

(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
2024年8月8日(08.08.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/162464 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/003437

(22) 国際出願日: 2024年2月2日(02.02.2024)

(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 2023-015093 2023年2月3日(03.02.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社インファーマシア
(INFIRMACEA INC.) [JP/JP]; 〒2600013 千葉県千葉市中央区中央2丁目5番1号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 井上 誠(INOUE Makoto); 〒2600013 千葉県千葉市中央区中央2丁目5番1号 株式会社インファーマシア内 Chiba (JP).

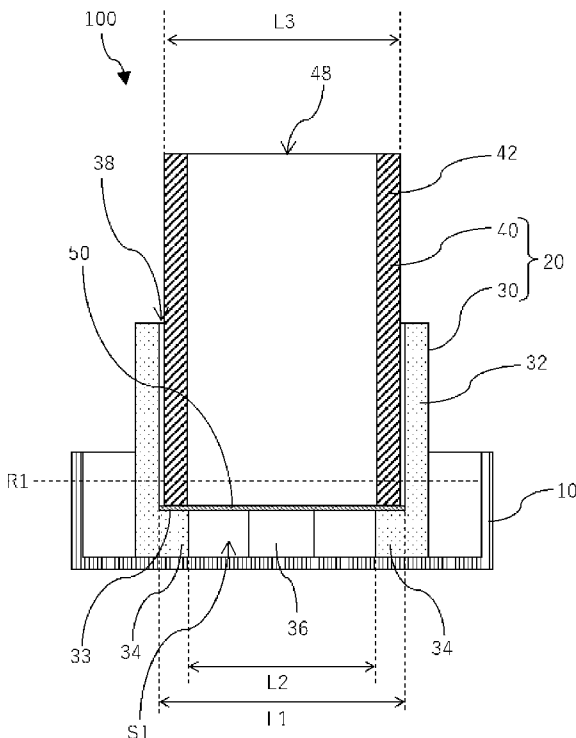
(74) 代理人: 堀 宏光, 外 (HORI Hiromitsu et al.);
〒1010025 東京都千代田区神田佐久間町1丁目
14番地第2東ビル610号 Tokyo (JP).

(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, 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, MU, 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, SC, 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,

(54) Title: CULTURE DEVICE, CULTURE TISSUE, PRODUCTION METHOD FOR CULTURE TISSUE, AND EVALUATION METHOD

(54) 発明の名称: 培養装置、培養組織、培養組織の製造方法及び評価方法



(57) Abstract: Provided are a culture device and/or culture method for tissue with which the form and/or function of the tissue can be maintained as much as possible over the long term. This culture device (100) has a mesh (50) for pressing tissue down into a culture medium.

(57) 要約: 組織の形態及び／又は機能を長期にわたってなるべく維持することが可能な組織の培養装置及び／又は培養方法を提供する。培養装置(100)は、組織を培地中に押下するためのメッシュ(50)を有する。

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)）

明 細 書

発明の名称：

培養装置、培養組織、培養組織の製造方法及び評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、培養装置、培養組織、培養組織の製造方法及び評価方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、生体内での微小環境を保持した状態で細胞を培養することを目的として、採取した組織（組織片を含む）を細胞分散させることなく培養する組織培養が行われることがある。下記の特許文献 1 及び特許文献 2 は、浮遊性の組織を培養する装置及び方法を開示する。

[0003] 特許文献 1，2 では、標的の組織は、第 1 の支持細胞層と第 2 の支持細胞層との間に挟まれた状態で培養される。具体的には、標的の組織は、第 1 の支持細胞層が接着された下部ベースと、第 2 の支持細胞層が接着された上部ベースと、の間に挟まれた状態で、培地に浸されて培養される。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献 1：国際公開第 2017/066471 号

特許文献 2：米国特許出願公開第 2021-0284969 号明細書

発明の概要

[0005] 動物ないし人体のような生体から採取された組織の形態及び／又は機能は、時間の経過とともに変化する。したがって、組織の形態及び／又は機能を長期にわたってなるべく健全に維持することが可能な組織の培養装置及び／又は培養方法が望まれる。培養組織の維持を目的として、特許文献 1，2 の様に、脂肪由来幹細胞のような支持細胞を用いる手法がある。一方で、培養組織内の細胞間相互作用という微小環境を保持したまま培養するためには、支持細胞のような外来細胞を用いずに培養することが求められる。外来細胞

を用いない培養は、特に培養組織の機能解析としてパスウェイ解析などを行う場合には重要である。

[0006] 一態様に係る培養装置は、組織を培地中に押下するためのメッシュを有する。

[0007] 一態様に係る培養装置の製造方法は、メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で組織を培養することを含む。

[0008] 一態様に係る培養組織は、メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で前記組織を培養することによって得られたものである。

[0009] 一態様に係る評価方法は、メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で培養することによって得られた培養組織に試薬を与え、前記試薬に対する前記培養組織の応答に応じて、前記試薬、及び／又は前記培養組織に関する機能評価を得ること、を含む。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、一実施形態に係る培養装置の斜視図である。

[図2]図2は、一実施形態に係る培養装置の一部を構成する保持部の斜視図である。

[図3]図3は、一実施形態に係る培養装置の一部を構成する保持部の第1筒状部の斜視図である。

[図4]図4は、一実施形態に係る培養装置の一部を構成する保持部の第2筒状部の斜視図である。

[図5]図5は、一実施形態に係る培養装置における図1の5A-5A線に沿った断面図である。

[図6]図6は、一実施形態に係る培養装置における図1の6A-6A線に沿った断面図である。

[図7]図7は、実施例1～5及び参考例1における培養上清中のグリセロール量を示すグラフである。

[図8]図8は、実施例1～5及び参考例1における培養上清中の分泌アディポネクチン量を示すグラフである。

[図9]図9は、実施例6における培養上清中のグルコース低下量を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、図面を参照して、実施形態について説明する。以下の図面において、同一又は類似の部分には、同一又は類似の符号を付している。

[0012] [培養装置]

まず、組織を培養するための培養装置について図1～6を参照して説明する。図1は、一実施形態に係る培養装置の斜視図である。図2は、一実施形態に係る培養装置の一部を構成する保持部の斜視図である。図3は、一実施形態に係る培養装置の一部を構成する保持部の第1筒状部の斜視図である。図4は、一実施形態に係る培養装置の一部を構成する保持部の第2筒状部の斜視図である。図5は、一実施形態に係る培養装置における図1の5A-5A線に沿った断面図である。図6は、一実施形態に係る培養装置における図1の6A-6A線に沿った断面図である。

[0013] 一実施形態に係る培養装置100は、組織培養をするための装置である。培養すべき組織は、浮遊性を有することが好ましい。ここで、浮遊性は、培地に浮遊する性質を有するものであってよい。

[0014] 培養すべき組織は、生体から採取された組織であってよい。ここで、「組織」という用語は、生体から採取した「組織片」を含む概念であることに留意されたい。組織を採取するための生体は、特に制限されないが、例えば動物ないし人体であることが好ましい。

[0015] 培養すべき組織は、例えば脂肪組織又は脳組織であってよい。培養すべき組織は、好ましくは動物の脂肪組織又は脳組織であり、より好ましくはヒトの脂肪組織又は脳組織である。脂肪組織は、任意の臓器から採取したものであってよい。脂肪組織は、例えば、皮下脂肪、内臓脂肪だけでなく、骨髓、胸腺、血管、心臓、腸間膜、脾臓、肝臓、後眼窩又は乳腺組織等から採取した脂肪片であってよい。培養する組織は、健常の臓器から採取した組織であってもよく、異常を有する臓器から採取した組織であってもよい。異常を有

