

(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
2017 年 10 月 12 日(12.10.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/175751 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 21/00 (2006.01) C12N 11/12 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/014064
- (22) 国際出願日: 2017 年 4 月 4 日(04.04.2017)
- (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 2016-075251 2016 年 4 月 4 日(04.04.2016) JP
- (71) 出願人: 日産化学工業株式会社(NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 Tokyo (JP). 独立行政法人国立高等専門学校機構(NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, JAPAN) [JP/JP]; 〒1930834 東京都八王子市東浅川町 7 0 1 番 2 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 金木 達朗(KANAKI, Tatsuro); 〒3490294 埼玉県白岡市白岡 1 4 7 0 日産化学工業株式会社 生物科学研究所内 Saitama (JP). 林 寿人(HAYASHI, Hisato); 〒2740052 千葉県船橋市鈴身町 4 8 8 番地 6 日産化学工業株式会社 材料科学研究所内 Chiba (JP). 川原 浩治(KAWAHARA, Hiroharu); 〒8020985 福岡県北九州市小倉南区志井 5 丁目 2 0 番 1 号 北九州工業高等専門学校内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, 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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).
- 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))

(54) Title: PROTEIN PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: タンパク質産生方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing proteins in which cells having protein-producing capability are suspension-cultured, under physically agitated conditions, in a medium composition containing nanofibers, said cells being adhered to the nanofibers.

(57) 要約: 本発明は、ナノファイバーを含有する培地組成物中、タンパク質産生能を有する細胞を、該ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養することを含む、タンパク質の産生方法を提供する。



WO 2017/175751 A1

明 細 書

発明の名称：タンパク質産生方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養によりタンパク質を産生する技術に関する。

背景技術

[0002] 近年、生命科学の分野では、目的とする有用タンパク質（抗体やワクチン等）を産生する動物細胞を大量培養することにより、有用タンパク質を工業的規模で産生することが非常に重要になってきている。動物細胞培養を用いた有用タンパク質の生産において、抗体などは浮遊培養が可能なCHO-DG44細胞等を用い、ワクチンなどはMDCK細胞やVero細胞をマイクロキャリア粒子に接着させた状態で培養している。しかしCHO-DG44培養でタンパク質を生産させる場合はすでに確立された多数の権利による制約下で実施しなくてはならない。さらに最近ヒト細胞を用いるヒト糖鎖修飾型の抗体生産法の開発が進められているが、開発中のPerC6細胞は同様に多数の権利による制約下で実施する必要がある。また同じヒト由来のHEK293細胞は接着性であることから浮遊培養に適していない。さらに自ら浮遊化し増殖する能力を有する細胞は、がん化のリスクがあるため、ポストCHO-DG44細胞に該当する細胞が出てこない状況である。

[0003] 一方、ワクチン生産で用いられるマイクロキャリア法は、MDCK細胞やVero細胞をキャリアー表面に接着させて培養する方法である。この方法の場合、攪拌培養が必要であるが、その攪拌によりキャリアー同士の衝突による表面上の細胞障害が問題となっている。この細胞障害はタンパク生産効率に悪影響を及ぼすことから、それに代わる新しい浮遊培養法の確立が望まれている。

[0004] 本発明者らは、細胞の培養に関し、特に動物細胞によるタンパク質の高産生化に適したタンパク質産生促進剤及びそれを含有する培地、該タンパク質産生促進剤及びそれを含有する培地を用いたタンパク質の製造方法を報告し

ている（特許文献1）。

- [0005] また、セルロースやキチン等の多糖類からなるナノファイバーを液体培地中に混合することにより、該液体培地の粘度を実質的に高めることなく、動植物細胞及び／又は組織を静置した状態で浮遊培養し得ること、この培地組成物を用いて培養することにより細胞の増殖活性が亢進することが報告されている（特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：WO 2014/030726 A1
特許文献2：WO 2015/111686 A1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、浮遊培養を用いた接着性細胞によるタンパク質生産を、より効率化する技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは鋭意検討の結果、セルロースやキチン等の多糖類からなるナノファイバーを含む液体培地中で、該ナノファイバーに接着させたタンパク質産生細胞を、攪拌条件下で、浮遊培養することにより、タンパク質産生量が顕著に増大することを見出し、本発明を完成させるに至った。

- [0009] すなわち、本発明は下記のとおりである：

- [0010] [1] ナノファイバーを含有する培地組成物中、タンパク質産生能を有する細胞を、該ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養することを含む、タンパク質の産生方法。

[2] 該ナノファイバーが、セルロース、キチン及びキトサンからなる群から選択されるいずれかの非水溶性多糖類から構成される、[1]に記載の方法。

[3] 該ナノファイバーが、キチンナノファイバーである、[1]に記載の方法。

[4] 培地組成物中のキチンナノファイバーの含有量が、0.003～0.1%（重量／容量）である、[3] に記載の方法。

[5] 該細胞が接着細胞である、[1] ～ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] ナノファイバーを含有する培地組成物中、細胞を、該ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養することを含む、細胞の増殖方法。

[7] 該ナノファイバーが、セルロース、キチン及びキトサンからなる群から選択されるいずれかの非水溶性多糖類から構成される、[6] に記載の方法。

[8] 該ナノファイバーが、キチンナノファイバーである、[6] に記載の方法。

[9] 培地組成物中のキチンナノファイバーの含有量が、0.003～0.1%（重量／容量）である、[8] に記載の方法。

[10] 該細胞が接着細胞である、[6] ～ [9] のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、細胞を効率的に増殖させ、酵素、細胞増殖因子、抗体等のタンパク質の大量生産を実施することができる。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、更に詳細に本発明を説明する。

本明細書において用いる用語につき、以下の通り定義する。

[0013] 本発明における細胞とは、動物或いは植物を構成する最も基本的な単位であり、その要素として細胞膜の内部に細胞質と各種の細胞小器官をもつものである。この際、DNAを内包する核は、細胞内部に含まれても含まれなくてもよい。例えば、本発明における動物由来の細胞には、精子や卵子などの生殖細胞、生体を構成する体細胞、幹細胞、前駆細胞、生体から分離された癌細胞、生体から分離され不死化能を獲得して体外で安定して維持される細胞（細胞株）、生体から分離され人為的に遺伝子改変が為された細胞、生体から分離され人為的に核が交換された細胞等が含まれる。生体を構成する体細胞の例としては、以下に限定されるものではないが、線維芽細胞、骨髄細胞、B

リンパ球、Tリンパ球、好中球、赤血球、血小板、マクロファージ、単球、骨細胞、骨髓細胞、周皮細胞、樹枝状細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝実質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神経系細胞、グリア細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、星状膠細胞、心臓細胞、食道細胞、筋肉細胞（たとえば、平滑筋細胞または骨格筋細胞）、膵臓ベータ細胞、メラニン細胞、造血前駆細胞、及び単核細胞等が含まれる。当該体細胞は、例えば皮膚、腎臓、脾臓、副腎、肝臓、肺、卵巣、膵臓、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、脾臓、膀胱、前立腺、精巣、胸腺、筋肉、結合組織、骨、軟骨、血管組織、血液、心臓、眼、脳または神経組織などの任意の組織から採取される細胞が含まれる。幹細胞とは、自分自身を複製する能力と他の複数系統の細胞に分化する能力を兼ね備えた細胞であり、その例としては、以下に限定されるものではないが、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛包幹細胞などが含まれる。前駆細胞とは、前記幹細胞から特定の体細胞や生殖細胞に分化する途中の段階にある細胞である。癌細胞とは、体細胞から派生して無限の増殖能を獲得した細胞である。細胞株とは、生体外での人為的な操作により無限の増殖能を獲得した細胞であり、その例としては、以下に限定されるものではないが、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞株）、HCT116、Huh7、HEK293（ヒト胎児腎細胞）、HeLa（ヒト子宮癌細胞株）、HepG2（ヒト肝癌細胞株）、UT7/TP0（ヒト白血病細胞株）、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、HT-29、AE-1、3D9、Ns0/1、Jurkat、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five（登録商標）、Vero等が含まれる。

