

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 7 月 6 日 (06.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/070752 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12M 1/36* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *G01F 19/00* (2006.01)
- (74) 代理人: 杉村 興作, 外(SUGIMURA, Kosaku et al.);
〒1000013 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 4 号 霞
山ビルディング 7 F Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/023803
- (22) 国際出願日: 2005 年 12 月 26 日 (26.12.2005)
- (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 2004-380651
2004 年 12 月 28 日 (28.12.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国
立大学法人 名古屋大学 (NATIONAL UNIVERSITY
CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石浦 正寛
(ISHIURA, Masahiro) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名
古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内
Aichi (JP). 岡本 和久 (OKAMOTO, Kazuhisa) [JP/JP];
〒4648601 愛知県名古屋千種区不老町 1 番 国立大
学法人名古屋大学内 Aichi (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CONTROL PROGRAM AND CULTURE APPARATUS

(54) 発明の名称: 制御プログラム及び培養装置

(57) Abstract: A control program that is capable of appropriately controlling a culture apparatus, realizing continuous culturing; and a culture apparatus that is capable of monitoring cell division rate, expression of arbitrary gene, etc. There is provided a control program for causing a computer to function as: means for reading and recording any measured value from a cell concentration sensor; means for in advance recording set value data of cell concentration; means for comparing the set value data with the measured value and transmitting to a culture medium supply unit such control signals that when the set value is higher, a culture medium is fed to a culture solution while the set value is lower, feeding of the culture medium is discontinued; and means for recording the amount of culture medium fed.

(57) 要約: 本発明は、培養装置を的確に制御し、連続培養を可能とする制御プログラムの提供、及び細胞分裂速度、任意遺伝子の発現等をモニタリングすることが可能な培養装置を提供することにある。コンピュータを、細胞濃度センサーからの測定値を読み取り、記録する手段、予め細胞濃度の設定値データを記録する手段、前記設定値データと前記測定値とを比較して、前記設定値が高い場合に培地を培養液へ供給し、低い場合に前記培地の供給を停止するように培地供給装置へ制御信号を送る手段、前記培地の供給量を記録する手段、として機能させるための制御プログラム。

明 細 書

制御プログラム及び培養装置

技術分野

- [0001] 本発明は、制御プログラム、及び培養装置に関し、特に、培養装置を制御するのに適当な制御プログラム、及び細胞の連続培養に適した培養装置に関する。

背景技術

- [0002] 細胞の液体培養は基礎研究や医療、醸造など様々な分野で行われており、細胞を一定の成長相に保ちつつ連続的に培養を行う連続培養は様々な研究で行われており、そのための装置は以前から存在していた(エイブル株式会社の製品群など;<http://www.able-biott.co.jp/index.html>)。従来の装置では細胞濃度や酸素濃度といった指標で細胞の状態をモニタリングすることと、連続培養からサンプリングした細胞を低温状態(4～10℃)で保存することができた。

- [0003] また、生物発光リアルタイム測定法は生物に発光遺伝子を組み込んで生きたままの細胞で任意遺伝子の発現量の変動を連続的に測定できる有効な実験法である。(Kondo et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, vol90 pp5672-5676)

非特許文献1:エイブル株式会社の製品群など;<http://www.able-biott.co.jp/index.html>

非特許文献2:Kondo et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, vol90 pp5672-5676

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] しかし、従来の装置では(1)細胞の分裂速度をモニタリングすることや(2)生物発光レポーター株の生物発光量をモニタリングすること、(3)連続培養からサンプリングした細胞を極低温状態(約－80℃以下)で保存することができなかった。
- [0005] また、従来の生物発光リアルタイム測定法は、細胞を一定の状態を保ちつつ、生物発光を測定することができなかった。
- [0006] したがって、これらの機能を総合的に兼ねそろえている培養装置、及び当該培養装置を効率的に制御し得る制御プログラムが提供されれば、細胞分裂速度及び任意

求項1～6項のいずれか1項に記載の制御プログラムによって制御されることを特徴とする。本発明の培養装置は、本発明の制御プログラムを使用することによって、好適に機能する。

また、本発明の培養装置の好ましい態様において、さらに、洗浄システム部を有することを特徴とする。この洗浄システム部によって、送液ラインの自動洗浄システムを提供することができる。すなわち、この洗浄システム部によって、複数種類の洗浄液（例えば、水、エタノールなど）と空気を用いてサンプリング経路を自動的に洗浄する機構を提供することが可能となる。

発明の効果

- [0021] 本発明によれば、細胞の分裂速度をモニタリングすることができるので、連続培養中の細胞の分裂速度をデータとして把握することができる。また、生物発光レポーター株の生物発光レポーター遺伝子のプロモーターとして任意の遺伝子のプロモーター領域を用いることで、連続培養中の細胞の任意遺伝子の発現を生物発光として連続的かつ自動的に測定・記録することができる。また、サンプリングした試料を極低温下で保管することによって、RNAや不安定なタンパクなどの成分が分解させずに保存できる。さらに、上記の機能、すなわち、細胞の分裂速度及び任意遺伝子の発現量のモニタリング機能、及びサンプリングした細胞の極定温状態での保存機能、を併せ持つことによって、細胞分裂速度や任意遺伝子の発現量を元にサンプリングのタイミングを計算して自動実行させることができる。細胞分裂速度や任意遺伝子の発現量とサンプリングした細胞から得たデータとを比較することができる。

図面の簡単な説明

- [0022] [図1]図1(a)は、本発明の模式図の一例を示す。図1(b)は、本発明の培養装置の一例における各部の写真と接続の様子を示す。
- [図2]図2は、本発明の培養装置における発光測定部の一例を示す。図2(a)は、液体基質を使用する場合、図2(b)は、揮発性基質を使用する場合の発光測定部の一例を示す。
- [図3]図3は、本発明の装置及び制御プログラムを用いて測定した細胞増殖速度のリズムを示す。

[図4]図4は、本発明の装置とプログラムを用いて測定した生物発光リズムを示す。図4(a)は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いた生物発光レポーター株の生物発光を測定した例を示す。図4(b)は、バクテリアルシフェラーゼ遺伝子を用いた生物発光レポーター株の生物発光を測定した例を示す。

[図5]図5は、本発明の装置とプログラムを用いて培養及びサンプリングを行ったクラミドモナスの細胞から抽出した全RNAとノーザンブロット解析の結果を示す。図5(a)は、装置を用いてサンプリングした試料から得られたトータルRNAの電気泳動図を示す。図5(b)は、Cabll DNA断片をプローブに用いたノーザンブロット解析の結果を示す。

[図6]図6は、本発明の模式図の一例を示す。

[図7]図7は、本発明の培養装置における発光測定部の一例を示す。図7(a)は、液体基質を使用する場合、図7(b)は、揮発性基質を使用する場合の発光測定部の一例を示す。いずれも、洗浄機構を用いた場合の例である。

[図8]図8は、単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の細胞増殖リズムのリアルタイムモニタリングの測定結果を示す。

[図9]図9は、種々の生物の発光レポーター株における生物発光リズムのリアルタイム測定の結果を示す。

[図10]図10は、*Chlamydomonas reinhardtii* の *psbD* 遺伝子のノーザン解析の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0023] 本発明の実施の形態を、図面を参照して詳細に説明する。図1(a)は、本発明の制御プログラムの模式図の一例を示す。図1(b)は、本発明の装置の各部の写真と接続の様子の一例を示す。

[0024] <本発明の使用方法和動作の一例>

本発明の装置は(A)制御用コンピュータ、(B)連続培養部分、(C)発光測定部分、(D)サンプリング部分で構成されている。装置の各部はコンピュータ内のプログラムで制御される。

[0025] (A)制御用コンピュータ：制御用コンピュータは本発明の他の部分と電氣的に接続

されている(図1a,b)。コンピュータ上で働く制御プログラムによって他の部分から送られてくる測定信号を読みとって電子ファイルとして記録し、制御信号を送って各部の動作を制御する(図1a,b)。

[0026] 当該制御プログラムとして、好適には、本発明の制御プログラムを適用することができる。

[0027] ここで、本発明の制御プログラムの一例について説明すると以下のようである。すなわち、まず、予め細胞濃度の設定値データをキーボードなどの入力装置から入力する。データファイルには、細胞濃度センサーからは測定値が記録される。

[0028] 中央処理装置は、メインメモリ中の制御プログラムの指令を受け、データファイルから設定値データと測定値データを読み出し、両者を比較し、設定値データと測定値データとでいずれが高いかを比較して、培地供給装置へ培地を培養液へ供給するかどうかの制御信号を送る。

[0029] また、培養液中の細胞濃度の算出は、予め入力した細胞濃度センサーからの測定値と細胞濃度との相関関係を利用する。得られた細胞濃度データと、記録された測定値と、測定中の測定値の変化量とによって、細胞増殖率を算出することができる。

[0030] ここで、細胞増殖速度について、算出方法の一例を含めて説明すれば以下の通りである。

[0031] 本発明にかかる装置は数秒おきに光電子センサーをもちいて培養液の濁度(培養中の細胞濃度に比例)を光電子センサー出力の電圧変化として測定することができる(標準で6秒ごとに5回測定して平均値を算出)。細胞濃度が高くなるほどに電圧値は低下し、電圧値が設定した下限値よりも低くなったなら培地を供給して細胞濃度を希釈することができる。逆に上限値よりも高くなったなら培地の供給を停止することができる。

