

(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
2016 年 9 月 29 日(29.09.2016)



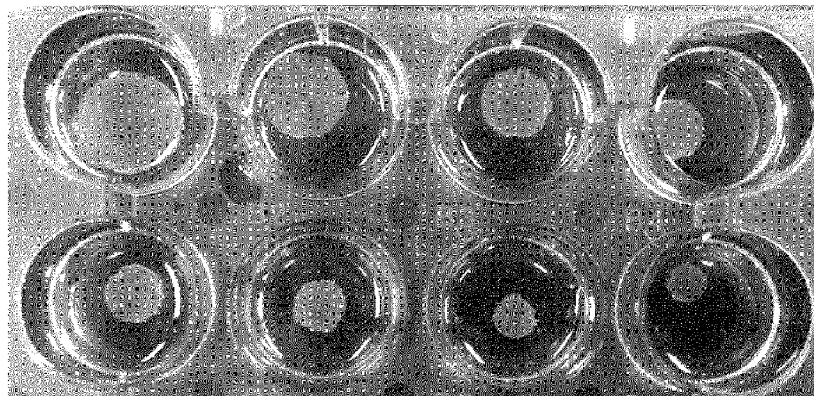
(10) 国際公開番号

WO 2016/152592 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/057863
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 11 日(11.03.2016)
- (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 2015-062434 2015 年 3 月 25 日(25.03.2015) JP
- (71) 出願人: テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目 4 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 廣瀬 正一(HIROSE, Shouichi); 〒3002358 茨城県つくばみらい市陽光台 2-1-1 0 0 3 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 葛和清司(KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023 東京都新宿区西新宿 6 丁目 2 番 1 号 西新宿三井ビルディング 1 7 階 葛和国际特許事務所 Tokyo (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, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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))

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING SHEET-LIKE CELL CULTURE

(54) 発明の名称: シート状細胞培養物の評価方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a method for evaluating a sheet-like cell culture; and a system for evaluating a sheet-like cell culture. The present invention relates to a method for evaluating a sheet-like cell culture, comprising the steps of: irradiating the sheet-like cell culture with a light beam; measuring the transmittance of the sheet-like cell culture which has been irradiated with the light beam; and calculating a measure, which relates to the quality of the sheet-like cell culture, from the transmittance.

(57) 要約: 本発明は、シート状細胞培養物の評価方法、およびシート状細胞培養物を評価するためのシステムの提供を目的とする。本発明は、シート状細胞培養物に光線を照射するステップ、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定するステップ、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出するステップを含む、シート状細胞培養物の評価方法に関する。

WO 2016/152592 A1

明 細 書

発明の名称：シート状細胞培養物の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、シート状細胞培養物の評価方法、およびシート状細胞培養物を評価するためのシステムに関する。

背景技術

[0002] 近年の心臓病に対する治療の革新的進歩にかかわらず、重症心不全に対する治療体系は未だ確立されていない。心不全の治療法としては、 β ブロッカーやACE阻害剤による内科治療が行われるが、これらの治療が奏功しないほど重症化した心不全には、補助人工心臓や心臓移植などの置換型治療、つまり外科治療が行われる。

[0003] このような外科治療の対象となる重症心不全には、進行した弁膜症や高度の心筋虚血に起因するもの、急性心筋梗塞やその合併症、急性心筋炎、虚血性心筋症（ICM）、拡張型心筋症（DCM）などによる慢性心不全やその急性増悪など、多種多様な原因がある。

これらの原因と重症度に応じて弁形成術や置換術、冠動脈バイパス術、左室形成術、機械的補助循環などが適用される。

[0004] この中で、ICMやDCMによる高度の左室機能低下から心不全を来したもののについては、心臓移植や人工心臓による置換型治療のみが有効な治療法とされてきた。しかしながら、これら重症心不全患者に対する置換型治療は、慢性的なドナー不足、継続的な免疫抑制の必要性、合併症の発症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全に対する普遍的な治療法とは言い難い。

[0005] その一方、最近、重症心不全治療の解決策として新しい再生医療の展開が不可欠と考えられている。

重症心筋梗塞等においては、心筋細胞が機能不全に陥り、さらに線維芽細胞の増殖、間質の線維化が進行し心不全を呈するようになる。心不全の進行

に伴い、心筋細胞は傷害されてアポトーシスに陥るが、心筋細胞は殆ど細胞分裂をおこさないため、心筋細胞数は減少し心機能の低下もさらに進む。

このような重症心不全患者に対する心機能回復には細胞移植法が有用とされ、既に自己骨格筋芽細胞による臨床応用が開始されている。

[0006] 近年、その一例として、組織工学を応用した温度応答性培養皿を用いることによって、成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む心臓に適用可能な三次元に構成された細胞培養物と、その製造方法が提供された（特許文献1）。

[0007] また、製造工程由来不純物を用いない方法でシート状細胞培養物を製造する試みがなされてきた。例えば、播種細胞数のコントロールや、加圧などによって、製造工程由来不純物を含まないシート状細胞培養物およびその製造方法が提供された（特許文献2および3）。

[0008] 一方、シート状細胞培養物を製造する過程において、シート状細胞培養物が正しく形成されたか否かを判定する技術は知られている。例えば特許文献4には、全播種細胞のうち培養容器に接着した細胞の割合を接着率として計測し、接着率が設定値以上である場合にシート状細胞培養物が形成されたと判定する方法が開示されている。

[0009] これらの方法により製造されたシート状細胞培養物を、医療の現場において、対象に投与して治療する場合、投与記録として、投与するシート状細胞培養物の品質に関する情報を記録しておくことが望ましい。しかし、シート状細胞培養物の品質を確認するためには、シート状細胞培養物を酵素処理などで破壊してシングルセルの状態にして、品質の指標となり得る細胞数や細胞密度を観察する必要があるため、実際に使用するシート状細胞培養物の品質を評価することはできなかった。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特表2007-528755号公報

特許文献2：特開2010-81829号公報

特許文献3：特開2010-226962号公報

特許文献4：特開2012-152189号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の目的は、シート状細胞培養物の評価方法、およびシート状細胞培養物の製造工程において、実際に使用するシート状細胞培養物を破壊することなく品質を確認することができる、シート状細胞培養物を評価するためのシステムを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を進める中、シート状細胞培養物の品質がシート状細胞培養物の透過率に依存していることを新たに見出した。さらに鋭意研究を続ける中で、シート状細胞培養物に光線を照射して透過率を測定するという単純な方法で、シート状細胞培養物の品質に関する指標を簡単かつ非破壊的に算出することができることを見出し、本発明を完成させた。

