

(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  
2014年9月4日(04.09.2014)



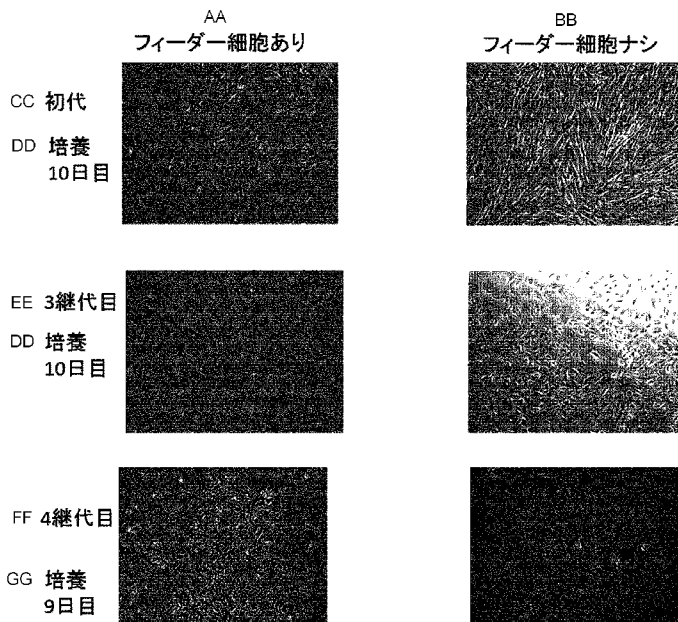
(10) 国際公開番号  
WO 2014/132936 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/074 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054400
- (22) 国際出願日: 2014年2月25日(25.02.2014)
- (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 2013-039341 2013年2月28日(28.02.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 富山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF TOYAMA) [JP/JP]; 〒9308555 富山県富山市五福3190 Toyama (JP).
- (72) 発明者: 二階堂 敏雄 (NIKAIDO Toshio); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP). 小池 千加 (KOIKE Chika); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP).
- (74) 代理人: 大谷 嘉一 (OTANI Kaichi); 〒9330023 富山県高岡市末広町14-45 Toyama (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, LT, 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,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SELECTIVELY AMPLIFYING PLACENTAL OR PERIPLACENTAL TISSUE STEM CELLS

(54) 発明の名称: 胎盤・胎盤周囲組織幹細胞の選択的増幅方法



AA WITH FEEDER CELLS  
 BB WITHOUT FEEDER CELLS  
 CC PRIMARY CULTURE  
 DD DAY 10 OF CULTURE  
 EE THIRD SUBCULTURE  
 FF FOURTH SUBCULTURE  
 GG DAY 9 OF CULTURE

(57) Abstract: [Problem] To provide a method for selectively and highly amplifying stem cells that are derived from a periplacental tissue, etc. [Solution] A method which comprises primary-culturing and sub-culturing, at a low cell concentration, a cell mass containing stem cells derived from the placenta, amnion, umbilical cord, etc., in the presence of feeder cells to efficiently prepare stem cells derived from, for example, the placenta, amnion or umbilical cord.

(57) 要約: 【課題】胎盤周囲組織などに由来する幹細胞の選択的かつ高増幅する方法を提供する。【解決手段】胎盤・羊膜、臍帯などに由来する幹細胞を含む細胞集団をフィーダー細胞の存在下で、かつ、低細胞濃度で初期培養および継代培養することにより、胎盤・羊膜、臍帯など、胎盤などに由来する幹細胞を効率的に調製する。

WO 2014/132936 A1

MZ, NA, RW, SD, SL, 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))

## 明 細 書

発明の名称：胎盤・胎盤周囲組織幹細胞の選択的増幅方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、胎児育成に関与する組織（胎盤、羊膜、臍帯）から上皮系幹細胞および間葉系幹細胞を選択的に増幅する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 胎児と母体の複合組織である胎盤および胎児組織である羊膜・臍帯は、胎児育成に関与する組織である。

胎盤は、胚および胎児の組織と母体の組織とが緊密に接着した複合組織であり、両者の間に物質の交換や細胞レベルの相互作用などの生理的に重要な役割を果たしている。

羊膜は、外胚葉由来の上皮細胞と中胚葉由来の間葉系細胞から構成される胚体外組織であり、多能性幹細胞としての特性を有する細胞群を含有することが確認されており、例えば、ヒト羊膜上皮由来幹細胞の肝細胞やインスリン産生細胞への分化、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の軟骨細胞や心筋細胞へ分化が知られている（特許文献1）。