[0014] 本発明における植物由来の細胞には、植物体の各組織から分離した細胞が含まれ、当該細胞から細胞壁を人為的に除いたプロトプラストも含まれる。

[0015] 本発明における組織とは、何種類かの異なった性質や機能を有する細胞が一定の様式で集合した構造の単位であり、動物の組織の例としては、上皮組

織、結合組織、筋組織、神経組織等が含まれる。植物の組織の例としては、分裂組織、表皮組織、同化組織、葉肉組織、通道組織、機械組織、柔組織、脱分化した細胞塊（カルス）等が含まれる。

[0016] 細胞及び／又は組織を培養するに際し、培養する細胞及び／又は組織は、前記に記載した細胞及び／又は組織から任意に選択して培養することができる。細胞及び／又は組織は、動物或いは植物体より直接採取することができる。細胞及び／又は組織は、特定の処理を施すことにより動物或いは植物体から誘導させたり、成長させたり、または形質転換させた後に採取してもよい。この際、当該処理は生体内であっても生体外であってもよい。動物としては、例えば魚類、両生類、爬虫類、鳥類、汎甲殻類、六脚類、哺乳類等が挙げられる。哺乳動物の例としては、限定されるものではないが、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、リス、ハムスター、ハタネズミ、カモノハシ、イルカ、クジラ、イヌ、ネコ、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ゾウ、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル、チンパンジーおよびヒトが挙げられる。植物としては、採取した細胞及び／又は組織が液体培養可能なものであれば、特に限定はない。例えば、生薬類（例えば、サポニン、アルカロイド類、ベルベリン、スコポリン、植物ステロール等）を生産する植物（例えば、薬用人参、ニチニチソウ、ヒヨス、オウレン、ベラドンナ等）や、化粧品・食品原料となる色素や多糖体（例えば、アントシアニン、ベニバナ色素、アカネ色素、サフラン色素、フラボン類等）を生産する植物（例えば、ブルーベリー、紅花、セイヨウアカネ、サフラン等）、或いは医薬品原体を生産する植物などがあげられるが、それらに限定されない。

[0017] 本発明において、細胞の浮遊とは、培養容器に対して細胞が接着しない状態（非接着）であることをいう。さらに、本発明において、細胞を増殖、分化或いは維持させる際、液体培地組成物に対する外部からの圧力や振動或いは当該組成物中での振とう、回転操作等を伴わずに細胞が当該液体培地組成物中で均一に分散し尚且つ浮遊状態にある状態を「浮遊静置」といい、当該状態で細胞を培養することを「浮遊静置培養」という。「浮遊静置」におい

て浮遊させることのできる期間としては、少なくとも5分以上、好ましくは、1時間以上、24時間以上、48時間以上、6日以上、21日以上であるが、浮遊状態を保つ限りこれらの期間に限定されない。

[0018] [ナノファイバー]

本発明に用いる培地組成物中に含まれるナノファイバーは、液体培地中で、細胞を浮遊させる効果を示すものである。例えば、高分子化合物からなる比較的大きな線維構造体を高圧処理などにより微細化することにより得られたナノファイバー等が、本発明の方法に用いる培地組成物中に含まれるナノファイバーとして挙げられる。

[0019] 本明細書において、ナノファイバーとは、平均線維径 (D) が、0.001乃至1.00 μm の線維をいう。本発明に用いるナノファイバーの平均線維径は、好ましくは、0.005乃至0.50 μm 、より好ましくは0.01乃至0.05 μm 、更に好ましくは0.01乃至0.02 μm である。平均線維径が0.001 μm 未満であると、ナノファイバーが微細すぎるにより浮遊効果が得られない恐れがあり、それを含有する培地組成物の特性の改善につながらない可能性がある。

[0020] 本発明に用いるナノファイバーのアスペクト比 (L/D) は、平均線維長／平均線維径より得られ、通常2～500であり、好ましくは5～300であり、より好ましくは10～250である。アスペクト比が2未満の場合には、培地組成物中の分散性に欠け、浮遊作用が十分に得られない恐れがある。500を超える場合には、線維長が極めて大きくなることを意味することから、当該組成物の粘度を上昇させることにより培地交換など継代操作に支障をきたす恐れがある。また、培地組成物が可視光を透過しづらくなることから透明性の低下につながり、培養細胞の経時的な観察が困難となることや吸光・蛍光・発光などを用いた細胞評価に支障をきたす可能性がある。

[0021] 尚、本明細書中、ナノファイバーの平均線維径 (D) は以下のようにして求める。まず応研商事 (株) 製コロジオン支持膜を日本電子 (株) 製イオンクリーナ (JIC-410) で3分間親水化処理を施し、評価対象のナノファイバー分散液 (超純水にて希釈) を数滴滴下し、室温乾燥する。これを (株) 日立製

作所製透過型電子顕微鏡（TEM、H-8000）（10,000倍）にて加速電圧200kVで観察し、得られた画像を用いて、標本数：200～250本のナノファイバーについて一本一本の線維径を計測し、その数平均値を平均線維径（D）とする。

[0022] また、平均線維長（L）は、以下のようにして求める。評価対象ナノファイバー分散液を純水により100ppmとなるように希釈し、超音波洗浄機を用いてナノファイバーを均一に分散させた。このナノファイバー分散液を予め濃硫酸を用いて表面を親水化処理したシリコンウェハー上へキャストし、110℃にて1時間乾燥させて試料とする。得られた試料の日本電子（株）製走査型電子顕微鏡（SEM、JSM-7400F）（2,000倍）で観察した画像を用いて、標本数：150～250本のナノファイバーについて一本一本の線維長を計測し、その数平均値を平均線維長（L）とする。

[0023] 本発明に用いるナノファイバーは、液体培地と混合した際、一次線維径を保ちながら当該ナノファイバーが当該液体中で均一に分散し、分散したナノファイバーへ細胞が付着することにより、細胞の沈降を防ぐ。

[0024] ナノファイバーを構成する原料は、非水溶性多糖類である。非水溶性多糖類としては、セルロース、ヘミセルロース等のセルロース類；キチン、キトサン等のキチン質等を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0025] セルロースとは、ブドウ糖の6員環であるD-グルコピラノースが β -1,4グルコシド結合した天然高分子化合物である。原料としては、例えば、木材、竹、麻、ジュート、ケナフ、コットン、農作物・食物残渣など植物由来のセルロース、又はバクテリアセルロース、シオグサ（クラドフォラ）、灰色植物（グラウコキスチス）、バロニア、ホヤセルロースなど、微生物産生若しくは動物産生のセルロースを使用することができる。植物由来のセルロースはミクロフィブリルと呼ばれる非常に細い線維がさらに束になりフィブリル、ラメラ、線維細胞と段階的に高次構造を形成している。また、バクテリアセルロースは菌細胞から分泌されたセルロースのミクロフィブリルが、そのままの太さで微細な網目構造を形成している。

[0026] 本発明において、コットンやバクテリアセルロースなど高純度のセルロー

ス原料は原料のまま用いる事ができるが、これ以外の植物由来のセルロースなどは、単離・精製したものをを用いる事が好ましい。本発明において好適に用いられるセルロースは、コットンセルロース、バクテリアセルロース、クラフトパルプセルロース、微結晶セルロース等である。特に、高い浮遊作用を有することから、クラフトパルプセルロースが好適に用いられる。

[0027] キチン質とは、キチン及びキトサンからなる群より選ばれる1以上の糖質をいう。キチン及びキトサンを構成する主要な糖単位は、それぞれ、N-アセチルグルコサミン及びグルコサミンであり、一般的に、N-アセチルグルコサミンの含有量が多く酸性水溶液に対し難溶性であるものがキチン、グルコサミンの含有量が多く酸性水溶液に対し可溶性であるものがキトサンとされる。本明細書においては、便宜上、構成糖に占めるN-アセチルグルコサミンの割合が50%以上のものをキチン、50%未満のものをキトサンと呼ぶ。高い浮遊作用を達成する観点から、キチンを構成する糖単位に占めるN-アセチルグルコサミンの割合が高いほど好ましい。キチンを構成する糖単位に占めるN-アセチルグルコサミンの割合は、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは98%以上、最も好ましくは100%である。