[0013] すなわち、本発明は以下に関する。

- (1) シート状細胞培養物に光線を照射するステップ、
光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定するステップ、
透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出するステップ、
を含む、シート状細胞培養物の評価方法。
- (2) 指標が、シート状細胞培養物の細胞密度、細胞数、収縮率および厚さからなる群から選択される1または2以上である、上記(1)に記載の方法。
- (3) シート状細胞培養物が、培養基材から剥離された後のシート状細胞培養物である、上記(1)または(2)に記載の方法。
- (4) 光線がレーザー光線である、上記(1)～(3)のいずれか1つに記載の方法。
- (5) 算出された指標と設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判

定するステップをさらに含む、上記（１）～（４）のいずれか１つに記載の方法。

（６）シート状細胞培養物に光線を照射し、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定し、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出し、算出された指標が設定値以上であることを判定することを含む、設定値以上の品質を有するシート状細胞培養物を製造する方法。

（７）シート状細胞培養物に光線を照射する照射部、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定する測定部、および透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出する解析部を含む、シート状細胞培養物を評価するためのシステム。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、シート状細胞培養物の品質に関する指標を簡単かつ非破壊的に算出することが可能となる。したがって、医療などの現場において投与するシート状細胞培養物の品質に関する情報を記録することが可能となる。そして、かかる情報と投与後の経過観察から有効量を特定することで、疾患の発症や再発を抑制し、症状を軽減し、または進行を遅延もしくは停止することが可能となる。さらに、かかる指標と事前設定された設定値とを比較して、シート状細胞培養物の品質を判定することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、細胞数の異なる複数のシート状細胞培養物を示す図である。
[図2]図２は、シート状細胞培養物の透過率と細胞数との相関性を示す図である。
[図3]図３は、剥離前と剥離後のシート状細胞培養物の透過率（中心）と細胞数との相関性を示す図である。
[図4]図４は、剥離前と剥離後のシート状細胞培養物の透過率（平均値）と細胞数との相関性を示す図である。
[図5]図５は、シート状細胞培養物の透過率と収縮率との相関性を示す図である。

[図6]図6は、均一に細胞を播種したシート状細胞培養物の透過率（図中左側）、および、不均一に細胞を播種したシート状細胞培養物の透過率（図中右側）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願、公開された出願および他の出版物は、その全体を参照により本明細書に援用する。

[0017] 本発明の一側面は、シート状細胞培養物に光線を照射するステップ、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定するステップ、および、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出するステップを含む、シート状細胞培養物の評価方法（以下、「本発明の評価方法」と称することがある）に関する。本発明の評価方法は、シート状細胞培養物に光線を照射するステップの前に、シート状細胞培養物を形成するステップを含んでもよい。

[0018] 本発明の評価方法における細胞は、シート状細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、特にiPS細胞から分化させたものであってもよい。本発明の評価方法における細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞

など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。

[0019] 本発明において、「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子などの細胞要素を介するものを含む）および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも物理的（機械的）に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、シート状細胞培養物を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも物理的（機械的）に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層（多層）、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。

[0020] 本発明のシート状細胞培養物は、好ましくはスキャフォールド（支持体）を含まない。スキャフォールドは、その表面上および／またはその内部に細胞を付着させ、シート状細胞培養物の物理的一体性を維持するために当該技術分野において用いられることがあり、例えば、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）製の膜等が知られているが、本発明のシート状細胞培養物は、かかるスキャフォールドがなくともその物理的一体性を維持することができる。また、本発明のシート状細胞培養物は、好ましくは、シート状細胞培養物を構成する細胞由来の物質のみからなり、それら以外の物質を含まない。

[0021] 本発明における細胞は、シート状細胞培養物による治療が可能な任意の生物に由来し得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギなどが含まれる。

[0022] シート状細胞培養物の形成に用いる細胞は1種類のみであってもよいが、

2種類以上の細胞を用いることもできる。また、生体から単離して得た細胞などにおいては、細胞が複数種の細胞を含むことが多く、全ての細胞種を特定することが困難である場合があるため、細胞種への言及は、ある細胞集団における最も比率の多い細胞のみにとどめることがある。例えば、ある細胞集団が所定の比率の細胞Aと、細胞A以外の1種または2種以上の細胞を含み、細胞Aの比率が最も多い場合、当該細胞集団を便宜的に細胞Aと称し、当該細胞集団で構成されるシート状細胞培養物を、「細胞Aで構成されるシート状細胞培養物」と称することがある。本発明の好ましい態様において、シート状細胞培養物を形成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の比率（純度）は、シート化培養開始時、または、シート状細胞培養物製造終了時において、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約75%以上である。

[0023] 細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」は、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、サルやブタに由来する細胞などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、本発明においては好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用する場合は、拒絶反応を抑制するため、免疫抑制処置が必要となることがある。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と総称することもある。本発明の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本発明の一態様において、細胞は自家細胞である。本発明の別の態様に

において、細胞は他家細胞である。

[0024] 本発明の評価方法における、シート状細胞培養物を形成するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、特許文献2に記載されたものが挙げられる。シート状細胞培養物を形成するステップは、培養基材上で行うことができる。また、シート状細胞培養物を形成するステップは、細胞を培養基材上に播種するステップ、および、播種した細胞をシート化するステップを含んでもよい。

[0025] 培養基材は、細胞がその上で細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、種々の材質の容器、容器中の固形もしくは半固形の表面などを含む。容器は、培養液などの液体を透過させない構造・材料が好ましい。かかる材料としては、限定することなく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ナイロン6, 6、ポリビニルアルコール、セルロース、シリコン、ポリスチレン、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、金属（例えば、鉄、ステンレス、アルミニウム、銅、真鍮）等が挙げられる。また、容器は、少なくとも1つの平坦な面を有することが好ましい。かかる容器の例としては、限定することなく、例えば、細胞培養皿、細胞培養ボトルなどが挙げられる。また、容器は、その内部に固形もしくは半固形の表面を有してもよい。固形の表面としては、上記のごとき種々の材料のプレートや容器などが、半固形の表面としては、ゲル、軟質のポリマーマトリックスなどが挙げられる。培養基材は、上記材料を用いて作製してもよいし、市販のものを利用してよい。好ましい培養基材としては、限定することなく、例えば、シート状細胞培養物の形成に適した、接着性の表面を有する基材が挙げられる。具体的には、親水性の表面を有する基材、例えば、コロナ放電処理したポリスチレン、コラーゲンゲルや親水性ポリマーなどの親水性化合物を該表面にコーティングした基材、さらには、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外マトリックスや、カドヘリンファミリー、

