(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117441013 A
(43)申请公布日 2024.01.23

(21)申请号 202280033722.X
(22)申请日 2022.03.29
(30)优先权数据
2021-080546 2021.05.11 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/015708 2022.03.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/239556 JA 2022.11.17
(71)申请人 BMG株式会社
地址 日本国京都府京都市
(72)发明人 相泽明 玄丞烋 玄优基
(74)专利代理机构 北京五洲洋和知识产权代理事务所(普通合伙) 11387
专利代理师 刘春成 刘春燕
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 5/073(2006.01)
A01N 1/02(2006.01)

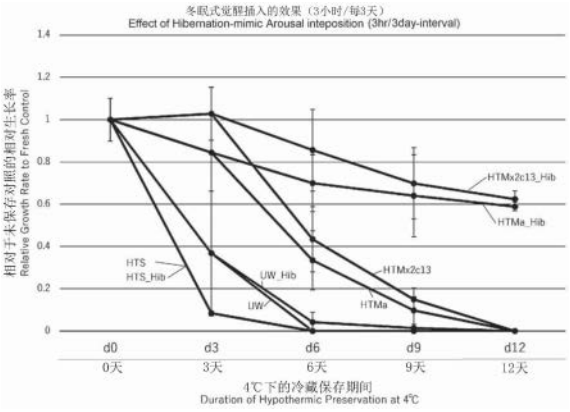
权利要求书2页 说明书16页 附图5页

(54)发明名称

干细胞用冷藏保存液以及保存方法

(57)摘要

本发明提供一种适于在非冷冻状态下冷藏保存人或动物的iPS细胞等干细胞或胚胎的冷藏保存方法和冷藏保存液。基于具体的一个实施方式的冷藏用保存液使用将MEM-alpha(Minimum Essential Medium Eagle(MEM)Alpha Modification:低限量Eagle培养基α改性)和UW液(UW_sln;BELZER UW(注册商标)COLD STORAGE SOLUTION)或改性UW液(将高分子成分变更为PVA)以约1/1～1/2的比率混合而成的液体(HTMα,HTMx2c13)或与其同等的组成,特别是具有钾离子和钠离子的浓度的冷藏保存液。然后,在2～8℃进行2～10天或4～20天的冷藏保存期间内,每隔2～5天插入维持在30～37℃的温度的觉醒期间(HTMα-Hib,HTMx2c13-Hib)。



CN 117441013 A

1.一种用于以非冷冻状态保存人或动物的干细胞或胚胎于冷藏保存液的冷藏保存方法,其特征在于,

按照每2～8天的期间,插入在0.5～8小时的期间维持20～37℃的温度的觉醒期间,

在所述冷藏保存液中,钾离子种类的含量为30～80mmoL/L,钠离子种类的含量为30～80mmoL/L,基于离子的钠离子种类的量相对于钾离子种类的量的摩尔比(Na^+/K^+的比)为0.5～1.3,

以0.5～8mM的浓度含有水溶性维生素E(Trolox)或其类似物,

以0.1～4.2mM的浓度含有腺嘌呤或其盐或者衍生物,

含有全部的必需氨基酸、或含有除1种、2种或3种以外的全部必需氨基酸,必需氨基酸的总含量为50～200mg,

非必需氨基酸的总含量为50～200mg/L。

2.一种用于以非冷冻状态保存人或动物的干细胞或胚胎于冷藏保存液的冷藏保存方法,其特征在于,

按照每2～8天的期间,插入在0.5～8小时的期间维持20～37℃的温度的觉醒期间,

所述冷藏保存液为含有:(i)以内酯换算的乳糖醛酸或其盐30～100mmoL/L、(ii)粗糖水合物10～30mmoL/L、(iii)芳香醇0.3～1mmoL/L、(iv)谷胱甘肽(总谷胱甘肽)1～3mmoL/L、(v)腺苷2～10mmoL/L、(vi)硫辛酸0.1～0.5μmol/L、(vii)丙酮酸钠0.1～0.7mmoL/L、(viii)葡萄糖1～5mmoL/L、(ix)抗坏血酸0.03～0.3mmoL/L、以及维生素E或其水溶性类似物·衍生物0.5～8mM、(x)腺嘌呤或其盐或衍生物0.1～4.2mM、(xi)其他维生素或其水溶性类似物·衍生物(包括叶酸、烟酰胺(Nicotinamide)、核黄素、B12、胆碱、肌醇、泛酸、吡啶甲酰磷酸、硫胺)、(xii)必需氨基酸合计50～200mg/L、(xiii)非必需氨基酸合计100～500mg/L、(xiv)钾离子种类30～80mmoL/L、以及(xv)钠离子种类20～90mmoL/L的生理缓冲液。

3.根据权利要求1或2所述的冷藏保存方法,其特征在于,

所述冷藏保存液含有羟乙基淀粉20～50g/L、聚乙烯醇5～50g/L、和/或甘露醇30～90mmoL/L。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的冷藏保存方法,其特征在于,

所述冷藏保存液以2～5mM的浓度含有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺或其它二肽替代品或其盐。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的冷藏保存方法,其特征在于,

悬浮或浸渍人或动物的iPS细胞或其他人工干细胞、其他干细胞、由此得到的类器官或胚胎,在2～8℃下保存1～10天。

6.一种用于在非冷冻状态下保存人或动物的干细胞或胚胎或生物体组织、脏器的冷藏保存液,其特征在于,

按照每2～8天的期间,插入在0.5～8小时的期间维持20～37℃的温度的觉醒期间,

所述冷藏保存液中,钾离子种类的含量为30～80mmoL/L,钠离子种类的含量为30～80mmoL/L,基于离子的钠离子种类的量相对于钾离子种类的量的摩尔比(Na^+/K^+的比)为0.5～1.3,

以0.5～8mM的浓度含有水溶性维生素E(Trolox)或其类似物,

以0.1～4.2mM浓度含有腺嘌呤或其盐或者衍生物,

含有全部的必需氨基酸、或含有除1种、2种或3种以外的全部必需氨基酸,必需氨基酸的总含量为50～200mg,

非必需氨基酸的总含量为50～200mg/L。

7.一种用于在非冷冻状态下保存人或动物的干细胞或胚胎或生物体组织、脏器的冷藏保存液,其特征在于,

按照每2～8天的期间,插入在0.5～8小时的期间维持20～37℃的温度的觉醒期间,

所述冷藏保存液为含有:(i)以内酯换算的乳糖醛酸或其盐30～100mmoL/L、(ii)粗糖水合物10～30mmoL/L、(iii)芳香醇0.3～1mmoL/L、(iv)谷胱甘肽(总谷胱甘肽)1～3mmoL/L、(v)腺苷2～10mmoL/L、(vi)硫辛酸0.1～0.5μmol/L、(vii)丙酮酸钠0.1～0.7mmoL/L、(viii)葡萄糖1～5mmoL/L、(ix)抗坏血酸0.03～0.3mmoL/L、以及维生素E或其水溶性类似物·衍生物0.5～8mM、(x)腺嘌呤或其盐或衍生物0.1～4.2mM、(xi)其他维生素或其水溶性类似物·衍生物(包括叶酸、烟酰胺(Nicotinamide)、核黄素、B12、胆碱、肌醇、泛酸、吡啶甲酰磷酸、硫胺)、(xii)必需氨基酸合计50～200mg/L、(xiii)非必需氨基酸合计100～500mg/L、(xiv)钾离子种类30～80mmoL/L、以及(xv)钠离子种类20～90mmoL/L的生理缓冲液。

干细胞用冷藏保存液以及保存方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于在非冷冻状态下保存细胞、组织、类器官、脏器等的保存液以及保存方法。特别是涉及用于在低于常温的温度下,例如2～15℃、2～10℃、2～8℃或2～6℃下进行保存的冷藏保存液以及保存方法。另外,特别涉及用于使人iPS细胞等多能干细胞(pluripotent cells)及其他干细胞(stem cells)、或由此得到的类器官等衍生物、初始胚胎等浮游或浸渍而保存的冷藏保存液以及保存方法。

背景技术

[0002] 简便、高效、稳定地保存和供给iPS、ES细胞等干细胞是再生医疗的基础研究和临床应用研究或制药研究领域不可缺少的关键技术。人的iPS细胞以及ES细胞的冷冻保存存在如果是缓慢冷冻保存法则保存后的生存率低、用于冷冻保存的抗冻材料DMSO所具有的细胞毒性、分化诱导性等许多问题。细胞的非冷冻低温保存,作为短期(例如1天～2周)到中期(例如半月～3个月)的保存法是非常有魅力的技术,除此之外,考虑到向分化诱导的细胞的保存、类器官的保存等再生医疗技术的产业化和制药中的应用的情况下,其优点很大。然而,使用作为脏器的低温保存液而被广泛使用的UW液(UW_sln;BELZER UW(注册商标)COLD STORAGE SOLUTION),低温保存含有人的iPS细胞的多能干细胞等是困难的,需要开发新的冷藏保存技术。

