

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 5 月 25 日 (25.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/36592 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 1/20, 1/00 [JP/JP]. 加納 誠 (KANOU, Makoto) [JP/JP]. 村尾耕三 (MURAO, Kouzo) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP). 安部泰輝 (ABE, Yasuteru) [JP/JP]; 〒214-0014 神奈川県川崎市多摩区登戸3816番地 三菱レイヨン株式会社 東京技術・情報センター内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07969
- (22) 国際出願日: 2000 年 11 月 10 日 (10.11.2000)
- (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:
特願平 11/322836
1999 年 11 月 12 日 (12.11.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.) [JP/JP]; 〒108-8506 東京都港区港南一丁目6番41号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺文昭 (WATANABE, Fumiaki) [JP/JP]. 岡崎華子 (OKAZAKI, Hanako) [JP/JP]. 水無 渉 (MIZUNASHI, Wataru)
- (81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STERILIZED MICROBIAL CELLS

(54) 発明の名称: 死滅化菌体

(57) Abstract: Sterilized microbial cells having been sterilized by adding a surfactant in the process of sterilizing vital cells, which contain an industrially useful enzyme or the like produced therein, without inactivating the enzyme or the like.

(57) 要約:

工業的に有用な酵素等を菌体内に生産させた生菌体を、該酵素等の活性を失活させることなしに死滅化させる工程において、界面活性剤を添加することにより死滅化させた死滅化菌体である。



WO 01/36592 A1

明 細 書

死滅化菌体

5 技術分野

本発明は、微生物触媒中に含まれる微生物菌体を死滅化させてなる死滅化菌体に関する。

背景技術

- 10 微生物菌体を工業的に使用する場合、製造中の漏出、製品への混入、あるいは使用後の取り扱い等で二次的に微生物汚染を引き起こす可能性が危惧される。通常は安全性の高い菌体を用いて閉鎖系で反応を行い、反応液から珪藻土等の助剤を用い、菌体をろ過により除去するか、菌体を固定化することにより菌体の漏洩を最小限にする措置を取るのが一般的である。この場合、安全性の高い菌体を用
- 15 いるために完全な死滅化は重要視されていなかったが、近年、製造者責任について注目を集める中、安全性の高い菌体を用いる場合においても生菌体の漏洩をなくすことが求められている。

- また、遺伝子組換え体を使用する場合には、各種ガイドラインにより閉鎖系以外での操作の場合には、微生物菌体の完全死滅化が要求されている。死滅化法と
- 20 して、例えば、目的とする酵素等の失活が起こらない条件での熱処理、あるいは菌体を破碎して粗酵素液として使用するのが一般的である。薬剤等を用いて、微生物を死滅化する方法としては、一般に界面活性剤が用いられ、界面活性剤が細菌の細胞膜を破壊する、あるいは生命維持に重要な酵素タンパク質を変性させる等により死滅化が達成される。特に陽イオン界面活性剤、両性イオン界面活性剤
- 25 を用いた場合、高い殺菌効果を発揮する。

先行技術として、塩化ベンザルコニウムを添加することにより、大腸菌組換え体を死滅化させる方法が開示されている。（特開昭61-152276号参照）

死滅化法として、熱処理の場合は、目的の酵素等が熱に耐性を有していないと

使用できない。また、菌体を破碎して粗酵素液とする場合には、煩雑な操作により粗酵素液を製造しなければならず、反応液からの酵素の分離操作が菌体を用いる場合に比べて非常に負荷の高いものとなる。よって、工業的な利用の観点からは多くの問題がある。

- 5 イオン系界面活性剤による殺菌方法は、周知であるが、一般に低濃度の微生物群を殺菌する除菌効果であり、本発明でいう高濃度の微生物菌体の死滅化を達成できることは全く知られていなかった。

- 10 また、先行技術（特開昭61-152276号）は、大腸菌のみに実施された処理法である。また、生理活性物質を抽出、精製過程において適用されることから、菌体の破壊、凝集等は問題にならないが、本発明で得られる死滅化菌体は、そのまま、あるいは固定化した後、物質生産の反応触媒として用いるものである。したがって、菌体の破壊や凝集等は、酵素活性、反応性の低下及び固定化時のトラブルの原因となり、工業的利用に極めて不利である。

15 発明の開示

- 本発明者らは、比較的穏和な条件で、汎用性が高く、且つ工業的に有用な酵素等を菌体内に生産させた生菌体を、該酵素活性等を失活させることなしに死滅させる手法に関して検討したところ、界面活性剤の存在下で微生物菌体を処理することにより、工業的に有用な酵素失活等を伴うことなく、微生物菌体の死滅化を
20 達成できることを見だし本発明を完成するに至った。本発明でいう菌体の死滅化とは、比較的高濃度の菌体懸濁中の当該細菌の生菌数を実質的に零にすることである。ここで、生菌数が実質的に零とは、微生物菌体の生存率が $1 / 10^{-5}$ 以下となることを意味する。生存率は、菌体懸濁液中の生菌数と死滅化処理後に菌体懸濁液に生存する生菌数との比で表される。生菌数は、計測対象の菌体懸濁
25 液を所定の濃度に希釈した後、菌体が生育可能な固体培地上に当該菌体懸濁液を撒き、当該固体培地上に生育した菌体数と希釈倍率とから算出される。

すなわち、本発明は、工業的に有用な酵素等を菌体内に生産させた生菌体を、該酵素等の活性を失活させることなしに死滅化させる工程において、界面活性剤

を添加することにより死滅化させた微生物菌体及びその製造法である。

本発明は、以下の(1)～(14)を包含する。

(1) 乾燥菌体重量が5g/L～200g/Lである微生物触媒を界面活性剤を含む水性媒体中で処理することにより死滅させた死滅化菌体。

5 (2) 界面活性剤が陽イオン系界面活性剤又は両性イオン性界面活性剤である(1)記載の死滅化菌体。

(3) 陽イオン系界面活性剤が、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化メチルステアロイル及び臭化セチルトリメチルアンモニウムの群から選択される少なくとも1つである(2)記載の死滅化菌体。

