

(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  
2011年2月3日(03.02.2011)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2011/013806 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/079 (2010.01) A61L 27/00 (2006.01)  
A61K 35/30 (2006.01) A61P 25/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/062915
- (22) 国際出願日: 2010年7月30日(30.07.2010)
- (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 2009-178340 2009年7月30日(30.07.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 戸山 芳昭 (TOYAMA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 中村 雅也 (NAKAMURA, Masaya) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 石井 賢 (ISHII, Ken) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 高木 岳彦 (TAKAGI, Takehiko) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人 (ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))



WO 2011/013806 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF PROGENITOR SCHWANN CELLS, AND METHOD FOR PROLIFERATION OF PROGENITOR SCHWANN CELLS

(54) 発明の名称: シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法

(57) Abstract: Disclosed are a method for proliferating progenitor Schwann cells and a method for producing progenitor Schwann cells. Peripheral nerves are damaged, and cells that are derived from the peripheral nerves and have been isolated 24 hours to 6 weeks after the damaging are subjected to floating culture. In this manner, undifferentiated progenitor Schwann cells having high proliferation capability can be produced. A transplantation composition containing the undifferentiated progenitor Schwann cells is effective for the treatment of diseases associated with nerve damage or neuropathy.

(57) 要約: 本発明の目的は、シュワン前駆細胞の増殖方法及び製造方法を提供することである。末梢神経の損傷を作製してから24時間から6週間後に単離された当該末梢神経由来の細胞を、浮遊培養することにより、増殖能力の高い未分化シュワン前駆細胞を製造することができる。この未分化シュワン前駆細胞を含有した移植組成物は神経損傷や神経障害に起因する疾患の治療に有効である。

## 明 細 書

**発明の名称**： シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法に関する。

### 背景技術

[0002] シュワン細胞は、末梢神経の軸索を取り囲む細胞である。末梢神経に損傷が生じた場合には、損傷部から遠位でシュワン細胞の脱分化が起こり、シュワン細胞管を既存の基底膜内で形成する。この未分化シュワン細胞が軸索再生を促進する物質を産生し、軸索再生を誘導する（例えば、Jassen R. K. and Richardson D. W. 編集、「Glial Cell Development, 2nd Ed.」Oxford University Press, 2001参照）。

[0003] そこで、損傷や障害により機能が失われた神経細胞の神経再生において、有効な治療手段と考えられるのが未分化なシュワン細胞の損傷や障害部位への移植である。移植するシュワン細胞として、拒絶反応の軽減や、倫理的問題を考慮すると移植が必要とされる患者本人の自家組織から調製した未分化なシュワン細胞であることが好ましいが、現在のところ、胎児では末梢神経から神経堤幹細胞が回収されたことが報告されているものの（例えば、Morrison S. J. et al., Cell 96(5): 737-749, 1999参照）、未分化なシュワン細胞の前駆細胞が単離された報告がない（例えば、Toma J. G. et al., Nat. Cell Biol. 3(9): 778-784, 2001; Wong C. E. et al., J. Cell Biol. 175(6): 1005-1015, 2006参照）。

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法を提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、以下の実施例に示すように、末梢神経の損傷が生じてから

24時間から6週間後に単離された当該末梢神経由来の細胞を、接着培養せずに浮遊培養することにより増殖能力の高いシュワン前駆細胞を製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] (1) シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法

本発明に係るシュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法は、末梢神経損傷が生じてから24時間から6週間後に単離された、当該末梢神経由来の細胞を、接着培養せず、且つ浮遊培養する工程を含むことを特徴とする。ここで、浮遊培養とは、目的の細胞や細胞塊を培養器の底面に接着させずに培養することを意味し、接着培養とは、目的の細胞や細胞塊を培養器の底面に接着させて培養することを意味する。なお、培養中、細胞や細胞塊が培養器の底面に接着するとは、細胞や細胞塊が、ECMなどに含まれる細胞-基質接着分子を通じて、培養器底面と接着している状態を意味し、培養液を軽く揺らしても細胞や細胞塊が培養液中に浮かんでこない状態を言う。一方、培養中、細胞や細胞塊が培養器の底面に接着しないとは、細胞や細胞塊が、ECMなどに含まれる細胞-基質接着分子を通じて培養器底面と接着していない状態を意味し、たとえ底面に触れていても培養液を軽く揺らすと細胞や細胞塊が培養液中に浮かんでくるような状態を言う。

[0007] 単離された細胞は、前記末梢神経損傷部位よりも遠位の末梢神経に由来することが好ましい。

[0008] 単離された細胞は、18時間以上、あるいは、24時間以上、好ましくは48時間以上、さらに好ましくは72時間以上浮遊培養する。また、血清を含む培地において浮遊培養することが好ましい。また、血清及び/または細胞増殖因子を含む培地において浮遊培養することが好ましい。細胞増殖因子はEGF及び/またはFGFであってもよい。

[0009] (2) シュワン前駆細胞

本発明に係るシュワン前駆細胞は、上記いずれかのシュワン前駆細胞製造方法によって製造されたことを特徴とする。

[0010] (3) 移植組成物

本発明に係る移植組成物は、末梢神経損傷が生じてから24時間から6週間後に単離された、当該末梢神経由来の細胞を、接着培養せず、且つ浮遊培養して得られるシュワン前駆細胞を含有することを特徴とする。

[0011] 単離された細胞は、前記末梢神経損傷部位よりも遠位の末梢神経に由来することが好ましい。

[0012] 単離された細胞は、18時間以上、あるいは、24時間以上、好ましくは48時間以上、さらに好ましくは72時間以上浮遊培養する。また、血清を含む培地において浮遊培養することが好ましい。また、血清及び／または細胞増殖因子を含む培地において浮遊培養することが好ましい。細胞増殖因子はEGF及び／またはFGFであってもよい。

[0013] 移植組成物は、神経損傷や神経障害に起因する疾患に罹患した患者あるいは患獣に移植することが好ましく、その疾患が、(1) 脊髄障害(脊髄損傷、脊髄梗塞などの脊髄血管障害、脊椎変性疾患に伴う脊髄・末梢神経障害、脊髄空洞症、脊髄腫瘍、脊髄炎、その他)、(2) 末梢神経障害(末梢神経損傷、糖尿病性末梢神経障害、ギランバレー症候群、Fisher症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、Charcot-Marie-Tooth病、家族性アミロイドポリニューロパチー、血管炎性ニューロパチー、中毒性ニューロパチー、特発性顔面神経麻痺、critical illness polyneuropathy (CIP)、神経痛性筋萎縮症(neuralgic amyotrophy)、その他)、(3) 脳血管障害など(脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、もやもや病、脳静脈洞血栓症、側頭動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、アルツハイマー病、水頭症など)、(4) 脱髄性・炎症性疾患(多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、神経ベーチェット病、神経Sweet病)、(5) 錐体外路症状疾患(パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、ジストニア・ジスキネジア、アテトーゼ、ヒョレア、バリズム、ミオクローヌスなど)、(6) 感染性疾患による神経障害であることがさらに好ましい。

[0014] ==クロスリファレンス==

本出願は、2009年7月30日付で出願した日本国特許出願2009-

178340に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

### 図面の簡単な説明

[0015] [図1]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから6時間、24時間、3日、7日、10日、2週間、3週間、6週間後に単離された細胞を1週間浮遊培養することにより得られた細胞塊を示す顕微鏡写真である。

[図2]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから6時間、24時間、3日、7日、10日、2週間、3週間、6週間後に単離された細胞を1週間浮遊培養することにより得られた細胞塊数を示すグラフである。

[図3]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから7日後に単離された細胞の初代浮遊培養においてメチルセルロース添加、あるいは無添加で行った結果を示す顕微鏡写真である。

[図4]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから7日後に単離された細胞の1回継代後の浮遊培養を、メチルセルロース添加、あるいは無添加で行った結果を示す顕微鏡写真である。

[図5]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから7日後に単離された細胞の2回継代後の浮遊培養を、メチルセルロース添加、あるいは無添加で行った結果を示す顕微鏡写真である。

[図6]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから7日後に単離された細胞を浮遊培養することによって形成された細胞塊の、各種抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果を示した顕微鏡写真である。

[図7]本発明の一実施例において、本発明に係る製造方法で製造されたシュワン前駆細胞を分化培地にて7日間培養した後、および、損傷を受けていない坐骨神経から単離されたシュワン細胞（インタクト）のp75およびP0の免疫組織化学的染色結果を示す顕微鏡写真である。

[図8]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから7日後に単離された細胞を浮遊培養することにより得られた細胞塊由来の細胞、または、対照の成熟シュワン細胞と、神経細胞との共培養後に得られたMBP陽性成熟

シュワン細胞、T u j - 1 陽性細胞を免疫組織化学的に検出した顕微鏡写真である。

[図9]本発明の一実施例において、坐骨神経を損傷させてから7日後に単離された細胞を浮遊培養することにより形成された細胞塊由来のシュワン前駆細胞を神経細胞と共培養した後の、全細胞数、M B P 陽性成熟シュワン細胞数、神経突起長を示したグラフである。

[図10]本発明の一実施例において、坐骨神経に損傷させてから7日後に単離された細胞を浮遊培養することにより形成された細胞塊由来のシュワン前駆細胞を神経細胞と共培養した後の、全細胞におけるM B P 陽性成熟シュワン細胞の割合を示したグラフである。

[図11]本発明の一実施例において、吸入麻酔し、うつ伏せに固定したマーモセット (A)、坐骨神経の損傷 (B)、神経損傷1週間後の坐骨神経 (矢印) の摘出 (C) を示す写真である。