セレクトインファミリー、インテグリンファミリーなどの細胞接着因子などを表面にコーティングした基材などが挙げられる。また、かかる基材は市販されている（例えば、Corning^(R) TC-Treated Culture Dish、Corningなど）。

[0026] 培養基材は、刺激、例えば、温度や光に応答して物性が変化する材料で表面が被覆されていてもよい。かかる材料としては、限定されずに、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド等）、N，N-ジアルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N，N-ジメチル（メタ）アクリルアミド、N，N-エチルメチルアクリルアミド、N，N-ジエチルアクリルアミド等）、環状基を有する（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-プロペニル）-モルホリン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-モルホリン等）、またはビニルエーテル誘導体（例えば、メチルビニルエーテル）のホモポリマーまたはコポリマーからなる温度応答性材料、アゾベンゼン基を有する光吸収性高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体、および、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲル等の光応答性材料などの公知のものを用いることができる（例えば、特開平2-211865、特開2003-33177参照）。これらの材料に所定の刺激を与えることによりその物性、例えば、親水性や疎水性を変化させ、同材料上に付着した細胞培養物の剥離を促進するこ

とができる。温度応答性材料で被覆された培養皿は市販されており（例えば、CellSeed Inc.のUpCell^(R)）、これらを本発明の評価方法に使用することができる。

[0027] 上記培養基材は、種々の形状であってもよいが、平坦であることが好ましい。また、その面積は特に限定されないが、典型的には、約 1 cm^2 ～約 200 cm^2 、好ましくは約 2 cm^2 ～約 100 cm^2 、より好ましくは約 3 cm^2 ～約 50 cm^2 である。

[0028] 培養基材への細胞の播種は、既知の任意の手法および条件で行うことができる。培養基材への細胞の播種は、例えば、細胞を培養液に懸濁した細胞懸濁液を培養基材（培養容器）に注入することにより行ってもよい。細胞懸濁液の注入には、スポイトやピペットなど、細胞懸濁液の注入操作に適した器具を用いることができる。

[0029] 本発明の好ましい態様において、播種は、細胞が実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度で行われる。「細胞が実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度」とは、成長因子を実質的に含まない非増殖系の培養液で培養した場合に、シート状細胞培養物を形成することができる細胞密度を意味する。例えば、骨格筋芽細胞の場合、成長因子を含む培養液を用いる方法では、シート状細胞培養物を形成するために、細胞を約 $6,500\text{ 個}/\text{cm}^2$ の密度で培養基材に播種するが（例えば、特許文献1参照）、かかる密度の細胞を、成長因子を含まない培養液で培養してもシート状の細胞培養物を形成しない。したがって、本態様における播種密度は、成長因子を含む培養液を用いる手法におけるものよりも高いものである。かかる密度は、具体的には、例えば、骨格筋芽細胞について典型的には約 $1.0 \times 10^5\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以上である。播種密度の上限は、シート状細胞培養物の形成が損なわれず、細胞が分化に移行しなければ特に制限されないが、骨格筋芽細胞については、約 $3.4 \times 10^6\text{ 個}/\text{cm}^2$ 未満である。

[0030] したがって、骨格筋芽細胞における「実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度」は、ある態様では約 1.0×10^5 ～約 3.4

$\times 10^6$ 個/ cm^2 、別の態様では約 $3.0 \times 10^5 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では約 $3.5 \times 10^5 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では約 $1.0 \times 10^6 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では約 $3.0 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^6$ 個/ cm^2 、別の態様では約 $3.5 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では約 $1.0 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^6$ 個/ cm^2 である。上記範囲は、上限が約 3.4×10^6 個/ cm^2 未満である限り、上限および下限の両方、または、そのいずれか一方を含んでもよい。したがって、上記密度は、例えば、約 3.0×10^5 個/ cm^2 以上かつ約 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限を含み、上限は含まない）、約 3.5×10^5 個/ cm^2 以上かつ約 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限を含み、上限は含まない）、約 1.0×10^6 個/ cm^2 以上かつ約 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限を含み、上限は含まない）、約 1.0×10^6 個/ cm^2 超かつ約 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限も上限も含まない）、約 1.0×10^6 個/ cm^2 超かつ約 1.7×10^6 個/ cm^2 以下（下限は含まないが、上限は含む）であってもよい。当業者であれば、骨格筋芽細胞以外の細胞について、本発明に適した細胞密度を、本明細書の教示に従い、実験により適宜決定することができる。一態様において、「細胞が実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度」は、細胞がコンフルエントに達する密度もしくはそれ以上、または、コンフルエント密度以上である。

[0031] 播種した細胞をシート化するステップも、既知の任意の手法および条件で行うことができる。かかる手法の非限定例は、例えば、特許文献1、2などに記載されている。細胞のシート化は、細胞同士が接着分子や、細胞外マトリックスなどの細胞間接着機構を介して互いに接着することにより達成され则认为られている。したがって、播種した細胞をシート化するステップは、例えば、細胞を、細胞間接着を形成する条件下で培養することにより達成することができる。かかる条件は、細胞間接着を形成することができればいかなるものであってもよいが、通常は一般的な細胞培養条件と同様の条件で

あれば細胞間接着を形成することができる。かかる条件としては、例えば、約37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。また、培養は通常の圧力下（大気圧下、非加圧下）で行うことができる。当業者であれば、播種する細胞の種類に応じて最適な条件を選択することができる。本明細書において、播種した細胞をシート化するための培養を、「シート化培養」と称することもある。

[0032] 本発明の一態様において、細胞の培養は、所定の期間内、好ましくは、細胞が分化に移行しない期間内に行われる。したがって、この態様において、細胞は、培養期間中、未分化の状態に維持される。細胞の分化への移行は、当業者に知られた任意の方法で評価することができる。例えば、骨格筋芽細胞の場合は、MHCの発現、クレアチンキナーゼ（CK）活性、細胞の多核化、筋管の形成などを分化の指標とすることができる。本発明の好ましい態様において、培養期間は約48時間以内、より好ましくは約40時間以内、さらに好ましくは約24時間以内である。

[0033] 細胞の培養は、当該技術分野で通常なされている条件で行うことができる。例えば、典型的な培養条件としては、約37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。また、培養は通常の圧力下（大気圧下、非加圧下）で行うことができる。培養期間は、シート状細胞培養物の十分な形成、および、細胞分化防止の観点から、好ましくは約48時間以内、より好ましくは約40時間以内、さらに好ましくは約24時間以内である。培養は任意の大きさおよび形状の容器で行うことができる。シート状細胞培養物の大きさや形状は、培養容器の細胞付着面の大きさ・形状を調整すること、または、培養容器の細胞付着面に、所望の大きさ・形状の型枠を設置し、その内部で細胞を培養することなどにより任意に調節することができる。

