



BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, 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, ME, 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 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

---

product from the cells, in which the cell culture apparatus is equipped with a culturing container in which a cell suspension containing the cells is contained and at least one bubble trapping container which is connected to an exterior part from the culturing container and can accumulate bubbles.

(57) 要約 : 本発明の課題は、培養液上面に発生する泡沫による排気フィルターの詰まりを抑止することができる、細胞培養による生産物の製造方法、並びに培養液上面に発生する泡沫による排気フィルターの詰まりを抑止することができる細胞培養装置を提供することである。本発明によれば、細胞培養装置を用いて細胞を培養して前記細胞から生産物を産生させることを含む、生産物の製造方法であって、前記細胞培養装置が、細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、前記培養容器の外部に接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも1つ以上の泡沫トラップ容器とを含む、生産物の製造方法が提供される。

## 明 細 書

**発明の名称**：生産物の製造方法、及び細胞培養装置

### 技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養装置を用いて細胞を培養することを含む生産物の製造方法に関する。本発明はさらに、細胞培養装置に関する。

### 背景技術

[0002] バイオ医薬品の製造においては、抗体の生産性を向上するためには培養液中の細胞密度を高くすることが重要である。培養液中の細胞密度を高くするためには、培養液中に多量の酸素を溶解し、高密度の細胞に対して十分量の酸素を供給する必要がある。細胞に十分量の酸素を供給するための手段としては、培養槽内にスパージャーを設置する方法が知られている。細胞に十分量の酸素の供給を行うためには、スパージャーの孔径を極力小さくすることにより酸素を溶解し易くし、かつ大量の酸素を供給することにより、細胞により多量の酸素を供給する技術が一般的である。しかしながら、酸素の気泡が小さくなるほど、その気泡が破裂する際に生じるエネルギーが与える細胞へのダメージも大きくなるため、マイクロバブルを用いて細胞に酸素を供給するのは難しく、実際上においては大量の酸素を供給することで対応しているのが実情である。

[0003] 培養液の液面上に生じた気泡が培養容器の排気口に溢流し難い培養装置として、特許文献1には、培養液を封入可能な培養容器と、培養容器内の下部に配置され、培養容器に封入された培養液に酸素を液中通気する液中通気手段と、培養容器の上部に位置し、培養容器内の気体を排気する排気口と、排気口の下方に配置され、排気口と培養液の液面とを隔てる遮蔽シートとを備えるシングルユース培養装置が記載されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：特開2018-19615号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 細胞に十分量の酸素を供給するためにスパージャーから大量の酸素を供給すると、培養液中に含まれる界面活性剤成分や細胞由来のタンパク質とで培養液上面に大量の泡沫が生じることになり。この泡沫は最終的に培養液上面の空間を埋め尽くし、ついにはバイオリクターに付随する排気フィルターを詰まらせてしまうため、培養を継続できなくなる。本発明者らは、細胞密度を増加させた培養においては、細胞が必要とする大量の酸素を供給することによって培養液上面に発生する泡沫をコントロールすることが課題であることを見出した。

[0006] 本発明は、細胞培養による生産物の製造方法において、培養液上面に発生する泡沫による排気フィルターの詰まりを抑止することができる、上記方法を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、培養液上面に発生する泡沫による排気フィルターの詰まりを抑止することができる細胞培養装置を提供することを解決すべき課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、培養槽と培養槽上部に設置される排気フィルターの間には泡沫トラップ容器を設置することにより、上記の課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

<1> 細胞培養装置を用いて細胞を培養して上記細胞から生産物を産生させることを含む、生産物の製造方法であって、上記細胞培養装置が、細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、上記培養容器の外部に接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも1つ以上の泡沫トラップ容器とを含む、生産物の製造方法。

<2> 上記泡沫トラップ容器に少なくとも1つ以上の排気フィルターが接続されている、<1>に記載の生産物の製造方法。

<3> 上記泡沫トラップ容器に排液ラインが接続されている、<1>又は<2>に記載の生産物の製造方法。

<4> 上記培養容器に通気される気体の排出口が、上記培養容器と上記泡沫トラップ容器をつなぐラインだけである、<1>から<3>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<5> 上記泡沫トラップ容器に接続される排液ラインが、無菌状態を維持した排液タンクに接続されている、<1>から<4>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<6> 上記排液タンクが無菌的に切り替えることができる、<5>に記載の生産物の製造方法。

<7> 上記泡沫トラップ容器内に消泡剤が添加されるか、上記泡沫トラップ容器内に物理的消泡機構がある、<1>から<6>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<8> 以下の式を満たす、<1>から<7>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

$$M i ^ 2 \times M a ^ { 0 . 5 } / S / 2 0 0 \leq V t \leq 1 0 W$$

式中、

$V t$  は泡沫トラップ容器容量 (L) を示し、

$M i$  は、 $1 \mu m \sim 2 0 0 \mu m$  の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

$M a$  は、 $0 . 1 m m \sim 1 0 m m$  の孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示し、

$S$  は、培養液の気液界面面積 ( $m^2$ ) を示し、

$W$  は、培養容器内の培養液量 (L) を示す。

<9> 以下の式を満たす、<1>から<8>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

$$L \leq [ P ^ 2 / ( M i ^ { 1 . 5 } + M a ) ] \times S ^ { 0 . 5 }$$

式中、

Lは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、  
 Sは、培養液の気液界面面積 (m<sup>2</sup>) を示し、  
 Pは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、  
 、  
 M<sub>i</sub>は、1 μm～200 μmの孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、  
 M<sub>a</sub>は、0.1 mm～10 mmの孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示す。

<10> 以下の式を満たす、<1>から<9>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

$$(M_i^{1.5} + M_a) \times L \times S^{0.5} / 10 \leq P \leq 50 \times V_t^{(1/3)}$$

Pは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、  
 、  
 Sは、培養液の気液界面面積 (m<sup>2</sup>) を示し、  
 Lは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、  
 M<sub>i</sub>は、1 μm～200 μmの孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、  
 M<sub>a</sub>は、0.1 mm～10 mmの孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示し、  
 V<sub>t</sub>は泡沫トラップ容器容量 (L) を示す。

<11> 以下の式を満たす、<1>から<10>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

$$W^{0.5} / 1000 \leq E \leq V_c / S / 100$$

式中、

Eは、泡沫トラップ容器に接続される排気フィルターの表面積 (m<sup>2</sup>) を示し、  
 、  
 Wは、培養容器内の培養液量 (L) を示し、  
 V<sub>c</sub>は、培養容器容積 (L) を示し、

Sは、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示す。

<12> 以下の式を満たす、<1>から<11>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

$$1000 \times S^2 \times M_i^2 \times M_a^{0.5} \times L / P^2 / (V_c - W) \leq F \leq W / 10$$

式中、

Fは、培養容器内に流す上面通気量（L/分）を示し、

V<sub>c</sub>は、培養容器容積（L）を示し、

Wは、培養容器内の培養液量（L）を示し、

M<sub>i</sub>は、1 μm～200 μmの孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量（L/分）を示し、

M<sub>a</sub>は、0.1 mm～10 mmの孔径を有するマクロスパージャーの通気量（L/分）を示し、

Lは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ（m）を示し、

Pは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ（mm）を示し、

Sは、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示す。

<13> 上記培養容器がシングルユース培養槽である、および/または上記泡沫トラップ容器がシングルユースバックである、<1>から<12>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<14> 上記泡沫トラップ容器が、外部に接続された配管以外は密閉された容器である、<1>から<13>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<15> 上記培養液の生細胞密度が $10 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLである、<1>から<14>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<16> 上記培養容器の培養液量が10L以上である、<1>から<15>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<17> 細胞を培養する方法が灌流培養である、<1>から<16>の何

れかーに記載の生産物の製造方法。

<18> 細胞がCHO細胞である、<1>から<17>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<19> 細胞が産生する生産物が抗体である、<1>から<18>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<20> 培養期間が14日以上である、<1>から<19>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<21> 細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、上記培養容器の外部に配管で接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも1つ以上の泡沫トラップ容器とを含む、細胞培養装置。

<22> 上記泡沫トラップ容器に少なくとも1つ以上の排気フィルターが接続されている、<21>に記載の細胞培養装置。

<23> 上記泡沫トラップ容器に排液ラインが接続されている、<21>又は<22>に記載の細胞培養装置。

<24> 上記培養容器に通気される気体の排出口が、上記培養容器と上記泡沫トラップ容器をつなぐラインだけである、<21>から<23>の何れかーに記載の細胞培養装置。

<25> 上記泡沫トラップ容器に接続される排液ラインが、無菌状態を維持した排液タンクに接続されている、<21>から<24>の何れかーに記載の細胞培養装置。

<26> 上記排液タンクが無菌的に切り替えることができる、<25>に記載の細胞培養装置。

<27> 上記泡沫トラップ容器内に物理的消泡機構がある、<21>から<26>の何れかーに記載の細胞培養装置。

<28> 以下の式を満たす、<21>から<27>の何れかーに記載の細胞培養装置。

$$M i^2 \times M a^{0.5} / S / 200 \leq V t \leq 10W$$

式中、

$V_t$  は泡沫トラップ容器容量 (L) を示し、

$M_i$  は、 $1\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$  の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

$M_a$  は、 $0.1\ \text{mm} \sim 10\ \text{mm}$  の孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示し、

$S$  は、培養液の気液界面面積 ( $\text{m}^2$ ) を示し、

$W$  は、培養容器内の培養液量 (L) を示す。

<29> 以下の式を満たす、<21>から<28>の何れかーに記載の細胞培養装置。

$$L \leq P^2 / (M_i^{1.5} + M_a) \times S^{0.5}$$

式中、

$L$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、

$S$  は、培養液の気液界面面積 ( $\text{m}^2$ ) を示し、

$P$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、

$M_i$  は、 $1\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$  の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

