(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7359407号
(P7359407)

(45)発行日　令和5年10月11日(2023.10.11)

(24)登録日　令和5年10月2日(2023.10.2)

(51)国際特許分類

		FI		
C12N	*5/07 (2010.01)*	C12N	5/07	
C12N	*1/00 (2006.01)*	C12N	1/00	G

請求項の数　10　（全58頁）

(21)出願番号　特願2018-536781(P2018-536781)
(86)(22)出願日　平成29年1月17日(2017.1.17)
(65)公表番号　特表2019-502389(P2019-502389A)
(43)公表日　平成31年1月31日(2019.1.31)
(86)国際出願番号　PCT/IL2017/050058
(87)国際公開番号　WO2017/125917
(87)国際公開日　平成29年7月27日(2017.7.27)
審査請求日　令和1年12月18日(2019.12.18)
審判番号　不服2021-15480(P2021-15480/J1)
審判請求日　令和3年11月11日(2021.11.11)
(31)優先権主張番号　62/279,843
(32)優先日　平成28年1月18日(2016.1.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
最終頁に続く

(73)特許権者　515217694
アモーフィカル リミテッド.
イスラエル国，７４０３１１８ ネス ジオナ，１１ ハハラシュ ストリート
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元
(72)発明者　ベン，ヨセフ
イスラエル国，８６８３０００ アラバ，メシェク ベン，ツォファル
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞培養培地のためのサプリメントとしての安定化無定形炭酸カルシウム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細胞培養培地であって、ここで当該細胞培養培地は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）が補充され、ここで当該細胞培養培地はヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚および卵巣から選択される生物学的培養物の発達、または成熟に適しているおよび前記発達、または成熟を高めるものであり、当該安定化剤は２～１０個のリン酸基を含むポリリン酸である、上記細胞培養培地。

【請求項２】

前記胚が、ヒト胚、または家畜動物、愛玩動物、およびげっ歯類胚から選択される非ヒト哺乳動物胚であり、前記生殖体の細胞が、卵母細胞または精子細胞から選択される、請求項１に記載の細胞培養培地。

【請求項３】

前記細胞培地が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、分割培地、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、Ｌ－１５培地（Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ）、ＭＣＤＢ培地、培地１９９、ｏｐｔｉ－ＭＥＭ、ハムＦ－１２、ハムＦ－１０、ＧＭＥＭ、エイムス培地、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、クレイコム、クリック培地、グラスゴー最小必須培地（ＧＭＥＭ）、ＭｅｇａＣｅｌｌ培地、マッコイ５Ａ改変培地、ＮＣＴＣ培地、ウィリアムズ培地Ｅ、ウェイマウス培地、ＴＣ－１０、ＩＰＬ－１０培地、精子の分離、洗浄、または成熟用培地、受精用培地、および胚発達用培地から選択される、請求項１または２に記載の細胞培養培地。

【請求項４】

前記安定化剤が、三リン酸である、請求項１に記載の細胞培養培地。
【請求項５】
ヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚および卵巣から選択される動物細胞の培養培地へのサプリメントとしての使用のための、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）であって、ここで当該安定化剤が２～１０個のリン酸基を含むポリリン酸であり、得られた細胞培養培地が前記動物細胞の成熟、または発達を高める、上記無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）。
【請求項６】
少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を含む、動物細胞培養培地サプリメントであって、ここで、動物細胞が、ヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚または卵巣から選択され、当該安定化剤が２～１０個のリン酸基を含むポリリン酸であり、得られたサプリメントがヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚または卵巣から選択される動物細胞の培養物の発達、または成熟を高める、上記サプリメント。
【請求項７】
安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を動物細胞培養培地のサプリメントとして使用するための、キットであって、ここで、動物細胞が、ヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚または卵巣から選択され、
（ｉ）請求項６に記載のサプリメント、または
（ｉｉ）塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、安定化剤、および当該塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、および安定化剤から安定化ＡＣＣを調製するための取扱説明書であって、ここで当該安定化剤は２～１０個のリン酸基を含むポリリン酸である、上記塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、安定化剤、および取扱説明書、
を含み、かつ
動物細胞培養培地を調製するための細胞培養培地と組み合わされる当該安定化ＡＣＣまたは当該サプリメントの使用のための取扱説明書を含み、
ここで得られたサプリメント培地はヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚および卵巣から選択される動物細胞の生物学的培養物の成熟、または発達を高め、
さらに任意選択で細胞培養培地を含む、キット。
【請求項８】
生物学的培養物の成長を高めるための方法であって、当該生物学的培養物を２～１０個のリン酸基を含むポリリン酸によって安定化されたＡＣＣに暴露することを含み、前記生物学的培養物の成長が、ヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖体、胚および卵巣から選択される生物学的培養物の成熟、および発達の少なくとも１つから選択される、上記方法。
【請求項９】
インビトロでの胚発達を高めることを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
卵母細胞および精子細胞から選択される生殖体の成熟を高めることを含む、請求項８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞培養培地のサプリメントとしての安定化無定形炭酸カルシウムを提供する。特に本ＡＣＣは細胞および組織培養の成長をインビトロで高めるために有用である。本発明のさらなる態様では、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントが提供される。
発明の背景
【０００２】
細胞培養技術は、適切な栄養素および条件を加えるとき、組織から取り出された動物、植物、または昆虫細胞をインビトロで成長させることができる。細胞培養技術は、細胞過程の検討、特定の細胞型に対する様々な化学化合物または薬剤の効果を評価すること、工

業スケールで価値ある生物製剤を合成すること、および移植目的のために拡張した細胞の産生を含む多くの応用を有する。細胞培養技術は体外受精、幹細胞研究、およびワクチン産生で有用である。

【０００３】

細胞培養技術の最も重要な利用の一つは、モノクローナル抗体のような特定タンパク質を含む生物製剤の大量生産である。このような商業的価値のある生物製剤の数は、ここ数十年にわたって急速に増加しており、哺乳動物細胞培養技術に現在の広範な興味をもたらしている。

【０００４】

培養細胞に使用される培地の組成は、細胞生存、増殖、および目的の生物製剤の産生に対するその影響のため、非常に重要なものである。細胞培養に対して種々のレベルの特異性を有する多くの異なる細胞培養培地が開発された。培地のいくつかは異なる細胞培養の要求事項に従って補充され得る基礎培地であるが、他はより複雑な培地である。所望の効果を得るために、数百の個別化合物が細胞培養培地に加えられ得る。しかし培地サプリメントの概念は通常、細胞培養の確立および維持を全般的に促進する物質の添加に限られている。中でも最も使用されるサプリメントはミネラル、ビタミン、アミノ酸、ホルモン、および血清であり、最も頻繁なものはウシ胎児血清、ウマ血清、またはヒト血清である。しかし、血清の使用は多くの場合で望ましくない可能性があり、血清含量を低下した成長培地または無血清培地が使用される。

【０００５】

培地、そして特に細胞および組織培養の維持および増殖を可能にし、特に効果的な大規模製造培養条件をもたらすことができる培地へのサプリメントの研究および開発が進行している。

【発明の概要】

【０００６】

安定化無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）が補充された細胞培養培地は、他のカルシウム源が補充された培地で成長させた細胞と比べて、様々な細胞の高められた成長をもたらすことが、驚くべきことに発見されている。特に、安定化ＡＣＣは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルであるｍｄｘ細胞における筋管形成を高めたことが認められている。さらに、胚の高められたインビトロ発達が、「ワンステップ」の単一培養培地、または「逐次」（分割培地）のどちらかで、安定化ＡＣＣを含む培地で認められた。安定化ＡＣＣを補充された分割培地で成長させた胚は、迅速な卵割および高い孵化率を示したことが驚くべきことに認められている。他の場合では、ＡＣＣが補充された培地で成長させた神経細胞は高められた神経細糸再生を示し、ＡＣＣ補充培地で成長させた幹細胞は速い増殖および分化を示した。さらに驚くべきことに、ＡＣＣの存在中でインキュベーションされた精子は、スイムアップ法後に著しく高い運動率を示し、上相（運動性精子）でＡＣＣとともにインキュベーションされた精子細胞の濃度は、未処置サンプルにおける濃度よりも７倍まで高かったことが認められた。さらに、ＡＣＣは精子サンプルへのCa^{2+}の添加で認められている精子運動率への二相性効果を有さなかったことが示されている。これらすべての結果は、細胞培養培地へのサプリメントである安定化ＡＣＣが細胞成長を高めて促進し、優れた機能性を付与することを示す。

【０００７】

一つの態様では、本発明は細胞培養培地を提供し、ここで細胞培養培地は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）が補充され、ここで当該細胞培養培地は生物学的培養の成長に適している。いくつかの実施形態により、培地は細胞の培養、組織培養、器官培養、または器官を成長させるのに適している。他の実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞、組織、および器官の成長を高めるまたは促進することができ、例えば、増殖、成熟、繁殖、再生、発達、凍結保存などの保存、および／または分化を高めることができる。一つの実施形態により、細胞は動物、植物、または昆虫細胞である。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充され

た細胞培養培地は、細胞培養、組織培養、器官培養の成長に適しており、任意に成長を高めることができ、ここで当該培養は動物、植物、または昆虫の細胞、組織、または器官培養である。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、胚性、絨毛性、羊水、造血性、間葉性、神経、グリア、鼻腔嗅粘膜（ＮＯＭ）、成体組織特異的、および誘導多能性幹細胞のような幹細胞の成長、あるいはヒトまたは非ヒト哺乳動物胚のような胚の成長に適している。他の実施形態では、このような細胞培養培地は、幹細胞増殖、拡張、および／または分化を高めることができ、生殖体成熟を高めることができ、あるいは胚の発達を高めることができる。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は成長に適しており、任意に、酵母または細菌の成長を高めることができる。いくつかの実施形態では、細菌は大腸菌またはビフィドバクテリウムおよびラクトバチルス属の細菌のようなプロバイオティック細菌である。前記実施形態のいずれか一つにより、本発明の細胞培養培地は、細胞の成長に適したいずれかの培地であり得、例えば、生物学的流体を含む天然培地、あるいは平衡化塩溶液、基礎培地、または複合培地のような人工培地などが挙げられる。本発明の細胞培養培地は、さらに従来技術で知られているように補充され得る。本発明により、細胞培養培地は、少なくとも１種類の安定化剤で安定化されたＡＣＣによって補充される。安定化剤は従来技術で知られているいずれかの物質であり得る。特定の実施形態では、安定剤は、無機ポリリン酸のようなポリリン酸、リン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、有機酸、およびそれらのいずれかの併用から選択される。いくつかの実施形態により、安定化剤は当該安定剤の組み合わせであり、例えば、クエン酸のような有機酸との無機ポリリン酸の併用、または有機酸とのリン酸化アミノ酸の併用などが挙げられる。

【０００８】

別の態様により、本発明は細胞培養培地へのサプリメントとして使用するために、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を提供する。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは培地の調製の際に培地に加えられる。別の実施形態により、ＡＣＣは使用前に培地に加えられる。

【０００９】

さらに別の態様により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を含む細胞培養培地サプリメントを提供する。一つの実施形態により、細胞培養培地サプリメントは安定化されたＡＣＣを含み、安定化ＡＣＣは培地の調製の際に培地に加えられる。別の実施形態により、サプリメントは使用前に培地に加えられる。細胞培養培地サプリメントは、固体、液体、または半液体サプリメントであり得る。前記実施形態のいずれか一つにより、ＡＣＣは少なくとも１種類の安定化剤によって安定化される。このような細胞培養培地サプリメントは、細胞、組織、および器官の成長を高めることができ、例えば、増殖、成熟、繁殖、再生、発達、および／または分化を高めることができる。

【００１０】

さらなる態様により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化され、細胞培養培地用のサプリメントとして製剤化される無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を提供し、ここで当該ＡＣＣは少なくとも１種類の安定化剤によって安定化される。

【００１１】

別の態様により、本発明は生物学的培養の細胞成長を高めるための方法を提供し、生物学的培養を少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣに暴露することを含む。いくつかの実施形態により、生物学的培養は、細胞の培養、細胞培養、組織培養、器官培養、および細菌培養から選択される。一つの実施形態では、本方法は、細胞成長を高める、特に、筋管形成を高める、胚発達を高める、神経細胞の再生を高める、ならびに生殖体の成熟および／または保存を高めることを含む。

【００１２】

一つの態様により、本発明は、本発明の細胞培養培地用のサプリメントとして使用するためのＡＣＣ、または安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメント、および細胞培養培

地と組み合わせた当該ＡＣＣまたは当該サプリメントの使用のための取扱説明書を含むキットを提供する。特定の態様により、本発明は少なくとも１種類の安定剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）、および細胞培養培地と組み合わせる当該ＡＣＣの使用のための取扱説明書を含むキットを提供する。一つの実施形態により、ＡＣＣは細胞培養培地サプリメントとしての使用のためのものである。いくつかの実施形態により、本キットは少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメント、および細胞培養培地と組み合わせる当該ＡＣＣの使用ための取扱説明書を含む。本発明のキットはさらに、細胞、組織、または器官の成長に適したいずれかの既知の培地を含み得る。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】培養した脊髄－後根神経節（ＳＣ－ＤＲＧ）スライスから得た神経発芽における異なるカルシウム源の効果を示す図である。下記のカルシウム化合物（２ｍＭのCa^{2+}濃度）に暴露されたＳＣ－ＤＲＧスライスから成長した神経線維の免疫蛍光染色（抗神経細糸抗体）。（Ａ）ＡＣＣ－エチドロン酸、（Ｂ）ＡＣＣ－ホスホセリン、（Ｃ）胃石、（Ｄ）結晶炭酸カルシウム（ＣＣＣ）、および（Ｅ）$CaCl_2$溶液（対照）。原倍率×１００。

【図２】キトサンマイクロキャリア（ＭＣ）で培養された脳細胞から得られる神経発芽における、（Ａ）エチドロン酸によって安定化されたＡＣＣ、および（Ｂ）$CaCl_2$溶液（対照）の効果を示す図である。ＡＣＣ－エチドロン酸または$CaCl_2$のどちらかの２ｍＭ存在下における培養３０日後に、脳細胞－キトサンＭＣ凝集物から成長した神経線維の免疫蛍光染色（抗神経細糸抗体）を示す。

【図３】健全な骨格筋培養における筋管の形成に対するＡＣＣの効果を示す図である。原倍率×４０。骨格筋培養は、下記のカルシウム化合物に暴露させた（２ｍＭの最終Ca^{2+}濃度）。ＡＣＣ－エチドロン酸、ＡＣＣ－ＡＤＰ、胃石、結晶炭酸カルシウム（ＣＣＣ）、および$CaCl_2$溶液（対照）。培養を４日および７日後に固定してギムザで染色した。骨格筋培養による筋管形成の向上がＡＣＣ処理細胞で認められた。

【図４】ｍｄｘ細胞株培養における筋管の初期形成に対する培養培地中のＡＣＣの効果を示す図である。$CaCl_2$、ＡＣＣ－ＥＴ、およびＡＣＣ－ホスホセリン（ＡＣＣ－ＰＳ）を含む培地に暴露された培養のギムザ染色を示す。原倍率×１００。

【図５】２種のＡＣＣ調製物（ＡＣＣ－ＥＴおよびＡＣＣ－ＰＳ）対$CaCl_2$に暴露されたｍｄｘ筋細胞株で測定されたクレアチニンキナーゼ（ＣＫ）量を示す図である。

【図６】ｍｄｘマウス一次培養における筋管の形成に対するＡＣＣ（ＡＣＣ－ＰＳ、ＡＣＣ－ＰＰ対対照（$CaCl_2$））の効果（ギムザ染色、原倍率×５０）を示す図である。

【図７】ｍｄｘマウス一次培養における筋管の形成に対するＡＣＣの効果を、ミオシンの免疫染色によって実証して示す図である。対照（$CaCl_2$）、ＡＣＣ－ＰＳ、ＡＣＣ－ポリリン酸（ＡＣＣ－ＰＰ）。原倍率×１００。

【図８】インビトロでのマウス胚発達に対する安定化ＡＣＣの効果を示す図である。

【図９】様々な培地処理の機能として培養１０日後の骨芽細胞のアリザリンレッド染色を示す図である。培地はＡ－ＡＣＣ、Ｂ－$CaCl_2$の１ｍＭの追加Ca^{2+}が補充され、Ｃ－対照はCa^{2+}未補充だった。

【図１０】様々な培地処理の機能として培養１０日後の骨芽細胞のアルカリホスファターゼ染色を示す図である。培地はＡ－ＡＣＣ、Ｂ－$CaCl_2$の１ｍＭの追加Ca^{2+}が補充され、Ｃ－対照はCa^{2+}未補充だった。

【図１１】添加された１ｍＭの追加Ca^{2+}の異なる供給源による培地で成長させたｍｄｘ細胞株のアリザリンレッド染色（Ａ～Ｃ）およびアルカリホスファターゼ（Ｄ～Ｆ）を示す図である。ＡおよびＤ－ＡＣＣ、ＢおよびＥ－$CaCl_2$、またはＣおよびＦ－対照（カルシウムの追加補充なし）。

【図１２】卵母細胞を囲む顆粒膜細胞が完全であるインビトロ培養された卵巣（Ａ）の安定化ＡＣＣの効果を、不完全な顆粒膜細胞および卵母細胞が胚胞段階で観察される対照（

Ｂ）（培地にＡＣＣ無添加）に対して示す図である。本発明の詳細な説明

【００１４】

細胞培養培地へのＡＣＣの添加が様々なタイプの細胞の成長を高めることが驚くべきことに発見されている。一つの態様により、本発明は無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）が補充された細胞培養培地を提供し、ここで当該ＡＣＣは少なくとも１種類の安定化剤によって安定化される。他の態様により、本発明は細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣを提供する。特定の態様では、本発明は安定化ＡＣＣを含む細胞培養サプリメントを提供する。

【００１５】

本発明の各態様のため、個別的および集合的に、次の用語が使用され、特定のパラメータが後述のように定められる。

【００１６】

用語「細胞培養培地」、「成長培地」、および「培養培地」は本明細書において交換可能で使用され、細胞、組織、または器官のような生物学的培養の成長に使用される、適している、または維持することができ、当該細胞、組織、または器官に適切な環境をもたらす培地を意味する。異なる細胞培養培地は異なる特性を有して異なる成分を含み得るが、ほとんどすべての培地は等張性培地であり、細胞成長に適した浸透圧を有する。このため、細胞培養培地は等張性細胞培養培地である。本明細書で使用される用語「等張性」は、３７℃で２７０～３００ｍＯｓｍｏｌ／ｋｇの範囲である水溶液の浸透圧を有する細胞培養培地を意味する。このため、一つの実施形態では、水またはより特定的には脱イオン水は、それ自体は細胞培養培地として考えられない。いくつかの実施形態により、組織培養は塩化ナトリウム、塩化カルシウム、および第一または第二リン酸ナトリウムのような亜リン酸塩源を含む。いくつかの実施形態により、培地は細胞培養、組織培養、器官培養、または器官を成長させるのに適している。細胞は真核生物または原核生物であり得る。特に、細胞培養培地は、細胞の成長真核生物培養、組織培養、または器官培養に適している培地を意味する。いくつかの実施形態では、培地は完全培地、基礎培地、細胞培養培地サプリメントが補充された基礎培地、様々な量の血清を有する培地、または化学的に規定された培地であり得る。

【００１７】

本明細書で使用される用語「補充された」は、少なくとも１種類の安定剤によって安定化ＡＣＣが加えられた培地を意味し、このため、培地は少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣを含む。用語はＡＣＣとともに調製された培地およびＡＣＣが使用前に添加される培地を包含する。

【００１８】

このため一つの態様では、本発明は細胞培養培地を提供し、ここで細胞培養培地は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）が補充され、ここで当該細胞培養培地は生物学的培養の成長に適している。

【００１９】

用語「培養」、「生物学的培養」、および「細胞の培養」は本明細書において交換可能で使用され、所定の条件においてインビトロで成長された細胞、組織、器官培養、または器官を意味する。いくつかの実施形態では、生物学的培養は動物、植物、または昆虫の細胞培養、動物、植物、または昆虫の組織培養、動物、植物、または昆虫の器官培養、酵母培養、および細菌培養から選択される。

【００２０】

本明細書で使用される用語「細胞培養」は、インビトロ環境で人工的に維持、培養、または成長される多細胞真核細胞の細胞を意味する。細胞培養は、細胞が一定の撹拌によって、またはマイクロキャリアにおいて液体培地で培養される懸濁培養、あるいは接着または単層培養であり得る。