[0028] キチンの原料としては、例えば、エビ、カニ、昆虫、貝、キノコなど、多くの生物資源を用いることができる。本発明に用いるキチンは、カニ殻やエビ殻由来のキチンなどの α 型の結晶構造を有するキチンであってもよく、イカの甲由来のキチンなどの β 型の結晶構造を有するキチンであってもよい。カニやエビの外殻は産業廃棄物として扱われることが多く、入手容易でしかも有効利用の観点から原料として好ましいが、不純物として含まれるタンパク質や灰分等の除去のために脱タンパク工程および脱灰工程が必要となる。そこで、本発明においては、既に脱マトリクス処理が施された精製キチンを用いることが好ましい。精製キチンは、市販されている。

[0029] [ナノファイバーの調製]

本発明に用いる培地組成物は、上述の原料から調製されたナノファイバーを含む。

- [0030] ナノファイバーの原料が非水溶性の高分子化合物（例えば、セルロース、キチン等の非水溶性多糖類）である場合、通常は、当該原料を粉砕することにより、ナノファイバーを得る。粉砕方法は限定されないが、本発明の目的に合う後述する線維径・線維長にまで微細化するには、高圧ホモジナイザー、グラインダー（石臼）、あるいはビーズミルなどの媒体攪拌ミルといった、強いせん断力が得られる方法が好ましい。
- [0031] これらの中でも高圧ホモジナイザーを用いて微細化することが好ましく、例えば特開2005-270891号公報や特許第5232976号に開示されるような湿式粉砕法を用いて微細化（粉砕化）することが望ましい。具体的には、原料を分散させた分散液を、一对のノズルから高圧でそれぞれ噴射して衝突させることにより、原料を粉砕するものであって、例えばスターバーストシステム（株）スギノマシン製の高圧粉砕装置）やナノヴェイタ（吉田機械興業（株）の高圧粉砕装置）を用いることにより実施できる。
- [0032] 前述の高圧ホモジナイザーを用いて原料を微細化（粉砕化）する際、微細化や均質化の程度は、高圧ホモジナイザーの超高压チャンバーへ圧送する圧力と、超高压チャンバーに通過させる回数（処理回数）、及び水分散液中の原料の濃度に依存することとなる。圧送圧力（処理圧力）は、通常、50～250 MPaであり、好ましくは150～245MPaである。圧送圧力が50MPa未満の場合には、ナノファイバーの微細化が不十分となり、微細化により期待される効果が得られない恐れがある。
- [0033] また、微細化処理時の水分散液中の原料の濃度は0.1質量％～30質量％、好ましくは1質量％～10質量％である。水分散液中の原料の濃度が0.1質量％未満だと生産性が低く、30質量％より高い濃度だと粉砕効率が低く、所望のナノファイバーが得られない。微細化（粉砕化）の処理回数は、特に限定されず、前記水分散液中の原料の濃度にもよるが、原料の濃度が0.1～1質量％の場合には処理回数は10～100回程度で十分に微細化されるが、1～10質量％では10～1000回程度必要となる。また、30質量％を超える高濃度な場合は、数千回以上の処理回数が必要となることや、取扱いに支障をきたす程度まで高

粘度化が進むため、工業的観点から非現実的である。

[0034] 本発明の培地組成物中におけるナノファイバーの濃度は、培養する細胞のタンパク質産生及び／又は増殖を促進することが可能な範囲で、適宜設定することができる。

キチンナノファイバーの場合、通常0.003～0.1%（重量／容量）、好ましくは0.003～0.03%（重量／容量）、より好ましくは0.01～0.03%（重量／容量）の濃度で培地中に添加すれば良い。

セルロースナノファイバーの場合、通常0.0001%乃至1.0%（重量／容量）、例えば0.0005%乃至1.0%（重量／容量）、好ましくは0.001%乃至0.5%（重量／容量）、より好ましくは0.01%乃至0.1%（重量／容量）、更に好ましくは、0.01%乃至0.05%（重量／容量）の濃度で培地中に添加すれば良い。

セルロースナノファイバーのうちパルプセルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の下限値は、好ましくは、0.01%（重量／容量）以上、0.015%（重量／容量）以上、0.02%（重量／容量）以上、0.025%（重量／容量）以上、又は、0.03%（重量／容量）以上である。また、パルプセルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の上限値は、好ましくは0.1%（重量／容量）以下、又は0.04%（重量／容量）以下である。

微結晶セルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の下限値は、好ましくは0.01%（重量／容量）以上、0.03%（重量／容量）以上、又は0.05%（重量／容量）以上である。また、微結晶セルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の上限値は、好ましくは、0.1%（重量／容量）以下である。

セルロースナノファイバー、キチンナノファイバー等の非水溶性のナノファイバーについては、通常、0.1%（重量／容量）以下の濃度であれば、培地組成物の粘度を実質的に高めることはなく、取り扱うことが可能である。

[0035] [培地]

培養対象の細胞が動物（特に哺乳動物）由来である場合、動物細胞（好ましくは、哺乳動物細胞）培養に通常用いられる培地を用いることができる。

例えばダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagles' s Medi

um ; DMEM)、ハムF12培地 (Ham' s Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12培地、マッコイ5A培地 (McCoy' s 5A medium)、イーグルMEM培地 (Eagles' s Minimum Essential Medium ; EMEM)、 α MEM培地 (alpha Modified Eagle' s Minimum Essential Medium ; α MEM)、MEM培地 (Minimum Essential Medium)、RPMI1640培地、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium ; IMDM)、MCDB131培地、ウィリアム培地E、IPL41培地、Fischer' s培地、StemPro34 (インビトロジェン社製)、X-VIVO 10 (ケンブレックス社製)、X-VIVO 15 (ケンブレックス社製)、HPGM (ケンブレックス社製)、StemSpan H3000 (ステムセルテクノロジー社製)、StemSpanSFEM (ステムセルテクノロジー社製)、StemlineII (シグマアルドリッチ社製)、QBSF-60 (クオリティバイオリジカル社製)、StemProhESCSFM (インビトロジェン社製)、mTeSR1或いは2培地 (ステムセルテクノロジー社製)、Sf-900II (インビトロジェン社製)、Opti-Pro (インビトロジェン社製)、などが挙げられる。

- [0036] 培養対象の細胞が植物由来である場合、植物組織培養に通常用いられるムラシゲ・スクーグ (MS) 培地、リンズマイヤー・スクーグ (LS) 培地、ホワイト培地、ガンボーグB5培地、ニツチェ培地、ヘラー培地、モーレル培地等の基本培地、或いは、これら培地成分を至適濃度に修正した修正培地 (例えば、アンモニア態窒素濃度を半分にする等) に、オーキシン類及び必要に応じてサイトカイニン類等の植物生長調節物質 (植物ホルモン) を適当な濃度で添加した培地が培地として挙げられる。これらの培地には、必要に応じて、カゼイン分解酵素、コーンステープリカー、ビタミン類等をさらに補充することができる。オーキシン類としては、例えば、3-インドール酢酸 (IAA)、3-インドール酪酸 (IBA)、1-ナフタレン酢酸 (NAA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 等が挙げられるが、それらに限定されない。オーキシン類は、例えば、約0.1~約10ppmの濃度で培地に添加され得る。サイトカイニン類としては、例えば、カイネチン、ベンジルアデニン (BA)、ゼアチン等が挙げられるが、それらに限定されない。サイトカイニン類は、例えば、

