

平成27年6月11日判決言渡 同日原本受領 裁判所書記官

平成26年(行ケ)第10081号 審決取消請求事件

口頭弁論終結日 平成27年5月14日

判 決

原 告 オルガノジェネシス インク.

訴訟代理人弁理士	廣	江	武	典
同	西	尾		務
同	服	部	素	明
同	橋	本		哲
同	谷	口	直	也
同	廣	江	政	典
同	隅	田	俊	隆
同	吉	田	哲	基
同	中	山	公	博

被 告	特	許	庁	長	官
指 定 代 理 人	郡	山			順
同	高		美	葉	子
同	板	谷	一		弘
同	根	岸	克		弘

主 文

- 1 原告の請求を棄却する。
- 2 訴訟費用は原告の負担とする。

- 3 この判決に対する上告及び上告受理申立てのための付加期間を
30日と定める。

事実及び理由

第1 請求

特許庁が不服2010-6184号事件について平成25年11月20日に
した審決を取り消す。

第2 事案の概要

1 特許庁における手続の経緯等

- (1) 原告は、平成11年11月19日、発明の名称を「生物工学的組織構築物およびそれを生成および使用する方法」とする発明について国際特許出願（PCT/US99/27505。パリ条約による優先権主張；平成10年11月19日（以下「本願優先権主張日」という。）、優先権主張国：米国。パリ条約による優先権主張：平成11年6月24日、優先権主張国：米国。請求項の数30。以下「本願」という。）をし、平成13年5月21日に日本国国内段階への移行手続を行ったところ（特願2000-582537。甲9）、平成21年11月18日付けで拒絶査定を受けたことから、平成22年3月23日、これに対する不服の審判を請求した。
- (2) 特許庁は、前記(1)の審判請求を不服2010-6184号事件として審理し、平成24年7月30日付けで拒絶理由通知をしたところ、原告から平成25年1月31日付け誤訳訂正書（請求項の数25）により特許請求の範囲等の補正を受け、さらに同年3月12日付けで拒絶理由通知をしたところ、原告から同年9月18日付け手続補正書により特許請求の範囲等を補正する内容の補正（請求項の数25。以下「本件補正」という。）を受けたが、同年11月20日、「本件審判の請求は、成り立たない。」との審決（以下「本件審決」という。）をし、その謄本は、同年12月3日、原告に送達された（甲8、10、13～16）。

(3) 原告は、平成26年4月1日、本件審決の取消しを求める本件訴訟を提起した。

2 特許請求の範囲の記載

本件補正後の特許請求の範囲の請求項1の記載は、次のとおりである（甲8）。以下、この請求項1に記載された発明を「本願発明」といい、本願に係る明細書（甲10及び甲8により訂正された甲9）を「本願明細書」という。

【請求項1】

培養線維芽細胞によって合成および組立てられる細胞外マトリックスの層を産生する条件下で成長し、前記培養線維芽細胞が前記細胞外マトリックスの層内に含まれている、線維芽細胞を包含する培養組織構築物であって、

前記細胞外マトリックスが、

(i) 4分の1差の67nm結合パターンを示す原線維および原線維束の包装組織化を示す原線維性コラーゲン；

(ii) デコリン；および

(iii) グリコサミノグリカンを包含し、そして該細胞外マトリックスが、培養条件の間、外因性マトリックス成分または合成構成員の不在下、化学的に定義された培養培地存在下で線維芽細胞を培養することによって産生されることを特徴とし、

前記化学的に定義された培養培地は、(I) 基礎栄養培地、(II) インスリン、(III) L-グルタミン又はL-グルタミン誘導体、および(IV) アスコルビン酸又はアスコルビン酸誘導体を含み、且つ未定義の動物臓器又は組織抽出物の無い培地であり、

前記未定義の動物臓器又は組織抽出物は、血清、下垂体抽出物、視床下部抽出物、胎盤抽出物、胚抽出物、並びにフィーダー細胞によって分泌されるタンパク質および因子である、

培養組織構築物。

3 本件審決の理由の要旨

(1) 本件審決の理由は、別紙審決書の写しのとおりである。要するに、本願発明は、本願優先権主張日前に頒布された刊行物1（特開昭64-10983号公報。甲1）に記載された発明（以下「引用発明」という。）並びに周知の技術的事項及び技術常識に基づいて当業者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法29条2項の規定により特許を受けることができない、というものである。

(2) 本件審決が認定した引用発明は、次のとおりである。

ヒト皮膚線維芽細胞の継代培養細胞をアスコルビン酸リン酸エステル及び10%（V/V）牛胎児血清（FCS）を含むダルベコズ・モディファイド・イーグルズ・ミニマル・エッセンシャル・メディウムで培養し、培養容器の器壁に該細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成せしめ、該組織を採取することを特徴とする当該細胞と細胞外マトリックスとからなる人工組織であって、該人工組織は、生体組織に存在する種々のプロテオグリカンが合成され、蓄積され、沈着しており、コラーゲン、プロコラーゲン、酸性グリコサミノグリカン（GAG）などからなる細胞外マトリックスの性状および含有割合が、動物の真皮に近似し、コラーゲンの型は $\alpha 1$ （I）、 $\alpha 2$ （I）、 $\alpha 1$ （III）および $\alpha 1$ （V）が含まれている人工組織。

(3) 本願発明と引用発明との対比

本件審決が認定した本願発明と引用発明との一致点及び相違点は、以下のとおりである。

ア 一致点

培養線維芽細胞によって合成および組立てられる細胞外マトリックスの層を産生する条件下で成長し、前記培養線維芽細胞が前記細胞外マトリックスの層内に含まれている、線維芽細胞を包含する培養組織構築物であって、

前記細胞外マトリックスが、

- (i) 原線維性コラーゲン；
- (ii) プロテオグリカン；および
- (iii) グリコサミノグリカン

を包含し、

そして該細胞外マトリックスが、培養条件の間、外因性マトリックス成分または合成構成員の不在下、培養培地存在下で線維芽細胞を培養することによって産生されることを特徴とし、

前記化学的に定義された培養培地は、(I) 基礎栄養培地、(III) L-グルタミン又はL-グルタミン誘導体、および(IV) アスコルビン酸又はアスコルビン酸誘導体を含む培地である、

培養組織構築物。

イ 相違点

(ア) 相違点 1

原線維性コラーゲンが、本願発明では「(i) 4分の1差の67nm結合パターンを示す原線維および原線維束の包装組織化を示す原線維性コラーゲン」であるのに対して、引用発明に含まれる「コラーゲン」の構造は不明である点。

(イ) 相違点 2

プロテオグリカンが、本願発明では「デコリン」であるのに対して、引用発明では「生体組織に存在する種々のプロテオグリカン」である点。

(ウ) 相違点 3

培養培地が、本願発明では、「化学的に定義された培養培地」であり、その成分に「(II) インスリン」を含み、「未定義の動物臓器又は組織抽出物の無い培地」、すなわち、「前記未定義の動物臓器又は組織抽出物は、血清、下垂体抽出物、視床下部抽出物、胎盤抽出物、胚抽出物、並

びにフィーダー細胞によって分泌されるタンパク質および因子」の無い培地であり、当該培地により「該細胞外マトリックス」が産生されるものであるのに対して、引用発明では、培養培地にインスリンを含んでおらず、また、牛胎児血清（FCS）を含む培養培地で細胞外マトリックスが産生されるものである点。

4 取消事由

- (1) 相違点3に係る容易想到性の判断の誤り（取消事由1）
 - ア 相違点3に係る構成の容易想到性の判断の誤り（取消事由1-(1)）
 - イ 作用効果の顕著性の認定判断の誤り（取消事由1-(2)）
- (2) 本件審決の手続違背（取消事由2）

第3 当事者の主張

- 1 取消事由1-(1)（相違点3に係る構成の容易想到性の判断の誤り）について

〔原告の主張〕

(1) 本件審決は、相違点3の容易想到性について、「本願発明は、引用発明において、無血清で培養すべく、周知のインスリンを添加し、細胞外マトリックスが無血清培地で期待どおり産生されることを確かめることで、相違点3に記載の本願発明の特定事項のごとくしたものであって、細胞外マトリックスが産生されることを確かめることは、当業者が何の創作性もなくなし得る単なる確認事項にすぎない。」と認定判断したが、以下のとおり、上記認定判断は誤りである。

(2) インスリンの添加について

ア 本件審決は、①「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用のあるインスリン」を無血清培地に添加することは周知の事項であると認定判断し、また、刊行物1（甲1）では、血清の入った培地であるが、臍線維芽細胞の培養において、インスリンを添加した培地で、

細胞外マトリックスの成分であるコラーゲンの合成が盛んになることを確認しており、これに基づいて、②「インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく、促進されることが分かる」と認定判断し、これらに基づいて、引用発明において、無血清で培養すべく、周知のインスリンを添加する程度のことは、当業者が何の困難性もなくなし得たことといえりと認定判断した。

イ 上記①の「全ての細胞に対して成長因子として働く作用のあるインスリン」との点について

刊行物N（甲7。以下、刊行物の引用については、本件審決が刊行物の引用において用いた「刊行物L～N」，「刊行物2，3」の表記を使用することがある。）の段落【0015】，【0018】及び【0020】には、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を、インスリンを含む無血清培地で培養した場合に、蛋白質等の産生が認められず、細胞が死滅ないし減少していることが記載され、また、刊行物L（甲5）の53頁右欄5～9行及び54頁左欄9～22行の記載から、無血清培地に添加されたインスリンは、単に線維芽細胞を維持する機能を有するにすぎず、線維芽細胞の「成長因子」として機能するものではないと理解されることからすれば、「インスリン」が「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用のある」ことが周知の事項であるとした本件審決の認定判断は誤りである。

仮に、「インスリン」が「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用」があることが周知であるとしても、後記(3)ウのとおり、「線維芽細胞を培養する」とことと、「線維芽細胞を培養することにより細胞外マトリックスを産生する」とこととは技術的意義が異なるから、上記周知事項が直ちに、「無血清で培養し、細胞外マトリックスを産生する際、インスリンを無血清培地に添加すること」が周知であることの根拠

とはなり得ず、まして、細胞外マトリックスを産生する際、インスリンを無血清培地に添加することについての動機付けとなるものではない。

ウ 上記②の「インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく、促進されることが分かる」との点について

刊行物 1 (甲 1) の「(刊 1 - 1 0)」(7 頁右下欄 5 行～8 頁右下欄末行。以下、刊行物の引用については、本件審決が刊行物の引用に際して付した「(刊○-○)」なる符号を使用することがある。)には、ある培地で線維芽細胞を培養することにより、細胞外マトリックスの成分であるコラーゲンの合成が盛んになったこと、及び当該培地中の「一成分として」インスリンが含まれていることを開示するにとどまり、インスリンがコラーゲン合成を促進した旨の記載はなく、インスリンとコラーゲン合成とを関係付ける技術的知見も存在せず、インスリンの技術的意義すら開示されていない。むしろ、刊行物 1 の「(刊 1 - 7)」(5 頁左下欄 9 行～6 頁右上欄 1 9 行)では、As-2-P (アスコルビン酸-2-リン酸エステル)を含み、インスリンを添加していない培地においてコラーゲンが産生されたことが記載され、刊行物 1 の「(刊 1 - 1 0)」には、コラーゲン合成の低下が、線維芽細胞のコラーゲン合成に対するアスコルビン酸エステルの刺激作用を弱めたことに起因する旨の記載があることに鑑みれば、当業者は、コラーゲン合成を促進する成分は、インスリンではなく、As-2-P であると認識するのが自然かつ合理的である。

したがって、刊行物 1 の記載に基づいて、「インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく、促進されることが分かる」とした本件審決の認定判断は誤りである。

エ 以上によれば、「インスリン」が「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用のある」ことは周知の事項でないから、無血清培地で細胞外マトリックスを産生する際、インスリンを添加すること

についての動機付けはなく、また、仮に上記事項が周知の事項であるとしても、このことは、無血清培地で細胞外マトリックスを産生する際、インスリンを添加することについての動機付けとはならない。

更に、刊行物1（甲1）には、「インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく、促進されること」は記載も示唆もないから、引用発明において、無血清培地で細胞外マトリックスを産生する際、インスリンを添加することは、当業者が容易になし得る程度のものではない。

したがって、「引用発明において、無血清で培養すべく、周知のインスリンを添加する程度のことは、当業者が何の困難性もなくなし得たことといえる」との本件審決の前記アの認定判断は誤りである。

(3) 細胞外マトリックスの産生について

ア 本件審決は、①「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項であり、無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた」と認定判断するとともに、②「線維芽細胞を無血清で培養することは、刊行物Lに記載のように古くから行われており、無血清で培養できることは技術常識であった」と認定判断した上、これらに基づいて、「無血清培地で細胞外マトリックスが必ず産生されるとまでは分からないとしても、引用発明のごとく血清添加培地では細胞外マトリックスが産生されており、かつ、無血清培地でも物質生産ができるという上記技術常識に照らせば、細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を当業者に抱かせることは明らかである」と認定判断した。

イ 上記①の「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項であり、無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた」との点について

刊行物M（甲6）の段落【0025】及び【0005】には、単に「ヒト腎細胞」の培養によりプロウロキナーゼを産生したことが示されているのみであり、また、血清濃度を減少させると細胞の増殖性が著しく低下させるか死滅し、所望の細胞生成物（蛋白質等）の収量が著しく減少するなどの問題があることが示され、さらに、インスリンを含有する無血清培地が、あらゆる細胞において蛋白質等の発現を可能にする旨の記載も示唆もない。特開2003-190273号公報（甲18）の段落【0014】には、線維芽細胞の培地から血清を除去すると、細胞死が誘導されることが、WO2007/080919号再公表公報（甲19）の段落【0004】、【0006】及び【0008】には、動物細胞の培養には通常、血清が添加された培地を用いて行われ、培地中の血清濃度を低下させることにより、細胞はその増殖性を著しく低下させるか又は死滅し、従来は無血清培地では、10%血清含有培地と比較して必ずしも十分な細胞増殖効果を得るに至っていないことが、それぞれ記載されている。また、刊行物N（甲7）の段落【0015】、【0018】及び【0020】は、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を、インスリンを含む無血清培地で培養しても、必ずしも血清含有培地で培養した場合と同様に蛋白質等を産生できるとは限らないことを示している。さらに、特開平8-308561号公報（甲11）の段落【0046】～【0049】は、血清含有培地でアルブミンを産生する肝細胞を、インスリンを含み、亜セレン酸ナトリウムを含有しない無血清培地で培養したところ、アルブミンの産生量が低下したことを示している。

これらの記載に鑑みれば、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞であっても、無血清培地の組成によっては、目的とする物質を産生することができず、細胞が死滅又は減少することもあることは明らかである。そのため、本願優先権主張日当時、無血清培地により蛋白質等の物質生

産を行うことは、特定の細胞及び培地に限って「可能」であるにすぎず、細胞及び培地組成を問わず、無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことが本願優先権主張日前から普通に行われているとはいえず、まして、無血清培地でも蛋白質等の物質を生産できることが技術常識であるということとはできない。

したがって、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項であり、無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた」とした本件審決の認定判断は誤りである。

ウ 上記②の「線維芽細胞を無血清で培養することは、刊行物Lに記載のように古くから行われており、無血清で培養できることは技術常識であった」との点について

一般に、細胞の「培養」には、蛋白質等を産生させるために培養することだけでなく、単に細胞を増殖させるために培養することも含まれる。そして、「細胞を増殖させるために培養すること」と、「蛋白質等を産生させるために培養すること」とは技術的意義が異なるから、前者が技術常識であるとしても、このことが当然に、後者が技術常識であることの根拠とはなり得ない。

そして、刊行物1（甲1）には、「種々の細胞は「分化」の過程で、コラーゲン、プロテオグリカンをはじめとする組織特異的な細胞外マトリックス成分（ECM）を合成し」（1頁左下欄15行～17行）と記載されているから、線維芽細胞が細胞外マトリックスを産生するには、分化（細胞が形態的、機能的に特殊性を獲得していくこと）が必要である。これに対して、刊行物L（甲5）は、ヒト線維芽細胞を無血清培養で「増殖」することについて開示するにすぎず、無血清培養における線維芽細胞の分化や細胞外マトリックスの産生についての技術的知見はない。

したがって、刊行物Lの「培養」は、線維芽細胞を「増殖」させることを意味するにすぎず、その結果、刊行物Lからは、せいぜい線維芽細胞を増殖させるために無血清で培養することが技術常識であるといえるだけで、線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することが技術常識であるとはいえない。

したがって、本件審決の刊行物L（甲5）についての上記認定判断が、「線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することが技術常識である」ことを意味するのであれば、かかる認定判断は誤りである。

エ 以上によれば、細胞及び培地組成を問わず無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項ではなく、無血清培地でも蛋白質等の物質を生産できることは技術常識ではないことに加え、線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することも技術常識ではないことから、引用発明において、「細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を当業者に抱かせること」はなく、本件審決の前記アの認定判断は誤りである。