する臓器は、例えば脂肪腫やがん組織などが挙げられる。

[0016] 培養する組織のサイズは、特に制限されないが、例えば1mg～1000mg、5mg～500mg、10mg～200mg、又は20mg～100mgであってよい。

[0017] 培養装置100は、組織を培地中に押下するためのメッシュ50を有する。メッシュ50は、格子状の形状を有している。メッシュ50は、組織の培養中に、培地の推移R1よりも下方に位置する。培養装置100は、培地を収容可能な収容部10と、メッシュ50を保持する保持部20と、を有してよい。収容部10には組織培養プレートを用いてもよい。

[0018] 培養装置100は、メッシュ50の下部に、組織を収容する培養空間S1を形成可能に構成されている。培養空間S1は、培養中の組織を収容する空間である。言い換えると、メッシュ50は、培養空間S1の少なくとも上側に設けられている（図5及び図6参照）。

[0019] メッシュ50は、組織の培養中において、組織を培地中に押下させる。これにより、組織が浮遊性を有する場合であったとしても、組織は、培養中に培地の界面から沈められた状態で培養される。これにより、組織は、組織の表面全体が培地と接触した状態で培養され得る。本願の発明者は、メッシュ50を用いて組織を培地中に押下して培養することによって、組織の形態及び／又は機能を長期にわたってなるべく維持できることを見出した。外来構造物を体内組織に使用した場合に炎症や線維化などを惹起することが一般的に知られているが、予想外にも本願の発明者はメッシュを用いた培養では、メッシュを用いない場合よりも炎症や線維化に関わる有意な遺伝子発現変動が少ないことを見出した。

[0020] メッシュ50は、例えば、10μm以上、20μm以上、30μm以上、40μm以上、又は55μm以上の目開きを有することが好ましい。メッシュ50の目開きが上記の所望の値よりも大きいことにより、メッシュ50を通して培地中の培養空間S1内に酸素や栄養素が行き渡り易くなるとともに、組織から生成された物質がメッシュ50に詰まることを抑制することがで

きる。これにより、組織の形態及び／又は機能をより長期にわたってなるべく維持することができると考えられる。

[0021] メッシュ50は、例えば200 μ m以下、又は188 μ m以下の目開きを有することが好ましい。メッシュ50の目開きが所望の値よりも小さいことによって、メッシュによって押下した組織、もしくは当該組織から分離した細胞が、メッシュ50の穴を通して上方に抜けにくくなる。

[0022] 脂肪細胞のサイズは、最大200 μ m程度である。したがって、組織を構成する細胞が脂肪細胞である場合、メッシュ50は、例えば200 μ m以下又は188 μ m以下の目開きを有することが好ましい。

[0023] また、培養組織中の細胞機能の良好に維持の観点から、メッシュ50の目開きは、例えば188 μ m以下、好ましくは108 μ m以下、より好ましくは77 μ m以下、よりいっそう好ましくは55 μ m以下であってよい。メッシュ50の目開きが培養組織のサイズよりも十分に小さいと、メッシュ50から培養組織への機械的な負荷が小さくなり、良好な培養環境が与えられると推測される。

[0024] メッシュ50の目開きに関する上記の上限値と下限値は、任意に組み合わせることができることに留意されたい。

[0025] メッシュ50の開口率は、特に制限されないが、例えば5～70%の範囲、好ましくは10～60%の範囲、より好ましくは25～50%の範囲であってよい。なお、メッシュ50を通して培地中の培養空間S1内に酸素や栄養素が行き渡り易くするという観点において、メッシュ50の開口率は、低すぎないことが好ましい。

[0026] メッシュ50の線径は、特に制限されないが、例えば10 μ m以上、好ましくは20 μ m以上、より好ましくは30 μ m以上であってよい。また、メッシュ50の厚みは、特に制限されないが、例えば20 μ m以上、好ましくは30 μ m以上、より好ましくは40 μ m以上であってよい。

[0027] メッシュ50の線径は、特に制限されないが、例えば200 μ m以下、好ましくは170 μ m以下、より好ましくは130 μ m以下であってよい。ま

た、メッシュ50の厚みは、特に制限されないが、例えば380 μ m以下、好ましくは320 μ m以下、より好ましくは240 μ m以下であってよい。メッシュ50の線径及び／又は厚みが小さいほどメッシュ50が柔らかくなると考えられるため、培養組織への機械的な負荷が小さくなり得ると推測される。

[0028] メッシュ50は、特に制限されないが、例えば3層以下、2層以下又は単層の格子状の構造を有してよい。メッシュ50の柔らかさの確保、及び／又は酸素や栄養素の通過性の観点から、メッシュ50を構成する層の数は、小さいことが好ましい。

[0029] メッシュ50を構成する材料は、特に制限されないが、例えば培養する組織に対して接着性の低い材料であることが好ましい。メッシュを構成する材料は、高圧蒸気滅菌、放射線滅菌あるいはEOG滅菌が可能な高分子、例えばシルク、ヒアルロン酸、セルロース、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリ乳酸、ポリメタクリル酸誘導体、ポリ塩化ビニル、ポリフェニレンサルファイド、ポリエチレンテレフタレート又はナイロンなどであってよい。

[0030] メッシュ50は、生体適合性を有するコーティング層を有していてもよい。生体適合性を有するコーティング層を構成する材料は、例えばハイドロゲルであってよい。ハイドロゲルは、例えば、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ゼラチンなどの種々の化合物から選択された少なくとも1つを含んでいてよい。

[0031] 本実施形態では、保持部20は、第1筒状部30と、第2筒状部40と、を有してよい。第2筒状部40は、第1筒状部30の内側（中空部）に嵌合可能に構成されている。あるいは第1筒状部30と第2筒状部40は、一体不可分の一つの構造体として形成されていてもよい。

[0032] 第1筒状部30の形状は、特に制限されないが、例えば円筒形状や角筒形状等であってよい。具体的には、第1筒状部30は、円筒形状や角筒形状の壁部32を有してよい。壁部32の内側の空間は、中空部38を構成し

ていてよい。

- [0033] 第1筒状部30を構成する壁部32の内面は段差33を有する。この段差33により、第1筒状部30の上部側の内径L1は、第1筒状部30の下部側の内径L2よりも大きくなっている。第2筒状部40の外径L3は、第1筒状部30の上部側の内径L1よりも小さく、かつ第1筒状部30の下部側の内径L2よりも大きくなっていてよい。これにより、第1筒状部30の中空部38に上方から挿入された第2筒状部40は、第1筒状部30の段差33付近まで挿入し得る（図5参照）。
- [0034] メッシュ50は、第2筒状部40の下端に設けられている。メッシュ50の端部は、第1筒状部30の段差33に当接する。具体的には、メッシュ50の端部は、第1筒状部30の段差33と、第2筒状部40を構成する壁部42との間に挟まれた状態になる（図5及び図6参照）。
- [0035] 第1筒状部30を構成する壁部32のうち段差33よりも下方の部分は、メッシュ50から下方に突出した突出部34を構成する。突出部34は、前述した培養空間S1の境界を規定していてよい。この場合、培養空間S1は、メッシュ50と突出部34により囲まれた空間によって規定される。
- [0036] 突出部34は、培養空間S1を完全に又は部分的に取り囲むよう構成されていてよい。突出部34がメッシュ50から下方に突出している場合、メッシュ50で押下された組織が、側方へ移動してメッシュ50が存在していない領域へ流れてしまうことを抑制することができる。
- [0037] 好ましくは、突出部34は、培地の流入が可能な開口36を有する。これにより、培地は、開口36を通して培養空間S1の内側から外側へ、又は外側から内側へ移動可能である。これにより、培養空間S1内の培地が新鮮な状態に維持されやすく、酸素や栄養素が培養空間S1内により流入し易くなる。
- [0038] 第1筒状部40の形状は、特に制限されないが、例えば円筒形状や角筒形状等であってよい。具体的には、第2筒状部40は、円筒形状や角筒形状の壁部42を有していてよい。第2筒状部40は、メッシュ50にアクセス可