[0032] 本発明は、細胞状態を一定に保つことができる。この際に本発明では、培地を供給した時間の比率や培養中の光電センサー電圧値の変化を記録しており、設定した測定間隔(下記T、細胞の種類によるが5～60 minに設定することが多い)毎にこれらの記録値を元に計算を行うことでリアルタイムに細胞増殖速度を算出・記録することができる。

[0033] <細胞増殖率の計算方法1:供給培地量型の計算>

以下の計算式は連続液体培養中の培養液量(V)と細胞濃度を均一に保つために加えた追加培養液の流速(S)、追加培地の供給時間率などの入力値から細胞増殖率(G_i)を計算する。

[0034] 入力値:

S:追加培養液の流速(ml/min)。連続培養開始時に決定する。

T:測定間隔(min)。連続培養開始時に決定する。

V:培養液の体積(ml)。連続培養開始時に決定する。

i:測定番号(0 - n)。連続培養期間に測定間隔毎にカウントアップしていく。

R_i : 測定番号i-1からiの期間における追加培地の供給時間率。連続培養期間に装置が自動的に記録する。

[0035] 出力値:

G_i : 単位時間あたりの細胞増殖率(Cell Growing rate / h)。入力値を元に自動的に算出する。

[0036] 出力値の計算式:

$$G_i = ((V + R_i \times T \times S) / V)^{(60 / T)}$$

[0037] <細胞増殖率の計算方法2:電圧変化量型の計算>

以下の計算式は測定開始時に入力した電圧－細胞濃度の検定曲線と、連続液体培養中の培地を追加していないときの電圧変化量の合計値($\sum \Delta E_i$)などの入力値から細胞増殖率(G_i)を計算する。

[0038] 入力値:

j:細胞濃度-電圧の検定曲線の組み番号(0 - n)。連続培養開始時に決定する。

C_j : 電圧-細胞濃度の検定曲線調べた際の細胞濃度(Cells / ml)。連続培養開始時に決定する。

E_j : 電圧-細胞濃度の検定曲線調べた際の電圧(V)。連続培養開始時に決定する。

C_c : 連続培養時の培養液の細胞濃度((Cells / ml))。連続培養開始時に決定する。

T:測定間隔(min)。連続培養開始時に決定する。

i:測定番号(0 - n)。連続培養期間に測定間隔毎にカウントアップしていく。

$\Sigma \Delta E_i$:測定番号i-1からiまでの期間における培地を供給していないときの電圧変化量合計。連続培養期間に装置が自動的に記録する。

[0039] 出力値:

ΔC : 培養濃度時における電圧変化量あたりの細胞濃度変化量(Cells / ml / V)。測定開始時に入力値を元に計算する。

G_i :単位時間あたりの細胞増殖率(Cell Growing rate / h)。入力値を元に自動的に算出する。

[0040] 出力値の計算式:

$$\Delta C = (C_j - C_{j-1}) / (E_j - E_{j-1})$$

・ただし、細胞濃度 C_j と C_{j-1} はそれぞれ電圧-細胞濃度の検量線を引いたときに「 $C_{j-1} < C_c < C_j$ 」を満たす細胞濃度 C_c もっともに近い値。

$$G_i = ((C_c + \Delta C \times \Sigma \Delta E_i) / C_c)^{(60 / T)}$$

[0041] 以上のような計算式の一例を用いて、記録された測定値と、記録された細胞濃度と、測定中の測定値の変化量によって、細胞増殖率を算出することができる。

[0042] また、制御プログラムは、予め設定されたタイミングで細胞のサンプリングを行うようにサンプリング装置へ制御信号を出力することができる。予め設定するタイミングは、任意に決定することができ、限定されないが、生物発光量のモニタリングによって得られた値や、細胞増殖速度などのデータに基づいて決定してもよい。例えば、細胞分裂速度や遺伝子の発現量がピークのときなどにサンプリングを実行したり、培養中にモニタリングした任意の値(細胞分裂速度、生物発光量)が設定値を越えた場合にサンプリングを実行するように設定することができる。また、それらの測定値をリズム解析して得た予測される分裂速度／生物発光量のピークに自動的にサンプリングを行うことができる。

[0043] (B)連続培養部分:

連続培養部分は液体培養用のフラスコとそれに取り付けた細胞濃度センサー、追加用の培地、培地の追加制御用の部品(送液ポンプや電磁弁など)から構成されている(図1a,b)。細胞濃度センサーは制御用コンピュータと接続され、コンピュータ上の制御プログラムが測定値を読みとる。培地の追加制御用の部品も制御コンピュータと

接続されており、コンピュータ上の制御プログラムは制御信号を送って培地の追加制御用部品の動作を制御する(図1a,b)。

- [0044] センサーによって細胞濃度を測定する手段について説明すれば、以下のである。例えば、光電センサーを用いて濁度として測定する方法や培養液の電気容量を測定する方法、粒子計を用いて測定する方法などがあり、これらを適宜本発明において使用することができる。濁度や電気容量として測定した場合は測定値を電気信号として取り出し、電流－電圧変換回路やA/D変換回路を介してコンピュータ上のプログラムで読みとる(図1a)。その際に細胞濃度は予め入力しておいたそれぞれの測定値と細胞濃度の相関を示した検量線から算出することができる。粒子計を用いた場合は粒子濃度を細胞濃度と見なすことができる。
- [0045] 本発明においては培養液の細胞濃度を濃度センサーを用いて任意の時間間隔で測定を行い、細胞濃度が入力した値よりも濃くなったら、培地を供給して細胞濃度を希釈することができる(図1a,b)。逆に設定値よりも薄くなったら培地の供給を停止し、細胞の増殖によって細胞濃度は増加する(図1a,b)。本発明はこの一連の動作を継続的に繰り返すことで細胞濃度を一定に保つことができる。細胞濃度以外にも上記の各測定値を直接指標にして培地の供給・停止を制御することができる。
- [0046] 培地の追加手段については、培地の供給の調節はコンピュータ上の制御プログラムから送液ポンプや電磁弁に電気信号を送ることで、送液ポンプの送液速度を制御することや電磁弁を開閉することによって行うことができる(図1a,b)。
- [0047] また、測定値や細胞濃度の値をデータとして記録する方法については、本発明は上記の方法によって細胞状態を一定に保つ際に、センサーの測定値や細胞濃度、追加用培地を供給した時間の比率や記録を電子ファイルとして制御用コンピュータに記録することができる(図1a,b)。更に、これらの記録値を元に設定した測定間隔毎に計算を行うことでリアルタイムに細胞増殖速度を算出し、制御用コンピュータに電子ファイルとして記録することができる。
- [0048] (C)発光測定部分：
- 細胞に生物発光遺伝子を組み込んでいた場合には、制御プログラムは装置を制御して定期的に培養液をサンプリングして、生物発光を測定することができる(図1a, 図2

）。

- [0049] サンプルングされた培養液中の生物試料の生物発光の測定には、例えば、基質が溶液、揮発性などの違いにより以下のような例を挙げることができる。基質が溶液である場合の例として、図2(a)に示す。発光レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼなどを用いる場合は、ペリスタポンプを駆動することで個別に送液した培養液と基質溶液とをサンプルング経路上で混合し、細胞に発光基質を供給することができる。その後、混合液が発する生物発光を光電子増倍管で測定することができる(図2a)。
- [0050] なお、図2(a)においては、培養液中にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ生物試料を用いて、当該生物試料とD-ルシフェリン溶液を混合させているが、生物発光を測定できれば、混合の手段は特に問わない。
- [0051] また、基質が揮発性のものを用いる場合の例として、図2(b)に示す。発光レポーター遺伝子としてバクテリアルシフェラーゼ遺伝子を用いる場合は、送液した培養液を揮発性基質であるn-デカナールを充満させた容器に通気性チューブを用いて通すことで細胞に発光基質を供給し、培養液が発する生物発光を測定部で測定する(図2b)。測定したデータは測定信号としてコンピューターに転送され、制御プログラムによって記録・表示される(図1a, 図2)。
- [0052] (D)サンプルング部
- 装置はプログラムの入力に基づいて送液ポンプを駆動して培養液をサンプルングし、保管することが可能である(図1a,b)。極低温の保冷剤を満たすことができる保温部をサンプルング部に付加することで、サンプルングした細胞を極低温状態で(−80℃以下)に保つことを可能になっている。極低温とは特に限定されないが、ほとんどのタンパク質の働きを止めることができ、分解しやすい生体高分子(mRNAなど)も安定して保存し得るという観点から、好ましい温度範囲としては、−70℃以下である。
- [0053] また、本発明の制御プログラムを利用すれば、予め設定されたタイミングで細胞のサンプルングを行うように、制御信号により制御されたサンプルング装置などの駆動装置によって、細胞を保管部又は測定装置へ移送することができる。
- [0054] ここで、本発明の一実施例を説明するが、本発明は、下記の実施例に限定して解釈されることを意図するものではない。以下の実施例は、本発明の一実施態様を説

