

(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
2015 年 10 月 1 日(01.10.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/146415 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 1/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/055016
- (22) 国際出願日: 2015 年 2 月 23 日(23.02.2015)
- (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 2014-068397 2014 年 3 月 28 日(28.03.2014) JP
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 東レエンジニアリング株式会社
(TORAY ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030021 東京都中央区日本橋本石町三丁目 3 番 1 6 号 (日本橋室町ビル) Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 津田 雄一郎 (TSUDA, Yuichiro); 〒5200842 滋賀県大津市園山一丁目 1 番 1 号 東レエンジニアリング株式会社内 Shiga (JP). 元井 昌司 (MOTOI, Masashi); 〒5200842 滋賀県大津市園山 1 丁目 1 番 1 号 東レエンジニアリング株式会社内 Shiga (JP). 寺田 豊治 (TERADA, Toyoharu); 〒5202141 滋賀県大津市大江一丁目 1 番 4

5 号 東レエンジニアリング株式会社内 Shiga (JP). 野上 義生 (NOGAMI, Yoshio); 〒5202141 滋賀県大津市大江一丁目 1 番 4 5 号 東レエンジニアリング株式会社内 Shiga (JP). 柴田 和正 (SHIBATA, Kazuma); 〒5200842 滋賀県大津市園山 1 丁目 1 番 1 号 東レエンジニアリング株式会社内 Shiga (JP).

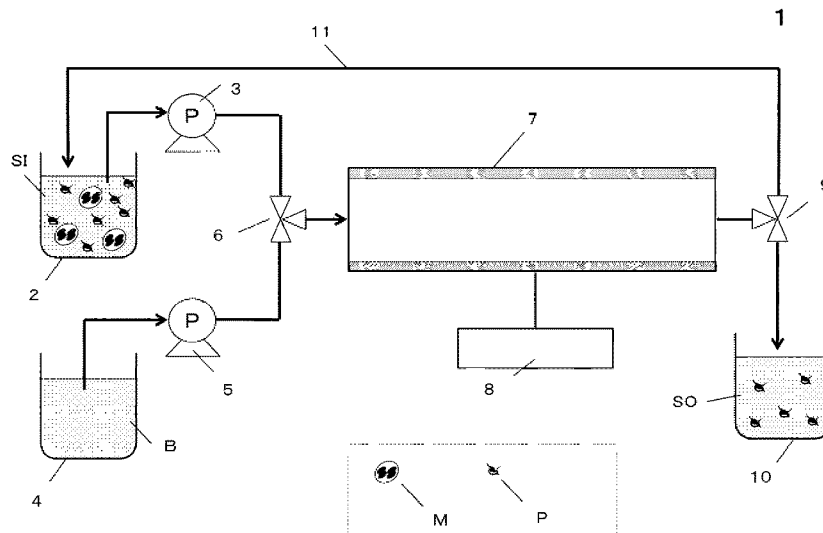
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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,

[続葉有]

(54) Title: SEPARATION APPARATUS AND SEPARATION METHOD

(54) 発明の名称: 分離装置および分離方法



(57) Abstract: Provided are a separation apparatus and a separation method, whereby it becomes possible to remove megakaryocytes highly efficiently from a culture liquid containing platelets and the megakaryocytes in a mixed state, and which do not adversely affect the platelets. Specifically provided are: a separation apparatus for removing megakaryocytes from a culture liquid containing the megakaryocytes and platelets in a mixed state, said separation apparatus being equipped with a culture solution storage vessel in which a culture solution is stored, a culture solution sending means which has a function of sending the culture solution in the culture solution storage vessel, a collected solution storage vessel in which a collected solution, which is produced by removing the megakaryocytes from the culture solution, is collected and stored, and an electric charge supply means; and a separation method.

(57) 要約: 血小板と巨核球が混在する培養液から、巨核球を効率よく取り除き、かつ血小板に悪影響を及ぼさない分離装置および分離方法を提供すること。具体的には、巨核球と血小板が混在する培養液から巨核球を除去する分離装置であって、培養液を送る培養液貯槽と、前記培養液貯槽内の培養液を送液する機能を有する培養液送液手段と、培養液から巨核球を除去した回収液を回収して貯える回収液貯槽と、電荷供給手段とを備える分離装置および分離方法を提供する。



WO 2015/146415 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 分離装置および分離方法

技術分野

[0001] 本発明は培養液から特定の成分を除去する分離装置および分離方法に関する。詳しくは、巨核球と血小板が含まれる培養液から、巨核球を除去する分離装置および分離方法に関する。

背景技術

[0002] 血液関連疾患の治療において血球細胞の輸血が行われている。なかでも血小板は止血において必須の細胞であるため、白血病、骨髄移植、抗癌治療などにおいては血小板の量的・質的低下に基づいた出血の予防や治療のための唯一の対処療法として、血小板輸血が行われている。輸血に用いられる血小板製剤は献血により賄われ、また、昨今では、献血者の全体数が減少する一方でウイルス感染症に汚染された献血者は増加するという現象もあり、献血に代わる安定した血小板供給源が求められ、その研究が活発に行われている。

[0003] その中でも、非特許文献1に記載の方法は、ヒトiPS細胞から自己複製が可能な巨核球を誘導することに成功している。巨核球は血小板を産生する細胞であることから、これにより血小板を安定的に大量に供給することも可能と成り得る。

