

(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  
2023年9月7日(07.09.2023)



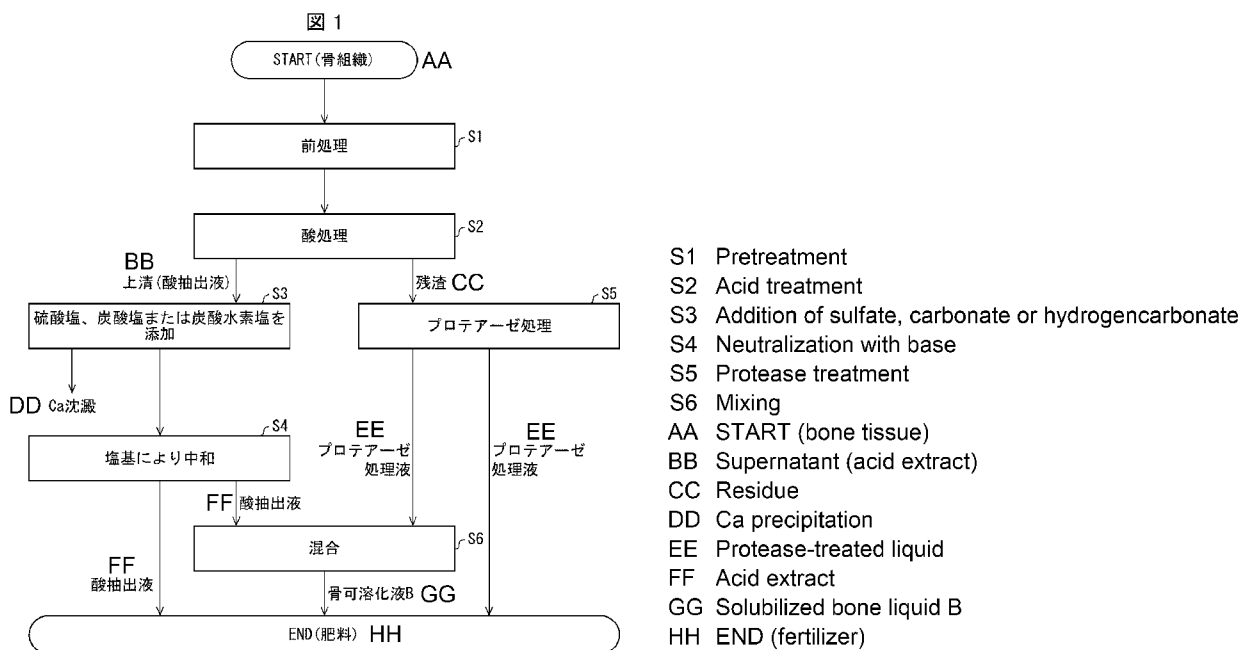
(10) 国際公開番号

WO 2023/167166 A1

- (51) 国際特許分類:  
C05F 1/00 (2006.01) C05G 5/20 (2020.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/007245
- (22) 国際出願日: 2023年2月28日(28.02.2023)
- (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 2022-031179 2022年3月1日(01.03.2022) JP
- (71) 出願人: 学校法人近畿大学 (KINKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5778502 大阪府東大阪市小若江3-4-1 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 森本 康一 (MORIMOTO, Koichi); 〒6496493 和歌山県紀の川市西三谷930 近畿大学 生物理工学部内 Wakayama (JP). 坂本 勝 (SAKAMOTO, Masaru); 〒6496493 和歌山県紀の川市西三谷930 近畿大学 生物理工学部内 Wakayama (JP). 田口 善智 (TAGUCHI, Yoshitomo); 〒6496493 和歌山県紀の川市西三谷930 近畿大学 生物理工学部内 Wakayama (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人 H A R A K E N Z O W O R L D P A T E N T & T R A D E M A R K (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(54) Title: FERTILIZER AND MANUFACTURING METHOD THEREOF

(54) 発明の名称: 肥料およびその製造方法



(57) Abstract: Provided is a manufacturing method of a novel fertilizer (for example, a liquid fertilizer) containing a decomposed bone tissue. A manufacturing method of a phosphoric acid-containing fertilizer according to one embodiment of the present invention includes at least one of the following step 1 (S7), step 2 (S2) and step 3 (S5). Step 1 (S7): A step for treating a bone tissue with a solution, which contains both an acid and a protease, and manufacturing a fertilizer from the resulting solubilized bone liquid A. Step 2 (S2): A step for treating a bone tissue with an acid and manufacturing a fertilizer from the resulting acid extract. Step 3 (S5): A step for treating an acid-treated bone tissue with a protease and manufacturing a fertilizer from the resulting protease-treated liquid.

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))
  - 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))
- 

(57) 要約: 骨組織分解物を含んでいる新規な肥料 (例えば液体肥料) の製造方法を提供する。本発明の一態様に係るリン酸を含有する肥料の製造方法は、下記工程1 (S7)、工程2 (S2) および工程3 (S5) のうち1つ以上を含む。工程1 (S7): 骨組織を酸およびプロテアーゼの両方を含む溶液で処理して、得られた骨可溶化液Aから肥料を製造する工程。工程2 (S2): 骨組織を酸処理して、得られた酸抽出液から肥料を製造する工程。工程3 (S5): 酸処理された骨組織をプロテアーゼ処理して、得られたプロテアーゼ処理液から肥料を製造する工程。

## 明 細 書

**発明の名称**：肥料およびその製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、肥料およびその製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 従来、骨組織を原料とする肥料として、高温処理または高圧処理を経て製造される骨粉が知られていた（例えば、特許文献1を参照）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0003] 特許文献1：特開2005-247616号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] 骨組織には、リン酸以外にも、無機成分（カルシウム、カリウム、ナトリウム、ビタミンなど）および有機成分（タンパク質、プロテオグリカン、脂肪酸、多糖、単糖など）が豊富に含まれている。さらに、上述した他にも、骨関連細胞（骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞など）；免疫細胞（T細胞、マクロファージ、白血球など）；赤血球、脂肪細胞、幹細胞などの残骸；骨組織に残留する骨髄、血液成分なども含まれており、骨組織は多様な無機成分と有機成分の集合体である。つまり、骨組織分解物には、リン酸以外にも植物の生長に効果的な分子が複数含まれており、相乗的効果が生まれる可能性が高い。それゆえ、骨組織分解物を含んでいる肥料は、高付加価値な商品となりうる。従来、食品残物の微生物による分解物、コンポストによる腐葉土などの肥料が知られている。しかし、食品残物は無機成分の含有量が比較的少なく、得られる肥料も無機成分の含有量が少なくなる傾向にある。また、微生物による食品残物の分解には長時間を要し、臭気が発生することも大きな課題となっている。さらに、既存の骨由来肥料は遅効性であり、数年間かけた土壌改良に利用される場合が多い。そこで、即効性があり、簡便かつ安価

で植物の生長を促進する肥料の開発が望まれていた。

[0005] しかし、特許文献1に記載された技術のように、高温処理または高圧処理を施す製造方法は、運転コストが高かつき、製造の制御が難しく、製造プラントの立地条件も限られる。そこで、本発明者らは、高温処理または高圧処理を伴わずに骨組織を分解し、得られた骨組織分解物を肥料とすることに着想した。本明細書において、肥料とは、固形肥料および液体肥料の両方を意味する。骨組織分解物は、稀釈液として液体肥料としてもよいし、凍結乾燥や風乾などの工程を経て固形肥料としてもよい。さらに、既存の固形肥料に骨組織分解物を噴霧または浸漬したものを肥料としてもよい。

[0006] また、高温処理または高圧処理した骨粉を含め、骨組織を原料とする既存の肥料は、固形肥料である。固形肥料は、養土に混ぜて使用するので、水耕栽培には適さない。仮に、固形肥料を水耕栽培に用いると、肥料の溶解速度が異なるので、肥料の濃度に偏りが生じ、肥料過多の箇所と肥料不足の箇所とが生じる可能性がある。さらに、固形肥料は、葉面散布などの施肥形態には利用できないし、植物生長効果は遅効性である。このように、骨組織を原料とする既存の固形肥料には、いくつかの難点が存在している。

[0007] 本発明の一態様は、骨組織分解物を含んでいる新規な肥料（例えば液体肥料）を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0008] <1>

下記工程1、工程2および工程3のうち1つ以上を含む、リン酸を含有する肥料の製造方法。

工程1：骨組織を酸およびプロテアーゼの両方を含む溶液で処理して、得られた骨可溶化液Aから肥料を製造する工程

工程2：骨組織を酸処理して、得られた酸抽出液から肥料を製造する工程

工程3：酸処理された骨組織をプロテアーゼ処理して、得られたプロテアーゼ処理液から肥料を製造する工程

## &lt;2&gt;

上記工程 2 および上記工程 3 を含み、  
さらに下記工程 4 を含む、<1>に記載の製造方法。

え 工程 4：上記酸抽出液および上記プロテアーゼ処理液を混合して、得られた骨可溶化液 B から肥料を製造する工程

## &lt;3&gt;

上記工程 1 または上記工程 2 を含み、硝酸、塩酸、蟻酸および硫酸からなる群より選択される 1 種類以上により骨組織を酸処理する、<1>または<2>に記載の製造方法。

## &lt;4&gt;

上記工程 1 または上記工程 3 を含み、至適 pH が 1.5～8.0 であるプロテアーゼにより骨組織をプロテアーゼ処理する、<1>～<3>のいずれかに記載の製造方法。

## &lt;5&gt;

上記工程 1 または上記工程 2 を含み、5～60℃にて骨組織を酸処理する、<1>～<4>のいずれかに記載の製造方法。

## &lt;6&gt;

上記工程 1 または上記工程 2 を含み、0.6～2.0 mol/L の酸により骨組織を酸処理する、<1>～<5>のいずれかに記載の製造方法。

## &lt;7&gt;

上記工程 1 または上記工程 2 を含み、6～48 時間骨組織を酸処理する、<1>～<6>のいずれかに記載の製造方法。

## &lt;8&gt;

上記工程 1 または上記工程 2 に先立って、上記骨組織を前処理する工程をさらに含み、

上記前処理は、上記骨組織の加熱、上記骨組織の加圧下における加熱および上記骨組織へのマイクロ波の照射からなる群より選択される 1 つ以上である、<1>～<7>のいずれかに記載の製造方法。

< 9 >

上記前処理工程において、上記骨組織に含まれているタンパク質を変性させる、< 1 >~< 8 >のいずれかに記載の製造方法。

< 1 0 >

< 1 >~< 9 >のいずれかに記載の製造方法により得られる肥料。

< 1 1 >

液体肥料である、< 1 0 >に記載の肥料。

< 1 2 >

リン酸と、

I型コラーゲン、アルファー2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片と、  
を含んでいる、肥料。

< 1 3 >

上記ペプチド断片は、当該断片が由来するタンパク質の活性を失っている、< 1 2 >に記載の肥料。

< 1 4 >

上記ペプチド断片の分子量は、1万Da以下である、< 1 2 >または< 1 3 >に記載の肥料。

< 1 5 >

上記肥料に含まれている上記リン酸の濃度は、280mM以上である、< 1 2 >~< 1 4 >のいずれかに記載の肥料。

### 発明の効果

[0009] 本発明の一態様によれば、骨組織分解物を含んでいる新規な肥料（例えば液体肥料）が提供される。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法の一例を表すフローチャートである。

[図2]本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法の他の例を表すフローチャートである。

[図3]本発明の一実施形態に係るリン酸の製造方法の一例を表すフローチャートである。

[図4]豚骨を硝酸で酸処理して得られた骨組織をプロテアーゼで処理した結果を表す図である。

[図5]豚骨を硝酸または塩酸で酸処理して得られた骨組織を、アクチニジンで処理した結果を表す図である。

[図6]種々の酸およびプロテアーゼを利用して、溶液交換を伴わずに骨可溶化液Aを調製した結果を表す図である。

[図7]酸抽出液による植物の生長効果を検討した実験の結果を表す図である。

[図8]酸抽出液、プロテアーゼ処理液または骨可溶化液Aによる植物の生長効果を検討した実験の結果を表す図である。

[図9]骨可溶化液Aまたは市販の培養液による植物の生長効果を比較した実験の結果を表す図である。

[図10]骨可溶化液Aまたは市販の培養液による植物の生長効果を比較した実験の結果を表す図である。

[図11]骨可溶化液Aまたは市販の液体肥料による、ストレス耐性関連遺伝子の発現量の変化を比較した実験の結果を表す図である。

[図12]骨可溶化液Aまたは市販の液体肥料による、ストレス耐性関連遺伝子の発現量の変化を比較した実験の結果を表す図である。

[図13]骨組織の前処理による、酸抽出液に含まれているリン酸の量への影響を表す図である。

[図14]酸抽出液に含まれているタンパク質成分を、電気泳動により分析した結果を表す図である。

[図15]種々のプロテアーゼを利用して、プロテアーゼ処理液を調製した結果を表す図である。

[図16]プロテアーゼ処理液に含まれているタンパク質成分を、電気泳動によ

り分析した結果を表す図である。

[図17]種々の酸およびプロテアーゼを利用して、溶液交換を伴わずに骨可溶化液Aを調製した結果を表す図である。

[図18]骨可溶化液Bまたは市販の液体肥料を与えて5日間栽培したスプラウトの葉における、発現変動遺伝子の解析結果を表す図である。

[図19]骨可溶化液Bと市販の液体肥料の混合液または市販の液体肥料のみを与えて5日間栽培したスプラウトの根における、発現変動遺伝子の解析結果を表す図である。

[図20]骨可溶化液Bと市販の液体肥料の混合液または市販の液体肥料のみを与えて5日間栽培したスプラウトの葉における、発現変動遺伝子の解析結果を表す図である。

[図21]市販の骨粉を原料としてリン酸を抽出した結果を表す溶出曲線である。

[図22]市販の骨粉を原料として液体肥料を製造した結果を表す図である。プロテアーゼとして、ニューラーゼF3Gを使用した。

[図23]市販の骨粉を原料として液体肥料を製造した結果を表す図である。プロテアーゼとして、パパインを使用した。

## 発明を実施するための形態

### [0011] [1. 肥料の製造方法]

本発明の一態様に係る肥料の製造方法は、下記工程1～3のうち1つ以上を含む。一実施形態において、肥料の製造方法は、下記工程4をさらに含む。以下、工程2、工程3、工程4、工程1の順に詳細に説明する。

[0012] 工程1：骨組織を酸およびプロテアーゼの両方を含む溶液で処理して、得られた骨可溶化液Aから肥料を製造する工程

工程2：骨組織を酸処理して、得られた酸抽出液から肥料を製造する工程

工程3：酸処理された骨組織をプロテアーゼ処理して、得られたプロテアーゼ処理液から肥料を製造する工程

工程4：酸抽出液およびプロテアーゼ処理液を混合して、得られた骨可溶

化液Bから肥料を製造する工程

[0013] [1. 1. 工程2]

工程2は、骨組織を酸処理して、得られた酸抽出液から肥料を製造する工程である。工程2では、主として骨組織から無機成分が分離して、酸抽出液中に溶離する。得られた酸抽出液からは、肥料を製造する。酸抽出液そのものを肥料としてもよいし、プロテアーゼ処理液と混合した骨可溶化液Bを肥料としてもよい。

[0014] 工程2に供する骨組織は、どのような生物に由来してもよい。生物の例としては、哺乳類、鳥類、両生類、魚類が挙げられる。肥料を大量生産するためには、肥料の原料となる骨組織を大量に入手できることが好ましく、例えば家畜（ウシ、ブタ、ヒツジ、ニワトリなど）の骨組織が好適に用いられる。骨組織を酸処理する前に、予め細断、粉碎してもよい。このようにすれば、骨組織の分解をより効率よく行えるので、製造時間を短縮できることがある。

[0015] 工程2で骨組織を処理する酸は、特に限定されない。酸の例としては、塩酸、硝酸、蟻酸、硫酸、トリクロロ酢酸が挙げられる。プランク・リュクロ液などの酸性脱灰液を使用してもよい。入手がしやすいという観点からは、硝酸、塩酸、蟻酸および硫酸からなる群より選択される1種類以上が好ましい。リン酸の回収効率の観点からは、塩酸、硫酸および硝酸からなる群より選択される1種類以上が好ましく、塩酸および硝酸からなる群より選択される1種類以上がより好ましい。カルシウムの回収効率の観点からは、塩酸および蟻酸からなる群より選択される1種類以上が好ましい。2種類以上の酸を適切な比率で混合して用いてもよい。

[0016] 工程2においては、酸を溶媒に希釈した溶液により、骨組織を酸処理してもよい。溶媒の例としては、水、低級アルコール、グリセロール、プロパン-1, 2-ジオール、1, 3-プロパンジオールが挙げられる。2種類以上の溶液を適切な比率で混合して用いてもよい。

[0017] 酸の濃度は、酸処理を施す骨組織の体積に応じて、適宜決定できる。骨組

織の体積が小さい場合は、低濃度の酸で処理できる。骨組織の体積が大きい場合は、酸の濃度が高い方が好ましい。低濃度の酸で酸処理を行う場合は、微粉化した骨組織を処理することが好ましい。しかし、骨組織の体積が大きい場合であっても、酸濃度を高くし、かつ長時間浸漬すれば、十分に無機成分を抽出できる。例えば、体積が数  $\text{cm}^3$  以下の骨破砕物を原料とする場合、工程2における酸の濃度の下限は、 $0.6 \text{ mol/L}$  以上、 $0.7 \text{ mol/L}$  以上、 $0.8 \text{ mol/L}$  以上または  $0.9 \text{ mol/L}$  以上でありうる。工程2における酸の濃度の上限は、 $2.0 \text{ mol/L}$  以下、 $1.5 \text{ mol/L}$  以下、 $1.0 \text{ mol/L}$  以下または  $0.9 \text{ mol/L}$  以下でありうる。酸の濃度が上記範囲であれば、無機成分を効率よく抽出でき、かつ、酸濃度が高すぎないので酸抽出液を中和するコストを低減できる。

[0018] 微粉化した骨組織を酸処理する場合における、好適な酸の濃度の例は次の通りである。酸が硝酸であるとき、硝酸の濃度の下限は、 $0.6 \text{ mol/L}$  以上が好ましく、 $0.7 \text{ mol/L}$  以上がより好ましい。硝酸の濃度の上限は、 $1.0 \text{ mol/L}$  以下が好ましく、 $0.9 \text{ mol/L}$  以下がより好ましい。酸が塩酸であるとき、塩酸の濃度の下限は、 $0.8 \text{ mol/L}$  以上が好ましく、 $0.9 \text{ mol/L}$  以上がより好ましい。塩酸の濃度の上限は、 $1.2 \text{ mol/L}$  以下が好ましく、 $1.1 \text{ mol/L}$  以下がより好ましい。酸が蟻酸であるとき、蟻酸の濃度の下限は、 $0.8 \text{ mol/L}$  以上が好ましく、 $0.9 \text{ mol/L}$  以上がより好ましい。蟻酸の濃度の上限は、 $1.2 \text{ mol/L}$  以下が好ましく、 $1.1 \text{ mol/L}$  以下がより好ましい。酸が硫酸であるとき、硫酸の濃度の下限は、 $0.8 \text{ mol/L}$  以上が好ましく、 $0.9 \text{ mol/L}$  以上がより好ましい。硫酸の濃度の上限は、 $1.2 \text{ mol/L}$  以下が好ましく、 $1.1 \text{ mol/L}$  以下がより好ましい。ただし、上記の濃度は骨組織を微粉化した場合における好適な濃度の例であり、体積がより大きい骨組織を原料とする場合は、酸の濃度をより高めてもよい。

[0019] 例えば、体積が数  $\text{cm}^3$  以下の骨破砕物を原料とする場合、工程2における抽出時間の下限は、6時間以上が好ましく、8時間以上がより好ましく、1

0時間以上がさらに好ましい。工程2における抽出時間の上限は、48時間以下が好ましく、24時間以下がより好ましく、14時間以下がさらに好ましい。抽出時間が上記の範囲であれば、骨組織に含まれている無機成分を十分に抽出できる。

[0020] 例えば、体積が数 $\text{cm}^3$ 以下の骨破砕物を原料とする場合、工程2における酸処理の温度は、 $5\sim 60^\circ\text{C}$ が好ましい。上記の温度範囲で酸処理を行えば、酸処理に伴う不快臭の発生を低減できる。そのため、肥料の製造工場の立地条件が緩やかになる。また、 $60^\circ\text{C}$ 以下の温度条件に調節するためには高価な特別の機器を必要とせず、ウォーターバスまたはインキュベーターを用いることで温度を一定に保つことができる。

[0021] 工程2においては、酸に加えて、カルシウムイオンを捕捉できるキレート剤を添加してもよい。あるいは、工程2において、酸処理の前後において骨組織をキレート剤処理してもよい（酸処理とキレート剤処理では、溶液を交換してもよいし、交換しなくてもよい）。キレート剤の例としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA、CAS登録番号：60-00-4）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA、CAS登録番号：67-42-5）、エチレンジアミン-N、N'-ジコハク酸（EDDS、CAS登録番号：20846-91-7）が挙げられる。工程2において、キレート剤を含んでいる溶液のpHは、 $6.0\sim 8.0$ が好ましい。例えば、体積が数 $\text{cm}^3$ 以下の骨破砕物を原料とする場合、工程2におけるキレート剤の濃度の下限は、 $0.1\text{mol/L}$ 以上、 $0.2\text{mol/L}$ 以上、 $0.3\text{mol/L}$ 以上または $0.4\text{mol/L}$ 以上でありうる。工程2におけるキレート剤の濃度の上限は、 $0.9\text{mol/L}$ 以下、 $0.8\text{mol/L}$ 以下、 $0.7\text{mol/L}$ 以下または $0.6\text{mol/L}$ 以下でありうる。

[0022] 工程2においては、酸処理の後において、カルシウムの少なくとも一部を除去してもよい。カルシウムを除去する方法の例としては、酸抽出液を中和する方法（リン酸カルシウム沈澱が生じる）、硫酸または硫酸塩を加える方法（硫酸カルシウムが沈澱する）、炭酸または炭酸塩を加える方法（炭酸カ

ルシウムまたは炭酸水素カルシウムが沈澱する)、炭酸水素塩を加える方法(炭酸カルシウムまたは炭酸水素カルシウムが沈澱する)が挙げられる。

[0023] 後述する前処理工程を実施すると、工程2において得られる酸抽出液のリン酸濃度が向上する傾向にある。酸抽出液に含まれているリン酸の濃度は、例えば、280 mM以上、300 mM以上または320 mM以上でありうる。

[0024] [1. 2. 工程3]

工程3は、酸処理された骨組織をプロテアーゼ処理して、得られたプロテアーゼ処理液から肥料を製造する工程である。得られたプロテアーゼ処理液からは、肥料を製造する。プロテアーゼ処理液そのものを肥料としてもよいし、酸抽出液と混合した骨可溶化液Bを肥料としてもよい。

[0025] 工程3において使用されるプロテアーゼは、特に限定されない。プロテアーゼの例としては、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼが挙げられる。

[0026] プロテアーゼの具体例としては、トリプシン [EC 3. 4. 21. 4]、キモトリプシン [EC 3. 4. 21. 1]、[EC 3. 4. 21. 2]、ペプシン [EC 3. 4. 23. 1]、エコリシン [EC 3. 4. 23. 19]、パpain [EC 3. 4. 22. 2]、フィシン [EC 3. 4. 22. 3]、アクチニダイン [EC 3. 4. 22. 14]、ブロメライン [EC 3. 4. 22. 32]、カテプシンB [EC 3. 4. 22. 1]、カテプシンH [EC 3. 4. 22. 16]、カテプシンK [EC 3. 4. 22. 38]、カテプシンL [EC 3. 4. 22. 15]、カテプシンS [EC 3. 4. 22. 27]、サーモライシン [EC 3. 4. 24. 27] が挙げられる。

[0027] プロテアーゼとして、市販の酵素製剤を使用してもよい。このような製剤の例としては、ニューラーゼF3G (Rhizopus niveus由来)、オリエンターゼAY (Aspergillus niger由来)、テトララーゼ (Aspergillus niger由来)

、スミチームA P (Aspergillus niger由来)、デナプシン2 P (Aspergillus属由来)、ブリューワーズクラレックス (Aspergillus niger由来)、マキシプロA F P (Aspergillus niger由来)、プロテアーゼS「アマノ」G (Bacillus stearothermophilus由来)、プロテアーゼN「アマノ」G (Bacillus subtilis由来)、プロテアーゼNL「アマノ」 (Bacillus subtilis由来)、プロテアーゼA「アマノ」G (Aspergillus oryzae由来)、ウマミザイム (Aspergillus oryzae由来)、プロテアーゼP「アマノ」3 G (Aspergillus melleus由来)、プロテアーゼM「アマノ」SD (Aspergillus oryzae由来)、ペプチダーゼR (Rhizopus oryzae由来)が挙げられる。あるいは、化学合成された酵素、遺伝子工学の手法により作製された酵素、生物から抽出された酵素を使用してもよい。

[0028] 工程3において用いるプロテアーゼは、好ましくは、至適pHが1.5～8.0であるプロテアーゼである。至適pHが1.5～8.0であるプロテアーゼの例としては、プロテアーゼS「アマノ」G (至適pH: 7.0～8.5)、プロテアーゼN「アマノ」G (至適pH: 6.0～7.5)、プロテアーゼNL「アマノ」 (至適pH: 6.5～7.5)、プロテアーゼA「アマノ」G (至適pH: 6.0～7.5)、ウマミザイム (至適pH: 6.0～7.5)、プロテアーゼM「アマノ」G (至適pH: 3.0～6.5)、プロテアーゼP「アマノ」3 G (至適pH: 7.0～8.0)、ペプチダーゼR「アマノ」 (至適pH: 6.0～8.0)、アクチニジン (至適pH: 2.5～7.5)、パパイン (至適pH: 4.0～9.0)、ペプシン (至適pH: 1.5～3.0)、ニューラーゼF3 G (至適pH: 3.0～5.0)、トリプシン (至適pH: 7.0～9.0)、キモトリプシン (至適pH: 7.0～9.0)が挙げられる。用いるプロテアーゼは、より好ましくは、至適pHが1.5～5.0であるプロテアーゼである。至適pHが1.5～5.0であるプロテアーゼの例としては、プロテアーゼM「アマノ」 (至適pH: 3.0～6.5)、アクチニジン (至適pH: 2.5～7.5)、パパイン (至適pH: 4.0～9.0)、ペプシン (至適pH: 1.