[0003] 在用于肝脏、肾脏等移植的脏器的冷藏保存中,广泛使用UW液,成为实质上的黄金汤(最佳基准)。20世纪80年代开发的UW液具有比较简单的组成,其在细胞内型的低Na离子且高K离子的盐类组成的溶液中含有内酯(Lactobionate)、棉子糖(Raffinose)、谷胱甘肽(Glutathion)、羟乙基淀粉(Hydroxy-ethyl starch)等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:第41届日本分子生物学会年会要旨集2018年11月9日3P-0445新开发人iPS细胞用冷藏保存液的低温应激・氧化应激保护效果相泽明[1],纪美佐[1],林正和[1],玄优基[1],玄丞烋[2]([1]株式会社BioVerde,[2]国立大学法人鹿儿岛大学共同兽医学部)

[0007] 非专利文献2:第18届日本再生医疗学会总会摘录2019年2月22日P-01-015具有以人iPS细胞的冷藏保存为目的的低温应激・氧化应激保护效果的新型保存液的开发相泽明(株式会社BioVerde)

[0008] 非专利文献3:COMPRE BELZER UWTM COLD STORAGE SOLUTION TO VIASPAN

[0009] https://bridgetolife.com/compare-belzer-uw-cold-storage-solution-to-viaspan/

[0010] 然而,在将细胞等冷藏保存的情况下,UW液不能充分抑制低温保存应激。本发明人提出这样的假说,在解决该问题时,将盐类组成以UW液为代表的、细胞内型和具有通常培养基的高Na离子低K离子细胞外型的中间型的盐类组成是重要的。另外,与脏器保存相比,蛋白质等高分子的添加认为是重要的,进行了UW液和细胞培养液的中间型的保存液的开发。

[0011] 关于细胞低温保存用的培养基,几乎没有报告。有少数的基于近年来开发的HTS FRS(Hypothermosol(注册商标)FRS;BioLife Solutions)进行保存的报告。有该HTS FRS可以将人皮肤成纤维细胞、平滑肌细胞低温保存3～5天的报告,但没有关于人iPS细胞等多能细胞的冷藏保存的报告。

[0012] 如未公开的国际申请PCT/JP2020/41313所述,本发明人等在尝试多种多样的组合中,尝试了使用将MEM-alpha(Minimum Essential Medium Eagle(MEM)Alpha Modification:低限量Eagle培养基α改性)和上述UW液以约1/1～1/2的比率混合而成的液体。基于MEM培养基,MEM-alpha含有非必需氨基酸、丙酮酸钠、硫辛酸、生物素和维生素B12。已知通过使用这种改良的冷藏保存液,可以对人iPS细胞等冷藏保存数天或更长的期间,并在一定程度上维持生存率。

[0013] 本发明人在尝试进一步改良的过程中,得到了能否应用在啮齿类(鼠目)等中发现的冬眠模型(Hibernation Model)的非常独创的构思。冬眠的啮齿类等在低温期之间必须有短的觉醒期。觉醒期是几天至一周的时间体温暂时恢复到37℃左右,采集食物后,返回到低体温状态。

发明内容

[0014] 本发明人等尝试了使用上述改良的冷藏保存液,并且在冷藏保存期间插入觉醒期。即,通过冬眠,与例如在从20℃左右到低于10℃的低体温下进行冬眠时以一定程度的间隔重复短的觉醒期相同,在冷藏保存期间内,尝试了插入返回到接近37℃的培养条件或与其接近的条件的短的期间。并且,通过实验确认由此产生的效果,从而完成了发明。

[0015] 因此,根据本发明的优选的实施方式,按照下述(i)～(iii)进行冷藏保存。

[0016] (i)使用将MEM-alpha与UW液或改性UW液(将高分子成分变更为PVA)以约1/1～1/2比率混合而成的混合液、或与其同等的保存液,特别是在钾离子和钠离子的浓度以及相互的比率方面与该混合液同等的冷藏保存液。

[0017] (ii)例如在2～10℃下冷藏保存2～10天、3～15天或4～20天时,以一定或不一定的间隔插入觉醒期间。

[0018] (iii)觉醒期间可以如下设定。

[0019] • 各觉醒期间的长度:0.5～10小时,特别是1～8小时。

[0020] • 在各觉醒期间的温度:37℃以下、30℃以上、32℃以上、33℃以上、34℃以上或35℃以上。

[0021] • 觉醒期间的间隔:2～8天,特别是2～5天,例如3～4天。

[0022] 根据本发明的优选的实施方式,例如可以通过在冰箱或冷藏室中静置进行2-10℃的冷藏保存,并且将觉醒期间的插入转移到通常的培养器中,放置在通常的细胞培养条件下(典型地为37℃、5%CO_2)来实现。

[0023] 另外,觉醒期间的插入可以以一定的间隔且以一定的长度,例如每3天、每2天、或者每4天、在1～6小时的范围内设定的一定的时间进行。但是,例如也可以在培养开始3天后插入最初的觉醒期间,接着以4天的间隔插入第2次觉醒期间。另外,也可以将最初的觉醒期间设为3小时,将第2次觉醒期间设为4小时。

[0024] MEM-alpha等MEM(Eagle's minimal essential medium:低限量Eagle培养基)培

养基包含以下成分(1)～(4)。

[0025] (1)氨基酸(L-精氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-苯基丙氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸)、

[0026] (2)盐(氯化钙、氯化钾、硫酸镁、氯化钠、磷酸二氢钠)、

[0027] (3)D-葡萄糖、以及

[0028] (4)维生素(叶酸、烟酰胺(Nicotinamide)、核黄素、B12、胆碱、肌醇、泛酸、吡啶磺酸、硫胺)。

[0029] 另一方面,UW液是细胞内液型组成的Ca^{2+}不含液,配合有用于调节渗透压和抑制细胞膨胀的乳糖酸或羟乙基淀粉(hydroxy-ethyl starch;HES)、作为抗炎症、血管松弛以及ATP的前体物质的腺苷、用于抗氧化的谷胱甘肽及芳香醇、作为缓冲成分的磷酸缓冲液。

[0030] 根据本发明的优选的一个实施方式的冷藏保存液具有下述a1～a6或a1～a9的特征。

[0031] a1.钾离子种类的含量为20～90mmoL/L或30～80mmoL/L,钠离子种类的含量为20～90mmoL/L或30～80mmoL/L。

[0032] a2.基于离子的钠离子种类的量相对于钾离子种类的量的摩尔比(Na^+/K^+的比)为0.5～1.5、0.5～1.3、或0.6～1.2。

[0033] a3.以0.5～10mM、1～8mM或2～7mM的浓度含有水溶性维生素E(Trolox)或其类似物。

[0034] a4.以0.1～4.2mM、0.1～6mM、1～6mM、2～5mM或3～5mM的浓度含有腺嘌呤或其盐或衍生物。

[0035] a5.含有全部或含有除1种、2种或3种以外的全部必需氨基酸,必需氨基酸的总含量优选为50～250mg/L,特别优选为50～200mg/L或80～150mg/L。

[0036] a6.非必需氨基酸的总含量优选为100～500mg/L,特别是50～200mg/L或80～150mg/L。

[0037] a7.镁离子种类(特别是硫酸镁)的含量为2～8mmoL/L、2～5mmoL/L或2～4mmoL/L,钙的含量为0.2～1.5mmoL/L、0.2～1mmoL/L或0.3～0.8mmoL/L。

[0038] a8.以0.5～10mmoL/L的浓度含有葡萄糖或其他低分子多糖(特别是麦芽糖等二糖、果糖等单糖)。

[0039] a9.含有下述维生素。但是,可以省略下述中的1种、2种、3种或4种。

[0040] 叶酸、烟酰胺(Nicotinamide)、核黄素、B12、胆碱、肌醇、泛酸、吡啶甲酰磷酸、以及硫胺。

[0041] 根据本发明的优选的一个实施方式的冷藏用保存液为含有:(i)以内酯换算的乳糖醛酸或其盐(Lactobionic acid or lactobionate)30～100mmoL/L(或10～40g/L)、(ii)粗糖水合物10～30mmoL/L(或5～20g/L)、(iii)芳香醇0.3～1mmoL/L(或0.05～0.1g/L)、(iv)谷胱甘肽(总谷胱甘肽)1～3mmoL/L,(v)腺苷2～10mmoL/L(或0.3～0.9g/L)、以及(vi)硫辛酸0.05～1μmol/L(或0.03～0.2mg/L)、(vii)丙酮酸钠0.1～1mmoL/L(或10～100mg/L)、(viii)葡萄糖0.5～10mmoL/L(或100～1000mg/L)、(ix)抗坏血酸0.03～0.3mmoL/L、以及维生素E或其水溶性类似物·衍生物1～10mM、(x)腺嘌呤或其盐或衍生物0.1～4.2mM、(xi)其他维生素或其水溶性类似物·衍生物、(xii)必需氨基酸合计50～200mg/L、(xiii)

非必需氨基酸合计100～500mg/L、(xiv)钾离子种类30～80mmoL/L、(xv)钠离子种类20～90mmoL/L的生理缓冲液,pH设定为7～7.5。

[0042] 该冷藏用保存液优选含有20～50g/L(xv)羟乙基淀粉。另外,优选含有(xvi)核糖核苷4～40mg/L和/或(xvii)脱氧核糖核苷4～40mg/L。另外,优选含有磷酸二氢钾(potassium dihydrogen phosphate)磷酸二氢钠(sodium dihydrogen phosphate)10～25mmoL/L。