[図12]本発明の一実施例において、マーモセットの坐骨神経を損傷させてから1週間後に単離した細胞を1週間浮遊培養することにより形成された細胞塊 (A、B) を示す顕微鏡写真である。

[図13]本発明の一実施例において、マーモセットの坐骨神経を損傷させてから1週間後に単離した細胞を1週間浮遊培養して得られた細胞塊を、1回継代し、さらに1週間浮遊培養して得られた細胞塊 (2代目細胞塊、A、B) および、A、Bの細胞塊をさらに継代し、1週間浮遊培養して得られた細胞塊 (3代目細胞塊、C) を示す顕微鏡写真である。

### 発明を実施するための形態

[0016] 以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。

実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seid

man, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd. 等の標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0017] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例等は、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0018] ==シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法==

シュワン前駆細胞は、動物個体において、末梢神経損傷が生じてから所定期間後に、損傷した末梢神経由来の細胞を単離し、接着培養せず、且つ浮遊培養することによって製造する。接着培養しないことにより、シュワン前駆細胞を未分化のまま増殖させることが可能になる。

[0019] ここで、末梢神経とは、神経系において、その中枢部である中枢神経系に対して周辺部の神経を意味し、本発明においては、シュワン細胞を付随している限り、動物の体のいずれの部位に位置している末梢神経も用いることができる。

[0020] シュワン前駆細胞を単離する動物は、神経系を有する、ヒト又はヒト以外の動物であれば制限されないが、マウスなどの哺乳動物であることが好ましく、マーモセットなどの霊長類であることがより好ましく、ヒトであることがさらに好ましい。特に、製造されたシュワン前駆細胞を移植に用いる場合、自家移植であることが好ましいので、末梢神経由来の細胞は、レシピエントから得ることが好ましい。

[0021] 末梢神経の損傷は、種類や原因に制限がなく、例えば、打撲、外傷、低温

、高熱、電気ショック、切断、圧迫、放射線等により生じる損傷であってもよい。また、これらの末梢神経の損傷が、事故によって生じたものであっても、人為的に引き起こされたものであってもよい。人為的な損傷として、手術用ハサミやメスによる切断、あるいは、鉗子やピンセット等を用いた圧迫等が例示できる。

[0022] このような末梢神経損傷から約24時間から約6週間後、好ましくは約24時間から約3週間後、より好ましくは約3日から約3週間後、もっとも好ましくは約3日から約10日後に末梢神経由来の細胞を単離する。その細胞は、損傷を受けた末梢神経において、損傷部位よりも遠位から単離することが好ましい。

[0023] 以上のような、単離された末梢神経由来の細胞を浮遊培養する際の条件に関し、使用する培地として、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地、MEM/ハムF-12培地が例示できるが、シュワン前駆細胞の製造が可能な範囲で制限されず、当業者に周知の培地から適宜選択できる。培地には、血清及び/または細胞増殖因子が添加されていることが好ましい。血清は、ウシ胎仔血清、ウシ新生児血清、ウシ血清アルブミン、ヤギ血清、ウサギ血清、マウス血清、サル血清、ヒト血清等が例示できるが、シュワン前駆細胞の製造が可能な範囲で制限されず、周知の血清から当業者が適宜選択できる。また、細胞増殖因子として、EGF、FGF、CNTF等が例示できるが、シュワン前駆細胞の製造が可能な範囲で制限されず、周知の細胞増殖因子から当業者が適宜選択できる。

[0024] さらに、培養細胞を維持するために一般的に用いられるその他の周知物質、サイトカイン等の末梢神経再生促進物質、または抗生物質、あるいはその組み合わせが添加されていてもよい。その他の周知物質として、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレン酸ナトリウム、プトレッシン、B27サプリメント (インビトロジェン社) 等が例示できるがこれらに制限されない。また、抗生物質として、ジェネティシン、ハイグロマイシン、ゼオシン、ピューロマイシン、ブラストシジン等が例示できるが、これらに



制限されない。なお、以上のいずれの添加物の濃度も、当業者が適宜決定することができる。

[0025] シュワン前駆細胞の浮遊培養は、5%CO<sub>2</sub>条件下、35~40°Cで行うのが好ましく、37°Cであることがより好ましい。培養時間は、シュワン前駆細胞が増殖する範囲内で制限されないが、18時間以上あるいは24時間以上が好ましく、48時間以上がより好ましく、72時間以上がさらに好ましい。48時間以上浮遊培養することで、シュワン前駆細胞が塊状になって、細胞塊（スフェア）としてシュワン前駆細胞を得ることができるからである。

[0026] 初代培養においてスフェアが1つでも形成されれば、いつでも継代し浮遊培養を繰り返すことができる。継代方法は特に制限されず、トリプシンやEDTAなどをもちいた常法を用いれば良い。シュワン前駆細胞を接着培養するとシュワン細胞に分化する傾向にあるので、継代している間は、細胞をディッシュ底面に接着させないことが望ましい。そのために、化学物質（ラミニン等）でコートしていないディッシュ（例えば、細菌用培養皿など）を用いるのが好ましい。

[0027] ==シュワン前駆細胞==

本発明に係るシュワン前駆細胞は、上述したいずれかの製造方法によって製造される。

[0028] このシュワン前駆細胞は、未分化細胞マーカーであるNestin陽性、および未分化シュワン細胞マーカーであるp75陽性である。同時に、このシュワン前駆細胞は、成熟シュワン細胞マーカーであるSox-10、NCAM (neural cell adhesion molecule)、P0、およびS100のいずれも陰性である。そして、このシュワン前駆細胞は、成熟シュワン細胞への分化能を有している。例えば、接着培養することによって、シュワン細胞に分化させることができる。

[0029] 本発明に係るシュワン前駆細胞の用途に関して、特に制限されず、例えば、シュワン前駆細胞やシュワン細胞に関連する研究に用いても、あるいは、

下記のような移植用組成物の製造に用いてもよい。

[0030] ==移植組成物及びその使用方法==

本発明に係る移植組成物は、末梢神経損傷してから所定時間後、当該末梢神経由来の細胞を、接着培養せず、且つ浮遊培養することによって得られるシュワン前駆細胞を含有する。

[0031] 本発明に係る移植組成物は、上記シュワン前駆細胞以外に、薬学的に許容される担体を含んでもよく、この担体としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液、血清、および体液等が挙げられるが、シュワン前駆細胞を正常に維持できる範囲内でこれらに限定されない。また、細胞の足場となる固体またはゲル状の支持体等と組み合わせてもよい。

[0032] 本発明の移植組成物は、細胞外基質 (extracellular matrix) 成分を含んでもよい。細胞外基質成分とは、細胞間に蓄積する不溶性の網状または繊維状構成物に含まれるタンパク質またはムコ多糖の成分であり、生物から分離されたものであっても、あるいは人工的に再構成したものであってもよい。

[0033] 本移植組成物の構造は特に制限されず、液状、あるいはゲル状またはペースト状の網構造、繊維状構造、平板 (ディスク) 状構造、ハニカム状構造、スポンジ様構造等が例示できる。本移植組成物の液状化やゲル化は、当業者に周知の方法に従って行うことができる。

[0034] 本移植組成物を神経損傷や神経障害に起因する疾患に罹患したヒトまたはヒト以外の動物の患部に移植することができる。移植部位では、このシュワン前駆細胞により、損傷・障害部位の神経線維の再生が促され、神経機能の再生が促進される。

[0035] 本発明に係る移植組成物は、例えば、シュワン前駆細胞の移植に関する研究用試薬の製造に用いても、あるいは、前記神経損傷や神経障害に起因する疾患の治療用医薬剤の製造に用いてもよく、特に制限されない。治療用医薬剤製造の際には、薬学的に許容される担体や安定剤、賦形剤などを含んで剤形化される。

[0036] ここで、神経損傷や神経障害に起因する疾患は、シュワン前駆細胞の移植によって神経線維の再生が生じ、治癒あるいは病状の改善が期待される疾患であれば特に制限されず、例えば、その疾患が、（１）脊髄障害（脊髄損傷、脊髄梗塞などの脊髄血管障害、脊椎変性疾患に伴う脊髄・末梢神経障害、脊髄空洞症、脊髄腫瘍、脊髄炎、その他）、（２）末梢神経障害（末梢神経損傷、糖尿病性末梢神経障害、ギランバレー症候群、Fisher症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、Charcot-Marie-Tooth病、家族性アミロイドポリニューロパチー、血管炎性ニューロパチー、中毒性ニューロパチー、特発性顔面神経麻痺、critical illness polyneuropathy (CIP)、神経痛性筋萎縮症 (neuralgic amyotrophy)、その他）、（３）脳血管障害など（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、もやもや病、脳静脈洞血栓症、側頭動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、アルツハイマー病、水頭症など）、（４）脱髄性・炎症性疾患（多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、神経ベーチェット病、神経Sweet病）、（５）錐体外路症状疾患（パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、ジストニア・ジスキネジア、アテトーゼ、ヒョレア、バリズム、ミオクローヌスなど）、（６）感染性疾患による神経障害であることが挙げられる。なお、損傷した神経は、末梢神経でも中枢神経でも構わない。

[0037] 本移植組成物の移植対象となる動物は、神経系を有する、ヒトまたはヒト以外の動物であれば制限がないが、例えば、哺乳動物であることが好ましく、霊長類であることがより好ましく、ヒトであることがさらに好ましい。

## 実施例

[0038] [実施例 1]

本実施例では、損傷させた坐骨神経の遠位から単離した細胞を浮遊培養することにより細胞塊（スフェア）が形成されること、および、その細胞塊が新しく分裂した細胞の集合体であることを示す。