10 (4) 界面活性剤を15%以下の溶液として添加し、処理することにより死滅させた(1)～(3)いずれか1に記載の死滅化菌体。

(5) 塩化ベンゼトニウムの濃度が、0.05～5%である(3)又は(4)に記載の死滅化菌体。

15 (6) 微生物触媒を界面活性剤及びグルタルアルデヒドを含む水性媒体中で処理することにより死滅させた死滅化菌体。

(7) 微生物触媒の乾燥菌体重量が5g/L～200g/Lである(6)記載の死滅化菌体。

(8) 界面活性剤が陽イオン系界面活性剤又は両性イオン性界面活性剤である(6)又は(7)に記載の死滅化菌体。

20 (9) 陽イオン系界面活性剤が、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化メチルステアロイル、臭化セチルトリメチルアンモニウムの群から選択される少なくとも1つである(6)～(8)いずれか1に記載の死滅化菌体。

(10) 塩化ベンゼトニウムの濃度が、0.05～5%である(9)記載の死滅化菌体。

25 (11) グルタルアルデヒドの濃度が、0.05～5%である(6)～(10)いずれか1に記載の死滅化菌体。

(12) 微生物触媒が、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、アミダーゼ、フマラーゼ、アスパルターゼ及びエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチ

レンジアミンリアーゼから選ばれる少なくとも 1 の酵素活性を有するものである
(1) ~ (11) いずれか 1 に記載の死滅化菌体。

(13) 微生物触媒が、遺伝子組換え体細菌を含むものである (12) 記載の死滅化菌体。

- 5 (14) 遺伝子組換え体細菌が、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌である (13) 記載の死滅化菌体。

本発明で対象となる微生物触媒は、特に限定されないが、化学品等を製造する際に生体触媒として使用する微生物菌体、特に遺伝子組換え体を含むものである。微生物菌体としては、例えば、アクリロニトリルをアクリルアミドに変換する

- 10 ニトリルヒドラターゼ生産菌である *Rhodococcus rhodochrous* J-1、ニトリルヒドラターゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え体 *R. rhodochrous* ATCC 12674/pKNH2、アクリロニトリルをアクリル酸に変換するニトリラーゼ生産菌である *Rhodococcus* sp. SK92、グリシンアミドをグリシンに変換するアミダーゼ生産菌である
15 *Rhodococcus* sp. EA4、フマル酸をリンゴ酸に変換するフマラーゼ生産菌である *Bacillus subtilis* ATCC 6051、*Bacillus stearothermophilus* ATCC 12016 及びロドコッカス *Rhodococcus* ATCC 12674、フマル酸とアンモニアを L-アスパラギン酸に変換するアスパルターゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え体ロドコッカス *Rhodococcus* ATCC
20 12674/pAR016、フマル酸とジアミン類をポリアミノカルボン酸類に変換する酵素遺伝子を導入した遺伝子組換え体である、*Rhodococcus rhodochrous* ATCC 17895/pSE001 等が挙げられる。

- 上記 *Rhodococcus rhodochrous* J-1 は、FERM BP-1478 として、昭和 62 年 9 月 18 日付けで通産省工業技術院生命工
25 学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。上記 *R. rhodochrous* ATCC 12674/pKNH2 は、FERM BP-3733 として、平成 3 年 3 月 1 日付けで通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号)

にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。上記 *Rhodococcus* sp. SK92 は、FERM BP-3324 として、平成2年2月21日付けで通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。上記 *Rhodococcus* sp. EA4 は、FERM BP-6231 として、平成3年3月28日付けで通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。上記 *Rhodococcus rhodochrous* ATCC17895/pSE001 は、FERM BP-6548 として、平成9年9月18日付けで通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

また、寄託番号の記載のない組換え体に関しては、その作成法を以下に示した。その他の菌は公知であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から容易に入手することができる。フマル酸とアンモニアから L-アスパラギン酸を製造する際に使用される遺伝子組換え体ロドコッカス ロドクロウス ATCC12674/pAR016 は、特開平10-337185号明細書記載の方法で作製した。

フマル酸とジアミン類からポリアミノカルボン酸類を製造する際に使用される遺伝子組換え体、ロドコッカス ロドクロウス ATCC17895/pSE001（FERM BP-6548）は、以下のようにして作製した。

プラスミド pED020（特開平10-210984号明細書記載）、 $2\mu\text{l}$ に対し、10倍濃度制限酵素用緩衝液 $2\mu\text{l}$ 、滅菌水 $15\mu\text{l}$ 、制限酵素 XhoI $1\mu\text{l}$ を添加し、 37°C にて2時間反応させた。エタノール沈殿によりプラスミドを回収し、乾燥後 $15\mu\text{l}$ の滅菌水、 $2\mu\text{l}$ の10倍濃度 Klenow fragment 用緩衝液、 $2\mu\text{l}$ の 10mM dNTP 溶液、 $1\mu\text{l}$ の Klenow fragment を添加して 37°C にて2時間反応させた。エタノール沈殿により DNA 断片を回収し、乾燥後 $8\mu\text{l}$ の滅菌水、 $1\mu\text{l}$ の XbaI リンカー溶液、 $16\mu\text{l}$ の Ligation kit（TaKaRa 酒造株式会社製

5 溶液A及び4 μ lの溶液Bを添加して16℃にて4時間反応させた後、JM109に形質転換させた。得られた組換え体よりプラスミドを調製して、pED020のXhoI部位がXbaI部位に変換されたプラスミドを得た。得られたプラスミド2 μ lに対し、10倍濃度制限酵素用緩衝液2 μ l、滅菌水15 μ l、
制限酵素EcoRV 1 μ lを添加し、37℃にて2時間反応させた。エタノール沈殿によりDNA断片を回収し、乾燥後8 μ lの滅菌水、1 μ lのSse8387Iリンカー溶液、16 μ lのLigation kit (TaKaRa酒造株式会社製) 溶液A及び4 μ lの溶液Bを添加して16℃にて4時間反応させた後JM109に形質転換させた。得られた組換え体よりプラスミドを調製し、
10 EcoRV部位がSse8387I部位に変換されたプラスミドを得た。得られたプラスミド2 μ lに対し、10倍濃度制限酵素用緩衝液2 μ l、滅菌水14 μ l、制限酵素XbaI 1 μ l及びSse8387I 1 μ lを添加し、37℃にて2時間反応させた。その後、0.7%アガロース電気泳動で分離し1.7Kbのバンドを回収しロドコッカス細菌のプロモーターを有するプラスミドpSJ034のXbaI-Sse8387I部位に挿入し、組換え体プラスミドpSE001を作成した。