【００２１】

本明細書で使用される用語「組織培養」は、インビトロで維持または成長される組織を

意味する。
【００２２】
本明細書で使用される用語「器官培養」は、インビトロで培養される器官の一部または全器官を意味する。
【００２３】
用語「幹細胞」は、異なる細胞型に増殖および分化する能力を有する細胞を意味する。
【００２４】
用語「無定形炭酸カルシウム」および「ＡＣＣ」は本明細書において交換可能で使用され、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された炭酸カルシウムの非結晶型を意味する。ＡＣＣは天然源または化学的な合成から得ることが可能である。用語はまた、胃石から得られるＡＣＣのような自然に安定化されたＡＣＣも含む。
【００２５】
本明細書で使用される用語「天然ＡＣＣ」は、天然源から分離または派生されるいずれかのＡＣＣを意味する。ＡＣＣの天然源の非限定的な例には、淡水甲殻類の胃石が含まれる。
【００２６】
本明細書で使用される用語「合成ＡＣＣ」は、ヒトによって生体外で産生および／または派生されるいずれかのＡＣＣを意味する。
【００２７】
いくつかの実施形態により、本発明による細胞培養培地は生物学的培養の成長に適している。一つの実施形態により、生物学的培養は真核細胞または原核細胞の培養である。本明細書で使用される用語「成長」は、増殖、成熟、繁殖、再生、維持、分化、発達、保存、凍結保存、およびそれらのいずれかの組み合わせのいずれかを包含し、細胞型に従って様々に使用され得る。一つの実施形態により、細胞培養培地は細胞を維持するため、増殖または繁殖のために適している。一つの例示的な実施形態では、細胞培養培地は真核細胞、例えば、単細胞生物または多細胞生物の細胞などの増殖または繁殖に適している。別の例示的な実施形態により、細胞培養培地は原核細胞の増殖または繁殖に適している。別の実施形態により、細胞培養は細胞の成熟および／または発達、例えば、胚の発達または生殖細胞の成熟などに適している。本明細書で使用される用語「胚」は、受精した哺乳動物卵母細胞、すなわち接合子、および発達のその初期段階でこの接合子から発達する多細胞生物を意味する。用語「生殖体」または「生殖細胞」は本明細書において交換可能で使用され、新しい二倍体個体の形成を開始することができるいずれかの雄または雌生殖細胞を意味する。生殖体の例は精子および卵母細胞である。本明細書において交換可能で使用される用語「精子（ｓｐｅｒｍ）」および「精子（ｓｐｅｒｍａｔｏｚｏａ）」は、雄の生殖細胞を意味する。用語「精子サンプル」は、精子を含む１つ以上のサンプルを意味する。精子サンプルは、被験体から得られる精液または処理された精液、液化精液、沈殿化および任意に再懸濁化精液などであり得る。いくつかの実施形態により、細胞培養培地は細胞の再生、例えば神経細胞の再生などに適している。本明細書で使用される用語「ニューロン再生」および「神経再生」は交換可能で使用され得、損傷した神経の機能の回復を意味する。具体的には、これは末梢または中枢神経系の損傷部位を修復すること、つまり軸索および樹状神経線維再成長による、神経を介したシグナル化の回復を含む。いくつかの実施形態では、神経再生は損傷した神経線維から発芽することを意味する。従って、本発明による細胞培養培地は、重大な神経線維再生を促進することができる。別の実施形態により、細胞培養培地は細胞の分化、例えば、幹細胞の分化、特に幹細胞の骨芽細胞への分化に適している。いくつかの実施形態により、細胞培養培地は組織培養および器官培養の増殖を維持するのに適している。いくつかの実施形態により、細胞培養培地は器官のインビトロ保存に適している。
【００２８】
いくつかの実施形態により、本発明による安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、生物学的培養の本明細書において前記で定められた成長を高めることができる。本明細書

で使用される用語「高める」は、成長パラメータを促進、改善、増大、改良、一般的には増加することを意味する。本発明のいくつかの実施形態により、用語「高めることができる」および「高める」は交換可能で使用される。高めることは、同一条件で成長されるがＡＣＣが添加されないコントロールサンプルと比較して測定され得る。このため一つの実施形態では、本発明による安定化ＡＣＣで補充された細胞培養培地は、細胞、組織、または器官の増殖、成熟、繁殖、再生、発達、凍結保存、および／または分化を高めることができる。一つの実施形態により、細胞培養培地は幹細胞の分化を高めることができる。別の実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は細胞の増殖を高めることができる。さらに別の実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は細胞の成熟を高めることができる。さらなる実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は細胞または組織の発達を高めることができる。特定の実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は細胞の再生を高めることができる。細胞、組織、または器官の増殖、成熟、繁殖、再生、発達、および／または分化の向上は、前述で定められる対照との比較における向上の割合として測定され得る。従って、一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、成長パラメータを約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０％～約１００％高めることができる。１００％の向上は２倍に増加したパラメータ、例えば増殖を意味し、２００％の向上は３倍に増加したパラメータ、例えば胚発達を意味する、などである。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００％～約５００％、約１２０％～約４００％、約１５０％～約３００％高められる。

【００２９】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は成長に適しており、任意に、真核細胞の培養、例えば、真核細胞、組織、または器官培養の成長を高めるのに適している。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は真核細胞の成長のためのものである。いくつかの実施形態により、真核細胞の培養は、動物、植物、および昆虫細胞の培養から選択される。

【００３０】

一つの実施形態により、真核生物の細胞、組織、または器官培養の培養は、動物細胞、組織、または器官培養、幹細胞、胚、および器官である。いくつかの実施形態により、動物はヒトまたは非ヒト哺乳動物である。そのため一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、哺乳動物細胞、組織、または器官培養、哺乳動物幹細胞、哺乳動物胚、または哺乳動物器官の成長、および任意に成長を高めるのに適している。

【００３１】

一つの実施形態により、哺乳動物はヒトであり、そのため一つの実施形態により、本発明による細胞培養培地はヒト細胞、組織、または器官培養、幹細胞、胚、あるいは器官の培養の成長に適している。

【００３２】

他の実施形態により、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。一つの実施形態により、非ヒト哺乳動物は、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラバ、ロバ、スイギュウ、またはラクダのような家畜動物である。別の実施形態では、非ヒト哺乳動物は、ネコまたはイヌなどの家庭用愛玩動物、マウス、ラット、モルモット、またはハムスターのようのげっ歯類、ウサギのようなウサギ目、あるいはサル（例えば、マカク）または類人猿（例えば、チンパンジー）などの霊長類である。

【００３３】

いくつかの実施形態により、本発明による細胞培養培地は哺乳動物細胞培養の成長に適している。いくつかの実施形態により、哺乳動物細胞培養、つまりヒトまたは非ヒト哺乳動物細胞培養のどちらかは、神経、筋肉、上皮、骨、脂肪、幹細胞、生殖体、および血液細胞の細胞培養から選択される。一つの実施形態により、細胞培養は筋細胞培養である。別の実施形態により、細胞培養は神経細胞培養である。さらなる実施形態により、細胞培

養は骨または骨細胞の細胞培養である。一つの実施形態により、細胞培養は骨髄細胞培養である。別の実施形態により、細胞培養は腫瘍または癌細胞である。いくつかの実施形態により、本発明によるＡＣＣが補充された細胞培養培地は、当該細胞培養の成長を高めることができる。いくつかの実施形態により、細胞培養は懸濁または接着細胞培養である。

【００３４】

いくつかの実施形態により、細胞培養は一次培養である。本明細書で使用される用語「一次培養」は、組織から分離されて、適切な条件下で増殖された細胞を意味する。

【００３５】

別の実施形態により、細胞培養は細胞株である。用語「二次培養」および「細胞株」は本明細書において交換可能で使用され、継代培養された一次培養、すなわち、一つの培養容器から別の培養容器に移された一次培養を意味する。いくつかの実施形態により、細胞株は有限細胞株、すなわち、限定された寿命を有して限定された細胞世代数によって完了する細胞株である。別の実施形態により、細胞株は連続細胞株、すなわち、無限に分裂する能力を獲得した不死細胞株である。

【００３６】

一つの特定の実施形態により、細胞株はＦＭ３、ＨｅＬａ、２９３、Ａ－５４９、ＡＬＣ、ＣＨＯ、ＨＢ５４、ＨＬ６０、ＣＯＳ－７、ＨＥＫ２９３、ＶＥＲＯ、ＢＨＫ、ＣＶｌ、ＭＤＣＫ、３Ｔ３、Ｃ１２７　ＭＲＣ－５、ＢＡＥ－１、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、Ｌ－９２９、ＨＥＰ　Ｇ２、ＮＳＯ、Ｕ９３７、ＮＡＭＡＬＷＡ、ＷＥＨＩ２３１、ＹＡＣ１、およびＵ２６６Ｂ１細胞株から選択される。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は当該細胞株の成長を高めることができる。

【００３７】

いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は哺乳動物組織培養の成長に適している。一つの実施形態により、哺乳動物組織培養はヒト組織培養である。別の実施形態により、組織培養は非ヒト哺乳動物組織培養である。一つの実施形態により、組織培養は上皮、結合、筋肉、および神経組織培養から選択される。一つの実施形態により、組織培養は神経組織培養である。別の実施形態により、組織培養は筋組織培養である。さらに別の実施形態により、組織培養は鼻腔嗅粘膜のような、上皮組織培養である。さらなる実施形態により、組織培養は骨組織培養である。

【００３８】

いくつかのより特定的な実施形態により、組織培養は腎臓、肝臓、腺、脳、骨、眼、および筋肉組織培養から選択される。一つの実施形態により、上皮組織培養は皮膚、胃および腸内壁、腎臓、および腺組織培養から選択され、筋組織培養は、平滑、骨格、および心筋組織培養から選択され、神経組織培養は脳、脊髄、および神経組織から選択される。

【００３９】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は当該組織培養の成長を高めることができる。一つの実施形態では、このような培地は神経組織培養の再生を高めることができる。いくつかの実施形態では、培地は神経培養の再生を約１０％～約２００％、約２０％～約１５０％、約３０％～約１２０％、または約４０％～約１００％高めることができる。他の実施形態では、このような培地は、筋管形成を高める、および／または筋細胞の収縮の発生を高めるまたは促進し、筋管の自発的収縮活動の発生までの時間を低下することもできる。一つの実施形態では、培地は筋管形成を約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０％～約１００％高めることができる。本明細書で使用される用語「筋管形成」は、筋芽細胞が多核化線維である筋管に融合する過程を意味する。

【００４０】

いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は幹細胞の成長に適している。いくつかの実施形態により、幹細胞はヒト幹細胞である。別の実施形態により、幹細胞は非ヒト哺乳動物幹細胞である。いくつかの実施形態により、幹細胞は胚性、絨毛性、羊水、造

血性、間葉性、神経、グリア、成体、および誘導多能性幹細胞から選択される。一つの実施形態により、幹細胞は胚幹細胞である。別の実施形態により、幹細胞は造血幹細胞である。さらなる実施形態により、幹細胞は間葉性ヒト幹細胞である。さらに別の実施形態により、幹細胞は多能性幹細胞である。いくつかの実施形態により、幹細胞は成体幹細胞であり、例えば、間葉幹細胞、表皮幹細胞、上皮幹細胞、造血幹細胞、または神経幹細胞が挙げられる。一つの実施形態により、本発明の細胞培養培地は幹細胞の増殖、拡張、および／または分化に適している。別の実施形態により、本発明の細胞培養培地は幹細胞の増殖および／または分化を高めることができる。一つの特定の実施形態により、本発明の細胞培養培地は、幹細胞の骨芽細胞への分化を高める、すなわち、骨芽細胞分化を高めることができる。

【００４１】

いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は胚の成長に適している。一つの実施形態により、本発明の細胞培養培地は胚の発達に適している。別の実施形態により、本発明の細胞培養培地は胚の発達を高めることができる。一つの実施形態では、培地は胚発達を約１０％～約３００％、約２０％～約２５０％、約３０％～約２００％、約４０％～約１５０％、約６０％～約１００％、または約７０％～約９０％高めることができる。用語「胚形成」および「胚発達」は本明細書において交換可能で使用され、従来技術で知られているように、胚が生じて接合子段階から発達して胚になる過程を意味し、分割、緊密化、胚盤胞形成、または胚盤胞孵化の期に達する段階を含む。本明細書で使用される用語「分割」、「緊密化」、「胚盤胞」、および「孵化」は、発生学で日常的に使用される用語を意味する。用語「分割」は、早期胚における細胞の分裂である。元の接合子と同様なサイズの細胞クラスターを生じる。分割から得られる異なる細胞は卵割球と呼ばれる。本明細書で使用される用語「緊密化」は、接合子から生じた分裂細胞が極性化および接着によってこれらの互いの接触を最大にして、堅い結合によって互いを保持する密着球を形成する段階を意味する。本明細書で使用される用語「胚盤胞」は、緊密化段階後に発達され、引き続き胚を形成する内細胞塊、ならびに内細胞塊および胞胚腔と呼ばれる流体が充満した孔を囲む胚盤胞の外層を含む構造を意味する。本明細書で使用される用語「孵化」は、胚がその外殻（透明帯）を通って出現する段階を意味する。

【００４２】

本明細書で使用される用語「胚発達を高める」は、発達過程の速度および／または効率を促進、向上、または改善すること、ならびに順調に成長および発達した胚の割合を意味する。向上は、同一処理を実施するが、成長培地にＡＣＣが添加されていない対照サンプルと比較して測定される。一つの実施形態により、胚はヒト胚である。別の実施形態により、胚は非ヒト哺乳動物胚である。いくつかの実施形態により、非ヒト哺乳動物は、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラバ、ロバ、スイギュウ、またはラクダから選択される。いくつかの他の実施形態では、非ヒト哺乳動物は、ネコ、イヌ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、サル、または類人猿から選択される。

【００４３】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地は前述のように、胚または生殖体の凍結保存を改善または延長することができる。本明細書で使用されるとき、用語「凍結保存」は胚の生殖体のような細胞の、超低温、通常液体窒素（－１９６℃）での保存を意味する。

【００４４】

いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は生殖細胞の成長に適している。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は生殖細胞の成熟および／または保存に適している。一つの実施形態により、生殖細胞は卵母細胞である。別の実施形態により、生殖細胞は精子細胞である。前記実施形態のいずれか一つにより、生殖細胞はヒトまたは非ヒト哺乳動物の生殖細胞である。いくつかの実施形態により、非ヒト哺乳動物は、家畜動物、家庭用愛玩動物、げっ歯類、野生動物、および霊長類からなる群から選択される。一つの実施形態では、家畜動物は、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラバ、ロバ、スイギュウ、およびラクダから選択される。いくつかの他の実施形態では、家庭

用愛玩動物はネコまたはイヌであり、げっ歯類はラット、マウス、モルモット、またはハムスターであり、ウサギ目はウサギであり、霊長類はマカクのようなサルまたはチンパンジーのような類人猿である。

【００４５】

別の実施形態により、生殖細胞は非哺乳動物の生殖細胞である。いくつかの実施形態により、非哺乳動物は魚類、昆虫、および鳥類からなる群から選択される。

【００４６】

一つの実施形態により、生殖細胞はヒト精子細胞または卵母細胞である。

【００４７】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は卵母細胞または精子の成熟を高めることができる。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は精子の質を改善することができる。用語「精子の成熟を高める」および「精子の質を改善する」は本明細書において交換可能で使用され、精子の質を改良すること、例えば、精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせなどを意味する。そのため、一つの実施形態では、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせを可能にする。本明細書で使用される用語「精子運動率」は、所定の標本サンプルにおけるすべての精子の中で動く精子の割合を意味する。本明細書で使用される用語「前進運動率」は、おおよそ一定方向に移動する精子の割合を意味する。本明細書で使用される用語「精子運動率を高める」および「精子前進運動率を高める」は、それぞれ運動性精子および前進運動性を有する精子の割合を増加することを意味する。従って、一つの実施形態では、本発明は精子運動率を高めるための方法を提供する。別の実施形態により、本発明は精子前進運動率を高めるための方法を提供する。精子運動率、前進運動率、および精子成熟期は、従来技術で知られている方法によって評価され得る。例えば、運動率はコンピュータ支援精子分析（ＣＡＳＡ）法（Ａｍａｎｎ＆Ｗａｂｅｒｓｋｉ，２０１４，Ｔｈｅｒｉｏｇｅｎｏｌｏｇｙ，８１：５－１７）によって評価され得る。用語「精子サンプル」は、精子を含む１つ以上のサンプルを意味する。精子サンプルは、被験体から得られる精液または処理された精液、液化精液、沈殿化および任意に再懸濁化精液などであり得る。いくつかの実施形態により、精子数を増加させることは、運動率または前進運動率処理における精子数を増加させることを含む。一つの実施形態により、運動率または前進運動率処理はスイムアップ法である。

【００４８】

いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は器官組織または器官の成長に適している。いくつかの実施形態により、器官組織または器官は卵巣、角膜、心臓、腎臓、膵臓、肝臓、脾臓、肺、精巣、膀胱、および血液小胞から選択される。一つの特定の実施形態では、器官組織または器官は卵巣である。このため、本発明の細胞培養培地は器官組織または器官の保存を高める、または維持することができる。

【００４９】

いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は植物細胞の成長に適している。いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は成長植物培養培地に適している。別の実施形態により、本発明の細胞培養培地は成長植物組織培養に適している。用語「植物細胞培養」は、植物の組織または細胞由来の植物細胞を意味し、容器またはレシピエントで培養される。用語「植物組織培養」は、カルス組織（カルス）、分化した培養組織、または培養した器官組織を含む。用語「カルス」は、植物組織（外植片）由来の未組織化柔細胞の塊を意味する。

【００５０】

別の実施形態により、本発明の細胞培養培地は昆虫細胞の成長に適している。一つの実施形態により、昆虫細胞は昆虫細胞培養、例えば、昆虫細胞株などである。細胞型は前述の通りである。一つの特定の実施形態では、細胞株はＳｆ９、Ｓｆ２１、およびｈｉｇｈ－ｆｉｖｅ細胞株から選択される。別の実施形態により、本発明の細胞培養培地は成長昆

虫組織培養に適している。さらなる実施形態により、昆虫細胞は昆虫器官培養である。
【００５１】
いくつかの実施形態により、細胞培養は懸濁または接着細胞培養である。
【００５２】
一つの実施形態では、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、植物細胞または組織培養の成長を高めることができ、あるいは昆虫細胞、組織、または器官培養の成長を高めることができる。
【００５３】
前記実施形態のいずれか一つにより、動物、植物、または昆虫の細胞、組織、または器官培養の成長に適した本発明の細胞培養培地は、本発明で定められるように、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充された天然培地または人工培地であり得る。いくつかの実施形態により、培地は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充される天然培地である。いくつかの実施形態により、天然培地は血漿、血清、リンパ、ヒト胎盤臍帯血、および羊水から選択される生物学的流体を含む。別の実施形態により、天然培地は、肝臓、脾臓、腫瘍、リンパ球、および骨髄の抽出物のような組織抽出物、ウシ胚およびニワトリ胚の抽出物を含む。さらなる実施形態により、天然培地は凝固剤または血餅を含む。いくつかの実施形態により、培地は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充される人工培地である。一つの実施形態により、人工培地は平衡化塩溶液である。平衡化塩溶液の例は、ＰＢＳ、ＤＰＢＳ、ＨＢＳＳ、ＥＢＳＳ、タイロードＴ６、ＷＭ１、プールＰ１、クインＨＴＦ、およびガードナーＧ１である。別の実施形態により、人工培地は基礎培地である。いくつかの実施形態により、培地はさらに従来技術で良く知られているように補充され得る。一つの実施形態により、培地は血清、例えば、ウシ胎児血清によって補充される。さらなる実施形態により、人工培地は複合培地である。
【００５４】
本明細書で使用される用語「基礎培地」は、無機塩、糖、アミノ酸の栄養素混合物を意味し、任意にまたビタミン、有機酸、および／または緩衝剤を含む。サプリメントを伴う基礎培地は、細胞の生命、成長、および再生産を支持するのに必要な栄養素を提供する。使用される基礎培地の選択は、培養に適したものであるべきである。
【００５５】
一つの実施形態により、人工培地は無血清培地である。さらなる実施形態により、人工培地は血清含量が低下した培地である。別の実施形態により、人工培地は無タンパク質培地である。
【００５６】
少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充され、本発明によって使用され得る細胞培地の例は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＥＭＥＭ）、ＲＰＭＩ１６４０培地（ロズウェルパーク記念研究所で開発された）、およびイーグル基礎培地（ＢＭＥ）である。本発明による培地のさらなる例は、ハム栄養混合物であり、ハムＦ－１０、ハムＦ－１２、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２（ＤＭＥＭおよびハムＦ－１２）が挙げられる。他の例は、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）、ｏｐｔｉ－ＭＥＭ、およびグラスゴ－ＭＥＭ（ＧＭＥＭ）である。昆虫細胞成長に適した培地の例は、ＩＰＬ－４１昆虫培地、シュナイダーショウジョウバエ培地、グレース昆虫培地、無血清昆虫培地、Ｓｆ－９００、ＴＣ－１０、Ｓｈｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｓａｎｇ Ｍ３昆虫培地、ＴＣ－１００昆虫培地、ＴＭＭ－ＦＨ昆虫培地、およびＩＰＬ－１０である。胚成長に適した培地の例は、ＳＡＧＥ１－Ｓｔｅｐ（商標）のような単一培養培地、またはＱｕｉｎｎｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）逐次培地（ＯＲＩＧＩＯ）のような逐次培地である。植物細胞成長に適した培地の例は、ムラシゲスクーグ（ＭＳ）、Ｂ５、Ｎ６、およびニッチ培地である。
【００５７】
培地の他の例は、改変培地、ＮＣＴＣ培地、ＭｅｇａＣｅｌｌ培地、クレイコム、クリ

