世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 **C12P 41/00, 7/02**	**A1**	(11) 国際公開番号 **WO99/34010** (43) 国際公開日 1999年7月8日(08.07.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP98/06005

(22) 国際出願日 1998年12月28日(28.12.98)

(30) 優先権データ
特願平9/369499 1997年12月29日(29.12.97) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
サンヨー食品株式会社
(SANYO SHOKUHIN CO., LTD.)[JP/JP]
〒107-0052 東京都港区赤坂三丁目5番2号
サンヨー赤坂ビル Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
永岡宏行(NAGAOKA, Hiroyuki)[JP/JP]
〒371-0802 群馬県前橋市天川町84-1 ツインズハウス107
Gunma, (JP)
(74) 代理人
弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.)
〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号
虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

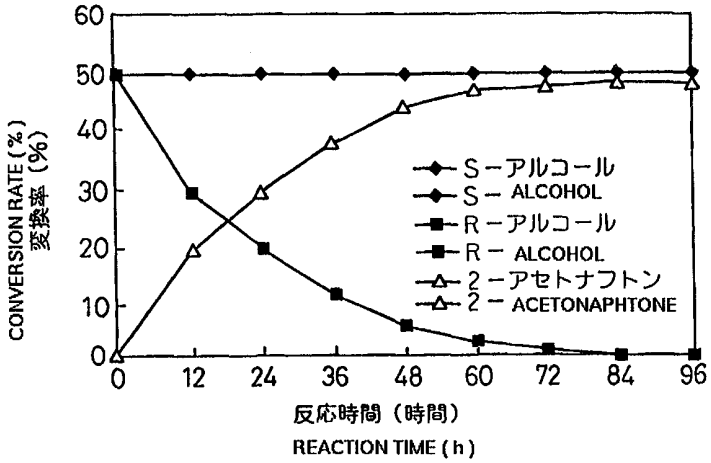
添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE ALCOHOLS

(54)発明の名称 光学活性アルコールの製造方法

(57) Abstract

A process for producing optically active alcohols having high optical purity by using an optical resolution catalyst comprising immobilized water-soluble proteins extracted from inexpensive and safe cereals or beans, and enzymatically converting feedstock substrates (optionally acylated racemic alcohols, ketones, etc.) therewith optionally followed by hydrolysis. This process aims at solving the problems encountered in the conventional processes for producing optically active alcohols by using microbial cells, enzymes originating in microorganisms, enzymes originating in animal tissues or cultured plant cells, for example, low yield due to side reactions, undesirable effects on ecological systems and an increase in cost associating therewith, and problems in the reaction processes, such as needs for aseptic operations and prolonged subculture.



(57)要約

従来の微生物菌体、微生物由来酵素、動物組織由来酵素、-植物培養細胞を用いる光学活性アルコールの製造法の問題点である副反応による収率の低さ、生態系への悪影響やそれに伴う経費負担、無菌操作の必要性や継体培養の長期化といった反応課程の問題点を解消するために、購入安価で安全な穀類や豆類から抽出した水溶性蛋白質を固定化したものを光学分割触媒として用いて、原料である基質、例えば、ラセミアルコール、ケトン、ラセミアルコールのアシル化体の酵素変換反応を行い、その後必要により加水分解することにより高光学純度の光学活性アルコールを製造する方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明　細　書

光学活性アルコールの製造方法

技術分野

本発明は、穀類及び豆類等の植物資源から抽出した水溶性蛋白成分を固定化したものを触媒として基質から光学活性アルコールを製造する方法に関する。

背景技術

光学活性アルコールは医薬品や農薬等の原料又は中間原料、強誘電性液晶等のファインケミカル分野における合成中間体として極めて重要な物質である。

このような光学活性アルコール等の光学活性物質を生合成するために、従来から1)微生物菌体及び微生物菌体由来酵素、２）動物組織由来酵素、３）植物培養細胞を基質と反応させて光学活性アルコールを製造する方法が知られている。

前記１）の微生物菌体を用いる方法は培養した菌体を基質と反応させて光学活性アルコールを得る手法であり、例えば特許第２７８４５７８号公報（光学活性１，２－ジオール類の製造方法）が公知である。

また、２）の微生物菌体由来酵素を用いる方法は遺伝子を導入して培養した菌体の粉砕液を基質と反応させて光学活性アルコールを得る手法であり、例えば特開平１０－２１０９８１号公報（ハロヒドリンより光学活性ジオールへの変換を触媒する新規なタンパク質）が公知である。

また、３）の動物組織由来酵素を用いる方法は動物組織より分離

した蛋白を基質と反応させて光学活性アルコールを得る手法であり、例えば特許第２７５６７９０号公報が公知である。

また、４）の植物培養細胞を用いる反応は植物細胞を基質と反応させて光学活性アルコールを得る手法であり、例えば文献Chem. Pharm. Bull., 43, pp.1458-1461に報告されている。

１）「微生物菌体」を用いる方法は、特許第２７８４５７８号公報（光学活性１，２－ジオール類の製造方法）、特許第２７７４３４１号公報（光学活性２－ヒドロキシ酸誘導体の製造法）で公知のように、微生物菌体は培養条件を適切に設定することにより培養溶液中で増殖し、この培養液を遠心分離又は濾過により処理して菌体を集め、菌体を0.1Mリン酸緩衝液（pH6.5）又は蒸留水等に懸濁した液中にて基質のケトン体を不斉還元させて光学活性アルコールを合成するものであるが、菌体含有酵素の種類が多様であることが原因で、基質変換反応以外の副反応が同時に起こるため、目的とする光学活性アルコールの収率が低く、又、反応生成物を含む溶媒中から単離・精製作業を行っても、得られる光学活性アルコールの純度が低い為、ファインケミカル分野での合成中間体として利用しにくい点がある。２）「微生物菌体由来酵素」を用いる方法は特開平１０－２１０９８１号公報（ハロヒドリンより光学活性ジオールへの変換を触媒する新規なタンパク質）に開示されているように遺伝子組替えの方法でクローン化された遺伝子を菌体内に多数存在する形質転換微生物を用いて光学活性エピハロヒドリン及び光学活性ジオールを製造する方法であるが、これも微生物菌体を用いる方法と反応工程自体に大きな違いはないために基質反応の際に生じる副反応は制御できず、「微生物菌体」を用いる方法と同様の問題点を有している。更に、遺伝子導入菌株は自然界では異品種であり、ヒトをはじめとする生態系へ悪影響を与える危険性があるため、外部環境