5～3.0)、ニューラーゼF3G(至適pH:3.0～5.0)が挙げられる。用いるプロテアーゼは、さらに好ましくは、至適pHが1.5～4.0であるプロテアーゼである。至適pHが1.5～4.0であるプロテアーゼの例としては、アクチニジン(至適pH:2.5～7.5)、ペプシン(至適pH:1.5～3.0)、ニューラーゼF3G(至適pH:3.0～5.0)が挙げられる。

[0029] 工程3におけるプロテアーゼの濃度は、適宜設定できる。プロテアーゼの濃度の下限は、2mg/L以上または10mg/L以上でありうる。プロテアーゼの濃度の上限は、100mg/L以下または50mg/L以下でありうる。

[0030] 工程3における温度およびpHは、適宜設定できる。使用するプロテアーゼの至適温度および至適pHに合わせることが、処理効率を向上させる上では好ましい。工程3における反応系の温度の例としては、20～60℃が挙げられる。工程2における反応系の温度の下限は、10℃超、20℃以上、25℃以上、30℃以上、35℃以上、40℃以上、45℃以上、50℃以上または55℃以上でありうる。工程2における反応系の温度の上限は、60℃以下または55℃以下でありうる。

[0031] 工程3においては、反応系に塩を加えてもよい。反応系に加わる塩の濃度に応じて、プロテアーゼの基質特異性が変化する可能性がある。したがって、反応系に塩を加えることにより、得られるプロテアーゼ処理液に含まれている成分を変化させることができる。

[0032] 工程3において反応系に加える塩の例としては、塩化物塩が挙げられる。塩化物塩の例としては、NaCl、KCl、LiCl、MgCl<sub>2</sub>が挙げられる。工程3において反応系に加える塩の濃度の下限は、0mmol/L超、20mmol/L以上、100mmol/L以上、150mmol/L以上、200mmol/L以上、500mmol/L以上、1000mmol/L以上、1500mmol/L以上、2000mmol/L以上でありうる。工程3において反応系に加える塩の濃度の上限は、4000mmol/L

以下または2000mmol/L以下でありうる。

[0033] 一実施形態において、工程3において生成するペプチド断片の大きさは、1万Da以下、8,000Da以下、6,000Da以下または4,000Da以下である。この程度の大きさにまで切断されたペプチド断片は、生理活性を失っている蓋然性が高い。また、この程度の大きさにまで切断されたペプチド断片は、植物に栄養として吸収されやすく、肥料の有効成分として機能する場合がある。一実施形態において、ペプチド断片は、I型コラーゲン、アルファー2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片である。

[0034] [1.3.工程4]

工程4は、工程2で得られた酸抽出液と、工程3で得られたプロテアーゼ処理液とを混合して、得られた骨可溶化液Bから肥料を製造する工程である。得られた骨可溶化液Bからは、肥料を製造する。工程4において、酸抽出液およびプロテアーゼ処理液の混合比率は、特に限定されない。得られる骨可溶化液Bを所望の組成とするために、混合比を適宜選択できる。

[0035] [1.4.工程1]

工程1は、骨組織を酸およびプロテアーゼの両方を含む溶液で処理して、得られた骨可溶化液Aから肥料を製造する工程である。工程1では、工程2における酸処理と、工程3におけるプロテアーゼ処理が同時に進行することになる。工程1においては、酸処理およびプロテアーゼ処理に際して、溶液を交換する必要がない。

[0036] 工程1において、骨組織と酸およびプロテアーゼを接触させる順序は、特に限定されない。例えば、以下の順序が挙げられる。これらの順序の中では、順序1が好ましい。

順序1：酸を含む溶液に骨組織を浸漬させ、所定時間が経過した後、当該溶液にプロテアーゼを添加する。プロテアーゼを添加する前に、溶液のpHをプロテアーゼの至適pHに調節してもよい。

順序2：プロテアーゼを含む溶液に骨組織を浸漬させ、所定時間が経過した後、当該溶液に酸を加える。

順序3：酸およびプロテアーゼの両方を含む溶液を調製し、当該溶液に骨組織を浸漬させる。

[0037] 工程1における酸処理およびプロテアーゼ処理の好ましい条件については、[1.1]節および[1.2]節の記載が援用される。

[0038] [1.5. その他の工程]

本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法は、工程1～4に加えて、肥料の製造において通常実施されうる工程をさらに含んでもよい。そのような工程の例としては、前処理工程、成分添加工程、乾燥工程、粉碎工程、被覆造粒工程、梱包工程が挙げられる。

[0039] 前処理工程は、工程1または工程2に先立つ工程である。前処理工程では、原料である骨組織を前処理する。前処理工程を施すことにより、骨組織から抽出されるリン酸の量を増加させることができる（実施例4を参照）。

[0040] 一実施形態において、前処理工程では、骨組織を加熱する。このときの加熱温度は、30℃以上または40℃以上；100℃以下または80℃以下でありうる。骨組織を酸に浸漬した状態で加熱してもよい。

[0041] 一実施形態において、前処理工程では、骨組織を加圧下において加熱する。このときの圧力は、200kPa以上または1MPa以上；500MPa以下または800MPa以下でありうる。このときの加熱温度は、10℃以上または50℃以上；120℃以下または200℃以下でありうる。

[0042] 一実施形態において、前処理工程では、骨組織にマイクロ波を照射する。加熱、加圧下における加熱およびマイクロ波照射を、任意に組合せて施してもよい。このうち、マイクロ波照射は短時間で効果が得られるため、前処理工程としてより好ましい。マイクロ波の照射時間は、5秒間以上、10秒間以上または15秒間以上；10分間以下、7分間以下または5分間以下でありうる。

[0043] 前処理工程を施すと、骨組織に含まれているタンパク質は変性する。それ

ゆえ、前処理工程を施して得られる肥料には、変性したタンパク質（またはその断片）が含まれている。変性したタンパク質（またはその断片）は、本来のタンパク質が有していた生理活性を失っている。

[0044] 成分添加工程は、追加の肥料成分を添加する工程である。成分添加工程を設ければ、栽培される植物に応じて好適な組成を有する肥料を製造できるようになる。成分添加工程において添加される肥料成分の例としては、カリウム成分（酸化カリウム、水酸化カリウム、塩化カリウム、硫酸カリウムなど）、窒素成分（尿素、硝酸アンモニウムなど）、マグネシウム成分（リン酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなど）、ビタミン、マンガン、ホウ素、鉄、銅、亜鉛、モリブデンが挙げられる。また、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液Aまたは骨可溶化液Bを、他の肥料（無機肥料、有機肥料など）と混合してもよい。

[0045] 乾燥工程は、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液Aまたは骨可溶化液Bから余剰の水分を除去する工程である。乾燥工程を経ることにより、固体またはペースト状の肥料が得られる。固体の肥料は、必要に応じて、施肥しやすい大きさおよび形状に切断、粉碎してもよい。

[0046] 被覆造粒工程は、固体肥料を被覆造粒する工程である。例えば、肥料をケイ酸化合物などで被覆すると、肥効時期を調整したり、リンおよびカルシウムの固定化を防止したり、肥料の流亡を防止したり、衝撃による肥料の破損を防止したりできる。

[0047] 梱包工程は、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液Aまたは骨可溶化液Bを容器に梱包して、肥料として流通または販売できるようにする工程である。梱包工程では、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液Aまたは骨可溶化液Bと、これらを肥料として使用するための説明書とを組合せてもよい。この説明書は、容器に印刷されていてもよいし、物理的または電子的な書類として梱包された肥料とは別に用意されていてもよい。説明書には、肥料の処方、施肥方法、施肥時期、対象作物などが記載されうる。

[0048] [1. 6. 例示的な肥料の製造方法]

本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法の一例を、例示的なフローチャートに従って説明する。

[0049] 図1は、工程2、工程3および／または工程4を含む製造方法を表す例示的なフローチャートである。このフローチャートにおいては、工程S1、工程S2、工程S3および工程S4を経ることにより、酸抽出液が得られる。また、工程S1、工程S2および工程S5を経ることにより、プロテアーゼ処理液が得られる。さらに、酸抽出液およびプロテアーゼ処理液が工程S6を経ることにより、骨可溶化液Bが得られる。酸抽出液、プロテアーゼ処理液および骨可溶化液Bは、いずれも、肥料または混合肥料の成分として使用できる。酸抽出液は、植物の必須栄養であるリン酸を含んでいるので、これ自体でも肥料として利用できる。

[0050] 工程S1では、骨組織を前処理する。工程S1は任意工程であり、実施しなくてもよい。骨組織を前処理することにより、酸抽出液に含まれるリン酸の量を増加させることができる。この工程については、[1.5]節において説明した通りである。

[0051] 工程S2では、骨組織を酸処理する。工程S2を経て得られる上清が、酸抽出液である。酸抽出液から肥料を製造すると、上述の工程2となる。骨組織の酸処理については、[1.1]節において説明した通りである。

[0052] 工程S3では、硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩を加える。工程S3は任意工程であり、実施しなくてもよい。工程S3により、酸抽出液に含まれていたカルシウムイオンが、硫酸カルシウム、炭酸カルシウムまたは炭酸水素カルシウムとして沈澱する。硫酸塩の例としては、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウムが挙げられる。炭酸塩の例としては、炭酸カリウム、炭酸アンモニウムが挙げられる。炭酸水素塩の例としては、炭酸水素カリウムが挙げられる。好ましくは、硫酸塩は、硫酸カリウム、硫酸アンモニウムおよび硫酸マグネシウムからなる群より選択される1種類以上である。好ましくは、炭酸塩は、炭酸カリウムである。好ましくは、炭酸水素塩は、炭酸水素カリウムである。これらの硫酸塩、炭酸塩また

は炭酸水素塩を用いると、カリウム、マグネシウムおよび／またはアンモニウムが酸抽出液に含まれるようになる。これらの成分は、植物にとって重要な栄養素である。

[0053] 工程 S 4 では、酸抽出液を塩基で中和する。工程 S 4 は任意工程であり、実施しなくてもよい。工程 S 4 により、酸抽出液の液性を酸性から中性近くに戻す。使用できる塩基の例としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムが挙げられる。このうち、水酸化カリウムを用いると、酸抽出液にカリウムイオンが含まれるようになる。カリウムイオンは植物にとって重要な栄養素であるので、水酸化カリウムで中和することが好ましい。

[0054] 工程 S 5 では、酸処理を経た骨組織を、プロテアーゼ処理する。工程 S 5 を経て得られる処理液が、プロテアーゼ処理液である。プロテアーゼ処理液から肥料を製造すると、上述の工程 3 となる。骨組織のプロテアーゼ処理酸処理については、[1. 2] 節において説明した通りである。

[0055] 工程 S 6 では、酸抽出液およびプロテアーゼ処理液を混合する。これにより、骨可溶化液 B が得られる。骨可溶化液 B から肥料を製造すると、上述の工程 4 となる。骨可溶化液 B の調製については、[1. 3] 節において説明した通りである。

[0056] 図 2 は、工程 1 を含む製造方法を表す例示的なフローチャートである。このフローチャートにおいては、工程 S 1、工程 S 7、工程 S 3 および工程 S 4 を経ることにより、骨可溶化液 A が得られる。骨可溶化液 A は、肥料または混合肥料の成分として使用できる。

[0057] 工程 S 1、S 3、S 4 については、上記に説明した通りであるので、再度の説明は省略する。

[0058] 工程 S 7 では、骨組織を酸およびプロテアーゼの両方で処理する。これにより、骨可溶化液 A が得られる。骨可溶化液 A から肥料を製造すると、上述の工程 1 となる。骨可溶化液 A の調製については、[1. 4] 節において説明した通りである。

[0059] [2. 肥料]

[ 2. 1. 製造方法により特定される肥料]

本発明の一態様に係る肥料は、本発明の一態様に係る肥料の製造方法によって得られる肥料である。したがって、本発明の一態様に係る肥料は、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液 A または骨可溶化液 B を含んでいる。この中でも、骨可溶化液 A または骨可溶化液 B を含んでいる肥料は、植物体の生長促進効果がより高いため好ましい。

[0060] 肥料の全重量に占める酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液 A または骨可溶化液 B の割合の下限は、0.01 重量%以上、0.05 重量%以上、0.1 重量%以上、0.5 重量%以上、1 重量%以上、5 重量%以上、10 重量%以上、20 重量%以上、30 重量%以上、40 重量%以上、50 重量%以上、60 重量%以上、70 重量%以上、80 重量%以上または90 重量%以上でありうる。肥料の全重量に占める酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液 A または骨可溶化液 B の割合の上限は、100 重量%である。一実施形態において、肥料は、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液 A、骨可溶化液 B、またはこれらの任意の混合物のみからなる。

[0061] 肥料の組成は、必要に応じて適宜変更してもよい。例えば、リンおよびカルシウムの一部または全部を、リン酸二水素カルシウムまたはクエン酸カルシウムに変化させてもよい。このような組成とすれば、植物体の生長段階に合わせてリンおよびカルシウムが供給されるように、肥効時期を調節できる。

[0062] 肥料は、固体肥料であってもよいし、液体肥料であってもよい。酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液 A または骨可溶化液 B は液体として得られるため、液体肥料に容易に加工できる。本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法によれば、骨組織の成分（例えば、骨組織の全成分）を可溶化できるので、植物の生長に有用な成分を豊富に含む液体肥料が得られると期待される。また、既存の骨由来固形肥料（骨粉）は遅効性であり、数年間をかけた土壌改良に用いられることが多いのに対し、液体肥料ならば即効性が期待できる。さらに、骨粉は水耕栽培には適していないのに対し、液体肥料は水

耕栽培に好適に利用できる。加えて、液体肥料には、葉面散布にも容易に適用できるという利点もある。

[0063] 肥料には、酸抽出液、プロテアーゼ処理液、骨可溶化液Aまたは骨可溶化液B以外の成分が含まれていてもよい。そのような成分の例としては、酸性肥料、アルカリ性肥料、その他一般的な肥料が挙げられる。酸性肥料の例としては、硫安、過燐酸石灰、硫酸カリウム、硫酸アルミニウム、ピートモス、黒土、灰、ミョウバンが挙げられる。アルカリ性肥料の例としては、草木灰、石灰窒素、チリ硝石、魚肥腐葉土、苦土石灰、有機石灰、消石灰、石灰窒素、石灰岩、セメント、重曹、貝殻、もみ殻、燐炭が挙げられる。その他一般的な肥料の例としては、藁、樹皮、糖蜜が挙げられる。遊離アミノ酸（ $\gamma$ -アミノ酪酸など）、植物成長ホルモン（オーキシンなど）、微量元素（マグネシウム、硫黄、鉄、マンガン、亜鉛、銅、ホウ素、モリブデンなど）をさらに含んでいてもよい。

[0064] [2. 2. 成分で特定される肥料]

本発明の一態様に係る肥料は、骨組織分解物を含んでいる。したがって、骨組織の主な有機成分であるI型コラーゲン、オステオカルシン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカン、SPARCまたはその分解ペプチドを含んでいることが多い。これらの成分は、他の製造方法で得られる肥料には含まれにくい。そのため、I型コラーゲン、オステオカルシン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、バイグリカン、SPARC、これらの分解ペプチド、またはこれらの組合せが含まれている肥料は、本発明の一実施形態に係る製造方法で製造された肥料である蓋然性が高い。

[0065] 一実施形態において、肥料は、I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片を含んでいる。本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法には、骨組織のプロテアーゼ処理が含まれる場合がある（工程S5および工程S7）。プロテアーゼによって切断される

ペプチド鎖の箇所は、当該プロテアーゼに固有に決定される。それゆえ、特定のタンパク質を特定のプロテアーゼによって処理すると、処理により生じるペプチド断片は一意に定まる。それぞれの断片は分子量が異なるので、例えば質量分析によれば、肥料に含まれているペプチド断片から、プロテアーゼ処理前のタンパク質を特定できる。したがって、当業者であれば、肥料に含まれているペプチド断片が、I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片であるか否かを判断できる。

[0066] 表1に、LC-MS/MSで検出されうるペプチド断片の例を示す。このペプチド断片は、肥料をトリプシン処理せずに分析したときに現れうるペプチド断片である。トリプシン処理していないので、ペプチド断片のC末端はLysまたはArgではないアミノ酸である。

[0067] [表1]

表 1

分解前タンパク質	ペプチド断片	分子量	配列番号
I型コラーゲン	GIAGPPG	568	13
	AGLPGVAGAPG	866	14
	PGAPGPKGELGPVG	1,232	15
$\alpha$ -2-HS-グリコプロテイン	DVPAASLVVGP	1,024	16
	AGADAGATPVVD	1,043	17
	AQPSIPAADGSVPV	1,308	18
ペリオスチン	SALRPDGEYLL	1,334	19
	GCPAVLPIDH	1,067	20
バイグリカン	KDLPETLNEL	1,171	21
SPARC	GIKEQDIDKDL	1,273	22
	DQHPIDGYLS	1,143	23

[0068] 一実施形態において、I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロ

テイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片は、生理活性を有していない。本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法には、タンパク質が生理活性を失いうる工程が、複数含まれている。一つは、前処理工程である。前処理工程においては、骨組織を加熱するか、骨組織を加圧下において加熱するか、または骨組織にマイクロ波を照射するので、タンパク質が変性し、生理活性を失う。もう一つは、工程1および工程3におけるプロテアーゼ処理である。プロテアーゼで処理されたタンパク質は断片となり、本来の生理活性を失う。

[0069] 一実施形態において、I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片の大きさは、1万Da以下、8,000Da以下、6,000Da以下または4,000Da以下である。この程度の大きさにまで切断されたペプチド断片は、生理活性を失っている蓋然性が高い。また、この程度の大きさにまで切断されたペプチド断片は、植物に栄養として吸収されやすく、肥料の有効成分として機能する場合がある。

[0070] 本明細書において、「I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCの生理活性」とは、下記の通りである。これらに由来する断片が生理活性を失っているとは、下記の活性を有していないことを意味する。

- ・ I型コラーゲンの生理活性：生理条件で自己会合して線維を形成する。
- ・ アルファ-2-HS-グリコプロテインの生理活性：カルシウムイオンと結合する。
- ・ ペリオスチンの生理活性：骨芽前駆細胞の細胞接着分子として機能する。
- ・ バイグリカンの生理活性：I型コラーゲンと結合する。
- ・ SPARCの生理活性：培養真皮線維芽細胞のI型コラーゲン合成を促進する。

[0071] 一実施形態において、肥料は、リン酸を含んでいる。本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法において、前処理工程を施すと、肥料に含まれるリン

酸の濃度が高くなる傾向にある。肥料に含まれているリン酸の濃度は、例えば、280 mM以上、300 mM以上または320 mM以上でありうる。

[0072] 一実施形態において、肥料は、I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片と、リン酸と、の両方を含んでいる。

[0073] [3. リン酸の製造方法]

本発明の他の態様は、骨組織を原料とするリン酸の製造方法に関する。リン酸の製造方法は、例えば、リン酸カルシウムの精製工程およびカルシウムの除去工程を含む。

[0074] リン酸カルシウムの生成工程の例としては、下記の手順が挙げられる。

1. 工程2で得られた酸抽出液に、アルカリ溶液を加えて中和する。これにより、沈澱物が得られる。
2. 沈澱物に酸溶液（塩酸水溶液など）を加えて、沈澱物を再び可溶化させる。
3. 1および2を繰返して、リン酸カルシウムを精製する。

[0075] カルシウムの除去工程では、精製したリン酸カルシウム溶液にキレート剤を加えることにより、カルシウムを除去する。他の例としては、精製したリン酸カルシウムの溶液に、硫酸塩、炭酸塩および炭酸水素塩からなる群より選択される1つ以上を加えることにより、カルシウムを硫酸カルシウムまたは炭酸カルシウムとして沈澱させてもよい。硫酸塩、炭酸塩および炭酸水素塩の例としては、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸アンモニウム、またはこれらの任意の複数成分の混合物が挙げられる。リン酸カルシウム溶液に加える試薬は、粉末のまま加えてもよいし、溶液（水溶液など）として加えてもよい。上述の方法は、酸性溶液かつ室温にも適用できるため、簡便にカルシウムを除去できる。

[0076] [3. 1. 例示的なリン酸の製造方法]

骨組織からリン酸を製造する方法として、2種類の製造方法が考えられる。一つは、骨を焼却して骨灰にし、骨灰からリン酸を精製する製造方法である。骨灰からリン酸を精製する工程では、リン鉱石からリン酸を精製する従来法を採用する。しかし、この製造方法は、大量のエネルギーを消費し、CO<sub>2</sub>の産出量も多くなるので、SDGsの達成には不向きである。

[0077] もう一つの製造方法が、図3のフローチャートに例示されている方法である。骨組織には、リン酸以外にも、カルシウムなどの無機成分や、コラーゲンなどの有機成分が含まれている。図3に例示されている方法においては、工程S11および工程S12においてリン酸を溶解させ、工程S13および工程S14においてリン酸およびカルシウム以外の成分を除去する。工程S13および工程S14は繰り返し行ってもよく、繰り返し回数は適宜設定できる。工程S15においては、カルシウムを除去するために、硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩を加える。工程S15で生じる硫酸カルシウム、炭酸カルシウムまたは炭酸水素カルシウムは、農業用肥料または工業原料として利用してもよい。以下、各工程を詳述する。