[0039] ==細胞の調製・培養方法==

成体マウス（ICRマウス、C57/BL6マウス、メス）をケタミン（

100 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) で麻酔してうつ伏せに固定し、背面尾部付近を切開して坐骨神経を露出させた。鉗子を用い、この坐骨神経に5分間一定に圧力をかけることにより、坐骨神経を損傷させた。マウスの傷口を縫合し、6時間、24時間、3日、7日、10日、2週間、3週間、あるいは6週間飼育を続けた (n=6)。その後、中枢神経に対して損傷部位より遠位の坐骨神経を摘出し、0.25%コラゲナーゼで30分間37°C、次いで0.25%トリプシン-EDTAで30分間37°Cで消化した後、ピペティングを行った。これを、さらにナイロンメッシュでろ過することにより不要な軟部組織を除去した。ここで得られたろ液を遠心し、細胞を回収した。DMEM無血清培地に、インスリン (25 µg/ml)、トランスフェリン (100 µg/ml)、プロゲステロン (20 nM)、セレン酸ナトリウム (30 nM)、ブトレスシン (60 nM)、EGF (100 ng/ml)、FGF (100 ng/ml)、B27 (20 ng/ml)、10% FBSを添加し (シュワン前駆細胞用培地)、ここに上記のようにして得た細胞を  $1 \times 10^5$  細胞/ml の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°Cで、浮遊培養した。なお、対照群では、坐骨神経を露出させた後損傷させずに縫合し、7日後に上記と同様にして細胞を単離し、培養した。

[0040] 培養開始7日目に単位容積の培地あたりの細胞塊の写真を撮影し、培地単位容積辺りの細胞塊を計測した。図1および図2に示すように、神経損傷後24時間以上経てから細胞を単離した群で、細胞塊が形成された。なお、細胞塊が形成された群では、2日目から細胞塊が観察でき、図1および2では、3日目から細胞塊が観察されている。

[0041] ==細胞分裂による新規細胞の確認==

次に、上記細胞塊を形成する細胞が分裂により新たに出現した細胞であることを確認した。神経損傷後7日目のマウス坐骨神経から単離した細胞を、0.8%メチルセルロース添加シュワン前駆細胞用培地で浮遊培養した。ここで得られた一次細胞塊を顕微鏡下でピペットを用いて回収し、0.25%トリプシンで37°C、30分間処理した。その後、細胞が解離するまでピペ

ッティングを行った。この単細胞を、0.8%メチルセルロース添加シュワン前駆細胞用培地に播種して5%CO<sub>2</sub>、37°Cで7日間浮遊培養した。同様にして、3代継代培養を行った。なお、メチルセルロースは、細胞同士の結合を妨げるため、メチルセルロース存在下で形成された細胞塊は単細胞の細胞分裂によって生じた細胞である。各継代ごとに、細胞塊が形成された。図3~5に、継代培養された細胞が形成した細胞塊の顕微鏡写真を示す。

[0042] これらの結果は、本実施例に記載の方法によって形成された細胞塊が、浮遊培養中の増殖によって生じたことを示す。このように、本実施例の方法によりシュワン前駆細胞を増殖させることができる。

[0043] [実施例2]

本実施例では、実施例1で製造された細胞がシュワン前駆細胞であることを示す。

[0044] ==免疫組織化学的染色==

実施例1で得られた細胞塊を各種マーカーにより標識し、細胞塊に含まれる細胞の分化段階を検討した。

[0045] 上記実施例1において損傷作製後7日のマウス坐骨神経から単離した細胞から得られた細胞塊を、顕微鏡下でピペットを用いて回収し、4%PFAで固定した。続いて、10%スクロース、30%スクロースにそれぞれ24時間ずつ浸した後、OCTコンパウンドに包埋し、MASコーティングスライドグラス（松浪硝子工業株式会社）に張り付けた。この試料に対し、5%FBS/0.3%Triton Xでブロッキングを行った。ここに、抗Nestinマウスモノクローナル抗体（3D Pharmingen社、1:200）、抗Ki67ウサギポリクローナル抗体（Novocastra社、1:500）、抗PCNAウサギポリクローナル抗体（Oncogene Research Products社、1:500）、抗Sox-10ヤギモノクローナル抗体（R&D Systems社、1:200）、抗NCAM (neural cell adhesion molecule) ラットモノクローナル抗体（Abcam社、1:200）、抗p75ウサギポリクローナル抗体（Chemica

on社、1:200)、抗P0ニワトリモノクローナル抗体(Aves社、1:200)、あるいは抗S100ウサギポリクローナル抗体(Dako社、1:500)を滴下し、湿潤環境において4°Cで一晩、インキュベートした。二次抗体として、Alexa488あるいはAlexa568(Molecular Probes社、1:1000)を滴下し、湿潤環境において室温で30分インキュベートし、蛍光標識を行った。対比染色としてDAPI(Sigma社、1:1000)を用いた。なお、抗体希釈液としてブロッキング液を用いた。その後、共焦点レーザースキャン鏡下で観察を行った。

[0046] 図6に示すように、細胞塊は未分化細胞のマーカであるNestin陽性であった。これは、細胞塊に含まれる細胞群に、高い割合で未分化段階の細胞が含まれることを示している。また、細胞増殖マーカであるKi67およびPCNA陽性であった。これは、細胞塊に含まれる細胞が増殖していることを示している。さらに、未分化シュワン細胞マーカであるp75、Sox-10、NCAMが陽性である一方で、成熟シュワン細胞マーカであるP0、S100はほぼ陰性であった。これは、細胞塊に含まれる細胞の多くが、成熟シュワン細胞に分化する以前の、未分化段階のシュワン前駆細胞であることを示している。

[0047] このように、実施例1の方法によって形成された細胞塊には、高い割合で、未分化で増殖しているシュワン前駆細胞が含まれている。

[0048] [実施例3]

本実施例では、製造されたシュワン前駆細胞がシュワン細胞への分化能を有することを示す。

[0049] 上記実施例1において損傷作製後7日のマウス坐骨神経から単離した細胞から得られた細胞塊を顕微鏡下でピペットを用いて回収し、ラミニンでコーティングした8ウェルのチャンバースライドガラスに播種し、10%FBS添加DMEM(分化培地)において、5%CO<sub>2</sub>、37°Cで7日間培養し、シュワン細胞への分化を誘導した。

- [0050] 細胞の分化段階の検出のため、培養前の細胞塊、および、培養後の細胞を抗p75ウサギポリクローナル抗体（Chemicon社、1：200）、抗P0ニワトリモノクローナル抗体（Aves社、1：200）を用いて、実施例2に記載の方法に従って免疫組織化学的染色を行った。
- [0051] また、対照として、損傷を作製しないマウスの坐骨神経から単離されたシュワン細胞を分化培地で同様に培養した。
- [0052] 図7に示すように、細胞塊はp75陽性、P0陰性であり（図7A～D）、未分化なシュワン前駆細胞からなることが確認された。一方で、7日間接着培養することによって、細胞におけるp75およびP0の標識パターン（図7E～H）は、単離した対照のシュワン細胞の標識パターン（図7I～K）と同様のパターンを示した。すなわち、成熟シュワン細胞のマーカであるP0の標識が、細胞塊（B）と比較し顕著に増加した。これは、7日間の接着培養によって未分化なシュワン前駆細胞が成熟シュワン細胞に分化誘導されたことを示している。
- [0053] このように、実施例1で製造されたシュワン前駆細胞は、接着培養によって、成熟シュワン細胞に分化誘導される。
- [0054] [実施例4]
- 本実施例では、実施例1で形成された細胞塊と神経細胞を共培養すると、シュワン前駆細胞がシュワン細胞に分化し、神経突起が伸長することを示す。
- [0055] 神経損傷後7日目のマウス坐骨神経から単離した細胞から得られた細胞塊を顕微鏡下でピペットを用いて回収し、0.25%トリプシンで37℃、30分間処理した。その後、細胞塊が単一細胞に分散するまでピペッティングを行った。このようにして得られた細胞を、2%B27、1%L-グルタミン酸、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したneurobasal medium（Gibco社）に $1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で播種した。この際、成体マウス（ICRマウス、C57/BL6マウス、メス）の後根神経節から単離した神経細胞 $8 \times 10^5$ 細胞/mlを共に播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃で7日間接

着共培養を行った。成体マウスからの神経細胞単離は、上記実施例1に記載の細胞の調製・培養方法に従って行った。なお、対照群では、坐骨神経を露出させた後損傷作製を行わずに縫合し、7日後に単離した成熟シュワン細胞を同様に播種し、後根神経節由来の神経細胞と同様にして共培養を行った。

[0056] 培養後、細胞を4% PFAで固定の後、PBSで洗浄し、5% FBS / 0.3% Triton Xでブロッキングを行った。抗MBPラットモノクローナル抗体 (Aves社、1:1000) および抗Tuj-1マウスモノクローナル抗体 (Sigma社、1:500) を滴下し、湿潤環境において4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体として、Alexa488あるいはAlexa568 (Molecular Probes社、1:1000) を滴下し、湿潤環境において室温で30分インキュベートし、蛍光標識を行った。対比染色としてDAPI (Sigma社、1:1000) を用いた。共焦点レーザースキャン顕微鏡下で観察し、MBP陽性成熟シュワン細胞数、全細胞数 (全細胞数はHoechst 33342において染色された核の数) を計数した (計数の際、100倍視野で撮影される660  $\mu$ m  $\times$  884  $\mu$ mの視野の細胞を計数した)。計測にはAdobe Photoshop CS4 Extendedを用いた。なお、Tuj-1は神経細胞のマーカーとして一般に使用される。抗体希釈液にはブロッキング液を用いた。

[0057] 1つの神経細胞から出る突起のうち最も長いものを選択し神経突起の長さを測定した。計測にはAdobe Photoshop CS4 Extendedを用いた。