から隔離する設備や反応残査等の焼却処理等の経費負担が必要である。また、３）「動物組織由来酵素」は、特許第２７５６７９０号公報（光学活性なシクロペンテノール誘導体の製造方法）で公知のとおり、豚の膵臓リパーゼの不斉加水分解反応を用いた光学活性シクロペンテノール誘導体の製造方法があるが、佐竹一夫著「生物学のための有機化学３　タンパク質」第１１４－１７２頁（朝倉書店発行）に記載されているように動物組織由来酵素は粗酵素である為、前述１）、２）と同様に副反応が生じて収率の低下を生ずることは否めない。また、４）「植物培養細胞」を用いる方法は植物含有酵素の種類が多様であることが原因で生ずる基質変換反応以外の副反応を理由とする光学活性アルコールの収率の低さの問題である。又、植物細胞の培養は全行程における無菌操作の必要性のように育種が難しく、更に１年から２年間の継体培養を繰り返す期間や基質と反応させる反応栄養培地液（ＭＳ培地等）の作製が必要であり反応操作の煩雑さが問題である。

発明の開示

本発明の目的は、上述の問題点を解消するために世界各国で生産されている購入安価な穀類や豆類から抽出した水溶性蛋白質を光学分割触媒として有機合成化学に応用するものであり、生態系に優しく、反応コストの大幅低減化を可能にし、更には高光学純度の光学活性アルコールを得る製造法を提供する点にある。

本発明において、前記光学分割触媒を用いて、高光学純度の光学活性アルコールを得る製造法は、概略、次のような方法を包含するものである。

（１）基質としてのラセミ体アルコールの一方の鏡像体を選択的に酸化してケトンとし、他方の鏡像体を未反応のまま残留させ、光

学活性アルコールとして分離する光学活性アルコールを製造する方法。

（２）基質としてのケトン分子の不斉還元により光学活性アルコールを製造する方法。

（３）基質としてのラセミ体アルコールのアシル化体の不斉加水分解により光学活性アルコールを製造する方法。

（４）有機溶媒中でラセミ体アルコールの一方の鏡像体を立体選択的にアシル化し、得られたそのアシル化された鏡像体を加水分解して、光学活性アルコールとして分離する光学活性アルコールを製造する方法。

本発明者は上記問題点を解決し安全かつ平易な方法で高純度の光学活性アルコールを得る方法について鋭意研究を行った結果、穀類又は豆類から水溶性蛋白質を抽出する第１の工程と、前記蛋白質を固定化する第２の工程と、前記固定化された蛋白質を触媒として基質の酵素変換反応を行う第３の工程と、該第３の工程により変換した前記反応基質及び反応生成物の混合物を有機溶媒により抽出する第４の工程と、該第４の工程の抽出物から光学活性アルコール又は光学活性アルコールのアシル化体を単離・精製する第５の工程を組み合わせ、必要によりさらに加水分解することにより、ファインケミカル分野における合成中間体を合成する原料として充分に利用可能な高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることを見出し本発明を完成するに至った。

本発明において用い得る穀類または豆類としては、蕎麦、アマランサス、米、小麦、大麦、トウモロコシ、エンバク、ライ麦、粟、ヒエ、キビ、ハト麦、モロコシ等の穀類、又は小豆、インゲン豆、豌豆、リョクトウ、大豆等の豆類が挙げられるが、これらに限定するものではない。

本発明の第１の工程における水溶性蛋白質の抽出においては、穀類又は豆類を砕き粒の大きい部分と殻部を取り除き、このようにして得られた穀類及び豆類粉砕粉を約２０～６０℃、好ましくは約４０℃で、ｐＨ約６～８、好ましくはｐＨ７．０において、穀類または豆類粉砕粉の約７～１５重量倍の水で、３０分以上抽出する。約４５分で抽出するのが最も効率的であって、これ以上長く抽出しても抽出物の量は変わらない。ｐＨの調整が必要なときは、H_2SO_4、ＨＣｌ、H_3PO_4などの食品級酸、又はＮａＯＨなどの食品級アルカリを用いて上記適正範囲に合わせてもよい。上記水溶性蛋白質抽出液、又はこの抽出液から、デカンター、遠心分離機などにより食物繊維部を分離した、タンパクカードをそのまま第２工程に移すか、必要に応じて噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥などにより粉末としてから、再溶解して第２工程に移してもよい。

しかしながら、多量の蛋白質の処理が必要なときには、上記タンパクカードをH_2SO_4、ＨＣｌ、H_3PO_4などの食品級酸、又はＮａＯＨなどの食品級アルカリを用いて等電点処理し、次いでデカンター、遠心分離機などによりホエイを分離してタンパクカードを得る。この等電点沈殿等は、水溶性蛋白質の濃縮を目的としたものであって、処理後においても水溶性蛋白質抽出液をそのまま噴霧乾燥などにより粉末化した場合と同様な効果を奏するものである。等電点沈殿のｐＨの選定は沈殿量の多い画分の選定が目的であって、大豆や豌豆蛋白質の場合にはｐＨ４．５付近であり、蕎麦の場合には約ｐＨ９．５付近である。このカードに５～１０重量倍の水を加え、ミキサー、攪拌機などにより解砕して、蛋白質スラリーを調製し、中和（ｐＨ６～８）し、中和スラリーとする。このスラリーを、前記と同様に噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥などにより粉末としてから、再溶解して第２工程に移す。

但し、噴霧乾燥を行う際の加熱条件については蛋白質、すなわち変換反応に関わる酵素の熱変性による失活を防ぐため、該抽出蛋白質自体が８０℃を越えない温度に設定しなくてはならない。

第２の工程において、該抽出蛋白質を固定化する方法は１）該抽出蛋白質を水不溶性の担体、例えば、セルロース、デキストラン、アガロース等の多糖類の誘導体、及びポリアクリルアミドゲル等に結合させる担体結合法、２）該抽出蛋白質を２個もしくはそれ以上の官能基を有する試薬を用いて該抽出蛋白質間に架橋結合を形成させて固定する架橋法、３）該抽出蛋白質を、ゲル、例えば、アルギン酸塩、デンプン、コンニャク、ポリアクリルアミドゲル及びポリビニルアルコール等のゲルの細かい格子の中に取り入れる（格子型）か、半透膜性の皮膜によって被覆する（マイクロカプセル型）包括法があり、いずれの固定化法も本願発明において用いることができる。しかしながら、海草より抽出するアルギン酸の塩を用いた包括固定化法が環境に優しく、かつ、固定化操作が平易な点で最も好ましい。

