

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-234794

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)10月20日

C 12 P 41/00

8412-4B\*

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 L-カルニチンの製造方法

⑯ 特 願 昭60-77926

⑰ 出 願 昭60(1985)4月11日

⑱ 発 明 者	河 村	昌 男	明石市東朝霧丘18-10
⑱ 発 明 者	安 久 津	成 一	加古川市山手2-24-15
⑱ 発 明 者	福 田	博 介	姫路市飾磨区今在家1044
⑱ 発 明 者	畑	啓 之	加古川市上荘町国包189-1
⑱ 発 明 者	森 下	剛 志	姫路市飾磨区今在家1044
⑱ 発 明 者	叶	健 児	姫路市飾磨区今在家1044
⑱ 発 明 者	西 森	弘 訓	姫路市飾磨区今在家1044
⑲ 出 願 人	製鉄化学工業株式会社		兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

L-カルニチンの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) クロトノベタインを不斉的に水和して、L-カルニチンを生成する能力を有する微生物を、カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質存在下嫌気条件下で培養することにより、カルニチンヒドロリアーゼを誘導せしめ、該酵素の作用によりクロトノベタインを不斉的に水和して光学活性L-カルニチンを生成させることを特徴とするL-カルニチンの製造方法。

(2) カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質がD-L-カルニチンである特許請求の範囲(1)記載の方法。ただし、エシエリヒア (Escherichia) 属、サルモネラ (Salmonella) 属、プロテウス (Proteus) 属の微生物は含まない。

(3) カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質がD-カルニチン、L-カルニチン、クロトノベタイン、

D-L-カルニチンニトリル、クロトン酸、アリルアルコール、アクロレイン、アクリロニトリル、アクリルアミド、アクリル酸よりなる群より選ばれた少なくとも1つの化合物である特許請求の範囲(1)記載の方法。ただし、D-カルニチンとL-カルニチンを同時に加える場合は除く。

(4) 微生物がエシエリヒア (Escherichia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、エアロバクター (Aerobacter) 属、エルビニア (Erwinia) 属、セラチア (Serratia) 属、プロテウス (Proteus) 属、サルモネラ (Salmonella) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、アхроモバクター (Achromobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アゾトバクター (Azotobacter) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、ア

ルスロバクター (Arthrobacter) 属, プレビバクテリウム (Brevibacterium) 属, セルロモナス (Cellulomonas) 属, ハフニア (Hafnia) 属, アセトバクター (Acetobacter) 属, クロモバクテリウム (Chromobacterium) 属, キサントモナス (Xanthomonas) 属, ビブリオ (Vibrio) 属, エアロモナス (Aeromonas) 属, プロタミノバクター (Protaminobacter) 属, アシネトバクター (Acinetobacter) 属, シトロバクター (Citrobacter) 属, バクテリウム (Bacterium) 属, クロストリジウム (Clostridium) 属, リゾビウム (Rhizobium) 属, グルコノバクター (Gluconobacter) 属, ストレプトコッカス (Streptococcus) 属, ペディオコッカス (Pediococcus) 属, ロイコノストック (Leuconostoc) 属, ラクトバシラス (Lactobacillus) 属, プロピオニバクテリウム (Propionibacterium) 属, エアロコッカス (Aerococcus) 属, マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属, ノカルディア (Nocardia) 属, ストレプトマイセス (Streptomyces) 属 よりなる群より選ばれた属に属する少

数種の菌体を用いて、安価に入手できるクロトノベタインより有利にL-カルニチンを生産する点にある。微生物菌体を破碎して得られる細胞抽出液、更に公知の方法を用いて細胞抽出液より得られる部分精製当該酵素、精製当該酵素の利用も有用である。

カルニチン ( $\beta$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -トリメチル- $\alpha$ -アミノ酪酸) にはD体およびL体の2種類の立体異性体が存在することはよく知られている。L-カルニチンは、通常生体内に存在し、活性化した長鎖の遊離脂肪酸をミトコンドリア膜から通過させるキャリアーとしての働きを有する。

カルニチンは左旋性のL-カルニチンのみが天然物の形態であるにもかかわらず、ラセミ体のカルニチンが食欲増進剤などに用いられてきた。

しかし最近、少なくともいくつかの治療学的使用に対しては、L-カルニチンのみを使用する方が効果的であることが明らかにされ、その重要性

なくとも一種の微生物である特許請求の範囲(1)記載の方法。

(7) カルニチンヒドロリアーゼとして、微生物菌体あるいは、その処理物を用いる特許請求の範囲(1)記載の方法。

(8) 嫌気条件下での培養時に微生物の産生する電子を受容し得る化合物を添加する特許請求の範囲(1)記載の方法。

(9) 電子を受容し得る化合物が $\text{KNO}_3$ または、 $\text{NaNO}_3$ である特許請求の範囲(8)記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### [発明の目的]