オ 被告の主張(2)ウについて

(ア) 被告は、「線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することも技術常識ではない」としても、「アスコルビン酸リン酸エステル」を含む「引用発明のごとくの血清培地では細胞外マトリックスが産生されて」いるのだから、引用発明において、刊行物2（甲2）及び乙2に記載の周知の技術にならい、血清に代えてインスリンを添加することにより無血清培地とした場合であっても、引用発明の「アスコルビン酸リン酸エステル」の作用により細胞外マトリックスが産生されるであろうという期待を当業者に抱かせ

ることは明らかである旨主張する。

しかし、血清培地での培養により物質産生する細胞を無血清で培養しても、当然に同様に物質産生をすることができないことは前記イのとおりであるから（甲6，7，11），引用発明において、血清培地で細胞外マトリックスが産生されているとしても、このことが直ちに、無血清培地でも同様に、細胞外マトリックスが産生されるであろうという期待を当業者に抱かせることの根拠とはなり得ない。また、刊行物1（甲1）の実験結果は、あくまで「アスコルビン酸リン酸エステル」という特定の成分が細胞外マトリックス産生に寄与することを実証するにすぎず、それ以外の成分、例えば動物血清が細胞外マトリックス産生に寄与しないことを根拠付けるものではない。むしろ、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を無血清培地で培養した場合に否定的なことが記載されている甲6の段落【0005】、甲18の段落【0014】並びに甲19の段落【0006】及び【0008】の記載を考慮すれば、「アスコルビン酸リン酸エステル」を含んでいても、引用発明において、血清培地に代えて無血清培地を用いた場合には、線維芽細胞が十分に増殖・分化して細胞外マトリックスを産生することができないと認識するのが通常である。

(イ) 被告は、線維芽細胞を使用してインスリンを含有する無血清培地で蛋白質の生産を目的とする培養方法も普通に知られているから（乙2）、血清の代わりとなる物質を添加した無血清培地で線維芽細胞の増殖及び蛋白質等の産生が妨げられるような技術常識も存在しない旨主張する。

しかし、乙2は血管内皮増殖因子蛋白質に関するものであり、引用発明のような人工組織とは性質が大きく異なるから、「蛋白質」という極めて大枠で一致するとしても、乙2の開示内容は、培地組成も異なる

引用発明において無血清培地とした場合の細胞外マトリックス産生について予測する材料とはなり得ない。

(4) 相違点3に関する審判段階での原告の主張について

ア 本件審決は、無血清培地を用いる点について、刊行物1（甲1）には、「牛胎児血清等の動物血清を添加することが好ましい」と記載があるだけであり、好ましいとは、添加することが必須であることを意味するものではなく、また、特許請求の範囲にも血清の有無は記載されていないから、刊行物1には、血清を加えない態様も包含されると理解され、刊行物1の記載事項は、無血清培地で培養することについての阻害要因となり得ないと認定判断した。

しかし、「動物血清を添加することが好ましい」ことが、動物血清を添加することが必須であることを直ちに意味するものではないとしても、かかる記載に接した場合、特段の事情がない限り、当業者は「好ましい」態様である動物血清を添加する態様を選択するのが自然かつ合理的である。更に、前記(3)イのとおり、本願優先権主張日当時、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を無血清培地で培養しても、必ずしも蛋白質等を産生できるとは限らないことが知られている上、引用発明が血清を加えない態様を「包含する」こと自体は、何ら血清を加えない態様の技術的意義を開示ないし示唆するものではなく、しかも、刊行物1には、無血清で培養した場合の実施例の記載はなく、無血清で培養した場合にも同様に細胞外マトリックスからなる人工組織を生産することができることについての技術的説明もない。

これらの点を考慮すれば、刊行物1（甲1）の「動物血清を添加することが好ましい」ことが、動物血清を添加することが必須であることを意味するものではなく、引用発明が血清を加えない態様を「包含する」としても、そのことは、刊行物1の上記記載事項が、相違点3の構成であ

る無血清培地で培養することに至ることについての阻害要因となることを否定する根拠とはなり得ない。

したがって、本件審決の上記認定判断は誤りである。

イ 本件審決は、仮に、刊行物1（甲1）において血清を添加することが求められているとしても、血清には、価格変動や供給不安があること（刊行物2（甲2））、ロット間でばらつきがあること（刊行物3（甲3））、ウイルスやマイコプラズマの感染源となること（刊行物M（甲6））等の欠点があることが本願優先権主張日前から知られており、引用発明において、無血清とする強い動機があるといえる旨認定判断した。

しかし、前記(3)イのとおり、本願優先権主張日当時、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を無血清培地で培養しても、必ずしも蛋白質等を産生できるとは限らないことが知られており、まして、本願優先権主張日当時、線維芽細胞を無血清で培養して細胞外マトリックスを産生することができることは知られていない。他方、刊行物2及び3で指摘されている上記欠点は、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果を達成する上で支障とならず、刊行物Mで指摘されている上記欠点についても、無血清培地を用いる以外の技術手段により回避することが可能であるのに対し、無血清で培養した場合にはそもそも細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果を達成することができるかが不明である。

そうすると、当業者は、引用発明において、血清を用いた場合のメリットが無血清の場合のメリットよりも上であると考え、その結果、無血清培養を忌避するのが自然かつ合理的であるから、血清には各種の欠点があることが本願優先権主張日前から知られているとしても、このことは、引用発明において無血清とする強い動機付けとはなり得ない。

したがって、本件審決の上記認定判断は誤りである。

〔被告の主張〕

(1) インスリンの添加について

ア 原告の主張(2)イについて

本件審決が、「全ての細胞に対して成長因子として働く作用のある」と認定したのは、刊行物2（甲2）の段落【0027】の記載による。また、刊行物N（甲7）の段落【0002】及び【0003】によれば、従来からインスリンは、無血清培地において血清に代わる物質として知られていた。また、無血清培地は、乙1（36頁1行～12行）に記載のように、本願優先権主張日前から、市販されているほど当たり前のものであり、市販のものには血清代替物として大抵インシュリンが含まれている。

以上のことから、「全ての細胞」でないにせよ多くの例において、無血清培地で培養する際に血清に代わる物質としてインスリンを添加することが周知の事項として知られていたことは明らかである。

イ 原告の主張(2)ウについて

本件審決が、「インスリンの添加によりコラーゲンの合成が妨げられることなく、促進される」と認定したのは、本件審決にあるとおり、刊行物1（甲1）の「(刊1-10)」(本件審決30頁7～14行)の記載を根拠とするものである。したがって、本件審決は、(a)インスリンを添加した培地で、インスリン添加によりコラーゲンの合成は妨げられないこと、(b)As-2-P及びインスリンを添加した培地で、コラーゲン合成が促進されたこと、の2つの事項が分かることをいうものである。本件審決の「インスリンの添加によりコラーゲンの合成が妨げられることなく、促進される」との記載は、原告が主張するような「インスリンがコラーゲンの合成を促進した」という趣旨ではない。

そして、刊行物1（甲1）の3頁右上欄3～12行、5頁右下欄9～12行及び7頁左上欄4～7行の記載によれば、引用発明において、コラー

ゲン及び細胞外マトリックスの産生に寄与するのは引用発明の「アスコルビン酸リン酸エステル」である。そして、刊行物1の「(刊1-10)」に記載された「デキサメサゾン、インスリン、As-2-P、EGF および 10%FCS 添加ウィリアムス培地 E」は、引用発明の「アスコルビン酸リン酸エステル」の一種である As-2-P のコラーゲンの合成作用を調べるために設計された培地であり、これを用いた実験において、「腱線維芽細胞は活発にコラーゲンを合成して」いるから「(a)インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることがなく、(b)As-2-P 及びインスリンを添加した培地で、コラーゲン合成が促進された」ことが理解される。

ウ 前記アのとおり、無血清培地に血清に代わる物質としてインスリンを添加することが周知であり、前記イのとおり、インスリン添加によりコラーゲン合成が妨げられていないことから、「引用発明において、無血清で培養すべく、周知のインスリンを添加する程度のことは、当業者が何の困難性もなくなし得たことといえる。」とした本件審決の認定判断に誤りはない。

(2) 細胞外マトリックスの産生について

ア 原告の主張(3)イについて

刊行物M(甲6)の段落【0005】の記載は、発明が解決しようとする課題として記載されているのであって、段落【0011】によれば、刊行物M記載の発明は、上記課題を解決するため、インスリン、ペプトン及びトランスフェリンを含有させた無血清培地を用いることにより、蛋白質を大量に生産できることを見出したものである。ところで、刊行物M(甲6)の段落【0005】に「血清濃度の減少によって細胞はその増殖性を著しく低下させるか死滅」することが記載されているように、血清代替物の添加がない無血清培地では、細胞の増殖性が著しく低下するか死滅することは技術常識である。それを解決するために、無血清培地に増殖因子を

添加することが要求され（乙3（2頁右下欄13行）、甲19（7頁40～41行））、刊行物M（甲6）においては、請求項1に、無血清培地で細胞を増殖させる作用のあるインスリン等を添加することで、死滅等の課題を解決している。同様に、甲19の段落【0006】及び甲18の段落【0014】の各記載も、血清を除去するだけでは、細胞が死滅するが、血清代替物であり細胞増殖因子であるインスリンや TGF-β の添加により、細胞死を抑制できることを示している。したがって、甲6、甲18及び甲19の記載は、無血清培地で細胞外マトリックスを産生することの阻害事由になるものではない。

そして、刊行物M（甲6）の段落【0021】には、線維芽細胞を含め多数の細胞も例示されているから、原告が主張するような特定の細胞及び培地に限って、「無血清培地で、蛋白質等の物質生産を行うこと」が可能であるものではない。

刊行物N（甲7）の段落【0003】記載のとおり、これまでに多くの文献に、様々な細胞で血清に代わる物質を用いた成功例があるからこそ、インスリンを含む血清代替物質が例示されており、また、細胞の種類や生産を目的とする物質の組み合わせにより、無血清培養する際に適切な血清の代わりとなる物質やその組み合わせが変わることは当然のことである。原告が指摘する刊行物Nの段落【0015】の記載は、ヒト結腸腺癌細胞株 Caco-2 の培養において、血清の代わりとなる物質の適切な組み合わせによりスクラーゼを産生することを示しているだけであり、原告が主張するような「無血清培地により蛋白質等の物質生産を行うことは、特定の細胞及び培地に限って「可能」である」ことを示すものではなく、このことは、刊行物Nの段落【0018】及び【0020】記載の実験についても同様である。

甲11の段落【0046】～【0049】の実施例は、肝細胞において

無血清培地でアルブミンを産生させるためには、インスリンに加えて、刊行物Nで血清に代わる物質として例示されている「セレン」の一種である亜セレン酸ナトリウムの組み合わせが適切であったことを示しているだけであって、上記のとおり、細胞の種類や生産を目的とする物質の組み合わせにより、無血清培養する際に適切な血清の代わりとなる物質やその組み合わせが変わることは当然のことであるから、かかる記載があるからといって、原告が主張するような「無血清培地により蛋白質等の物質生産を行うことは、特定の細胞及び培地に限って「可能」である」ことを示すものではない。

以上のとおりであるから、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることが技術常識となっていた」との本件審決の認定判断に誤りはない。

イ 原告の主張(3)ウについて

原告は、本件審決の刊行物L(甲5)についての認定判断が、「線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することが技術常識である」ことを意味するのであれば、それは誤りである旨主張するが、本件審決認定のとおり、刊行物Lは、線維芽細胞を無血清で培養できることが技術常識となっていたことを示しているだけであり、原告主張のような意味ではない。

ウ 原告の主張(3)エについて

細胞に蛋白質等を産生させるための無血清培地において、血清に代えてインスリンを添加することは周知の技術事項であった(刊行物N(甲7)の【請求項1】、段落【0001】～【0003】及び【0017】の記載、刊行物2(甲2)の(刊2-2)の記載、刊行物M(甲6)の(刊M-2)の記載、乙2の2頁左上欄5～9行及び17～19行の記載、乙4の4頁右上欄8～14行)。このように、血清代替物であるインスリンを含む無血清培地は、分化を目的とする培養に普通に使用されるものであり、細胞を分

化，増殖させ，細胞外マトリックスを産生するアスコルビン酸リン酸エステル
の作用を妨げるようなものではない。

そして，原告が主張するように「線維芽細胞を分化させて細胞外マトリ
ックスを産生させるために無血清で培養することも技術常識ではない」と
しても，「アスコルビン酸リン酸エステル」を含む「引用発明のごとくの
血清培地では細胞外マトリックスが産生されて」いるのだから，引用発明
において，上記周知の技術にならい，血清に代えてインスリンを添加する
ことにより無血清培地とした場合であっても，引用発明の「アスコルビン
酸リン酸エステル」の作用により細胞外マトリックスが産生されるであろ
うという期待を当業者に抱かせることは明らかである。

しかも，線維芽細胞を使用しインスリンを含有する無血清培地で蛋白質
の生産を目的とする培養方法も，例えば，乙2（2頁左上欄5～9行及び
17～19行）に示すように普通に知られている。血清の代わりとなる物
質を添加した無血清培地で線維芽細胞の増殖及び蛋白質等の産生が妨げら
れるような技術常識も存在しない。

そうであるならば，細胞外マトリックスが産生されることを確認するこ
とは，調べてみないとはっきりしないようなことを確かめたものではなく，
確実に産生されるであろうと当業者が思うような事項を単に確認しただけ
のことであって，何の困難性も要しない事項である。

したがって，本件審決の認定判断に誤りはない。

(3) 相違点3に関する審判段階での原告の主張について

ア 原告の主張(4)アについて

引用発明が血清を加えない態様を包含しているといえるのであれば，そ
のことが，相違点3の構成，すなわち，無血清培地で培養することに至る
ことについての阻害要因となるわけがない。だからこそ，本件審決は，刊
行物1の記載事項が阻害要因となり得ないことを述べているのである。

イ 原告の主張(4)イについて

血清には、本件審決の指摘する欠点があり、無血清で培養することが周知の課題となっていた。そして、無血清とすることで多大な作用効果が得られるのだから、無血清とする動機はあるのであって、「無血清培養における線維芽細胞の分化や細胞外マトリックスの産生についての技術的知見は存在」せず、「線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することも技術常識ではない」ことは、無血清にすることを諦めてしまう程の事情とはいえない。

2 取消事由 1 – (2) (作用効果の顕著性の認定判断の誤り) について

〔原告の主張〕

- (1) 本件審決は、本願発明の効果は、刊行物 1 並びに周知の技術的事項及び技術常識に基づき当業者が予測し得るものであって、格別顕著な効果とはいえないと認定判断した。
- (2) しかし、刊行物 1 (甲 1) の実験結果 (7 頁左上欄 4 行～7 行) は、あくまで「アスコルビン酸リン酸エステル」という特定の成分が細胞外マトリックス産生に寄与することを実証するにすぎず、それ以外の成分、例えば動物血清が細胞外マトリックス産生に寄与しないことを根拠付けるものではなく、まして、無血清培地であっても、「アスコルビン酸リン酸エステル」が細胞外マトリックス産生に寄与することまで実証するものではない。刊行物 1 には、無血清で培養した場合の実施例の記載はなく、また、無血清で培養した場合にも同様に、細胞外マトリックスからなる人工組織を産生することができることについての技術的知見もない。その上、前記 1 〔原告の主張〕
- (3) イのとおり、本願優先権主張日当時、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を無血清培地で培養しても、必ずしも蛋白質等を産生できるとは限らないことが知られている。更に、前記 1 〔原告の主張〕 (3) オのとおり、本件審決が認定判断した周知の技術的事項及び技術常識は、線維芽細胞を無血

清培地で培養した場合に、細胞外マトリックスが産生されることが周知であることを何ら根拠付けるものではない。

したがって、本願発明の効果は、刊行物 1 並びに周知の技術的事項及び技術常識に基づき当業者が予測し得る程度のものではない。

- (3) 本件審決は、本願明細書（甲 10 及び甲 8 により訂正された甲 9）には、他の成長因子等を加えずに、インスリンのみを基本培地に加えたような実施例は存在せず、段落【0119】～【0125】は、基礎培地に市販の無血清培地に加えらるるトランスフェリン、表皮成長因子が加えられており、更にヒドロコチゾンも添加されており、インスリンを単独で添加したものではないから、特定の実施例における効果にすぎないと認定判断した。

確かに、本願明細書には、他の成長因子等を加えずに、インスリンのみを基本培地に加えたような実施例は存在せず、段落【0119】～【0125】の実施例もインスリンを単独で添加したものではない。しかし、このことが直ちに、当該実施例に記載の効果が、特定の実施例における効果に限定されることの根拠とはなり得ない。その他の本願明細書の記載及び本願優先権主張日当時の技術常識から、本願明細書の段落【0119】～【0125】に記載の作用効果が、特定の実施例における効果に限定され、本願発明全般の作用効果であるとは認められない事情は存在しない。

したがって、本願明細書には、他の成長因子等を加えずに、インスリンのみを基本培地に加えたような実施例が存在しないとしても、このことは、本願発明の作用効果の顕著性・非予測性を否定する根拠とはなり得ない。