[0058] 図8および9は、細胞塊由来シュワン前駆細胞またはシュワン細胞と神経細胞の共培養の結果である。細胞塊由来シュワン前駆細胞と神経細胞を共培養した場合には、全細胞数およびMBP陽性成熟シュワン細胞数は、対照群と比較して有意に多かった (ステューデントの t 検定)。また、神経突起の長さも、細胞塊由来シュワン前駆細胞と神経細胞と共培養した場合に、対照群と比較して有意に長かった (ステューデントの t 検定)。さらに図10に示すように、全細胞あたりのMBP陽性成熟シュワン細胞率も、細胞塊由来



シュワン前駆細胞において高かった。

[0059] このように、細胞塊由来シュワン前駆細胞は、成熟シュワン細胞に比べ、神経細胞の髄鞘化と突起伸長の促進効果が高い。従って、本発明によって作製された細胞塊由来シュワン前駆細胞は、神経損傷や神経障害等に起因する疾患に対し、治療効果の高い移植体として使用できる。

[0060] [実施例 5]

本実施例では、霊長類においても、損傷させた坐骨神経の遠位から単離した細胞を浮遊培養することにより細胞塊（スフェア）が形成されること、および、その細胞塊が新しく分裂した細胞の集合体であることを示す。

[0061] ==細胞の調製・培養方法==

成体マーモセット（ $n = 1$ ）をイソフルレンで吸入麻酔してうつ伏せに固定し（図 1 1 A）、背面尾部付近を切開して坐骨神経を露出させた。鉗子を用い、この坐骨神経に 5 分間一定に圧力をかけることにより、坐骨神経を損傷させた（図 1 1 B）。マーモセットの傷口を縫合し、1 週間飼育を続けた。その後、中枢神経に対して損傷部位より遠位の坐骨神経を摘出し、0. 25% コラゲナーゼで 30 分間 37°C、次いで 0. 25% トリプシン-EDT A で 30 分間 37°C で消化した後、ピペティングを行って細胞を解離し、さらにナイロンメッシュでろ過することにより不要な軟部組織を除去した。ここで得られたろ液を遠心し、細胞を回収した。このようにして得た細胞を 0. 8% メチルセルロース添加シュワン前駆細胞様培地（実施例 1 参照）に  $1 \times 10^5$  細胞/ml の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で、浮遊培養した（損傷群）。なお、対照群では、坐骨神経を露出させた後損傷させずに縫合し、1 週間後に上記と同様にして細胞を単離し、浮遊培養した。

[0062] 図 1 2 A、B は、浮遊培養開始から 1 週間後の損傷群の細胞の様子を示す。損傷群では細胞塊が形成されたが、対照群では細胞塊は形成されなかった。

[0063] 損傷群の細胞塊を、浮遊培養開始から 1 週間目に継代し、さらに 1 週間後に 2 回目の継代を行った。培地に添加されたメチルセルロースが細胞同士の

結合を妨げるため、メチルセルロース存在下で形成された細胞塊は単細胞の細胞分裂によって生じた細胞からなる。

[0064] 図13A、Bに1回継代後の細胞が1週間後に形成した細胞塊、図13Cに2回継代後の細胞が1週間後に形成した細胞塊の顕微鏡写真を示す。各継代毎に細胞塊が形成された。

[0065] 以上の結果は、実施例1と同様の方法によって、霊長類の坐骨神経から単離した細胞から細胞塊が形成されること、さらに、この細胞塊が、浮遊培養中の増殖によって形成されたことを示す。このように、霊長類においても、本実施例の方法により、シュワン前駆細胞を増殖させることができる。

### **産業上の利用可能性**

[0066] 本発明によって、シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法、その製造方法によって製造されたシュワン前駆細胞、シュワン前駆細胞を含有する移植組成物を提供することができる。

## 請求の範囲

- [請求項1] シュワン前駆細胞を増殖させる増殖方法であって、  
末梢神経損傷が生じてから24時間から6週間後に単離された、当該末梢神経由来の細胞を、浮遊培養する工程を含むことを特徴とする、増殖方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の増殖方法であって、  
前記細胞が、前記末梢神経損傷部位よりも遠位の末梢神経に由来することを特徴とする、増殖方法。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の増殖方法であって、  
18時間以上浮遊培養することを特徴とする、増殖方法。
- [請求項4] 請求項3に記載の増殖方法であって、  
48時間以上浮遊培養することを特徴とする、増殖方法。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれかに記載の増殖方法であって、  
前記単離された細胞を、血清を含む培地において培養することを特徴とする、増殖方法。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載の増殖方法であって、  
前記単離された細胞を、細胞増殖因子を含む培地において培養することを特徴とする、増殖方法。
- [請求項7] 請求項6に記載の増殖方法であって、  
細胞増殖因子がEGF及び/またはFGFであることを特徴とする、増殖方法。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれかに記載の増殖方法であって、  
前記単離された細胞を、化学物質でコートされていないプラスチック培養皿を用いて浮遊培養することを特徴とする、増殖方法。
- [請求項9] シュワン前駆細胞の製造方法であって、  
末梢神経損傷が生じてから24時間から6週間後に単離された、当該末梢神経由来の細胞を、浮遊培養する工程を含むことを特徴とする、製造方法。

- [請求項10] 請求項9に記載の製造方法によって製造されたことを特徴とする、浮遊培養されたシュワン前駆細胞。
- [請求項11] シュワン前駆細胞を含有することを特徴とする、移植組成物。
- [請求項12] 請求項11に記載の移植組成物であって、  
前記シュワン前駆細胞が、末梢神経損傷が生じてから24時間から6週間後に単離された、当該末梢神経由来の細胞を、接着培養せず、且つ浮遊培養することによって得られることを特徴とする、移植組成物。
- [請求項13] 請求項11または12に記載の移植組成物であって、  
前記単離された細胞が、前記末梢神経損傷部位よりも遠位の末梢神経に由来することを特徴とする、移植組成物。
- [請求項14] 請求項12～13のいずれかに記載の移植組成物であって、  
前記単離された細胞を18時間以上浮遊培養することを特徴とする、移植組成物。
- [請求項15] 請求項14に記載の移植組成物であって、  
前記単離された細胞を48時間以上浮遊培養することを特徴とする、移植組成物。
- [請求項16] 請求項12～15のいずれかに記載の移植組成物であって、  
前記単離された細胞を、血清を含む培地において浮遊培養することを特徴とする、移植組成物。
- [請求項17] 請求項12～16のいずれかに記載の移植組成物であって、  
前記単離された細胞を、細胞増殖因子を含む培地において浮遊培養することを特徴とする、移植組成物。
- [請求項18] 請求項17に記載の移植組成物であって、  
細胞増殖因子がEGF及び/またはFGFであることを特徴とする、移植組成物。
- [請求項19] 請求項12～18のいずれかに記載の移植組成物であって、  
前記単離された細胞を、化学物質でコートされていないプラスティ

ック培養皿を用いて浮遊培養することを特徴とする、移植組成物。

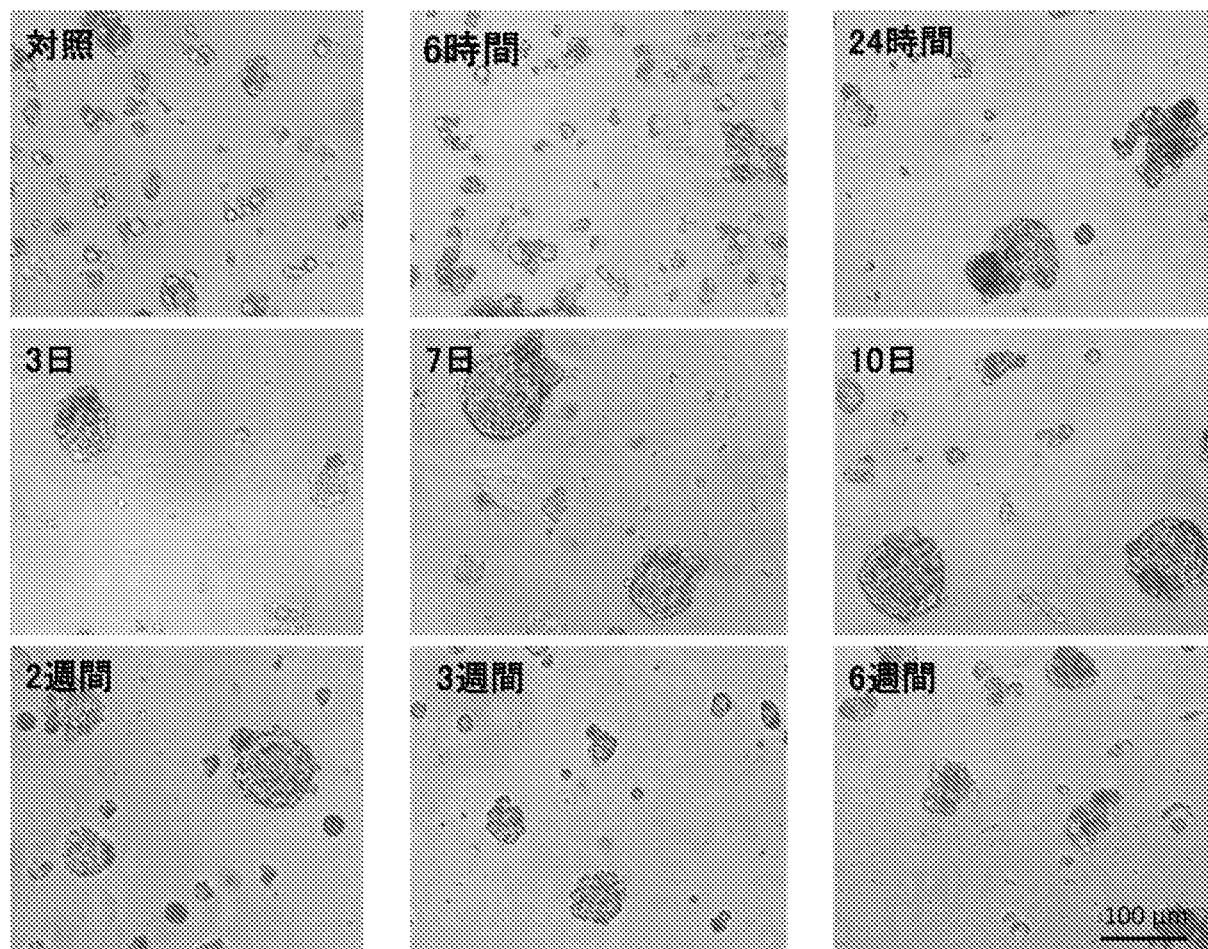
[請求項20]