[0004] 非特許文献1の方法においては、培養液中の巨核球の自己複製を強制的に止めることにより、巨核球が成熟して血小板を産生する旨が記されている。ところで、培養液中の巨核球は同時に成熟して血小板を産生するのではなく、全ての巨核球が血小板を産生するには時間を要する。一方において、血小板の特性は経時劣化するため、全ての巨核球が血小板を産生した段階においては初期に産生された血小板の劣化が進んでいる可能性がある。

[0005] また、血小板と巨核球が混在した状態で血小板製剤とすると、免疫系が活性化するという影響があって好ましくない。このため、血小板と巨核球が存

在する培養液から巨核球を除去する必要がある。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Nakamuraら、”Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically-Appllicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells”、[online]、2014/2/13、Cell Stem Cell、[平成26年3月27日検索]、インターネット<URL; <http://www.cell.com/cell-stem-cell/newarticles>>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 培養液から特定の細胞成分を除去する方法としては、遠心分離が一般的に用いられるが、巨核球と血小板とは比重が近いため、大きな遠心加速度を付与する必要がある。このため、遠心分離法では、巨核球と血小板が分離できても、大きな遠心加速度により破壊される血小板が増え、血小板の回収率が低下する問題がある。
- [0008] 本発明は、このような事情を鑑みてなされたものであり、血小板と巨核球が混在する培養液から、巨核球を効率よく取り除き、かつ血小板に悪影響を及ぼさない分離装置および分離方法を提供するものである。

課題を解決するための手段

- [0009] 上記課題を解決するために、請求項1に記載の発明は、巨核球と血小板が混在する培養液から巨核球を除去する分離装置であって、培養液を貯える培養液貯槽と、前記培養液貯槽内の培養液を送液する機能を有する培養液送液手段と、培養液から巨核球を除去した回収液を回収して貯える回収液貯槽と、電荷供給手段とを備える分離装置である。

[0010] 本発明の分離装置により、培養液から巨核球を除去した回収液を得ることが出来る。

[0011] 請求項 2 に記載の発明は、請求項 1 に記載の分離装置であって、培養液貯槽と回収液貯槽間に電荷供給手段として機能する電荷供給流路を備え、前記電荷供給流路の回収液貯槽側の接続先を、回収液貯槽または、培養液貯槽への帰還流路の何れかに切り換える機能を有する流出先切換バルブを備え、前記電荷供給流路に巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給することで、流動する培養液中の巨核球を前記電荷供給流路の壁面に付着させる機能を有していることを特徴とする分離装置である

本発明の分離装置では、電荷供給流路で巨核球が壁面に付着して行くため、流体中の巨核球の比率が下がる。このため、最終的には培養液から巨核球を除去することが出来る。

[0012] 請求項 3 に記載の発明は、請求項 2 に記載の分離装置であって、緩衝液を貯える緩衝液貯槽と、前記緩衝液貯槽内の緩衝液を送液する緩衝液送液手段と、前記電荷供給流路入口の接続先を、培養液送液手段または緩衝液送液手段の何れかに切り換える機能を有する流入先切換バルブを備え、緩衝液で前記壁面に付着している付着物を剥離して、電荷供給流路を洗浄する機能を有していることを特徴とする分離装置である。

[0013] 本発明の分離装置によると、電荷供給流路の壁面に付着している付着物による分離性能低下を防ぐことが出来る。

[0014] 請求項 4 に記載の発明は、巨核球と血小板が混在する培養液を、培養液貯槽から流路に流動させる過程において、培養液貯槽及び流路の壁面に、巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給して、巨核球を前記壁面に付着させることにより、培養液から巨核球を除去することを特徴とする分離方法である。

[0015] 本発明の分離方法により、流路の流動方向に沿って、巨核球が流路の壁面に付着して行くため、流体中の巨核球の比率が下がる。このため、最終的には培養液から巨核球を除去することが出来る。

[0016] 請求項 5 に記載の発明は、請求項 4 に記載の分離方法であって、流路の壁面に、巨核球に帯電している電荷と同じ極性の電荷を供給することで、前記壁面に付着している付着物を剥離して、流路を洗浄することを特徴とする分離方法である。

[0017] 本発明の分離方法によると、流路の壁面に付着している主な付着物である巨核球を容易に剥離することが出来、流路を効率的に洗浄することが出来る。

発明の効果

[0018] 血小板と巨核球が混在する培養液から、巨核球を効率よく取り除き、かつ血小板に悪影響を及ぼさない分離が可能となる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の一実施形態における分離装置の構成を説明する図である。

[図2]本発明の一実施形態における電荷供給流路の機能を説明する図である。

[図3]本発明の一実施形態における電荷供給流路の機能を断面で説明する図である。

[図4]本発明の別の実施形態における分離装置の構成を説明する図である。

[図5]本発明の別の実施形態における筒型モジュールについて説明する図である。

[図6]本発明の別の実施形態を用いた巨核球の分離を説明する図である。

[図7]本発明の別の実施形態を用いた機能例を説明する図である。

[図8]培養液貯槽で巨核球を付着させる実施形態を説明するための図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下に、本発明の実施形態について、図を用いて説明する。

