアセチルC o Aやピルビン酸などである。

[0042] 表1にC o AとアセチルC o Aの定量値を示す。

[0043] [表1]

条件	濃度 pmol/10 ⁶ cell			RSD(%)		
	アセチルCoA	CoA	アセチルCoA+CoA	アセチルCoA	CoA	アセチルCoA+CoA
本 発 明 法	メタノール+水-1	1.1	89.8	90.9		
	メタノール+水-2	1.7	103.9	105.6	25.1	14.0
	メタノール+水-3	1.9	78.4	80.3		13.8
従 来 法	液液抽出-1	24.0	40.4	64.4		
	液液抽出-2	14.7	45.8	60.5	48.0	13.2
	液液抽出-3	8.9	52.6	61.5		3.3

[0044] 液液抽出法ではアセチルC o Aの相対標準偏差RSDが大きい、アセチルC o AとC o Aの総和を取るとRSDが小さくなる。すなわち、液液抽出法ではアセチルC o AからC o Aへの変換が生じており、本発明法ではそれが抑えられているものと考えられる。

[0045] 例えばC o Aには脂質代謝の際に消費され、アセチルC o Aが生成されるといった反応があり、液液抽出法では酵素が完全に失活せず、このような反応が生じているものと考えられる。代謝経路上、ピルビン酸はアセチルC o Aの直後の代謝物であり、ピルビン酸もその影響を受けているものと考えられる。

[0046] 60%メタノール水溶液抽出法と本発明の実施例1の抽出量及び再現性の比較結果を図4に示す。

[0047] メタノール水溶液抽出法は、同じ培養細胞に対して60%メタノールを1300μL添加することにより行った。

[0048] 液液抽出との比較の際と同様、チオール酸化が抑えられて、還元型グルタチオン、C o Aなどのチオール化合物の抽出量が増加し、ジスルフィド化合物（システイングルタチオンジスルフィド）の抽出量が減少している。すなわち、化合物の酸化が抑えられている。

[0049] また、NADPHの抽出量が増加し、NADP+の抽出量が減少している。NADPHは酵素的にNADP+へ酸化されるが、本発明法ではその反応

が抑えられている。

[0050] また、本発明法では、O-アセチルホモセリン、チオプロリン、ピルビン酸、グリセロアルデヒド3-リン酸のRSDが顕著に小さくなる。

[0051] 以上から、本発明法では従来法と比較し、酸化や代謝を止めながら再現性の高い抽出が可能といえる。

実施例 2

[0052] 例えば直径90mmシャーレ上の接着状態にある 2×10^7 個の培養細胞に90%アセトニトリル水溶液(v/v)80 μ Lを加え、シャーレ上の培養細胞全体に90%アセトニトリル水溶液を浸潤させ、酸化を抑制しながら酵素を失活させ、代謝を停止させた。

[0053] 90%アセトニトリル水溶液を浸潤させた後、水を600 μ L加え、90%アセトニトリル水溶液と混合させながらシャーレ上の培養細胞全体に水を浸潤させ、親水性物質を抽出した。

[0054] 混合液を1mL回収し、後は従来法と同様に、遠心分離した後、上澄みを限外ろ過し、ろ液を蒸発乾固させ、例えば50 μ Lの水に溶解し、例えばCE-MSで測定を行った。

[0055] 抽出量及び再現性の液液抽出法との比較結果を図5に示す。

[0056] チオール関連物質のばらつきが減少し、システイングルタチオンジスルフィドが減少しており、液液抽出法と比較し、実施例1と同様チオール化合物の酸化が抑えられている。アセチルCoAのばらつきも減少しており、液液抽出法と比較し、実施例1と同様アセチルCoAの代謝が抑えられている。

実施例 3

[0057] 例えば直径90mmシャーレ上の接着状態にある 2×10^7 個の培養細胞にメタノール650 μ Lを加え、シャーレ上の培養細胞全体にメタノールを浸潤させ、酸化を抑制しながら酵素を失活させ、代謝を停止させた。