$M_a$  は、 $0.1\ \text{mm} \sim 10\ \text{mm}$  の孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示す。

<30> 以下の式を満たす、<21>から<29>の何れかーに記載の細胞培養装置。

$$(M_i^{1.5} + M_a) \times L \times S^{0.5} / 10 \leq P \leq 50 \times V_t^{(1/3)}$$

$P$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、

$S$  は、培養液の気液界面面積 ( $\text{m}^2$ ) を示し、

$L$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、

$M_i$  は、 $1\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$  の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

$M a$ は、0.1 mm～10 mmの孔径を有するマクロスパージャーの通気量（L/分）を示し、

$V t$ は泡沫トラップ容器容量（L）を示す。

<31> 以下の式を満たす、<21>から<30>の何れかーに記載の細胞培養装置。

$$W^{0.5} / 1000 \leq E \leq V c / S / 100$$

式中、

$E$ は、泡沫トラップ容器に接続される排気フィルターの表面積 $E$ （ $m^2$ ）を示し、

$W$ は、培養容器内の培養液量（L）を示し、

$V c$ は、培養容器容積（L）を示し、

$S$ は、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示す。

<32> 上記培養容器の容積が10 L以上である、<21>から<31>の何れかーに記載の細胞培養装置。

<33> 上記培養容器がシングルユース培養槽である、および/または上記泡沫トラップ容器がシングルユースバックである、<21>から<32>の何れかーに記載の細胞培養装置。

<34> 上記泡沫トラップ容器が、外部に接続された配管以外は密閉された容器である、<21>から<33>の何れかーに記載の細胞培養装置。

## 発明の効果

[0009] 本発明によれば、培養液上面に発生する泡沫による排気フィルターの詰まりを抑止することができ、高濃度での細胞培養を継続することが可能である。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、本発明の細胞培養装置の一例を示す。

[図2]図2は、本発明の細胞培養装置の別の例を示す。

[図3]図3は、本発明の細胞培養装置のさらに別の例を示す。

[図4]図4は、本発明の細胞培養装置のさらに別の例を示す。

## 発明を実施するための形態

- [0011] 以下において、本発明の内容について詳細に説明する。本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を意味する。
- [0012] 本発明の生産物の製造方法は、細胞培養装置を用いて細胞を培養して上記細胞から生産物を産生させることを含む方法である。本発明による生産物の製造方法において使用する細胞培養装置は、細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、上記培養容器の外部に接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも1つ以上の泡沫トラップ容器とを含む装置である。
- [0013] 本発明の細胞培養装置は、細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、上記培養容器の外部に配管で接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも1つ以上の泡沫トラップ容器とを含む装置である。
- [0014] 本発明においては、細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器（培養槽ともいう）と培養容器上部に設置される排気フィルターとの間に泡沫トラップ容器を設置することにより、泡沫を泡沫トラップ容器に留めることができ、これにより泡沫が排気フィルターを閉塞することを防ぎ、培養を継続することが可能となる。
- [0015] 従来においては、排気フィルターのラインとは別のラインを設けて泡沫を積極的に吸い出しているが、想定以上の泡沫が発生した際には、泡沫が排気フィルターに到達し、排気フィルターの詰まりが起きてしまうという問題があった。また、培養容器内に泡沫を溜めるための泡沫トラップの空間を設置しても、十分な空間を用意することが困難であるため、すぐにその空間が泡沫で満たされ、排気フィルターに泡沫が到達してしまう。さらに、単に培養容器に泡沫を排出するためのラインを取り付けた場合、流れ込む泡沫とラインとの圧力損失によって、培養容器内部の圧力が上昇し、通常、培養装置に設置されている過剰圧力防止機構が働き、培養容器内部への各種ガス供給が止められ、培養が継続できなくなる。
- [0016] それに対して本発明では、排気フィルターの手前に泡沫をトラップする空

間を設けることにより、排気フィルターに向かう泡沫を確実にトラップすることができる。

[0017] また、泡沫トラップ容器に排液ラインを設ける場合には、泡沫トラップ容器の空間が泡沫および泡沫から生じる液で満たされそうになっても、排液ラインから排出することで、泡沫トラップ容器を泡沫で満たされることを防ぐこともでき、これにより泡沫が排気フィルターを閉塞することを防ぐことができる。

[0018] さらに培養容器と泡沫をトラップする容器をつなぐライン（チューブ）を適切な長さかつ適切な太さにすることで、泡沫が流れ込むことにより生じる圧力損失を抑えることができ、過剰圧力防止機構を作動させず、培養槽内部への各種ガスの供給を止めることなく、培養を継続することが可能となる。

[0019] 本発明の細胞培養装置の具体例を図1～図4に示す。

図1～4において、培養容器1は、ベッセル8の内側に設置されている。培養容器1は、細胞を含む細胞懸濁液を収容する容器である。培養容器1の内部には、攪拌翼を有する攪拌装置が設けられていてもよい。攪拌翼を回転させることで、培養容器1の内部に細胞とともに収容された培地が攪拌され、培地の均質性が保たれる。培養容器1はシングルユース培養槽（シングルユースバック）でもよく、低溶出性の素材やガスバリア性のある素材により作られたシングルユースバックが好ましい。

[0020] 培養容器1の外部には、配管であるチューブ4により泡沫トラップ容器2が接続されている。チューブ4の素材は特に限定されないが、シリコーン、又は熱融着接合可能な素材であることが好ましい。図1においては、2個の泡沫トラップ容器2が接続されているが、泡沫トラップ容器2の数は特に限定されず、1個でもよいし、2個又は2個以上でもよい。図2～図4においては、泡沫トラップ容器2の数が1個である場合を示している。培養容器1に通気される気体の排出口は、培養容器1と泡沫トラップ容器をつなぐライン（チューブ4）だけであることが好ましい。

[0021] 泡沫トラップ容器 2 には、少なくとも 1 つ以上の排気フィルター 3 が接続されている。

泡沫トラップ容器 2 には、排液ライン 5 が接続されており、排液ライン 5 の途中には排液用ポンプ 6 が設置されている。泡沫トラップ容器 2 に接続される排液ライン 5 は、無菌状態を維持した排液タンク 7 に接続されている。排液タンクは無菌的に切り替えることができるようになっていてもよい。

[0022] 泡沫トラップ容器 2 が、外部に接続された配管以外は密閉された容器であることが好ましい。泡沫トラップ容器はシングルユースバックでもよく、低溶出性の素材やガスバリア性のある素材により作られたシングルユースバックが好ましい。

[0023] 図 2 は、泡沫トラップ容器 2 内に消泡剤 1 6 が添加されている状態を示している。図 3 は、泡沫トラップ容器 2 内に物理的消泡機構 1 7 が設けられている状態を示している。物理的消泡機構 1 7 としては、攪拌装置などを使用することができる。

[0024] 図 4 は、培養容器 1 と泡沫トラップ容器 2 とを接続するチューブとして、分岐を有するチューブを使用した場合を示している。分岐した部分には、チューブクランプ 1 8 が設けられ、分岐部分の末端には、無菌コネクター 1 9 が設けられ、追加の泡沫トラップ容器を接続することができるように構成されている。

[0025] 図 1 ~ 図 4 において、培養容器 1 の下方には、マクロスパージャー 9 およびマイクロスパージャー 1 0 が設けられている。マクロスパージャー 9 は、培養液中のガス濃度を調整するために使われ、好ましくは培養液中の  $\text{CO}_2$  濃度を調整するためのスパージャーである。マイクロスパージャー 1 0 は、培養液中のガス濃度を調整するために使われ、好ましくは培養液中の酸素濃度を調整するためのスパージャーである。培養容器 1 には灌流装置 1 1 が接続されており、培養容器 1 の内部の培養液は、灌流装置 1 1 を通過し、細胞の生産物を含む透過液 1 5 は、培養容器 1 から取り出される。

[0026] 培養容器 1 には、培養容器内に培養液を導入した場合における培養液の上

部の空間の圧力を測定するための圧力センサー 12 が設けられている。培養容器 1 の上部には、上面通気 13 を行うための開口が設けられている。また、また、培養容器 1 の上部には、供給培地 14 を導入するための開口が設けられている。

[0027] 本発明の生産物の製造方法および細胞培養装置においては、以下の式 1～式 5 の一以上を満たすことが好ましい。

$$(式1) \quad M i^2 \times M a^{0.5} / S / 200 \leq V t \leq 10W$$

$$(式2) \quad L \leq [P^2 / (M i^{1.5} + M a)] \times S^{0.5}$$

$$(式3) \quad (M i^{1.5} + M a) \times L \times S^{0.5} / 10 \leq P \leq 50 \times V t$$

(1/3)

$$(式4) \quad W^{0.5} / 1000 \leq E \leq V c / S / 100$$

$$(式5) \quad 1000 \times S^2 \times M i^2 \times M a^{0.5} \times L / P^2 / (V c - W) \leq F \leq W / 10$$

P を、式 3 で定義する範囲にすることにより、圧力を抑える効果を得ることができる（後記する実施例 9 と実施例 13 を参照）。

F を、式 5 で定義する範囲にすることにより、圧力の上昇を抑制する効果を得ることができる（式 5 の範囲外の場合を示す実施例 12 と実施例 13 を参照）。

[0028] 上記の式中、

V c は、培養容器容積 (L) を示し、

W は、培養容器内の培養液量 (L) を示す。

S は、培養液の気液界面面積 (m<sup>2</sup>) を示し、

F は、培養容器内に流す上面通気量 (L/分) を示す。

E は、泡沫トラップ容器に接続される排気フィルターの表面積 (m<sup>2</sup>) を示し、

、

M i は、1 μm～200 μm の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

M a は、0.1 mm～10 mm の孔径を有するマクロスパージャーの通気量

(L/分)を示し、

$V_t$  は泡沫トラップ容器容量 (L) を示し、

L は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、

P は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示す

。

[0029] 各パラメーターの測定方法を以下に説明する。

S (培養液の気液界面面積) : 培養時の液量を充填した場合の液面上端において水平に切断した時の投影面積であって、レーザー測定器、ノギスによって測定することができる。