第３の工程において、原料である基質から光学活性アルコール又は光学活性アルコールのアシル化体を得るための酵素変換方法は、

（１）基質としてのラセミ体アルコールの一方の鏡像体を選択的に酸化してケトンとし、他方の鏡像体を未反応のままの光学活性アルコールとして残留させる方法、

（２）基質としてのケトン分子の不斉還元により光学活性アルコールを得る方法、

（３）基質としてのラセミ体アルコールのアシル化体の不斉加水分解により光学活性アルコールを得る方法、

（４）有機溶媒中で基質としてのラセミ体アルコールの一方の鏡像体をハロゲン化アシル又は酢酸ビニルにより立体選択的アシル化

する方法を包含する。

これらの反応では、

（２）のケトン分子を基質として用いる不斉還元反応では、酵素変換の不斉還元反応は１００％に至らず途中で止まってしまうので、止まった時点あるいは止まる前に反応溶液を抽出処理しないと時間の経過に伴い光学純度が低下するので、穀類、豆類の種類により反応停止時間を決定する必要があるが、変換率２０％程度で反応を終了させると、その生成光学活性アルコールの立体配置と光学純度は、（１）の基質にラセミアルコールを用いた場合と同様であり、

（３）の基質としてラセミアルコールのアシル化体を用いる反応においては、不斉加水分解反応は、変換率２０％程度を越えると光学純度が低下するので、穀類、豆類の種類により反応停止時間を決定する必要があり、収率が低いが、変換率２０％程度で反応を終了させた場合、その生成光学活性アルコールの立体配置と光学純度は、（１）の基質にラセミアルコールを用いた場合と同様であり、また、

（４）の有機溶媒中のラセミ体アルコールの不斉アシル化を用いる反応は、不斉アシル化反応により得られたアシル化体を、さらに加水分解することにより、光学活性アルコールを得るものであるが、不斉アシル化反応は変換率２０％程度を越えると光学純度が低下するので、穀類、豆類の種類により反応停止時間を決定する必要があり、変換率２０％程度でアシル化反応を終了させたとき、その後の加水分解により得られた生成光学活性アルコールの立体配置と光学純度は、（１）の基質にラセミアルコールを用いた場合と同様である。本発明においては、（１）のラセミ体アルコールを基質とする一方の鏡像体を選択的に酸化して光学活性アルコールを得る方法が収率などの点から最も好ましい。上記（１）～（４）の反応温度は

、約２５～４５℃、好ましくは３０～４０℃が適当であって、約３５℃で行うことが最も好ましい。また、上記（１）～（３）の反応においては、極性溶媒として水、非極性溶媒としてアセトン、メタノール、エタノール等を用いることができるが、極性溶媒の水が最も好ましい。（４）の反応においては、ベンゼン、トルエン、ヘプタン、イソプロピルアルコール（ドライ）などの有機溶媒を用い得るが、ベンゼンを用いることが好ましい。反応時間は、基質、水溶性蛋白質の由来、反応の種類により異なるが、約２～１５日位であり、前記のように（２）～（４）の反応では、変換率が２０％程度に達した時点で反応を終了させる。

また、反応により得られる光学活性アルコールは、基質の置換基の影響により、Ｓ体又はＲ体となる。

第４の工程において抽出有機溶媒は非反応性溶媒の酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン等を用いることができる。

第５の工程において、単離・精製を行う操作としてはシリカゲルクロマトグラフ又はシリカゲル薄層クロマトグラフを用いるのが最も好ましいが、特許第２８０４２４７号公報（固定化生体触媒を用いる反応）に記載されているような、反応槽から生成物に富む反応液の一部を抜き出し、生成物の析出温度に設定した晶析槽に移送して生成物を析出させ、濾過により分離後、その母液に基質を添加し、反応槽に戻して反応させる一連の操作を繰り返し、晶析槽に懸濁状の生成物を蓄積させる単離・精製方法などの本出願前公知の単離・精製方法を用い得る。

図面の簡単な説明

図１は、基質ラセミ体 1-（2- ナフチル）エタノールの(R)-1-(2- ナフチル）エタノールの立体選択的酸化に伴う 2- アセトナフト

ンへの生変換を経由する(S)-1-(2- ナフチル) エタノールの反応時間と生成変換率の関係を示すグラフ図である。

図２は、本発明の固定化水溶性蛋白質を連続使用したときの有効性を示すものであって、図１の反応を行ったときの１～３回目のそれぞれの反応時間と生成変換率の関係を示すグラフ図である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、これは説明のためのものであって、これにより、本発明を限定して解すべきではない。

（１）の基質としてのラセミ体アルコールの一方の鏡像体を選択的に酸化して、光学活性アルコールを製造する方法

実施例１（豌豆水性蛋白質）

先ず第１の工程として、豌豆を粉砕して殻を取り除き、pH7.0 付近の蒸留水（約40℃）９重量倍にて、約４５分間に溶解される豌豆蛋白質成分をNaOH水溶液を用いてpH7.0 にして沈殿成分の食物繊維を除去し、水溶性蛋白部分を酸性条件（pH4.5 付近）にして蛋白を等電点沈殿させ、蛋白沈殿部をpH7.0 の蒸留水にて再溶解して得られる豌豆蛋白水溶液（試料濃度5.0%）を噴霧乾燥処理を行い、粉体の豌豆蛋白を調製する。また、アルギン酸ナトリウム水溶液はオートクレーブの条件、温度121 ℃、時間２０分で、アルギン酸ナトリウムを水溶液中に溶解して調製する。

次に、第２の工程において、豌豆蛋白粉20g に10倍等量の蒸留水200ml を加え、5%のアルギン酸ナトリウム水溶液を1.5 倍等量の250ml を加えて均一になるまで攪拌し、得られた豌豆・アルギン酸ナトリウム混合溶液を、0.6 %の塩化カルシウム水溶液中に注射器等

を用いて滴下して固定化状態の豌豆蛋白含有・アルギン酸カルシウムゲルビーズを作製する。更に0.6 %塩化カルシウム水溶液中で5時間以上放置してビーズ膜を強固にする。

