

(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5月10日(10.05.2024)



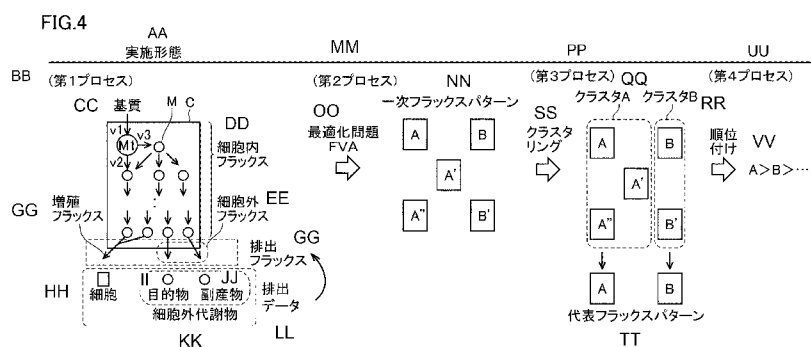
(10) 国際公開番号

WO 2024/095564 A1

- (51) 国際特許分類:
G16B 5/00 (2019.01) C12M 3/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/030109
- (22) 国際出願日: 2023年8月22日(22.08.2023)
- (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 2022-174798 2022年10月31日(31.10.2022) JP
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 草 ▲ な ぎ ▼ 俊 宏 (KUSANAGI, Toshihiro); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 愛須 亮太 (AISU, Ryota); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 田川 雄介 (TAGAWA, Yusuke); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人深見特許事務所 (FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 中之島フェスティバルタワー・ウエスト Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

(54) Title: METHOD FOR ESTIMATING METABOLIC FLUX DISTRIBUTION, ANALYSIS DEVICE, AND PROGRAM

(54) 発明の名称: 代謝フラックス分布の推定方法、解析装置、プログラム



(57) Abstract: Provided is a method for estimating the metabolic flux distribution of cells, the method comprising: a step for acquiring discharge data including time-series data of a substance discharged to the outside of the cells with respect to a first strain cell and a second strain cell that is a reference for comparison; a step for calculating a discharge flux of the substance to the outside of the cells on the basis of the discharge data; a step for estimating a plurality of primary flux patterns on the basis of the discharge flux; and a step for clustering the plurality of primary flux patterns on the basis of the mutual similarity of the plurality of primary flux patterns and then outputting the clustered result.

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, 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))

(57) 要約: 細胞の代謝フラックス分布の推定方法であって、第1株細胞および比較対象の第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列データを含む排出データを取得するステップと、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える。

明 細 書

発明の名称：

代謝フラックス分布の推定方法、解析装置、プログラム

技術分野

[0001] 本発明は、代謝フラックス分布の推定方法、解析装置、プログラムに関し、より特定的には、細胞の代謝フラックス分布の推定方法、解析装置、プログラムに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子操作技術により微生物等の細胞の代謝を改変し、燃料、機能性食品、医薬品等に用いる有用物質を目的物として生産させる合成生物学分野がある。

[0003] 非特許文献 1，2 には、合成生物学分野において、フラックスバランス解析（FBA：Flux Balance Analysis）を用いて細胞の代謝デザインを行なう方法が開示されている。FBAは代謝反応を線形式で表した代謝モデルを構築し、線形計画法により細胞の増殖速度を最大にする代謝流速（フラックス）分布を求める代謝フラックス解析方法である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：松田史生、吉川勝徳、清水浩、「代謝シミュレーションによる細胞内代謝のデザインと工学的応用」、生物工程、Vol. 92, 593-597 (2014)

非特許文献2：戸谷吉博、計算機シミュレーションを利用した代謝デザイン技術、化学と生物、Vol. 55, 83-85 (2017)

非特許文献3：A. K. Ramirez et al., "Integrating Extracellular Flux Measurements and Genome-Scale Modeling Reveals Differences between Brown and White Adipocytes", Cell Reports, Vol. 21, 3040-3048 (2017) .

非特許文献4：岡橋伸幸、川名修一、松田史生、清水浩、「GC-MSを用いた¹³C代謝フラックス解析法の紹介」、Technical Report (C146-0355)

非特許文献5：清水浩、松田史生、戸谷吉博、「代謝デザインと¹³C同位体標識を用いた代謝フラックス解析の物質生産への応用」、Kagaku to Seibutsu 53 (7) : 455-461 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] FBAのような代謝フラックス解析方法において、数種類の代謝物の実際の計測値を模してパラメータに制約を与えた上で、代謝フラックス分布を求める試みもなされている。非特許文献3には、4つの添加する阻害剤と2つの細胞外へ排出される代謝物の実際の計測値を利用して、FBAを行なう方法が開示されている。これにより、実際に計測した数種類の代謝物に関するフラックスについては、実際に細胞で行なわれている代謝反応とよく整合する、代謝フラックス分布が推定できる。

[0006] しかし、代謝モデルにおけるフラックスの解空間は膨大であり、FBAなどの代謝フラックス解析ではその中からただ1つの解のみを抽出するのが一般的である。よって、従来の方法では、上記数種類の代謝物以外の物質に関するフラックスについては、正しく推定できていない可能性も考えられる。

[0007] 本開示は、このような事情を鑑みてなされたものであり、その目的は、細胞の代謝フラックス分布の解析において、代謝フラックスを正しく推定する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本開示の第1の態様は、細胞の代謝フラックス分布の推定方法であって、第1株細胞および比較対象の第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列データを含む排出データを取得するステップと、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次

フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える。

[0009] 本開示の第2の態様は、細胞の代謝フラックス分布の推定方法であって、所定の株細胞について、細胞外へ排出される物質の時系列データを含む排出データを取得するステップと、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える。

[0010] 本開示の第3の態様は、細胞の代謝フラックス分布を推定する解析装置である。解析装置は、メモリと、プロセッサとを備える。メモリは、第1株細胞および比較対象の第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列変化データを含む排出データを記憶する。プロセッサは、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出し、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定し、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力する。

発明の効果

[0011] 本開示による代謝フラックス分布の推定方法によれば、細胞の代謝フラックス分布の解析において、代謝フラックスを正しく推定する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施形態に係る解析システムの構成を示す図である。

[図2]代謝マップを説明するための図である。

[図3]代謝フラックス分布およびFBAを説明するための図である。

[図4]実施形態に係るフラックスパターンの推定方法を説明するための図である。

[図5]実施形態に係るフラックスパターンの推定処理を示すフローチャートである。

[図6]増殖フラックスの計算方法を説明するための図である。

[図7]一次フラックスパターンの推定処理を示すフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に、本発明の実施の形態について図面を参照して詳細に説明する。なお、以下では図中の同一または相当部分には同一の符号を付して、その説明は原則的に繰返さないものとする。

[0014] [1. 解析システムの構成]

図1は、実施形態に係る解析システムの構成を示す図である。図1を参照して、解析システム100は、解析装置1と、計測装置2と、培養装置3とを含む。

[0015] 培養装置3は、細胞を培養するための装置である。一実施例において、培養装置3は、第1株の細胞である第1株細胞と、第1株細胞の比較対象である、第2株の細胞である第2株細胞とを培養する。一実施例において、第1株細胞および第2株細胞は、特定の種類の代謝物（以下、「特定代謝物」と称する）の生産量が異なる株の細胞である。また、第1株細胞および第2株細胞は、同一系統である2種類の菌株に各々属する細胞である。また、特定代謝物は、培養によって得ることが目的とされる、所定の有用な代謝物である。本明細書において、このような所定の有用な代謝物を、「目的物」と称する。

[0016] 計測装置2は、細胞外へ排出された代謝物の量を計測する。本明細書において、細胞外へ排出された代謝物を「細胞外代謝物」とも称する。

[0017] 計測装置2は、たとえば、細胞計測部21と、細胞外代謝物計測部22とを含む。

細胞計測部21は、細胞の量（以下、「細胞量」とも称する）を計測する部である。細胞計測部21は、細胞量を直接的に計測しても良いし、細胞量に相関する所定の物質の濃度等を計測することによって算出されても良い。細胞計測部21は一例として、濁度計を含み、この場合は濁度に基づいて細胞量を計測することができる。細胞計測部21の他の例は、細胞の乾燥菌体

重量を計測するための器具（たとえば乾燥用の皿および重量計）を含む。この場合、ユーザは当該器具を用いて細胞の乾燥菌体重量を計測し、計測した細胞の乾燥菌体重量に基づいて細胞量を計測する。細胞計測部 21 のさらに他の例は、所定の器具および R I P A（Radio-Immunoprecipitation Assay）バッファ、ビシンコニン酸（B C A : Bicinchoninic Acid）等の薬品を含む。この場合、ユーザはこれらの薬品を用いてタンパク質を抽出、定量することにより、細胞量を定量する。なお、細胞量が所定の種類の細胞外代謝物の量に相関する場合、細胞量の計測は、当該所定の種類の細胞外代謝物の量の計測に代替されてもよい。関連して、細胞量が所定の種類の基質の消費量に相関する場合、細胞量の計測は、当該消費量の計測に代替されてもよい。当該所定の種類の基質とは、たとえば、酸素である。

[0018] 一実施例において、細胞計測部 21 は、細胞量を計測した時刻も記録する。この場合、たとえば、細胞計測部 21 は、当該時刻と、時刻に対応する細胞量とを含む、細胞量の時系列データを解析装置 1 に送信する。時系列データは、時系列変化を含む。細胞量の時系列データを、以下、「細胞データ」とも称する。ただし、解析システム 100 における細胞データの取得方法は、上記の例に限定されない。たとえば、細胞計測部 21 は、細胞量を計測した値を直ちに解析装置 1 に送信し、解析装置 1 は、当該細胞量の計測値を受信した時刻に基づいて、細胞量を計測した時刻を算出し、培養中の細胞データを作成してもよい。