明するために用いたものであり、特許請求の範囲に記載された本発明の要旨及び範囲を逸脱しない限り、いかなる変更等を排除するものではない。

[0055] 実施例1

本実施例において用いた培養装置について説明すれば以下の通りである。

連続培養部分は液体培養用の角フラスコとそれに取り付けた光センサー（細胞濃度測定用）、追加用の培地、培地制御の追加制御用の送液ポンプから構成される。連続培養の開始には、液体培養用の角フラスコ内に培養液を入れ、光センサーを取り付ける。培養用のボトルには送液ポンプを介して新鮮な培地を追加できるように接続する。制御プログラムは光センサーを用いて培養液の細胞濃度を測定し、培養液濃度が入力した値よりも上昇すると培地を追加することで細胞濃度を一定に保つ。また、制御プログラムは測定した細胞濃度や細胞濃度の変化、追加した培養液量をそれぞれ記録しており、これらの値から細胞濃度を表示することや、細胞増殖速度の変化を計算して表示することができる。

[0056] 細胞に生物発光遺伝子を組み込んでいた場合には、制御プログラムは装置を制御して定期的に培養液をサンプリングして、生物発光を測定することができる。発光レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子などを用いる場合は、ペリスタポンプを駆動することで個別に送液した培養液と基質溶液とをサンプリング経路上で混合し、細胞に発光基質を供給する。その後、混合液が発する生物発光を光電子増倍管で測定する。発光レポーター遺伝子としてバクテリアルシフェラーゼを用いる場合は、送液した培養液を揮発性基質であるn-デカノールを充填させた容器に通気性チューブを用いて通すことで細胞に発光基質を供給し、培養液が発する生物発光を測定部で測定する。測定したデータをコンピューターに転送され、制御プログラムによって記録・表示される。

[0057] 装置はプログラムの入力に基づいて送液ポンプを駆動して培養液をサンプリングし、極低温で保管する。

[0058] 以上のような培養装置を用いて、実際に、細胞増殖速度のモニタリング、生物発光のモニタリング、細胞から抽出したRNAの解析を行った。

[0059] (1) *Synechocystis* sp. PCC6803の細胞増殖速度のモニタリング

藍色細菌 *Synechocystis* sp. PCC6803 を 1L の BG-11 液体培地に植え付け、本装置を用いて 30 °C、白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) で通気培養を開始し、培養液濃度が $\text{OD}_{730}=0.25 (2.5 \times 10^9 \text{ cells}/\text{ml})$ になるまで細胞を増殖させた。培養液濃度の安定を確認した後、12時間の暗処理を行い、その後、白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) に置き、細胞の増殖速度を追加した新鮮な培地の量から計算した。

[0060] その結果、連続培養中の *Synechocystis* の細胞増殖速度の変動パターンを観測できていることが判明した(図3)。図3は、本発明の装置及び制御プログラムを用いて測定した細胞増殖速度のリズムを示す。図3は、本培養装置の細胞増殖速度モニタリング機能を用いて、藍色細菌 *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 の細胞増殖速度を測定した一実施例を示す。横軸は、測定開始からの時間、縦軸は、1時間あたりの細胞数の増殖倍率である。連続培養期間中の細胞増殖速度の変動パターンが観察できている。

[0061] 図3に示す値は連続培養期間中に表示されており、これの表示値を元に実験スケジュールを柔軟に変更することができる。

[0062] (2)次に、ホタルルシフェラーゼを発光遺伝子として用いた生物発光モニタリングを行った。

[0063] 好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* に耐熱性ホタルルシフェラーゼを発光遺伝子として組み込んだ発光レポーター株を 1L の BG-11 液体培地に植え付け、本装置を用いて 50 °C、白色光照射下 ($20 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)、5% CO_2 通気培養を開始し、培養液濃度が $\text{OD}_{730}=0.6 (6 \times 10^9 \text{ cells}/\text{ml})$ になるまで細胞を増殖させた。培養液濃度の安定を確認した後、12時間の暗処理を行い、その後、連続明下 ($12 \mu \text{Mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) で連続培養を行った。生物発光測定は培養液を2時間に1回サンプリングして、5mM D-ルシフェリン溶液と混合して暗室内に110分間静置し、光電子増倍管で生物発光を測定した。

[0064] その結果、本装置の生物発光測定機能を用いて、好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* に耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーター株の生物発光を測定することができた(図4a)。図4は、本発明の装置とプログラムを用いて測定した生物発光リズムを示す。図4(a)は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を

用いた生物発光レポーター株の生物発光を測定した例を示す。図4(b)は、バクテリアルシフェラーゼ遺伝子を用いた生物発光レポーター株の生物発光を測定した例を示す。

- [0065] これによって、連続培養期間中の細胞の任意遺伝子の発現量が生物発光として測定できることが分かる。そして、ルシフェラーゼの前に接続したプロモーターの活性に従った明確なリズムを観測することができることが判明した。
- [0066] (3)次に、バクテリアルシフェラーゼを発光遺伝子として用いた生物発光モニタリングを行った。
- [0067] 藍色細菌*Synechocystis* sp. PCC6803にバクテリアルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーター株を1LのBG-11液体培地に植え付け、本装置を用いて30℃、白色光照射下($12 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)、通気培養を開始し、培養液濃度が $\text{OD}_{730}=0.25$ になるまで細胞を増殖させた。培養液濃度の安定を確認した後、12時間の暗処理を行い、その後、連続明下($12 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)で連続培養を行った。生物発光測定は培養液を1時間に1回サンプリング、通気性のチューブを用いて3%*n*-デカナール溶液を入れた容器通してから、暗室内に50分間静置した後、光電子増倍管で生物発光を測定した。
- [0068] その結果、本装置の生物発光測定機能を用いて、藍色細菌*Synechocystis* sp. PCC6803にバクテリアルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーター株の生物発光を測定することができた(図4b)。Thermosynechococcusのときと同様、明確なリズムを観測することができる。
- [0069] (4)次に、自動サンプリング装置を用いてサンプリングしたクラミドモナス細胞から抽出したRNAの解析を行った。
- [0070] *Chlamydomonas reinhardtii*を1LのTAP液体培地に植え付け、本装置を用いて23℃、白色光照射下($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)で通気培養を開始し、培養液濃度が(1.7×10^6 cells/ml)になるまで細胞を増殖させた。培養液濃度の安定を確認した後、12時間の暗処理を行い、その後、白色光照射下($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)に置いた。本発明の自動サンプリング機能を用いて、連続培養したクラミドモナス細胞を2時間毎に50mlずつサンプリングし、極低温下で保管した。24時間のサンプリングの終了後、極低温下

で保管していた試料からRNAを抽出し、cabII遺伝子のプローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。

- [0071] その結果、本発明の培養装置を用いてサンプリングした試料から得たRNAの電気泳動図のパターン(図5a)においては、rRNAが分解していないことが判明した。図5は、本発明の装置とプログラムを用いて培養及びサンプリングを行ったクラミドモナスの細胞から抽出したトータルRNAとノーザンブロット解析を示す。図5(a)は、装置を用いてサンプリングした試料から得られたトータルRNAの電気泳動図を示す。図5(b)は、CabII遺伝子プローブを用いたノーザンブロット解析を示す。
- [0072] また、CabII遺伝子のDNA断片をプローブに用いたノーザン・ハイブリダイゼーション(図5b)では、CabII mRNAのバンドは分解されておらず明確なバンドを示した。このことから、本発明を用いてサンプリングしたクラミドモナス細胞から高品質のRNAを調製することができることが判明した。以上の結果、本発明の培養装置を用いてサンプリングし保管したクラミドモナス細胞から高品質のRNAを調製できることが判明した。
- [0073] 要約すると、本発明の培養装置及び制御プログラムにより、連続培養している細胞の分裂速度の変動を計算・表示できること、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーター株の生物発光を測定・表示できること、バクテリアルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発光レポーター株の生物発光を測定・表示できること、自動サンプリングした試料から分解しやすい生体高分子(mRNAなど)を高品質で調整できることが証明された。
- [0074] また、本発明の装置・プログラムはこれらの機能を兼ね備えることにより、リアルタイム表示した細胞分裂速度や生物発光量(遺伝子発現量)をもとに培養液の自動サンプリングを柔軟なスケジュールで行うことができる。また、サンプリングした試料から得たデータと細胞分裂速度や生物発光量(遺伝子発現量)を比較することができることも証明された。
- [0075] 実施例2
- 次に、本発明の装置の機能について、既存の装置と比較した。本発明の装置と既存の装置との比較を以下の表1にまとめた。
- [0076] [表1]

機能		既存の 連続培養装置	開発した 連続培養装置
細胞濃度測定		○	○
培地の自動追加		○	○
リアルタイム測定	細胞分裂速度	×	○
	ホタル ルシフェラーゼ	×	○
	バクテリア ルシフェラーゼ	×	○
	自動サンプリング	×	○
凍結保存		×	○

[0077] 既存の連続培養装置は培地の自動追加によって細胞濃度を一定に保つ機能は持っている。本発明の培養装置は、既存の培養装置が有していない以下の機能、「細胞分裂速度のリアルタイム測定機能」、「ホタルルシフェラーゼやバクテリアルシフェラーゼなどの発光レポーターを用いた生物発光のリアルタイム測定機能」、「自動サンプリング機能」、「自動凍結保存機能」、を装置に搭載することで、培養中の細胞の状態を詳細かつ全自動でリアルタイム測定し、自動的にサンプリングして凍結保存することを可能とすることができると判明した。