ック培地、Ｌ－１５培地、培地１９９、ＭＣＤＢ培地、エイムス培地、ＢＧＪｂ培地（フィットン－ジャクソン改変）、クリック培地、ＣＭＲＬ－１０６６培地、マッコイ５Ａ改変培地、ＮＣＴＣ培地、スイムＳ－７７培地、ウェイマウス培地、ウィリアム培地Ｅ、ならびに体外受精培地、例えば、ｇｌｏｂａｌ（登録商標）、ＧＭ５０１、ＳＳＭ（商標）、分割Ｋ－ＳＩＣＭ、胚細胞Ｋ－ＳＩＢＭ、Ｑｕｉｎｎｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（登録商標）分割、Ｑｕｉｎｎｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（登録商標）胚細胞、ＦＥＲＴＩＣＵＬＴ（商標）ＩＶＦ培地、ＦＥＲＴＩＣＵＬＴ（商標）Ｇ３培地、ＩＶＣ－ＴＷＯ（商標）、ＩＶＣ－ＴＨＲＥＥ（商標）、ＥＣＭ（登録商標）、ＭｕｌｔｉＢｌａｓｔ（登録商標）、ＥｍｂｒｙｏＡｓｓｉｓｔ（商標）、ＢｌａｓｔＡｓｓｉｓｔ（商標）、ＩＳＭ１、ＩＳＭ２、Ｇ－１（商標）ＰＬＵＳ、Ｇ－２（商標）ＰＬＵＳ、ＩＶＦ（商標）、およびＣＣＭ（商標）である。培地のさらなる例は、精子分離用培地であるＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））など、精子洗浄用培地であるＱｕｉｎｎｓ（商標）Ｓｐｅｒｍ Ｗａｓｈｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、またはゲンタマイシン添加改変ＨＴＦ培地など、精子受精能獲得用培地であるビガーズ－ウィッテン－ウィッティンガム（ＢＷＷ）培地、ハム－Ｆ１０、および改変タイロード培地（ＨＳＭ）など、ならびに未成熟卵母細胞を移植に適した完全に発達した胚に培養することができる成熟用培地である。他の実施形態では、培地は卵母細胞成熟用の培地であるＳＡＧＥ（商標）インビトロ成熟培地（ＩＶＭ）およびＢＯ－ＩＶＭ卵母細胞成熟培地など、受精用培地、胚発達用培地、生殖体ハンドリング用培地、着床前遺伝子診断（ＰＧＤ）用培地、あるいは胚および／または生殖体成熟、ハンドリング、および／または凍結保存用培地である。そのため、一つの実施形態により、細胞培養培地は、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、Ｌ－１５培地（Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ）、ＭＣＤＢ培地、培地１９９、ｏｐｔｉ－ＭＥＭおよびＤＭＥＭ／Ｆ－１２、シュナイダーショウジョウバエ培地、グレース昆虫培地、ＩＰＬ－４１昆虫培地、Ｓｆ－９００、無血清昆虫培地、Ｓｈｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｓａｎｇ Ｍ３昆虫培地、ＴＣ－１００昆虫培地、ＴＮＭ－ＦＨ昆虫培地、ハムＦ－１２、ハムＦ－１０、ＧＭＥＭ、エイムス培地、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、クレイコム、クリック培地、グラスゴー最小必須培地（ＧＭＥＭ）、ＭｅｇａＣｅｌｌ培地、マッコイ５Ａ改変培地、ＮＣＴＣ培地、ウィリアムズ培地Ｅ、ウェイマウス培地、ＴＣ－１０、およびＩＰＬ－１０培地から選択される。別の実施形態により、細胞培養培地は、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ｏｐｔｉ－ＭＥＭ、ＧＭＥＭ、ハムＦ－１２およびＤＭＥＭ／Ｆ－１２、シュナイダーショウジョウバエ培地、グリース昆虫培地、Ｓｆ－９００、ＴＣ－１０、ＩＰＬ－１０培地、精子分離、洗浄、または成熟用培地であるＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、Ｑｕｉｎｎｓ（商標）精子洗浄培地、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、ビガーズ－ウィッテン－ウィッティンガム（ＢＷＷ）培地、ハムＦ－１０、および改変タイロード培地（ＨＳＭ）、およびゲンタマイシン添加改変ＨＴＦ培地など、受精用培地、胚発達用培地、ならびに胚および／または生殖体成熟、ハンドリングおよび／または凍結保存用培地から選択される。

【００５８】

いくつかの実施形態により、本発明の安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は単細胞真核生物の成長に適している。一つの実施形態により、単細胞真核生物はサッカロマイセス、より特定的にはサッカロマイセス・セレビシエのような酵母である。一つの実施形態により、サッカロマイセス・セレビシエなどの単細胞真核生物の成長に適している本発明の細胞培養培地は、酵母抽出物ペプトンデキストロース（ＹＰＤ）、酵母抽出物－ペプトン－グリセロール（ＹＰＧ）、および酵母抽出物－ペプトン－デキストロース（ＹＰＡＤ）培地から選択される。一つの実施形態では、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は酵母の成長を高めることができる。

【００５９】
いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は原核生物の成長に適している。特定の実施形態では、本発明の細胞培養培地は微生物の成長に適している。いくつかの実施形態では、本微生物は微生物叢微生物である。いくつかの実施形態では、本微生物は細菌である。このため、特定の実施形態では、本発明の細胞培養培地は細菌の成長に適している。いくつかの実施形態では、細菌は大腸菌またはビフィドバクテリウムおよびラクトバチルス属の細菌のようなプロバイオティック細菌である。プロバイオティック細菌種株のさらなる例は、ラクトバチルス・パラカセイ、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ラクトバチルス・ジョンソニ、ラクトバチルス・フェルメンタム、ペジオコックス・アシディラクティシィであり、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ラムノサスＧＧ、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ラクチス、ラクトバチルス・ブルガリカス、ラクトバチルス・シリバリウス、ラクトバチルス・プランタルム、ラクトバチルス・ロイテリ、ラクトバチルス・カゼイ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、サッカロマイセス・ブラウディ、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、バチルス・コアグランス、ラクトバチルス・ブレビスなどが挙げられる。いくつかの実施形態により、細菌の成長に適した培地はＬＢおよびＭ９から選択される。一つの実施形態では、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は細菌の成長を高めることができる。

【００６０】
いくつかの実施形態により、本発明の細胞培養培地は古細菌の成長に適している。一つの実施形態では、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は古細菌の成長を高めることができる。

【００６１】
本発明の態様および実施形態のいずれか一つにより、ＡＣＣは少なくとも１種類の安定化剤によって安定化される。用語「安定化剤」および「安定剤」は本明細書では交換可能で使用され、炭酸カルシウムをＡＣＣ生産、製剤化、保存、および使用の際に無定形状態に維持するのに寄与するいずれかの物質を意味する。特定の実施形態では、安定化剤は単剤である。他の実施形態では、いくつかの安定化剤の使用が包含される。用語「安定化ＡＣＣ」および「少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣ」は、いくつかの実施形態では交換可能で使用され得る。

【００６２】
安定剤は１つ以上の官能基を有する分子を含み得、限定されないが、ヒドロキシル、カルボキシル、エステル、アミン、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、スルホニル、サルフェート、またはスルフィン基から選択される。水酸化物と結合されるヒドロキシ含有化合物は、任意にカルボキシルなどの他の官能基も有するが、エステル化されないヒドロキシルを伴う。

【００６３】
いくつかの実施形態により、安定剤は哺乳動物細胞または生物、特にヒトに対して毒性が低いまたは毒性を有さない。いくつかの実施形態により、安定剤は食品、栄養補助食品、または医薬品グレードである。

【００６４】
特定の実施形態では、ＡＣＣ安定化剤は各存在において独立して、有機酸；リン酸化、ホスホン酸化、硫酸化、またはスルホン酸化有機化合物；ヒドロキシルカルボン酸のリン酸または硫酸エステル；有機アミン化合物；ヒドロキシルを含む有機化合物；有機亜リン酸化合物またはその塩；リン酸化アミノ酸およびその誘導体、ビスホスホネート；有機リン酸化合物；有機ホスホン酸化合物；有機ポリリン酸、無機ポリリン酸、無機亜リン酸、前記で定められる複数官能基を有する有機化合物；無機リン酸およびポリリン酸化合物；ポリリン酸鎖を有する有機化合物；有機界面活性剤；生体必須無機イオン；サッカライドおよびその誘導体、タンパク質、リン酸化タンパク質、天然および合成バイオポリマーおよびそれらの誘導体、あるいはそれらのいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形

態により、安定剤はまた医薬品活性を有し得、例えばビスホスホネートまたはＡＴＰである。

【００６５】

このため、一つの実施形態では、安定化剤は、無機ポリリン酸のようなポリリン酸、有機酸、リン酸化、ホスホン酸化、硫酸化、またはスルホン酸化有機化合物、ヒドロキシカルボン酸のリン酸または硫酸エステル、リン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、有機ポリリン酸、サッカライドおよびそれらの誘導体、タンパク質、ペプチド、リン酸化タンパク質、リン酸化ペプチド、およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態により、安定化剤は、ホスホセリン、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、フィチン酸、クエン酸、エチドロン酸、ピロリン酸、ポリリン酸、三リン酸、エタノール、ヘキサメタンリン酸、キチン、およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。

【００６６】

いくつかの実施形態により、安定剤は有機酸である。特定の実施形態により、有機酸はアスコルビン酸、クエン酸、乳酸、酢酸、シュウ酸、マロン酸、グルタコン酸、コハク酸、マレイン酸、乳酸、グルタミン酸、アコニット酸、および任意に少なくとも２つのカルボン酸を有して任意に２５０ｇ／ｍｏｌを超えない分子量を有する化合物、例えばクエン酸、酒石酸、リンゴ酸などから選択される。一つの特定の実施形態により、安定剤はクエン酸である。

【００６７】

別の実施形態では、ヒドロキシルカルボン酸のリン酸エステルはホスホエノールピルビン酸である。別の実施形態では、ヒドロキシルカルボン酸のリン酸または硫酸エステルはアミノ酸を含む。このようなエステルの例はホスホセリン、ホスホトレオニン、スルホセリン、スルホトレオニン、およびホスホクレアチンである。

【００６８】

別の実施形態では、安定剤はサッカライドである。一つの実施形態により、サッカライドは、モノ－、ジ－、トリ－、オリゴ－、およびポリサッカライドであり、スクロース、マンノース、グルコース、キトサン、およびキチンなどである。安定剤は、いくつかの実施形態ではグリセロールなどのポリオールである。別の実施形態により、安定剤はアミノ酸であり、セリンまたはトレオニンなどである。それぞれの実現性は本発明の別々の実施形態を示す。

【００６９】

天然および合成バイオポリマーおよび誘導体の非限定例はポリヌクレオチドおよび糖タンパク質である。

【００７０】

食品で承認されているようなＡＣＣ安定剤におけるいくつかの具体的な非限定例は、自然食品またはヒトで認められており、フィチン酸、クエン酸、ピロリン酸ナトリウム二塩基性、アデノシン５’－一リン酸（ＡＭＰ）ナトリウム塩、アデノシン５’－二リン酸（ＡＤＰ）ナトリウム塩、およびアデノシン５’－三リン酸（ＡＴＰ）二ナトリウム塩水和物、ホスホセリン、リン酸化アミノ酸、食品グレード界面活性剤、ステアロイルラクチラートナトリウム、およびそれらの組み合わせを含む。

【００７１】

いくつかの実施形態により、安定剤は、ホスホエノールピルビン酸、ホスホセリン、ホスホトレオニン、スルホセリン、またはスルホトレオニンのようなヒドロキシルカルボン酸のリン酸または硫酸エステル、ならびに例えば、スクロース、マンノース、グルコースなどのモノ－、ジ－、トリ－、オリゴ－、およびポリサッカライドから選択されるサッカライドから選択される、少なくとも１種類の成分を含む。ヒドロキシ含有化合物はさらに、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのような、少なくとも１種類の水酸化アルカリを含み得る。リン酸化された酸は、オリゴペプチドおよびポリペプチドに存在し得る。本発明の別の実施形態では、安定剤はモノカルボン酸または多カルボン酸、例えば、ジカル

ボン酸またはトリカルボン酸から選択される有機酸である。それぞれの実現性は本発明の別々の実施形態を示す。有機酸は前記で定める通りであり得る。

【００７２】

本発明のいくつかの実施形態では、ＡＣＣ安定剤はリン酸化アミノ酸、ポリオール、およびそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、安定なＡＣＣは安定剤としてリン酸化化合物を含み、ここでリン酸化は有機化合物のヒドロキシル基で実施される。いくつかの実施形態では、安定なＡＣＣはクエン酸、ホスホセリン、ホスホトレオニン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。ホスフェート、ホスファイト、ホスホネート基、およびそれらの塩またはエステルを含む安定剤の非限定的な例は、フィチン酸、リン酸ジメチル、リン酸トリメチル、ピロリン酸ナトリウム、ピロリン酸テトラエチル、リブロースビスホスフェート、エチドロン酸、および他の医療用ビスホスホネート、３－ホスホグリセリン酸塩、グリセルアルデヒド３－リン酸、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－リン酸ナトリウム塩、ジエチレントリアミンペンタキス（メチルホスホン酸）、ニトリロトリ（メチルホスホン酸）、５－ホスホ－Ｄ－リボース１－二リン酸五ナトリウム塩、アデノシン５’－二リン酸ナトリウム塩、アデノシン５’－三リン酸二ナトリウム塩水和物、α－Ｄ－ガラクトサミン１－リン酸、２－ホスホ－Ｌ－アスコルビン酸三ナトリウム塩、α－Ｄ－ガラクトース１－リン酸二カリウム塩五水和物、α－Ｄ－ガラクトサミン１－リン酸、Ｏ－ホスホリルエタノールアミン，二ナトリウム塩水和物、２，３－ジホスホ－Ｄ－グリセリン酸五ナトリウム塩、ホスホ（エノール）ピルビン酸一ナトリウム塩水和物、Ｄ－グリセルアルデヒド３－リン酸、ｓｎ－グリセロール３－リン酸リチウム塩、Ｄ－（－）－３－ホスホグリセリン酸二ナトリウム塩、Ｄ－グルコース６－リン酸ナトリウム塩、ホスファチジン酸、イバンドロン酸ナトリウム塩、ホスホノ酢酸、ＤＬ－２－アミノ－３－ホスホノプロピオン酸、またはそれらの組み合わせを含む。生体必須無機イオンは、とりわけ、Ｎａ、Ｋ、Ｍｇ、Ｚｎ、Ｆｅ、Ｐ、Ｓ、Ｎ、酸化物の相におけるＰまたはＳ、あるいはアンモニアまたはニトロ基としてのＮを含み得る。

【００７３】

安定剤はさらにホスホン酸化合物を含み得、限定されないが、ビスホスホネート、ポリリン酸など、限定されないがピロリン酸またはポリリン酸または有機ポリリン酸など、限定されないがアデノシン二リン酸（ＡＤＰ）またはアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）などが挙げられる。

【００７４】

任意にＡＣＣはホスホセリンおよびクエン酸の併用によって安定化される。別の実施形態では、ＡＣＣは三リン酸およびクエン酸によって安定化される。

【００７５】

ＡＣＣは１種類を超える安定剤、例えば２種類の安定剤によって安定化され得る。安定なＡＣＣは２種類を超える安定剤を含むことができ、ここで１種類以上の安定剤はＡＣＣの形成および沈殿の際にＡＣＣに加えられ、そのため「内部」安定剤を構成し、別の１種類以上の安定剤はＡＣＣ粒子表面にこれらの形成後に加えられ、そのため「外部」安定化剤を構成する。安定なＡＣＣおよびその調製のためのさらなる例は、国際特許出願番号ＷＯ２００９／０５３９６７、ＷＯ２０１４／０２４１９１、およびＷＯ２０１６／１９３９８２に認められ得る。

【００７６】

いくつかの実施形態では、安定化剤はタンパク質である。一つの実施形態では、タンパク質は天然に産生されて精製されたタンパク質である。別の実施形態では、タンパク質は合成によって産生されたタンパク質である。いくつかの実施形態では、タンパク質はＧＡＰ６５、ＧＡＰ２２、ＧＡＰ２１、およびＧＡＰ１２タンパク質から選択される。別の実施形態では、タンパク質は、ＣｑＣＤＡ１、キチナーゼ２、β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ、ＧＡＭＰ様タンパク質、キチン結合タンパク質、ＣｑＣＢＰ、ＣＡＰ１０、ＧＡＰ１８．２、ＧＡＰ０２５２６、ＣｑＨｃ１、ＣｑＨｃ２、ＣｑＨｃ３、ＣｑＨｃ４、ＣｑＨｃ５、ＣｑＨｃ６、ＣｑＨｃ７、クリプトシアニン１、シクロフィリン、シスタチ

ン１、シスタチン２、ＬＰＳ－ＢＰ、ＬＥＡタンパク質、およびクリスタシアニンから選択され、任意に当該タンパク質はレッドクロウ由来である。特定の実施形態により、タンパク質はリン酸化タンパク質である。

【００７７】

いくつかの実施形態では、安定化剤は、ポリリン酸、リン酸化アミノ酸、有機酸、リン酸化、ホスホン酸化、硫酸化、またはスルホン酸化有機化合物、ヒドロキシカルボン酸のリン酸または硫酸エステル、ビスホスホネート、サッカライド、それらの誘導体、タンパク質、リン酸化タンパク質、天然および合成バイオポリマー、およびそれらの誘導体、ならびにそれらのいずれかの組み合わせから選択される。他の実施形態では、安定化剤は、ホスホセリン、三リン酸、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、フィチン酸、クエン酸、エチドロン酸、ピロリン酸、エタノール、ヘキサメタリン酸、キチン、およびそれらのいずれかの組み合わせから選択される。

【００７８】

いくつかの実施形態では、安定化剤は、有機酸、リン酸化有機酸、ヒドロキシカルボン酸のリン酸または硫酸エステル、リン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、有機ポリリン酸、サッカライド、それらの誘導体、タンパク質、ならびにそれらのいずれかの組み合わせから選択される。

【００７９】

いくつかの実施形態により、少なくとも１種類の安定剤は、ポリリン酸、ビスホスホネート、リン酸化アミノ酸、クエン酸、およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、１種類を超える安定剤、例えば、２、３、または４種類の安定剤が加えられる。

【００８０】

いくつかの実施形態により、安定剤は、ポリリン酸または医薬品として許容可能なその塩である。いくつかの実施形態により、ポリリン酸は、ナトリウム、カリウム、およびポリリン酸の他の欠かせないカチオンからなる群から選択される、生理学的に適合性である水溶性ポリリン酸塩である。一つの実施形態では、ポリリン酸は有機または無機ポリリン酸である。本明細書で使用される用語「ポリリン酸」は、PO_4の高分子量エステルを意味する。いくつかの実施形態により、ポリリン酸は、ポリリン酸ナトリウムおよびカリウムからなる群から選択される、生理学的に適合性である水溶性ポリリン酸塩である。いくつかの実施形態では、ポリリン酸は無機ポリリン酸またはその医薬品として許容可能な塩である。このような塩の非限定的な例は、Ｎａ、Ｋ、Ｍｇ、Ｍｎ、およびＺｎである。いくつかの実施形態により、無機リン酸は２～１０個のリン酸基を含み、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のリン酸基である。いくつかの実施形態により、ポリリン酸はピロリン酸、三リン酸、およびヘキサメタリン酸から選択される。一つの実施形態により、安定剤はピロリン酸またはその医薬品として許容可能な塩であり、ピロリン酸ナトリウムなどが挙げられる。別の実施形態により、安定剤は三リン酸またはその医薬品として許容可能な塩であり、三リン酸ナトリウムなどが挙げられる。用語「三リン酸」および「トリポリリン酸」は本明細書において交換可能で使用される。さらなる実施形態により、安定剤はヘキサメタリン酸またはその医薬品として許容可能な塩であり、ヘキサメタリン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【００８１】

いくつかの実施形態により、安定剤はビスホスホネート、またはその医薬品として許容可能なこの塩である。塩の非限定的な例は、Ｎａ、Ｋ、Ｍｇ、Ｍｎ、およびＺｎである。

【００８２】

本明細書で使用される用語「ビスホスホネート」は、２つのリン酸（$PO(OH)_2$）基を有する有機化合物を意味する。用語はさらにPO_3－有機－PO_3の骨格を有する化合物を意味する。最も一般的なものは、骨粗鬆症を治療する医薬品として使用される一連のビスホスホネートである。いくつかの実施形態により、ビスホスホネートは、エチドロン酸、ゾレドロン酸、メドロン酸、アレンドロン酸、およびそれらの医薬品として許容可

能な塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態により、安定剤はエチドロン酸またはその医薬品として許容可能な塩である。別の実施形態により、安定剤はゾレドロン酸またはその医薬品として許容可能なこの塩である。さらなる実施形態により、安定剤はメドロン酸またはその医薬品として許容可能なこの塩である。いくつかの実施形態により、安定剤はアレンドロン酸またはその医薬品として許容可能な塩である。

【００８３】

特定の実施形態により、安定剤はリン酸化アミノ酸である。一つの実施形態により、リン酸化アミノ酸はホスホセリンである。別の実施形態により、リン酸化アミノ酸はホスホトレオニンである。

【００８４】

いくつかの実施形態により、ＡＣＣ組成物は前記で開示される安定剤の組み合わせを含む。

【００８５】

いくつかの実施形態により、安定剤は前述で定められるポリリン酸またはビスホスホネートであり、安定剤のＰ原子とＡＣＣのＣａ原子の間のモル比（Ｐ：Ｃａモル比）は、約１：９０～１：１である。一つの実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：４０～約１：１である。さらなる実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：３５～約１：２である。特定の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：３０～約１：３である。特定の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：２８～約１：３１である。他の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：２５～約１：４である。さらなる実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：２０～約１：５である。別の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：２０～約１：６である。特定の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：１５～約１：５である。別の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：２５～約１：５である。いくつかの実施形態により、このようなポリリン酸は、ピロリン酸、三リン酸、ヘキサメタリン酸、またはそれらの医薬品として許容可能な塩である。別の実施形態により、ビスホスホネートは、アレンドロン酸、エチドロン酸、ゾレドロン酸、またはメドロン酸であり、Ｐ：Ｃａモル比は前述で定められた通りである。

【００８６】

いくつかの実施形態により、ポリリン酸またはビスホスホネートを含む安定化ＡＣＣのカルシウム含量（Ｃａ含量）は、約１ｗｔ％～約３９ｗｔ％、約５ｗｔ％～約３９ｗｔ％、約１０ｗｔ％～約３９ｗｔ％、約１５ｗｔ％～約３９％、約２０ｗｔ％～約３８ｗｔ％、約２５ｗｔ％～約３８ｗｔ％、または約３０ｗｔ％～約３８ｗｔ％である。用語「Ｃａ含量」および「カルシウム含量」は、本明細書において交換可能で使用され、ＡＣＣの最終組成物におけるカルシウムの含量を意味する。

【００８７】

特定の実施形態では、Ｐ：Ｃａモル比は約１：４０～約１：１であり、Ｃａ含量は約２０ｗｔ％～約３９ｗｔ％である。いくつかの実施形態では、モル比は約１：２８～約１：３であり、Ｃａ含量は約３０ｗｔ％～約３８ｗｔ％である。別の実施形態では、モル比は約１：２５～約１：５であり、Ｃａ含量は約３０ｗｔ％～約３６ｗｔ％である。