pSJ034はプラスミドpSJ023 (特願平9-65618号明細書記載) より図1に示した工程により作成した。

Rhodococcus rhodochrous ATCC17895株の
20 対数増殖期の細胞を遠心分離機により集菌し、氷冷した滅菌水にて3回洗浄し、滅菌水に懸濁した。プラスミドpSE001 1 μ lと菌体懸濁液10 μ lを混合し氷冷した。キュベットにDNAと菌体の懸濁液を入れ、遺伝子導入装置Gene Pulser (BIO RAD) により2.0KV、200 OHMSで電気パルス処理を行った。電気パルス処理液を氷冷下、10分間静置し、37℃
25 で10分間ヒートショックを行い、MYK培地 (ポリペプトン 5g/L、バクトイーストエキス 3g/L、バクトモルトエキス 3g/L、K₂HPO₄ 2g/L、KH₂PO₄ 2g/L) 500 μ lを加え、30℃、5時間静置した後、50mg/Lカナマイシン入りMYK寒天培地に塗布し、30℃、3日間

培養して組換え体 *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 17895 / pSE001 (FERM BP-6548) を作製した。

- 本発明において、死滅化处理とは、微生物触媒中に含まれる微生物菌体に対して界面活性剤及び/又はグルタルアルデヒドを作用させる処理を意味する。具体的、死滅化处理とは、微生物菌体懸濁液に界面活性剤及び必要に応じてその他の添加剤を溶解し、微生物菌体と界面活性剤とを、又は微生物菌体と界面活性剤と添加剤とを接触させる処理である。この死滅化处理に際しては、保冷或いは保温しながら行うことが好ましい。死滅化处理を所定の温度に維持した状態で行うことによって、微生物触媒としての能力を高く維持することができる。さらに、死滅化处理は、攪拌しながら行っても良い。

菌体を処理する際、培養液、該培養液を適当な緩衝液等で洗浄した洗浄菌体、又はその処理物を用いることができる。また、死滅化处理に際しては、例えば、洗浄性向上、細胞膜の透過性向上及び菌体の安定性向上等を目的として、薬剤処理、菌体破碎処理等を予め施すことが好ましい。

- 死滅化处理時の菌体濃度は、特に限定されないが、培養液の菌濃度以上が望ましい。工業的な利用の観点からは、乾燥菌体で 5 g / L 以上が良い。また、死滅化处理時の菌体濃度は、乾燥菌体で 200 g / L 以下であることが好ましい。本発明によれば、高濃度の微生物菌体懸濁液に対して確実に死滅化处理を行うことができる。しかしながら、乾燥菌体で 200 g / L を越える菌体濃度である場合には、微生物の種類及び性質によるが、一般的に菌体懸濁液の流動性が著しく低下し、界面活性剤等の分散性及び溶解性が悪くなり、微生物菌体の死滅化を効率よく行えない虞がある。したがって、死滅化处理時の菌体濃度は、5 ~ 200 g / L であることが好ましい。

- 菌体を死滅化处理する際の処理温度は氷結温度から 80 °C、好ましくは 0 ~ 70 °C で行うことができる。温度に関しては、特に限定されないが、目的とする酵素等の安定性に応じて任意に設定することができる。

菌体を死滅化处理する際に添加する界面活性剤としては、特に限定されないが陽イオン系界面活性剤、陰イオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤及び両

性イオン性界面活性剤等何でも用いることができる。非イオン系界面活性剤として、例えば、K S 6 0 4（信越化学工業株式会社製）、プルロニック L 6 1、L G 1 2 6（旭電化工業株式会社製）、エマルゲン 1 0 9 P（花王株式会社製）、トリトン X-1 0 0 等が挙げられる。また、陽イオン系界面活性剤としては、例えば、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化メチルステアロイル、臭化セチルトリメチルアンモニウム等が挙げられる。両性イオン性界面活性剤としては、カルボキシベタイン型、アミノカルボン酸塩等が挙げられる。陽イオン系界面活性剤や両性イオン性界面活性剤は殺菌効果が高いことが知られており、低濃度で効果的に菌体を死滅化させることができるので好ましい。また、菌体の死滅化処理には、必要に応じて単独あるいは２種類以上の界面活性剤を混合して用いることができる。

菌体を死滅化処理する際の界面活性剤の濃度は、0.01～20%好ましくは0.05～10%が良い。界面活性剤の濃度は、低すぎると菌体の死滅化に十分な効果が期待されず、また、高すぎると処理後の廃液の処理の問題や工業的に有用な酵素等の失活等の問題が生じるため使用する微生物菌体及び目的とする酵素等の安定性等を考慮して最適な濃度を選択することが望ましい。

また、イオン系界面活性剤を使用する際、添加時に高濃度溶液を使用すると、死滅化処理時に微生物菌体の溶菌、破壊及び凝集を引き起こす場合がある。界面活性剤は、低濃度で添加することが有効である。濃度としては、0.5～15%、好ましくは1～8%程度で添加するのが良い。

死滅化処理する際、処理液のpHは4～11、好ましくは5～10が良い。処理の際のpHは、目的とする酵素等の安定性を考慮して選択するのが望ましい。

死滅化処理の際に、その効果を向上させる目的で各種の添加剤を添加することも有効である。例えば、エタノール等のアルコール類、2-メルカプトエタノール等のチオール類、エチレンジアミン等のアミン類、システイン、オルニチン及びシトルリン等のアミノ酸類、グルタルアルデヒド等のアルデヒド類が挙げられる。

また、目的とする酵素等の安定性を向上させる目的で該酵素等の基質、生成物、

阻害剤等を添加することも有効である。例えば、各種ニトリル、各種アミド、各種有機酸、アミノ酸、ポリアミノカルボン酸等が挙げられる。これらの添加剤は、目的とする酵素等の安定性を考慮して単独であるいは2種類以上混合して最適な組み合わせ及び最適な濃度を選択するのが望ましい。