- (4) 以上より、本願発明の効果は、刊行物 1 並びに周知の技術的事項及び技術常識に基づき当業者が予測し得えない顕著な効果であるから、本願発明の作用効果についての本件審決の前記(1)の認定判断は誤りである。

〔被告の主張〕

- (1) 原告の主張(2)について

刊行物1(甲1)の7頁左上欄4～7行記載の実験結果をもって、細胞外マトリックス産生に寄与する物質が引用発明の「アスコルビン酸リン酸エステル」であることは実証されている。そして、原告が主張するように「無血清で培養した場合にも同様に、細胞外マトリックスからなる人工組織を産生することができることについての技術的知見」がなく、「血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を無血清培地で培養しても、必ずしも蛋白質等を産生できるとは限らないことが知られている」としても、細胞外マトリックス産生に寄与する物質が引用発明の「アスコルビン酸リン酸エステル」であることが判明しているのだから、アスコルビン酸リン酸エステル含有の無血清培地に血清の代わりとなる物質を添加した場合でも、細胞外マトリックスが産生されることは十分に期待される。また、前記1の〔被告の主張〕(2)のとおり、血清の代わりとなる物質を添加した無血清培地で、線維芽細胞の増殖及び蛋白質等の産生が妨げられるような技術常識もないから、細胞外マトリックスが産生され得ないと予測する当業者はいない。そして、当該期待のとおり、本願発明において細胞外マトリックスが産生されたというだけでは、当業者が予測し得ない顕著な効果とはいえない。

(2) 原告の主張(3)について

原告主張に係る本件審決の認定判断部分は、原告が平成25年9月18日付け意見書(甲16の3頁27～28行)で主張するように、「当業者は、牛胎児血清等の動物血清を添加することが好ましいことが記載されている刊行物1において、血清含有培地に替えて、インスリン含有無血清培地により培養した場合に、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織が形成されると予測することは全くあり得ず、その結果、当業者は、刊行物1において、血清含有培地に替えて、インスリン含有無血清培地により培養することを想起することは全くあり得」ないとするなら、そのような効果が本願明細書に記載されているとはいえないことを判断したものである。

本願明細書の段落【0119】～【0125】の実施例は、インスリンとヒドロコチゾンの両者の濃度を変化させていることから、インスリン単独による作用を観察しようとして試みられた実験ではないことは明らかである。そして、いずれの実験でも細胞外マトリックスの形成が確認されている。しかし、実施例における条件1～3の効果は、トランスフェリン及び表皮成長因子を含む基礎培地に、さらに、条件1～3の濃度でインスリンとヒドロコチゾンを添加した培地で奏される効果であり、特に、条件3による効果は、インスリンを条件2の75倍の375 μ g/ml及びヒドロコチゾンを15倍の6 μ g/mlもの量添加したことで達成された効果である。本願発明は、ヒドロコチゾンは発明特定事項になっていないし、濃度の限定もないのだから、本件審決が認定判断したとおり、上記段落に記載された効果は、特定の実施例の効果にすぎず、原告が主張する本願発明の効果は本願明細書に記載されていない。

3 取消事由2（本件審決の手續違背）について

〔原告の主張〕

相違点3の判断において、本件審決が周知技術を示すものとして引用した刊行物L～N（甲5～7）は、いずれも本願の審査及び審判段階で示されたことがなく、本件審決で初めて示された文献である。相違点3についての以下の審理の経過に鑑みれば、原告には、刊行物L～Nに記載された事項及び当該事項を引用発明に適用することについて意見を述べる機会を全く与えられておらず、本件審決は、特許法159条2項で準用する同法50条の規定に違反してされたものであり、当該違反は、審決の結論に影響を及ぼすものであるから、取り消されるべきである。

(1)ア 特許庁審判長は、平成24年7月30日付けで拒絶理由を通知した（甲13）。当該拒絶理由通知書（21，22頁）では、引用発明の「アスコルビン酸リン酸エステル及び10%（v/v）牛胎児血清（FCS）を

含むダルベコズ・モディファイド・イーグルズ・ミニマル・エッセンシャル・メディウム」は、本願発明の「化学的に定義された培養培地は、未定義の動物臓器の無い培地または、血清、下垂体抽出物、視床下部抽出物、胎盤抽出物、胚抽出物、供給細胞によって分泌されるタンパク質および因子からなる群より選択される組織抽出物」に包含されると認定判断し、相違点3を実質的に相違点として認定判断していない。

イ 原告は、上記拒絶理由通知に対して、平成25年1月31日付け誤訳訂正書（甲10）により、特許請求の範囲の請求項1を補正するとともに、同日付け意見書（甲14・5頁）において、「本願発明と刊行物1発明とを対比すると、本願発明は、「化学的に定義された培養培地」は、血清等の「未定義の動物組織抽出物」を含まないのに対し、刊行物1発明の培地は、「アスコルビン酸リン酸エステル及び10%（V/V）牛胎児血清（FCS）を含むダルベコズ・モディファイド・イーグルズ・ミニマル・エッセンシャル・メディウム」、即ち、「10%（V/V）牛胎児血清（FCS）」という、「未定義の動物組織抽出物」を含んでいる点で相違します。」と、相違点3に係る構成を相違点として主張した。

ウ 特許庁審判長は平成25年3月12日付けで再度拒絶理由を通知した（甲15）。当該拒絶理由通知書（22, 25, 26頁）において、相違点3として、化学的に定義された「培養培地」が、「(ii) インスリンを含み」、「未定義の動物臓器又は組織抽出物の無い培地」、すなわち、「前記未定義の動物臓器又は組織抽出物は、血清、下垂体抽出物、視床下部抽出物、胎盤抽出物、胚抽出物、並びにフィーダー細胞によって分泌されるタンパク質および因子」の無い培地であるのに対して、刊行物1発明では「インスリンを含んでおらず、また、牛胎児血清（FCS）を含む点」と認定した上で、相違点3についての容易想到性について、刊行物2（甲2）及び刊行物3（甲3）を引用し、「血清には、…欠点があることが知

られており、本願優先権主張日前から無血清培地での培養が周知の課題となっていた」から、かかる周知の課題に基づいて、引用発明において、無血清で培養すべくインスリンを添加して本願発明のごとく構成することは、当業者が何の困難性もなくなし得たことである旨判断した。

エ これに対して、原告は、平成25年9月18日付け意見書（甲16）を提出し、相違点3の容易想到性について、専ら血清含有培地における課題の周知性が、相違点3の構成の容易想到性の根拠とはなり得ない旨の反論を述べた。同意見書において、原告は、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うこと」が周知の事項であり、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できること」が技術常識であること、「線維芽細胞を無血清で培養すること」が技術常識であること及びこれに基づく相違点3の構成の容易想到性についての意見は述べていない。

オ しかるに、本件審決では、相違点3の容易想到性について、新たに刊行物M、N（甲6、7）を引用し、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うこと」が周知の事項であり、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できること」が技術常識であると認定し、刊行物L（甲5）を引用し、「線維芽細胞を無血清で培養すること」が技術常識であると認定し、かかる周知の事項に基づいて、引用発明において無血清で培養することは、当業者に容易であると認定判断した。

(2) 以上の経過に鑑みれば、相違点3の構成は、平成25年1月31日付誤訳訂正書（甲10）により明瞭にされ、同日付け意見書（甲14）で原告は相違点3の存在を明確に主張しているから、少なくとも審判官合議体はこの時点で相違点3の存在を認識できるはずであり、その結果、平成25年3月12日付けで再度拒絶理由を通知する時点で、相違点3の容易想到性に関して刊行物L～N（甲5～7）を引用することができたはずである。そして、本件審決では、刊行物L～N（甲5～7）を、単に当業者の技術水準を知る

ためや、先行文献に記載された事項の技術的意義を明確にするなど補助的に用いたものではなく、相違点3の容易想到性を肯認する判断の核心的な引用例として用いたものであって、本件審決による前記(1)オの認定判断が「査定理由と異なる理由」に該当することは明らかである。

また、原告は、意見書(甲16)では、専ら血清含有培地における課題の周知性が、相違点3の構成の容易想到性の根拠とはなり得ない旨の反論を述べただけであり、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うこと」が周知の事項であり、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できること」が技術常識であること、「線維芽細胞を無血清で培養すること」が技術常識であること及びこれに基づく相違点3の構成の容易想到性についての意見は述べていないから、これらを周知事項及び技術常識とした認定判断及びこれに基づく相違点3の構成の容易想到性について、原告には、実質的な防御の機会が与えられていない。

以上のような手続の経過、拒絶の理由の内容等に照らせば、刊行物L～N(甲5～7)について、意見書提出の機会を与えなくとも手続の公正及び原告の利益を害さない等の特段の事情が存しないことは明らかである。したがって、本件審決の審判手続は、特許法159条2項で準用する同法50条の規定に違反するものであり、かかる違反は、本件審決の結論に影響を及ぼすものである。

〔被告の主張〕

(1) 本件審決で示した刊行物L～Nを根拠とする技術常識は、

技術常識1「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用のあるインスリンを無血清培地に添加することは周知の事項であった(例えば、刊行物2の(刊2-2)、刊行物Kの(刊K-1)、刊行物Lの(刊L-2)、刊行物Mの(刊M-2)及び刊行物Nの(刊N-1))」こと、

技術常識2「無血清培地で、蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先

権主張日前から普通に行われている周知の事項(例えば、刊行物Mの(刊M-2)及び刊行物Nの(刊N-1))であり、無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた」こと、

技術常識3「線維芽細胞を無血清で培養することは、刊行物Lに記載のように、古くから行われており、無血清で培養できることは技術常識であった」こと、

の3つの技術常識である。

(2) 技術常識1について

技術常識1を更に裏付けるものとして、平成25年3月12日付け拒絶理由通知書で示した刊行物2及び刊行物Kの内容に加えて、本件審決で刊行物L～Nを補足したにすぎない。

(3) 技術常識2について

本件審決で加えられた技術常識2は、技術常識1に加え、蛋白質等の物質生産を行う目的でもインスリンを無血清培地に添加することが技術常識であったことを補足するものである。このことは、刊行物2(甲2)の段落【0001】に「本発明は、組換えの方法によりえられるタンパク質のような哺乳動物細胞産物の生産を支持することができる無血清培地に関する。」ことを前提として、「インスリンは…無血清培地において添加剤として用いられている」(刊2-2)と記載されているのであるから、平成25年3月12日付け拒絶理由通知書を読んだ当業者であれば当然に理解できたことにすぎない。

(4) 技術常識3について

技術常識3は、技術常識1が、線維芽細胞についても該当することを明確にしたものであり、そのために、本件審決で刊行物Lを補足したにすぎない。本件審決で加えられた技術常識3は、平成25年3月12日付け拒絶理由通

知書に記した技術常識 1 の一例にすぎず，新たな技術常識を示すものではない。

- (5) 以上のように，本件審決で加えられた技術常識 2 及び技術常識 3 は，平成 25 年 3 月 12 日付け拒絶理由通知書に記した技術常識 1 を補足するだけのものであり，しかも当業者であれば誰もが知る技術常識であるから，これらについて，再度の意見を述べる機会を与えなかったからといって，手続違背となることはない。

第 4 当裁判所の判断

1 本願発明について

- (1) 本願発明に係る特許請求の範囲は，前記第 2 の 2 記載のとおりである。本願明細書（甲 10 及び甲 8 により訂正された甲 9）の発明の詳細な説明には，次の記載がある。

【0001】

【発明の属する技術分野】

（発明の分野）

本発明は，組織工学の分野にある。本発明は，細胞外マトリックスを産生する細胞を誘導する生体外での方法に向けられる。組織様特性を有するこの生きた細胞外マトリックスは，試験または臨床目的のために使用できる。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

（発明の背景）

組織工学の分野は，生物工学的方法を，正常な，および病理学的哺乳類組織での構造的および機能的関係を理解するライフサイエンスの概念と結びつける。組織工学の目標は，組織機能を保持，維持，または改善する生物学的置換の開発および最終使用である。したがって，組織工学を通して，実験室で生物工学的組織を設計および製造することが可能である。生物工

学的組織としては、通常元来の哺乳類またはヒト組織と関連する細胞、および合成または外因性マトリックススカーホードを挙げることができる。新たな生物工学的組織は、宿主に移殖された場合、機能性があり、そして宿主の体に恒久的に組み込まれるか、または受容体宿主患者から得られる細胞によって進行的に生物再生されるに違いない。支持体構成員またはスカーホードなしに等価の組織の作製で、新たな生物工学的組織を作成する上での科学的挑戦に至る。

【0003】

【課題を解決するための手段】

(発明の要旨)

本発明は、外因性マトリックス成分またはネットワーク支持体またはスカーホード構成員の必要なしに、培養細胞および内因的に産生された細胞外マトリックス成分の生物工学的組織構築物に向けられる。したがって、本発明は、ヒト細胞、および例えば、生物工学的組織構築物が、ヒトに使用するために設計される場合、それらの細胞により産生されるヒト・マトリックス成分から全体的に有利に作製できる。

【0004】

本発明は、外因性マトリックス成分、ネットワーク支持体、またはスカーホード構成員のいずれかの添加なしに、細胞外マトリックス成分を産生する、線維芽細胞のような培養物中の細胞を刺激することによって、組織構築物を産生する方法にも向けられる。

【0005】

本発明は、定義された培地システム中の細胞外マトリックス成分を産生する、線維芽細胞のような培養物中の細胞の刺激によって、および／またはウシ血清または臓器抽出物のような、未定義または非ヒト由来の生物学的成分を使用することなし、組織構築物を産生する方法にも向けられる。

【0007】

いっそうさらに、組織構築物は、スカホード支持体の必要、または外因性細胞外マトリックス成分の添加なしに、培養細胞によって産生および自己組立される。

【0009】

本発明の組織構築物は、皮膚腫瘍または創傷のような組織または臓器欠陥を有する患者に対する移植のような医療目的のために、または安全性試験または医薬、化粧、および化学製品の確証のような生体外での組織試験または動物移植のために有用である。

(本発明の詳細な説明)

これまで、最近工業化された生きた組織構築物は、完全には細胞で組立てられず、そして外因性マトリックス成分または構造または支持のための合成構成員の添加または組込みのいずれか、または両方に依るに違いない。

【0010】

ここに記述される生物工学的組織構築物は、それらの細胞が誘導される組織の由来の特性の多くを示す。それにより生成された組織構築物は、患者に移植するか、または生体外での試験のために使用しうる。

【0019】

細胞-マトリックス構築物を形成するための本発明の好ましい方法では、第一の細胞型である、細胞外マトリックス産生細胞型を、基質に蒔き、培養および誘導して、それらの周囲に組織化細胞外マトリックスを合成および分泌して、細胞-マトリックス構築物を形成する。本発明の別の好ましい方法では、細胞-マトリックス構築物の表面に、第二の細胞型の細胞を蒔き、そして培養して、二層組織構築物を形成する。より好ましい方法では、元来のヒト皮膚に類似の特性を示す十分な厚みの皮膚構築物が、ケラチノサイトのようなヒト上皮細胞が、播種され、そして、十分に分化した

層化表皮層を形成するのに十分な条件下で培養される皮膚層である，皮膚の細胞およびマトリックスの細胞-マトリックスを形成するマトリックス合成を誘導するのに十分な条件下で，ヒト皮膚の線維芽細胞のような線維芽細胞を培養することによって形成される。

【0020】

したがって，本発明の組織構築物を得る1つの方法は；

(a) 外因性細胞外マトリックス成分または構造的支持体構成員の不在下で，少なくとも1つの細胞外マトリックス産生細胞型を培養すること；および

(b) 段階(a)の細胞を刺激して，細胞外マトリックス成分を合成，分泌および組織化させ，それらの細胞により合成される細胞およびマトリックスから構成される組織構築物を形成し，段階(a)および(b)が，同時にまたは連続して行われるうることを包含する。

【0029】

本発明の培養組織構築物は，組織構築物の形成のための，網目構成員のような合成または生体吸収性構成員に依存しない。網目構成員は，織物，編物またはフェルト材料として組織化される。…

【0033】

化学的に定義された培養培地の使用が好ましく，すなわち，未定義の動物臓器のない培地または，組織抽出物例えば，血清，下垂体抽出物，視床下部抽出物，胎盤抽出物，または胚抽出物，およびフィーダー細胞によって分泌されるタンパク質および因子である。…診療所でこのような構築物を使用する上での利点は，偶発的動物または交雑種ウイルス混入および感染の関係が減少されることである。試験のシナリオで，化学的に定義された構築物の利点は，試験されるときに，未定義の成分の存在により，混乱されるべき結果の機会がないことである。

【0034】

培養培地は、通常さらに、他の成分で補足された栄養塩基から構成される。…多くの市販で入手可能な栄養源は、本発明の実施の上で有用である。これらとしては、ダルベッコの修飾イーグル培地 (DMEM) ; 最小必須培地 (MEM) ; M199 ; RPMI 1640 ; イスコフの修飾ダルベッコ培地 (EDMEM) のような無機塩、エネルギー源、アミノ酸、およびB-ビタミンを供給する市販で入手可能な栄養源が挙げられる。…