【００８８】

いくつかの実施形態により、安定剤は、ポリリン酸、リン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、クエン酸、酒石酸、およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。一つの実施形態により、ポリリン酸は、三リン酸、ピロリン酸、およびヘキサメタリン酸からなる群から選択され、リン酸化アミノ酸はホスホセリンまたはホスホトレオニンであり、ビスホスホネートはアレンドロン酸、エチドロン酸、ゾレドロン酸、およびメドロン酸からなる群から選択される。

【００８９】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは安定化剤を２０ｗｔ％未満、１５ｗｔ％未満、１０ｗｔ％未満、または５ｗｔ％未満含む。いくつかの実施形態では、安定化ＡＣＣは安定化剤を５ｗｔ％まで含む。

【００９０】
一つの実施形態により、安定化ＡＣＣ一次粒子の平均直径は約１０ｎｍ～約５μｍである。別の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の平均直径は約３０ｎｍ～約４００ｎｍである。さらに別の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の平均直径は約３０ｎｍ～３５０ｎｍである。特定の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の平均直径は、約３５ｎｍ～３００ｎｍ、４０ｎｍ～約２５０ｎｍ、約４５ｎｍ～約２００ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、または約６０ｎｍ～約１００ｎｍである。なお別の実施形態により、ＡＣＣの一次粒子は凝集され、凝集体の平均直径は０．５μｍ～３００μｍである。一つのさらなる実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の凝集体の直径は、約１～約１００μｍ、約１０～約５０μｍ、または約２０～約４０μｍである。別の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の凝集体の平均直径は１μｍ～１０μｍである。

【００９１】
前記実施形態のいずれか一つにより、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約２０ｍＭ、約０．５～約１５ｍＭ、約１～約１０ｍＭ、約２～約８ｍＭ、約３ｍＭ～約６ｍＭ、または約４ｍＭ～約５ｍＭである。より特定的な実施形態では、安定化ＡＣＣは、０．５～約４ｍＭ、約１～約３ｍＭ、約１．５～約２．５、あるいは約１、１．５、２、または２．５ｍＭの濃度で存在する。いくつかの実施形態により、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの濃度は、約０．０００１％ｗ／ｖ～約１％ｗ／ｖ、約０．０００５％ｗ／ｖ～約０．５％ｗ／ｖ、約０．００１％ｗ／ｖ～約０．１％ｗ／ｖ、約０．００５％ｗ／ｖ～約０．０５％ｗ／ｖ、約０．０１％ｗ／ｖ～約０．０３％ｗ／ｖである。

【００９２】
いくつかのより具体的な実施形態により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充された細胞培養培地を提供し、ここで安定化剤は無機ポリリン酸のようなポリリン酸、リン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、有機酸、およびそれらのいずれかの組み合わせから選択され、細胞培養培地は（ｉ）筋肉、神経、または骨の細胞または組織培養、（ｉｉ）ヒトまたは非ヒト哺乳動物胚、（ｉｉｉ）幹細胞、（ｉｖ）生殖細胞、または（ｖ）卵巣の成長に適している。いくつかの実施形態により、安定化剤はホスホセリンである。別の実施形態により、安定化剤は三リン酸である。さらに別の実施形態により、安定化剤はホスホセリンと、クエン酸のような有機酸の併用である。さらなる実施形態により、安定化剤は三リン酸ナトリウムのような三リン酸と、クエン酸のような有機酸の併用である。一つの実施形態により、このような細胞培養培地は、筋肉、神経、または骨の細胞または組織培養に適している。より特定的な実施形態により、細胞培養培地は細胞の成長、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を維持および高めることができる。一つの実施形態により、細胞は神経細胞、より特定的には損傷した神経細胞である。このため一つの実施形態により、このような細胞培養培地は損傷した神経の再生を高めることができる。別の実施形態により、細胞は筋細胞、特にデュシェンヌ型筋ジストロフィー細胞のようなジストロフィー筋細胞である。このため、一つの実施形態により、細胞培養培地は筋管形成および／または収縮発生を高めることができる。別の実施形態により、このような細胞培養培地は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物胚の成長に適している。一つの特定の実施形態では、細胞培養培地はヒト胚の成長に適している。さらにより特定的な実施形態では、細胞培養培地はヒト胚の発達を高めることができる。別の実施形態により、このような細胞培養培地は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物生殖細胞の成長に適している。一つの特定の実施形態では、細胞培養培地はヒト生殖細胞の成熟に適している。さらにより特定的な実施形態では、細胞培養培地はヒト生殖細胞の成熟を高めることができる。別の実施形態により、細胞培養培地はヒト精子の成熟を可能にし、例えば、ヒト精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせを可能にする。さらなる実施形態により、このような細胞培地培養は、幹細胞、特にヒト幹細胞の成長に適している。いくつかの実施形態により、幹細胞は胚性、絨毛性、羊水、造血性、間葉性、神経、グリア、成体、および誘導多能性幹細胞から選択される。

一つの実施形態により、このような細胞培養培地は幹細胞の増殖および／または分化に適している。一つの特定の実施形態により、このような細胞培養培地は、ＭＢＡ１３のような幹細胞の骨芽細胞への分化を高めることができる。いくつかの実施形態により、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約８ｍＭ、約０．５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭである。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞の成長パラメータ、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を、約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０～約１５０％、または約７０～約１００％高めることができる。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００％～約５００％、約１２０％～約４００％、約１５０％～約３００％高められる。

【００９３】

いくつかの実施形態により、本発明は、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充された分割、単一培養、または逐次培地のような細胞培養培地を提供し、ここで本剤はホスホセリンまたは三リン酸ナトリウムであり、任意にクエン酸と併用され、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は約０．１～約８ｍＭ、約０．５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭであり、細胞培養培地はヒト胚の発達のような成長を高めることができる。

【００９４】

いくつかの実施形態により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充された、ＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、Ｑｕｉｎｎｓ（商標）精子洗浄培地、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、およびゲンタマイシン添加改変ＨＴＦ培地などの精子分離、洗浄、または成熟のための培地のような細胞培養培地を提供し、ここで本剤はホスホセリンまたは三リン酸ナトリウムであり、任意にクエン酸と併用され、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は約０．１～約８ｍＭ、約０．５～６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭであり、細胞培養培地は精子細胞の成熟を高めことができ、例えば、精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせを可能にする。

【００９５】

他の実施形態により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣが補充された細胞培養培地を提供し、ここで本剤はホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムであり、任意にクエン酸と併用され、細胞培養培地は神経細胞の再生を高めることができる。

【００９６】

他の実施形態により、本発明は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、または任意にウマ血清（ＨＳ）、Ｌ－グルタミン、ゲンタマイシン、およびインスリンが補充されたＤＭＥＭ／Ｆ１２のような細胞培養培地を提供し、ここで当該培地はホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムによって、任意にクエン酸と併用で安定化されたＡＣＣがさらに補充され、ここで細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約８ｍＭ、約０，５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭであり、当該細胞培養培地は筋管形成および／またはデュシェンヌ型筋ジストロフィー症例などの骨格筋細胞における収縮の発生を高めることができる。

【００９７】

他の実施形態により、本発明は、ホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムによって、任意にクエン酸と併用で安定化されたＡＣＣが補充された細胞培養培地を提供し、当該細胞培養培地は幹細胞の分化、特にＭＢＡ１３の骨芽細胞への分化を高めることができ、ここで細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約８ｍＭ、約０．５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭである。

【００９８】

他の実施形態により、本発明は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、または１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭグルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および０．３～０．５％ＮＶＲ－Ｇｅｌを有するＤＭＥＭ／Ｆ１２のような細胞培養培地を提供し、ここで当該培地はホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムによって、任意にクエン酸と併用で安定化されたＡＣＣがさらに補充され、ここで細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約８ｍＭ、約０．５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭであり、当該細胞培養培地は卵巣の保存を高めることができる。

【００９９】

別の態様により、本発明は細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のために、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を提供する。用語「サプリメント」および「細胞培養培地サプリメント」は本明細書において交換可能で使用され、細胞培養培地への添加のための１種類または複数種類の成分を意味する。一つの特定の実施形態において、本用語は細胞培養培地に加えられる、または加えられることが意図された安定化ＡＣＣを意味する。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは培地の調製の際に培地に加えられる。別の実施形態により、ＡＣＣは使用前に培地に加えられる。

【０１００】

一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは生物学的培養を成長させるのに適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１０１】

いくつかの実施形態により、本発明の安定化ＡＣＣは細胞培養培地に加えられるとき、細胞の成長を高める。従って、一つの実施形態では、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、細胞の成長を高めることができる。一つの実施形態では、細胞培養培地へのサプリメントとして使用される安定化ＡＣＣは、細胞、組織、および器官の増殖、成熟、繁殖、再生、発達、および／または分化を高める。一つの実施形態により、本発明の細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのＡＣＣは、幹細胞の分化を高めることができる。別の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのこのようなＡＣＣは、細胞の増殖を高めることができる。さらに別の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのＡＣＣは、例えば生殖体などの成熟を高める、あるいは、例えば胚などの細胞の発達を高めることができる。特定の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのＡＣＣは、細胞の再生を高めることができる。

【０１０２】

一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞の成長パラメータ、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を、約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０％～約１００％高めることができる。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００～約５００％、約１２０～約４００％、約１５０～約３００％高められる。

【０１０３】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地サプリメントは任意の既知細胞培養培地に加えられ得る。いくつかの実施形態により、培地は前述で定められる通りである。一つの実施形態により、細胞培養培地は天然培地または人工培地から選択される。一つの実施形態により、培地はいずれかの生物学的培養、例えば、細胞培養、組織培養、器官培養、単細胞真核生物、または細菌のような微生物の成長のために適している。一つの実施形態により、細胞培養培地は、動物、植物、または昆虫の細胞、組織、および／または器官の培養から選択される培養の成長に適している。別の実施形態により、細胞培養培地は、細菌または酵母の成長に適している。

【０１０４】

いくつかの実施形態により、動物細胞の培養は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物の細胞培養

、組織培養、器官培養、幹細胞、生殖体、胚、および器官から選択される。別の実施形態により、哺乳動物は非ヒト哺乳動物であり、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラバ、ロバ、スイギュウ、またはラクダのような家畜動物、ネコまたはイヌなどの家庭用愛玩動物、マウス、ラット、モルモット、またはハムスターのようのげっ歯類、ウサギのようなウサギ目、あるいはサル（例えば、マカク）または類人猿（例えば、チンパンジー）などの霊長類である。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは一次または二次培養の成長に適した細胞培養へのサプリメントとしての使用のためのものである。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは当該細胞株の成長を高めることができる。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは哺乳動物組織培養の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは幹細胞の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。別の実施形態により、幹細胞はヒトまたは非ヒト哺乳動物幹細胞である。

【０１０５】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは胚の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。一つの実施形態により、本発明の細胞培養培地は胚の成熟および発達に適している。別の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、胚の発達を高めることができる。一つの実施形態により、胚はヒト胚である。別の実施形態により、胚は非ヒト哺乳動物胚である。

【０１０６】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは生殖体の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。一つの実施形態により、本発明の細胞培養培地は生殖体の成熟または保存に適している。別の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、生殖体の成熟または保存、例えば、精子または卵母細胞の成熟または保存を高めることができる。

【０１０７】

別の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、前述のように、胚または生殖体の凍結保存を高めることができる、

【０１０８】

いくつかの実施形態により、精子の成熟を高めることは、精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせから選択される。一つの実施形態により、精子はヒト精子である。別の実施形態により、精子は非ヒト哺乳動物精子である。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは器官培養または器官の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。いくつかの実施形態により、器官組織または器官は、卵巣、角膜、心臓、腎臓、膵臓、肝臓、脾臓、胚、精巣、膀胱、および血液小胞から選択される。一つの特定の実施形態では、器官組織または器官は卵巣である。

【０１０９】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは植物または昆虫細胞の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１１０】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは、動物、植物、または昆虫細胞の成長に適した、生物学的流体、組織抽出物、および血餅から選択される天然培地、あるいは平衡化塩溶液、基礎培地、および複合培地から選択される人工培地である細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、安定化ＡＣＣは、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、Ｌ－１５培地（Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ）、ＭＣＤＢ培地、培地１９９、ｏｐｔｉ－ＭＥＭおよびＤＭＥＭ／Ｆ－１２、シュナイダーショウジョウバエ培地、グレース昆虫培地、ＩＰＬ－４１昆虫培地、Ｓｆ－９００、無血清昆虫培地、Ｓｈｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｓａｎｇ Ｍ３昆虫培地、ＴＣ－１００昆虫培地、ＴＮＭ－ＦＨ昆虫培地、ハムＦ－１２、

ハムＦ－１０、ＧＭＥＭ、エイムス培地、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、クレイコム、クリック培地、グラスゴー最小必須培地（ＧＭＥＭ）、ＭｅｇａＣｅｌｌ培地、マッコイ５Ａ改変培地、ＮＣＴＣ培地、ウィリアムズ培地Ｅ、ウェイマウス培地、ＴＣ－１０、およびＩＰＬ－１０培地から選択される細胞培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは、Ｑｕｉｎｎ’ｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）（ＳＡＧＥ）培地１－Ｓｔｅｐ（商標）のような単一培地、Ｑｕｉｎｎ’ｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）、逐次培地（ＯＲＩＧＩＯ）、ＭＥＤＩＣＵＬＴ、ユニバーサルＩＶＭ、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ｏｐｔｉ－ＭＥＭ、ＧＭＥＭ、ハムＦ－、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２、シュナイダーショウジョウバエ培地、グレース昆虫培地、Ｓｆ－９００、ＴＣ－１０、ＩＰＬ－１０、Ｂ５、Ｎ６、およびニッチ培地のような逐次培地から選択される細胞培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは、精子用培地、ＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、Ｑｕｉｎｎｓ（商標）精子洗浄培地、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、およびゲンタマイシン添加改変ＨＴＦ培地のような精子または成熟用培地、受精用培地、胚発達用培地、ならびに胚および／または生殖体成熟、ハンドリングおよび／または凍結保存用培地から選択される細胞培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１１２】

これらの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのＡＣＣは、細胞培養培地に加えられたときに成長細胞培養、組織培養、または器官培養を高めることができる。

【０１１３】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは単細胞真核生物の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。一つの実施形態により、単細胞真核生物はサッカロマイセス、より特定的にはサッカロマイセス・セレビシエのような酵母である。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは、ＹＰＤ、ＹＰＧ、またはＹＰＡＤ培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１１４】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは、原核生物、例えば細菌などの成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。いくつかの実施形態では、細菌は大腸菌またはビフィドバクテリウムおよびラクトバチルス属の細菌のようなプロバイオティック細菌である。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは、ＬＢおよびＭ９培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１１５】

これらの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、細胞培養培地に加えられたとき、当該酵母または当該細菌の成長を高めることができる。

【０１１６】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは古細菌の成長に適した細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のためのものである。

【０１１７】

いくつかの実施形態により、安定剤は、三リン酸、ホスホセリンのようなリン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、クエン酸、ならびに三リン酸とクエン酸の併用またはホスホセリンとクエン酸の併用のようなそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。

【０１１８】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、乾燥剤形における非晶相で少なくとも７日、少なくとも１ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、または少なくとも１年の期間、安定を維持する。他の実施形

態では、安定化ＡＣＣは細胞培養培地に分散されるとき、少なくとも１時間、少なくとも４、６、８、１２、または２４時間、少なくとも７日間、または少なくとも１ヶ月間、非晶相で安定を維持する。

【０１１９】

前記実施形態のいずれか一つにより、細胞培養培地のためのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、固体、液体、または半液体剤形として製剤化され得る。いくつかの実施形態により、本発明の使用のための安定化ＡＣＣは、固体剤形、例えば、粉末、錠剤、カプセル、または顆粒などで製剤化される。一つの特定の実施形態では、サプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、粉末として製剤化される。いくつかの実施形態により、サプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、液体または半液体剤形として製剤化される。一つの実施形態により、液体剤形は懸濁液またはエマルションであり、半液体剤形はゲルまたはコロイド状懸濁液のような粘性懸濁液である。一つの特定の実施形態により、安定化ＡＣＣは懸濁液として製剤化される。従って一つの実施形態では、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、細胞培養培地の調製の間、またはこの培地の使用の前に粉末または懸濁液として、細胞培養培地に加えられる。一つのさらに具体的な実施形態により、安定化ＡＣＣは新たに調製された懸濁液として加えられる。

【０１２０】

一つの実施形態により、安定化ＡＣＣ一次粒子の平均直径は約１０ｎｍ～約５μｍである。別の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の平均直径は約３０ｎｍ～約４００ｎｍである。さらに別の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の平均直径は約３０ｎｍ～３５０ｎｍである。

【０１２１】

特定の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の平均直径は、約３５ｎｍ～３００ｎｍ、４０ｎｍ～約２５０ｎｍ、約４５ｎｍ～約２００ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、または約６０ｎｍ～約１００ｎｍである。なお別の実施形態により、ＡＣＣの一次粒子は凝集され、凝集体の平均直径は０．５μｍ～３００μｍである。一つのさらなる実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の凝集体の直径は、約１～約１００μｍ、約１０～約５０μｍ、または約２０～約４０μｍである。別の実施形態により、ＡＣＣ一次粒子の凝集体の平均直径は１μｍ～１０μｍである。

【０１２２】

前記実施形態のいずれか一つにより、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、約０．１～約２０ｍＭ、約０．５～約１５ｍＭ、約１～約１０ｍＭ、約２～約８ｍＭ、約３ｍＭ～約６ｍＭ、または約４ｍＭ～約５ｍＭの最終濃度で細胞培養培地に加えられる。より特定的な実施形態では、安定化ＡＣＣは、０．５～約４ｍＭ、約１～約３ｍＭ、約１．５～約２．５、あるいは約１、１．５、２、または２．５ｍＭの濃度で存在する。

【０１２３】

いくつかのより具体的な実施形態により、本発明は、（ｉ）筋肉、神経、または骨の細胞または組織培養、（ｉｉ）ヒトまたは非ヒト哺乳動物胚、（ｉｉｉ）幹細胞、（ｉｖ）生殖細胞、または（ｖ）卵巣の成長に適している細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のために、有機ポリリン酸のようなポリリン酸、リン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、有機酸、およびそれらのいずれかの組み合わせから選択される、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されるＡＣＣを提供する。いくつかの実施形態により、安定化剤はホスホセリンである。別の実施形態により、安定化剤は三リン酸である。さらに別の実施形態により、安定化剤はホスホセリンと、クエン酸のような有機酸の併用である。さらなる実施形態により、安定化剤は三リン酸ナトリウムのような三リン酸と、クエン酸のような有機酸の併用である。一つの実施形態により、このような細胞培養培地は、筋肉、神経、または骨の細胞または組織培養に適している。一つの実施形態により、当該細胞培養培地を補充する安定化ＡＣＣは、細胞の成長、例えば、増殖、発達、成熟、または分化を

高めることができる。一つの実施形態により、細胞は神経細胞、より特定的には損傷した神経細胞である。一つの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、損傷した神経細胞の再生を高めることができる。別の実施形態により、細胞は筋細胞、特にデュシェンヌ型筋ジストロフィー細胞のようなジストロフィー筋細胞である。一つの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、筋管形成および／または筋細胞の収縮の発生を高めることができる。一つの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、ヒト胚の発達を高めることができる。一つの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、生殖体、特に精子の成熟または保存を高めることができる。別の実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、前述のように、胚または生殖体の凍結保存を高めることができる。一つの実施形態により、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせを可能にする。さらなる実施形態により、サプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、幹細胞、特にヒト幹細胞の成長、例えば、増殖、拡張、および／または分化を高めることができる。いくつかの実施形態により、幹細胞は胚性、絨毛性、羊水、造血性、間葉性、神経、グリア、成体、および誘導多能性幹細胞から選択される。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞の成長パラメータ、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を、約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０％～約１００％高めることができる。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００％～約５００％、約１２０％～約４００％、約１５０％～約３００％高められる。

【０１２４】

いくつかの実施形態により、本発明は分割、単一培養、または逐次培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣを提供し、ここで安定化剤はホスホセリンまたは三リン酸ナトリウムであり、任意にクエン酸と併用され、当該安定化ＡＣＣはヒト胚の発達を高めることができる。

【０１２５】

いくつかの実施形態により、本発明は、細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣを提供し、ここで本剤はホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムであり、任意にクエン酸と併用され、当該安定化ＡＣＣは神経細胞の再生を高めることができる。

【０１２６】

いくつかの実施形態により、本発明は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、または任意にウマ血清（ＨＳ）、Ｌ－グルタミン、ゲンタマイシン、およびインスリンが補充されたＤＭＥＭ／Ｆ１２へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣを提供し、ここで安定化剤はホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムから選択され、任意にクエン酸と併用され、当該安定化ＡＣＣは筋管形成および／または骨格筋細胞、デュシェンヌ型筋ジストロフィー症例などの骨格筋細胞における収縮の発生を高めることができる。

【０１２７】

いくつかの実施形態により、本発明は細胞培養培地へのサプリメントとしての使用のために、ホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムによって、任意にクエン酸と併用で安定化されたＡＣＣを提供し、これによって幹細胞の分化、特にＭＢＡ１３の骨芽細胞への分化を高めることができる。

【０１２８】

いくつかの実施形態により、本発明は、ＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、Ｑｕｉｎｎｓ（商標）精子洗浄培地、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、ゲンタマ

イシン添加改変ＨＴＦのような精子分離、洗浄、または成熟のための培地へのサプリメントとしての使用のため、ホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムによって、任意にクエン酸と併用で安定化されたＡＣＣを提供し、これによって、精子細胞の成熟を高めることができ、例えば、ヒト精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせを可能にする。

【０１２９】

本発明は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、または１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭグルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および０．３～０．５％ＮＶＲ－Ｇｅｌを有するＤＭＥＭ／Ｆ１２のような培地へのサプリメントとしての使用のため、ホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムによって、任意にクエン酸と併用で安定化されたＡＣＣを提供する。