[0078] 実施例3

次に、本発明の別の実施態様を試みた。本発明の別の実施態様における模式図の一例を図6に示す。

既に説明した本発明の図1に示す実施態様との違いは、以下のようである。

すなわち、図1と比較した場合の変更点は、「洗浄システム」を追加した点である。「洗浄システム」はエタノールを用いて送液チューブ内壁に付着した細胞を洗浄し、空気と水を用いてエタノールを除去することで、送液チューブ内を常にクリーンな状態に保つためのものである。「洗浄システム」を搭載したことによって、高濃度の細胞培養液の自動サンプリングや生物発光のリアルタイム測定を安定に行うことが可能となる。高濃度の培養液を用いた生物発光リアルタイム測定については、後述の実施例4で説明する。

[0079] この洗浄システムを追加した場合の本発明の装置の動作について説明すれば、以

下の通りである。

[0080] 培養装置の動作機構

細胞濃度を光センサーで測定し、コンピューター上の制御プログラムによって培地の追加量を自動計算して培養液へ培地を自動追加することで、細胞濃度を一定に保つ。細胞濃度は実験者が任意に設定することができる。また、同プログラムによって、単位時間あたりの培地追加量(体積)、または単位時間あたりの光センサーの電圧変化量から細胞分裂速度(細胞増殖速度)をリアルタイムに自動算出する。実験者が設定した任意の時間間隔で培養液を自動的にサンプリングし、発光検出部で生物発光量を自動測定して測定値を信号としてコンピュータへ送信する。発光検出部の測光デバイスは、光電子増倍管や高感度CCDカメラなどを使用する。コンピュータが受信した信号は、プログラムによって自動処理されて生物発光量がリアルタイム測定される。さらに、実験者が設定した任意のタイミングで培養液を自動的にサンプリングして、凍結保存容器中で保存する。生物発光測定のためのサンプリングや凍結保存のためのサンプリングを自動実行した直後は毎回、洗浄システムでサンプリング経路に付着した細胞を自動的に洗浄して取り除く。このように一連の動作によって、洗浄システムによって、細胞を自動的に洗浄することが可能である。

[0081] このようにして洗浄システムを用いることによって、送液チューブ内を常にクリーンな状態にすることができることが分かる。

[0082] 実施例4

次に、本発明の別の実施態様に係る装置について検討を加えた。この実施態様は、図2の装置に変更を加えたものであり、実施例3で述べた洗浄機構を利用している。

本装置における生物発光のリアルタイム測定の仕組みについて説明すれば、以下の通りである。

[0083] (a)はホタルルシフェラーゼなど水溶性の発光基質を要求する生物発光系をレポーターに持った細胞の生物発光リアルタイム測定法である。まず、連続培養している培養液を送液ポンプで三叉路へ送液する。同時に別の送液ポンプでD-ルシフェリンなどの水溶性の基質を三叉路へ送液して培養液と混合し、培養液とルシフェリンの混合

液を光電子増倍管などの測光デバイスの直下へ送液する。次に、測光デバイスで生物発光を測定し、測定データをコンピュータへ送信して記録する。コンピュータ上のプログラムで発光測定データをリアルタイムに視覚化および解析する。測定後の培養液は、廃液入れへ送液されて廃棄される。一連の動作は、コンピュータ上の制御プログラムによって実験者の設定した任意のタイミング・繰り返し回数・その他の設定値に基づいて自動的に実行される。

- [0084] (b)はバクテリアルシフェラーゼ遺伝子など揮発性物質を発光基質に要求する生物発光系をレポーターに持った細胞の生物発光リアルタイム測定法である。まず、連続培養している培養液を送液ポンプで送液する。送液チューブには通気性チューブを使用し、これをあらかじめn-デカナールなどの揮発性の基質を充満させておいた容器に通しておく。揮発性の基質は通気性チューブの中へ拡散することができるので、送液チューブの中を培養液がゆっくりと通過する過程で培養液中の細胞に発光基質が投与される。基質を投与された培養液を光電子増倍管などの測光デバイスの直下へ送液する。次に、測光デバイスで生物発光を測定し、測定データをコンピュータへ送信して記録する。コンピュータ上のプログラムで測定データをリアルタイムに視覚化および解析する。測定後の培養液は、廃液入れへ送液されて廃棄される。一連の動作は、コンピュータ上の制御プログラムによって実験者の設定した任意のタイミング・繰り返し回数・その他の設定値に基づいて自動的に実行される。

- [0085] こうして送液チューブ内をクリーンに保ちつつ測定を行うことができる結果、より高精度の装置を実現できることが分かる。

- [0086] 実施例5

次に、実施例1の実験手順にならって、単細胞性緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*の細胞増殖リズムのリアルタイムモニタリングについて調査した。

- [0087] 単細胞性緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*を1LのTAP液体培地に植え付け、本装置を用いて23℃、白色光照射下 ($46 \mu \text{mol/m}^2/\text{sec}$) で通気培養を行った。培養液の細胞濃度が $\text{OD}_{730} = 0.3$ になるまで細胞を増殖させ、細胞濃度をこの値に保つように連続培養を行った。連続培養中に12時間の暗期を培養液に与えて細胞内の生物時計をリセットした後、連続白色光照射下 ($46 \mu \text{mol/m}^2/\text{sec}$) へ移してこの時刻を0時間目

とした。連続明開始からの細胞の増殖速度をリアルタイム測定した。図8aは、培養液に追加した培地の体積から本明細書段落番号[0036]に記載の計算式によって細胞増殖速度を算出した場合であり、図8bは、培養液の細胞濃度変化を光センサーの電圧変化として捉えて本明細書段落番号[0040]に記載の計算式によって細胞増殖速度を算出した場合である。いずれの場合も、細胞増殖速度は1時間あたりの細胞数の増殖倍率として図中に表示した。その結果、いずれの計算方法を用いた場合も、細胞増殖速度の変動パターンを概日リズムとして測定することができた。したがって、本装置を用いて2つの計算方法のいずれを用いても、細胞増殖速度をリアルタイム測定できることが実証された。

[0088] 実施例6

次に、種々の生物の発光レポーター株における生物発光リズムのリアルタイム測定を行った。

[0089] (a) 常温性藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 の $P_{kaiBC}::luxAB$ 発光レポーター株の生物発光リズム(図9(a))

[0090] バクテリアルシフェラーゼ遺伝子 $luxAB$ を発光レポーターに持つ *Synechococcus* を 1 L の BG-11 液体培地に植え付け、本装置を用いて 30°C、白色光照射下 ($20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) で 5% CO_2 ガスを通気して培養を行った。培養液の細胞濃度が $\text{OD}_{730}=0.3$ になるまで細胞を増殖させ、細胞濃度をこの値に保つように連続培養を行った。連続培養中に 12 時間の暗期を培養液に与えて細胞内の生物時計をリセットした後、連続白色光照射下 ($20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) へ移してこの時刻を 0 時間目とした。そして、連続明開始からの生物発光を本装置でリアルタイム測定した。その結果、 $P_{kaiBC}::luxAB$ 発光レポーター遺伝子の発現を明瞭な生物発光リズムとしてリアルタイム測定することができた。

[0091] (b) 好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* の $P_{kaiA}::luc_{Te}$ 発光レポーター株の生物発光リズム(図9(b))

[0092] *Thermosynechococcus* のゲノムに最適化した耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子 luc_T を発光レポーターに持つ *Thermosynechococcus* を 1 L の BG-11 液体培地に植え付け、本装置を用いて 50°C、白色光照射下 ($45 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) で 5% CO_2 ガスを通気して

培養を行った。培養液の細胞濃度が $OD_{730}=2.0$ という高濃度になるまで細胞を増殖させ、細胞濃度をこの値に保つように連続培養を行った。連続培養中に12時間の暗期を培養液に与えて細胞内の生物時計をリセットした後、連続白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) へ移してこの時刻を0時間目とした。そして、連続明開始からの生物発光を本装置でリアルタイム測定した。その結果、 $P_{\text{kaiA}}::\text{luc}_{\text{Te}}$ 発光レポーター遺伝子の発現を明瞭な生物発光リズムとしてリアルタイム測定することができた。したがって、本装置は高濃度の培養液においても生物発光レポーター株の生物発光リアルタイム測定が可能であることが実証された。

[0093] (c) 単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の $P_{\text{psbD}}::\text{lucCP}$ 発光レポーター株の生物発光リズム (図9(c))

[0094] *Chlamydomonas* の葉緑体ゲノムに最適化したホタルルシフェラーゼ遺伝子 lucCP を発光レポーターに持つ *Chlamydomonas* を1LのTAP液体培地に植え付け、本装置を用いて23℃、白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) で通気培養を行った。培養液の細胞濃度が $OD_{730}=0.35$ になるまで細胞を増殖させ、細胞濃度をこの値に保つように連続培養を行った。連続培養中に12時間の暗期を培養液に与えて細胞内の生物時計をリセットした後、連続白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) へ移してこの時刻を0時間目とした。そして、連続明開始からの生物発光を本装置でリアルタイム測定した。その結果、 $P_{\text{psbD}}::\text{lucCP}$ 発光レポーター遺伝子の発現を明瞭な生物発光リズムとしてリアルタイム測定することができた。*Chlamydomonas* は真核生物なので、本装置は真核生物の生物発光レポーター株の生物発光リアルタイム測定が可能であることが実証された。

