



(10) 申请公布号 CN 118974243 A

(43) 申请公布日 2024.11.15

(21) 申请号 202380032758.0

(22) 申请日 2023.03.03

(30) 优先权数据

2022-065637 2022.04.12 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/008060 2023.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/199641 JA 2023.10.19

(71) 申请人 株式会社大塚制药工场

地址 日本德岛县

(72) 发明人 西村益浩 小森奈月

(74) 专利代理机构 北京金知睿知识产权代理事

务所(普通合伙) 11379

专利代理师 蔡民军

(51) Int.Cl.

C12N 5/0775 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书40页 附图16页

(54) 发明名称

哺乳动物细胞冷冻保存液

(57) 摘要

本发明涉及能够有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡、并且能够有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力的细胞冷冻保存液,以及使用该细胞冷冻保存液的哺乳动物细胞冷冻保存方法。本发明使用包含2.5~8.75(v/v)%丙二醇的液体作为哺乳动物细胞冷冻保存液。

1. 一种哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,包含2.5~8.75(v/v) %的丙二醇。
2. 如权利要求1所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,丙二醇的浓度为2.5~5.0(v/v) %;被用于提高冷冻融解后哺乳动物细胞的增殖能力。
3. 如权利要求1所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,还包含从右旋糖酐或其衍生物或者它们的盐、以及羟乙基淀粉或其衍生物或者它们的盐中选择的高分子化合物。
4. 如权利要求1所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,还包含海藻糖或其衍生物或者它们的盐。
5. 如权利要求1所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,为包含2.5~8.75(v/v) %丙二醇的等渗液。
6. 如权利要求5所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,等渗液选自乳酸林格氏液、生理盐水、林格氏液和乙酸林格氏液。
7. 如权利要求1~6中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,哺乳动物细胞为间充质干细胞、T细胞或造血干细胞。
8. 如权利要求1~6中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,包含哺乳动物细胞。
9. 如权利要求8所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,哺乳动物细胞为间充质干细胞、T细胞或造血干细胞。
10. 如权利要求9所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,其特征在于,包含脐带血。
11. 一种哺乳动物细胞冷冻保存方法,其特征在于,包括将权利要求8所述的哺乳动物细胞冷冻保存液冷冻保存的步骤(a)。
12. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,还包括在步骤(a)之后、将哺乳动物细胞冷冻融解并培养5天以上的步骤(b)。

哺乳动物细胞冷冻保存液

技术领域

[0001] 本发明涉及含有2.5~8.75(v/v)%的丙二醇(以下可称为“PG”)的哺乳动物细胞冷冻保存液(以下可称为“本冷冻保存液”),以及包括将包含哺乳动物细胞的本冷冻保存液冷冻保存的步骤(a)的哺乳动物细胞冷冻保存方法(以下可称为“本冷冻保存方法”)等。

背景技术

[0002] 细胞的冷冻保存作为细胞生物学研究中必不可少的技术被广泛应用。近年来,细胞冷冻保存技术不仅被应用于世界各地细胞库中各种确立细胞株的保存,还被应用于畜牧业中物种的保存,用于家畜增产的精子、卵子或受精卵的冷冻保存,以及生殖医疗中生殖细胞的冷冻保存等。

[0003] 胚胎干细胞(Embryonic Stem cell;ES细胞)、诱导多能干细胞(induced Pluripotent Stem cell;iPS细胞)等多能干细胞是具有无限增殖能力和向多种组织细胞多分化能力的细胞。对于人类多能干细胞,期望利用其特性应用于再生医疗,为实现这一目标,必须确立高质量的细胞冷冻技术,即在解冻后保障较高的细胞存活率和未分化性的细胞冷冻技术。

[0004] 细胞的冷冻保存方法一般可大体划分为缓慢冷冻法和快速冷冻法(玻璃化法)。缓慢冷冻法是使细胞悬浮在包含甘油、二甲基亚砷(以下有时称为“DMSO”)、水解角蛋白、水解明胶、血清、血清白蛋白等作为冷冻保护剂的冷冻保存液(专利文献1~5)中,以每分钟约1°C的速度降温而逐渐进行冷冻的方法。通过缓慢地冷却,将细胞内的水分子用冷冻保护剂置换而脱水,抑制细胞内和细胞周围的冰晶的生长,防止细胞膜和细胞内结构的损伤以及蛋白质的变性和断裂(非专利文献1)。最近,除了将胚胎冷冻保存的情况外,在将一般的细胞冷冻保存的情况下,即使不使用程序冷冻机严格地控制温度调节,也能够使用泡沫聚苯乙烯盒或市售的细胞冷冻盒缓慢地进行冷冻。这样的方法因为简便,也被称为简单缓慢冷冻法,在实验室和细胞库等中被广泛使用。

[0005] 另一方面,玻璃化法是为了抑制因冷冻导致的细胞内外的冰晶生成而通过快速冷却使其以玻璃状冷冻的方法。玻璃化法从1937年被报道直至被实用化的技术开发经历了较长的期间,于1985年开发出了使用含有由高浓度DMSO、乙酰胺、PG和聚乙二醇(以下称为“PEG”)构成的冷冻保护剂的玻璃化保存液的方法。通过这种方法的开发,实现了小鼠早期胚胎的冷冻保存,以及用缓慢冷冻法难以实现的牛胚和猪胚的冷冻保存。目前,包括胚胎库在内的许多机构都在使用玻璃化法。

[0006] 最近,正在积极进行人ES细胞和iPS细胞的冷冻保存液的开发以及冷冻保存方法的改进。例如,有报道称,如果使人ES细胞悬浮在含有5%DMSO、10%胎牛血清(Fetal bovine serum;FBS)和10%乙二醇(EG)的冷冻保存液中,使用简单缓慢冷冻法进行冷冻保存,则解冻后的细胞存活率会提高(非专利文献2)。还有报道称,如果使人ES细胞或iPS细胞悬浮在冷冻保存液(STEM—CELLBANKER[日本全药工业社制])中,使用简单缓慢冷冻法进行冷冻保存,解冻后的细胞存活率会提高(非专利文献3)。

[0007] 此外,还提出了含有海藻糖等糖类和PG,且不含DMSO、增稠剂和天然动物源性成分的细胞冷冻保存用溶液(专利文献6)。此外,还提出了含有从由牛磺酸、甘氨酸及其衍生物构成的集合中选择的至少一种,以及除DMSO外的冷冻保护剂、水溶性多糖类和寡糖类的动物细胞冷冻保存液(专利文献7)。

[0008] [现有技术文献]

[0009] [专利文献]

[0010] [专利文献1]国际公开第2003/064634号小册子

[0011] [专利文献2]日本特开平6—46840号公报

[0012] [专利文献3]日本特开平7—255469号公报

[0013] [专利文献4]日本特开平8—325101号公报

[0014] [专利文献5]日本特开2002—233356号公报

[0015] [专利文献6]国际公开第2019/172112号小册子

[0016] [专利文献7]日本特开2021—000027号公报

[0017] [非专利文献]

[0018] [非专利文献1]J.R.Dobrinsky, Theriogenology, 45, 17—26 (1996)

[0019] [非专利文献2]Y.S.Ha et al., Human Reprod., 20, 1779—1785 (2005)

[0020] [非专利文献3]F.Holm et al., Human Reprod., 25, 1271—1279 (2010)

发明内容

[0021] [发明要解决的问题]

[0022] 本发明的目的是提供一种能够有效抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡,并且能够有效提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力的细胞冷冻保存液,以及使用该细胞冷冻保存液的哺乳动物细胞冷冻保存方法。

[0023] [问题解决的手段]

[0024] 本发明人在为解决上述问题而反复进行的深入研究中发现,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含有2.5~5%的PG的细胞冷冻保存液中,则与冷冻保存在含有2.5~5%的DMSO的细胞冷冻保存液中的情况相比,冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力更高(例如,后述实施例的图1~图3)。此外还确认了,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含有2.5~5%的PG的细胞冷冻保存液中,则与冷冻保存在含有2.5~5%以外浓度的PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地提高冷冻融解后哺乳动物细胞的增殖能力(例如,后述实施例的图4和图8)。进一步还确认了,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含有2.5~8.75%的PG的细胞冷冻保存液中,则与冷冻保存在含有2.5%~8.75%以外浓度的PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的通过冷冻融解发生的细胞死亡(例如,后述实施例的图7)。本发明是基于这些认识而完成的。

[0025] 也就是说,本发明如下所述。

[0026] (1)一种哺乳动物细胞冷冻保存液,包含2.5~8.75(v/v)%丙二醇。

[0027] (2)如上述(1)所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,丙二醇的浓度为2.5~5.0(v/v)%;被用于提高冷冻融解后哺乳动物细胞的增殖能力。

[0028] (3)如上述(1)或(2)所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,还包含从右旋糖酐或其衍

生物或者它们的盐、以及羟乙基淀粉或其衍生物或者它们的盐中选择的高分子化合物。

[0029] (4)如上述(1)~(3)中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,还包含海藻糖或其衍生物或者它们的盐。

[0030] (5)如上述(1)~(4)中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,为包含2.5~8.75(v/v)%丙二醇的等渗液。

[0031] (6)如上述(5)所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,等渗液选自乳酸林格氏液、生理盐水、林格氏液和乙酸林格氏液。

[0032] (7)如上述(1)~(6)中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,哺乳动物细胞为间充质干细胞、T细胞或造血干细胞。

[0033] (8)如上述(1)~(6)中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,包含哺乳动物细胞。

[0034] (9)如上述(8)所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,哺乳动物细胞为间充质干细胞、T细胞或造血干细胞。

[0035] (10)如上述(9)所述的哺乳动物细胞冷冻保存液,包含脐带血。

[0036] (11)一种哺乳动物细胞冷冻保存方法,包括将上述(8)~(10)中任一项所述的哺乳动物细胞冷冻保存液冷冻保存的步骤(a)。

[0037] (12)如上述(11)所述的方法,还包含在步骤(a)之后、将哺乳动物细胞冷冻融解并培养5天以上的步骤(b)。

[0038] [发明的效果]

[0039] 根据本发明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含有2.5~8.75%的PG的细胞冷冻保存液中,则与冷冻保存在含有2.5~8.75%以外浓度的PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的通过冷冻融解发生的细胞死亡,并且如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含有2.5~5%的PG的细胞冷冻保存液中,则与冷冻保存在含有2.5~5%以外浓度的PG的细胞冷冻保存液中的情况或冷冻保存在含有2.5~5%的DMSO的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力,因此能够提供用于再生医疗中的优质的移植用含哺乳动物细胞液。

附图说明

[0040] 图1A是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有1.25~10%DMSO的4种细胞冷冻保存液(含1.25%DMSO、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“1.25%DMSO+Tre+D”];含2.5%DMSO、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“2.5%DMSO+Tre+D”];含5%DMSO、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“5%DMSO+Tre+D”];以及含10%DMSO、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“10%DMSO+Tre+D”])中31天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD, n=3)的图。图中的“*”和“**”表示相对于“10%DMSO”分别在统计学上存在显著差异(p<0.05和p<0.01)。图1B是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有1.25~10%PG的4种细胞冷冻保存液(含1.25%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“1.25%PG+Tre+D”];含2.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“2.5%PG+Tre+D”];含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“5%PG+Tre+D”];以及含10%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“10%PG+

Tre+D”])中31天,对融解后hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图中的“*”和“**”表示相对于“10% PG”分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 和 $p<0.01$)。

[0041] 图2是示出基于图1的结果对于DMSO和PG浓度相同的细胞冷冻保存液进行比较的结果的图。图中的“**”和“***”表示在培养天数相同的试样间分别在统计学上存在显著差异($p<0.01$ 和 $p<0.001$)。

[0042] 图3是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有4%PG或4%DMSO的含有海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液(含4%PG、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR[图中的“4% PG+Tre+D”];以及含4%DMSO、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR[图中的“4% DMSO+Tre+D”])中23天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力和未冷冻保存的hAD—MSC(图中的“—”)的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=6)的图。图中的“*”和“***”表示相对于培养天数相同的“—”分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 和 $p<0.001$)。

[0043] 图4是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有1.25~10%PG的4种基液(LR[图4A];含右旋糖酐的LR[图4B];含海藻糖的LR[图4C];以及含海藻糖和右旋糖酐的LR[图4D])中44天(图4A和图4B)或29天(图4C和图4D),对融解后hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图中的“*”、“**”和“***”表示在培养天数相同的试样间分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 、 $p<0.01$ 和 $p<0.001$)。

[0044] 图5是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有5%PG的4种基液(生理盐水[PG/S]、林格氏液[PG/R]、乙酸林格氏液[PG/AR]和乳酸林格氏液[PG/LR])中(分别对应于图中的黑色柱状图),或冷冻保存在含有5%PG和4.75%右旋糖酐的上述4种基液(分别为“PG+D/S”、“PG+D/R”、“PG+D/AR”和“PG+D/LR”)中33天,对刚融解后的细胞存活率(图5A)、存活细胞回收率(图5B)和膜联蛋白V(Annexin V)阳性率(图5C)进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图中的“*”表示相对于与其分别对应的“PG”在统计学上存在显著差异($p<0.05$)。

[0045] 图6A是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有5%PG的生理盐水(图中的“PG/S”)或含有5%PG和4.75%右旋糖酐的生理盐水(图中的“PG+D/S”)中70天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图6B是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有5%PG的林格氏液(图中的“PG/R”)或含有5%PG和4.75%右旋糖酐的林格氏液(图中的“PG+D/R”)中70天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图6C是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有5%PG的乙酸林格氏液(图中的“PG/AR”)或含有5%PG和4.75%右旋糖酐的乙酸林格氏液(图中的“PG+D/AR”)中70天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图6D是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有5%PG的乳酸林格氏液(图中的“PG/LR”)或含有5%PG和4.75%右旋糖酐的乳酸林格氏液(图中的“PG+D/LR”)中70天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。

[0046] 图7是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有1.25~10%PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液、即8种细胞冷冻保存液(含1.25%PG和4.94%右旋糖酐的LR[图中的“1.25%”];含2.5%PG和4.88%右旋糖酐的LR[图中的“2.5%”];含3.75%PG和4.81%右旋糖酐的LR[图中的“3.75%”];含5%PG和4.75%右旋糖酐的LR[图中的“5%”];含6.25%PG和4.69%右旋糖酐的LR[图中的“6.25%”];含7.5%PG和4.63%右旋糖酐的LR[图中的“7.5%”];含8.75%PG

和4.56%右旋糖酐的LR[图中的“8.75%”];以及含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“10%”])中40天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图7A)、存活细胞回收率(图7B)和膜联蛋白V阳性率(图7C)进行分析的结果(平均值±SD,n=4)的图。图中的“*”、“**”和“***”表示相对于“10%”分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 、 $p<0.01$ 和 $p<0.001$)。

[0047] 图8是示出将hAD—MSC冷冻保存在图7中的8种细胞冷冻保存液中28天,对融解后的hAD—MSC的细胞增殖能力进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图中的“*”和“**”表示相对于“含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR”分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 和 $p<0.01$)。

[0048] 图9是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有4%PG和0~9.6%右旋糖酐的细胞冷冻保存液,即6种细胞冷冻保存液(含4%PG的LR[图中的“0%”];含4%PG和1.2%右旋糖酐的LR[图中的“1.2%”];含4%PG和2.4%右旋糖酐的LR[图中的2.4%];含4%PG和4.8%右旋糖酐的LR[图中的4.8%];含4%PG和7.2%右旋糖酐的LR[图中的7.2%];以及含4%PG和9.6%右旋糖酐的LR[图中的9.6%])中38天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图9A)、存活细胞回收率(图9B)和膜联蛋白V阳性率(图9C)进行分析的结果(平均值±SD,n=4)的图。图中的“*”、“**”和“***”表示相对于“0%”分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 、 $p<0.01$ 和 $p<0.001$)。

[0049] 图10是示出将hAD—MSC冷冻保存在6种细胞冷冻保存液(含4%PG的LR[图中的“4%PG”];含10%PG的LR[图中的“10%PG”];含4%PG和4.8%右旋糖酐的LR[图中的“4%PG+D”];含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“10%PG+D”];含4%PG和4.8%HES的LR[图中的“4%PG+HES”];以及含10%PG和4.5%HES的LR[图中的“10%PG+HES”])中24天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图10A)、存活细胞回收率(图10B)和膜联蛋白V阳性率(图10C)进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图中的“*”表示通过邓内特检验在统计学上存在显著差异($p<0.05$),图中的“†”和“††”表示通过学生t检验分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 和 $p<0.01$)。

[0050] 图11是示出将hAD—MSC冷冻保存在6种细胞冷冻保存液(含4%PG和2.88%海藻糖的LR[图中的“4%PG+Tre”];含10%PG和2.7%海藻糖的LR[图中的“10%PG+Tre”];含4%PG、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR[图中的“4%PG+Tre+D”];含10%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“10%PG+Tre+D”];含4%PG、2.88%海藻糖和4.8%HES的LR[图中的“4%PG+Tre+HES”];以及含10%PG、2.7%海藻糖和4.5%HES的LR[图中的“10%PG+Tre+HES”])中24天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图11A)、存活细胞回收率(图11B)和膜联蛋白V阳性率(图11C)进行分析的结果(平均值±SD,n=3)的图。图中的“*”和“**”表示通过邓内特检验分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 和 $p<0.01$),图中的“†”表示通过学生t检验在统计学上存在显著差异($p<0.05$)。

[0051] 图12是示出将人脂肪来源的间充质干细胞(hAD—MSC)冷冻保存在3种细胞冷冻保存液(含2.5%PG的乳酸林格氏液[图中的“PG”];含2.5%PG和2.925%海藻糖的乳酸林格氏液[图中的“PG+Tre”];以及含2.5%PG、2.925%海藻糖和4.875%右旋糖酐的乳酸林格氏液[图中的“PG+Tre+D”])中28天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图12A)、存活细胞回收率(图12B)和膜联蛋白V阳性率(图12C)进行分析的结果(平均值±标准偏差[SD],n=4)的图。图中的“*”和“***”表示相对于“PG”分别在统计学上存在显著差异($p<0.05$ 和 $p<$

0.001)。

[0052] 图13是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有5种糖类(葡萄糖、果糖、海藻糖、蔗糖或乳糖)的含有4%PG的细胞冷冻保存液(分别为图中的“+Glu”、“+Flu”、“+Tre”、“+Suc”和“+Lac”)、或不含这些糖类的含有4%PG的细胞冷冻保存液(图中的“-”)中35天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图13A)和存活细胞回收率(图13B)进行分析的结果(平均值±SD, n=4)的图。图中的“*”表示相对于“-”在统计学上存在显著差异($p < 0.05$)。

[0053] 图14是示出将hAD—MSC冷冻保存在含有4%PG和0~11.52%海藻糖的细胞冷冻保存液,即6种细胞冷冻保存液(含4%PG的LR[图中的“0%”];含4%PG和0.72%海藻糖的LR[图中的“0.72%”];含4%PG和1.44%海藻糖的LR[图中的“1.44%”];含4%PG和2.88%海藻糖的LR[图中的“2.88%”];含4%PG和5.76%海藻糖的LR[图中的“5.76%”];以及含4%PG和11.52%海藻糖的LR[图中的“11.52%”])中32天,对刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率(图14A)、存活细胞回收率(图14B)和膜联蛋白V阳性率(图14C)进行分析的结果(平均值±SD, n=4)的图。图中的“*”、“**”和“***”表示相对于“0%”相分别在统计学上存在显著差异($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$)。

[0054] 图15是示出对于悬浮在含有4%PG的3种基液(含血清的培养液[图中的“PG+Med”]、含海藻糖的LR[图中的“PG+Tre”]和LR[图中的“PG”])中的hCD8阳性T细胞,对冷冻保存前的细胞存活率(图15A),以及冷冻保存46~167天、刚融解后(0小时)、融解后1小时、3小时和6小时的细胞存活率(图15A)和存活细胞回收率(图15B)进行分析的结果(平均值±SD, n=4)的图。图中的“*”、“**”和“***”表示相对于“PG+Med”分别在统计学上存在显著差异($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$),图中的“†”、“††”和“†††”表示在“PG+Tre”和“PG”的两组比较中分别在统计学上存在显著差异($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$)。

[0055] 图16是示出对于悬浮在含有2~7.5%PG的细胞冷冻保存液,即5种细胞冷冻保存液(含2%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“2”];含3%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“3”];含4%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“4”];含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“5”];以及含7.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR[图中的“7.5”])中的hCD8阳性T细胞,对冷冻保存前的细胞存活率(图16A),以及冷冻保存54~74天、刚融解后(0小时)和融解后3小时的细胞存活率(图16A)和存活细胞回收率(图16B)进行分析的结果(平均值±SD, n=4)的图。图中的“*”、“**”和“***”表示相对于“2”分别在统计学上存在显著差异($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$),图中的“†”和“†††”分别表示相对于“7.5”在统计学上存在显著差异($p < 0.05$ 和 $p < 0.001$)。

[0056] 图17是示出将hCD8阳性T细胞冷冻保存在图16中使用的含有2~7.5%PG的细胞冷冻保存液中46天,对刚融解后的hCD8阳性T细胞的细胞存活率(图17A)、存活细胞回收率(图17B)和膜联蛋白V阳性率(图17C)进行分析的结果(平均值±SD, n=3)的图。图中的“**”和“***”表示相对于“2%”分别在统计学上存在显著差异($p < 0.01$ 和 $p < 0.001$)。

[0057] 图18是示出将hCD4阳性T细胞冷冻保存在图16中使用的含有2~7.5%PG的细胞冷冻保存液中40~44天,对刚融解后的hCD4阳性T细胞的细胞存活率(图18A)、存活细胞回收率(图18B)和膜联蛋白V阳性率(图18C)进行分析的结果(平均值±SD, n=6)的图。图中的“***”表示相对于“2%”在统计学上存在显著差异($p < 0.001$)。图中的“††”表示相对于

“7.5%”在统计学上存在显著差异 ($p < 0.01$)。

[0058] 图19是对冷冻保存前的hCD34阳性造血干细胞的细胞存活率和CD34阳性率进行分析,并将hCD34阳性造血干细胞冷冻保存在图16中使用的含有2~7.5%PG的细胞冷冻保存液中14天、对刚融解后的hCD34阳性造血干细胞的细胞存活率和CD34阳性率进行分析,示出细胞存活率(图19A)与CD34阳性率比值(刚冷冻融解后相对于冷冻保存前的CD34阳性率比值)(图19B)的结果(平均值 \pm SD, $n=4$)的图。图中的“*”表示相对于“2%”在统计学上存在显著差异 ($p < 0.05$)。

具体实施方式

[0059] 本发明的哺乳动物细胞冷冻保存液是被指定用于“冷冻保存哺乳动物细胞”这一用途的、含有2.5~8.75(v/v)%丙二醇的液体(即本冷冻保存液)。丙二醇浓度为2.5~5.0(v/v)%的本冷冻保存液,与在含有2.5~5.0(v/v)%以外浓度的丙二醇的细胞冷冻保存液或含有DMSO的细胞冷冻保存液中冷冻保存哺乳动物细胞的情况相比,能够有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力。因此,丙二醇浓度为2.5~5.0(v/v)%的本冷冻保存液也可以被指定用于“提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力”这一用途。