請求項 11～19のいずれかに記載の移植組成物であって、  
神経損傷や神経障害に起因する疾患に罹患した患者に移植されることを特徴とする、移植組成物。

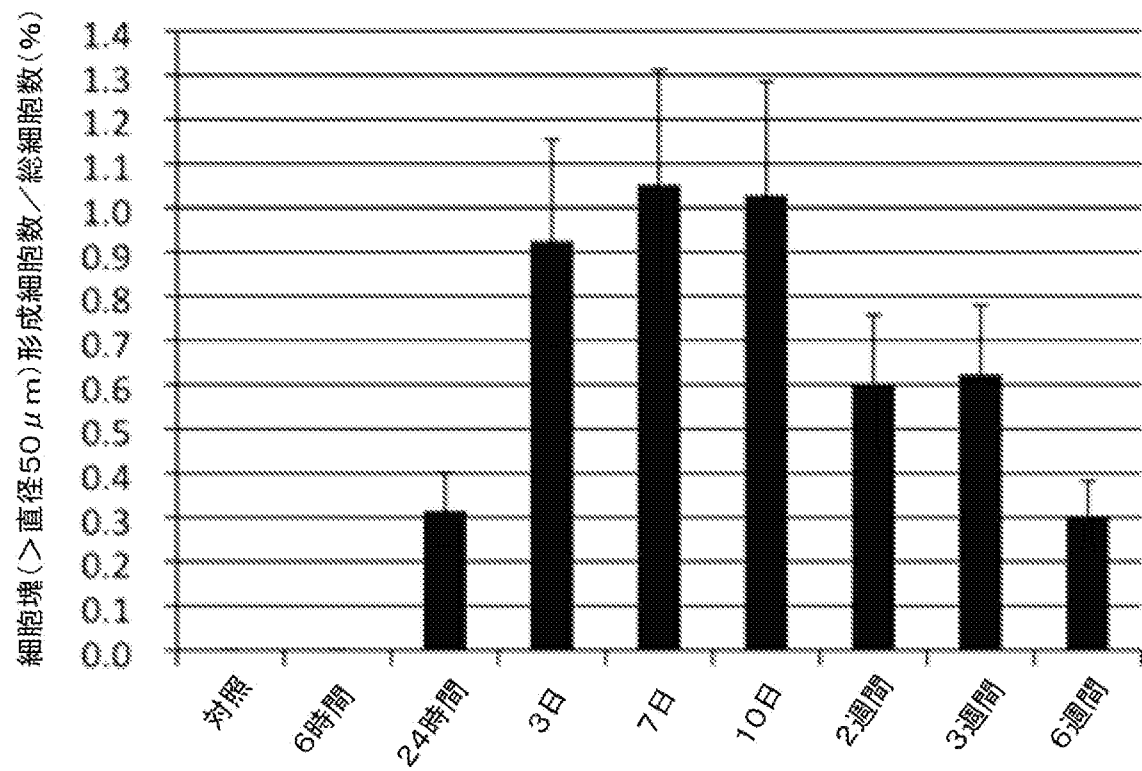
[請求項21]

請求項 20に記載の移植組成物であって、  
前記神経損傷や神経障害に起因する疾患が脊髄障害、末梢神経障害、脳血管障害、脱髄性・炎症性疾患、錐体外路症状疾患、及び、感染性疾患による神経障害からなる群から選ばれることを特徴とする、移植組成物。

[図1]

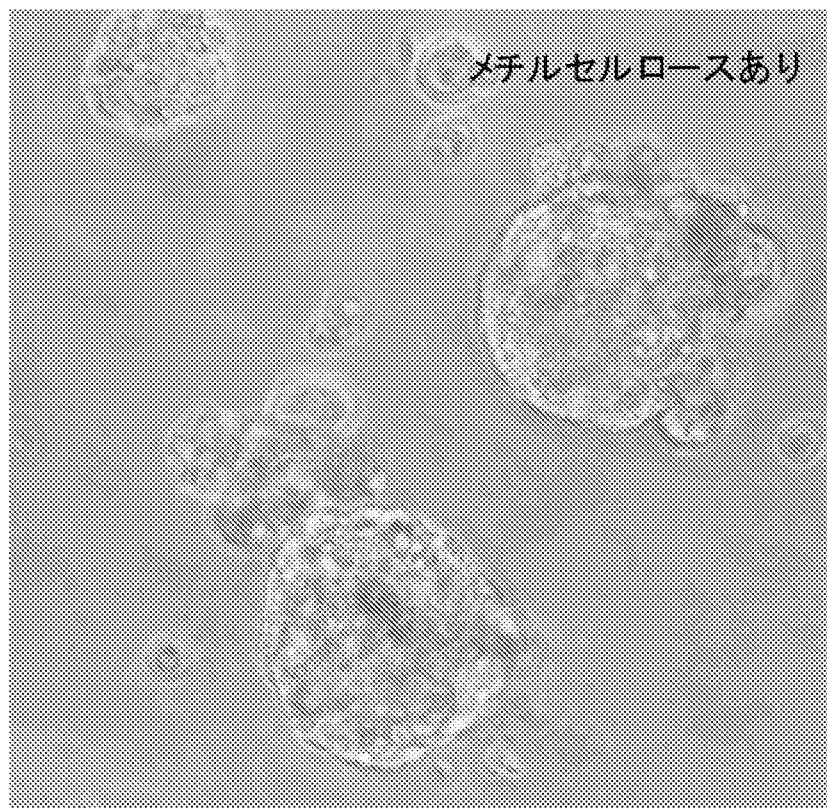
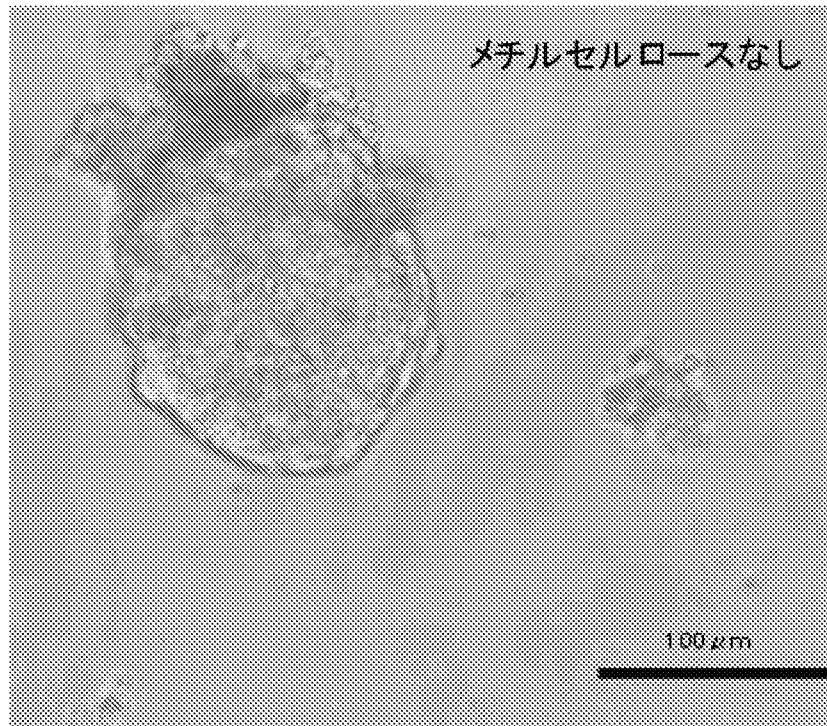


[図2]



[図3]