本発明は、クロトノベタインに微生物由来の酵素(カルニチンヒドロリアーゼ)を作用させることにより、L-カルニチンを酵素反応的に製造する方法に関する。

#### (産業上の利用分野)

本発明の新規性は、微生物をD-L-カルニチン、クロトノベタインなどのカルニチンヒドロリアー

に対する関心が高まりつつある。

実際、心血管系での急性ならびに慢性の心筋虚血、狭心症、心臓性の不整脈または、心不全の治療に用いられている。

#### (従来の技術)

光学活性L-カルニチンの製法としては、例えば下記の方法が知られている。

(1) 化学的な合成法によって得られたラセミ体のカルニチンを光学分割する方法。その光学分割の方法は、前駆体であるD-L-カルニチンニトリルにN-アセチル-D-グルタミン酸または、N-アセチル-L-グルタミン酸を分割剤として加え塩を生成させ、溶解度の差を利用して分割し、次いでこれを加水分解して、L-およびD-カルニチンクロライドとなす(特公昭43-8248)、が代表的なものである。

(2) 3-デヒドロカルニチンを微生物の酵素(カルニチンデヒドロゲナーゼ)の作用で不斉還元して、L-カルニチンを得る方法。

(米特許第4,221,869号)

(3) アープロベタインに微生物の酵素(ヒドロキシラーゼ)を反応させることにより、L-カルニチンを製造する方法。(特開昭57-39791)

(4) 好氣的培養法、あるいは好氣的培養法により得られる菌体を用いて、クロトノベタインよりL-カルニチンを製造する方法。(特開昭59-183694, 特開昭59-192095)

しかしながら、(1)は光学分割剤として用いるN-アセチル-D-グルタミン酸が高価であり、操作が複雑で収率が悪い。

(2)は、原料の3-デオヒドロカルニチンが不安定で取扱が困難な上、補酵素として高価なNADHあるいはNADを必要とする。

(3)は、原料となるアープロベタインが高価であるなどの理由で以上あげたいずれの方法も工業的製造法としては有利な方法とは云えない。

また(4)は、本発明者らの追試によれば好氣的に培養した菌体においては、カルニチンヒドロリア

ーゼ誘導物質存在下での培養にもかかわらず、カルニチンヒドロリアーゼ活性を取得し得ない菌種が多数存在するし、カルニチンヒドロリアーゼ活性を取得した菌株についてもその活性が弱い場合が多い。

そこで本発明者らは、エピクロルヒドリンより安価に製造できるクロトノベタインに着目し、L-カルニチンの新規製造法の開発を目的として鋭意検討を行なった結果、DL-カルニチン、L-カルニチン、クロトノベタインなどのカルニチンヒドロリアーゼ誘導物質存在下、微生物を嫌氣的に培養すると多数の菌種の菌体において強いカルニチンヒドロリアーゼ活性が誘導されることを見出し、本発明に至った。

本発明の実施態様の一例を説明すると、菌体取得のためには例えば、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01%, ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5%, DL-カルニチン 0.3% からなる液体培地 20 ml に、斜面培

地からセラチア マルセンサス(IFO3736)の菌種を1白金耳量接種し、30℃で2日間、嫌氣的に培養した。このようにして得られた培養液より遠心分離により菌体を得た。得られた菌体は5 mlの生理食塩水で洗浄後反応に供した。反応は得られた菌体をクロトノベタイン1.5%(105 mM)を含む0.1 M リン酸緩衝液(pH6)中に添加した後、30℃で18時間振盪することにより行なった。得られた反応液は遠心分離により菌体を取り除いた後、80℃で5分間加熱処理を行ない、D. J. Pearsonらの酵素法(Method in Enzymology 14, 612 (1969))で分析すると53mMのL-カルニチンが生成していた。

本発明において用いるクロトノベタインをL-カルニチンに変換せしめる能力を有する微生物としては、例えば エシエリヒア コリ IFO3301, エンテロバクター クロアカエ IFO3320, クレブシエラ ~~ニュー~~モニアエ IFO3512, エアロバクター クロアカエ IAM1134, エルビニア アロイデア