[0060] 此外,本冷冻保存液(含有2.5~8.75(v/v)%丙二醇的液体)与在含有DMSO的细胞冷冻保存液或含有2.5~8.75(v/v)%以外浓度的丙二醇的细胞冷冻保存液中冷冻保存哺乳动物细胞的情况相比,能够在解冻后的室温(1°C~30°C)保存中将细胞存活率保持为较高的值。因此,本冷冻保存液也可以被指定用于“提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的细胞存活率”这一用途。

[0061] 作为本发明的将哺乳动物细胞冷冻保存的方法,只要是包括将包含哺乳动物细胞的本冷冻保存液冷冻保存(换言之,将哺乳动物细胞冷冻保存在本冷冻保存液中)的步骤(a)的方法(即本冷冻保存方法)即可,没有特别限制,在该步骤(a)中,既可以将哺乳动物细胞使用缓慢冷冻法冷冻然后保存,也可以使用快速冷冻法(玻璃化法)冷冻然后保存。作为该缓慢冷冻法,例如可以举出将含有哺乳动物细胞的本冷冻保存液转移到细胞保存用管或小瓶中,在低温冷冻机或超低温冷冻机(通常在-20°C~-150°C范围内)中冷冻,然后在液氮(通常在-150°C~-196°C范围内)中保存的方法。作为上述快速冷冻法,例如可以举出使哺乳动物细胞悬浮在本冷冻保存液中后,根据需要而转移到麦管内,在液氮(通常在-150°C~-196°C范围内)中快速冷冻并保存的方法。

[0062] 在本说明书中,作为丙二醇的浓度,只要是2.5~8.75(v/v)%的范围内即可,例如可以举出2.5~7.5%、2.5~6.25%、2.5~5.0%、2.5~4.9%、2.5~4.8%、2.5~4.6%、2.5~4.4%、2.5~4.2%、2.5~4.0%、2.5~3.8%、2.5~3.6%、2.5~3.4%、2.5~3.2%、2.5~3.0%、2.5~2.8%、2.5~2.6%、2.6~8.75%、2.8~8.75%、3.0~8.75%、3.2~8.75%、3.4~8.75%、3.6~8.75%、3.8~8.75%、4.0~8.75%、4.2~8.75%、4.4~8.75%、4.6~8.75%、4.8~8.75%、5.0~8.75%、6.25~8.75%、7.5~8.75%、2.6~7.5%、2.6~6.25%、2.6~5.0%、2.6~4.9%、2.6~4.8%、2.6~4.6%、2.6~4.4%、2.6~4.2%、2.6~4.0%、2.6~3.8%、2.6~3.6%、2.6~3.4%、2.6~3.2%、2.6~3.0%、2.6~2.8%、2.8~7.5%、2.8~6.25%、2.8~5.0%、2.8~4.9%、2.8~4.8%、2.8~4.6%、2.8~4.4%、2.8~4.2%、2.8~4.0%、2.8~3.8%、2.8~3.6%、2.8~3.4%、2.8~3.2%、

2.8~3.0%、3.0~7.5%、3.0~6.25%、3.0~5.0%、3.0~4.9%、3.0~4.8%、3.0~4.6%、3.0~4.4%、3.0~4.2%、3.0~4.0%、3.0~3.8%、3.0~3.6%、3.0~3.4%、3.0~3.2%、3.2~7.5%、3.2~6.25%、3.2~5.0%、3.2~4.9%、3.2~4.8%、3.2~4.6%、3.2~4.4%、3.2~4.2%、3.2~4.0%、3.2~3.8%、3.2~3.6%、3.2~3.4%、3.4~7.5%、3.4~6.25%、3.4~5.0%、3.4~4.9%、3.4~4.8%、3.4~4.6%、3.4~4.4%、3.4~4.2%、3.4~4.0%、3.4~3.8%、3.4~3.6%、3.6~7.5%、3.6~6.25%、3.6~5.0%、3.6~4.9%、3.6~4.8%、3.6~4.6%、3.6~4.4%、3.6~4.2%、3.6~4.0%、3.6~3.8%、3.8~7.5%、3.8~6.25%、3.8~5.0%、3.8~4.9%、3.8~4.8%、3.8~4.6%、3.8~4.4%、3.8~4.2%、3.8~4.0%、4.0~7.5%、4.0~6.25%、4.0~5.0%、4.0~4.9%、4.0~4.8%、4.0~4.6%、4.0~4.4%、4.0~4.2%、4.2~7.5%、4.2~6.25%、4.2~5.0%、4.2~4.9%、4.2~4.8%、4.2~4.6%、4.2~4.4%、4.4~7.5%、4.4~6.25%、4.4~5.0%、4.4~4.9%、4.4~4.8%、4.4~4.6%、4.6~7.5%、4.6~6.25%、4.6~5.0%、4.6~4.9%、4.6~4.8%、4.8~7.5%、4.8~6.25%、4.8~5.0%、4.8~4.9%、4.9~7.5%、4.9~6.25%、4.9~5.0%、5.0~7.5%、5.0~6.25%、6.25~7.5%等。

[0063] 作为本冷冻保存液,优选还包含高分子化合物。在本说明书中,高分子化合物是指重量平均分子量(Mw)为 1×10^4 以上的化合物。作为这种高分子化合物,例如可以举出从右旋糖酐或其衍生物或者它们的盐(以下可称为“右旋糖酐类”)、羟乙基淀粉(也称为羟乙基淀粉)或其衍生物或者它们的盐(以下可称为“羟乙基淀粉类”)、白蛋白、羧甲基纤维素或其盐、黄原胶或其盐、明胶、支链淀粉或其盐等中选择的高分子化合物,其中,由于在后述的本实施例中证实了其效果,可以优选例示从右旋糖酐类和羟乙基淀粉类中选择的高分子化合物。作为本冷冻保存液,可以含有右旋糖酐类和羟乙基淀粉类以外的高分子化合物,也可以不含。

[0064] 作为上述右旋糖酐类中的右旋糖酐,只要是由D-葡萄糖组成的多糖($C_6H_{10}O_5$)_n,以 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 键为主链即可,没有被特别限制,作为右旋糖酐的重量平均分子量(Mw),例如可以是 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 的范围内(例如,右旋糖酐40[Mw=40000],右旋糖酐70[Mw=70000])。这些右旋糖酐可以通过化学合成、借助微生物的生产、借助酶的生产等任何公知的方法制造,但也可以使用市售品。例如,可以举出右旋糖酐40(东京化成工业社制),右旋糖酐70(东京化成工业社制)等市售品。

[0065] 作为上述右旋糖酐类中的右旋糖酐衍生物,例如可以举出羧基化右旋糖酐、二乙氨基乙基(DEAE)-右旋糖酐等。

[0066] 作为上述羟乙基淀粉类中的羟乙基淀粉,只要是 α -D-葡萄糖直链结合($\alpha-1,4$ 键)的直链淀粉和具有分支($\alpha-1,6$ 键)的支链淀粉的混合物,是葡萄糖单元的C2、C3和C6中的一个或两个以上被羟乙基化的物质(支链淀粉的衍生物)即可,没有特别限制,作为羟乙基淀粉的Mw,例如可以是 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ (例如, $7 \times 10^4, 2 \times 10^5$)的范围内。此外,作为上述羟乙基淀粉的取代度(每1个葡萄糖单位的羟乙基数),没有特别限制,例如可以举出0.4~0.8的范围内(例如,0.50~0.55)。这些羟乙基淀粉也可以通过化学合成、借助微生物的生产、借助酶的生产等任何公知的方法制造,但也可以使用市售品。例如,可以举出HES(Fresenius Kabi Austria GmbH公司制)等市售品。

[0067] 作为上述羟乙基淀粉类中的羟乙基淀粉衍生物,例如可以举出DEAE-羟乙基淀粉

等。

[0068] 作为本冷冻保存液中的高分子化合物的浓度,只要能确认与PG的并用效果即可,没有特别限制,作为高分子化合物浓度的下限值,例如可以举出1.0(w/v)%、1.2(w/v)%、1.4(w/v)%、1.6(w/v)%、1.8(w/v)%、2.0(w/v)%、2.2(w/v)%、2.4(w/v)%、2.6(w/v)%、2.8(w/v)%、3.0(w/v)%、3.2(w/v)%、3.4(w/v)%、3.6(w/v)%、3.8(w/v)%、4.0(w/v)%、4.2(w/v)%、4.4(w/v)%、4.6(w/v)%、4.8(w/v)%等。此外,作为本冷冻保存液中高分子化合物浓度的上限值,例如可以举出20(w/v)%、16(w/v)%、13(w/v)%、10(w/v)%、9.8(w/v)%、9.6(w/v)%等。

[0069] 因此,作为上述高分子化合物的浓度,例如可以举出1.0~20%、1.2~20%、1.4~20%、1.6~20%、1.8~20%、2.0~20%、2.2~20%、2.4~20%、2.6~20%、2.8~20%、3.0~20%、3.2~20%、3.4~20%、3.6~20%、3.8~20%、4.0~20%、4.2~20%、4.4~20%、4.6~20%、4.8~20%、1.0~16%、1.2~16%、1.4~16%、1.6~16%、1.8~16%、2.0~16%、2.2~16%、2.4~16%、2.6~16%、2.8~16%、3.0~16%、3.2~16%、3.4~16%、3.6~16%、3.8~16%、4.0~16%、4.2~16%、4.4~16%、4.6~16%、4.8~16%、1.0~13%、1.2~13%、1.4~13%、1.6~13%、1.8~13%、2.0~13%、2.2~13%、2.4~13%、2.6~13%、2.8~13%、3.0~13%、3.2~13%、3.4~13%、3.6~13%、3.8~13%、4.0~13%、4.2~13%、4.4~13%、4.6~13%、4.8~13%、1.0~10%、1.2~10%、1.4~10%、1.6~10%、1.8~10%、2.0~10%、2.2~10%、2.4~10%、2.6~10%、2.8~10%、3.0~10%、3.2~10%、3.4~10%、3.6~10%、3.8~10%、4.0~10%、4.2~10%、4.4~10%、4.6~10%、4.8~10%、1.0~9.8%、1.2~9.8%、1.4~9.8%、1.6~9.8%、1.8~9.8%、2.0~9.8%、2.2~9.8%、2.4~9.8%、2.6~9.8%、2.8~9.8%、3.0~9.8%、3.2~9.8%、3.4~9.8%、3.6~9.8%、3.8~9.8%、4.0~9.8%、4.2~9.8%、4.4~9.8%、4.6~9.8%、4.8~9.8%、1.0~9.6%、1.2~9.6%、1.4~9.6%、1.6~9.6%、1.8~9.6%、2.0~9.6%、2.2~9.6%、2.4~9.6%、2.6~9.6%、2.8~9.6%、3.0~9.6%、3.2~9.6%、3.4~9.6%、3.6~9.6%、3.8~9.6%、4.0~9.6%、4.2~9.6%、4.4~9.6%、4.6~9.6%、4.8~9.6%等,当高分子化合物为右旋糖酐类时,优选为1.2~9.6%,更优选为2.4~9.6%,更加优选为4.8~9.6%。

[0070] 作为还含有高分子化合物的本冷冻保存液中的丙二醇和高分子化合物的重量比的范围,例如可以举出1:0.1~1:10、1:0.1~1:8、1:0.1~1:6、1:0.1~1:4、1:0.2~1:10、1:0.2~1:8、1:0.2~1:6、1:0.2~1:4、1:0.3~1:10、1:0.3~1:8、1:0.3~1:6、1:0.3~1:4、1:0.4~1:10、1:0.4~1:8、1:0.4~1:6、1:0.4~1:4、1:0.5~1:10、1:0.5~1:8、1:0.5~1:6、1:0.5~1:4等,当高分子化合物为右旋糖酐类时,优选为1:0.1~1:4,更优选为1:0.3~1:4,更加优选为1:0.5~1:4。

[0071] 作为本冷冻保存液,优选还含有海藻糖或其衍生物或者它们的盐(以下有时称为“海藻糖类”)。作为海藻糖类中的海藻糖,除了作为两个 α -葡萄糖通过1,1-糖苷键结合的二糖类的 α,α -海藻糖外,还可以举出作为 α -葡萄糖和 β -葡萄糖通过1,1-糖苷键结合的二糖类的 α,β -海藻糖,以及作为两个 β -葡萄糖通过1,1-糖苷键结合的二糖类的 β,β -海藻糖,其中 α,α -海藻糖是优选的。这些海藻糖可以通过化学合成、借助微生物的生产、借助酶的生产等任何公知的方法制造,但也可以使用市售品。例如,可以举出海藻糖二水合物

(富士胶片和光纯药社制)等市售品。

[0072] 作为上述海藻糖类中的海藻糖衍生物,只要是对二糖海藻糖结合一个或多个糖单位的糖基海藻糖类即可,没有特别限制,在糖基海藻糖类中,包括葡萄糖基海藻糖、麦芽糖基海藻糖、麦芽三糖基海藻糖等。

[0073] 作为本冷冻保存液中海藻糖类的浓度,只要能确认与PG的并用效果即可,没有特别限制,作为海藻糖类浓度的下限值,例如可以举出0.7(w/v)%、0.8(w/v)%、0.9(w/v)%、1.0(w/v)%、1.1(w/v)%、1.2(w/v)%、1.3(w/v)%、1.4(w/v)%等。此外,作为本冷冻保存液中海藻糖类浓度的上限值,例如可以举出40(w/v)%、35(w/v)%、30(w/v)%、25(w/v)%、20(w/v)%、15(w/v)%、12(w/v)%、6.0(w/v)%等。

[0074] 因而,作为上述海藻糖类的浓度,例如可以举出0.7~40%、0.8~40%、0.9~40%、1.0~40%、1.1~40%、1.2~40%、1.3~40%、1.4~40%、0.7~35%、0.8~35%、0.9~35%、1.0~35%、1.1~35%、1.2~35%、1.3~35%、1.4~35%、0.7~30%、0.8~30%、0.9~30%、1.0~30%、1.1~30%、1.2~30%、1.3~30%、1.4~30%、0.7~25%、0.8~25%、0.9~25%、1.0~25%、1.1~25%、1.2~25%、1.3~25%、1.4~25%、0.7~20%、0.8~20%、0.9~20%、1.0~20%、1.1~20%、1.2~20%、1.3~20%、1.4~20%、0.7~15%、0.8~15%、0.9~15%、1.0~15%、1.1~15%、1.2~15%、1.3~15%、1.4~15%、0.7~12%、0.8~12%、0.9~12%、1.0~12%、1.1~12%、1.2~12%、1.3~12%、1.4~12%、0.7~6.0%、0.8~6.0%、0.9~6.0%、1.0~6.0%、1.1~6.0%、1.2~6.0%、1.3~6.0%、1.4~6.0%等。

[0075] 作为还含有海藻糖类的本冷冻保存液中丙二醇和海藻糖类的重量比范围,例如可以举出1:0.08~1:16、1:0.08~1:14、1:0.08~1:12、1:0.08~1:10、1:0.08~1:8、1:0.08~1:6、1:0.08~1:4、1:0.08~1:2.4、1:0.1~1:16、1:0.1~1:14、1:0.1~1:12、1:0.1~1:10、1:0.1~1:8、1:0.1~1:6、1:0.1~1:4、1:0.1~1:2.4、1:0.12~1:16、1:0.12~1:14、1:0.12~1:12、1:0.12~1:10、1:0.12~1:8、1:0.12~1:6、1:0.12~1:4、1:0.12~1:2.4、0.14~1:16、1:0.14~1:14、1:0.14~1:12、1:0.14~1:10、1:0.14~1:8、1:0.14~1:6、1:0.14~1:4、1:0.14~1:2.4、0.16~1:16、1:0.16~1:14、1:0.16~1:12、1:0.16~1:10、1:0.16~1:8、1:0.16~1:6、1:0.16~1:4、1:0.16~1:2.4等。

[0076] 本冷冻保存液是含有2.5~8.75(v/v)%丙二醇的可用于哺乳动物细胞冷冻保存的液体(例如,等渗液、低渗液、高渗液),优选是含有2.5~8.75(v/v)%丙二醇的等渗液。在本说明书中,“等渗液”是指具有与体液或细胞液的渗透压大致相同的渗透压的液体,具体是指具有250~380mOsm/L范围内渗透压的液体。此外,在本说明书中,“低渗液”是指具有比体液或细胞液的渗透压低的渗透压的液体,具体是指具有小于250mOsm/L渗透压的液体。作为该低渗液,优选是细胞不破裂的程度的低渗液(具体是指具有100~小于250mOsm/L范围内渗透压的液体)。此外,在本说明书中,“高渗液”是指具有比体液或细胞液的渗透压高的渗透压的液体,具体是指渗透压高于380mOsm/L(优选为380mOsm/L以上~1000mOsm/L范围内)的液体。

[0077] 作为上述等渗液,没有特别限制,只要是通过钠离子、钾离子、钙离子等调整盐浓度或糖浓度等以成为与体液或细胞液的渗透压大致相同的等渗液即可,具体可以举出生理盐水或具有缓冲效果的生理盐水(例如,PBS、Tris缓冲生理盐水[Tris Buffered Saline;

TBS]、HEPES缓冲生理盐水)、林格氏液、乳酸林格氏液、乙酸林格氏液、碳酸氢盐林格氏液、5%葡萄糖水溶液、动物细胞培养用基础培养基(例如,DMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199)、等渗剂(例如,葡萄糖、D-山梨醇、D-甘露醇、乳糖、氯化钠)等,其中,由于在后述的本实施例中证实了其效果,所以可以优选例示从乳酸林格氏液、生理盐水、林格氏液和乙酸林格氏液中选择等渗液。等渗液既可以是市售的,也可以是自行配制的。作为市售品,可以举出大塚生理盐注射液(大塚制药工场社制)(生理盐水)、林格氏液“Otsuka”(大塚制药工场社制)(林格氏液)、Lactec(注册商标)注射液(大塚制药工场社制)(乳酸林格氏液)、Veen(注册商标)F输液(扶桑药品工业社制)(乙酸林格氏液)、大塚糖液5%(大塚制药工场社制)(5%葡萄糖水溶液)、BICANATE(注册商标)输液(大塚制药工场社制)(碳酸氢盐林格氏液)。

[0078] 作为本冷冻保存液,也可以含有PG以外的冷冻保护成分(例如,DMSO;甘油;乙二醇;PEG;丝胶蛋白;异麦芽低聚糖;人、牛等来源的血清),但由于以PG单独就能有效提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力,所以优选不含PG以外的冷冻保护成分。

[0079] 作为本冷冻保存液,可以含有海藻糖类以外的寡糖(例如,蔗糖、乳糖、麦芽糖等二糖类;麦芽三糖、棉子糖、松三糖等三糖类;阿卡波糖、水苏糖等四糖类)或单糖类(例如,葡萄糖、果糖、半乳糖),但也可以不含。

[0080] 在本冷冻保存液中,通常不含从牛磺酸或其衍生物或者它们的盐、以及甘氨酸或其衍生物或者它们的盐中选择的物质。作为该牛磺酸衍生物,例如可以举出N-取代牛磺酸(例如,N-(2-乙酰胺)-2-氨基乙磺酸、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸、N-环己基-2-氨基乙磺酸、2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸、2-吗啉乙磺酸、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)、N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸等)、亚牛磺酸、硫代牛磺酸等。作为上述甘氨酸衍生物,例如可以举出肌氨酸(N-甲基甘氨酸)、N-乙基甘氨酸、N-丙基甘氨酸、N,N-二乙基甘氨酸、N,N-二甲基甘氨酸、N-氨基甘氨酸、N-氨基-N-甲基甘氨酸、甘氨酸甘氨酸、苯乙酰氨酸、甘氨酸甲酯、甘氨酸乙酯、甘氨酸正丁酯、甘氨酸叔丁酯、甘氨酸正丙酯、甘氨酸正戊酯、甘氨酸苄酯等。作为牛磺酸、牛磺酸衍生物、甘氨酸及甘氨酸衍生物的“盐”,例如可以举出盐酸盐、溴氢酸盐、氢碘酸盐、磷酸盐、硝酸盐、硫酸盐、乙酸盐、丙酸盐、甲苯磺酸盐、琥珀酸盐、草酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、乙醇酸盐、甲磺酸盐、丁酸盐、戊酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、马来酸盐、苹果酸盐等酸加成盐,或钠盐、钾盐、钙盐等金属盐,或铵盐、烷基铵盐等。

[0081] 在本说明书中,作为(右旋糖酐、右旋糖酐衍生物、羟乙基淀粉、羟乙基淀粉衍生物、海藻糖、海藻糖衍生物、羧甲基纤维素、黄原胶和支链淀粉)的“盐”,例如可以举出盐酸盐、溴氢酸盐、氢碘酸盐、磷酸盐、硝酸盐、硫酸盐、乙酸盐、丙酸盐、甲苯磺酸盐、琥珀酸盐、草酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、乙醇酸盐、甲磺酸盐、丁酸盐、戊酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、马来酸盐、苹果酸盐等酸加成盐,或钠盐、钾盐、钙盐等金属盐,或铵盐、烷基铵盐等。另外,这些盐在使用时被作为溶液使用,其作用优选为与使用右旋糖酐、右旋糖酐衍生物、羟乙基淀粉、羟乙基淀粉衍生物、海藻糖、海藻糖衍生物、羧甲基纤维素、黄原胶和支链淀粉的情况效果相同。(右旋糖酐、右旋糖酐衍生物、羟乙基淀粉、羟乙基淀粉衍生物、海藻糖、海藻糖衍生物、羧甲基纤维素、黄原胶和支链淀粉)的“盐”也可以形成水合物或溶剂合物,也可以单独使用其中任何一种或适当组合使用两种以上。

[0082] 作为本冷冻保存液中的任意成分,例如可以举出维生素类(例如,氯化胆碱、泛酸、叶酸、烟酰胺、盐酸吡哆醛、核黄素、盐酸硫胺、抗坏血酸、生物素、肌醇)、螯合剂(例如,EDTA、EGTA、柠檬酸、水杨酸盐)、抗生素(例如,青霉素、链霉素)、蛋白质、抗氧化物质(例如,多酚、槲皮素)等。在本说明书中,“任意成分”是指既可以包含也可以不包含的成分。

[0083] 作为上述哺乳动物细胞的具体细胞,例如可以举出干细胞(例如,经由血管对再生医疗等施用的干细胞),胰岛细胞(例如,对I型糖尿病患者经静脉施用的胰岛细胞),T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞等淋巴细胞系细胞,单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等抗原呈递细胞,嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞等粒细胞等,由于在后述的本实施例中证实了其效果,所以可以优选例示T细胞。作为该T细胞,可以举出 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、肿瘤浸润T细胞、记忆T细胞、初始T细胞、NKT细胞。T细胞可以通过公知的一般方法从哺乳动物的骨髓、末梢血、脐带血等中获取。

[0084] 在本说明书中,作为“哺乳动物”,可以例示小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等啮齿类,兔子等兔形目,猪、牛、山羊、马、绵羊等有蹄目,狗、猫等食肉目,人类、猴子、恒河猴、食蟹猴、狨猴、猩猩、黑猩猩等灵长类等,其中,可以优选例示小鼠、猪、人类。