5

図面の簡単な説明

図1は、プラスミド p S J 0 3 4 の作製方法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 10 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕

R h o d o c o c c u s r h o d o c h r o u s A T C C 1 7 8 9 5 / p
S E 0 0 1 (F E R M B P - 6 5 4 8)

15 1. 培養

- MYK-Km培地（MYK培地に50mg/L カナマイシン含有）200m
lに接種し、30℃、72時間前培養した。この培養物を30Lジャーを用いて、
グルコース 15g/L、グルタミン酸ナトリウム 10g/L、バクトイー
ストエキス 1g/L、KH₂PO₄ 0.5g/L、K₂HPO₄ 0.5g/
20 L、硫酸マグネシウム 0.5g/L、50mg/L カナマイシンからなる培
地20L（pH7.2）に加え、30℃、60時間通気攪拌培養を行った。得ら
れた培養液20Lを中空糸膜クロスフローSF FILTER KL-F-81
02（クラレ株式会社製）中をモノポンプ（1m/s）で循環することにより
濃縮を行った。培養ろ液が10L排出された後、培養ろ液が2L排出されるごと
25 に100mMホウ酸緩衝液（pH9.2）を2L添加し、合計20Lの緩衝液を
用いて連続洗浄を行い、洗浄菌体10kgを作製した。得られた洗浄菌体の菌濃
度は、乾燥菌体で42g/Lであった。

2. 死滅化処理

該洗浄菌体 50 ml を用いて、表 1 に示す 5 % 界面活性剤溶液をそれぞれ 1 ml 添加して 45 °C で処理を行った。

3. 生菌数の測定

菌体処理終了後、使用した洗浄菌体と同容量の 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.2) で 2 回洗浄を行い、洗浄菌体と同容量になるよう懸濁した。各々の懸濁液を 0.1 ml ずつ MYK-Km 寒天培地に塗布し、30 °C、3 日間培養して生菌数を調べた。

4. 酵素活性測定

各死滅化菌体 1 ml を 342 mM フマル酸と 171 mM エチレンジアミンを含む pH 8.0 の水溶液 50 ml に懸濁し 24 時間反応させた。反応液から遠心分離により菌体を除いた後、上清のエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸量を HPLC を用いて分析し、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ (以下、EDDS アーゼと略す) 活性を調べた。(カラム; WAKOSIL 5C8 (和光純薬株式会社製)、溶出液; 10 mM 水酸化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムと 0.4 mM CuSO₄ を含む 50 mM 燐酸 pH 2.0) 死滅化処理を行っていない洗浄菌体の EDDS アーゼ活性を 100 として、処理後の EDDS アーゼ活性残存率を求めた。

表 1

	界面活性剤	処理時間(h)	生菌数 (個/ml)	残存活性(%)
1	なし	8	$>10^3$	98
2	なし	96	$>10^2$	33
3	KS602	72	0	56
4	LG126	72	0	62
5	フルロニックL61	96	0	41
6	エマルゲン109P	48	0	84
7	トリトンX-100	48	0	87
8	塩化セチルピリジニウム	24	0	65
9	塩化チルメチルステアロイル	24	0	64
10	塩化ベンゼトニウム	24	0	67

〔実施例 2〕

- 5 実施例 1 の方法で作製した洗浄菌体 50 ml を用いて、表 2 に示す濃度となるように、2.5%塩化ベンゼトニウム溶液を添加し、10℃又は30℃で8時間、処理を行い、処理後の生菌数及びEDDSアーゼの活性残存率を求めた。

表 2

	塩化ベンゼトニウム濃度	処理温度 (°C)	生菌数 (個/ml)	残存活性(%)
1	なし	10	$>10^7$	100
2	なし	30	$>10^6$	100
3	0.1%	10	125	98
4	0.1%	30	10	74
5	0.25%	10	0	96
6	0.25%	30	0	57
7	0.5%	10	0	94
8	0.5%	30	0	12

〔実施例 3〕

- 5 実施例 1 の方法で作製した洗浄菌体 50 ml を用いて表 3 に示す濃度となるように、0.6%、1.5%、3% の塩化ベンゼトニウムを含む 30% エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸溶液 (pH 8.5) を 10 ml 添加し、30°C 又は 50°C で 3 時間菌体処理を行い、処理後の生菌数及び EDDS アーゼの活性残存率を求めた。

表 3

	塩化ベンゼントリウム濃度	処理温度 (°C)	生菌数 (個/ml)	残存活性 (%)
1	なし	30	$>10^6$	98
2	なし	50	$>10^3$	106
3	0.1%	30	142	92
4	0.1%	50	10	98
5	0.25%	30	0	89
6	0.25%	50	0	98
7	0.5%	30	0	91
8	0.5%	50	0	0

〔実施例 4〕

- 5 実施例 1 の方法で作製した培養液 50 ml を用いて表 4 に示す濃度になるように、それぞれの 2 % 界面活性剤溶液を添加し、4 °C 又は 30 °C にて 3 時間菌体処理を行い、処理後の生菌数及び EDD S アーゼの活性残存率を求めた。

表 4

	界面活性剤	処理温度(℃)	生菌数(個/ml)	残存活性(%)
1	なし	4	$>10^9$	100
2	なし	30	$>10^6$	68
3	0.1%塩化セチル ^o リジニウム	4	0	114
4	0.1%塩化セチル ^o リジニウム	30	0	106
5	0.05%塩化セチル ^o リジニウム	4	$>10^2$	115
6	0.05%塩化セチル ^o リジニウム	30	0	100
7	0.1%塩化メチルステアロイル	4	0	120
8	0.1%塩化メチルステアロイル	30	0	102
9	0.1%塩化ベンゼトニウム	4	0	98
10	0.1%塩化ベンゼトニウム	30	0	96
11	0.05%塩化ベンゼトニウム	4	0	102
12	0.05%塩化ベンゼトニウム	30	0	103