[0095] 実施例7

次に、*Chlamydomonas reinhardtii* の psbD 遺伝子のノーザン解析について調べた。

[0096] 単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を1LのTAP液体培地に植え付け、本装置を用いて23℃、白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) で通気培養を行った。細胞濃度が $OD_{730}=0.35$ になるまで細胞を増殖させ、細胞濃度をこの濃度に保つように連続培養を行った。連続培養中に12時間の暗期を培養液に与えて生物時計をリセットした後、連続白色光照射下 ($45 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) へ移してこの時刻を0時間目とした。本装置の自動サンプリング機能を用いて、*Chlamydomonas* の細胞を4時間間隔で50mlず

つサンプリングし、極低温に凍結保存した。極低温で凍結保存した細胞から全RNAを抽出し、Chlamydomonasの葉緑体遺伝子であるpsbDの発現をノーザン解析した(図10)。rRNAを染色して対照とした。その結果、psbD mRNAレベルの変動を概日リズムとして捉えることができた。したがって、本装置で培養、サンプリング、凍結保存した細胞から抽出したRNAは質的に十分良質であり、ノーザン解析などの実験に用いることが可能であることが実証された。

産業上の利用可能性

[0097] 基礎研究、医療、醸造などの種々の分野における細胞の液体培養に利用することができる。

請求の範囲

- [1] コンピュータを、
細胞濃度センサーからの測定値を読み取り、記録する手段、
予め細胞濃度の設定値データを記録する手段、
前記設定値データと前記測定値とを比較して、前記設定値が高い場合に培地を培養液へ供給し、低い場合に前記培地の供給を停止するように培地供給装置へ制御信号を送る手段、
前記培地の供給量を記録する手段、
として機能させるための制御プログラム。
- [2] さらに、コンピュータを、
予め入力した細胞濃度センサーからの測定値と細胞濃度との相関関係を利用して、培養液中の細胞濃度を算出する手段、
前記算出された細胞濃度データを記録する手段、
前記記録された測定値と、前記記録された細胞濃度と、測定期間中の前記記録された測定値の変化量とによって、細胞増殖率を算出する手段、
として機能させるための請求項1記載の制御プログラム。
- [3] コンピュータを、
前記記録された培地の供給量と培養液の体積によって、細胞増殖率を算出する手段、
として機能させるための請求項1記載の制御プログラム。
- [4] コンピュータを、
予め設定されたタイミングで細胞のサンプリングを行うようにサンプリング装置へ制御信号を出力する手段、
として機能させるための請求項1～3のいずれか1項に記載の制御プログラム。
- [5] コンピュータを、
リアルタイムに送られてくる前記測定値に基づいて、前記細胞増殖率を表示する手段と、
所定時間後に新たにリアルタイムに送られてくる測定値に基づいて、前記細胞増殖

- 率をリアルタイムで更新表示する手段、
- として繰り返し実行させるための請求項1～4項のいずれか1項に記載の制御プログラム。
- [6] さらに、コンピュータを、
- リアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号に基づいてリアルタイムでの生物試料の発光測定結果の表示内容を記録する手段、
- 前記記録した表示内容を比較する手段、
- として機能させる請求項1～5項のいずれか1項に記載の制御プログラム。
- [7] コンピュータを、
- リアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果及び細胞増殖速度結果に基づいて前記サンプリングのタイミングを制御し、前記サンプリング装置へ制御信号を出力する手段、
- として機能させるための請求項1～6項のいずれか1項に記載の制御プログラム。
- [8] 請求項1～7項のいずれか1項に記載のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体。
- [9] 連続培養部と、前記連続培養部からサンプリングされた培養液中に存在する生物試料の生物発光を測定する発光測定部と、前記連続培養部からの培養液のサンプリングを行うサンプリング部と、制御用コンピュータとからなる培養装置。
- [10] さらに、生物試料を保管する保管部を含む請求項9記載の装置。
- [11] 前記サンプリング部が、前記生物発光を測定するため又は保管部へ保管するために、生物試料のサンプリングを行う請求項9又は10記載の装置。
- [12] 前記発光測定部が、生物発光を測定するために生物試料に発光基質を供給するための手段を含む請求項9～11のいずれか1項に記載の装置。
- [13] 前記制御用コンピュータが、請求項1～7項のいずれか1項に記載の制御プログラムによって制御される請求項9～12項のいずれか1項に記載の装置。
- [14] さらに洗浄システム部を含む請求項9～13項のいずれか1項に記載の装置。

[図1]

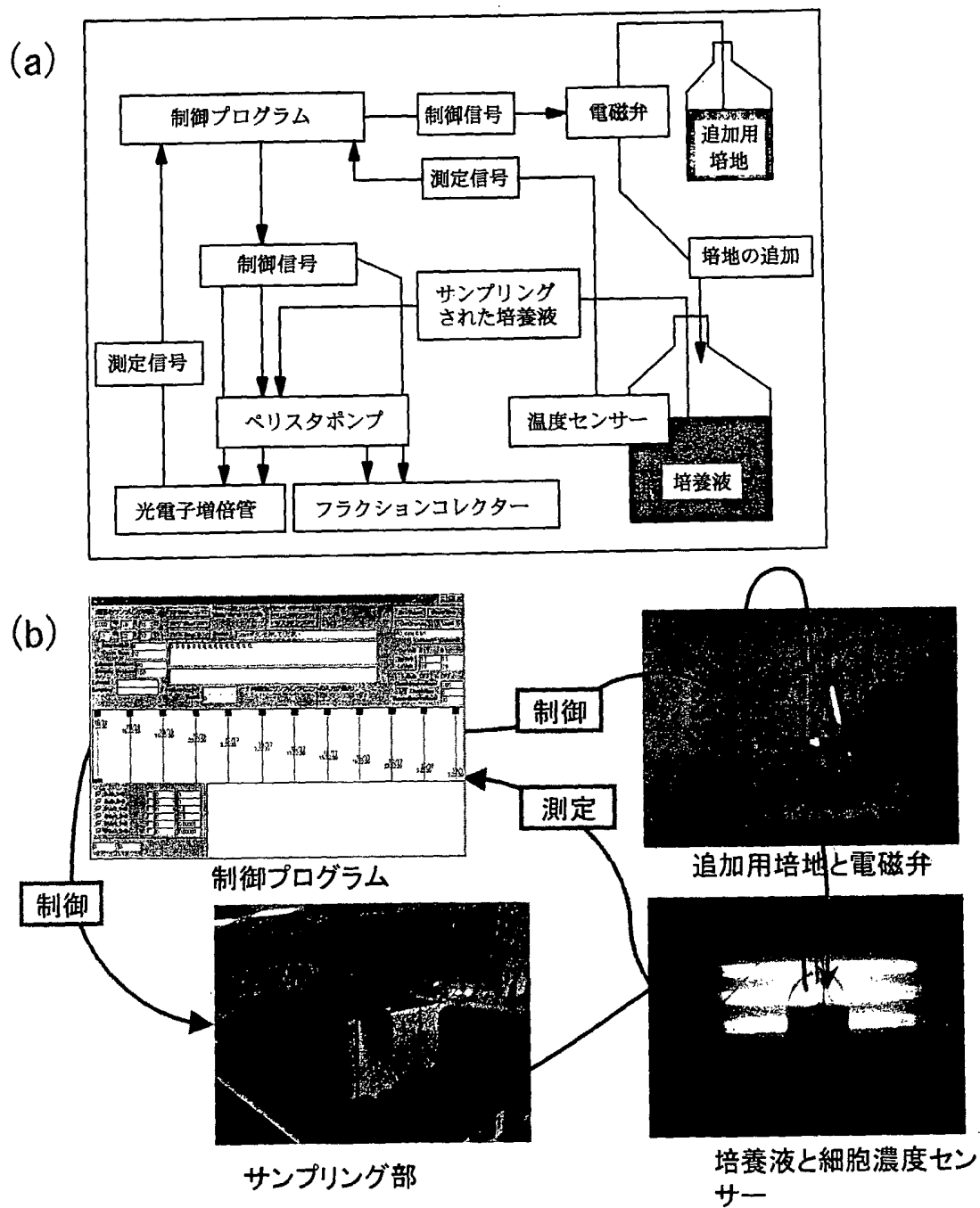
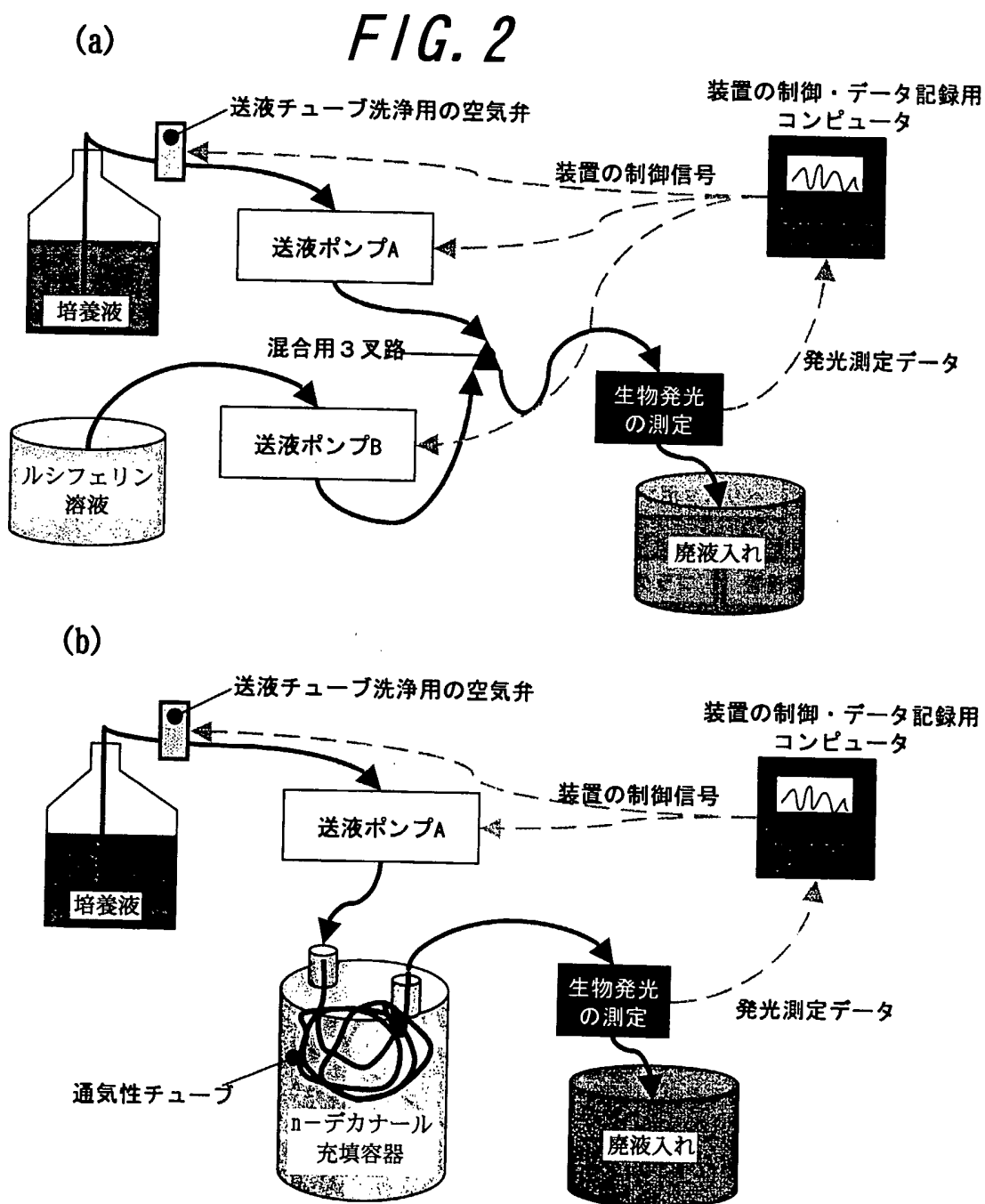