臍帯は、外層を取り囲む羊膜とワルトンのゼリーと呼ばれる膠様組織及び臍動脈、臍静脈で構成される組織であり、ワルトンのゼリーには間葉系幹細胞が存在し、軟骨細胞、脂肪組織、骨に分化することが知られている（非特許文献1）。

胎盤は合胞体栄養細胞、Langhans細胞、線維芽細胞、組織球、脱落膜細胞など多数の細胞が含まれ、これらの細胞の中でCD59陽性を示す細胞が幹細胞として有望である。

[0003] 一方、放射線照射したヒトもしくはマウス細胞（フィーダー細胞）が、上皮細胞などを培養する際の増殖促進のために使用されている。

例えば、MRC-5（ヒト胎児肺線維芽細胞）、3T3（マウス皮膚線維芽細胞）、STO（チオグアニン／ウバイン耐性マウス胎児線維芽細胞）

などが知られている。

[0004] 特許文献1：日本国特開2003-231639号公報

特許文献2：PCT/JP2012/080375

非特許文献1：Cellular Reprograming, 14(5), 448-455 (2012).

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] ヒト胎盤およびその周囲組織は、出産後の排泄物として廃棄されるものであるため、生体材料として使用する上での倫理的問題が少ない。

また、胎盤周囲組織の中で羊膜は、免疫学的にも特殊な性質を有しており、免疫原性が低いため、他家移植による免疫拒絶反応も比較的穏やかであることが期待されているものの、羊膜由来細胞の細胞集団から、選択的に上皮系幹細胞や間葉系幹細胞を取得する技術や効率良く細胞を増幅する技術に関しては、改良技術が求められている。

同様に、胎盤周囲組織に含まれる種々の細胞から、選択的に間葉系幹細胞を取得し、効率良く細胞を増幅する技術に関し、改良技術が求められている。

### 課題を解決するための手段

[0006] このような状況下、本発明者らは、哺乳動物の胎盤周囲組織の細胞、特に羊膜由来の間葉系細胞について、効率よく簡便に、長期間にわたり継代培養可能な増殖能と高い分化能を兼ね備えた間葉系幹細胞集団を調製する方法に関して、国際特許出願（特許文献2）を行うとともにさらに研究を進め、ヒト羊膜細胞から増殖能の高い上皮系幹細胞・間葉系幹細胞を選択的に取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

以下、本発明を詳細に説明する。

[0007] 本発明は、（A）哺乳動物の胎盤または胎盤周囲組織から幹細胞を含む細胞集団を採取するステップと、（B）前記採取された細胞集団を、 $1\sim 500$  /  $\text{cm}^2$ の細胞濃度において播種し、フィーダー細胞の存在下に2～3週間共培養（初期培養）するステップと、（C）前記初期培養された細胞集団を1～

500/cm<sup>2</sup>細胞濃度において播種し、フィーダー細胞存在下に1週間に2回の培地交換を行う継代培養を2～5回繰り返すステップと、(D)前記継代培養において円形状の形態を有する細胞のコロニーが形成されるまで同一の培養皿で培養を維持するステップを含む、胎盤または胎盤周囲組織幹細胞の選択的増幅方法を提供するものである。

- [0008] 前記哺乳動物は、ヒトをはじめとする霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、イヌ、ウサギ、モルモット、ラット、マウスなどが挙げられるが、ヒトが好ましい。
- [0009] 前記胎盤周囲組織は、羊膜および臍帯が挙げられるが、羊膜が好ましい。
- [0010] 前記ステップ(B)および(C)における細胞濃度は、5～50/cm<sup>2</sup>であることが好ましい。
- [0011] 前記ステップ(B)および(C)におけるフィーダー細胞は、ガンマ線など放射線で処理された、Swiss/3T3、NIH/3T3、BALB/3T3、3T3J2などマウス3T3細胞が好ましい。
- [0012] 本発明における共培養は、同一の培養皿で培養することが好ましいが、胎盤または胎盤周囲組織からの幹細胞を含む細胞集団とフィーダー細胞とが接触しないように膜などで隔壁を設けて(非接触の状態)培養してもよい。
- [0013] 前記胎盤または胎盤周囲組織の幹細胞は、形態に関係なく、20回以上の細胞分裂が可能であることが望ましい。
- [0014] 胎盤周囲組織の一つである羊膜に由来の幹細胞は、円形状の形態、かつ20回以上の細胞分裂(population doubling)が可能であることが望ましい。

