

(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  
2015年12月30日(30.12.2015)



(10) 国際公開番号  
WO 2015/199119 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 5/071* (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*C12M 3/00* (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/068155
- (22) 国際出願日: 2015年6月24日(24.06.2015)
- (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 2014-130944 2014年6月26日(26.06.2014) JP
- (71) 出願人: 日本ゼオン株式会社(ZEON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008246 東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 市村 直也(ICHIMURA Naoya); 〒1008246 東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 日本ゼオン株式会社内 Tokyo (JP). 平野 孝明(HIRANO Takaaki); 〒1008246 東京都千代田区丸の内一丁目6番2号 日本ゼオン株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 大石 治仁(OHISHI Haruhito); 〒1010047 東京都千代田区内神田2丁目5番3号 児谷ビル1階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR CULTURING ADHESIVE CELLS, CULTURE VESSEL, AND METHOD FOR PRODUCING PROTEIN

(54) 発明の名称: 接着型細胞の培養方法、培養容器およびタンパク質の産生方法

(57) Abstract: The present invention is a method for culturing adhesive cells with which it is possible to grow adhesive cells without killing the cells even if the cells are in a suspended state, a culture vessel obtained by using an alicyclic structure-containing polymer including a liquid medium and living adhesive cells suspended in this liquid medium, and a method for producing a protein. The adhesive cells can be grown in a suspended state in liquid medium by bringing the adhesive cells and an alicyclic structure-containing polymer molded article into contact.

(57) 要約: 本発明は、接着型細胞を浮遊状態にしても、死滅させることなく増殖させることができる接着型細胞の培養方法、液体培地と、当該液体培地中に浮遊して生存している接着型細胞とを含む、脂環構造含有重合体を用いてなる培養容器、および、タンパク質の産生方法である。接着型細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させることにより、当該接着型細胞を液体培地中に浮遊させた状態で増殖させることができる。



WO 2015/199119 A1

## 明 細 書

発明の名称：

接着型細胞の培養方法、培養容器およびタンパク質の産生方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、接着型細胞を浮遊状態にしても、死滅させることなく増殖させることができる接着型細胞の培養方法、液体培地と、当該液体培地中に浮遊して生存している接着型細胞とを含む、脂環構造含有重合体を用いてなる培養容器、および、タンパク質の産生方法に関する。

### 背景技術

[0002] 創薬研究や、万能細胞、幹細胞を対象とした研究において、目的のタンパク質を遺伝子組み換え法により産生させることが行われている。例えば、組み換え医薬品として、ガン治療やリウマチ治療に用いられる抗体や、赤血球を増やすためのホルモンであるエリスロポイエチン（EPO）などのタンパク質を成分とするものが知られている。これらの組み換え医薬品は、予期しない副作用が起きるリスクが従来の化学合成による医薬品よりも少ないと考えられており、非常に注目されている。

しかしながら、組み換え医薬品は、治療のために投与する量が多く、また、生産するための費用が高いことがあり、十分に普及するには至っていない。したがって、生産性を上げることが課題となっている。

[0003] 組み換え医薬品は、例えば、CHO細胞などの接着型細胞に、目的のタンパク質の遺伝子を導入して、無血清培地に馴化させ、浮遊状態で増殖するようになった組み換えCHO細胞内で、目的のタンパク質を生合成させることにより生産される。組み換え医薬品の生産性を上げるためには、細胞の密度が高い状態で細胞を培養することが好ましいと考えられる。

[0004] 目的のタンパク質の生産性を向上させる方法として、マイクロキャリアを利用するものが知られている（非特許文献1）。この方法においては、CHO細胞をマイクロキャリアに接着させ、これを培養液中に分散させる。この

ため、CHO細胞を浮遊状態にせずに、培養液中で攪拌培養することができる。

しかしながら、この方法においてはマイクロキャリアが高価であるという問題や、マイクロキャリアの表面にのみ細胞が存在するため、培養液中における細胞密度を十分に高くすることが困難であるという問題があった。

[0005] また、接着型細胞であるCHO細胞を浮遊させて培養する方法としては、例えば、特許文献1には、目的のタンパク質をコードする遺伝子とジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を有するプラスミドをCHO細胞に遺伝子導入し、得られた組み換えCHO細胞を、通常よりも細胞密度が低い条件で培養を繰り返すことにより、組み換えCHO細胞を浮遊状態で培養する方法が記載されている。

しかしながら、この方法は、CHO細胞を浮遊状態にするまでに培養を繰り返すものであるため、それまでに8週間程度という長い時間が必要になる。また、継代培養期間が長くなると、遺伝子の変異や細胞の変質などの状態を管理し、確認する手間と費用が増加することとなる。

[0006] また、特許文献2には、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子欠損株細胞に、ヒトアンチトロンビン遺伝子とジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を組み込み、浮遊状態とした組み換えCHO細胞を、ホローファイバー型培養装置を用いて培養することで、この細胞を浮遊させながら、ヒトアンチトロンビンを製造する方法が記載されている。

しかしながら、この方法には、ホローファイバーを組み込んだ装置が複雑で高価であるため、費用面での問題があった。また、大量培養のためにホローファイバーサイズを大きくすると、ホローファイバーの両端での培地交換が均等ではなく、培地が不均一になりやすかった。この結果、培地のpH等が変化し、ホローファイバー内の細胞にストレスがかかるため、目的のタンパク質の生産性が低下するおそれがあった。

**先行技術文献**

**特許文献**

[0007] 特許文献1：特開平2-009388号公報

特許文献2：特開2005-073509号公報

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：<http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/0830.html>

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0009] 上記のように、これまでも接着型細胞を高密度の条件で培養する技術がいくつか提案されてきたものの、より効率よく、かつ、より安価に培養し得る方法が要望されているのが現状である。

本発明は、かかる実情に鑑みてなされたものであり、接着型細胞を特殊な操作を要せずに、浮遊状態にしても、死滅させることなく増殖させることができる接着型細胞の培養方法、液体培地と、当該液体培地中に浮遊して生存している接着型細胞とを含む、脂環構造含有重合体を用いてなる培養容器、および、前記接着型細胞の培養方法を利用したタンパク質の産生方法、を提供することを課題とする。

#### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、培養細胞に、脂環構造含有重合体成形体を接触させることで、本来、足場である細胞外基質を必要とする接着型細胞を、液体培地中に浮遊状態で生存かつ増殖させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] かくして本発明によれば、下記(1)～(5)の接着型細胞の培養方法、(6)、(7)の培養容器、及び(8)のタンパク質の産生方法が提供される。

(1) 接着型細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させることにより、当該接着型細胞を液体培地中に浮遊させた状態で増殖させることを特徴とする、接着型細胞の培養方法。

(2) 前記接着型細胞が、外来遺伝子を発現する遺伝子組み換えされたものである(1)に記載の接着型細胞の培養方法。

(3) 前記接着型細胞がCHO細胞である(1)又は(2)に記載の接着型細胞の培養方法。

(4) 前記接着型細胞が、外来遺伝子を発現することのできる細胞である(1)又は(2)に記載の接着型細胞の培養方法。

(5) 前記浮遊状態の接着型細胞が、細胞塊を形成したものである(1)～(4)のいずれかに記載の接着型細胞の培養方法。

(6) 液体培地と、当該液体培地中に浮遊して生存している接着型細胞とを含む、脂環構造含有重合体を用いてなる培養容器。

(7) 前記接着型細胞が細胞塊を形成したものである(6)に記載の培養容器。

(8) 生理活性タンパク質をコードする外来遺伝子を発現することのできる組換え細胞の培養中に、当該細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させることを特徴とする、当該タンパク質の産生方法。

### 発明の効果

[0012] 本発明によれば、接着型細胞を特殊な操作を要せずに、浮遊状態にしても、死滅させることなく増殖させることができる接着型細胞の培養方法、液体培地と、当該液体培地中に浮遊して生存している接着型細胞とを含む、脂環構造含有重合体を用いてなる培養容器、および、前記接着型細胞の培養方法を利用したタンパク質の産生方法、が提供される。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、組換えCHO細胞を培養したときの、経過日数に対する生細胞数を示すグラフである。

[図2]図2は、組換えCHO細胞を17日間培養したときの、培地中のEPOの濃度を示すグラフである。

[図3]図3は、組換えCHO細胞を培養したときの、培地中のEPOの濃度と、細胞内の成分の漏洩を反映したLDH活性測定値の相関を示すグラフであ

る。

### 発明を実施するための形態

[0014] 本発明の方法は、接着型細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させることにより、当該接着型細胞を、液体培地中に浮遊させた状態で増殖させることを特徴とする、接着型細胞の培養方法である。

[0015] 本発明に用いる接着型細胞は、特に限定されず、目的に応じて任意に選択することができる。本発明において、接着型細胞とは接着型細胞そのものであっても、接着型細胞由来の細胞であってもよい。接着型細胞そのものとは、通常の培養条件において、細胞外基質に接着することで生存及び増殖が可能な細胞のことで、足場依存性細胞とも言われる細胞である。接着型細胞由来の細胞とは、接着型細胞を馴化培養し浮遊状態でも生存・増殖可能になった細胞など、接着型細胞に何らかの外的要因を与えることで細胞外基質に接着しなくても生存し、かつ増殖が可能な細胞である。接着型細胞としては、CHO細胞、VERO細胞、NIH3T3細胞、HEK293細胞などに代表される、遺伝子操作の宿主細胞やウイルス感受性のある細胞が挙げられ、なかでもCHO細胞が好ましい。

また、接着型細胞は、外来遺伝子を発現する遺伝子組み換えされたものが好ましい。かかる細胞としては、ファージやプラスミドのベクター等を用いた形質導入などによって、外来遺伝子を発現することのできるものが挙げられる。

ここで外来遺伝子は、目的に応じて任意に選択することができる。具体的には、エリスロポエチン（以下、「EPO」という）、インターフェロン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）、顆粒球コロニー刺激因子G-CSF、インターロイキン、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子GM-CSF、人成長ホルモン、インスリン、グルカゴンHGF、血液凝固第VII因子、ヒト型抗体などのサイトカインやホルモンのような生理活性タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

こうした組換え細胞の培養中に脂環構造含有重合体成形体を接触させると

、生理活性タンパク質の生産量が増大する。

[0016] 本発明において、細胞を培養する際には、液体培地が用いられる。

液体培地としては、通常、pH緩衝作用があり、浸透圧が細胞に好適なものであり、細胞の栄養成分を含み、かつ、細胞に対して毒性がないものが用いられる。

pH緩衝作用を示す成分としては、トリス塩酸塩、各種リン酸塩、各種炭酸塩等が挙げられる。

液体培地の浸透圧調整は、通常、細胞の浸透圧とほぼ同じになるように、カリウムイオン、ナトリウムイオン、カルシウムイオン、グルコース等の濃度を調整した水溶液を用いて行われる。かかる水溶液としては、具体的には、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、HEPES緩衝生理食塩水等の生理食塩水；乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液等のリンゲル液；等が挙げられる。

細胞の栄養成分としては、アミノ酸、核酸、ビタミン類、ミネラル類等が挙げられる。

液体培地としては、RPMI-1640、HAM、 $\alpha$ -MEM、DMEM、EMEM、F-12、F-10、M-199等の各種市販品を利用することができる。

[0017] 液体培地には、添加剤を配合することもできる。添加剤としては、タンパク質等の誘導因子、分化誘導活性を有する低分子化合物、ミネラル、金属、ビタミン成分等が挙げられる。

用いる添加剤としては、細胞表面の受容体に作用する、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト；核内受容体の、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト；コラーゲンやファイブネクチンなどの細胞外マトリックス；細胞外マトリックスの一部あるいは、模擬した化合物；細胞内の情報伝達経路に関わるタンパク質に作用する成分；細胞内の1次代謝または2次代謝の酵素に作用する成分；細胞内の核内またはミトコンドリア内の遺伝子の発現に影響を与える成分；ウィルスベクターなどと組み合わせて細胞内に導入すること