能な中空部48を有することが好ましい。この場合、壁部42の内側の空間が中空部48を構成する。これにより、組織の培養を行う作業者は、メッシュ50を介して培地の表面に浮かんだ油分などを容易に除去することができる。

[0039] 図示していないが、培養装置100は、培養空間S1を密閉するための蓋を有していても良い。不図示の蓋は、例えば、収容部に取り付けられ、保持部20全体を取り囲むよう構成されていてもよい。

[0040] [培養組織及び培養組織の製造方法]

以下、培養組織の製造方法について説明する。本実施形態に係る培養組織の製造方法は、例えば前述した培養装置100を用いて実施することができる。

[0041] 培養組織の製造方法は、まず、生体から培養すべき組織を採取することを含む。採取された組織は、所望のサイズにカットされてもよい。本実施形態で培養する組織の種類は、前述したとおりであるため、その説明を省略する。

[0042] 所望のサイズにカットされた組織は、メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で培養される。培地の種類は、特に制限されず、培養する組織に応じて適切に選択されればよい。ここで、組織に対して、コラゲナーゼ処理のような細胞分散処理は行わず、組織塊のまま培養する。

[0043] メッシュは、例えば、10 μ m以上、20 μ m以上、30 μ m以上、40 μ m以上又は55 μ m以上の目開きを有することが好ましい。また、メッシュは、例えば200 μ m以下、又は188 μ m以下の目開きを有することが好ましい。メッシュに関するその他の好ましいパラメータについては前述したとおりである。

[0044] このような組織の培養は、前述した培養装置100を用いて実施できる。培養装置100の構成は、前述したとおりであるため、その説明を省略する。本実施形態において、組織の培養は、支持細胞のような外来細胞を用いずに行われる。

- [0045] 培養に用いる培地は、DMEM、MEM、RPMI、F12、M199あるいはこれらの混合培地に血清アルブミン（BSAやHSAなど）、ポリビニルアルコール、リポタンパク質（LDLやHDLなど）、遊離脂肪酸、インスリン、デキサメタゾン、コルチゾール、グルコース、ピルビン酸、グルタミン、脂肪酸、ビオチン、パントテン酸、トランスフェリン、亜セレン酸、バナジン酸などの添加剤に加えゲンタマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシンなどの抗生物質を含んでよい。
- [0046] 組織の培養日数は、特に制限されない。ただし、組織は、例えば14日以上、24日以上、32日以上、42日以上、49日以上、又は56日以上、培養することができる。前述した培養装置100により、長期わたって組織の形態を維持した状態で組織を培養することができる。
- [0047] 組織の培養日数の上限は、特に制限されない。組織の培養日数は、例えば120日以下、90日以下、80日以下、70日以下又は60日以下であってよい。
- [0048] 組織の培養開始から所望の日数ごとに、培地の交換が行われることが好ましい。培地交換のタイミングや頻度は、特に制限されないことに留意されたい。各々の培地交換において、培地の除去と培地の添加は、例えば1回ずつ行われてもよく、複数回繰り返し行われてもよい。
- [0049] 上記のように組織を培養することによって培養組織が製造される。言い換えると、本実施形態に係る培養組織は、上記の製造方法によって製造された組織であってよい。
- [0050] 上記のように、メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で組織を培養することによって、培養組織の遺伝子発現機能及び／又は生理活性機能を長期にわたってなるべく維持できる。
- [0051] 例えば、培養32日目における組織について、培養4日目における組織の遺伝子発現と比較して有意に変動する遺伝子の数が少ない、あるいは組織の線維化や炎症に関わるような組織の変質に関わる有意な遺伝子変動が少ない。

[0052] また、上記の培養方法により、例えばアディポネクチン分泌量のような脂肪組織の生理活性機能の低下を抑制することができる。

[0053] 上記の培養装置、培養組織、及び／又は培養組織の製造方法は、種々の組織の機能評価方法のツールとして利用することができる。当該評価方法は、メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で培養することによって得られた培養組織に試薬を与え、試薬に対する培養組織の応答に応じて、試薬、及び／又は培養組織に関する評価を得ること、を含む。

[0054] ここで、メッシュには、前述したものであってよい。具体的には、前述した培養装置に備えられたメッシュであってよい。前述した培養方法によって培養された組織に与える試薬は、評価すべき項目に応じて適切に設定すればよい。

[0055] 当該評価方法は、試薬に対する組織の応答を測定するための薬理試験及び／又は薬効試験として利用できる。当該評価方法は、創薬のスクリーニング目的としても利用できる。この場合、試薬は、薬剤の候補物質であってよい。

[0056] [実施例]

(実施例1)

まず、代謝性疾患のない71才女性患者から手術により摘出したヒト腹部脂肪組織（以下、単に「脂肪組織」と称することがある。）から比較的大きい血管及び結合組織を除去した後、手術用ハサミによって脂肪組織を20mg～100mgの小片になるようカットした。カットした脂肪組織片から遠心分離にて赤血球を除去することによって、培養する脂肪組織（組織）を得た。

[0057] 次に、小片にカットされた脂肪組織を前述した培養装置100にて培養した（図1～図6も参照）。脂肪組織は、培養中、メッシュにより培地（培養液）中に押下された。メッシュはコラーゲンにてコーティングされた。以下表1に示すように、実施例1では、メッシュの目開きは30 μ mであり、メッシュの開口率は25%であり、メッシュの線径は30 μ mであり、メシ

ユの厚みは47 μm であった。

[0058] ここで、培養液は、0.1%のBSA、100mg/mLのグルコース、3nMのデキサメタゾン、1ng/mLのインスリン、10 μg /mLのゲンタマイシンを含有したDMEMであった。培養装置100を浸漬させた24ウェル組織培養プレートをCO₂インキュベーターに静置し、37℃で5%の二酸化炭素雰囲気下で培養した。

[0059] 培養装置100で組織の培養を開始した日をDay 0としたとき、Day 1, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 30において培地交換が行われた。Day 2, 16及びDay 30での培地交換においては、培地除去と培地添加を3回繰り返して行い培地を完全に交換した。なお、Day 4, 18及びDay 32において培地交換前の培地の一部は採取し、脂肪組織機能評価のため凍結保存した。

[0060] (実施例2)

メッシュのパラメータの違いを除き、実施例1と同様に脂肪組織(組織)を培養した。以下表1に示すように、実施例2では、メッシュの目開きは55 μm であり、メッシュの開口率は34%であり、メッシュの線径は39 μm であり、メッシュの厚みは62 μm であった。

[0061] (実施例3)