[0021] 図 1 は、巨核球 M および血小板 P が混在する培養液 S 1 から、巨核球 M を除去する分離装置 1 の構成を示している。培養液貯槽 2 には培養液 S 1 が貯えられており、ポンプ 3 は培養液貯槽 2 中の培養液 S 1 を送液する培養液送液手段である。また、緩衝液貯槽 4 には緩衝液 B が貯えられており、ポンプ 5 は緩衝液貯槽 4 中の緩衝液 B を送液する緩衝液送液手段である。ポンプ 3

およびポンプ 5 の送液側には切換バルブ 6 があり、切換バルブ 6 の先には電荷供給流路 7 があって、ポンプ 3 またはポンプ 5 から送液される液の何れかを電荷供給流路 7 に通液する流入先切換機能をバルブ 6 は有している。電荷供給流路 7 は、液体を流す流路であるが、壁面に電荷が供給される構成となっている。電荷供給手段 8 は、電荷供給流路 7 の壁面に電荷を供給する機能を有している。電荷供給流路 7 の流出側には切換バルブ 9 があり、切換バルブ 9 は流出先を回収液貯槽 10 または帰還流路 11 の何れかに切り換える流出先切換機能を有している。回収液貯槽 10 は電荷供給流路 7 で巨核球 M を除去した回収液 S O が貯えられるようになっている。また、帰還流路 11 は培養液貯槽 2 と接続されている。

[0022] 次に、分離装置 1 により培養液 S I から巨核球 M を除去する方法について説明する。まず、切換バルブ 6 の流入先をポンプ 3 とし、切換バルブ 9 の流出先を回収液貯槽 10 とした状態で、ポンプ 3 を駆動すれば培養液貯槽 2 中の培養液 S I が電荷供給流路 7 内を流動する。この段階で、電荷供給手段 8 により電荷供給流路 7 の壁面に巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給する。そうすると、図 2 (a) のように、培養液 S I 中の巨核球 M が電荷供給流路 7 の壁面に付着するようになる。すなわち、流路の断面が円筒形状の場合を例にとると、図 3 (a) のように培養液 S I 中の巨核球 M には主流路 7 の壁面側へのクーロン力が働き、壁面に付着する。このため、電荷供給流路 7 を培養液 S I が流動することにより、培養液 S I から壁面に付着し、上流から下流に行く程、巨核球の比率が減少することになる。そこで、電荷供給流路 7 の長さおよび、電荷供給流路 7 の壁面への供給電荷量を適切に設定することにより、回収液貯槽 10 には巨核球 M を含まない回収液 S O が流れ込む。電荷供給流路 7 の長さおよび壁面への電荷供給量が不足すると、回収液 S O 中に巨核球 M が残り、回収液 S O を培養液貯槽 2 に戻して再度分離を行う必要がある。なお、培養液を電荷供給流路 7 に 1 回だけ流しただけで全ての巨核球を分離出来ないことが明らかな場合は、切換バルブ 9 の流出先を帰還流路 11 としてもよい。この場合、ポンプ 3 を駆動すれば培

養液貯槽 3 → 電荷供給流路 7 → 帰還流路 11 → 培養液貯槽 3 の循環を所定時間行った後に切換バルブ 9 の流出先を回収液貯槽 11 にすることで、巨核球を含まない回収液 S O を得ることが出来る。

[0023] 以上のように、分離装置 1 により培養液 S I から巨核球 M を除去する操作を行うと、電荷供給流路 7 の壁面に巨核球 M が付着した状態となる。このため、この巨核球除去操作を続けると、電荷供給流路 7 の壁面に多数の巨核球 M が付着することになる。このような状態では、培養液 S I の流動により電荷供給流路 7 の壁面から巨核球 M が剥離することも起こりうる。また、長期使用しなかった場合等においては、電荷供給流路 7 の壁面への不純物蓄積も懸念される。そこで、分離装置 1 は、電荷供給流路 7 を洗浄する機能を備えていることが望ましい。

[0024] 電荷供給流路 7 を洗浄するために、図 1 の分離装置 1 において、切換バルブ 6 の流入先をポンプ 5、切換バルブ 9 の流出先を帰還流路 11 としてポンプ 5 を駆動すれば、電荷供給流路 7 に緩衝液 B が流動する。この緩衝液 B の流速を上げることにより、電荷供給流路 7 の壁面に付着した巨核球 M および不純物は剥離し、培養液貯槽 2 側に流れ込むため電荷供給流路 7 が洗浄される。

[0025] 更に、緩衝液 B を電荷供給流路 7 に流動させる過程において、電荷供給流路 7 の壁面に巨核球表面に帯電している電荷と同じ極性の電荷を供給すれば、前記壁面付着した巨核球 M を容易に剥離することが出来る。

[0026] これを分離装置 1 を用いて説明する。まず、切換バルブ 6 の流入先をポンプ 5 とし、切換バルブ 9 の流出先を帰還流路 11 とした状態で、ポンプ 5 を駆動すれば緩衝液貯槽 4 中の緩衝液 B が電荷供給流路 7 内を流動する。この段階で、電荷供給手段 8 により電荷供給流路 7 の壁面に巨核球表面に帯電している電荷と同じ極性の電荷を供給する。そうすると、図 2 (b) のように、主流路 7 の壁面に付着した巨核球 M が壁面から剥離し緩衝液 B に混ざった状態となる。すなわち、流路の断面が円筒形状の場合を例にとると、図 3 (b) のように電荷供給流路 7 の壁面に付着したの巨核球 M には壁面から離れ