[0019] 細胞外代謝物計測部 22 は、細胞外代謝物の量（以下、「細胞外代謝物量」とも称する）を計測するための部である。細胞外代謝物計測部 22 は、細胞外代謝物量を計測するための装置を含む。細胞外代謝物量を計測するための装置は、たとえば、G C（Gas Chromatograph）、L C（Liquid Chromatograph）、M S（Mass Spectrometry）、L C-M S（Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry）、または、H P L C（High Performance Liquid Chromatography）等の分析装置を含む。たとえば、ユーザは、培養装置 3 の培養液の一部を抽出し、当該抽出した培養液の一部を試料として、これら

を細胞外代謝物計測部 22 に含まれる分析装置によって分析する。

[0020] 一実施例において、細胞外代謝物計測部 22 は、細胞を分析した時刻も記録する。この場合、たとえば、細胞外代謝物計測部 22 は、当該時刻と、時刻に対応する細胞外代謝物量とを含む、細胞外代謝物量の時系列データを解析装置 1 に送信する。細胞外代謝物量の時系列データを、以下、「細胞外代謝物データ」とも称する。ただし、解析システム 100 における細胞外代謝物データの取得方法は、上記の例に限定されない。たとえば、細胞外代謝物計測部 22 は、細胞外代謝物を分析した値を直ちに解析装置 1 に送信し、解析装置 1 は、当該細胞外代謝物量の計測値を受信した時刻に基づいて、細胞外代謝物量を計測した時刻を算出し、細胞外代謝物データを作成してもよい。

[0021] 解析装置 1 は、細胞データおよび細胞外代謝物データを取得し、これらのデータに基づいて、細胞の代謝フラックス分布のパターンである「フラックスパターン」を推定する。フラックスパターンの推定方法については、後に説明する。

[0022] 解析装置 1 は、コントローラ 19 と、ディスプレイ 15 と、操作部 14 とを含む。コントローラ 19 には、ディスプレイ 15 および操作部 14 が接続される。操作部 14 は、典型的には、タッチパネル、キーボード、マウスなどで構成される。操作部 14 は、プロセッサ 10 に対するユーザの操作入力を受け付ける。ディスプレイ 15 は、例えば画像を表示可能な液晶パネルで構成される。ディスプレイ 15 は、ユーザの操作入力の受け付けに関する画像を表示し、プロセッサ 10 による処理の結果を表示する。

[0023] コントローラ 19 は、主な構成要素として、プロセッサ 10 と、メモリ 11 と、通信部 12 と、入出力部 13 とを有する。これらの各部は、バスを介して互いに通信可能に接続される。

[0024] 入出力部 13 は、プロセッサ 10 と、入出力部 13 に接続される外部機器との間で各種データをやり取りするためのインターフェイスである。外部機器は、計測装置 2 と、操作部 14 と、ディスプレイ 15 とを含む。一実施例

において、入出力部 13 は、細胞外代謝物データおよび細胞データを、計測装置 2 から受信する。ただし、解析装置 1 における細胞外代謝物データおよび細胞データの取得方法はこれに限定されず、たとえば、通信部 12 を介して取得してもよいし、USB メモリ等の記憶媒体を介して取得してもよい。

[0025] 通信部 12 は、外部装置と各種データをやり取りするための通信インターフェイスであり、アダプタまたはコネクタなどによって実現される。なお、通信方式は、無線 LAN (Local Area Network) などによる無線通信方式であってもよいし、USB (Universal Serial Bus) などを利用した有線通信方式であってもよい。

[0026] メモリ 11 は、入出力部 13 において取得した、細胞外代謝物データおよび細胞データを記憶する。メモリ 11 は、たとえば、ROM (Read Only Memory)、RAM (Random Access Memory)、および、HDD (Hard Disk Drive) などの記憶装置で実現される。ROM は、プロセッサ 10 にて実行されるプログラムを格納することができる。RAM は、プロセッサ 10 におけるプログラムの実行中に利用されるデータを一時的に格納することができる、作業領域として利用される一時的なデータメモリとして機能することができる。HDD は、不揮発性の記憶装置である。HDD に加えて、あるいは、HDD に代えて、フラッシュメモリなどの半導体記憶装置を採用してもよい。なお、上記プログラムおよび／またはデータは、プロセッサ 10 がアクセス可能な外部の記憶装置に格納されていてもよい。

[0027] プロセッサ 10 は、メモリ 11 に記憶された細胞外代謝物データおよび細胞データに基づいて、細胞の代謝フラックス分布のパターンであるフラックスパターンを推定する。プロセッサ 10 は、典型的には、CPU (Central Processing Unit) または MPU (Micro Processing Unit) などの演算処理部である。プロセッサ 10 は、メモリ 11 に記憶されたプログラムを読み出して実行することで、解析装置 1 の動作を制御する。当該プログラムは、コンピュータによって実行されることにより、コンピュータに実施形態に係るフラックスパターンの推定方法を実施させるプログラムを含む。

[0028] [2. 従来の代謝フラックス分布の推定方法、および、その問題点]

生物の細胞は、外部から基質を取り込み、各種代謝物に変換し、その一部を外部に排出する。この現象を利用して、細胞を遺伝子操作すること等により、所定の有用な代謝物である目的物を適切に生産させるように変化させる技術が、合成生物学分野において研究、開発されている。

[0029] 合成生物学分野では、培養状況の変化、継代による遺伝子変異等によって、細胞の代謝が変化し、目的物の生産性が変化することがある。生産性変化の要因を検討するには、代謝流速を理解することが重要である。代謝流速は、「代謝フラックス」または単に「フラックス」と称される。

[0030] (2-1. FBAの概要)

フラックスを理解するために、非特許文献1, 2において解説されているとおり、FBAが用いられる場合がある。FBAは、代謝反応を線形式で表した代謝モデルを構築し、線形計画法により代謝フラックス分布を推定する手法である。以下に、図2～図3を用いてFBAについてより詳細に説明する。

[0031] 図2は、FBAの前提となる「代謝マップ」を説明するための図である。図2には、細胞(C)において起こりうる代謝反応のマップ(代謝マップ)が模式的に示されている。丸(M)は各代謝物を示し、矢印は代謝物の変換を示す。代謝マップは、たとえば、細胞のゲノム情報に基づいて作成される。

[0032] まず細胞は、基質を細胞内に取り込む。次に細胞は、取り込んだ基質を別の代謝物に変換する。細胞内で、代謝物の変換が繰り返された後、最終的には、いくつかの代謝物が細胞外に排出される。合成生物学分野では、しばしば、当該細胞外に排出される代謝物の一部が目的物として利用される。細胞外へ排出される目的物以外の代謝物は、副産物と称される場合もある。また、代謝物の一部は次世代の細胞を構成するために用いられる。

[0033] このような代謝マップは、上記したようにゲノム情報に基づいて作成可能であるが、実際にどの代謝反応がどの程度行なわれているかを予測すること

は難しい。F B Aは、このような実際に行われている代謝反応の程度を予測する方法である。

[0034] 図3は、代謝フラックス分布およびF B Aを説明するための図である。フラックスは、代謝物の変化量で表される。図3（A）の例では、基質から丸M1で示した代謝物への変化量 v_1 、または代謝物からの他の代謝物への変化量 v_2 、 v_3 が例示されている。

[0035] F B Aを行なう際には、2つの仮定が条件として設定される。F B Aの第1条件は、細胞内の全ての代謝物において、代謝が定常状態にあるという条件である。これにより、全ての代謝物の量は時間に応じて変化しない。よって、図3（A）に示す代謝物M1についての物質収支式においても、その変化量である、 $v_1 - v_2 - v_3$ は0となる。このように全ての代謝物について、解が0となる物質収支式を立てる。

[0036] 全ての代謝物についての物質収支式は、1つの行列式にまとめられる。当該行列式のように、細胞におけるフラックスを包括的に含むモデルは、当業者において、代謝モデル、化学量論モデル等と称されるが、本明細書においては、「代謝モデル」と称する。F B Aにおいては、この第1条件に基づく代謝モデルを用いて、細胞の増殖速度が最大となるという第2条件を満たすフラックス分布を一意にもとめる（図3（B））。

[0037] このようにF B Aにおいて作成されたフラックス分布において、環境条件、所定の遺伝子の破壊の有無、栄養要求性等を模してパラメータの制約を与えることにより、代謝フラックス分布の変化を推定することができる。パラメータの制約とは、たとえば、各フラックスの上限および下限の制約である。このように推定したフラックス分布の変化について、実際の微生物において環境条件等の変化を加えて検証した例が報告されている。

[0038] しかし、逆に言えば、F B Aにおいて作成されたフラックス分布において、実際の環境条件等に対応したパラメータの制約を与えなければ、間違ったフラックス分布の変化が推定されてしまう。これにより、F B Aにおいては、実際の環境条件に対応したパラメータの制約を与えることが重要である。

[0039] このような観点から、実際に計測した細胞外代謝物の量を代謝モデルのパラメータの制約として与えてFBAを行なうことにより、実際の計測値に合うフラックス分布を推定する研究も報告されている。

[0040] (2-2. 計測値を利用したFBA、およびその問題点)

フラックスの単位は、細胞質量 (gram dry cell weight) と、単位時間 (h) と、代謝成分のミリモル質量 (mmol) とを用いて、 $\text{mmol} / (\text{h} \cdot \text{gDCW})$ と表される。そのため、実際の計測値からフラックスを計算するには、代謝物濃度 (mol/mL) と細胞密度 (gDCW/mL) の時系列データを取得する必要がある。代謝物濃度の計測には、HPLC、MS等の分析装置が用いられる。細胞密度の計測は、培養液を濁度計で計測する方法、RIPA buffer およびBCAを用いてタンパク質を抽出・定量する方法がある。

[0041] 非特許文献3においては、4つの添加する阻害剤と2つの細胞外へ排出される代謝物の実際の計測値を利用して、FBAを行なった例が開示されている。非特許文献3の例では、Seahorse XF Analyzerを用いて計測したDirectly Measured Fluxの値と、計測値から計算したIndirectly Measured Fluxの値とを、代謝モデルにおけるフラックスの制約として与えて、FBAが行なわれた。この結果、推定されたフラックス分布においては、GABA (Gamma-Aminobutyric Acid)、ABAT (4-Aminobutyrate Aminotransferase)、ブドウ糖、グルタミン酸、パルミチン酸塩の推定値が、実測値と一致した。しかし、代謝モデルにおけるフラックスの解空間は膨大であり、FBAではその中からただ1つの解のみを抽出しているため、評価した上記5種類の物質以外の物質に関するフラックスが正しく推定できていない可能性も考えられる。