約0.1～約10ppmの濃度で培地に添加され得る。

[0037] 上記の培地には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、各種アミノ酸、各種ビタミン、抗生物質、血清、脂肪酸、糖などを当業者は目的に応じて自由に添加してもよい。動物由来の細胞及び／又は組織培養の際には、当業者は目的に応じてその他の化学成分あるいは生体成分を一種類以上組み合わせて添加することもできる。動物由来の細胞及び／又は組織の培地に添加される成分としては、ウシ胎児血清、ヒト血清、ウマ血清、インシュリン、トランスフェリン、ラクトフェリン、コレステロール、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、モノチオグリセロール、2-メルカプトエタノール、ウシ血清アルブミン、ピルビン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、各種ビタミン、各種アミノ酸、寒天、アガロース、コラーゲン、メチルセルロース、各種サイトカイン、各種ホルモン、各種増殖因子、各種細胞外マトリックスや各種細胞接着分子などが挙げられる。培地に添加されるサイトカインとしては、例えばインターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-11 (IL-11)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-13 (IL-13)、インターロイキン-14 (IL-14)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)、インターロイキン-21 (IL-21)、インターフェロン- α (IFN- α)、インターフェロン- β (IFN- β)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、単球コロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、幹細胞因子 (SCF)、flk2/flt3リガンド (FL)、白血病細胞阻害因子 (LIF)、オンコスタチンM (OM)、エリスロポエチン (EP0)、トロンプオエチン (TP0) などが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

[0038] 培地に添加されるホルモンとしては、メラトニン、セロトニン、チロキシ

ン、トリヨードチロニン、エピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミン、抗ミューラー管ホルモン、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン、アンギオテンシノゲン及びアンギオテンシン、抗利尿ホルモン、心房ナトリウム利尿性ペプチド、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトロピン放出ホルモン、エリスロポイエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、ゴナドトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトーゲン、成長ホルモン、インヒビン、インスリン、インスリン様成長因子、レプチン、黄体形成ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロラクチン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポイエチン、甲状腺刺激ホルモン、チロトロピン放出ホルモン、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、カルシトリオール、カルシジオール、プロスタグランジン、ロイコトリエン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、プロラクチン放出ホルモン、リポトロピン、脳ナトリウム利尿ペプチド、神経ペプチドY、ヒスタミン、エンドセリン、膵臓ポリペプチド、レニン、及びエンケファリンが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

[0039] 培地に添加される増殖因子としては、トランスフォーミング成長因子- α (TGF- α)、トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β)、マクロファージ炎症蛋白質-1 α (MIP-1 α)、上皮細胞増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子-1、2、3、4、5、6、7、8、又は9 (FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神経細胞増殖因子 (NGF) 肝細胞増殖因子 (HGF)、白血病阻止因子 (LIF)、プロテアーゼネキシンI、プロテアーゼネキシンII、血小板由来成長因子 (PDGF)、コリン作動性分化因子 (CDF)、ケモカイン、Notchリガンド (Delta1など)、Wnt蛋白質、アンジオポエチン様蛋白質2、3、5または7 (Angpt2、3、5、7)、インスリン様成長因子 (IGF)、インスリン様成長因子結合蛋白質 (IGF BP)、プレイオトロフィン (Pleiotrophin) などが挙げられるが、これらに

限られるわけではない。

また、遺伝子組換え技術によりこれらのサイトカインや増殖因子のアミノ酸配列を人為的に改変させたものも添加させることもできる。その例としては、IL-6／可溶性IL-6受容体複合体あるいはHyper IL-6（IL-6と可溶性IL-6受容体との融合タンパク質）などが挙げられる。

[0040] 各種細胞外マトリックスや各種細胞接着分子の例としては、コラーゲンI乃至XIX、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン-1乃至12、ニトジェン、テネイシン、トロンボスポンジン、フォンビルブランド（von Willebrand）因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン、各種エラスチン、各種プロテオグリカン、各種カドヘリン、デスモコリン、デスモグレイン、各種インテグリン、E-セレクチン、P-セレクチン、L-セレクチン、免疫グロブリンスーパーファミリー、マトリゲル、ポリ-D-リジン、ポリ-L-リジン、キチン、キトサン、セファロース、ヒアルロン酸、アルギン酸ゲル、各種ハイドロゲル、さらにこれらの切断断片などが挙げられる。

[0041] 培地に添加される抗生物質の例としては、サルファ製剤、ペニシリン、フェネチシリン、メチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、ナフシリン、アンピシリン、ペニシリン、アモキシシリン、シクラシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、アズロシリン、メクズロシリン、メシリナム、アンジノシリン、セファロsporin及びその誘導体、オキシリン酸、アミフロキサシン、テマフロキサシン、ナリジクス酸、ピロミド酸、シプロフロキササン、シノキサシン、ノルフロキサシン、パーフロキサシン、ロザキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、ピペミド酸、スルバクタム、クラブリン酸、 β -ブROMOペニシラン酸、 β -クロロペニシラン酸、6-アセチルメチレン-ペニシラン酸、セフォキサゾール、スルタンピシリン、アディノシリン及びスルバクタムのホルムアルデヒド・フードラートエステル、タゾバクタム、アズトレオナム、スルファゼチン、イソスルファゼチン、ノルカディシン、m-カルボキシフェニル、フェニルアセトアミドホスホン酸メチル、クロルテトラサイクリン、オキシテ

トラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、メタサイクリン、並びにミノサイクリンが挙げられる。

[0042] [培地組成物の製造方法]

上記ナノファイバーを、培養対象の細胞のタンパク質産生及び／又は増殖を促進できる濃度となるように、細胞培養用の液体培地と混合することにより、本発明に用いる培地組成物を製造することができる。

[0043] 当該ナノファイバーの形状は、粉末、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤のような製剤化された固体、適切な生理的な水性溶媒中の分散液のような液体、又は基板や単体に結合させた状態であり得る。製剤化される際の添加物としては、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤；乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニット等の賦形剤；ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤；ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等が挙げられる。これらの添加物は上記のものに限定されることはなく、当業者が利用可能であれば自由に選択することができる。滅菌方法は特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌、オートクレーブ滅菌、フィルター滅菌等が挙げられる。

[0044] 好ましい態様において、上記ナノファイバーの生理的な水性溶媒中の分散液と、液体培地とを混合することにより、本発明に用いる培地組成物を調製する。該分散液は、滅菌（オートクレーブ、ガンマ線滅菌等）されていてもよい。あるいは、該分散液と、粉末培地を水に溶かして調製した液体培地（培地の水溶液）とを混合した後に、滅菌して使用してもよい。該分散液と液体培地の滅菌は、混合する前に、別々に行ってもよい。水性溶媒の例としては、水、ジメチルスルホキシド（DMSO）などが挙げられるが、これらに限られるわけではない。水性溶媒としては、水が好ましい。水性溶媒中には、適切な緩衝剤や塩が含まれていてもよい。上記ナノファイバーの分散液は、本発明に用いる培地組成物を調製するための培地添加剤として有用である。

[0045] 混合比率は、ナノファイバーの分散液：液体培地（培地の水溶液）が、通

常1 : 99~99 : 1、好ましくは10 : 90~90 : 10、より好ましくは、20 : 80~80 : 20である。

[0046] ナノファイバーを含有する培地組成物の製造方法を例示するが、本発明はこれによって限定されるものではない。ナノファイバーをイオン交換水あるいは超純水に添加する。そして、全体が均一な状態に分散されるまで室温にて攪拌した後、滅菌（例えば、121℃にて20分でのオートクレーブ滅菌）を行う。静置培養に使用する任意の培地を攪拌（例えば、ホモミキサー等）しながら、当該培地に前記滅菌後のナノファイバー分散液を添加し、当該培地と均一になるように混合する。本水溶液と培地の混合方法は特に制限はなく、例えばピペティング等の手動での混合、マグネチックスターラーやメカニカルスターラー、ホモミキサー、ホモジナイザー等の機器を用いた混合が挙げられる。

[0047] 一態様において、上述のナノファイバーを含有する培地組成物は、細胞の維持や培養が可能な温度範囲（例えば、0~40℃）の少なくとも1点において、細胞の浮遊静置が可能である。本発明の培地組成物は、好ましくは25~37℃の温度範囲の少なくとも1点において、最も好ましくは37℃において、細胞の浮遊静置が可能である。当該培地組成物は、例えば、WO 2015/111686 A1に記載された方法により製造することができる。

[0048] [培養方法]

本発明は、上記培地組成物中、細胞を、ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養する方法を提供するものである。