【０１３０】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約８ｍＭ、約０．５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭである。

【０１３１】

さらに別の態様により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を含む細胞培養培地サプリメントを提供する。

【０１３２】

一つの実施形態により、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、培地の調製の際に培地に加えられる。別の実施形態により、サプリメントは使用前に培地に加えられる。

【０１３３】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地サプリメントは固体サプリメントである。他の実施形態により、サプリメントは液体または半液体サプリメントである。

【０１３４】

前記実施形態のいずれか一つにより、ＡＣＣは前述で定められる少なくとも１種類の安定化剤によって安定化される。いくつかの実施形態により、安定剤は、三リン酸のようなポリリン酸、ホスホセリンのようなリン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、クエン酸、ならびに三リン酸とクエン酸の併用またはホスホセリンとクエン酸の併用のようなそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。

【０１３５】

安定化ＡＣＣを含む本発明の細胞培養培地サプリメントは、前述で説明されるいずれかの細胞培養培地に添加され得る。一つの実施形態では、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、生物学的培養、例えば、細胞の培養、組織培養、器官培養、または器官を成長するのに適している細胞培養培地に加えられ得る。細胞は真核生物または原核生物であり得る。特に、細胞培養培地は、成長真核細胞培養、組織培養、または器官に適している培地を意味する。いくつかの実施形態により、細胞培養は懸濁または接着細胞培養である。いくつかの実施形態では、培地は完全培地、基礎培地、細胞培養培地サプリメントが補充された基礎培地、様々な量の血清を有する培地、または化学的に規定された培地であり得る。

【０１３６】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、細胞または組織の成長を高めることができる。このため一つの実施形態では、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、細胞、組織、または器官の増殖、成熟、繁殖、再生、発達、および／または分化を高めることができる。一つの実施形態により、サプリメントは幹細胞の分化を高めることができる。別の実施形態により、サプリメントは細胞の培養の増殖を高めることができる。さらに別の実施形態により、サプリメントは細胞または組織の成熟および／または発達を高めることができる。特定の実施形態により、サプリメントは細胞の再生を高めることができる。いくつかの実施形態により、細胞は真核細胞である。一つの実施形態により、真核細胞は動物、植物、または昆虫細胞である。さらなる実施

形態により、動物細胞の培養は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物の細胞培養、組織培養、器官培養、幹細胞、生殖体、胚、および器官から選択される。いくつかの実施形態により、哺乳動物はヒトであり、ヒト細胞の培養はヒト細胞、組織培養、および器官培養から選択される。他の実施形態により、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態により、ヒトまたは非ヒト哺乳動物細胞培養のどちらかである細胞培養は、神経、筋肉、上皮、骨、脂肪、幹細胞、生殖体、および血液細胞の細胞培養から選択される。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞の成長パラメータ、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を、約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０％～約１００％高めることができる。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００％～約５００％、約１２０％～約４００％、約１５０％～約３００％高められる。

【０１３７】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、酵母の成長に適した細胞培養培地に加えられ得、当該細胞培養培地はＹＰＤ、ＹＰＧ、およびＹＰＡＤから選択される。

【０１３８】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、原核生物の成長に適した細胞培養培地に加えられ得、当該培地はＬＢおよびＭ９から選択される。

【０１３９】

いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントは、酵母および細菌の成長を高めることができる。

【０１４０】

いくつかのより具体的な実施形態により、本発明は少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントを提供し、ここで本剤はリン酸化アミノ酸、ポリリン酸、ビスホスホネート、有機酸、およびそれらのいずれかの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態により、サプリメントは、（ｉ）筋肉、神経、または骨の細胞または組織培養、（ｉｉ）ヒトまたは非ヒト哺乳動物胚、（ｉｉｉ）幹細胞、（ｉｖ）生殖体、または（ｖ）卵巣の成長に適している細胞培養培地に加えられる。いくつかの実施形態により、安定剤はホスホセリンである。別の実施形態により、安定化剤は三リン酸である。さらに別の実施形態により、安定化剤はホスホセリンと、クエン酸のような有機酸の併用である。さらなる実施形態により、安定化剤は三リン酸ナトリウムのような三リン酸と、クエン酸のような有機酸の併用である。より特定的な実施形態により、細胞培養培地サプリメントは細胞の成長、例えば、増殖、分化、発達、または成熟を高めることができる。一つの実施形態により、このような細胞培養培地サプリメントは損傷した神経細胞の再生を高めることができる。別の実施形態により、このような細胞培養培地サプリメントは筋管形成を高める、および／または筋管の収縮の発生を促進することができる。さらなる実施形態により、このような細胞培養培地サプリメントは、ヒト胚のような胚の発達を高めることができる。さらなる実施形態により、このような細胞培養培地サプリメントは、生殖体、特に精子の成熟または保存を高めることができる。一つの特定の実施形態により、このような細胞培養培地サプリメントは、前述で説明されるような、胚または生殖体の凍結保存を高めることができる。一つの実施形態により、このような細胞培養培地は幹細胞の増殖および分化に適している。いくつかの実施形態により、幹細胞は胚性、造血性、間葉性、神経、グリア、成体、および誘導多能性幹細胞から選択される。別の実施形態により、このような細胞培養培地サプリメントは幹細胞の分化を高めることができる。一つの特定の実施形態により、細胞培養培地サプリメントは、ＭＢＡ１３のような幹細胞の骨芽細胞への分化を高めることができる。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞の成長パラメータ、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を、約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０

％～約１００％高めることができる。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００％～約５００％、約１２０％～約４００％、約１５０％～約３００％高められる。

【０１４１】

いくつかの実施形態により、本発明は、ホスホセリン、エチドロン酸、または三リン酸ナトリウムから選択される少なくとも１種類の安定化剤によって、任意にクエン酸との併用で安定化されたＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメントを提供する。一つの実施形態により、サプリメントは分割、単一培養、または逐次培地に加えられ、従ってヒト胚の発達を高める。一つの実施形態により、サプリメントは、ＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、Ｑｕｉｎｎｓ（商標）精子洗浄培地、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、またはゲンタマイシン添加改変ＨＴＦ培地のような精子分離、洗浄、または成熟のための培地に加えられ、従って生殖体、特に精子の成熟または保存を高める。別の実施形態により、このようなサプリメントは神経細胞の成長に適した細胞培養培地に添加され、従って神経細胞の再生を高める。さらなる実施形態により、サプリメントはＤＭＥＭ／Ｆ１２培地、または任意にさらにウマ血清（ＨＳ）、Ｌ－グルタミン、ゲンタマイシン、およびインスリンが補充されたＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に加えられ、従って、デュシェンヌ型筋ジストロフィー症例などの骨格筋細胞における筋管形成を高める。さらに別の実施形態により、サプリメントは幹細胞の成長に適した細胞培養培地に加えられ、これによって幹細胞の分化、特にＭＢＡ１３の骨芽細胞への分化を高める。他の実施形態により、サプリメントはＤＭＥＭ／Ｆ１２、または１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭグルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および０．３～０．５％ＮＶＲ－Ｇｅｌを有するＤＭＥＭ／Ｆ１２のような培地に加えられ、これによって卵巣の保存を高める。いくつかの前記実施形態により、細胞培養培地における安定化ＡＣＣの最終濃度は、約０．１～約８ｍＭ、約０．５～約６ｍＭ、約１～約５ｍＭ、または約２～約４ｍＭである。

【０１４２】

前記実施形態のいずれか一つにより、用語「含む」は「からなる」の意味を有し、従ってこのような実施形態により、細胞培養培地サプリメントは少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣからなる。

【０１４３】

さらなる態様により、本発明は、少なくとも１種類の安定剤によって安定化され、細胞培養培地のためのサプリメントとして製剤化される無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を提供する。

【０１４４】

特定の態様により、本発明は生物学的培養の成長を高めるための方法を提供し、当該方法は当該培養を少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣに暴露することを含む。一つの実施形態により、生物学的培養は真核細胞、組織、または器官、および原核細胞から選択される。

【０１４５】

他の実施形態により、本方法は、細胞、組織、および器官のような生物学的培養の成長を高める、例えば、増殖、成熟、繁殖、再生、分化、および／または発達を高めることを含む。

【０１４６】

一つの実施形態により、細胞の培養は、動物、植物、または昆虫細胞培養から選択される。別の実施形態により、組織培養は動物、植物、または昆虫組織培養から選択される。さらなる実施形態により、器官培養は動物、植物、または昆虫器官培養から選択される。いくつかの実施形態により、動物はヒトまたは非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態により、非ヒト哺乳動物は、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラバ、ロバ、スイギュウ、またはラクダのような家畜動物、ネコまたはイヌなどの家庭用愛玩動物、マウス、ラット、モルモット、またはハムスターのようのげっ歯類、ウサギのようなウサギ目、およびサ

ル（例えば、マカク）または類人猿（例えば、チンパンジー）などの霊長類から選択される。

【０１４７】

いくつかの実施形態により、哺乳動物細胞であるヒトまたは非ヒト哺乳動物細胞培養のどちらかは、神経、筋肉、上皮、骨、脂肪、幹細胞、生殖体、および血液細胞から選択される。一つの実施形態により、組織培養は上皮、結合、筋肉、および神経組織培養から選択される。いくつかのより特定的な実施形態により、組織培養は腎臓、肝臓、腺、脳、骨、眼、および筋組織培養から選択される。いくつかの実施形態により、器官組織または器官は、卵巣、角膜、心臓、腎臓、膵臓、肝臓、脾臓、胚、精巣、膀胱、および血液小胞から選択される。一つの特定の実施形態では、器官組織または器官は卵巣である。

【０１４８】

一つの実施形態により、本発明は筋細胞の成長を高めるための方法を提供する。別の実施形態により、筋細胞の成長を高めることは筋管形成を高めることを含む。いくつかの実施形態により、本発明はまた、当該筋管の自発的収縮活動の発生に対する時間を低下することを含む。自発的収縮活動の発生までの時間は、筋芽細胞が融合して自発的に収縮するまでに必要な時間として定められる。一つの実施形態では、当該筋芽細胞から形成される筋細胞は骨格筋細胞または心筋細胞から選択される。より特定的な実施形態では、筋細胞は骨格筋細胞である。いくつかの実施形態により、本方法は、例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー症例などの骨格筋細胞における筋管形成および／または収縮の発生を高めることを含む。

【０１４９】

他の実施形態により、本方法は神経細胞の成長を高めることを含む。一つの実施形態では、神経細胞の成長を高めることは、神経細胞再生を高めるおよび促進することを含む。そのため一つの実施形態では、本方法は、末梢および中枢神経系の軸索および樹状神経線維の再成長を高める、および／または損傷した神経線維から発芽させることを含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態により、本方法は生殖体の成熟または保存を高める、例えば、精子または卵母細胞のインビトロ成熟または保存を高めることを含む。いくつかの実施形態により、生殖体はヒト生殖体または非ヒト哺乳動物生殖体から選択される。一つの実施形態により、生殖体は精子である。このため一つの態様では、本発明は精子の成熟を高めるまたは質を改善する方法を提供し、当該方法は当該培養を少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣに暴露することを含む。

【０１５１】

一つの実施形態により、精子の質を改善することは、精子運動率を高める、精子前進運動率を高める、精子数を増加する、およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。

【０１５２】

いくつかの実施形態により、精子数を増加することは、運動率または前進運動率処理における精子数を増加することを含む。一つの実施形態により、運動率または前進運動率処理はスイムアップ法である。

【０１５３】

前記実施形態のいずれか１つにより、精子はヒトまたは非ヒト哺乳動物の精子である。いくつかの実施形態により、非ヒト哺乳動物は、家畜動物、家庭用愛玩動物、げっ歯類、野生動物、および霊長類からなる群から選択される。

【０１５４】

一つの実施形態では、家畜動物は、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラバ、ロバ、スイギュウ、およびラクダから選択される。いくつかの他の実施形態では、家庭用愛玩動物はネコまたはイヌであり、げっ歯類はラット、マウス、モルモット、またはハムスターであり、ウサギ目はウサギであり、霊長類はマカクのようなサルまたはチンパンジーのような類人猿である。

【０１５５】
別の実施形態により、精子は非哺乳動物の精子である。いくつかの実施形態により、非哺乳動物は魚類、昆虫、および鳥類からなる群から選択される。
【０１５６】
一つの実施形態により、精子はヒト精子である。他の実施形態により、本方法はインビトロでの胚発達を高めることを含む。
【０１５７】
いくつかの実施形態により、本方法は幹細胞分化および／または増殖を高めることを含む。いくつかの実施形態により、幹細胞は胚性、絨毛性、羊水、造血性、間葉性、神経、グリア、成体、および誘導多能性幹細胞から選択される。一つの実施形態により、本方法はＭＢＡ１３の骨芽細胞への分化のような幹細胞の分化を高めることを含む。
【０１５８】
一つの実施形態により、安定化ＡＣＣが補充された細胞培養培地は、細胞の成長パラメータ、例えば、増殖、成熟、発達、または分化を、約１０％～約６００％、約２０％～約５００％、約３０％～約４００％、約４０％～約３００％、約５０％～約２００％、約６０％～約１５０％、または約７０％～約１００％高めることができる。いくつかの実施形態により、成長パラメータは約１００％～約５００％、約１２０％～約４００％、約１５０％～約３００％高められる。
【０１５９】
いくつかの実施形態により、細胞の培養は細菌または酵母の培養であり、そのためこのような実施形態により、本方法は酵母または細菌の成長を高めることを含む。いくつかの実施形態では、細菌は大腸菌またはビフィドバクテリウムおよびラクトバチルス属の細菌のようなプロバイオティック細菌である。前記実施形態のいずれか一つにより、少なくとも１種類の安定化剤によって安定化されたＡＣＣに細胞を暴露することは、当該ＡＣＣを細胞培養培地に加えることを含む。用語「に暴露する」および「と接触させる」は、本明細書において交換可能で使用され、安定化ＡＣＣのような対象の成分を含む培地に細胞を加えるまたは移す、あるいはＡＣＣなどの成分を細胞が成長または培養される培地に加えることを意味する。細胞培地は従来技術で知られている任意の培地であり得る。いくつかの実施形態により、培地は前述で定められる通りである。一つの実施形態により、細胞培養培地は天然培地または人工培地から選択される。いくつかの実施形態により、天然培地は血漿、血清、リンパ、ヒト胎盤臍帯血、および羊水から選択される生物学的流体を含む。別の実施形態により、天然培地は、肝臓、脾臓、腫瘍、リンパ球、および骨髄の抽出物のような組織抽出物、ウシ胚およびニワトリ胚の抽出物を含む。さらなる実施形態により、天然培地は凝固剤または血餅を含む。いくつかの実施形態により、培地は少なくとも１種類の安定化剤で安定化されたＡＣＣが補充された人工培地である。一つの実施形態により、人工培地は平衡化塩溶液である。平衡化塩溶液の例は、ＰＢＳ、ＤＰＢＳ、ＨＢＳＳ、ＥＢＳＳ、タイロードＴ６、ＷＭ１、プールＰ１、クインＨＴＦ、およびガードナーＧ１である。別の実施形態により、人工培地は基礎培地である。いくつかの実施形態により、培地はさらに従来技術で良く知られているように補充され得る。一つの実施形態により、培地は血清、例えば、ウシ胎児血清によって補充される。さらなる実施形態により、人工培地は複合培地である。
【０１６０】
一つの実施形態により、人工培地は無血清培地である。さらなる実施形態により、人工培地は血清含量が低下した培地である。別の実施形態により、人工培地は無タンパク質培地である。
【０１６１】
一つの実施形態により、本法は、ＤＭＥＭ、ＥＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０培地、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ハムＦ－１０、ハム－１２、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２、ＩＭＤＭ、ｏｐｔｉ－ＭＥＭ、ＧＭＥＭ、ＩＰＬ－４１昆虫培地、シュナイダーショウジョウバエ培地、グリース昆虫培地、無血清昆虫培地、Ｓｆ－９００、ＴＣ－１０、Ｓｈｉｅｋｌｓ ａ

ｎｄ　Ｓａｎｇ　Ｍ３昆虫培地、ＴＣ－１００昆虫培地、ＴＮＭ－ＦＨ昆虫培地、ＩＰＬ－１０、Ｑｕｉｎｎ’ｓ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）（ＳＡＧＥ）培地１－Ｓｔｅｐ（商標）のような単一培地、Ｑｕｉｎｎ’ｓ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）分割培地のような逐次培地、ムラシゲスクーグ（ＭＳ）、Ｂ５、Ｎ６、ニッチ培地、ＮＣＴＣ培地、ＭｅｇＣｅｌｌ培地、クレイコム、クリック培地、Ｌ－１５培地、１９９培地、ＭＣＤＢ培地、エイムス培地、ＢＧＪｂ培地、クリック培地、ＣＭＲＬ－１０６６培地、マッコイ５Ａ改変培地、ＮＣＴＣ培地、スイムＳ－７７培地、ウェイマウス培地、ウィリアム培地Ｅ、インビトロ成熟培地、Ｍｅｎｅｚｏ　Ｂ２およびＢ３培地、Ｂｅｈｒ胚盤胞培地、ガードナーＧ２ユニバーサル培地ＩＶＭ（ＯＲＩＧＩＯ）、および胚成長用逐次培地から選択される細胞培養培地に安定化ＡＣＣと加えることを含む。一つの実施形態により、本方法は、ＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ　Ｈａｎｄｌｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、Ｑｕｉｎｎｓ（商標）精子洗浄培地、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ　Ｈａｎｄｌｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、ゲンタマイシン添加改変ＨＴＦ培地のような精子分離用培地、精子洗浄用培地、および成熟用培地から選択される細胞培養培地に安定化ＡＣＣを加えることを含む。一つの実施形態により、本方法は、受精用培地、胚発達用培地、あるいは胚および／または生殖体成熟、ハンドリング、および／または凍結保存用の培地から選択される細胞培養培地に安定化ＡＣＣを加えることを含む。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、細胞はＣｙｔｏｄｅｘ１または３、Ｃｙｔｏｐｏｒｅ２、ポリスチレン、ゼラチン、デキストラン、ポリアクリルアミド、または他の代替担体のような担体に定着または固定化された培養として成長させる。

【０１６３】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地は単細胞真核生物の成長に適している。一つの実施形態により、単細胞真核生物はサッカロマイセス、より特定的にはサッカロマイセス・セレビシエのような酵母である。一つの実施形態により、本方法は、サッカロマイセス・セレビシエなどの単細胞真核生物の成長に適している細胞培養培地に安定化ＡＣＣを加えることを含み、当該細胞培養培地は、酵母抽出物ペプトンデキストロース（ＹＰＤ）、酵母抽出物－ペプトン－グリセロール（ＹＰＧ）、および酵母抽出物－ペプトン－デキストロース（ＹＰＡＤ）培地から選択される。

【０１６４】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地は原核生物の成長に適しており、例えば、細菌は大腸菌あるいはビフィドバクテリウム属およびラクトバチルス属の細菌のようなプロバイオティック細菌である。一つの実施形態により、本方法はＬＢまたはＭ９のような細菌の成長に適した培地に安定化ＡＣＣを加えることを含む。

【０１６５】

前記実施形態のいずれか一つにより、安定化ＡＣＣは前記実施形態のいずれか一つによる細胞培養培地に、約０．１～約２０ｍＭ、約０．５～約１５ｍＭ、約１～約１０ｍＭ、約２～約８ｍＭ、約３ｍＭ～約６ｍＭ、または約４ｍＭ～約５ｍＭの最終濃度で加えられる。より特定的な実施形態では、安定化ＡＣＣは、０．５～約４ｍＭ、約１～約３ｍＭ、約１．５～約２．５、あるいは約１、１．５、２、または２．５ｍＭの濃度で存在する。

【０１６６】

一つの実施形態により、ＡＣＣは固体、液体、または半液体の剤形で製剤化される。一つの特定の実施形態では、安定化ＡＣＣは懸濁液の剤形で加えられる。さらに別の実施形態では、懸濁液は新たに調製される懸濁液である。

【０１６７】

前記実施形態のいずれか一つにより、ＡＣＣは前述で定められる少なくとも１種類の安定化剤によって安定化される。特定の実施形態では、ＡＣＣ安定化剤は各存在で独立して、有機酸；リン酸化、ホスホン酸化、硫酸化、またはスルホン酸化有機化合物；ヒドロキシルカルボン酸のリン酸または硫酸エステル；有機アミン化合物；ヒドロキシルを含む有

機化合物；有機亜リン酸化合物またはその塩；リン酸化アミノ酸およびその誘導体、ビスホスホネート；有機リン酸化合物；有機ホスホン酸化合物；有機ポリリン酸、無機ポリリン酸、無機亜リン酸、前記で定められる複数官能基を有する有機化合物；無機リン酸およびポリリン酸化合物；ポリリン酸鎖を有する有機化合物；有機界面活性剤；生体必須無機イオン；サッカライドおよびそれらの誘導体、タンパク質、リン酸化タンパク質、天然および合成バイオポリマーおよびそれらの誘導体、あるいはそれらの組み合わせである。別の実施形態により、安定化剤は、ホスホセリン、アデノシン三リン酸、アデノシン二リン酸、フィチン酸、クエン酸、エチドロン酸、ピロリン酸、ポリリン酸、三リン酸、エタノール、ヘキサメタンリン酸、キチン、およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。本化合物は前述で定められる通りである。いくつかの実施形態により、ＡＣＣは１種類を超える安定化剤、例えば、２または３種類の安定化剤によって安定化される。

【０１６８】

いくつかの実施形態により、安定剤は、三リン酸、ホスホセリンのようなリン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、クエン酸、ならびに三リン酸とクエン酸の併用またはホスホセリンとクエン酸の併用のようなそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。

【０１６９】

別の態様により、本発明は、少なくとも１種類の安定剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）を含む細胞培養培地の調製の方法を提供し、当該方法は細胞培養培地に安定化ＡＣＣを加えることを含む。