W (培養容器内の培養液量) : 培養装置に付随する重量測定装置によって測定することができる。付随していない場合は、培養時の高さになるまで水をいれて、その水の重量を別途測定することによっても測定することができる。

。

L (チューブの長さ) : 定規・コンベックス・ノギスなどの適切な測長機器で測定することができる。

P (チューブの太さ) : カタログスペックもしくは、ノギスで測定することができる。

$V_c$  (培養容器容積) : カタログスペック、もしくは、適当な流体で満たしたときのその流体の比重から算出することができる。

$V_t$  (泡沫トラップ容器容量) : カタログスペック、もしくは、適当な流体で満たしたときのその流体の比重から算出することができる。

E (排気フィルターの表面積) : カタログスペック

F (培養容器内に流す上面通気量)、 $M_i$  (マイクロスパージャーからの通気量)、 $M_a$  (マクロスパージャーの通気量) : スパージャーにおける通気量の設定値。

[0030]  $V_c$  (培養容器容積) は、大量培養及び生産性の観点から、好ましくは 10L~50000L であり、より好ましくは、20L~20000L であり、さらに好ましくは 100L~2000L であり、特に好ましくは 300~

1500Lである。

W（培養容器内の培養液量）は、好ましくは10L～20000Lであり、より好ましくは20L～5000Lであり、さらに好ましくは100L～2000Lであり、特に好ましくは300～1500Lである。

S（培養液の気液界面面積）は、好ましくは $0.01\text{m}^2$ ～ $10\text{m}^2$ であり、より好ましくは $0.05\text{m}^2$ ～ $5\text{m}^2$ である。

F（培養容器内に流す上面通気量）は、好ましくは $0.01\text{L}/\text{分}$ ～ $200\text{L}/\text{分}$ であり、より好ましくは $0.1\text{L}/\text{分}$ ～ $100\text{L}/\text{分}$ である。

E（泡沫トラップ容器に接続される排気フィルターの表面積）は、好ましくは、 $0.01\text{m}^2$ ～ $10\text{m}^2$ であり、より好ましくは、 $0.02\text{m}^2$ ～ $5\text{m}^2$ である。

[0031]  $M_i$ （ $1\mu\text{m}$ ～ $200\mu\text{m}$ の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量）は、好ましくは、 $0.1\text{L}/\text{分}$ ～ $100\text{L}/\text{分}$ であり、より好ましくは、 $0.5\text{L}/\text{分}$ ～ $50\text{L}/\text{分}$ である。マイクロスパージャーの孔径は、好ましくは $5\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ であり、より好ましくは $10\mu\text{m}$ ～ $50\mu\text{m}$ である。 $M_i$ は、培養液中の酸素濃度を維持するためのマイクロスパージャーからの通気量であってもよい。

$M_a$ （ $0.1\text{mm}$ ～ $10\text{mm}$ の孔径を有するマクロスパージャーの通気量）は、好ましくは、 $0.01\text{L}/\text{分}$ ～ $100\text{L}/\text{分}$ であり、より好ましくは、 $0.1\text{L}/\text{分}$ ～ $50\text{L}/\text{分}$ である。マクロスパージャーの孔径は、好ましくは $0.2\text{mm}$ ～ $5\text{mm}$ であり、より好ましくは $0.5\text{mm}$ ～ $2\text{mm}$ である。 $M_a$ は、培養液中の $\text{CO}_2$ 濃度を調整するためのマクロスパージャーの通気量であってもよい。

$V_t$ （泡沫トラップ容器容量）は、好ましくは、 $0.5\text{L}$ ～ $1000\text{L}$ であり、より好ましくは、 $1\text{L}$ ～ $500\text{L}$ である。

L（泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ）は、好ましくは、 $0.05\text{m}$ ～ $5\text{m}$ であり、より好ましくは、 $0.1\text{m}$ ～ $3\text{m}$ である。

P（泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ）は、好ましく

は、2 mm～300 mmであり、より好ましくは、5 mm～50 mmである。

[0032] 本発明においては、培養液の生細胞密度が $10 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることが好ましく、 $30 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることが好ましく、 $40 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることがさらに好ましく、 $50 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることがさらに好ましく、 $70 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることがさらに好ましく、 $100 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることがさらに好ましく、 $120 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells/mLであることがさらに好ましい。10<sup>6</sup>の代わりにMと表記することもある。

[0033] 細胞培養においては、培地に消泡剤を添加してもよい。消泡剤の消泡成分としては、シリコン系が好ましく、ジメチコンが特に好ましい。消泡剤の消泡成分としては、ポリジメチルシロキサンを含むものが好ましく、より好ましくはポリジメチルシロキサンに微粉末シリカを含むものである。消泡剤としては、例えば、Cytiva社製 HyClone ADCF Antifoam Agentを使用することができる。また、消泡剤による細胞ダメージを考慮する必要がないため、上記の消泡剤よりも高濃度の消泡剤を使うこともできる。

また、図2に示すように、泡沫トラップ容器2内に消泡剤16を添加する場合における消泡剤16としても、上記した消泡剤を使用することができる。

[0034] 本発明においては、培養容器から抜き出した細胞懸濁液を分離膜に通過させて、細胞含有液と透過液とに分離してもよい。この操作は、灌流装置を用いて行うことができる。この操作においては、培養槽中から抜き出した細胞懸濁液は、上記細胞懸濁液よりも高い細胞濃度を有する細胞含有液と、上記細胞懸濁液よりも低い細胞濃度を有する透過液とに分離される。細胞濃度は Beckman Coulter 製 生死細胞アナライザー Vi-CEL

L XRによって測定することができる。

- [0035] 上記した膜分離処理工程は、タンジェンシャルフィルトレーションであることが好ましく、Alternating tangential flow (ATF) やTangential flow であることがより好ましく、Alternating tangential flowであることが最も好ましい。Alternating tangential flowを行えるフィルターとしては、Repligen社製のSuATF10-S02PESや、F2 RF02PES等がある。
- [0036] 細胞培養に用いる培地としては、通常の動物細胞の培養で使用されている培地を用いることができる。例えば、CD OptiCHO (Thermo Fisher社製)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、イーグル最小必須培地 (MEM)、RPMI-1640培地、RPMI-1641培地、F-12K培地、ハムF12培地、イスコプ変法ダルベッコ培地 (IMDM)、マッコイ5A培地、ライボビッツL-15培地、及びEX-CELL (商標) 300シリーズ (JRH Biosciences社)、CHO-S-SFM11 (Invitrogen社)、CHO-SF (Sigma-Aldrich社)、CD-CHO (Invitrogen社)、IS CHO-V (Irvine Scientific社)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich社) などを使用することができる。又は自作培地を用いてもよい。
- [0037] 培地には牛胎児血清 (FCS) 等の血清を添加してもよいし、血清を添加しなくてもよい。培地には、アミノ酸、塩、糖類、ビタミン、ホルモン、増殖因子、緩衝液、抗生物質、脂質、微量元素、植物タンパク質の加水分解物などの追加成分を補充してもよい。タンパク質不含培地を用いることもできる。
- [0038] 培地のpHは培養する細胞により異なるが、一般的にはpH6.0~8.0であり、好ましくはpH6.4~7.6であり、より好ましくはpH6.7~7.4である。

培養温度は、一般的には $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ であり、好ましくは $32^{\circ}\text{C}\sim 39^{\circ}\text{C}$ であり、より好ましくは $36^{\circ}\text{C}\sim 38^{\circ}\text{C}$ であり、培養中に培養温度を変更してもよい。

培養は、 $\text{CO}_2$ 濃度が $0\sim 40\%$ 、好ましくは $2\sim 25\%$ 、さらに好ましくはさらに好ましくは $3\sim 20\%$ の雰囲気下で行うことができる。

[0039] 培養期間は特に限定されないが、一般的には12時間～90日間であり、好ましくは1日間から80日間であり、より好ましくは1日以上70日未満であり、さらに好ましくは5日以上65日未満であり、特に好ましくは7日以上60日未満である。本発明においては、培養期間が14日以上であることが好ましい。

[0040] 培養においては、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加えることができる。培養の攪拌を行う場合、攪拌回転数は特に限定されないが、単位体積当たりの攪拌動力は、一般的には $10\sim 300\text{ kW}/\text{m}^3$ であり、好ましくは $20\sim 200\text{ kW}/\text{m}^3$ であり、より好ましくは $30\sim 100\text{ kW}/\text{m}^3$ である。

[0041] 細胞培養は、本明細書において上記した構成を有する細胞培養装置を用いて行うことができる。細胞培養装置としては、発酵槽型タンク培養装置、エアリフト型培養装置、カルチャーフラスコ型培養装置、スピナーフラスコ型培養装置、マイクロキャリア型培養装置、流動層型培養装置、ホロファイバー型培養装置、ローラーボトル型培養装置、又は充填槽型培養装置等のいずれでもよい。

[0042] 培養液の粘度は、好ましくは $1.2\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $15\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であり、より好ましくは $1.4\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $12\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であり、特に好ましくは $1.6\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $10\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満である。