[0042] (2-3. 計測値変化から要因となる代謝経路を特定することが困難という問題点)

また、FBAにおいては、いずれかの代謝経路のフラックスに制約条件を与えることで、目的物の生産性または増殖速度を変化させる順方向の計算は可能であるが、目的物の生産性変化の計測値からその要因となる代謝経路を

特定することは困難であった。

[0043] 生産性変化の計測値に整合するような代謝フラックス分布のパターン（「フラックスパターン」）は多数計算されるため、ユーザがフラックスパターンを確認する作業が膨大となるという課題もあった。

[0044] （２－４． ^{13}C 代謝フラックス解析法、およびその問題点）

合成生物学分野におけるフラックスを推定するための方法として、安定同位体を用いたフラックス解析法も知られている。非特許文献４，５には、GC-MSを用いた ^{13}C 代謝フラックス解析法による細胞内代謝経路のフラックス分布の推定方法が開示されている。 ^{13}C とは、炭素 13 であり、天然に存在する炭素 12 （ ^{12}C ）の安定同位体である。

[0045] ^{13}C 代謝フラックス解析法においては、炭素の安定同位体 ^{13}C で標識した炭素源である ^{13}C グルコースを含む培地で細胞を培養し、細胞に取り込まれた ^{13}C グルコースを基とする代謝物における ^{13}C 標識割合を計測することにより、フラックス分布を推定することができる。

[0046] しかし、 ^{13}C 代謝フラックス解析法は、 ^{13}C グルコースが高価であるという問題がある。また、グリセロール、二酸化炭素等は ^{13}C で標識できないのでこれらの物質を炭素源とする宿主には適用できない等の問題もある。また、 ^{13}C 代謝フラックス解析法を含む安定同位体を使用するフラックス解析方法は、実験系が少し異なるだけで、実験条件のチューニングが必要となり、技術的なハードルが高いという問題もある。具体的には、安定同位体を使用するフラックス解析方法では望ましい状態において実験系を停止させる必要があるが、これが技術的に非常に難しい。

[0047] 以上のように、従来の合成生物学分野においては、複数のフラックスパターンの推定方法が知られていたが、それぞれに問題があった。

[0048] [３．実施形態に係るフラックスパターンの推定方法]

このような実情を鑑みて、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法は、以下に示す、４つのプロセスである第１～第４プロセスを含む。

[0049] 図４は、実施形態に係るフラックスパターンの推定方法を説明するための

図である。

本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法の第1プロセスの特徴は、多くの種類の細胞外代謝物の時系列データを取得することであり、好ましくは、細胞外メタボロームデータの時系列データを取得することである。実際の細胞内で行われている代謝反応に整合性の高いフラックスパターンを推定するには、計測する細胞外代謝物の種類は多いほど好ましく、さらに理想的には計測可能な全種類の細胞外代謝物について網羅的に計測することが好ましいからである。

[0050] 第1プロセスにおいては、まず、細胞および細胞外代謝物の時系列データを取得する。物質収支の考え方からは、細胞増殖により生じた細胞および細胞外代謝物は、共に、基となる細胞外へ排出される物質の一形態である。よって、本明細書では、細胞および細胞外代謝物を「排出物」と総称し、細胞量の時系列データおよび細胞外代謝物量の時系列データを「排出データ」と総称する。

[0051] 次に、細胞データに基づいて細胞増殖速度のフラックスである増殖フラックスを、細胞外代謝物データに基づいてその変化量である細胞外フラックスを算出する。本明細書において、増殖フラックスおよび細胞外フラックスを、「排出フラックス」と総称する。また、細胞外フラックスと対比して、細胞内の代謝反応のフラックスを、「細胞内フラックス」と称する。

[0052] 多くの種類の細胞外代謝物は、好ましくは、アミノ酸類、ビタミン類、有機酸、アミノ酸代謝に関わる代謝物（有機酸等）、核酸代謝に関わる代謝物、TCAサイクル（Tricarboxylic Acid Cycle）に関わる代謝物等を含む。多くの種類の細胞外代謝物は、より好ましくは、細胞外代謝物の総体をなす代謝物である。細胞外代謝物の総体は「細胞外メタボローム」と称され、その計測値は「細胞外メタボロームデータ」と称される。

[0053] 多くの種類の細胞外代謝物は、たとえば、数十種類以上の物質を含み、好ましくは百種以上の物質を含む。

[0054] 第2プロセスにおいては、最適化問題およびフラックス変動解析（Flux V

ariability Analysis: FVA) を用いて、計測値に基づいた複数のフラックスパターンを推定する。具体的な算出方法については後述する。このように最適化問題およびFVAにより推定されるフラックスパターンを、本明細書において、「一次フラックスパターン」とも称する。

[0055] 第3～第4プロセスにおいては、推定された複数の一次フラックスパターンの中でも、もっともらしいフラックスパターンをユーザに呈示するために、後処理（クラスタリングおよび順位付け）を実施する。もっともらしいフラックスパターンとは、換言すると、現実の細胞において行なわれている可能性が高いと考えられるフラックスパターンである。

[0056] 第3プロセスにおいては、推定された一次フラックスパターンは、類似する一次フラックスパターン同士クラスタリングされる。次に、各クラスタ内の一次フラックスパターンから、代表的なフラックスパターンである代表フラックスパターンが生成される。

[0057] 第4プロセスにおいては、代表フラックスパターンは、もっともらしい順に順位付けされる。もっともらしい順とは、換言すると、現実の細胞において行なわれている可能性が高いと考えられる順である。代表フラックスパターンの順位付けの方法については、後述する。

[0058] 本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法は、第1プロセスにおいて、細胞増殖速度の計測値、および、多くの種類の細胞外代謝物の計測値に基づいて最適化問題を解く。よって、理論的な最大細胞増殖率を制約とするFBAに比べ、実際の計測値に整合したフラックスパターンを求めることができる。また、少数（たとえば5種類）の細胞外代謝物の計測値のみを組み込むFBAに比べても、フラックス空間をより絞り込むことができる。また、第2プロセスにおいて、FBAのように1つのフラックスパターンに限定するのではなく、もっともらしい複数のフラックスパターンを推定することができる。よって、従来の代謝フラックス解析よりも、実際の細胞における代謝反応を反映したフラックスパターンを解に含む可能性が高くなると考えられる。

[0059] さらに第3～第4プロセスにおいて、複数のフラックスパターンの中でも、代表的なパターンを、順位付けて確認できることにより、ユーザに過度な負担を生じない。

[0060] さらに、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法によれば、生産性が変化した要因となる代謝経路を推定することも容易である。続く図5に、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法を示す。

[0061] [4. 実施形態に係るフラックスパターンの推定処理]

図5は、実施形態に係るフラックスパターンの推定処理を示すフローチャートである。図5に示すステップは、解析装置1のプロセッサ10によって実行される。なお、図中において、「S」は「STEP」の略称として用いられる。図5のS11～S12は、図4の第1プロセスに対応する。図5のS21は、図4の第2プロセスに対応する。図5のS31は、図4の第3プロセスに対応する。図5のS41は、図4の第4プロセスに対応する。

[0062] 図5を参照して、S11において、プロセッサ10は、第1株細胞および第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列変化データを含む排出データを取得する。

[0063] 上記したように、第2株細胞は、第1株細胞とは特定代謝物の生産量が異なる。一実施例において、第1株細胞および第2株細胞は、同一系統である2種類の菌株に各々属する細胞である。

[0064] 第1株細胞および第2株細胞は、原核細胞であっても、真核細胞であってもよい。第1株細胞および第2株細胞は、好ましくは、ゲノムに基づく代謝マップが構築されている、大腸菌、枯草菌、結核菌、出芽酵母、緑藻、線虫、シロイヌナズナ、ヒト等の生物を由来とする細胞である。当該ゲノムに基づく代謝マップは、当業者において「ゲノムスケール代謝モデル」とも称される。ただし、既存の代謝マップが存在しない生物由来の細胞であっても、代謝マップを構築することにより、本実施形態に係る代謝フラックスパターンの推定方法の対象とすることが可能である。

[0065] 特定代謝物は、典型的には細胞外へ排出される代謝物であり、この場合「

特定代謝物の生産量」は「特定代謝物の細胞外への排出量」に相当する。特定代謝物は、典型的には所定の有用な代謝物である目的物である。

[0066] 排出データは、細胞の量の時系列データである細胞データ、および、細胞外へ排出される代謝物である細胞外代謝物の量の時系列変化データである細胞外代謝物データを含む。一実施例において、細胞データは細胞密度 (gDCW/mL) の時系列データであり、細胞外代謝物データは細胞外代謝物濃度 (mol/mL) の時系列データである。

[0067] 一実施例において、目的物の量の時系列データは、GCおよび／またはMSの計測値から得られる。一実施例において、副産物（たとえば、アミノ酸類、ビタミン類、有機酸、アミノ酸代謝に関わる代謝物（有機酸等）、核酸代謝に関わる代謝物、TCAサイクルに関わる代謝物）の量の時系列データは、LC-MS細胞培養プロファイリングメソッド（株式会社島津製作所製）の計測値から得られる。

[0068] S12において、プロセッサ10は、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出する。

[0069] 一実施例において、プロセッサ10は、細胞外代謝物データから、細胞外代謝物の時間当たり細胞辺りの変化量である、細胞外代謝物フラックスを算出する。また、細胞データから、その時間当たり細胞辺りの変化量である、増殖フラックスを算出する。排出フラックスは、細胞外代謝物フラックスおよび増殖フラックスを含む。