【０１７０】

特定の態様により、本発明は、少なくとも１種類の安定剤によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）、および細胞培養培地と組み合わせる当該ＡＣＣの使用のための取扱説明書を含むキットを提供する。一つの実施形態により、安定化ＡＣＣは細胞培養培地サプリメントとしての使用のためのＡＣＣである。一つの実施形態により、本発明は、塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、少なくとも１種類の安定化剤、および塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、少なくとも１種類の安定化剤から安定化ＡＣＣを調製するための取扱説明書、ならびに細胞培養培地と組み合わせた当該安定化ＡＣＣの使用のための取扱説明書を含むキットを提供する。一つの実施形態により、塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、および／または少なくとも１種類の安定化剤は水溶液として存在する。

【０１７１】

別の実施形態により、キットは少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメント、および細胞培養培地と組み合わせる当該サプリメントの使用ための取扱説明書を含む。一つの実施形態により、細胞培養培地サプリメントは、少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣからなる。

【０１７２】

前記実施形態のいずれか一つにより、キットはさらに、前述で定められる細胞培養培地を含む。従って、一つの実施形態において、キットは少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣ、細胞培養培地、および使用のための取扱説明書を含む。他の実施形態では、キットは少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣを含む細胞培養培地サプリメント、培地、および使用ための取扱説明書を含む。

【０１７３】

少なくとも１種類の安定剤によって安定化されたＡＣＣおよび細胞培養培地は前述で説明された通りである。

【０１７４】

いくつかの実施形態により、安定剤は、三リン酸、ホスホセリンのようなリン酸化アミノ酸、ビスホスホネート、クエン酸、ならびに三リン酸とクエン酸の併用またはホスホセリンとクエン酸の併用のようなそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。

【０１７５】

いくつかの実施形態により、ＡＣＣ組成物は前記で開示される安定剤の組み合わせを含

む。

【０１７６】

前記実施形態のいずれか一つにより、安定化ＡＣＣは、固体、液体、または半液体製剤として製剤化され得る。このため一つの実施形態では、細胞培養培地のサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、固体、液体または半液体として製剤化される。いくつかの実施形態により、安定化ＡＣＣは、固体剤形、例えば、粉末、錠剤、カプセル、または顆粒などで製剤化される。このため一つの特定の実施形態では、細胞培養へのサプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、粉末として製剤化される。他の実施形態により、サプリメントとしての使用のための安定化ＡＣＣは、液体または半液体として製剤化される。一つの実施形態により、液体剤形は懸濁液またはエマルションであり、半液体剤形はゲルまたはコロイドである。一つの具体的な実施形態では、安定化ＡＣＣは懸濁液として製剤化される。従って一つの実施形態では、粉末としてまたは懸濁液として製剤化された安定化ＡＣＣが、細胞培養培地にその培地の使用前に加えられる。一つのさらに具体的な実施形態により、安定化ＡＣＣは新たに調製された懸濁液として加えられる。

【０１７７】

本発明のキットは、さらに細胞培養培地を含み得る。細胞培養培地は従来技術で良く知られており、任意の培地が使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は生物学的培養を成長するのに適しており、当該培養は細胞の培養、組織培養、器官培養、または器官から選択される。細胞の培養は真核細胞または原核細胞の培養であり得る。特に、細胞培養培地は、成長真核細胞培養、組織培養、または器官に適している培地を意味する。いくつかの特定の実施形態では、培地は完全培地、基礎培地、細胞培養培地サプリメントが補充された基礎培地、様々な量の血清を有する培地、または化学的に規定された培地であり得る。

【０１７８】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地は、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、Ｌ－１５培地（Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ）、ＭＣＤＢ培地、培地１９９、ｏｐｔｉ－ＭＥＭおよびＤＭＥＭ／Ｆ－１２、シュナイダーショウジョウバエ培地、グレース昆虫培地、ＩＰＬ－４１昆虫培地、Ｓｆ－９００、無血清昆虫培地、Ｓｈｉｅｌｄｓ ａｎｄ Ｓａｎｇ Ｍ３昆虫培地、ＴＣ－１００昆虫培地、ＴＮＭ－ＦＨ昆虫培地、ハムＦ－１２、ハムＦ－１０、ＧＭＥＭ、エイムス培地、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、クレイコム、クリック培地、グラスゴー最小必須培地（ＧＭＥＭ）、ＭｅｇａＣｅｌｌ培地、マッコイ５Ａ改変培地、ＮＣＴＣ培地、ウィリアムズ培地Ｅ、ウェイマウス培地、ＴＣ－１０、およびＩＰＬ－１０培地から選択される。一つの特定の実施形態では、細胞培養培地は、Ｑｕｉｎｎ’ｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）（ＳＡＧＥ）培地１－Ｓｔｅｐ（商標）のような単一培地、Ｑｕｉｎｎ’ｓ Ａｄｖａｎｔａｇｅ（商標）分割培地のような逐次培地、ＭＥＤＩＣＵＬＴ、ユニバーサルＩＶＭ、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ｏｐｔｉ－ＭＥＭ、ＧＭＥＭ、ハムＦ－、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２、シュナイダーショウジョウバエ培地、グレース昆虫培地、Ｓｆ－９００、ＴＣ－１０、ＩＰＬ－１０、Ｂ５、Ｎ６、またはニッチ培地から選択される。培地のさらなる例は、ＩＳｏｌａｔｅ（登録商標）、ＰｕｒｅＣｅｐｔｉｏｎ（商標）、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））のような精子分離用の培地、ならびにＱｕｉｎｎｓ（商標）Ｓｐｅｒｍ Ｗａｓｈｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ、Ｍｕｌｔｉｐｕｒｐｏｓｅ Ｈａｎｄｌｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）（ＭＨＭ（登録商標））、およびゲンタマイシン－ＨＥＰＥＳ添加改変ＨＴＦ培地のような精子洗浄用の培地である。他の実施形態は、培地はＳＡＧＥ（商標）インビトロ成熟培地（ＩＶＭ）およびＢＯ－ＩＶＭ卵母細胞成熟培地のような、卵母細胞成熟用の培地である。さらなる実施形態により、細胞培養培地は、受精用培地、胚発達用培地、生殖体ハンドリング用培地、着床前遺伝子診断（ＰＧＤ）用培地、ならびに胚および／または生殖体成熟、ハンドリング、および／または凍結保存用の培地である。

【０１７９】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地は、酵母の成長に適しており、当該細胞培養培地はＹＰＤ、ＹＰＧ、およびＹＰＡＤから選択される。

【０１８０】

いくつかの実施形態により、細胞培養培地は、原核生物の成長に適しており、当該培地はＬＢおよびＭ９から選択される。

【０１８１】

一つの実施形態により、本発明は、塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、少なくとも１種類の安定化剤、および安定化ＡＣＣを調製するための取扱説明書、ならびに細胞培養培地と組み合わせた当該安定化ＡＣＣの使用のための取扱説明書を含むキットを提供する。いくつかの実施形態により、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムが水溶液として存在する。一つの実施形態により、少なくとも１種類の安定化剤は、１つまた２つの別々の溶液として存在する。一つの実施形態により、ＡＣＣを調製するための取扱説明書は、塩化カルシウムおよび少なくとも１種類の安定剤を含む溶液を炭酸ナトリウムと混合し、さらに少なくとも１種類の安定化剤を含む溶液を加えるための取扱説明書を含む。

【０１８２】

本発明のいくつかの実施形態により、いくつかの実施形態における用語「高めることができる」および「高める」は、交換可能で使用される。

【０１８３】

前記実施形態のいずれか一つにより、用語「含む」は「からなる」の意味を含み、これによって置換され得る。

【０１８４】

本明細書で使用されるとき、用語「約」は、量、一時的期間などのような測定可能な値を意味する場合、特定された値から±１０％、または±５％、±１％、またはさらに±０，１％の変動を包含することが意味される。

【０１８５】

本発明書はここで全般的に説明されているが、同様なことは、図によって示され、本発明を制限することが意図されない、後述の例を参考にしてさらに容易に理解されるであろう。

例

例１．ＳＣ－ＤＲＧ共培養におけるＡＣＣの効果

【０１８６】

方法

【０１８７】

培養培地

【０１８８】

培養培地は、カルシウム枯渇した（カルシウムイオン無添加培地、特別調製）ダルベッコ改変イーグル培地－栄養素混合物Ｆ－１２（ＤＭＥＭ－Ｆ１２）が９０％、１０％熱不活化ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、６ｇ／ＬのＤ－グルコース、２ｍＭグルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および０．０５ｎｇ／ｍＬインスリン用増殖因子１（ＩＧＦ－Ｉ）（すべてＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ－Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、イスラエルから購入）から構成された。

【０１８９】

神経培養用の基材としてのＮＶＲ－Ｇｅｌ

【０１９０】

Ｎｅｕｒａｌ ａｎｄ Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｇｅｌ（神経および血管再構成ゲル）（ＮＶＲ－Ｇｅｌ、ＮＶＲ Ｌａｂｓ所有権）は、２種の主成分である高分子ヒアルロン酸（ＨＡ、３×10^6Ｄａ、ＢＴＧ、イスラエル）およびラミニン（シグマ）からなる。神経細胞培養では、１％のＮＶＲ－Ｇｅｌを０．３～０．５％の最終濃度まで培養培地で希釈した。ゲルは粘性液体の組成を有し、これは組み込まれた細胞または外植片をプラスチックまたはガラスの基底に容易に適切に付着させ、神経線維

の３Ｄパターンにおける神経線維成長を可能にした。

【０１９１】

神経組織培養の調製

【０１９２】

すべての実験は、動物実験に関してイスラエル当局によって承認された地域倫理委員会によって実施され認可された。後根神経節（ＤＲＧ）および脊髄（ＳＣ）の静置組織培養、ならびに分離された脳細胞の培養を、ラット胎児（妊娠１５日、ルイス同系交配、ｈａｒｌａｎ、イスラエル）から調製した。切除後直ちに、分離した組織をＭａｃｗａｉｎ組織チョッパーで小切片（厚さ４００μｍ）に切断した。これらの試験では、２種の組織培養法を使用した。第一の方法では、組織片を０．３～０．５％ＮＶＲ－Ｇｅｌ含有の１ｍＬ培養培地を含む１２ウェル培養プレートに直接的に播種した。第二の方法では、組織片をさらにトリプシン－ＥＤＴＡによって３０分間解離させ、培養培地で洗浄した。続いて、解離した細胞をキトサン粉末または胃石粉末（マイクロ担体、ＭＣ）の懸濁液に加え、懸濁液中で３７℃、４日間インキュベーションした。そして形成された浮遊性細胞／ＭＣ凝集体を収集して、０．３～０．５％ＮＶＲ－Ｇｅｌ含有の１ｍＬ培養培地を含む１２ウェル培養プレートに播種した。

【０１９３】

Ca^{2+}サプリメント源

【０１９４】

Ca^{2+}源（下表に示す）を１または２ｍＭの最終濃度で、播種段階でゲルに一度加え、そして各引き続く補給時に栄養培地に加えた。カルシウム源は、ＡＣＣ－エチドロン酸、（ＡＣＣ－ＥＴ）（新鮮な懸濁液）、ＡＣＣ－ホスホセリン（ＡＣＣ－ＰＳ）（新鮮な懸濁液）、胃石（０．１ＭのＨＣｌで溶解し、１ＭのＮａＯＨで中和）、胃石粉末、ＣＣＣ－結晶炭酸カルシウムの水性懸濁液（市販ナノ粒子粉末）、および$CaCl_2$溶液－対照だった。

【０１９５】

培養は、培養を進行設定した２４時間後から開始した位相差顕微鏡観察によって毎日モニタリングした。

【０１９６】

新鮮なＡＣＣ調製物の懸濁液は、安定な懸濁液を形成する粒子からなった。胃石はカニから分離された天然ＡＣＣであり、乾燥粉末としてのみ購入することができる。この剤形では、他の特徴的成分（カルシウムイオンおよびタンパク質など）は細胞に利用可能ではない。これらの生物利用能を高めるため、胃石粉末を０．１ＭのＨＣｌ（胃に存在する酸性を模倣する）に溶解してから１ＭのＮａＯＨによって中和した。

【０１９７】

神経培養の免疫蛍光染色

【０１９８】

培養培地の除去後、後根神経節（ＤＲＧ）培養をリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、４％ホルムアルデヒドで１５分間固定して、再度ＰＢＳで洗浄した。固定した細胞を０．１％トライトンＸ－１００含有ＰＢＳで透過処理してから１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）含有ＰＢＳによって室温で１時間、免疫ブロッキング（非特異染色を回避するため）した。そして標本を抗神経細糸ウサギ抗体（ＮＦ、Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１：５００）と共にインキュベーションして神経突起成長を可視化した。第一抗体を０．１％ＢＳＡおよび０．０５％ツイーン２０含有ＰＢＳ（希釈緩衝液）で希釈し、標本とともに４℃で一昼夜インキュベーションした。０．０５％ツイーン２０含有ＰＢＳ（洗浄緩衝液）ですすいだ後、ＤＲＧ標本を第二抗体であるＡｌｅｘａ－Ｆｌｏｕｒ－５９４共役体化ロバ抗ウサギＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ，米国、希釈緩衝液で１：８００）とともに室温で１時間インキュベーションした。最後に、サンプルを洗浄緩衝液で再度すすいで、封入剤（Ｉｍｍｃｏ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ、米国）によって封入した。画像はすべてオリンパスＩＸ７０顕微鏡によって観察した。

【０１９９】
結果
【０２００】
様々なカルシウム調製物の効果をＳＣ－ＤＲＧ共培養で試験した。一般的に、培養は４００ミクロンのＳＣ片を、接着または分離されたＤＲＧ片とともに含んだ。試験したＡＣＣ調製物のすべて（ＡＣＣ－ＥＴ、ＡＣＣ－ＰＳ、および胃石）が、神経線維再生をＣＣＣおよびＣａＣｌ$_2$と比べて有意に高めた。表１は、様々なカルシウム調製物（２ｍＭのCa^{2+}濃度）の存在または安定化剤のみの存在における培養４日後に発芽する神経線維を表す外植片の一部（６例のうち）を示す（安定剤は各ウェルに（５％のストック溶液から）０．０５％の濃度で添加された）。最も強い発芽はＡＣＣ－ＥＴ（外植片の１００％）に暴露された培養で観察され、ＡＣＣ－ＰＳおよび胃石（外植片の６６．６％）が続いたことが認められた。ＣＣＣおよびＣａＣｌ$_2$は外植片の５０％からのみの神経発芽を誘発し、安定化剤のみはさらに低い割合（０～３３％）だった。培養の確立の間（培養の第一週の後）、神経ネットワークの形成まで、主に様々なＡＣＣ調製物に暴露された場合、再生した神経線維はより長く、より厚く、そして分枝されるようになった（図１）。
【０２０１】
【表１】
表１．ＳＣ－ＤＲＧ共培養から得られる初期神経線維発芽におけるＡＣＣ調製物の効果

カルシウム調製物のタイプ	軸索再生を伴う培養（％）
ACC-ET(新鮮な懸濁液)	100
ACC-PS(新鮮な懸濁液)	66.6
胃石	66.6
CCC(結晶炭酸カルシウム)	50
$CaCl_2$水溶液(対照)	50
ET	33.3
PS	0

例２．脳培養におけるＡＣＣの効果
【０２０２】
ＡＣＣの効果を、懸濁液における４日後にゲルに播種された脳細胞－ＭＣ凝集体の培養で試験した（例１の方法部分を参照する）。結果を図２に示し、ＡＣＣが塩化カルシウムよりも有意に神経線維再生を高めたことを示す。このことは特に、２処置間で神経線維の数よび長さを比較したときに顕著である。
例３－健全な骨格筋細胞におけるＡＣＣ調製物の効果
【０２０３】
方法
【０２０４】
骨格筋培養の調製
【０２０５】
静置骨格筋培養を健康な１日齢新生ラット（スプラグドーリー、Ｈａｒｌａｎ、イスラエル）から調製した。筋組織を後脚から切除し、完全に刻んだ。消化をトリプシン－ＥＤＴＡによって、優しく粉砕しながら実施した。３０分後、切除した細胞を含む上清を収集し、新鮮なトリプシン－ＥＤＴＡを加えた。この手順を２回を超えて繰り返した。そして、すべての上清をプールして遠心分離し、細胞ペレットを増殖培地に再懸濁させた。細胞をゼラチンコーティングした１２ウェル培養培地プレートに、細胞1×10^5個／ウェルを含む増殖培地１ｍＬで播種した。２日後、培地を融合培地に変更し、そして週に２回交換した。培養は、培養を設定して進行した２４時間後から位相差顕微鏡観察によって毎日モニタリングした。所定の日に、培養をメタノールで２０分間固定し、そしてギムザによって染色して培養期間で形成された筋管の数を評価した。

【０２０６】
ゼラチンコーティング培養プレート
【０２０７】
水に１％ブタゼラチンを含有するストック溶液を、オートクレーブで滅菌した。冷却後、溶液５００μＬを１２ウェル培養プレートの各ウェルに加えた。室温で２０分間インキュベーション後、過剰な溶液を取り除き、細胞を播種した。
【０２０８】
増殖培地
【０２０９】
増殖段階では、細胞はＤＭＥＭ／Ｆ１２（１ｍＭのCa^{2+}含有）＋１０％ＦＢＳ、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および２ｍＭのＬ－グルタミン中で培養した。
【０２１０】
融合培地
【０２１１】
融合段階では、増殖培地を融合培地に変更し、融合培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２（１ｍＭのCa^{2+}含有）、２％ウマ血清（ＨＳ）、２ｍＭのＬ－グルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および４単位／１００ｍＬインスリン（すべてＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ－Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、イスラエルから購入）によって調製した。
【０２１２】
試験したカルシウム調製物のリスト
【０２１３】
融合培地は表２にリスト化された様々なカルシウム調製物によって１ｍＭのCa^{2+}濃度で増加させた（培地は既に１ｍＭのカルシウムイオンを含んだため、Ca^{2+}の最終濃度は２ｍＭだった）。対照培養はさらにカルシウムを加えることなく成長させる、または培養を遊離（可溶性）安定剤によって増加させた。実験は種々のカルシウム調製液に任意の番号のみを印すことによって盲検化した。
【０２１４】
成分は方法として、（ｉ）乾燥材料の水性懸濁液、（ｉｉ）新鮮な材料（乾燥前）の水性懸濁液、または（ｉｉｉ）ＨＣｌによる溶解（胃に存在する酸性度を模倣する。溶解が終了した後、生成された溶液を１ＭのＮａＯＨで中和した。）の方法の一つで添加した。

【表２】

表２．試験材料リスト

添加物質	培地の１ｍＭのＣａ$^{2+}$イオンを含む全カルシウム濃度（ｍＭ）
ＡＣＣ－エチドロン酸（ＡＣＣ－ＥＴ）	2
ＡＣＣ－ピロリン酸（ＡＣＣ－ＰｙＰ）	2
ＡＣＣ－ホスホセリン（ＡＣＣ－ＰＳ）	2
ＡＣＣ－アデノシン三リン酸（ＡＣＣ－ＡＴＰ）	2
ＡＣＣ－アデノシン二リン酸（ＡＣＣ－ＡＤＰ）	2
ＡＣＣ－フィチン酸	2
ＡＣＣ－クエン酸	2
結晶炭酸カルシウム（ＣＣＣ）（市販粉末）	2
$CaCl_2$水溶液	2
ＥＴ	1
ＰｙＰ	1
ＰＳ	1
ＡＴＰ	1
ＡＤＰ	1
フィチン酸	1
クエン酸	1
対照	1

【０２１５】

結果

【０２１６】

健全な骨格筋における乾燥ＡＣＣの効果

【０２１７】

第一段階では、乾燥ＡＣＣ粉末を使用した。粉末（これらの調製物で使用される安定化剤に従って表２に示す）を水に懸濁させ、ついで１ｍＭの濃度で培養培地に加えた。培地は既に１ｍＭのカルシウムイオンを含んだため、Ｃａ$^{2+}$の最終濃度は２ｍＭだった。結果は、そのいくつかを図３（左図）で示すが、ＡＣＣに暴露された培養は、培養の４日以内で既に多くの筋管の初期形成を現わし、異なるＡＣＣ調製物間で有意差はなかったことを示した。添加されたＣＣＣまたは$CaCl_2$に暴露された対照培養では、筋管形成は遅れて観察された。７日後、ＡＣＣによって処理された培養は多数の長くて厚い筋線維を示したが、一方、ＣＣＣおよび$CaCl_2$によって処理された培養では、これよりも少ない薄く短い筋線維が発達した（図３、右図）。

【０２１８】

ＡＣＣ調製物に暴露された培養では、筋収縮が播種の７日後に既に観察されたが、一方、添加されたＣＣＣまたは$CaCl_2$に暴露された培養では、筋収縮は１０日以降でのみ現れたことも留意する。

【０２１９】

前記インビトロ結果から、すべてのＡＣＣ調製物が健全な横紋筋培養の筋管形成および初期筋収縮を高めると結論付けられた。

例４．デュシェンヌ型筋ジストロフィー筋細胞株におけるＡＣＣの効果を評価する－インビトロ試験

【０２２０】

方法

【０２２１】

ｍｄｘ細胞調製

【０２２２】
異なるカルシウム調製物の影響を、イスラエルのワイツマン科学研究所からＤａｖｉｄＹａｆｆｅ教授（名誉）によって厚意により提供されたｍｄｘ細胞株（デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル）について検討した。
【０２２３】
ｍｄｘ細胞株由来の株をゼラチンコーティングした１２ウェル培養プレートに、細胞３×１０^{4}個／ウェルを含む増殖培地１ｍＬで播種した。２日後（約６６％の密集）、培地を融合培地に変更し、週に２回交換した。様々なカルシウム調製物を、表３に記載された処理に従って融合培地に別々に加えた。培養は様々なカルシウム調製物によって、１ｍＭのCa^{2+}濃度で増加させた。培地は既に１ｍＭのカルシウムイオンを含んだため、Ca^{2+}の最終濃度は２ｍＭだった。
【表３】
表３．カルシウム源