[0043] 本発明においては、培養中に、pH調整剤を添加してもよい。ろ過フィルタ流路詰まりの点から、培養槽に添加するpH調整剤の1日当たりの添加量は、好ましくは $8\text{ mmol}/\text{day}/\text{L}$ 以下であり、より好ましくは $7\text{ mmol}/\text{day}/\text{L}$ 以下である。ただし、pH調整剤を添加しなくてもよい。

pH調整剤としては特に限定されないが、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 水溶液、 $\text{NaOH}$ 水溶液または $\text{NaHCO}_3$ 水溶液が好ましく、より好ましくは $\text{NaHCO}_3$ 水溶液である。pH調整剤は、単独で添加してもよいし、培地や消泡剤に混ぜて添加してもよい。pH調整剤の添加による培養液中の局所的なpHの変動を避けるためには、pH調整剤は培地に混ぜて添加するのが好ましい。

[0044] 細胞を培養する方法の様式は特に限定されず、例えば、灌流培養、バッチ培養、又はフェドバッチ培養の何れでもよいが、好ましくは灌流培養である。

[0045] バッチ培養とは、細胞を固定体積の培養液中で短期間増殖させ、その後、完全に回収する不連続な方法である。

[0046] フェドバッチ培養は、ポーラス又は連続的に培地を供給して、消費された培地成分を補給することによって、バッチプロセスを改善する培養方法である。

[0047] 灌流培養は、新鮮な培地を添加し、同時に使用済み培地を除去する培養法であり、バッチ培養及びフェドバッチ培養をさらに改善できる可能性がある。灌流培養によれば、一般的に、高い生細胞密度を達成することが可能である。典型的な灌流培養は、1日間又は2日間続くバッチ培養スタートアップで始まり、その後、培養物に新鮮な供給培地を連続的、段階的、及び／又は断続的に添加し、使用済み培地を同時に除去する。灌流培養においては、沈降、遠心分離又はろ過などの方法を用いて、生細胞密度を維持しながら使用済み培地を除去することができる。灌流培養の利点は、目的タンパク質が生産される培養が、バッチ培養法又はフェドバッチ培養よりも長期間維持されることである。

[0048] 灌流は、連続的、段階的、断続的又はこれらの組み合わせの何れの形態でもよい。好ましくは、連続的な形態がよい。動物細胞は、培養物中に保持され、除去される使用済みの培地は、細胞を実質的に含まないか、又は培養物よりもはるかに少ない細胞を有していてもよい。細胞培養によって発現される生産物は膜孔径の選択により、培養物中に保持又は回収することができる。

。培養中の生細胞密度が過剰にならないよう、培養液の一部を細胞ごと抜き取り、新鮮な培地を同量加えることにより生細胞密度を減らす（セルブリーディング）ことを行っても良い。

[0049] 本発明における細胞の種類は特に限定されないが、動物細胞、植物細胞、酵母などの真核細胞、枯草菌などの原核細胞及び大腸菌などが挙げられる。細胞は、好ましくは、動物細胞（より好ましくは哺乳類細胞）、又は昆虫細胞であり、哺乳類細胞が最も好ましい。細胞としては、初代細胞でも株化細胞でもよい。

[0050] 細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HEK細胞（Human Embryonic Kidney 由来細胞）、BHK細胞、293細胞、ミエローマ細胞（NSO細胞など）、PerC6細胞、SP2/O細胞、ハイブリドーマ細胞、COS細胞（アフリカミドリザル腎臓由来細胞）、3T3細胞、HeLa細胞、Vero細胞（アフリカミドリザル腎臓上皮細胞）、MDC K細胞（イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞）、PC12細胞、WI38細胞などを挙げることができる。上記の中でも、CHO細胞、HEK細胞、BHK細胞、ハイブリドーマが好ましく、より好ましくは、CHO細胞、HEK細胞であり、最も好ましくはCHO細胞である。CHO細胞は、組換えタンパク質、例えば、サイトカイン、凝固因子、及び抗体の産生に広く使用されている。ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）を欠損したCHO細胞を使用することが好ましく、DHFR欠損CHO細胞としては、例えば、CHO-DG44を使用することができる。

[0051] 細胞の生存率としては、高い方が好ましいが、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、99%以上が最もこの好ましい。

[0052] これらの細胞は、発現させたいタンパク質をコードする外来遺伝子を導入した細胞であってもよい。発現させたいタンパク質をコードする外来遺伝子を細胞に導入するためには、発現ベクターを使用することができる。発現させたいタンパク質をコードするDNAと、発現調節配列（例えば、エンハン

サー、プロモーター及びターミネーターなど) と、所望により選択マーカー遺伝子とを含む発現ベクターを細胞に導入することにより、発現させたいタンパク質をコードする外来遺伝子を導入した細胞を作製することができる。発現ベクターとしては特に限定はなく、細胞の種類、用途などに応じて適宜選択して使用することができる。

[0053] プロモーターとしては、哺乳動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の I E ( i m m e d i a t e e a r l y ) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス ( m o l o n e y m u r i n e l e u k e m i a v i r u s ) のプロモーター及びエンハンサー等を挙げることができる。また、ヒトCMVの I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0054] 選択マーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子、又は蛍光遺伝子(緑色蛍光タンパクGFPなどをコードする遺伝子)などを用いることができる。

[0055] 細胞に発現ベクターを導入する方法は、特に限定はなく、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、ジーンガン法及びリポフェクション法などを用いることができる。

[0056] 本発明による生産物の製造方法は、細胞培養装置を用いて細胞を培養して上記細胞から生産物を産生させることを含む。

[0057] 本発明において、生産物の種類は特に限定されないが、好ましくは組み換えタンパク質である。生産物としては、例えば、組み換えポリペプチド鎖、組み換え分泌ポリペプチド鎖、抗原結合タンパク質、抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、マウス抗体、バイスペシフィック抗体など)

、Fc融合タンパク質、断片化免疫グロブリン、一本鎖抗体（scFv）などが挙げられる。また、他にもアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスなどであってもよい。

[0058] 生産物は、好ましくは抗体であり、より好ましくはヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、又はマウス抗体である。断片化免疫グロブリンとしては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなどが挙げられる。抗体のクラスも特に限定されるものではなく、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgG、IgA、IgD、IgE、IgMなどいずれのクラスでもよいが、医薬として用いる場合はIgG及びIgMが好ましい。

[0059] ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列から誘導される1つ又は複数の可変及び定常領域を有する全ての抗体を含む。一実施形態では、可変及び定常ドメインの全てが、ヒト免疫グロブリン配列から誘導される（完全ヒト抗体）。

[0060] ヒト化抗体は、ヒト対象に投与されたときに、非ヒト種抗体と比較して、ヒト化抗体が免疫反応を誘発する可能性が低くなるように、及び／又は重篤な免疫反応の誘発がより少なくなるように、1つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、及び／又は付加により非ヒト種から誘導された抗体の配列と異なる配列を有する。一例では、非ヒト種抗体の重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク及び定常ドメイン内のある特定のアミノ酸は、ヒト化抗体を産生するように変異している。別の例では、ヒト抗体からの定常ドメインは、非ヒト種の可変ドメインに融合される。

[0061] キメラ抗体とは、互いに由来の異なる可変領域と定常領域を連結した抗体である。例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域からなる抗体は、マウス・ヒト異種キメラ抗体である。マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結させ、これを発現ベクターに組み込むことによって、キメラ抗体を発現する組換えベクターが作製できる。上記ベクターにより形質転換された組換え細胞を培養し、組み込まれたDNAを発現させることによって、培養中に生

産されるキメラ抗体を取得できる。

[0062] バイスペシフィック抗体とは、2つの異なる抗原特異性を認識する抗体である。様々な形態のバイスペシフィック抗体が存在する。バイスペシフィック抗体を作製する方法としては、2つのイムノグロブリン分子をN-サクシニミジル 3-(2-ピリジルジチオール) プロピオネート又はS-アセチルメルカプトサクシニックアシッドアンハイドライドなどの架橋剤を用いて結合して作製する方法、イムノグロブリン分子のFabフラグメントどうしを結合して作製する方法などが報告されている。また、バイスペシフィック抗体をコードする遺伝子を細胞に導入することにより、発現させることも可能である。

[0063] Fc融合タンパク質とは、Fc領域を有するタンパク質を示し、抗体を含む。

Fabは、VL、VH、CL及びCH1ドメインを有する一価断片である。

F(ab')<sub>2</sub>は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された2つのFab断片を有する二価断片である。

Fv断片は、抗体のシングルアームのVL及びVHドメインを有する。

一本鎖抗体(scFv)は、VL及びVH領域がリンカー（例えば、アミノ酸残基の合成配列）を介して接合して、連続したタンパク質鎖を形成する抗体であり、ここでリンカーは、タンパク質鎖をそれ自身に折り重ね、一価抗原結合部位を形成させるのに十分な長さである。

[0064] 抗体としては、特に限定されないが、例えば、抗IL-6レセプター抗体、抗IL-6抗体、抗グリピカン-3抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗GP11b/IIIa抗体、抗TNF抗体、抗CD25抗体、抗EGFR抗体、抗Her2/neu抗体、抗RSV抗体、抗CD33抗体、抗CD52抗体、抗IgE抗体、抗CD11a抗体、抗VEGF抗体及び抗VLA4抗体などが挙げられる。

[0065] 上記した培養により製造される生産物は精製することができる。生産物の分離及び精製は通常のタンパク質で使用されている分離及び精製方法を使用

すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外ろ過、塩析、透析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択及び組み合わせることにより、生産物を分離及び精製することができるが、これらに限定されるものではない。上記で得られた生産物の濃度測定は、吸光度測定又は酵素結合免疫吸着検定法（Enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA）等により行うことができる。