ができるDNAやRNA；等が挙げられる。

これらの添加剤は一種単独で、あるいは二種以上を組み合わせる用いることができる。

[0018] 細胞の培養条件は特に限定されず、用いる細胞や目的に応じて適宜決定することができる。

例えば、二酸化炭素濃度が5%程度で、温度が20℃～37℃の範囲で一定に維持された、加湿された恒温器を用いて細胞を培養することができる。

[0019] 本発明に用いる脂環構造含有重合体成形体は、脂環構造含有重合体を任意の形状に成形してなるものである。

脂環構造含有重合体は、主鎖及び／又は側鎖に脂環構造を有する樹脂であり、機械的強度、耐熱性などの観点から、主鎖に脂環構造を含有するものが好ましい。

[0020] 前記脂環構造としては、飽和環状炭化水素（シクロアルカン）構造、不飽和環状炭化水素（シクロアルケン）構造などが挙げられるが、機械的強度、耐熱性などの観点から、シクロアルカン構造やシクロアルケン構造が好ましく、中でもシクロアルカン構造を有するものが最も好ましい。

[0021] 脂環構造を構成する炭素原子数は、格別な制限はないが、通常4～30個、好ましくは5～20個、より好ましくは5～15個である。脂環構造を構成する炭素原子数がこの範囲内であるときに、機械的強度、耐熱性、及び成形性の特性が高度にバランスされ、好適である。

[0022] 脂環構造含有重合体中の脂環構造を有する繰り返し単位の割合は、使用目的に応じて適宜選択されればよいが、通常30重量%以上、好ましくは50重量%以上、より好ましくは70重量%である。脂環構造含有重合体中の脂環構造を有する繰り返し単位の割合が過度に少ないと耐熱性に劣り好ましくない。脂環構造含有重合体中の脂環構造を有する繰り返し単位以外の残部は、格別な限定はなく、使用目的に応じて適宜選択される。

[0023] 脂環構造含有重合体の具体例としては、（1）ノルボルネン系重合体、（2）単環の環状オレフィン系重合体、（3）環状共役ジエン系重合体、（4

) ビニル脂環式炭化水素系重合体、及び(1)～(4)の水素化物などが挙げられる。これらの中でも、耐熱性、機械的強度等の観点から、ノルボルネン系重合体及びその水素化物が好ましい。

[0024] (1) ノルボルネン系重合体

ノルボルネン系重合体は、ノルボルネン骨格を有する単量体であるノルボルネン系単量体を重合してなるものであり、開環重合によって得られるものと、付加重合によって得られるものに大別される。

[0025] 開環重合によって得られるものとしては、ノルボルネン系単量体の開環重合体及びノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体との開環重合体、ならびにこれらの水素化物などが挙げられる。付加重合によって得られるものとしては、ノルボルネン系単量体の付加重合体及びノルボルネン系単量体とこれと共重合可能なその他の単量体との付加重合体などが挙げられる。これらの中でも、ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物が、耐熱性、機械的強度等の観点から好ましい。

[0026] ノルボルネン系単量体としては、ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン (慣用名ノルボルネン)、5-メチル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5, 5-ジメチル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-エチル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-エチリデン-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-ビニル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-プロペニル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-メトキシカルボニル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-シアノ-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン、5-メチル-5-メトキシカルボニル-ビスクロ [2. 2. 1] ヘプター-2-エン等の2環式単量体；

トリシクロ [4. 3. 0<sup>1,6</sup>. 1<sup>2,5</sup>] デカー-3, 7-ジエン (慣用名ジシクロペンタジエン)、2-メチルジシクロペンタジエン、2, 3-ジメチルジシクロペンタジエン、2, 3-ジヒドロキシジシクロペンタジエン等の3環式単量体；

テトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン (テトラシクロドデセン)、テトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8 - メチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8 - エチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8 - エチリデンテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8, 9 - ジメチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8 - エチル - 9 - メチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8 - エチリデン - 9 - メチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、8 - メチル - 8 - カルボキシメチルテトラシクロ [4. 4. 0. 1<sup>2, 5</sup>. 1<sup>7, 10</sup>] - 3 - ドデセン、7, 8 - ベンゾトリシクロ [4. 3. 0. 1<sup>2, 5</sup>] デカー 3 - エン (慣用名メタノテトラヒドロフルオレン: 1, 4 - メタノ - 1, 4, 4 a, 9 a - テトラヒドロフルオレンともいう)、1, 4 - メタノ - 8 - メチル - 1, 4, 4 a, 9 a - テトラヒドロフルオレン、1, 4 - メタノ - 8 - クロロ - 1, 4, 4 a, 9 a - テトラヒドロフルオレン、1, 4 - メタノ - 8 - ブロモ - 1, 4, 4 a, 9 a - テトラヒドロフルオレン等の 4 環式単量体; 等が挙げられる。

[0027] ノルボルネン系単量体と開環共重合可能なその他の単量体としては、シクロヘキセン、シクロヘプテン、シクロオクテン、1, 4 - シクロヘキサジエン、1, 5 - シクロオクタジエン、1, 5 - シクロデカジエン、1, 5, 9 - シクロドデカトリエン、1, 5, 9, 13 - シクロヘキサデカテトラエン等の単環のシクロオレフィン系単量体が挙げられる。

これらの単量体は、置換基を 1 種又は 2 種以上有していてもよい。置換基としては、アルキル基、アルキレン基、アリール基、シリル基、アルコキシカルボニル基、アルキリデン基等が挙げられる。

[0028] ノルボルネン系単量体と付加共重合可能なその他の単量体としては、エチレン、プロピレン、1 - ブテン、1 - ペンテン、1 - ヘキセン等の炭素数 2 ~ 20 の  $\alpha$  - オレフィン系単量体; シクロブテン、シクロペンテン、シクロ

ヘキセン、シクロオクテン、テトラシクロ [9, 2, 1, 0<sup>2</sup>, 1<sup>0</sup>, 0<sup>3</sup>, 8] テトラデカ-3, 5, 7, 12-テトラエン (3a, 5, 6, 7a-テトラヒドロ-4, 7-メタノ-1H-インデンとも言う) 等のシクロオレフィン系単量体; 1, 4-ヘキサジエン、4-メチル-1, 4-ヘキサジエン、5-メチル-1, 4-ヘキサジエン、1, 7-オクタジエン等の非共役ジエン系単量体; 等が挙げられる。

これらの中でも、ノルボルネン系単量体と付加共重合可能なその他の単量体としては、 $\alpha$ -オレフィン系単量体が好ましく、エチレンがより好ましい。

これらの単量体は、置換基を1種又は2種以上有していてもよい。置換基としては、アルキル基、アルキレン基、アリール基、シリル基、アルコキシカルボニル基、アルキリデン基等が挙げられる。