メッシュのパラメータの違いを除き、実施例1と同様に脂肪組織(組織)を培養した。以下表1に示すように、実施例3では、メッシュの目開きは77 μm であり、メッシュの開口率は37%であり、メッシュの線径は50 μm であり、メッシュの厚みは83 μm であった。

[0062] (実施例4)

メッシュのパラメータの違いを除き、実施例1と同様に脂肪組織(組織)を培養した。以下表1に示すように、実施例4では、メッシュの目開きは108 μm であり、メッシュの開口率は41%であり、メッシュの線径は61 μm であり、メッシュの厚みは106 μm であった。

[0063] (実施例5)

メッシュのパラメータの違いを除き、実施例 1 と同様に脂肪組織（組織）を培養した。以下表 1 に示すように、実施例 5 では、メッシュの目開きは $188\mu\text{m}$ であり、メッシュの開口率は 35% であり、メッシュの線径は $130\mu\text{m}$ であり、メッシュの厚みは $235\mu\text{m}$ であった。

[0064] （表 1）

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
目開き	$30\mu\text{m}$	$55\mu\text{m}$	$77\mu\text{m}$	$108\mu\text{m}$	$188\mu\text{m}$
開口率	25%	34%	37%	41%	35%
線径	$30\mu\text{m}$	$39\mu\text{m}$	$50\mu\text{m}$	$61\mu\text{m}$	$130\mu\text{m}$
厚み	$47\mu\text{m}$	$62\mu\text{m}$	$83\mu\text{m}$	$106\mu\text{m}$	$235\mu\text{m}$

[0065] （参考例 1）

実施例 1 と同様の手法で培養するヒト腹部脂肪組織（組織）を得た。組織は、前述したメッシュを使用することなく培地に浮遊させたまま培養した。培地及びその他の培養条件は、実施例 1 と同様である。

[0066] [培養上清中のグリセロール量の定量]

実施例 1 ～ 5 及び参考例 1 において、Day 4, 18 および Day 32 で採取し凍結保存した培養液を 4°C で融解し、遠心処理の後、上澄みの一部を用いて、培地上清中のグリセロール量をグリセロールアッセイキット（Sigma-Aldrich 社；MAK117）にて測定した。

[0067] 図 7 は、実施例 1 ～ 5 及び参考例 1 における Day 4、Day 18 及び Day 32 の培養上清中のグリセロール量を示すグラフである。何れの場合においても Day 4 から Day 18 にかけてグリセロール量の上昇が見られた。これは低いグルコース濃度に呼応した脂質分解の向上によるものであると推察される。また、Day 18 と Day 32 ではほぼ同程度のグリセロール量を示した。この結果は培養組織における脂質分解機能が維持されていることを示唆する。

[0068] [培養上清中のアディポネクチン分泌量の定量]

実施例 1 ～ 5 及び参考例 1 において、Day 4, 18 および Day 32 で採取し凍結保存した培養液を 4°C で融解した後、遠心処理ののち上澄みの一

部を用いて、培地中の分泌アディポネクチン量をHuman Adiponectin ELISA Kit (ABclonal社; RK00060) にて測定した。

[0069] 図8は、実施例1～5及び参考例1におけるDay 4、Day 18及びDay 32の培養上清中の分泌アディポネクチン量を示すグラフである。参考例1では、培養日数とともにアディポネクチン分泌量の顕著な低下が認められた。これに対して実施例1～5では、アディポネクチン分泌量は保持される傾向であり、アディポネクチン分泌量の低下は抑制された。特に30 μ m及び77 μ mの範囲、より詳細には30 μ m及び55 μ mの目開きを有するメッシュを備えた培養装置100が用いられた場合、非常に良好に分泌量が保持された。この結果は、メッシュを備えた培養装置100を用いることによって、培養組織中の脂肪細胞機能が良好に維持されることを示す。

[0070] [RNA抽出処理]

Day 4及びDay 32において、組織（湿重量計100～200mg）をQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) 中でホモジナイズし、メーカー規定のプロトコルに沿って、RNA抽出液を得た。このRNA抽出液から、「ISOSPIN Cell & Tissue RNA (ニッポンジーン; 314-08211)」にて、メーカーのプロトコルに沿って、精製RNA溶液を得た。得られたRNAは、バイオアナライザーによる分析にてRIN値7以上の十分な品質を示した。以下実測値の一例を表2に示した。

[0071] (表2)

サンプル	組織湿重量	RNA量	RIN値
参考例1	118mg	1.41 μ g	9.0
実施例1	109mg	1.75 μ g	8.6
実施例2	128mg	1.67 μ g	9.2
実施例3	90mg	1.46 μ g	8.7
実施例4	105mg	1.21 μ g	9.0
実施例5	97mg	1.56 μ g	8.9

[0072] [遺伝子発現データ]

実施例1～5及び参考例1においてDay 4及びDay 32に精製したRNA溶液を用いて、Rhelixa社委託試験 (RNA-seq) により、Illumina NovaSe

q 6000 (標準取得リード長 : PE 150(150bp×2 paired-end)) を用いて、生データ (fastqファイル) を取得した。その後、fastqファイルからfastp/STAR/featureCountを用いてゲノム配列にマッピングした後、EdgeRにて遺伝子発現変動解析を実施した。

[0073] 発現変動遺伝子のうち、線維化や炎症を惹起する遺伝子の有意な発現上昇が参考例 1 において特異的にみられるものがあった。参考例 1 において有意な発現上昇をした遺伝子について、log FC (log fold-change)、FDR (False Discovery Ratio)、有意差順位を以下の表 3 に示した。ここで、「log FC」は、特定の遺伝子について、底を 2 とし、Day 3 2 における遺伝子の発現量 (シグナル値) を Day 4 における遺伝子の発現量 (シグナル値) で割った値の対数によって定義される。「FDR」は、多重比較検定法における誤検出率である。有意差順位は、p 値の小さい順に遺伝子を並べたときの順位に相当する。また、本明細書において、遺伝子の「有意な発現上昇」は、「FDR の値が 0.01 以下」かつ「log FC の値が 1.0 以上」によって規定される。

[0074] (表 3)

遺伝子		EGR1	FOSB	PLTP	FADS1	COL1A1	LTBP2	FADS2
遺伝子機能		線維化	炎症	炎症	炎症	線維化	線維化	炎症
参考例 1	log FC	3.35	4.71	2.15	1.85	1.92	1.36	1.45
	FDR	0.001	0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006
	有意差順位	1	6	9	28	36	38	39
実施例 1	log FC	1.92	2.64	1.15	0.01	1.18	0.87	-0.24
	FDR	0.004	0.016	0.028	0.992	0.044	0.043	0.677
	有意差順位	21	69	106	2802	153	150	1378
実施例 2	log FC	1.47	1.96	1.30	-0.09	0.29	0.46	-0.32
	FDR	0.014	0.050	0.020	0.918	0.678	0.270	0.500
	有意差順位	49	154	60	2370	1490	620	1087
実施例 3	log FC	0.53	-0.56	1.08	0.58	0.93	0.32	0.19
	FDR	0.264	0.560	0.031	0.227	0.079	0.425	0.704
	有意差順位	813	1396	145	735	351	1150	1742
実施例 4	log FC	1.02	-0.47	1.63	-0.73	1.15	0.59	-0.28
	FDR	0.047	0.713	0.007	0.151	0.044	0.143	0.531
	有意差順位	202	1780	30	424	188	411	1121
実施例 5	log FC	0.80	0.90	1.34	-0.57	0.75	0.79	-0.69
	FDR	0.092	0.400	0.012	0.233	0.150	0.047	0.088
	有意差順位	393	1206	79	731	525	250	386