[0085] 上述“干细胞”是指具有自我复制能力和分化增殖能力的未成熟细胞。在干细胞中,根据分化能力,包括多能干细胞(pluripotent stem cell)、多潜能干细胞(multipotent stem cell)、单能干细胞(unipotent stem cell)等子集。多能干细胞是指虽然以其自身不能成为个体、但具有能够向构成生物体的全部组织或细胞分化的能力的细胞。多潜能干细胞是指具有虽然不是全部种类但能够向多种组织或细胞分化的能力的细胞。单能干细胞是指具有向特定组织或细胞分化的能力的细胞。

[0086] 作为多能干细胞,可以举出胚胎干细胞(ES细胞)、EG细胞、iPS细胞等。ES细胞可以通过在饲养层细胞上或含LIF的培养基中培养内细胞群来制备。ES细胞的制备方法例如记载在W096/22362、W002/101057、US5843,780、US6,200,806、US6,280,718等中。EG细胞可以通过在含有mSCF、LIF和bFGF的培养基中培养原始生殖细胞来制备(Cell,70:841—847,1992)。iPS细胞可以通过对体细胞(例如成纤维细胞、皮肤细胞等)导入Oct3/4、Sox2和Klf4(根据需要还包括c-Myc或n-Myc)等重编程因子来制备(Cell,126:p.663—676,2006;Nature,448:p.313—317,2007;Nat Biotechnol,26;p.101—106,2008;Cell 131:p.861—872,2007;Science,318:p.1917—1920,2007;Cell Stem Cells 1:p.55—70,2007;Nat Biotechnol,25:p.1177—1181,2007;Nature,448:p.318—324,2007;Cell Stem Cells2:p.10—12,2008;Nature451:p.141—146,2008;Science,318:p.1917—1920,2007)。此外,通过培养借助将体细胞核移植而制备的早期胚胎而建立的干细胞也作为多能性干细胞是优选的(Nature,385,810(1997);Science,280,1256(1998);Nature Biotechnology,17,456(1999);Nature,394,369(1998);Nature Genetics,22,127(1999);Proc.Natl.Acad.Sci.USA,96,14984(1999)、Rideout III等(Nature Genetics,24,109(2000))。

[0087] 作为多潜能干细胞,可以举出能分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞等细胞的间充质干细胞,能分化为白细胞、红细胞、血小板等血球系细胞的造血干细胞(例如,从CD34、CD110、CD111、CD112和CD117中选择的至少一个细胞表面标记物为阳性的造血干细胞,优选为CD34阳性造血干细胞),能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等细胞的神经系

干细胞,骨髓干细胞、生殖干细胞等成体干细胞等,由于在后述的本实施例中证实了其效果,所以可以优选例示间充质干细胞或造血干细胞。多潜能干细胞自身可以通过公知的方法从生物体中分离。例如,间充质干细胞可以通过公知的一般方法从哺乳动物的骨髓、脂肪组织、末梢血、脐带血等中获取。此外,也可以通过骨髓穿刺后的造血干细胞等的培养、传代来分离人间充质干细胞(*Journal of Autoimmunity*,30(2008)163—171)。例如,造血干细胞可以通过公知的一般方法从哺乳动物的骨髓、末梢血、脐带血等中获取。多潜能干细胞也可以通过在适当的诱导条件下培养上述多能性干细胞来获得。间充质干细胞优选是人脂肪来源的间充质干细胞。此外,造血干细胞优选是人来源的CD34阳性造血干细胞。

[0088] 作为本冷冻保存液,既可以是不含哺乳动物细胞的形态,也可以是含有哺乳动物细胞的形态,在实施本冷冻保存方法的情况下,含有哺乳动物细胞的形态(即含有哺乳动物细胞的本冷冻保存液)是优选的。含有哺乳动物细胞的本冷冻保存液可以通过任意方法制备,例如,可以举出1)将含有哺乳动物细胞的液体通过离心处理分离为上清(液体)和沉淀(哺乳动物细胞)后,通过去除上清(液体)并对沉淀(哺乳动物细胞)添加本冷冻保存液来制备的方法,或2)在与含有哺乳动物细胞的液体混合时,将进行调整以使本冷冻保存液中所含成分的最终浓度达到目标浓度(例如,在PG的情况下为2.5~8.75(v/v)%)的液体与含有哺乳动物细胞的液体混合来制备的方法等。作为含有哺乳动物细胞的本冷冻保存液,优选为含有脐带血的本冷冻保存液。含有脐带血的本冷冻保存液例如可以按照上述2)的方法,将脐带血(即含有造血干细胞等哺乳动物细胞的液体)与含有PG的液体以任意比例(例如,10:1~1:10[例如,10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10等])混合来制备。

[0089] 作为保存在本冷冻保存液中的哺乳动物细胞,可以例示贴壁性的细胞。在本说明书中,“贴壁性”细胞是指通过粘附在支架上而能够生存、增殖、进行物质生产的支架依赖性的细胞。作为贴壁性干细胞,可以举出多能性干细胞、间充质干细胞、神经系干细胞、骨髓干细胞、生殖干细胞等。贴壁性干细胞优选的是间充质干细胞。

[0090] 保存在本冷冻保存液中的哺乳动物细胞(群)既可以是从生物体内分离的,也可以是在生物体外传代培养的,但优选是经过分离或纯化的。在本说明书中,“分离或纯化”是指实施将目标成分以外的成分去除的操作。被分离或纯化后的哺乳动物细胞的纯度(哺乳动物干细胞数等目标细胞数相对于总细胞数的比例)通常为30%以上,优选为50%以上,更优选为70%以上,更加优选为90%以上(例如100%)。

[0091] 保存在本冷冻保存液中的哺乳动物细胞(群)优选为单细胞(单个细胞)状态。在本说明书中,“单细胞状态”是指未与其他细胞聚集形成团(即,未聚集的状态)。单细胞状态的哺乳动物细胞可以通过对在生物体外培养的哺乳动物细胞用胰蛋白酶/EDTA等进行酶处理后,用移液、放液等该技术领域中公知的方法使细胞悬浮来制备。哺乳动物细胞中包含的单细胞状态的哺乳动物细胞的比例通常为70%以上,优选为90%以上,更优选为95%以上,更加优选为99%以上(例如100%)。单细胞状态的细胞比例可以通过将哺乳动物细胞分散在PBS中,将其在显微镜下观察,对于随机选择的多个(例如1000个)细胞检查聚集的有无来决定。

[0092] 作为本冷冻保存方法,优选的是,包括在上述步骤(a)之后、将哺乳动物细胞冷冻融解并培养的步骤(b)。作为培养期间,例如可以举出1天以上、2天以上、3天以上、4天以上、

5天以上、6天以上、7天以上、8天以上等,但优选为5天以上。

[0093] 在上述步骤(b)中,作为将哺乳动物细胞冷冻融解的方法,没有特别限制,可以将包含冷冻的含有哺乳动物细胞的本冷冻保存液的容器(细胞保存用试管、细胞保存用小瓶、麦管等)在常温(例如,10~28°C范围内)下自然解冻,但从防止再冻结的观点来看,优选的是浸入温水(例如,30~40°C范围内的水)中并快速解冻。

[0094] 在上述步骤(b)中,冷冻融解后的哺乳动物细胞的培养在适当的容器(培养板、培养皿、培养瓶等)内在适当的培养液存在下进行。作为该培养液,例如可以举出含有0.1~30(v/v)%血清(FBS、CS等)的动物细胞培养用培养液(DMEM、EMEM、IMDM、RPMI1640、 α MEM、F-12、F-10、M-199、AIM-V等)、MyeloCult H5100培养基(STEMCELL Technologies公司制,ST-05150)等。此外,作为不含血清的培养液(无血清培养液),例如可以举出适量(例如,1~30%)添加了前述的市售的B27补充剂(—胰岛素)、N2补充剂、B27补充剂、Knockout Serum Replacement等血清替代物的上述动物细胞培养用培养液等。

[0095] 在上述步骤(b)中,冷冻融解后的哺乳动物细胞的培养温度通常约为30~40°C范围内,优选为37°C。此外,培养时的CO₂浓度通常约为1~10%范围内,优选约为5%。此外,培养时的湿度通常约为70~100%范围内,优选约为95~100%范围内。此外,培养时的O₂浓度既可以是正常氧浓度(18~22% O₂),也可以是低氧浓度(0~10% O₂)。

[0096] 以下,通过实施例更具体地说明本发明,但本发明的技术范围不限于这些示例。

[0097] [实施例1]

[0098] 1.方法

[0099] [用于研究1的细胞冷冻保存液的制备]

[0100] 1) 含10(v/v)%DMSO、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR通过将CellStore S(大塚制药工场社制)(即,含3(w/v)%海藻糖和5(w/v)%右旋糖酐的乳酸林格氏液)与CultureSure(注册商标)DMSO(富士胶片和光纯药工业社制)以9:1的比例混合而制备。

[0101] 2) 含5(v/v)%DMSO、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,含2.5(v/v)%DMSO、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,以及含1.25(v/v)%DMSO、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,通过用CellStore S以2倍公比稀释上述“含10%DMSO、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR”而制备。

[0102] 3) 含10(v/v)%丙二醇(PG)(丸石制药社制)、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR通过将CellStore S与PG以9:1的比例混合而制备。

[0103] 4) 含5(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,含2.5(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,以及含1.25(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,通过用CellStore S以2倍公比稀释上述“含10(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR”而制备。

[0104] [用于研究2的细胞冷冻保存液的制备]

[0105] 1) 含4(v/v)%PG、2.88(w/v)%海藻糖和4.8(w/v)%右旋糖酐的LR通过将0.4mL的上述PG与9.6mL的CellStore S混合而制备。

[0106] 2) 含4(v/v)%DMSO、2.88(w/v)%海藻糖和4.8(w/v)%右旋糖酐的LR通过将0.4mL的上述DMSO与9.6mL的CellStore S混合而制备。

[0107] [用于研究3的细胞冷冻保存液的制备]

[0108] 1) 含10 (v/v) %PG的LR通过将Lactec注射液(大塚制药工场社制)与上述PG以9:1的比例混合而制备。

[0109] 2) 含5 (v/v) %PG的LR、含2.5 (v/v) %PG的LR和含1.25 (v/v) %PG的LR通过用Lactec注射液以2倍公比稀释上述“含10 (v/v) %PG的LR”而制备。

[0110] 3) 含10 (v/v) %PG和4.5 (w/v) %右旋糖酐的LR通过首先将500mg右旋糖酐40 (Mw=40000, 东京化成工业社制) 溶解在10mL的Lactec注射液中制备含5 (w/v) %右旋糖酐的LR, 然后将含5 (w/v) %右旋糖酐的LR与上述PG以9:1的比例混合而制备。

[0111] 4) 含5 (v/v) %PG和4.75 (w/v) %右旋糖酐的LR, 含2.5 (v/v) %PG和4.88 (w/v) %右旋糖酐的LR, 以及含1.25 (v/v) %PG和4.94 (w/v) %右旋糖酐的LR, 通过用上述“含5 (w/v) %右旋糖酐的LR”以2倍公比稀释上述“含10 (v/v) %PG和4.5 (w/v) %右旋糖酐的LR”而制备。

[0112] 5) 含10 (v/v) %PG和2.7 (w/v) %海藻糖的LR通过将0.5mL的上述PG与0.5mL的CellStore (注册商标) W (大塚制药工场社制) (即, 含3 (w/v) %海藻糖的乳酸林格氏液) 混合而制备。

[0113] 6) 含5 (v/v) %PG和2.85 (w/v) %海藻糖的LR, 含2.5 (v/v) %PG和2.925 (w/v) %海藻糖的LR, 以及含1.25 (v/v) %PG和2.9625 (w/v) %海藻糖的LR, 通过用CellStore W以2倍公比稀释上述“含10 (v/v) %PG和2.7 (w/v) %海藻糖的LR”而制备。

[0114] 7) 含10 (v/v) %PG、2.7 (w/v) %海藻糖和4.5 (w/v) %右旋糖酐的LR使用在前述研究1的3) 中制备的溶液。

[0115] 8) 含5 (v/v) %PG、2.85 (w/v) %海藻糖和4.75 (w/v) %右旋糖酐的LR, 含2.5 (v/v) %PG、2.925 (w/v) %海藻糖和4.875 (w/v) %右旋糖酐的LR, 以及含1.25 (v/v) %PG、2.9625 (w/v) %海藻糖和4.9375 (w/v) %右旋糖酐的LR, 通过用CellStore S以2倍公比稀释上述“含10 (v/v) %PG、2.7 (w/v) %海藻糖和4.5 (w/v) %右旋糖酐的LR”而制备。

[0116] [用于研究4的细胞冷冻保存液的制备]

[0117] 1) 含5 (v/v) %PG的4种基液(生理盐水[S]、林格氏液[R]、乙酸林格氏液[AR]和乳酸林格氏液[LR]) 通过将0.5mL的上述PG与9.5mL的4种基液(大塚生理盐注射液[大塚制药工场社制]、林格氏液“Otsuka”[大塚制药工场社制]、Veen F输液[扶桑药品工业社制]和Lactec注射液) 混合而制备。

[0118] 2) 含5 (v/v) %PG和4.75 (w/v) %右旋糖酐的S通过首先将500mg右旋糖酐40 (Mw=40000, 东京化成工业社制) 溶解在10mL的Lactec注射液中制备含5 (w/v) %右旋糖酐的LR, 然后将0.5mL的上述PG与9.5mL的上述“含5 (w/v) %右旋糖酐的LR”混合而制备。

[0119] 3) 含5 (v/v) %PG和4.75 (w/v) %右旋糖酐的R通过首先将500mg上述右旋糖酐40溶解在10mL的林格氏液“Otsuka”中制备含5 (w/v) %右旋糖酐的R, 然后将0.5mL的上述PG与9.5mL的含5 (w/v) %右旋糖酐的R混合而制备。

[0120] 4) 含5 (v/v) %PG和4.75 (w/v) %右旋糖酐的AR通过首先将500mg上述右旋糖酐40溶解在10mL Veen F输液中制备含5 (w/v) %右旋糖酐的AR, 然后将0.5mL的上述PG与9.5mL的含5 (w/v) %右旋糖酐的AR混合而制备。

[0121] 5) 含5 (v/v) %PG和4.75 (w/v) %右旋糖酐的LR通过首先将500mg上述右旋糖酐40溶解在10mL的Lactec注射液中制备含5 (w/v) %右旋糖酐的LR, 然后将0.5mL的上述PG与

9.5mL的含5(w/v) %右旋糖酐的LR混合而制备。

[0122] [用于研究5的细胞冷冻保存液的制备]

[0123] 1) 含10(v/v) %PG和4.5(w/v) %右旋糖酐的LR, 含5(v/v) %PG和4.75(w/v) %右旋糖酐的LR, 含2.5(v/v) %PG和4.88(w/v) %右旋糖酐的LR, 以及含1.25(v/v) %PG和4.94(w/v) %右旋糖酐的LR, 使用在上述[用于研究3的细胞冷冻保存液的制备]的3)和4)中制备的溶液。

[0124] 2) 含7.5(v/v) %PG和4.63(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含5(v/v) %PG和4.75(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述“含10(v/v) %PG和4.5(w/v) %右旋糖酐的LR”以1:1的比例混合而制备。

[0125] 3) 含3.75(v/v) %PG和4.81(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含2.5(v/v) %PG和4.88(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述“含5(v/v) %PG和4.75(w/v) %右旋糖酐的LR”以1:1的比例混合而制备。

[0126] 4) 含6.25(v/v) %PG和4.69(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含5(v/v) %PG和4.75(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述“含7.5(v/v) %PG和4.63(w/v) %右旋糖酐的LR”以1:1的比例混合而制。

[0127] 5) 含8.75(v/v) %PG和4.56(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含7.5(v/v) %PG和4.63(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述“含10(v/v) %PG和4.5(w/v) %右旋糖酐的LR”以1:1的比例混合而制备。

[0128] [用于研究6的细胞冷冻保存液的制备]

[0129] 1) 含4(v/v) %PG的LR通过将上述“含10(v/v) %PG的LR”与乳酸林格氏注射液以4:6的比例混合而制备。

[0130] 2) 含4(v/v) %PG和9.6(w/v) %右旋糖酐的LR通过首先将1g上述右旋糖酐40溶解在10mL的乳酸林格氏注射液中, 制备含10(w/v) %右旋糖酐的LR后, 将含10(w/v) %右旋糖酐的LR与上述PG以96:4的比例混合而制备。

[0131] 3) 含4(v/v) %PG和4.8(w/v) %右旋糖酐的LR, 含4(v/v) %PG和2.4(w/v) %右旋糖酐的LR, 以及含4(v/v) %PG和1.2(w/v) %右旋糖酐的LR, 通过用上述“含4(v/v) %PG的LR”以2倍公比稀释上述“含4(v/v) %PG和9.6(w/v) %右旋糖酐的LR”而制备。

[0132] 4) 含4(v/v) %PG和7.2(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含4(v/v) %PG和4.8(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述“含4(v/v) %PG和9.6(w/v) %右旋糖酐的LR”以1:1的比例混合而制备。

[0133] [用于研究7的细胞冷冻保存液的制备]

[0134] 1) 含10(v/v) %PG的LR使用在上述[用于研究3的细胞冷冻保存液的制备]的1)中制备的溶液。

[0135] 2) 含4(v/v) %PG的LR使用在上述[用于研究6的细胞冷冻保存液的制备]的1)中制备的溶液。

[0136] 3) 含10(v/v) %PG和4.5(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含5(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述PG以9:1的比例混合而制备。

[0137] 4) 含4(v/v) %PG和4.8(w/v) %右旋糖酐的LR通过将上述“含10(v/v) %PG和4.5(w/v) %右旋糖酐的LR”与上述“含5(w/v) %右旋糖酐的LR”以4:6的比例混合而制备。

[0138] 5) 含10 (v/v) % PG和4.5 % 羟乙基淀粉 (HES) 的LR通过首先将500mg HES (Mw=2220339[实测值]) (Fresenius Kabi Austria GmbH公司制) 溶解在10mL的乳酸林格氏注射液中, 制备含5 (w/v) % HES的LR后, 将含5 (w/v) % HES的LR与上述PG以9:1的比例混合而制备。

[0139] 6) 含4 (v/v) % PG和4.8 (w/v) % HES的LR通过将上述“含10 (v/v) % PG和4.5 (w/v) % HES的LR”与上述“含5 (w/v) % HES的LR”以4:6的比例混合而制备。

[0140] 7) 含10 (v/v) % PG和2.7 (w/v) % 海藻糖的LR使用在上述[用于研究3的细胞冷冻保存液的制备]的5) 中制备的溶液。

[0141] 8) 含4 (v/v) % PG和2.88 (w/v) % 海藻糖的LR通过将上述“含10 (v/v) % PG和2.7 (w/v) % 海藻糖的LR”与Cell Store W以4:6的比例混合而制备。

[0142] 9) 含10 (v/v) % PG、2.7 (w/v) % 海藻糖和4.5 (w/v) % 右旋糖酐的LR通过首先将500mg上述右旋糖酐40溶解在10mL的CellStore W中, 制备含5 (w/v) % 右旋糖酐的CellStore W后, 将含5 (w/v) % 右旋糖酐的CellStore W与上述PG以9:1的比例混合而制备。

[0143] 10) 含4 (v/v) % PG、2.88 (w/v) % 海藻糖和4.8 (w/v) % 右旋糖酐的LR通过将上述“含10 (v/v) % PG、2.7 (w/v) % 海藻糖和4.5 (w/v) % 右旋糖酐的LR”与上述“含5 (w/v) % 右旋糖酐的CellStore W”以4:6的比例混合而制备。

[0144] 11) 含10 (v/v) % PG、2.7 (w/v) % 海藻糖和4.5 (w/v) % HES的LR通过首先将500mg上述HES溶解在10mL的CellStore W中, 制备含5 (w/v) % HES的CellStore W后, 将含5 (w/v) % HES的CellStore W与上述PG以9:1的比例混合而制备。

[0145] 12) 含4 (v/v) % PG、2.88 (w/v) % 海藻糖和4.8 (w/v) % HES的LR通过将上述“含10 (v/v) % PG、2.7 (w/v) % 海藻糖和4.5 (w/v) % HES的LR”与上述“含5 (w/v) % HES的CellStore W”以4:6的比例混合而制备。

[0146] [用于研究8的细胞冷冻保存液的制备]

[0147] 1) 含2.5 (v/v) % PG的乳酸林格氏液 (LR) 通过将乳酸林格氏注射液和PG以39:1的比例混合而制备。

[0148] 2) 含2.5 (v/v) % PG和2.925 (w/v) % 海藻糖的LR通过将CellStore W和上述PG以39:1的比例混合而制备。

[0149] 3) 含2.5 (v/v) % PG、2.925 (w/v) % 海藻糖和4.875 (w/v) % 右旋糖酐的LR是通过将CellStore S和上述PG以39:1的比例混合而制备。

[0150] [用于研究9的细胞冷冻保存液的制备]

[0151] 1) 含4 (v/v) % PG的LR使用在上述[用于研究6的细胞冷冻保存液的制备]的1) 中制备的溶液。

[0152] 2) 含4 (v/v) % PG和1.44 (w/v) % 葡萄糖的LR通过首先将150mg的D(+) —葡萄糖(富士胶片和光纯药工业社制) 溶解在10mL的乳酸林格氏注射液中, 制备含有1.5 (w/v) % 葡萄糖的LR后, 将0.4mL的上述PG和9.6mL的含1.5 (w/v) % 葡萄糖的LR混合而制备。

[0153] 3) 含4 (v/v) % PG和1.44 (w/v) % 果糖的LR通过首先将150mg D(-) —果糖(富士胶片和光纯药工业社制) 溶解在10mL乳酸林格氏注射液中, 制备含1.5 (w/v) % 果糖的LR后, 将0.4mL的上述PG和9.6mL的含1.5 (w/v) % 果糖的LR混合而制备。

[0154] 4) 含4 (v/v) % PG和2.88 (w/v) % 海藻糖的LR通过首先将332mg海藻糖二水合物(富

士胶片和光纯药社制)溶解在10mL的乳酸林格氏注射的液中,制备含有3(w/v)%海藻糖的LR后,将0.4mL的上述PG和9.6mL的含3(w/v)%海藻糖的LR而制备。

[0155] 5) 含4(v/v)%PG和2.88%蔗糖的LR通过首先将300mg蔗糖(富士胶片和光纯药社制)溶解在10mL的乳酸林格氏注射液中,制备含有3%蔗糖的LR后,将0.4mL的上述PG和9.6mL的含3%蔗糖的LR而制备。

[0156] 6) 含4(v/v)%PG和2.88(w/v)%乳糖的LR通过首先将316mg乳糖一水合物(富士胶片和光纯药社制)溶解在10mL的乳酸林格氏注射液中,制备含3(w/v)%乳糖的LR后,将0.4mL上述PG和9.6mL的含3(w/v)%乳糖的LR而制备。

[0157] [用于研究10的细胞冷冻保存液的制备]