〔実施例 5〕

5 (1) *Rhodococcus rhodochrous* J-1 (FERM BP-1478)

1. 培養

グルコース 10 g/L、 K_2HPO_4 0.5 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、酵母エキス 1 g/L、ペプト
 10 シン 7.5 g/Lからなる培地 (pH 7.2) を調製し、これらを500 ml 容三角フラスコに100 ml 分注し、120℃にて15分間オートクレープで滅菌した。この培地に*R. rhodochrous* J-1 (FERM BP-1478) を接種して28℃で3日間振盪培養を行った。この培養液1 ml を同じ培地 (三角フラスコ20本) に接種し、同時に尿素15 g/L、 $CoCl_2$ 10
 15 mg/Lを添加して28℃で96時間振盪培養した。遠心分離によって回収した

菌体を培養液と同量の50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.7) で洗浄後、100 ml の同緩衝液に懸濁し、洗浄菌体を作製した。得られた洗浄菌体の菌濃度は、乾燥菌体で105 g/Lであった。

2. 死滅化処理

- 5 該洗浄菌体を用いて、表5に示す濃度となるように1.5%塩化ベンゼトニウム溶液及び/又は0.25%グルタルアルデヒド溶液を添加し、30℃、5時間、死滅化処理を行った。また、比較として、1.5%塩化ベンゼトニウム溶液及び/又は0.25%グルタルアルデヒド溶液に代えて、リン酸緩衝液を添加し、同様な死滅化処理も行った。

10 3. 生菌数の測定

処理後、洗浄菌体を作製した際に用いた緩衝液で3回洗浄し、死滅化処理時と同じ容量になるよう同緩衝液で懸濁し、各々の懸濁液を0.1 ml ずつMYK寒天培地に塗布し30℃で3日間培養して生菌数を調べた。

4. 酵素活性測定

- 15 ニトリルヒドラターゼ活性は、1 Mアクリロニトリル1.0 ml、0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml 及び死滅化処理後の洗浄菌体を含む反応混合液2 ml について10℃で所定時間反応を行わせてから0.2 ml の1 N HCl を添加して反応を停止させた後、ガスクロマトグラフィーにより生成したアクリルアミドの量を分析することにより測定した。

- 20 (2) *R. rhodochrous* ATCC 12674 / pKNH2 (FERM BP-3733)

1. 培養

- グリセロール 10 g/L、ポリペプトン 5 g/L、酵母エキス 3 g/L、マルツエキス 3 g/L からなる培地 (pH 7.2) を調製し、これらを50
25 0 ml 容三角フラスコに100 ml 分注して120℃にて15分間オートクレープで滅菌した。この培地に*R. rhodochrous* ATCC 12674 / pKNH2 (FERM BP-3733) を接種して25℃で2日間振盪培養を行った。この培養液1 ml を同じ培地 (三角フラスコ20本) に接種し、同時に

イソブチロニトリル、イソブチルアミドをそれぞれ 1 g/L となるように添加して 25℃ で光照射下、3 日間培養を行った。遠心分離によって回収した菌体を、培養液と同量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) で洗浄後、200 ml の同緩衝液に懸濁し、洗浄菌体を作製した。得られた洗浄菌体の菌濃度は、乾燥菌体
5 で 32 g/L であった。

2. 死滅化处理

該洗浄菌体を用いて、表 5 に示す濃度となるように 1.5% 塩化ベンゼトニウム溶液を添加し、30℃、5 時間、死滅化处理を行った。また、比較として、1.5% 塩化ベンゼトニウム溶液に代えて、リン酸緩衝液を添加し、同様な死滅化
10 処理も行った。

3. 生菌数の測定

処理後、洗浄菌体を作製した際に用いた緩衝液で 3 回洗浄し、死滅化处理時と同じ容量になるよう同緩衝液で懸濁し、各々の懸濁液を 0.1 ml ずつ、MYK-Km 寒天培地に塗布し、30℃ で 3 日間培養して生菌数を調べた。

15 4. 酵素活性測定

ニトリルヒドラターゼ活性は、1 M アクリロニトリル 1.0 ml、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml 及び死滅化处理後の洗浄菌体を含む反応混合液 2 ml について 10℃ で所定時間反応を行わせてから 0.2 ml の 1 N HCl を添加して反応を停止させた後、ガスクロマトグラフィーにより生
20 成したアクリルアミドの量を分析することにより測定した。

(3) *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324)

1. 培養

シュークロース 20 g/L、ポリペプトン 5 g/L、 KH_2PO_4 1 g
25 /L、 K_2HPO_4 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L からなる培地 (pH 7.2) を調製し、これらを 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 分注して 120℃ にて 15 分間オートクレープで滅菌した。この培地に *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324) を接種して 30℃ で 3

日間振盪培養を行った。この培養液 1 ml を同じ培地（三角フラスコ 20 本）に接種し、同時にエチレンシアンヒドリン 2 ml を添加して 30℃で 20 時間振盪培養した後、エチレンシアンヒドリンを 3 ml 添加してさらに 3 日間培養を行った。

- 5 遠心分離によって回収した菌体を、培養液と同量の 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.7）で洗浄後、200 ml の同緩衝液に懸濁し、洗浄菌体を作製した。得られた洗浄菌体の菌濃度は、乾燥菌体で 36 g/L であった。

2. 死滅化処理

- 10 該洗浄菌体を用いて、表 5 に示す濃度となるように 1.5% 塩化ベンゼトニウム溶液を添加し、30℃、5 時間、死滅化処理を行った。また、比較として、1.5% 塩化ベンゼトニウム溶液に代えて、リン酸緩衝液を添加し、同様な死滅化処理も行った。

3. 生菌数の測定

- 15 処理後、洗浄菌体を作製した際に用いた緩衝液で 3 回洗浄し、死滅化処理時と同じ容量になるよう同緩衝液で懸濁し、それぞれの懸濁液を 0.1 ml ずつ、MYK-Km 寒天培地に塗布し、30℃で 3 日間培養して生菌数を調べた。