[0070] 図6は、増殖フラックスの計算方法を説明するための図である。図6は、細胞量の時系列変化を示すグラフであり、横軸は培養時間、縦軸は菌体数（ログスケール）を示す。一実施例において、増殖フラックスは、所定の期間において増殖した菌数を、当該所定の期間および所定の期間の開始時の菌数の積によって、除算した値である。

[0071] 再び図5を参照して、S21において、プロセッサ10は、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定する。一次フラックスパターンの推定処理については、図7において詳しく説明する。

[0072] S 3 1 において、プロセッサ 1 0 は、複数の一次フラックスパターンの互いの類似性に関する情報を使って、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングすることにより、代表的な代表フラックスパターンを推定する。本明細書において、フラックスパターンまたはフラックスにおける、互いの類似性の度合いを「類似度」と示す。

[0073] 好ましくは、プロセッサ 1 0 は、排出フラックスの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングする。その理由を以下に説明する。一次フラックスパターンにおいて、排出フラックスが同じ場合でも、細胞内フラックスの自由度により、細胞内フラックスは異なるときがある。このときの細胞内フラックスの違いは、排出フラックスへの影響が無い場合、目的物の生産性変化の要因として重要ではないので、クラスタリングに組み込む必要が無いと考えられる。これにより、目的物の生産性変化の要因として重要でない要素がクラスタリングに影響する可能性を低減できる。

[0074] 一実施例において、プロセッサ 1 0 は、階層的クラスタリングを用いてクラスタリングを行なう。たとえば、プロセッサ 1 0 は、2 つの一次フラックス同士のエウクリッド距離を算出し、最も距離の近い（類似度が高い）組み合わせ同士をクラスタリングすることを繰り返し、樹形図を作成することにより、階層的なクラスタリングを行なう。距離の計算方法は、たとえば、ワード法（最小分散法）を用いる。

[0075] プロセッサ 1 0 は、各クラスタの中に含まれる一次フラックスパターンに基づいて、代表フラックスパターンを推定する。代表フラックスパターンは、クラスタ内の一次フラックスパターンの中から 1 つのフラックスパターンを選択しても良いし、クラスタ内の一次フラックスパターンの少なくとも一部を統合することにより作成されても良い。

[0076] S 4 1 において、プロセッサ 1 0 は、代表フラックスパターンを順位付ける。当該順位とは、もっともらしい順位、より具体的には、実際に細胞で行なわれているフラックスパターンと類似している可能性が高いと考えられ

る順位である。換言すると、順位 1 位の代表フラックスパターンは、最ももっともらしいフラックスパターンである。

[0077] 当該順位は、ユーザにとって、代表フラックスパターンを検討する際の優先順位であるともいえる。たとえば、ユーザは、当該順位 1 位の代表フラックスパターンについて、最優先で検証実験を行なうことが最も効率的であると考えられる。

[0078] 好ましくは、プロセッサ 10 は、排出フラックスの計測値と FBA による推定値との整合性に基づいて、順位づけする。一実施例において、プロセッサ 10 は、増殖フラックスについての計測値と FBA による推定値との誤差、および、細胞外代謝物フラックスについての計測値と FBA による推定値との誤差に基づいて前記代表フラックスパターンを順位付けする。誤差は、たとえば、以下の式で求められる平均二乗パーセント誤差 (RMSPE : Root Mean Squared Percentage Error) である。

[0079] [数1]

$$[\text{数 } 1] \text{ RMSPE} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{a_i - f_i}{a_i} \right)^2} \quad a_i = \text{正解値 (計測値)}, f_i = \text{推定値} \quad \dots (1)$$

[0080] S51において、プロセッサ10は、第1株細胞の代表フラックスパターンと、第2株細胞の代表フラックスパターンとを比較することにより、相違点を検出する。一実施例において、プロセッサ10は、まず、第1株細胞の代表フラックスパターンと、第2株細胞の代表フラックスパターンとを比較することにより、第1株細胞と第2株細胞とで類似するフラックスパターンペアを検出する。次に、プロセッサ10は、当該フラックスパターンペアを比較することにより、フラックスパターンペア間において相違する相違フラックスを検出する。当該相違フラックスは、第2株細胞における目的物の生産量の変化の要因であると推定されるフラックスである。以上のように、ユーザは、第2株細胞における目的物の生産量の変化の要因となるフラックスを、推定することができる。

[0081] S61において、プロセッサ10は、複数の一次フラックスパターンをク

ラストリンして出力し、処理を終了する。S 6 1において、プロセッサ 1 0は、代表フラックスパターン、順位付けされた代表フラックスパターン、フラックスパターンペアおよび相違フラックスの少なくとも1つを出力してもよい。一実施例において、プロセッサ 1 0は、これらの推定結果をディスプレイ 1 5に表示することにより出力する。ただし、推定結果の出力形態はこれに限定されず、たとえば通信部 1 2を介して解析システム 1 0 0の外部の機器に送信され、外部の機器により出力されてもよい。外部の機器は、たとえばプリンタ、または、ディスプレイを備えたコンピュータである。これにより、ユーザは推定結果を容易に把握することができる。さらに、ユーザは当該推定結果を基に、当該推定結果の検証実験の計画を立てることができる。

[0082] 図 7 は、一次フラックスパターンの推定処理を示すフローチャートである。図 7 は、図 5 の S 2 1 のサブルーチンに対応し、図 5 の S 1 2 の後、S 5 1 の前に実行される。

[0083] 図 7 に示すステップは、解析装置 1 のプロセッサ 1 0によって実行される。

図 7 を参照して、S 2 1 1 において、プロセッサ 1 0は、細胞内のフラックスを説明変数とし、細胞増殖速度の計測値と推定値との誤差、および、特定代謝物の排出量の計測値と推定値との誤差を目的関数とした、最適化問題を解く。これにより推定されたフラックスパターンを、本明細書においては「最適化フラックスパターン」と称する。換言すると、最適化フラックスパターンは、細胞増殖速度と特定代謝物の計測値を説明するために最適化されたフラックスパターンである。

[0084] 最適化問題を解く場合には、2つの条件が設定される。第1条件は、F B Aの第1条件と同じく、細胞内の全ての代謝物について、物質収支式が0であるという条件である。第2条件は、F B Aの第2条件とは異なり、細胞外代謝物の推定値と実験値との誤差が最小となる複数のフラックスパターンを求めることである。

- [0085] 一実施例において、プロセッサ 10 は、細胞増殖速度の計測値と推定値との誤差の二乗値および特定代謝物の排出量の計測値と推定値との誤差の二乗値の総和が最小となるフラックスパターンを、最適化フラックスパターンとして算出する。細胞増殖速度との計測値は、たとえば、計測された増殖データに基づいて算出された増殖フラックスである。細胞増殖速度の推定値は、最適化フラックスパターンの候補となるフラックスパターンにおける増殖フラックスである。特定代謝物の排出量の計測値は、たとえば、計測された細胞外代謝物データに基づいて算出された特定代謝物の細胞外フラックスである。特定代謝物の排出量の推定値は、たとえば、最適化フラックスパターンの候補となるフラックスパターンにおける特定代謝物の細胞外フラックスである。
- [0086] S 2 1 2 において、プロセッサ 10 は、最適化フラックスパターンについて、説明変数、細胞増殖速度および特定代謝物の排出量を維持した状態で、細胞内の各フラックスについて、FVA を行ない、最小値と最大値とを得る。
- [0087] FVA とは、制約条件の中での理論最大収率、理論最小収率を計算してフラックスの変動範囲を求める解析方法である。本実施形態においては、目的関数は特定代謝物の細胞外フラックスである。より具体的には、計測値から算出した特定代謝物の細胞外フラックスの値に整合するという条件下での、各細胞内フラックスの最小値および最大値を求める。なお、これだけだと細胞増殖能については考慮しないことになるので、細胞増殖能をある程度維持した状態での理論最大収率を算出する場合は、細胞増殖速度を、理論的な最大値から所定の割合以内に収まるという制約も加える。
- [0088] ここで、本実施形態において FVA を用いる利点をより詳細に説明する。最適化問題を解くことにより、1 つの最適化フラックスパターンが推定される。しかし、説明変数、細胞増殖速度、目的物の排出フラックスが同じフラックスパターンは複数あり、推定した最適化フラックスパターンはその一例に過ぎない。また、実際の生物において、各フラックスの値はある程度自由

度（ゆらぎ）を有する方が自然でもある。そこで、FVAにおいては、細胞内フラックスの最小値および最大値を求め、その範囲内でのフラックスパターンも考慮することとする。

[0089] また、FBAと異なり、細胞増殖速度を最大値に一意に固定せず、最大値から所定の割合以内に収まる場合を想定する。これは、実際の生物においては、必ずしも理論的な最大細胞増殖速度を満たす代謝反応が行われているとは限らないからである。たとえば、理論的な細胞増殖速度が最大となるフラックスパターンをAとし、理論的な細胞増殖速度が最大値よりわずかに低いフラックスパターンをBとした場合、細胞内ではフラックスパターンBが実行されている可能性も十分に起こりうると考えられる。

[0090] これにより、FVAによって、各フラックスがある程度の範囲内で自由度を有した状態で、複数のもっともらしいフラックスパターン（一次フラックスパターン）を推定することができる。これにより、単にFBAを解く場合に比べ、実際の細胞において行なわれている代謝反応に即したフラックスパターンを推定できる可能性が向上すると考えられる。

[0091] S213において、プロセッサ10は、自由度が所定の閾値以上ある、具体的には、最小値と最大値との差が所定の閾値以上であるフラックスについては、さらに、フラックスを最小値とした場合およびフラックスを最大値とした場合の各々について、FBAを用いて一次フラックスパターンを推定する。

[0092] たとえば所定の細胞内フラックスを最小値に固定した場合、その他のフラックスの値は計測値に基づいて算出される。この所定の細胞内フラックスの最小値と、対応するその他のフラックスの値とが、1つの、一次フラックスパターンを構成する。

[0093] 自由度がほぼない、具体的には、細胞増殖速度を所定の割合以内で変化させても、値がほとんど変化しないフラックスについては、その値を固定することができる。一実施例において、プロセッサ10は、最小値と最大値との差が所定の閾値以下であるフラックスについては、値を一意に固定する。こ