[0158] 1) 含4(v/v)%PG的LR使用在上述[用于研究6的细胞冷冻保存液的制备]的1)中制备的溶液。

[0159] 2) 含4(v/v)%PG和11.52(w/v)%海藻糖的LR通过首先将1.328g上述海藻糖二水合物溶解在10mL乳酸林格氏注射液中,制备含12(w/v)%海藻糖的LR后,将含12(w/v)%海藻糖的LR与上述PG以96:4的比例混合而制备。

[0160] 3) 含4(v/v)%PG和5.76(w/v)%海藻糖的LR,含4(v/v)%PG和2.88(w/v)%海藻糖的LR,含4(v/v)%PG和1.44(w/v)%海藻糖的LR,以及含4(v/v)%PG和0.72(w/v)%海藻糖的LR,通过用上述“含4(v/v)%PG的LR”以2倍公比稀释上述“含4(v/v)%PG和11.52(w/v)%海藻糖的LR”而制备。

[0161] [用于研究11的细胞冷冻保存液的制备]

[0162] 含4(v/v)%PG的3种基液(含血清培养液、含海藻糖的LR和LR)通过将含10%FBS(Gibco公司制)的MEM α (Gibco公司制)、CellStore W和乳酸林格氏注射液分别与上述PG以24:1的比例混合而制备。

[0163] [用于研究12~15的细胞冷冻保存液的制备]

[0164] 含2(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,含3(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,含4(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,含5(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,以及含7.5(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR,通过首先将CellStore S与上述PG以9:1的比例混合,制备含10(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR后,将CellStore S与“含10(v/v)%PG、2.7(w/v)%海藻糖和4.5(w/v)%右旋糖酐的LR”分别以4:1、7:3、3:2和1:1的比例混合而制备。

[0165] [hAD—MSC的培养(研究1~10)]

[0166] 人脂肪来源间充质干细胞(hAD—MSC)(Lonza Walkersville公司制)的培养按照Lonza Walkersville公司的人脂肪细胞来源干细胞培养操作手册进行。具体来说,在75cm²培养瓶中装入15mL的用培养基套装(PT—4505,ADSC BulletKit,Lonza Walkersville公司制)制备的培养基(以下称为“MSC培养基”),将hAD—MSC播种,在37°C、5%CO₂培养箱中培养。每3天或4天进行一次培养基更换。细胞以约90%汇合度(80~100%汇合度)时传代,将2~5次传代后的培养瓶用于以下“hAD—MSC的制备(研究1~10)”项目所记载的方法。

[0167] [hAD—MSC的制备(研究1~10)]

[0168] 按以下步骤[1]~[11]制备hAD—MSC。

- [0169] [1]将个人培养箱(PIC-100,亚速旺社制)设定为37°C,进行加温。
- [0170] [2]从CO₂培养箱中取出正在培养hAD-MS的75cm²培养瓶。
- [0171] [3]在显微镜下观察细胞状态,使用80%~100%汇合度的细胞。
- [0172] [4]将MSC培养基抽吸出,向每个75cm²培养瓶中添加8mL的PBS(-)(产品编号:14190-144,GIBCO公司制)。
- [0173] [5]在将PBS(-)抽吸出之后,向培养瓶中各添加4mL的胰蛋白酶/EDTA(产品代码:CC-5012,Lonza Walkersville公司制),在个人培养箱中在37±2°C条件下培养5分钟。
- [0174] [6]一边在显微镜下观察一边轻轻摇晃,直到约90%的细胞脱落。
- [0175] [7]各加入8mL的TNS(胰蛋白酶中和液,产品代码:CC-5002,Lonza Walkersville公司制),使胰蛋白酶反应停止,通过移液使细胞脱落,转移到50mL Proteosave(MS-52550,住友电木社制)中。
- [0176] [8]以210×g、5分钟,在室温下离心收集细胞。
- [0177] [9]将上清抽吸,悬浮到CellStore W中。
- [0178] [10]取20μL的细胞悬液,与20μL的0.4%台盼蓝(商品编号:15250-061,gibco公司制)混合,用细胞计数板(One Cell Counter,商品编号:OCC01,生物医疗科学公司制)计测细胞数(活细胞和死细胞)。计测的细胞数为使用One Cell Counter计测的一个区域的四角区域的细胞数。
- [0179] [11]按下式计算总细胞浓度。式:总细胞浓度(cells/mL)=(计测的总细胞数×10⁴)/4×2
- [0180] [hCD8阳性T细胞的培养(研究11和12)]
- [0181] 将1.5×10⁶个人CD8阳性T细胞(hCD8阳性T细胞)(STEMCELL Technologies公司制)播种到装有T淋巴细胞培养用培养液的培养瓶(产品名:TLY CULTURE套装25,TLY-FK25,GC淋巴技术公司制)中,在37°C、5%CO₂培养箱中开始培养。在培养后第3天,转移到8或10个25cm²的培养瓶中。之后,将培养后第9天的培养瓶用于以下的[hCD8阳性T细胞的制备(研究11和12)]项目中记载的方法。
- [0182] [hCD8阳性T细胞的制备(研究11和12)]
- [0183] 按以下的步骤[1]~[4]制备hCD8阳性T细胞。
- [0184] [1]将hCD8阳性T细胞从培养瓶转移到50mL Proteosave(MS-52550,住友电木社制)中。
- [0185] [2]以300×g、10分钟,在室温下离心收集细胞。
- [0186] [3]将上清抽吸出,悬浮到Lactec注射液中。
- [0187] [4]分离取出100μL的细胞悬液,使用Via2-Cassette(Chemometec公司制)采样,用Nucleo Counter(Chemometec公司制)测量总细胞数。
- [0188] [hCD8阳性T细胞和hCD4阳性T细胞的培养(研究13和14)]
- [0189] 将1.5×10⁶个人CD8阳性T细胞(hCD8阳性T细胞)(STEMCELL Technologies公司制)或人CD4阳性T细胞(hCD4阳性T细胞)(Lonza Walkersville公司制)分别播种到装有T淋巴细胞培养用培养液的培养瓶(产品名:TLY CULTURE套装25,TLY-FK25,GC淋巴技术公司制)中,在37°C、5%CO₂培养箱中开始培养。在培养后第3天,将hCD8阳性T细胞或hCD4阳性T细胞分别转移到3个75cm²培养瓶中。在培养后第7天和第9天,分别各将1个培养瓶用于以下

[hCD8阳性T细胞和hCD4阳性T细胞的制备(研究13和14)]项目所记载的方法。进而,在培养后第10天,从剩余的1个培养瓶中回收细胞,分成3个75cm²培养瓶,向每个培养瓶中加入10mL的T细胞培养基(产品名:X-VIVO15无血清淋巴细胞培养基,04-418Q,Lonza Walkersville公司制)。之后,将培养后第11天的3个培养瓶用于以下的[hCD8阳性T细胞和hCD4阳性T细胞的制备(研究13和14)]项目所记载的方法。

[0190] [hCD8阳性T细胞和hCD4阳性T细胞的制备(研究13和14)]

[0191] 按以下步骤[1]~[5]制备hCD8阳性T细胞。

[0192] [1]将hCD8阳性T细胞或hCD4阳性T细胞从培养瓶转移到50mL Proteosave (MS-52550,住友电木社制)中。

[0193] [2]以300×g、10分钟,在室温下离心收集细胞。

[0194] [3]将上清抽吸,悬浮到CellStore W中。

[0195] [4]取20μL细胞悬液,与20μL的0.4%台盼蓝(商品编号:15250-061,gibco公司制)混合,用细胞计数板(One Cell Counter,商品编号:0CC01,生物医疗科学公司制)计测细胞数(活细胞和死细胞)。计测的细胞数是使用One Cell Counter计测一个区域的四角区域的细胞数。

[0196] [5]按下式计算总细胞浓度。式:总细胞浓度(cells(细胞数)/mL) = (计测的总细胞数×10⁴)/4×2

[0197] [hCD34阳性造血干细胞的培养(研究15)]

[0198] 将含2×10⁴cells/mL脐带血来源人CD34阳性造血干细胞(hCD34阳性造血干细胞)(TaKaRa生物公司制)的造血前体细胞增殖培养液XF(TaKaRa生物公司制)播种到75cm²悬浮培养用培养瓶(产品名:Super Quality悬浮细胞培养用培养瓶75cm²带过滤盖,MS-2325RS,住友电木社制)中,在37℃、5%CO₂培养箱中开始培养。在培养后第2~3天,加入等量的造血前体细胞增殖培养液XF,再培养3天。1)将培养液转移到50mL的Proteosave (MS-52550,住友电木社制)中,以240×g、10分钟,在室温下离心收集细胞。2)将上清抽吸,加入新的造血前体细胞增殖培养液XF,使细胞悬浮后,播种到新的75cm²悬浮培养用培养瓶中。每2~3天重复上述1)和2)的操作,将第12天的培养瓶用于以下的[hCD34阳性造血干细胞的制备(研究15)]项目所记载的方法。

[0199] [hCD34阳性造血干细胞的制备(研究15)]

[0200] 按以下步骤[1]~[4]制备hCD34阳性造血干细胞。

[0201] [1]将hCD34阳性造血干细胞从培养瓶转移到50mL的Proteosave (MS-52550,住友电木社制)中。

[0202] [2]以240×g、10分钟,在室温下离心收集细胞。

[0203] [3]将上清抽吸,悬浮到Lactec注射液中。

[0204] [4]取100μL细胞悬液,使用Via2-Cassette (Chemometec公司制)采样,用Nucleo Counter (Chemometec公司制)测量总细胞数。

[0205] [哺乳动物细胞的冷冻保存]

[0206] 按以下的步骤[1]~[4]对4种哺乳动物细胞(hAD-MSc、hCD8阳性T细胞、hCD4阳性T细胞和hCD34阳性造血干细胞)进行冷冻保存。

[0207] [1]将悬浮在CellStore W或Lactec注射液中的各种哺乳动物细胞转移到15mL的

Stemfull (品号MS-90150, 尺寸15mL, 住友电木株式会社) 中。

[0208] [2] 离心处理 (hAD-MSC的情况, 210×g、5分钟、室温; hCD8阳性T细胞和hCD4阳性T细胞的情况, 300×g、10分钟、室温; hCD34阳性造血干细胞的情况, 240×g、10分钟、室温), 将上清抽吸出。

[0209] [3] 用各种细胞冷冻保存液将各种哺乳动物细胞再次悬浮, 以成为 1.0×10^6 cells/mL, 每1mL装入到小瓶 (Nunc CryoTube Vials, 品号375418, 尺寸1.8mL, Thermo Fisher Scientific公司制) 中。

[0210] [4] 将小瓶放入Bicell (冷冻处理容器) (日本冷冻机社制) 中, 在-80°C的冷冻机中保存到第二天, 然后将小瓶从Bicell转移到试样盒中, 转移到液氮罐 (Thermo Line Locator Plus液氮冷冻保存容器类型509, CS509X21A-70, 东荣社制) 中, 保存任意的期间。

[0211] [冷冻融解后的细胞的试样制备]

[0212] 按以下步骤[1]~[6]制备评价冷冻融解后的4种哺乳动物细胞 (hAD-MSC、hCD8阳性T细胞、hCD4阳性T细胞和hCD34阳性造血干细胞) 的存活率的试样。

[0213] [1] 将恒温槽 (水浴) 设定为37°C, 进行加温。

[0214] [2] 从液氮罐将装有冷冻的包含各种哺乳动物细胞的各种细胞冷冻保存液的小瓶取出, 移动到装有干冰的容器中。

[0215] [3] 将小瓶快速转移到设定为37°C的恒温水浴中, 一边轻轻搅拌一边溶解直到稍稍留有冰晶的状态。

[0216] [4] 快速除去小瓶表面的水后, 用70%乙醇擦拭, 转移到安全柜中。

[0217] [5] 在解冻后, 在将吸头尖端插入到从底部目视约5mm的位置的状态下, 进行悬浮 (使用1mL移液管, 用500μL液量缓缓移液5次)。

[0218] [6] 分别取50μL和20μL的用于膜联蛋白V阳性率评价用细胞悬液和台盼蓝染色用细胞悬液, 分取100μL的Nucleo Counter分析用细胞悬液, 分取800μL的hCD34阳性造血干细胞悬液作为CD34阳性率的评价用。另外, 为了实施研究11和12, 将所分取的细胞悬液在室温下振荡保存 (100rpm, 25mm)。

[0219] [[冷冻融解后哺乳动物细胞的膜联蛋白V阳性率]

[0220] 按以下的步骤[1]~[6], 对冷冻融解后的4种哺乳动物细胞 (hAD-MSC、hCD8阳性T细胞、hCD4阳性T细胞和hCD34阳性造血干细胞) 的膜联蛋白V阳性率进行评价。

[0221] [1] 将随附于凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC Kit, nacalai tesque公司制) 的膜联蛋白结合缓冲液 (Annexin Binding Buffer) (×10) 用大塚蒸馏水稀释10倍, 配制膜联蛋白V染色用液, 并进行冰冷处理。

[0222] [2] 将100μL氯化钙校正液 (1mEq/mL) 用900μL大塚蒸馏水稀释10倍, 调整为氯化钙稀释液。

[0223] [3] 将所分取的膜联蛋白V阳性率评价用细胞悬液50μL分取到圆底管中。

[0224] [4] 向各细胞悬液中添加3μL氯化钙稀释液, 以使钙离子浓度成为1.5mM以上。

[0225] [5] 添加1μL的Annexin V-FITC并混合, 在冰上避光处进行15分钟染色。

[0226] [6] 在染色后, 添加400μL的膜联蛋白V染色用液, 经由细胞过滤器转移到圆底标准管中, 迅速使用流式细胞仪 (Gallios, Beckman Coulter公司制) 评价膜联蛋白V阳性率。使用Kaluzza分析软件 (版本1.5a, Beckman Coulter公司制) 分析和计算膜联蛋白V阳性率。

[0227] [台盼蓝染色(研究2、4~10、13和14)]

[0228] 将所分取的台盼蓝染色用细胞悬液20 μ L与台盼蓝染色液20 μ L混合,使用光学显微镜(ECLIPSE TS100,尼康公司社制,和OLYMPUS CKX53,奥林巴斯公司制),通过One Cell Counter分别测量总细胞数和死细胞数。然后,将这些测量值分别输入到式子(细胞存活率(%))=[总细胞数-死细胞数]/总细胞数 \times 100)和式子(存活细胞回收率(%))=冷冻后各时间点1mL中的活细胞数/冷冻前1mL中的活细胞数 \times 100)中,计算细胞存活率和存活细胞回收率。

[0229] [Nucleo Counter分析(研究11、12和15)]

[0230] 将分取的Nucleo Counter分析用细胞悬液100 μ L用Via2-Cassette (Chemometec公司制)采样,用Nucleo Counter (Chemometec公司制)分别测量总细胞数和死细胞数。然后,将这些测量值分别代入公式(细胞存活率(%))=[总细胞数-死细胞数]/总细胞数 \times 100)和公式(存活细胞回收率(%))=冷冻后各时间点1mL中的活细胞数/冷冻前1mL中的活细胞数 \times 100),计算细胞存活率和存活细胞回收率。

[0231] [冷冻融解后hAD-MSc的细胞增殖能力]

[0232] 将刚冷冻融解后的hAD-MSc以 5.6×10^3 细胞/ cm^2 (5.0×10^4 细胞/ 9cm^2 /孔)的密度播种到6孔板中,使用MSc培养基培养。培养基更换在播种后24小时内和之后的第3~4天进行。从播种起第1天、第3天、第5天和第7天,将培养后的hAD-MSc的6孔板用PBS(-)清洗,用胰蛋白酶/EDTA进行酶处理,用TNS使胰蛋白酶反应停止,用One Cell Counter计测再培养后的细胞数,评价冷冻融解后hAD-MSc的细胞增殖能力。

[0233] [hCD34阳性造血干细胞的CD34阳性率评价]

[0234] 按以下步骤[1]~[9],对冷冻融解后的hCD34阳性造血干细胞的CD34阳性率进行评价。

[0235] [1]将800 μ L的hCD34阳性造血干细胞悬液分为500 μ L(染色用试样)和300 μ L(对照用试样),分取到1.5mL的Proteosave (MS4265M,住友电木社制)中。

[0236] [2]进行离心处理(240 \times g、10分钟、室温),抽吸出上清。

[0237] [3]向染色用试样和对照用试样中分别添加49 μ L和30 μ L的染色缓冲液(FBS),进行悬浮。

[0238] [4]向染色用试样中添加1 μ L的PE-CD34抗体(Milteny公司制)并混合。

[0239] [5]在冷冻机中避光培养10分钟(抗原抗体反应)。

[0240] [6]向染色用试样和对照用试样中分别加入1mL的染色缓冲液(FBS),进行离心处理(240 \times g、10分钟、4 $^{\circ}$ C)。

[0241] [7]抽吸出上清后,向染色用试样和对照用试样中分别加入1mL的染色缓冲液(FBS),进行离心处理(240 \times g、10分钟、4 $^{\circ}$ C)。

[0242] [8]抽吸出上清后,加入500 μ L的染色缓冲液(FBS),使细胞悬浮,通过细胞过滤器转移到圆底标准管中。

[0243] [9]使用流式细胞仪(Gallios,Beckman Coulter公司制)检测PE来源的荧光信号为阳性的细胞(即hCD34阳性造血干细胞),使用分析软件Kaluzza(版本1.5a,Beckman Coulter公司制),计算CD34阳性细胞相对于总细胞数的比例(CD34阳性率)后,计算设冷冻保存前的细胞的CD34阳性率为1时的相对值(图19B的纵轴的值)。

[0244] [计算方法和统计处理]

[0245] 求出各组的平均值±标准偏差。统计分析使用SAS 9.4 (EXSUS版本10.0) 进行。根据需要,进行学生t检验、邓内特检验和图基检验,将显著性水平小于5%判定为显著。

[0246] 2. 结果

[0247] 2-1研究1

[0248] 为了研究在含DMSO的细胞冷冻保存液中冷冻保存哺乳动物细胞的情况与在含PG的细胞冷冻保存液中冷冻保存哺乳动物细胞的情况之间,在冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力上是否存在差异,将hAD-MSc分别冷冻保存在含1.25~10% DMSO的基液(含2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中和含1.25~10% PG的上述基液中,将冷冻融解后的hAD-MSc培养1~7天,分析细胞数的随时间的变化。

[0249] 结果,在培养第5天以后,对于冷冻保存在含1.25~10% DMSO的细胞冷冻保存液中的hAD-MSc,未确认因DMSO浓度的不同导致在细胞增殖效率上有差异(图1A和表1)。另一方面,冷冻保存在含2.5~5% PG的细胞冷冻保存液中的hAD-MSc与冷冻保存在含10% PG的细胞冷冻保存液中的hAD-MSc相比,显示出显著更有效率地进行增殖(图1B和表1)。此外,冷冻保存在含2.5~5% PG的细胞冷冻保存液中的hAD-MSc与冷冻保存在含2.5~5% DMSO的细胞冷冻保存液中的hAD-MSc相比,显示出显著更有效率地进行增殖(图2B和图2C)。

[0250] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%以外浓度的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况或将哺乳动物细胞冷冻保存在含DMSO、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力。

[0251] [表1]

细胞冷冻保存液	细胞数 ($\times 10^4$ 细胞数/孔)				
	刚冷冻融解后	冷冻融解后			
		第1天	第3天	第5天	第7天
基液 (含海藻糖和右旋糖酐的 LR)					
[0252] 1.25% DMSO	5.2±0.0	4.2±0.9	12.8±1.4	25.6±2.0	25.3±0.5
2.5% DMSO	5.1±0.2	6.0±0.4	17.8±2.6	22.6±1.7	24.1±1.5
5% DMSO	5.1±0.2	6.0±0.1	16.7±0.4	23.5±0.9	22.4±2.3
10% DMSO	5.1±0.3	6.3±0.8	16.4±0.8	22.4±3.2	23.8±1.0
1.25% PG	5.1±0.1	2.3±0.5	11.0±2.8	23.5±4.6	26.2±3.7
2.5% PG	5.2±0.0	5.1±0.4	16.5±1.2	39.9±3.4	42.8±3.1
5% PG	5.0±0.1	5.6±1.0	18.4±0.9	41.9±5.7	43.5±4.8
10% PG	5.0±0.2	5.1±1.3	15.9±3.1	24.8±1.6	27.0±3.1

[0253] 基于表1的结果制作了图1。

[0254] 2-2研究2

[0255] 为了比较研究作为含2.5~5% PG的细胞冷冻保存液的基液使用含海藻糖和右旋糖酐的LR的效果与含DMSO的细胞冷冻保存液的效果,将hAD-MSc冷冻保存在含4% PG或4% DMSO的含海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液(含4% PG、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR,以及含4% DMSO、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR)中,分析了刚冷冻融解后的hAD-MSc的细胞存活率和存活细胞回收率、以及冷冻融解后的细胞增殖能力。另外,作为比

较对照,也同样分析了未冷冻保存的hAD—MSC的细胞增殖能力。

[0256] 结果表明,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率在将hAD—MSC冷冻保存哪种细胞冷冻保存液中的情况下都较高(表2)。

[0257] [表2]

	细胞冷冻保存液	冷冻保存前	刚冷冻融解后
	基液(含海藻糖及右旋糖酐的LR)		
	细胞存活率(%)		
[0258]	4%PG	98.8±0.7	94.7±1.7
	4%DMSO		96.1±1.8
	存活细胞回收率(%)		
	4%PG	100.0	94.5±5.5
	4%DMSO		95.5±6.4

[0259] 此外,将冷冻融解后的hAD—MSC培养1~7天,分析细胞数的随时间的变化,结果表明,冷冻保存在含4%PG的含海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液(含4%PG、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR)中的hAD—MSC,与未冷冻保存的hAD—MSC相比,以同等或更高效率进行增殖(图3和表3)。另一方面,冷冻保存在含4%DMSO的含海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液(含4%DMSO、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR)中的hAD—MSC,与未冷冻保存的hAD—MSC相比,从培养第3天后起增殖水平显著下降(图3和表3)。

[0260] 这些结果表明,含4%PG的细胞冷冻保存液和含4%DMSO的细胞冷冻保存液虽然都以相同水平发挥抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡的效果,但在提高冷冻融解后的哺乳动物细胞增殖能力的效果方面,含4%PG的细胞冷冻保存液更高。

[0261] [表3]

	细胞数($\times 10^4$ 细胞数/孔)				
	第0天	第1天	第3天	第5天	第7天
—	5.0±0.3	6.7±1.0	22.9±1.6	37.0±2.9	45.6±2.4
[0262] 细胞冷冻保存液(刚冷冻融解后)					
	基液(含海藻糖及右旋糖酐的LR)				
	4%PG	5.5±0.9	20.8±2.7	43.5±6.9	47.6±5.7
	4%DMSO	6.1±1.0	19.1±2.3	28.8±2.7	28.3±2.3

[0263] 基于表3的结果制作了图3。

[0264] 2—3研究3

[0265] 为了研究将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%PG的细胞冷冻保存液中的情况与将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%以外浓度PG的细胞冷冻保存液中的情况之间,在冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力上是否存在差异,将hAD—MSC冷冻保存在含1.25~10%PG的4种基液(LR;含右旋糖酐的LR;含海藻糖的LR;以及含海藻糖和右旋糖酐的LR)中,将冷冻融解后的hAD—MSC培养1~7天,分析细胞数的随时间的变化。