[0078] 工程S11では、骨組織を前処理する。工程S11は任意工程であり、実施しなくてもよい。骨組織を前処理することにより、酸抽出液に含まれるリン酸の量を増加させることができる。この工程は、上述した工程S1と同じ工程であり、詳細は[1.5]節において説明した通りである。

[0079] 工程S12では、骨組織を酸処理する。この工程により、酸抽出液が得られる。この工程は、上述した工程S2と同じ工程であり、酸処理の条件については、[1.1]節の記載が援用される。

[0080] 工程S13では、酸抽出液を塩基で中和する。工程S13により、酸抽出液に含まれていたリン酸イオンがリン酸カルシウムとして沈澱し、骨夾雑物由来の成分は上清に含まれるようになる。したがって、沈澱を回収することにより、リン酸を精製できる。使用できる塩基の例としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムが挙げられる。

[0081] 工程S14では、リン酸カルシウムの沈澱に酸を加える。これにより、沈

澱として析出していたリン酸カルシウムが、再び溶解する。使用できる酸の例としては、塩酸、硝酸、蟻酸が挙げられる。

[0082] 工程S13およびS14は、繰り返し行ってもよい。これらの工程を繰り返すことにより、リン酸の純度が上昇する。工程S13およびS14を繰り返す回数は、例えば、2回以上、3回以上、4回以上または5回以上でありうる。経済性の観点から、工程S13およびS14を繰り返す回数は、例えば、10回以下であってもよい。工程S13およびS14を繰り返した後、工程S15に移行する前に、リン酸カルシウム沈澱に含まれる不要な成分を純水で洗い流す洗浄処理を、必要な回数だけ施してもよい。

[0083] 工程S15では、リン酸カルシウム溶液に硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩を加える。これにより溶液中のカルシウムイオンが、硫酸カルシウム、炭酸カルシウムまたは炭酸水素カルシウムとして沈澱する。沈澱した硫酸カルシウム、炭酸カルシウムまたは炭酸水素カルシウムは、遠心分離などにより除去する。硫酸塩の例としては、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウムおよび硫酸マグネシウムから選択される1種類以上が挙げられる。炭酸塩の例としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムおよび炭酸アンモニウムから選択される1種類以上が挙げられる。炭酸水素塩の例としては、炭酸水素ナトリウムおよび炭酸水素カリウムから選択される1種類以上が挙げられる。また、硫酸塩、炭酸塩および炭酸水素塩のうち2つ以上を任意に組合せることもできる。工程S15において、硫酸ではなく硫酸塩を加えることには、次のような利点がある。

- ・液体を加えないので、反応系の体積増加を低減できる。
- ・反応系が強酸性にならないので、中和のために必要な塩基の量が少量で済む。
- ・安全性が高い。
- ・カルシウムの除去率が高い。

[0084] 工程S15において加える硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩の量は、当業者により適宜設定できる。硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩の投入量は、例

例えば、反応系における硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩の濃度が0.2 M以上、0.4 M以上、0.6 M以上、0.8 M以上または1.0 M以上となる量であってもよい。硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩の投入量が多い方が、残留するカルシウムを少なくできる。硫酸塩、炭酸塩または炭酸水素塩の投入量の上限は、例えば、反応系における硫酸塩の濃度が3.0 M以下、2.0 M以下または1.0 Mとなる量であってもよい。

[0085] 工程S15においては、溶解度積の都合上、少量の硫酸イオン、炭酸イオンまたは炭酸水素イオンが上清に残存する。これらのイオンを除去する際に、炭酸イオンまたは炭酸水素イオンは、加熱により二酸化炭素に変換されるので、容易に除去できる。それゆえ、工程S15において加える塩は、炭酸塩および炭酸水素塩からなる群より選択される1種類以上が好ましい。

[0086] 工程S16においては、カルシウムを除去した後の上清を精製する。上清には、硫酸塩に含まれていたナトリウムイオンなどのカチオンや、塩素イオンなどのアニオンが含まれている場合がある。これらのイオンを、例えばイオン交換樹脂に吸着させることにより、高純度のリン酸が得られる。炭酸イオンまたは炭酸水素イオンが含まれている場合は、加熱により二酸化炭素に変換することで、イオンを系外に除去できる。

[0087] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。異なる実施形態に開示された技術的手段を適宜組合せて得られる実施形態も、本発明の技術的範囲に含まれる。

## 実施例

[0088] [実施例1：骨組織分解物を含んでいる肥料の作製]

[実施例1-1：硝酸による酸抽出液の作製および成分分析]

下記の手順により骨組織を硝酸で酸処理し、酸抽出液を得た。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル（IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN株式会社）で細粉碎した。
2. 湿重量3 gの豚骨に、40 mLの硝酸水溶液を加えて、20℃にて浸漬した。硝酸水溶液の濃度は、0.3 mol/L、0.5 mol/L、0.

75 mol/Lまたは1.0 mol/Lとした。浸漬時間は、12時間、24時間または48時間とした。

3. 上清を回収し、酸抽出液とした。

[0089] [実施例1-2：塩酸による酸抽出液の作製および成分分析]

下記の手順により骨組織を塩酸で酸処理し、酸抽出液を得た。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル（IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN株式会社）で細粉碎した。

2. 湿重量2gの豚骨に、35mLの塩酸水溶液を加えて、20℃にて浸漬した。塩酸水溶液の濃度は、0.3 mol/L、0.5 mol/Lまたは1.0 mol/Lとした。浸漬時間は、6時間、12時間または24時間とした。

3. 上清を回収し、酸抽出液とした。

[0090] [実施例1-3：蟻酸による酸抽出液の作製および成分分析]

下記の手順により骨組織を蟻酸で酸処理し、酸抽出液を得た。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル（IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN株式会社）で細粉碎した。

2. 湿重量2gの豚骨に、35mLの蟻酸水溶液を加えて、20℃にて浸漬した。蟻酸水溶液の濃度は、0.3 mol/L、0.5 mol/Lまたは1.0 mol/Lとした。浸漬時間は、6時間、12時間または24時間とした。

3. 上清を回収し、酸抽出液とした。

[0091] [実施例1-4：硫酸による酸抽出液の作製および成分分析]

下記の手順により骨組織を硫酸で酸処理し、酸抽出液を得た。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル（IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN株式会社）で細粉碎した。

2. 湿重量2gの豚骨に、35mLの硫酸水溶液を加えて、20℃にて浸漬した。硫酸水溶液の濃度は、0.3 mol/L、0.5 mol/Lまたは1.0 mol/Lとした。浸漬時間は、6時間、12時間または24時間と

した。

3. 上清を回収し、酸抽出液とした。

[0092] 表2に、得られた酸抽出液の全リンを分析した結果を示す。成分分析は、株式会社クリタ分析センターに委託した。表2は、骨の湿重量1gあたりに換算した全リン(mg)の測定結果である。硝酸、塩酸、蟻酸または硫酸の濃度と、浸漬した時間ごとに、分析結果を各々の酸でまとめた。どの酸水溶液においても、24時間程度でほとんどのリンが回収できることが示された。また、酸の濃度は、1mol/L程度で十分にリンが回収できることが示された。検討した4種類の酸の中では、塩酸および硫酸が、リンの回収効率が高かった。表2から、1gの骨組織から100mg程度のリンを回収できることが分かった。

[0093] [表2]

表2

硝酸水溶液				塩酸水溶液			
濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)			濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)		
	12	24	48		6	12	24
0.5	70	74	74	0.3	19	62	60
0.75	84	77	84	0.5	64	89	87
1.0	81	88	88	1.0	98	107	107

蟻酸水溶液				硫酸水溶液			
濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)			濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)		
	6	12	24		6	12	24
0.5	65	47	55	0.5	83	77	102
0.75	74	70	77	0.75	89	95	100
1.0	74	86	79	1.0	91	74	105

[0094] 表3に、得られた酸抽出液の全カルシウムを分析した結果を示す。成分分析は、株式会社クリタ分析センターに委託した。表3は、骨の湿重量1gあ

たりに換算した全カルシウム（mg）の測定結果である。硝酸、塩酸、蟻酸、硫酸の濃度と、浸漬した時間ごとに、分析結果を各々の酸でまとめた。硝酸、塩酸および蟻酸の水溶液においては、24時間程度でほとんどのカルシウムが回収できていることが示された。また、硫酸水溶液においては、遊離したカルシウムは不溶性の硫酸カルシウムを形成する。そのため、分析結果としてはカルシウム濃度が低い、実際には骨組織からカルシウムが溶出している。酸の濃度は、1 mol/L程度で十分にカルシウムが回収できることが示された。検討した4種類の酸の中では、塩酸および蟻酸が、カルシウムの回収効率が高かった。表3から、1gの骨組織から約200mg程度のカルシウムを回収できることが分かった。

[0095] [表3]

表 3

硝酸水溶液				塩酸水溶液			
濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)			濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)		
	12	24	48		6	12	24
0.5	151	136	149	0.3	35	107	107
0.75	165	152	162	0.5	116	161	170
1.0	165	164	179	1.0	179	196	214

蟻酸水溶液				硫酸水溶液			
濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)			濃度 (mol/L)	浸漬時間 (h)		
	6	12	24		6	12	24
0.5	120	164	183	0.5	13	11	12
0.75	152	194	205	0.75	11	11	12
1.0	192	182	192	1.0	11	11	14

[0096] [実施例1-5：プロテアーゼ処理液の調製]

実施例1-2で得られた酸処理後の骨組織を、下記2種類のプロテアーゼを含んでいる処理液に浸漬した。プロテアーゼ処理の条件は、プロテアーゼ

濃度：2% (w/w)、温度：50℃、pH：至適pHとした。

- ・プロテアーゼ1：ニューラーゼF3G（天野エンザイム株式会社、*Rhizopus niveus*糸状菌由来のプロテアーゼ）
- ・プロテアーゼ2：ペプシン（Sigma Aldrich、アスパラギン酸プロテアーゼ）

[0097] 結果を図4に示す。図4において、Aはプロテアーゼ1で処理した結果を表し、Bはプロテアーゼ2で処理した結果を表す。処理時間は3.5時間、19時間または24時間とした。処理液の透明性および骨組織の残存を目視で確認した結果は、次の通りである。

- ・3.5時間後：いずれのプロテアーゼで処理した系でも、骨組織がほとんど消失していた。
- ・24時間後：いずれのプロテアーゼで処理した系でも、骨組織が完全に消失し、プロテアーゼ処理液の透明度も上昇した。

[0098] このように、酸処理された骨組織を市販のプロテアーゼで処理することにより、プロテアーゼ処理液が得られることが分かった。

[0099] [実施例1-6：プロテアーゼ処理液の調製および成分分析]

下記の手順により、プロテアーゼ処理液を得た。

1. 骨組織を1mol/Lの硝酸水溶液または塩酸水溶液に48時間浸漬して、酸処理した。
2. 得られた処理液を、酸抽出液と骨組織の残渣に分別し、酸抽出液を別容器に移した。
3. 骨組織残渣に、0.1mol/Lのクエン酸緩衝液（pH3.5）を加えた。添加量は、最初の骨重量1g当たり10mLとした。
4. アクチニダイン（キウイフルーツ由来のシステインプロテアーゼ）を前処理した。具体的には、25℃で、10mol/Lのジチオスレイトールおよび5mol/Lのエチレンジアミン四酢酸を含む20mol/Lリン酸緩衝液（pH6.5）に、90分間接触させた。
5. 3で得られた反応系に、活性化したアクチニダインを加えて、プロテ

アーゼ処理した。処理条件は、温度：20℃または50℃、pH：3.5（100mmol/Lリン酸緩衝液により調節）、時間：3日間とした。

[0100] 結果を図5に示す。硝酸または塩酸のいずれで酸処理した系でも、反応温度が50℃であれば、骨組織はほとんど消失していた。

[0101] 得られたプロテアーゼ処理液を100μmのフィルターに通し、微細な不溶物を除去した濾液を得た。この濾液を成分分析した結果を、表4に示す（骨の湿重量1gあたりに換算した数値を示す）。成分分析は、株式会社クリタ分析センターに委託した。

[0102] [表4]

表 4

酸処理	1M 硝酸		1M 塩酸	
プロテアーゼ処理	アクチニジン			
反応温度 (°C)	20	50	20	50
電気伝導率 (S/m)	20.2	1.21	ND	ND
全窒素 (g/L)	19.2	1.72	0.78	2.23
全リン (mg/L)	22.2	384	212	186
カリウム (mg/L)	8.08	10.1	ND	ND
全カルシウム (mg/L)	<20.2	313	ND	ND
全マグネシウム (mg/L)	<505	5.1	ND	ND

ND:Not done

[0103] [実施例1-7：骨可溶化液Aの調製および成分分析]

酸処理とプロテアーゼ処理との間に溶液交換を伴わずに、一段階で骨可溶化液Aを調製した。具体的な手順は下記の通りである。

1. 骨組織を1mol/Lの硝酸水溶液、塩酸水溶液、蟻酸水溶液または硫酸水溶液に48時間浸漬して、酸処理した。
2. 反応系に、最終濃度0.1mol/Lになるようにクエン酸緩衝液（pH3.5）を加えた。

3. 5 NのNaOHおよび5 NのHClにより、プロテアーゼの至適pHに調節した。具体的には、アクチニダインはpH 3.5、ペプシンはpH 3.0、ニューラーゼF3GはpH 3.0に調節した。

4. 各プロテアーゼを、1% (w/w) となるように加えた。プロテアーゼの反応条件は、温度50°Cで4日間とした。なお、アクチニダイン（キウイフルーツ由来のシステインプロテアーゼ）は、あらかじめ、10 mmol/Lのジチオスレイトールおよび5 mmol/Lのエチレンジアミン四酢酸を含む20 mmol/Lリン酸緩衝液（pH 6.5）で、25°Cにて90分間前処理した。

[0104] 結果を図6に示す。いずれの系においても、反応温度が50°Cであれば、骨組織は小さくなっていた。このように、酸処理とプロテアーゼ処理との間に溶液交換を挟まずに、ワンステップで骨組織から骨可溶化液Aが得られた。特に、ペプシンと塩酸または硝酸との組合せは骨組織をよく溶解し、残存した骨組織はごく僅かであった。

[0105] 得られた骨可溶化液Aを100 μmのフィルターに通し、微細な不溶物を除去した濾液を得た。この濾液のカルシウム濃度を測定した結果を、表5に示す（骨の質重量1 gあたりに換算した数値を示す）。カルシウムの測定は、コンパクトカルシウムイオンメータLAQUA twin-Ca-11（株式会社堀場アドバンスドテクノ）を用いた。

[0106] [表5]

表 5  
浸漬時間 (96h)

酸	カルシウム (mg)
塩酸水溶液	226
硝酸水溶液	238
蟻酸水溶液	133
硫酸水溶液	97

## [0107] [実施例1-8：リン酸の抽出]

下記の手順により、骨組織から粗精製のリン酸を得た。

1. 骨組織を1mol/Lの硝酸水溶液、塩酸水溶液、蟻酸水溶液または硫酸水溶液に48時間浸漬して、酸処理した。
2. 反応系に5NのNaOHを0.15容量加えてよく混合し、室温で1時間静置した。これにより、白色の溶液を得た。
3. 得られた溶液を、10,000gで10分間、室温で遠心分離して上清を除去した。白色沈澱に1NのHClを工程1で加えた量と同じ量だけ加えて、よく混合した。これにより、透明な溶液を得た。
4.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ または $\text{NaHCO}_3$ を、反応系に含まれるカルシウム濃度と同じ量となるように加えてよく混合し、室温で1時間静置した。これにより、白色の溶液を得た。
5. 得られた溶液を、10,000gで10分間、室温で遠心分離して上清を撈取した。得られた透明な溶液に、リン酸が含まれる。

[0108] 骨組織を硫酸に浸漬することにより、カルシウムがある程度除去されたリン酸含有溶液を得ることができる。しかし、硫酸による処理は、容積が増加し、溶液が強酸性になり、さらに不純物が多く精製が困難である。一方、上記の工程によれば、簡便に純度の高いリン酸を含む溶液を得ることができる。

## [0109] [実施例2：骨組織分解物を含んでいる肥料で栽培した植物体の生長評価および成分分析]

## [材料および方法]

1. ダイコン (*Raphanus sativus* L) の種子 (タキイ種苗株式会社) を、濡れた紙タオルに播種した。暗下、22℃にて2日間静置し、種子を発芽させた。
2. 得られた植物体を、水耕栽培用ウレタンキューブ (2cm×2cm×2cm) に移植した。

3. ウレタンキューブに酸抽出液、プロテアーゼ処理液または骨可溶化液 A を浸漬させ、5 日間生長させた。この期間の光条件は、光合成有効光量子束密度：約  $150 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ 、明期：16 時間、暗期：8 時間とした。光源には、栽培植物育成用蛍光灯（ビオルックス A、NEC ライティング株式会社）を用いた。

4. 生長した植物体の生長評価および成分分析を行った。具体的には、下記の通りである。

- ・地上部新鮮重：植物体を胚軸と根の境界で切断し、胚軸側の重量を測定した。

- ・地上部乾物重：新鮮重を測定した植物体の部分を、 $80^\circ\text{C}$  のオーブンで 2 日間乾燥させた。その後、重量を測定した。

- ・地上部水分含有率：地上部新鮮重と地上部乾物重の差に基づいて算出した

- ・葉面積：植物体の子葉をスキャナーで取り込み、Image J を用いて葉面積を測定した。

- ・総ポリフェノール含量：50 mg の子葉を、90%メタノール溶液中で破碎した。遠心分離して得られた上清を用いて、フォーリン・チオカルト法により総ポリフェノール含量を測定した。

#### [0110] [結果および考察]

##### (1) 酸抽出液の濃度の生長に対する影響

500 倍または 2000 倍に希釈した酸抽出液を与えた条件で植物体を生長させた。結果を図 7 に示す。500 倍に希釈した酸抽出液で生長させた植物体は、コントロールの植物体と比較して、地上部新鮮重が増加した。この結果から、500 倍程度に希釈した酸抽出液には、植物体の生長促進効果があると分かった。以降の実験では、500 倍に希釈した酸抽出液およびプロテアーゼ処理液を使用した。

#### [0111] (2) 酸抽出液、プロテアーゼ処理液または骨可溶化液 A の生長に対する影響

下記の 6 条件で植物体を生長させ、地上部新鮮重を比較した。

- ・水のみを与える（コントロール）
- ・加熱処理していないプロテアーゼ処理液（プロテアーゼ処理液1）を与える
- ・50℃にて加熱処理したプロテアーゼ処理液（プロテアーゼ処理液2）を与える
- ・酸抽出液を与える
- ・プロテアーゼ処理液1および酸抽出液を混合した骨可溶化液Aを与える
- ・プロテアーゼ処理液2および酸抽出液を混合した骨可溶化液Aを与える

結果を図8に示す。プロテアーゼ処理液1およびプロテアーゼ処理液2を与えた植物体は、コントロールと比較して生長が促進された。同様に、酸抽出液を与えた植物体も、コントロールと比較して生長が促進された（この点は、（1）にて示した通りである）。さらに、プロテアーゼ処理液と酸抽出液とを混合した骨可溶化液Aを与えた植物体は、コントロールと比較した生長促進効果がより一層高かった。この結果から、酸抽出液およびプロテアーゼ処理液のいずれもが、植物体の生長促進効果を有していることが分かる。さらに、骨可溶化液Aによる植物体の生長促進効果は、酸抽出液またはプロテアーゼ処理液単独による生長促進効果よりも高いことが分かった。

[0112] （3）市販の培養液との効果の比較

骨可溶化液Aと市販の培養液との生長促進効果を比較した。市販の培養液としては、OATハウス（OATアグリオ株式会社）のA処方をさらに1/6倍に希釈したものを使用した。この希釈により、骨可溶化液Aと同じ硝酸イオン濃度（約600ppm）になるように調節した。

[0113] 結果を図8、9に示す。市販の培養液を与えた植物体は、骨可溶化液Aを与えた植物体と同程度に生長が促進された。骨可溶化液Aと培養液の両方を与えた植物体は、それぞれを単独で与えた植物体よりも、生長促進効果がさらに高まった。このことから、骨可溶化液Aにより、市販の培養液の生長促進効果をさらに向上できることが示唆された。

[0114] 植物体の地上部水分含有率は、骨可溶化液Aを与えることで増加し、骨可溶化液Aおよび培養液の両方を加えることによりさらに増加した。子葉あた

りの総ポリフェノール含量は、骨可溶化液Aを与えることで増加し、骨可溶化液Aおよび培養液の両方を与えることでさらに増加した。これは、植物体の生長が促進された結果、子葉重量が増加した影響によると考えられる。

[0115] [実施例3：植物体のRNA発現解析1]

[植物体の全RNA抽出]

1. ダイコン (*Raphanus sativus* L) の種子 (タキイ種苗株式会社) を、濡れた紙タオルに播種した。暗下、湿度100%、22℃にて2日間静置し、種子を発芽させた。
2. 得られた植物体を、ウレタンスポンジに移植した。ウレタンスポンジには、(1) 水、(2) 骨可溶化液A、(3) 市販の液体肥料、または(4) 骨可溶化液Aと市販の液体肥料との混合液のいずれかを含浸させた。
3. 植物体を22℃にて1日間、3日間または5日間生長させた。この期間の光条件は、光量：約100  $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ 、明期：16時間、暗期：8時間とした。光源には、栽培植物育成用蛍光灯 (ビオルックスA、NECライティング株式会社) を用いた。
4. 生長させた植物体から、葉および根の組織を約0.1gずつ採取した。採取後すぐに乳鉢に入れて液体窒素を加え、組織を凍結させた状態で磨砕した。
5. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、磨砕した組織から全RNAを抽出した。
6. Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) および蛍光光度計 (Qubit-4) を用いて、水溶液中における全RNAの濃度を測定した。併せて、230nm、260nmおよび280nmにおける吸光度 ( $A_{230}$ 、 $A_{260}$ および $A_{280}$ ) を分光光度計によって測定し、抽出したRNAの純度を調べた。

[0116] 結果を表6に示す。培養開始から5日目までの時点において、植物体の葉約0.1gからは、13.2~88.2  $\mu\text{g}$  の全RNAが抽出された。植物体の根約0.1gからは、8.4~43.8  $\mu\text{g}$  の全RNAが抽出された。

$A_{260}/A_{280}$ は2.0程度であり、RNAの純度没有问题がないことを確認した。

[0117] [表6]