### 発明の効果

- [0015] 本発明に係る幹細胞集団の調製方法は、高い分化能と増殖能を有する胎盤・胎盤周囲組織幹細胞、特に羊膜間葉系幹細胞集団・羊膜上皮系幹細胞集団を、哺乳動物の胎盤・胎盤周囲組織から効率よく簡便に調製することを可能とする。

また、本発明に係る方法により調製された羊膜幹細胞集団などの胎盤周囲組織幹細胞を用いることにより、倫理的問題が少なく、かつ、他家移植によ

る免疫拒絶反応が少ない安全な再生医療が可能となる。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団の培養状態を示す図である。

[図2]ヒト羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団から形成された細胞集団（コロニー）の転写因子の発現（mRNA）を示す図である。（a）ヒト羊膜間葉系幹細胞コロニー／フィーダー細胞（ $3 \times 10^4$ ）（b）ヒト羊膜間葉系幹細胞コロニー／フィーダー細胞（ $1 \times 10^5$ ）（c）ヒト羊膜間葉系幹細胞コロニー／フィーダー細胞（ $3 \times 10^5$ ）（d）フィーダー細胞（3T3-J2）のみをそれぞれ示す。

### 発明を実施するための形態

[0017] 「胎盤周囲組織」とは哺乳動物の発生過程において形成される、羊膜、臍帯など胎児育成に関与する組織である。

[0018] 「羊膜」とは、哺乳動物の発生過程において形成される、胎子と羊水を包む膜である。本発明で使用される羊膜は、好ましくはヒトの羊膜である。

[0019] 「細胞集団」とは、当該技術分野において通常理解される意味であり、複数の細胞の集まりのことである。

採取された羊膜幹細胞の細胞集団、臍帯及び胎盤周囲組織の細胞集団には、種々の増殖能、寿命、性質を有する細胞が混在している。

[0020] 羊膜などの胎盤周囲組織は、通常の外科的手法により得ることができる。または、分娩後に廃棄される胎盤から得ることも可能である。

ヒト胎盤周囲組織は、例えばインフォームドコンセントを得た妊婦から、帝王切開により採取することができる。

[0021] 胎盤周囲組織の一つである羊膜の場合、本発明の方法では、ステップ（A）として、哺乳動物の羊膜から幹細胞の細胞集団を採取する。

羊膜は、上皮細胞と間葉系細胞とから構成されている。

上皮系細胞は、例えば、羊膜をヒアルロニダーゼやデオキシリボヌクレアーゼなどの存在下に断片化し、トリプシンなどの酵素で羊膜組織片を消化し、得られた消化液を、ガーゼ等を使用したろ過処理したろ液から採取すれば

よい。

また、間葉系細胞は、上記したろ過処理でガーゼ等に残った羊膜組織片を、コラゲナーゼなどの酵素で羊膜組織片を消化し得られた消化液から採取すればよい。

また、哺乳動物の羊膜から幹細胞の細胞集団の採取は、特開2003-231639号公報に記載される方法に準じて行うことができる。

[0022] 胎盤周囲組織の一つである臍帯から幹細胞集団を採取する場合、外側の羊膜及び臍動脈、臍静脈を剥離する。

その他部位を細切し、トリプシン、コラゲナーゼなどの酵素で臍帯ワルトンのゼリーの断片を消化し、得られた消化液を、ガーゼ等を使用したろ過処理したろ液から採取すればよい。

[0023] 胎盤から幹細胞集団を採取する場合、胎盤から十分に血液を除去した後、組織を細切し、ヒアルロニダーゼやデオキシリボヌクレアーゼなどの存在下に断片化し、トリプシンなどの酵素で羊膜組織片を消化し、得られた消化液を、ガーゼ等を使用したろ過処理したろ液から採取すればよい。

[0024] 本発明方法では、フィーダー細胞を使用する。

このフィーダー細胞で好ましいものは、Swiss/3T3、NIH/3T3、BALB/3T3、3T3J2などマウス3T3細胞であり、それはガンマ線など放射線で処理されたものである。

[0025] 本発明方法で使用されるフィーダー細胞の濃度は、 $3 \times 10^2 / \text{cm}^2 \sim 5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 、好ましくは、 $3 \times 10^3 / \text{cm}^2 \sim 5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ である。