[0043] 发明效果

[0044] 在冷藏保存人iPS细胞等多能细胞时,能够维持高生存率维持效果和再培养后的增殖能力。

附图说明

[0045] 图1是表示使用与本申请实施方式中使用的同样的改良的冷藏保存液,在4℃下连续进行冷藏保存的情况下的、随着保存期间的经过的增殖率的变化的曲线图。

[0046] 图2是表示进行基于本申请实施方式的觉醒插入的冷藏保存(下段)、以及不进行觉醒插入的连续冷藏保存(上段)的冷藏保存以及评价的顺序的要点的示意图。

[0047] 图3是表示在6天的冷藏保存期间中经过3天时插入了觉醒期间的情况下的觉醒期间的长度的影响的条形图。

[0048] 图4是在得到图3的结果的冷藏保存实验时,将冷藏保存刚结束后以及1小时的恢复培养后的表示死亡细胞的荧光显微镜照片变换成灰度的照片。

[0049] 图5是汇总表示使用两种改良的冷藏保存液和两种以往的一般冷藏保存液进行12天的冷藏保存的结果的曲线图。汇总表示使用各冷藏保存液每隔3天进行3小时的觉醒期间的插入的情况(Hib)以及不进行的情况。

[0050] 图6是表示在小鼠胚胎的冷藏保存时的觉醒期间插入的效果的条形图。

[0051] 图7是将小鼠胚胎在改良的冷藏保存液中进行12天的冷藏保存的结果汇总表示的图表。汇总表示每隔3天进行3小时的觉醒期间的插入的情况(Hib)以及不进行的情况。

具体实施方式

[0052] 在本发明的优选实施方式中使用的冷藏用保存液是含有下述(i)～(vi)的生理缓冲液,pH设定为7～7.5。

[0053] (i)乳酸或其盐(Lactobionic acid or lactobionate)按内酯换算为20～100mmoL/L、30～100mmoL/L、30～80mmoL/L或30～60mmoL/L、或10～50g/L、10～40g/L、15～35g/L或20～30g/L。

[0054] (ii)棉子糖水合物10～40mmoL/L、10～30mmoL/L或10～20mmoL/L、或5～20g/L或8～15g/L。

[0055] (iii)别嘌醇0.3～2mmoL/L、0.3～1mmoL/L或0.4～0.8mmoL/L、或0.03～0.15g/L、0.05～0.1g/L或0.06～0.08g/L。

[0056] (iv)谷胱甘肽(总谷胱甘肽)1～3mmoL/L或1.5～2.5mmoL/L、或0.3～1g/L、0.4～0.9g/L或0.4～0.8g/L。

[0057] (v)腺苷2～10mmoL/L、2～8mmoL/L或2～5mmoL/L、或0.5～1.5g/L或0.5～1.3g/L。

[0058] (vi)硫辛酸0.05～1μmol/L、0.1～0.5μmol/L或0.2～0.4μmol/L、或0.03～0.2mg/L或0.05～0.1mg/L。

[0059] (vii)丙酮酸钠0.1～1mmoL/L、0.1～0.7mmoL/L或0.2～0.5mmoL/L、或10～100mg/L或20～50mg/L。

[0060] (viii)葡萄糖0.5～10mmoL/L、1～5mmoL/L或1～3mmoL/L、或100～1000mg/L或200～500mg/L。

[0061] (ix)下述抗氧化性的维生素或其水溶性类似物•衍生物

[0062] (都可以采用盐的形态。根据情况,可以省略下述两种中的ix-1。)

[0063] ix-1.抗坏血酸0.03～0.3mmoL/L、0.05～0.2mmoL/L或0.05～0.15mmoL/L、或5～20mg/L或10～15mg/L。

[0064] ix-2.维生素E、水溶性维生素E(Trolox)或其他水溶性维生素E类似物•衍生物0.5～10mM、1～8mM或2～7mM。

[0065] (x)腺嘌呤或其盐或者衍生物0.1～6mM、0.1～5mM、0.1～4.5mM、0.1～4.2mM或2～5mM。根据情况,0.1～0.3mM或0.05～0.2mM。

[0066] (xi)上述其他维生素或其水溶性类似物•衍生物

[0067] (都可以采用盐的形态。另外,可以省略下述10种中的1～5种、1～4种或1～3种。)

[0068] xi-1.生物素0.03～0.25μmol/L、0.05～0.2μmol/L或0.1～0.15μmol/L、或0.01～0.1mg/L或0.02～0.05mg/L。

[0069] xi-2.维生素B12 0.03～3μmol/L、0.05～2μmol/L或0.1～0.5μmol/L、或0.1～0.8mg/L或0.2～0.6mg/L。

[0070] xi-3.叶酸0.2～2μmol/L、0.3～1μmol/L或0.5～0.9μmol/L、或0.1～1mg/L或0.2～0.5mg/L。

[0071] xi-4.烟酰胺0.5～8μmol/L、1～6μmol/L或1-4μmol/L、或0.03～0.2mg/L或0.05～0.1mg/L。

[0072] xi-5.核黄素0.03～0.3μmol/L、0.04～0.2μmol/L或0.05～0.15μmol/L、或0.03～0.2mg/L或0.05～0.1mg/L。

[0073] xi-6.胆碱0.05～1μmol/L、0.1～0.5μmol/L或0.1～0.4μmol/L、或0.1～1mg/L或0.2～0.5mg/L。

[0074] xi-7.肌醇1～10μmol/L、1～8μmol/L或2-6μmol/L、或0.03～0.2mg/L或0.05～0.1mg/L。

[0075] xi-8.泛酸0.02～0.2μmol/L、0.03～0.1μmol/L或0.04～0.08μmol/L、或0.1～1mg/L或0.2～0.5mg/L。

[0076] xi-9.吡哆醛0.5～3μmol/L、0.1～2μmol/L或1-2μmol/L、或0.1～1mg/L或0.2～0.5mg/L。

[0077] xi-10.硫胺素0.3～3μmol/L、0.4～2μmol/L或0.5～1.5μmol/L、或0.1～1mg/L或0.2～0.5mg/L。

[0078] (xii)必需氨基酸总计为50～200mg/L或80～150mg/L。

[0079] 各成分的量在将表2中记载的含量除以3得到的值(下述实施例中的“HTM-alpha”中的值)设为A的情况下,可以在A/3～3A的范围(即“HTM-alpha”中的值的1/3～3倍的值的

范围)或A/2～2A的范围内适当设定。对于上述的非必需氨基酸和上述维生素也是同样的。

[0080] xii-1.异亮氨酸

[0081] xii-2.亮氨酸

[0082] xii-3.赖氨酸

[0083] xii-4.甲硫氨酸

[0084] xii-5.苯丙氨酸

[0085] xii-6.苏氨酸

[0086] xii-7.色氨酸

[0087] xii-8.巴林

[0088] xii-9.组氨酸

[0089] (xiii)非必需氨基酸总计100～500mg/L或150～400mg/L。

[0090] (都可以采用盐的形态。另外,可以省略下述10种中的1～5种、1～4种或1～3种。)

[0091] xiii-1.甘氨酸

[0092] xiii-2.丙氨酸

[0093] xiii-3.精氨酸

[0094] xiii-4.天冬酰胺

[0095] xiii-5.天冬氨酸

[0096] xiii-6.半胱氨酸

[0097] xiii-7.胱氨酸

[0098] xiii-8.谷氨酸

[0099] xiii-9.谷氨酰胺

[0100] xiii-10.脯氨酸

[0101] (xiv)钾离子种类20～90mmoL/L、30～80mmoL/L、40～80mmoL/L或50～70mmoL/L。即,20mmoL/L以上、30mmoL/L以上、40mmoL/L以上或50mmoL/L以上,且小于90mmoL/L、小于80mmoL/L或小于70mmoL/L。

[0102] (xv)钠离子种类20～90mmoL/L、30～80mmoL/L、40～80mmoL/L或50～70mmoL/L。即,20mmoL/L以上、30mmoL/L以上、40mmoL/L以上或50mmoL/L以上,且小于90mmoL/L、小于80mmoL/L或小于70mmoL/L。

[0103] 该冷藏用保存液优选含有下述(xvi)。

[0104] (xvi)羟乙基淀粉10～80g/L、20～50g/L或20～40g/L。

[0105] 该冷藏用保存液优选含有下述(xvii)和(xviii)中的至少一种。

[0106] (xvii)核糖核苷2～4种,总计4～40mg/L、5～30mg/L或10～15mg/L。

[0107] (xviii)脱氧核糖核苷2～4种,总计4～40mg/L、5～30mg/L或10～15mg/L。

[0108] 该冷藏用保存液优选含有下述(xix)～(xx)。

[0109] (xix)磷酸二氢钾(potassium dihydrogen phosphate)或磷酸二氢钠(sodium dihydrogen phosphate)10～30mmoL/L、10～25mmoL/L或15～25mmoL/L。

[0110] (xx)镁离子种类(特别是硫酸镁)2～8mmoL/L、2～5mmoL/L或2～4mmoL/L。

[0111] (xxi)钙离子种类(特别是氯化镁)0.2～1.5mmoL/L、0.2～1mmoL/L或0.3～0.8mmoL/L。

[0112] 此外,在本发明的优选的一个实施方式中,钠离子种类以摩尔比(Na/K的离子的比)计,可以是例如钾离子种类的0.7～1.3倍、0.8～1.2倍、或0.9～1.1倍。另外,在另一个优选的实施方式中,钠离子种类的摩尔比可以是例如钾离子种类的0.5～1.5倍、0.5～1.3倍或0.6～1.2倍。