[0029] ノルボルネン系単量体の開環重合体、又はノルボルネン系単量体とこれと開環共重合可能なその他の単量体との開環重合体は、単量体成分を、公知の開環重合触媒の存在下で重合して得ることができる。開環重合触媒としては、例えば、ルテニウム、オスミウムなどの金属のハロゲン化物と、硝酸塩又はアセチルアセトン化合物、及び還元剤とからなる触媒、あるいは、チタン、ジルコニウム、タングステン、モリブデンなどの金属のハロゲン化物又はアセチルアセトン化合物と、有機アルミニウム化合物とからなる触媒を用いることができる。

ノルボルネン系単量体の開環重合体水素化物は、通常、上記開環重合体の重合溶液に、ニッケル、パラジウムなどの遷移金属を含む公知の水素化触媒を添加し、炭素-炭素不飽和結合を水素化することにより得ることができる。

[0030] ノルボルネン系単量体の付加重合体、又はノルボルネン系単量体とこれと共重合可能なその他の単量体との付加重合体は、単量体成分を、公知の付加重重合触媒の存在下で重合して得ることができる。付加重重合触媒としては、例えば、チタン、ジルコニウム又はバナジウム化合物と有機アルミニウム化合

物とからなる触媒を用いることができる。

[0031] (2) 単環の環状オレフィン系重合体

単環の環状オレフィン系重合体としては、例えば、シクロヘキセン、シクロヘプテン、シクロオクテンなどの、単環の環状オレフィン系単量体の付加重合体を用いることができる。

(3) 環状共役ジエン系重合体

環状共役ジエン系重合体としては、例えば、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエンなどの環状共役ジエン系単量体を 1, 2-又は 1, 4-付加重合した重合体及びその水素化物などを用いることができる。

(4) ビニル脂環式炭化水素重合体

ビニル脂環式炭化水素重合体としては、例えば、ビニルシクロヘキセン、ビニルシクロヘキサンなどのビニル脂環式炭化水素系単量体の重合体及びその水素化物；スチレン、 $\alpha$ -メチルスチレンなどのビニル芳香族系単量体の重合体の芳香環部分の水素化物；などが挙げられる。ビニル脂環式炭化水素重合体は、これらの単量体と共重合可能な他の単量体との共重合体であってもよい。

[0032] 脂環構造含有重合体の分子量に格別な制限はないが、シクロヘキサン溶液（重合体が溶解しない場合はトルエン溶液）のゲル・パーミエーション・クロマトグラフィーで測定したポリスチレン換算の重量平均分子量で、通常 5,000 以上であり、好ましくは 5,000~500,000、より好ましくは 8,000~200,000、特に好ましくは 10,000~100,000 である。重量平均分子量がこの範囲内であるときに、機械的強度と成形加工性が高度にバランスし、好適である。

[0033] 脂環構造含有重合体のガラス転移温度は、使用目的に応じて適宜選択されればよいが、通常 50~300℃、好ましくは 100~280℃、特に好ましくは 115~250℃、更に好ましくは 130~200℃ である。ガラス転移温度がこの範囲内であるときに、耐熱性と成形加工性が高度にバランスし、好適である。

本発明においてガラス転移温度は、J I S K 7 1 2 1に基づいて測定されたものである。

[0034] これらの脂環構造含有重合体は、それぞれ単独で、あるいは2種以上を組み合わせて用いることができる。

また、脂環構造含有重合体には、熱可塑性樹脂材料で通常用いられている配合剤、例えば、軟質重合体、酸化防止剤、紫外線吸収剤、光安定剤、近赤外線吸収剤、離型剤、染料や顔料などの着色剤、可塑剤、帯電防止剤、蛍光増白剤などの配合剤を、通常採用される量、添加することができる。

また、脂環構造含有重合体には、軟質重合体以外のその他の重合体（以下、単に「その他の重合体」という）を混合しても良い。脂環構造含有重合体に混合されるその他の重合体の量は、脂環構造含有重合体100重量部に対して、通常200重量部以下、好ましくは150重量部以下、より好ましくは100重量部以下である。

脂環構造含有重合体に対して配合する各種配合剤やその他の重合体の割合が多すぎると細胞が浮遊し難くなるため、いずれも脂環構造含有重合体の性質を損なわない範囲で配合することが好ましい。

配合剤やその他の重合体との混合方法は、ポリマー中に配合剤が十分に分散する方法であれば、特に限定されない。また、配合の順番に格別な制限はない。配合方法としては、例えば、ミキサー、一軸混練機、二軸混練機、ロール、ブラベンダー、押出機などを用いて樹脂を熔融状態で混練する方法、適当な溶剤に溶解して分散させた後、凝固法、キャスト法、又は直接乾燥法により溶剤を除去する方法などが挙げられる。

二軸混練機を用いる場合、混練後は、通常は熔融状態で棒状に押し出し、ストランドカッターで適当な長さに切り、ペレット化して用いられることが多い。

[0035] 脂環構造含有重合体の成形方法は、細胞と接触させる際に用いる脂環構造含有重合体成形体の形状に応じて任意に選択することができる。成形方法としては、例えば、射出成形法、押出成形法、キャスト成形法、インフレーション

ョン成形法、ブロー成形法、真空成形法、プレス成形法、圧縮成形法、回転成形法、カレンダー成形法、圧延成形法、切削成形法、紡糸等が挙げられ、これらの成形法を組み合わせたたり、成形後必要に応じて延伸等の後処理をすることもできる。

[0036] 脂環構造含有重合体成形体の形状に格別な制限はなく、板状、粉状、粒状、紐状、シート状、その他いかなる形状であってもよい。また、その表面は平らであっても、凹凸形状を有していてもよいし、中空状の成形体であってもよい。また異なる形状の成形体を、接着剤等を介して又は介さずに組み合わせて別の成形体にすることもできる。

また、細胞と接触することができる限りにおいて、ディッシュ、プレート、バッグ、チューブ、スキャホールド、カップ、ジャー・ファーメンターなどの培養容器；攪拌翼、攪拌子、バッフル、連結チューブなど培養装置の部品；ピペット、攪拌素子、フィルタ、セルスクレイパーなどの培養操作に用いる培養器具；等の一部又は全部を構成する部材であってもよい。