[0026] 本発明の方法で得られる羊膜幹細胞は、円形状の形態、かつ50回以上の細胞分裂 (population doubling) が可能である。

[0027] 本発明の方法で得られる臍帯幹細胞は、紡錘状の形態で、かつ浮遊培養により20回以上の細胞分裂 (population doubling)、幹細胞としての特性維持が可能である。

また、本発明の方法で得られる胎盤からの細胞集団は、形態に関係なく、

かつ20回以上の細胞分裂 (population doubling) が可能である。

### 実施例 1

[0028] 以下、本発明を参考例、実施例で説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

[0029] <羊膜幹細胞の細胞集団の調製>

インフォームドコンセントを得たヒト妊婦を帝王切開し、ヒト羊膜を入手した。

得られた羊膜から血液などを除去した後、直ちに0.03%ヒアルロニダーゼと0.025%デオキシリボヌクレアーゼⅠが入ったリン酸塩緩衝液に浸し、手術用ハサミにより断片化した。

その後、0.25% trypsin / DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 溶液中、37℃で30分間インキュベートすることにより羊膜組織断片を消化し、消化溶液をガーゼで濾過する操作を6~8回繰り返した。

この工程により、羊膜組織断片からヒト羊膜上皮幹細胞を含む細胞集団を採取した。

[0030] ガーゼに残った羊膜組織断片を、0.075%コラゲナーゼ-0.0075%DNアーゼⅠ / DMEM溶液中、37℃で15分間インキュベートすることにより消化した。

得られた消化溶液をガーゼで濾過し、ヒト羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団を採取した。

[0031] <フィーダーの調製>

マウス線維芽細胞3T3J2細胞を10%牛胎児血清、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンを含むDMEM培地を用い、37℃、5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。

3~4日でコンフルエントになったところで0.05%トリプシン、0.004%EDTAを含むリン酸塩緩衝液処理することにより剥離回収した。



回収した細胞で継代培養を行った。

0.05%トリプシン、0.004%EDTAを含むリン酸塩緩衝液処理により剥離回収した3T3J2細胞を放射線処理(60Gry)した後、 $1 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>で播種し、一晚培養したものをフィーダーとした。

[0032] <羊膜幹細胞の選択的増幅>

ヒト羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団を5個/cm<sup>2</sup>~50個/cm<sup>2</sup>ディッシュで播種し、10%牛胎児血清、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンを含むDMEM培地を用い、37℃、5%炭酸ガスインキュベーター中でフィーダー細胞存在下または不存在下に培養した。1週間に2回培地を交換する。7~10日後にコロニーが見えてくる(図1の初代培養)。

20~30日間培養した後、0.05%トリプシン、0.004%EDTAを含むリン酸塩緩衝液処理することにより剥離回収し、再度、上記と同条件で3T3J2細胞をフィーダー細胞として用いた上に播種すると7~10日後にコロニーが見えてくるようになる。これを繰り返す(図1の継代培養)。

[0033] ヒト羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団は、初代培養では、紡錘形の細胞と円形の細胞が存在するが、継代を重ねることで、円形の細胞のみになっていた。

一方、ヒト羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団は、初代培養では、フィーダー細胞非存在下で増殖を示したが、継代を重ねるごとに、増殖しなくなった。

[0034] ヒト羊膜間葉系幹細胞を含む細胞集団から形成された細胞集団(コロニー)は、OCT3/4、Nanog、c-mycおよびKLF4などの転写因子のmRNAを発現する(図2)。