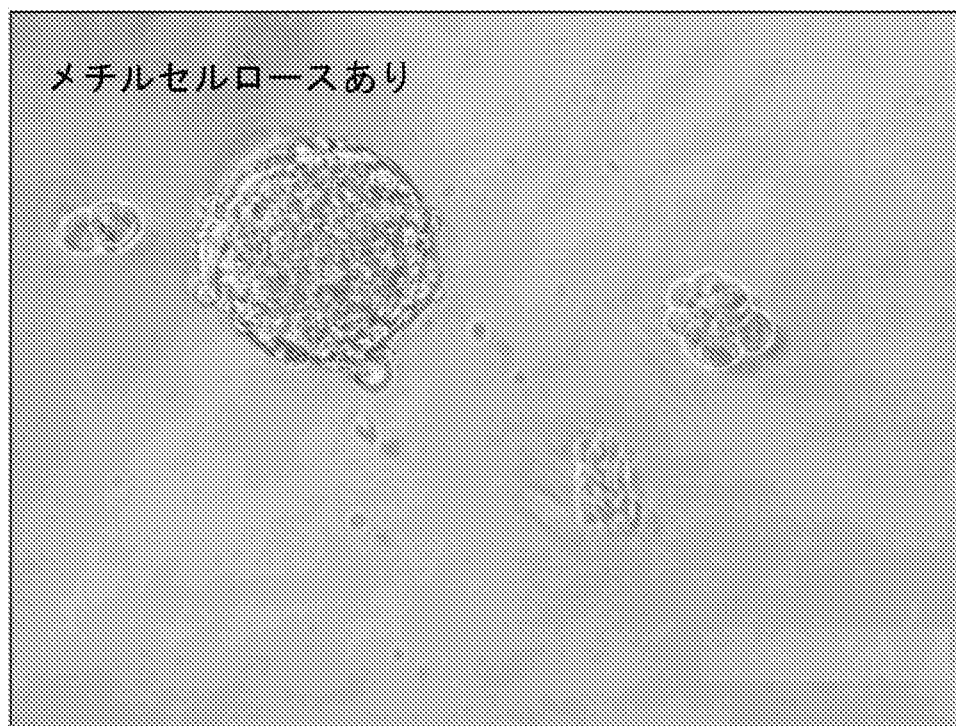
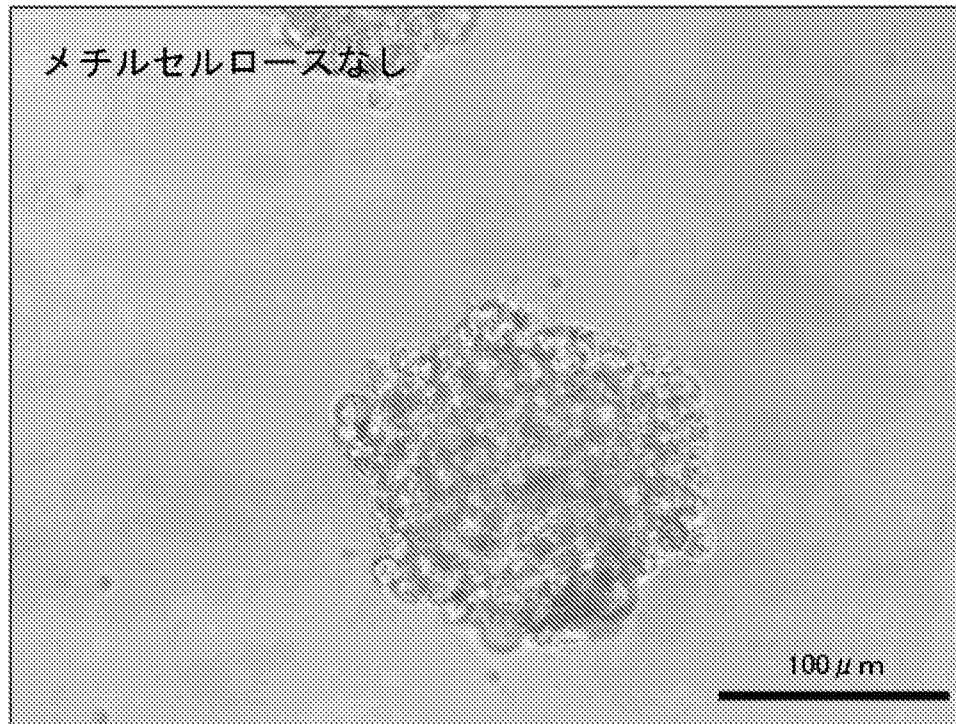
## 初代細胞塊





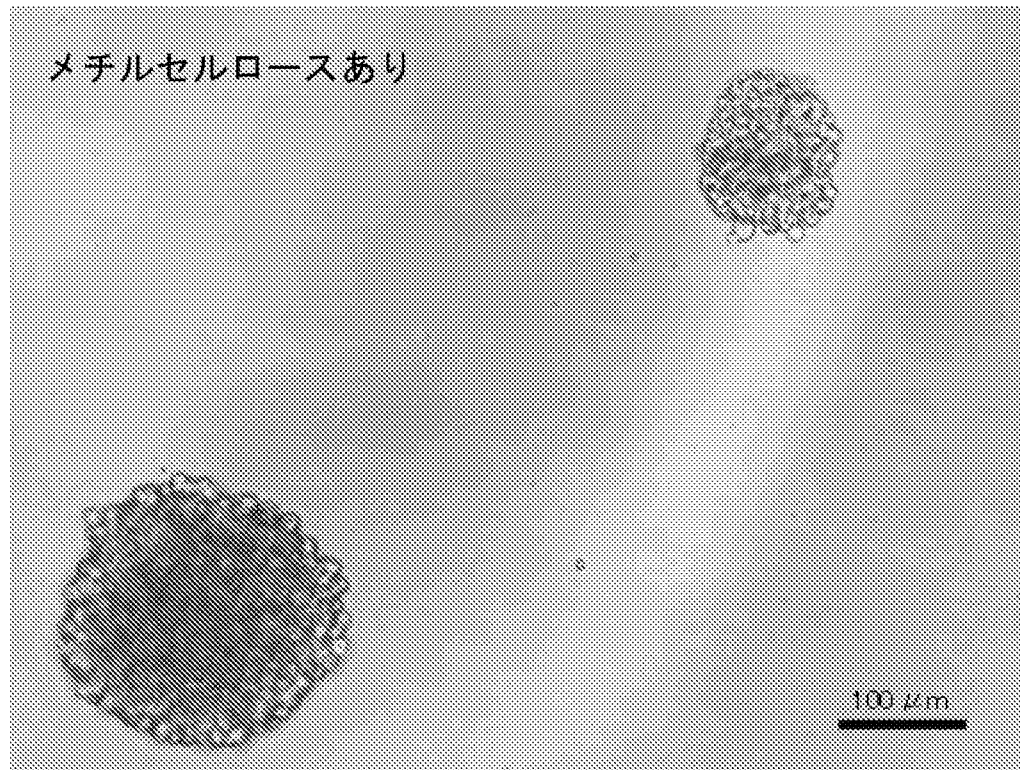
[図4]

## 2代目細胞塊



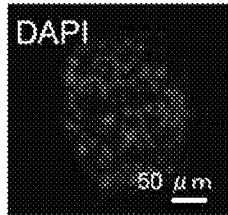
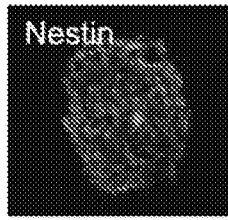
[図5]

## 3代目細胞塊

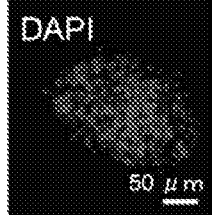
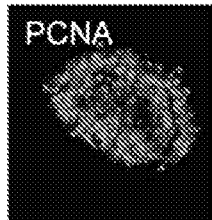
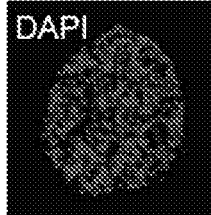
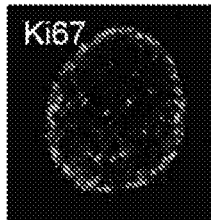
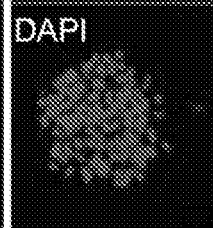
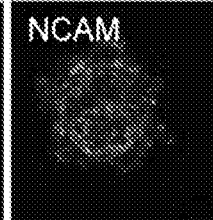
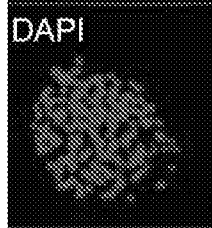
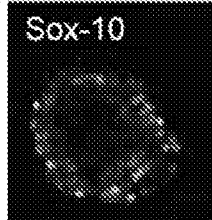
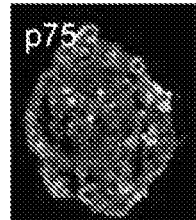


[図6]

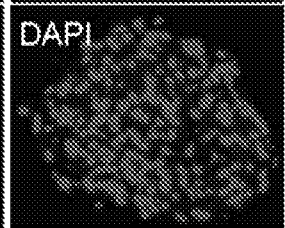
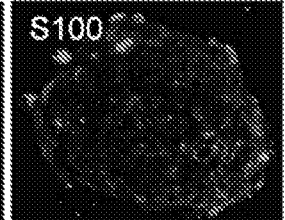
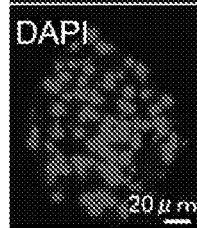
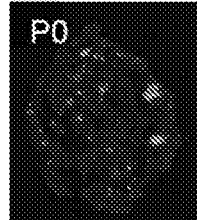
未分化細胞マーカー