続いて、第3の工程において、豌豆・アルギン酸カルシウムゲルビーズを蒸留水にて十分に洗浄し、塩化カルシウム水溶液を除去した後に用いた豌豆蛋白粉の20倍等量の蒸留水（400ml ）を反応溶液として添加し、恒温振とう培養器を用いて蒸留水の温度を３５℃にした後、基質ラセミアルコールとして、１－（２－ブロモフェニル）エタノール、１－（２－クロロフェニル）エタノール、１－（２－メチルフェニル）エタノール、１－（２－メトキシフェニル）エタノール、１－（２－ニトロフェニル）エタノール、１－フェニルエタノール、１－（２－ナフチル）エタノールを添加し、それぞれ振とう培養器５５rpm の条件に設定し、基質変換させた。

反応終了後に第4の工程において、ビーズと反応溶媒部分を概略分離してビーズを十分に蒸留水等の溶媒で洗浄した後、その洗浄溶媒液と反応基質及び反応生成物を含む反応溶媒部分をジエチルエーテルで抽出した。更に、そのエーテル層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムにより脱水乾燥して放置した。

最後に第5の工程において、ジエチルエーテル層をエバポレータを用いて除去し、反応基質及び反応生成物を70～230 メッシュのシリカゲルクロマトグラフを用いて、ヘキサン対酢酸エチル9 対1の展開溶媒で目的物の光学活性アルコールを単離・精製する。

単離した光学活性アルコールは、文献値として J. CHEM. SOC. P

ERKIN TRANS 1 1995 pp.1295-1298 とPhytochemistry, Vol.30, No.11, pp. 3595-3597 を参照して得られる（＋又は－）値と得られる光学活性アルコールの旋光度との比較から立体配置が決定でき、高速液体クロマトグラフ（HPLC）の分析条件、キラルセル OB 0.46cmφ×25cm（ダイセル化学株式会社製）：30°,UV254nm, 溶離液：ヘキサン：2-プロパノール＝9：1、流速0.5ml/分によって、基質（±）-1-(4- ブロモフェニル）エタノール、（±）-1-(4- クロロフェニル）エタノール、（±）-1-フェニルエタノール、（±）-1-(2-ナフチル）エタノールの、又、キラルセル OB 0.46cmφ×25cm（ダイセル化学株式会社製）：30°,UV254nm, 溶離液：ヘキサン：2-プロパノール＝9：1、流速1.0ml/分によって基質（±）-1-(4- メトキシフェニル）エタノール、（±）-1-(4- ニトロフェニル）エタノールの立体配置Ｓ体とＲ体のリテンションタイムが確認でき、HPLCに現れる立体配置Ｓ体とＲ体両鏡像体の積分比率の差を光学純度（e.e.＝enantiomer excess）として求めた。

以上の機器分析にて、（±）-1-(4- ブロモフェニル）エタノールのリテンションタイム、Ｓ体；10.447、Ｒ体；11.031、（±）-1-(4-クロロフェニル）エタノールのリテンションタイム、Ｓ体；9.936、Ｒ体；10.355、（±）-1-フェニルエタノールのリテンションタイム、Ｓ体；11.958、Ｒ体；13.133、（±）-1-(2- ナフチル）エタノールのリテンションタイム、Ｓ体；15.693、Ｒ体；17.049、（±）-1-(4- メトキシフェニル）エタノールのリテンションタイム、Ｓ体；9.165、Ｒ体；10.781、（±）-1-(4- ニトロフェニル）エタノールのリテンションタイム、Ｒ体；18.923、Ｓ体；19.562をそれぞれ確認した。また、各基質の酸化にて生じる生成4-ブロモアセトフェノン、4-クロロアセトフェノン、4-メトキシアセトフェノン、4-ニトロアセトフェノンも同様に、リテンションタイム；13.112、10

.304、17.169、37.208を確認した。

(S)-1-(4- ブロモフェニル) エタノールの合成

固定化豌豆蛋白質の基質 (±)-1-(4- ブロモフェニル) エタノール (200mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(R)-1-(4-ブロモフェニル) エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-ブロモアセトフェノンへの生変換を経由して、8 日を要し、収量114mg で、57% の収率にて(S)-1-(4- ブロモフェニル) エタノールが得られた。光学純度は88%e.e. で得られた。GC条件はHITACHI G-3500ガスクロマトグラフ, キャリアーガス, He 0.48 ml/ 分; スピリット比; 1/55, オーブン温度; 150 ℃, 入口温度; 250 ℃, 出口温度; 250 ℃ ,圧力. 136., 流量値. 42.,分析カラム : TC-5HT 0.25mm I. D ×30M df (ジーエルサイエンス株式会社製) で、反応追跡と反応終了時の時間を決定した。

(S)-1-(4- クロロフェニル) エタノールの合成

固定化豌豆蛋白質の基質(±)-1-(4- クロロフェニル) エタノール (200mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(R)-1-(4-クロロフェニル) エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-クロロアセトフェノンへの生変換を経由して、8 日を要し、収量84mgで、42% の収率にて(S)-1-(4- クロロフェニル) エタノールが得られた。光学純度は87%e.e. で得られた。

(S)-1-(4- メトキシフェニル) エタノールの合成

固定化豌豆蛋白質の基質(±)-1-(4- メトキシフェニル) エタノール (200mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(R)-1-(4- メトキシフェニル) エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-メト

キシアセトフェノンへの生変換を経由して、７日を要し、収量96mgで、48% の収率にて(S)-1-(4- メトキシフェニル) エタノールが得られた。光学純度は95%e.e. で得られた。尚、HPLC条件は流速1.0 ml/ 分、GC条件はオーブン温度を190 ℃に設定した。

(R)-1-(4- ニトロフェニル) エタノールの合成

固定化豌豆蛋白質の基質(±)-1-(4- ニトロフェニル) エタノール (200mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4- ニトロフェニル) エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-ニトロアセトフェノンへの生変換を経由して、4 日を要し、収量76mgで、38% の収率にて(R)-1-(4- ニトロフェニル) エタノールが得られた。光学純度は54%e.e. で得られた。HPLC条件は流速0.5ml/分、GC条件はオーブン温度190 ℃に設定した。

(S)- 1 -フェニルエタノールの合成

固定化豌豆蛋白質の基質(±)-1 - フェニルエタノール (201mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(R) - 1 - フェニルエタノールの立体選択的酸化に伴うアセトフェノンへの生変換を経由して、６日を要し、収率61% (122mg) で (S) - 1 - フェニルエタノールが98%e.e. の光学純度で得られた。