[0075] 表 3 で示された遺伝子群 (EGR1, FOSB, PLTP, FADS1, COL1A1, LTBP2, FADS2) は組織の健常な機能維持という点において、有意な発現上昇を避けるべきものである。実施例 1～5 ではこれらの遺伝子のうち有意な発現上昇を示したものがほとんど見られなかった。具体的には、実施例 1, 2 では、有意な発現上昇をした遺伝子は、表 3 に掲載した遺伝子群のうちの EGR1 のみであった。また、実施例 4 では、有意な発現上昇をした遺伝子は、表 3 に掲載した遺伝子群のうちの PLTP のみであった。実施例 3, 5 では、有意な発現上昇をした遺伝子は、表 3 に掲載した遺伝子群のなかに存在しなかった。このように、実施例 1～5 では、表 3 で示された遺伝子群のなかで、有意な発現上昇をした遺伝子は、0 ないし 1 つだけであった。このことは、実施例 1～5 では脂肪組織の形態及び／又は機能が、参考例 1 と比較すると、長期にわたって維持されていることを意味する。

[0076] 以下の表 4 は、解析したすべての遺伝子群の中で、Day 4 と Day 3 2 との間における有意な発現変動をした遺伝子の数を示している。ここで、本

明細書において、遺伝子の「有意な発現変動」は、「FDRの値が0.01以下」かつ「log FCの絶対値が1.0以上」によって規定される。

[0077] (表4)

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
有意な発現変動をした遺伝子の数	48	30	44	65	64

[0078] 表4から、実施例1～3では有意な発現変動をした遺伝子の数は他の実施例4, 5よりも少なく、実施例2では有意な発現変動をした遺伝子の数が最も少ない。したがって、30 μ m以上、かつ77 μ m以下のメッシュを用いた組織の培養は、遺伝子の機能発現の維持という観点からより好ましいことがわかる。もっとも、実施例4, 5においても、有意な発現変動をした遺伝子の数は十分に小さいため、本発明に係るメッシュの目開きは、上記数値範囲の外であってもよいことに留意されたい。

[0079] (実施例6)

小片にカットされた代謝性疾患のない72才女性由来ヒト腹部脂肪組織（以下、「脂肪組織」と称する。）20–100mgを前述した培養装置100にて培養した（図1～図6も参照）。脂肪組織は、培養中、メッシュにより培地（培養液）中に押下した。培養装置100にはコラーゲンコーティング処置した目開き77 μ mのメッシュを用いた。当該メッシュは、実施例3で使用したものと同一である。培地組成は0.2%のBSA、3nMのデキサメタゾン、1ng/mLのインスリン、300mg/dLのグルコース、0.18mMのパルミチン酸、10 μ g/mLのゲンタマイシンを含有したDMEMであった。培養装置100を浸漬させた24ウェル組織培養プレートにCO₂インキュベーターに静置し、37℃で5%の二酸化炭素雰囲気下で21日間培養した。培養を開始した日をDay 0としたとき、Day 1, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19において培地交換を行った。Day 19での培地交換は、培地除去後、培地添加を3回行い、培地を完全に交換した。培地交換直後、100 μ Lの培地を採取し凍結保存した（凍結保存サ

ンプル1)。Day 19での培地交換から24時間培養後(Day 20)、
100 μ Lの培地を採取し凍結保存した(凍結保存サンプル2)。

[0080] 凍結保存サンプル2の取得後、Day 20においては、インスリン濃度を
20 ng/mLとした培地にて培地交換を行った。Day 20において、D
ay 19と同様培地交換を3回行った。Day 20において培地交換直後1
00 μ Lの培地を採取し凍結保存した(凍結保存サンプル3)。培地交換か
ら24時間培養後(Day 21)、100 μ Lの培地を採取し凍結保存した
(凍結保存サンプル4)。

[0081] 採取し凍結保存した培地(凍結保存サンプル1~4)を解凍した後、培地
中のグルコース濃度をグルコース測定キット(同仁化学研究所; G264)にて
定量した。凍結保存サンプル1と凍結保存サンプル2における培地中のグル
コース濃度を比較することによって、1 ng/mLのインスリン濃度におけ
る24時間後の培地中グルコース濃度の変化量を求めた。同様に、凍結保存
サンプル3と凍結保存サンプル4における培地中のグルコース濃度を比較す
ることによって、20 ng/mLのインスリン濃度における24時間後の培
地中グルコース濃度の変化量を求めた。これらのグルコース濃度の変化量は
、脂肪組織へのグルコース取込量に相当すると考えられる。

[0082] 図9は、上記手順により評価した実施例6における培養上清中のグルコー
ス低下量を示すグラフである。図9において、1 ng/mLのインスリン濃
度が示すグラフは、凍結保存サンプル2のグルコース濃度と凍結保存サンプ
ル1のグルコース濃度の差分に相当する。同様に、20 ng/mLのインス
リン濃度が示すグラフは、凍結保存サンプル4のグルコース濃度と凍結保存
サンプル1のグルコース濃度の差分に相当する。図9から、インスリン濃度
20 ng/mLでは1 ng/mLと比較して顕著なグルコース取込上昇が確
認された。このことから、組織培養後もインスリン応答性の脂肪組織機能が
保持されていることが確認された。

[0083] ここで、参考例1では、遺伝子EGR1及びFOSBは、有意に発現上昇している
。EGR1及びFOSBはインスリン抵抗性に関連するという示唆があり、参考例1

ではインスリン応答性が低下すると予想される。したがって、実施例 6 に係る組織の培養方法及び培養組織は、参考例 1 と比較してインスリン応答性の脂肪組織機能が維持されることが期待できる。

[0084] [付記]

前述した実施形態及び／又は実施例の記載により、少なくとも以下の付記として記載された発明が本明細書内に明示されていることに留意されたい。

[0085] [付記 1]

組織を培地中に押下するためのメッシュを有する培養装置。

[付記 2]

前記メッシュは、 $10\mu\text{m}$ 以上、かつ $200\mu\text{m}$ 以下の目開きを有する、付記 1 に記載の培養装置。

[付記 3]

前記メッシュは、生体適合性を有するコーティング層を有する、付記 1 又は 2 に記載の培養装置。

[付記 4]

前記組織は浮遊性を有する、付記 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の培養装置。

[付記 5]

前記組織は、脂肪組織又は脳組織である、付記 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の培養装置。

[付記 6]

前記メッシュから下方に突出した突出部を有する、付記 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の培養装置。

[付記 7]

前記突出部は、前記組織の培養空間を囲むよう形成されており、

前記突出部は、培地の流入が可能な開口を有する、付記 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の培養装置。

[付記 8]

前記メッシュを保持しつつ、上方に延びた第2筒状部を有し、
前記第2筒状部は、前記メッシュにアクセス可能な中空部を有する、付記1から7のいずれか1項に記載の培養装置。

[付記9]

メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で組織を培養することを含む、培養組織の製造方法。

[付記10]

前記メッシュは、10 μm 以上、かつ200 μm 以下の目開きを有する、付記9に記載の培養組織の製造方法。

[付記11]

前記メッシュは、生体適合性を有するコーティング層を有する、付記9又は10に記載の培養組織の製造方法。

[付記12]