4. 酵素活性測定

- 20 ニトリラーゼ活性は、1 M アクリロニトリル 1.0 ml、0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）0.5 ml 及び死滅化処理後の洗浄菌体を含む反応混合液 2 ml について 10℃で所定時間反応を行わせてから 0.2 ml の 1 N HCl を添加して反応を停止させた後、液体クロマトグラフィーにより生成したアクリル酸の量を分析することにより測定した。

(4) *Rhodococcus* sp. EA4 (FERM BP-6231)

1. 培養

- 25 グリセロール 5 g/L、酵母エキス 0.02 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L からなる培地（pH 7.0）を調製し、これらを 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 分注して 120℃にて 15 分間オートクレープで滅菌した。この培地に *Rhodococcus*

c o c c u s s p . E A 4 (F E R M B P - 6 2 3 1) を接種して 3 0 ° C で 3 日間振盪培養を行った。この培養液 1 m l を同じ培地 (三角フラスコ 2 0 本) に接種し、同時にアセトアミド 5 g / L を添加して 3 0 ° C で 4 8 時間振盪培養した。

- 5 遠心分離によって回収した菌体を、培養液と同量の 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 7) で洗浄後、 2 0 0 m l の同緩衝液に懸濁し、洗浄菌体を作製した。得られた洗浄菌体の菌濃度は、乾燥菌体で 3 6 g / L であった。

2 . 死滅化处理

- 10 該洗浄菌体を用いて、表 5 に示す濃度となるように 1 . 5 % 塩化ベンゼトニウム溶液を添加し、 3 0 ° C 、 5 時間、死滅化处理を行った。また、比較として、 1 . 5 % 塩化ベンゼトニウム溶液に代えて、リン酸緩衝液を添加し、同様な死滅化处理も行った。

3 . 生菌数の測定

- 15 処理後、洗浄菌体を作製した際に用いた緩衝液で 3 回洗浄し、死滅化处理時と同じ容量になるよう同緩衝液で懸濁し、それぞれの懸濁液を 0 . 1 m l ずつ M Y K 寒天培地に塗布し、 3 0 ° C で 3 日間培養して生菌数を調べた。

4 . 酵素活性測定

- 20 アミダーゼ活性は、 0 . 2 M グリシンアミドを含む 0 . 0 5 M リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 7) 0 . 5 m l 及び死滅化处理後の洗浄菌体を含む反応混合液 1 m l について 3 0 ° C で所定時間反応を行わせてから遠心分離により菌体を除去した後、液体クロマトグラフィーにより生成したグリシンの量を分析することにより測定した。

(5) R . r h o d o c h r o u s A T C C 1 2 6 7 4 / p A R 0 1 6

1 . 培養

- 25 M Y K - K m 培地 1 0 0 m l に R h o d o c o c c u s r h o d o c h r o u s A T C C 1 2 6 7 4 / p A R 0 1 6 を接種し、 3 0 ° C で 7 2 時間培養した。本培養は、同培地 5 L (5 0 0 m l 容三角フラスコに 1 0 0 m l ずつ培地を入れた) で行い、前培養から 1 % 接種し、 3 0 ° C で 9 6 時間培養した。遠心分離に

よって回収した菌体を、培養液と同量の100 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄後、500 mlの同緩衝液に懸濁して洗浄菌体を作製した。得られた洗浄菌体の菌濃度は、乾燥菌体で42 g/Lであった。

2. 死滅化処理

- 5 該洗浄菌体を用いて、表5に示す濃度となるように1.5%塩化ベンゼトニウム溶液を添加し、30℃、5時間、死滅化処理を行った。また、比較として、1.5%塩化ベンゼトニウム溶液に代えて、リン酸緩衝液を添加し、同様な死滅化処理も行った。

3. 生菌数の測定

- 10 処理後、1 mMのMgCl₂を含有する100 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)で3回洗浄後、菌体処理時の容量と同じになるように同緩衝液で懸濁した。

処理後、洗浄菌体を作製した際に用いた緩衝液で3回洗浄し、死滅化処理時と同じ容量になるよう同緩衝液で懸濁し、それぞれの懸濁液を0.1 mlずつMYK-Km寒天培地に塗布し30℃で3日間培養して生菌数を調べた。

- 15 4. 酵素活性測定

アスパルターゼ活性は、1 Mフマル酸アンモニウム及び1 mM MgCl₂を含む0.05 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 8.0) 0.5 ml及び死滅化処理後の洗浄菌体を含む反応混合液1 mlについて30℃で所定時間反応を行わせてから遠心分離により菌体を除去した後、液体クロマトグラフィーにより生成した

- 20 アスパラギン酸の量を分析することにより測定した。

(6) ロドコッカス ロドクロウス ATCC 12674

1. 培養

グルコース 5 g/L、酵母エキス 0.02 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、K₂HPO₄ 1 g/Lからなる培地

- 25 (pH 7.0)を調製し、これらを500 ml容三角フラスコに100 ml分注して120℃にて15分間オートクレープで滅菌した。この培地にロドコッカス

ロドクロウス ATCC 12674を接種して30℃で3日間振盪培養を行った。この培養液1 mlを10 g/Lのフマル酸を含む同じ培地(三角フラスコ2

0本)に接種し、30℃で48時間振盪培養した。遠心分離によって回収した菌体を、培養液と同量の50mMリン酸緩衝液(pH7.7)で洗浄後、200mlの同緩衝液に懸濁し、洗浄菌体を作製した。得られた洗浄菌体の菌濃度は、乾燥菌体で31g/Lであった。

5 2. 死滅化处理

該洗浄菌体を用いて、表5に示す濃度となるように1.5%塩化ベンゼトニウム溶液を添加し、30℃、5時間、死滅化处理を行った。また、比較として、1.5%塩化ベンゼトニウム溶液に代えて、リン酸緩衝液を添加し、同様な死滅化处理も行った。

10 3. 生菌数の測定

処理後、1mMのMgCl₂を含有する100mMリン酸緩衝液(pH8.0)で3回洗浄後、菌体処理時の容量と同じになるように同緩衝液で懸濁した。

処理後、洗浄菌体を作製した際に用いた緩衝液で3回洗浄し、死滅化处理時と同じ容量になるよう同緩衝液で懸濁した懸濁液を0.1mlずつMYK寒天培地に塗布し30℃で3日間培養して生菌数を調べた。