(R)- 1 - (2-ナフチル) エタノールの合成

固定化豌豆蛋白質の基質１-(２- ナフチル) エタノール (201mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(R) - 1 -(2 - ナフチル) エタノールの立体選択的酸化に伴う2-アセトナフトンへの生変換を経由して、４日を要し、収率50% (100mg) で (S) - 1 -(2 - ナフチル) エタノールが99%ee 以上の光学純度で得られた。(図

1参照）

次に、固定化豌豆蛋白質を光学分割触媒として用いた上記の光学活性アルコールの合成結果を以下の表に示す。

	穀類及び豆類蛋白質 豌豆	反応光学活性アルコール (Chiral Product)	収率 (%)	光学純度 (%e.e.)
1	Pisum sativum L.	(S)-1-(4- ブロモフェニル)エタノール	57	88
2	Pisum sativum L.	(S)-1-(4- クロロフェニル)エタノール	42	87
3	Pisum sativum L.	(S)-1-(4- メトキシフェニル)エタノール	48	95
4	Pisum sativum L.	(R)-1-(4- ニトロフェニル)エタノール	38	54
5	Pisum sativum L.	(S)-1-フェニルエタノール	61	98
6	Pisum sativum L.	(S)-1-(2- ナフチル) エタノール	51	99

以上から、豌豆水溶性蛋白質がファインケミカル分野における合成中間体を合成する光学分割触媒として有効であり、高純度のR体又はS体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることを見出した。

実施例2（大豆蛋白質）

第1の工程の大豆蛋白質の水溶性抽出と第2の工程の固定化については実施例1の条件と同じであり、第3の工程において、大豆・アルギン酸カルシウムゲルビーズを蒸留水温度を35℃にした後に、基質ラセミアルコールとして、1－（2－ブロモフェニル）エタノール、1－（2－クロロフェニル）エタノール、1－（2－メチ

ルフェニル）エタノール、１－（２－メトキシフェニル）エタノール、１－（２－ニトロフェニル）エタノール、１－（２－ナフチル）エタノールを添加し、それぞれ振とう培養器５５rpm の条件に設定し基質変換させ、豌豆蛋白質で用いた条件と同様に第４の工程と第５の工程を経由して得られた光学活性アルコールの評価を豌豆蛋白質の時と同様に行った。

(R)-1-(4- ブロモフェニル）エタノールの合成

固定化大豆蛋白質の基質（±)-1-(4- ブロモフェニル）エタノール（200mg ）に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4- ブロモフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-ブロモアセトフェノンへの生変換を経由して、2 日を要し、収量108mg で、54 % の収率にて(R)-1-(4- ブロモフェニル）エタノール得られた。光学純度は88%e.e. で得られた。機器条件は固定化豌豆蛋白質と同様である。

(R)-1-(4- クロロフェニル）エタノールの合成

固定化大豆蛋白質の基質(±)-1-(4- クロロフェニル）エタノール；200mg に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4- クロロフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-クロロアセトフェノンへの生変換を経由して、3 日を要し、収量102mg で、51% の収率にて(R)-1-(4- クロロフェニル）エタノールが得られた。光学純度は96%e.e. で得られた。

(R)-1-(4- メトキシフェニル）エタノールの合成

固定化大豆蛋白質の基質(±)-1-(4- メトキシフェニル）エタノール；200mg に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4- メ

トキシフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-メトキシアセトフェノンへの生変換を経由して、5 日を要し、収量96mgで、48% の収率にて(R)-1-(4- メトキシフェニル）エタノールが得られた。光学純度は97%e.e. で得られた。

(S)-1-(4- ニトロフェニル）エタノールの合成

固定化大豆蛋白質の基質(±)-1-(4- ニトロフェニル）エタノール；200mg に対する生化学変換反応は以下の通り、(R)-1-(4- ニトロフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-ニトロアセトフェノンへの生変換を経由して、4 日を要し、収量90mgで、45% の収率にて(S)-1-(4- ニトロフェニル）エタノールが得られた。光学純度は99%e.e. で得られた。

次に、固定化大豆蛋白質を光学分割触媒として用いた上記の光学活性アルコールの合成結果を以下に示す。

	穀類及び豆類蛋白質 大豆	反応光学活性アルコール (Chiral Product)	収率 (%)	光学純度 (%e.e.)
1	Glycine max.	(R)-1-(4- ブロモフェニル) エタノール	54	82
2	Glycine max.	(R)-1-(4- クロロフェニル) エタノール	51	91
3	Glycine max.	(R)-1-(4- メトキシフェニル) エタノール	48	99
4	Glycine max.	(S)-1-(4- ニトロフェニル) エタノール	45	99
5	Glycine max.	(S)-1-(2- ナフチル) エタノ ール	49	99

以上から、大豆水溶性蛋白質がファインケミカル分野における合成中間体を合成する光学分割触媒として有効であり、高純度のＲ体

又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることを見出した。

実施例３（蕎麦蛋白質）

第１の工程の蕎麦の水溶性蛋白質の抽出において、実施例１の豌豆蛋白質と同様に処理して食物繊維を除去した後、アルカリ条件（pH9.5 付近）にして等電点沈殿させ、以下豌豆蛋白質と同様の操作にて蕎麦水溶性蛋白質を得、第２の工程において実施例１の操作を行い、蕎麦蛋白質・アルギン酸カルシウムゲルビーズを得、第３の工程において、蒸留水温度を３５℃にした後に、基質ラセミアルコールとして、実施例２と同様に基質ラセミ体アルコールを添加し、第４の工程と第５の工程を経由して得られる光学活性アルコールの評価を行った。

(R)-1-(4- ブロモフェニル）エタノールの合成

固定化蕎麦蛋白質の基質（±)-1-(4- ブロモフェニル）エタノール（200mg ）に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4- ブロモフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-ブロモアセトフェノンへの生変換を経由して、11日を要し、収量114mg で、57％の収率にて(R)-1-(4- ブロモフェニル）エタノール得られた。光学純度は82%e.e. で得られた。

(R)-1-(4- クロロフェニル）エタノールの合成

固定化蕎麦蛋白質の基質(±)-1-(4- クロロフェニル）エタノール（200mg ）に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4- クロロフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-クロロアセトフェノンへの生変換を経由して、13日を要し、収量116mg で、58