エ IFO12380, セラチア マルセンサス IFO3736, プロテウス ブルガリス IFO3851, サルモネラ チフィムリウム IFO12529, アルカリゲネス ファエカリス ATCC8750, フラボバクテリウム エステロアロマティカム IFO3751, アクロモバクター パルプラス IFO13181, パシラス スファエリカム IFO3526, アグロバクテリウム ラジオバクター IFO12664, アゾトバクター ビネランディ IFO12018, ミクロコッカス ロゼウス IFO3768, コリネバクテリウム ラサユ IFO12161, スタフィロコッカス オーレウス IFO3060, シュードモナス マルギナリス IFO3925, アルスロバクター シンプレックス IFO12069, プレバクテリウム リネンス IFO12141, セルロモナス フラビゲナ IFO3748, ハフニア アルベイ IFO3731, アセトバクター オルレアネンス IFO3259, クロモバクテリウム イオディナム IFO3558, キサントモナス キャンベストリス IFO13303, ビブリオ パラハエモリティカス IFO12711, クレブシエラ ニューモニ

アエ IFO3319, エアロモナス ハイドロフィラ IFO12978, プロタミノバクター アルボフラバス IFO3707, アシネトバクター カルコアセティカス IFO13006, シトロバクター インターメデウス IFO13544, バクテリウム グラシル IFO3231, クロストリジウム プチリカム IFO3858, リゾビウム ジャボニカム IFO13338, グルコノバクター セリナス IFO3264, ストレプトコッカス ファエカリス IFO3128, ペディオコッカス ペントサシク ス IFO3893, ロイコノストック メセンテロイデス IFO3426, ラクトバシラス アシドフィラス IFO3205, プロビオニバクテリウム テクニカム IFO12428, エアロコッカス ビリダンス IFO12317, マイコバクテリウム アビウム IFO3082, ノカルディア アステロイデス IFO3423, ストレプトマイセス アルプス IFO13014, 等がある。

菌の培養条件は使用する菌株により多少異なるが、一般的にいえば炭素源として、グルコース、フラクトース、シュークロース、マルトースなど

範囲である。

通常8時間~10日間の培養で菌を生育させる。

このようにして得られた嫌気培養液から通常の方法により取り出した菌体は、クロトノベタインを含む溶液と接触せしめることによって、L-カルニチンを生産することが可能である。反応のpHは通常2~10が、好ましくは5~7がよい結果を与える。反応の温度は、通常10~60℃が、好ましくは25~40℃である。最初に添加するクロトノベタイン量は、通常0.1~10%であるが、好ましくは1~5%である。クロトノベタインを分割添加するとよい結果を与えることもある。また、反応時にグルコース、シュークロース、マルトース、グリセロール、酵母エキスなどを加えるとよい結果を与えることがある。反応系に亜鉛、カリウム、カルシウム、クロム、コバルト、ストロンチウム、鉄、銅、ナトリウム、ニッケル、バリウム、マグネシウム、マンガン、モリブデン、リチウム化合物を添加すると反応収率が

の糖質やグリセロールなど、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸カリウム、尿素、アミノ酸、ペプトン、カザミノ酸、コーンステイーブリカー、ふすま、米ぬか、酵母エキスなど、無機塩類として硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウムなど、他の栄養源として麦芽エキス、肉エキス、ファーマノディアなどを含む培地が用いられるが、これらに限定されるものではない。更にこの培地に通常は、0.01~2%のDL-カルニチン、L-カルニチン、クロトノベタインなどのカルニチンヒドロリアーゼ誘導物質を添加するが、カルニチンヒドロリアーゼ活性が得られる濃度であれば、これに限定されるものではない。

この培地に菌株を接種し、嫌氣的に培養する。培養に適した温度は、通常は15~60℃であるが、更に好ましくは25~40℃である。培地の初発pHは、通常は3~9、好ましくは5~8の

向上することが多い。

反応の酵素源としては、菌体のほかに菌体より公知の処理方法により得られたカルニチンヒドロリアーゼ活性画分も利用できる。例えば、公知の方法で得た固定菌体あるいは、固定化酵素も有効である。固定化に用いる担体としては、カラギーナン、アルギン酸、寒天、コラーゲン、ゼラチン、ペクチン、などの天然化合物あるいはまたポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、エチレンアクリル酸共重合体、光架橋性樹脂などの合成高分子が利用できる。また、acetone powderやdry cellに処理した菌体を用いたり、界面活性剤を添加する方法がよい結果を与える場合もある。変異処理をほどこした菌体であっても、カルニチンヒドロリアーゼ活性を有する限り本発明に含まれる。