るクーロン力が働き、壁面から剥離する。剥離した巨核球Mおよび血小板Pは緩衝液Bの流動により、帰還流路11を経て培養液貯槽2に流れ込む。

[0027] 図4は本発明の別の実施形態である分離装置100の構成を示している。図1の分離装置1との違いは、電荷供給流路7が複数の筒型モジュールによって構成されていることである。図1における電荷供給流路7と、図4における筒型モジュール71（筒型モジュール72、73、74についても同じ）との関係は図5（a）と図5（b）に示すとおり筒の長さが短くなっている。なお、図5において、電荷供給流路7および筒型モジュールを円筒形としているが、断面形状は円に限定されるものではなく流路を形成出来れば、多角形状等であっても良い。また、図4においては、筒型モジュール71、72、73、74によって主流路7を構成しているが、筒型モジュールの数は4個に限るわけではなく、これより少なくても、多くても良く、必要に応じて電荷供給流路7の長さ（筒型モジュールの数）を決めれば良い。

[0028] 図4の分離装置100によって、各筒型モジュール71、72、73、74に巨核球表面に帯電している電荷と逆極性の電荷を供給した状態で、培養液が流動する際の巨核球Mと血小板Pの混合状態を例示したのが図6であり、巨核球Mが壁面に付着することにより、徐々に除去される様子を表している。なお、前述のとおり、連結する筒型モジュールの数が換えられるので、図7のように巨核球Mの濃度が低い培養液S1の分離操作においては、分離モジュール74を省いても良い。

[0029] ここまで説明した実施の形態においては、電荷供給流路7の壁面に電荷を供給して巨核球Mを付着しているが、培養液貯槽2に電荷を供給して培養液貯槽の壁面に巨核球Mを吸着させることも可能である。その場合の一例を、図1の分離装置1の培養液貯槽2の壁面にも電荷供給手段8から電荷を供給出来るようにした、図8の分離装置101について説明する。分離装置101では、電荷供給手段8から培養液貯槽2の壁面に、巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給した状態で、切換バルブ6の流入先をポンプ3、切換バルブ9の流出先を帰還流路11としてポンプ3を駆動する。こ

うすることで、培養液 S 1 は、培養液貯槽 2 → 電荷供給流路 7 → 帰還流路 1 1 → 培養液貯槽 2 を循環することにより、循環する液体内の巨核球 M が、培養液貯槽 2 の壁面に吸着していく。そこで、所定の循環条件（流速、時間、等）を経た段階で、切換バルブ 9 の流出先を回収液貯槽 1 0 とすれば、巨核球 M が含まれない回収液 S 0 が得られる。また、この段階の、巨核球 M を含まない回収液 S 0 を回収液貯槽 1 0 に導入するのに際して、ポンプ 3 の流出先が回収液貯槽 1 0 になるような流路およびバルブを設けて送液しても良い。

[0030] なお、培養液貯槽 2 の壁面に電荷を供給して巨核球 M を除去する場合においては、電荷供給流路 7 の部分は電荷供給機能のない通常の流路であっても良いが、培養液貯槽 2 と電荷供給流路 7 の両方に、巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給して、巨核球 M を付着させても良い。

産業上の利用可能性

[0031] 本発明は巨核球と血小板が混在する培養液から巨核球を除去する用途に適するが、これに限定されるものではなく、微粒子や細胞が混在する懸濁液から特定の微粒子または細胞を除去するような用途全般にも適用可能である。

符号の説明

[0032]	1、1 0 0	分離装置
	2	培養液貯槽
	3	ポンプ
	4	緩衝液貯槽
	5	ポンプ
	6	切換バルブ
	7	電荷供給流路
	8	電荷供給手段
	9	切換バルブ
	1 0	回収液貯槽
	1 1	帰還流路