[0066] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、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、ゲルろ過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC（high performance liquid chromatography；高速液体クロマトグラフィー）又はFPLC（fast protein liquid chromatography）等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0067] なお、生産物には、精製前又は精製後に適当なポリペプチド修飾酵素を作用させることにより、生産物を修飾したり、部分的にペプチドを除去することもできる。ポリペプチド修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

[0068] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

[0069] <抗体産生細胞の樹立>

IgG1及びIgG4をコードする核酸配列を含むベクターを構築し、構築したベクターをCHO-DG44細胞へ導入することにより、IgG1を発

現させるCHO-DG44細胞（IgG1細胞）とIgG4を発現させるCHO-DG44細胞（IgG4細胞）を作製した。ベクターの構築及び細胞への導入は、特表2016-517691号公報の実施例2に準じて行った。上記により、モノクローナル抗体を産生するCHO細胞を準備し、以下の実施例において使用した。

以下の実施例及び比較例においては、図1に示す細胞培養装置を用いて実験を行った。

[0070] <実施例1～3>

細胞；CHO細胞

培養方法；灌流培養

培地；CD OptiCHO (ThermoFisherScientific社製)

培養槽；直径349mm，槽高さ685mmのプラスチック製シングルユース培養容器，攪拌翼は直径116mmのプロペラ翼

培養液量；50L

生細胞播種密度； $5 \times 10^5$  cells/mL

培養環境；36℃以上38度以下、pHは6.7以上7.4以下、CO<sub>2</sub>濃度は160mmHg以下

[0071] 到達生細胞密度； $1.2 \times 10^8$  cells/mL

細胞播種以後、1日1回の細胞密度測定を実施し、上記の到達細胞密度を超えた場合には、上記細胞密度になるように培養液を抜き出して、同量の培地を添加して総培養液量が一定になるように調整し、細胞密度が到達密度を維持するように調整を実施した。

[0072] 灌流比；1.2

培養開始2日後から灌流を開始した。即ち、培養槽に連続的に新培地を供給し、同時に供給培地と同量でろ過フィルタからの透過液を抜き出し、供給する新培地と抜き出す透過液の量が、1日当たり培養液量の1.2倍になるように調整した。

[0073] ろ過；Repligen社製ATF4システムにF4 RF02PES-V2膜を使用した。F4 RF02PES-V2膜の孔径は $0.2\mu\text{m}$ 、中空糸径は $1\text{mm}$ 、ろ過面積は $0.77\text{m}^2$ である。

[0074] 酸素濃度；酸素濃度を33%以上に維持。

消泡剤；Cytiva社製HyClone ADCF Antifoam Agentを培養7日目から有効成分であるSimeticonを $0.2\text{mg/L/hr}$ の添加速度で連続的に添加開始した。

培養期間；実施例1から3では、培養は34日間行った。

[0075] <実施例4>

細胞；CHO細胞

培養方法；フェドバッチ培養

培地；CD OptiCHO (ThermoFisherScientific社製)

培養槽；直径 $349\text{mm}$ 、槽高さ $685\text{mm}$ のプラスチック製シングルユース培養容器、攪拌翼は直径 $116\text{mm}$ のプロペラ翼

培養液量； $50\text{L}$

生細胞播種密度； $5\times 10^5\text{cells/mL}$

培養環境； $36^\circ\text{C}$ 以上 $38^\circ\text{C}$ 以下、 $\text{pH}$ は $6.7$ 以上 $7.4$ 以下、 $\text{CO}_2$ 濃度は $160\text{mmHg}$ 以下

到達生細胞密度； $4.0\times 10^7\text{cells/mL}$ 、細胞播種以後、1日1回の細胞密度測定を実施。

酸素濃度；酸素濃度を33%以上に維持

消泡剤；Cytiva社製HyClone ADCF Antifoam Agentを必要に応じて適宜添加

培養期間；実施例4では、培養は14日間行った。

[0076] <実施例5～16、比較例1>

培養槽；直径 $756\text{mm}$ 、槽高さ $1472\text{mm}$ のプラスチック製シングルユース培養容器、攪拌翼は直径 $251\text{mm}$ のプロペラ翼。

模擬液；1 L中にNaCl 7g、NaHCO<sub>3</sub> 2g、界面活性剤Kolliphor P188 1gを純水で溶解した溶液

液量；500L

灌流比；模擬的に灌流比1.2で灌流を実施。

ろ過；Repligen社製ATF10のシステムにsuATF10-S02 PES膜を使用した。suATF10-S02 PES膜の孔径は0.2 μm、中空糸径は1mm、ろ過面積は11m<sup>2</sup>である。

泡沫トラップ容器内の消泡剤；Cytiva社製 HyClone ADC F Antifoam Agent

比較例1では、引用文献1に記載の装置のように、泡沫トラップ容器が培養槽の中に設けられた装置を使用した。

[0077] <最大内部圧力の測定>

プラスチック製シングルユースバッグから延びるチューブにTruTor II圧力センサー（Thermo Fisher Scientific社）を無菌的に接続し、シングルユースバッグ内部の圧力を測定した。

[0078] 実施例1～16及び比較例1の内容及び結果を以下の表に示す。

[0079] 上面通気量の欄の括弧内の数値範囲は、

$$(式5) \quad 1000 \times S^2 \times M i^2 \times M a^{0.5} \times L / P^2 / (V_c - W) \leq F \leq W / 10$$

を満たす範囲を示す。

[0080] 排気フィルター面積の欄の括弧内の数値範囲は、

$$(式4) \quad W^{0.5} / 1000 \leq E \leq V_c / S / 100$$

を満たす範囲を示す。

[0081] 泡沫トラップ容器容量の欄の括弧内の数値範囲は、

$$(式1) \quad M i^2 \times M a^{0.5} / S / 200 \leq V_t \leq 10W$$

を満たす範囲を示す。

[0082] チューブ長さの欄の括弧内の数値範囲は、

$$(式2A) \quad (S / \pi)^{0.5} / 2 \leq L \leq [P^2 / (M i^{1.5} + M a)]$$

$] \times S^{0.5}$

を満たす範囲を示す。

[0083] チューブ太さの欄の括弧内の数値範囲は、

$$(式3) \quad (M i^{1.5} + M a) \times L \times S^{0.5} / 10 \leq P \leq 50 \times V t$$

(1/3)

を満たす範囲を示す。

[0084] 表3の結果におけるA～Dは以下の基準で判定した。

A：最大内部圧力が5 p s i 未満である場合

B：最大内部圧力が瞬時的（圧力表示装置に1回だけ）に5 p s i となるが培養継続が可能である場合

C：最大内部圧力が断続的（圧力表示装置に連続的に2回以上）に5 p s i を超えることがあり、培養の制御が一時的に止まることがあったが、培養は継続できた場合

D：排気フィルターに泡沫が溜り、培養が継続できない場合

[0085]

[表1]

実施例/ 比較例	液	培養方式	生細胞 密度	培養槽 容積	培養 液量	気液界面 面積	上面通気量	培養槽排気 フィルター
	-	-	Mcells/mL	L	L	m <sup>2</sup>	L/min	-
実施例 1	培養液	灌流	120	65.5	50	0.096	0.5(0.19~5)	なし
実施例 2	培養液	灌流	200	65.5	50	0.096	1(0.74~5)	なし
実施例 3	培養液	灌流	120	65.5	50	0.096	0.5(0.33~5)	なし
実施例 4	培養液	フェドバッチ	40	65.5	50	0.096	0.5(0.03~5)	なし
実施例 5	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(2.51~50)	なし
実施例 6	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(1.41~50)	なし
実施例 7	模擬液	灌流		660	500	0.438	5(2.51~50)	なし
実施例 8	模擬液	灌流		660	500	0.438	20(2.51~50)	なし
実施例 9	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(2.51~50)	なし
実施例 10	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(2.51~50)	なし
実施例 11	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(2.51~50)	なし
実施例 12	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(10.03~50)	なし
実施例 13	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(10.04~50)	なし
実施例 14	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(6.28~50)	なし
実施例 15	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(2.51~50)	あり
実施例 16	模擬液	灌流		660	500	0.438	10(0.03~50)	あり
比較例 1	模擬液	灌流		660	500	0.438	10	なし

[0086]

[表2]

実施例/ 比較例	排気フィルター 面積	マイクロ バー ज्या 一通気量	マクロ バー ज्या 一通気量	攪拌 回転数	泡沫トラ ップ容器 の位置	泡沫トラッ プ容器容 量	泡沫 トラッ プ容 器個 数
	m <sup>2</sup>	L/min	L/min	rpm	-	L	-
実施例 1	0.073(0.007~6.85)	4	1	250	外部	10(0.8~500)	1
実施例 2	0.073(0.007~6.85)	10	2	250	外部	10(7.4~500)	1
実施例 3	0.073(0.007~6.85)	8	1	250	外部	10(3.3~500)	1
実施例 4	0.073(0.007~6.85)	1	0.2	250	外部	10(0.0~500)	1
実施例 5	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 6	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 7	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 8	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 9	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 10	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 11	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 12	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 13	0.73(0.022~15.06)	40	10	150	外部	100(57.7~5000)	2
実施例 14	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 15	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	外部	100(14.4~5000)	2
実施例 16	0.73(0.022~15.06)	2	10	150	外部	100(0.1~5000)	2
比較例 1	0.73(0.022~15.06)	20	10	150	内部	20(14.4~5000)	1

[0087]

[表3]