% の収率にて(R)-1-(4- クロロフェニル) エタノールが得られた。光学純度は91%e.e. で得られた。

(R)-1-(4- メトキシフェニル) エタノールの合成

固定化蕎麦蛋白質の基質(±)-1-(4- メトキシフェニル) エタノール (200mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(S)-1-(4-メトキシフェニル) エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-メトキシアセトフェノンへの生変換を経由して、6 日を要し、収量112mgで、46% の収率にて(R)-1-(4- メトキシフェニル) エタノールが得られた。光学純度は99%e.e. で得られた。

(S)-1-(4- ニトロフェニル) エタノールの合成

固定化蕎麦蛋白質の基質(±)-1-(4- ニトロフェニル) エタノール (200mg) に対する生化学変換反応は以下の通り、(R)-1-(4- ニトロフェニル) エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-ニトロアセトフェノンへの生変換を経由して、17日を要し、収量50mgで、25%の収率にて(S)-1-(4- ニトロフェニル) エタノールが得られた。光学純度は99%e.e. で得られた。

次に、固定化蕎麦蛋白質を光学分割触媒として用いる以上の光学活性アルコールの合成結果を下記の表に示す。

	穀類及び豆類蛋白質 蕎麦	反応光学活性アルコール (Chiral Product)	収率 (%)	光学純度 (%e.e.)
1	Fagopyrum esculentum.	(R)-1-(4- ブロモフェニル)エタノール	57	88
2	Fagopyrum esculentum.	(R)-1-(4- クロロフェニル)エタノール	58	96
3	Fagopyrum esculentum.	(R)-1-(4- メトキシフェニル)エタノール	46	99
4	Fagopyrum esculentum.	(S)-1-(4- ニトロフェニル)エタノール	25	99
5	Fagopyrum esculentum.	(S)-1-(2- ナフチル) エタノール	62	99

以上から、蕎麦蛋白質がファインケミカル分野における合成中間体を合成する光学分割触媒として有効であり、高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることを見出した。

実施例４（豌豆、大豆、蕎麦蛋白質の連続再利用の有効性）

実施例１～実施例３のように第１の工程で調製した豌豆、大豆、蕎麦蛋白質を用いた第２～第５の工程における１回目の有効性については、ファインケミカル分野における合成中間体として充分に利用可能な光学分割触媒として有効であり、高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られたことを見出した。実施例４は、固定化豌豆、大豆、蕎麦蛋白質の連続再利用の有効性についての結果を記す。

実施例１の結果は図２に示すように、１回目で固定化豌豆蛋白質はラセミ体の１－（２－ナフチル）エタノールのＲ体を立体選択的に２－アセトナフトンに酸化し、残存するＳ体の１－（２－ナフチ

ル）エタノールを99%e.e. 以上の高光学純度で生合成した。反応終了後の第４の工程で使用済みの固定化豌豆蛋白質を連続再利用して、第３の工程から同様の反応を試みた結果は図２のように、１回目の約半分の反応時間で99%e.e. 以上の高光学純度の（Ｓ）－１－(２－ナフチル）エタノールを生合成した。更に３回目の同様の反応を試みた結果、その８分の３の反応時間で99%e.e. 以上の高光学純度の（Ｓ）－１－(２－ナフチル）エタノールを生合成した。

次に、固定化豌豆蛋白質の連続再利用による基質１－(２－ナフチル）エタノールの合成結果を以下に示す。

連続再利用	反応時間（時間）	立体配置	光学純度	化学収率
1st	96	S	99	50
2nd	48	S	99	50
3ed	36	S	99	50

以上から、豌豆蛋白質がファインケミカル分野における合成中間体を合成する光学分割触媒として有効であり、連続再利用が可能なので大量に合成でき、高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることを見出した。

更に実施例２にて固定化大豆蛋白質の基質（±）-1-(4-メトキシフェニル）エタノール（200mg）に対する生化学変換反応は以下の通り、（Ｒ）-1-(4-メトキシフェニル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う4-メトキシアセトフェノンへの生変換を経由して、2日を要し、収量100mg で、50% の収率、光学純度は99%e.e. 以上にて(R)-1-(4-メトキシフェニル）エタノールが得られた。実施例４は

、第４の工程で使用済みの固定化大豆蛋白質を基質（ ±）-1-(4- メトキシフェニル）エタノールを用いて、再度第３の工程から同様の反応を検討した結果、１回目の約半分の反応時間で99%e.e. 以上の高光学純度の（ R）-1-(4- メトキシフェニル）エタノールを生合成した。更に、３回目の同様の反応を試みた結果、１回目の半分の反応時間で99%e.e. 以上の高光学純度の(R)-1-(4- メトキシフェニル）エタノールを生合成した。

次に、固定化大豆蛋白質の連続再利用による基質１-(4-メトキシフェニル）エタノールの合成結果を以下に示す。

連続再利用	反応時間	立体配置	光学純度	化学収率
1st	48	R	99	50
2nd	24	R	99	50
3ed	24	R	99	49

以上から、大豆蛋白質がファインケミカル分野における合成中間体を合成する光学分割触媒として有効であり、連続再利用が可能なので大量に合成でき、高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることを見出した。

実施例３にて、固定化蕎麦蛋白質の基質（ ±)-1-(2- ナフチル）エタノール（200mg ）に対する生化学変換反応は以下の通り、（ R)-1-(2- ナフチル）エタノールの立体選択的な酸化に伴う2-アセトナフトンへの生変換を経由して、４日を要し、収量100mg で、50%の収率、光学純度は99%e.e. 以上にて（ Ｓ)-1-(2- ナフチル）エタノールが得られた。実施例４はこの第４の工程で使用済みの固定化

蕎麦蛋白質を第３の工程から再度連続再利用して基質(±)-1-(2-ナフチル) エタノールと反応させた結果、一回目と同様に、(R)-1-(2- ナフチル) エタノールを立体選択的に2-アセトナフトンに酸化する変換機構を経由し、光学活性(S)-1-(2- ナフチル) エタノールが99%e.e. の光学純度にて得られた。固定化蕎麦蛋白質の連続再利用は少なくとも３回の有効性を持ち反応時間、化学収率、光学純度は共に変化が見られなかった。

次に、固定化蕎麦蛋白質の連続再利用による基質１-(2-ナフチル) エタノールの合成結果を以下に示す。以上から、蕎麦蛋白質がファインケミカル分野における合成中間体を合成するための光学分割触媒として有効であり、連続再利用が可能なので大量に合成できるため高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られることが分かる。