[0034] 本発明の好ましい態様において、細胞は計測誤差の範囲を超えて増殖しない。細胞が増殖したか否かは、例えば、播種時の細胞数と、シート状細胞培養物形成後の細胞数とを比較することにより評価することができる。本発明において、シート状細胞培養物形成後の細胞数は、典型的には播種時の細胞

数の約300%以下、好ましくは約200%以下、より好ましくは約150%以下、さらに好ましくは約125%以下、特に好ましくは約100%以下である。

[0035] 細胞の増殖は、様々な条件、例えば播種細胞数（播種細胞密度）、培養環境（例えば、培養時間、培養温度など）、培地の組成などにより左右されるため、これらの条件を調節することにより、細胞を実質的に増殖させないことができる。これらの条件のうち、播種細胞密度を高めることにより、細胞の増殖を抑えながら、比較的短時間でシート状細胞培養物を得ることができるため、本発明においては播種細胞密度により増殖をコントロールすることが好ましい。細胞が実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度については、すでに上記したとおりである。

[0036] 本発明の評価方法における、シート状細胞培養物に光線を照射するステップは、既知の任意の手法および条件により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、シート状細胞培養物に、光線、例えば、可視光線を照射することなどが挙げられる。光線の光源としては、発生する光線の波長を一定に保つことができるものであれば特に限定されないが、例えば、レーザー、LED、蛍光灯、白熱灯、高輝度放電灯、水銀灯などが挙げられる。光線の波長としては、限定されずに、例えば、380～430nm、380～430nm、430～490nm、490～550nm、550～590nm、590～640nm、640～770nm、好ましくは640～770nmとすることができる。光線の照射は、シート状細胞培養物の全体、または、シート状細胞培養物の中心部、上部、下部、右側、左側など、複数の点に対して行われてもよい。また、光線の照射面積は、特に限定されないが、例えば、100～0.01mm²、好ましくは、10～0.01mm²、より好ましくは5～0.05mm²とすることができる。本発明の好ましい態様において、光線は、指向性、単色性、コヒーレンス、波長の一定性の観点から、レーザー光線を使用してもよい。

[0037] 本発明の評価方法における、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過

率を測定するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、シート状細胞培養物の光線が照射された部分を、光度計で計測することなどが挙げられる。ここで、「透過率」とは、光線が物質を通過する間に吸収された光量に関する数値であり、例えば、シート状細胞培養物に入射する前の光線と、シート状細胞培養物を通過した後の光線との強度比から算出することができる。透過率の測定は、光線が照射されたシート状細胞培養物上の1または2以上の点に対して行ってもよい。2以上の点に対して行う場合は、測定値の平均値を算出してもよい。

[0038] 本発明の評価方法における、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。ここで、「シート状細胞培養物の品質に関する指標」とは、シート状細胞培養物の細胞密度、細胞数、収縮率、厚さなどを意味する。かかる手法としては、限定されずに、例えば、透過率からシート状細胞培養物の細胞密度を算出することなどが挙げられる。

シート状細胞培養物の透過率は、シート状細胞培養物の細胞密度に依存して変化し得る。すなわち、シート状細胞培養物の細胞密度が高ければ、光線がシート状細胞培養物を通過する間に細胞に吸収される光量が大きいため、透過率が低くなる。逆に、シート状細胞培養物の細胞密度が低ければ、光線がシート状細胞培養物を通過する間に細胞に吸収される光量が小さいため、透過率が高くなる。

[0039] シート状細胞培養物の透過率と細胞密度との相関性は、これに限定するものではないが、例えば、サンプル用の複数のシート状細胞培養物にそれぞれ光線を照射して透過率を測定した後、シート状細胞培養物をそれぞれ酵素処理して細胞数を計測し、得られた透過率、細胞数から検量線を描くことで、事前に求めておくことが挙げられる。本発明において、シート状細胞培養物の細胞数とは、シート状細胞培養物形成後のシート状細胞培養物に含まれる細胞数を意味する。これにより、シート状細胞培養物の透過率から、細胞数

を簡単に算出することができる。シート状細胞培養物の細胞密度は、シート状細胞培養物の細胞数とシート状細胞培養物の面積から簡単に算出することができる。一態様において、本発明の評価方法は、シート状細胞培養物の面積を測定するステップを含んでもよい。

[0040] また、シート状細胞培養物の収縮率は、シート状細胞培養物の細胞密度に依存して変化し得る。すなわち、培養基材上への細胞の播種密度が小さい場合は、1細胞当たりの基材上への接着面積が大きく、各細胞は培養基材上で広がった形状で他の細胞と接着しシート状細胞培養物を形成する。そして、例えば、シート状細胞培養物を培養基材から剥離すると、広がった形状の各細胞が細胞間接着を維持しながら徐々に元の形状に戻ろうとするため、シート状細胞培養物も全体的に徐々に収縮する。逆に、播種密度が大きい場合は、1細胞当たりの基材上への接着面積が小さく、各細胞が培養基材上で広がる度合いが小さいため、剥離後のシート状細胞培養物の収縮する度合いは小さい。

[0041] シート状細胞培養物の細胞密度と収縮率との相関性は、上記のようにサンプル用の複数のシート状細胞培養物を使用して細胞密度と収縮率を計測することにより、予め求めておくことができる。シート状細胞培養物の収縮率は、シート状細胞培養物の面積を培養基材から剥離する前と後とで比較したり、剥離したシート状細胞培養物の面積の変化を経時的に観察したりすることで求めることができる。そして、上述の透過率と細胞密度との相関性から、透過率と収縮率との相関性も簡単に求めることができる。これにより、シート状細胞培養物の透過率から、シート状細胞培養物の収縮後の大きさを推定することができる。

[0042] さらに、シート状細胞培養物の透過率は、シート状細胞培養物の厚さに依存して変化し得る。すなわち、シート状細胞培養物の厚さが大きければ、光線がシート状細胞培養物を通過する間に細胞に吸収される光量が大きいため、透過率が低くなる。逆に、シート状細胞培養物の厚さが小さければ、光線が細胞に吸収される光量が小さいため、透過率が高くなる。この透過率と厚