実施例/ 比較例	チューブ 長さ	チューブ 太さ	チューブ 素材	チュー ブ分岐	消泡 機能	排液 ライン	最大内部 圧力	結果
	m	mm	-	-	-	-	psi	
実施例 1	0.8(0.09~1.39)	6.35(2.32~107.72)	シリコーン	有り	無し	あり	2.9	A
実施例 2	0.8(0.09~0.84)	9.53(8.72~107.72)	シリコーン	有り	無し	あり	5	B
実施例 3	0.8(0.09~1.19)	9.53(6.11~107.72)	シリコーン	有り	無し	あり	4.5	A
実施例 4	0.8(0.09~1.66)	2.54(0.31~107.72)	シリコーン	有り	無し	あり	1.2	A
実施例 5	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	4.5	A
実施例 6	0.6(0.19~4.29)	25.4(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	3.2	A
実施例 7	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	5	B
実施例 8	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	4.4	A
実施例 9	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	なし	4.4	A
実施例 10	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	シリコーン	有り	消泡剤	なし	4.3	A
実施例 11	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	シリコーン	無し	消泡剤	なし	4.4	A
実施例 12	0.6(0.19~0.60)	9.53(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	5	B
実施例 13	0.6(0.19~0.91)	19.05(23.83~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	>5	C
実施例 14	1.5(0.19~2.42)	19.05(22.53~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	>5	C
実施例 15	0.6(0.19~2.42)	19.05(9.01~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	4.5	A
実施例 16	0.6(0.19~18.73)	19.05(1.16~232.08)	熱融着	無し	消泡剤	あり	1.5	A
比較例 1					消泡剤	あり		D

[0088] 実施例 1 においては、培養槽内の内圧を 5 p s i 未満に維持できた。抗体の生産性も高かった。

実施例 2 においては、培養槽内の内圧が瞬間的に 5 p s i に達したが継続は可能であった。抗体の生産性も高かった。

実施例 3 においては、培養槽内の内圧を 5 p s i 未満に維持できた。抗体の生産性も高かった。

実施例 4 においては、培養槽内の内圧を 5 p s i 未満に維持できた。灌流培養よりも抗体の生産性は劣るが、抗体は生産できた。

[0089] 実施例 5 及び 6 においては、培養槽内の内圧が 5 p s i 未満に維持できた。

実施例 7 においては、培養槽内の内圧が瞬間的に 5 p s i に達したが継続は可能であった。

実施例 8 ~ 1 1 においては、培養槽内の内圧を 5 p s i 未満に維持できた。

実施例 1 2 においては、培養槽内の内圧が瞬間的に 5 p s i に達したが継続は可能であった。

実施例 1 3 及び 1 4 においては、培養槽内の内圧が 5 p s i を超え、培養の制御が停止したが、すぐに 5 p s i を下回り制御が再起動したため、培養が継続できた。

[0090] 実施例 1 5 においては、泡沫が培養槽に付属する排気フィルターに辿り着き、培養槽の排気フィルターは詰まったが、泡沫トラップ容器側の排気フィルターが機能し続け、培養槽内の内圧を 5 p s i 未満に維持できた。

実施例 1 6 においては、泡沫が培養槽に付属する排気フィルターに辿り着き、培養槽の排気フィルターは詰まったが、泡沫トラップ容器側の排気フィルターが機能し続け、培養槽内の内圧を 5 p s i 未満に維持できた。

比較例 1 においては、泡沫トラップが内部にあるので容積が小さいため、泡沫トラップがすぐに泡沫で埋め尽くされ、排気フィルターに泡沫が到達し、排気ガスの出口がなくなり培養を継続できなくなった。

## 符号の説明

- [0091] 1 培養容器  
2 泡沫トラップ容器  
3 排気フィルター  
4 チューブ  
5 排液ライン  
6 排液用ポンプ  
7 排液タンク  
8 ベッセル  
9 マクロスパージャー

- 1 0 マイクロスパージャー
- 1 1 灌流装置
- 1 2 圧力センサー
- 1 3 上面通気
- 1 4 供給培地
- 1 5 透過液
- 1 6 消泡剤
- 1 7 物理的消泡機構
- 1 8 チューブクランプ
- 1 9 無菌コネクター

## 請求の範囲

- [請求項1] 細胞培養装置を用いて細胞を培養して前記細胞から生産物を産生させることを含む、生産物の製造方法であって、前記細胞培養装置が、細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、前記培養容器の外部に接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも1つ以上の泡沫トラップ容器とを含む、生産物の製造方法。
- [請求項2] 前記泡沫トラップ容器に少なくとも1つ以上の排気フィルターが接続されている、請求項1に記載の生産物の製造方法。
- [請求項3] 前記泡沫トラップ容器に排液ラインが接続されている、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。
- [請求項4] 前記培養容器に通気される気体の排出口が、前記培養容器と前記泡沫トラップ容器をつなぐラインだけである、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。
- [請求項5] 前記泡沫トラップ容器に接続される排液ラインが、無菌状態を維持した排液タンクに接続されている、請求項3に記載の生産物の製造方法。
- [請求項6] 前記排液タンクが無菌的に切り替えることができる、請求項5に記載の生産物の製造方法。
- [請求項7] 前記泡沫トラップ容器内に消泡剤が添加されるか、前記泡沫トラップ容器内に物理的消泡機構がある、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。
- [請求項8] 以下の式を満たす、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。  
$$M i^2 \times M a^{0.5} / S / 200 \leq V t \leq 10W$$
式中、  
V t は泡沫トラップ容器容量 (L) を示し、  
M i は、1 μm ~ 200 μm の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L / 分) を示し、  
M a は、0.1 mm ~ 10 mm の孔径を有するマクロスパージャーの

通気量 (L/分) を示し、

S は、培養液の気液界面面積 (m<sup>2</sup>) を示し、

W は、培養容器内の培養液量 (L) を示す。

[請求項9] 以下の式を満たす、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。

$$L \leq [P^2 / (M_i^{1.5} + M_a)] \times S^{0.5}$$

式中、

L は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、

S は、培養液の気液界面面積 (m<sup>2</sup>) を示し、

P は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、

M<sub>i</sub> は、1 μm ~ 200 μm の孔径を有するマイクロパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

M<sub>a</sub> は、0.1 mm ~ 10 mm の孔径を有するマクロパージャーの通気量 (L/分) を示す。

[請求項10] 以下の式を満たす、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。

$$(M_i^{1.5} + M_a) \times L \times S^{0.5} / 10 \leq P \leq 50 \times V_t^{(1/3)}$$

P は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、

S は、培養液の気液界面面積 (m<sup>2</sup>) を示し、

L は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、

M<sub>i</sub> は、1 μm ~ 200 μm の孔径を有するマイクロパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

M<sub>a</sub> は、0.1 mm ~ 10 mm の孔径を有するマクロパージャーの通気量 (L/分) を示し、

V<sub>t</sub> は泡沫トラップ容器容量 (L) を示す。

[請求項11] 以下の式を満たす、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。

$$W^{0.5} / 1000 \leq E \leq V_c / S / 100$$

式中、

Eは、泡沫トラップ容器に接続される排気フィルターの表面積（ $m^2$ ）を示し、

Wは、培養容器内の培養液量（L）を示し、

$V_c$ は、培養容器容積（L）を示し、

Sは、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示す。

[請求項12] 以下の式を満たす、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。

$$1000 \times S^2 \times M_i^2 \times M_a^{0.5} \times L / P^2 / (V_c - W) \leq F \leq W / 10$$

式中、

Fは、培養容器内に流す上面通気量（L/分）を示し、

$V_c$ は、培養容器容積（L）を示し、

Wは、培養容器内の培養液量（L）を示し、

$M_i$ は、 $1 \mu m \sim 200 \mu m$ の孔径を有するマイクロパーチャーからの通気量（L/分）を示し、

$M_a$ は、 $0.1 mm \sim 10 mm$ の孔径を有するマクロパーチャーの通気量（L/分）を示し、

Lは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ（m）を示し、

Pは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ（mm）を示し、

Sは、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示す。

[請求項13] 前記培養容器がシングルユース培養槽である、および/または前記泡沫トラップ容器がシングルユースバックである、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。

[請求項14] 前記泡沫トラップ容器が、外部に接続された配管以外は密閉された容

器である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。

- [請求項15] 前記培養液の生細胞密度が  $10 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$  cells / mL である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。
- [請求項16] 前記培養容器の培養液量が 10 L 以上である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。
- [請求項17] 細胞を培養する方法が灌流培養である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。
- [請求項18] 細胞が CHO 細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。
- [請求項19] 細胞が産生する生産物が抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。
- [請求項20] 培養期間が 14 日以上である、請求項 1 又は 2 に記載の生産物の製造方法。
- [請求項21] 細胞を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、前記培養容器の外部に配管で接続された、泡沫を蓄積することができる少なくとも 1 つ以上の泡沫トラップ容器とを含む、細胞培養装置。
- [請求項22] 前記泡沫トラップ容器に少なくとも 1 つ以上の排気フィルターが接続されている、請求項 21 に記載の細胞培養装置。
- [請求項23] 前記泡沫トラップ容器に排液ラインが接続されている、請求項 21 又は 22 に記載の細胞培養装置。
- [請求項24] 前記培養容器に通気される気体の排出口が、前記培養容器と前記泡沫トラップ容器をつなぐラインだけである、請求項 21 又は 22 に記載の細胞培養装置。
- [請求項25] 前記泡沫トラップ容器に接続される排液ラインが、無菌状態を維持した排液タンクに接続されている、請求項 23 に記載の細胞培養装置。
- [請求項26] 前記排液タンクが無菌的に切り替えることができる、請求項 25 に記載の細胞培養装置。
- [請求項27] 前記泡沫トラップ容器内に物理的消泡機構がある、請求項 21 又は 2

2に記載の細胞培養装置。

[請求項28] 以下の式を満たす、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

$$M i^2 \times M a^{0.5} / S / 200 \leq V t \leq 10W$$

式中、

$V t$  は泡沫トラップ容器容量 (L) を示し、

$M i$  は、 $1 \mu m \sim 200 \mu m$ の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