れにより、ほぼ同じである一次フラックスパターンのバリエーションを無駄に増やすことがない。

[0094] S 2 1 3 を終了すると、プロセッサ 1 0 は、処理を図 5 の S 3 1 に進める。

以下、図 6 および図 7 に示した処理に沿って、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法の効果を説明する。S 1 1 ~ S 1 2 によれば、増殖フラックスと、細胞外フラックスとを計測値から算出することができる。これにより、計測値に適合するフラックスパターンの推定が可能である。特に、細胞外代謝物を網羅的に計測した細胞外メタボロームデータを利用することにより、より現実に即したフラックスパターンを推定することが可能である。

[0095] S 2 1 1 においては、計測値に基づいて、第 2 株細胞の細胞増殖速度と目的物の細胞外フラックスとの誤差が最小となる最適化フラックスパターンを簡便に推定することができる。

[0096] 一方で、説明変数、細胞増殖速度、目的物の排出フラックスが同じフラックスパターンは複数あるため、S 2 1 1 で求めた最適化フラックスパターンはその一例に過ぎないともいえる。S 2 1 2 において F V A を行なうことにより、各細胞内フラックスの許容範囲を求めることができる。これにより、S 2 1 3 において、説明変数、細胞増殖速度、目的物の排出フラックスが同じで、細胞内フラックスが異なる様々なフラックスパターン（一次フラックスパターン）を推定することができる。

[0097] 一方で、様々なフラックスパターンが求められたとしても、同じようなフラックスパターンを複数ユーザに提示しても、ユーザの考察に役に立たないばかりか、煩雑になるおそれもある。そこで、S 3 1 において、代表的なフラックスパターンである代表フラックスパターンを抽出し、ユーザに提示することにより、目的物の排出量に変化した要因を考察する効率を向上する。

[0098] さらに、S 4 1 において、代表フラックスパターンの中でも、細胞増殖速度および細胞外フラックスについての計測値と推定値との一致度を計算する

。そして、当該一致度を基に代表フラックスパターンを順位付けすることによって、ユーザはどの代表フラックスパターンがもっともらしいか（真実である可能性が高いか）を、容易に判断することができる。

[0099] 以上のように、細胞の代謝フラックス分布の解析において、細胞外へ排出される物質の計測値に基づいて、実際に細胞において行われている代謝反応に整合する可能性の高い、複数の代謝フラックス分布のパターンを推定することができる。また、当該複数の代謝フラックス分布のパターンの中で、代表的なパターンを推定することができる。

[0100] また、S 5 1において、第1株細胞と第2株細胞の代表フラックスパターンの推定結果を比較することにより、ユーザは目的物の生産量の変化の要因を知ることができる。なお、既に第1株細胞のフラックスパターンが推定されている場合、ユーザはS 1 1～S 4 1において第2株細胞の代表フラックスパターンのみを推定し、S 5 1において既存の第1株細胞のフラックスパターンと比較することができる。

[0101] S 6 1において、フラックスパターンの推定結果をユーザに提示することにより、ユーザは生産量の変化の原因となる要因を認識することができる。また、ユーザは、当該要因に対して具体的なアプローチをとることができる。よって、ユーザは、生産量の変化をコントロールすることができる。

[0102] より具体的には、当該生産量の変化が好ましい場合、ユーザは当該要因を安定的に保つ手立てを取ることで、当該生産量の変化を保つことができる。また、次回以降に同じ株細胞を培養する場合にも当該要因を再現することにより、好ましい生産量を再現することができる。これにより、好ましい培養系を確立することができる。

[0103] さらに、当該要因についての知識を基に、さらに生産量を改良する手立てを探ることができる。たとえば当該要因となるフラックスに影響する物質を培地に加えたり、当該要因となるフラックスに影響する遺伝子を操作したりすることを試みることができる。

[0104] また、要因を明確化することにより、異なる手技、装置および培養スケー

ルを有する第三者においても、当該要因を再現することが容易である。よって、好ましい生産量の変化を、簡易に、より広範囲に実施することができる。

[0105] 一方で、当該生産量の変化が好ましくない場合には、ユーザは当該要因を阻害する手立てを考えることができる。これにより、同じ要因により生産量が悪化する事態を防ぐことができる。

[0106] 以上のように、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法によれば、培養系をコントロールすることで、培養系の安定性、および、発展性を向上することができる。

[0107] なお、上記では、目的物が細胞から排出される代謝物の場合を例示したが、目的物が細胞内に蓄積される代謝物であり、細胞を破砕して集められる場合についても、本実施形態は適用可能である。細胞内に蓄積される代謝物とは、たとえば、細胞内小器官または細胞骨格を構成する代謝物である。一実施例においては、細胞の培養液の一部を、所定の時刻（たとえば所定の時間間隔ごと）に分画し、当該培養液の一部から細胞を破砕して目的物を計測することにより、目的物の量が計測できる。細胞外フラックスは、目的物を計測した培養液の一部を用いて計測しても良いし、培養液の別の一部を用いて計測してもよい。細胞増殖速度は、目的物および／または細胞外フラックスを計測した培養液の一部を用いて計測しても良いし、大元の培養液において、たとえば濁度により計測しても良い。これにより、目的物の量と、細胞増殖速度と、細胞外フラックスとを計測することが可能である。よって、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法によって、細胞内に蓄積される代謝物の生産量の変化の原因となる代謝経路を求めることができる。

[0108] なお、目的物の一部が細胞外に排出され、残りが細胞内に蓄積される代謝物については、細胞外に排出される量と、細胞内に蓄積される量とを別々に計測することにより、目的物の細胞外への排出量および／または細胞内の蓄積量を変化させる原因となる代謝経路を求めることができる。

[0109] よって、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法は、目的物の少

なくとも一部が細胞内に蓄積される系について、フラックスパターンおよび変化の要因となるフラックスを求める場合にも適用可能である。

[0110] また、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法の対象は、第1株細胞とは特定代謝物の生産量が異なる第2株細胞である必要は無く、任意の株細胞であっても良い。よって、本実施形態に係るフラックスパターンの推定方法は、所定の株細胞のフラックスパターンを推定する場合にも適用可能である。この場合、図5のS11においては、当該所定の株細胞について排出データが取得される。また、S12～S41, S61においては、当該所定の株細胞についてのみ処理がなされる。S51は行なわれない。

[0111] [態様]

上述した複数の例示的な実施形態は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

[0112] (第1項) 一態様に係る細胞の代謝フラックス分布の推定方法は、第1株細胞および比較対象の第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列データを含む排出データを取得するステップと、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える。

[0113] 第1項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、細胞の代謝フラックス分布の解析において、細胞外へ排出される物質の計測値に基づいて、実際に細胞において行われている代謝反応に整合する可能性の高い、複数の代謝フラックス分布のパターンを推定することができる。また、当該複数の代謝フラックス分布のパターンをクラスタリングして出力できる。これにより、細胞の代謝フラックス分布の解析において、代謝フラックスを正しく推定する方法を提供することができる。

[0114] (第2項)

第1項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、出力するステッ

プは、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングすることにより、代表的な代表フラックスパターンを推定するステップを含む。

[0115] 第2項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、複数の代謝フラックス分布のパターンの中で、代表的なパターンを推定することができる。

[0116] (第3項) 第2項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、代表フラックスパターンを順位付けするステップをさらに備える。

[0117] 第3項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、ユーザはどの代表フラックスパターンがもっともらしいか（真実である可能性が高いか）を、容易に判断することができる。

[0118] (第4項) 第3項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、第1株細胞の代表フラックスパターンと、第2株細胞の代表フラックスパターンとを比較することにより、相違点を検出するステップをさらに備える。

[0119] 第4項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、ユーザは、第1株細胞の代表フラックスパターンと、第2株細胞の代表フラックスパターンとの差を容易に認識できる。特に、第1株細胞および第2株細胞が、特定代謝物の生産量が異なる細胞である場合、ユーザは生産量の変化の要因（フラックス）を認識することができる。また、ユーザは、当該要因に対して具体的なアプローチをとることができる。よって、ユーザは、生産量の変化をコントロールすることができる。なお、特定代謝物は、たとえば、培養の目的物である。

[0120] (第5項) 第4項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、複数の一次フラックスパターン、代表フラックスパターン、順位付けされた代表フラックスパターンおよび相違点の少なくとも1つを表示するステップをさらに備える。

[0121] 第5項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、ユーザは推定結果を容易に把握することができる。さらに、ユーザは当該推定結果を基に、当該推定結果の検証実験の計画を立てることができる。

[0122] (第6項) 第1～5のいずれか1項に記載の代謝フラックス分布の推定方

法において、第1株細胞および第2株細胞は、同一系統である2種類の菌株に各々属する細胞である。

[0123] 第6項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、同一系統である2種類の菌株に各々属する細胞において、代謝フラックスを正しく推定する方法を提供することができる。

[0124] (第7項) 第1～6のいずれか1項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、排出データは、細胞の量の時系列データである細胞データ、および、細胞外へ排出される代謝物である細胞外代謝物の量の時系列変化データである細胞外代謝物データを含む。排出フラックスは、細胞増殖速度のフラックスである増殖フラックス、および、細胞外代謝物の排出のフラックスである細胞外フラックスとを含む。

[0125] 第7項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、細胞増殖速度の計測値、および、細胞外代謝物の計測値に整合した、フラックスパターンを推定することができる。

[0126] (第8項) 第7項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、細胞外代謝物は、アミノ酸類、ビタミン類、アミノ酸代謝に関わる代謝物、核酸代謝に関わる代謝物、および、TCAサイクル (Tricarboxylic Acid Cycle) に関わる代謝物の少なくとも1つを含む。

[0127] 第8項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、アミノ酸類、ビタミン類、アミノ酸代謝に関わる代謝物、核酸代謝に関わる代謝物、および、TCAサイクルに関わる代謝物の少なくとも1つの計測値を基に、好ましくは全ての計測値を基に、実際の計測値と整合するフラックスパターンを推定することができる。