表 6

培養期間	栽培条件	組織	A230	A260	A280	希釈倍率	濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	260/230	260/280	RNAの総量 ( $\mu\text{g}$ ) (60 $\mu\text{L}$ 分)
0日	(1)	葉	0.6	1.28	0.62	25	1.28	2.13	2.06	76.8
0日	(1)	根	0.28	0.73	0.37	25	0.73	2.61	1.97	43.8
1日	(1)	葉	0.36	0.78	0.38	25	0.78	2.17	2.05	46.8
1日	(1)	根	0.16	0.44	0.19	25	0.44	2.75	2.32	26.4
1日	(2)	葉	0.6	1.14	0.67	25	1.14	1.90	1.70	68.4
1日	(2)	根	0.17	0.47	0.2	25	0.47	2.76	2.35	28.2
1日	(3)	葉	0.51	1.22	0.59	25	1.22	2.39	2.07	73.2
1日	(3)	根	0.12	0.24	0.085	25	0.24	2.00	2.82	14.4
1日	(4)	葉	0.7	1.47	0.68	25	1.47	2.10	2.16	88.2
1日	(4)	根	0.15	0.28	0.11	25	0.28	1.87	2.55	16.8
3日	(1)	葉	0.26	0.65	0.3	25	0.65	2.50	2.17	39.0
3日	(1)	根	0.11	0.21	0.1	25	0.21	1.91	2.10	12.6
3日	(2)	葉	0.31	0.69	0.32	25	0.69	2.23	2.16	41.4
3日	(2)	根	0.08	0.18	0.081	25	0.18	2.25	2.22	10.8
3日	(3)	葉	0.35	0.87	0.4	25	0.87	2.49	2.18	52.2
3日	(3)	根	0.17	0.22	0.1	25	0.22	1.29	2.20	13.2
3日	(4)	葉	0.38	0.91	0.41	25	0.91	2.39	2.22	54.6
3日	(4)	根	0.14	0.35	0.15	25	0.35	2.50	2.33	21.0
5日	(1)	葉	0.068	0.24	0.13	25	0.24	3.53	1.85	14.4
5日	(1)	根	0.033	0.14	0.062	25	0.14	4.24	2.26	8.4
5日	(2)	葉	0.065	0.22	0.11	25	0.22	3.38	2.00	13.2
5日	(2)	根	0.068	0.22	0.1	25	0.22	3.24	2.20	13.2
5日	(3)	葉	0.19	0.55	0.29	25	0.55	2.89	1.90	33.0
5日	(3)	根	0.16	0.22	0.11	25	0.22	1.38	2.00	13.2
5日	(4)	葉	0.2	0.61	0.31	25	0.61	3.05	1.97	36.6
5日	(4)	根	0.22	0.3	0.16	25	0.3	1.36	1.88	18.0

[0118] [RNAシーケンスライブラリーの作製および次世代シーケンサーによるRNA配列解析]

スプラウトより抽出した全RNAからのcDNAライブラリーの作製と、

次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析は、アゼンタ株式会社に委託して実施した。その解析の手順は以下の通りである。

1. 抽出した全RNAの品質（RNAの分解度）を、BioAnalyzer（Agilent Technologies）によって評価した。
2. 抽出した全RNAから、polyT オリゴDNAを結合したビーズを用いて、polyA-mRNAを濃縮した。
3. 逆転写酵素を用いてcDNAライブラリーを作製した。
4. 次世代シーケンサー（DNBSEQ-G400、MGITech）を用いてcDNAの塩基配列を決定した。これにより、発現しているmRNAの塩基配列を網羅的に決定した（RNAseq解析）。スプラウト遺伝子のアセンブリーはStringtieソフトウェアによって行った。このとき、公益財団法人かずさDNA研究所のデータベースで公開されているスプラウトの全ゲノム塩基配列（<http://radish.kazusa.or.jp>）を参照した。

[0119] [発現量に変化した遺伝子の解析]

1. 栽培条件の違いによって発現量が有意に変化した遺伝子を、それぞれの遺伝子のリード数を転写産物長で補正して得られるFPKM値（fragments per kilobase of exon per million reads mapped）に基づいて同定した。同定には、DESeq2ソフトウェアを用いた。
2. 発現量が有意に増加または減少している遺伝子（DEG）を、網羅的に決定した。解析結果は、ボルケーノプロットによって表示した。発現量の比較は、（1）水のみ、（2）骨可溶化液A、（3）市販の液体肥料、（4）骨可溶化液Aと市販の液体肥料との混合液の4群で実施した。（2）または（4）群において発現量が有意に増加または減少している遺伝子を同定した。
3. 同定された発現変動遺伝子について、GOseqソフトウェアを用いてGOエンリッチメント解析を行った。これにより、発現変動遺伝子の生物学的な機能を解析した。

## [0120] [定量RT-PCR]

ストレス耐性に関連が深い5種類の遺伝子を標的遺伝子とし、当該遺伝子の発現を、定量RT-PCRによって検討した。標的遺伝子としては、グルタチオンS-転移酵素 $\epsilon$ 19 (GSTU19)、カタラーゼ2 (CAT2)、オーキシン輸送体類似タンパク質2-1 (LAX2-1)、グルタチオンS-転移酵素12 (GST12) およびカルモジュリン5 (CaM5) を採用した。具体的な手順は下記の通りである。

1. (1) 水、(2) 骨可溶化液A、(3) 市販の液体肥料、または(4) 骨可溶化液Aと市販の液体肥料との混合液を与えて生長させた植物体の葉および根から、全RNAを抽出した。

2. ランダムプライマーを用いて逆転写酵素反応(RT反応)を行った。逆転写酵素には、PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ株式会社) を用いた。

3. 標的遺伝子を定量PCRした。定量PCRには、2.0ngのcDNAをテンプレートとする特異的なプライマー対、TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社) を用いた。定量PCRを実行する機器としては、Thermal Cycler Dice Real Time System TP850 (タカラバイオ株式会社) を用いた。

[0121] 定量RT-PCRにおいては、各標的遺伝子の発現量を、アクチン遺伝子の発現量に対して標準化した。標的遺伝子およびアクチン遺伝子の増幅に用いたプライマー対の塩基配列を、表7に示す(上から順に配列番号1~12)。

[0122]

[表7]

表 7

		塩基配列 (5' →3')	
Actin	ACT	F	GCATCACACTTTCTACAAC
		R	CCTGGATAGCAACATACAT
glutathione S-transferase TAU 19	GSTU19	F	ACTGAACATAGATAGGAACC
		R	GTGGACATTGGATTGATTG
catalase 2	CAT2	F	GGGCAATAAGCAAATATGAA
		R	GCAACCTGGAGATAGATAC
auxin transporter-like protein 2-1	LAX2-1	F	GTGGGAGAAAGTGATAGG
		R	ATTGATTGGACCGAAGAA
glutathione S-transferase 12	GST12	F	GGATGGAATAATGAATGAATGA
		R	AGTTTTGGCACATACAGT
calmodulin 5 (Ca <sup>2+</sup> binding)	CaM5	F	CAAAGAACCCATCACAGA
		R	AACAGAGGAAGAGGACAT

[0123] [結果]

グルタチオンS-転移酵素 $\epsilon$ 19 (GSTU-19) をコードする遺伝子の発現量は、ウレタンスポンジへの移植前には検出されなかった。同じく、移植後1日目の時点では、(1)水、(2)骨可溶化液Aおよび(3)市販の液体肥料を含む系で生長させた植物体の葉および根からも検出されなかった。しかし、移植後1日目の時点において、(4)骨可溶化液Aと市販の液体肥料との混合液を含む系で生長させた植物体の葉および根では、GSTU-19の発現量が顕著に上昇していた(図11)。同様に、移植後1日目の時点において、(4)骨可溶化液Aと市販の液体肥料との混合液を含む系で生長させた植物体の葉ではカタラーゼ2 (CAT2)、オーキシン輸送体類似タンパク質2-1 (LAX2-1)、グルタチオンS-転移酵素12 (GST12) およびカルモジュリン5 (CaM5) をコードする遺伝子の発現量が顕著に上昇していた(図12)。

[0124] このように、本発明の一実施形態に係る肥料と既存の液体肥料とを併用す

ると、植物のストレス耐性に関与する遺伝子の発現が促進されることが示された。この結果は、本発明の一実施形態に係る肥料と既存の液体肥料との併用により、植物体のストレス耐性を向上できることを示唆している。

[0125] [実施例4：前処理によるリン酸抽出率の向上]

骨組織を前処理することにより、酸抽出液に含まれるリン酸の量が増加することを確認した。具体的には、下記の手順により酸抽出液を調製し、含まれているリン酸の量を定量した。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル（IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN株式会社）で細粉碎した。

2. 5 gの粉碎した豚骨に、下記（1）～（5）のいずれかの前処理を施した。

（1）処理なし

（2）30 mLの硝酸（1 mol/L）中で50℃にて1日浸漬

（3）500Wのマイクロ波を30間秒照射

（4）500Wのマイクロ波を60間秒照射

（5）500Wのマイクロ波を120間秒照射

3. （1）および（3）～（5）の豚骨に、30 mLの硝酸（1 mol/L）を加えた。30 mLの硝酸に浸漬した（1）～（5）の豚骨を、20℃にて48時間、振盪（100 rpm）しながら浸漬した。このようにして、骨組織を脱灰した。

4. 上清を回収し、酸抽出液とした。

5. リン酸濃度をMalachite Green Phosphate Assay Kit（BioAssay Systems）により測定した。測定方法は、製品付属マニュアルに従った。測定に際しては、上清を蒸留水で希釈した。

[0126] [結果]

結果を図13に示す。50℃で加熱して前処理した骨組織（2）からは、前処理をしなかった骨組織（1）よりも、1.18倍のリン酸が抽出された

。また、マイクロ波照射で前処理した骨組織（3）～（5）からは、前処理をしなかった骨組織（1）よりも、最大で1.26倍のリン酸が抽出された。

[0127] このように、適切な前処理をすることにより、酸抽出液に抽出されるリン酸の量が増加することが分かった。特に、マイクロ波の照射は、短時間で完了し、加熱の必要がなく、大きな骨組織にも応用でき、さらにリン酸の抽出率をより向上できるので、好ましい態様である。

[0128] [実施例5：酸抽出液に含まれているタンパク質成分の分析]

下記の手順により、酸抽出液に含まれているタンパク質成分を分析した。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル（IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN株式会社）で細粉碎した。
2. 湿重量2gの豚骨に、30mLの塩酸（1mol/L）を加え、20℃にて48時間、振盪（100rpm）しながら浸漬した。このようにして、骨組織を脱灰した。
4. 上清を回収し、酸抽出液とした。
5. 得られた酸抽出液を、それぞれ（1）酸抽出液原液、（2）酸抽出液1/2希釈液、（3）酸抽出液1/4希釈液とした。
6. 1mol/LのNaOH溶液を適量加えて、pHを中性にした。
5. 等量のジチオトレイトールを還元剤として加えて、95℃にて10分間加熱した。
6. 5%ポリアクリルアミドゲル（高分子成分用）および12.5%ポリアクリルアミドゲル（低分子成分用）を使用して、常法により電気泳動させた。

[0129] [結果]

結果を図14に示す。対照サンプルとして、骨に多量に含まれているタンパク質であるI型コラーゲンと、分子量マーカールとを同じゲルで電気泳動させた。同図から分かるように、酸抽出液からは、高感度な銀染色キットで染色される分子量1万Da以上のタンパク質が検出されなかった。つまり、酸

抽出液には、タンパク質成分がほとんど含まれていないことが分かった。これは、強酸である塩酸で処理したため、タンパク質のペプチド結合が切断されて低分子ペプチドおよびアミノ酸になったからだと考えられる。

[0130] [実施例6：プロテアーゼ処理液の調製およびタンパク質成分分析]

[実施例6-1：プロテアーゼ処理液の調製]

下記の手順により、プロテアーゼ処理液を得た。

1. 骨組織を1mol/Lの塩酸水溶液に48時間浸漬して、酸処理した。
2. 得られた処理液を、酸抽出液と骨組織の残渣に分別し、酸抽出液を別容器に移した。
3. 骨組織残渣に、0.1mol/Lのクエン酸緩衝液(pH3.5)を加えた。添加量は、最初の骨重量1g当たり10mLとした。
4. 得られた骨組織残渣を、下記3種類のプロテアーゼを含んでいる処理液に浸漬した。プロテアーゼ処理の条件は、プロテアーゼ濃度：2% (w/w)、温度：50℃、pH：至適pHとした。
  - ・プロレザーFG-F (天野エンザイム株式会社、Bacillus sp.由来)
  - ・プロテアーゼP「アマノ」3G (天野エンザイム株式会社、Aspergillus melleus由来)
  - ・プロテアーゼM「アマノ」SD (天野エンザイム株式会社、Aspergillus oryzae由来)

[0131] [結果]

処理液の外観を図15に示す。参考として、実施例1-5 (ニューラーゼF3Gおよびペプシン) および実施例1-6 (アクチニダイン) の結果も併せて示す。同図から分かるように、本実施例で検討したプロテアーゼでも骨分解残渣が分解され、プロテアーゼ処理液が得られることが分かった。なお、本実施例で得られたプロテアーゼ処理液には沈澱が見られるが、これは、液性が中性に近いために生じたカルシウム塩の沈澱と考えられる。後述する実施例6-2の結果も踏まえると、プロテアーゼ処理によって骨分解残渣に

含まれていたタンパク質は十分に分解されていると言える。

[0132] [実施例 6-2 : プロテアーゼ処理液に含まれるタンパク質成分分析]

実施例 1-5、1-6 および 6-1 と同様にして、下記のプロテアーゼを用いてプロテアーゼ処理液を調製した。

- ・ペプシン (Sigma Aldrich、アスパラギン酸プロテアーゼ)
- ・ペプチダーゼ R (天野エンザイム株式会社、Rhizopus 属由来)
- ・プロテアーゼ P 「アマノ」 3 G (天野エンザイム株式会社、Aspergillus melleus 由来)
- ・プロレザー F G-F (天野エンザイム株式会社、Bacillus sp. 由来)
- ・ニューラーゼ F 3 G (天野エンザイム株式会社、Rhizopus niveus 由来)
- ・プロテアーゼ M 「アマノ」 S D (天野エンザイム株式会社、Aspergillus oryzae 由来)
- ・アクチニジン (キウイフルーツ由来、システインプロテアーゼ)

[0133] 得られたプロテアーゼ処理液を、10 倍希釈 (レーン A) または 5 倍希釈 (レーン B) して、16% ポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動させた。泳動させたタンパク質を、銀染色した。対照サンプルとして、酵素のみを加えた溶液 (レーン C) も電気泳動させた。

[0134] 結果を図 16 に示す。同図に示すように、いずれのプロテアーゼ処理液にも、酵素 (レーン C) とは異なる分子量のタンパク質成分が含まれていた。つまり、いずれのプロテアーゼで処理しても、骨組織残渣に含まれていたタンパク質が分解されていた。このように分解されたペプチドは、栄養源として植物体に利用される。

[0135] [実施例 7 : 骨組織からのリン酸の回収]

下記の手順により、酸抽出液から沈澱としてリン酸を回収した。また、リン酸の回収率も計算した。

1. 屠殺場から入手した豚骨を、ミル (IKA TUBE MILL 100、IKA JAPAN 株式会社) で細粉碎した。
2. 粉碎した豚骨を、1 N の硝酸水溶液または 1 N の塩酸水溶液に 48 時

間浸漬した。

3. 上清を回収して、酸抽出液を得た。
4. 0.5 mLの酸抽出液に、5 Nの水酸化ナトリウム水溶液を、30  $\mu$ L、50  $\mu$ L、70  $\mu$ L、100  $\mu$ Lまたは120  $\mu$ L加えて、室温にて1時間静置した。これにより、リン酸を沈澱させた。
5. 遠心分離により、反応液を上清と沈澱とに分けた。
6. 沈澱に1 Nの塩酸水溶液を0.5 mL加えて、リン酸を再溶解させた。
7. 工程5で得られた沈澱の最溶解液および工程4で得られた上清におけるリン酸含有量を測定した。測定には、Malachite Green Phosphate Assay Kit (BioAssay Systems)を用いた。また、工程3で得られた酸抽出液におけるリン酸含有量を基準として、リン酸回収率を計算した。

[0136]

[表8]

表 8

硝酸水溶液						
NaOH添加量 ( $\mu\text{L}$ )	沈澱		上清		沈澱+上清	
	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)
50	8.86	36.0	12.07	49.0	20.9	84.9
70	12.8	52.0	7.93	32.2	20.7	84.1
100	18.5	75.2	3.36	13.6	21.9	88.8
120	20.5	83.4	2.47	10.0	23.0	93.4

塩酸水溶液						
NaOH添加量 ( $\mu\text{L}$ )	沈澱		上清		沈澱+上清	
	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)
30	6.48	41.7	8.30	54.9	14.8	97.7
50	8.18	52.7	7.78	51.4	16.0	106
70	13.6	72.5	1.52	25.7	15.1	100
100	15.1	97.5	1.87	12.3	17.0	112

## [0137] [結果]

結果を表8に示す。硝酸を用いた酸抽出液においては、NaOH水溶液の添加量を100 $\mu\text{L}$ 以上にすれば、70%以上のリン酸を沈澱として回収できた。一方、上清に含まれているリン酸は、NaOH水溶液の添加量を120 $\mu\text{L}$ とすると、10%程度にまで減少した。塩酸を用いた酸抽出液においては、NaOH水溶液の添加量を70 $\mu\text{L}$ 以上にすれば、70%以上のリン酸を沈澱として回収できた。一方、上清に含まれているリン酸は、NaOH水溶液の添加量を100 $\mu\text{L}$ とすると、10%程度にまで減少した。このように、酸抽出液に適量のNaOH水溶液を添加することにより、沈澱としてリン酸を回収・粗精製できた。

[0138] ちなみに、硝酸を用いた酸抽出液におけるリン酸の含有量は、24.6m

gであった。これは、工程2で使用した豚骨の湿重量（71mg）に対して、34.7%に当たる。また、塩酸を用いた酸抽出液におけるリン酸の含有量は、15.1mgであった。これは、工程2で使用した豚骨の湿重量（74.5mg）に対して、20.2%に当たる。乾燥前の骨組織に占めるリン酸の重量は25～35%とされているので、酸抽出液の調製により、最大で99%（ $=34.7/35 \times 100$ ）のリン酸が取出せていることになる。

[0139] [実施例8：硫酸塩の添加によるリン酸の精製]

[実施例8-1：上清におけるリン酸回収率の検討]

下記の手順により、実施例7で得られたリン酸沈澱の再溶解液から、カルシウムを硫酸カルシウム沈澱として除去した。

1. 実施例7と同様にして、リン酸沈澱の再溶解液を調製した。実施例7の工程2において使用する酸は、1Nの硝酸水溶液または1Nの塩酸水溶液とした。実施例7の工程4において添加する5Nの水酸化ナトリウム水溶液の量は、100 $\mu$ Lとした。
2. 硫酸または硫酸塩（硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウムまたは硫酸マグネシウム）を加えた。硫酸または硫酸塩の添加量は、最終濃度が0.4M、0.6M、0.8Mまたは1.0Mとなる量とした。
3. 生成した硫酸カルシウム沈澱を、遠心分離により除去した。
4. 上清に含まれているリン酸の重量を測定した。測定には、Malachite Green Phosphate Assay Kit (Bio Assay Systems)を用いた。また、硫酸または硫酸塩を加える前の、酸抽出液に水酸化ナトリウム水溶液を加えて生じた沈澱（実施例7の工程5で得られた沈澱）におけるリン酸含有量を基準として、リン酸回収率を計算した。

[0140]

[表9]

表 9

硝酸水溶液											
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>		
	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	
0.4	11.6	62.6	12.6	68.1	12.7	68.7	11.0	59.6	10.9	58.8	
0.6	12.4	66.7	11.4	61.5	9.82	53.0	11.6	62.7	11.9	64.2	
0.8	13.2	71.5	11.0	59.3	9.69	52.3	11.5	62.3	11.4	61.6	
1.0	12.3	66.5	11.2	60.5	9.47	51.1	11.7	63.2	11.5	62.2	
最高回収率におけるリン酸濃度	169mM (0.8mL)		257mM (0.5mL)		260mM (0.5mL)		239mM (0.5mL)		243mM (0.5mL)		

塩酸水溶液											
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>		
	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	
0.4	11.5	84.4	11.9	87.5	12.7	93.4	13.1	96.7	12.5	91.8	
0.6	12.8	94.5	12.0	88.5	10.1	74.7	12.6	92.6	12.3	90.2	
0.8	13.4	98.8	12.3	90.5	11.6	85.3	12.2	90.0	11.7	86.3	
1.0	13.1	96.3	11.9	87.5	11.3	83.1	12.4	91.2	11.8	86.7	
最高回収率におけるリン酸濃度	171mM (0.8mL)		251mM (0.5mL)		259mM (0.5mL)		267mM (0.5mL)		255mM (0.5mL)		

[0141] [結果]

結果を表9に示す。硫酸塩の濃度を適切に設定すれば、硫酸と同程度のリン酸回収率を硫酸塩でも達成できることが分かった。また、0.4 Mの低濃度においては、硫酸塩の添加により得られるリン酸濃度は、硫酸の添加により得られるリン酸濃度よりも若干高い傾向にあった。重要なことには、硫酸

塩を添加は硫酸の添加よりも系の体積を少なくできるだけでなく、得られるリン酸の濃度も1.5倍程度高い。この点において、本発明の一実施形態に係る方法は、リン酸を精製する有用な方法である。さらに、技術を実用化する際には、硫酸または硫酸塩の添加量が少ない方が好ましいことから、硫酸塩によるカルシウム除去効果の有効性が改めて証明された。

[0142] カルシウムの沈澱に硫酸ではなく硫酸塩を用いることには、次のような利点がある。

- ・リン酸濃度が1.5倍程度高い。
- ・液体を加えないので、反応系の体積増加を低減できる。
- ・反応系が強酸性にならないので、中和のために必要な塩基の量が少量で済む。
- ・安全性が高い。

[0143] [実施例8-2：上清からのカルシウム除去能の検討]

実施例8-1の工程4で得られた上清における、カルシウム含有量を測定した。測定には、LAQUAtwin-Ca-11を用いた。また、硫酸または硫酸塩を加える前の、酸抽出液に水酸化ナトリウム水溶液を加えて生じた沈澱（実施例7の工程5で得られた沈澱）におけるカルシウム含有量を基準として、カルシウム残留率を計算した。

[0144]

[表10]

表 10

硝酸水溶液											
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>		
	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	
0.4	2200	27.6	320	4.01	435	5.45	387	4.85	700	8.77	
0.6	975	12.2	170	2.13	312	3.91	165	2.07	295	3.70	
0.8	600	7.52	115	1.44	216	2.71	115	1.44	175	2.19	
1.0	432	5.41	90.0	1.13	28.0	0.351	95.0	1.19	120	1.50	
最低残留率におけるCa <sup>2+</sup> 濃度	12mM (0.9mL)		4.5mM (0.5mL)		1.8mM (0.4mL)		4.8mM (0.5mL)		6.0mM (0.5mL)		

塩酸水溶液											
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>		
	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	重量 (μg)	残留率 (%)	
0.4	1210	18.3	155	2.35	215	3.26	155	2.35	270	4.09	
0.6	650	9.85	90.0	1.36	172	2.61	80.0	1.21	125	1.89	
0.8	512	7.76	65.0	0.985	31.5	0.477	70.0	1.06	95.0	1.44	
1.0	297	4.50	50.0	0.758	<18.0	<0.273	50.0	0.758	75.0	1.14	
最低残留率におけるCa <sup>2+</sup> 濃度	8.3mM (0.9mL)		2.5mM (0.5mL)		<1.0mM (0.5mL)		2.5mM (0.5mL)		3.8mM (0.5mL)		

[0145] [結果]

結果を表10に示す。同じ濃度で比較すると、一般に、硫酸よりも硫酸塩の方が、カルシウム残留率が低かった。例えば、塩酸での酸処理後に0.4 M水酸化ナトリウムを加えた実験系において、溶液中のカルシウム量は、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>では1,210 μgであったのに対し、硫酸塩では155~270 μg

であった。つまり、この条件におけるカルシウム除去能は、硫酸塩の方が最大で7.8倍高かった。加えて、重要なことには、硫酸塩を添加した溶液と硫酸を添加した溶液とを比較すると、溶液の体積は前者が後者の約1/2でありながら、カルシウム濃度は前者が後者の約1/2まで減少していた。つまり、硫酸塩を添加することにより、リン酸を精製する上で不必要なカルシウムを効率よく除去できる。