【0035】

基本培地は、アミノ酸、成長因子およびホルモンのような成分で補足される。…好ましい具体例では、基本培地は、動物細胞培養で習熟者に知られている以下の成分で補足される。インシュリン、トランスフェリン、トリヨードチロニン (T3)、および補足についての濃度および置換が、習熟者によって決定されうる、いずれかまたは両方のエタノールアミンおよび α -ホスホリル-エタノールアミン。

【0036】

インシュリンは、多重継代より長期間利点を供するグルコースおよびアミノ酸の摂取を促進するポリペプチドホルモンである。インシュリンまたはインシュリン様成長因子 (IGF) の補足は、グルコースおよびアミノ酸を取込む細胞の能力の最終的枯渇、および細胞表現型の可能性のある分解がある場合に長期培養に必要である。…

【0037】

トランスフェリンは、鉄輸送調節のための培地内にある。…

【0038】

トリヨードチロニン (T3) は、基本的成分であり、そして細胞代謝の速度を維持する培地中に含まれるチロイドホルモンの活性形態である。…

【0039】

リン脂質であるエタノールアミンおよび α -ホスホリル-エタノールアミ

ンのいずれかまたは両方を，その機能が，イノシトール経路および脂肪酸代謝での重要な前駆体であるものに添加する。血清に正常に見られる脂質の補足は，血清不含培地で必要である。…

【0040】

培養期間中に，基本培地に，合成または分化を誘導するか，またはヒドロコルチゾン，セレンウムおよびL-グルタミンのような細胞成長を改善する他の成分をさらに補足される。

【0041】

ヒドロコルチゾンは，ケラチノサイト表現型を促進する，したがって，被膜およびケラチノサイトトランスグルタミナーゼ含有量のような分化した特徴を増強するケラチノサイト培養で見られた…。したがって，ヒドロコルチゾンは，ケラチノサイトシート状移植片または皮膚構築物の形成でのようなこれらの特徴が，有益である例で，望ましい添加剤である。…

【0042】

セレンウムを，血清不含培地に添加して，血清によって正常に供給されるセレンウムの痕跡要素を再補足する。…

【0043】

アミノ酸L-グルタミンは，ある種の栄養基本に存在し，そして存在しないか，または不十分な量存在する場合に添加されうる。L-グルタミンは，グルタMAX-I™（ジブコ・ビーアールエル，ニューヨーク州グランドアイランド）の商標の下販売されるもののような安定な形態で供給もされる。…

【0044】

表皮成長因子（EGF）のような成長因子は，細胞規模拡大および播種を通して培養物の確立の助けになる培地にも添加されうる。…

【0045】

上に記述される培地は、一般に、下に規定されるとおり製造される。…

【0047】

マトリックス産生細胞の培養により細胞-マトリックス層を形成するために、培地に、細胞によるマトリックス合成および沈着を促進する追加の剤を補足する。これらの補足剤は、細胞適合性があり、高度の純度に定義され、そして混入を含まない。細胞-マトリックス層を生成するのに使用される培地は、「マトリックス産生培地」と称される。

【0048】

マトリックス産生培地を作製するために、基本培地に、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸のようなアスコルベート誘導体、またはL-アスコルビン酸ホスフェートマグネシウム塩n-ハイドレートのようなそのいっそう化学的に安定な誘導体の内の1つを補足する。アスコルベートを添加して、沈着コラーゲン分子に対する可溶性前駆体である、プロリンの水酸化およびプロコラーゲンの分泌を促進する。アスコルベートは、I型およびIII型コラーゲン合成のアップレギュレーターと同様に、他の酵素後期翻訳過程のための重要なコファクターであることも示された。

【0049】

理論によって結合されることを望まない一方で、タンパク質合成に関与したアミノ酸を有する培地を補足することで、細胞にアミノ酸それら自身を生成させる必要のないことにより、細胞エネルギーを保存する。プロリンおよびグリシンの添加は、プロリンの水酸化形態、ヒドロキシプロリンと同様に、それらが、コラーゲンの構造を作る基本的アミノ酸である場合好ましい。

【0050】

必要とされない場合、マトリックス産生培地に、都合により、中性高分子を補足する。本発明の細胞-マトリックス構築物は、中性高分子なしに生

成され得るが、しかし、理論に結び付けられることを望まないで、マトリックス産生培地でのその存在は、コラーゲン過程およびサンプルの間についてそう一定な沈着でありうる。1つの好ましい中性高分子は、マトリックス沈着コラーゲンに対して、培養細胞により産生される可溶性先駆体プロコラーゲンの生体外での過程を促進することが示されたポリエチレングリコール (PEG) である。…

【0051】

細胞産生細胞がコンフルエントであり、そして培養培地に、マトリックス合成、分泌、または組織化で支援する成分を補足する場合、細胞は、それらの細胞によって合成された細胞およびマトリックスから構成される組織構築物を形成するのを刺激するようである。

【0052】

したがって、好ましいマトリックス産生培地処方としては、ダルベッコの修飾イーグル培地 (DMEM) (高グルコース処方, L-グルタミンなし) および 4 mM の L-グルタミンまたは等価物, 5 ng/ml 上皮成長因子, 0.4 μg/ml ヒドロコルチゾン, 1×10^{-4} M の o-ホスホリル-エタノールアミン, 5 μg/ml インシュリン, 5 μg/ml トランスレリン, 20 pM トリヨードチロニン, 6.78 ng/ml セレニウム, 50 ng/ml の L-アスコルビン酸, 0.2 μg/ml の L-プロリン, および 0.1 μg/ml グリシンで補足されたハム F-12 培地の基本的 3:1 混合物を包含する。産生培地のために、他の薬理的剤を、培養物に添加して、分泌される細胞外マトリックスの特性、量、または型を変化させうる。これらの剤としては、ポリペプチド成長因子、転写因子、またはコラーゲン転写を上向きに調節する無機塩が挙げられる。ポリペプチド成長因子の例としては、形質転換成長因子 β 1 (TGF-β 1) および組織-プラスミンノーゲンアクチベーター (TPA) が挙げられ、その両方は、コラーゲン

合成を上向きに調節することが知られている。…コラーゲン産生を刺激する無機塩の例は、セリウムである。…

【0086】

実施例3：化学的に限定した培地中でのヒト新生児包皮繊維芽細胞によるコラーゲンマトリックスの *In Vitro* 形成

実施例1で述べた操作を用いてヒト新生児包皮繊維芽細胞を増殖させた。細胞を 3.0×10^6 細胞/ml 濃度になるように再懸濁し、6穴トレイの0.4ミクロンポアサイズの24mm直径組織培養用挿入体に 3.0×10^6 細胞/TW (6.6×10^5 細胞/cm²) の濃度で接種した。細胞はこの後新生子牛血清を除いた培地で実施例1と全く同様に培養した。特に、培地の組成は、DMEMおよびHams F-12培地(…)の3:1混合物、4mM GlutaMAX-1TM(…)および以下の添加物を含む；5ng/ml ヒトリコンビナント表皮成長因子(…)、0.4μg/ml ハイドロコチゾン(…)、 1×10^{-4} M エタノールアミン(…)、 1×10^{-4} M オーフオスフォルルエタノールアミン(…)、5μg/ml インスリン(…)、5μg/ml トランスフェリン(…)、20pM トリヨードサイロニン(…)、6.78ng/ml セレン(…)、50ng/ml L-アスコルビン酸(…)、0.2μg/ml L-プロリン(…)、0.1μg/ml グリシン(…)、および0.05% ポリエチレングリコール(PEG)(…)。…組織学的な評価で、構造体は限定培地で2%新生子牛血清存在下と同様に生育することが証明された。

【0090】

また、細胞-マトリックス構造体中には内因性に産生される繊維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンが存在した。

【0119】

実施例15：化学的に限定した培地中でのヒト新生児包皮繊維芽細胞によ

る コラーゲンマトリックスの *In Vitro* 形成

実施例 1 で述べた操作を用いてヒト新生児包皮繊維芽細胞を増殖させた。細胞を $3.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 濃度になるように再懸濁し、6 穴トレイの 0.4 ミクロンポアサイズの 24 mm 直径組織培養用挿入体に 3.0×10^6 細胞 / TW (6.6×10^5 細胞 / cm^2) の濃度で接種した。この実施例では、細胞は全て化学的に限定した培地で培養した。

【0120】

培地の組成は、DMEM および Hams F-12 培地 (…) の 3 : 1 混合物、4 mM GlutaMAX-1 TM (…) および以下の添加物を含む ; $5 \text{ ng} / \text{ml}$ ヒトリコンビナント表皮成長因子 (…) , $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ エタノールアミン (…) , $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ オーフオスフォリルエタノールアミン (…) , $5 \mu \text{ g} / \text{ml}$ トランスフェリン (…) , 20 pM トリヨードサイロニン (…) , $6.78 \text{ ng} / \text{ml}$ セレン (…) , $50 \text{ ng} / \text{ml}$ L-アスコルビン酸 (…) , $0.2 \mu \text{ g} / \text{ml}$ L-プロリン (…) , および $0.1 \mu \text{ g} / \text{ml}$ グリシン (…) 。

【0121】

上記基礎培地に加え、以下の条件で下記の添加物を加えた。

【0122】

1. $5 \mu \text{ g} / \text{ml}$ インスリン (…) , $0.4 \mu \text{ g} / \text{ml}$ ハイドロコチゾン (…) , および 0.05% ポリエチレングリコール (PEG) (…) 。

【0123】

2. $5 \mu \text{ g} / \text{ml}$ インスリン (…) および $0.4 \mu \text{ g} / \text{ml}$ ハイドロコチゾン (…) 。

【0124】

3. $375 \mu \text{ g} / \text{ml}$ インスリン (…) および $6 \mu \text{ g} / \text{ml}$ ハイドロコチゾン (…) 。

【0125】

サンプルはホルマリンで固定しヘマトキシリンおよびエオジンで光学顕微鏡用の染色をした。組織学的な観察評価で、PEGのない条件2でもPEGが存在する条件1とかなり同様なマトリックスを形成することが証明された。構造物のコラーゲン含量を生化学的に測定すると、PEGが存在する条件1では $168.7 \pm 7.98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; PEGのない条件2では $170.88 \pm 9.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, と両方でほとんど同量の値を示した。高濃度のインスリンとヒドロコチゾンを含む条件3では、他の2つの条件よりも早い時点でコラーゲンを含んでマトリックスの発現が大きいことが示された。また、全ての条件下で細胞マトリックス構造体中には内因性に産生される繊維性コラーゲン、デコリン、およびグリコサミノグリカンが存在した。本実施例の条件2の方法で作成した培養真皮構造体を…に示した。化学的に限定した培地で培養した21日目の培養ヒト真皮繊維芽細胞から形成した細胞マトリックス構造体の、固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリンおよびエオジン染色した切片の写真を…に示した。多孔性の膜は構造物の下で薄い半透明のバンドのように見える。細胞は膜の表面上で生育し膜をマトリックスの中に取り込まないことが分かる。」

- (2) 前記第2の2の特許請求の範囲請求項1及び前記(1)によれば、本願明細書には、本願発明に関し、以下の点が開示されていることが認められる。

本願発明は、移植のような医療目的、あるいは生体外での組織試験等に用いられる組織構築物に関する（【0001】、【0009】、【0010】）。

従来、工業化された生きた組織構築物は、完全には細胞で組み立てられず、外因性マトリックス成分又は構造若しくは支持のための合成構成員が組み込まれていたところ（【0002】、【0009】）、本願発明は、培養条件の間、外因性マトリックス成分又は合成構成員を用いずに、線維芽細胞を、細胞外マトリックスの層を産生する条件下で培養することにより得られた、

前記線維芽細胞が前記細胞外マトリックスの層内に含まれている培養組織構築物である（【0003】，【0004】，【0007】，【請求項1】）。また，本願発明は，基礎栄養培地，インスリン，L-グルタミン又はL-グルタミン誘導体，及びアスコルビン酸又はアスコルビン酸誘導体を含む化学的に定義された培地を用いて培養したものであり，当該培地は，ウシ血清又は臓器抽出物のような，未定義の動物臓器又は組織抽出物を含まないものである（【0005】，【0007】，【請求項1】）。このような培地を用いることの利点は，偶発的動物又は交雑種ウイルス混入及び感染の関係が減少されること，並びに，未定義の成分の存在により混乱されるべき結果の機会がないことである（【0033】）。

2 引用発明について

(1) 刊行物1（甲1）には，次の記載がある。

ア（刊1-1）

「2. 特許請求の範囲

(1) 結合組織の細胞をアスコルビン酸リン酸エステル含有培地で培養し，結合組織細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成せしめ，該組織を採取することを特徴とする人工組織の製造法。

(2) 請求項(1)記載の方法で得られる結合組織細胞と細胞外マトリックスとからなる人工組織。」（1頁左下欄4～10行）

イ（刊1-11）

「従来技術

種々の細胞は分化の過程で，コラーゲン，プロテオグリカンをはじめとする組織特異的な細胞外マトリックス成分（ECM）を合成し，この合成されたECMは逆に細胞の接着性や，増殖，分化に重要な役割を果たすことが知られている。このECM中の主成分であるコラーゲンは高等動物のタンパク質の30%を占める。」（1頁左下欄14行～同頁右下欄1行）

ウ（刊1－2）

「課題を解決するための手段

上記の事情に鑑み、本発明者は、結合組織の細胞を培養することにより増殖させる方法について種々検討したところ、培地中に、アスコルビン酸に代えてアスコルビン酸リン酸エステルを添加すると該アスコルビン酸リン酸エステルは培地中において安定であり、しかも、有効な細胞増殖促進効果、細胞分化促進効果、生体組織に近い成分からなるECMの合成促進能などを有することを見出した。

さらに本発明者は、長期間の結合組織の細胞の培養により、結合組織細胞とECMとからなるすぐれた人工組織が得られ、このためとりわけアスコルビン酸リン酸エステルの添加が非常に有効であることを見出した。

本発明者は、これらの知見に基づいてさらに鋭意研究した結果、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、結合組織の細胞をアスコルビン酸リン酸エステル含有培地で培養し、結合組織細胞とECMとからなる組織を形成せしめ、該組織を採取することを特徴とする人工組織の製造法、および結合組織の細胞をアスコルビン酸リン酸エステル含有培地で培養して得られる結合組織細胞とECMとからなる人工組織を提供するものである。

本発明方法において用いられる結合組織の細胞としては、たとえば線維芽細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、内皮細胞などが挙げられる。線維芽細胞としては、たとえばヒト皮膚線維芽細胞、ヒト胎児線維芽細胞、ラット皮膚線維芽細胞、鶏胚腱線維芽細胞などが挙げられる。」（3頁左上欄18行～同頁左下欄8行）

エ（刊1－3）’

「本発明方法において用いられる培地としては、結合組織などの細胞の培養に用いられるものであれば、いずれでもよく、特に限定されるものでは

ない。

培地の例としては、たとえば、ダルベコズ・モディファイド・イーグルズ・ミニマル・エッセンシャル・メディウム (DMEM) などの動物細胞培養用培地が有利に用いられる。培地には、たとえば動物血清、抗生物質などを添加するのが好ましい。動物血清としては、たとえば牛胎児血清が好ましく、通常約 0.1 ~ 50% (V/V), 好ましくは約 2 ~ 20% (V/V) となるように添加する。抗生物質としては、たとえばカナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシンなどが挙げられ、これらを通常約 0.05 ~ 1 mg/ml の濃度となるように加える。」(3 頁左下欄下から 4 行 ~ 同頁右下欄 12 行)

オ (刊 1 - 4)

「かくして得られる本発明の人工組織は、通常培養容器の器壁にシート状に生成する。従って、このまま有利に人工組織として使用することができ、所望によりエチレンジアミンテトラアセテート (EDTA) などの剥離剤を用いてシート状に分離することができる。」(4 頁左下欄 12 ~ 17 行)

カ (刊 1 - 5)

「コラーゲンは細胞内でまずプロコラーゲンとして合成され、その後にプロセッシングを受けてコラーゲンが形成されることが知られている。さらにコラーゲンとして、現在 I 型から XI 型までの 11 種があることが知られており、その分布は細胞あるいは組織特異性を示す。又、コラーゲン分子は相互に会合し、コラーゲン線維となり、他の細胞外マトリックス成分 [酸性グリコサミノグリカン (GAG)] 等と複合体を作り、ECM を形成する。」(4 頁左下欄 18 行 ~ 同頁右下欄 6 行)

キ (刊 1 - 6)

「本発明の人工組織は、含まれる結合組織およびコラーゲン、プロコラーゲン、GAG などからなる ECM の性状および含有割合が、動物の真皮に

近似するものである。」(5頁右上欄16～19行)

ク(刊1-7)