[0058] メタノールを浸潤させた後、水を650 μ L加え、メタノールと混合させながらシャーレ上の培養細胞全体に水を浸潤させ、親水性物質を抽出した。

[0059] 混合液を1mL回収し、後は従来法と同様に、遠心分離した後、上澄みを

限外ろ過し、ろ液を蒸発乾固させ、例えば50 μ Lの水に溶解し、例えばC
E－MSで測定を行った。

実施例 4

[0060] 例えば直径90 mmシャーレ上の接着状態にある 2×10^7 個の培養細胞にメタノール900 μ Lを加え、シャーレ上の培養細胞全体にメタノールを浸潤させ、酸化を抑制しながら酵素を失活させ、代謝を停止させた。

[0061] メタノールを浸潤させた後、水を400 μ L加え、メタノールと混合させながらシャーレ上の培養細胞全体に水を浸潤させ、親水性物質を抽出した。

[0062] 混合液を1 mL回収し、後は従来法と同様に、遠心分離した後、上澄みを限外ろ過し、ろ液を蒸発乾固させ、例えば50 μ Lの水に溶解し、例えばC
E－MSで測定を行った。

[0063] 実施例1、3及び4における抽出量及び再現性の比較結果を図6に示す。
実施例1（メタノールの割合 $800 / (800 + 550) \div 60\%$ ）と実施例3（メタノールの割合 $650 / (650 + 650) = 50\%$ ）を比較すると、液液抽出の比較時程ではないがチオール関連化合物の再現性が悪化する傾向が見られた。それ以外の物質についてはほぼ同一の結果が得られた。実施例1、4（メタノールの割合 $900 / (900 + 400) \div 70\%$ ）ではほぼ同じ結果となった。従って、抽出に用いる有機溶媒の最終的な割合が50%以下の条件は好ましくない。

[0064] 以上のように、液液抽出法と比較した場合、本発明法は、溶媒を問わず、チオールの酸化の抑制やアセチルC o Aに関連した物質の代謝の抑制が確認された。

[0065] 又、メタノール水溶液抽出法と比較した場合、本発明法は、ばらつきの大
きい物質について再現性が改善され、チオールの酸化の抑制、NADPHの酸化の抑制が確認された。

[0066] 以上、本発明法は、これまでの抽出法と比較し、物質の酸化を抑制しつつ代謝の進行を効率的に止めながら高い抽出効率を実現できた。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明法により調製した試料は、C E、液体クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィ、MS、薄層クロマトグラフィ、核磁気共鳴、分光学的手法などを用いた分析などに適用できる。

[0068] 又、本発明法により調製した試料は、酵素反応の基質としても利用することができる。

[0069] 本発明は、更に、培養細胞や微生物を用いた物質生産におけるターゲット物質の効率的な抽出法としても利用できる。

[0070] 本発明法は、大腸菌、酵母等の微生物、培養動物細胞、培養植物細胞、血球、精子、卵子、その他の単細胞試料や肝臓や脳、筋肉などの生体組織に適用することができる。