7 1、7 2、7 3、7 4 筒型モジュール

B 緩衝液

M 巨核球

P 血小板

S I 培養液

S O 回収液

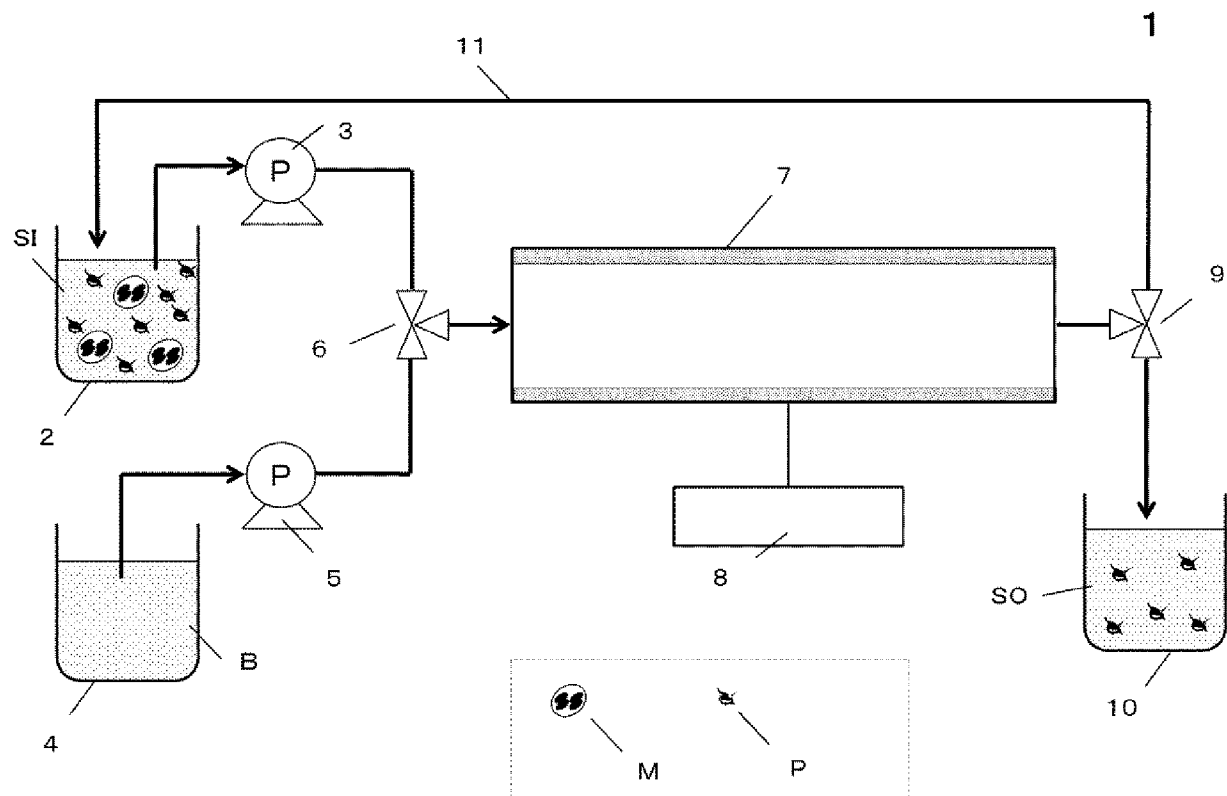
請求の範囲

- [請求項1] 巨核球と血小板が混在する培養液から巨核球を除去する分離装置であって、
培養液を貯える培養液貯槽と、
前記培養液貯槽内の培養液を送液する機能を有する培養液送液手段と、
培養液から巨核球を除去した回収液を回収して貯える回収液貯槽と、
電荷供給手段とを備える分離装置。
- [請求項2] 請求項1に記載の分離装置であって、
培養液貯槽と回収液貯槽間に電荷供給手段として機能する電荷供給流路を備え、
前記電荷供給流路の回収液貯槽側の接続先を、回収液貯槽または、培養液貯槽への帰還流路の何れかに切り換える機能を有する流出先切換バルブを備え、
前記電荷供給流路に巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給することで、流動する培養液中の巨核球を前記電荷供給流路の壁面に付着させる機能を有していることを特徴とする分離装置。
- [請求項3] 請求項2に記載の分離装置であって、
緩衝液を貯える緩衝液貯槽と、
前記緩衝液貯槽内の緩衝液を送液する緩衝液送液手段と、
前記電荷供給流路入口の接続先を、培養液送液手段または緩衝液送液手段の何れかに切り換える機能を有する流入先切換バルブを備え、
緩衝液で前記壁面に付着している付着物を剥離して、電荷供給流路を洗浄する機能を有していることを特徴とする分離装置。
- [請求項4] 巨核球と血小板が混在する培養液を、培養液貯槽から流路に流動させる過程において、
培養液貯槽及び流路の壁面に、巨核球表面に帯電している電荷と逆の極性の電荷を供給して、巨核球を前記壁面に付着させることにより、

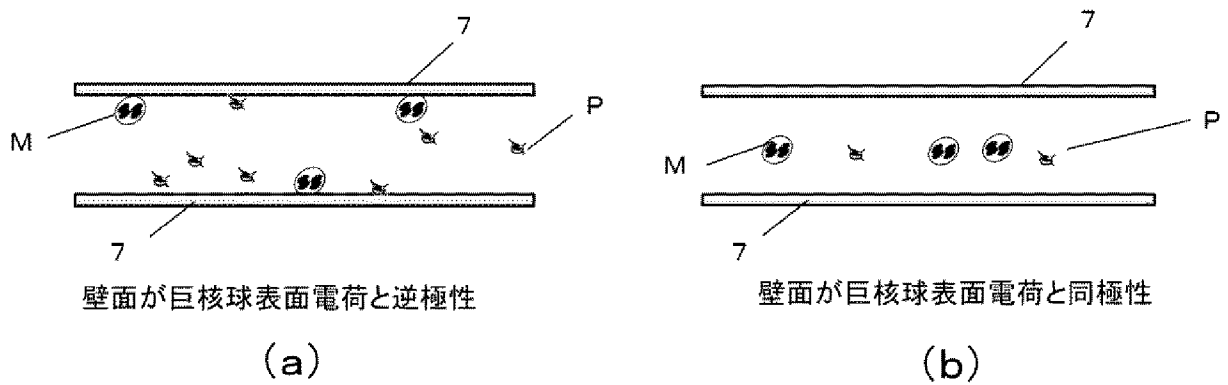
培養液から巨核球を除去することを特徴とする分離方法。

[請求項5] 請求項4に記載の分離方法であって、全電荷供給流路の壁面に巨核球に帯電している電荷と同じ極性の電荷を供給することで、前記壁面に付着している付着物を剥離して、電荷供給流路を洗浄することを特徴とする分離方法。