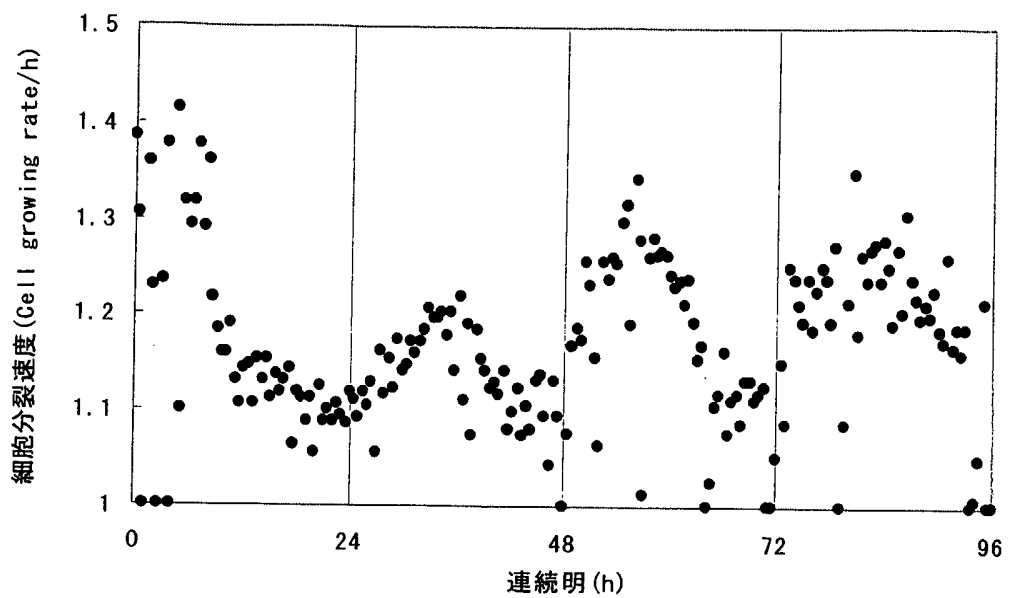
FIG.1

[図2]



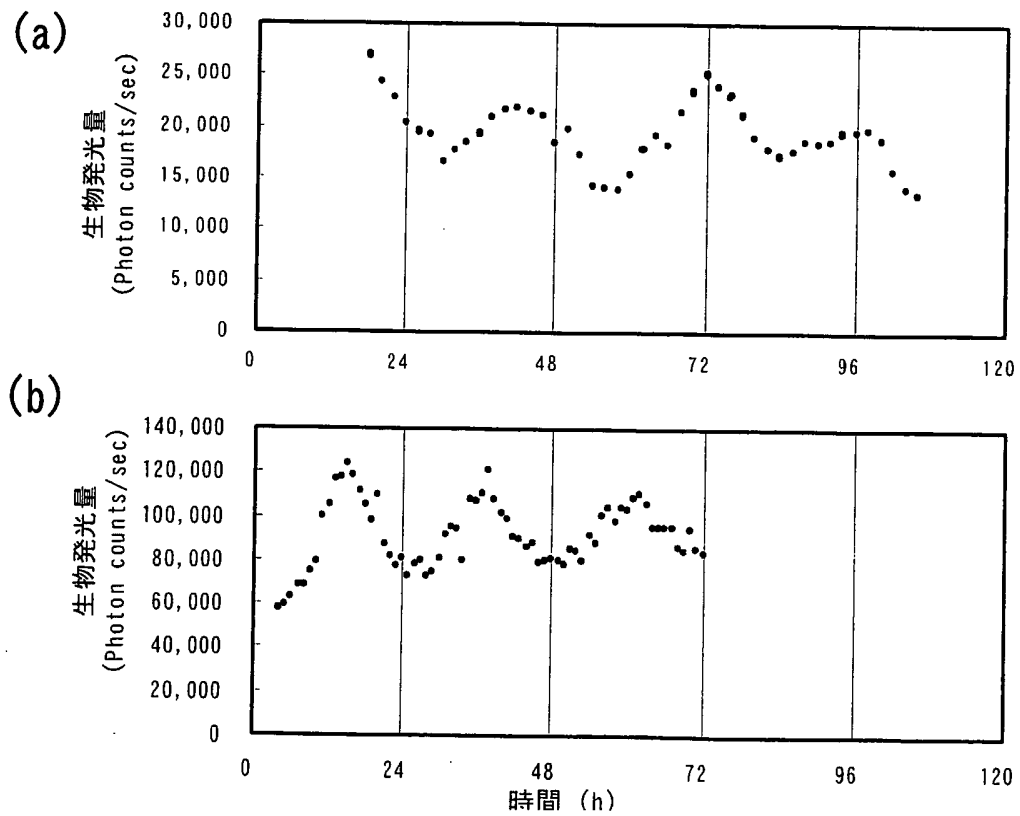
[図3]

FIG.3



[図4]

FIG.4



[図5]