符号の説明

- [0071] 1 0…培養細胞
1 2…シャーレ
1 4…メタノール
1 6…超純水
1 8…フィルタ

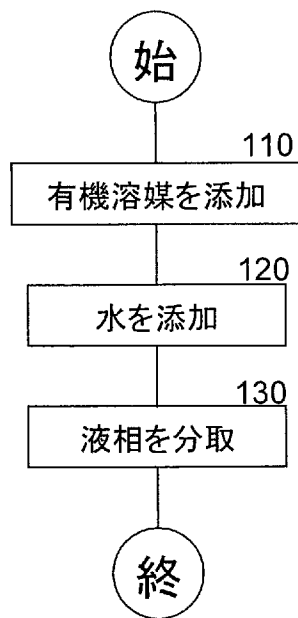
請求の範囲

- [請求項1] 代謝物の抽出に際して、
まず、水と任意に混合する有機溶媒を添加して、酸化を抑制しながら酵素を失活させる第1ステップと、
次いで、水を添加することにより、親水性の代謝物を液相に溶解させる第2ステップと、
その後、液相を分取する第3ステップとを含むことを特徴とする代謝物の抽出方法。
- [請求項2] 前記第1ステップで添加する有機溶媒が、メタノール又はアセトニトリルであることを特徴とする請求項1に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項3] 前記第2ステップで添加する水が超純水又は純水又は水道水であることを特徴とする請求項1又は2に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項4] 前記第1ステップで添加する有機溶媒が、所定割合以下の水を含む第1の溶液とされていることを特徴とする請求項1又は2に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項5] 前記第2ステップで添加する水が、所定割合以下の有機溶媒を含む第2の溶液とされていることを特徴とする請求項1又は3に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項6] 前記第2の溶液中の有機溶媒の割合が、前記第1の溶液中の有機溶媒の割合よりも小さいことを特徴とする請求項5に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項7] 前記第1の溶液と前記第2の溶液の合計量に対する前記第1の溶液中の有機溶媒と前記第2の溶液中の有機溶媒の合計量の割合が所定値以上とされていることを特徴とする請求項5又は6に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項8] 前記第3ステップで、遠心分離した後、上澄みを限外ろ過することを特徴とする請求項1に記載の代謝物の抽出方法。
- [請求項9] 請求項1乃至8のいずれかに記載の抽出方法を用いてチオール化合

物を抽出することを特徴とする代謝物の抽出方法。

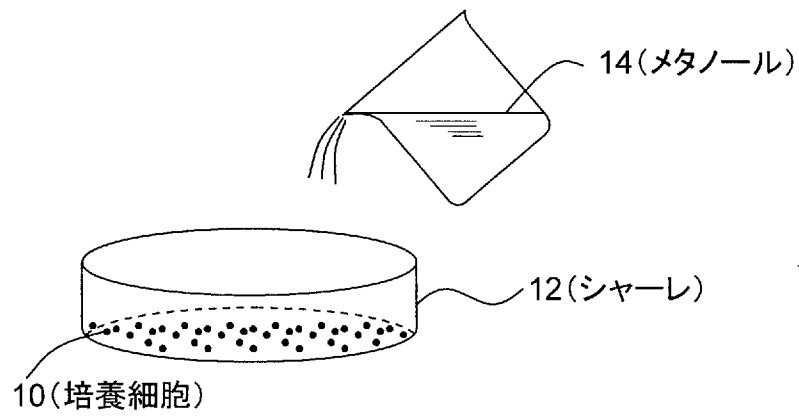
[請求項10] 請求項1乃至9のいずれかに記載の抽出方法を用いて接着細胞から代謝物を抽出することを特徴とする代謝物の抽出方法。

[図1]

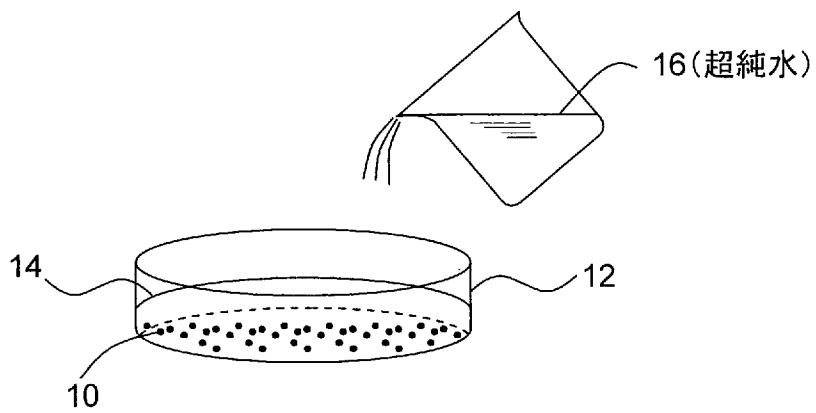


[図2]

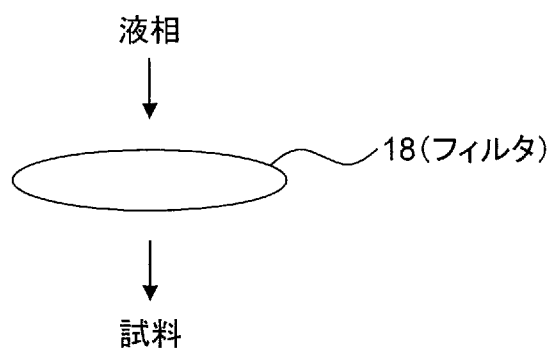
(A)