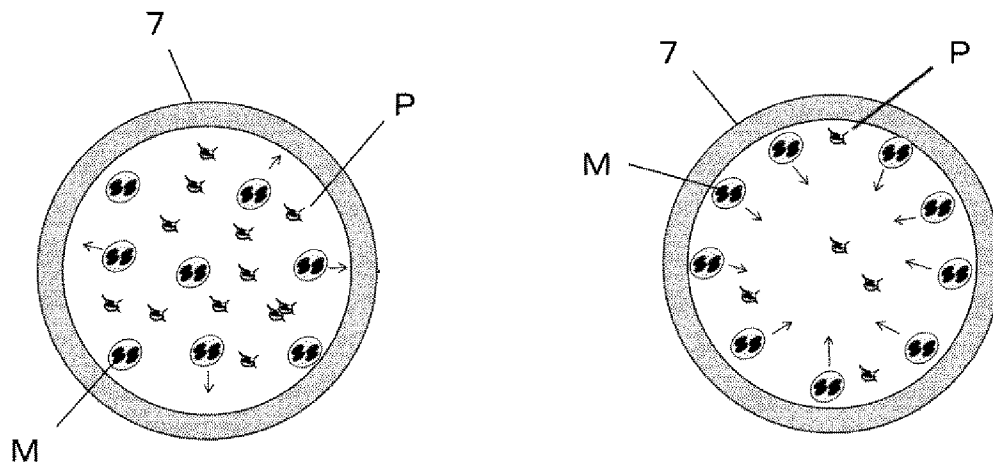
[図1]



[図2]



[図3]