[0146] 酸処理に使用した酸で比較すると、塩酸による酸処理の方が、硝酸による酸処理よりもカルシウム残留率が低かった。最もカルシウムを除去できていたのは、塩酸で酸処理した酸抽出液に1Mの硫酸カリウムを添加した系であった。

[0147] 表11に、表9、10の結果に基づいて、カルシウム量(mg)/リン酸量(mg)の相対比率(%)を計算した値を示す。硫酸の添加によってもリン酸を回収できるが、いずれの濃度においても、カルシウムの残留量は硫酸塩を添加した実験系よりも多いことが示された。一方、硫酸塩を添加してリン酸を回収すると、硫酸を添加した実験系よりもカルシウムの残留量が著しく少なくなり、リン酸の回収量が相対的に高いことも示された。このように、適切な硫酸塩を添加することにより、リン酸の回収量を減少させることなく、カルシウムの残存量を0.2重量%まで低減させることができる。したがって、骨組織から抽出したリン酸の精製には、硫酸よりも硫酸塩を用いる方が好ましいと言える。

[表11]

表 11

硝酸水溶液					
濃度	カルシウム (mg) / リン酸 (mg) × 100 (%)				
(M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>
0.4	19.0	2.5	3.4	3.5	6.4
0.6	7.9	1.5	3.2	1.4	2.5
0.8	4.5	1.1	2.2	1.0	1.5
1.0	3.5	0.8	0.3	0.8	1.0

塩酸水溶液					
濃度	カルシウム (mg) / リン酸 (mg) × 100 (%)				
(M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>
0.4	10.6	1.3	1.7	1.2	2.2
0.6	5.1	0.7	1.7	0.6	1.0
0.8	3.8	0.5	0.3	0.6	0.8
1.0	2.3	0.4	0.2	0.4	0.6

## [0148] [実施例 8-3 : 沈澱へのリン酸脱漏率の検討]

下記の手順により、実施例 8-1 の工程 3 で得られた硫酸カルシウム沈澱における、リン酸の含有量を測定した。

1. 硫酸カルシウム沈澱に EDTA (pH 7.4) および 5 N の水酸化ナトリウムを加えて、再溶解させた。
2. 得られた溶解液におけるリン酸含有量を測定した。測定には、Malachite Green Phosphate Assay Kit (BioAssay Systems) を用いた。また、硫酸または硫酸塩を加える前の、酸抽出液に水酸化ナトリウム水溶液を加えて生じた沈澱 (実施例 7 の工程 5 で得られた沈澱) におけるリン酸含有量を基準として、リン酸脱漏率を計算した。

## [0149]

[表12]

表 12

硝酸水溶液										
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>	
	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)
0.4	1.53	8.23	2.00	10.8	2.15	11.6	2.81	15.1	2.45	13.2
0.6	1.97	10.6	1.69	9.13	5.29	28.5	2.38	12.9	4.32	23.3
0.8	1.43	7.70	1.71	9.25	5.22	28.2	1.54	8.32	1.96	10.6
1.0	2.01	10.8	1.74	9.41	4.80	25.9	1.50	8.11	1.84	9.93

塩酸水溶液										
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>	
	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)	重量 (mg)	脱漏率 (%)
0.4	1.18	8.67	0.776	5.71	0.957	7.05	1.2	8.87	1.36	10.1
0.6	0.923	6.80	0.716	5.27	3.73	27.5	2.25	16.6	1.67	12.3
0.8	0.824	6.07	0.705	5.19	2.37	17.5	1.49	10.9	1.55	11.4
1.0	0.782	5.76	0.705	5.19	2.45	18.1	1.13	8.34	1.49	11.0

[0150] [結果]

結果を表12に示す。表から分かるように、硫酸塩の濃度を適宜調節すれば、硫酸カルシウム沈澱におけるリン酸含有量を硫酸と同程度に低減できた。硫酸塩の濃度は、0.4 Mあれば、脱漏するリン酸を十分に低減できた。

[0151] [実施例8-4：合計リン酸回収率の検討]

実施例 8 - 1 で検討した上清におけるリン酸回収率と、実施例 8 - 3 で検討した沈澱へのリン酸脱漏率の合計量を検討した。沈澱に含まれているリン酸は、沈澱の洗浄によって再回収できる見込みがある。例えば、沈澱（硫酸カルシウム）を純水により洗浄することで、沈澱に含まれていたリン酸を回収できる。そのため、合計リン酸含有量が多いほど、回収できるリン酸の潜在量も多くなる。

[0152]

[表13]

表 13

硝酸水溶液										
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>	
	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)
0.4	13.1	70.9	14.6	78.9	14.9	80.3	13.9	74.8	13.3	72.0
0.6	14.3	77.3	13.1	70.6	15.1	81.5	14.0	75.5	16.2	87.5
0.8	14.7	79.2	12.7	68.5	14.9	80.5	13.1	70.6	13.4	72.1
1.0	14.3	77.4	13.0	69.9	14.3	77.0	13.2	71.3	13.4	72.1

塩酸水溶液										
濃度 (M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub>	
	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)	重量 (mg)	回収率 (%)
0.4	12.6	93.1	12.7	93.2	13.6	100	14.3	106	13.8	102
0.6	13.7	101	12.7	93.8	13.9	102	14.8	109	13.9	103
0.8	14.2	105	13.0	95.7	13.9	103	13.7	101	13.3	97.8
1.0	13.9	102	12.6	92.7	13.7	101	13.5	100	13.3	97.7

[0153] [結果]

結果を表 1 3 に示す。濃度を適切に調節すれば、硫酸と同程度のリン酸回収率を硫酸塩でも達成できることが分かった。合計回収率は塩酸を用いた酸抽出液の方が高かったが、絶対的なリン酸含有量は塩酸を用いた酸抽出液と硝酸を用いた酸抽出液とで同程度であった。

## [0154] [実施例 9 : 植物体の RNA 発現解析 2]

[cDNA ライブラリーの作製および次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析]

実施例 3 と同様の手順により行った。

## [0155] [発現量に変化した遺伝子の解析]

実施例 3 と同様の手順により行った。発現量の比較は、骨可溶化液 B vs. 市販の液体肥料、および、骨可溶化液 B と市販の液体肥料との混合液 vs. 市販の液体肥料のみの 2 組で実施した。

## [0156] [結果]

図 18 は、骨可溶化液 B または市販の液体肥料を与えて 5 日間栽培したスプラウトの葉における、発現変動遺伝子の解析結果である。FPKM 値が 2 倍以上に増加した遺伝子は、1, 568 個であった。FPKM 値が 2 分の 1 以下に減少した遺伝子は、1, 654 個であった。したがって、合計 3, 222 個の遺伝子の発現量に変動していた。GO エンリッチメント解析の結果、発現量に変動している遺伝子には、成長の制御に関連する遺伝子が 65 個、光合成に関連する遺伝子が 44 個、光合成の光化学系 I における光捕集に関係する遺伝子が 26 個含まれていた。

[0157] 図 19 は、骨可溶化液 B と市販の液体肥料との混合液または市販の液体肥料のみを与えて 5 日間栽培したスプラウトの根における、発現変動遺伝子の解析結果である。FPKM 値が 2 倍以上に増加した遺伝子は、766 個であった。FPKM 値が 2 分の 1 以下に減少した遺伝子は、1, 235 個であった。したがって、合計 2, 001 個の遺伝子の発現量に変動していた。GO エンリッチメント解析の結果、発現量に変動している遺伝子には、硝酸同化に関連する遺伝子が 17 個、根毛の伸長に関連する遺伝子が 16 個、硝酸の取り込みに関係する遺伝子が 12 個含まれていた。

[0158] 図 20 は、骨可溶化液 B と市販の液体肥料との混合液または市販の液体肥料のみを与えて 5 日間栽培したスプラウトの葉における、発現変動遺伝子の解析結果である。FPKM 値が 2 倍以上に増加した遺伝子は、582 個であ

った。FPKM値が2分の1以下に減少した遺伝子は、662個であった。したがって、合計1,244個の遺伝子の発現量が変動していた。GOエンリッチメント解析の結果、発現量が変動している遺伝子には、アブシシン酸（植物ホルモン）に対する反応に関連する遺伝子が32個、根毛の伸長に関連する遺伝子が13個、発芽の促進に係る遺伝子が6個含まれていた。

[0159] 図18～20に示される結果から、骨可溶化液Bは、スプラウトの遺伝子発現を変動させることが分かった。特に、葉部または根部の組織成長、葉における光合成、および根における養分吸収に関連する遺伝子群の発現が、大きく変動していた。

[0160] [実施例10：硫酸塩の添加によるカルシウムイオン除去効率の検討]

リン酸沈澱の再溶解液に硫酸塩を添加することにより、カルシウムイオンを炭酸カルシウム沈澱として除去した。沈澱除去後の上清におけるカルシウムイオン含有量を測定して、カルシウム除去効率を検討した。具体的な手順は次の通りである。

1. 実施例7と同様にして、リン酸沈澱の再溶解液を調製した。実施例7の工程2において使用する酸は、1Nの塩酸水溶液とした。実施例7の工程4において添加する5Nの水酸化ナトリウム水溶液の量は、100 $\mu$ Lとした。
2. 液体の硫酸( $H_2SO_4$ )または固体の硫酸塩( $Na_2SO_4$ 、 $K_2SO_4$ 、 $Mg_2SO_4$ および $(NH_4)_2SO_4$ )を加えた。硫酸または硫酸塩の添加量は、最終濃度がそれぞれ0.4Mとなる量とした。
3. 生成した硫酸カルシウム沈澱を、遠心分離により除去した。
4. 上清に含まれているカルシウムイオンの重量(mg)を測定した。カルシウムイオンの測定は、TSK gel Super IC-Cation HSI (4.6mm I.D.  $\times$  10cm)を接続した高速イオンクロマトグラフィーIC-8100EX(東ソー株式会社)を用いて、精密測定条件で実施した。3.0mmol/Lのメタスルホン酸および2.7mmol/Lの18-クラウン-6の混合液を溶離液とした。測定温度は40 $^{\circ}$ C、流

速は 1.0 mL/分、注入量は 30  $\mu$ L であった。電気電動度 ( $\mu$ S) を測定し、標準物質の面積から回帰式を求めることにより、カルシウムイオン濃度を測定した。カルシウムイオン濃度から、1つのサンプル (30  $\mu$ L) あたりのカルシウムイオン含有量を求めた。

[0161] [表14]

表 14

	添加前	添加後				
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>
Ca <sup>2+</sup> 含有量 (mg)	5.24	1.41	0.327	0.345	0.397	0.461
除去率 (%)	-	73	94	93	92	91

[0162] [結果]

結果を表 14 に示す。液体の硫酸を添加した系は、系全体の容積が増加するだけでなく、カルシウムイオンの除去率も 73% と一番低かった。固体の硫酸塩を加えた系では、系全体の容積の増加が少なく、カルシウムイオンの除去率も 91~94% と高かった。また、強酸である硫酸を使用しないので、硫酸塩を加える方法は安全性も高い。さらに、硫酸塩の添加量を適宜増減させることで、所望する濃度のカルシウムを残存させることもできた。

[0163] リン酸またはリン酸を含有する肥料を骨組織から製造する際に、骨組織に含まれているカルシウムイオンは、リン酸の回収を減少させる一因となる。これは、中性域においては、カルシウムイオンがリン酸イオンと結合してリン酸カルシウム沈澱となるためである。したがって、カルシウムイオンを沈澱により除去することが望ましく、硫酸塩の添加により上首尾に除去できることが示された。

[0164] 硫酸塩に含まれているカリウムイオン、マグネシウムイオンまたはアンモニウムイオンは、植物の生長に必要な成分である。それゆえ、硫酸塩として硫酸カリウム、硫酸マグネシウムまたは硫酸アンモニウムを使用すると、植物の生長に必要な成分を肥料に含ませることができる。あるいは、実施例 7 の工程 4 で加える塩基を、水酸化ナトリウムから水酸化カリウムに変更して

も、植物の生長に必要な成分を肥料に含ませることができる。このような製造方法を採用すれば、価値を高めた肥料が製造できる。

[0165] [実施例 11 : 炭酸塩の添加によるリン酸の精製]

下記の手順により、実施例 7 で得られたリン酸沈澱の再溶解液から、カルシウムを炭酸カルシウム沈澱として除去した。

1. 実施例 7 と同様にして、リン酸沈澱の再溶解液を調製した。実施例 7 の工程 1 において使用する酸は、1 N の硝酸水溶液または 1 N の塩酸水溶液とした。実施例 7 の工程 4 において添加する 5 N の水酸化ナトリウム水溶液の量は、100  $\mu$ L とした。
2. 炭酸塩（固体の炭酸水素ナトリウムまたは炭酸ナトリウム）を加えた。炭酸水素ナトリウムの添加量は、最終濃度が 0.4 M となる量とした。炭酸ナトリウムの添加量は、最終濃度が 0.6 M となる量とした。
3. 生成した炭酸カルシウム沈澱を、遠心分離により除去した。
4. 上清に含まれているリン酸イオンの濃度（ppm）を測定した。リン酸イオンの測定は、TSK gel Super IC-Anion HS（4.6 mm I.D.  $\times$  10 cm）を接続した高速イオンクロマトグラフィー IC-8100EX（東ソー株式会社）を用いて、精密測定条件で実施した。
7. 5 mmol/L の炭酸水素ナトリウムおよび 0.8 mmol/L の炭酸ナトリウムの混合液を溶離液とした。測定温度は 40  $^{\circ}$ C、流速は 1.5 mL/分、注入量は 30  $\mu$ L であった。電気電動度（ $\mu$ S）を測定し、標準物質の面積から回帰式を求めることにより、リン酸イオン濃度を測定した。リン酸イオン濃度から、1 つのサンプル（30  $\mu$ L）あたりのリン酸イオン含有量を求めた。

[0166]

[表15]

表 15

	NaHCO <sub>3</sub> を添加	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> を添加
	0.4M	0.6M
塩酸による酸抽出液	9,800	11,400
硝酸による酸抽出液	1,670	2,850

## [0167] [結果]

結果を表15に示す。炭酸塩を添加することにより、カルシウムイオンは炭酸カルシウムとなって沈澱し、リン酸イオンは上清に残った。例えば、塩酸による酸抽出液に炭酸水素ナトリウムを加えた系では、9,000ppm以上のリン酸が上清に含まれていた。上清に残留している炭酸イオンは、加熱すると二酸化炭素に変換されるので、容易に除去できる。

## [0168] [実施例12：硫酸塩に含まれていた陽イオンの除去]

## [実施例12-1：ナトリウムイオンまたはカリウムイオンの除去]

下記の手順により、カルシウムイオン除去するために加えた硫酸塩に含まれていた陽イオン（ナトリウムイオンまたはカリウムイオン）を除去した。具体的には、強陽イオン交換ゲルを用いてナトリウムイオンまたはカリウムイオンを吸着させた。

1. TSKgel SP-TOYOPEARL 650Mゲル（東ソー株式会社）を純水でデカンテーションして、マイクロスピナラム（GE Healthcare）に充填した。

2. 硫酸塩を添加して硫酸カルシウムを除去した後の上清を、ゲルの上層に適量加えた。

3. 卓上遠心機で遠心することにより、上清にゲルを通過させた。ゲルを通過した素通り画分を集めた。

3. 素通り画分に含まれるナトリウムイオンまたはカリウムイオンの含有量（mg）を測定した。ナトリウムイオンの測定には、LAQUA twin-Na-11（株式会社堀場アドバンスドテクノ）を用いた。カリウムイオ

ンの測定には、LAQUAtwin-K-11（株式会社堀場アドバンスドテクノ）を用いた。

[0169] [表16]

表 16

	ナトリウムイオン	カリウムイオン
原液 (mg)	11.6	11.2
素通り画分 (mg)	1.96	1.56
除去率 (%)	83.1	86.1

[0170] [結果]

結果を表 16 に示す。硫酸ナトリウムまたは硫酸カリウムの添加により硫酸カルシウムを沈澱させた後の上清には、ナトリウムイオンまたはカリウムイオンが含まれている。これらのイオンは、強陽イオン交換ゲルに通すことで除去できた。具体的に、ナトリウムイオンは 83% が除去され、カリウムイオンは 86% が除去された。強陽イオン交換ゲルへの流通を繰り返すことにより、さらに多くの陽イオンを除去できる。

[0171] このように、硫酸塩を添加する方法において、硫酸塩として加えられた陽イオンは、強陽イオン交換ゲルで除去できることが示された。ただし、骨組織から肥料を製造する場合、カリウムイオン、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンは、植物の生長にとって重要な栄養元素であるから、除去しなくてもよい。

[0172] [実施例 12-2 : マグネシウムイオンまたはアンモニウムイオンの除去]

下記の手順により、カルシウムイオン除去するために加えた硫酸塩に含まれていた陽イオン（マグネシウムイオンまたはアンモニウムイオン）を除去した。具体的には、強陽イオン交換ゲルを用いてマグネシウムイオンまたはアンモニウムイオンを吸着させた。

1. TSK gel SP-TOYOPEARL 650Mゲル（東ソー株式会社）を純水でデカンテーションして、マイクロスピナラム（GE H

healthcare) に充填した。

2. 硫酸塩を添加して硫酸カルシウムを除去した後の上清を、ゲルの上層に適量加えた。

3. 卓上遠心機で遠心することにより、上清にゲルを通過させた。ゲルを通過した素通り画分を集めた。

3. 素通り画分に含まれるマグネシウムイオン、アンモニウムイオンまたはカルシウムイオンの含有量 ( $\mu\text{g}$ ) を測定した。イオン濃度の測定は、TSK gel Super IC-Cation HSI (4.6 mm I.D.  $\times$  10 cm) を接続した高速イオンクロマトグラフィー IC-8100 EX (東ソー株式会社) を用いて、精密測定条件で実施した。3.0 mmol/L のメタスルホン酸および 2.7 mmol/L の 18-クラウン-6 の混合液を溶離液とした。測定温度は 40°C、流速は 1.0 mL/分、注入量は 30  $\mu\text{L}$  であった。電気電動度 ( $\mu\text{S}$ ) を測定し、標準物質の面積から回帰式を求めることにより、カルシウムイオン濃度を測定した。イオン濃度から、1つのサンプル (30  $\mu\text{L}$ ) あたりのイオン含有量を求めた。

[0173] [表17]

表 17

	MgSO <sub>4</sub> を添加		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> を添加	
	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
原液 ( $\mu\text{g}$ )	3,770	461	5,910	397
素通り画分 ( $\mu\text{g}$ )	19.5	14.6	827	10.8
除去率 (%)	99.5	96.8	86	97.3

[0174] [結果]

結果を表 17 に示す。マグネシウムイオン、アンモニウムイオンおよびカルシウムイオンも、強陽イオン交換ゲルと接触させることにより上清から除去できることが示された。強陽イオン交換ゲルへの流通を繰り返すことにより、カルシウムイオンも含め、さらに多くの陽イオンを除去できる。これにより、リン酸の純度を高められることが示唆された。

## [0175] [実施例 13 : 市販の骨粉からのリン酸精製]

下記の手順により、市販の蒸製骨粉（株式会社大宮グリーンサービス）を可溶化して、リン酸を回収した。

1. 1 g の蒸製骨粉に、10 mL の硫酸（1 N）、塩酸（1 N）または硝酸（1 N）を加えて、25℃にて19時間振盪した。
2. 得られた酸抽出液を、遠心機を用いて上清と沈澱とに分けた。
3. 0.5 mL の上清に、0.1 mL の NaOH 水溶液（5 N）を加えて、1時間振盪させた。
4. 遠心分離により、反応液を上清と沈澱とに分けた。
5. 適量の塩酸（1 N）を沈澱に加えて沈澱を溶解させた。
6. 工程3～5を複数回繰り返した。その後、0.5 mL の塩酸（0.4 N）に沈澱を溶解させた。これにより、リン酸を濃縮した沈澱溶解液を得た。
7. 得られた沈澱溶解液におけるアニオン含有量を測定した。測定は、TSK gel Super IC-Anion HS（4.6 mm I. D. × 10 cm）を接続した高速イオンクロマトグラフィー IC-8100EX（東ソー株式会社）を用いて、精密測定条件で実施した。7.5 mmol/L の炭酸水素ナトリウムおよび0.8 mmol/L の炭酸ナトリウムの混合液を溶離液とした。測定温度は40℃、流速は1.5 mL/分、注入量は30 μL であった。電気電動度（μS）を測定し、標準物質の面積から回帰式を求めることにより、アニオンイオン濃度を測定した。アニオンイオン濃度から、1つのサンプル（30 μL）あたりのアニオンイオン含有量を求めた。

## [0176] [表18]

表 18

検出されたアニオン	添加した酸		
	塩酸	硝酸	硫酸
リン酸イオン (ppb)	17.1	18.2	5.34
塩化物イオン (ppm)	0	0	0
硝酸イオン (ppm)	0	0	0
硫酸イオン (ppb)	0	0	7.14

## [0177] [結果]

結果を表18および図21に示す。市販の蒸製骨粉（高圧下で加熱処理した骨組織）を原料としても、本発明の一実施形態に係るリン酸の製造方法により、効率よく比較的安全にリン酸を回収できた。表18によると、硫酸による酸抽出液を用いるよりも、塩酸または硝酸による酸抽出液を用いる方が、リン酸の回収効率が高い。塩酸または硝酸を用いた系のリン酸回収効率は、硫酸を用いた系のリン酸回収効率の3.2～3.4倍に達した。

[0178] このことは、図21にも示されている。同図に示すイオンクロマトグラフィーの溶出曲線によると、塩酸または硝酸を用いた系において、リン酸イオン以外のアニオンは、塩化物イオン以外にほとんど含まれていなかった（工程5において沈澱を溶解させるのに塩酸を使用した）。一方、硫酸を用いた系においては、リン酸イオンの他に硫酸イオンが検出された。

[0179] 本実施例の結果は、市販の骨粉（加圧下で加熱処理された骨組織）からリン酸を取り出せることを示している。これにより、本発明の一実施形態に係るリン酸の製造方法は、リン鉱石や下水汚泥乾燥物からリン酸を回収する方法よりも、エネルギーコストが低く、環境破壊を起こしにくい持続可能な技術であることが証明された。

## [0180] [実施例14：市販の骨粉からのプロテアーゼ処理液の製造]

下記の手順により、市販の蒸製骨粉（株式会社大宮グリーンサービス）を可溶化して、プロテアーゼ処理液を製造した。

1. 1gの蒸製骨粉に、10mLの硫酸（1N）、塩酸（1N）または硝酸（1N）を加えて、25℃にて24時間振盪した。
2. 得られた酸抽出液を、遠心機を用いて上清（酸抽出液）と沈澱（骨残渣）とに分けて回収した。
3. 沈澱に、0.1mol/Lのクエン酸緩衝液（pH3）または0.1mol/Lのトリス塩酸緩衝液（pH8）を10mL加えた。
4. 図1のS5にしたがって、沈澱からプロテアーゼ処理液を調製した。プロテアーゼとしては、ニューラーゼF3G（天野エンザイム株式会社）ま

たはパパインW-40（天野エンザイム株式会社）を用い、実施例1-5と同じ手順で処理した。具体的には、次の通りであった。

- ・ニューラーゼF3G系：プロテアーゼ濃度＝最初の骨重量の1%（w/w）、緩衝液＝クエン酸緩衝液（pH3）、温度＝37℃、浸漬時間＝3日間
  - ・パパインW-40系：プロテアーゼ濃度＝最初の骨重量の1%（w/w）、緩衝液＝トリス塩酸緩衝液（pH8）、温度＝37℃、浸漬時間＝3日間
5. 反応液を遠心して、沈澱物と上清に分けた。

[0181] [結果]