[0113] 如上所述,在本发明的优选的实施方式中使用的冷藏保存液,以0.1mM以上、0.3mM以上、0.5mM以上、1mM以上、2mM以上、3mM以上、4mM以上、或5mM以上、且10mM以下、8mM以下、或6mM以下的浓度含有水溶性维生素E(Trolox)或其他水溶性维生素类似物。

[0114] 如上所述,在本发明的优选的实施方式中使用的冷藏保存液,特别是以0.1mM以上、0.3mM以上、0.5mM以上、1mM以上、2mM以上、3mM以上,且8mM以下、6mM以下、5mM以下或4mM以下的浓度,例如0.1～4.2mM或1～4.2mM的浓度含有腺嘌呤或其盐。特别是,认为在细胞彼此粘接而形成三维块并保存胚胎或类器官时,腺嘌呤的添加显示出显著的效果。另外,在保存胚胎或类器官时,即使是比较低的浓度,例如0.01～0.2mM(10～200μM)或0.05～0.3mM(5～300μM)也有效果。另一方面,认为在不形成胚胎或类器官的状态下,在培养iPS细胞等干细胞时,例如以0.5～6mM、特别是1～5mM或2～4mM的浓度添加腺嘌呤是特别有效的。

[0115] 在本发明的优选的实施方式中使用的冷藏保存液还以1～6mM、2～5mM或3～5mM的浓度含有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺或其他二肽替代物或其盐。

[0116] 在本发明的优选的一个实施方式中使用的冷藏保存液是将表1中表示组成的UW液和表2中表示组成的MEM alpha培养基以UW液为MEM alpha培养基的1～3倍、优选1.5～2.5倍、更优选1.8～2.2倍的体积比混合而得到的。另外,对于表1和表2的组成及由该混合比率得到的各成分的含量,可以在±50%的范围内、±40%的范围内、±30%的范围内、或±20%的范围内适当增减。另外,在一些成分、特别是表2中列举的成分中,可以省略非必需氨基酸中的一部分(例如1～5种)、核苷中的一部分(例如1～5种)、维生素的一部分(例如1～5种)、无机盐的一部分(例如1～3种)以及苯酚红。

[0117] 根据本发明的优选的一个实施方式的冷藏保存方法是在上述任一种冷藏保存液中,以使多能细胞(pluripotent cells)成为1×10^3个/mL～1×10^9个/mL或1×10^4个/mL～1×10^8个/mL的方式分散为单细胞状态,例如进行1～10天或1～7天的冷藏保存。

[0118] 根据本发明的优选的一个实施方式的冷藏保存方法是在加入上述任一种冷藏保存液的培养容器中,以使多能细胞(pluripotent cells)成为1×10^3个/cm^2～1×10^9个/cm^2或1×10^4个/cm^2～1×10^8个/cm^2的方式进行播种,例如培养2～6天,然后进行例如1～10天或1～7天的冷藏保存。

[0119] 根据本发明的优选的一个实施方式的冷藏保存方法,能够在保持将细胞粘接在培养基上的状态下、即在通常的培养的状态下直接进行,特别是能够在包括觉醒期间在内的整个保存期间内,维持使细胞粘接在培养基上的状态。

[0120] 根据本发明的优选的实施方式,作为冷藏保存的对象的多能细胞或干细胞例如是ES细胞、iPS细胞等称为人工多能干细胞的万能细胞、或造血干细胞、神经干细胞、肝干细胞、皮肤干细胞、生殖干细胞等。另外,作为冷藏保存对象的多能细胞可以来自人,或者可以来自灵长类、小鼠、豚鼠等哺乳类。

[0121] 另外,根据另一实施方式,冷藏保存的对象可以是人或动物的胚胎,特别是牛、马、猪、山羊等家畜动物的胚胎。

[0122] 实施例

[0123] 1.冷藏保存实验用的细胞的准备

[0124] 对从京都大学iPS细胞研究所获得的健康人来源的人iPS细胞株(253G1),在无饲养条件下进行了维持培养。在该培养中,使用市售的临床研究用(人ES/iPS细胞用)培养基StemFit(注册商标)AK02N(Ajinomoto),在培养开始第7天达到70～80％的融合的时刻,酶促地(使用0.5X TrypLE(注册商标)Select)剥离,分散清洗。此后,作为ROCK抑制剂悬浮在10μM含有Y27362(FUJIFILM和光纯药)的新的StemFit(注册商标)AK02N培养基中,作为进一步的细胞培养基料,添加iMatrix-511(MATRIXOME,Inc.)至0.1μg/cm^2,以1.3E3/cm^2(1.3×以10^3/cm^2)的浓度播种。在播种的第二天,更换为不含Y27362的StemFit(注册商标)AK02N培养基,然后每隔3天更换培养基,在第7天进行传代或实验。

[0125] 另一方面,为了尝试对小鼠胚胎进行冷藏保存(图6),在从雌性及雄性小鼠(均为ICR)进行体外受精后,进行了3.5天(84小时)的培养。此时,在介质精用培养基中使用HTF(FUJIFILM和光纯药),在培养中使用KSOM(电弧资源)。

[0126] 另外,在本申请中,只要没有特别说明,培养在37℃培养器(5％CO_2)中进行。

[0127] 2.冷藏保存液

[0128] 准备下述2种至3种冷藏保存液。为了方便起见,分别称为HTM-alpha、HTMX2C13和HTMM19。都是添加水溶性维生素E(Trolox)至5mM,添加GlutaMAX(注册商标,GIBCO)至5倍浓度(x5;10mM)来使用。

[0129] • HTM-alpha:UW液+MEM-alpha(12571-MEM alpha,nucleosides,Thermo Fisher Scientific),混合体积比:2/1。

[0130] • HTMx2c13:由HTM-alpha液改性而成。添加了90mM的Mannitol、0.25％的PVA代替羟乙基淀粉。即,根据下述表1的UW液的组成,准备省略羟乙基淀粉、含有90mM甘露醇和0.25％聚乙烯醇的改性UW液,将该改性UW液与MEM-alpha(12571-MEM alpha)以2/1的体积比混合使用。这里使用的聚乙烯醇(PVA)是Merck公司的#363146,皂化度为99％,重均分子量Mw为85000～124000,20℃下4％水溶液的旋转粘度为28～32mPa/sec(28-32cP,4％in H_2O(20℃)(lit.))。

[0131] • HTMM19:由HTM-alpha液改性而成。准备改变了氨基酸组成和维生素组成的MEM-alpha液,将UW液和该改性MEM-alpha液以2:1的体积比混合使用。这里使用的改性MEM-alpha液的氨基酸组成和维生素组成分别示于后述的表4～5中。

[0132] 进而,在图1的参考例中,也使用了下述两种冷藏保存液。为方便起见,分别称为HTMa+10％KSR和HTMa+PVA99_0.2％。

[0133] • HTMa+10％KSR:向上述HTM-alpha中添加KnockOut™Serum Replacement(KSR)至10重量％而成。这里使用的KnockOut™Serum Replacement(KSR)是用于培养人和小鼠的多能干细胞的无血清补充剂,是血清的替代物。

[0134] • HTMa+PVA99_0.2％:向上述HTM-alpha中添加0.2重量％的聚乙烯醇(PVA)而成。这里使用的聚乙烯醇与上述HTMx2c13中使用的相同。即,皂化度99％、Mw85000～124000、20℃下的4％水溶液的旋转粘度为28～32mPa/sec,具体为Merck公司的#363146。

[0135] 另外,将下述两种冷藏保存液中的任一种作为比较例的冷藏保存液使用。如下所示:

[0136] • UW液:BELZER UW(注册商标)COLD STORAGE SOLUTION

[0137] • HTS FRS:HypoThermosol(注册商标)FRS,BioLife Solutions

[0138] 根据上述非专利文献3,UW液(BELZER UW(注册商标)COLD STORAGE SOLUTION)的组成如下表所示。

[0139] [表1]UW液的组成

[0140]

成分	G/L	MMOL/L
羟乙基淀粉	50.0	NA
乳酸（内酯换算）	35.83	105
磷酸二氢钾	3.4	25
硫酸镁水合物	1.23	5
棉子糖 5 水合物	17.83	30
腺苷	1.34	5
别嘌醇	0.136	1
总谷胱甘肽	0.922	3
氢氧化钾	5.61	100
氢氧化钠/盐酸	（调整为 pH 7.4）	
注射用水	适量	

[0142] “HTM-alpha”中使用的MEM alpha培养基(12571-MEM alpha,nucleosides,Thermo Fisher Scientific)具体具有下述组成(https://www.thermofisher.com/jp/en/home/technical-resources/media-formulation.94.html)。

[0143] [表2]MEM alpha培养基的组成

[0144]