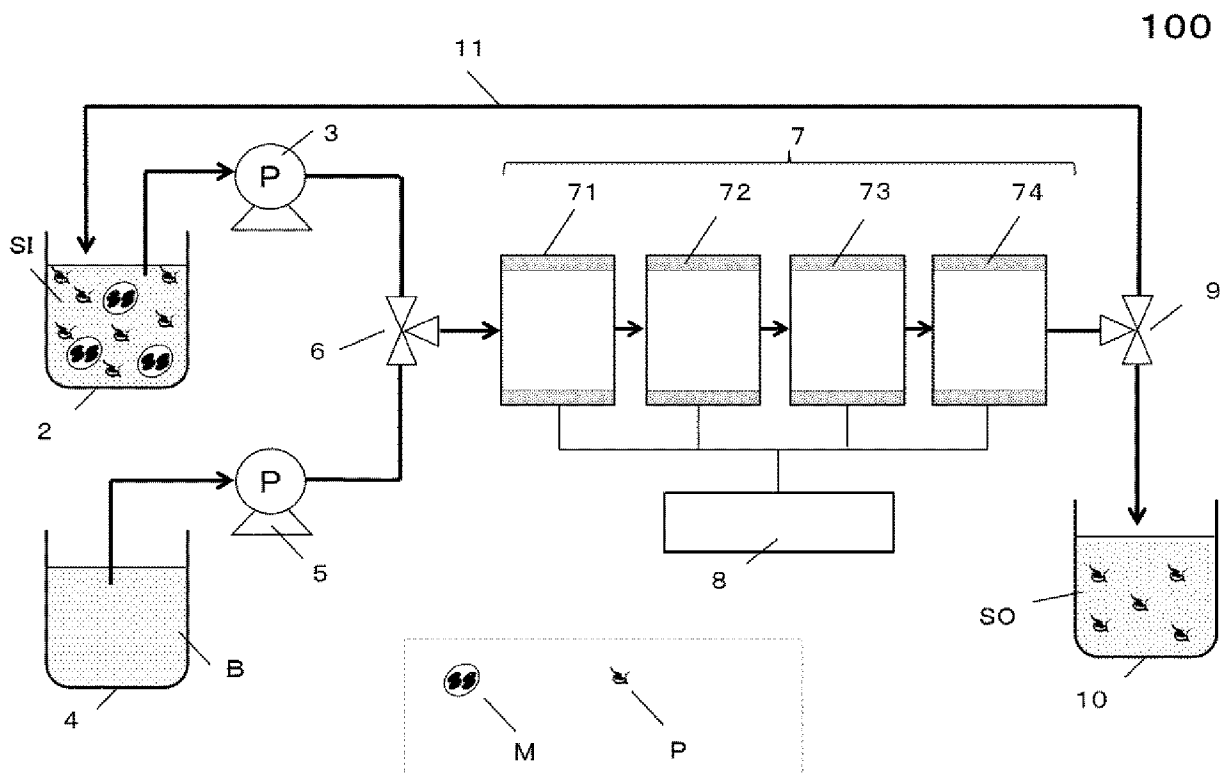
壁面が巨核球表面電荷と逆極性

壁面が巨核球表面電荷と同極性

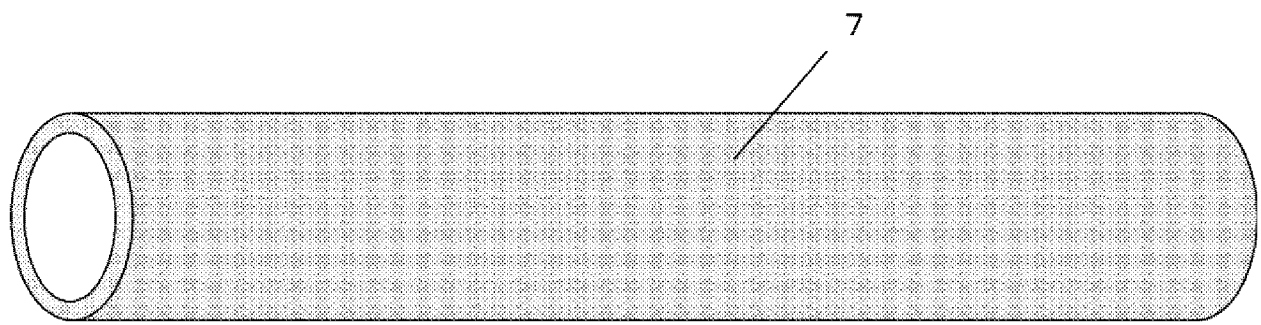
(a)

(b)

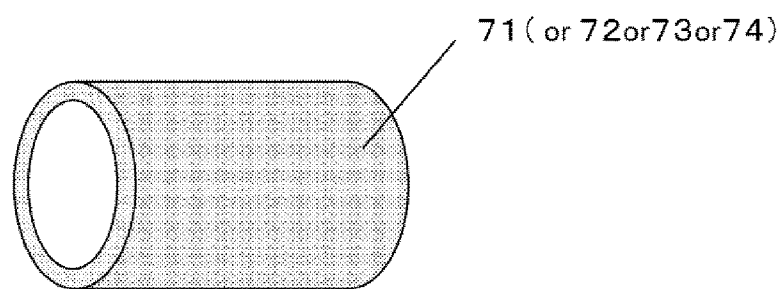
[図4]



[図5]

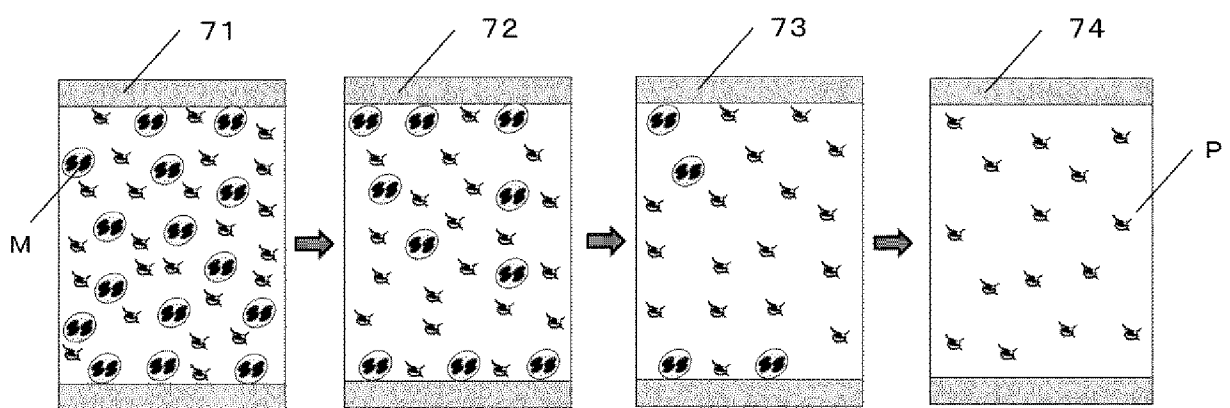


(a)

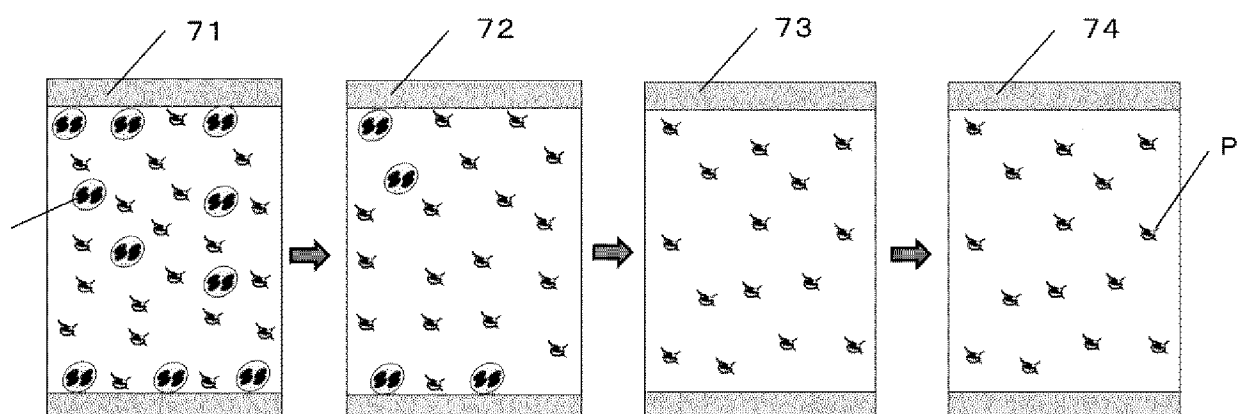


(b)