以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明する。

#### 実施例1

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%, ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5%, カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質(DL-カルニチンまたはクロトノベタイン) 0.3%からなる液体培地 20 mlに、斜面培地から第1表に示す菌株の1白金耳量を接種し、30℃で2日間嫌氣的に培養した。このようにして得られた培養液より遠心分離により菌体を得た。得られた菌体を5 mlの生理食塩水で洗浄後、クロトノベタイン1.5% (105 mM)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6)中に添加した後、30℃で18時間振盪することにより反応を行なった。得られた反応液は、遠心分離により菌体を取り除いた後、80℃で5分間加熱処理を行ない分析した。L-カルニチンの生成量を第1表に示した。

第 1 表

菌 名	カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質	
	DL-カルニチン	クロトノベタイン対照
アクロモバクター バルブラス IFO13181	3.0 mM	2.6 mM
バセラス スフアエリカ IFO3526	2.0	1.9
アグロバクテリウム ラジノバクター IFO12664	2.1	1.7
アノトバクター ビネランディ IFO12018	1.6	2.9
ミクロコッカス ロゼウス IFO3768	1.8	1.9
コリネバクテリウム ラサユ IFO12161	1.5	1.4
スタフィロコッカス オレウス IFO3060	2.3	2.5
シュードモナス マルギナリス IFO3925	1.5	1.0
アルスロバクター シンプレックス IFO12069	2.1	1.7
プレバクテリウム リネンス IFO12141	2.6	2.1
セルロモナス フラビグナ IFO3748	2.0	2.4

菌 名	カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質	
	DL-カルニチン	クロトノベタイン対照
ハフニア アルベイ IFO3731	3.4 mM	3.9 mM
アセトバクター オルレアネンス IFO3259	2.4	2.6
クロモバクテリウム イオディナム IFO3558	1.8	1.9
キサントモナス キャンベストリス IFO13303	1.3	1.4
ビブリオ パラハエモリチイカス IFO12711	7	1.4
クレブシエラ ニューモニアエ IFO3319	2.1	2.6
エアロモナス ハイドロフィラ IFO12978	2.1	2.0
プロトアミノバクター アルボフラバ IFO3707	1.4	1.1
アシネトバクター カルコアセチイカス IFO13006	1.4	1.9
シトロバクター インターメディア IFO13539	4.2	4.5
バクテリウム グラシル IFO3231	2.0	2.8

菌 名	カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質	
	DL-カルニチン	クロトノベタイン対照
エシエリビア コリ IFO3301	4.1 mM	5.3 mM
エンテロバクター クロアカエ IFO3320	4.2	5.1
クレブシエラ ニューモニアエ IFO3512	3.6	3.7
エテロバクター クロアカエ IAM1134	4.5	5.1
エルビニア アロイデア IFO12380	3.5	3.7
セラチア マルセンサス IFO3736	5.1	5.3
プロテウス フルガリス IFO3851	5.2	5.1
カルモネラ チフィリウス IFO12529	4.2	4.6
アルカリゲネス フラエカリス ATCC8750	2.9	2.5
フラボバクテリウム エステロアロマティカム IFO3751	2.1	2.7

菌名	カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質	
	DL-カルニチン	クロトノベタイン
クロストリジウム プチリカム IFO3858	1.1 mM	1.1 mM
リゾビウム ジャポニカム IFO13338	1.1	1.2
グルコンバクター セリナス IFO3264	1.9	1.2
ストレプトコッカス フォエカリス IFO3128	1.2	1.0
ペディオコッカス ベントザシクス IFO3893	1.5	1.8
ロイコストラック メセンテロイデス IFO3426	1.6	1.8
ラクトバシラス アシドフィラス IFO3205	1.1	1.5
プロビオニバクテリウム テクニカム IFO12428	1.1	1.0
エフロコッカス ビリダニス IFO12317	2.2	1.8
マイコバクテリウム アビカム IFO3062	1.1	1.6
ノカルディア アステロイデス IFO3423	1.2	1.6
ストレプトマイセス アルプス IFO13014	1.4	1.7

なお、対照として好氣的に培養して得られた菌体を用いて反応を行なったときの結果を第1表中に併記した。条件は、グリセロール 2%、硫酸アンモニウム 0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg/dl、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 mg/dl、酵母エキス 1%、ペプトン 1%、マルトエキス 0.5%、クロトノベタイン・硫酸塩 0.3%、炭酸カルシウム(別殺菌) 4% (pH 7.0) よりなる 5 ml の培地に第1表に示す菌株を接種後 16 時間、30℃で振盪培養した。この培養液より菌体を遠心分離により採取し、培養液と同量の生理食塩水で一回洗浄し、菌体を集めた。この菌体をクロトノベタイン塩酸塩 1.5% (8.36 mM) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 5 ml に添加し、30℃に 16 時間保持反応した。この反応液中の L-カルニチン量を上で述べたと同様の方法にて分析し、第1表の対照に示す結果を得た。