4. 酵素活性測定

フマラーゼ活性は、0.2Mフマル酸を含む0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.7)0.5ml及び死滅化处理後の洗浄菌体を含む反応混合液1mlについて30℃で所定時間反応を行わせてから遠心分離により菌体を除去した後、液体クロマトグラフィーにより生成したリンゴ酸の量を分析することにより測定した。

表 5

	供試菌体	酵素	処理条件	生菌数 (個/ml)	残存活性 (%)
1	J-1	ニトリルヒトラーゼ	リン酸緩衝液	$>10^5$	100
2	J-1	ニトリルヒトラーゼ	1.5%塩化ベンゼトニウム	0	95
3	J-1	ニトリルヒトラーゼ	1.5%塩化ベンゼトニウム	25	97
4	J-1	ニトリルヒトラーゼ	0.25%グルタルアルデヒド	1200	98
5	J-1	ニトリルヒトラーゼ	0.2%塩化ベンゼトニウム+ 0.25%グルタルアルデヒド	0	98
6	ATCC12674/pKNH2	ニトリルヒトラーゼ	リン酸緩衝液	$>10^5$	120
7	ATCC12674/pKNH2	ニトリルヒトラーゼ	0.25%塩化ベンゼトニウム	0	94
8	SK-92	ニトリラーゼ	リン酸緩衝液	$>10^5$	98
9	SK-92	ニトリラーゼ	0.25%塩化ベンゼトニウム	0	84
10	EA-4	アミターゼ	リン酸緩衝液	$>10^5$	99
11	EA-4	アミターゼ	0.25%塩化ベンゼトニウム	0	91
12	ATCC12674/pAR016	アスパルターゼ	リン酸緩衝液	$>10^5$	100
13	ATCC12674/pAR016	アスパルターゼ	0.25%塩化ベンゼトニウム	0	94
14	ATCC12674	アマーゼ	リン酸緩衝液	$>10^5$	100
15	ATCC12674	アマーゼ	0.25%塩化ベンゼトニウム	0	98

なお、本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考と

5 して本明細書に取り入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、工業的に有用な酵素等を失活させることなしに死滅させた微生物菌体を製造することができるため、微生物菌体を工業的に用いる場合、生菌

体の漏洩による二次的汚染を回避することができる。特に遺伝子組換え体を使用する場合、本発明による死滅化処理を行うことにより、後の工程での菌体の取り扱いが簡便化されて、特殊な設備を必要としない等の工業的に有用な手段を提供することができる。

請 求 の 範 囲

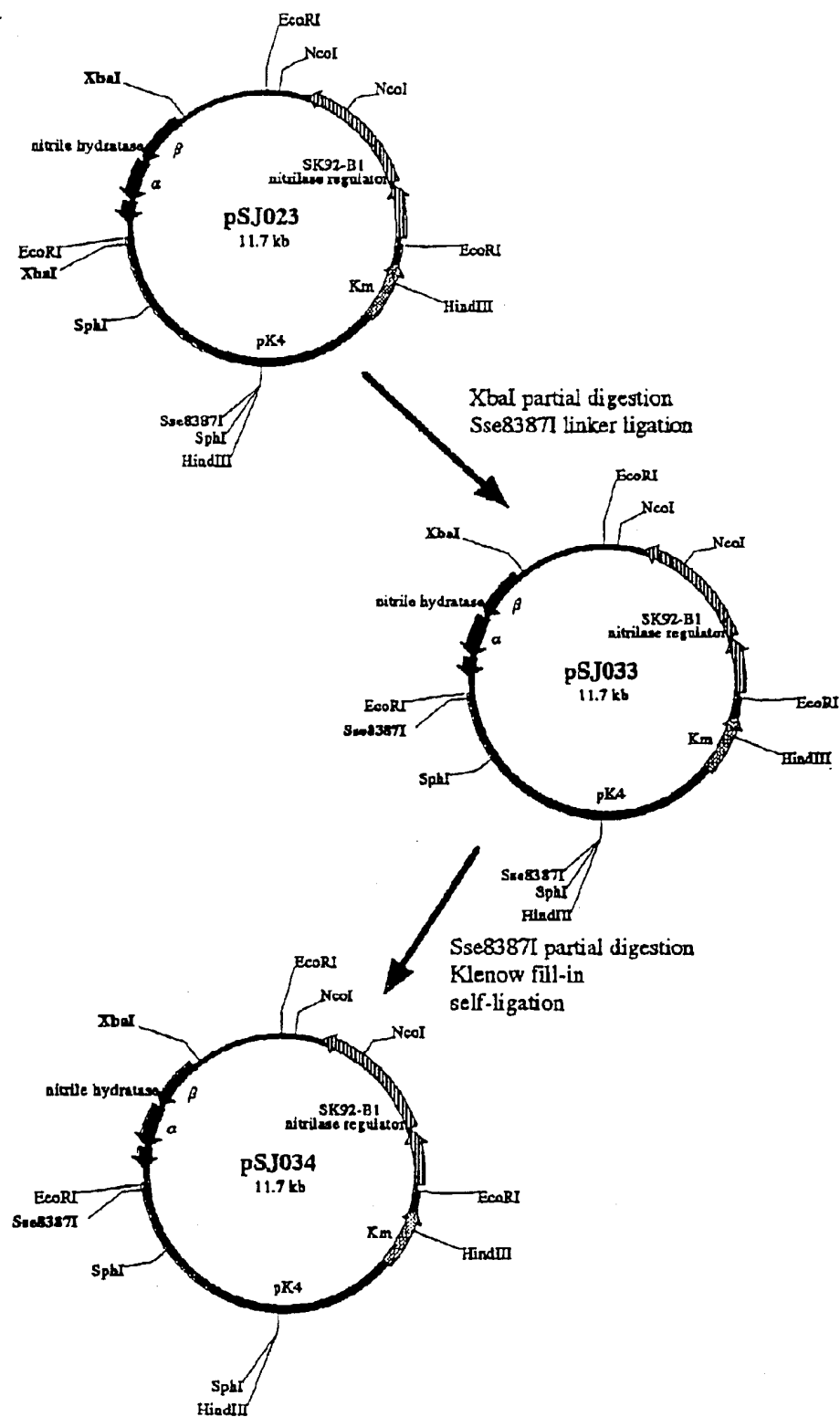
1. 乾燥菌体重量が5g/L～200g/Lである微生物触媒を界面活性剤を含む水性媒体中で処理することにより死滅させた死滅化菌体。
- 5 2. 界面活性剤が陽イオン系界面活性剤又は両性イオン性界面活性剤である請求項1記載の死滅化菌体。
 3. 陽イオン系界面活性剤が、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化メチルステアロイル及び臭化セチルトリメチルアンモニウムの群から選択される少なくとも1つである請求項2記載の死滅化菌体。
- 10 4. 界面活性剤を15%以下の溶液として添加し、処理することにより死滅させた請求項1～3いずれか1項に記載の死滅化菌体。
 5. 塩化ベンゼトニウムの濃度が、0.05～5%である請求項3又は4いずれか1項に記載の死滅化菌体。
 6. 微生物触媒を界面活性剤及びグルタルアルデヒドを含む水性媒体中で処理することにより死滅させた死滅化菌体。
- 15 7. 微生物触媒の乾燥菌体重量が5g/L～200g/Lである請求項6記載の死滅化菌体。
 8. 界面活性剤が陽イオン系界面活性剤又は両性イオン性界面活性剤である請求項6又は7記載の死滅化菌体。
- 20 9. 陽イオン系界面活性剤が、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化メチルステアロイル、臭化セチルトリメチルアンモニウムの群から選択される少なくとも1つである請求項8記載の死滅化菌体。
 10. 塩化ベンゼトニウムの濃度が、0.05～5%である請求項9記載の死滅化菌体。
- 25 11. グルタルアルデヒドの濃度が、0.05～5%である請求項6～10いずれか1項に記載の死滅化菌体。
 12. 微生物触媒が、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、アミダーゼ、フマラーゼ、アスパルターゼ及びエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレ

