

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成27年3月26日(2015.3.26)

【公表番号】特表2014-504651(P2014-504651A)

【公表日】平成26年2月24日(2014.2.24)

【年通号数】公開・登録公報2014-010

【出願番号】特願2013-552721(P2013-552721)

【国際特許分類】

A 6 1 K	36/18	(2006.01)
A 6 1 K	36/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/352	(2006.01)
A 6 1 K	31/7048	(2006.01)
A 6 1 P	1/12	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)

【F I】

A 6 1 K	35/78	C
A 6 1 K	35/78	Y
A 6 1 K	35/78	X
A 6 1 K	31/352	
A 6 1 K	31/7048	
A 6 1 P	1/12	
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	17/00	

【手続補正書】

【提出日】平成27年2月2日(2015.2.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞培養物であって、

細胞懸濁培養液に入っている柔らかいセイヨウスノキ細胞を含み、前記細胞が：

実生の胚軸、子葉、葉部、茎部、若しくは根部；又は、

ベリー、ベリー部、節部若しくは節間部を含む茎部、または、葉、葉部、若しくは成葉部；のうちの1つ以上に由来し、

前記セイヨウスノキ細胞は、増殖7日目の液中細胞容積を少なくとも55%にし得るよう選択され、かつ

前記セイヨウスノキ細胞の乾燥重量の少なくとも5%はプロシアニジンを含む、細胞培養物。

**【請求項 2】**

前記セイヨウスノキ細胞の乾燥重量の少なくとも 10%、15%、又は 20% はポリフェノールを含む、請求項 1 に記載の細胞培養物。

**【請求項 3】**

前記セイヨウスノキ細胞の乾燥重量の少なくとも 7.5%、10%、または 15% はプロシアニジンを含む、請求項 1 に記載の細胞培養物。

**【請求項 4】**

前記セイヨウスノキ細胞の乾燥重量の 0.5%、0.1%、0.01%、または 0.001% 未満はアントシアニンを含む、請求項 1 に記載の細胞培養物。

**【請求項 5】**

前記細胞懸濁培養液に含まれる細胞が、セイヨウスノキの細胞カルスに由来するものである、請求項 1 に記載の細胞培養物。

**【請求項 6】**

前記細胞懸濁培養液が、細胞の粒状懸濁液または微細な細胞の懸濁液を含む、請求項 1 に記載の細胞培養物。

**【請求項 7】**

セイヨウスノキ細胞の細胞培養物を調製する方法であって、前記方法が：  
実生の胚軸、子葉、葉部、茎部、若しくは根部；又は、  
ベリー、ベリー部、節部若しくは節間部を含む茎部、または、葉、葉部、若しくは成葉部；のうちの 1 つ以上に由来する、セイヨウスノキ細胞のカルス細胞を調製する工程と、  
カルスに由来する 1 個以上の細胞を液体培地に導入する工程と、  
前記液体培地中で前記 1 個以上の細胞を搅拌する工程と、  
前記液体培地を新鮮な液体培地に置き換え、あるいは前記細胞を新鮮な液体培地に移して、セイヨウスノキ細胞懸濁培養を樹立する工程と、  
液中細胞容積が少なくとも 55% になるまで前記セイヨウスノキの細胞懸濁培養物を増殖させる工程と、

前記セイヨウスノキ細胞の乾燥重量のうち、少なくとも 10%、15%、又は 20% はポリフェノールを含み、かつ前記細胞の乾燥重量の少なくとも 5% はプロシアニジンを含む、細胞懸濁培養物を選別する工程と、を含む、調製法。

**【請求項 8】**

前記セイヨウスノキの細胞懸濁培養物を、7 日以内で液中細胞容積が少なくとも 55% または 60% になるまで増殖させる工程を更に含む、請求項 7 に記載の調製法。

**【請求項 9】**

前記セイヨウスノキ細胞の乾燥重量のうち、約 10% はプロシアニジンを含む、請求項 7 に記載の調製法。

**【請求項 10】**

前記セイヨウスノキ細胞が、約 0.5%、0.1%、0.01%、または 0.001% 未満のアントシアニンを含有する、若しくはアントシアニンを実質的に含有しない請求項 7 に記載の調製法。