さとの相関性も、上記のようにサンプル用の複数のシート状細胞培養物の透過率と厚さを測定することにより求めることができる。

[0043] 以上のように、シート状細胞培養物の透過率から、シート状細胞培養物の細胞密度、細胞数、収縮率、厚さなどのシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出することができる。これにより、これまではシート状細胞培養物を破壊または剥離することでしか確認できなかった、シート状細胞培養物の品質に関する指標を、シート状細胞培養物を破壊または剥離することなく推定することが可能になる。シート状細胞培養物の品質に関する情報は、移植部位や移植方法を決定するために重要な情報であり、事前にこれらが把握できれば、移植手術をスムーズに進めることができる。また、実際に移植に使用するシート状細胞培養物の品質に関する様々な情報を記録することができるため、有効量の特定などを正確に行うことができる。

[0044] また、シート状細胞培養物の製造工程において、算出されたシート状細胞培養物の品質に関する指標と、事前設定された設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判定することもできる。これにより、例えば、剥離前のシート状細胞培養物の品質を判定して、その後の剥離工程を行うかどうかを選択したり、剥離後のシート状細胞培養物の品質を判定して、移植部位や移植方法を決定したりすることもできる。したがって、本発明の評価方法は、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出するステップの後に、算出された指標と設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判定するステップを含んでもよい。算出された指標と設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判定するステップは、既知の任意の手法により行うことができる。

[0045] シート状細胞培養物の品質に関する指標の算出は、シート状細胞培養物上の1または2以上の点を対象にして行われてもよい。例えば、シート状細胞培養物の中心、上、下、右、左の5点の透過率をそれぞれ測定して品質に関する指標を算出することで、例えば、シート状細胞培養物における細胞密度、細胞数、収縮率、厚さなどの均一性を判定してもよい。本発明において、

シート状細胞培養物は、培養基材から剥離される前のものでも、培養基材から剥離された後のものでもよい。

[0046] 本発明の一側面は、シート状細胞培養物に光線を照射し、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定し、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出し、算出された指標が設定値以上であることを判定することを含む、設定値以上の品質を有するシート状細胞培養物を製造する方法に関する。

[0047] 本発明の評価方法において採用されているステップは、特にシート状細胞培養物に光線を照射し、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定し、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出し、算出された指標と設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判定することを可能にする。

したがって、本発明の一側面は、シート状細胞培養物に光線を照射する照射部、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定する測定部、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出する解析部、算出された指標と設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判定する判定部を含む、シート状細胞培養物を評価するためのシステムが包含される。

実施例

[0048] 本発明を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これは本発明の特定の具体例を示すものであり、本発明はこれらに限定されるものではない。

例 1

温度応答性培養皿（セルシード社製 Up cell 12 well、表面積：3.5 cm²/well）上に、骨格筋芽細胞を播種細胞数を変えて24時間培養し、細胞数の異なる複数のシート状細胞培養物を調製して培養基材から剥離した（図1）。中心部にレーザー光線を照射して各シート状細胞培養物の透過率を測定した（測定機：キーエンス社製レーザセンサアンプ LX2-V10、レーザセンサヘッド LX2-100、波長：670 nm）。その後、シート状細胞培養物を酵素処理して細胞数を測定した。結果を下表1

および図 2 に示す。

[0049] [表1]

表 1

No	播種細胞数	シート化細胞数	シートのレーザー透過率 (%)
			シート中心
1	5.55.E+06	5.03.E+06	39.61
2	3.70.E+06	3.85.E+06	46.68
3	2.78.E+06	3.04.E+06	52.44
4	1.85.E+06	2.32.E+06	59.37
5	1.39.E+06	1.70.E+06	64.3
6	9.25.E+05	1.28.E+06	70.25
7	4.63.E+05	5.20.E+05	75.6

[0050] 表 1 および図 2 から明らかなように、透過率は、細胞数が多いシート状細胞培養物よりも細胞数が少ないシート状細胞培養物の方が高いことが確認された。これらの結果は、シート状細胞培養物の透過率と細胞数との相関性が高いことを示すものである。

[0051] 例 2

温度応答性培養皿（セルシード社製 Up cell 12 well、表面積：3.5 cm²/well）上に、骨格筋芽細胞を播種細胞数を変えて 24 時間培養し、細胞数の異なる複数のシート状細胞培養物を調製した。シート状細胞培養物を培養皿から剥離する前と後で、中心と 5 点とで透過率を測定した（測定機：キーエンス社製レーザセンサアンプ LX2-V10、レーザセンサヘッド LX2-100、波長：670 nm）。その後、シート状細胞培養物を酵素処理して細胞数を測定した。シート状細胞培養物の中心の透過率と細胞数を測定した結果を下表 2 および図 3 に、シート状細胞培養物の 5 点の透過率の平均値と細胞数を測定した結果を下表 3 および図 4 に示す。

[0052]

[表2]

表2				透過率		
				剥離前 Upcell面積 (剥離前シート面積) (cm ²)	剥離前シート 中心	剥離後シート 中心
No	播種細胞数	シート化細胞数	播種時密度 (cells/cm ²)			
1	5.55.E+06	4.65.E+06	1.33.E+06	3.5	78.5	58.82
2	3.70.E+06	3.68.E+06	1.05.E+06	3.5	86.6	66.78
3	2.78.E+06	2.80.E+06	8.00.E+05	3.5	90.75	69
4	1.85.E+06	1.94.E+06	5.54.E+05	3.5	94.21	76.7
5	1.39.E+06	1.41.E+06	4.03.E+05	3.5	95.83	81.14
6	9.25.E+05	8.15.E+05	2.33.E+05	3.5	97.46	83.07

[0053] 表2および図3から明らかなように、透過率は、細胞数が多いシート状細胞培養物よりも細胞数が少ないシート状細胞培養物の方が高いことが確認された。これらの結果は、剥離前でも、剥離後でも、シート状細胞培養物の透過率と細胞数との相関性が高いことを示すものである。

[0054] [表3]

表3				透過率		
				剥離前 Upcell面積 (剥離前シート面積) (cm ²)	剥離前シート Average	剥離後シート Average
No	播種細胞数	シート化細胞数	播種時密度 (cells/cm ²)			
1	5.55.E+06	4.65.E+06	1.33.E+06	3.5	78.3	58.66
2	3.70.E+06	3.68.E+06	1.05.E+06	3.5	86.26	66.12
3	2.78.E+06	2.80.E+06	8.00.E+05	3.5	90.096	68.348
4	1.85.E+06	1.94.E+06	5.54.E+05	3.5	94.158	74.784
5	1.39.E+06	1.41.E+06	4.03.E+05	3.5	95.864	79.584
6	9.25.E+05	8.15.E+05	2.33.E+05	3.5	97.362	82.188