結果を図22、23に示す。市販の蒸製骨粉は、高圧下で加熱処理した豚骨と鶏骨との混合物である。この骨粉を原料としても、本発明の一実施形態に係る肥料の製造方法により、プロテアーゼ処理液が調製できた。プロテアーゼ処理液は、それ自体を肥料とすることもできるし、骨可溶化液Bの原料とすることもできる。液体肥料には、固形の骨粉では期待できない即効性の植物生長効果が期待される。また、液体肥料は、水耕栽培や葉面散布にも適用できる。

[0182] ニューラーゼF3Gを用いたプロテアーゼ処理に関して、塩酸で酸処理した後の骨残渣は、プロテアーゼ処理によってほとんど全て溶解した。硝酸で酸処理した後の骨残渣は、プロテアーゼ処理によって全て溶解した。硫酸で酸処理した後の骨残渣は、プロテアーゼ処理の後にも白色沈澱が見られた。この沈澱は硫酸カルシウムと見られ、タンパク質成分の少なくとも一部は分解されていると考えられる。

[0183] パパインW-40を用いたプロテアーゼ処理に関して、塩酸または硝酸で酸処理した後の骨残渣は、プロテアーゼ処理によってほとんど全て溶解した。硫酸で酸処理した後の骨残渣は、プロテアーゼ処理の後にも白色沈澱が見られた。この沈澱は硫酸カルシウムと見られ、タンパク質成分の少なくとも一部は分解されていると考えられる。

[0184] 以上の結果から、硫酸を用いた酸抽出液を原料としてプロテアーゼ処理液を得る際には、遠心分離などによる沈澱の除去が必要となる場合があること

が分かった。塩酸または硝酸を用いた酸抽出液を原料としてプロテアーゼ処理液を得る際には、沈澱の除去は必要なく、この点において、塩酸または硝酸を酸処理工程で用いることが好ましい。また、プロテアーゼ処理後の溶液の遠心上清は、硫酸で酸処理したものは透明であり、硝酸または塩酸で処理したものは濁っていた。この結果から、骨残渣をより完全に分解するためには、塩酸または硝酸で酸処理することがより好ましいと分かった。ただし、硫酸を用いてもプロテアーゼ処理液を調製できることには留意されたい。

[0185] [実施例 15：市販の骨粉を原料とする酸抽出液におけるペプチド濃度の測定]

下記の手順により、市販の蒸製骨粉（株式会社大宮グリーンサービス）から酸抽出液を調製した。酸抽出液に含まれているペプチド濃度を測定した。

1. 1 g の蒸製骨粉に、10 mL の硫酸（1 N）、塩酸（1 N）または硝酸（1 N）を加えて、25℃にて24時間振盪した。
2. 得られた酸抽出液を、遠心機を用いて上清と沈澱とに分けた。上清を酸抽出液として回収した。
3. 0.5 mL の上清に、0.4 mol/L の水酸化カリウム水溶液を加えて、離散カルシウムを沈澱させた。
4. 工程3で得られた反応液から沈澱を除去した上清におけるペプチド濃度を測定した。測定には、プロテインアッセイBCAキット（品番297-73101、富士フィルム和光）を使用した。測定方法は、製品マニュアルに従った。540 nmにおける吸光度を測定した。吸光度が高いほど、ペプチド濃度も高い。
5. 工程3で得られた反応液から沈澱を回収した。このとき回収したのは、工程1において、塩酸または硝酸で処理した系のみとした。
6. 沈澱を1 Nの塩酸で完全に溶解させた。その後、0.4 mol/Lの水酸化カリウムを再び加えて、リン酸カルシウムを沈澱させた。この溶解-沈澱のプロセスを3回繰り返した。
7. 工程6において、1回目および3回目の繰り返しが完了した後に、反

応液から沈澱を除去した上清におけるペプチド濃度を測定した。測定には、プロテインアッセイBCAキット（品番297-73101、富士フィルム和光）を使用した。測定方法は、製品マニュアルに従った。540nmにおける吸光度を測定した。吸光度が高いほど、ペプチド濃度も高い。

[0186] [表19]

表 19

リン酸Ca除去後の上清に含まれるペプチド			
	塩酸	硝酸	硫酸
540nm吸光度	0.652	0.309	0.520

リン酸沈澱に残存するペプチド				
	塩酸		硝酸	
	繰り返し1回目	繰り返し3回目	繰り返し1回目	繰り返し3回目
540nm吸光度	0.319	0.013	0.167	0.002

[0187] [結果]

結果を表19に示す。市販の蒸製骨粉を原料として調製した酸抽出液には、ペプチドが検出された。ペプチド濃度は、塩酸で処理した酸抽出液、硫酸で処理した酸抽出液、硝酸で処理した酸抽出液の処理の順番に高かった。この結果から、特に塩酸で処理した酸抽出液には、多くのペプチドが含まれることが示された。ペプチドは、骨組織に含まれている有機成分である。それゆえ、酸抽出液には植物生長効果をもたらす成分が含まれていることが示唆された。

[0188] 実施例5において、酸抽出液には、銀染色キットで染色されるタンパク質成分がほとんど含まれていないことが示されていた（図14も参照）。この理由について、実施例5では、タンパク質のペプチド結合が切断されて低分子ペプチドおよびアミノ酸になったと推定していた。本実施例は、この推定を裏付けるものである。

[0189] ペプチドは、リン酸の製造においては不純物となる。不純物としてのペプ

チドは、リン酸カルシウムの溶解－沈澱のプロセス（図3の工程S13および工程S14）を繰り返すことにより、ほとんど除去できることが分かった。表19に示す通り、溶解－沈澱プロセスを3回繰り返すことにより、ペプチド濃度は1／100まで減少した。この結果から、特に塩酸または硝酸により処理した酸抽出液からは、上首尾にペプチドを除去してリン酸濃度を高められることが示唆された。

### 産業上の利用可能性

[0190] 本発明は、植物の育成などに利用できる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 下記工程1、工程2および工程3のうち1つ以上を含む、リン酸を含有する肥料の製造方法。
- 工程1：骨組織を酸およびプロテアーゼの両方を含む溶液で処理して、得られた骨可溶化液Aから肥料を製造する工程
- 工程2：骨組織を酸処理して、得られた酸抽出液から肥料を製造する工程
- 工程3：酸処理された骨組織をプロテアーゼ処理して、得られたプロテアーゼ処理液から肥料を製造する工程
- [請求項2] 上記工程2および上記工程3を含み、さらに下記工程4を含む、請求項1に記載の製造方法。
- 工程4：上記酸抽出液および上記プロテアーゼ処理液を混合して、得られた骨可溶化液Bから肥料を製造する工程
- [請求項3] 上記工程1または上記工程2を含み、硝酸、塩酸、蟻酸および硫酸からなる群より選択される1種類以上により骨組織を酸処理する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4] 上記工程1または上記工程3を含み、至適pHが1.5～8.0であるプロテアーゼにより骨組織をプロテアーゼ処理する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項5] 上記工程1または上記工程2を含み、5～60℃にて骨組織を酸処理する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項6] 上記工程1または上記工程2を含み、0.6～2.0mol/Lの酸により骨組織を酸処理する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項7] 上記工程1または上記工程2を含み、6～48時間骨組織を酸処理する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項8] 上記工程1または上記工程2に先立って、上記骨組織を前処理する工程をさらに含み、
- 上記前処理は、上記骨組織の加熱、上記骨組織の加圧下における加

熱および上記骨組織へのマイクロ波の照射からなる群より選択される1つ以上である、請求項1に記載の製造方法。

[請求項9] 上記前処理工程において、上記骨組織に含まれているタンパク質を変性させる、請求項8に記載の製造方法。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法により得られる肥料。

[請求項11] 液体肥料である、請求項10に記載の肥料。

[請求項12] リン酸と、

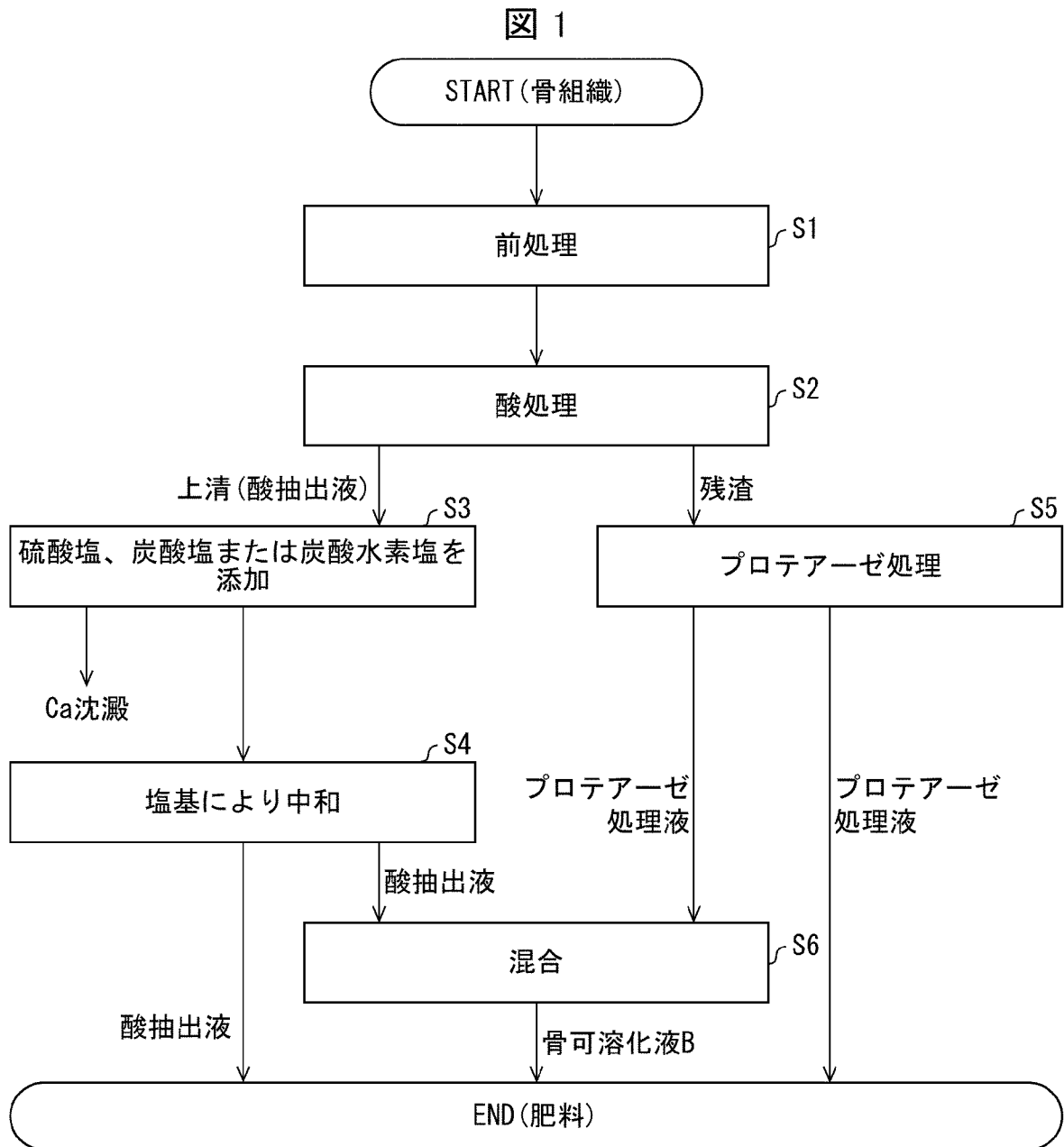
I型コラーゲン、アルファ-2-HS-グリコプロテイン、ペリオスチン、バイグリカンおよびSPARCからなる群より選択される1つ以上に由来するペプチド断片と、  
を含んでいる、肥料。

[請求項13] 上記ペプチド断片は、当該断片が由来するタンパク質の活性を失っている、請求項12に記載の肥料。

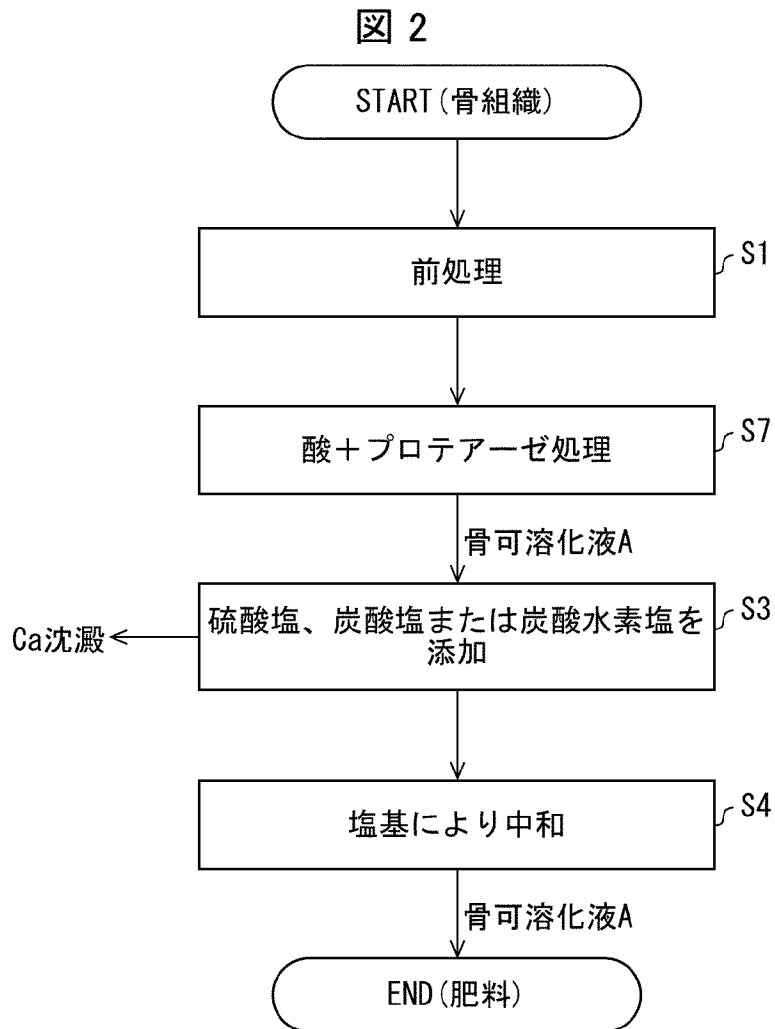
[請求項14] 上記ペプチド断片の分子量は、1万Da以下である、請求項12に記載の肥料。

[請求項15] 上記肥料に含まれている上記リン酸の濃度は、280mM以上である、請求項12に記載の肥料。

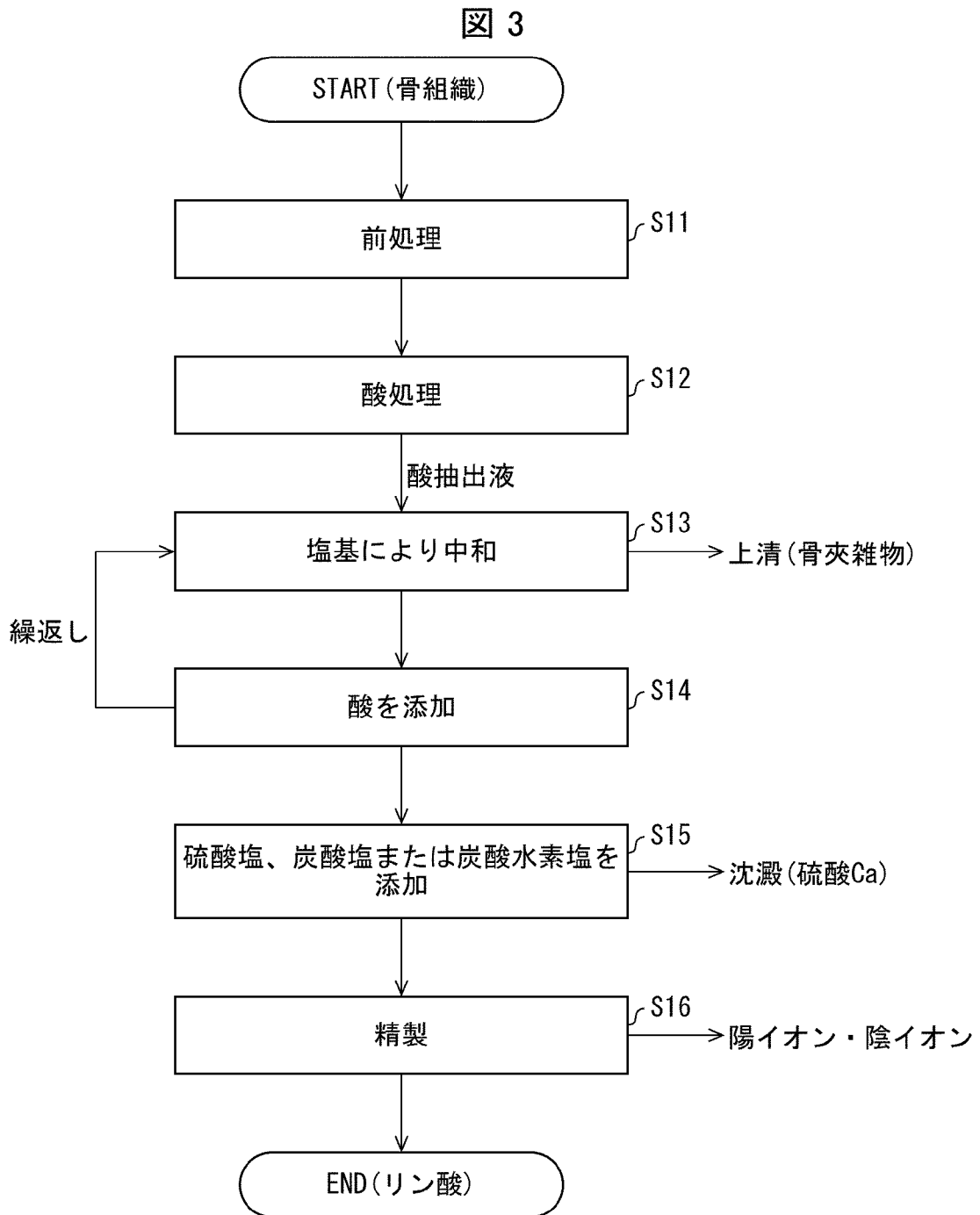
[図1]



[図2]



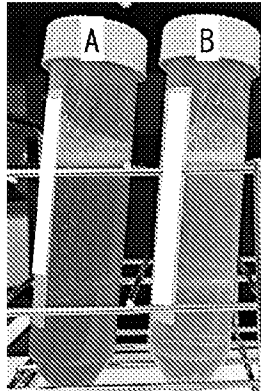
[図3]



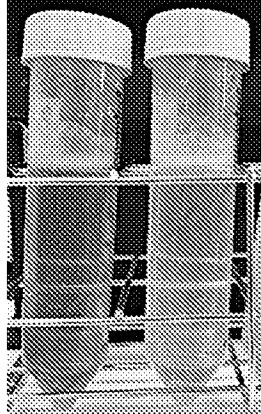
[図4]

図 4

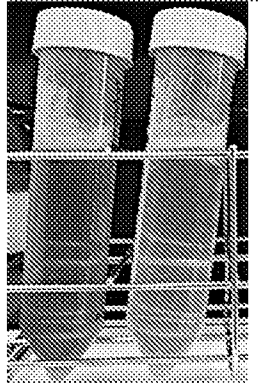
3.5時間後



19時間後

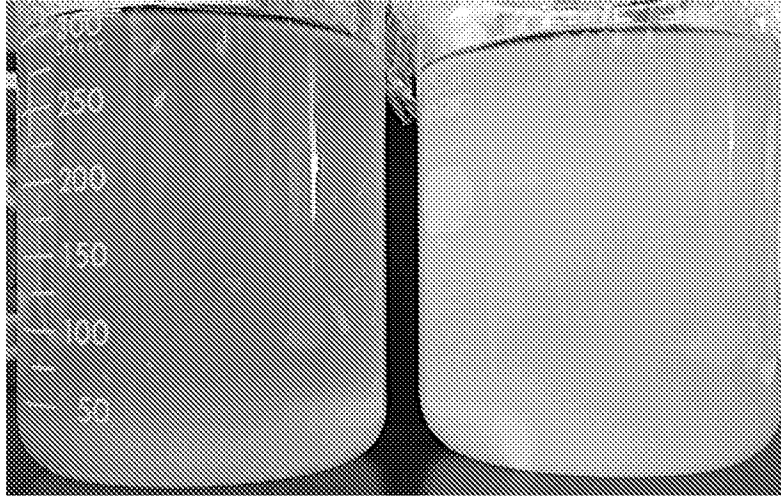


24時間後



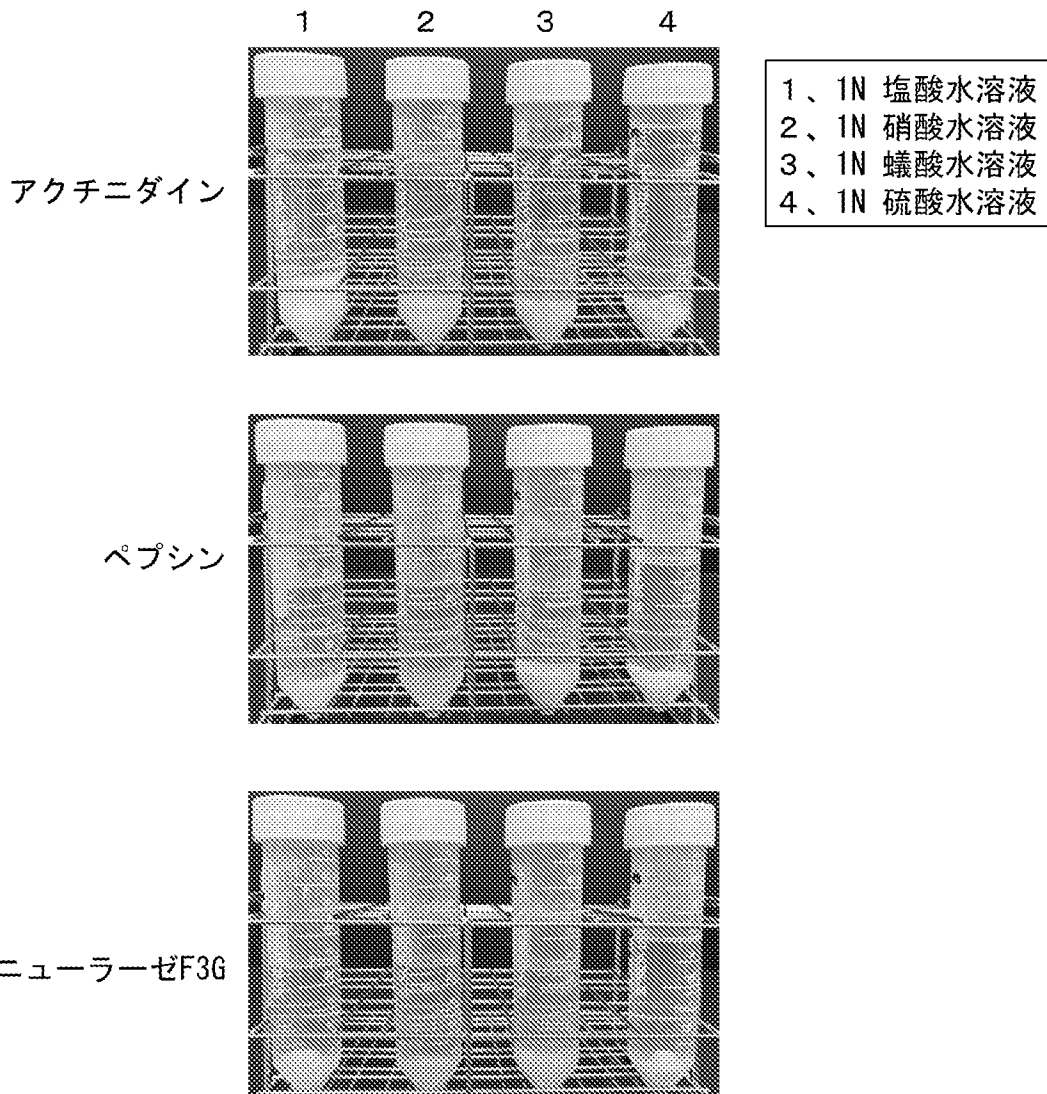
[図5]