[0266] 结果表明,与研究1的结果同样,无论使用哪种基液,冷冻保存在含2.5~5%PG的细胞冷冻保存液中的hAD—MSC与冷冻保存在含10%PG的细胞冷冻保存液中的hAD—MSC相比都更有效率地进行增殖(图4和表4)。特别是在使用3种基液(含右旋糖酐的LR;含海藻糖的LR;以及含海藻糖和右旋糖酐的LR)的情况下,hAD—MSC的细胞增殖能力显著变高(图4B

~图4D和表4)。

[0267] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%PG的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%以外浓度PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力。

[0268] [表4]

细胞冷冻保存液	细胞数 ($\times 10^4$ 细胞数/孔)				
	刚冷冻融解后	冷冻融解后			
		第1天	第3天	第5天	第7天
基液 (LR)					
1.25% PG	5.0 \pm 0.5	0.9 \pm 0.7	4.5 \pm 3.3	18.8 \pm 13.0	20.4 \pm 9.2
2.5% PG	5.2 \pm 0.4	3.0 \pm 0.8	11.9 \pm 2.2	33.3 \pm 7.3	38.9 \pm 2.4
5% PG	5.3 \pm 0.3	3.3 \pm 0.7	16.1 \pm 0.7	35.2 \pm 3.0	39.6 \pm 4.1
10% PG	5.5 \pm 0.3	3.4 \pm 0.5	15.2 \pm 1.6	29.9 \pm 1.2	30.7 \pm 2.3
基液 (含右旋糖酐的 LR)					
1.25% PG	5.3 \pm 0.3	1.8 \pm 0.5	9.5 \pm 5.3	27.3 \pm 8.1	33.2 \pm 3.3
2.5% PG	5.5 \pm 0.2	3.8 \pm 0.5	16.5 \pm 0.3	45.5 \pm 3.5	46.8 \pm 6.3
5% PG	5.1 \pm 0.3	3.9 \pm 0.3	19.2 \pm 2.9	41.6 \pm 2.2	46.4 \pm 3.2
10% PG	5.3 \pm 0.3	4.1 \pm 0.5	18.2 \pm 3.2	33.8 \pm 1.7	32.3 \pm 0.4
基液 (含海藻糖的 LR)					
1.25% PG	4.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	5.1 \pm 1.0	18.9 \pm 4.7	24.7 \pm 1.7
2.5% PG	5.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.8	7.9 \pm 1.4	27.3 \pm 4.6	31.3 \pm 2.3
5% PG	5.1 \pm 0.1	3.6 \pm 0.6	12.8 \pm 2.0	33.1 \pm 4.0	35.3 \pm 3.4
10% PG	5.0 \pm 0.1	3.6 \pm 0.5	14.4 \pm 0.6	22.2 \pm 1.1	24.1 \pm 1.7
基液 (含海藻糖及右旋糖酐的 LR)					
1.25% PG	5.2 \pm 0.2	2.4 \pm 1.1	11.2 \pm 1.2	28.3 \pm 3.3	30.6 \pm 2.8
2.5% PG	5.3 \pm 0.0	4.7 \pm 0.6	15.7 \pm 0.7	39.3 \pm 3.5	40.7 \pm 4.2
5% PG	5.1 \pm 0.1	5.4 \pm 0.5	19.0 \pm 0.5	38.0 \pm 5.4	42.6 \pm 4.0
10% PG	4.9 \pm 0.2	3.9 \pm 0.4	13.6 \pm 1.7	24.6 \pm 2.0	26.9 \pm 0.7

[0270] 基于表4的结果制作了图4。

[0271] 2—4研究4

[0272] 为了研究含PG的细胞冷冻保存液的基液,将hAD—MSC冷冻保存在8种细胞冷冻保存液(含5%PG的4种基液[生理盐水、林格氏液、乙酸林格氏液和乳酸林格氏液],以及含5%PG和4.75%右旋糖酐的上述4种基液)中,分析了刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率、膜联蛋白V阳性率和细胞增殖能力。

[0273] 结果,在hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率的所有测量结果中,在使用含5%PG的细胞冷冻保存液和含5%PG及4.75%右旋糖酐的细胞冷冻保存液的情况下,上述4种基液之间均未见显著的差异(图5和表5)。此外,使用含5%PG及4.75%右旋糖酐的细胞冷冻保存液的情况的hAD—MSC的细胞存活率,在上述4种基液中均高于使用含5%PG的细胞冷冻保存液的情况的细胞存活率,特别是使用林格氏液和乙酸林格氏液作为基液时显著更高(图5A和表5)。hAD—MSC的存活细胞回收率也显示类似趋势,特别是在使用乙酸林格氏液作为基液的情况下显著更高(图5B和表5)。另一方面,使用含5%PG及4.75%右旋糖酐的细胞冷冻保存液的情况的hAD—MSC的膜联蛋白V阳性率,在上述4种基液中均比使用含5%PG的细胞冷冻保存液的情况低(图5C和表5)。

[0274] 这些结果表明,将PG与右旋糖酐并用的情况的效果(即,抑制哺乳动物细胞的因冷

冻融解发生的细胞死亡的效果)与细胞冷冻保存液的基液种类无关而发挥。

[0275] [表5]

细胞冷冻保存液	刚冷冻融解后 细胞存活率 (%)
PG/S	81.7±11.4
PG/R	79.9±7.2
PG/AR	66.6±12.3
PG/LR	77.5±16.7
PG+D/S	91.9±5.2
PG+D/R	96.0±1.0
PG+D/AR	92.7±0.9
PG+D/LR	94.1±1.7
	存活细胞回收率 (%)
PG/S	88.6±13.8
PG/R	72.1±11.1
PG/AR	71.6±9.3
PG/LR	86.1±15.2
PG+D/S	96.2±6.3
PG+D/R	85.4±9.7
PG+D/AR	100.9±7.1
PG+D/LR	104.0±8.3
	膜联蛋白 V 阳性率 (%)
PG/S	24.2±7.6
PG/R	30.9±9.7
PG/AR	29.6±13.2
PG/LR	25.3±7.4
PG+D/S	12.6±0.9
PG+D/R	16.5±4.8
PG+D/AR	15.6±3.5
PG+D/LR	14.7±6.2

[0277] 基于表5的结果制作了图5。

[0278] 此外,将冷冻融解后的hAD—MSC培养1~7天,分析细胞数的随时间的变化,结果表明,冷冻保存在含5%PG及4.75%右旋糖酐的上述4种基液中的hAD—MSC,与冷冻保存在含5%PG的上述4种基液中的hAD—MSC相比,效率更高地进行增殖(图6和表6)。

[0279] 这一结果表明,将PG与右旋糖酐并用时的效果(即,提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力的效果)与细胞冷冻保存液的基液种类无关而发挥。

[0280] [表6]

	细胞冷冻保存液	细胞数 ($\times 10^4$ 细胞数/孔)				
		刚冷冻融解后	冷冻融解后			
			第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
	PG/S	4.7 \pm 0.3	4.3 \pm 1.4	18.3 \pm 4.4	32.1 \pm 1.3	33.6 \pm 6.0
	PG/R	5.1 \pm 0.5	4.1 \pm 1.7	13.6 \pm 3.3	27.9 \pm 2.5	30.9 \pm 3.9
[0281]	PG/AR	4.9 \pm 0.5	3.4 \pm 1.2	12.9 \pm 5.5	28.8 \pm 3.4	30.9 \pm 1.6
	PG/LR	5.3 \pm 0.4	3.9 \pm 0.6	14.2 \pm 3.1	30.1 \pm 7.6	30.9 \pm 3.3
	PG+D/S	5.0 \pm 0.4	4.7 \pm 1.2	21.2 \pm 0.6	36.3 \pm 2.4	39.6 \pm 1.8
	PG+D/R	4.9 \pm 0.7	4.1 \pm 0.9	17.6 \pm 1.9	35.8 \pm 4.8	34.8 \pm 1.2
	PG+D/AR	5.2 \pm 0.3	5.4 \pm 1.2	18.3 \pm 5.0	36.8 \pm 9.7	35.5 \pm 3.4
	PG+D/LR	4.9 \pm 0.6	4.2 \pm 0.8	18.3 \pm 2.6	34.0 \pm 2.2	38.6 \pm 3.8

[0282] 根据表6的结果,制作了图6。

[0283] 2—5研究5

[0284] 为了分析含PG的细胞冷冻保存液中PG的最优的浓度,将hAD—MSC冷冻保存在8种细胞冷冻保存液(含1.25%PG和4.94%右旋糖酐的LR;含2.5%PG和4.88%右旋糖酐的LR;含3.75%PG和4.81%右旋糖酐的LR;含5%PG和4.75%右旋糖酐的LR;含6.25%PG和4.69%右旋糖酐的LR;含7.5%PG和4.63%右旋糖酐的LR;含8.75%PG和4.56%右旋糖酐的LR;以及含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR)中,分析了刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率,以及冷冻融解后的细胞增殖能力。

[0285] 结果表明,如果将hAD—MSC冷冻保存在含2.5~8.75%PG的6种细胞冷冻保存液(含2.5%PG和4.88%右旋糖酐的LR;含3.75%PG和4.81%右旋糖酐的LR;含5%PG和4.75%右旋糖酐的LR;含6.25%PG和4.69%右旋糖酐的LR;含7.5%PG和4.63%右旋糖酐的LR;以及含8.75%PG和4.56%右旋糖酐的LR)中,则与将hAD—MSC冷冻保存在含1.25%PG的细胞冷冻保存液(含1.25%PG和4.94%右旋糖酐的LR)或含10%PG的细胞冷冻保存液(含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR)中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率更高,特别是当细胞冷冻保存液中PG的浓度为2.5~6.25%时,细胞存活率显著更高(图7A和7B,表7)。

[0286] 此外,如果将hAD—MSC冷冻保存在含2.5~8.75%PG的上述6种细胞冷冻保存液中,则与将hAD—MSC冷冻保存在含1.25%PG的细胞冷冻保存液或含10%PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的膜联蛋白V阳性率更低,特别是当细胞冷冻保存液中PG的浓度为2.5~6.25%时显著更低(图7C,表7)。

[0287] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~8.75%(特别是2.5~6.25%)PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~8.75%(特别是2.5~6.25%)以外浓度的PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡。

[0288] [表7]

PG+D 中的 PG 浓度	刚冷冻融解后
	细胞存活率 (%)
1.25%	77.6±6.4
2.50%	93.1±2.8
3.75%	93.9±3.2
5.00%	94.1±2.3
6.25%	92.2±3.1
7.50%	91.8±2.5
8.75%	89.8±3.2
10.0%	85.1±0.7
	存活细胞回收率 (%)
1.25%	81.8±10.7
2.50%	101.4±3.1
[0289] 3.75%	100.4±3.5
5.00%	96.2±6.7
6.25%	92.5±7.7
7.50%	93.5±4.7
8.75%	89.8±10.5
10.0%	91.6±7.8
	膜联蛋白 V 阳性率 (%)
1.25%	70.4±5.9
2.50%	17.0±3.9
3.75%	13.3±2.6
5.00%	14.0±2.2
6.25%	14.2±3.0
7.50%	15.8±2.3
8.75%	18.5±3.8
10.0%	22.6±3.5

[0290] 根据表7的结果,制作了图7。

[0291] 此外,将冷冻融解后的hAD—MSC培养1~7天,分析细胞数的随时间的变化,结果表明,在培养第5天以后,冷冻保存在含2.5~7.5%PG的5种细胞冷冻保存液(含2.5%PG和4.88%右旋糖酐的LR;含3.75%PG和4.81%右旋糖酐的LR;含5%PG和4.75%右旋糖酐的LR;含6.25%PG和4.69%右旋糖酐的LR;以及含7.5%PG和4.63%右旋糖酐的LR)中的hAD—MSC,与冷冻保存在含10%PG的细胞冷冻保存液(含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR)中的hAD—MSC相比,效率更高地进行增殖,特别是当细胞冷冻保存液中PG的浓度为2.5~5%时更显著地进行增殖(图8和表8)。

[0292] 这一结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,与则将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%以外浓度的PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力。

[0293] [表8]

PG+D 中的 PG 浓度 (%)	细胞数 ($\times 10^4$ 细胞数/孔)				
	刚冷冻融解后	冷冻融解后			
		第 1 日	第 3 日	第 5 日	第 7 日
[0294] 1.25%	4.9 \pm 0.5	1.4 \pm 0.4	10.5 \pm 3.9	30.3 \pm 10.7	40.1 \pm 8.4
2.50%	5.1 \pm 0.6	4.2 \pm 1.2	18.3 \pm 3.0	44.8 \pm 5.5	53.8 \pm 4.7
3.75%	4.8 \pm 0.3	4.3 \pm 1.2	19.3 \pm 1.6	51.0 \pm 6.5	56.1 \pm 8.4
5.00%	4.8 \pm 0.4	3.9 \pm 0.8	20.0 \pm 2.2	50.4 \pm 1.4	51.6 \pm 1.3
6.25%	4.8 \pm 0.2	4.7 \pm 0.7	18.6 \pm 3.3	41.3 \pm 2.8	43.3 \pm 4.1
7.50%	4.8 \pm 0.2	4.2 \pm 0.8	19.5 \pm 2.4	39.5 \pm 2.4	41.8 \pm 3.8
8.75%	4.7 \pm 0.5	4.4 \pm 0.8	17.6 \pm 0.6	36.1 \pm 1.7	37.8 \pm 1.4
10.0%	4.9 \pm 0.1	3.8 \pm 0.6	15.1 \pm 1.4	34.8 \pm 1.5	37.9 \pm 5.2

[0295] 根据表8的结果,制作了图8。

[0296] 2—6研究6

[0297] 为了研究含2.5~5%PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的右旋糖酐的最优的浓度,将hAD—MSC冷冻保存在6种细胞冷冻保存液(含4%PG的LR;含4%PG和1.2%右旋糖酐的LR;含4%PG和2.4%右旋糖酐的LR;含4%PG和4.8%右旋糖酐的LR;含4%PG和7.2%右旋糖酐的LR;以及含4%PG和9.6%右旋糖酐的LR)中,分析了刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率。

[0298] 结果表明,如果将hAD—MSC冷冻保存在含4%PG和1.2~9.6%右旋糖酐的细胞冷冻保存液(含4%PG和1.2%右旋糖酐的LR;含4%PG和2.4%右旋糖酐的LR;含4%PG和4.8%右旋糖酐的LR;含4%PG和7.2%右旋糖酐的LR;以及含4%PG和9.6%右旋糖酐的LR)中,则与将hAD—MSC冷冻保存在不含右旋糖酐的含有4%PG的细胞冷冻保存液(含4%PG的LR)中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率更高,特别是当细胞冷冻保存液中的右旋糖酐的浓度为1.2~9.6%时,细胞存活率显著更高,此外当细胞冷冻保存液中的右旋糖酐的浓度为2.4~9.6%时,存活细胞回收率显著更高(图9A和图9B,表9)。

[0299] 此外,如果将hAD—MSC冷冻保存在含4%PG和1.2~9.6%右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将hAD—MSC冷冻保存在不含右旋糖酐的含有4%PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的膜联蛋白V阳性率更低,特别是当细胞冷冻保存液中的右旋糖酐的浓度为4.8~9.6%时显著更低(图9A和图9B,表9)。

[0300] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%PG和至少1.2%(特别是至少2.4% [例如,2.4~9.6%,4.8~9.6%])右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在不含右旋糖酐的含2.5~5%PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡。

[0301] [表9]

	细胞冷冻保存液 (4%PG + D 中 D 的浓度)	刚冷冻融解后
		细胞存活率 (%)
	0.0%	73.7±9.2
	1.2%	85.7±5.1
	2.4%	91.5±3.5
	4.8%	95.6±1.5
	7.2%	95.8±0.8
	9.6%	96.2±0.4
		存活细胞回收率 (%)
[0302]	0.0%	61.3±10.9
	1.2%	76.4±6.6
	2.4%	90.6±9.9
	4.8%	99.4±5.3
	7.2%	98.7±9.2
	9.6%	96.4±8.0
		膜联蛋白 V 阳性率 (%)
	0.0%	27.8±3.7
	1.2%	26.5±3.2
	2.4%	23.7±3.8
	4.8%	19.1±2.9
	7.2%	15.3±3.8
	9.6%	14.9±3.5

[0303] 根据表9的结果,制作了图9。

[0304] 2—7研究7

[0305] 为了研究作为右旋糖酐以外的高分子化合物而将HES与PG并用的情况下是否也能发挥与并用右旋糖酐和PG时同样的效果,将hAD—MSC冷冻保存在6种细胞冷冻保存液(含4%PG的LR;含10%PG的LR;含4%PG和4.8%右旋糖酐的LR;含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR;含4%PG和4.8%HES的LR;以及含10%PG和4.5%HES的LR)中,分析了刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率。

[0306] 结果表明,如果将hAD—MSC冷冻保存在含PG和HES的细胞冷冻保存液(含4%PG和4.8%HES的LR;以及含10%PG和4.5%HES的LR)中,则与将hAD—MSC冷冻保存在含PG和右旋糖酐的细胞冷冻保存液(含4%PG和4.8%右旋糖酐的LR;以及含10%PG和4.5%右旋糖酐的LR)中的情况同样,与将hAD—MSC冷冻保存在只含PG的细胞冷冻保存液(含4%PG的LR;和含10%PG的LR)中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率更高,此外膜联蛋白V阳性率更低(图10和表10)。同样,当含PG和HES的细胞冷冻保存液中的PG的浓度为4%时,与PG浓度为10%时相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率更高,此外膜联蛋白V阳性率更低(图10和表10)。

[0307] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含PG和HES(与右旋糖酐相似的高分子化合物)的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含PG和右旋糖酐的细

胞冷冻保存液中的情况同样,能够有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡。

[0308] [表10]

细胞冷冻保存液	刚冷冻融解后 细胞存活率 (%)
4% PG	78.4±16.9
10% PG	70.1±3.8
4% PG + D	92.3±2.8
10% PG + D	86.0±7.8
4% PG + HES	95.3±1.3
10% PG + HES	84.3±5.5
	存活细胞回收率 (%)
4% PG	74.5±14.9
10% PG	67.2±2.0
[0309] 4% PG + D	87.4±8.3
10% PG + D	82.6±7.0
4% PG + HES	89.3±1.6
10% PG + HES	73.4±7.0
	膜联蛋白 V 阳性率 (%)
4% PG	35.7±8.6
10% PG	43.4±2.9
4% PG + D	18.4±0.9
10% PG + D	41.3±8.2
4% PG + HES	18.2±2.6
10% PG + HES	39.8±7.6

[0310] 根据表10的结果,制作了图10。

[0311] 此外,将冷冻融解后的hAD—MSC培养1~7天,分析细胞数的随时间的变化,结果表明,与使用含海藻糖的上述6种细胞冷冻保存液,即含4%PG和2.88%海藻糖的LR,含10%PG和2.7%海藻糖的LR,含4%PG、2.88%海藻糖和4.8%右旋糖酐的LR,含10%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR,含4%PG、2.88%海藻糖和4.8%HES的LR,以及含10%PG、2.7%海藻糖和4.5%HES的LR进行分析的情况同样,也确认了HES与PG的并用效果(图11和表11)。

[0312] 这些结果表明,将PG与高分子化合物(右旋糖酐、HES等)并用的情况的效果(即,提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力的效果)在并用海藻糖的情况下也能发挥。

[0313] [表11]

	细胞冷冻保存液	刚冷冻融解后 细胞存活率 (%)
	4% PG + Tre	81.6±6.9
	10% PG + Tre	64.9±9.0
	4% PG + Tre + D	91.9±3.2
	10% PG + Tre + D	85.9±4.2
	4% PG + Tre + HES	90.8±7.0
	10% PG + Tre + HES	87.1±3.0
		存活细胞回收率 (%)
	4% PG + Tre	77.6±4.8
	10% PG + Tre	58.3±9.2
[0314]	4% PG + Tre + D	90.1±8.1
	10% PG + Tre + D	81.6±1.2
	4% PG + Tre + HES	96.0±11.0
	10% PG + Tre + HES	83.3±2.6
		膜联蛋白 V 阳性率 (%)
	4% PG + Tre	28.1±2.8
	10% PG + Tre	39.9±7.6
	4% PG + Tre + D	16.3±3.7
	10% PG + Tre + D	28.0±4.9
	4% PG + Tre + HES	13.1±2.9
	10% PG + Tre + HES	23.8±3.8

[0315] 根据表11的结果,制作了图11。

[0316] 2—8研究8

[0317] 为了确认在细胞冷冻保存液中并用PG与海藻糖或右旋糖酐的情况的效果,将hAD—MSC冷冻保存在3种细胞冷冻保存液(含2.5%PG的LR;含2.5%PG和2.925%海藻糖的LR;以及含2.5%PG、2.925%海藻糖和4.875%右旋糖酐的LR)中,分析了刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率。

[0318] 结果表明,如果将hAD—MSC冷冻保存在含2.5%PG和2.925%海藻糖的LR;或含2.5%PG、2.925%海藻糖和4.875%右旋糖酐的LR中,则与将hAD—MSC冷冻保存在含2.5%PG的LR中的情况相比,刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率更高,特别是在使用含2.5%PG、2.925%海藻糖和4.875%右旋糖酐的LR的情况下,这些值显著更高(图12A和图12B,表12)。

[0319] 此外,如果将hAD—MSC冷冻保存在含2.5%PG和2.925%海藻糖的LR,或含2.5%PG、2.925%海藻糖和4.875%右旋糖酐的LR中,则与将hAD—MSC冷冻保存在含2.5%PG的LR中的情况相比,刚融解后的hAD—MSC的膜联蛋白V阳性率显著更低(图12C,表12)。

[0320] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在由含PG、海藻糖和右旋糖酐的乳酸林格氏液构成的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在由只含PG的乳酸林格氏液构成的细胞冷冻保存液中的情况相比,具有更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡的作用。

[0321] [表12]

细胞冷冻保存液	冷冻保存前	刚冷冻融解后
细胞存活率 (%)		
PG		33.2±11.9
PG + Tre	97.6±1.4	44.0±15.0
PG + Tre + D		80.8±5.9
存活细胞回收率 (%)		
[0322] PG		32.2±11.4
PG + Tre	100.0	42.0±14.4
PG + Tre + D		82.5±6.8
膜联蛋白 V 阳性率 (%)		
PG		63.3±5.9
PG + Tre		52.7±5.4
PG + Tre + D		28.2±5.0

[0323] 根据表12的结果,制作了图12。

[0324] 2—9研究9

[0325] 根据研究8的结果,确认了PG与海藻糖的并用效果,所以为了研究是否也能确认与海藻糖以外的糖类的并用效果,将hAD—MSC冷冻保存在含5种糖类(1.44%葡萄糖、1.44%果糖、2.88%海藻糖、2.88%蔗糖或2.88%乳糖)的含有4%PG的LR中,分析了刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率。另外,作为比较对照,也同样使用不含这些糖类的含有4%PG的LR进行了分析。此外,各糖类的摩尔浓度均以0.08M相同。