ンジアミンリアーゼから選ばれる少なくとも 1 の酵素活性を有するものである請求項 1 ～ 1 1 いずれか 1 項に記載の死滅化菌体。

1 3. 微生物触媒が、遺伝子組換え体細菌を含むものである請求項 1 2 記載の死滅化菌体。

- 5 1 4. 遺伝子組換え体細菌が、ロドコッカス (Rhodococcus) 属細菌である請求項 1 3 記載の死滅化菌体。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N1/20, C12N1/00		
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 ⁷ C12N1/20, C12N1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Rosa Pallanza et al. "In vitro activity of A-16686, a potential antiplaque agent" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (1984) Vol.26 No.4 P.462-465	1-5, 12-14 6-14
X Y	JP, 52-3833, A (Mototaka UENO), 12 January, 1999 (12.01.99) (Family: none)	1-5, 12-14 6-14
X Y	EP, 338439, A (KATAYAMA CHEM INC), 25 October, 1989 (25.10.89) & FI, 8901812, A & FI, 8901813, A & JP, 2-42007, A & US, 4963586, A & US, 5026723, A & CA, 1307202, C & CA, 1307203, C & DE, 68903664, E & FI, 92638, B & 92640, B & JP, 2716044, B2	1, 2, 12-14 6-14
X Y	JP, 61-152276, A (SUNTORY LIMITED), 10 July, 1986 (10.07.86) (Family: none)	1, 2, 12-14 6-14
☒ 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 05 February, 2001 (05.02.01)		Date of mailing of the international search report 13 February, 2001 (13.02.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07969

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 9-52804, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 25 February, 1997 (25.02.97) (Family: none)	1,2,12-14 6-14
X Y	JP, 2-55794, A (ASAHI DENKA KOGYO K.K.), 26 February, 1990 (26.02.90) (Family: none)	1,2,12-14 6-14
Y	BE, 858992, A (BAYER AG), 23 March, 1978 (23.03.78) & DE, 2643213, A & JP, 53-41419, A & DK, 7704214, A & FR, 2365632, A & GB, 1552726, A & US, 4188375, A & CH, 637422, A & DE, 2643213, C & IT, 1087527, B	6-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/07969

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12N1/20, C12N1/00

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.Cl⁷ C12N1/20, C12N1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), BIOSIS (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
<u>X</u> Y	Rosa Pallanza et al. "In vitro activity of A-16686, a potential antiplaque agent" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (1984) Vol.26 No.4 P.462-465	<u>1-5, 12-14</u> 6-14
<u>X</u> Y	JP, 52-3833, A (上野 素敬) 12.1月.1977 (12.01.77) ファミリーなし	<u>1-5, 12-14</u> 6-14

☒ 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

05.02.01

国際調査報告の発送日

13.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	EP, 338439, A (KATAYAMA CHEM INC) 25. 10月. 1989 (25. 10. 89) & FI, 8901812, A & FI, 8901813, A & JP, 2-42007, A & US, 4963586, A & US, 5026723, A & CA, 1307202, C & CA, 1307203, C & DE, 68903664, E & FI, 92638, B & 92640, B & JP, 2716044, B2	<u>1, 2, 12-14</u> 6-14
$\frac{X}{Y}$	JP, 61-152276, A (サントリー株式会社) 10. 7月. 1986 (10. 07. 86) ファミリーなし	<u>1, 2, 12-14</u> 6-14
$\frac{X}{Y}$	JP, 9-52804, A (武田薬品工業株式会社) 25. 2月. 1997 (25. 02. 97) ファミリーなし	<u>1, 2, 12-14</u> 6-14
$\frac{X}{Y}$	JP, 2-55794, A (旭電化工業株式会社) 26. 2月. 1990 (26. 02. 90) ファミリーなし	<u>1, 2, 12-14</u> 6-14
Y	BE, 858992, A (BAYER AG) 23. 3月. 1978 (23. 03. 78) & DE, 2643213, A & JP, 53-41419, A & DK, 7704214, A & FR, 2365632, A & GB, 1552726, A & US, 4188375, A & CH, 637422, A & DE, 2643213, C & IT, 1087527, B	6-14