[0037] 本発明においては、成形体を、培養細胞と接触させるに当たり、成形体を滅菌処理することが好ましい。

滅菌処理の方法に格別な制限はなく、高圧蒸気法や乾熱法などの加熱法； $\gamma$ 線や電子線などの放射線を照射する放射線法や高周波を照射する照射法；酸化エチレンガス（EOG）などのガスを接触させるガス法；滅菌フィルタを用いる濾過法；など、医療分野で一般的に採用される方法から、成形体の形状や用いる細胞に応じて、選択することができる。なかでも、表面状態の変化が少ないことから、ガス法が好ましい。

また、これらの成形体表面は、プラズマ処理、コロナ放電処理、オゾン処理、紫外線照射処理など培養容器に対して一般的に施す、滅菌目的以外の処理を行うこともできる。ただし、これらの表面処理操作を施すことにより発生する費用を抑えることができることや、表面処理に伴う形成体表面の部分分解により清浄性が損なわれるおそれがあること、細胞の浮遊化能が低下するおそれがあることなどから、これらの表面処理操作を行わない、又は表面

処理前の容器底面（培養液に接する側）の水接触角に対して、使用時の同底面の水接触角が±20%、好ましくは±10%の弱い表面処理しかされていないことが好ましい。ここで、水接触角は、全自動接触角計（協和界面科学社製「LCD-400S」）を用い、ディッシュ底面をΦ30mmのサークルカッターで切り取って試料の中心と、そこを中央とする1辺20mmの正方形の頂点4か所、計5か所を測定点とし、液滴の半径 $r$ と高さ $h$ を求め、 $\tan \theta = h / r$ 、 $\theta = 2 \arctan (h / r)$  で求められる $\theta$ である（ $\theta / 2$ 法）。

[0038] 培養細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させる方法は、脂環構造含有重合体成形体の形状に応じて任意の方法を採用すればよい。例えば、脂環構造含有重合体成形体を混合した培地中で細胞を培養する方法；脂環構造含有重合体を用いて成形された培養容器内で細胞を培養する方法；脂環構造含有重合体を用いて成形された培養器具を用いて培養操作を行う方法；などが挙げられ、これらを組み合わせることもできる。

尚、細胞には、情報伝達能があるため、培養中の全ての培養細胞が脂環構造含有重合体成形体に接触する必要はなく、また、培養期間全体に渡って両者が接触している必要もない。但し、接触による効果は経時的に低下するため、接触時間は長い方が好ましい。

培養細胞と、脂環構造含有重合体成形体との接触温度は細胞が増殖できる温度であれば特に制限されない。

[0039] 本発明の方法により長期間培養され浮遊状態で生存している細胞は、通常、細胞塊を形成している。「細胞塊」とは、単独での細胞以外の細胞集合であり、2個以上の細胞が1つにまとまった状態をいう。

本発明において細胞が「生存している」とは、細胞内で代謝活動を行い、細胞増殖が可能な状態をいう。例えば、細胞外の培地中に含まれる成分が細胞内部に侵入・浸透してきた場合に、その成分が細胞の生命活動に不要であれば、細胞外部に排除できる生命活動を起こすことができる状態をいう。細胞が生存しているかどうかは、実験的には、トリパンブルーなどの生命活動

に不要な色素を細胞外の液に添加し、細胞内に侵入・浸透した色素を細胞外に排除できる状態の細胞が生存している細胞、排除できない細胞は死滅細胞として判定することができる。

本発明の方法においては、細胞塊中の細胞も死滅はせず、細胞が形質導入された細胞であれば、増殖し、かつタンパク質を産生する能力を有している。

このように、本発明の方法においては、接着型細胞であっても、浮遊状態で培養することが可能であるため、高い密度で培養することができる。

「高い密度」とは、ポリスチレン製ディッシュで培養した接着細胞のコンフルエントの細胞数の1.5倍以上、望ましくは、2倍以上のことをいう。

[0040] 上記のように、本発明の培養方法は、接着型細胞であっても、浮遊状態で、高い密度で培養することができるため、当該細胞にタンパク質を産生させる際に、好ましく利用される。

例えば、生理活性タンパク質をコードする外来遺伝子を発現することのできる組換え細胞の培養中に、当該細胞と脂環式構造含有重合体成形体とを接触させることにより、タンパク質を大量に産生させることができる。

## 実施例

[0041] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

### 〔製造例1〕 組み換えEPO産生CHO細胞の作製

抗生物質G418への耐性遺伝子を内包するベクターpLXRN (Clontech社製)の発現遺伝子の挿入サイトに、EPO遺伝子配列を挿入してプラスミドpLXRN-EPOを構築した。構築したプラスミドの中のEPO遺伝子は、その塩基配列解析を行うことにより確認した。

次に、構築したプラスミドpLXRN-EPOとプラスミドpVSV-G (Clontech社製)を、パッケージ細胞であるGP293T細胞 (Clontech社製)に形質導入することにより、EPO遺伝子を含有するウイルス粒子を調製した。

なお、細胞へのプラスミド pLXRN-EPO の導入操作のための遺伝子導入試薬として、Lipofectamine (invitrogen 社製) を用い、遺伝子導入操作は、メーカーのマニュアルに従った。

[0042] 遺伝子導入操作を行った GP293T 細胞を培養し、その培養上清を取り出して、フィルタ濾過し、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$  のポリブレン (santacruz 社製) を加えることにより、EPO 遺伝子を保持したウイルス粒子を含む培養上清試料を調製した。

続いて、あらかじめ培養した CHO 細胞試料の培養液を除いて、上記の EPO 遺伝子を保持したウイルス粒子を含む培養上清試料を添加して、8 時間培養維持することにより、EPO 遺伝子を保持したウイルス粒子を CHO 細胞に感染させた。

8 時間のインキュベーションの後に、CHO 細胞の培養培地に交換を行い、組み換え EPO を産生する CHO 細胞の培養操作を行った。

[0043] ウイルスの感染は、以下のようにゲノム PCR により確認した。まず、Instagene (BioRad 社製) を用いて、感染操作を行った CHO 細胞からゲノムを抽出し、pLXRN-EPO 配列がゲノムに導入されていることを PCR で確認した。PCR に用いた Primer は、pLXRN-seq-F (5' -CGCCTCCGTCTGAATTTTT) 及び pLXRN-seq-R (TCCCTATGCAAAAGCGAAAC) とした。