[0049] 本発明で用いるナノファイバーは、細胞及び／又は組織を生体外で培養した時に、当該細胞及び／又は組織を、当該ナノファイバーを含有する液体中で浮遊させる効果（好ましくは浮遊静置させる効果）を示すものである（WO 2015/111686 A1）。従って、目的とする細胞を、上記培地組成物中で培養すると、該細胞は培地組成物中に分散されたナノファイバーに付着し、攪拌や振とう操作等の物理的攪乱がなくても、細胞を当該液体培地組成物中で均一に分散し尚且つ浮遊状態を維持しながら、培養することが可能である。この

ように、上記培地組成物を用いると、攪拌や振とう操作等の物理的攪乱がなくても、細胞の浮遊培養が可能であり、それにより細胞増殖が促進される（WO 2015/111686 A1）。従来の浮遊培養法では、攪拌や振とう操作を伴う場合、細胞に対するせん断力が働くため、細胞の増殖率や回収率が低い、或いは細胞の機能が損なわれてしまうと考えられていたが、上述のナノファイバーを含む培地組成物中での細胞の浮遊培養を、敢えて物理的攪乱条件下で行うと、驚くべきことに、静置浮遊培養と比較して、細胞増殖が顕著に促進し、タンパク質の産生が顕著に亢進する。

[0050] 物理的攪乱条件としては、攪拌、振とう、回転等が挙げられるが、これらに限定されない。攪拌は、攪拌子（スターラー）やスクリューによって、細胞と培地とを混ぜ合わせるにより行われる。振とうは、一定の頻度で培養容器を振り動かし、細胞と培地とを混ぜ合わせるにより行われる。好ましい物理的攪乱条件としては、例えば、20～150rpm、好ましくは50～130rpm、より好ましくは80～120rpm、より更に好ましくは90～110rpm（例えば、100rpm）での振とうを挙げることができる。該振とうは、例えば、EYELA Multi shaker MMS (Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)により行うことができる。

[0051] また、本発明の培養方法を用いると、細胞が効率よく増殖するため、本発明の培養方法は、細胞の増殖方法又は細胞の増殖促進方法として優れている。本発明の方法を用いて、細胞を培養すると、細胞は、培養容器に接着せずに、培地組成物中に分散されたナノファイバーに付着し、培養容器の底面のみに偏在せずに、三次元的な広がりをもって分散し、更に、物理的攪乱が加わるにより、増殖が促進される。特に、ナノファイバーとしてキチンナノファイバーを用いると、細胞がキチンナノファイバーに付着し、そこを足場として強力に増殖し、その結果、増殖した細胞が、ぶどうの房状にナノファイバー上に連なる状態となる。この増殖促進効果には、細胞及び／又は組織を浮遊させる（即ち、細胞や組織の培養容器への接着を回避する）のに十分な濃度のナノファイバーが培地組成物中に含まれていればよく、浮遊静置（即ち、外部からの圧力、振動、振とう、回転操作等を伴わずに細胞及び／

又は組織が液体培地組成物中で均一に分散し尚且つ浮遊状態にあること)が可能であることは必須ではない。例えば、キチンナノファイバーの場合、浮遊作用発現に十分な0.0001% (重量/容量) 以上、好ましくは、0.003% (重量/容量) 以上の濃度であれば、安定した浮遊静置培養を可能にする0.03% (重量/容量) 以下の濃度 (例、0.025% (重量/容量) 以下、0.02% (重量/容量) 以下) であっても、増殖促進効果が奏される。

[0052] ナノファイバーの中でも、とりわけキチンナノファイバーは、細胞増殖促進効果に優れている。

[0053] 本発明の培養方法においては、浮遊細胞及び接着細胞のいずれの細胞も用いることができる。接着細胞は、生育・増殖に足場を必要とする細胞である。浮遊細胞は、生育・増殖に足場を必要としない細胞である。本発明の培養方法においては、好ましくは接着細胞が用いられる。本発明の方法において、接着細胞を用いると、接着細胞が培養容器の底面に接着せずに、培養容器の底面のみに偏在せずに、三次元的な広がりをもって分散し、ナノファイバーに付着した状態で増殖する。特に、ナノファイバーとしてキチンナノファイバーを用いると、細胞がキチンナノファイバーに付着し、そこを足場として強力に増殖し、その結果、増殖した細胞が、ぶどうの房状にナノファイバー上に連なる状態となる。そのため、接着細胞の浮遊培養が可能となる。また、その結果、培養容器の底面へ接着させた状態で培養した場合よりも、接着細胞の増殖が促進される。また、培養容器の底面へ接着させた状態で培養した場合よりも、高い密度で接着細胞を培養することができる。

[0054] 本発明の培養方法においては、接着細胞の浮遊培養が可能なので、本発明の培養方法により接着細胞を浮遊培養した後、培養容器からの細胞の剥離操作を要することなく、新鮮な本発明の培地組成物を培養後の培養物に単に添加するか、新鮮な本発明の培地組成物へ、培養後の培養物の全部又は一部を添加することのみで接着細胞を継代することが可能である。本発明は、このような接着細胞の継代培養方法をも提供する。従って、本発明の継代培養方法を用いることにより、接着細胞を、培養容器からの細胞の剥離操作を行う

ことなく、継代培養することができる。また、本発明の継代培養方法を用いることにより、培養容器からの細胞の剥離操作を行うことなく、接着細胞の培養スケールを拡大することができる。培養容器からの細胞の剥離操作としては、キレート剤（例、EDTA）及び／又はタンパク質分解酵素（例、トリプシン、コラゲナーゼ）による処理が挙げられる。本発明の継代培養方法は、培養容器からの細胞の剥離操作に感受性が高い接着細胞（例えば、剥離操作により生存性が低下する接着細胞、剥離操作により形質が変わりやすい接着細胞）の継代培養に有利である。培養容器からの細胞の剥離操作に感受性が高い接着細胞としては、ヒト多能性幹細胞；ヒト前駆細胞；肝細胞、腎細胞、軟骨細胞、血管細胞および脂肪細胞などの組織から調製する初代細胞；MDC K細胞、HEK293細胞およびCHO細胞などの生物医薬品（医薬品用タンパク質）の生産細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0055] 本発明の培養方法を用いると、高い密度で接着細胞を培養することができ、細胞を効率よく増殖することが可能であり、タンパク質産生効率を上昇させることができる。従って、本発明の培養方法は、インビトロ細胞培養によるタンパク質の生産に有用である。目的とするタンパク質産生能を有する細胞を、上述のナノファイバーを含有する培地組成物中で、該ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養に付し、培養物中から、当該タンパク質を単離することにより、当該タンパク質物質を得ることが出来る。タンパク質としては、抗体、酵素（ウロキナーゼ等）、ホルモン（インシュリン等）、サイトカイン（インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、コロニー刺激因子、成長因子等）、ワクチンの抗原、その他の生理活性タンパク質を挙げることができるが、これらに限定されない。目的とするタンパク質を産生する細胞には、皮膚細胞、軟骨細胞、肝細胞、膵臓細胞、腎細胞等の非形質転換細胞や、目的とするタンパク質をコードする遺伝子や該タンパク質の生合成に関与する遺伝子を導入した形質転換細胞が含まれる。目的とするタンパク質をコードする遺伝子や該タンパク質の生合成に関与する遺伝子は外因性遺伝子であり得る。目的とするタンパク質産生能を