「作用および実施例

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 ヒト皮膚線維芽細胞の初代培養とその継代：

成人前腕より無菌的に約10mm²の皮膚をメスで切りとり、抗生物質(250μlのファンギゾン、50mg/lジヒドロストレプトマイシンおよび50mg/lペニシリンG)を含むDMEM(DMEM-0)で洗浄後、カミソリで1mm²角に細切し培養皿に入れ、10分間乾燥させた後、10%(V/V)牛胎児血清(FCS)を含むDMEM(DMEM-10)を加え、37℃で炭酸ガスふ卵器中で培養し、2～3日毎に培地交換を行い、培養皿一杯にまで増殖させた(初代培養)。以後、培養液を除き、細胞を洗浄後、トリプシン液を用いて細胞培養皿からはく離させ、適当に希釈し、新たな培養液を加えて細胞を播種する操作を繰り返した(細胞継代)。以下においては、集団倍加数が10～30回に至ったものを用いた。

実施例2 アスコルビン酸-2-リン酸エステル(As-2-P)添加培地を用いたヒト皮膚線維芽細胞の培養における増殖促進とコラーゲン合成の促進(…)：

実施例1で得られた細胞を直径3.5cmの培養皿(ファルコン社製、米国)に播種し、上記の培養液中に0.1-1.0mMのAs-2-Pを加え(●, ○), 合計3週間、37℃で5%炭酸ガス-95%空気中で培養した。対照として、一部の実験はAs-2-Pを添加しなかった。培地は週に2度各濃度のAs-2-Pを含む新鮮な培地に交換し計3週間培養を続けた。一部の実験(◇, ◆)では、最初1週間、As-2-Pを加えないで培養し、その後0.1mMのAs-2-Pを加えてさらに2週間培養した。3週間の培養において最後の24時間に³H-プロリン(10μ

Ci/ml) と As-2-P (0.1 mM) を含む DMEM-10 で培養し、培養上清と細胞を一緒に合わせた。その後畑らの方法 [バイオケミストリー (Biochemistry) 19, 169 (1980)] に従ってプロテアーゼフリーの細菌由来コラゲナーゼ [バイオケミストリー (Biochemistry) 10, 988 (1971)] によって分解される³H-プロリンの取込みによってコラーゲン合成速度を測定した (…)

また、3週間の培養の後、培養上清を除去し、細胞層を1mlのトリス溶液 (0.05M Tris-HCl, 0.11M NaCl, pH 7.4) で洗った後、1mlの冷トリクロロ酢酸 (10%) を加えて細胞を集め、畑らの方法 [ジャーナル・オブ・セルラー・フィジオロジー (J. Cell. Physiol), 122, 333 (1985)] により蛍光法によりDNA含量の測定を行った (…)

…にみられる様に、As-2-P添加3週間培養により、最後の1日だけAs-2-P添加培養した場合に比べ、コラーゲン合成率は2倍に上昇した。また、アスコルビン酸ナトリウム (AsNa) 添加の場合は、0.2mM以上ではコラーゲン合成を阻害したが、As-2-Pでは1mM添加でも阻害は全く認められなかった。

…にみられる様に、As-2-P存在下3週間培養することにより、培養皿当たりのDNA量は4倍増加した。また、最後の2週間のみAs-2-Pを添加培養するだけでもDNA量増加がみられることは、As-2-Pが細胞接着の段階にだけ促進効果を及ぼしているのではなく、細胞増殖にも促進的に作用していることを示している。

同様にAs-2-Pの効果は、健康人の皮膚組織細胞だけでなく、各種の結合組織における疾患を有する患者皮膚線維芽細胞においても、また胎児の肺の線維芽細胞においても認められた。」(5頁左下欄9行～6頁右上欄19行)

ケ (刊 1-8)

「実施例 3 As-2-P 添加培地を用いたヒト皮膚線維芽細胞の培養により産生されるプロコラーゲンとコラーゲン (…);

実施例 1 で得られた細胞を実施例 2 と同じ方法で培養 (ただし As-2-P の濃度は 0.1 mM を使用) し, ^3H -プロリンを用いた標識を行った。その後培養上清画分 (M) と細胞層画分 (C) を別々に集め氷上で軽く超音波破碎を行った。上記各画分について硫酸アンモニウム (176 mg/ml) を, プロテアーゼ阻害剤 (25 mM EDTA, 10 mM N-エチルマレイミド, 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド) の存在下に加え, 析出した沈殿を 0.5 M 酢酸に溶かし, その半量をとってプロテアーゼ阻害剤 (5 ml 中にペプスタチン, アンチペイン, ロイペプチンを各々 200 μg 含有) 添加後, 5 mM 酢酸を加えて透析し, プロコラーゲン画分とした。

残りの半分を用いて, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシンを加え, 5°C 6 時間処理を行った。その後 pH を 8 に上げてペプシンを不活化し, ペプスタチン添加後透析し, コラーゲン画分とした。

凍結乾燥したプロコラーゲンとコラーゲンサンプルをジチオスレイトール (DTT) 存在, または非存在下に SDS-5% PAGE によって, 畑らの方法 […] に従い分離した。…中のコラーゲンの型は次のとおりであった。 $\alpha 1$ (I), $\alpha 2$ (I), $\alpha 1$ (III) および $\alpha 1$ (V) : $\alpha 1$ または $\alpha 2$ はコラーゲンを構成する α 鎖の種類を示し, I~V はコラーゲンの型を示す。Pro, Pn, Pc はプロコラーゲン, Pn コラーゲン, Pc コラーゲンを示す。 β , γ はコラーゲン 2 本もしくは 3 本の α 鎖間で架橋が起った成分を示している。」(6 頁右上欄末行~同頁右下欄 14 行)

コ (刊 1-9)

「さらに, As-2-P 添加培地を用いたヒト皮膚線維芽細胞を実施例

2～4と同様に培養し、電子顕微鏡を用いて観察したところ、粗面小胞体とゴルジ装置の発達を認め、さらに細胞の周りにGAG-タンパクの複合体であるプロテオグリカンおよびコラーゲン線維の著しい沈着が認められた。

また、細胞増殖促進とECMの発達に基づくと思われる細胞の多層化が明瞭であった。

実施例2～4にみられたAs-2-P添加培養によるヒト皮膚線維芽細胞のこれらの変化、すなわち細胞増殖の促進、コラーゲン様物質合成の促進、プロコラーゲンからコラーゲンへのプロセシングの促進、コラーゲン分子間の架橋の促進、細胞層へのコラーゲンと生体組織に多く存在する種類のプロテオグリカンの合成、蓄積と沈着およびこれらを裏付ける電子顕微鏡的観察の結果は、すべて皮膚線維芽細胞の培養においてAs-2-Pが添加されることにより生体組織に近い形の組織形成が促進されていることを示すものである。」(7頁左下欄6行～同頁右下欄4行)

サ(刊1-10)

「また以下に示すとおり、結合組織の細胞を肝細胞など皮膚以外の臓器細胞とコカルチャーすることにより、生体組織に類似する組織を製造することができる。

実施例5

細胞の分離と培養:

肝細胞はジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー, 122, 333 (1985)に記載された二段階灌流法によってウイスター雄性ラット(体重: 230-270g)から分離した。細胞(2.5×10^5)を直径35-mmプラスチック培養皿(約 10 cm^2)またはあらかじめ線維芽細胞を培養した培養皿に蒔き、10% FCS, インスリン 10^{-6} M , デキサメサゾン 10^{-5} M , As-2-P $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, N-2-ヒドロ

キシエチルーピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 10^{-2} M, フンギゾン (0.25 mg/l), ペニシリン (50 mg/l), ストレプトマイシン (50 mg/l) を添加したウィリアムス培地E中, 5%CO₂/95%空気存在下37°Cで培養した。培地は播種後1日目および2日目に交換し, その後1週間に2度交換した。また培地交換時にEGF (20 ng/ml) を加えた。…

培養中の肝細胞と線維芽細胞の代謝活性:

2日間デキサメサゾン, インスリン, As-2-P, EGFおよび10%FCS添加ウィリアムス培地Eで培養した肝細胞はアルブミンと少量ではあるが有意な量のコラーゲン (全蛋白質量の $0.32 \pm 0.02\%$: …) を産生した。30日間の培養により, 2日間培養時の50%のDNAおよび60%のアルブミンが保持された (…)。細胞による全蛋白質の合成は減少したが, コラーゲンの合成は増加した (…)。従って, 30日間の培養による全蛋白質合成に対するコラーゲン合成の相対速度は8倍に増加し, $2.58 \pm 0.04\%$ となった。

同じ条件下で培養した腱線維芽細胞は活発にコラーゲンを合成し, 2日間の添加物含有ウィリアムス培地E中での培養により, 全蛋白質合成に対するコラーゲン合成の相対速度は, $6.14 \pm 0.10\%$ であった。4週間に亘る培養中, 細胞の増殖は良好であった。各培養皿におけるコラーゲン合成 (…) および全蛋白質合成はその時増加したが, 30日間の培養による相対速度は $3.95 \pm 0.11\%$ に低下した。30日後のコラーゲン合成速度の低下は, 線維芽細胞のコラーゲン合成に対するアスコルビン酸エステルの刺激作用を弱めるEGFが培養中に存在したためと思われる。

肝細胞と線維芽細胞を2日間コカルチャーするとDNA含量から調べた細胞数は, 二種の細胞を独立して培養した時の合計細胞数と同数であった。全細胞数はコカルチャーにおいて高かったが, コラーゲン感受性放射活性

により調べた各培養皿あたりのコラーゲン合成は、線維芽細胞の単独培養時に比べ低かった。線維芽細胞はアルブミンを全く産生しなかったが、アルブミンの生産量は、肝細胞の単独培養時に比べ、コカルチャー時に高かった（…）。この事実は二種の細胞間の代謝相互作用の存在を示している。30日間の培養により、細胞数およびコラーゲン合成は増加するが、線維芽細胞単独30日間培養時に比べて低かった。アルブミン量は2日間培養時の75%であったが、依然として肝細胞をプラスチック皿で培養して得られた最大値よりも高かった（…）。この事実もまた肝細胞と線維芽細胞との間の相互作用の存在を示している。」（7頁右下欄5行～8頁右下欄末行）

- (2) そして、刊行物1には、前記第2の3(2)記載のとおり、次の引用発明が記載されていることは、当事者間に争いが無い。

ヒト皮膚線維芽細胞の継代培養細胞をアスコルビン酸リン酸エステル及び10% (V/V) 牛胎児血清 (FCS) を含むダルベコズ・モディファイド・イーグルズ・ミニマル・エッセンシャル・メディウム (判決注: DMEM) で培養し、培養容器の器壁に該細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成せしめ、該組織を採取することを特徴とする当該細胞と細胞外マトリックスとからなる人工組織であって、該人工組織は、生体組織に存在する種々のプロテオグリカンが合成され、蓄積され、沈着しており、コラーゲン、プロコラーゲン、酸性グリコサミノグリカン (GAG) などからなる細胞外マトリックスの性状および含有割合が、動物の真皮に近似し、コラーゲンの型は $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 1(III)$ および $\alpha 1(V)$ が含まれている人工組織。

- (3) なお、引用発明におけるアスコルビン酸リン酸エステルは、ヒト線維芽細胞の培養における増殖促進と、コラーゲン等からなる生体組織に近い成分からなるECM (細胞外マトリックス成分) の合成促進能を有するものであ

ると認められる（刊行物 1（甲 1）の 3 頁右上欄 3～7 行（刊 1－2）、実施例 2（刊 1－7））。

3 取消事由 1－(1)（相違点 3 に係る構成の容易想到性の判断の誤り）について

(1) 本願優先権主張日（平成 10 年 1 月 19 日）当時の培養培地における血清の役割と問題点に関する技術的知見について

ア 本願優先権主張日当時の培養培地における血清の役割と問題点について、証拠（甲 2，3，6，7）には、概ね、以下の各記載がある。

(ア) 刊行物 2（特開平 6－153931 号公報。甲 2）

【0003】細胞を培養するためには、培養培地に血清を添加することが必要である。血清は、たいていの生物学的に活性な産物の生産のためだけでなく、すべての細胞系の生長のための全般的な栄養物として働く。血清には、ホルモン、成長因子、キャリアータンパク質、接着および伸展因子、栄養物、微量元素などが含まれている。培養培地には、通常約 10%以下の動物血清、たとえば牛胎児血清（FBS）が含まれている。

【0004】広く使われてはいるが、血清には多くの制約がある。血清には高濃度でおびただしいタンパク質が含まれており、それによって、細胞の生産する少量の所望のタンパク質が劇的に妨げられる。工程の後の方でこれらの血清タンパク質を生産物から分けることが必要で、このことが工程を複雑にし、コストを増加させる。別の制約は、バッチ間での血清の不一致のために生産物中の種々の血清タンパク質汚染について重大な制約の懸念が生じることである。…

【0006】FBSなどの動物の血清を用いることのさらなる欠点は、需要の増加により供給が不安定となり、価格の上昇変動が起こることである。

【0007】したがって、細胞の生長および生物学的に活性な産物の生

産を支持するための代替の培地補助剤の開発が強く望まれている。」

(イ) 刊行物3 (特開平7-178号公報。甲3)

【0002】

【従来の技術】従来、動物細胞の培養には牛胎仔血清添加培地が使用されてきたが、当該培地は高価であり、且つロット間のばらつきがあることから、血清を使用しない無血清培地の利用が増加しつつある。」

(ウ) 刊行物M (特開平9-252767号公報。甲6)

【0003】従来、動物細胞を生育(増殖)させる際の培地としては、極めて多種の培地、例えば、DMEM培地…、F12培地…およびRPMI1640培地…等が使用されてきた。しかし、これらの培地を使用して動物細胞を生育(増殖)させるには、培地に血清を加えなければならない。このため、一般には、ウシ胎児、ウマまたはヒト等の血清を1~15%程度の濃度で使用しなければならなかった。

【0004】しかし、血清含有培地を使用する際には以下の様な問題があった。

- ① 血清自体が高価なためコスト高となる。
- ② 血清にはロット差があり、再現性のある培養には不利である。
- ③ 産生物の培養上清からの精製が困難となる。
- ④ ウイルスやマイコプラズマの汚染源となる恐れがある。

【0005】このような現状に鑑みて、培地中の血清濃度を減少させる方法が検討されている。しかし、血清濃度の減少によって細胞はその増殖性を著しく低下させるか死滅し、所望の細胞生成物(例えば、蛋白質)の収量が著しく減少するなどの問題があり、培地中の血清濃度の減少は困難であった。

【0006】このような理由から、血清を含まず、細胞が増殖性を失わずに培養される無血清培地に対して多大な関心が持たれている。

【0016】基本培地としては，一般的に用いられる基礎培地が挙げられ，すなわち通常動物細胞が同化しうる炭素源，消化しうる窒素源および無機塩等を含有させたものが用いられ，また，必要に応じて微量栄養促進物質，前駆物質などの微量有効物質を配合してもよい。かかる基礎培地としては，細胞培養のためのすべての公知培地を使用することができ，例えば前述のDMEM培地，F12培地およびRPMI1640培地が例示され，特にRPMI1640培地が好適である。」

(エ) 刊行物N（特開平7-255470号公報。甲7）

「【0002】

【従来の技術】近年，動物細胞の培養技術が発達するにつれて，動物細胞の生産する生理活性物質を医薬品として応用することが期待されている。また生体から細胞を採取し，この細胞を培養し，細胞の生産する物質を研究することが活発に行われるようになってきた。通常，動物細胞の培養にあたっては，アミノ酸，糖，無機塩，ビタミン類を含有する基礎培地に，ウシ胎児血清を添加した培地が用いられている。この培地を通常は，血清添加培地とよぶ。血清は，成長促進因子，ホルモン，脂質の供給源であり，通常の細胞培養には必須である。しかし，血清中には種々の蛋白質や未知の成分が含まれており，物質の生産にあたっては，これらの成分と目的とする蛋白質や，生理活性物質を分離精製することが困難な場合がしばしば発生する。また細胞培養に供する血清は，家畜のなかでも特に，胎児や幼体から採取したものが望ましいとされているが，動物愛護の面からも問題提起されている。

【0003】このため，物質生産を目的とした細胞培養においては，血清を添加しない無血清培地を使用することが多かった。…」

イ 前記アによれば，一般に，アミノ酸，糖，無機塩，ビタミン類等を含有させた基礎栄養培地（基本培地；例えば，DMEM，F-12，RPMI

1640) に、血清を添加した血清含有培地を用いて、動物細胞を培養し、当該細胞を増殖させたり、あるいは、当該細胞に生物学的に活性な物質を産生させることが従来から広く行われていたが、他方において、血清には、様々な物質が含まれており生物学的に活性な産生物の培養上清からの精製の工程が複雑であること、ロット差があり再現性のある培養には不利であること、ウイルスやマイコプラズマの汚染源となること等の様々な問題点があることから、本願優先権主張日当時には、動物細胞の培養培地を、血清含有培地ではなく、血清を含有しない無血清培地を使用することもよく行われている周知の技術であったことが認められる。