ウイルスが感染し、ゲノムに EPO 遺伝子が組み込まれた CHO 細胞を選抜するため、抗生物質 G418 を培地に添加し、培養維持して、抗生物質 G418 耐性の CHO 細胞を薬剤選択することにより、組み換え EPO 産生 CHO 細胞 (以下、EPO 産生 CHO 細胞という。) を選抜した。

[0044] [実施例 1]

脂環構造含有重合体として、ゼオネックス (登録商標) 790R (日本ゼオン社製、ノルボルネン系開環重合体水素化物; 以下、単に「790R」という) を用いて、射出成形法により、直径 3cm のディッシュを作製した。以下、このディッシュを「790R 製ディッシュ」という。

培養容器として790R製ディッシュを使用し、液体培地として10%牛胎児血清を含むHam培地を使用して、EPO産生CHO細胞を $1.25 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ で播種して、5%CO<sub>2</sub>雰囲気37℃の条件で17日間培養を行った。培養途中11日時点で、水の蒸散により培地液量が減少したので、培地液量を保持するために、減少した液量と同量の培地を添加した。

培養から2日目、7日目、10日目、14日目及び17日目に、以下の方法により生細胞数を計測した。

(細胞数の計測)

浮遊状態にある細胞については、培養上清を取り出して遠心処理により沈殿回収した細胞をトリパンブルー染色して生細胞と死滅細胞を区別して、生細胞数を計測した。

一方、ディッシュ底面に接着している細胞は、生理食塩水で洗浄後、トリプシン処理によりディッシュから細胞を剥離した後、これらをトリパンブルー染色して生細胞と死細胞を区別して、生細胞数を計測した。

[0045] [比較例1]

実施例1において、790R製ディッシュに代えて、ポリスチレン製ディッシュ〔ファルコン(登録商標)ディッシュ(ベクトンデッキンソン社製、型番353001)〕(以下、「ポリスチレン製ディッシュ」と称する)を使用したことを除き、実施例1と同様にして培養を行い、生細胞数を計測した。

[0046] 培養7日目では、790R製ディッシュのEPO産生CHO細胞は、塊状となって、非接触型の状態で増殖していることが観察された。一方、ポリスチレン製ディッシュでは、生きているEPO産生CHO細胞の多くは底面に接着した状態のものであり、培地中に浮遊している細胞は、1個の細胞単独で存在し、かつ、ほとんどが、死滅状態にあった。

図1に示すように、790R製ディッシュを用いた培養における生細胞数は、ポリスチレン製ディッシュを用いた培養のものに比較して、培養7日目

で、約5倍の値である。

また、培養10日目では、790R製ディッシュとポリスチレン製ディッシュともに、生細胞数が減少したが、11日目での培地追加により、790R製ディッシュでの生細胞は、再び増加している。このように、790R製ディッシュは、培地追加などの操作により、容易に、生細胞数を再増加させるものである。

一方、ポリスチレン製ディッシュでは、培地追加によっても、生細胞数の増加はほとんど観察されなかった。

[0047] [実施例2]

培養容器として790R製ディッシュを使用し、EPO産生CHO細胞を3回、繰り返し培養した。培養17日目における培地を用いて、ELISA法(eBioscience社製のhuman EPO Platinum ELISA)により、活性型EPO量の測定を行った。

[0048] [比較例2]

実施例2において、790R製ディッシュに代えて、ポリスチレン製ディッシュを使用したことを除き、実施例2と同様にして培養を行い、活性型EPO量の測定を行った。

[0049] 図2に示されるように、790R製ディッシュで培養したEPO産生CHO細胞から産生されたEPO量は、既存の培養技術に相当するポリスチレン製ディッシュで培養したものに比較して約5倍であり、本発明によれば、従来技術では得られない高濃度のEPOを生産し得ることが示された。

[0050] [実施例3]

培養容器として790R製ディッシュを使用し、EPO産生CHO細胞を培養した。次いで、その培養培地を用いて、細胞内の代謝酵素である乳酸デヒドロゲナーゼ(以下、「LDH」という)の活性を測定し、EPO産生CHO細胞の死滅による細胞内の成分の漏洩の程度を調べた。なお、LDH測定は、LDH Cytotoxicity Detection Kit(Takara社製)を用いた。

## [0051] [比較例3]

実施例3において、790R製ディッシュに代えて、ポリスチレン製ディッシュを使用したことを除き、実施例3と同様にして培養を行い、LDH測定を行った。

[0052] 図3のグラフにおいて、横軸は培地中のEPO濃度を表し、縦軸はLDH活性値を表す。790R製ディッシュで培養した際の培地についての測定値を丸で、ポリスチレン製ディッシュで培養した際の培地についての測定値を三角で示す。

どちらのディッシュを用いた場合も、EPO濃度が高くなるにつれて、細胞の漏洩成分量が増加するが、ポリスチレン製ディッシュでの培養に比較して、790R製ディッシュでの培養では、細胞の漏洩成分量がより少ないことが分かる。

### 産業上の利用可能性

[0053] 本発明の方法によれば、細胞を用いて、組み換えタンパク質を生産する場合において、より高密度な条件で細胞を培養することができ、目的のタンパク質が高濃度で得られる。このため、細胞培養における操作回数をより少なくしたり、培養規模をより小さくしたりすることができ、人件費や、装置、培地等に要する費用を抑えることができる。

また、目的のタンパク質が高濃度で得られるため、変性しやすいタンパク質を濃縮する手間が軽減されるとともに、そのようなタンパク質が変性するリスクを軽減できる。

さらに、細胞内からの漏洩物が少ないことから、タンパク質を精製する場合において、精製コストが軽減され、経済的に有利であることに加え、より高純度のタンパク質の精製が期待されるので、発熱などの副作用を引き起こす可能性のある成分の混入のリスクが軽減される。

医薬品開発研究などのバイオテクノロジー研究においては、少量のスケールで、より高濃度で高純度の組み換えタンパク質を得ることが期待されるので、本発明の方法は、生理活性評価の実験などの円滑な進捗に貢献し得る。