有する細胞は、接着細胞であっても浮遊細胞であってもよいが、好ましくは接着細胞である。目的とするタンパク質産生能を有する細胞は、好適には、該タンパク質を細胞外へ分泌する細胞である。目的とするタンパク質産生能を有する細胞としては、具体的には、目的とするタンパク質をコードする遺伝子や該タンパク質の生合成に関与する遺伝子を導入した、HEK293、CHO-K1、BHK-21、MDCK、Vero、HepG2、MCF-7等を挙げることができるが、これらに限定されない。組み換えタンパク質の生産に使用される細胞は当業者に周知であり、これらの細胞を適宜本発明の方法において用いることが出来る。培養スケールの拡大に際しては、上述のように、培養容器からの細胞の剥離操作を行うことなく、新鮮な上記ナノファイバーを含有する培地組成物を培養後の培養物に添加するか、新鮮なナノファイバーを含有する培地組成物へ、培養後の培養物の全部又は一部を添加してもよい。目的とするタンパク質を培養物から単離するにあたり、培養物から細胞を除く必要があるが、本発明の方法においては、細胞がナノファイバーに付着した状態で本が培地組成物中に浮遊しているので、遠心分離やろ過処理等の簡便な方法で細胞を除去することができる。また、培地組成物中のナノファイバーも、遠心分離やろ過処理等の簡便な方法で除去することができる。タンパク質を培養物から単離する方法は、当業者に周知であり、例えばクロマトグラフィー（例、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー）等の、生理活性物質の生化学的な分離精製方法を適用可能である。

[0056] 本発明の培養方法を用いて細胞を培養する際には、細胞の培養に一般的に用いられるシャーレ、フラスコ、プラスチックバック、テフロン（登録商標）バック、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトル等の培養器材を用いて培養することが可能である。これらの培養器材の材質は特に制限されないが、例えば、ガラス、ポリ塩化ビニ

ル、セルロース系ポリマー、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリエステル、ポリアミド、ポリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチック等が挙げられる。また、これらのプラスチックに対して種々の表面処理（例えば、プラズマ処理、コロナ処理等）を施してもよい。更に、これらの培養器材に対しては、予め細胞外マトリックスや細胞接着分子などをコーティングしてもよい。

[0057] 細胞及び／又は組織の培養は、機械的な制御下のもと閉鎖環境下で細胞播種、培地交換、細胞画像取得、培養細胞回収を自動で実行し、pH、温度、酸素濃度などを制御しながら、高密度での培養が可能なバイオリアクターや自動培養装置によって行うこともできる。これらの装置を用いて培養の途中に新しい培地を補給し、要求する物質を過不足なく細胞及び／又は組織に供給する手法として、流加培養、連続培養及び灌流培養があるが、いずれの手法も本発明の培養方法に用いることができる。

[0058] 細胞及び／又は組織を培養する際の温度は、動物細胞であれば通常25乃至39℃、好ましくは33乃至39℃（例、37℃）である。CO₂濃度は、通常、培養の雰囲気中、4乃至10体積％であり、4乃至6体積％（例、5体積％）が好ましい。培養期間は通常3乃至35日間、好ましくは7乃至20日間、より好ましくは10乃至14日であるが、培養の目的に合わせて自由に設定すればよい。植物細胞の培養温度は、通常20乃至30℃であり、光が必要であれば照度2000～8000ルクスの照度条件下にて培養すればよい。培養期間は通常3乃至70日間であるが、培養の目的に合わせて自由に設定すればよい。本発明の方法においては、全培養期間を通じて、物理的攪乱条件下、浮遊培養を実施することが好ましい。

[0059] 本発明の方法で細胞を培養する際には、本発明の培養組成物に対して別途調製した細胞を添加し、均一に分散される様に混合すればよい。その際の混合方法は特に制限はなく、例えばピペッティング等の手動での混合、スターラー、ヴォルテックスミキサー、マイクロプレートミキサー、振とう機等の機器を用いた混合が挙げられる。混合後、物理的攪乱条件下で、浮遊培養を

実施する。また、培養期間において培地組成物の交換が必要となった際には、遠心やろ過処理を行うことにより細胞と培地組成物を分離した後、新鮮なナノファイバーを含む培地組成物を細胞に添加すればよい。或いは、遠心やろ過処理を行うことにより細胞を適宜濃縮した後、新鮮なナノファイバーを含む培地組成物をこの濃縮液に添加すればよい。例えば、遠心する際の重力加速度 (G) は100乃至400Gであり、ろ過処理をする際に用いるフィルターの細孔の大きさは10 μ m乃至100 μ mであるが、これらに制限されることは無い。また、目的とする細胞に特異的に結合する抗体を表面上にコーティングした磁性微粒子を用いて、磁力により培養した細胞を分離することができる。この様な磁性微粒子の例としては、ダイナビーズ (ヴェリタス社製)、MACSマイクロビーズ (ミルテニーバイオテク社製)、BioMag (テクノケミカル社製) 等が挙げられる。これらの培地組成物の交換は、機械的な制御下のもと閉鎖環境下で実行が可能なバイオリアクターや自動培養装置によって行うこともできる。

実施例

[0060] 以下に本発明の培地組成物の実施例を具体的に述べることで、本発明をさらに詳しく説明する。以下の実施例に示す材料、使用量、割合、処理内容及び処理手順は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例に解釈されるべきものではない。

[0061] (試験例1: キチンナノファイバーを用いた3D培養におけるHEK293細胞増殖および振盪効果)

WO 2015/111686 A1に記載の方法に準じて調製したキチンナノファイバー (バイオマスナノファイバー BiNF_i-S (ピンフィス) 2質量%、株式会社スギノマシン) を1% (w/v) となるように超純水 (Milli-Q水) に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。無血清培地SFM Transfx293培地 (HyClones社製) に終濃度0.01% (w/v)、0.1%のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、そして上

記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、培養したヒト胎児腎細胞株HEK293（DSファーマバイオメディカル社製）を、133333細胞/mLとなるように上記のキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、50mL mini bioreactor（コーニング社製、431720）に15mLになるように分注した。各reactorはCO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内にて静置状態あるいは振盪状態（cfg100rpm）で培養し、10日間継続した。0、10日目の培養液をピペティングで懸濁し、その細胞懸濁液100μLに対してATP試薬100μL（CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega社製）を添加し反応させ、約10分間室温で静置した後、FlexStation3（Molecular Devices社製）にて発光強度（RLU値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き4点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0062] その結果、キチンナノファイバーを添加した培地組成物中でHEK293細胞を50mL mini bioreactor中で培養すると、キチンナノファイバー添加による細胞増殖促進作用が認められた。さらに振盪とともに培養するとキチンナノファイバーの増殖促進効果はさらに向上した。各培養でのRLU値（ATP測定、発光強度）を表1に示す。

[0063] [表1]

		0日目	10日目
静置条件	未添加	24554	46340
静置条件	キチンナノファイバー 0.01%	25091	100707
静置条件	キチンナノファイバー 0.01%	25525	86930
振盪条件	未添加	24199	83362
振盪条件	キチンナノファイバー 0.01%	25606	241622
振盪条件	キチンナノファイバー 0.1%	24817	191088

[0064] （試験例2：キチンナノファイバーを用いた3D培養におけるHEK293細胞増殖作用）

WO 2015/111686 A1に記載の方法に準じて調製したキチンナノファイバー（

バイオマスナノファイバー BiNFfi-S（ビンフィス） 2質量%、株式会社スギノマシン）を1%（w/v）となるように超純水（Milli-Q水）に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。無血清培地SFM Transfx293培地（HyClones社製）に終濃度0.01%（w/v）のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、培養したヒト胎児腎細胞株HEK293（DSファーマバイオメディカル社製）を、13333細胞/mLあるいは33333細胞/mLとなるように上記のキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、50mL mini bioreactor（コーニング社製、431720）に15mLになるように分注した。各reacterはCO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内にて振盪状態（cfg100rpm）で培養し、7日間および14日間継続した。0、7、14日目の培養液をピペティングで懸濁し、その細胞懸濁液100μLに対してATP試薬100μL（CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega社製）を添加し反応させ、約10分間室温で静置した後、FlexStation3（Molecular Devices社製）にて発光強度（RLU値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き4点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0065] その結果、キチンナノファイバーを添加した培地組成物中でHEK293細胞を50mL mini bioreactor中で培養すると、播集数が少ない低密度培養においても、キチンナノファイバー添加による細胞増殖促進作用が認められた。7日目における培養でのRLU値（ATP測定、発光強度）を表2に、14日目における培養でのRLU値（ATP測定、発光強度）を表3に示す。

[0066] [表2]