[0326] 结果表明,在将hAD—MSC冷冻保存在含海藻糖以外的4种糖类(葡萄糖、果糖、蔗糖或乳糖)的含有4%PG的细胞冷冻保存液中时,与将hAD—MSC冷冻保存在含有4%PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率几乎没有变化(图13和表13)。

[0327] 这一结果表明,在海藻糖以外的糖类中未确认有与PG的并用效果。

[0328] [表13]

细胞冷冻保存液	刚冷冻融解后 细胞存活率 (%)
4% PG	79.8±5.6
4% PG + Glu	83.3±6.5
4% PG + Flu	84.2±2.1
4% PG + Tre	89.4±4.6
4% PG + Suc	80.1±8.0
[0329] 4% PG + Lac	82.5±4.5
	存活细胞回收率 (%)
4% PG	76.8±5.0
4% PG + Glu	79.0±12.3
4% PG + Flu	90.7±3.3
4% PG + Tre	99.0±6.2
4% PG + Suc	83.0±3.5
4% PG + Lac	88.6±10.5

[0330] 根据表13的结果,制作了图13。

[0331] 2—10研究10

[0332] 为了研究含2.5~5%PG和海藻糖的细胞冷冻保存液中的海藻糖的最优的浓度,将hAD—MSC冷冻保存在6种细胞冷冻保存液(含4%PG的LR;含4%PG和0.72%海藻糖的LR;含4%PG和1.44%海藻糖的LR;含4%PG和2.88%海藻糖的LR;含4%PG和5.76%海藻糖的LR;以及含4%PG和11.52%海藻糖的LR)中,分析了刚融解后的hAD—MSC的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率。

[0333] 结果表明,如果将hAD—MSC冷冻保存在含4%PG和0.72~11.52%海藻糖的细胞冷冻保存液(含4%PG和0.72%海藻糖的LR;含4%PG和1.44%海藻糖的LR;含4%PG和2.88%海藻糖的LR;含4%PG和5.76%海藻糖的LR;以及含4%PG和11.52%海藻糖的LR)中,则与将hAD—MSC冷冻保存在不含海藻糖的含有4%PG的细胞冷冻保存液(含4%PG的LR)中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的细胞存活率和存活细胞回收率更高,特别是当细胞冷冻保存液中的海藻糖的浓度为1.44~2.88%和11.52%时,细胞存活率显著更高,而当细胞冷冻保存液中海藻糖的浓度为0.72~5.76%时,存活细胞回收率显著更高(图14A和图14B,表14)。

[0334] 此外,如果将hAD—MSC冷冻保存在含4%PG和0.72~11.52%海藻糖的细胞冷冻保存液中,则与将hAD—MSC冷冻保存在不含海藻糖的含有4%PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,刚冷冻融解后的hAD—MSC的膜联蛋白V阳性率更低(图14C,表14)。

[0335] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含2.5~5%PG和至少0.72%(例如,1.44~11.52%,0.72~5.76%)海藻糖的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在不含海藻糖的含2.5~5%PG的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡。

[0336] [表14]

细胞冷冻保存液 (4% PG + Tre 中 Tre 的浓度)		刚冷冻融解后
		细胞存活率 (%)
	0.00%	72.9±10.1
	0.72%	82.1±3.7
	1.44%	85.5±1.7
	2.88%	87.8±3.6
	5.76%	82.5±5.2
	11.52%	86.4±5.1
		存活细胞回收率 (%)
[0337]	0.00%	61.6±6.7
	0.72%	81.7±11.2
	1.44%	91.2±9.4
	2.88%	95.0±8.0
	5.76%	83.2±8.9
	11.52%	76.9±11.4
		膜联蛋白 V 阳性率 (%)
	0.00%	29.1±6.0
	0.72%	25.2±3.4
	1.44%	24.0±2.3
	2.88%	28.0±3.6
	5.76%	23.7±6.7
	11.52%	23.0±5.4

[0338] 根据表14的结果,制作了图14。

[0339] 2—11研究11

[0340] 为了确认在将hAD—MSC以外的哺乳动物细胞冷冻保存在本发明的冷冻保存液中的情况下也发挥PG与海藻糖的并用效果,将hCD8阳性T细胞冷冻保存在3种细胞冷冻保存液(含4%PG的含血清培养液;含4%PG的含有海藻糖的LR;和含4%PG的LR)中,分析了刚融解后、融解后1小时、3小时和6小时的hCD8阳性T细胞的细胞存活率和存活细胞回收率。

[0341] 结果表明,如果将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含4%PG的含血清培养液或含4%PG的含有海藻糖的LR中,则与将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含4%PG的LR中的情况相比,刚融解后或之后的hCD8阳性T细胞的细胞存活率和存活细胞回收率更高(图15和表15)。

[0342] 这一结果表明,含PG的含海藻糖乳酸林格氏液具有与含PG的含血清培养液同等程度的细胞保存效果,同时也表明含PG的含海藻糖乳酸林格氏液与含PG的乳酸林格氏液相比细胞保存效果更高,支持了上述研究7和8的结果。

[0343] [表15]

细胞冷冻保存液	冷冻保存前	冷冻保存并溶解后			
		0 小时	1 小时	3 小时	6 小时
细胞存活率 (%)					
[0344] PG+Med	87.0±1.7	52.5±5.6	49.1±8.8	50.7±4.2	47.3±5.2
PG+Tre	79.7±1.1	59.5±2.4	43.6±6.7	55.8±4.7	51.4±3.9
PG	78.6±1.0	48.0±11.7	22.5±6.1	30.6±4.4	35.7±8.3
存活细胞回收率 (%)					
PG+Med	-	60.1±6.4	54.9±8.2	56.9±8.5	49.3±6.6
PG+Tre	-	67.2±8.3	48.6±14.5	72.9±12.2	68.9±17.2
PG	-	50.7±18.0	23.6±8.9	36.3±5.4	44.5±12.3

[0345] 根据表15的结果,制作了图15。

[0346] 2—12研究12

[0347] 为了确认在将hAD—MSC以外的哺乳动物细胞冷冻保存在本发明冷冻保存液中的情况下也能发挥上述研究1~10所示的效果,将hCD8阳性T细胞冷冻保存在5种细胞冷冻保存液(含2%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含3%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含4%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;以及含7.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中,分析了刚融解后和融解后3小时的hCD8阳性T细胞的细胞存活率和存活细胞回收率。

[0348] 结果表明,如果将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含3~7.5%PG的4种细胞冷冻保存液(含3%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含4%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;以及含7.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中,则与将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含2%PG的细胞冷冻保存液(含2%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中的情况相比,刚融解后或之后的hCD8阳性T细胞的细胞存活率和存活细胞回收率更高,特别是当细胞冷冻保存液中的PG的浓度为3~5%时细胞存活率更高,此外当细胞冷冻保存液中的PG的浓度为4~5%时存活细胞回收率更高(图16和表16)。

[0349] 这一结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%,进一步是4~5%)的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%,进一步是4~5%)以外浓度的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡,支持了上述研究1~10的结果。

[0350] [表16]

	细胞冷冻保存液 (PG+Tre+D 中 PG 的 浓度)	冷冻保存前	冷冻保存且解冻后	
			0 小时	3 小时
[0351]	细胞存活率 (%)			
	2%	80.3±1.2	62.3±10.4	63.1±2.0
	3%	80.0±1.4	73.5±2.6	73.7±0.9
	4%	78.4±2.0	75.6±3.4	74.8±1.5
	5%	79.2±0.8	75.9±3.4	75.0±1.2
	7.5%	79.2±1.8	68.6±4.3	72.9±3.6
	存活细胞回收率 (%)			
	2%	-	68.8±19.9	73.8±5.5
	3%	-	77.8±11.7	87.7±6.6
	4%	-	88.1±22.1	91.0±10.6
5%	-	83.2±23.6	90.4±8.0	
7.5%	-	57.9±8.9	80.7±9.3	

[0352] 根据表16的结果,制作了图16。

[0353] 2—13研究13

[0354] 继研究12之后,为了确认在将hAD—MSC以外的哺乳动物细胞冷冻保存在本发明冷冻保存液中的情况下也能发挥上述研究1~10所示的效果,将hCD8阳性T细胞冷冻保存在研究12中使用的5种细胞冷冻保存液中,分析了刚融解后的hCD8阳性T细胞的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率。

[0355] 结果表明,如果将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含3~7.5%PG的4种细胞冷冻保存液(含3%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含4%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;以及含7.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中,则与将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含2%PG的细胞冷冻保存液(含2%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中的情况相比,刚冷冻融解后的hCD8阳性T细胞的细胞存活率和存活细胞回收率更高,特别是当细胞冷冻保存液中PG的浓度为4~5%时细胞存活率更高,此外当细胞冷冻保存液中PG的浓度为3~5%时存活细胞回收率更高(图17A和图17B,表17)。

[0356] 此外,如果将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含3~7.5%PG的上述4种细胞冷冻保存液中,则与将hCD8阳性T细胞冷冻保存在含2%PG的上述细胞冷冻保存液中的情况相比,刚冷冻融解后的hCD8阳性T细胞的膜联蛋白V阳性率显著更低,特别是当细胞冷冻保存液中PG的浓度为4~5%时最低(图17C和表17)。

[0357] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%,进一步是4~5%)PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%,进一步是4~5%)以外浓度的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡,支持了上述研究1~10的结果。

[0358] [表17]

细胞冷冻保存液 (PG+Tre+D 中 PG 的浓度)		刚冷冻融解后 细胞存活率 (%)
	2%	77.4±5.0
	3%	83.0±7.9
	4%	86.1±3.0
	5%	86.9±4.3
	7.5%	82.5±3.8
		存活细胞回收率 (%)
[0359]	2%	86.8±8.5
	3%	99.3±14.5
	4%	102.4±6.4
	5%	96.6±14.4
	7.5%	88.8±8.2
		膜联蛋白 V 阳性率 (%)
	2%	42.3±1.9
	3%	31.9±1.7
	4%	26.8±2.5
	5%	26.0±0.8
	7.5%	31.0±4.8

[0360] 根据表17的结果,制作了图17。

[0361] 2—14研究14

[0362] 继研究12和13之后,为了确认在将hAD—MSC以外的哺乳动物细胞冷冻保存在本发明冷冻保存液中的情况下也能发挥上述研究1~10所示的效果,将hCD4阳性T细胞冷冻保存在由研究12和13使用的5种细胞冷冻保存液中,分析了刚融解后的hCD4阳性T细胞的细胞存活率、存活细胞回收率和膜联蛋白V阳性率。

[0363] 结果表明,如果将hCD4阳性T细胞冷冻保存在含3~7.5%PG的4种细胞冷冻保存液(含3%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含4%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;以及含7.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中,则与将hCD4阳性T细胞冷冻保存在含2%PG的细胞冷冻保存液(含2%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中的情况相比,刚冷冻融解后的hCD4阳性T细胞的细胞存活率和存活细胞回收率显著更高,特别是当细胞冷冻保存液中PG的浓度为4~5%时最高(图18A和图18B,表18)。

[0364] 此外,如果将hCD4阳性T细胞冷冻保存在含3~7.5%PG的上述4种细胞冷冻保存液中,则与将hCD4阳性T细胞冷冻保存在含2%PG的上述细胞冷冻保存液中的情况相比,刚冷冻融解后的hCD4阳性T细胞的膜联蛋白V阳性率显著更低,特别是当细胞冷冻保存液中的PG的浓度为4~5%时最低(图18C和表18)。

[0365] 这些结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%,进一步是4~5%)PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%,进一步是4~5%)以外浓度的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷

冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡,支持了上述研究1~13的结果。

[0366] [表18]

	细胞冷冻保存液 (PG+Tre+D 中 PG 的浓度)	刚冷冻融解后
		细胞存活率 (%)
	2%	58.8±12.4
	3%	80.4±4.8
	4%	85.3±5.6
	5%	89.0±4.8
	7.5%	78.7±9.4
		存活细胞回收率 (%)
[0367]	2%	60.8±12.7
	3%	95.1±5.5
	4%	102.0±7.8
	5%	104.6±5.1
	7.5%	84.2±12.1
		膜联蛋白 V 阳性率 (%)
	2%	40.1±8.7
	3%	24.2±4.9
	4%	21.0±4.1
	5%	20.0±3.1
	7.5%	24.8±4.5

[0368] 根据表18的结果制作了图18。

[0369] 2—15研究15

[0370] 继研究12~14之后,为了确认在将hAD—MSC以外的哺乳动物细胞冷冻保存在本发明冷冻保存液中的情况下也能发挥上述研究1~10所示的效果,将hCD34阳性造血干细胞(冷冻保存前的细胞存活率为73.3±1.2%)冷冻保存在由研究12~14使用的5种细胞冷冻保存液中,分析了刚融解后的hCD34阳性造血干细胞的细胞存活率和CD34阳性率。

[0371] 结果表明,如果将hCD34阳性造血干细胞冷冻保存在含3~7.5%PG的4种细胞冷冻保存液(含3%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含4%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;含5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR;以及含7.5%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中,则与将hCD34阳性造血干细胞冷冻保存在含2%PG的细胞冷冻保存液(含2%PG、2.7%海藻糖和4.5%右旋糖酐的LR)中的情况相比,刚融解后的hCD34阳性造血干细胞的细胞存活率更高,特别是当细胞冷冻保存液中的PG的浓度为3~5%时细胞存活率更高(图19A和表19)。

[0372] 这一结果表明,如果将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%)的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中,则与将哺乳动物细胞冷冻保存在含3~7.5%(特别是3~5%)以外浓度的PG、海藻糖和右旋糖酐的细胞冷冻保存液中的情况相比,能够更有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡,支持了上述研究1~14的结果。

[0373] 此外,冷冻保存后的hCD34阳性造血干细胞中的CD34阳性率与冷冻保存前hCD34阳性造血干细胞中的CD34阳性率几乎没有变化(图19B和表19),所以可知细胞冷冻保存液中含有的PG、海藻糖和右旋糖酐不会给hCD34阳性造血干细胞的性质带来影响。

[0374] [表19]

细胞冷冻保存液 (PG+Tre+D 中的 PG 的 浓度)	冷冻保存前的细胞 存活率 (%)	刚冷冻融解后的细胞 存活率 (%)
2%	73.3±1.2	45.0±8.5
3%		54.4±5.7
4%		51.0±4.6
5%		54.8±6.6
7.5%		51.1±8.1
细胞冷冻保存液 (PG+Tre+D 中的 PG 的 浓度)	冷冻保存前相对于刚冷冻融解后的 CD34 阳性率之比	
2%	1.0±0.4	
3%	0.9±0.4	
4%	1.0±0.3	
5%	1.3±0.2	
7.5%	1.2±0.7	

[0376] 根据表19的结果,制作了图19。

[0377] [工业实用性]

[0378] 根据本发明,能够有效地抑制哺乳动物细胞的因冷冻融解发生的细胞死亡,并且能够有效地提高冷冻融解后的哺乳动物细胞的增殖能力,因此在再生医疗等的移植医疗领域和癌症治疗领域中具有实用性。