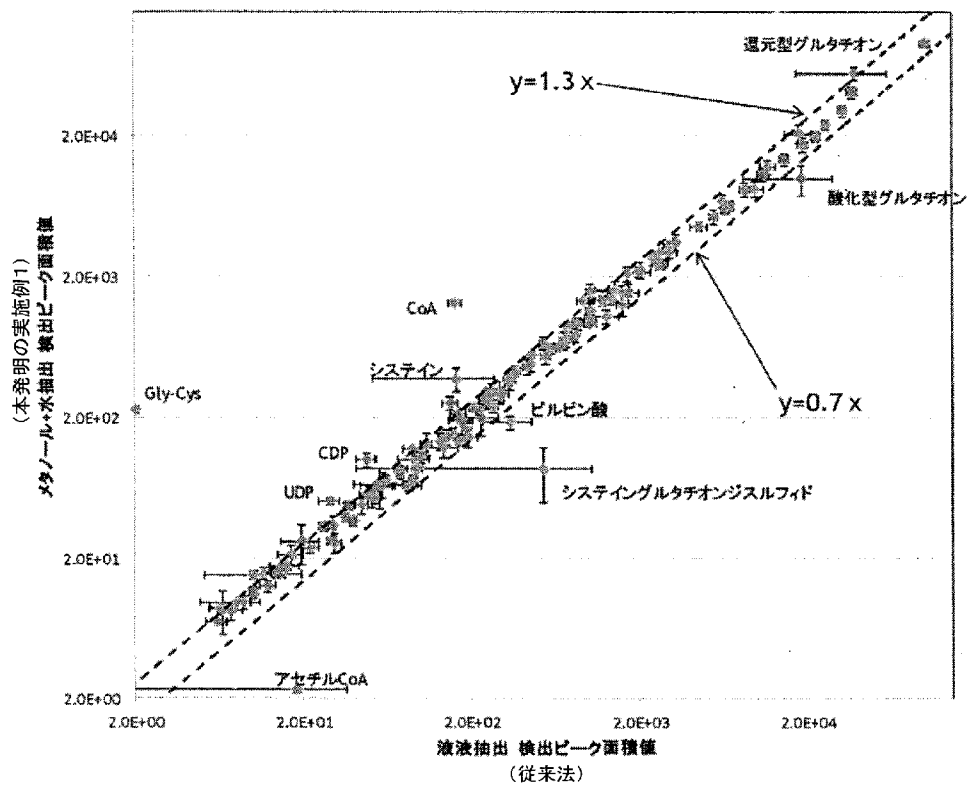
(B)



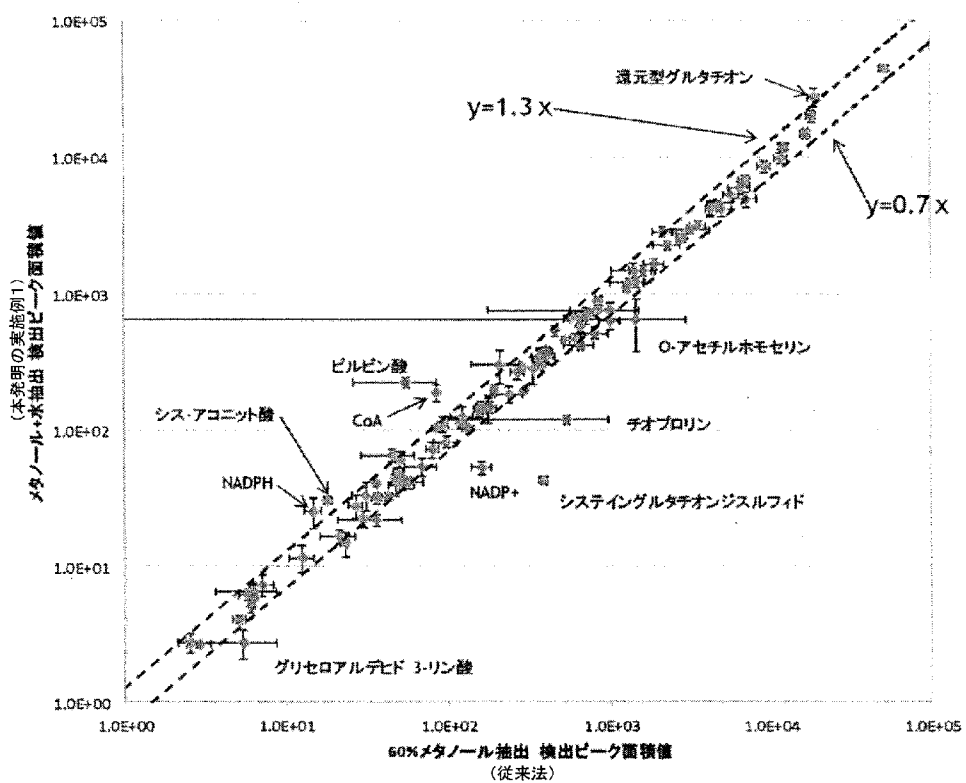
(C)