### 産業上の利用可能性

[0035] 本発明の方法は、長期間にわたり継代培養することができ、かつ、増殖能の高い胎盤・胎盤周囲組織の幹細胞、特に羊膜由来の上皮系幹細胞および間

葉系幹細胞を調製できる。

本発明は、再生医療分野などにおいて利用される胎盤・胎盤周囲組織の幹細胞、特に羊膜由来幹細胞の効率的な調製に極めて有用な手段を提供するものである。

## 請求の範囲

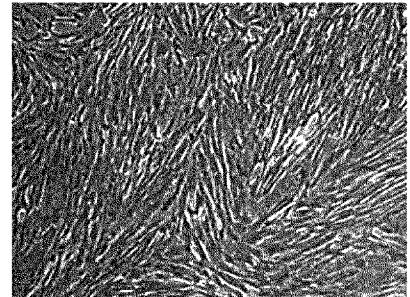
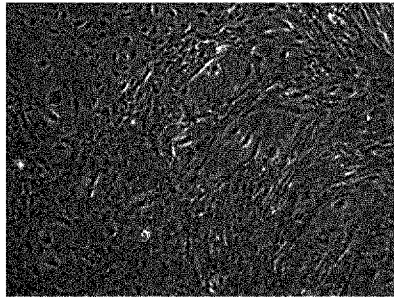
- [請求項1] (A) 哺乳動物の胎盤または胎盤周囲組織から幹細胞を含む細胞集団を採取するステップと、(B) 前記採取された細胞集団を、 $1\sim 500/c m^2$ の細胞濃度において播種し、フィーダー細胞の存在下に2～3週間共培養(初期培養)するステップと、(C) 前記初期培養された細胞集団を $1\sim 500/c m^2$ 細胞濃度において播種し、フィーダー細胞存在下に1週間に2回の培地交換を行う継代培養を2～5回繰り返すステップと、(D) 前記継代培養において円形状の形態を有する細胞のコロニーが形成されるまで共培養を維持するステップを含む、胎盤または胎盤周囲組織幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項2] 哺乳動物の胎盤または胎盤周囲組織が、胎盤周囲組織である請求項1に記載の幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項3] 胎盤周囲組織が羊膜または臍帯である請求項2に記載の幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項4] 羊膜がヒト羊膜である請求項3に記載の幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項5] 初期培養および/または継代培養における共培養が、同一の培養皿で培養を行うものである、請求項1～4のいずれかに記載の幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項6] 初期培養および/または継代培養における共培養が、幹細胞を含む細胞集団とフィーダー細胞とが非接触の状態で行うものである、請求項1～4のいずれかに記載の幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項7] フィーダー細胞がマウス3T3である請求項1～6のいずれかに記載の幹細胞の選択的増幅方法。
- [請求項8] フィーダー細胞の濃度が $3\times 10^2/c m^2\sim 5\times 10^5/c m^2$ 、である請求項1～7のいずれかに記載の幹細胞の選択的増幅方法。

[図1]

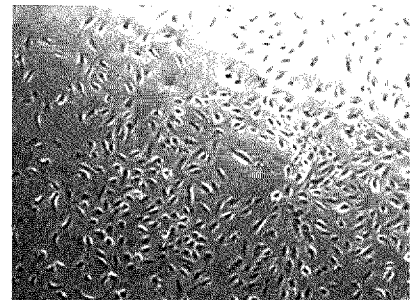
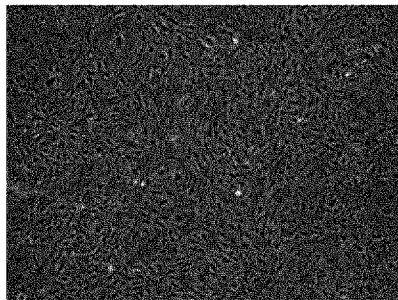
フィーダー細胞あり

フィーダー細胞ナシ

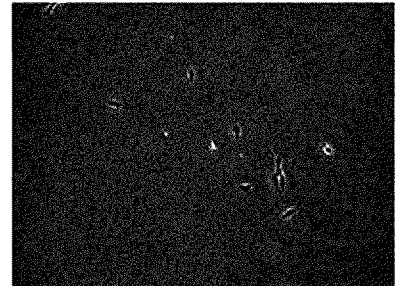
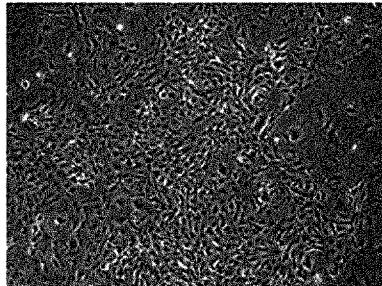
初代