[0055] 表3および図4から明らかなように、透過率は、細胞数が多いシート状細胞培養物よりも細胞数が少ないシート状細胞培養物の方が高いことが確認された。これらの結果は、シート状細胞培養物の透過率の測定は、シートの中心に対して行っても、シートの複数の点に対して行っても良いことを示すものである。

[0056] 例3

温度応答性培養皿（セルシード社製 Upcell 12well、表面積：3.5cm²/well）上に、骨格筋芽細胞を播種細胞数を変えて24

時間培養して、細胞数の異なる複数のシート状細胞培養物を調製した。シート状細胞培養物を培養皿から剥離する前に、中心と5点とで透過率を測定した（測定機：キーエンス社製レーザセンサアンプLX2-V10、レーザセンサヘッドLX2-100、波長：670nm）。その後、シート状細胞培養物を剥離して収縮率を測定した。結果を下表4および図5に示す。

[0057] [表4]

								透過率	
				剥離前	剥離後			剥離前シート	
No	播種細胞数	シート化細胞数	播種時密度 (cells/cm ²)	Up cell面積 (剥離前シート面積) (cm ²)	シート直径 (cm)	剥離後シート面積 (cm ²)	シート収縮率 (%)	中心	Average
1	5.55.E+06	4.65.E+06	1.33.E+06	3.5	1.3	1.33	37.9	78.5	78.3
2	3.70.E+06	3.68.E+06	1.05.E+06	3.5	1.175	1.08	31.0	86.6	86.28
3	2.78.E+06	2.80.E+06	8.00.E+05	3.5	1.075	0.91	25.9	90.75	90.096
4	1.85.E+06	1.94.E+06	5.54.E+05	3.5	0.975	0.75	21.3	94.21	94.158
5	1.39.E+06	1.41.E+06	4.03.E+05	3.5	0.945	0.70	20.0	95.83	95.864
6	9.25.E+05	8.15.E+05	2.33.E+05	3.5	0.8	0.50	14.4	97.46	97.362

[0058] 表4および図5から明らかなように、透過率は、収縮率が大きいシート状細胞培養物よりも収縮率が小さいシート状細胞培養物の方が高いことが確認された。これらの結果は、シート状細胞培養物の透過率と収縮率との相関性が高いこと、また、剥離前のシート状細胞培養物の透過率から収縮率を算出し、剥離後のシート状細胞培養物の大きさを推定できることを示すものである。

[0059] 例4

温度応答性培養皿（セルシード社製 Up cell 3.5cm、表面積：8.8cm²）上に、骨格筋芽細胞を均一に播種して24時間培養したシート状細胞培養物と、不均一に播種して24時間培養したシート状細胞培養物を調製した。シート状細胞培養物を培養皿から剥離する前に5点の透過率をそれぞれ5回測定し（測定機：キーエンス社製レーザセンサアンプLX2-V10、レーザセンサヘッドLX2-100、波長：670nm）、各点の透過率の平均値を算出した。結果を下表5および図6に示す。

[0060]

[表5]

表5

	均一					不均一				
	剥離前					剥離前				
	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
シート 透過率 (%)	92.2	93.6	93.4	92.3	91.5	93.5	92.6	95.7	95.2	92.9
	92.7	94.32	93.45	94.72	93.14	94.25	92.14	93.58	92.41	95.11
	94.71	95.56	91.88	94.04	94.09	97.26	96.32	80.17	90.02	89.53
	93.77	95.01	93.9	95.76	93.74	99.58	98.74	90.64	88.02	90
	94.85	95.44	94.05	93.7	93.26	96.38	91.98	79.35	88.99	92.04
Average	93.6	94.8	93.3	94.1	93.1	96.2	94.4	87.9	90.9	91.9
S.D.	1.2	0.8	0.9	1.3	1.0	2.4	3.0	7.6	2.9	2.3

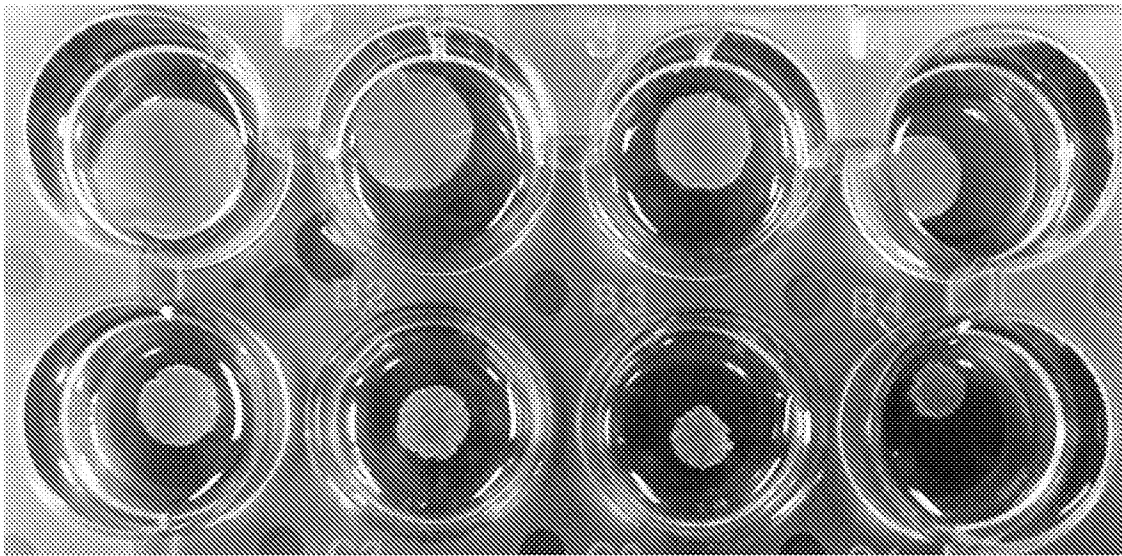
[0061] 表5および図6から明らかなように、均一に細胞を播種したシート状細胞培養物（図中左側）は、透過率のバラツキが小さく、不均一に細胞を播種したシート状細胞培養物（図中右側）は、透過率のバラツキが大きいことが確認された。これらの結果は、シート状細胞培養物の厚さの均一性を、シート状細胞培養物の複数の点の透過率を測定することで確認できることを示すものである。

[0062] 本明細書に記載された本発明の種々の特徴は様々に組み合わせることができ、そのような組合せにより得られる態様は、本明細書に具体的に記載されていない組合せも含め、すべて本発明の範囲内である。また、当業者は、本発明の精神から逸脱しない多数の様々な改変が可能であることを理解しており、かかる改変を含む均等物も本発明の範囲に含まれる。したがって、本明細書に記載された態様は例示にすぎず、これらが本発明の範囲を制限する意図をもって記載されたものではないことを理解すべきである。