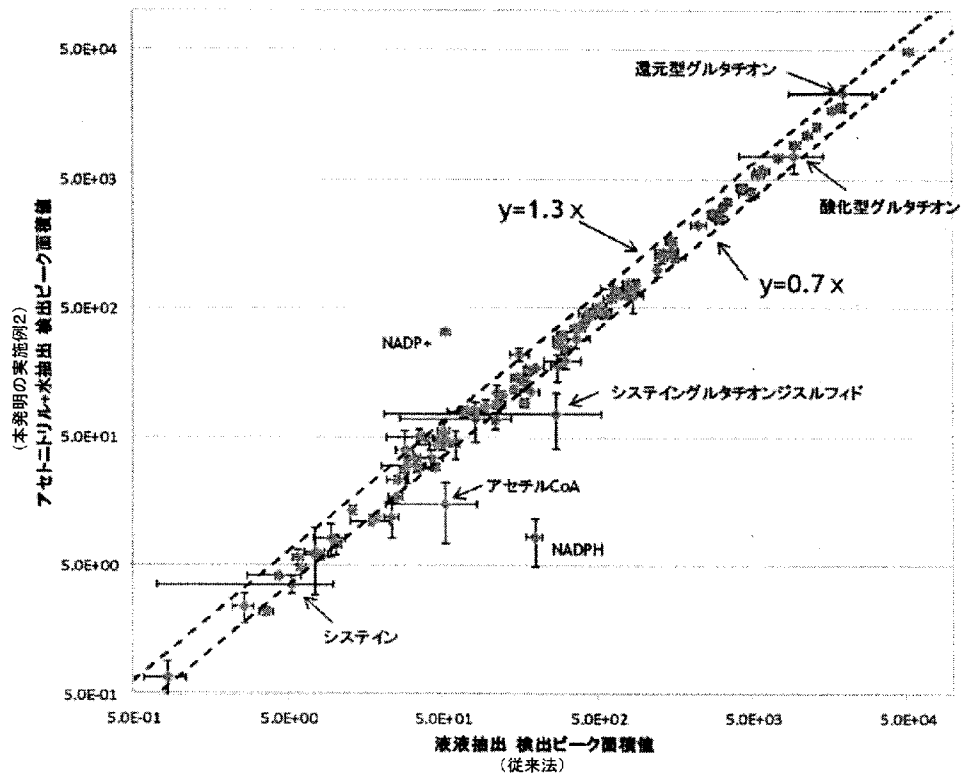
[図3]