(2) 本願優先権主張日当時の無血清培地に添加される成分に関する技術的知見について

ア 本願優先権主張日当時の無血清培地に添加される成分について、証拠(甲2, 5, 6, 7, 乙1, 2, 4, 甲11)には、概ね、以下の各記載がある。

(ア) 刊行物2 (特開平6-153931号公報。甲2)

a 刊行物2には、概ね、次の記載がある。

「【請求項1】基本培地ならびに (a) 細胞バイアビリティ保護剤、(b) インスリンおよび (c) トロンビンもしくはトロンビンレセプター活性化因子のいずれかを含んでなる哺乳動物細胞のための無血清培地。」

「【0021】本発明の無血清培地は、哺乳動物細胞の生物学的に活性な産物の生産を血清入りのものに匹敵する程度に支持する。

【0027】インスリンはすべての種類の細胞に対して成長因子として働くことが知られており、いくつかの無血清培地において添加剤として用いられている。

【0052】実施例4：生長因子の機能的寄与

インスリンもトロンビンもいずれもCHO（判決注：チャイニーズハムスター卵巣）細胞の生長を刺激する。いずれもどちらかをADC-1（判決注：細胞バイアビリティ保護剤）含有培地に添加すると細胞生長は同程度となる…。しかしながら、インスリンのみ存在下でのIL-6生産はきわめて低く、一方トロンビンは有意に生産レベルを刺激した…。ウェル中での短期間の実験においては…、トロンビンのみを用いた生産能は、インスリンとトロンビンの両方をADCに添加したばあいにごくわずか増大したにすぎなかった。しかしながらスピナー（100ml）中で生産をモニターすると、初期にインスリン添加でも無添加でも同等であったIL-6レベルが、インスリン非存在下では9日ののちに明らかに減少した…。これらの結果よりインスリンが最適な長期間の生産に必須であることが示唆された。」

b 前記aによれば、刊行物2には、基本培地に、細胞バイアビリティ保護剤、インスリン及びトロンビンを加えた無血清培地を用いて、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞からIL-6を長期間産生させることができ、トロンビンがIL-6の産生を刺激し、インスリンは最適な長期間のIL-6産生に必須であることが記載されているといえることができる。

(イ) 刊行物L（抗酸菌病研究所雑誌，第39巻第1号，1987，53～59頁，昭和62年7月15日発行。甲5）

a 刊行物Lには、概ね、次の記載がある。

「WI-38細胞を含むヒト正常2倍体線維芽細胞は、インシュリン、トランスフェリン、デキサメサゾンを加えたMCDB-104培養液に、PDGF，FGF，brainFGF（acidic FGF），又はEGFを加えると著しく増殖する。」（53頁の要旨1～3行）

「 I I . ヒト線維芽細胞の無血清培養

II-1 WI-38 細胞

WI-38 細胞は, Wistar Institute (Philadelphia) で, 1965 年に培養樹立されたヒト胎児肺由来線維芽細胞である. この細胞の低血清下のコロニー形成に有効な MCDB-104 培地を無血清培養用の培地に用いた. インシュリン(5 μ g/ml), トランスフェリン(1 μ g/ml), デキサメサゾン(55 ng/ml) が, この細胞の維持に有効であることがわかり, これらを加えた培養液を, MCDB-ITD とした. …は, MCDB-ITD に種々の成長因子を加え, WI-38 細胞の増殖をみたものである. EGF の他, FGF や PDGF もこの細胞の増殖を著しく促進することが認められた.」

(54 頁左欄 9 ~ 22 行)

- b 前記 a によれば, 刊行物 L には, MCDB-104 培地に, インシュリン, トランスフェリン及びデキサメサゾンを加えた無血清培地は, WI-38 細胞 (ヒト胎児肺由来線維芽細胞) の維持に有効であり, EGF や FGF 等の成長因子を添加すると, この細胞の増殖が著しく促進されることが記載されているといえることができる。

(ウ) 刊行物 M (特開平 9 - 252767 号公報。甲 6)

- a 刊行物 M には, 概ね次の記載がある。

「【請求項 1】 インスリン, ペプトンおよびトランスフェリンを含有することを特徴とする無血清培地。」

「【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは, 上記目的を達成するため鋭意研究を重ねた結果, インスリン, ペプトンおよびトランスフェリンを含有させた培地を用いることにより, 細胞を十分に増殖させることができ, かつ細胞の順化工程がなくとも細胞が生育でき, アルブミンを含まないために蛋白質の分離精製が容易にできること, またこ

の無血清培地を用いることにより蛋白質を大量に生産できることを見出して本発明を完成した。

【0021】本発明の無血清培地で培養可能な動物細胞としては、その細胞自体が蛋白質発現可能なものでも、遺伝子工学により形質転換され異種蛋白質を発現するものであってもよい。細胞自体が蛋白質を発現するものとして、例えば、…IFN- β を産生する線維芽細胞、…等が例示される。…

【0024】実施例1

(1) 無血清培地の作製

基本培地としてRPMI 1640培地…10.2gを用い、添加物としてインスリン1mg, BP(牛肉由来ペプトン)5g, トランスフェリン10mg, ヒポキサンチン13mg, チミジン4mg, α -トコフェロール0.13mgおよびセレン4 μ gを用いて無血清培地1Lを作製した。

【0025】(2) ヒト腎細胞の培養

ヒト腎細胞をマイクロキャリアビーズに付着させたものを(1)の無血清培地中に…添加した。37 $^{\circ}$ C, 5%二酸化炭素の条件で培養したところ、2日間で培養液中に0.6~2.5V/m相当のプロウロキナーゼの産生が確認できた。その後、2~3日毎に培養液を交換し、長期間(少なくとも1ヶ月以上)の連続培養が可能であった。」

b 前記aによれば、刊行物Mには、基本培地に、インスリン、ペプトン及びトランスフェリンを添加した無血清培地を用いて、ヒト腎細胞を培養するとプロウロキナーゼの産生が確認され、長期培養が可能であったことが記載され、この無血清培地で培養可能な細胞の例として、IFN- β を産生する線維芽細胞が挙げられているといえることができる。

(エ) 刊行物N (特開平7-255470号公報。甲7)

a 刊行物Nには、概ね、次の記載がある。

「【請求項1】 ガングリオシドを含有し、細胞分化を誘導することを特徴とする無血清培地。」

「【0003】 このため、物質生産を目的とした細胞培養においては、血清を添加しない無血清培地を使用することが多かった。血清に代わる物質としては、増殖・成熟因子、トランスフェリンやラクトフェリンなどの蛋白質、脂溶性ビタミン類などの栄養物質、セレンやクロムなどを含む微量金属原子、インシュリンやステロイドホルモンを含むホルモン類、フィブロネクチンやラミニンあるいはレクチン類を含む細胞接着因子などを種々組み合わせて使用される。これらの成分を含有する無血清培地については、これまでに多くの文献が開示されているが、村上浩紀編集による細胞制御工学 (学窓社、昭和61年6月20日刊) に詳しく開示されている。また特開平3-22972号公報には、このような知見に基づいた細胞成長因子、ホルモン、脂質、接着因子を配合した細胞培養用培地が開示されている。

【0004】 しかし、正常な組織から分離した細胞 (正常細胞) や株化していない細胞などの培養にこうした無血清培地を用いた場合、無血清培地が目的とする本来無限に増殖する細胞ではないために、細胞が産生する生理活性物質を生産できないばかりか、良好な細胞の成育が得られないことが多かった。また、株化細胞においても無血清培地で培養できるものは限られており、通常の場合でも、血清濃度のより低い培地で順次継代培養して、血清が少なくても成育できる細胞だけを選択したり、細胞を低濃度血清に馴化させることによって、無血清培養が可能となるようにしている。しかしながら、選択や馴化の過程で本来もつ特性 (生理活性物質の産生能など) が消失してしま

う場合が多く、こうした無血清培地で増殖または維持できる変異株を得る操作は物質生産上好ましくなかった。また、生体内の生理代謝機能を研究するうえで、正常細胞を *in vitro* で培養するモデル系が求められているが、従来の無血清培地は株化した増殖細胞のために開発されたものであるために、正常な細胞の生理代謝の研究には適していない。そこで、生体から採取した正常組織由来の正常細胞が用いられているが、こうした細胞は無血清培養がほとんど不可能であった。

【0010】 ガングリオシド以外の成分としては、必須アミノ酸などを含む基礎培地成分に、さらに通常の株化細胞の培養に必要と考えられる有効成分を添加してもよい。たとえば、栄養成分としてピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン酸ナトリウム、エタノールアミン、各種ビタミン類（例：x100 Vitamins，Flow Laboratory 社）、亜セレン酸、グルコース、フラクトースなどが添加できる。また、ホルモンとしてインシュリンやトランスフェリンを添加してもよい。

【0013】

【実施例1】 …

【0015】 …ヒト結腸腺癌細胞株 Caco-2 をインシュリン（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびトランスフェリン（ $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含む上記RPMI-1640培地で培養した。この際、シャーレを4群にわけ、…シャーレDには何も添加しなかった。…この特の細胞の生育状態を観察したところD群では細胞が死滅していた（判決注：D群は、インシュリンとトランスフェリンを含む。）。一方、ガングリオシド添加群（判決注：インシュリン、トランスフェリン及びガングリオシドを含む）では細胞が生育しており、特に G_{M3} 添加群では血清の添加群と同様の細胞生育状態が観察された。

【0017】

【実施例 2】本実施例においては、市販の培養液にガングリオシドを添加した培養液で細胞を培養した例を示す。培地中濃度が $G_{M3} 2 \mu g/ml$ となるように、市販されている代表的な培地で増殖因子としてインシュリンとトランスフェリンを添加した無血清培地である Cosmedium 001（コスモバイオ）に添加した。…ヒト結腸腺癌細胞株 Caco-2 を培養し、…比較した。…これは市販の培地では生体の組織内環境を再現できないことによると考えられる。しかし、本発明培養液を用いた場合には、分化誘導を引き出すことができることから、本発明による培地は生体内の環境を反映しているものと考えられた。また本発明培地は、生体中で起こる細胞分化を *in vitro* で再現することを可能とすることが判明した。

【0018】

【実施例 3】本実施例においては、ヒトから分離したリンパ球の初代培養例と物質生産に及ぼす効果を示す。…リンパ球を 10 ml の PBS に分散して洗浄した後、 $150 \times g$ で 10 分間遠心分離した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、上に記載したインシュリン ($10 \mu g/ml$) およびトランスフェリン ($5 \mu g/ml$) を含む RPMI-1640 培地 9 ml を添加し、3 ml ずつシャーレ 3 枚 (A ; B ; C) に分注した。シャーレ A にはウシ胎児血清 (FCS) を 0.3 ml 添加し、シャーレ B には $G_{M3} 3 \mu g$ を添加した。7 日後に培養液中の IgA 含量を測定したところ、シャーレ A と B では IgA が検出されたが、シャーレ C では IgA が検出されないどころか、リンパ球が死滅していた。リンパ球の培養においては、本発明は、血清含有培地の代替が可能であることが確認できた。

【0020】

【実施例 4】本実施例においては、ACTH とサイクリック AMP の作用

で副腎皮質ホルモン…を分泌することが知られているマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 Y 1 細胞の培養例を示す。…この Y 1 細胞を、インシュリン (10 μ g/ml) およびトランスフェリン (5 μ g/ml) を含む RPMI-1640 培地でシャーレ 3 枚を使い培養した。シャーレ A には FCS (10%) + ACTH (10 mU) + サイクリック AMP (1 mM), シャーレ B には G_{M3} (10 μ g/ml) + ACTH (10 mU) + サイクリック AMP (1 mM), シャーレ C には ACTH (10 mU) + サイクリック AMP (1 mM) だけを添加した。…吸光度と蛋白質量から単位蛋白質重量あたりのステロイド量を計算したところ、血清添加培地と G_{M3} 添加培地で培養した Y 1 のみ、ステロイドを産生していた。細胞の生育状態を観察したところ A 及び B のシャーレでは順調に生育していることが確認されたが、C のシャーレでは生細胞数が減少していることが観察された。」

- b 前記 a によれば、ガングリオシドは細胞分化を誘導することができることから、インシュリン及びトランスフェリンを含有する無血清培地にガングリオシドを加えると、ヒト結腸腺癌細胞株 Caco-2, ヒトリンパ球 (初代培養), マウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 Y1 において、細胞分化を確認したり、IgA やステロイドの産生を誘導することができるが、ガングリオシドを加えない場合には、当該細胞が死滅したり、細胞数が減少することが記載されているということが出来る。

(オ) 乙 1 (三井洋司監訳「動物細胞培養の実際」35, 36 頁, 平成 2 年 2 月 28 日発行)

- a 乙 1 には、概ね、次の記載がある。

「2 哺乳動物細胞の培養のための無血清培地作成に向けて

…

最後に、実験者はその細胞の培養が最終的に何を目的としているの

かを明確にしなくてはならない。一般に、培養細胞はその由来組織を反映し、由来組織の基本的な特性を有し、その組織が発現するような分化や増殖の特性を示すであろう。このような目的がある細胞によって達成できる場合もある一方で、現在の組織培養法では限界のある場合もあることを認識することは重要である。培養細胞が増殖と分化・機能発現とを同時に行わない可能性もある。」(章の表題，34頁下から7～2行)

「2・5 至適な哺乳動物細胞培養のための市販培地

哺乳動物細胞の最適な培養のために種々の会社が販売している培地には大別して以下の3種類がある…

(i) 血清補充物…

(ii) 血清代替物 細胞は血清代替物を加えた基本培地(たとえばRPMI-1640/DME 1:1混合培地)中で増殖できる。この血清代替物はたいていインシュリン，トランスフェリン，増殖因子(ほとんどがEGF，FGF，PDGF)，ホルモン(たいていヒドロコルチゾンまたはデキサメタゾン， T_3 ，プロゲステロン)である。…

(iii) 無血清培地 細胞はこの培地(DME-F12 1:1)で血清を添加せずに増殖できる。この培地には一般に、インシュリン，トランスフェリン，セレン…を含む，製品は，HB101，…BM-86(Wissler)。」(35，36頁)

b 前記aによれば，乙1には，培養細胞が増殖と分化・機能発現とを同時に行わない可能性もあること，及び市販の無血清培地には血清代替成分として，インシュリンをはじめトランスフェリン等の様々な成分が含まれていることが記載されているということが出来る。

(カ) 乙2 (特開昭62-56428号公報)

a 乙2には，概ね，次の記載がある。

「本発明は…ヒト二倍体線維芽細胞を無血清培地で培養し，培養上清液をアフィニティークロマトグラフィー処理を含む精製工程で精製することを特徴とする血管内皮細胞増殖因子蛋白質の製造法を提供するものである。…ヒト二倍体線維芽細胞の培養に用いられる培地としてはたとえばインスリンおよびマウス表皮細胞増殖因子を含む無血清培地があげられる。…特に好ましい培地としてはたとえば…無血清培地 RITC80-7 [組成：第2表参照] などがあげられる。…

第2表

構成成分	…
…	
グリシン	
…	
セリン	
…	
3, 3', 5-トリヨードチロニン	
マウス表皮細胞増殖因子 (判決注：マウスEGF)	
トランスフェリン	
インスリン	
…	
イーグル変法基礎培地	」(1頁右下欄下から2行～3頁左上欄19行)

「実施例1 ヒト二倍体線維芽細胞の無血清培養上清液の調製

ヒト二倍体線維芽細胞を10%胎児牛血清を含むイーグル変法培地で培養し，培養細胞がサブコンフルエンスに達した時点で，この培地を除去し，無血清培地RITC80-7を加えて48～96時間培養した。…

実施例2 ヒト二倍体線維芽細胞（HEL）の産生するf-ECGF蛋白質の分離精製

実施例1に記載した如く、HELを無血清培地RITC80-7で2～3日間培養した培養上清液（SFCM）を出発材料とした。…以上の分離精製操作の結果、f-ECGF蛋白質は…回収率36%、約6200倍に精製された。」（4頁右上欄下から2行～5頁左上欄1行）

- b 前記aによれば、乙2には、ヒト二倍体線維芽細胞（HEL）をインシュリン、トランスフェリン、セレン等を添加した無血清培地で培養すると、血管内細胞増殖因子が産生されたことが記載されているとすることができる。

(キ) 乙4（特開平3-72872号公報）

- a 乙4には、概ね、次の記載がある。

「MCDB107培地と、インシュリン及びトランスフェリンより選ばれた少なくとも一種の化合物とからなる無血清培地。」（特許請求の範囲第1項）

「本発明において使用されるMCDB107培地は公知の培地であり、従来から基礎培地として使用されているF12培地を基にして、セレンを含む10種類の微量金属を添加し、ヘペス緩衝剤を用いてより安定な緩衝系培地としたものである。」（3頁右上欄13～19行）

「本発明の無血清培地は、哺乳類細胞、特に心筋細胞の培養の基礎培地として優れているMCDB107培地と、細胞のDNA合成及び蛋白合成を促進する作用を有するインシュリン及び／又はトランスフェリンとからなるので、血清成分を含有しなくとも、哺乳類細胞を長期間安定に培養することができる。…

従って、本発明の無血清培地及びそれを用いた哺乳類細胞の培養法

によれば、未知成分を含有する血清成分を全く使用しておらず、成分既知物質からなる無血清培地のため、DNA合成、増殖に関する因子、また収縮など分化に関する因子の発見、固定が容易に試験できるという効果を奏する。」(4頁左上欄下から3行～右上欄14行)