[0128] (第9項) 第7または8項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、細胞外代謝物データは、細胞外代謝物の総体のデータである細胞外メタボロームデータに基づいて算出される。

[0129] 第9項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、実際の細胞内で行われている代謝反応に整合性の高いフラックスパターンが推定できる。

- [0130] (第10項) 第7～9項のいずれか1項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、第1株細胞および第2株細胞は、特定代謝物の生産量が異なる細胞である。複数の一次フラックスパターンを推定するステップは、細胞内のフラックスを説明変数とし、細胞増殖速度の計測値と推定値との誤差、および、特定代謝物の排出量の計測値と推定値との誤差を目的関数とした、最適化問題を解くことにより、最適化フラックスパターンを推定するステップと、最適化フラックスパターンにおいて、説明変数、細胞増殖速度および特定代謝物の排出量を維持した状態で、細胞内の各フラックスについて、フラックス変動解析を行ない、最小値と最大値とを得るステップと、最小値と最大値との差が所定の閾値以上であるフラックスについては、さらに、フラックスを最小値とした場合およびフラックスを最大値とした場合の各々について、フラックスバランス解析を用いて一次フラックスパターンを推定するステップとを含む。
- [0131] 第10項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、最適化問題とFVAとを組み合わせることによって、実際の計測値と整合する複数の一次フラックスパターンを推定することができる。これにより、特定代謝物の生産量が異なる原因となるフラックスの差を推定することができる。
- [0132] (第11項) 第1～10のいずれか1項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、クラスタリングして出力するステップは、排出フラックス間の類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングするステップをさらに含む。
- [0133] 第11項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、細胞内フラックスの違いは、排出フラックスへの影響が無い場合、排出物の変化の要因として重要ではない。よって、排出物の排出量の変化の要因として重要でない要素がクラスタリングに影響する可能性を低減できる。特に、排出物に、培養の目的物が含まれる場合、目的物の生産性変化の要因として重要でない要素がクラスタリングに影響する可能性を低減できる。
- [0134] (第12項) 第3項に記載の代謝フラックス分布の推定方法において、順

位付けするステップは、排出フラックスについての計測値とフラックスバランス解析による推定値との誤差に基づいて代表フラックスパターンを順位付けするステップを含む。

[0135] 第12項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、排出フラックスの計測値とFBA推定値との整合性に基づいて、順位づけすることが可能である。

[0136] (第13項) 第2の態様に係る細胞の代謝フラックス分布の推定方法は、所定の株細胞について、細胞外へ排出される物質の時系列変化データを含む排出データを取得するステップと、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える。

[0137] 第13項に記載の代謝フラックス分布の推定方法によれば、細胞の代謝フラックス分布の解析において、細胞外へ排出される物質の計測値に基づいて、実際に細胞において行われている代謝反応に整合する可能性の高い、複数の代謝フラックス分布のパターンを推定することができる。また、当該複数の代謝フラックス分布のパターンをクラスタリングして出力できる。これにより、細胞の代謝フラックス分布の解析において、代謝フラックスを正しく推定する方法を提供することができる。

[0138] (第14項) 第3の態様に係る解析装置は、細胞の代謝フラックス分布を推定する解析装置である。解析装置は、メモリと、プロセッサとを備える。メモリは、第1株細胞および比較対象の第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列変化データを含む排出データを記憶する。プロセッサは、排出データに基づいて、細胞外への物質の排出フラックスを算出し、排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定し、複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力する。

[0139] 第14項に記載の解析装置によれば、細胞の代謝フラックス分布の解析において、細胞外へ排出される物質の計測値に基づいて、実際に細胞において行われている代謝反応に整合する可能性の高い、複数の代謝フラックス分布のパターンを推定することができる。また、当該複数の代謝フラックス分布をクラスタリングして出力できる。これにより、細胞の代謝フラックス分布の解析において、代謝フラックスを正しく推定する方法を提供することができる。

[0140] (第15項) コンピュータによって実行されることにより、コンピュータに第1～13のいずれか1項に記載の代謝フラックス分布の推定方法を実施させる、プログラム。

[0141] 今回開示された実施形態はすべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は、上記した説明ではなく、請求の範囲によって示され、請求の範囲と均等の意味および範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

符号の説明

[0142] 1 解析装置、2 計測装置、3 培養装置、10 プロセッサ、11 メモリ、12 通信部、13 入出力部、14 操作部、15 ディスプレイ、19 コントローラ、21 細胞計測部、22 細胞外代謝物計測部、100 解析システム。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞の代謝フラックス分布の推定方法であって、
- 第1株細胞および比較対象の第2株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列データを含む排出データを取得するステップと、
- 前記排出データに基づいて、前記細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、
- 前記排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、
- 前記複数の一次フラックスパターンの互いの類似性に関する情報を使って、前記複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える、代謝フラックス分布の推定方法。
- [請求項2] 前記出力するステップは、前記複数の一次フラックスパターンをクラスタリングすることにより、代表的な代表フラックスパターンを推定するステップを含む、請求項1に記載の代謝フラックス分布の推定方法。
- [請求項3] 前記代表フラックスパターンを順位付けするステップをさらに備える、請求項2に記載の代謝フラックス分布の推定方法。
- [請求項4] 前記第1株細胞の前記代表フラックスパターンと、前記第2株細胞の前記代表フラックスパターンとを比較することにより、相違点を検出するステップをさらに備える、請求項3に記載の代謝フラックス分布の推定方法。
- [請求項5] 前記複数の一次フラックスパターン、前記代表フラックスパターン、前記順位付けされた代表フラックスパターンおよび前記相違点の少なくとも1つを出力するステップをさらに備える、請求項4に記載の代謝フラックス分布の推定方法。
- [請求項6] 前記第1株細胞および前記第2株細胞は、同一系統である2種類の菌株に各々属する細胞である、請求項1に記載の代謝フラックス分布

の推定方法。

[請求項7] 前記排出データは、細胞の量の時系列データである細胞データ、および、細胞外へ排出される代謝物である細胞外代謝物の量の時系列変化データである細胞外代謝物データを含み、

前記排出フラックスは、細胞増殖速度のフラックスである増殖フラックス、および、前記細胞外代謝物の排出のフラックスである細胞外フラックスとを含む、請求項1に記載の代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項8] 前記細胞外代謝物は、アミノ酸類、ビタミン類、アミノ酸代謝に関わる代謝物、核酸代謝に関わる代謝物、および、T C A サイクル (Tricarboxylic Acid Cycle) に関わる代謝物の少なくとも1つを含む、請求項7に記載の代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項9] 前記細胞外代謝物データは、前記細胞外代謝物の総体のデータである細胞外メタボロームデータに基づいて算出される、請求項7に記載の代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項10] 前記第1株細胞および前記第2株細胞は、特定代謝物の生産量が異なる細胞であって、

前記複数の一次フラックスパターンを推定するステップは、

細胞内のフラックスを説明変数とし、前記細胞増殖速度の計測値と推定値との誤差、および、前記特定代謝物の排出量の計測値と推定値との誤差を目的関数とした、最適化問題を解くことにより、最適化フラックスパターンを推定するステップと、

前記最適化フラックスパターンにおいて、前記説明変数、前記細胞増殖速度および前記特定代謝物の排出量を維持した状態で、細胞内の各フラックスについて、フラックス変動解析を行ない、最小値と最大値とを得るステップと、

前記最小値と前記最大値との差が所定の閾値以上であるフラックスについては、さらに、フラックスを前記最小値とした場合およびフ

ラックスを前記最大値とした場合の各々について、フラックスバランス解析を用いて前記一次フラックスパターンを推定するステップとを含む、請求項 9 に記載の代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項11] 前記クラスタリングして出力するステップは、前記排出フラックス間の類似度に基づいて、前記複数の一次フラックスパターンをクラスタリングするステップをさらに含む、請求項 1 に記載の代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項12] 前記順位付けするステップは、前記排出フラックスについての計測値とフラックスバランス解析による推定値との誤差に基づいて前記代表フラックスパターンを順位付けするステップを含む、請求項 3 に記載の代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項13] 細胞の代謝フラックス分布の推定方法であって、
所定の株細胞について、細胞外へ排出される物質の時系列変化データを含む排出データを取得するステップと、
前記排出データに基づいて、前記細胞外への物質の排出フラックスを算出するステップと、
前記排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定するステップと、
前記複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、前記複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力するステップとを備える、代謝フラックス分布の推定方法。

[請求項14] 細胞の代謝フラックス分布を推定する解析装置であって、
第 1 株細胞および比較対象の第 2 株細胞の各々について、細胞外へ排出される物質の時系列変化データを含む排出データを記憶するメモリと、
プロセッサとを備え、
前記プロセッサは、
前記排出データに基づいて、前記細胞外への物質の排出フラックス