連続再利用	反応時間（時間）	立体配置	光学純度	化学収率
1st	96	S	99	50
2nd	96	S	99	50
3ed	96	S	99	50

実施例５（苦蕎麦蛋白質）

苦蕎麦の粉砕粉を１２メッシュの篩にかけて粒の大きな部分と殻部を取り除き、このようにして得られた粉砕粉を約４０℃、ｐＨ7.0 で、約９重量倍の蒸留水を用いて、４５分かけて水溶性蛋白質を抽出した。この抽出液からデカンターを用いて食物繊維部を分離し、タンパクカードを得た。このタンパクカード20ｇを計り取り、10倍等量の蒸留水200 ㎖中でミキサーで解砕して蛋白質スラリーを調

製した。

このスラリーを用いて、実施例１の第２工程と同様にして、固定化ビーズを得た。

±－１－フェニルエタノールからの（Ｓ）－１－フェニルエタノールの合成

続いて、この固定化ビーズを触媒として、苦蕎麦タンパクカードの２０倍等量の蒸留水400 *ml*を反応溶媒として添加し、恒温振とう培養器を用いて、蒸留水温度35℃にした後、基質として±－１－フェニルエタノール201 mgを添加し、培養器を５５rpm の条件に設定し、8 日間基質転換させた。豌豆蛋白質で用いた条件と同様に第４と第５の工程を経由して、変換率５０％で、光学純度９５％e.e.、収率４２％で（Ｓ）－１－フェニルエタノールが得られた。生成アセトフェノンは収率５１％（１０２ｍｇ）であった。

（２）のケトン分子を基質として用いる不斉還元反応により、光学活性アルコールを製造する方法

実施例６（蕎麦蛋白質）

実施例５と同様にして、蕎麦の粉砕粉から固定化ビーズを得た。

アセトフェノンからの（Ｓ）－１－フェニルエタノールの合成

続いて、この固定化ビーズを触媒として、蕎麦タンパクカードの２０倍等量の蒸留水400 *ml*を反応溶媒として添加し、恒温振とう培養器を用いて、蒸留水温度35℃にした後、基質としてアセトフェノン202 mgを添加し、培養器５５rpm の条件に設定し、基質転換させた。第４工程として、ジエチルエーテルで抽出し、第５工程としてシリカゲルクロマトグラフ（７０～２３０メッシュ）を用いて、展

開溶媒として、ヘキサン：酢酸エチル＝９：１を用いて、単離精製した。残留アセトフェノンは５０％であった。反応条件、変換率、光学純度、収率、及び得られたフェニルエタノールの立体配置を下表に示す。

実施例７～１２

アセトフェノンからの（Ｓ）－１－フェニルエタノールの合成

アマランサス粉、紅花隠元粉、キビ粉、栗粉、苦蕎麦粉を用いて、実施例６と同様にして、アセトフェノンを基質転換させた。残留アセトフェノンは、それぞれ、５５％、５１％、４５％、１１％及び５１％であった。反応条件、変換率、光学純度、収率、及び得られたフェニルエタノールの立体配置を下表に示す。

穀類名	反応時間（日）	変換率（％）	収率（％）	光学純度（％e.e.）	立体配置
普通蕎麦粉	6	34	30	66	S
アマランサス粉	7	21	20	97	S
紅花隠元粉	7	30	25	15	S
キビ粉	4	50	33	96	S
栗粉	4	85	60	62	S
苦蕎麦粉	7	40	22	97	S

２－アセトナフトンからの（Ｓ）－１－（２－ナフチル）エタノールの合成

実施例１３（苦蕎麦粉蛋白質）

苦蕎麦粉３００ｇを約４０℃で、４５分間、２０００㎖の水で抽出し、水溶性成分を７０００ｒｐｍ／分で、２０分間遠心分離し、

得られた沈殿物（固体）を、実施例１と同様に固定化しビーズを調製した。基質として、２－アセチルナフトン２０３ｍｇを用い、実施例５と同様にして、４日間反応させると、収率１１％（１０５ｍｇ）で（Ｓ）－１－（２－ナフチル）エタノールが生合成された。キラルセルＯＢ（ダイセル株式会社製）を用いた（Ｓ）－１－（２－ナフチル）エタノールのＨＬＰＣ分析を、ヘキサン対２－プロパノール９対１の展開溶媒で、流速０．５㎤／分、吸光度２５４ｎｍに設定して行った結果、リテンションタイム２０．８分に９９．９％のＳアルコールの吸収、２３．８分に０．１％のＲアルコールの吸収が確認できた。

産業上の利用可能性

穀類又は豆類から水溶性蛋白質を抽出する第１の工程と、該蛋白質を固定化する第２の工程と、前記蛋白質を触媒として原料である基質の酵素変換反応を行う第３の工程と、該第３の工程により変換した前記反応基質及び反応生成物を有機溶媒により抽出する第４の工程と、該第４の工程で抽出した反応基質及び反応生成物から光学活性アルコール又は光学活性アルコールのアシル化体を単離・精製する第５の工程を組み合わせ、必要により加水分解することにより、ファインケミカル分野における合成中間体を合成する触媒として充分に利用可能な高純度のＲ体又はＳ体の光学活性アルコールが安全かつ平易に得られる。

請　求　の　範　囲

1．穀類又は豆類から水溶性蛋白質を抽出する第1の工程と、該蛋白質を固定化する第2の工程と、該蛋白質を触媒として原料である基質の酵素変換を非極性溶媒又は極性溶媒で行う第3の工程と、該第3の工程により変換した反応混合物を有機溶媒を用いて抽出する第4の工程、該第4の工程における抽出物から光学活性アルコール又は光学活性アルコールのアシル化体を単離、精製する第5の工程及び必要により加水分解工程とからなることを特徴とする光学活性アルコールの製造方法。

2．触媒が蕎麦、アマランサス、米、小麦、大麦、トウモロコシ、エンバク、ライ麦、粟、ヒエ、キビ、ハト麦、モロコシ等の穀類、又は小豆、インゲン豆、豌豆、リョクトウ、大豆等の豆類より抽出した水溶性蛋白質である請求項1に記載の光学活性アルコールの製造方法。