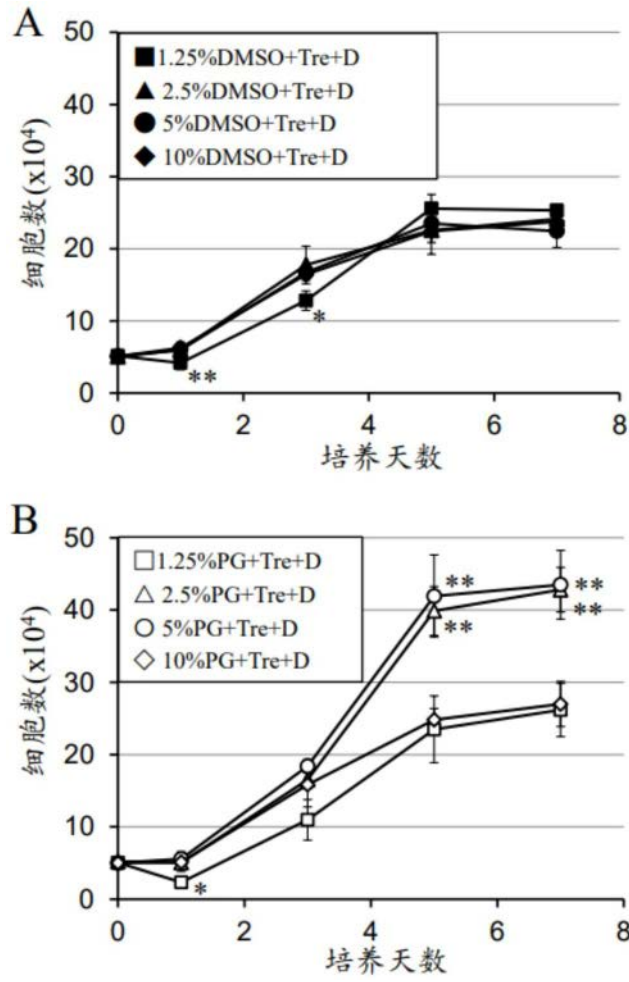


图1

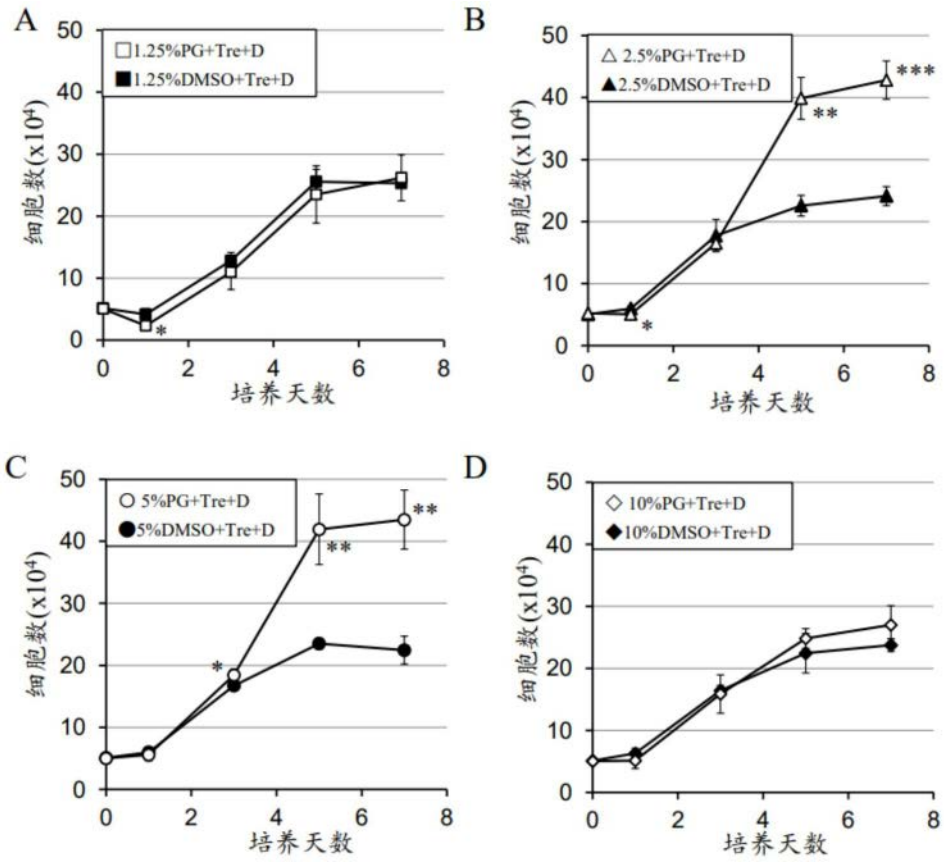


图2

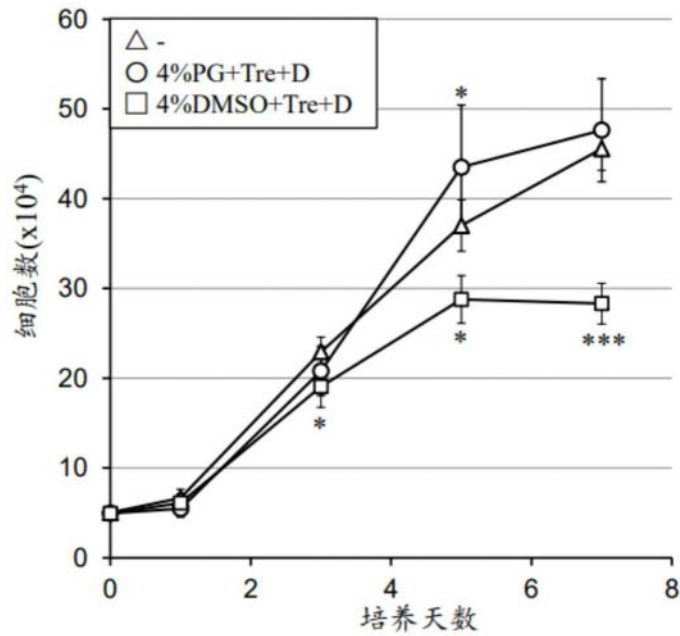


图3

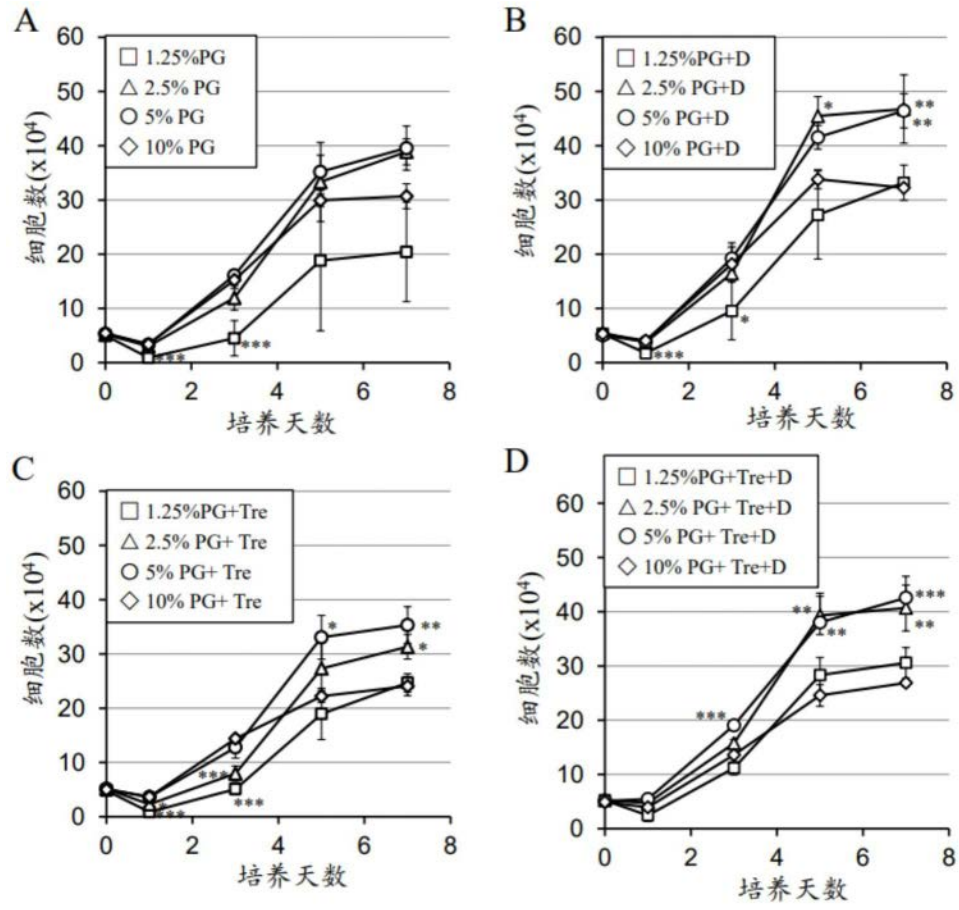


图4

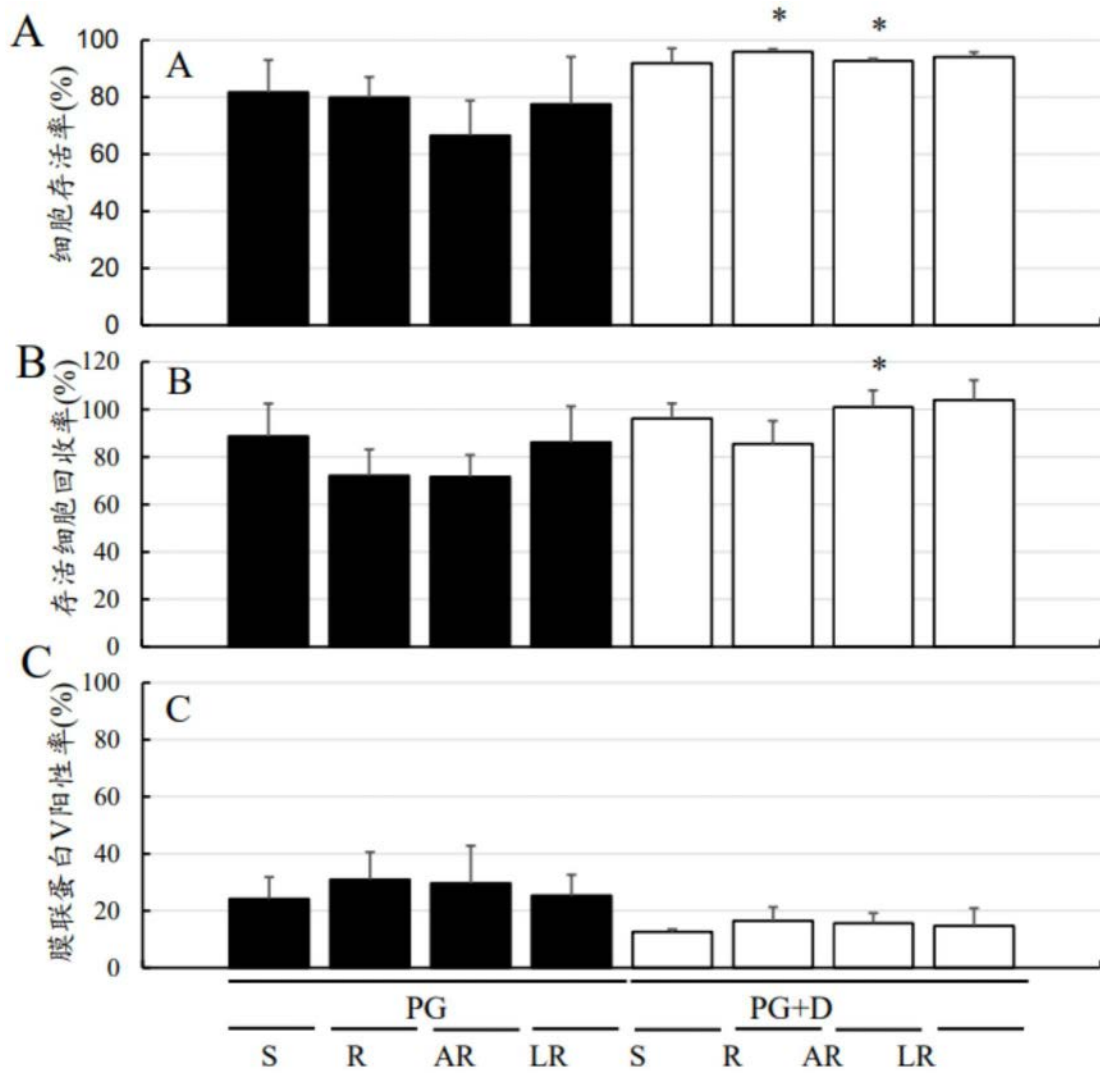


图5

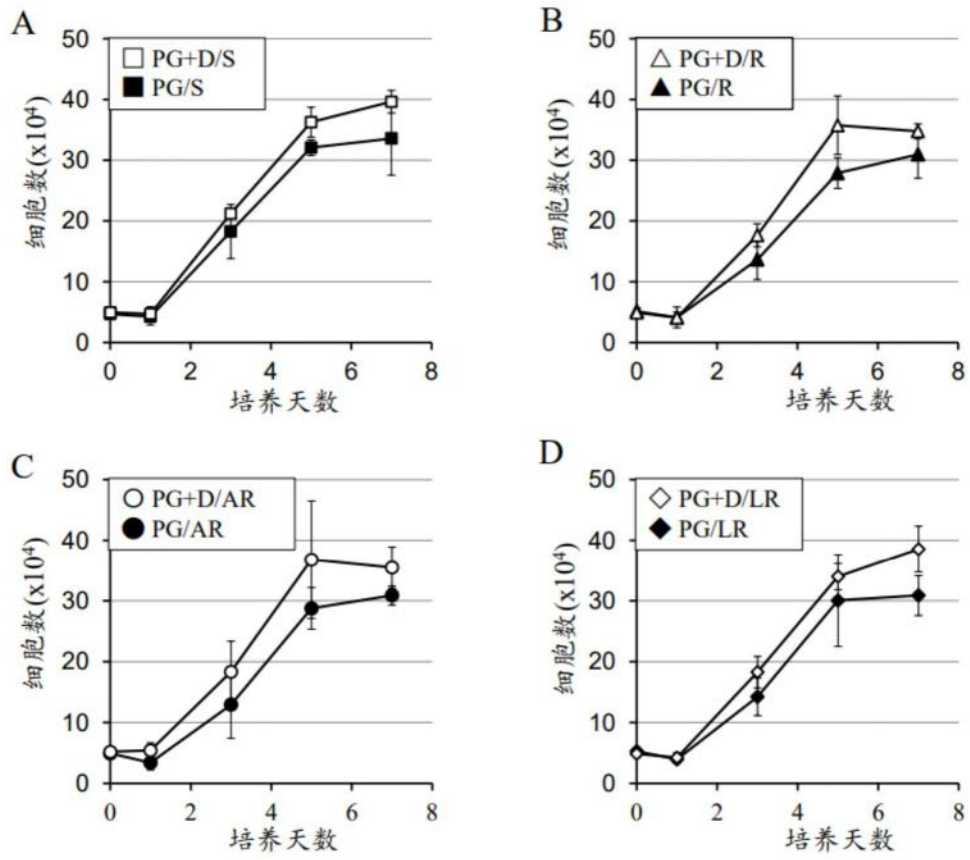


图6

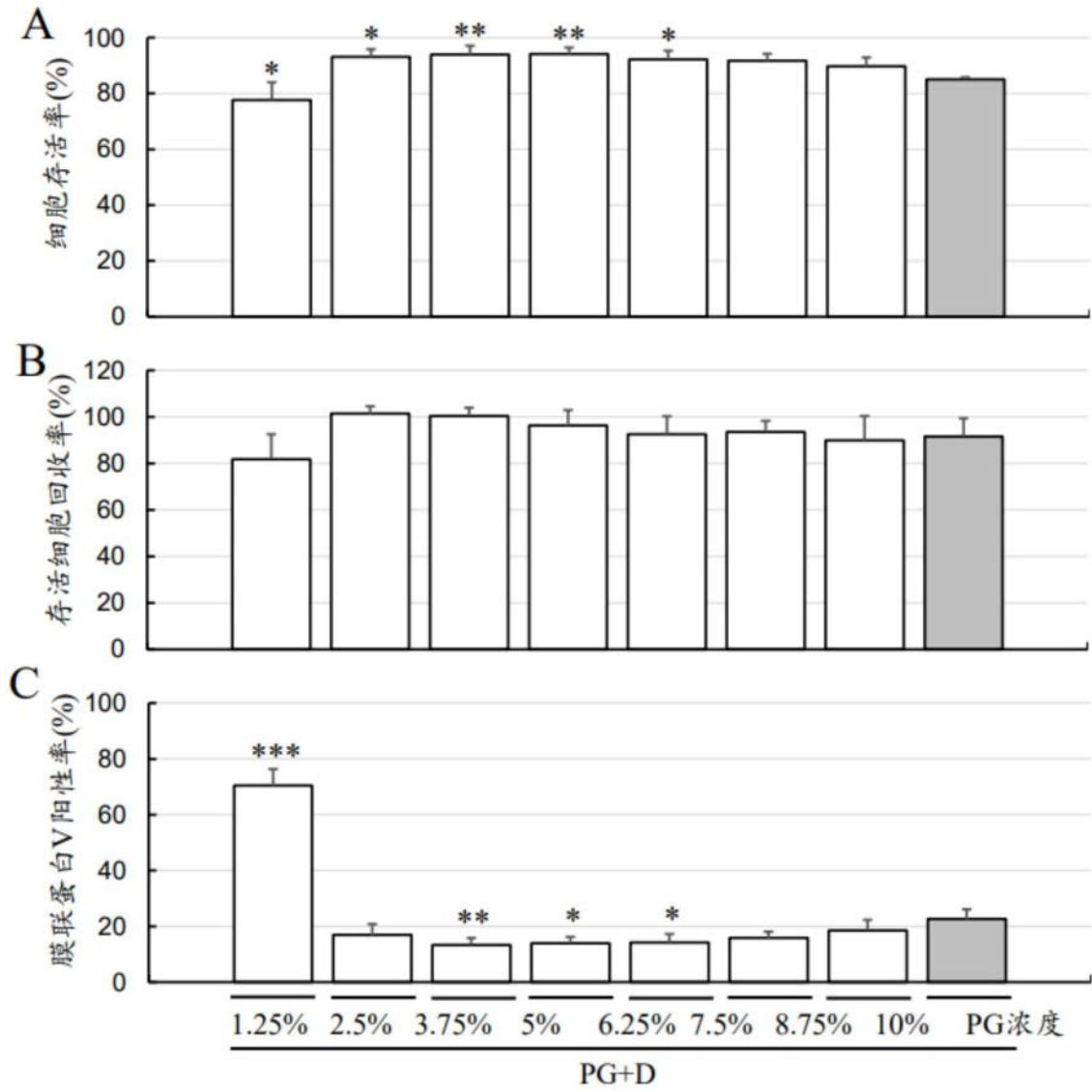


图7

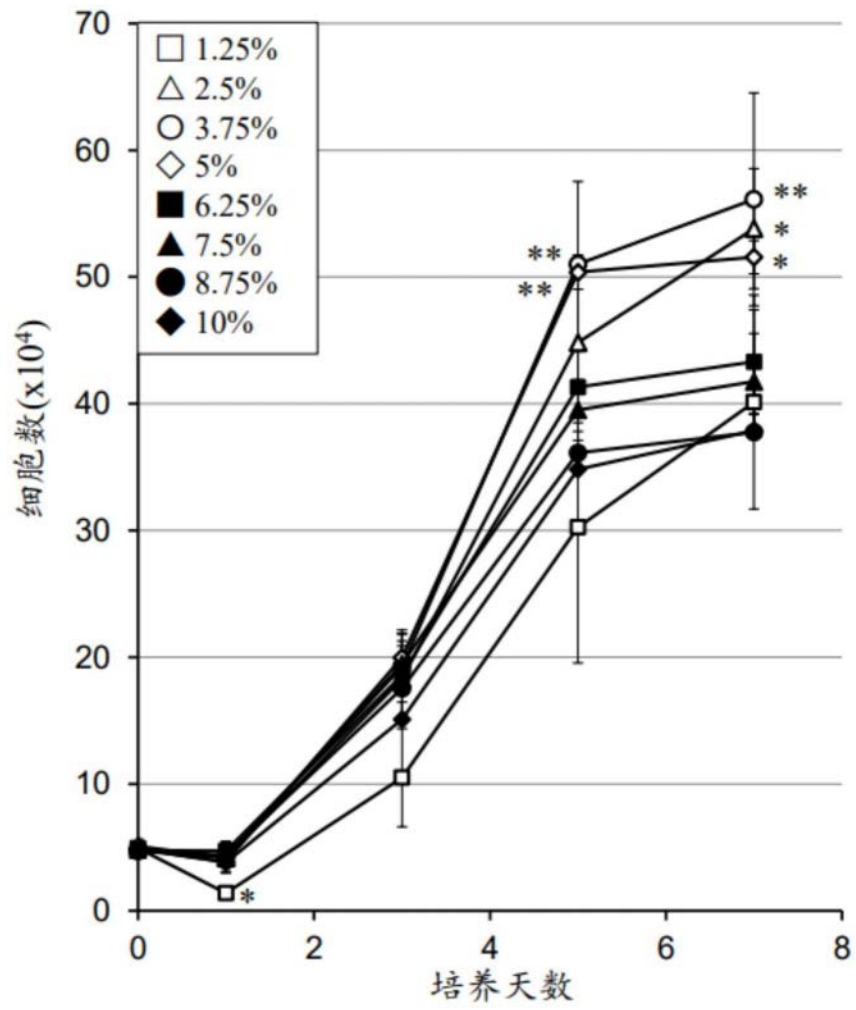


图8

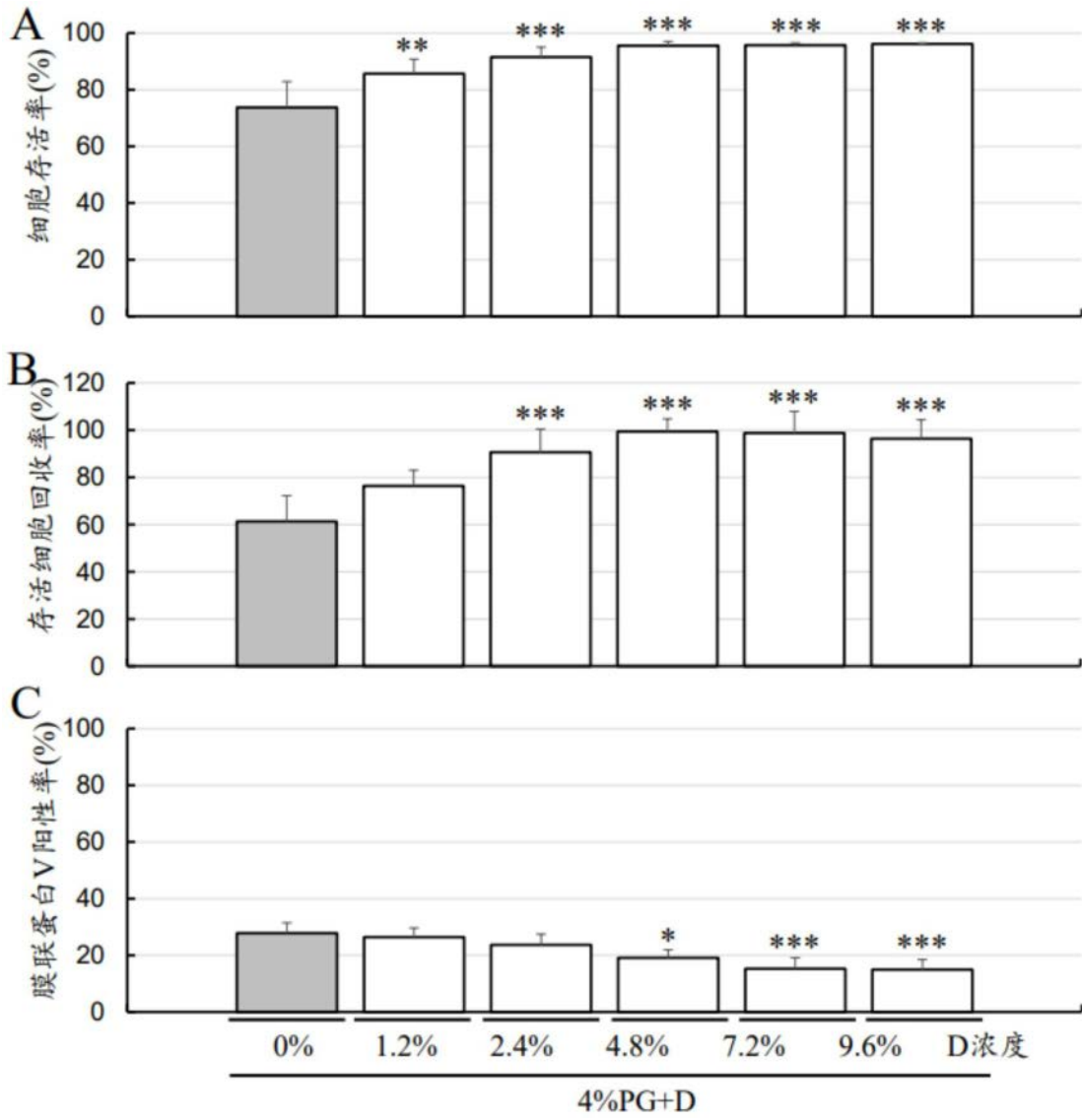


图9

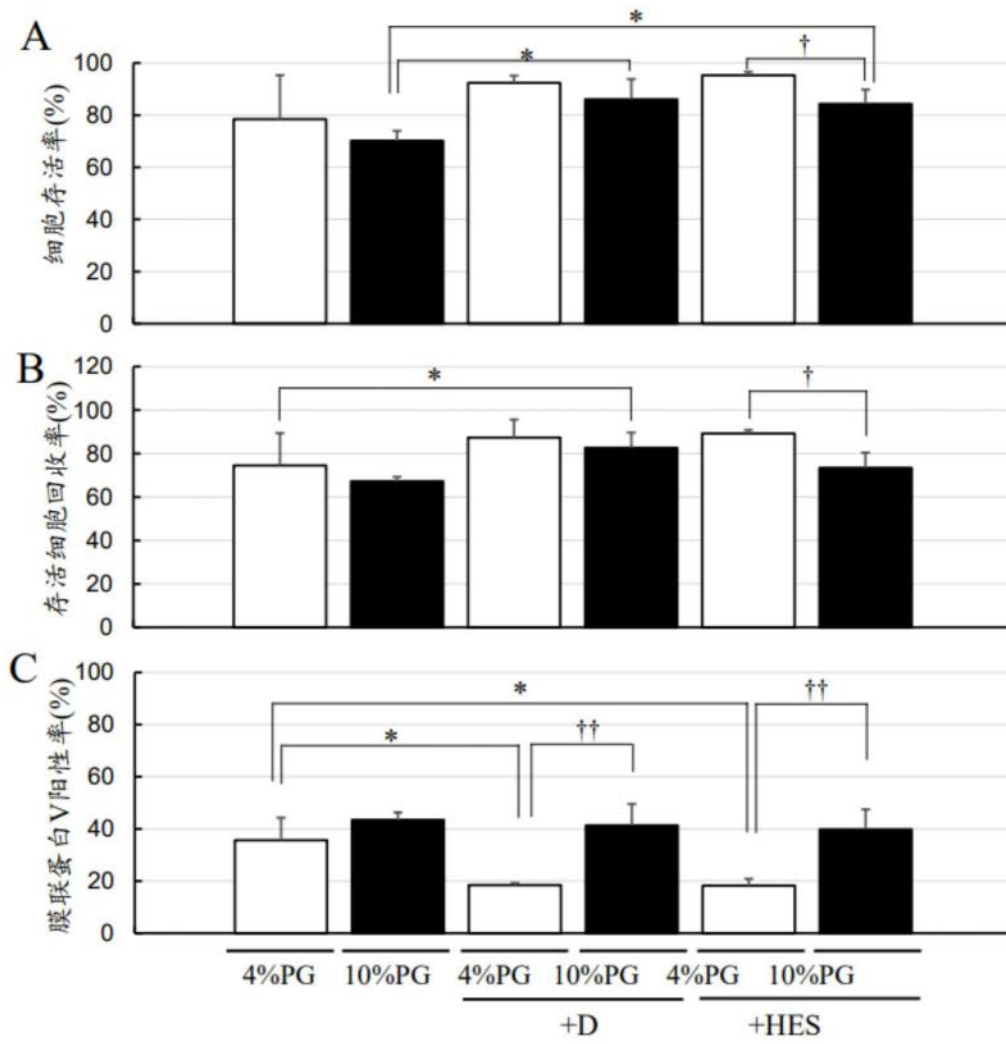