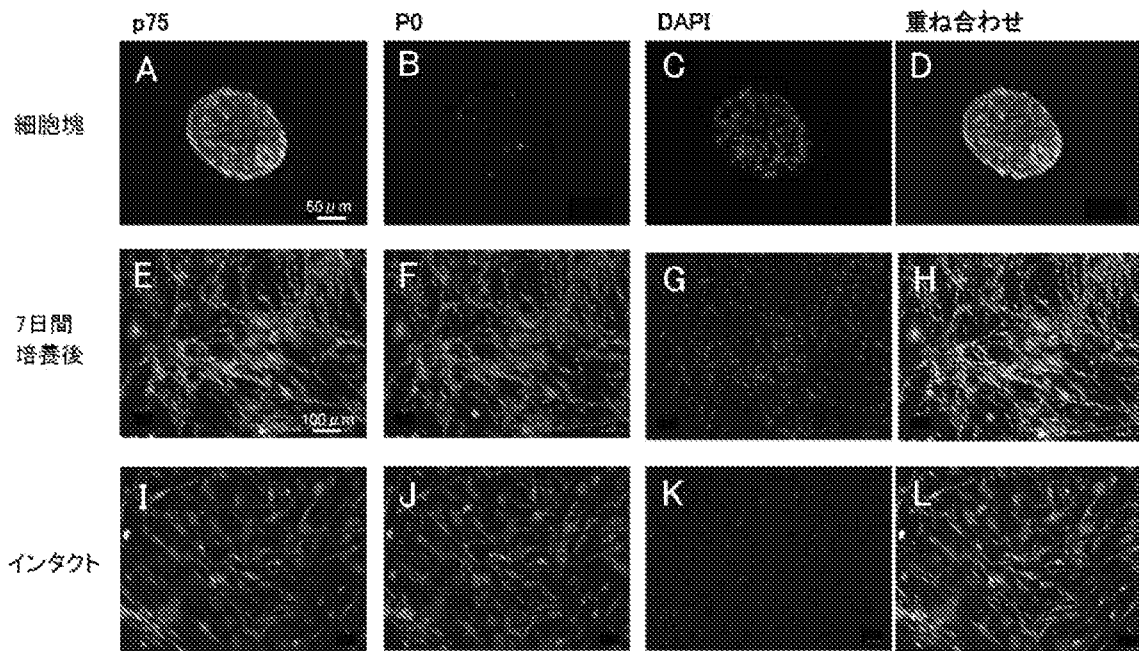
増殖細胞マーカー

未分化シュワン  
細胞マーカー

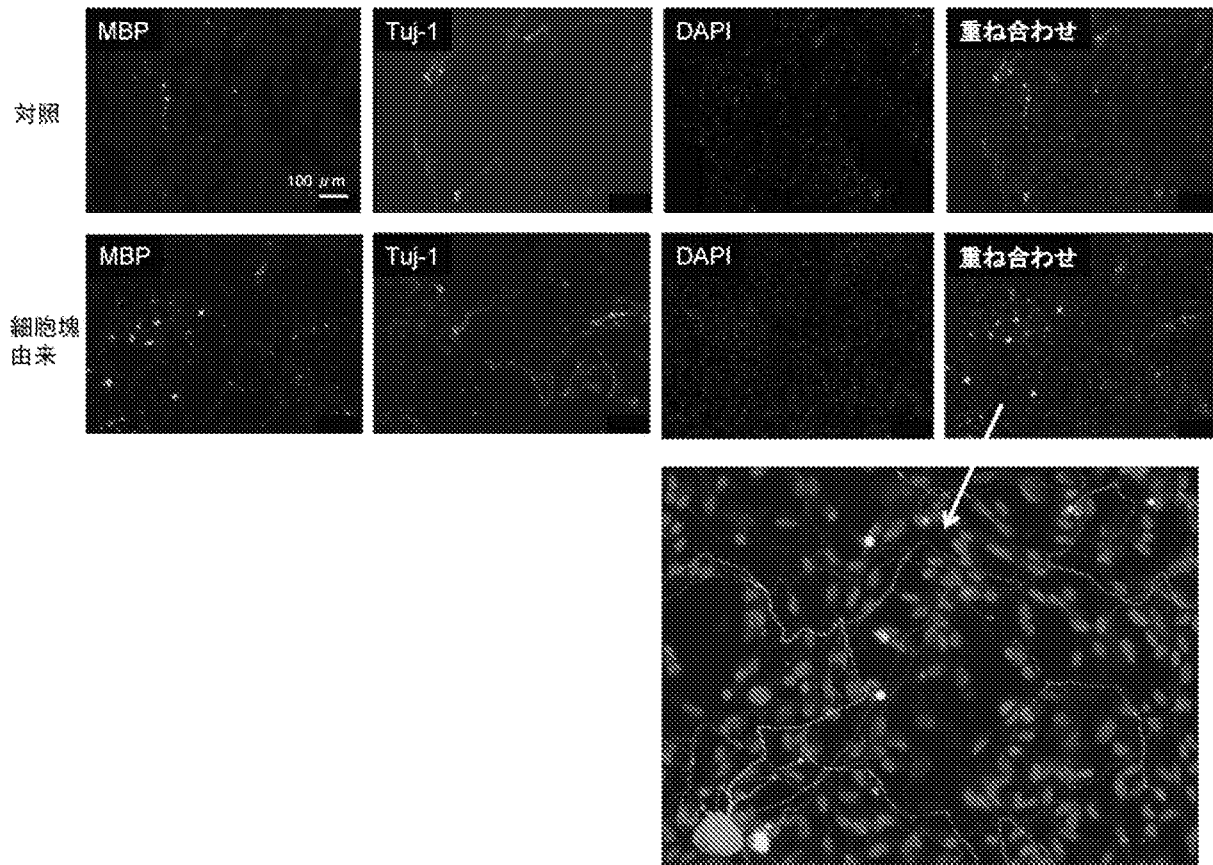
成熟シュワン細胞マーカー



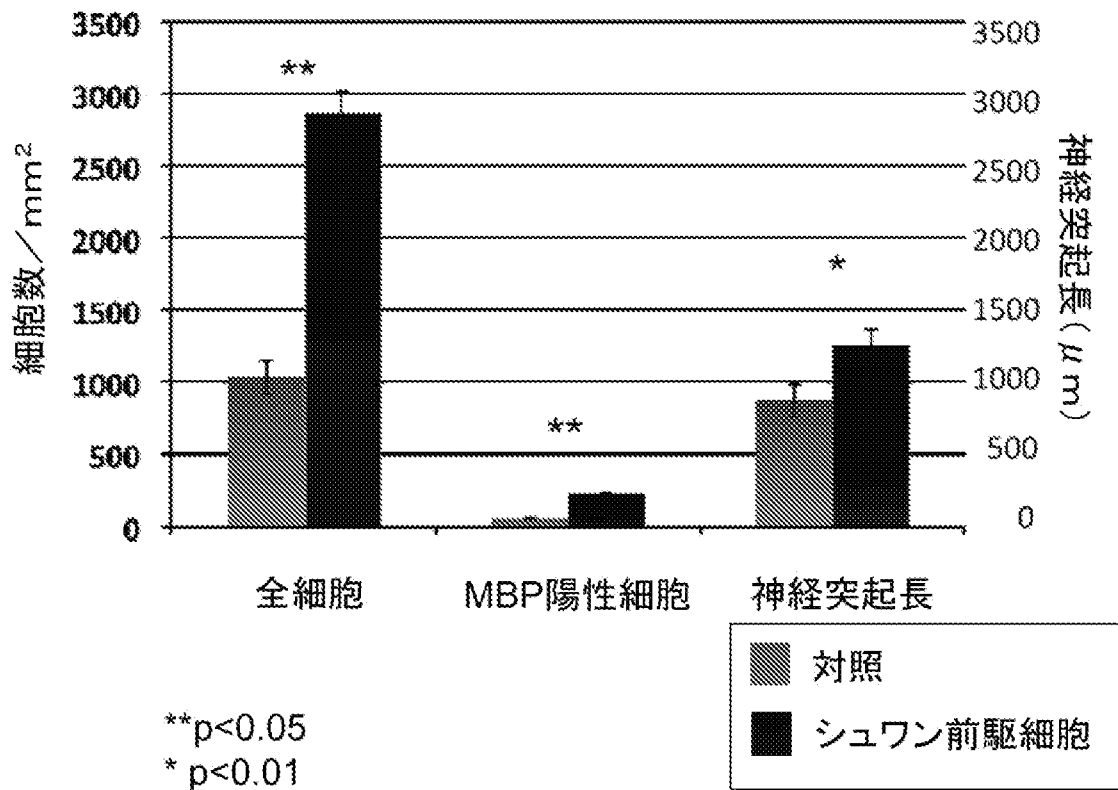
[図7]



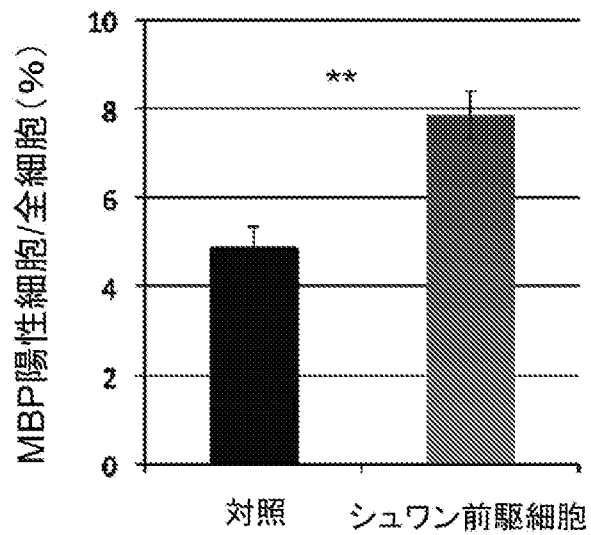
[図8]



[図9]