処理	カルシウム源（２ｍＭ）
対照	$CaCl_2$
ACC-ET	無定形炭酸カルシウム－エチドロン酸
ACC-PS	無定形炭酸カルシウム－ホスホセリン

【０２２４】
細胞増殖、筋管を形成する融合、および筋収縮に対する試験した炭酸カルシウム調製物の効果を、位相差顕微鏡観察によって毎日モニタリングした。所定の日に、培養をメタノールで２０分間固定し、そしてギムザによって染色して培養期間で形成された筋管の数を評価した。
【０２２５】
筋組織培養におけるクレアチニンキナーゼ（ＣＫ）分析
【０２２６】
筋細胞培養では、ＣＫは筋管形成における指標であり、ＣＫ量は筋培養における筋管形成の発達と正の相関で（組織培養プレート中で）増加する。所定の日に、細胞を培養ウェルから収集し（ラバーポリスマンを使用）、分析するまで１ｍＬのＰＢＳ（Ca^{2+}無添加）中で－７０℃に維持した。ＣＫ測定のため、細胞サンプルを小分けして、超音波処理装置を用いて物理的に溶解させて、筋管からＣＫを放出させた。ＣＫ濃度をクレアチニンキナーゼ活性アッセイキット（ＣＫ－ＮＡＣ　ＲＥＡＧＥＮＴ　ＳＥＴ，ＣＵＲＴＩＳＳ，ＣＨＥＭ－ＩＮＤＥＸ　ＩＮＣ，Ｈｉａｌｅａｈ，ＦＬ，米国）を用いて測定した。
【０２２７】
結果
【０２２８】
前記実験の結果を図４および５に示す。明確に示されるように、ＡＣＣの添加は、従来のカルシウム源（$CaCl_2$）の添加よりも筋管の細胞融合および形成を高めた。この驚くべき結果は、生化学的（ＣＫ活性）および形態学的（顕微鏡）分析の両方で実証された（図４および５）。さらに、ＡＣＣ調製物に暴露された培養では、筋収縮が播種の７日後に既に観察されたが、一方、対照では、これは１０日以降でのみ現れた。従って、ＡＣＣサプリメント添加はＤＭＤ患者を治療する可能性を有すると結論付けられる。
例５．一次ｍｄｘマウス細胞におけるカルシウム源の効果
【０２２９】
方法
【０２３０】
一次細胞の抽出
【０２３１】
大腿筋を新生（１日齢）ｍｄｘマウスの後脚から無菌条件下で取り出し、ＰＢＳで洗浄して過剰な血液細胞を取り除いた。筋肉を小さい断片に切り刻んだ。酵素的解離のため、

筋断片をトリプシン－ＥＤＴＡ溶液（０．２５ｍＭ）を含むビーカーに加えた。細胞分離を確実にするため、混合物をスターラーに設置し、室温で２０分間静かに撹拌した。混合物を収集して３００×ｇで５分間遠心分離した。ペレットをＤＭＥＭ含有ＰＢＳで再懸濁させた。トリプリン処理段階を３回を超える回数で繰り返した。すべての上清を１本の試験管に集めた。細胞分離を目視（位相差顕微鏡を使用）によって測定した。細胞密度を、血球計算機を用いて測定した。

【０２３２】

細胞を１２ウェルプレートに２×１０^{5}個／ウェルの濃度で加えた。使用した培地は、１５％ＦＢＳおよび２ｍＭのＬ－グルタミン、ゲンタマイシン（２５μｇ／ｍｌ）を添加したＤＭＥＭ／Ｆ１２　Ｗ／Ｏ　Ｃａ$^{2+}$だった。カルシウムを表４に記載された処理に従って培地に別々に加えた。２日目（約６６％密集）に、培地を融合培地（Ｃａ$^{2+}$無添加、１０％ＨＳ、インスリン（４単位／１００ｍＬ）、およびゲンタマイシン（２５μ／ｍＬ）の添加）に変更した。培地は３日毎に交換した。

【表４】

表４．一次細胞試験で使用されたカルシウム源

処理	カルシウム源（２ｍＭ）
対照	$CaCl_2$
ACC-PP	ポリリン酸によって安定化された無定形炭酸カルシウム
ACC-PS	ホスホセリンによって安定化された無定形炭酸カルシウム

【０２３３】

細胞増殖および融合は質的に毎日モニタリングした。培養を２、３、４、５、および７日目に固定して、ギムザまたはミオシン抗体を用いて染色した。

【０２３４】

結果

【０２３５】

結果を図６および７に示す。ＡＣＣ製剤の有効な効果が対照と比べて、特に早い時点である３および４日目の筋管形成によって実証された。形成された筋管における差は、５および７日目で区別できなくなった。ギムザ染色とミオシンに対する染色の間に高い相関があった。

ＡＣＣ補充培地における胚発達の向上

例６．

【０２３６】

材料および方法

【０２３７】

ＣＢＡ雄マウスをＢＬ　Ｃ５７雌マウスと交配させた。マウスを無制限の水および食餌供給によって、１２時間の明暗サイクルで維持した。子を得た６～８週後、各雌マウスに妊馬血清性ゴナドトロピン（ＰＭＳＧ）の５ＩＵを腹腔内注射した。

【０２３８】

４８時間後、各雌マウスに５ＩＵのヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈＣＧ）を腹腔内注射した。繁殖力が証明されている雄マウスを、過排卵雌と一緒にした。次の朝、雌マウスを膣栓の存在について検査した。膣栓を有した雌を２４時間後（性交後約３６時間）に安楽死させ、卵管をＱｕｉｎｎ’ｓ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ分割培地（ＳＡＧＥ，Ｏｒｉｇｉｏ，デンマーク）中で切開し、胚をミネラルオイルで積層したＱｕｉｎｎ’ｓ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ分割培地（ＳＡＧＥ，Ｏｒｉｇｉｏ，デンマーク）による２０μＬ液滴に移し、５％CO_2および大気酸素下、３７℃で培養することによって、２細胞期の胚を卵管から回収した。収集した胚は胚盤胞／孵化期まで成長、すなわちインビトロ培養（ＩＶＣ）を続けた。無定形炭酸カルシウムの効果を試験するため、Ｑｕｉｎｎ’ｓ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ分割培地（以後、「分割培地」）を異なる添加剤、すなわち、ポリリン酸によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ－ＰＰ）、結晶炭酸カルシウム（ＣＣＣ）、ポリリン

酸（ＰＰ）、ホスホセリン（ＰＳ）、または炭酸ナトリウム（$NaCO_3$）で補充した。すべてのサプリメントは新たに調製した懸濁液として加え、ＡＣＣサプリメントの調製は無菌条件下で実施した。未処理分割培地（いずれの添加物の添加もない）を対照（ＣｏｎｔＱとして表示）として使用した。胚を、２細胞、緊密化期、胚盤胞形成、および孵化期の段階の検出のために顕微鏡観察によって毎日評価した。各期に到達した胚の割合（パーセント）を計算した（２細胞胚の数を１００％に設定した）。

【０２３９】

結果

【０２４０】

ＰＰで安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ－ＰＰ）の１．７ｍＭが補充された分割培地における胚発達を、対照（ＣｏｎｔＱ－未処理培地における発達）と比較した。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（後者は括弧で示す）を表５に示す。

【表５】

表５．未処理分割培地およびＡＣＣ－ＰＰ補充培地における胚成長間の比較

	２細胞／ｄ１	緊密／ｄ２	胚盤胞／ｄ３	孵化／ｄ４
ContQ	12	2(16.6)	10(83.3)	8(66.6)
ACC-PP	40	17(42.5)	40(100)	32(80)

例７．

【０２４１】

ＡＣＣ－ＰＰまたは塩化カルシウム（$CaCl_2$）のどちらかが１．７ｍＭ補充された分割培地における胚発達を２つの別々の検査で試験した（ＡおよびＢ）。試験Ａでは胚を胚盤胞期まで、試験Ｂでは孵化期まで成長させた。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表６（試験Ａ）および表７（試験Ｂ）に示す。

【表６】

表６．試験Ａ：ＡＣＣ－ＰＰまたは$CaCl_2$のどちらかが１．７ｍＭ補充された分割培地において成長した胚間の比較

	２細胞／ｄ１	緊密／ｄ２	胚盤胞／ｄ３
$CaCl_2$	25	16(64)	16(64)
ACC-PP	26	24(92.3)	22(84.6)

【表７】

表７．試験Ｂ：ＡＣＣ－ＰＰまたは$CaCl_2$のどちらかが１．７ｍＭ補充された分割培地において成長した胚間の比較

	２細胞／ｄ１	緊密／ｄ２	胚盤胞／ｄ３	孵化／ｄ４
$CaCl_2$	27	20(70)	20(74)	11(40.7)
ACC	23	23(100)	23(100)	23(100)

例８．

【０２４２】

１．７ｍＭの$CaCl_2$、１．７ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ、または０．８５ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ（ＡＣＣ－ＰＰの最初の濃度の半分、ＡＣＣ－ＰＰ０．８５として識別）が補充された分割培地における胚発達。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表８に示す。

【表８】

表８．１．７ｍＭのＣａＣｌ$_2$、１．７ｍＭまたは０．８５ｍＭのＡＣＣ－ＰＰが補充された分割培地において成長した胚間の比較

	２細胞／ｄ１	緊密／ｄ２	胚盤胞／ｄ３	孵化／ｄ４
$CaCl_2$	10	3(30)	8(80)	3(30)
ACC	11	7(63.6)	9(81.8)	7(63.6)
ACC-PP0.85	11	8(72.7)	9(81.8)	8(72.7)

例９．

【０２４３】

１．７ｍＭのＣａＣｌ$_2$、１．７ｍＭまたは０．８５ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ（ＡＣＣ－ＰＰ０．８５）が補充された分割培地における胚発達を試験し、未処理培地における発達と比較した。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表９に示す。

【表９】

表９．未処理分割培地および１．７ｍＭのＣａＣｌ$_2$、１．７ｍＭまたは０．８５ｍＭのＡＣＣ－ＰＰが補充された分割培地において成長した胚間の比較

	２細胞／ｄ１	緊密／ｄ２	胚盤胞／ｄ３	孵化／ｄ４
ContQ	42	30(71.4)	38(90.4)	15(35.7)
$CaCl_2$	30	16(53.3)	24(80)	13(43.3)
ACC-PP	30	23(76.6)	27(90)	12(40)
ACC-PP0.85	30	21(70)	30(100)	24(80)

例１０．

【０２４４】

この実験では、４匹の５月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから得る胚を材料および方法で記載されたように収集したが、胚は一緒にプールせず、各マウスの各卵管からの胚を１．７ｍＭのＣａＣｌ$_2$または１．７ｍＭのＡＣＣ－ＰＰが補充された分割培地のどちらかで成長させて、培養で別々に成長させた。この方法では、各雌から得る胚が同胞だったため、マウス間の差を評価することもできた。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表１０に示す。

【表１０】

表１０．ＣａＣｌ$_2$またはＡＣＣ－ＰＰのどちらかが１．７ｍＭ補充された分割培地において別々に成長した、４匹の雌から得た胚間の比較

	$CaCl_2$	ACC-PP	$CaCl_2$	$CaCl_2$	ACC-PP	ACC-PP	$CaCl_2$	$CaCl_2$	ACC-PP	ACC-PP	$CaCl_2$	ACC-PP	$CaCl_2$	ACC-PP
マウスＮｏ．	全胚数	全胚数	2細胞/d1	無効/d1	2細胞/d1	無効/d1	8細胞/d2	緊密/d2	8細胞/d2	緊密/d2	胚盤胞/d3	胚盤胞/d3	孵化/d4	孵化/d4
1	12	11	3	9	3	8	2	1	0	3	1 (8.3)	3 (27.3)	0 (0)	2 (18.2)
2	9	13	3	6	4	9	0	3	0	5	2 (22.2)	5 (38.5)	0 (0)	4 (30.8)
3	10	10	7	3	3	7	0	6	0	4	5 (50)	4 (40)	3 (30)	3 (30)
4	18	17	14	4	13	4	4	10	2	12	12 (66.7)	14 (82.3)	7 (41.2)	12 (70.6)

例１１．

【０２４５】

この実験では、７匹の６月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから、胚を材料および方法で記載されたように収集したが、マウスＮｏ．１および２からは、胚は一緒にプールせず、例５のように別々に成長させた。マウスＮｏ．１から得る胚は、未処理分割培地または２．６ｍＭのＡＣＣ－ＰＰを補充した培地（ＡＣＣ－ＰＰ２．６）のどちらかで成長させた。マウスＮｏ．２から得る胚は、ＡＣＣ－ＰＰの１．３ｍＭまたは０．６ｍＭが補充された分割培地（それぞれ、ＡＣＣ－ＰＰ１．３およびＡＣＣ－ＰＰ０．６で表す）で成長させた。マウスＮｏ．３～７から得る胚はすべて一緒にプールし、ポリリン酸の１．６ｍＭ添加で成長させた（ＰＰ）。さらに、胚盤胞の直径および容積を計算した。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表１１に示す。

【表１１】

表１１．未処理分割培地またはＡＣＣ－ＰＰが異なる濃度で補充された培地において成長させた同胞胚間の比較。マウスＮｏ．３～７からプールした胚をポリリン酸が補充された培地で成長させた。

	マウスＮｏ．１		マウスＮｏ．２		マウスＮｏ．３～７
添加剤	ContQ	ACC-PP2.6	ACC-PP1.3	ACC-PP0.6	PP
全数	17	19	18	13	37
８細胞／ｄ２	7	3	7	4	9
緊密／ｄ２	10	16	11	8	20
胚盤胞／ｄ３	17(100)	19(100)	18(100)	13(100)	20(54.1)
孵化／ｄ４	11(64.7)	19(100)	17(94.4)	6(46.2)	17(45.9)

【０２４６】

ＡＣＣ－ＰＰの２．６ｍＭ添加で成長させて孵化した胚盤胞は、対照よりも２８％大きい直径および２倍大きい容積を有した。

例１２．

【０２４７】

この実験では、７匹の６月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから得る胚を材料および方法（例６）に記載されたよう収集した。胚を一緒にプールし、５群に分けて、未処理分割培地（ＣｏｎｔＱ）、または２．６ｍＭ、１．３ｍＭ、０．６ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ（それぞれ、ＡＣＣ－ＰＰ２．６、ＡＣＣ－ＰＰ１．３、およびＡＣＣ－ＰＰ０．６として表す）、または１．６ｍＭのポリリン酸（ＰＰ）が補充された培地で成長させた。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表１２に示す。

【表１２】

表１２．未処理分割培地あるいは２．６ｍＭ、１．３ｍＭ、または０．６ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ、あるいは１．６ｍＭのＰＰが補充された培地における胚成長間の比較

	ContQ	ACC-PP2.6	ACC-PP1.3	ACC-PP0.6	PP
全数	42	20	31	21	36
８細胞／ｄ２	19	5	7	5	6
緊密／ｄ２	25	15	24	16	30
胚盤胞／ｄ３	35(83.33)	20(100)	26(83.87)	3(14.28)	34(94.44)
孵化／ｄ４	16(38.09)	19(95)	15(48.38)	18(85.7)	16(44.44)

例１３．

【０２４８】

この実験では、６匹の６月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから得る胚を材料および方法に記載されたよう収集した。胚を一緒にプールして３つの群に分け、１つの群は対照（ＣｏｎｔＱ）として使用し、他の２つの群では胚はＡＣＣ－ＰＰの３．３ｍＭ（ＡＣＣ－ＰＰ３．３）または３．３ｍＭの市販ナノメーター結晶炭酸カルシウム（ＣＣＣ）が補充された分割培地で成長させた。すべての培地は無菌条件下で調製した。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表１３に示す。

【表１３】

表１３．未処理分割培地あるいは３．３ｍＭのＡＣＣ－ＰＰまたは３．３ｍＭのＣＣＣが補充された培地で成長した胚間の比較

	ContQ	ACC-PP3.3	CCC
全数	18	45	17
８細胞／ｄ２	10	0	3
緊密／ｄ２	8	45	14
胚盤胞／ｄ３	18(100)	45(100)	17(100)
孵化／ｄ４	14(77.7)	42(93.3)	14(82.35)

例１４．

【０２４９】

この実験では、６匹の７月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから、胚を材料および方法（例６）に記載されたよう収集した。胚は一緒にプールし、１．７ｍＭの$CaCl_2$、１．７ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ、０．８ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ（ＡＣＣ－ＰＰ０．８）、または１．７ｍＭのホスホセリン（ＰＳ）が補充された分割培地において成長させた。各発達期の胚数および最初の胚数に対するこれらの割合（括弧内）を表１４に示す。

【表１４】

表１４．１．７ｍＭのＣａＣｌ$_2$、１．７ｍＭ、０．８ｍＭのＡＣＣ－ＰＰ、または１．７ｍＭのＰＳが補充された分割培地において成長した胚間の比較

	$CaCl_2$	ACC-PP	ACC-PP0.8	PS
全数	11	15	14	13
８細胞／ｄ２	6	1	3	5
緊密／ｄ２	5	14	11	8
胚盤胞／ｄ３	10(90.90)	14(93.3)	14(100)	12(92.3)
孵化／ｄ４	4(36.36)	13(86.6)	11(78.57)	10(76.9)

【０２５０】

この特定の実験では、塩化カルシウムを加えることは、胚発達に負の影響を及ぼし、胚盤胞および孵化胚盤胞の低い割合をもたらした。

例１５．

【０２５１】

この実験では、６匹の６月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから得る胚を材料および方法（例６）に記載されたように収集したが、マウスＮｏ．１および２から得る胚は一緒にプールせず、同胞実験としてむしろ別々に成長させた（例１０を参照）。雌Ｎｏ．１から得る胚を未処理分割培地または１．７ｍＭのナノメーター結晶炭酸カルシウム（ＣＣＣ）が補充された培地で成長させた。マウスＮｏ．２から得る胚を１．７ｍＭのＡＣＣ－ＰＰまたは１．７ｍＭの炭酸ナトリウム（$NaCO_3$）が補充された培地で成長させた。マウスＮｏ．３～６から得る胚はすべて一緒にプールし、未処理培地、あるいは１．７ｍＭの$NaCO_3$または１．７ｍＭのＡＣＣ－ＰＰが補充された培地で成長させた。さらに、胚盤胞の直径および容積を計算した（表１５を参照）。

【表１５】

表１５．異なる補充がされた分割培地における２匹のマウスから得られた同胞胚およびプールした胚の発達評価

	マウスＮｏ．１		マウスＮｏ．２		マウスＮｏ．３～６		
添加剤	ContQ	CCC	ACC-PP	$NaCO_3$	ContQ	$NaCO_3$	ACC-PP
全数	20	24	12	16	20	10	19
８細胞／ｄ２	14	14	3	6	14	2	17
緊密／ｄ２	6	6	8	8	6	7	8
変性	0	1	1	2	0	1	0
初期胚盤胞／ｄ３	11	8	2	14	12	0	2
胚盤胞／ｄ３	9	12	9	2	8	0	17
胚盤胞／ｄ４	6	5	0	0	6	0	0
孵化／ｄ４	14(70)	15(62.5)	11(91.6)	2(12.5)	14(70)	0(0)	19(100)

【０２５２】

炭酸ナトリウムを添加することは、対照またはＡＣＣ－ＰＰの添加と比べて非常に乏しい胚発達をもたらしたことが認められる。ＡＣＣ－ＰＰの２．６ｍＭ補充した分割培地で成長させて孵化した胚盤胞は、対照よりも２８％大きい直径および２倍大きい容積を有したことも認められた。

例１６．細胞培養培地サプリメントとして製剤化された１０％ＴＰ－１％クエン酸ＡＣＣ（１０％三リン酸および１％クエン酸によって安定化されたＡＣＣ）の調製

【０２５３】

３％塩化カルシウム溶液３６ｍｌを０．２７％クエン酸溶液４ｍＬおよび０．５４０６％三リン酸溶液１０ｍＬと混合した。１．９４８５％炭酸ナトリウム溶液４０ｍＬを加え

てＡＣＣを沈殿させた。０．５４０６％三リン酸を含む安定化溶液１０ｍＬをＡＣＣ懸濁液に加えて安定化ＡＣＣ懸濁液を得た。得られた懸濁液をＱｕｉｎｎ’ｓ（商標）分割培地またはＱｕｉｎｎ’ｓ（商標）１－Ｓｔｅｐ培地にサプリメントとして使用した。懸濁液を１．７または３．４ｍＭのＡＣＣ最終濃度まで加えた。あるいは、懸濁液をブフナー漏斗によってろ過し、固体物を水で洗浄し、固体物をさらにオーブンなどで乾燥させる。粉末を１．７または３．４ｍＭの最終濃度まで分割培地に加える。

例１７．

【０２５４】

この実験では、４匹の６～８月齢雌マウスを安楽死させた。各マウスから得る胚を材料および方法に記載されたように収集した。安定化ＡＣＣ（１０％三リン酸および１％クエン酸によって安定化されたＡＣＣ）を例１６で説明したように調製した。各雌から得る胚を分離し、第一部分を未処理ＳＡＧＥ１－Ｓｔｅｐ（商標）培地で、第二部分を１．７ｍＭのＡＣＣ－ＰＰまたは３．４ｍＭのＡＣＣ－ＰＰが補充されたＳＡＧＥ１－Ｓｔｅｐ（商標）培地で成長させた。図８から認められるように、安定化ＡＣＣの添加は胚発達に正の効果を有し、特に３．４ｍＭのＡＣＣによって胚盤胞および孵化胚盤胞の高い割合がもたらされた。安定化ＡＣＣが補充された分割培地で成長させた胚は、迅速な卵割および高い孵化率を示したことが驚くべきことに認められている。