を算出し、

前記排出フラックスに基づいて、複数の一次フラックスパターンを推定し、

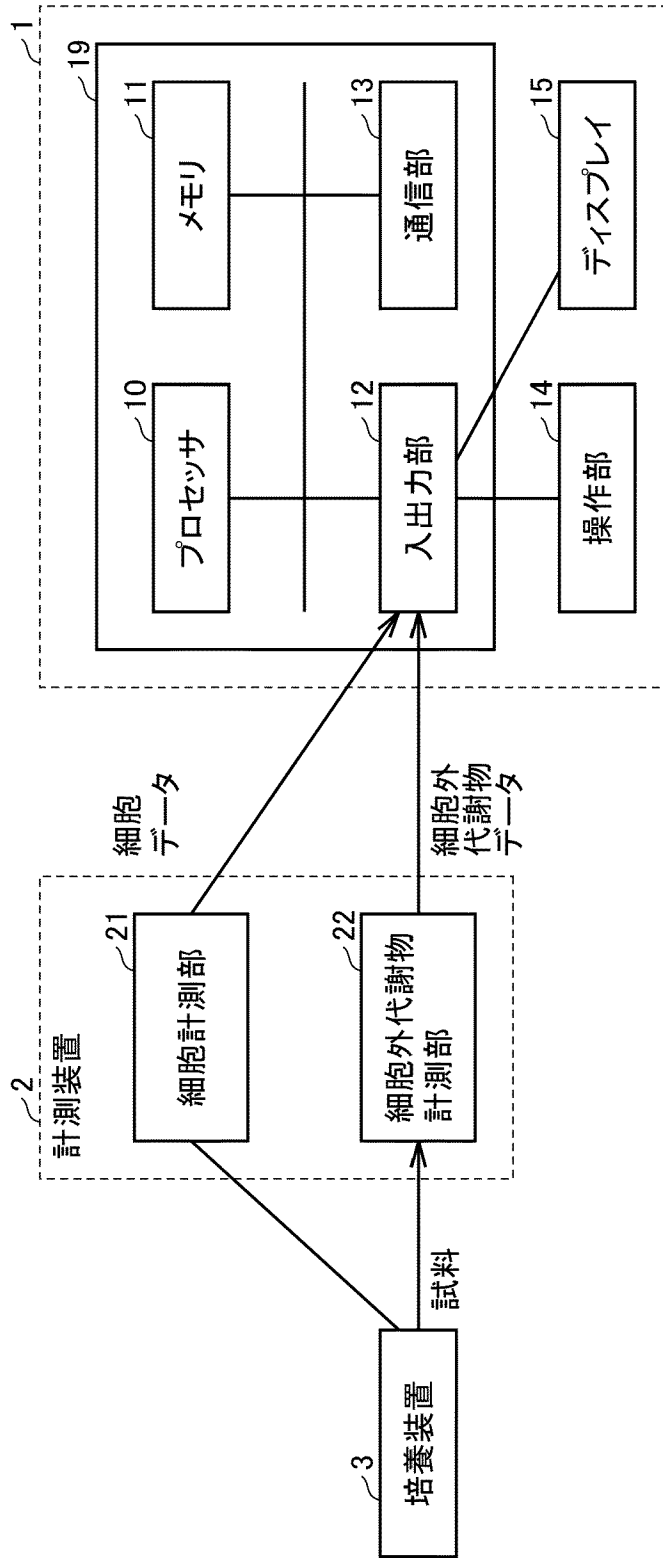
前記複数の一次フラックスパターンの互いの類似度に基づいて、前記複数の一次フラックスパターンをクラスタリングして出力する、解析装置。

[請求項15] コンピュータによって実行されることにより、前記コンピュータに請求項1に記載の代謝フラックス分布の推定方法を実施させる、プログラム。

FIG.1

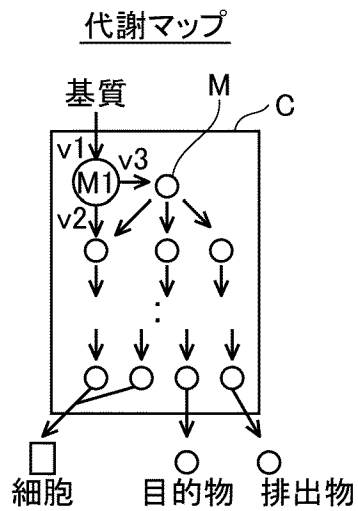
[図1]

100



[図2]

FIG.2

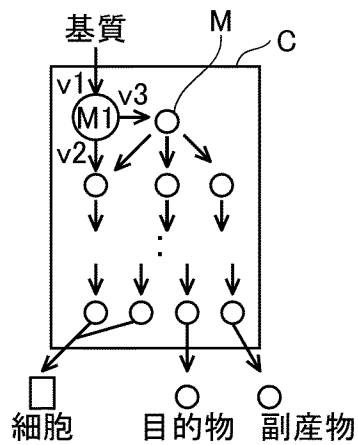


[図3]

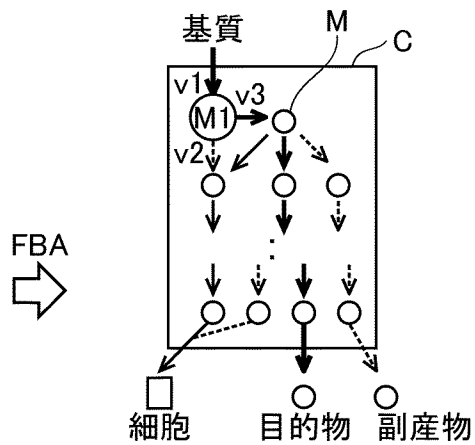
FIG.3

FBA

(A)



(B)



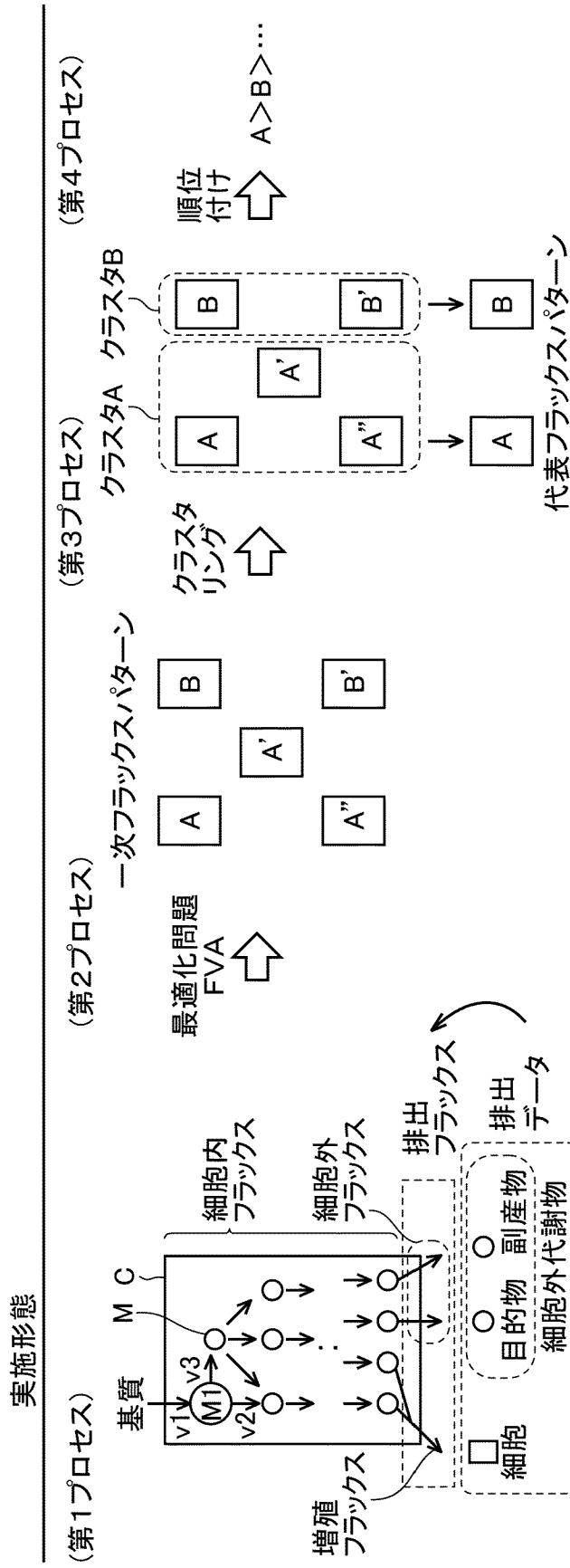
物質収支式が0

$$\frac{d[M1]}{dt} = v1 - v2 - v3 = 0$$

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & \dots \\ 0 & 1 & 0 & \dots \\ 0 & 0 & 1 & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v1 \\ v2 \\ v3 \\ \vdots \end{pmatrix} = 0$$

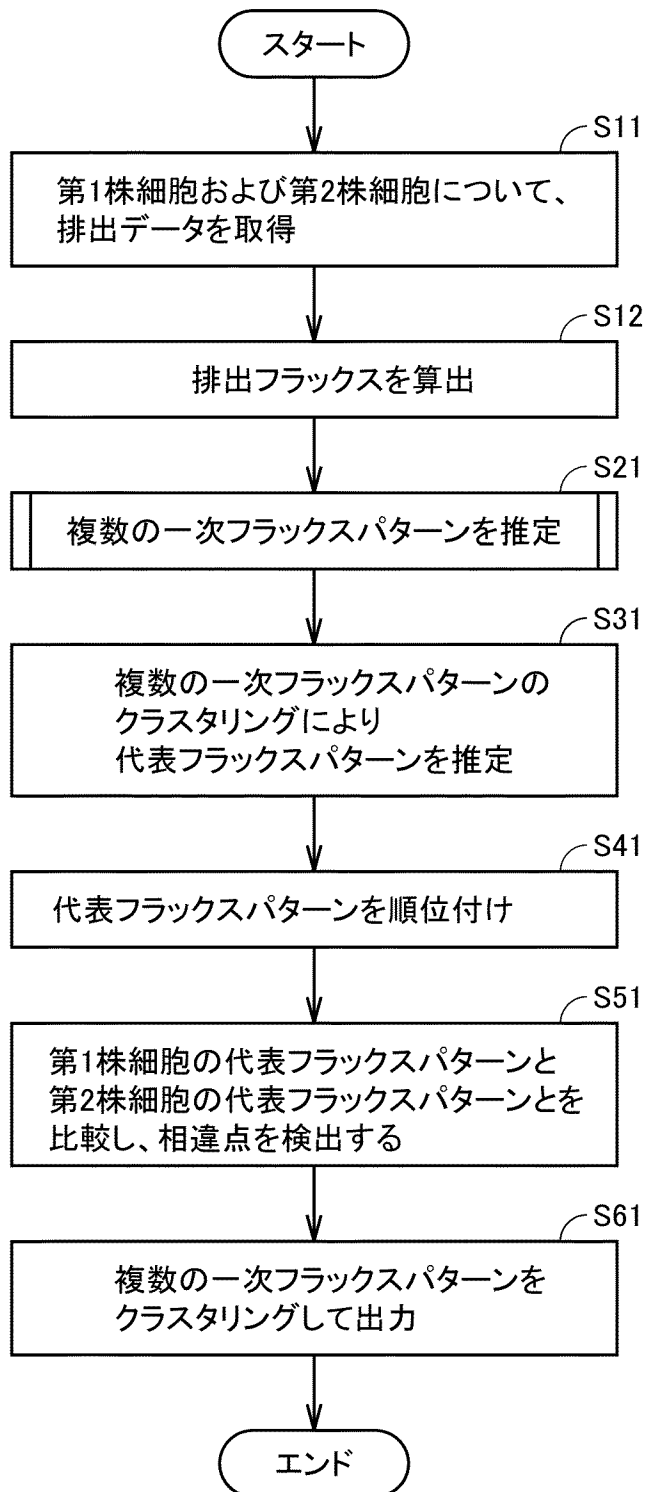
[図4]