図 5

硝酸処理後の  
プロテアーゼ処理液塩酸処理後の  
プロテアーゼ処理液

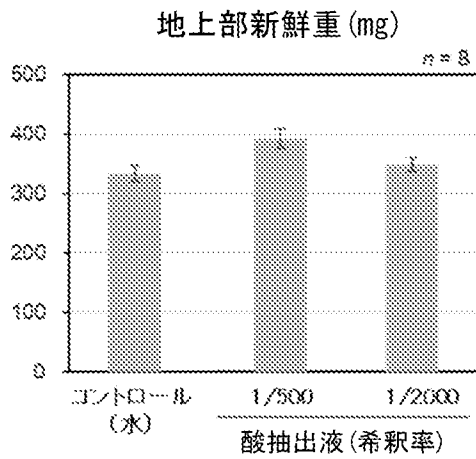
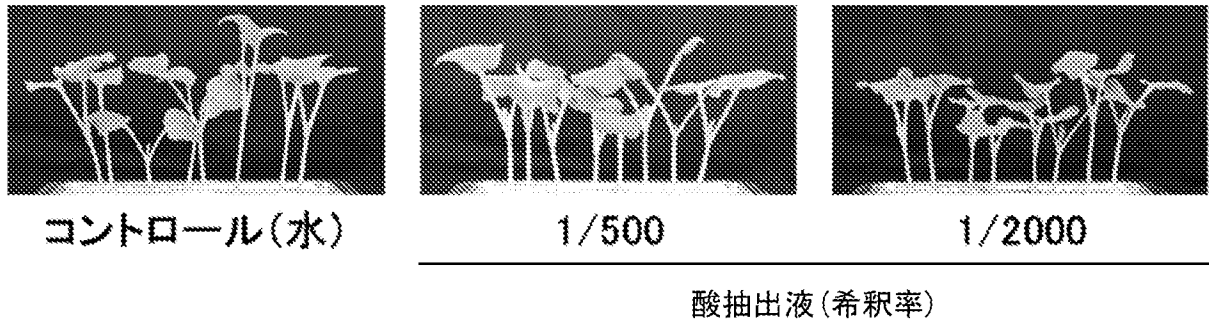
[図6]

図 6



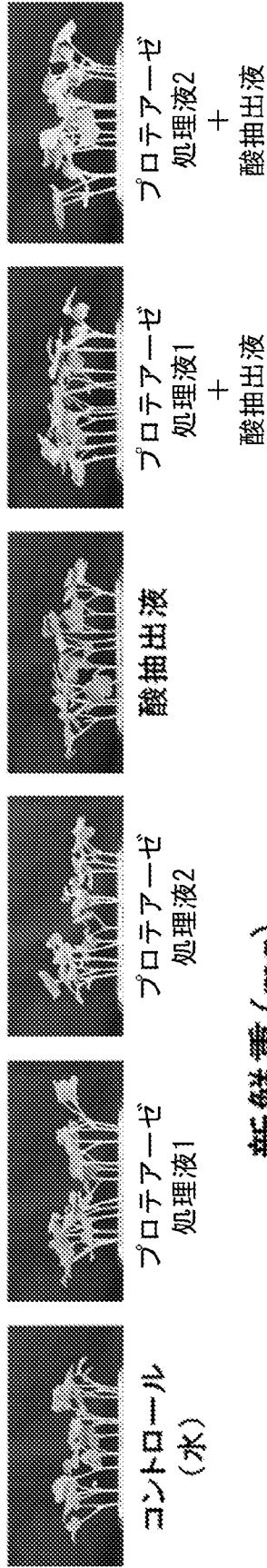
[図7]

図 7



[図8]

酸抽出液と骨溶解液は500倍希釈を使用



新鮮重 (mg)

n = 8

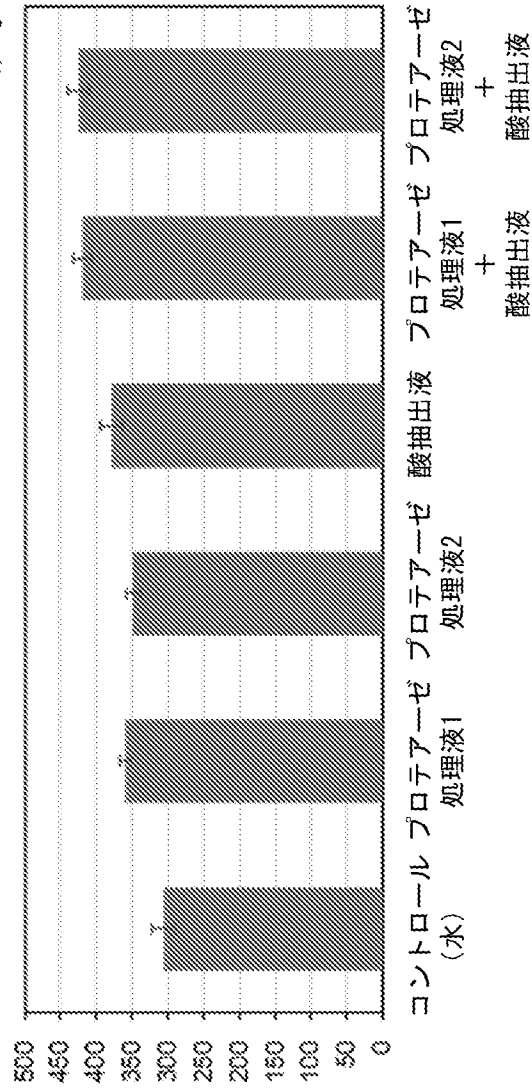
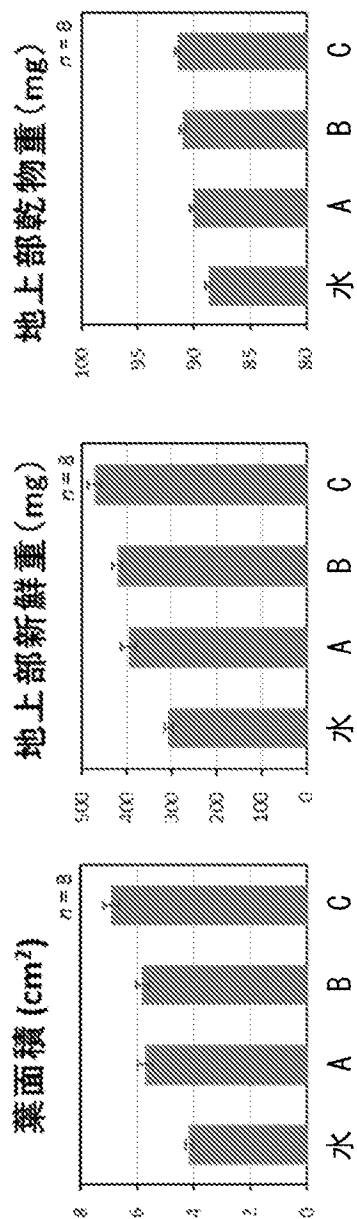
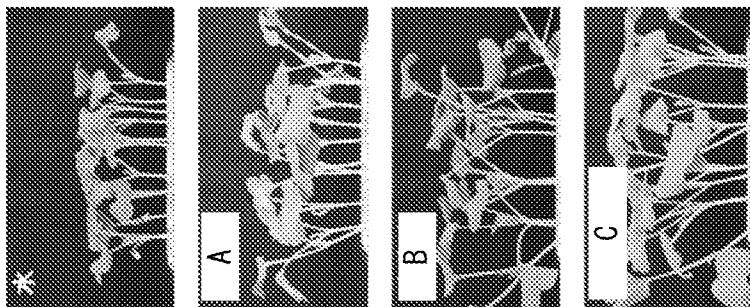


図9

図9

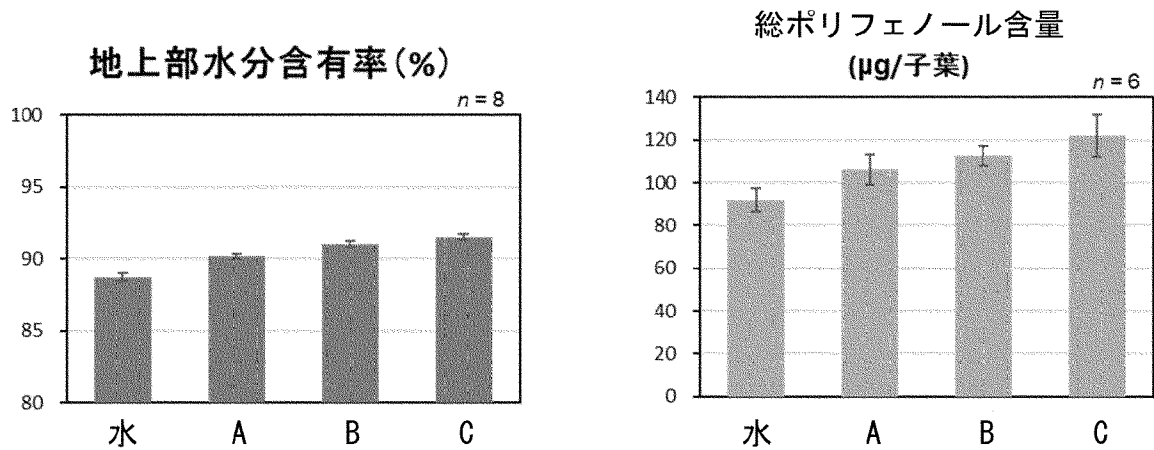
コントロール【水】  
 プロテアゼ処理液＋酸抽出液【A】  
 市販培養液【B】  
 プロテアゼ処理液＋酸抽出液＋市販培養液【C】



[図10]

図 10

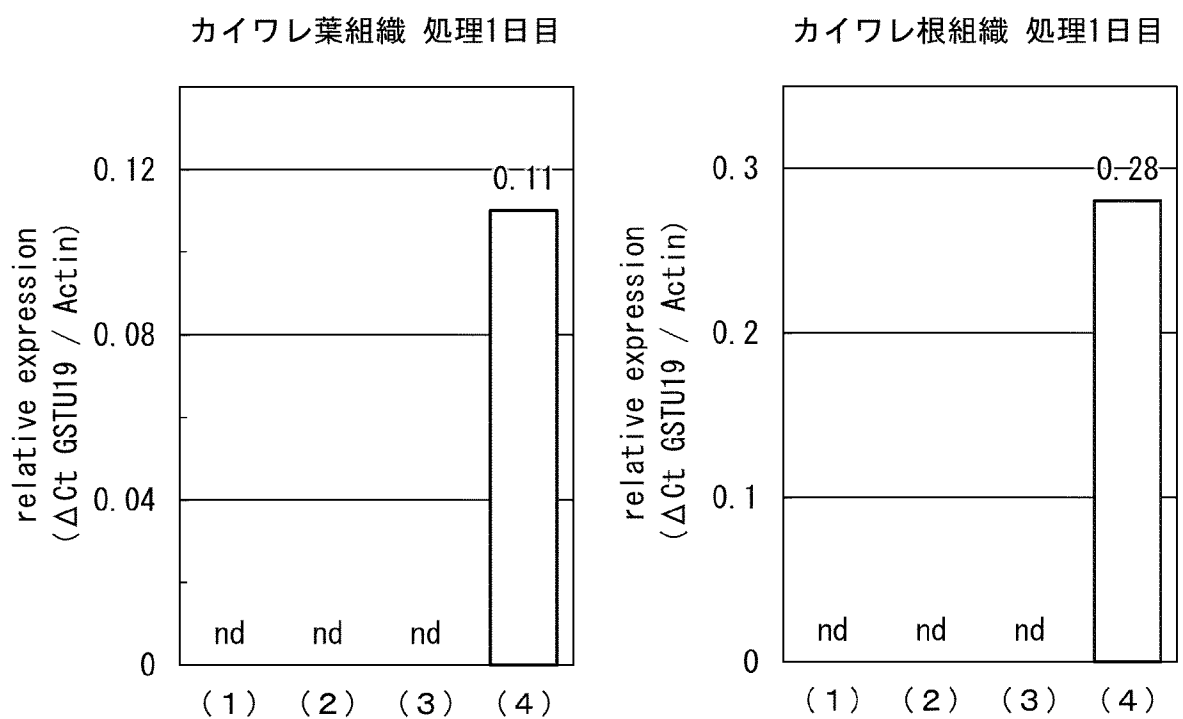
コントロール【水】  
 プロテアーゼ処理液+酸抽出液【A】  
 市販培養液【B】  
 プロテアーゼ処理液+酸抽出液+市販培養液【C】



[図11]

図 11

(1) 水  
 (2) 骨可溶化液A  
 (3) 市販液体肥料  
 (4) 市販液体肥料+骨可溶化液A



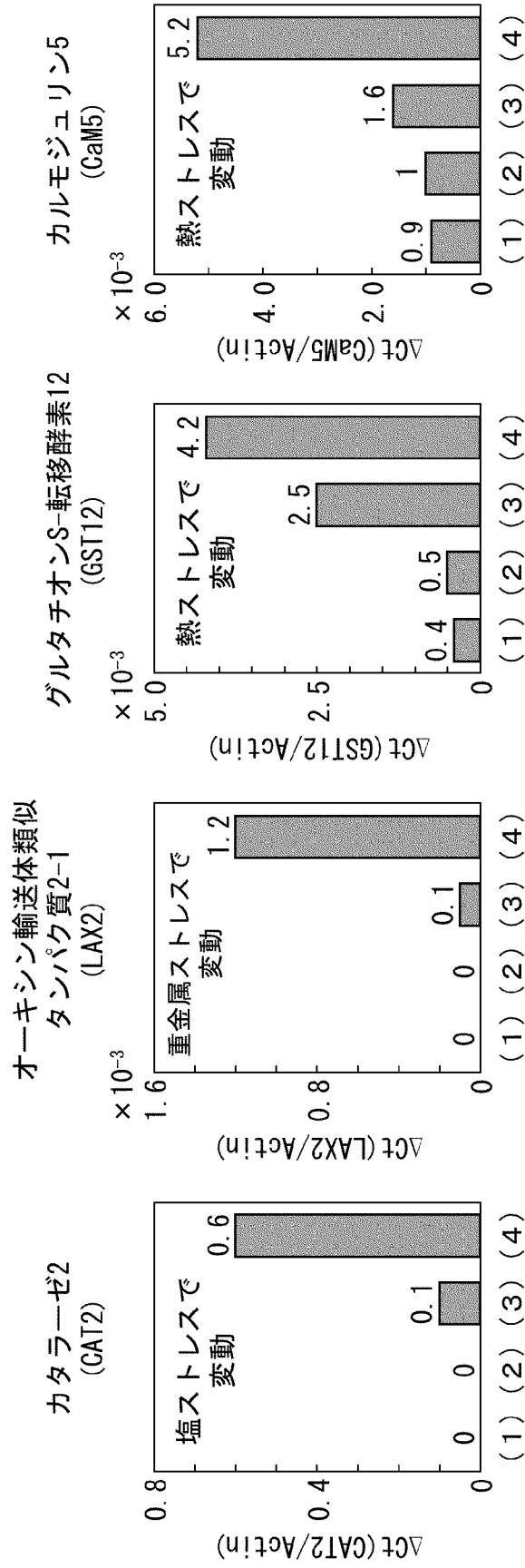
[図12]

図 12

- (1) 水
- (2) 骨可溶化液A
- (3) 市販液体肥料
- (4) 市販液体肥料 + 骨可溶化液A

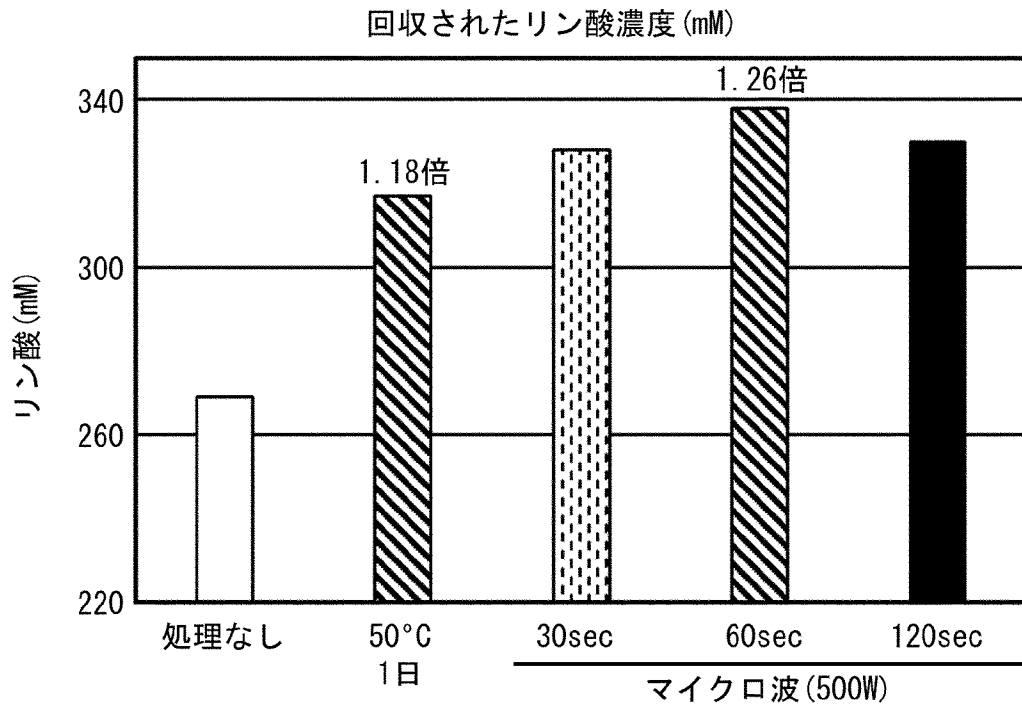
【カイワレダイコン葉(処理1日目)】

(レファレンス遺伝子: Actin)



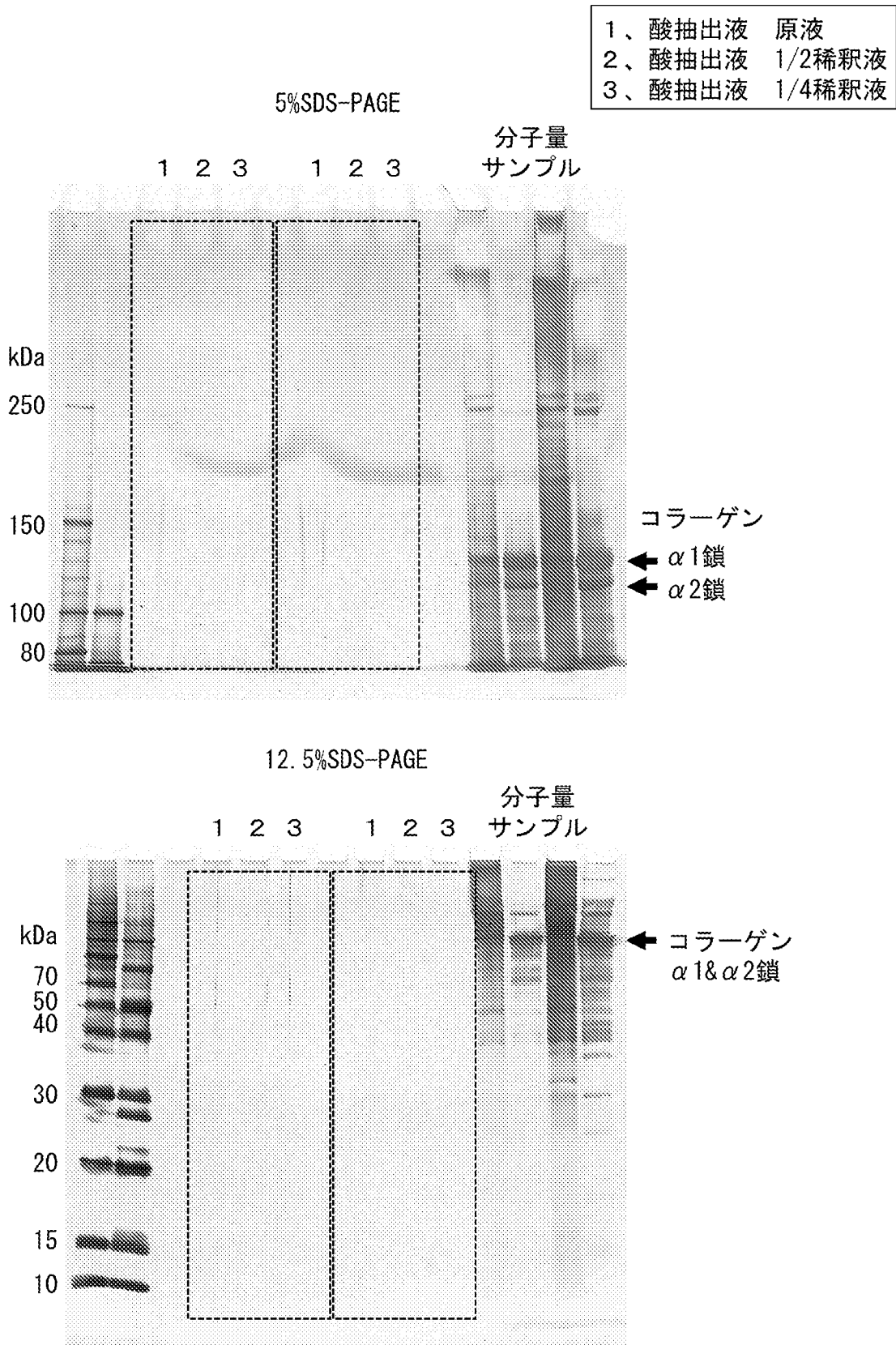
[図13]

図 13



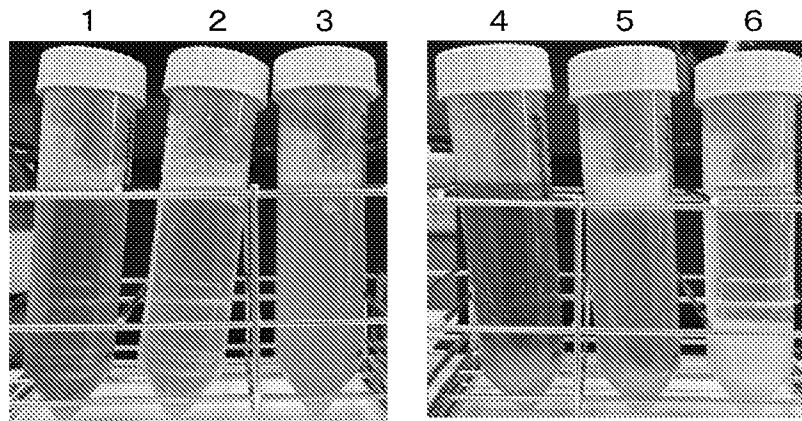
[図14]

図 14



[図15]