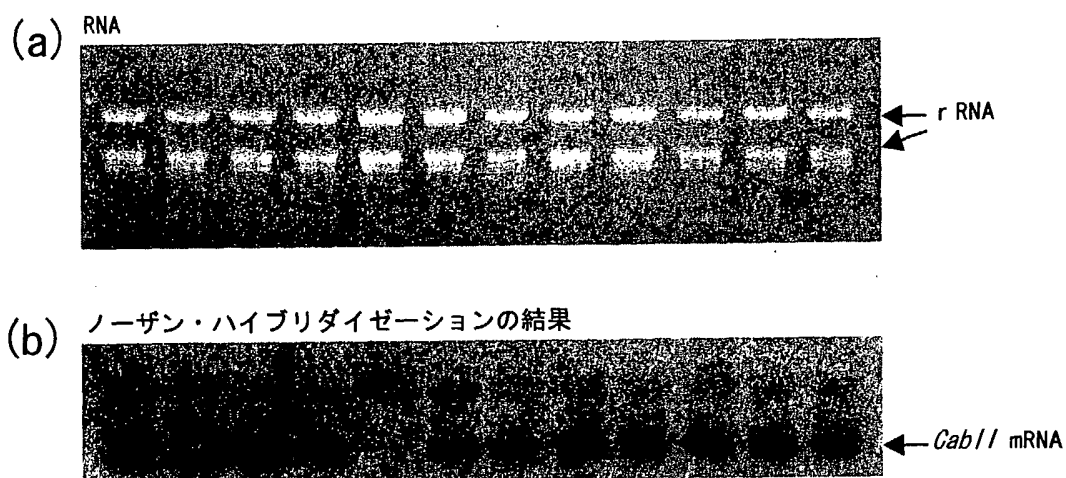
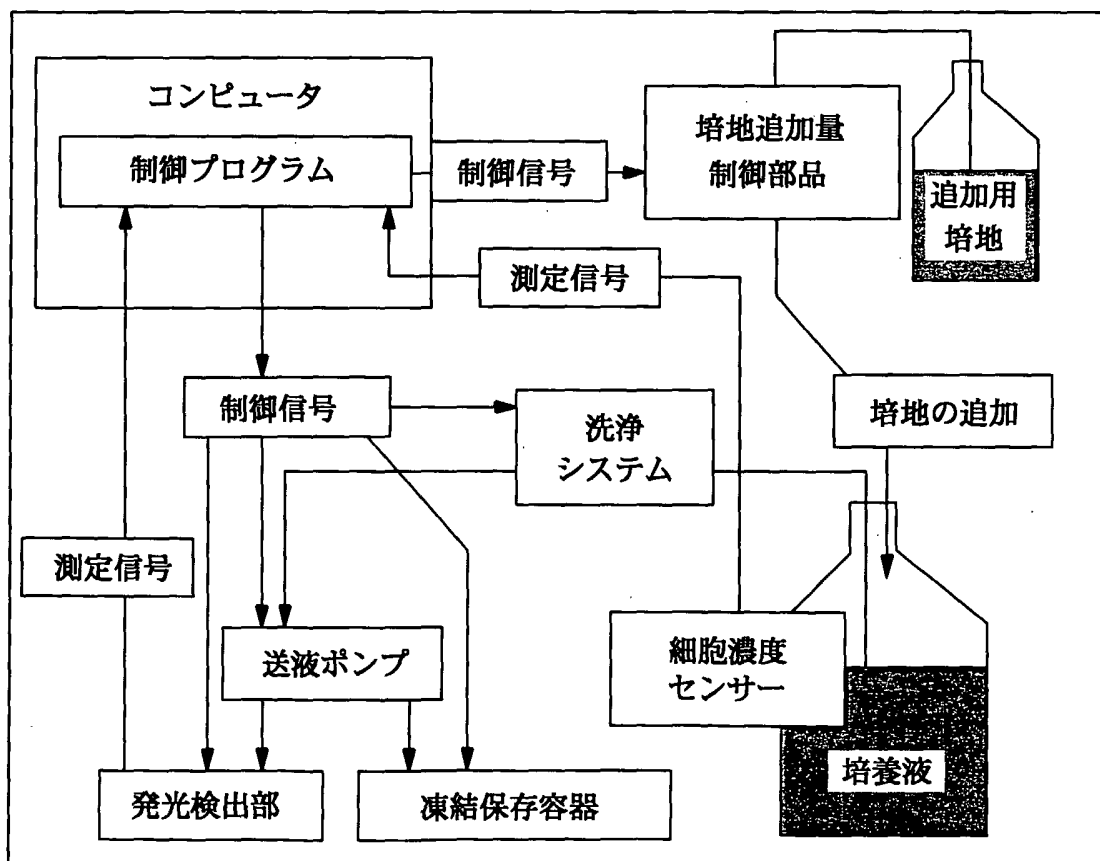


FIG.5

[図6]

FIG. 6



[図7]

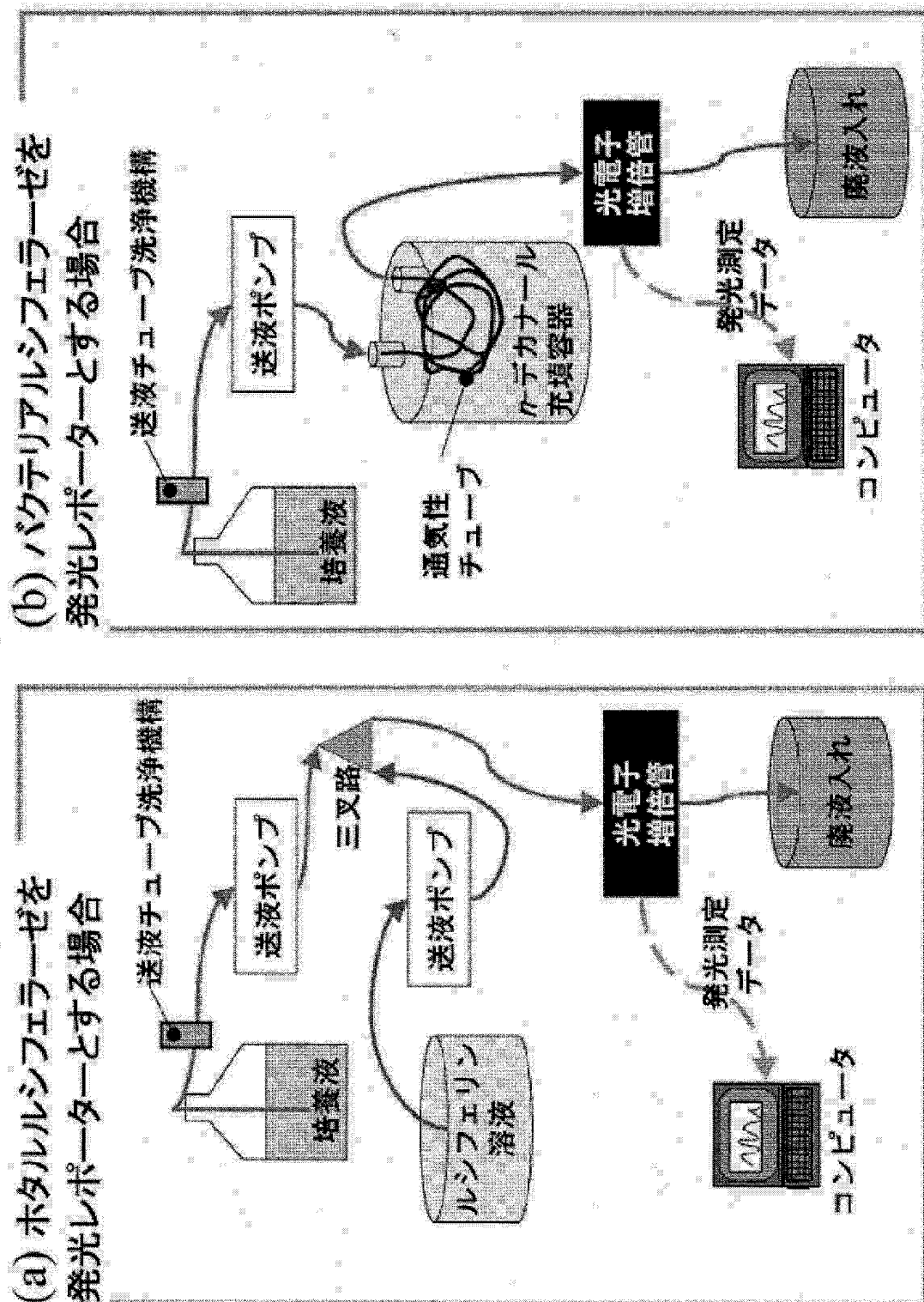


FIG.7

[図8]

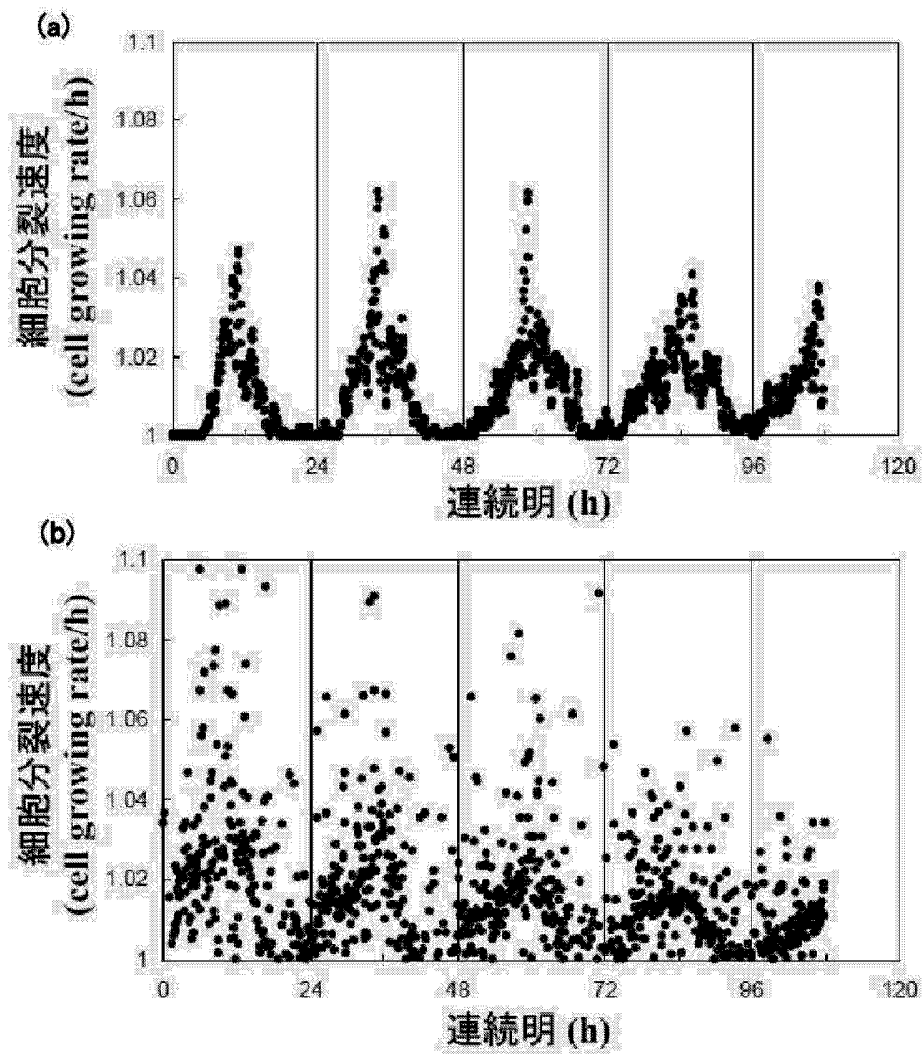


FIG.8

[図9]