FIG.4



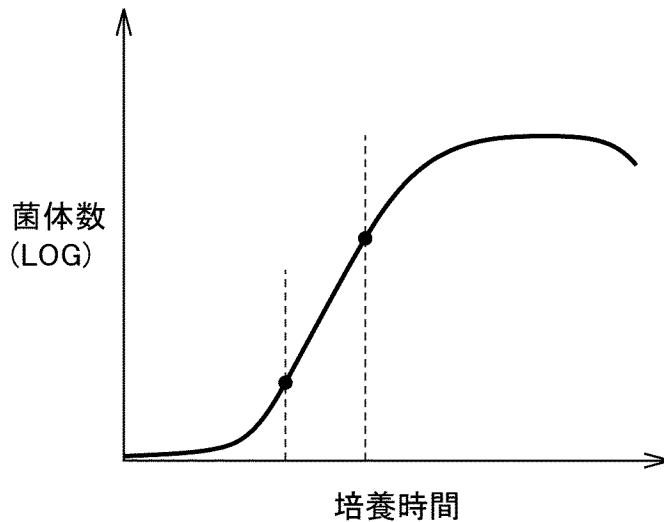
[図5]

FIG.5



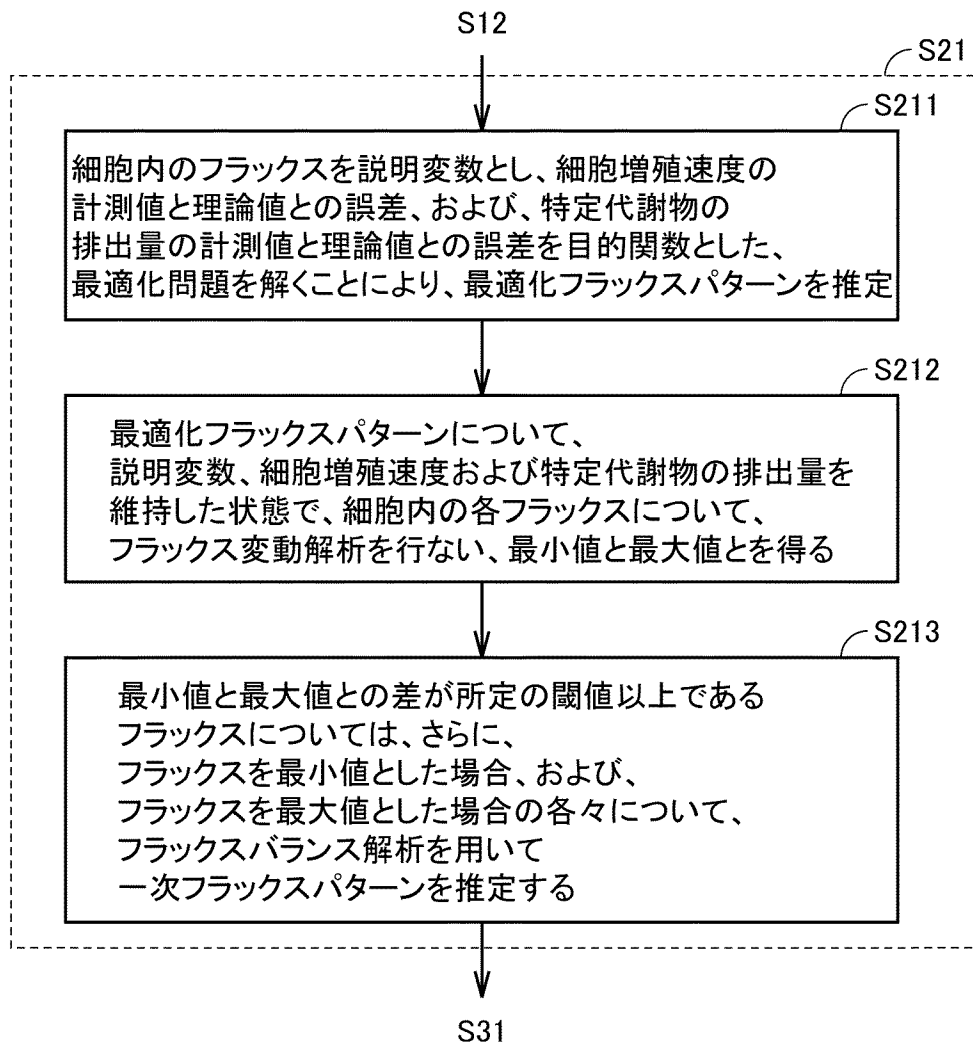
[図6]

FIG.6



[図7]

FIG.7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/030109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G16B 5/00**(2019.01)i; **C12M 1/00**(2006.01)i; **C12M 1/34**(2006.01)i; **C12M 3/00**(2006.01)i; **C12Q 1/02**(2006.01)i

FI: G16B5/00; C12M1/00 C; C12M1/34 D; C12M3/00 Z; 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)

G16B5/00; C12M1/00; C12M1/34; C12M3/00; 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 1971-2023
 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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2021-508872 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 11 March 2021 (2021-03-11) paragraphs [0010]-[0345]	1-3, 6-9, 11, 13-15
A	entire text, all drawings	4, 5, 10, 12
Y	バイオものづくりプロジェクト技術集, [online], 20 October 2022, p. 15, [retrieval date 22 September 2023], Internet:<URL:https://web.archive.org/web/20221020083707/https://www.jba.or.jp/b-production/asset/pdf/JBA_pamphlet.pdf> p. 15, non-official translation (Bio-Manufacturing Project Technology Collection)	1-3, 6-9, 11, 13-15
A	p. 15	4, 5, 10, 12
A	JP 2019-103447 A (HITACHI LTD) 27 June 2019 (2019-06-27) entire text, all drawings	1-15
A	WO 2020/142035 A1 (ISTANBUL SEHIR UNIVERSITY) 09 July 2020 (2020-07-09) entire text, all drawings	1-15
A	US 2013/0095566 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH) 18 April 2013 (2013-04-18) entire text, all drawings	1-15

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

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2023

Date of mailing of the international search report

10 October 2023

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/JP2023/030109

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0185226 A1 (FAMILI, Imandohkt) 19 July 2012 (2012-07-19) entire text, all drawings	1-15
A	CN 102629304 A (TIANJIN UNIVERSITY) 08 August 2012 (2012-08-08) entire text, all drawings	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/030109

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2021-508872	A	11 March 2021	US 2020/0377844 A1 paragraphs [0008]-[0420] WO 2019/129891 A1 EP 3732485 A1 CN 112119306 A	
JP	2019-103447	A	27 June 2019	US 2021/0189452 A1 WO 2019/116772 A1	
WO	2020/142035	A1	09 July 2020	(Family: none)	
US	2013/0095566	A1	18 April 2013	US 9037445 B2 US 2009/0061445 A1	
US	2012/0185226	A1	19 July 2012	US 2016/0364520 A1 WO 2010/098865 A1 EP 2401696 A1	
CN	102629304	A	08 August 2012	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G16B 5/00(2019.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i FI: G16B5/00; C12M1/00 C; C12M1/34 D; C12M3/00 Z; 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）） G16B5/00; C12M1/00; C12M1/34; C12M3/00; 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 1971-2023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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); PubMed		
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	JP 2021-508872 A (エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 11.03.2021 (2021-03-11)	1-3, 6-9, 11, 13-15
A	段落[0010]-[0345] 全文, 全図	4, 5, 10, 12
Y	バイオものづくりプロジェクト技術集, [online], 2022.10.20, p.15, [検索日 2023.09.22], インターネット:<URL:https://web.archive.org/web/20221020083707/https://www.jba.or.jp/b-production/asset/pdf/JBA_pamphlet.pdf>	1-3, 6-9, 11, 13-15
A	p.15	4, 5, 10, 12
A	JP 2019-103447 A (株式会社日立製作所) 27.06.2019 (2019-06-27)	1-15
	全文, 全図	
A	WO 2020/142035 A1 (ISTANBUL SEHIR UNIVERSITY) 09.07.2020 (2020-07-09)	1-15
	全文, 全図	
☒ 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 29.09.2023		国際調査報告の発送日 10.10.2023
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） 松野 広一 5R 3658 電話番号 03-3581-1101 内線 3502

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
A	US 2013/0095566 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH) 18.04.2013 (2013 - 04 - 18) 全文, 全図	1-15
A	US 2012/0185226 A1 (Imandohkt, FAMILI) 19.07.2012 (2012 - 07 - 19) 全文, 全図	1-15
A	CN 102629304 A (TIANJIN UNIVERSITY) 08.08.2012 (2012 - 08 - 08) 全文, 全図	1-15

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/JP2023/030109

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2021-508872	A	11.03.2021	US	2020/0377844	A1	
				段落[0008]-[0420]			
				WO	2019/129891	A1	
				EP	3732485	A1	
				CN	112119306	A	
JP	2019-103447	A	27.06.2019	US	2021/0189452	A1	
				WO	2019/116772	A1	
WO	2020/142035	A1	09.07.2020	(ファミリーなし)			
US	2013/0095566	A1	18.04.2013	US	9037445	B2	
				US	2009/0061445	A1	
US	2012/0185226	A1	19.07.2012	US	2016/0364520	A1	
				WO	2010/098865	A1	
				EP	2401696	A1	
CN	102629304	A	08.08.2012	(ファミリーなし)			