培養  
10日目

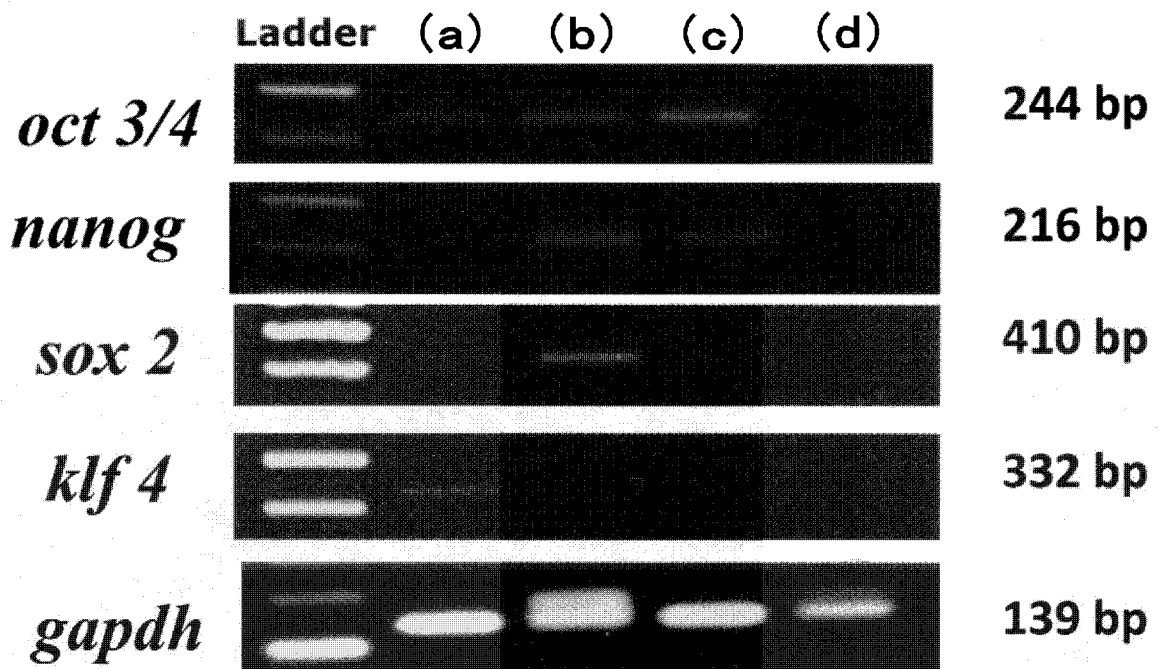
3継代目

培養  
10日目

4継代目

培養  
9日目

[図2]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/054400

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)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)  
C12N5/0775, C12N5/074

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2008-509699 A (Cell Research Corporation Pte Ltd.), 03 April 2008 (03.04.2008), & JP 2013-066473 A & US 2006/0078993 A1 & GB 2432166 A & EP 1789534 A & EP 2597149 A1 & WO 2006/019357 A1	1-3, 5, 7, 8/4, 6
Y/A	DIAZ-PRADO S. et al., Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, Vol.111, pp.846-857	4/1-3, 5-8
Y/A	JP 10-295369 A (Japan Tobacco Inc.), 10 November 1998 (10.11.1998), (Family: none)	6/1-5, 7, 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 23 April, 2014 (23.04.14)	Date of mailing of the international search report 13 May, 2014 (13.05.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054400

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chika KOIKE et al., "Stem cell -Seishoku tono Kakawari- Seishoku to Kan'yokei Kansaibo (3) 'Yomaku Yurai Saibo'", HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 2009, vol.16, no.3, pages 233 to 240	1-8
A	MIKI T. et al., Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells, 2005, Vol.23, No.10, pp.1549-1559	1-8
A	JP 2005-151907 A (Shigeo SAITO), 16 June 2005 (16.06.2005), (Family: none)	1-8
A	HAN Y. et al., Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into dermal fibroblasts in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, Vol.413, pp.561-565	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)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. C12N5/0775, C12N5/074		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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)、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2008-509699 A (セルリサーチ コーポレイション ピーティイー リミ テッド) 2008.04.03 & JP 2013-066473 A & US 2006/0078993 A1 & GB 2432166 A & EP 1789534 A & EP 2597149 A1 & WO 2006/019357 A1	1-3, 5, 7, 8/ 4, 6
<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 23.04.2014	国際調査報告の発送日 13.05.2014	
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) 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3960



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
Y/ A	DIAZ-PRADO S. et al., Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, Vol.111, pp.846-857	4/ 1-3, 5-8
Y/ A	JP 10-295369 A (日本たばこ産業株式会社) 1998.11.10 ファミリーなし	6/ 1-5, 7, 8
A	小池 千加、外3名、 Stem cell-生殖とのかかわりー 生殖と間葉系幹細胞 (3)「羊膜由来細胞」. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 2009, Vol.16, No.3, pp.233-240	1-8
A	MIKI T. et al., Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells, 2005, Vol.23, No.10, pp.1549-1559	1-8
A	JP 2005-151907 A (齋藤 成夫) 2005.06.16 ファミリーなし	1-8
A	HAN Y. et al., Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into dermal fibroblasts in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, Vol.413, pp.561-565	1-8