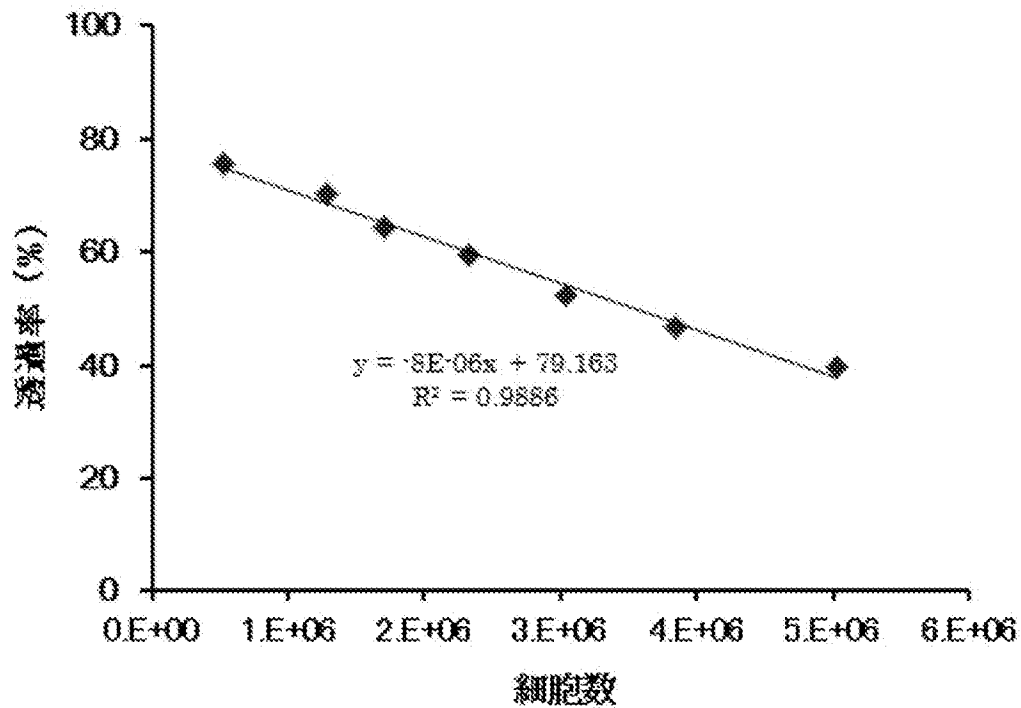
請求の範囲

- [請求項1] シート状細胞培養物に光線を照射するステップ、
光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定するステップ、
透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出するステップ、
を含む、シート状細胞培養物の評価方法。
- [請求項2] 指標が、シート状細胞培養物の細胞密度、細胞数、収縮率および厚さからなる群から選択される1または2以上である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] シート状細胞培養物が、培養基材から剥離された後のシート状細胞培養物である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 光線がレーザー光線である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 算出された指標と設定値とを比較してシート状細胞培養物の品質を判定するステップをさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] シート状細胞培養物に光線を照射し、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定し、透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出し、算出された指標が設定値以上であることを判定することを含む、設定値以上の品質を有するシート状細胞培養物を製造する方法。
- [請求項7] シート状細胞培養物に光線を照射する照射部、光線が照射されたシート状細胞培養物の透過率を測定する測定部、および透過率からシート状細胞培養物の品質に関する指標を算出する解析部を含む、シート状細胞培養物を評価するためのシステム。

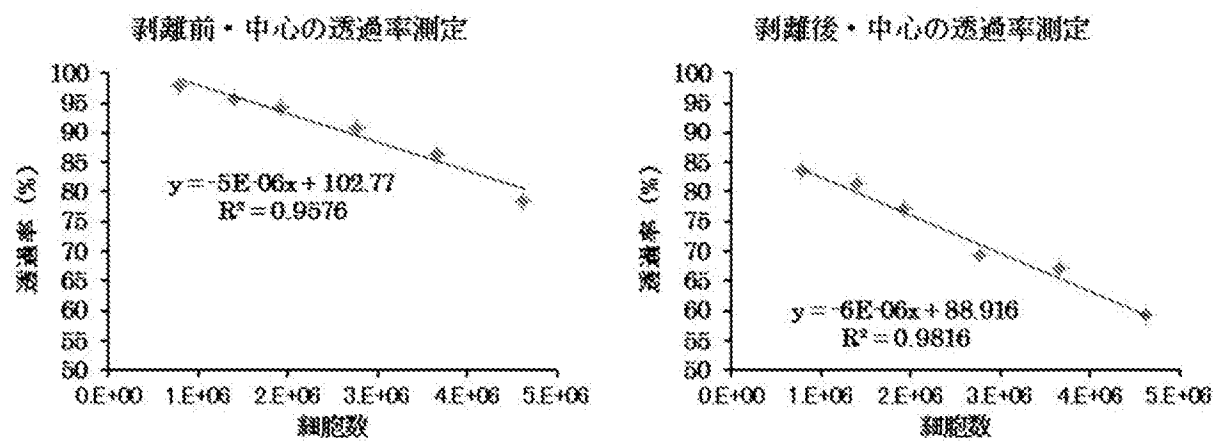
[図1]



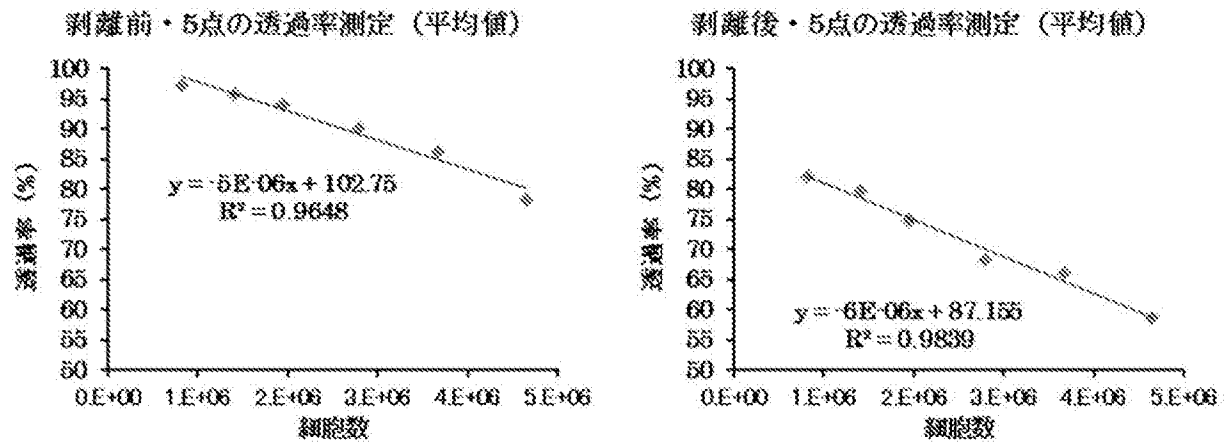
[図2]