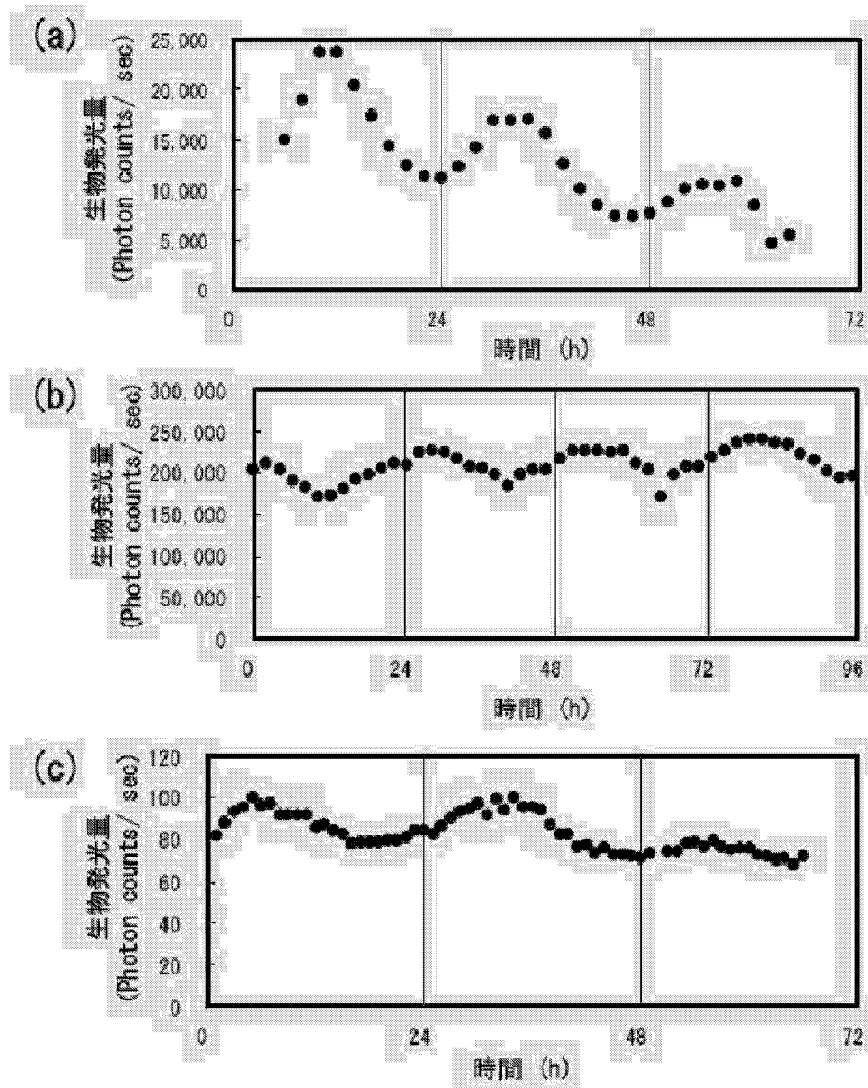
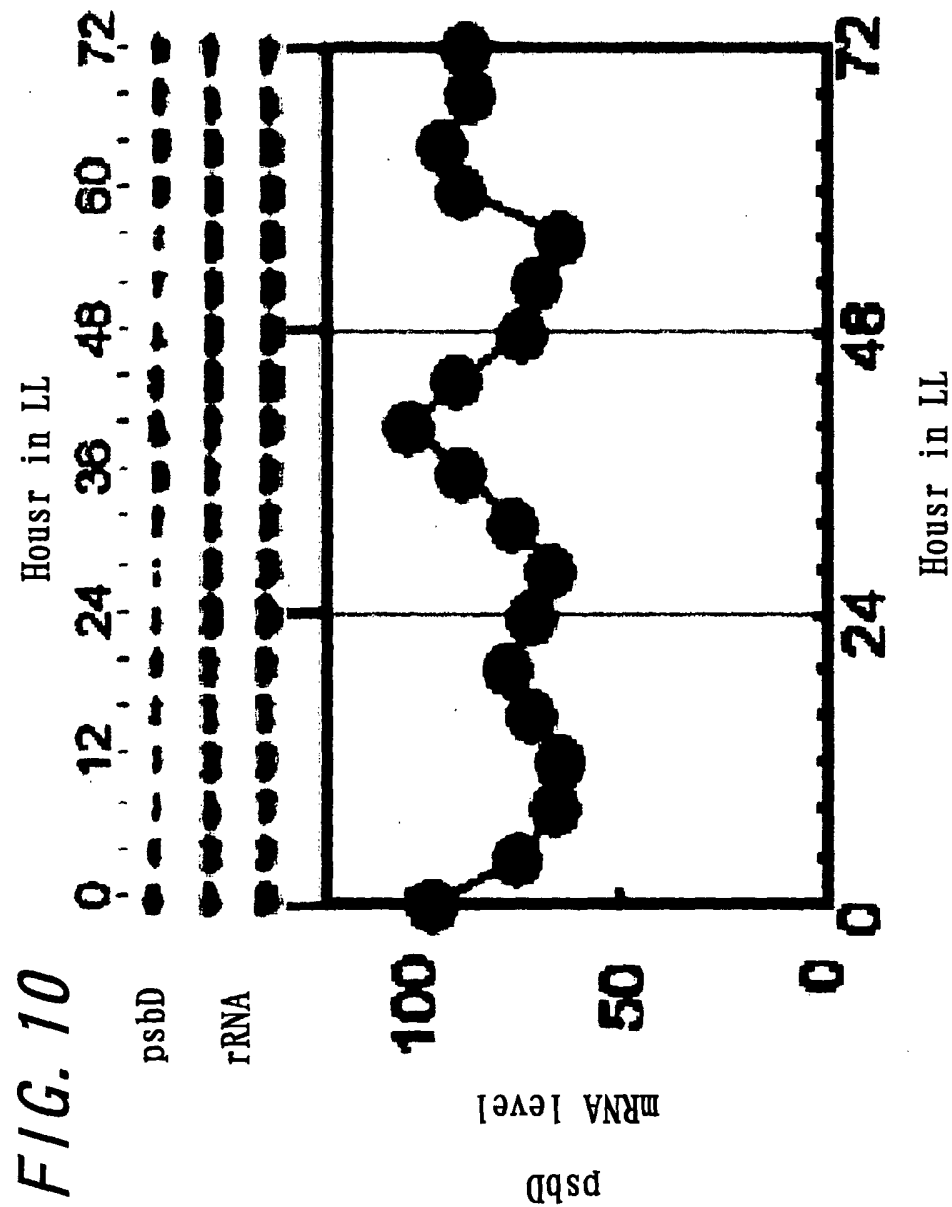


FIG.9

[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01), **C12M1/00** (2006.01), **C12M1/36** (2006.01),
G01F19/00 (2006.01)

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)

C12N15/00 (2006.01) - **C12N15/09** (2006.01), **C12M1/00** (2006.01) - **C12M3/10**
(2006.01), **G01F19/00** (2006.01)

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
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 06-054678 A (CHUO SETSUBI ENG. K.K.), 01 March, 1994 (01.03.94), (Family: none)	1-14
Y	JP 07-184634 A (AJINOMOTO CO. INC.), 25 July, 1995 (25.07.95), & EP 0661380 A2	1-14
Y	JP 2002-027987 A (ZH SHINSANGYO SOZO KENKYU KIKO), 29 January, 2002 (29.01.02), (Family: none)	9-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier 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
26 January, 2006 (26.01.06)

Date of mailing of the international search report
07 February, 2006 (07.02.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023803

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KONDO T. et al., "Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.90, (1993), pages 5672 to 5676	9-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01), C12M1/00(2006.01), C12M1/36(2006.01), G01F19/00(2006.01)			
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. C12N15/00(2006.01)~C12N15/09(2006.01), C12M1/00(2006.01)~C12M3/10(2006.01), G01F19/00(2006.01)			
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 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006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)			
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 請求の範囲の番号	
Y	JP 06-054678 A (CHUO SETSUBI ENG. K.K.) 1994.03.01 (ファミリー無し)	1-14	
Y	JP 07-184634 A (AJINOMOTO CO. INC.) 1995.07.25 & EP 0661380 A2	1-14	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 26.01.2006		国際調査報告の発送日 07.02.2006	
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) 齊藤真由美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-027987 A (ZH SHINSANGYO SOZO KENKYU KIKO) 2002.01.29 (ファミリー無し)	9-14
A	KONDO T.et al., "Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.90, (1993), p.5672-5676.	9-14