その結果、医薬品などの開発コストが抑制されるとともに、製造コストも低減できる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 接着型細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させることにより、当該接着型細胞を液体培地中に浮遊させた状態で増殖させることを特徴とする、接着型細胞の培養方法。
- [請求項2] 前記接着型細胞が、外来遺伝子を発現する遺伝子組み換えされたものである請求項1に記載の接着型細胞の培養方法。
- [請求項3] 前記接着型細胞がCHO細胞である請求項1又は2に記載の接着型細胞の培養方法。
- [請求項4] 前記接着型細胞が、外来遺伝子を発現することのできる細胞である請求項1又は2に記載の接着型細胞の培養方法。
- [請求項5] 前記浮遊状態の接着型細胞が、細胞塊を形成したものである請求項1～4のいずれかに記載の接着型細胞の培養方法。
- [請求項6] 液体培地と、当該液体培地中に浮遊して生存している接着型細胞とを含む、脂環構造含有重合体を用いてなる培養容器。
- [請求項7] 前記接着型細胞が細胞塊を形成したものである請求項5に記載の培養容器。
- [請求項8] 生理活性タンパク質をコードする外来遺伝子を発現することのできる組換え細胞の培養中に、当該細胞と脂環構造含有重合体成形体とを接触させることを特徴とする、当該タンパク質の産生方法。

[図1]

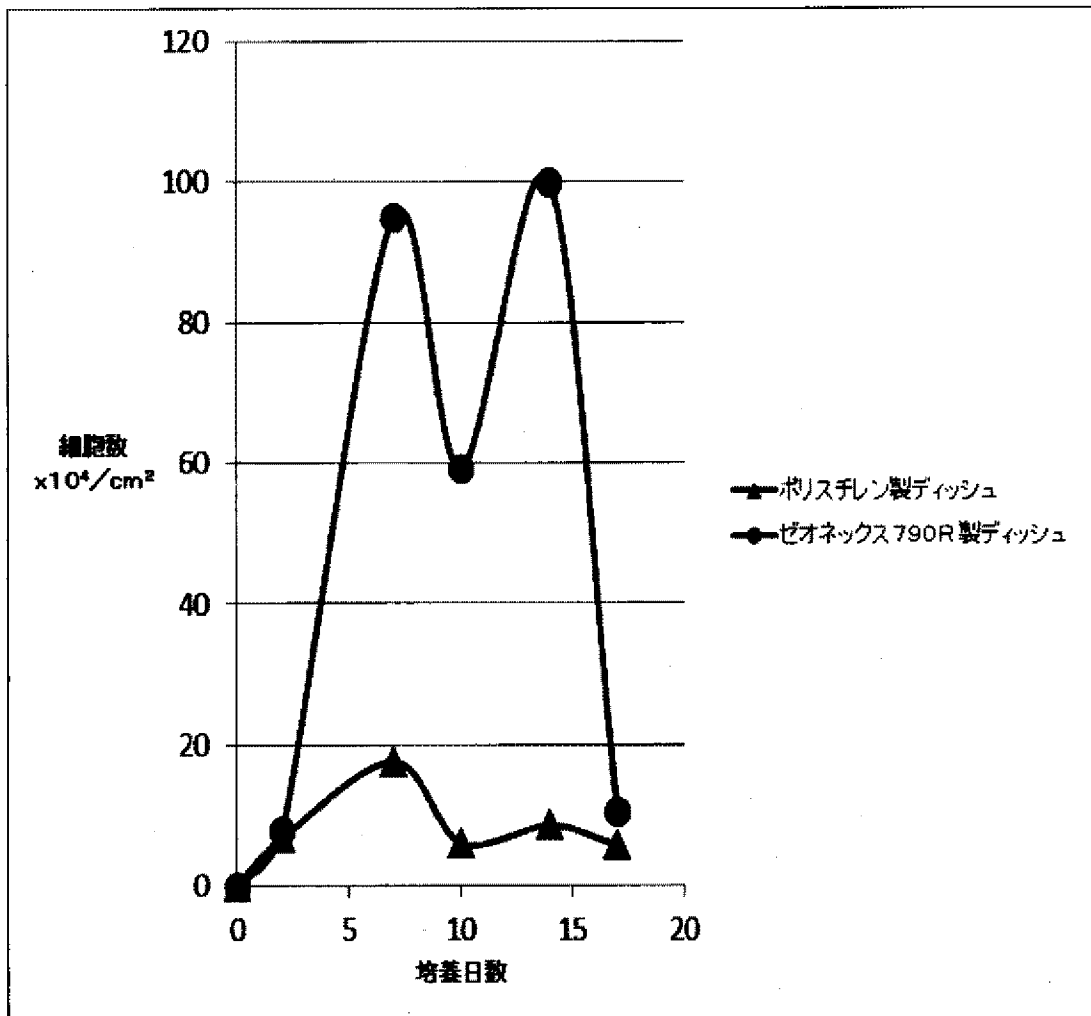


図 1

[図2]