3．第3工程における酵素変換の基質がラセミ体アルコールであって、その一方の鏡像体を選択的に酸化することを特徴とする請求項1に記載の光学活性アルコールの製造方法。

4．第3工程における酵素変換の基質がケトンであって、不斉還元反応によることを特徴とする請求項1に記載の光学活性アルコールの製造方法。

5．第3工程における酵素変換の基質がラセミアルコールのアシル化体であって、不斉加水分解反応によることを特徴とする請求項1に記載の光学活性アルコールの製造方法。

6．第3工程における酵素変換が基質ラセミ体アルコールのハロゲン化アシル又は酢酸ビニルによる不斉アシル化反応であり、第4の工程における抽出物が光学活性アルコールのアシル化体であり、

第５工程の後に加水分解工程を含むことを特徴とする請求項１に記載の光学活性アルコールの製造方法。

Fig.1

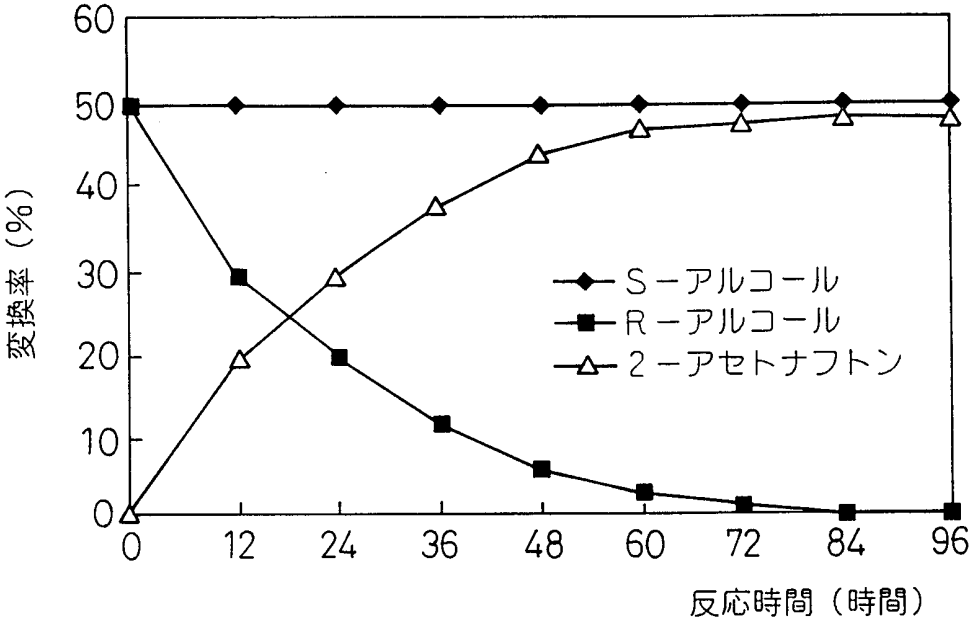
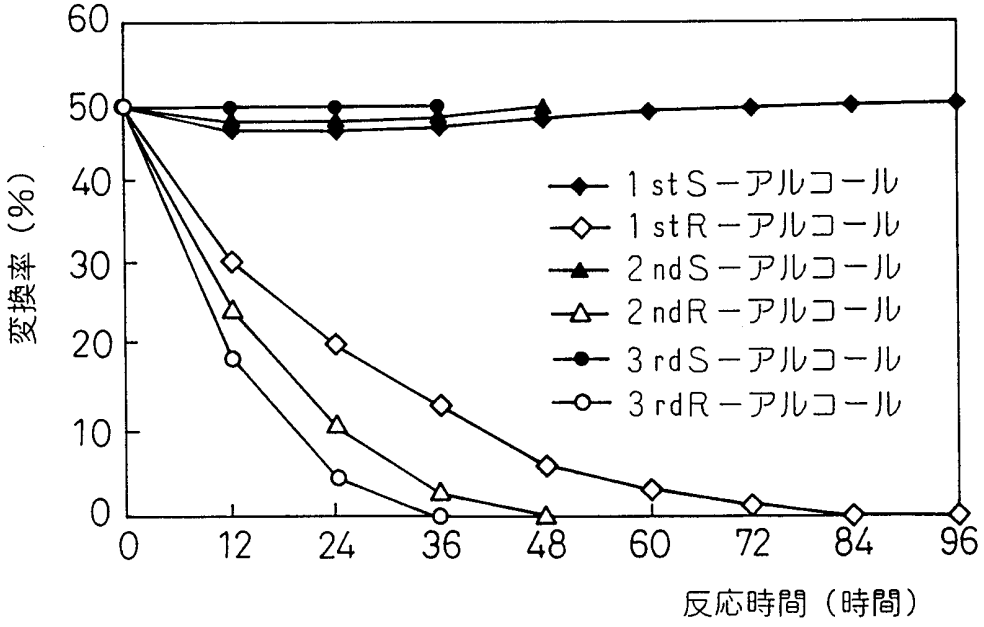

60
50
40
30
20
10
0
変換率（%）
0
12
24
36
48
60
72
84
96
反応時間（時間）
S－アルコール
R－アルコール
2－アセトナフトン

Fig.2


60
50
40
30
20
10
0
変換率（%）
0
12
24
36
48
60
72
84
96
反応時間（時間）
1 st S－アルコール
1 st R－アルコール
2 nd S－アルコール
2 nd R－アルコール
3 rd S－アルコール
3 rd R－アルコール

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/06005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[6] C12P41/00, C12P7/02

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)
Int.Cl[6] C12P41/00, C12P7/02

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-222592, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 August, 1992 (12. 08. 92) (Family: none)	1-6
A	JP, 8-103289, A (Nisshinbo Industries,Inc.), 23 April, 1996 (23. 04. 96) (Family: none)	1-6

☐ 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 document 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	Date of mailing of the international search report
15 March, 1999 (15. 03. 99)	23 March, 1999 (23. 03. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９８／０６００５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl^{6}　Ｃ１２Ｐ４１／００，Ｃ１２Ｐ７／０２

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^{6}　Ｃ１２Ｐ４１／００，Ｃ１２Ｐ７／０２

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

BIOSIS(DIALOG),WPI(DIALOG)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ａ	ＪＰ，４－２２２５９２，Ａ（中外製薬株式会社）１２．８月．１９９２（12.08.92）　（ファミリーなし）	１－６
Ａ	ＪＰ，８－１０３２８９，Ａ（日清紡績株式会社）２３．４月．１９９６（23.04.96）　（ファミリーなし）	１－６

☐ 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	国際調査報告の発送日
１５．０３．９９	23.03.99

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	９４５２
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	滝本　晶子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４９		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）