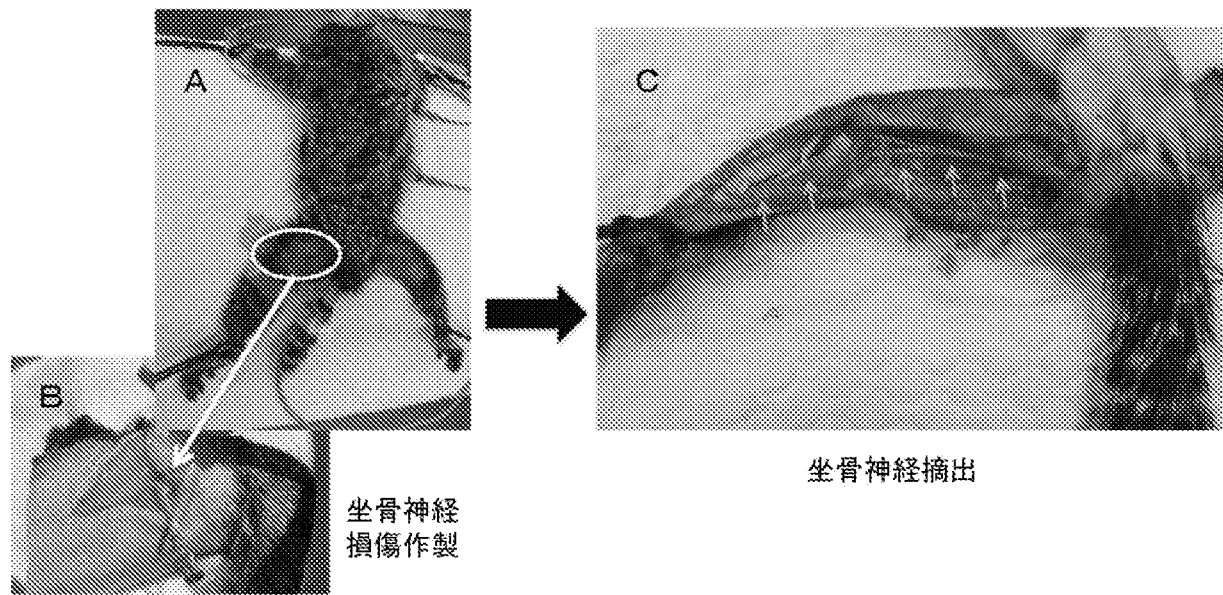


[図10]



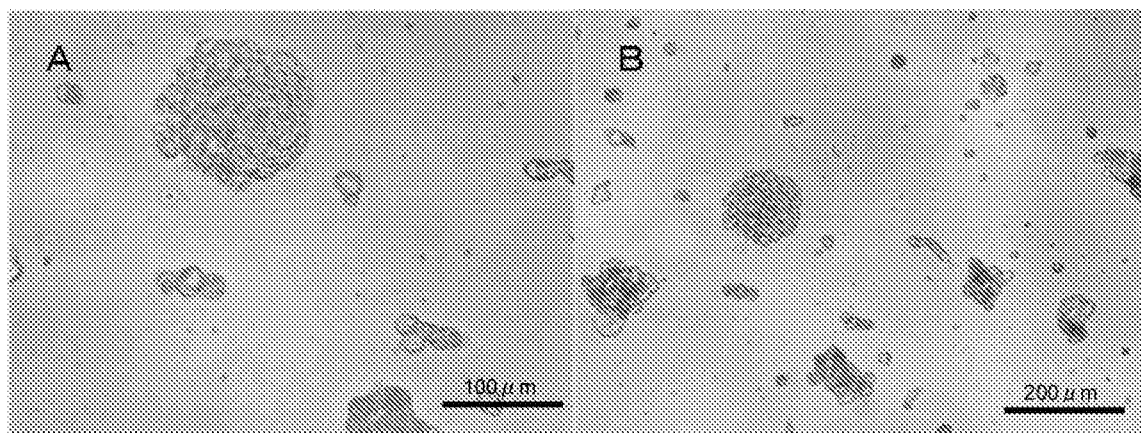
\*\*p&lt;0.05

[図11]



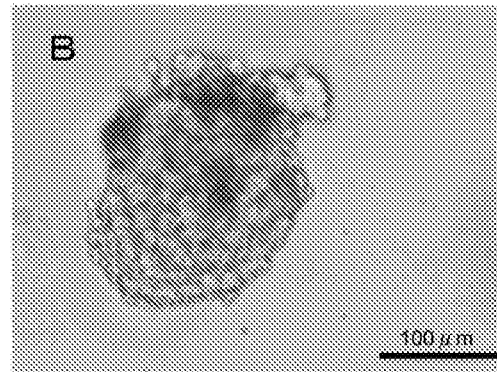
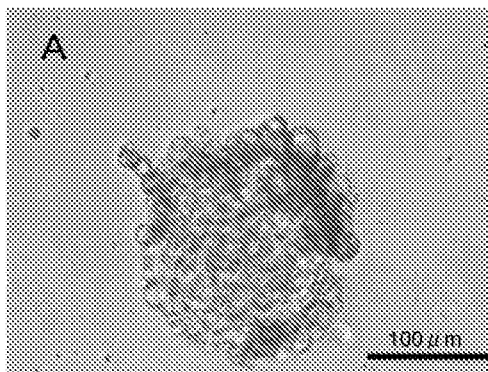
[図12]

損傷群で形成された細胞塊

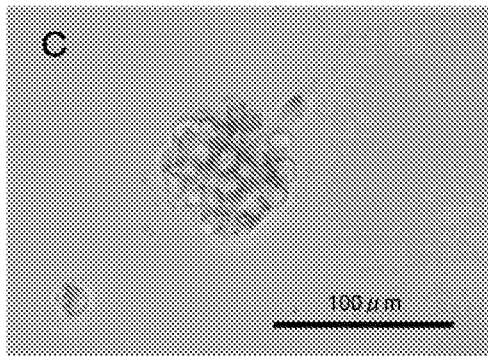


[図13]

## 2代目細胞塊



## 3代目細胞塊



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062915

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/079(2010.01) i, A61K35/30(2006.01) i, A61L27/00(2006.01) i, A61P25/02(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)  
C12N5/079, A61K35/30, A61L27/00, A61P25/02

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## 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 2000-83655 A (Hitoshi HIRATA), 28 March 2000 (28.03.2000), claim 1; paragraphs [0002], [0006] (Family: none)	1, 2, 5-7, 9-21 /3, 4, 8
P, X	Takehiko TAKAGI et al., "Sonsho Massho Shinkei Yurai no Mibunka Saibokai no Kaiseki", Dai 24 Kai Annual Research Meeting of the Japanese Orthopaedic Association, Abstracts, 25 August 2009 (25.08.2009), page S1072, 1-E-20	1-21
A	JP 2003-70465 A (Keio University), 11 March 2003 (11.03.2003), (Family: none)	1-21



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 October, 2010 (15.10.10)Date of mailing of the international search report  
26 October, 2010 (26.10.10)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062915

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KEILHOFF G., et al., In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits., J.Neurosci.Methods, 1999, Vol. 89, No. 1, pp. 17-24	1-21
A	RODRIGUEZ F.J., et al., Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration., Exp.Neurol., 2000, Vol. 161, No. 2, pp. 571-584	1-21
A	Hiroshi HAMAOKA, "Experimental Studies on the Purification of Schwann Cells by Using Double Soft Agar Culture", Journal of the Jusen Medical Society, Kanazawa University, 1988, vol.97, no.4, pages 869 to 882	1-21
A	Mitsuru IKEDA et al., "A Novel Culture Method of Schwann Cell with the Serum-free Medium for Tissue-Engineered Nerve", Peripheral nerve, 2002, vol.13, no.1, pages 75 to 78	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/062915

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062915

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention in claim 1, the invention in claim 9 and the invention in claim 11 have such a common technical feature as Schwann precursor cell. However, the above-said technical feature cannot be regarded to be a special technical feature, since the technical feature does not make contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1. Furthermore, there is no other same or corresponding special technical feature among those inventions. The following three inventions (invention groups) are involved in claims.

(Invention 1) the inventions in claims 1 - 8  
Method for multiplication of Schwann precursor cell

(Invention 2) the inventions in claims 9, 10  
Method for production of Schwann precursor cell

(Invention 3) the inventions in claims 11 - 21  
Transplantation composition containing Schwann precursor cell

Document 1: JP 2000-83655 A (Hitoshi HIRATA), 28 March 2000 (28.03.2000)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/079(2010.01)i, A61K35/30(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P25/02(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. C12N5/079, A61K35/30, A61L27/00, A61P25/02		
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		
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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
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 2000-83655 A (平田仁) 2000.03.28, 請求項1、第【0002】、 【0006】欄 (ファミリーなし)	1, 2, 5-7, 9-21 /3, 4, 8
P, X	高木岳彦, 他, 損傷末梢神経由来の未分化細胞塊の解析, 第24回日 本整形外科学会基礎学術集会抄録集, 2009.8.25, p. S1072, 1-E-20	1-21
A	JP 2003-70465 A (学校法人慶應義塾) 2003.03.11, (ファミリーな し)	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <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 15. 10. 2010	国際調査報告の発送日 26. 10. 2010	
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) 千葉 直紀 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3434

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
A	KEILHOFF G., et al., In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits., J.Neurosci.Methods, 1999, Vol. 89, No. 1, pp. 17-24	1-21
A	RODRIGUEZ F.J., et al., Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration., Exp.Neurol., 2000, Vol. 161, No. 2, pp. 571-584	1-21
A	浜岡寛士, 二重寒天培地を用いたシュワン細胞の単離培養に関する実験的研究, 金沢大学十全医学会雑誌, 1988, Vol. 97, No. 4, pp. 869-882	1-21
A	池田崇, 他, ハイブリット型人工神経のための人工アミノ酸付加無血清培地による Schwann 細胞の培養, 末梢神経, 2002, Vol. 13, No. 1, pp. 75-78	1-21

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
  
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
  
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1 に係る発明、請求項 9 に係る発明、請求項 11 に係る発明は、それぞれシュワン前駆細胞という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲には以下に示す 3 つの発明（群）が含まれる。

- （発明 1）請求項 1－8 に係る発明  
シュワン前駆細胞を増殖させる増殖方法。
- （発明 2）請求項 9、10 に係る発明  
シュワン前駆細胞の製造方法。
- （発明 3）請求項 11－21 に係る発明  
シュワン前駆細胞を含有する移植組成物。

文献 1：JP 2000-83655 A（平田仁）2000.03.28