播種細胞数		0日目	7日目
13333細胞/mL	未添加	3785	17555
13333細胞/mL	キチンナノファイバー 0.01%	3687	32166
33333細胞/mL	未添加	8656	24006
33333細胞/mL	キチンナノファイバー 0.01%	8529	57849

[0067]

[表3]

播種細胞数		0日目	14日目
13333細胞/mL	未添加	3899	40442
13333細胞/mL	キチンナノファイバー 0.01%	3939	127986
33333細胞/mL	未添加	8573	46483
33333細胞/mL	キチンナノファイバー 0.01%	8898	102441

[0068] (参考例1: IFN- β 産生HEK293細胞の調製)

以下のようにしてヒトインターフェロン β (IFN- β) 遺伝子をHEK293に組み込み、培養上清中にIFN- β を産生する細胞株を作製した。

[0069] まず、IFN- β 生産細胞であるヒト皮膚由来正常二倍体線維芽細胞株TIG-108からの、IFN- β 遺伝子の取得を行った。細胞数 5×10^6 cellsのTIG-108を $400 \times g$ で5分間遠心し、上清を除いた後、核酸抽出試薬ISOGEN (NIPPON GENE社) 1mL、クロロホルム (和光純薬) 0.2mLを加えDNA、タンパク質を有機層に沈殿させた。 $12000 \times g$ で15分遠心を行った後、水相 (RNA層) を取得し、これにイソプロパノール (和光純薬) 0.5mLを加え、 $12000 \times g$ で15分遠心後、RNAを沈殿させた。沈殿させたRNAを滅菌水に溶解した後、First-Strand Reaction Mix Beads (Amersham Bioscience社) とpd(N)6 Random Hexamer (Amersham Bioscience社) 1 μ Lを加え、室温で1分間静置後、37°Cで60分間の逆転写反応を行い、cDNAを合成した。

[0070] 続いて、IFN- β 遺伝子のPCR増幅を試みた。まず、滅菌水 35.5 μ L、Blend Taq buffer 5 μ L、dNTP mix 4 μ L、Primer F (5' -ATGACCAACAAGTGTCTCCT-3' ; 配列番号1) 1 μ L (10 pmoles)、Primer R (5' -TCAGTTTCGGAGGTAACCTG-3' ; 配列番号2) 1 μ L (10 pmoles)、Taq DNA polymerase 0.25 μ L (Takara Bio社)、cDNA 3 μ L (50ng) を0.2mLチューブに混合した。このチューブをProgram Temp. Control System (ASTECC社) に入れ、PCRを行った。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で確認した後、Freeze' N Squeeze スピンカラム (BIO RAD社) で精製した。精製されたPCR産物2 μ Lと、pTARGETベクター1 μ L (50ng) を、TaKaRa DNA Ligation Kit (Takara Bio社) 3 μ Lと混合し、16°C

、30分間のライゲーション反応を行った。続いて、ライゲーション後のpTARGETベクターをヒートショック反応によりJM109細胞（Promega社）に導入し、LB培地プレートに播種した。生育したコロニーを取得し、LB培地1mL、37℃で一晩、振盪培養を行った後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN社）により、pTARGETベクターを抽出した。続いて、IFN- β 遺伝子配列上に認識配列が存在する制限酵素PstI（TOYOBO社）でpTARGETベクターを切断することで、IFN- β 遺伝子がpTARGETベクターにクローニングされたことを確認した。続いて、HEK293細胞株を10%ウシ胎児血清（Fetal bovine serum FBS、トレース社）含有-E-RDF（10% FBS-E-RDF）培地で培養後、 5×10^6 cells/mLに調製し、PBSに置き換えた。次に、IFN- β 遺伝子がpTARGETベクターにクローニングされたことを確認した。

[0071] IFN- β 遺伝子が組み込まれたpTARGETベクターを $3 \mu\text{g}$ 添加し、 0.75 kV/cm 、 $350 \mu\text{F}$ の条件で電圧を印可した。10% FBS-E-RDF培地にて回復培養を行い、96穴培養プレート（Becton&Dickinson社）に $100 \mu\text{L/well}$ 分注した。24時間インキュベートした後、G-418（Geneticin, Invitrogen社）を終濃度 $500 \mu\text{g/mL}$ 添加した10%FBS-E-RDF培地で遺伝子導入した細胞を選択培養した。その後、増殖が確認できた細胞については、IFN- β 遺伝子の発現確認を行うことにより、IFN- β 産生HEK293細胞を作製した。

[0072] （試験例3：キチンナノファイバーを用いた3D培養におけるIFN- β 産生HEK293細胞の増殖とIFN- β の分泌）

WO 2015/111686 A1に記載の方法に準じて調製したキチンナノファイバー（バイオマスナノファイバー BiNFi-S（ピンフィス） 2質量%、株式会社スギノマシン）を1%（w/v）となるように超純水（Milli-Q水）に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。無血清で懸濁培養用の培地であるCD293培地（Thermofisher Scientific社製）に終濃度0.003%、0.01%、0.03%（w/v）のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、培養したIFN- β 産生HEK293細胞を、 1.33333×10^6 細胞/mLと

なるように上記のキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、50mL mini bioreactor（コーニング社製、431720）に15mLになるように分注した。各reacterはCO₂インキュベーター（37℃、5%CO₂）内にて振盪状態（cfg100rpm）で培養し、7日間および14日間継続した。0、7、14日目の培養液をピペティングで懸濁し、その細胞懸濁液100μLに対してATP試薬100μL（CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega社製）を添加し反応させ、約10分間室温で静置した後、FlexStation3（Molecular Devices社製）にて発光強度（RLU値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き4点の平均値として生細胞の数を測定した。また7、14日目の細胞培養液を遠心し（200G、3分間）、培養上清を分注した。

[0073] [酵素抗体法によるIFN-β 産生量の測定]

培養上清中のIFN-β 産生量を酵素抗体法（ELISA ; enzyme-linked immunosorbent assay）を用いて測定した。ヤギ抗ヒトIFN-β 抗体（R&D System INC.）をリン酸緩衝食塩水（PBS）で1μg/mLとなるように希釈し96穴イムノプレートに100μL/wellで分注してプレートコートした。室温下で1時間静置した後、非特異的反応を防ぐために、PBSにウシ血清アルブミン（BSA ; ICN）を1%に希釈した溶液（1%BSA/PBS）を150μL/wellで分注し、ブロッキングを行った。その後、室温下で1時間静置し、定量するIFN-β 抗体を含む培養上清を50μL/wellで分注した。また、同様に0μg/mL～200μg/mLの標準溶液を50μL/well分注し、室温下で1時間静置した。その後、マウス抗ヒトIFN-β 抗体（R&D System INC.）を1% BSA/PBSで1μg/mLとなるように希釈し、100μL/wellで分注した後、室温下で1時間静置した。その後、西洋わさび由来ペルオキシターゼ標識ラット抗マウスIgG抗体を1% BSA/PBS溶液で、約6,000倍に希釈し、100μL/wellで分注して室温下で1時間静置した。発色液として10%3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine（TMB）発色液（フナコシ社製、#TMBW-100-0）を100μL/wellで分注し、発色を確認した後にSTOP Solution（KPL社製、#50-85-04）で反応を停止後、450nmの波長により吸光度を測定した。各反応の間ではPBSにポリエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（Tween20）（和

光純薬)を0.05%濃度に希釈した溶液で3回洗浄した。

[0074] その結果、キチンナノファイバーを含む培地組成物を用いてIFN- β 産生HEK 293細胞を50mL mini bioreactor中で培養すると、キチンナノファイバー添加による細胞増殖促進作用が認められた。また培養上清中にヒトIFN- β 量が増加していた。本結果より、キチンナノファイバーを含む培地組成物中で振盪培養を行うことにより、細胞増殖とIFN- β 生産が共に亢進することが明らかとなった。7日目における培養でのRLU値(ATP測定、発光強度)を表4に、14日目における培養でのRLU値(ATP測定、発光強度)を表5に、ヒトIFN- β 分泌量(ng/mL)を表6に示す。

[0075] [表4]