成分 Components	分子量 Molecular Weight	浓度 Concentration（mg/L）	mM
氨基酸 Amino Acids			
甘氨酸 Glycine	75.0	50.0	0.6666667
丙氨酸 L-Alanine	89.0	25.0	0.28089887
盐酸精氨酸 L-Arginine hydrochloride	211.0	105.0	0.49763033
天冬酰胺 L-Asparagine-H_2O	150.0	50.0	0.33333334
天冬氨酸 L-Aspartic acid	133.0	30.0	0.22556391
半胱氨酸盐酸盐 L-Cysteine hydrochloride-H_2O	176.0	100.0	0.5681818
胱氨酸盐酸盐 L-Cystine2HCl	313.0	31.0	0.09904154
谷氨酸 L-Glutamic Acid	147.0	75.0	0.5102041
谷氨酰胺 L-Glutamine	146.0	292.0	2.0
组氨酸 L-Histidine	155.0	31.0	0.2
异亮氨酸 L-Isoleucine	131.0	52.4	0.4
亮氨酸 L-Leucine	131.0	52.0	0.39694658
赖氨酸 L-Lysine	183.0	73.0	0.3989071

[0145]

甲硫氨酸 L-Methionine	149.0	15.0	0.10067114
苯丙氨酸 L-Phenylalanine	165.0	32.0	0.19393939
脯氨酸 L-Proline	115.0	40.0	0.3478261
丝氨酸 L-Serine	105.0	25.0	0.23809524
苏氨酸 L-Threonine	119.0	48.0	0.40336135
色氨酸 L-Tryptophan	204.0	10.0	0.04901961
酪氨酸二钠 L-Tyrosine disodium salt	225.0	52.0	0.23111111
巴林 L-Valine	117.0	46.0	0.3931624
维生素 Vitamin			
抗坏血酸 Ascorbic Acid	176.0	50.0	0.2840909
生物素 Biotin	244.0	0.1	4.0983607E-4
氯化胆碱 Choline chloride	140.0	1.0	0.007142857
泛酸钙 D-Calcium pantothenate	477.0	1.0	0.002096436
叶酸 Folic Acid	441.0	1.0	0.0022675737
烟酰胺 Niacinamide	122.0	1.0	0.008196721
盐酸吡哆沙星 Pyridoxal hydrochloride	204.0	1.0	0.004901961
核黄素 Riboflavin	376.0	0.1	2.6595744E-4
硫胺盐 Thiamine hydrochloride	337.0	1.0	0.002967359
维生素 B12Vitamin B12	1355.0	1.36	0.0010036901
肌醇 i-Inositol	180.0	2.0	0.011111111
无机盐 Inorganic Salts			
氯化钙 Calcium Chloride（CaCl2）（anhyd.）	111.0	200.0	1.8018018
硫酸镁 Magnesium Sulfate（MgSO4）（anhyd.）	120.0	97.67	0.8139166
氯化钾 Potassium Chloride（KCl）	75.0	400.0	5.3333335
碳酸氢钠 Sodium Bicarbonate（NaHCO3）	84.0	2200.0	26.190475
氯化钠 Sodium Chloride（NaCl）	58.0	6800.0	117.24138

[0146]

磷酸二氢钠 Sodium Phosphate monobasic（NaH2PO4-H2O）	138.0	140.0	1.0144928
核糖核苷 Ribonucleosides			
腺苷 Adenosine	267.0	10.0	0.037453182
胞嘧啶 Cytidine	243.0	10.0	0.041152265
鸟氨酸 Guanosine	283.0	10.0	0.03533569
尿苷 Uridine	244.0	10.0	0.040983606
脱氧核糖核苷 Deoxyribonucleosides			
脱氧腺苷 2'Deoxyadenosine	251.0	10.0	0.03984064
脱氧胞嘧啶 HCl2'Deoxycytidine HCl	264.0	11.0	0.041666668
脱氧鸟苷 2'Deoxyguanosine	267.0	10.0	0.037453182
胸腺嘧啶 Thymidine	242.0	10.0	0.041322313
其他成分 Other Components			
葡萄糖 D-Glucose	180.0	1000.0	5.5555553
硫辛酸 Lipoic Acid	206.0	0.2	9.708738E-4
苯酚红 Phenol Red	376.4	10.0	0.026567481
丙酮酸钠 Sodium Pyruvate	110.0	110.0	1.0

[0147] 添加到“HTM-alpha”中的GlutaMAX(注册商标,GIBCO)市售有将作为L-谷氨酰胺的二肽替代品的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺溶解于生理盐水(0.85N NaCl)中的200mM溶液(“GlutaMAX™I(100×)”)。将其稀释到1/20到10mM(5×),添加到“HTM-alpha”中使用。

[0148] 对于上述UW液、HTM-alpha、HTMX2C13以及HTS-FRS、钠离子、钾离子以及它们的摩尔比汇总示于下述表3。另外,StemFit(注册商标)AK02N中的离子浓度与MEM-alpha相同。参照后述的实验结果,认为Na^+/K^+的摩尔比应为1左右或比1稍小的值。

[0149] [表3]市售的培养基和实施例培养基中Na^+/K^+的摩尔比

[0150]

	UW solution	MEM-alpha	HTM-alpha 以及 HTMx2c13、HTMM19	HTS-FRS
Na^+ (mM)	25.0	116.4	55.5	100.0

[0151]

K^+ (mM)	125.0	5.4	85.1	42.5
Na/K	0.2：1	21.7：1	0.7：1	2.3：1

[0152] 如上所述,蛋白质、肽和生长因子包含在StemFit(注册商标)AK02N中,但不包含在MEM-alpha中。因此,不包含在HTM-alpha中。

[0153] 3.粘接状态下的冷藏保存以及此后的MTT细胞增殖测定

[0154] 使用与上述“1.”同样获得的人iPS细胞。但是,在培养的最后阶段,以比上述“1.”

的维持培养稍稀的浓度(1.0E3/cm^2)播种并培养,在该播种的第二天,更换为不含Y27362的StemFit(注册商标)AK02N培养基后,在播种后的第4天去除培养基。

[0155] 然后,将培养基更换为上述“2.”所述的各冷藏保存液,在4℃条件下静置保存3天、6天或9天。即,细胞相互凝聚、粘接,另外,在粘接于培养容器的状态下进行规定期间的冷藏保存。

[0156] 将冷藏保存后的细胞去除冷藏保存培养基后,用培养用培养基轻轻清洗。然后加入StemFit(注册商标)AK02N培养基,进行1天(24小时)的培养。

[0157] 在该培养结束的时刻,酶促地(使用0.5X TrypLE(注册商标)Select)剥离细胞并使其分散,通过MTT细胞增殖测定来测定细胞增殖。具体来说,添加Cosmo Bio株式会社的“CytoSelect™MTT细胞增殖测定“试剂后,将细胞在37℃、5%CO_2中孵育3小时,在表面活性剂溶液中溶解3小时后,测定540nm的吸光度,通过比色法进行评价。

[0158] 另外,同样地,使用上述变形例的冷藏保存液HTMa+10%KSR、HTMa+PVA99_0.2%、以及比较例的冷藏保存液UW液和HTS FRS进行实验。

[0159] 4.基于连续冷藏方式(以往的方式)保存(参考例)

[0160] 使用上述“1.”的人IPS细胞,使用上述“2.”中说明的各冷藏保存液,如上述“3.”那样在4℃下进行2～7天的冷藏保存时的细胞增殖测定的结果如图1所示。

[0161] 根据图1的结果,已知使用本发明人等改良的冷藏保存液HTM-alpha、HTMX2C13及其变形(HTMa+10%KSR和HTMa+PVA99_0.2%)中的任一种,直到3天为止几乎没有损伤,但之后生存性急剧降低。但是,也确认了改良后的冷藏保存液的保存效果均显著比UW液以及HTS FRS大。

[0162] 本申请实施例中的统计学处理在1way ANOVA检定中使用Graphpad Prism 5.04进行计算。

[0163] 5.使用冬眠式觉醒插入的人干细胞的冷藏保存(1)

[0164] 图2示意性地示出了基于本申请发明的觉醒(arousal)的插入以及之后的细胞增殖测定的顺序。图1如图2的上段所示,表示没有进行觉醒(arousal)的插入的情况下的结果。

[0165] 图3表示如图2的下段所示插入了觉醒期间的情况下的效果。即,冷藏保存开始3天(72小时)后,转移到37℃的培养器中,在培养条件下放置1小时、3小时或6小时。然后,再次回到4℃的冷藏室,再在2.75天(66小时)后进行1天培养后进行细胞增殖测定。

[0166] 如图3所示,通过插入觉醒期间,细胞增殖率显著增加。当觉醒期间从1小时增加到3小时时,观察到显著的增加,但当从3小时增加到6小时时,虽然多少会进一步增加,但不能说是显著的差异。

[0167] 6.使用冬眠式觉醒插入的人干细胞的冷藏保存(2)

[0168] 在图4中,关于冬眠式觉醒插入的效果,用灰度表示荧光显微镜照片,该荧光显微镜照片表示在刚进行上述“5.”的冷藏保存之后以及上述1天的恢复培养之后的死亡细胞。具体来说,用Takara Bio株式会社的Live or Dead™用死细胞染色试剂盒染色,以白色表示染色的部分。

[0169] 图4的左上表示对进行冷藏保存前的细胞进行与上述同样的1天的恢复培养时的情况,当然,没有观察到细胞的显著的死亡。图4的左下表示不进行觉醒插入而进行6天的连

续冷藏保存时的情况。与刚进行冷藏保存后相比,在1天的恢复培养后,死亡细胞的面积显著增大。与此相对,在图4的右下所示的插入6小时的觉醒期间的情况下,与图4的左下的情况相比,刚进行冷藏保存后的细胞死亡也少,在1天的恢复培养后,细胞死亡的减少更显著。