$M a$  は、 $0.1 mm \sim 10 mm$ の孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示し、

$S$  は、培養液の気液界面面積 ( $m^2$ ) を示し、

$W$  は、培養容器内の培養液量 (L) を示す。

[請求項29] 以下の式を満たす、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

$$L \leq P^2 / (M i^{1.5} + M a) \times S^{0.5}$$

式中、

$L$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ (m) を示し、

$S$  は、培養液の気液界面面積 ( $m^2$ ) を示し、

$P$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、

$M i$  は、 $1 \mu m \sim 200 \mu m$ の孔径を有するマイクロスパージャーからの通気量 (L/分) を示し、

$M a$  は、 $0.1 mm \sim 10 mm$ の孔径を有するマクロスパージャーの通気量 (L/分) を示す。

[請求項30] 以下の式を満たす、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

$$(M i^{1.5} + M a) \times L \times S^{0.5} / 10 \leq P \leq 50 \times V t^{(1/3)}$$

$P$  は、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの太さ (mm) を示し、

Sは、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示し、

Lは、泡沫トラップ容器と培養容器をつなぐチューブの長さ（m）を示し、

M<sub>i</sub>は、 $1\mu m\sim 200\mu m$ の孔径を有するマイクロパーチャーからの通気量（L/分）を示し、

M<sub>a</sub>は、 $0.1mm\sim 10mm$ の孔径を有するマクロパーチャーの通気量（L/分）を示し、

V<sub>t</sub>は泡沫トラップ容器容量（L）を示す。

[請求項31] 以下の式を満たす、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

$$W^{0.5}/1000 \leq E \leq V_c/S/100$$

式中、

Eは、泡沫トラップ容器に接続される排気フィルターの表面積E（ $m^2$ ）を示し、

Wは、培養容器内の培養液量（L）を示し、

V<sub>c</sub>は、培養容器容積（L）を示し、

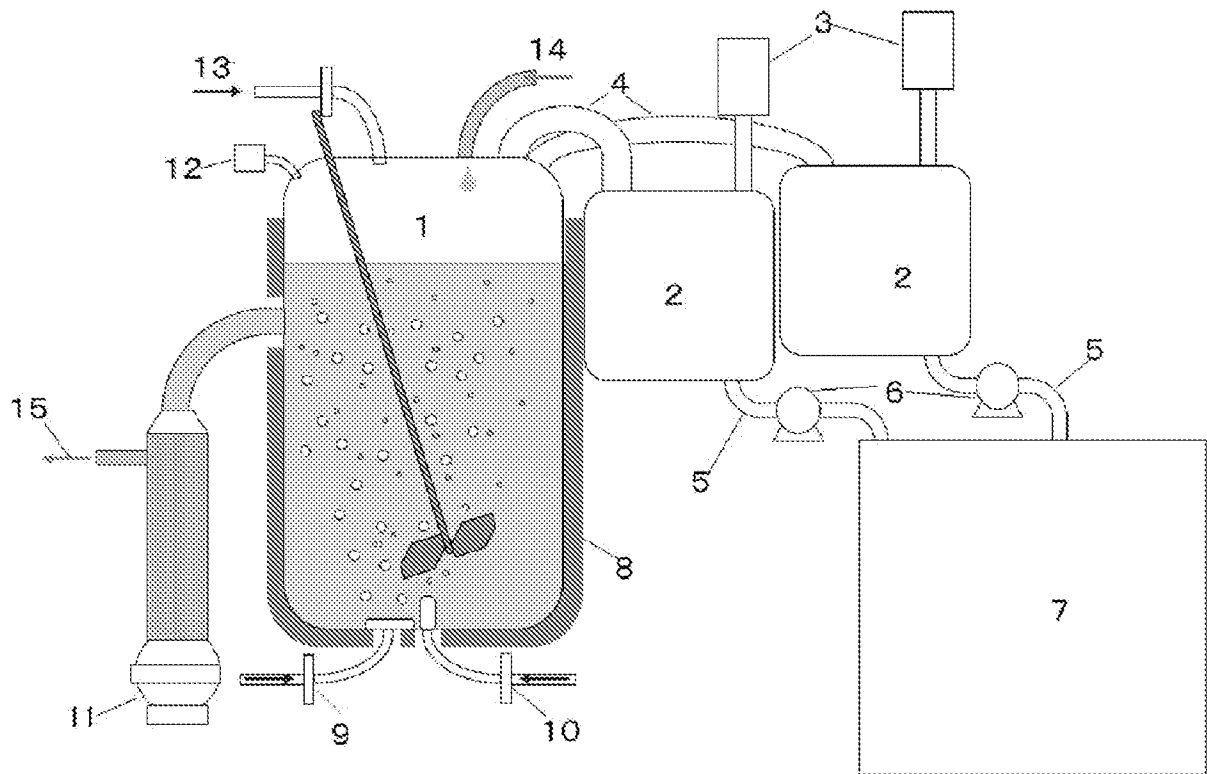
Sは、培養液の気液界面面積（ $m^2$ ）を示す。

[請求項32] 前記培養容器の容積が10L以上である、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

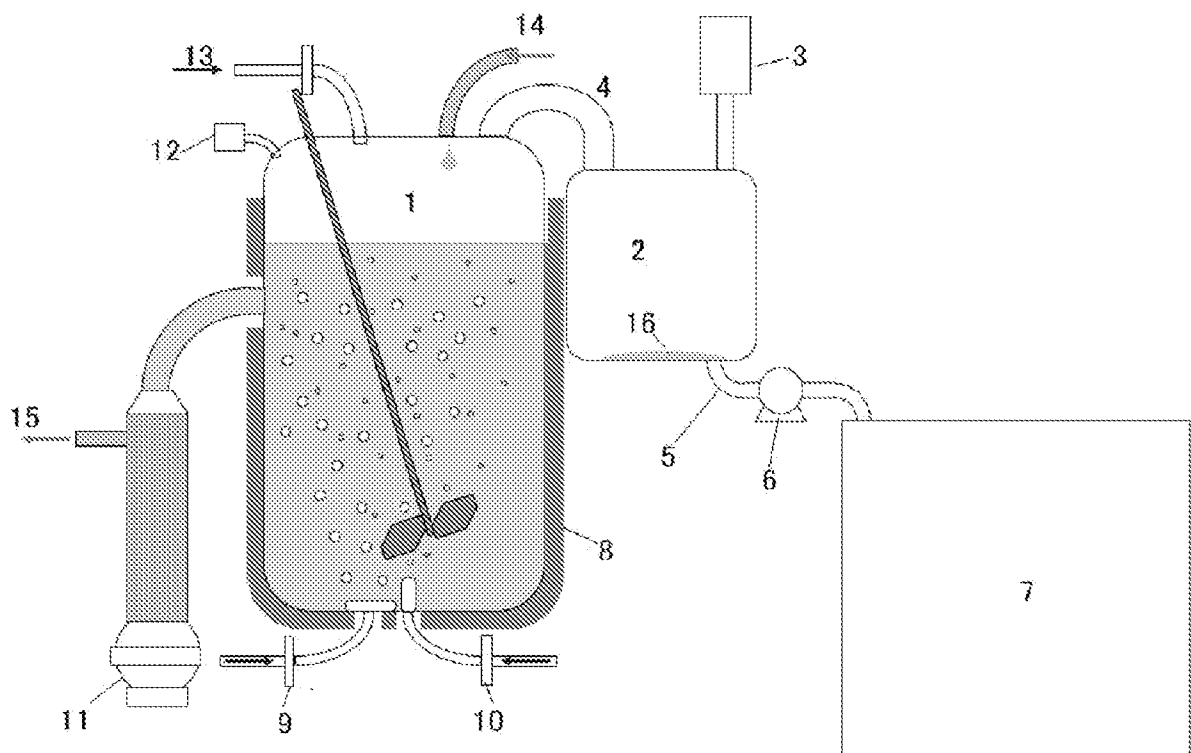
[請求項33] 前記培養容器がシングルユース培養槽である、および/または前記泡沫トラップ容器がシングルユースバックである、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

[請求項34] 前記泡沫トラップ容器が、外部に接続された配管以外は密閉された容器である、請求項21又は22に記載の細胞培養装置。

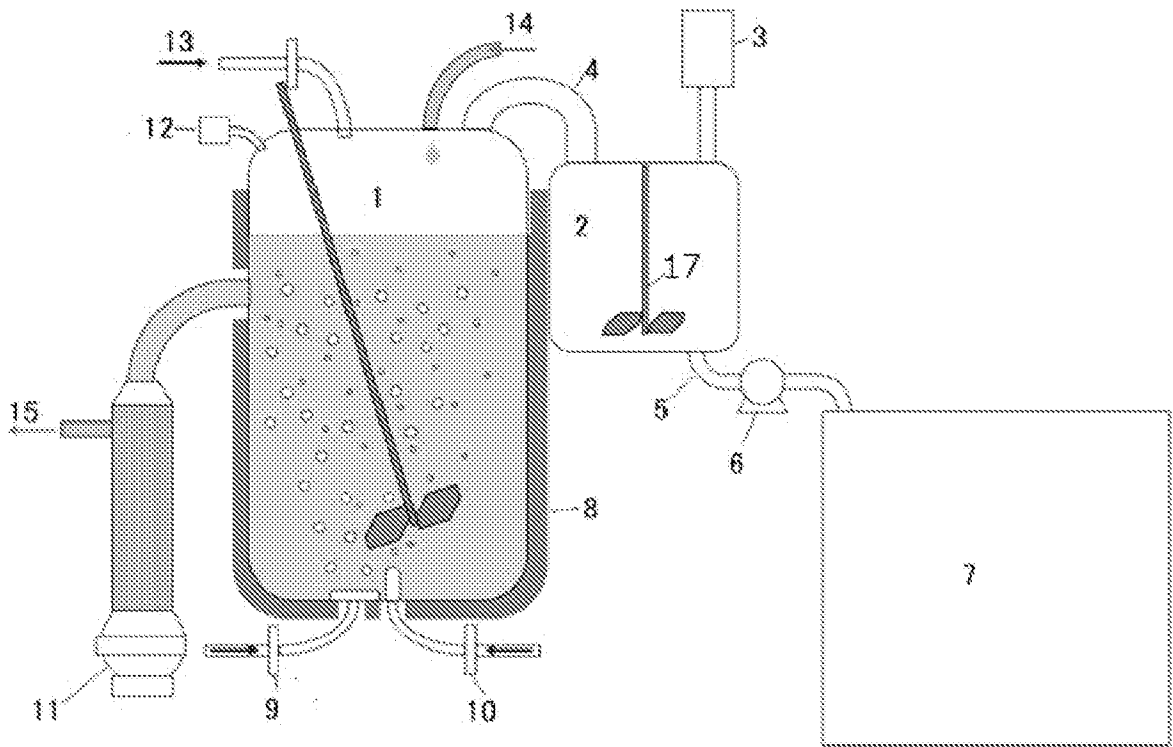
[図1]