前記培養組織は浮遊性を有する、付記9から11のいずれか1項に記載の培養組織の製造方法。

[付記13]

前記培養組織は、脂肪組織である、付記9から12のいずれか1項に記載の培養組織の製造方法。

[付記14]

前記組織を、14日以上培養する、付記9から13のいずれか1項に記載の培養組織の製造方法。

[付記15]

メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で前記組織を培養することによって得られた、培養組織。

[付記16]

前記組織は浮遊性を有する、付記15に記載の培養組織。

[付記17]

前記組織は、脂肪組織である、付記15又は16に記載の培養組織。

[付記 18]

前記組織を、14日以上培養することによって得られた、付記15から17のいずれか1項に記載の培養組織。

[付記 19]

メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で培養することによって得られた培養組織に試薬を与え、前記試薬に対する前記培養組織の応答に応じて、前記試薬、及び／又は前記培養組織に関する機能評価を得ること、を含む、評価方法。

[0086] 上述したように、実施形態及び実施例を通じて本発明の内容を開示したが、この開示の一部をなす論述及び図面は、本発明を限定するものであると理解すべきではない。この開示から当業者には様々な代替の実施形態、実施例及び運用技術が明らかとなる。したがって、本発明の技術的範囲は、上述の説明から妥当な特許請求の範囲に係る発明特定事項によってのみ定められるものである。

[0087] 本出願は2023年2月3日に提出された日本国特許出願2023-015093号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容がここに参照により援用される。

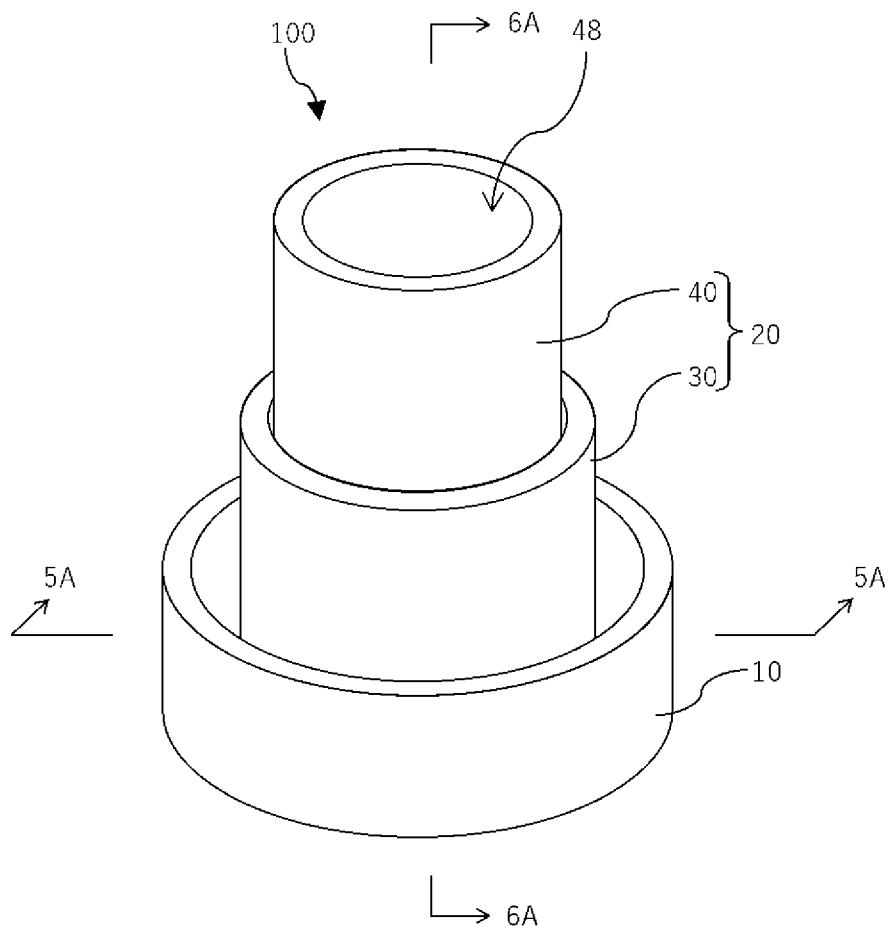
請求の範囲

- [請求項1] 組織を培地中に押下するためのメッシュを有する培養装置。
- [請求項2] 前記メッシュは、 $10\mu\text{m}$ 以上、かつ $200\mu\text{m}$ 以下の目開きを有する、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項3] 前記メッシュは、生体適合性を有するコーティング層を有する、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項4] 前記組織は浮遊性を有する、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項5] 前記組織は、脂肪組織又は脳組織である、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項6] 前記メッシュから下方に突出した突出部を有する、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項7] 前記突出部は、前記組織の培養空間を囲むよう形成されており、
前記突出部は、培地の流入が可能な開口を有する、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項8] 前記メッシュを保持しつつ、上方に延びた第2筒状部を有し、
前記第2筒状部は、前記メッシュにアクセス可能な中空部を有する、請求項1に記載の培養装置。
- [請求項9] メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で組織を培養することを含む、培養組織の製造方法。
- [請求項10] 前記メッシュは、 $10\mu\text{m}$ 以上、かつ $200\mu\text{m}$ 以下の目開きを有する、請求項9に記載の培養組織の製造方法。
- [請求項11] 前記メッシュは、生体適合性を有するコーティング層を有する、請求項9に記載の培養組織の製造方法。
- [請求項12] 前記培養組織は浮遊性を有する、請求項9に記載の培養組織の製造方法。
- [請求項13] 前記培養組織は、脂肪組織である、請求項9に記載の培養組織の製造方法。
- [請求項14] 前記組織を、14日以上培養する、請求項9に記載の培養組織の製