**【請求項 11】**

前記増殖させる工程を、暗条件下、室温条件下、および / または 23 + / - 5 で実施する、請求項 7 に記載の調製法。

**【請求項 12】**

前記新鮮な液体培地を、1 週間毎に添加するか、又は前記細胞を、1 週間毎に前記新鮮な液体培地に移す、請求項 7 に記載の調製法。

**【請求項 13】**

前記懸濁培養時に、前記細胞の糖消費速度を測定する工程を更に含む、請求項 7 に記載の調製法。

**【請求項 14】**

前記糖消費速度が、屈折率 (R I) をもとに測定され、および、

前記 R I が、前記新鮮な培地の初期 R I の半分以下である場合に、懸濁培養液に含まれる前記細胞に追加で新鮮な培地を与え、および／または、

継代培養後 6 日目に R I 及び細胞重量を測定し、液体培地を交換する、

請求項 13 に記載の調製法。

【請求項 15】

細胞懸濁培養時のセイヨウスノキ細胞の増殖性を増大させる方法であって、前記方法が

セイヨウスノキ細胞の懸濁培養細胞を調製する工程と、

液体培地を用い、前記細胞を懸濁培養法により培養する工程と、

液中細胞容積 ( P C V ) および、前記液体培地中の糖濃度の増大に応じて、蓄積量が増大するポリフェノール及び／又はプロシアニジンが 45 % 以上の細胞懸濁培養物を選別する工程と、

を含む方法。

【請求項 16】

前記液体培地の糖濃度には、スクロースで約 30 ~ 60 g / L が含まれ、および／または、

懸濁培養時に、前記細胞におけるプロシアニジン蓄積量が、20 g / L スクロース下での 1 ~ 2 g / L P C V から、30 g / L スクロース下での 3 ~ 7 g / L P C V へと増大し、および、

懸濁培養時に、前記細胞におけるポリフェノール蓄積量が、20 g / L スクロース下での 2 ~ 4 g / L P C V から、60 g / L スクロース下での 5 ~ 10 g / L P C V へと増大する、

請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記培養が約 7 日間にわたり、P C V が 45 % に到達するのに 8 日以上かかった細胞懸濁培養物を廃棄する工程を更に含む請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記細胞の提供が、初期細胞密度 15 % P C V ~ 25 % P C V 、または 25 % P C V 以上、または 20 % P C V 以上から開始される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

50 % 超の P C V 、55 % 超の P C V 、または 55 % 超の P C V の細胞懸濁培養物を選別する工程を更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

P C V が 45 % に到達するのに 8 日以上かかった細胞懸濁培養物を廃棄する工程を更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

本開示は、液体培地において懸濁培養により生育させるよう構成された、セイヨウスノキの細胞培養に関する。細胞は、セイヨウスノキの 1 箇所以上の部位、例えば、植物の可食部（例えば、葉部又はベリー部）又は茎部などに由来するものである。細胞は、比較的短期間（例えば、約 7 日）に増殖して高密度になるよう構成されている。更に、細胞は、高濃度のポリフェノール及び／又はプロシアニジンを産生し、かつ本質的にアントシアニンは産生しないよう構成されている。懸濁培養でセイヨウスノキ細胞を増殖させて、ポリフェノール及びプロシアニジンを産生させる方法も開示する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

一実施形態では、細胞培養法を開示する。細胞の懸濁培養には、柔らかいセイヨウスノキ細胞を含む。懸濁培養に用いる細胞は：実生の胚軸、子葉、葉部、茎部、又は根部；あるいはベリー、節部若しくは節間部を含む茎部、又は成葉部；のうちの1つ以上に由来する。一実施形態では、細胞は、植物の可食部、例えば、葉部又はベリーに由来し得る。細胞は、増殖7日目の液中細胞容積が少なくとも55%になるよう選別され、この場合、セイヨウスノキ細胞の乾燥重量のうち少なくとも10%はポリフェノールを含み、セイヨウスノキ細胞の乾燥重量の少なくとも5%はプロシアニジンを含む。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

好みしくは、セイヨウスノキ細胞は、乾燥重量で少なくとも12.5%、15%、又は20%以上はポリフェノールを含む。好みしくは、セイヨウスノキ細胞は、乾燥重量で少なくとも7.5%、10%、15%、20%以上はプロシアニジンを含む。細胞重量には本質的にアントシアニンが含まれないことも好みしい。例えば、セイヨウスノキ細胞の細胞集団に含有されるアントシアニン量は、乾燥重量で0.5%、0.1%、0.01%、0.001%未満であることが好みしい。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

他の実施形態では、セイヨウスノキ細胞の細胞培養物の產生方法を記載する。この方法は、(1)実生の胚軸、子葉、葉部、茎部、又は根部、あるいはベリー、節部又は節間部を含む茎部、又は成葉部のうちの1つ以上から、セイヨウスノキ細胞のカルス細胞を誘導し、產生する工程、(2)カルスに由来する1個以上の細胞を液体培地に導入する工程、(3)液体培地中で1個以上の細胞を攪拌する工程、(4)液体培地を新鮮な液体培地に置き換え、あるいは細胞を新鮮な液体培地に移して、セイヨウスノキの細胞懸濁培養を樹立する工程、(5)液中細胞容積が少なくとも55%になるまでセイヨウスノキの細胞懸濁培養物を増殖させる工程、並びに(6)セイヨウスノキ細胞の懸濁培養物のうち、乾燥重量の少なくとも10%はポリフェノールを含み、及び／又は少なくとも5%はプロシアニジンを含む培養物を選別する工程、を包含する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