	0日目	7日目
未添加	1 8 0 0 1	2 2 1 9 3
キチンナノファイバー 0.003%	1 8 2 0 2	1 6 0 8 4
キチンナノファイバー 0.01%	1 8 9 1 9	4 6 8 6 1
キチンナノファイバー 0.03%	1 9 5 7 2	6 3 6 0 8

[0076] [表5]

	0日目	14日目
未添加	1 9 4 3 5	2 6 3 4 0
キチンナノファイバー 0.003%	1 8 8 4 3	5 8 3 0 0
キチンナノファイバー 0.01%	1 8 4 6 5	4 7 4 9 5
キチンナノファイバー 0.03%	1 8 5 1 2	5 5 0 7 0

[0077]

[表6]

	7日目	14日目
未添加	4.83	6.64
キチンナノファイバー 0.003%	3.77	9.39
キチンナノファイバー 0.01%	7.06	12.79
キチンナノファイバー 0.03%	6.82	19.88

[0078] (試験例4: キチンナノファイバーを用いた3D培養におけるMDCK細胞増殖および振盪効果)

WO 2015/111686 A1に記載の方法に準じて調製したキチンナノファイバー (バイオマスナノファイバー BiNF-i-S (ビンフィス) 2質量%、株式会社スギノマシン) を1% (w/v) となるように超純水 (Milli-Q水) に懸濁した後、90℃にて加熱しながらの攪拌により溶解し、本水溶液を121℃で20分オートクレーブ滅菌した。無血清培地SFM Transfx293培地 (HyClones社製) に終濃度0.01% (w/v)、0.1%のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、培養したイヌ腎臓尿細管上皮細胞株MDCK (DSファーマバイオメディカル社製) を、133333細胞/mLとなるように上記のキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、50mL mini bioreactor (コーニング社製、431720) に15mLになるように分注した。各reactorはCO₂インキュベーター (37℃、5%CO₂) 内にて静置状態あるいは振盪状態 (cfg100rpm) で培養し、10日間継続した。0、10日目の培養液をピペティングで懸濁し、その細胞懸濁液100μLに対してATP試薬100μL (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay、Promega社製) を添加し反応させ、約10分間室温で静置した後、FlexStation3 (Molecular Devices社製) にて発光強度 (RLU値) を測定し、培地のみ発光値を差し引き4点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0079] その結果、キチンナノファイバーを含む培地組成物を用いてMDCK細胞を50m

L mini bioreactor中で培養すると、キチンナノファイバー添加による細胞増殖促進作用が認められた。さらに振盪とともに培養するとキチンナノファイバーの細胞増殖促進効果はさらに向上した。各培養でのRLU値（ATP測定、発光強度）を表7に示す。

[0080] [表7]

		0日目	10日目
静置条件	未添加	11707	12708
静置条件	キチンナノファイバー 0.01%	12084	58282
静置条件	キチンナノファイバー 0.01%	12655	73354
振盪条件	未添加	12427	3763
振盪条件	キチンナノファイバー 0.01%	12263	155610
振盪条件	キチンナノファイバー 0.1%	12013	112137

産業上の利用可能性

[0081] 本発明によれば、細胞を効率的に増殖させ、酵素、細胞増殖因子、抗体等のタンパク質の大量生産を実施することができる。

[0082] ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0083] 本出願は、日本で出願された特願2016-075251（出願日：2016年4月4日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] ナノファイバーを含有する培地組成物中、タンパク質産生能を有する細胞を、該ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養することを含む、タンパク質の産生方法。
- [請求項2] 該ナノファイバーが、セルロース、キチン及びキトサンからなる群から選択されるいずれかの非水溶性多糖類から構成される、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 該ナノファイバーが、キチンナノファイバーである、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 培地組成物中のキチンナノファイバーの含有量が、0.003～0.1%（重量／容量）である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 該細胞が接着細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] ナノファイバーを含有する培地組成物中、細胞を、該ナノファイバーに付着した状態で、物理的攪乱条件下、浮遊培養することを含む、細胞の増殖方法。
- [請求項7] 該ナノファイバーが、セルロース、キチン及びキトサンからなる群から選択されるいずれかの非水溶性多糖類から構成される、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 該ナノファイバーが、キチンナノファイバーである、請求項6に記載の方法。
- [請求項9] 培地組成物中のキチンナノファイバーの含有量が、0.003～0.1%（重量／容量）である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 該細胞が接着細胞である、請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P21/00(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i, C12N11/10(2006.01)n, C12N11/12(2006.01)n, C12P21/02(2006.01)n

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)

C12P21/00, C12N5/02, C12N11/10, C12N11/12, C12P21/02

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/111686 A1 (Nissan Chemical Industries, Ltd.), 30 July 2015 (30.07.2015), claims; paragraphs [0087], [0100], [0204] to [0205] & US 2017/0009201 A1 claims; paragraphs [0167], [0188], [0263] to [0264] & EP 3098300 A1 & CA 2937801 A & CN 105934511 A & KR 10-2016-0117496 A & TW 201615829 A	1-10

☒ 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
05 June 2017 (05.06.17)

Date of mailing of the international search report
13 June 2017 (13.06.17)

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/JP2017/014064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 62-500001 A (LITWIN, Jack), 08 January 1987 (08.01.1987), claims; examples & WO 1985/005375 A1 claims; examples & EP 0216771 A1 & SE 454518 B & NO 860180 A & SE 8402742 A & DK 19086 A & SE 8402742 A0	1-10
A	JP 2011-107722 A (Innovia Films Ltd.), 02 June 2011 (02.06.2011), & US 2004/0197512 A1 & GB 106410 D0 & WO 2002/074874 A1 & DE 60206899 D & CA 2440240 A & CN 1501967 A & KR 10-0858573 B1	1-10
A	JP 2013-067075 A (Toppan Printing Co., Ltd.), 18 April 2013 (18.04.2013), (Family: none)	1-10
A	JP 2013-066745 A (Loma Linda University Medical Center), 18 April 2013 (18.04.2013), & US 2007/0123816 A1 & WO 2007/044510 A1 & DE 602006020488 D & CN 101495047 A & AT 499882 T	1-10
A	JP 2004-141301 A (Techno Network Shikoku Co., Ltd.), 20 May 2004 (20.05.2004), (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P21/00(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i, C12N11/10(2006.01)n, C12N11/12(2006.01)n,
C12P21/02(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. C12P21/00, C12N5/02, C12N11/10, C12N11/12, C12P21/02

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
X	WO 2015/111686 A1 (日産化学工業株式会社) 2015.07.30, 特許請求の範囲、段落[0087], [0100], [0204]-[0205] & US 2017/0009201 A1, 特許請求の範囲、段落[0167], [0188], [0263]-[0264] & EP 3098300 A1 & CA 2937801 A & CN 105934511 A & KR 10-2016-0117496 A & TW 201615829 A	1-10

☑ 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

0 5 . 0 6 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 6 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

布川 莉奈

4 B

6 2 2 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
X	JP 62-500001 A (リトウイン、ジャック) 1987. 01. 08, 特許請求の範囲、実施例 & WO 1985/005375 A1, 特許請求の範囲、実施例 & EP 0216771 A1 & SE 454518 B & NO 860180 A & SE 8402742 A & DK 19086 A & SE 8402742 A0	1-10
A	JP 2011-107722 A (イノヴィア フィルムズ リミテッド) 2011. 06. 02, & US 2004/0197512 A1 & GB 106410 D0 & WO 2002/074874 A1 & DE 60206899 D & CA 2440240 A & CN 1501967 A & KR 10-0858573 B1	1-10
A	JP 2013-067075 A (凸版印刷株式会社) 2013. 04. 18, (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2013-066745 A (ローマ リンダ ユニヴァーシティ メディカル センター) 2013. 04. 18, & US 2007/0123816 A1 & WO 2007/044510 A1 & DE 602006020488 D & CN 101495047 A & AT 499882 T	1-10
A	JP 2004-141301 A (株式会社テクノネットワーク四国) 2004. 05. 20, (ファミリーなし)	1-10