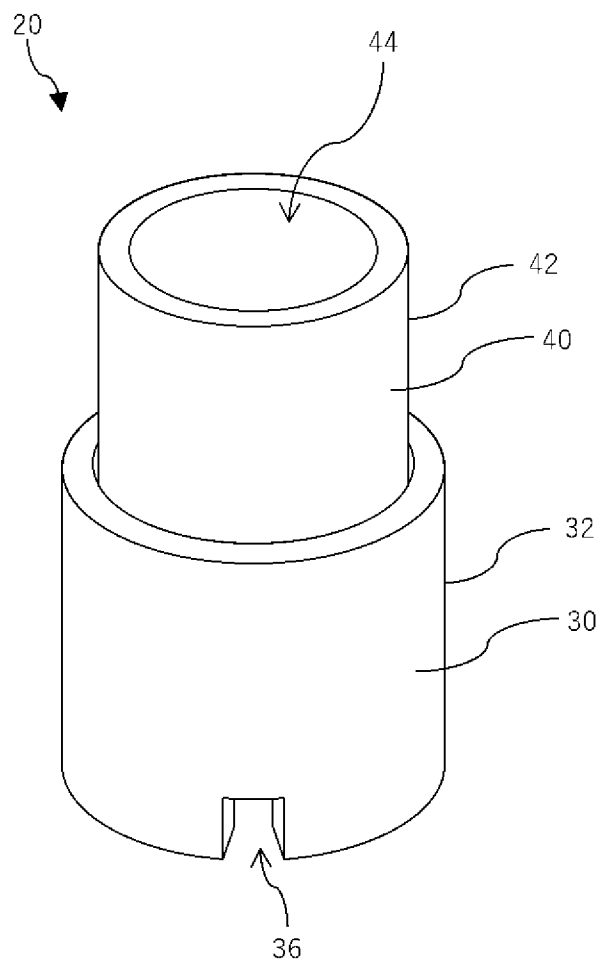
造方法。

- [請求項15] メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で前記組織を培養することによって得られた、培養組織。
- [請求項16] 前記組織は浮遊性を有する、請求項15に記載の培養組織。
- [請求項17] 前記組織は、脂肪組織である、請求項15に記載の培養組織。
- [請求項18] 前記組織を、14日以上培養することによって得られた、請求項15に記載の培養組織。
- [請求項19] メッシュにより培地中に組織を押下させた状態で培養することによって得られた培養組織に試薬を与え、前記試薬に対する前記培養組織の応答に応じて、前記試薬、及び／又は前記培養組織に関する機能評価を得ること、を含む、評価方法。
- [請求項20] 動物ないし人体から採取した1mg～1000mgのサイズを有する脂肪組織を、10μm以上かつ200μm以下の目開きを有するメッシュにより培地中に押下させた状態で、脂肪組織の形態を維持しながら、14日以上かつ120日以下の期間、培養することを含む、培養組織の製造方法。

[図1]



[図2]



[図3]

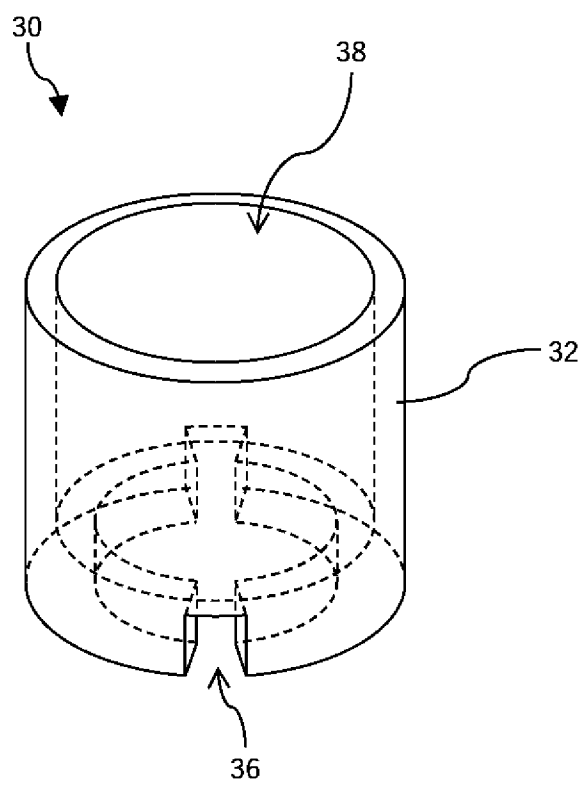
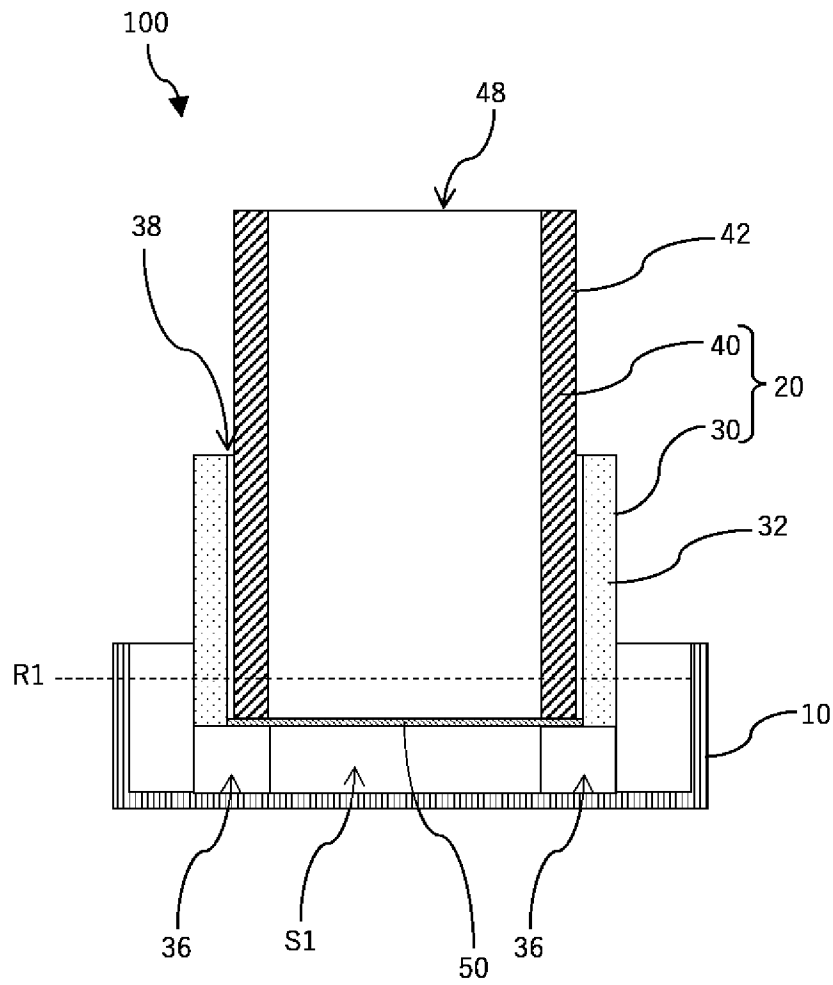
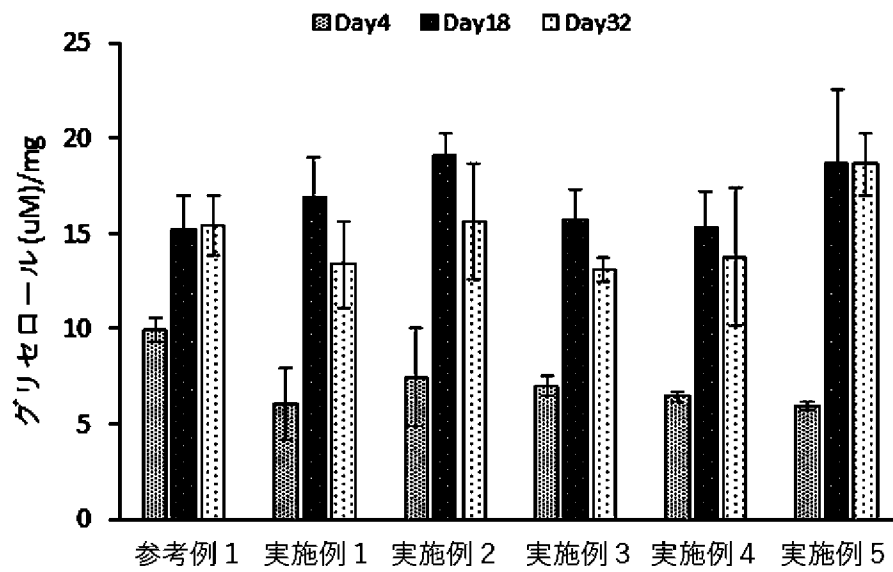


FIG. 1 is a perspective view of a cylindrical container 40. The container has a top rim 48 and a side wall 42. The bottom of the container is indicated by dashed lines, suggesting it is open or transparent.