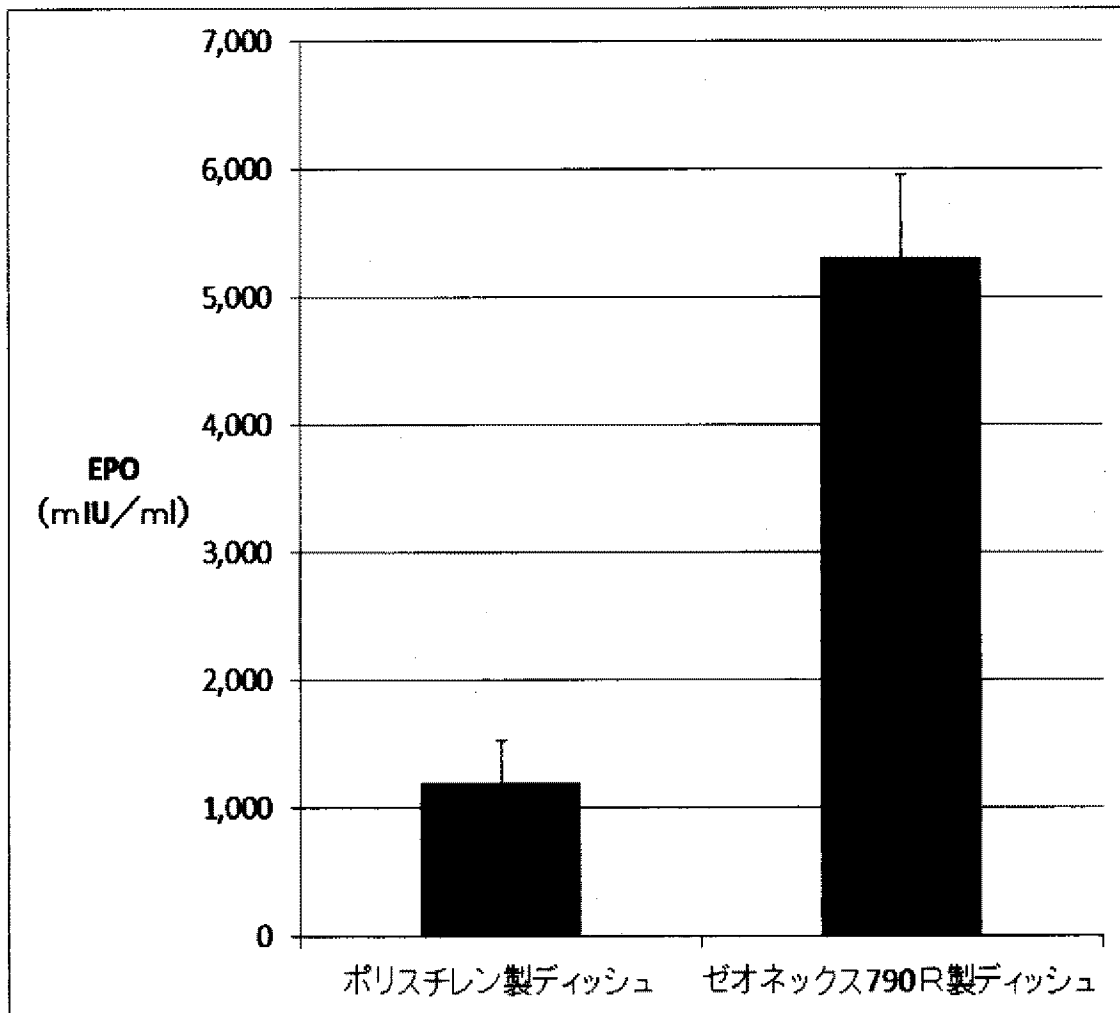


図 2



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2015/068155

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N5/071(2010.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N5/071, C12M3/00, C12N5/10, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2002-515125 A (Aurora Biosciences Corp.), 21 May 2002 (21.05.2002), example 3 & JP 2009-80119 A & US 6063338 A & US 6229603 B1 & US 6232114 B1 & US 5910287 A & US 6171780 B1 & US 6426050 B1 & US 6517781 B1 & US 6254833 B1 & US 2002/0155617 A1 & US 2003/0039591 A1 & US 2004/0202582 A1 & US 6825042 B1 & US 2005/0019221 A1 & US 2005/0214174 A1 & US 2007/0009883 A1 & US 2009/0148350 A1 & WO 1998/055231 A1 & WO 1999/042608 A1 & EP 921857 A1 & EP 1066400 A1	1, 3-7/2, 8

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 September 2015 (14.09.15)	Date of mailing of the international search report 29 September 2015 (29.09.15)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/068155

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2009-27944 A (Fukoku Co., Ltd.), 12 February 2009 (12.02.2009), examples; particularly, comparative example 3 (Family: none)	1, 4-7/2, 3, 8
Y/A	WO 2008/023771 A1 (Takara Bio Inc.), 28 February 2008 (28.02.2008), claims 1, 26 to 28; paragraphs [0004], [0007] & JP 2008-48653 A	8/1-7
Y/A	JP 8-228775 A (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), 10 September 1996 (10.09.1996), claims 14, 15; paragraph [0027] (Family: none)	8/1-7
A	JP 2008-17839 A (Nipro Corp.), 31 January 2008 (31.01.2008), paragraphs [0006] to [0008] (Family: none)	1-8
A	JP 2007-525647 A (Aurora Discovery, Inc.), 06 September 2007 (06.09.2007), claims 67 to 131; paragraph [0093]; examples & US 2005/0048575 A1 & WO 2004/098764 A2 & EP 1641555 A2	1-8
A	YOSHII Y.et al., The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well- regulated spheroid formation, Biomaterials, 2011 Sep, 32(26), p.6052-8, Epub 2011 Jun 2	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/071, C12M3/00, C12N5/10, C12P21/00		
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)		
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/A	JP 2002-515125 A (オーロラ バイオサイエンシズ コーポレーション) 2002.05.21, 実施例 3 & JP 2009-80119 A & US 6063338 A & US 6229603 B1 & US 6232114 B1 & US 5910287 A & US 6171780 B1 & US 6426050 B1 & US 6517781 B1 & US 6254833 B1 & US 2002/0155617 A1 & US 2003/0039591 A1 & US 2004/0202582 A1 & US 6825042 B1 & US 2005/0019221 A1 & US 2005/0214174 A1 & US 2007/0009883 A1 & US 2009/0148350 A1 & WO 1998/055231 A1 & WO 1999/042608 A1 & EP 921857 A1 & EP 1066400 A1	1, 3-7/2, 8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		
<input 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日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	14.09.2015	国際調査報告の発送日
		29.09.2015
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 渡邊 潤也	4 B   3 1 3 1
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	JP 2009-27944 A (株式会社フコク) 2009. 02. 12, 実施例, 特に比較例 3 (ファミリーなし)	1, 4-7/2, 3, 8
Y/A	WO 2008/023771 A1 (タカラバイオ株式会社) 2008. 02. 28, 請求項 1, 26-28, [0004], [0007] & JP 2008-48653 A	8/1-7
Y/A	JP 8-228775 A (株式会社大塚製薬工場) 1996. 09. 10, 請求項 14, 15, [0027] (ファミリーなし)	8/1-7
A	JP 2008-17839 A (ニプロ株式会社) 2008. 01. 31, [0006]-[0008] (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2007-525647 A (オーロラ ディスカバリー インコーポレイティ ッド) 2007. 09. 06, 請求項 67-131, [0093], 実施例 & US 2005/0048575 A1 & WO 2004/098764 A2 & EP 1641555 A2	1-8
A	YOSHII Y. et al., The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation, Biomaterials, 2011 Sep, 32(26), p. 6052-8, Epub 2011 Jun 2	1-8