[0170] 7.使用冬眠式觉醒插入的人干细胞的冷藏保存(3)

[0171] 在图5中,将上述“1.”的人iPS细胞在上述“2.”的各冷藏保存液中,与上述图2～3的情况完全相同,将每3天进行3小时的觉醒插入的情况下的结果与不进行的情况下的结果进行对比并表示。另外,折线图中的误差线表示基于4～16次实验的标准偏差。

[0172] 在图5的右端部出现在上端部的是,根据本发明,使用改良后的冷藏保存液(HTM-alpha和HTMx2c13),并且进行觉醒期间的插入。在这些本申请发明的实施例(HTM-a_Hib和HTMx2c13_Hib)中,显示了未保存的情况下的约60％或其以上的细胞增殖率。与此相对,即使使用相同的冷藏保存液,在不进行觉醒期间的插入的情况下,如图5的右半的下部所示,6天后以及9天后的细胞增殖率显著降低,无法实际使用。另外,12天后几乎看不到细胞增殖。另外,在使用以往的一般的冷藏保存液(UW液、HTS FRS)的情况下,3天的保存也很困难,另外,未看出觉醒插入的效果。

[0173] 8.小鼠胚胎的冷藏保存

[0174] 如上所述,立即直接使用体外受精后3.5天的胚泡期胚胎,进行冷藏保存实验。具体而言,对于该胚泡期胚胎,将培养基置换成HTMM19,然后放入塑料管中,在4℃条件下静置3天(72小时)或其2～4倍的期间(6天、9天和12天)保存。另外,这里的HTM-alpha都是添加了5mM的Trolox和5倍浓度(x5;10mM)的GlutaMAX(注册商标)的HTM-alpha。

[0175] 图6还进行了2天的培养,显示了在这2天的培养期间脱出透明带的胚胎的率和胚胎的产生率。图6还一并示出了对未进行冷藏保存的未保存对照(Fresh_Control)也同样进行培养的结果。

[0176] 如图6所示,通过每隔3天插入两次觉醒期间(各3小时),在9天的冷藏保存(“3+3+3天”)后、以及12天的冷藏保存(“3+3+3+3天”)后,也观察到比较高的透明带脱出率(黑地部)以及胚胎的产生率(黑地部+白地部)。在图6的条形图中,白地的部分表示扩张胚泡期胚胎。“6天”是不插入觉醒期间而冷藏保存6天的结果。在插入觉醒期间并进行6天冷藏保存的情况下(“3+3天”)、透明带脱出率(Hed+Hing)以及胚胎的产生率(“Hed+Hing”+“Exp”)均比未插入的情况(“6天”)显著增高。另外,在不插入觉醒期间而冷藏保存9天的情况下(“9天”),未发现胚胎的产生。

[0177] 在图6中,“Hed+Hing”表示脱出透明带的胚胎和正在脱出的胚胎的总数。另外,“Exp”是指扩张胚泡期胚胎。扩张胚泡是即将成为脱出胚泡之前的状态,正常产生胚的可能性高,加入到了胚胎的产生率中。另外,这里没有显示数据,但在UW液和HTS FRS中,在3天保存区分别显示出29.4％和15.0％的显著低的脱出率。

[0178] 图7以折线图表示图6中所示的透明体脱出率(黑地)。另外,折线图中的误差线表示基于2～6次实验的标准偏差。

[0179] 为了得到这里使用的冷藏保存液HTMM19(UW液和改性MEM-alpha液的2:1的混合液)而使用的改性MEM-alpha液的氨基酸组成和维生素组成如表4～5所示。如通过与表3的MEM alpha培养基的组成进行比较所知,在改性MEM-alpha液中,省略了一部分氨基酸和维生素。

[0180] [表4]改性MEM-alpha液的氨基酸组成

成分 Components	分子量 Molecular Weight	浓度 Concentration (mg/L)	mM
甘氨酸 Glycine	75	3.75	0.05
丙氨酸 L-Alanine	89	4.45	0.05
盐酸精氨酸 L-Arginine hydrochloride	211	252.8	1.20
天冬酰胺 L-Asparagine	132	6.6	0.05
天冬氨酸 L-Aspartic acid	133	6.65	0.05
胱胺酸 L-Cystine	240	48	0.20
谷氨酸 L-Glutamic Acid	147	73.5	0.50
L-组氨酸盐酸盐 L-Histidine hydrochloride-H2O	210	84	0.40
异亮氨酸 L-Isoleucine	131	104.8	0.80
亮氨酸 L-Leucine	131	104.8	0.80
L-盐酸赖氨酸 L-Lysine hydrochloride	183	145	0.79
甲硫氨酸 L-Methionine	149	30.2	0.20
苯丙氨酸 L-Phenylalanine	165	66	0.40
脯氨酸 L-Proline	115	5.75	0.05
丝氨酸 L-Serine	105	5.25	0.05
苏氨酸 L-Threonine	119	95.2	0.80

[0181]

色氨酸 L-Tryptophan	204	20.4	0.10
酪氨酸 L-Tyrosine	181	72	0.40
巴林 L-Valine	117	93.6	0.80

[0182]

[0183] [表5]改性MEM-alpha液的维生素组成

[0184]

成分 Components	分子量 Molecular Weight	浓度 Concentration (mg/L)	mM
氯化胆碱 Choline chloride	140	0.5	0.021
泛酸钙 D-Calcium pantothenate	477	0.5	0.006
叶酸 Folic Acid	441	0.5	0.007
烟酰胺 Nicotinamide	122	0.5	0.025
盐酸吡哆沙星 Pyridoxal hydrochloride	204	0.5	0.015
核黄素 Riboflavin	376	0.05	0.001
硫胺盐 Thiamine hydrochloride	337	0.5	0.009
肌醇 i-Inositol	180	1	0.033

[0185] 虽然iPS细胞的冷藏保存技术与冷冻保存相比限制了保存期间,但例如能够保持培养状态(粘接)的保存、不可冷冻的分化诱导的类器官的保存以及运输、或者在制药研究中的按需细胞供给等,是应用范围非常高的技术。因此,使人iPS细胞的保存成为可能的本技术非常重要。

[0186] 由于使用本申请实施方式的细胞低温保存用培养基“HTM-alpha”等,在小鼠胚胎的冷藏保存中发挥了效果,因此认为在人以及各种动物的胚胎性或非胚胎性的干细胞、包含该干细胞的组织的冷藏保存中也会发挥效果。另外,由于在冷藏保存一般难以保存的干细胞中发挥了效果,因此认为在其他细胞或组织的冷藏保存中,甚至在脏器及其一部分的冷藏保存中也会发挥效果。

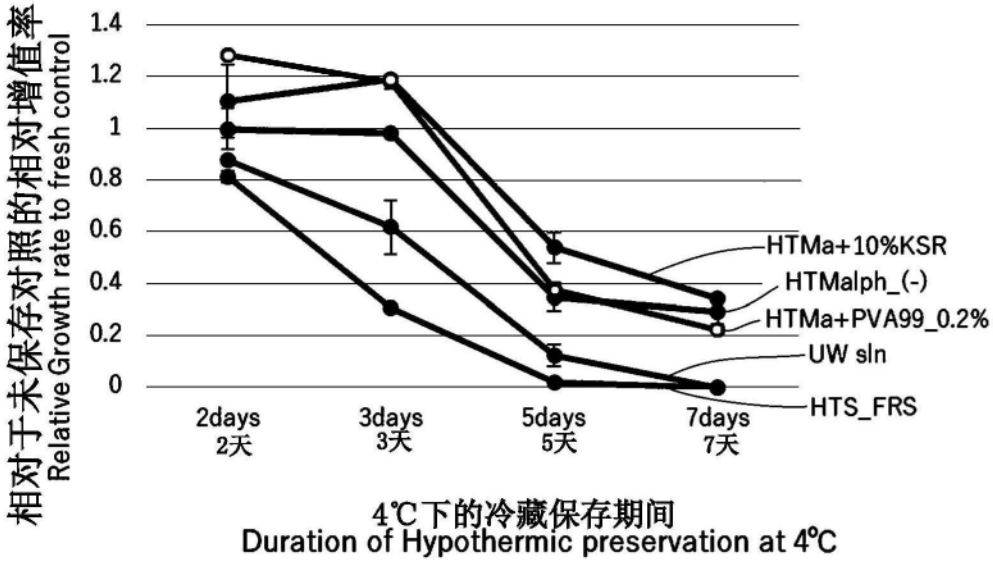

相对于未保存对照的相对增值率
Relative Growth rate to fresh control
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2days
2天
3days
3天
5days
5天
7days
7天
HTMa+10%KSR
HTMalph_(-)
HTMa+PVA99_0.2%
UW sln
HTS_FRS
4℃下的冷藏保存期间
Duration of Hypothermic preservation at 4℃