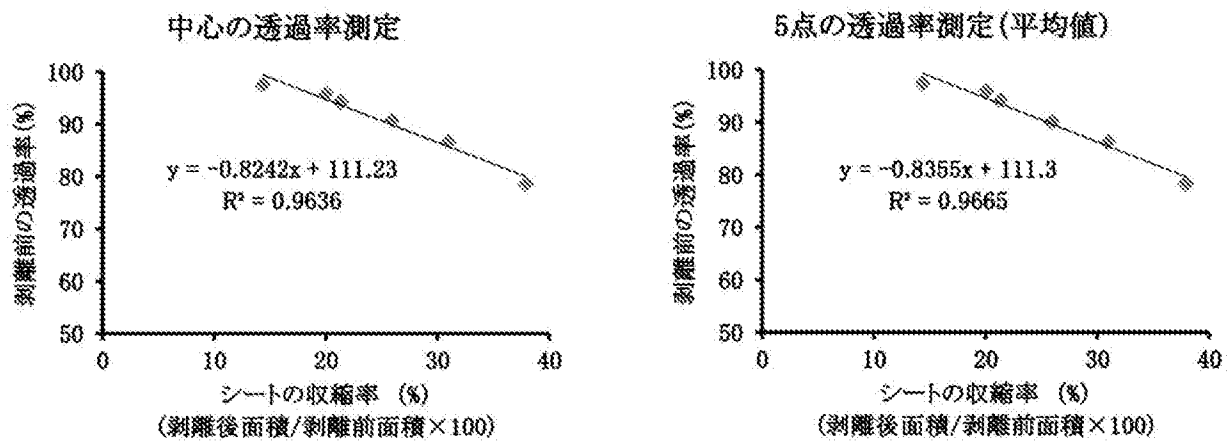
[図3]



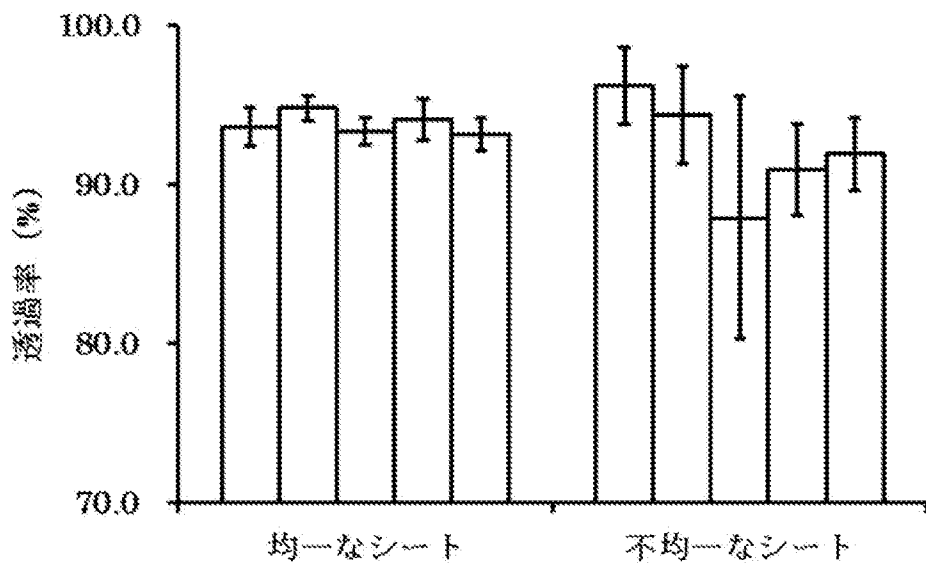
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)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)

C12Q1/02, C12M1/34, C12N5/071

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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/Y	JP 2012-29605 A (Terumo Corp.), 16 February 2012 (16.02.2012), claims 1, 6; paragraphs [0021], [0028], [0037] (Family: none)	1, 3, 5-7/1-7
X/Y	JP 2012-147687 A (Terumo Corp.), 09 August 2012 (09.08.2012), claims 1, 7; paragraphs [0023], [0030], [0037], [0038] (Family: none)	1, 3, 5-7/1-7
Y	JP 2012-147713 A (Terumo Corp.), 09 August 2012 (09.08.2012), claim 1; paragraphs [0019], [0020] (Family: none)	1-7

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
27 May 2016 (27.05.16)

Date of mailing of the international search report
07 June 2016 (07.06.16)

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/JP2016/057863

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAEDA S., ET AL, Shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disk-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells., J. Biosci. Bioeng., 2011, Vol.111, No.4, p.489-492, Abstract, Fig.1	1-7
Y	KUBOTA A., ET AL, Transplantable retinal pigment epithelial cell sheets for tissue engineering., Biomaterials, 2006, Vol.27, No.19, p.3639-3644, Abstract, Fig.2	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)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. C12Q1/02, C12M1/34, C12N5/071

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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/Y	JP 2012-29605 A (テルモ株式会社) 2012.02.16, 請求項 1, 6, 【0021】, 【0028】, 【0037】 段落 (ファミリーなし)	1, 3, 5-7/1-7
X/Y	JP 2012-147687 A (テルモ株式会社) 2012.08.09, 請求項 1, 7, 【0023】, 【0030】, 【0037】, 【0038】 段落 (ファミリーなし)	1, 3, 5-7/1-7

☒ 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

27.05.2016

国際調査報告の発送日

07.06.2016

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）

柴原 直司

4 N

3534

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 2012-147713 A (テルモ株式会社) 2012.08.09, 請求項 1, 【0019】, 【0020】段落 (ファミリーなし)	1-7
Y	MAEDA S., ET AL, Shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disk-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells., J. Biosci. Bioeng., 2011, Vol.111, No. 4, p. 489-492, Abstract, FIG. 1	1-7
Y	KUBOTA A., ET AL, Transplantable retinal pigment epithelial cell sheets for tissue engineering., Biomaterials, 2006, Vol.27, No. 19, p. 3639-3644, Abstract, Fig. 2	1-7