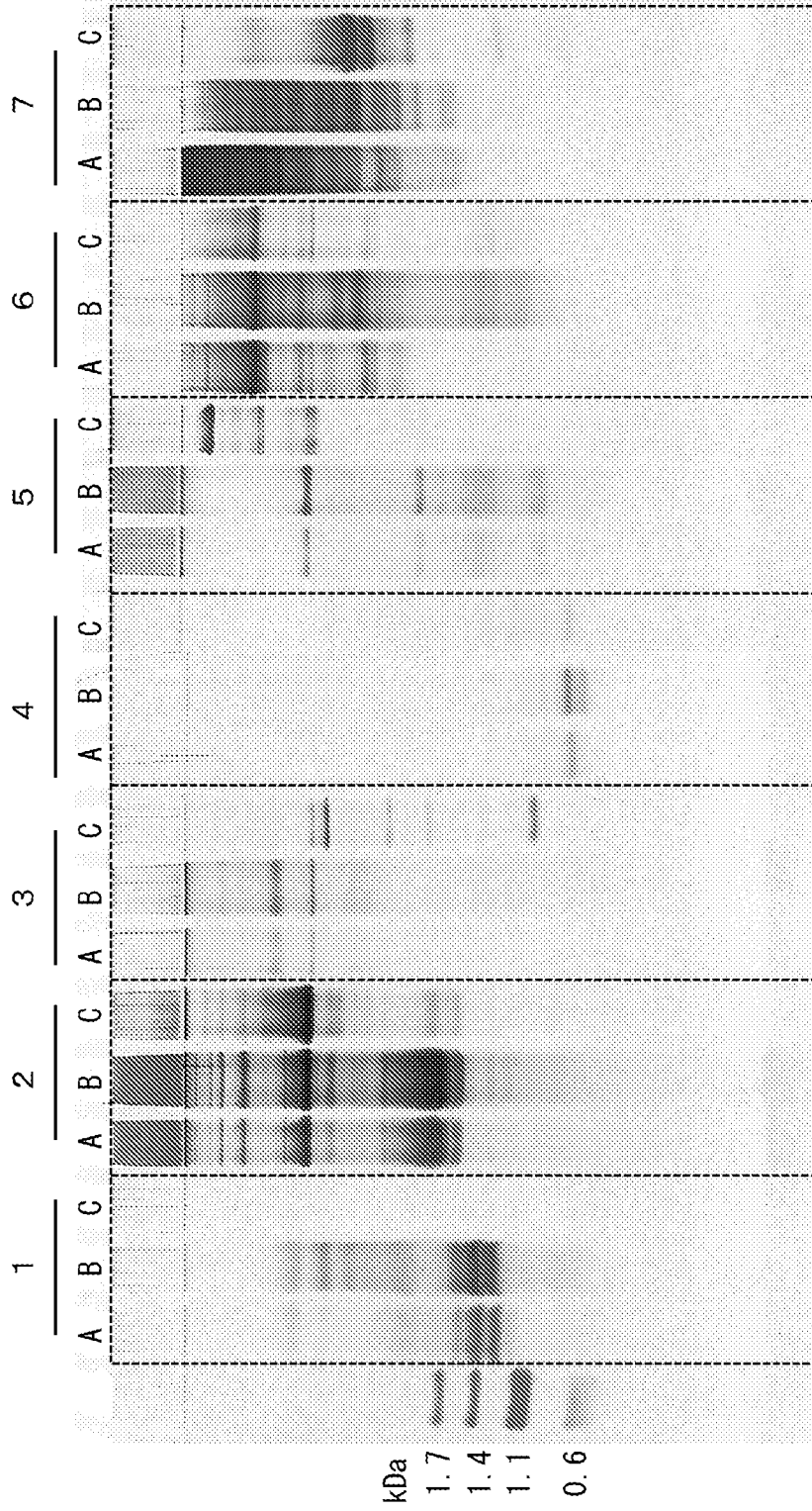
図 15



- 1、アクチニジン
- 2、ペプシン
- 3、ニューラーゼF3G
- 4、プロレザーFG-F
- 5、プロテアーゼP「アマノ」3G
- 6、プロテアーゼM「アマノ」SD

[図16]

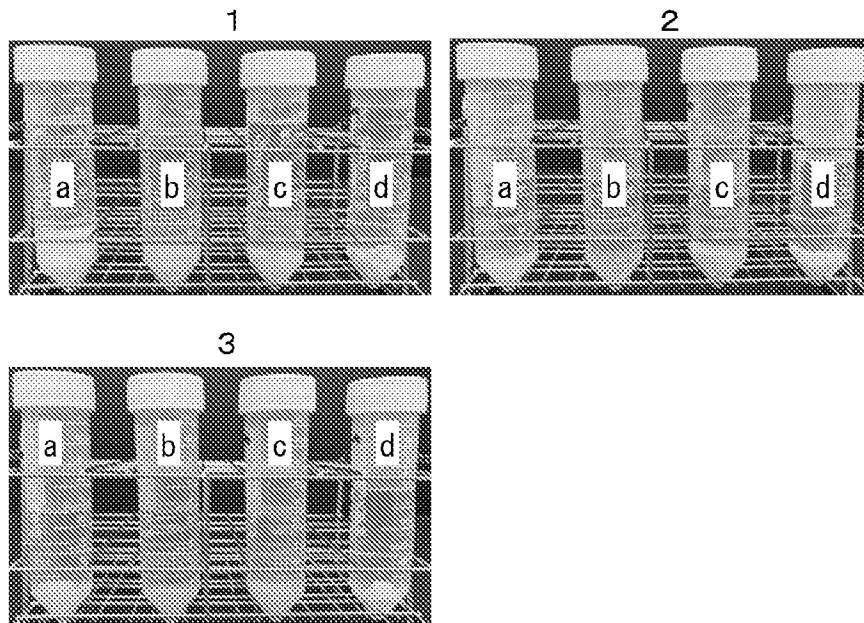
図 16



- |    |           |            |
|----|-----------|------------|
| 1、 | ペプシン      | A : 1/10稀釈 |
| 2、 | ペプチダーゼR   | B : 1/5稀釈  |
| 3、 | P「アマノ」3G  | C : 酵素のみ   |
| 4、 | プロレザーFG-F |            |
| 5、 | ニューラーゼF3G |            |
| 6、 | M「アマノ」SD  |            |
| 7、 | アクチニジン    |            |

[図17]

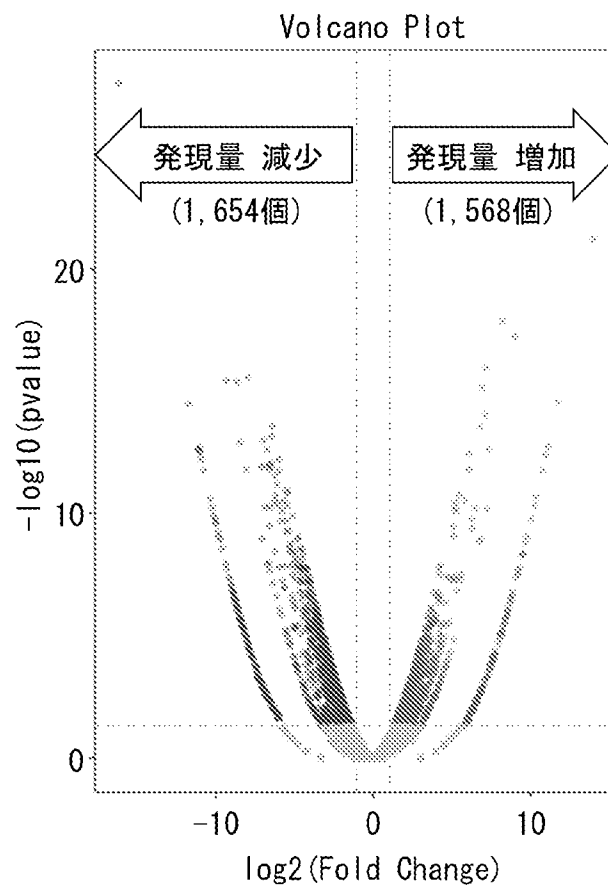
図 17



a HCl	×	1、アクチニダイン
b HNO <sub>3</sub>		2、ペプシン
c HCOOH		3、ニューラーゼF3G
d H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		

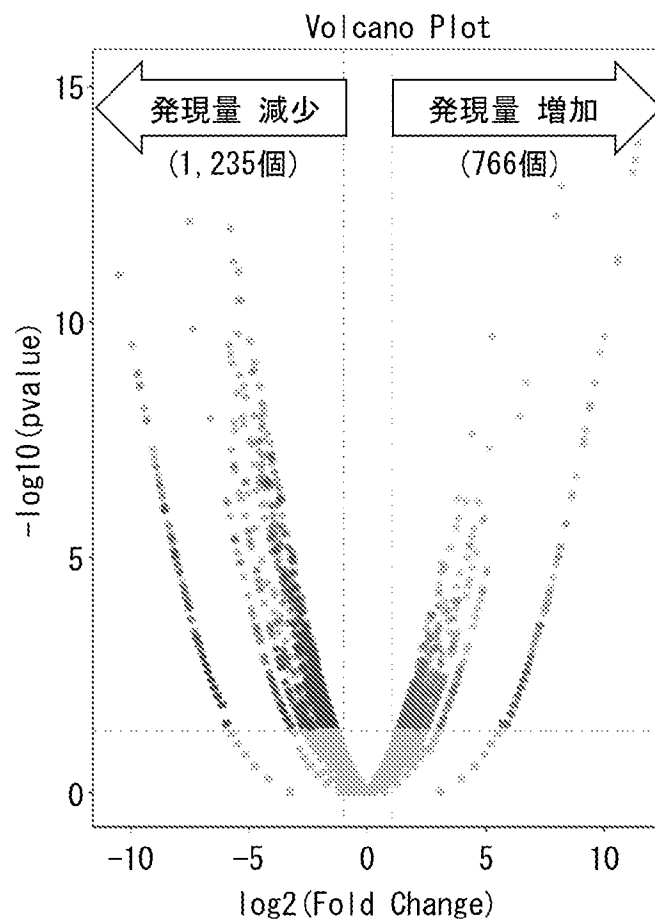
[図18]

図 18

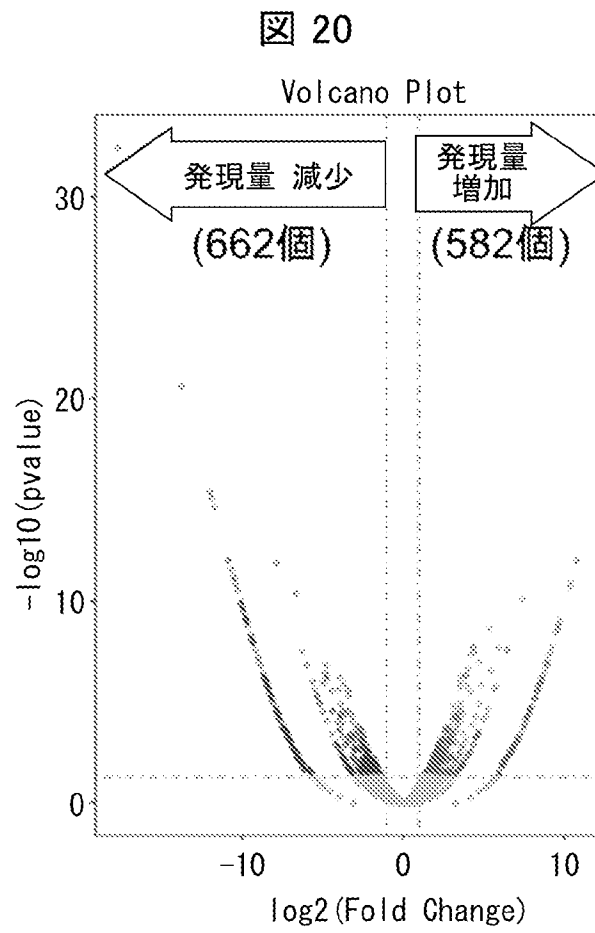


[図19]

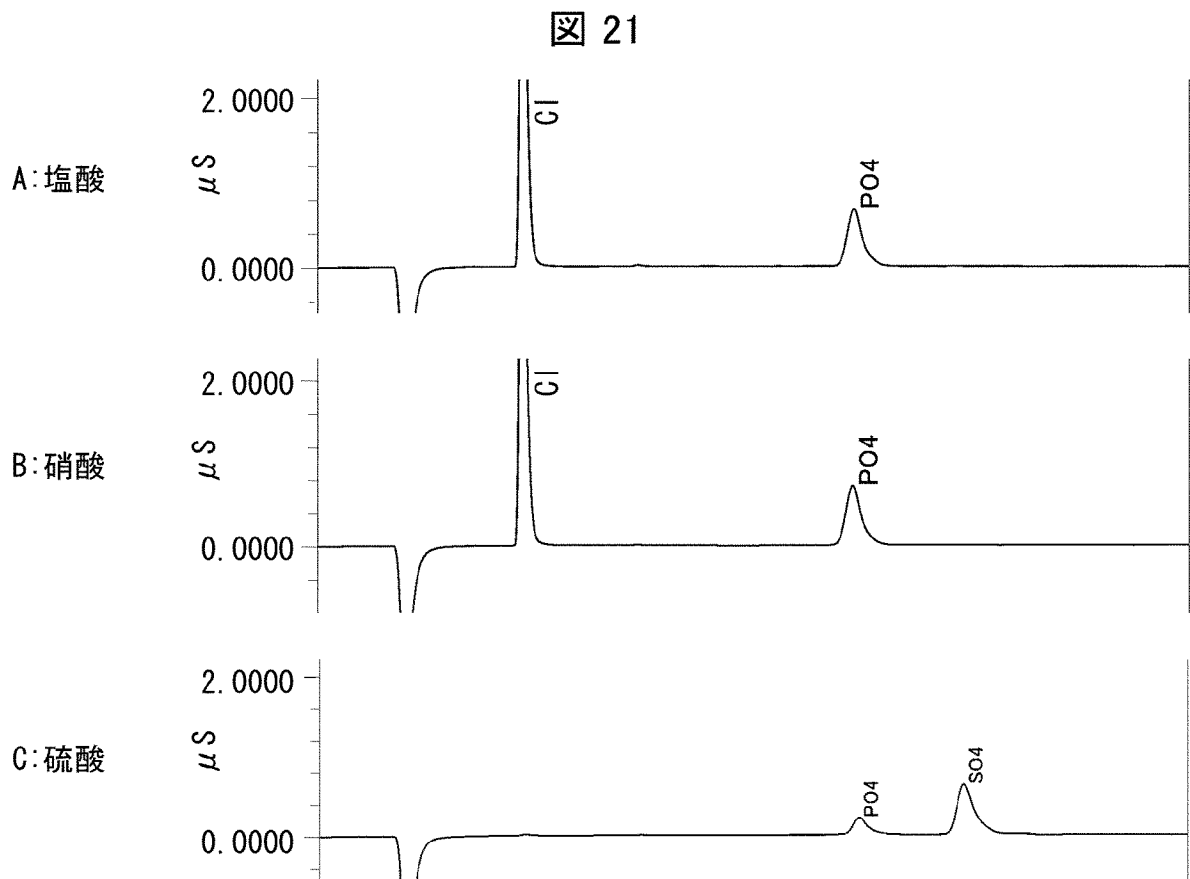
図 19



[図20]

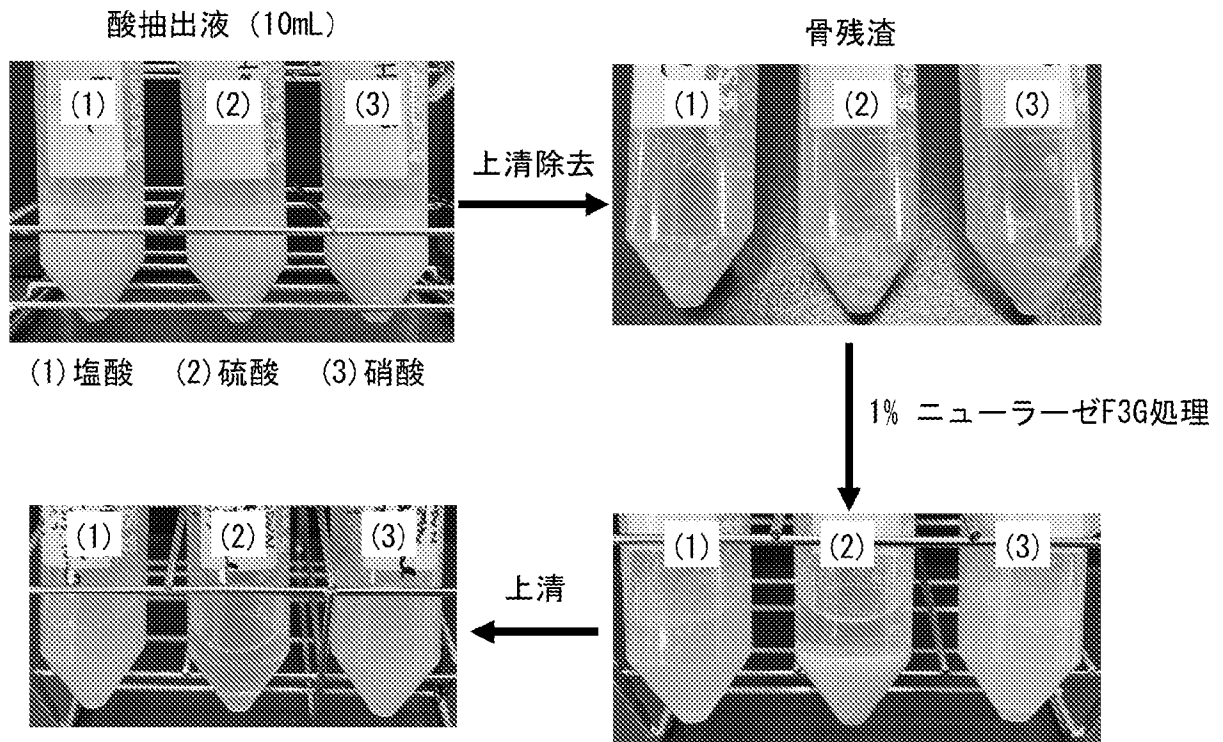


[図21]



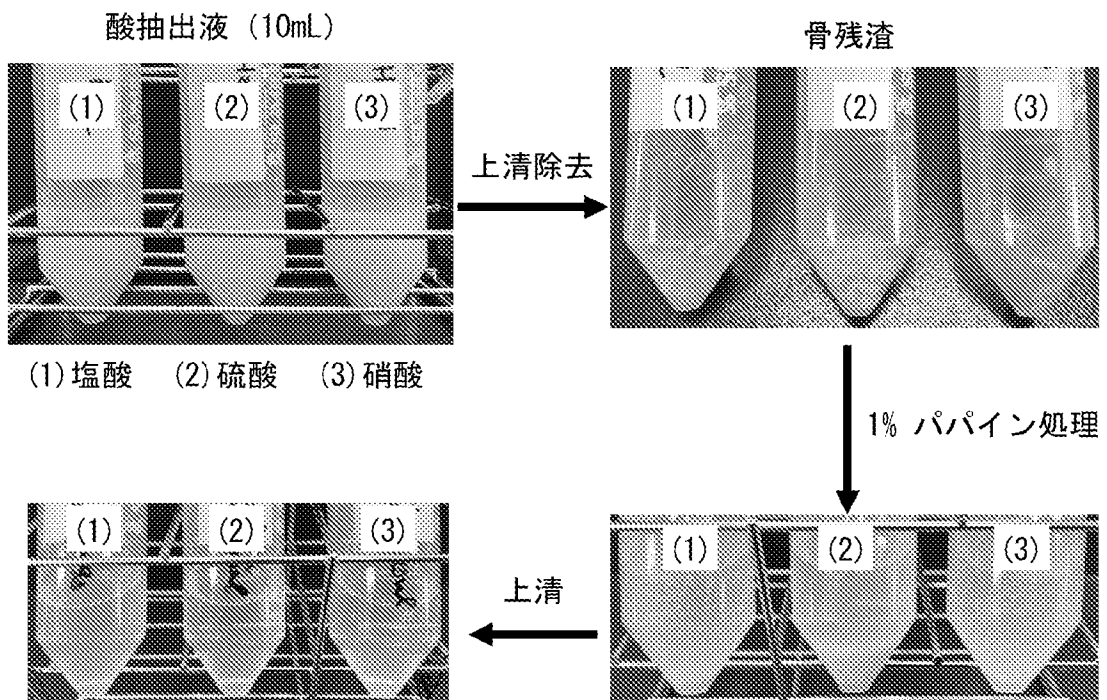
[図22]

図 22



[図23]

図 23



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/007245

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C05F 1/00</i> (2006.01); <i>C05G 5/20</i> (2020.01) FI: C05F1/00; C05G5/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C01B~G; A01G; C01B25/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 8-91976 A (ARAFUKA, Hiroto) 09 April 1996 (1996-04-09) claims 1, 4, 6, examples	1, 3, 5-7, 10-11
A	JP 2000-506367 A (AUTOIMMUNE, INC.) 30 May 2000 (2000-05-30) claims 1-10	1-15
A	CN 111170767 A (BINZHOU CITY JINGYANG BIO-FERTILIZER CO., LTD.) 19 May 2020 (2020-05-19) claims 1, 3	1-15
A	JP 2013-116825 A (AJINOMOTO CO., INC.) 13 June 2013 (2013-06-13) claim 1, paragraphs [0001]-[0004]	1-15
A	JP 2001-329000 A (UNIV. NIHON) 27 November 2001 (2001-11-27) claims 1, 4	1-15
A	JP 9-192481 A (TOYO DENKA KOGYO KK) 29 July 1997 (1997-07-29) claim 4	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>10 April 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>25 April 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/007245**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 8-91976 A	09 April 1996	(Family: none)	
JP 2000-506367 A	30 May 2000	US 5840848 A claims 1-10 WO 1997/025435 A1 EP 871763 A1	
CN 111170767 A	19 May 2020	(Family: none)	
JP 2013-116825 A	13 June 2013	WO 2011/115302 A1 claim 1, paragraphs [0001]-[0004]	
JP 2001-329000 A	27 November 2001	(Family: none)	
JP 9-192481 A	29 July 1997	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C05F 1/00(2006.01)i; C05G 5/20(2020.01)i FI: C05F1/00; C05G5/20		
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）） C01B~G; A01G; C01B25/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2023年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2023年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2023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）		
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	JP 8-91976 A (荒深 博敏) 09.04.1996 (1996 - 04 - 09) 請求項1, 4, 6, 実施例	1, 3, 5-7, 10-11
A	JP 2000-506367 A (オートイミュン インク) 30.05.2000 (2000 - 05 - 30) 請求項1-10	1-15
A	CN 111170767 A (BINZHOU CITY JINGYANG BIO-FERTILIZER CO., LTD.) 19.05.2020 (2020 - 05 - 19) 請求項1, 3	1-15
A	JP 2013-116825 A (味の素株式会社) 13.06.2013 (2013 - 06 - 13) 請求項1, [0001]-[0004]	1-15
A	JP 2001-329000 A (学校法人 日本大学) 27.11.2001 (2001 - 11 - 27) 請求項1, 4	1-15
A	JP 9-192481 A (東洋電化工業株式会社) 29.07.1997 (1997 - 07 - 29) 請求項4	1-15
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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抵触するものではなく、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	
10.04.2023	25.04.2023	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  本多 仁 4V 1971  電話番号 03-3581-1101 内線 3483	

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式  
     紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
     紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/007245

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 8-91976 A	09.04.1996	(ファミリーなし)	
JP 2000-506367 A	30.05.2000	US 5840848 A 請求項1-10	
		WO 1997/025435 A1	
		EP 871763 A1	
CN 111170767 A	19.05.2020	(ファミリーなし)	
JP 2013-116825 A	13.06.2013	WO 2011/115302 A1 請求項1, [0001]-[0004]	
JP 2001-329000 A	27.11.2001	(ファミリーなし)	
JP 9-192481 A	29.07.1997	(ファミリーなし)	