実施例 2

反応に加えたクロトノベタインが 3% (210 mM) で、反応時間が 48 時間となった以外は、実施例 1 と同様に行ない、第 2 表の結果を得た。数値は生成した L-カルニチン量を示す。

第 2 表

菌名	カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質	
	DL-カルニチン	クロトノベタイン
エシエリビア コリ IFO3301	100 mM	103 mM
シトロバクター インターメディアス IFO13539	90	96
セラチア マルセンサス IFO3736	104	106
プロテウス ブルガリス IFO3851	102	104

実施例 3

実施例 1 の方法に従って、誘導物質としてクロトノベタインを用い、エシエリビア コリ (IFO3301) を培養し、得られた菌体を生理食塩水で洗浄した。

(無傷細胞)

該菌体を超音波破碎した後、遠心分離により沈殿面分を集め、該沈殿面分を界面活性剤 Triton X-100 で処理した後、遠心分離して無細胞抽出液を調製した。酵素反応は、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、50 mM クロトノベタイン、2 mg/ml タンパク質に相当する上記酵素調製物を用い、温度 37℃、3 時間行なった。

無傷細胞を酵素として用いた反応では、1.5 mM の L-カルニチンを、無細胞抽出液を酵素として用いた反応では、2.1 mM の L-カルニチンをそれぞれ生成した。

実施例 4

培養スケール、反応スケールを共に 100 倍とし、セラチア マルセンサス (IFO3736) を用いた以外は、実施例 2 と同様に行なった。この反応スケールでは、最初に加えるクロトノベタインは 7.5 g (52.4 mmol) であった。反応液より、菌体を遠心分離により除去して得られた上清を、

特開昭61-234794 (7)

Dowex カラム長さ 80 cm, 内径 5 cm に通し、カルニチン画分を得た。

このカルニチン画分より亜硫酸水素ナトリウムで処理する方法(特願昭59-187377)を用いてクロトノベタインを除き、3.6 g (22.4 mmol) のL-カルニチンを得た。このL-カルニチンの比旋光度は  $[\alpha]_D^{20} = -30.5^\circ$  (C = 1.0 水溶液) であった。

実施例 5

実施例 1 に示した組成の培地 1 ℓ にエシエリヒア コリ (IFO3301) を接種し、30℃で2日間嫌氣的に培養した。

このようにして得られた培養液より遠心分離により菌体を得た。100 ml の生理食塩水で菌体を洗浄後、1 g を用いてカラギーナンに固定化し、10 g の固定化菌体を得た。

クロトノベタイン 200 mM, クエン酸ナトリウム 10 mM, KNO<sub>3</sub> 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, リン酸緩衝液 100 mM を含む

反応液 (pH 6.0) 50 ml に 5 g の固定化酵母を加え、温度 30℃で24時間反応させた。反応終了後、反応液中のL-カルニチンを定量した。

次に固定化菌体を取り出し洗浄後、上記の反応液に再び添加し、反応を繰り返して行った。結果を第3表に示す。

該固定化菌体は、15日以上安定にL-カルニチンを生産することができた。

第 3 表

反応回数	L-カルニチン生成量 (mM)
1	8.8
2	9.2
3	10.1
4	8.3
5	8.5
6	8.4
7	8.1

実施例 6

第4表に示した化合物をカルニチンヒドロリアーゼ誘導物質とし、0.1%濃度で用いた以外は、実施例1と同様に行ない、第4表の結果を得た。用いた菌株は、シトロバクター インターメディアス (IFO13539) である。数値は生じたL-カルニチンの濃度 (mM) を示す。

第 4 表

カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質	生成 L-カルニチン (mM)
D-カルニチン	4.2
L-カルニチン	4.3
クロトノベタイン	4.5
DL-カルニチンニトリル	4.4
クロトン酸	2.2
アリアルアルコール	4.7
アクロレイン	3.0
アクリロニトリル	2.8
アクリルアミド	4.4
アクリル酸	4

第1頁の続き

	識別記号	庁内整理番号
⑤Int. Cl. <sup>4</sup>		
//(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:01)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:185)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:22)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:18)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:425)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:37)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:42)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:05)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:20)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:025)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:07)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:065)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:265)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:15)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:44)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:38)

	識別記号	庁内整理番号
⑤Int. Cl. <sup>4</sup>		
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:06)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:13)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:02)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:64)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:63)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:145)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:41)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:46)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:225)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:365)
(C 12 P		41/00
(C 12 R		1:465)