「試験例2

ラット新生児心筋細胞の無血清培地による培養

フィブロネクチンで処理された24-ウェルカルチュアプレートに 8×10^4 個のラット新生児心筋細胞を播種した。この際、MCDB107培地にインシュリン($10 \mu\text{g/ml}$)とトランスフェリン($10 \mu\text{g/ml}$)を添加した培地を用いた。…

…24時間後の付着細胞率は78%であった。4～5日目にかけて約24%の細胞数の増加がみられた。この培地で最大18日間細胞数の減少もなく長期間培養できた。細胞の生存率は18日間、常に90%以上の高い値を示した。」(5頁左下欄下から4行～右下欄13行)

b 前記aによれば、乙4には、MCDB-107培地に、インシュリン又はトランスフェリンを添加した無血清培地を用いると、ラット新生児心筋細胞の長期間培養が可能であったことが記載されているといえることができる。

(ク) 甲11 (特開平8-308561号公報)

a 甲11には、概ね、次の記載がある。

「【請求項1】培地にセレン化合物を含むことを特徴とする動物細胞培養用無血清培地。

【請求項12】前記培地にさらに細胞機能促進剤を含むことを特徴とする請求項1～11のいずれかに記載の動物細胞培養用無血清培地。

【請求項13】前記細胞機能促進剤がグルコシルチコイドまたはインスリンであることを特徴とする請求項12に記載の動物細胞培養用無

血清培地。」

「【0046】(実施例2)

血清培地との比較

A. 細胞培養容器の作製…

【0047】 B. 無血清培地の調整

培地としてL-15に、インスリン…、EGF…、DMSO…、デキサメタゾン…プロリン…を加えたものに、さらにそれぞれそれぞれ亜セレン酸ナトリウムを…添加したものを調整し、…比較用の無血清培地として亜セレン酸ナトリウムを添加していない培地を、血清培地として亜セレン酸ナトリウムの代わりに10%の牛胎児血清を添加した培地を使用した。

【0048】 C. 肝細胞の培養

上記の方法で作製した細胞培養容器と無血清培地を用いて、次に示す細胞培養実験を行った。…

【0049】 その結果は、…に示す通りである。…一方、亜セレン酸ナトリウム不含培地（判決注：インスリンを含む無血清培地である。）では長期培養ができていない事が確認された。この結果、亜セレン酸を含有する無血清培地で細胞機能の長期維持が可能であることがわかった。」

b 前記aによれば、甲11には、L-15培地に、亜セレン酸ナトリウムに加え、インスリン、EGF等を添加した無血清培地を用いると、ラット幹細胞の長期間の培養が可能であったが、当該無血清培地から亜セレン酸ナトリウムを除くと、長期間の培養はできなかつたことが記載されているといふことができる。

イ 前記アによれば、多数の文献において、インスリンを含む無血清培地を用いて、動物細胞を培養し、細胞の維持又は細胞数の増加（刊行物L

(甲5), 乙4, 甲11) や生物学的に活性な物質の産生を行ったことが記載され(刊行物2(甲2), 刊行物M(甲6), 刊行物N(甲7), 乙2), 線維芽細胞の培養もインスリンを含有する無血清培地が用いられており(刊行物L(甲5), 乙2), 実際に, インスリンをはじめトランスフェリンやセレン等の様々な成分を添加した無血清培地が市販されていた(刊行物N(甲7)の【0017】, 乙1等)ことから, 本願優先権主張日当時, 無血清培地において, 血清を代替する成分の一つとしてインスリンが汎用されていたことが認められる。

一方, インスリンを含む無血清培地を用いても, ヒト結腸腺癌細胞株CaCo-2又はヒトから分離したリンパ球が死滅したり, マウス副腎皮質腫瘍由来細胞株Y1細胞の生細胞数が減少すること(刊行物N(甲7)), あるいは, 肝細胞の長期培養ができないこと(甲11)等が報告されており, 血清を代替する成分としてインスリンさえ添加すれば, どのような動物細胞であっても必ず培養できるものではなく, また, 乙1に「培養細胞が増殖と分化・機能発現とを同時に行わない可能性もある。」(34頁下から3~2行)と記載されているように, 培養細胞を培養した際に, 増殖が生じたとしても, 同時に, 生物学的に活性な物質の産生のような分化・機能発現も生じるとは限らないことも, この技術分野においては広く知られており, 刊行物2(甲2)には, ADC-1(細胞バイアビリティ保護剤)とインスリンを含む基本培地(DMEM)では, CHO細胞の生長は刺激されるが, トロンビン添加時には産生されていたIL-6の産生は極めて低くなることが記載されている。

(3) 相違点3に係る構成の容易想到性について

そこで, 本願発明と引用発明との相違点3に係る構成の容易想到性について検討する。

前記(1)のとおり, 本願優先権主張日当時, 細胞を培養して, 細胞を増殖

させたり生物学的に活性な物質を産生させるに当たり、従来から血清含有培地を用いることが広く行われていたとともに、血清含有培地の問題点を克服するために、血清を含有しない無血清培地を使用することもよく行われていた周知の技術であって、当業者は、細胞を培養する目的及び用途等に応じて、血清培地と無血清培地のいずれを用いるかを選択できるということは周知の事項であったといえることができる。

ところで、刊行物1（甲1）には、アスコルビン酸リン酸エステルが、細胞分化促進効果やコラーゲン等の細胞外マトリックス成分（ECM）の合成促進能を有していることから（刊1-2）、ヒト皮膚線維芽細胞等の結合組織細胞を「アスコルビン酸リン酸エステル含有培地」で培養することにより、結合組織細胞と細胞外マトリックスとからなる人工組織を形成せしめることが記載されている（刊1-1）。そして、刊行物1の実施例2～4においては、牛胎児血清を含む培地を用いているものの、「培地には、たとえば動物血清、抗生物質などを添加するのが好ましい。」（刊1-3）と記載されていることから、刊行物1の記載に接した当業者は、細胞外マトリックスの産生には、アスコルビン酸リン酸エステルは必須ではあるが、血清は必須とはされておらず、血清を添加しなかったからといって細胞外マトリックスが産生されないとは直ちには認識しないものであると認められる。

そうすると、引用発明の人工組織を得るにあたり、アスコルビン酸リン酸エステルと共に牛胎児血清を含むDMEM（基礎栄養培地；基本培地）に代えて、細胞外マトリックスの産生に必須であるアスコルビン酸リン酸エステルは含むこととする一方で、添加することが好ましい成分ではあるものの必須の成分とはされていない「牛胎児血清」を含まない無血清培地を用いることも、当業者であれば、細胞を培養する目的及び用途等に応じて、選択して試みるものであるといえることができる。

そして、前記(2)のとおり、本願優先権主張日当時、無血清培地において、

血清を代替する成分の一つとしてインスリンが汎用されており、動物細胞の増殖だけでなく、CHO細胞からのIL-6の産生（刊行物2（甲2））、ヒト腎細胞からのプロウロキナーゼの産生（刊行物M（甲6））、ヒト二倍体線維芽細胞からの血管内皮細胞増殖因子の産生（乙2）等のように、線維芽細胞等の様々な動物細胞において、インスリンを含む無血清培地での生理学的に活性な物質の産生が可能となっていた。

したがって、上記の周知の技術に基づき、無血清培地を用いて引用発明の人工組織を得るにあたり、適切な血清代替成分を添加すれば、牛胎児血清が存在する場合と同様に細胞外マトリックスが産生されることを期待することができ、その血清代替成分として、汎用されているインスリンを選択し、アスコルビン酸リン酸エステル及びインスリンを含むDMEMを用いることは、当業者が容易に想到し得たことというべきである。

(4) 原告の主張について

ア 原告は、刊行物1（甲1）の「動物血清を添加することが好ましい」との記載が、動物血清を添加することが必須であることを意味するものではなく、引用発明が血清を加えない態様を「包含する」としても、そのことは、刊行物1の上記記載事項が、相違点3の構成である無血清培地で培養することに至ることについての阻害要因となることを否定する根拠とはなり得ない旨主張する。

しかし、刊行物1（甲1）の上記記載は、血清を加えない態様を排除するものではなく、血清培地とするか無血清培地とするかは、当業者が、細胞を培養する目的及び用途等に応じて選択し得る技術である以上、同記載が、無血清培地で培養することの阻害要因となるものではないことは明らかであって、原告の上記主張は失当である。

イ 原告は、刊行物2及び3で指摘されている欠点は、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果を達成する上で支障と

ならず、刊行物Mで指摘されている欠点についても、無血清培地を用いる以外の技術手段により回避することが可能であるのに対し、本願優先権主張日当時、線維芽細胞を無血清で培養して細胞外マトリックスを産生することができることは知られておらず、無血清で培養した場合にはそもそも細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果を達成することができるかが不明であるから、当業者は、血清を用いた場合のメリットが無血清の場合のメリットよりも上であると考え、その結果、無血清培養を忌避するのが極めて自然かつ合理的であり、血清には各種の欠点があることが知られているとしても、このことは、引用発明において無血清とする強い動機付けとはなり得ない旨主張する。

しかし、前記(1)イで認定した、血清には、ロット差があり再現性のある培養には不利であることや、ウイルスやマイコプラズマの汚染源となること等の問題点をどのような技術で回避可能であるのかについて原告は何ら具体的な説明をしていないから、「刊行物Mで指摘されている欠点についても、無血清培地を用いる以外の技術手段により回避することが可能である」との原告の主張には根拠がない。

また、無血清で培養した場合には、線維芽細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果を達成することができるとの確信が事前に得られなくとも、適切な血清代替成分を添加すれば、当該技術的結果を期待することができることは、既に説示したとおりである。

そうすると、当業者が、血清を用いた場合のメリットが無血清の場合のメリットよりも上であると考え、その結果、無血清培養を忌避するのが極めて自然かつ合理的であるとする原告の主張にも根拠がない。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

ウ 原告は、刊行物N（甲7）には、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を、インスリンを含む無血清培地で培養した場合に、蛋白質等の産生が

認められず、細胞が死滅ないし減少していることが記載され、刊行物L（甲5）には、無血清培地に添加されたインスリンは、単に線維芽細胞を維持する機能を有するにすぎず、線維芽細胞の「成長因子」として機能するものではないことが記載されていることからすれば、「インスリン」が「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用のある」ことが周知の事項であるとした本件審決の認定判断は誤りであり、仮に、「インスリン」が「無血清で培養する際、全ての細胞に対して成長因子として働く作用」があることが周知であるとしても、「線維芽細胞を培養する」ことと、「線維芽細胞を培養することにより細胞外マトリックスを産生する」こととは技術的意義が異なるから、細胞外マトリックスを産生する際、インスリンを無血清培地に添加することについての動機付けとなるものではない旨主張する。

しかし、前記(2)のとおり、本願優先権主張日当時、無血清培地において、血清を代替する成分の一つとしてインスリンが汎用されていたものと認められるから、刊行物N（甲7）や刊行物L（甲5）に記載されているように、インスリンが成長因子として作用せず、そのため、インスリンが「全ての細胞」に対して成長因子として働く作用があるとまでは認められないにしても、「無血清で培養する際、…インスリンを無血清培地に添加することは周知の事項であった」との本件審決の認定部分には誤りはない。そして、引用発明において無血清培地で細胞外マトリックスを産生することを試みるに当たり、周知の成分の中から適切な血清代替物を選択することは当然であるから、汎用されているインスリンを添加することについての動機付けは十分に存在するというべきである。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

エ 原告は、細胞及び培地組成を問わず無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項では

なく、無血清培地でも蛋白質等の物質を生産できることは技術常識ではないことに加え、線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することも技術常識ではないことから、引用発明において、「細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を当業者に抱かせること」はないのであって、本件審決が、「無血清培地で細胞外マトリックスが必ず産生されるとまでは分からないとしても、引用発明のごとく血清添加培地では細胞外マトリックスが産生されており、かつ、無血清培地でも物質生産ができるという上記技術常識に照らせば、細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を当業者に抱かせることは明らかである」との認定判断は誤りである旨主張する。

確かに、前記(2)において検討したところによれば、細胞及び培地組成を問わず、無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことができることが技術常識であったとはいえないとしても、CHO細胞からのIL-6の産生(刊行物2(甲2))、ヒト腎細胞からのプロウロキナーゼの産生(刊行物M(甲6))、ヒト二倍体線維芽細胞からの血管内皮細胞増殖因子の産生(乙2)等のように、様々な細胞において無血清培地での蛋白質等の物質生産が可能とされており、上記の物質生産がされた無血清培地においては血清代替物として汎用の成分であるインスリンが含まれている。

また、前記(3)のとおり、刊行物1の記載に接した当業者は、細胞外マトリックスの産生には、アスコルビン酸リン酸エステルは必須ではあるが、血清は必須とはされておらず、血清を添加しなかったからといって細胞外マトリックスが産生されないとは直ちには認識しないと認められる。

そうすると、細胞及び培地組成を問わず、無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うことができること、あるいは、線維芽細胞を分化させて細胞外マトリックスを産生させるために無血清で培養することが、いずれも技術常識でないとしても、刊行物1の記載に接した当業者であれば、引用発明

において、アスコルビン酸リン酸エステルが存在していれば、牛胎児血清が適切な血清代替物に置換されるならば、細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を抱くことは、極めて自然なことといえる。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

オ 原告は、刊行物1（甲1）の実験結果は、「アスコルビン酸リン酸エステル」という特定の成分が細胞外マトリックス産生に寄与することを実証するにすぎず、それ以外の成分、例えば動物血清が細胞外マトリックス産生に寄与しないことを根拠付けるものではなく、むしろ、血清含有培地で蛋白質等を産生する細胞を無血清培地で培養した場合に否定的なことが記載されている甲6の段落【0005】、甲18の段落【0014】並びに甲19の段落【0006】及び【0008】の記載を考慮すれば、「アスコルビン酸リン酸エステル」を含んでいても、引用発明において、血清培地に代えて無血清培地を用いた場合には、線維芽細胞が十分に増殖・分化して細胞外マトリックスを産生することができないと認識するのが通常である旨主張する。

しかし、刊行物1（甲1）に、動物血清が細胞外マトリックス産生に寄与することが記載ないし示唆されているわけではなく、刊行物M（甲6）の段落【0005】及び甲18の段落【0014】の記載は、血清濃度を減少又は血清を除去した場合の問題点を指摘するだけであるから、これらの記載から、直ちに、引用発明において、血清代替成分を添加した無血清培地に変更した場合に細胞外マトリックスを産生することができなくなることにつながるものではない。

また、甲19は本願優先権主張日（平成10年11月19日）よりも7年以上も後の日（平成18年1月13日）を優先日とする特許出願であるから、その記載事項を、本願優先権主張日当時の技術常識として考慮することは相当ではない。

そうすると、原告が指摘する上記の点を考慮しても、引用発明において、血清代替成分を添加した無血清培地を用いた場合には細胞外マトリックスを産生することができないとまで、当業者が認識するということはできない。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

カ 原告は、乙2は血管内皮増殖因子蛋白質に関するものであり、引用発明のような人工組織とは性質が大きく異なるから、「蛋白質」という極めて大枠で一致するとしても、乙2の開示内容は、培地組成も異なる引用発明において無血清培地とした場合の細胞外マトリックス産生について予測する材料とはなり得ない旨主張する。

しかし、細胞外マトリックスが、血管内皮増殖因子とは性質が大きく異なるからといって、乙2の開示内容から、引用発明において、無血清培地とした場合に、細胞外マトリックスが産生されることがあり得ないと予測するような事情は特に見出すことができない。そして、細胞外マトリックスが産生されるとの確信が得られないことは、引用発明において、牛胎児血清に代えて、血清代替成分として汎用されているインスリンを添加した無血清培地を用いることを阻害するものではなく、そのような無血清培地を用いることを当業者が容易に想到し得ることは、既に説示したとおりである。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

キ 原告は、刊行物1（甲1）の（刊1-10）は、一成分としてインスリンが含まれているある培地で線維芽細胞を培養することにより、細胞外マトリックスの成分であるコラーゲンの合成が盛んになったことを開示するに留まり、コラーゲン合成を促進する成分はインスリンではなく、As-2-Pであると認識するのが自然かつ合理的であるから、本件審決が「インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく、促進される

ことが分かる」とした認定判断は誤りである旨主張する。

しかし、本件審決の上記認定判断が、「インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく、As-2-Pによりコラーゲン合成が促進されることが分かる」との趣旨であることは、前記2の刊行物1の記載からみて明らかであるから、原告の上記主張は採用することができない。

(5) 小括

以上によれば、相違点3に係る本願発明の構成は、当業者であれば、引用発明から容易に想到し得たものといえることができるから、この点に関する本件審決の判断に誤りはなく、原告主張の取消事由1-(1)は理由がない。