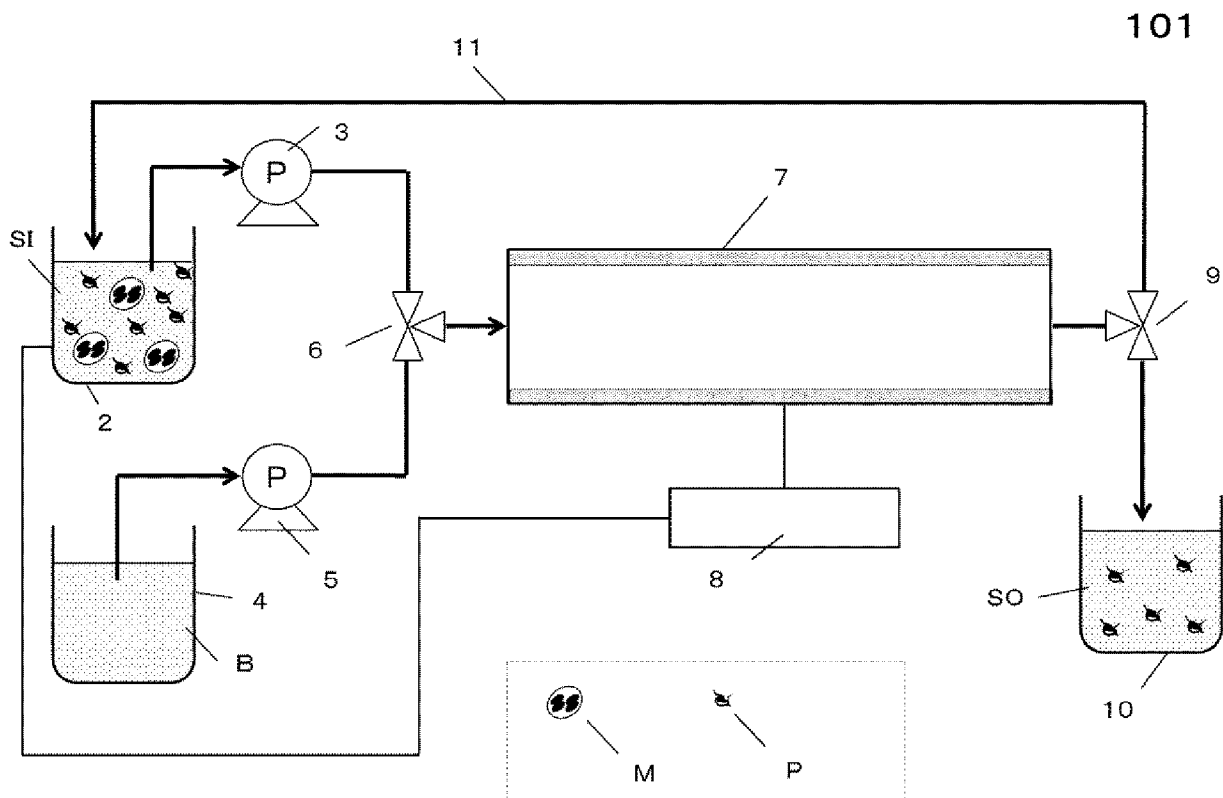
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/055016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, C12N1/02(2006.01)i

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)

C12M1/00, C12N1/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-518603 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 05 June 2008 (05.06.2008), claims; paragraph [0017] & WO 2006/050330 A2 & EP 1807507 A2 & US 2006/0099198 A1 & GB 2434157 A & KR 10-2007-0073932 A & CN 101052170 A	1-5
Y	JP 2013-031428 A (The University of Tokyo), 14 February 2013 (14.02.2013), claims; paragraph [0028]; fig. 1 (Family: none)	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 May 2015 (11.05.15)

Date of mailing of the international search report
19 May 2015 (19.05.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/055016

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-545372 A (University of Rochester), 18 December 2008 (18.12.2008), paragraph [0003] & WO 2006/078994 A2 & US 2006/0183223 A1 & EP 1838845 A2	1-5
Y	JP 2007-521800 A (Vicam, L.P.), 09 August 2007 (09.08.2007), paragraph [0004] & WO 2005/054808 A2 & EP 1695059 A2 & US 2005/0114915 A1	1-5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12N1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12M1/00, C12N1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2015年
日本国実用新案登録公報	1996-2015年
日本国登録実用新案公報	1994-2015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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

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
Y	JP 2008-518603 A（ウイスコンシン アラムニ リサーチ ファン デーション）2008.06.05, 特許請求の範囲,【0017】など, & WO 2006/050330 A2 & EP 1807507 A2 & US 2006/0099198 A1 & GB 2434157 A & KR 10-2007-0073932 A & CN 101052170 A	1-5
Y	JP 2013-031428 A（国立大学法人 東京大学）2013.02.14, 特許請求の範囲,【0028】,図1など, （ファミリーなし）	1-5

☒ 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

11.05.2015

国際調査報告の発送日

19.05.2015

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（ISA/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

坂崎 恵美子

4B

9451

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 請求項の番号
Y	JP 2008-545372 A (ユニバーシティー オブ ロチェスター) 2008. 12. 18, 【 0 0 0 3】, & WO 2006/078994 A2 & US 2006/0183223 A1 & EP 1838845 A2	1 - 5
Y	JP 2007-521800 A (ヴァイカム・エルピー) 2007. 08. 09, 【 0 0 0 4】, & WO 2005/054808 A2 & EP 1695059 A2 & US 2005/0114915 A1	1 - 5