图1

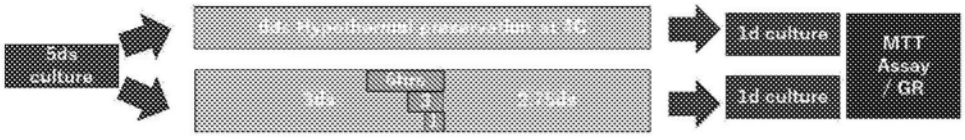

5ds
culture
1d culture
1d culture
MTT
Assay
/ GR

图2

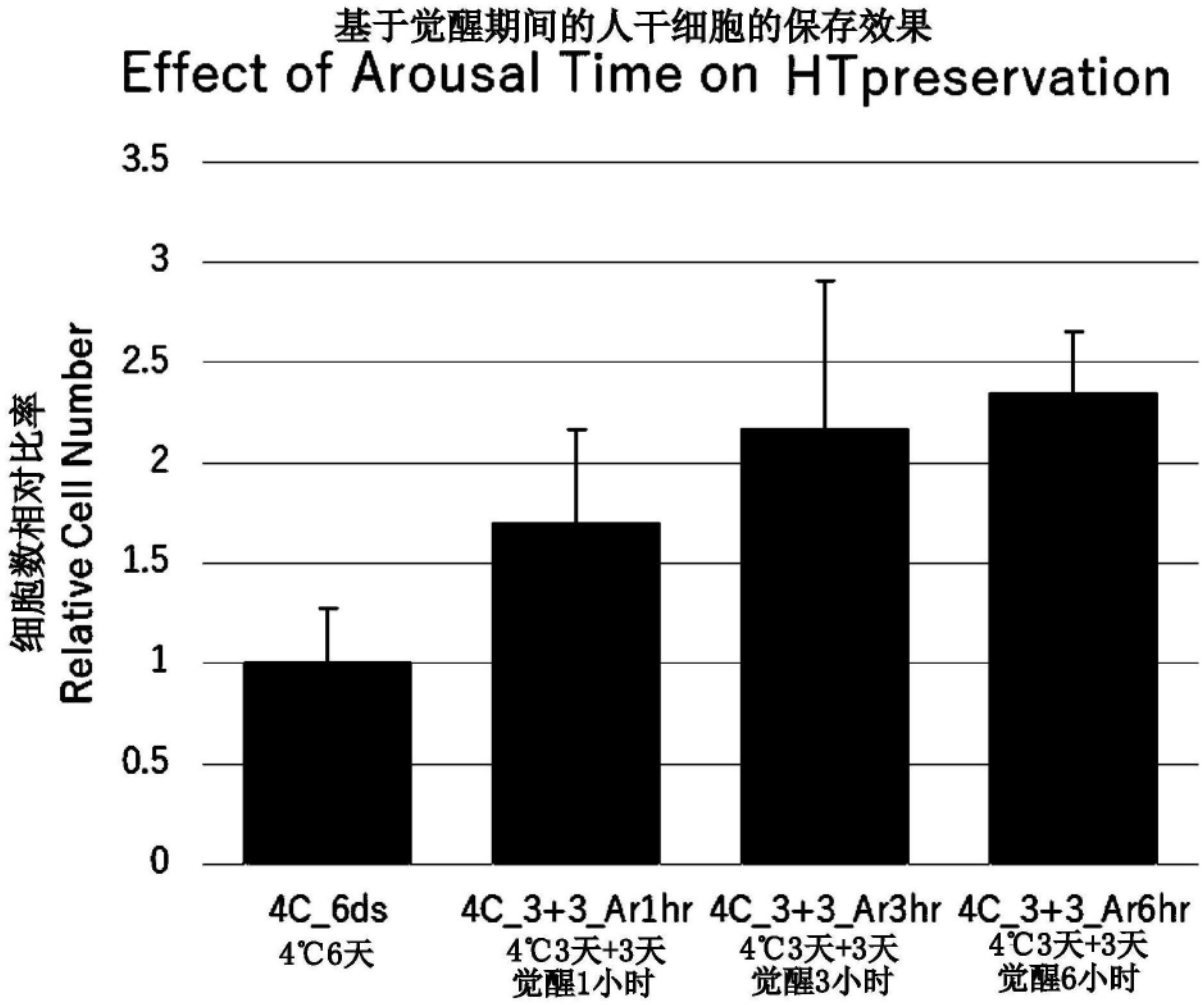

基于觉醒期间的人干细胞的保存效果
Effect of Arousal Time on HTpreservation
细胞数相对比率
Relative Cell Number
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
4C_6ds
4℃6天
4C_3+3_Ar1hr
4℃3天+3天
觉醒1小时
4C_3+3_Ar3hr
4℃3天+3天
觉醒3小时
4C_3+3_Ar6hr
4℃3天+3天
觉醒6小时

图3

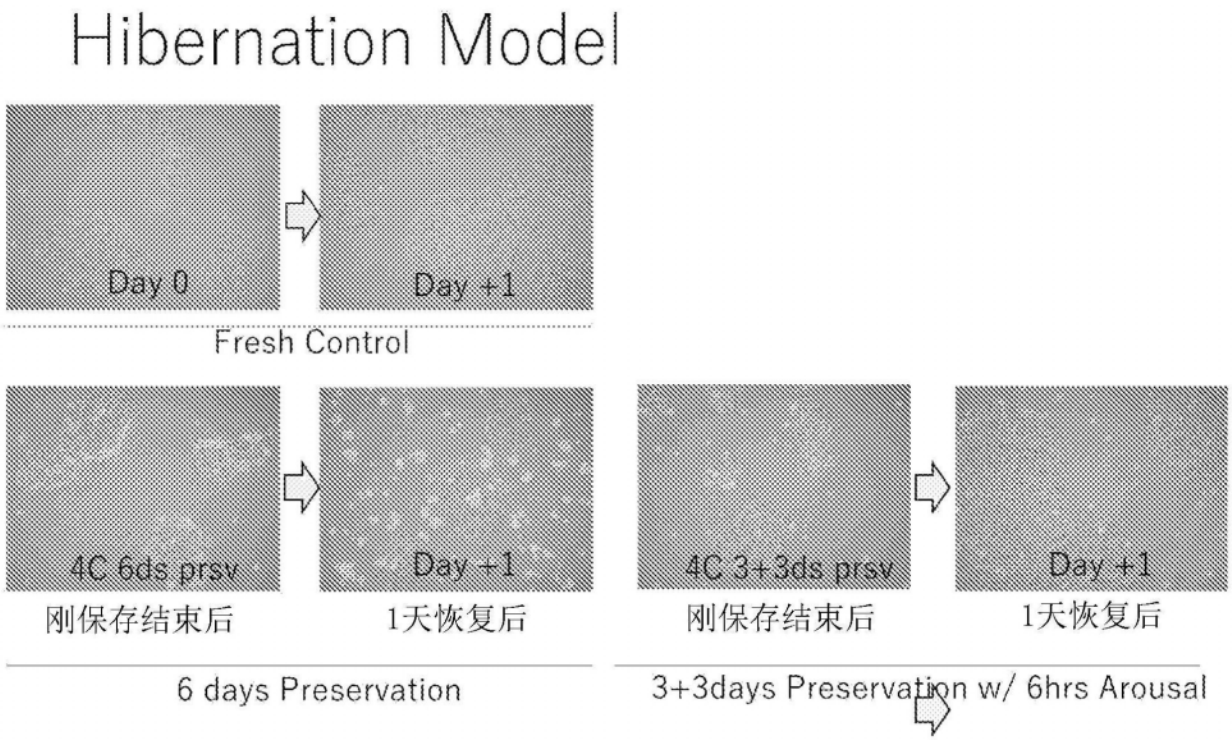

Hibernation Model
Day 0
Day +1
Fresh Control
4C 6ds prsv
Day +1
刚保存结束后
1天恢复后
6 days Preservation
4C 3+3ds prsv
Day +1
刚保存结束后
1天恢复后
3+3days Preservation w/ 6hrs Arousal