图10

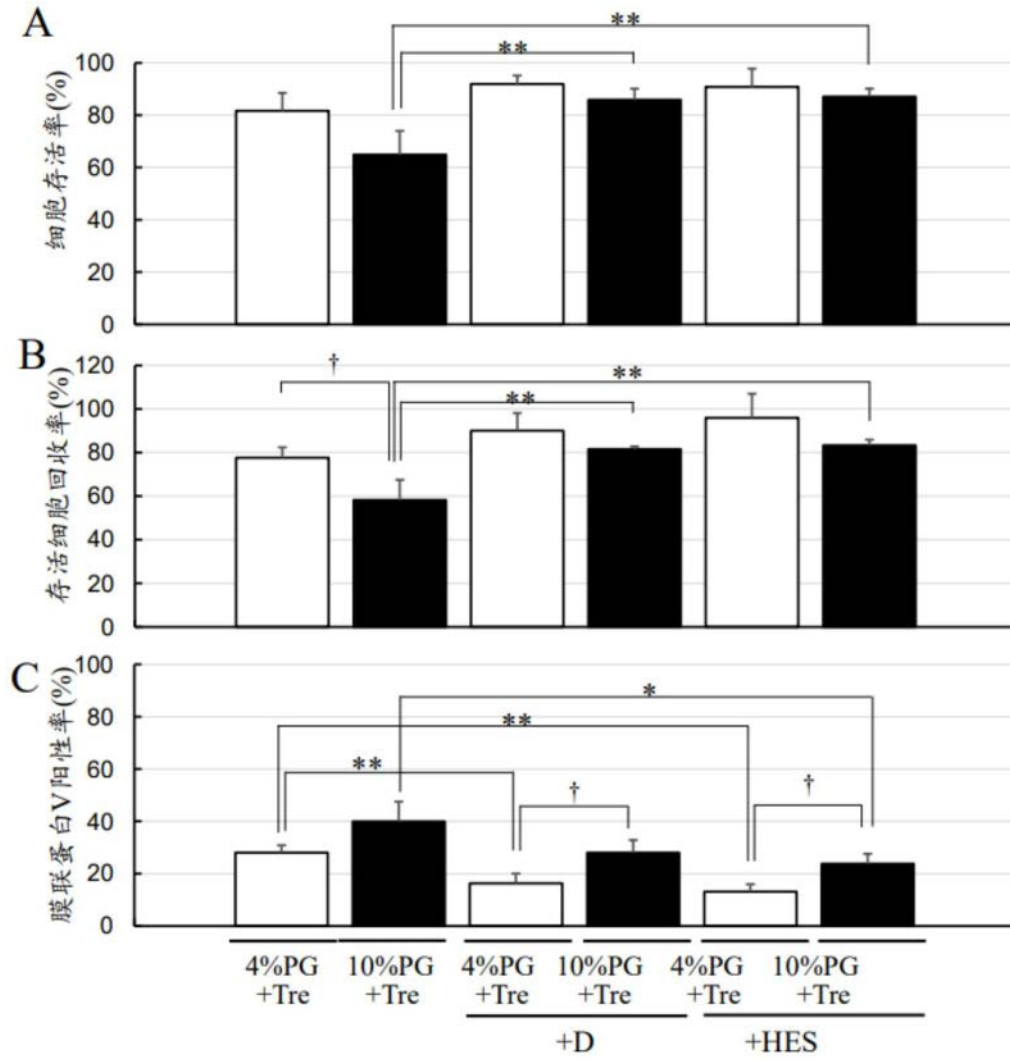


图11

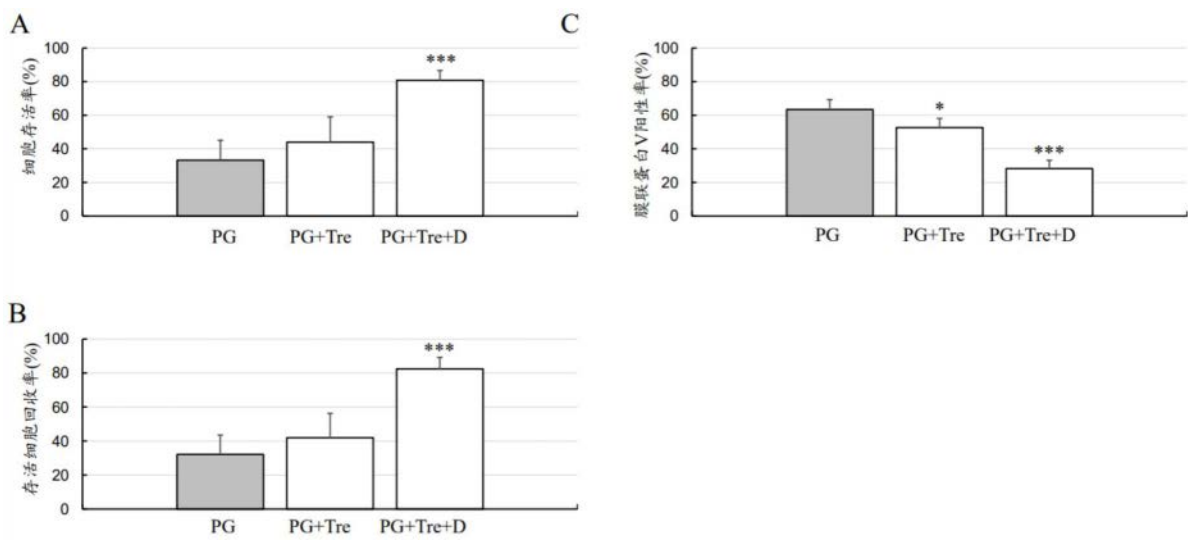


图12

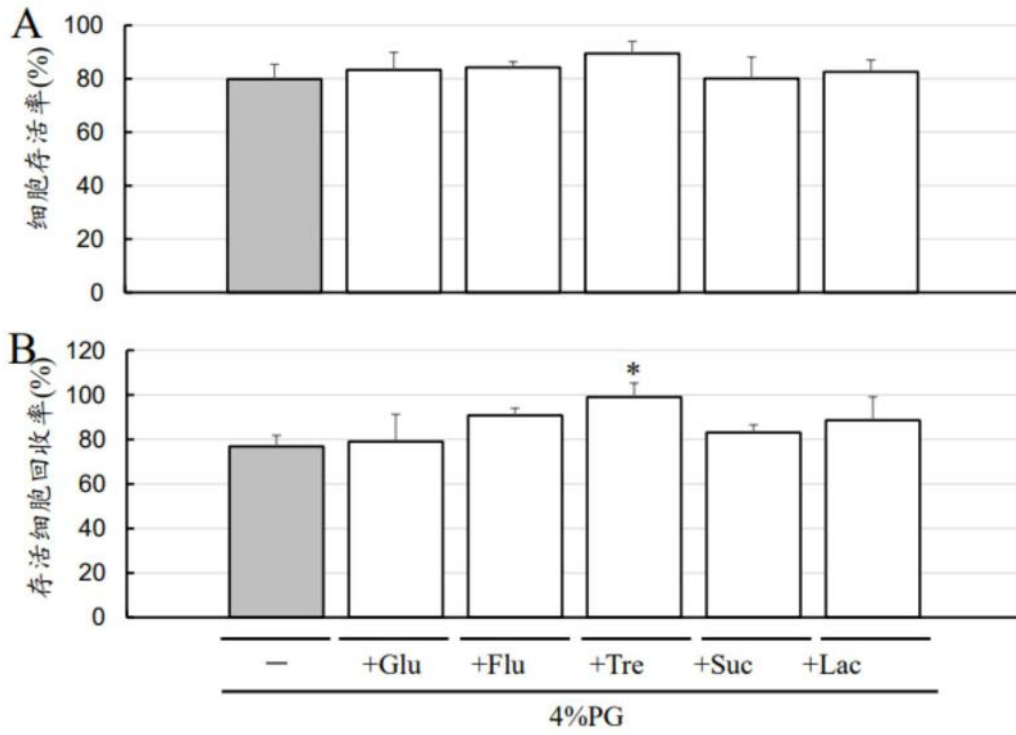


图13

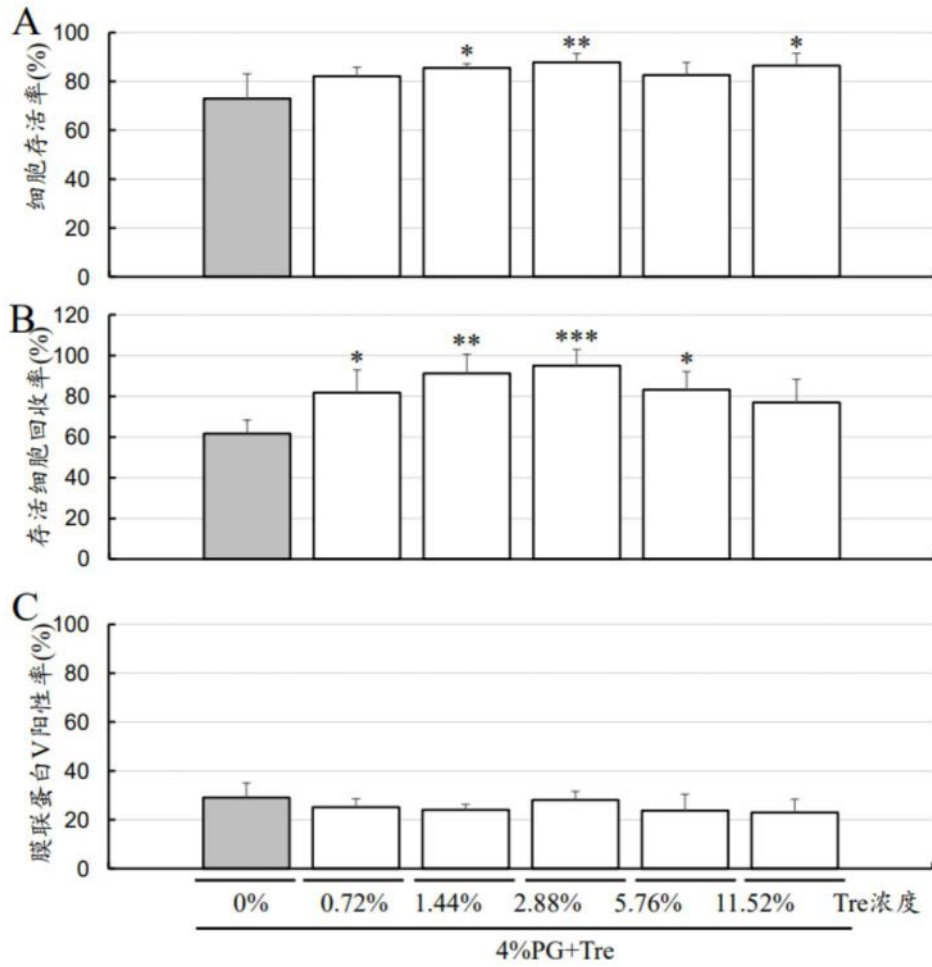


图14

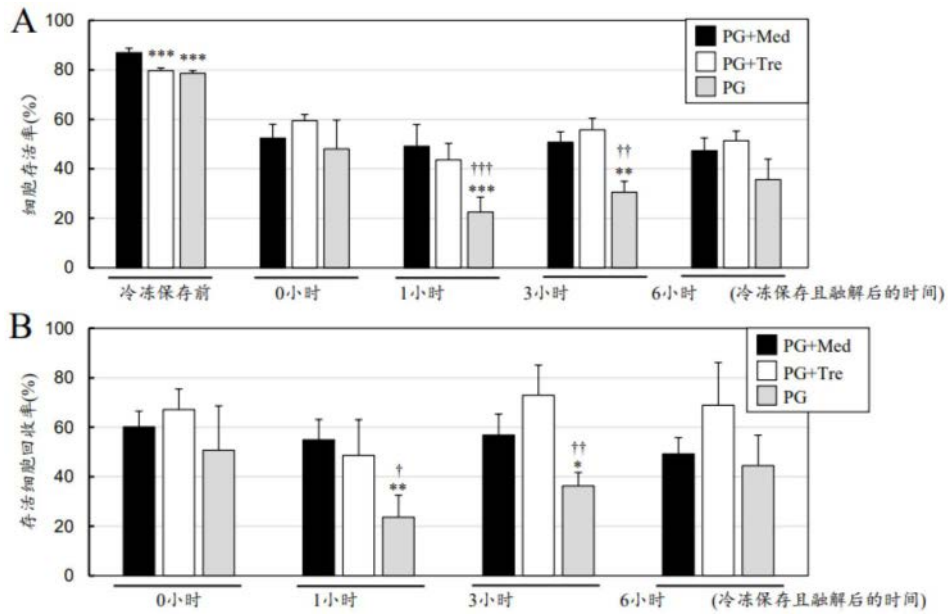


图15

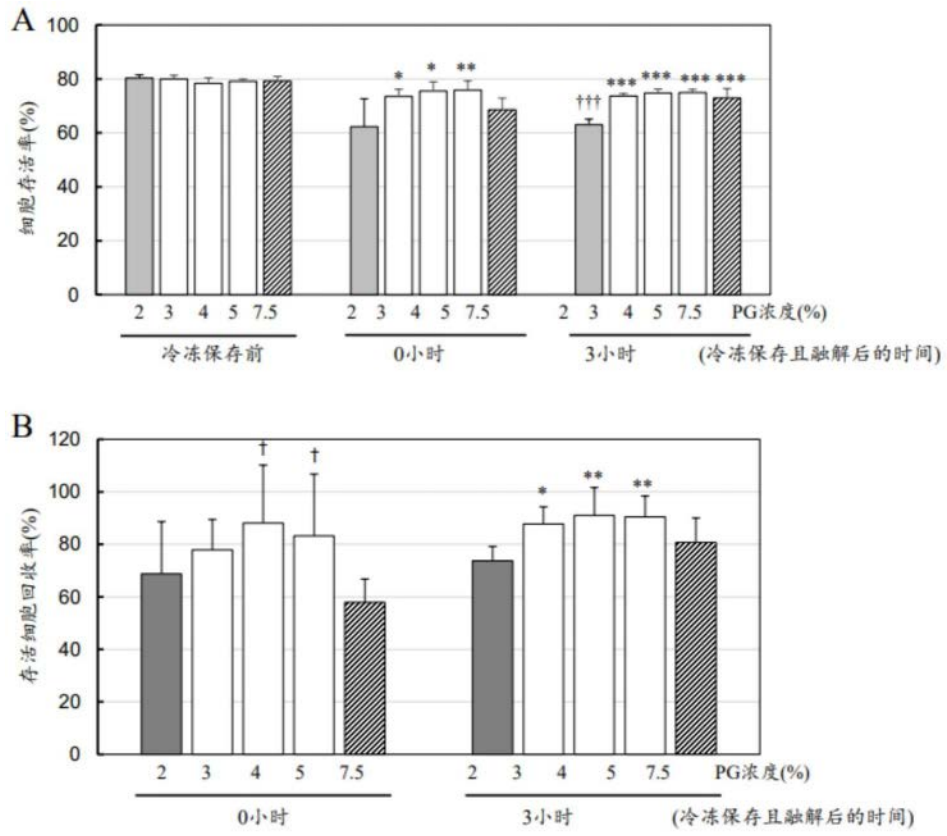


图16

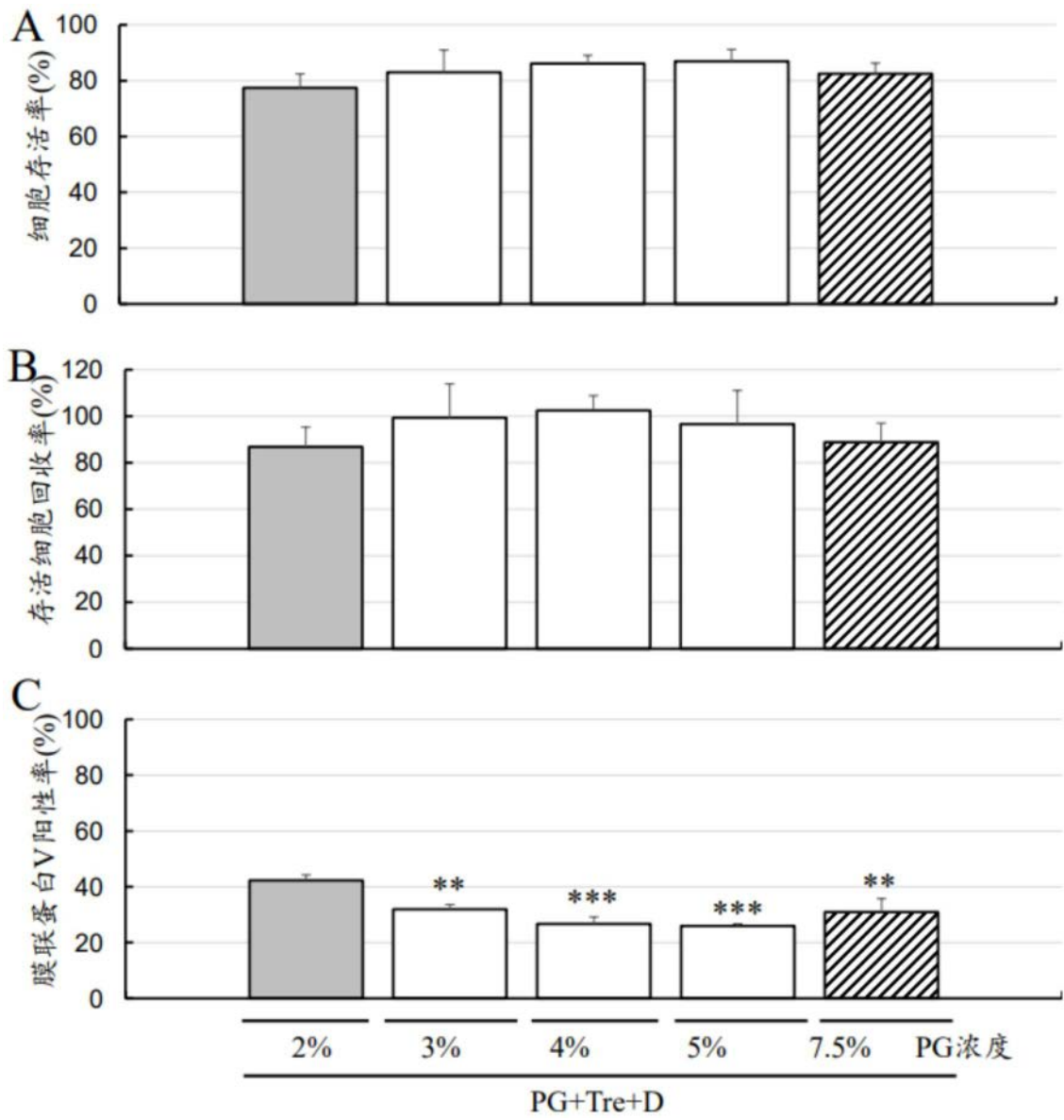


图17

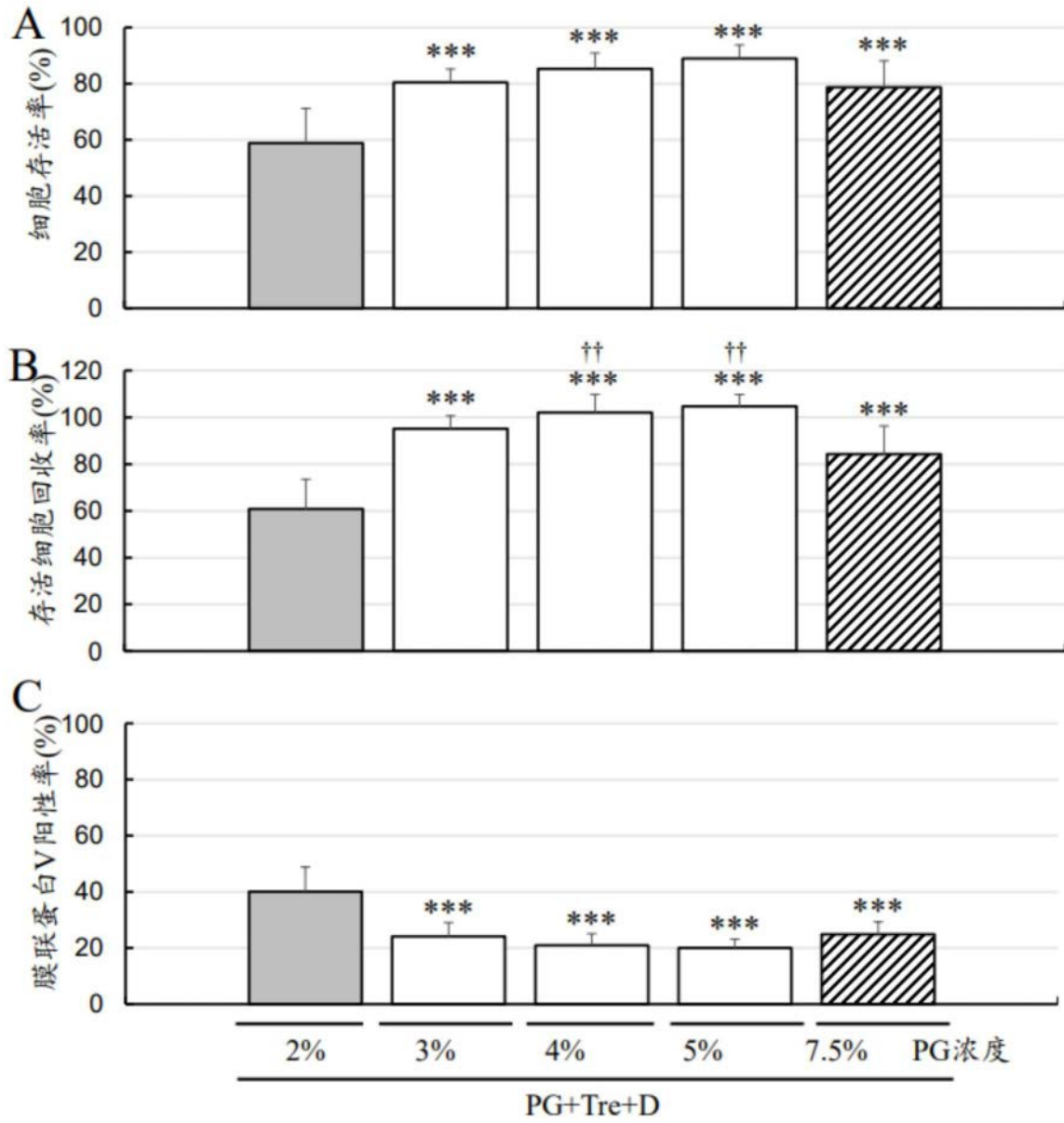


图18

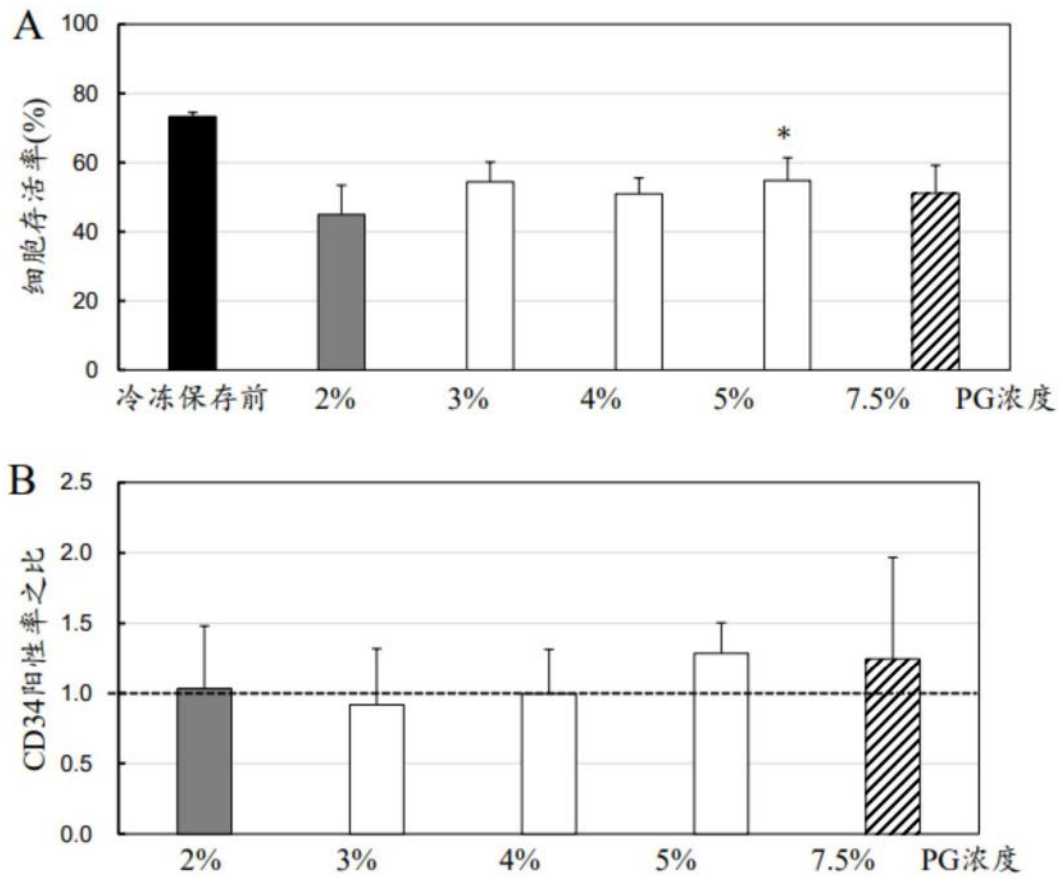


图19