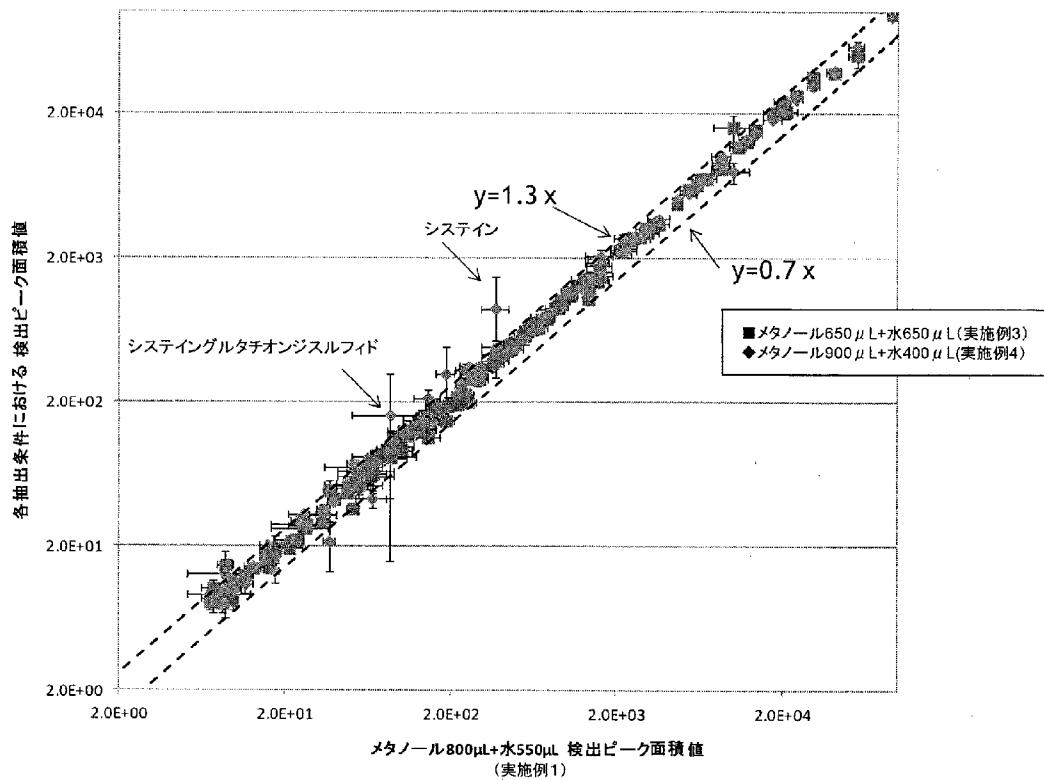
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074319

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01D11/02(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, G01N1/10(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)

B01D11/00-11/04, C12Q1/00-3/00, G01N1/00-1/34, G01N33/00-33/98

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(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	JP 2007-192746 A (Keio University), 02 August 2007 (02.08.2007), claims; paragraphs [0022], [0024] to [0026], [0028]; fig. 1, 3, 4 & WO 2007/083632 A1 & EP 1975621 A1 & US 2009/0029409 A1	1-9 10
X Y	WO 2011/158590 A1 (Keio University), 22 December 2011 (22.12.2011), paragraph [0045] & US 2013/0116148 A1	1-8 10

☒ 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

"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
04 December, 2013 (04.12.13)

Date of mailing of the international search report
17 December, 2013 (17.12.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074319

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/003945 A1 (BASF PLANT SCIENCE CO. GMBH), 13 January 2011 (13.01.2011), page 3, line 21 to page 4, line 13; page 12, lines 21 to 30 & JP 2012-533053 A1 & US 2012/0107940 A1 & EP 2273267 A1	10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. B01D11/02(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, G01N1/10(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. B01D11/00-11/04, C12Q1/00-3/00, G01N1/00-1/34, G01N33/00-33/98

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 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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)

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 2007-192746 A（学校法人慶應義塾）2007.08.02, 特許請求の範囲、段落【0022】、【0024】－【0026】、【0028】、図1, 3, 4 & WO 2007/083632 A1 & EP 1975621 A1 & US 2009/0029409 A1	1-9 10
X Y	WO 2011/158590 A1（学校法人慶應義塾）2011.12.22, [0045] & US 2013/0116148 A1	1-8 10

☒ 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 4 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 7 . 1 2 . 2 0 1 3

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）

神田 和輝

4 Q

3 4 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 6 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
Y	WO 2011/003945 A1 (BASF PLANT SCIENCE COMPANY GMBH) 2011.01.13, 第3頁21行―第4頁13行、第12頁第21―30行 & JP 2012-533053 A1 & US 2012/0107940 A1 & EP 2273267 A1	10