图4

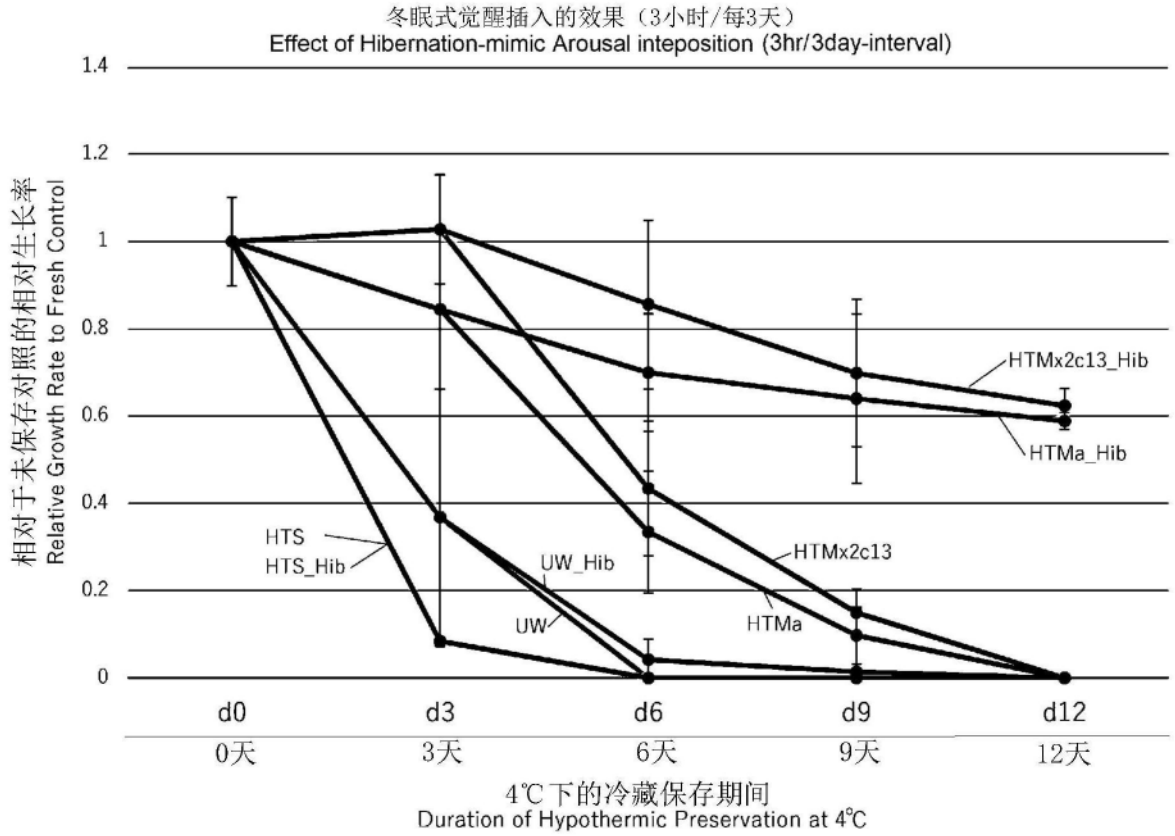

冬眠式觉醒插入的效果（3小时/每3天）
Effect of Hibernation-mimic Arousal inteposition (3hr/3day-interval)
相对于未保存对照的相对生长率
Relative Growth Rate to Fresh Control
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HTMx2c13_Hib
HTMa_Hib
HTS
HTS_Hib
UW_Hib
UW
HTMx2c13
HTMa
d0
d3
d6
d9
d12
0天
3天
6天
9天
12天
4℃下的冷藏保存期间
Duration of Hypothermic Preservation at 4℃

图5

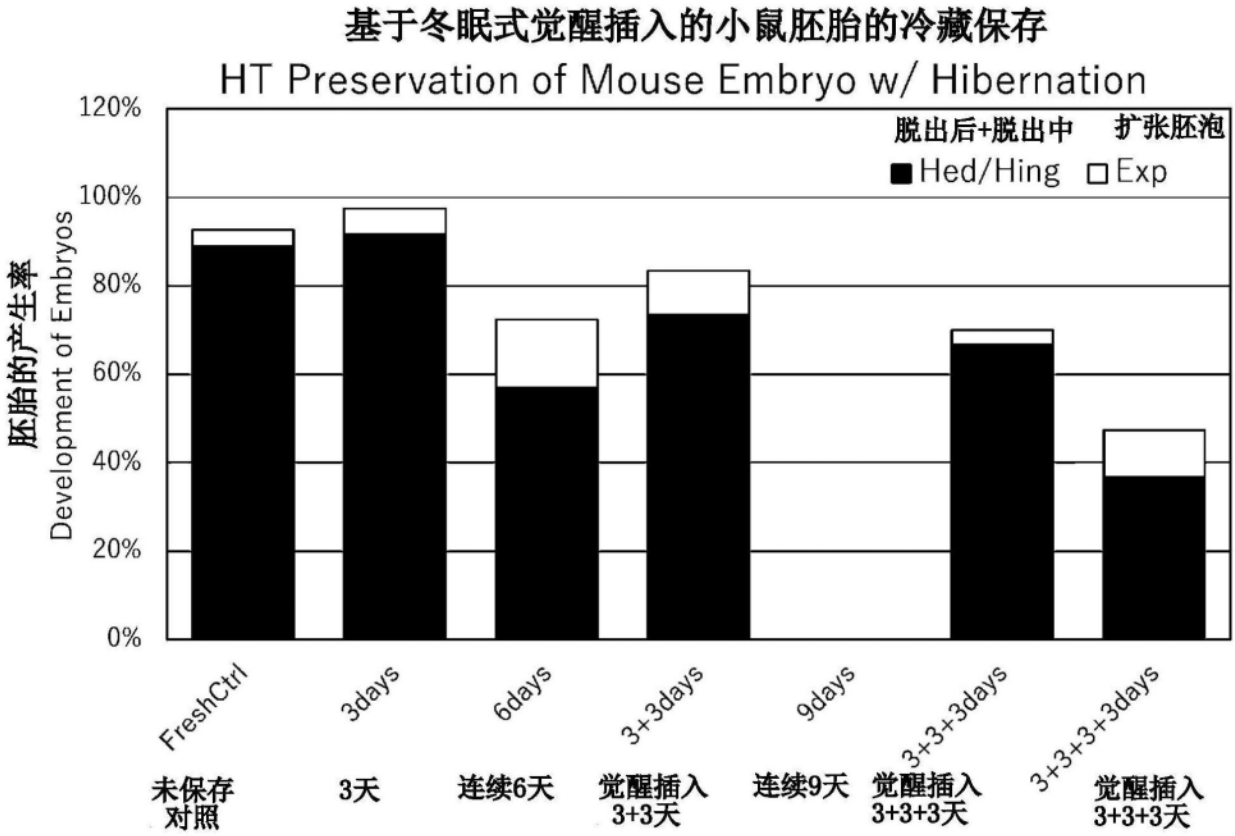

基于冬眠式觉醒插入的小鼠胚胎的冷藏保存
HT Preservation of Mouse Embryo w/ Hibernation
脱出后+脱出中
扩张胚泡
Hed/Hing
Exp
胚胎的产生率
Development of Embryos
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
FreshCtrl
3days
6days
3+3days
9days
3+3+3days
3+3+3+3days
未保存
对照
3天
连续6天
觉醒插入
3+3天
连续9天
觉醒插入
3+3+3天
觉醒插入
3+3+3天

图6

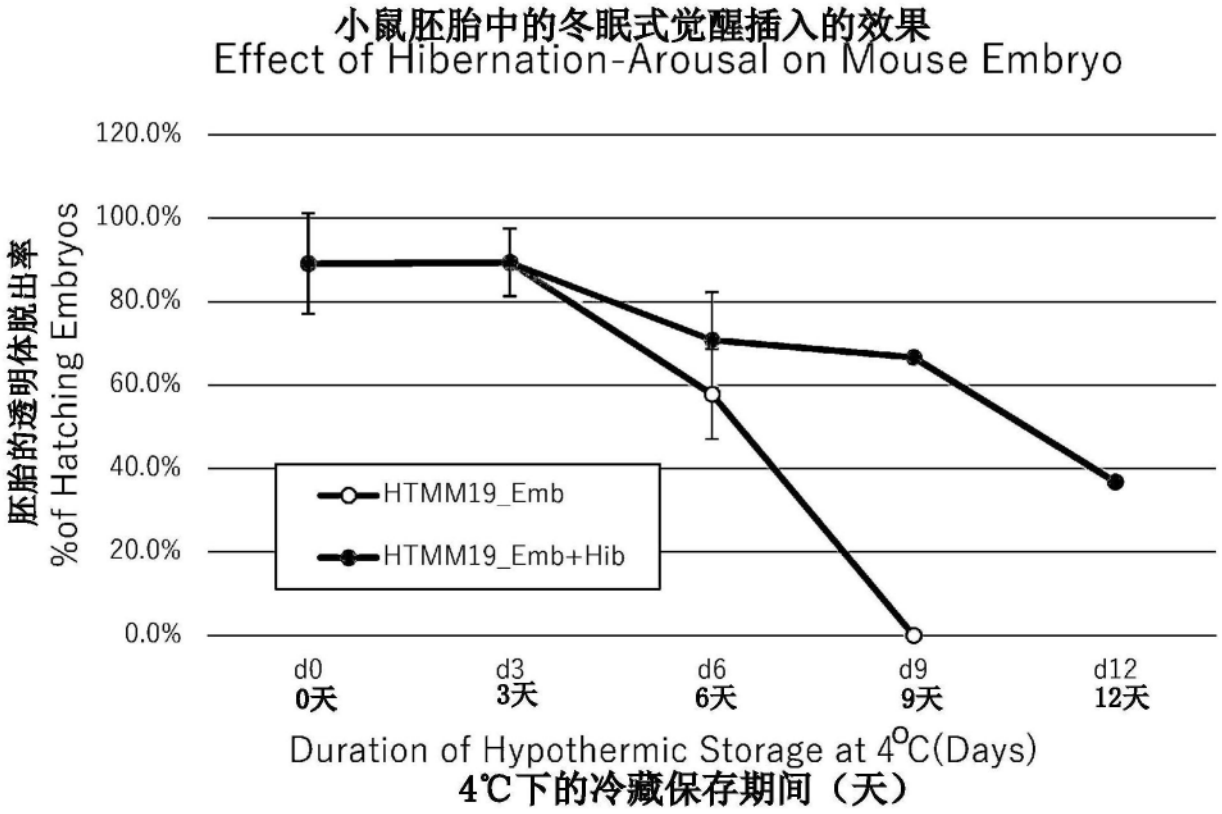

小鼠胚胎中的冬眠式觉醒插入的效果
Effect of Hibernation-Arousal on Mouse Embryo
120.0%
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
胚胎的透明体脱出率
%of Hatching Embryos
HTMM19_Emb
HTMM19_Emb+Hib
d0
0天
d3
3天
d6
6天
d9
9天
d12
12天
Duration of Hypothermic Storage at 4°C(Days)
4℃下的冷藏保存期间（天）

图7