更に他の実施形態では、培養時の、セイヨウスノキ細胞からのポリフェノール產生量を増大させる方法を記載する。方法は、(1)懸濁培養法で増殖させるのに適したセイヨウスノキ細胞を選別する工程、及び(2)ポリフェノール產生量を増大させるのに十分な量の糖の存在下で、細胞懸濁培養法により細胞を培養する工程、を包含する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

更に他の実施形態では、培養時の、セイヨウスノキ細胞からポリフェノールを抽出する方法を記載する。この方法は、(1)懸濁培養法で増殖させるのに適したセイヨウスノキ細胞を選別する工程、及び(2)溶媒を用い、細胞からポリフェノールを抽出する工程、を含み、ここで、乾燥重量でセイヨウスノキ細胞の少なくとも10%はポリフェノールを含み、かつ少なくとも5%はプロシアニジンを含む。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本開示は、液体培地において懸濁培養により生育させるよう構成された、セイヨウスノキの細胞培養に関する。細胞は、セイヨウスノキの1種以上の部位、例えば、植物の可食部（例えば、葉部又はベリー部）又は茎部などに由来するものである。細胞は、比較的短期間（例えば、約7日）のうちに増殖して高密度になるよう構成されている。更に、細胞は、高濃度のポリフェノール及び／又はプロシアニジンを産生し、かつ本質的にアントシアニンは産生しないよう構成されている。本開示の主題は、以降の実施例を用いることと、更に具体的に及び詳細に記載し、説明され得る。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

(実施例3) N C G R から回収されたセイヨウスノキ組織からのカルス誘導

本実施例は、屋外栽培したセイヨウスノキに由来する様々な外植片（ベリー、節部、節間部、又は葉部由来）からカルス生成を開始し、及び維持するための方法及び培地の配合を記載する。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

培養プレートを暗所にて25℃下で保管した。全体的に、植物片を外植し始めてから、VM1516培地では4週間後、VM1491培地では6週間後にカルスが観察された。葉部外植片に関しては、全体のカルス誘導率は53%であった。葉部外植片からのカルス生成はVM1491培地（初期外植片の73%）及びVM1516培地（初期外植片の76%）で見られ、かつVM1672培地及びTC1596培地ではカルスは観察されなかった。VM1516では、VM1491よりも活発なカルス生成が観察された。節部に関しては、VM1516において外植片のうちの47%がカルスを生成した。節間部を異なる3種の培地、VM1516、VM1491、及びTC1596に配置した。VM1516では、外植片の51%がカルスを生成した一方、VM1491では20%がカルスを生成し、TC1596ではカルスは生成されなかった。ベリー由來の外植片では、VM1516で59%がカルスを生成した。

**【手続補正 1 1】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 0 3 5****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0 0 3 5】**

(実施例 5) N C G R より収集したセイヨウスノキ組織由来のカルスからの懸濁液生成懸濁液を生成するにあたって、柔らかい細胞株を選別した。滅菌三角フラスコを用い、セイヨウスノキカルス(実施例 3 に記載の通りに、節部、節間部、葉部、及びベリー)を液体培地(VM 1933; 表 2)に播種し、細胞懸濁液を生成した。滅菌シリコン(発泡体)キャップでフラスコに蓋をし、施回振盪器において 120 每分回転(rpm)で攪拌した。懸濁液を暗所にて 25 下で保管した。細胞培養を樹立するにあたって、使用した培地は除去し、新鮮な VM 1933 培地を添加した。培地の屈折率(RI)の差分を測定し、糖の消費速度をもとに、細胞の増殖率を測定した。RI が培地の初期 RI 以下であった場合、新鮮な培地を細胞に加えた。RI が 1/2 よりも大きかった場合、新鮮な培地は 1 週間後のみに添加した。

**【手続補正 1 2】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 0 4 1****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0 0 4 1】**

(実施例 8) 実生ビルベリーの各部分に由来する懸濁液におけるポリフェノール及びプロシアニジン産生の検出及び確認

本実施例では、実施例 4 及び 5 に記載の通りに植物の各部位(根部、胚軸、ベリー、子葉、茎部、及び葉部)から調製したすべての懸濁液から、プロシアニジンを製造可能であったことを実証する。図 3 は、各部分についてのクロマトグラムを示す。確認されているカカオプロシアニジンクロマトグラムと重ねあわせたところ(図 4)、示されているクロマトグラムがプロシアニジンのものであること、各オリゴマーの保持時間がカカオにおけるものと同様であること、ビルベリーでも、その他の二量体、三量体、及び四量体の異性体が示されることを更に確認した。280 nm での UV 吸収でも、パターンがカカオと類似していることが示され、かつプロシアニジンの存在が確認された(図 5)。