4 取消事由1-(2)（作用効果の顕著性の認定判断の誤り）について

(1) 原告は、本願発明の効果は、刊行物1並びに周知技術の技術的事項及び技術常識に基づき、当業者が予測し得ない顕著な効果であるから、本件審決が、本願発明の効果は格別顕著な効果とはいえないとした認定判断は誤りである旨主張する。

しかし、前記3で説示したとおり、引用発明において、無血清で培養した場合にも、同様に細胞外マトリックスが産生されるという確証が事前に存在しなくとも、周知の課題に基づき、無血清培地を用いて引用発明の人工組織を得るにあたり、適切な血清代替成分を添加すれば、牛胎児血清が存在する場合と同様に細胞外マトリックスが産生されることを、当業者は期待することができる。

そして、本願発明において、そのような当業者の期待どおりに、血清代替成分として汎用されているインスリンを含有する実施例で用いられた無血清培地を用いた際に、細胞外マトリックスが産生され人工組織が得られたことは、当業者の予測し得ない格別顕著な効果ということとはできない。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

(2) 原告は、本件審決が、無血清培地で細胞外マトリックスが産生される効

果は、基礎培地に市販の無血清培地に加えられるトランスフェリン、表皮成長因子が加えられており、更にヒドロコチゾンも添加されており、インスリンを単独で添加したものではないから、特定の実施例における効果にすぎない旨認定判断したことについて、本願明細書の記載及び本願優先権主張日当時の技術常識から、本願明細書の段落【0119】～【0125】に記載の作用効果が、特定の実施例における効果に限定され、本願発明全般の作用効果であるとは認められない事情は存在しないから、他の成長因子等を加えずに、インスリンのみを基本培地に加えたような実施例が存在しないとしても、このことは、本願発明の作用効果の顕著性・非予測性を否定する根拠とはなり得ず、本件審決の上記認定判断は誤りである旨主張する。

しかし、本願明細書の「基本培地は、アミノ酸、成長因子およびホルモンのような成分で補足される。…好ましい具体例では、基本培地は、動物細胞培養で習熟者に知られている以下の成分で補足される。インシュリン、トランスフェリン、トリヨードチロニン（T3）、および補足についての濃度および置換が、習熟者によって決定される、いずれかまたは両方のエタノールアミンおよび α -ホスホリルエタノールアミン。」（【0035】）、及び、「インシュリンは、多重継代より長期間利点を供するグルコースおよびアミノ酸の摂取を促進するポリペプチドホルモンである。インシュリンまたはインシュリン様成長因子（IGF）の補足は、グルコースおよびアミノ酸を取込む細胞の能力の最終的枯渇、および細胞表現型の可能性のある分解がある場合に長期培養に必要である。…」（【0036】）との記載をみても、インスリンが、同等に例示されているトランスフェリンやトリヨードチロニン等の他の動物細胞培養で習熟者に知られている成分と対比して、細胞外マトリックスの産生において異なる役割を果たすことは記載されていない。

そうすると、実施例における培地に含まれている、インスリン以外のヒドロコチゾン、トランスフェリン、トリヨードサイロニン、セレン等の多

数の成分の中から、インスリンのみが、その他の成分の存在にかかわらず細胞外マトリックスの産生において、重要な役割を果たすことの根拠は見出せない。

そして、前記3(2)によれば、無血清培地に添加される血清代替成分については、インスリン、トランスフェリン、セレン等の複数の成分を同時に添加することが周知であるということが出来るから、実施例の無血清培地に含まれる多数の成分の中から、インスリンのみを選択して、所定の効果を果たすための重要な成分として本願発明の発明特定事項とすることの根拠は見出せない。

したがって、本願明細書の記載及び本願優先権主張日当時の技術常識から、実施例で確認された効果が、トランスフェリンやセレン等の他の成分を含まない本願発明の全体にわたって奏される効果ということとはできないから、本件審決がした認定判断に誤りはなく、原告の上記主張は採用することができない。

(3) 小括

以上によれば、原告主張の取消事由1-(2)は理由がない。

5 取消事由2(本件審決の手續違背)について

- (1) 原告は、相違点3の判断において、本件審決が周知技術を示すものとして引用した刊行物L~N(甲5~7)は、いずれも本願の審査及び審判段階で示されたことがなく、本件審決で初めて示された文献であるところ、本件審決では、相違点3の容易想到性に関して、刊行物M, N(甲6, 7)を引用し、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うこと」が周知の事項であり、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できること」が技術常識であると認定し、刊行物L(甲5)を引用し、「線維芽細胞を無血清で培養できること」が技術常識であると認定し、かかる周知の事項に基づいて、引用発明において無血清で培養することは、当業者に容易であると判断したものであるが、

これは、刊行物L～N（甲5～7）を、単に当業者の技術水準を知るためや、先行文献に記載された事項の技術的意義を明確にするなど補助的に用いたものではなく、相違点3の容易想到性を肯認する判断の核心的な引用例として用いたものであって、本件審決の上記認定判断が「査定の理由と異なる理由」に該当し、原告には、上記認定判断に基づく相違点3の構成の容易想到性について、実質的な防御の機会が与えられておらず、意見書提出の機会を与えなくとも手続の公正及び原告の利益を害さない等の特段の事情が存しないことは明らかであるから、本件審決の審判手続は、特許法159条2項で準用する同法50条の規定に違反するものであり、かかる違反は、本件審決の結論に影響を及ぼす旨主張する。

そこで、この点について、以下検討する。

(2) 証拠（甲15、16）及び弁論の全趣旨によれば、以下の事実が認められる。

ア 特許庁は、原告に対し、平成25年3月12日付けで拒絶理由を通知したが、当該拒絶理由通知書（甲15）には、相違点3の容易想到性について、次の記載がある。

「ウ 相違点3について

従来より、血清には、価格変動や供給不安があること（刊行物2の摘記（刊2-1）参照。）、ロット間でばらつきがあること（刊行物3の摘記（刊3-1）参照。）等の欠点が有ることが知られており、本願優先権主張日前から無血清培地での培養が周知の課題となっていた。

そして、無血清で培養する際、インスリンを添加することは周知の事項であった（刊行物2の摘記（刊2-2）参照。）

そうすると、刊行物1発明において、無血清で培養すべくインスリンを添加して本願発明1のごとく構成することは、当業者が何の困難性もなくなし得たことといえる。」（25、26頁）

イ これに対して、原告は、平成25年9月18日付け意見書（甲16）を提出した。当該意見書には、相違点3の容易想到性について、次の記載がある。

「また、刊行物2及び3は、血清には、価格変動や供給不安があること及びロット間でばらつきがあること等の欠点が有ることを指摘しているに過ぎず、あらゆる細胞が、血清含有培地と同様に、無血清培地でも培養することができることについての技術的知見は全く存在せず、まして、血清含有培地と同様に、無血清培地で培養することにより、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織が形成されることについて何らも触れられていません。

しかも、刊行物2及び3で指摘されている上記欠点は、発明の「商業的实施」という観点から問題とされるものであり、「技術的实施」という観点から問題とされるものではありません。即ち、血清について、価格変動や供給不安があり、あるいはロット間でばらつきがあるとしても、そのこと自体は、細胞の種類を問わず、血清含有培地と同様に、無血清培地で培養することが可能であり、また、細胞を培養により、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織が形成されることについての技術的根拠とはなり得ず、また、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果（商業的实施ではない。）を達成するために、血清含有培地に替えて、無血清培地で培養することについての示唆等となるものでもありません。

かかる刊行物1～3の記載に鑑みれば、刊行物2及び3の記載より、本願優先権主張日前から無血清培地での培養が周知の課題となっていたとしても、当業者は、牛胎児血清等の動物血清を添加することが好ましいことが記載されている刊行物1において、血清含有培地に替えて、インスリン含有無血清培地により培養した場合に、細胞と細胞外マトリックスとから

なる組織が形成されると予測することは全くあり得ず，その結果，当業者は刊行物1において，血清含有培地に替えて，インスリン含有無血清培地により培養することを想起することは全くあり得ません。」（3頁）

ウ しかして，本件審決は，相違点3の容易想到性について，次のとおり認定判断した。

「3 相違点3について

（1）インシュリンの添加について

従来より，血清には，価格変動や供給不安があること（刊行物2の摘記（刊2-1）参照。），ロット間でばらつきがあること（刊行物3の摘記（刊3-1）参照。），ウイルスやマイコプラズマの感染源となること（刊行物Mの摘記（刊M-1））等の欠点があることが知られており，本願優先権主張日前から無血清培地で培養することが周知の課題となっていた。

そして，無血清で培養する際，全ての細胞に対して成長因子として働く作用のあるインスリンを無血清培地に添加することは周知の事項であった（刊行物2の摘記（刊2-2），刊行物Kの摘記（刊K-1），刊行物Lの摘記（刊L-2），刊行物Mの摘記（刊M-2）及び刊行物Nの摘記（刊N-1）参照。）。

さらに，刊行物1において，「…」と記載されており，血清の入った培地であるが，臍線維芽細胞の培養において，インスリンを添加した培地で，細胞外マトリックスの成分であるコラーゲンの合成が盛んなことを確認しており，インスリンの添加によりコラーゲン合成が妨げられることなく，促進されることが分かる。

そうすると，引用発明において，無血清で培養すべく，周知のインスリンを添加する程度のことは，当業者が何の困難性もなくなし得たことといえる。

（2）細胞外マトリックスの産生について

無血清培地で、蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項（例えば、刊行物Mの摘記（刊M-2）及び刊行物Nの摘記（刊N-1））であり、無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた。

そして、線維芽細胞を無血清で培養することは、刊行物Lに記載のように、古くから行われており、無血清で培養できることは技術常識であった。

無血清培地で細胞外マトリックスが必ず産生されるとまでは分からないとしても、引用発明のごとく血清添加培地では細胞外マトリックスが産生されており、かつ、無血清培地でも物質生産ができるという上記技術常識に照らせば、細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を当業者に抱かせることは明らかである。

そして、本願発明は、引用発明において、無血清で培養すべく、周知のインスリンを添加し、細胞外マトリックスが無血清培地で期待どおり産生されることを確かめることで、相違点3に記載の本願発明の特定事項のごとくしたものであって、細胞外マトリックスが産生されることを確かめることは、当業者が何の創作性もなくなし得る単なる確認事項にすぎない。」（29～31頁）

(3) 本件審決が、刊行物M, N（甲6, 7）を引用したことについて

前記(2)認定事実によれば、平成25年3月12日付け拒絶理由通知書（甲15）においては、「無血清で培養する際、インスリンを添加することは周知の事項であった（刊行物2の摘記（刊2-2）参照。）」ことは記載されているものの、「無血清培地で、蛋白質等の物質生産を行うこと」についての具体的な言及はされていない。これに対して、本件審決では、「(1)インシュリンの添加について」とは別に「(2)細胞外マトリックスの産生について」の項目を立てた上で、無血清培地で細胞外マトリックスが産生されるかもしれないという期待を当業者に抱かせることの根拠として、「無血清

培地で、蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項（例えば、刊行物Mの摘記（刊M－2）及び刊行物Nの摘記（刊N－1））であり、無血清培地でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた。」ことが記載されている。

しかしながら、前記3(2)で検討したように、多数の文献において、インスリンを含む無血清培地を用いて、動物細胞を培養し、細胞の維持又は細胞数の増加や生物学的に活性な物質の産生を行ったことが記載されていることからすれば、一方において、乙1に「培養細胞が増殖と分化・機能発現とを同時に行わない可能性もある。」と記載されているように、培養細胞を培養した際に、増殖が生じたとしても、同時に、生物学的に活性な物質の産生のような分化・機能発現も生じるとは限らないことが広く知られているにしても、一般に、培地を用いて細胞を「培養する」とは、細胞を維持・増殖させることに限定して使用される用語ではなく、これに加えて、それが成功するかどうかは別として、生物学的に活性な物質を産生させることをも包含する概念として使用されているということが出来る。このことは、拒絶理由通知書（甲15）において引用されている刊行物2（甲2）の段落【0007】に、「したがって、細胞の生長および生物学的に活性な産物の生産を支持するための代替の培地補助剤の開発が強く望まれている。」と記載されていることによっても示されているということが出来る。そうすると、拒絶理由通知書（甲15）の「無血清で培養する際」との上記記載は、細胞を維持・増殖させることに加えて、細胞から生物学的に活性な物質を産生させることをも包含する趣旨であることは、当業者であれば容易に理解し得る自明なことというべきである。

そして、本件審決の「無血清培地で、蛋白質等の物質生産を行うことは、本願優先権主張日前から普通に行われている周知の事項（例えば、刊行物Mの摘記（刊M－2）及び刊行物Nの摘記（刊N－1））であり、無血清培地

でも蛋白質等の物質生産できることは技術常識となっていた。」との上記記載は、拒絶理由通知書（甲15）の「無血清で培養する際」との記載を、具体的に説明し、無血清で培養し、蛋白質等の物質生産を行うことも周知であったことを明らかにしたものにすぎないといえる。そうすると、本件審決が、初めて刊行物M、N（甲6、7）を引用して、上記記載を追加したとしても、これが拒絶理由通知（甲15）とは異なる拒絶理由を構成したということとはできない。

加えて、前記(2)のとおり、原告は、拒絶理由通知（甲15）に対する意見書（甲16）において、「刊行物2及び3は、…指摘しているにすぎず、あらゆる細胞が、血清含有培地と同様に、無血清培地でも培養することができることについての技術的知見は全く存在せず、まして、血清含有培地と同様に、無血清培地で培養することにより、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織が形成されることについて何らも触れられていません。」、「細胞の種類を問わず、血清含有培地と同様に、無血清培地で培養することが可能であり、また、細胞を培養により、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織が形成されることについての技術的根拠とはなり得ず、また、細胞と細胞外マトリックスとからなる組織を形成するという技術的結果（商業的实施ではない。）を達成するために、血清含有培地に替えて、無血清培地で培養することについての示唆等となるものでもありません。」と記載するなどして、明らかに、「無血清培地で、蛋白質等（具体的には、細胞外マトリックス）の物質生産を行うこと」は示唆されていない旨主張しているのであるから、刊行物M、N（甲6、7）が、本件審決において初めて引用された文献ではあるものの、すでに原告は、意見書において「無血清培地で、蛋白質等の物質生産を行うこと」についての意見を述べているといえることができるから、実質的に防御の機会が与えられていなかったということもできない。

(4) 本件審決が、刊行物L（甲5）を引用したことについて

前記(3)で検討したところによれば、本件審決の、刊行物L（甲5）を引用した上で、「線維芽細胞を無血清で培養することは、…技術常識であった。」との認定は、拒絶理由通知書（甲15）の「無血清で培養する際、インスリンを添加することは周知の事項であった」ことが、線維芽細胞においても当てはまることを補足的に説明したものであるというべきであるから、拒絶理由通知（甲15）と異なる拒絶理由を形成するものではない。

また、前記(2)のとおり、原告は、意見書（甲16）において、「あらゆる細胞が、血清含有培地と同様に、無血清培地でも培養することができることについての技術的知見は全く存在せず」と主張しており、これは、線維芽細胞を含めたあらゆる細胞を無血清で培養することについての意見を述べたものであるから、本件審決の上記認定について実質的な防御の機会が与えられていなかったということもできない。

(5) 原告の主張について

原告は、この点について、意見書（甲16）では、原告は、専ら血清含有培地における課題の周知性が、相違点3の構成の容易想到性の根拠とはなり得ない旨の反論を述べただけであり、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うこと」が周知の事項であり、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できること」が技術常識であること、「線維芽細胞を無血清で培養すること」が技術常識であること及びこれに基づく相違点3の構成の容易想到性についての意見は述べていないから、これらを周知事項及び技術常識とした認定判断及びこれに基づく相違点3の構成の容易想到性について、原告には、実質的な防御の機会が与えられていない旨主張する。

しかし、前記のとおり、原告は、意見書（甲16）において、血清含有培地における課題の周知性に関する反論以外にも、「無血清培地での蛋白質等（具体的には、細胞外マトリックス）の物質生産を行うこと」に関する意見を、実質的に述べているということができる。

したがって、原告の上記主張は採用することができない。

(6) 小括

以上によれば、本件審決が、相違点3の容易想到性に関して、平成25年3月12日付け拒絶理由通知書においては示していなかった刊行物M、N（甲6、7）を引用し、「無血清培地で蛋白質等の物質生産を行うこと」が周知の事項であり、「無血清培地でも蛋白質等の物質生産できること」が技術常識であると認定し、刊行物L（甲5）を引用し、「線維芽細胞を無血清で培養できること」が技術常識であると認定し、かかる周知の事項に基づいて、引用発明において無血清で培養することは、当業者に容易であると判断したことについて、特許法159条2項で準用する同法50条の規定に違反する違法な手続があったということとはできない。

したがって、原告主張の取消事由2は理由がない。

6 結論

以上のとおり、原告主張の取消事由はいずれも理由がなく、本件審決にこれを取り消すべき違法は認められない。

よって、原告の請求は理由がないから、これを棄却することとし、主文のとおり判決する。

知的財産高等裁判所第4部

裁判長裁判官 富 田 善 範

裁判官 田 中 芳 樹

裁判官 柵 木 澄 子