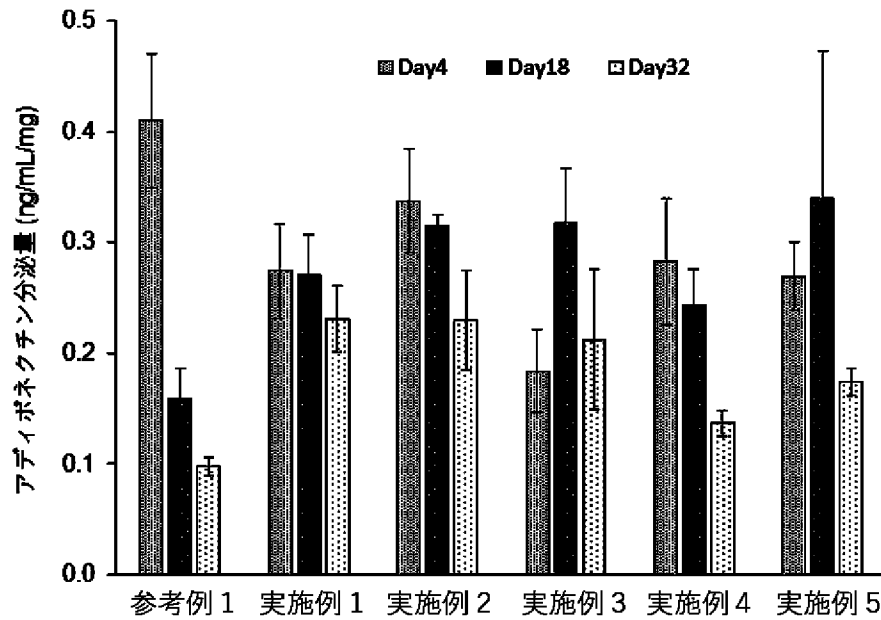
[図6]



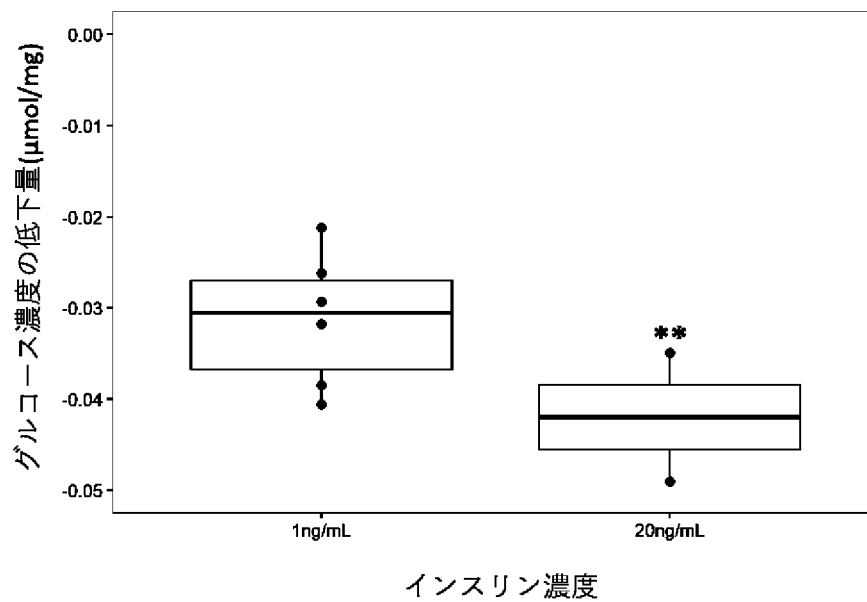
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12M 3/00*(2006.01)i; *C12N 5/077*(2010.01)i; *C12N 5/079*(2010.01)i; *C12Q 1/02*(2006.01)i

FI: C12M3/00 Z; C12N5/077; C12N5/079; C12Q1/02

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)

C12M3/00; C12N5/077; C12N5/079; C12Q1/02

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 1971-2024

Registered utility model specifications of Japan 1996-2024

Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/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	JP 2003-180335 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 02 July 2003 (2003-07-02) claim 1, paragraphs [0010], [0019]	1-2, 4, 6-10, 12, 15-16, 19
Y	claim 1, paragraphs [0010], [0019]	5, 13, 17
A	claim 1, paragraphs [0010], [0019]	20
X	JP 2005-087029 A (JAPAN TISSUE ENGINEERING KK) 07 April 2005 (2005-04-07) paragraphs [0031], [0033]	1, 3, 6-7, 9, 11, 15, 19
Y	paragraphs [0031], [0033]	5, 13, 17
A	paragraphs [0031], [0033]	20
X	JP 2015-073520 A (AGC TECHNO GLASS CO., LTD.) 20 April 2015 (2015-04-20) claim 1, paragraphs [0001], [0018], [0033]	1, 6-9, 14-15, 18-19
Y	claim 1, paragraphs [0001], [0018], [0033]	5, 13, 17
A	claim 1, paragraphs [0001], [0018], [0033]	20

☒ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

21 March 2024

Date of mailing of the international search report

02 April 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003437

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/059945 A1 (JAPAN TISSUE ENGINEERING KK) 22 May 2008 (2008-05-22) paragraph [0008]	5, 13, 17
A	paragraph [0008]	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/003437

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2003-180335	A	02 July 2003	(Family: none)	
JP	2005-087029	A	07 April 2005	(Family: none)	
JP	2015-073520	A	20 April 2015	(Family: none)	
WO	2008/059945	A1	22 May 2008	US 2010/0055773	A1
				paragraph [0010]	
				JP 2008-125399	A
				EP 2085465	A1
				KR 10-2009-0067217	A

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 5/077(2010.01)i; C12N 5/079(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i

FI: C12M3/00 Z; C12N5/077; C12N5/079; C12Q1/02

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; C12N5/077; C12N5/079; C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年

日本国公開実用新案公報1971-2024年

日本国実用新案登録公報1996-2024年

日本国登録実用新案公報1994-2024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	JP 2003-180335 A（住友ベークライト株式会社）02.07.2003（2003 - 07 - 02） 請求項1, 段落0010, 0019	1-2, 4, 6-10, 12, 15-16, 19
Y	請求項1, 段落0010, 0019	5, 13, 17
A	請求項1, 段落0010, 0019	20
X	JP 2005-087029 A（株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング） 07.04.2005（2005 - 04 - 07） 段落0031, 0033	1, 3, 6-7, 9, 11, 15, 19
Y	段落0031, 0033	5, 13, 17
A	段落0031, 0033	20
X	JP 2015-073520 A（AGCテクノグラス株式会社）20.04.2015（2015 - 04 - 20） 請求項1 段落0001, 0018, 0033	1, 6-9, 14- 15, 18-19
Y	請求項1 段落0001, 0018, 0033	5, 13, 17
A	請求項1 段落0001, 0018, 0033	20

☒ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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21.03.2024

国際調査報告の発送日02.04.2024

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）

藤山 純 4N 1968

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	W0 2008/059945 A1 (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) 22.05.2008 (2008 - 05 - 22) 段落0008	5 ,13, 17
A	段落0008	20

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/JP2024/003437

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2003-180335	A	02.07.2003	(ファミリーなし)	
JP	2005-087029	A	07.04.2005	(ファミリーなし)	
JP	2015-073520	A	20.04.2015	(ファミリーなし)	
WO	2008/059945	A1	22.05.2008	US 2010/0055773 A1	
				paragraph 0010	
				JP 2008-125399 A	
				EP 2085465 A1	
				KR 10-2009-0067217 A	