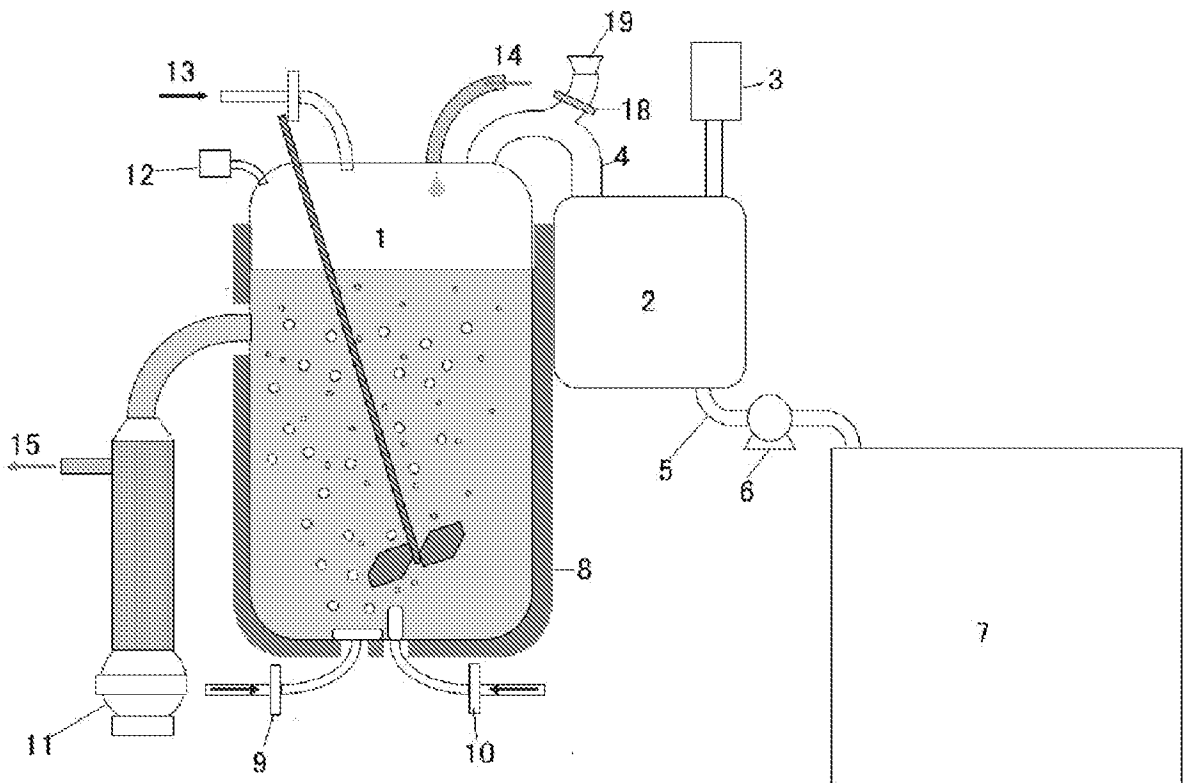
[図2]



[図3]



[図4]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2022/046000**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12M 3/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/08</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/107</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/21</i> (2006.01)i FI: C12P21/08; C12M3/00 Z; C12M1/00 D; C12M1/21; C12M1/107; C12N1/00 E; C12N1/00 A; C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M3/00; C12N5/10; C12N1/00; C12P21/08; C12M1/00;		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 57-5688 A (TORAY INDUSTRIES, INC.) 12 January 1982 (1982-01-12) p. 1, left column, line 12 to p. 2, lower right column, line 4, fig. 1, 2	1-6, 8-26, 28-34
Y	p. 1, left column, line 12 to p. 2, lower right column, line 4, fig. 1, 2	7, 27
Y	Microfilm of the specification and drawings annexed to the request of Japanese Utility Model Application No. 059702/1978 (Laid-open No. 1097/1979) (SHINKO INDUSTRIES CO., LTD.) 06 January 1979 (1979-01-06), p. 3, line 15 to p. 8, line 5, fig. 1, 2	7, 27
A	entire text	1-6, 8-26, 28-34
Y	CN 206688452 U (UNIVERSITY TIANJIN SCIENCE & TECH.) 01 December 2017 (2017-12-01) paragraph [0015], fig. 1	7, 27
A	entire text	1-6, 8-26, 28-34
Y	JP 2017-127226 A (TAISEI CORP.) 27 July 2017 (2017-07-27) paragraphs [0043]-[0046], fig. 2	7, 27
A	entire text	1-6, 8-26, 28-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>17 February 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>28 February 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2022/046000**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 1-281072 A (HITACHI, LTD.) 13 November 1989 (1989-11-13) entire text	1-34
A	JP 5-146286 A (AJINOMOTO CO., INC.) 15 June 1993 (1993-06-15) entire text	1-34
A	JP 2012-170364 A (HITACHI PLANT TECHNOLOGIES LTD.) 10 September 2012 (2012-09-10) entire text	1-34
A	JP 2018-19615 A (HITACHI, LTD.) 08 February 2018 (2018-02-08) entire text	1-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/046000**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 57-5688 A	12 January 1982	(Family: none)	
JP 54-1097 U1	06 January 1979	(Family: none)	
CN 206688452 U	01 December 2017	(Family: none)	
JP 2017-127226 A	27 July 2017	(Family: none)	
JP 1-281072 A	13 November 1989	US 5162204 A entire document WO 1989/002458 A1 EP 336966 A1 KR 10-1990-0018366 A	
JP 5-146286 A	15 June 1993	US 5476573 A entire document	
JP 2012-170364 A	10 September 2012	(Family: none)	
JP 2018-19615 A	08 February 2018	WO 2018/025686 A1 entire document	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/107(2006.01)i; C12M 1/21(2006.01)i FI: C12P21/08; C12M3/00 Z; C12M1/00 D; C12M1/21; C12M1/107; C12N1/00 E; C12N1/00 A; C12N5/10		
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）） C12M3/00; C12N5/10; C12N1/00; C12P21/08; C12M1/00; 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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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）		
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	JP 57-5688 A (東レ株式会社) 12.01.1982 (1982-01-12) 第1頁左欄第12行-第2頁右下欄第4行, 第1-2図	1-6, 8-26, 28-34
Y	第1頁左欄第12行-第2頁右下欄第4行, 第1-2図	7, 27
Y	日本国実用新案登録出願53-059702号(日本国実用新案登録出願公開54-1097号)の願書に添付した明細書及び図面の内容を撮影したマイクロフィルム(新光産業株式会社) 06.01.1979 (1979-01-06) 第3頁第15行-第8頁第5行, 第1-2図	7, 27
A	全文	1-6, 8-26, 28-34
Y	CN 206688452 U (UNIV. TIANJIN SCIENCE & TECH.) 01.12.2017 (2017-12-01) [0015], 図1	7, 27
A	全文	1-6, 8-26, 28-34
Y	JP 2017-127226 A (大成建設株式会社) 27.07.2017 (2017-07-27) [0043]-[0046], [図2]	7, 27
A	全文	1-6, 8-26, 28-34
A	JP 1-281072 A (株式会社日立製作所) 13.11.1989 (1989-11-13) 全文	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な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抵触するものではなく、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	17.02.2023	国際調査報告の発送日 28.02.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  中村 俊之 4N 5576  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
A	JP 5-146286 A (味の素株式会社) 15.06.1993 (1993 - 06 - 15) 全文	1-34
A	JP 2012-170364 A (株式会社日立プラントテクノロジー) 10.09.2012 (2012 - 09 - 10) 全文	1-34
A	JP 2018-19615 A (株式会社日立製作所) 08.02.2018 (2018 - 02 - 08) 全文	1-34

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/046000

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 57-5688 A	12.01.1982	(ファミリーなし)	
JP 54-1097 U1	06.01.1979	(ファミリーなし)	
CN 206688452 U	01.12.2017	(ファミリーなし)	
JP 2017-127226 A	27.07.2017	(ファミリーなし)	
JP 1-281072 A	13.11.1989	US 5162204 A the whole sentence WO 1989/002458 A1 EP 336966 A1 KR 10-1990-0018366 A	
JP 5-146286 A	15.06.1993	US 5476573 A the whole sentence	
JP 2012-170364 A	10.09.2012	(ファミリーなし)	
JP 2018-19615 A	08.02.2018	WO 2018/025686 A1 the whole sentence	