例１８．細胞培養培地サプリメントとして製剤化されたＡＣＣの調製

【０２５５】

異なる安定化剤（三リン酸（ＴＰ）、ヘキサメタリン酸（ＨＭＰ）、ピロリン酸（Ｐｙｒ）、ホスホセリン（ＰＳ）、エチドロン酸（ＥＴ）、ゾレドロン酸（ＺＡ）、またはメドロン酸（ＭＡ）を調製した）によって安定化されたＡＣＣの組成物を調製した。典型的な手順では、カルシウム溶液（水３００ｍＬ、塩化カルシウム２４ｇ、および安定剤）および炭酸溶液（水２００ｍＬおよび炭酸ナトリウム１７．３ｇ）を一緒に混合してＡＣＣを沈殿させた。安定剤溶液（水１００ｍＬおよび安定剤、表１６にカルシウムおよび安定剤溶液における安定剤の含量を示す）をＡＣＣ懸濁液に加えて安定化ＡＣＣ懸濁液を得た。懸濁液はサプリメントとして使用され得る。ついでＡＣＣをブフナー漏斗によってろ過し、固体物を水で洗浄した。懸濁液を乾燥させて粉末を得た。粉末は細胞培養培地サプリメントとして加える、または水性培地に再懸濁させて懸濁液として加え得る。

【表１６】

表１６．異なるＡＣＣ組成物における安定剤の含量

安定剤	組成物							
	1%%P	2%TP/HMP/Pyr	3%TP/HMP/Pyr	4%TP/HMP/Pyr	5%TP/HMP/Pyr/PS/ET/ZA/MA	6% TP/HMP/Pyr/PS/	10% TP/HMP/Pyr/PS/ET/ZA/MA	15% TP/HMP/Pyr/PS
カルシウム溶液（ｇ）	0.12	0.24	0.36	0.48	0.6	0(72)	1.2	1.8
安定化溶液（ｇ）	0.12	0.24	0.36	0.48	0.6	0(72)	1.2	1.8

【０２５６】

他の例では、組成物は前述のように、最終組成物で１％クエン酸を得るように、カルシウム溶液へのクエン酸の添加によって調製した。懸濁液それ自体が培養培地サプリメントとして使用される。あるいは、懸濁液はさらに水で洗浄して乾燥させて粉末を得た。粉末は任意の細胞培養培地に加え得る、または水性培地で再懸濁させ得る。

例１９．ＭＢＡ１３幹細胞（骨髄間質細胞）の骨芽細胞への成長

【０２５７】

材料および方法

【０２５８】
解凍の２日後、ＭＢＡ－１３細胞（ワイツマン科学研究所、Ｄｏｖ　Ｚｉｐｏｒｉ教授から入手）を組換えトリプシン溶液に再懸濁し、ＭＳＣ　Ｎｕｔｒｉｓｔｅｍ（登録商標）ＸＦ基礎培地（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、ｃａｔ　Ｎｏ．０５－２００－１Ａ）に間葉幹細胞（ＭＳＣ）補充混合培地（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ　ｃａｔ　Ｎｏ．０５－２０１－０６）を５０ｍｌ：３００μＬの割合で補充して用いて、９６ウェルプレートに細胞１×１０^{4}個／ウェルの濃度で播種した（０日目）。９６ウェルプレートの１～４列のＡ～Ｈ行を、細胞播種のためにＰＢＳ（Ｃａ$^{2+}$、Ｍｇ$^{2+}$イオン無添加）で１：１００の比に希釈したＭＣＳ接着溶液によってプレコーティングした。９６ウェルプレートの５～８列のＡ～Ｈ列を、０．１％ゼラチンによって室温、３０分間プレコーティングした。

【０２５９】
２日目に、８０％を超える細胞密集が達成されたとき（約４８時間）、培地を骨芽細胞分化を促進する因子を含むＭＳＣｇｏ　ｒａｐｉｄ　ｏｓｔｅｏｇｅｎｉｃ　ｍｅｄｉｕｍ（迅速骨形成培地）（ｃａｔ　Ｎｏ．０５－４４２－１Ｂ）に交換した。培地交換後、Ａ～Ｃ行に１０％三リン酸＋１％クエン酸によって安定化された無定形炭酸カルシウム（ＡＣＣ）由来の１ｍＭ追加カルシウム（全２．４８８ｍＭカルシウム）を補充し、Ｄ～Ｆ行に塩化カルシウム由来の１ｍＭ追加カルシウム（全２．４８８ｍＭカルシウム）を補充し、プレートのＧ行はＭＳＣｇｏ培地（全１．４８８ｍＭカルシウム）で処理した。プレートのＨ行はＭＳＣ　ＮｕｔｒｉＳｔｅｍ（登録商標）　ＸＦ栄養基礎培地＋サプリメント混合物（全１．４８８ｍＭカルシウム）で処理した。

【０２６０】
４日目に、培地をＡＣＣの新鮮な調製物に交換した。

【０２６１】
並行して、対照プレートもＭＤＸマウスの損傷した筋肉由来のＭＤＸ細胞株で播種した。これらの細胞の染色を使用して、細胞本来のカルシウムのバックグランド染色を設定し、またＡＣＣ処理のカルシウム沈着が染色される可能性を排除した。播種前に、ウェルをゼラチンでコーティングし、これはＭＤＸ細胞接着用の標準的基材として使用される。ＭＤＸ細胞を２４ウェルプレートに３×１０^{4}個／ウェルの濃度で加えた。播種日を「０日」として定める。

【０２６２】
２日目に、ウェルの培地を次のように交換した。

【０２６３】
１および２列は施設内で調製する脊髄（ＳＣ）培地（０．６ｗｔ％Ｄ－グルコース、２ｍＭのＬ－グルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、Ｂ２７、N_2、０．１　ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ、Ｈｅｐｅｓ、１０％ＦＢＳ、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、および５０ｎｇ／ｍＬのＩＧＦ－Ｉを含む培地）＋ＡＣＣ由来の１ｍＭカルシウム（２ｍＭの全カルシウム濃度）で処理した。３および４列はＳＣ培地＋$CaCl_2$由来の１ｍＭで処理した。５および６列はＳＣ培地で処理した。細胞の両タイプ（ＭＢＡ１３およびＭＤＸ）を１０日目まで培養した。

【０２６４】
各タイプについて数ウェルの固定（４％ホルムアルデヒドで２０分間）を、培地交換後の５、７、および１０日目、すなわち試験の７、９、および１２日目に実施した。

【０２６５】
細胞を固定してから、２種の染色試薬を使用して細胞外カルシウムまたは骨沈着を染色して骨芽細胞機能性を評価した。（ｉ）アリザリンレッド（シグマ、Ａ５５３３３）および（ｉｉ）アルカリホスファターゼ（ＤＡＫＯ、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質システムＫ０５９８）は次の通りだった。

【０２６６】
アリザリンレッド染色手順－ｐＨを４．２に調整した。細胞をＰＢＳで２回洗浄し、冷

却エタノールで５分間固定し、ついでＰＢＳで再度洗浄した。アリザリン溶液を２％の濃度で１５～２０分間使用した。染色インキュベーション後、サンプルを水で２～３回洗浄して非特異的染色を取り除いた。

【０２６７】

アルカリホスファターゼ染色－細胞をＰＢＳで１または２回洗浄し、ついで４％パラホルムアルデヒドで２０分間固定した。そしてＰＢＳで３回洗浄し、残存ＰＢＳを除去後、ＢＣＩＰ／ＮＢＴキット溶液の３滴を使用して細胞を覆い、対照としていずれの細胞も含まない空ウェルを測定の質を高めるために含めた。アルカリホスファターゼキットのインキュベーションを１時間実施し、ついで蒸留水ですすいだ。

【０２６８】

結果

【０２６９】

１０日間培養し、アリザリンおよびアルカリホスファターゼによって染色された細胞の結果を示す。１０日前に実施された観察は、両染色法においていずれのカルシウム沈着もほとんど検出されなかった。

【０２７０】

細胞状態を２日および４日の２時点で光学顕微鏡（固定なし）によって観察した。両観察において、ＭＳＣ接着溶液によってプレコーティングしたウェルに播種された細胞は、良好な状態でなく、細胞は丸みを帯びた。これに対し、ゼラチンでプレコーティングしたウェルに播種された細胞は良好な状態だった。だが、両タイプのプレコーティングで継続することにした。次の結果および染色手順は、接着基材として使用されたゼラチンにおける細胞成長に関するものである。

【０２７１】

アリザリンレッド染色では、カルシウム沈着はオレンジレッド色によって検出される。

【０２７２】

アリザリンレッド染色は、ＡＣＣが補充された骨芽細胞における非常に強いシグナルを、弱いシグナルのみを示した$CaCl_2$が補充されたものと比較して実証した（図９）。シグナルに加え、大きいカルシウム沈着が染色され、これは対照処理のいずれでも観察されないことが図で認められる。

【０２７３】

ＭＳＣｇｏ迅速培地で成長させた細胞のアリザリンレッド染色もまたカルシウム沈着のいくつかの染色を示したが、沈着のサイズおよびその量は有意に低く、$CaCl_2$が補充された細胞で認められた形態学および量と類似する。カルシウム沈着はＭＳＣ　ＮｕｔｒｉＳｔｅｍ＋サプリメント（ＭＳＣｓｕｐ、テータは示さず）で成長させた細胞では認められなかった。ＭＳＣ　ＮｕｔｒｉＳｔｅｍ＋サプリメント培地は通常、細胞分化よりもむしろ細胞増殖を誘発するために使用される。実際、観察される細胞の数は多いが、カルシウム沈着は観察されない。

【０２７４】

観察は、ＡＣＣ処理が骨芽細胞へのＭＢＡ１３細胞分化を高め、細胞カルシウム沈着を増加させる、すなわちこれらの機能性を高めることを示唆する。

【０２７５】

骨芽細胞分化に関する別の独立したマーカーはアルカリホスファターゼである。この酵素は、細胞のマトリックス成熟期が生じるとき、最大限に発現される。アルカリホスファターゼ染色は、骨芽細胞分化および機能性を検出する補足的方法として使用し、アリザリン染色によって得られた結果を検証した。

【０２７６】

アルカリホスファターゼ染色は黒色として示され、結果を図１０に示す。ＡＣＣによって処理されたＭＢＡ１３細胞は、他の処理と比べて強いシグナルを示した。実際、アルカリホスファターゼ染色は、骨芽細胞分化がＡＣＣによって処置された培養で優れていることを裏付ける。

【０２７７】
ＡＣＣ添加培地によって播種後１０日間処理されたＭＤＸ細胞のアリザリン染色は、処理間で染色に大きな差のないことを示した（図１１Ａ～Ｃを参照）。これらの結果は、骨芽細胞のアリザリンレッド染色が、骨芽細胞によるカルシウム沈着に起因しており、処理それ自体によって生じたＡＣＣ沈着によるものではないことを裏付ける（すなわち、実験上の人為的結果ではない）。
【０２７８】
ＭＤＸ細胞株のアルカリホスファターゼ染色（図１１Ｄ～Ｅ）は、骨形成が生じなかったことを示した。興味深いことに、アルカリホスファターゼ染色では、高められた筋管形成が、$CaCl_2$補充された培地または対照で成長された細胞と比べてＡＣＣ処理細胞で観察された。
【０２７９】
結論
【０２８０】
異なる培地における播種の１０日後のアリザリンレッドおよびアルカリホスファターゼ染色である独立した両染色は、使用された対照と比べてＡＣＣが補充された培地で成長した骨芽細胞沈着のかなり強い染色を示した。
【０２８１】
細胞をＡＣＣの存在中で成長させるとき、大きいカルシウム沈着プラークが観察されたが、このような沈着は$CaCl_2$が補充された培地で成長させた細胞では観察されなかった。染色がより多くのプラーク沈着を示したため、強いシグナルは高い機能性について示している可能性がある。ＭＤＸ細胞染色によって得られる結果は、プラークがＡＣＣ添加によるものではなく、骨芽細胞の機能による直接的な結果であることを示唆する。
例２０．精子運動率向上のためのＡＣＣ
【０２８２】
材料および方法
【０２８３】
ＡＣＣサプリメント調製
【０２８４】
３％塩化カルシウム溶液３６ｍｌを０．３％クエン酸溶液４ｍＬおよび０．５％三リン酸溶液１０ｍＬと混合した。２％炭酸ナトリウム溶液４０ｍＬを加えてＡＣＣを沈殿させた。０．５％三リン酸を含む安定化溶液１０ｍＬをＡＣＣ懸濁液に加えて安定化ＡＣＣ懸濁液を得た。得られる懸濁液のカルシウム元素濃度は７５ｍＭだった。
【０２８５】
精子収集
【０２８６】
精子を同一ヒツジから３回（実験１）または３頭のヒツジから２回（実験２および３）採取し、室温で濃度および運動率を評価した。精子を、ミリＱ水に１０７．７０ｍＭのＮａＣｌ、７．１６ｍＭのＫＣｌ、１．１９ｍＭのKH_2PO_4、１．７１ｍＭの$CaCl_2$、０．４９ｍＭの$MgCl_2$、２５．０７ｍＭの$NaHCO_3$、３．３０ｍＭの乳酸ナトリウム、および１．５０ｍＭグルコース（１０）を含む合成卵管液（ＳＯＦ）で５千万個／ｍＬの濃度に希釈した。モル浸透圧濃度は２７０ｍＯｓｍｏｌおよびｐＨ７．５５となる。
【０２８７】
そして精子についてＣＡＳＡ（Ｔｈｅ ｒｉｏｇｅｎｏｌｏｇｙ，２０１４，Ｖｏｌｕｍｅ８１，Ｉｓｓｕｅ１，Ｐａｇｅｓ５－１７）を用いで運動率を評価し、４℃まで１℃／分で冷却した。
【０２８８】
スイムアップ法
【０２８９】

スイムアップ法は３８℃で実施し、原精子（１０μＬ）をエッペンドルフ１ｍＬバイアルに加え、０．２５ｍＬストロー（ＣＢＳ、フランス）に挿入されたＳＯＦ培地中で約１時間インキュベーションした。４０～６０分後、ストローに入った精子をスライドに加え、ＣＡＳＡによって評価した。

【０２９０】

結果

【０２９１】

新たに収集された精子の運動率を材料および方法セクションで説明されたように、無定形炭酸カルシウムの添加または無添加で試験した。結果を表１７に示す。

【表１７】

表１７．ＡＣＣ懸濁液３４μＬ／ｍＬの添加（カルシウム元素の２．６ｍＭ）の有無による精子の運動率評価

	運動率　％	前進運動率　％
対照	96±1.15	55.3±1.15
ACC(34μL/mL、2.6mMのCa元素)	95±1	70.6±3.2

【０２９２】

ＡＣＣが補充された精子は未処理精子と比べて非常に高い前進運動率を有したことが認められる。

例２１．スイムアップ実験における精子運動率に対するＡＣＣの効果

【０２９３】

精子運動率におけるＡＣＣの効果を評価するため、標準的なスイムアップ実験をＡＣＣ懸濁液の１７μＬ／ｍＬおよび３４μＬ／ｍＬ（それぞれ１．３および２．６ｍＭのＣａ元素）の存在中で実施した。生存可能な精子を１時間後に計数し、結果を表１８にまとめて示す。

【表１８】

表１８．スイムアップ実験における精子運動率に対するＡＣＣの効果（百万個／ｍＬ濃度）

ＡＣＣ濃度（カルシウム元素濃度）	精子濃度（×１０^6／ｍＬ）		
	実験１	実験２	実験３
対照	142±7.3	97±15	207±12
ACC 17μL/mL(1.3mMのCa元素)	523±5.7	186±14	
ACC 34μL/mL(2.6mMのCa元素)			1463±400

【０２９４】

ＡＣＣの添加はすべての実験において生存可能な精子の数を有意に増加したことが明確に認められる。ＡＣＣが補充されたサンプルでは、生存可能な精子の数は未処理サンプルよりも２～７倍高かった。

例２２．スイムアップ実験における精子運動率に対するＡＣＣ濃度の効果

【０２９５】

精子の運動率におけるＡＣＣ濃度の効果を、各ＡＣＣについて３種の異なるサンプルを用いてスイムアップ実験によって試験した。結果を表１９にまとめて示す。

【表１９】

表１９．スイムアップ実験における精子運動率に対するＡＣＣ濃度の効果（百万個／ｍＬ濃度）

ＡＣＣ濃度（カルシウム元素濃度）	精子濃度（×１０^6）
対照	45.5
ACC 8μL/mL(0.6mMのCa元素)	102、77、89
ACC 17μL/mL(1.3mMのCa元素)	179、170、174
ACC 34μL/mL(2.6mMのCa元素)	196、200、198
ACC 60μL/mL(4.6mMのCa元素)	183、205、193

【０２９６】

卵管液（ＳＯＦ）溶液への１７μＬ／ｍＬのＡＣＣ懸濁液の添加および３８℃で１時間のインキュベーションは、運動性精子の濃度を少なくとも３倍増加した。興味深いことに、ＡＣＣの濃度が高くなるとスイムアップ後の移動性精子の濃度を低下させなかった。ＡＣＣはスイムアップ法後の精子濃度を高め、イオン性カルシウムにおけるいずれの二相性効果も有さなかった。最小の効果的用量を超えるいずれのＡＣＣ濃度も運動率を増加させる。

例２３．ＡＣＣはインビトロで卵巣を維持する。

【０２９７】

材料および方法

【０２９８】

卵巣をマウス（６週齢）から収集して０．４mm×０．４mm片に切断した。卵巣を１２ウェルプレートで培養した。培養培地は、カルシウム枯渇した（カルシウムイオン無添加培地、特別調製）ダルベッコ改変イーグル培地－栄養素混合物Ｆ－１２（ＤＭＥＭ－Ｆ１２）が９０％、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２mMグルタミン、２５μｇ／ｍＬゲンタマイシン、および０．３～０．５％ＮＶＲ－Ｇｅｌから、３．４mM安定化ＡＣＣ－ＰＰの添加または無添加で構成された。培養の４８時間後、妊馬血清性ゴナドトロピン（ＰＭＳＧ）の５ＩＵを培養皿に加えた。

【０２９９】

結果

【０３００】

二次卵胞が安定化ＡＣＣの存在下でインビトロ培養の２週後に発達し、卵母細胞を囲む顆粒膜細胞は完全なものだったことが、図１２で認められる。これに反し、対照群における二次卵胞は、不完全な顆粒膜細胞および胚胞卵母細胞を示す。かなり多くの卵胞がＡＣＣ群で観察され、培養培地におけるＡＣＣの添加が卵胞の迅速で優れた成長および卵巣の改善された保存を可能にすることを意味した。

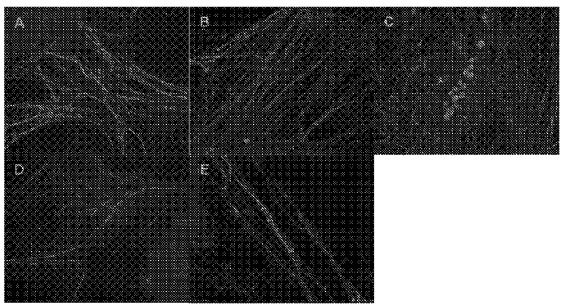
【０３０１】

本発明はその好ましい実施形態の手段によって本明細書で前述されているが、添付の請求で定められる本発明の精神および性質から逸脱することなく変更され得る。

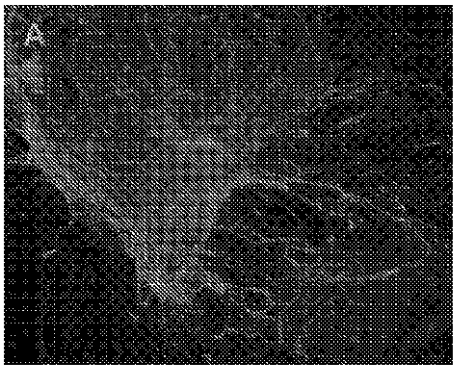
【図面】

【図１】

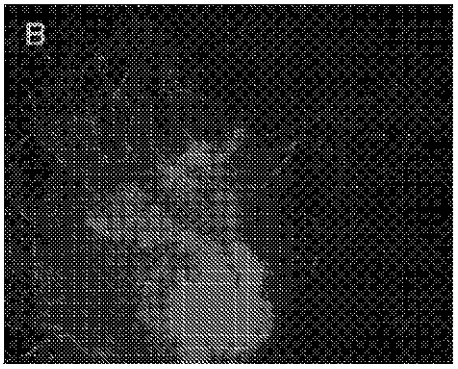
FIG. 1



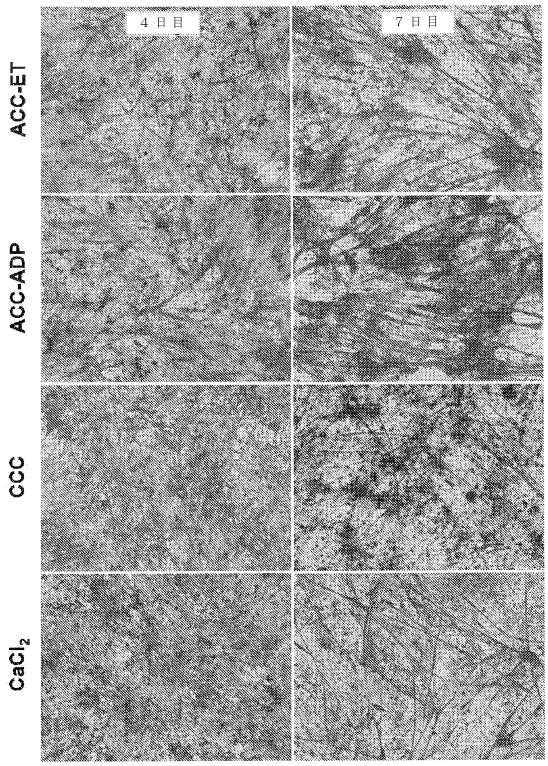
【図２Ａ】



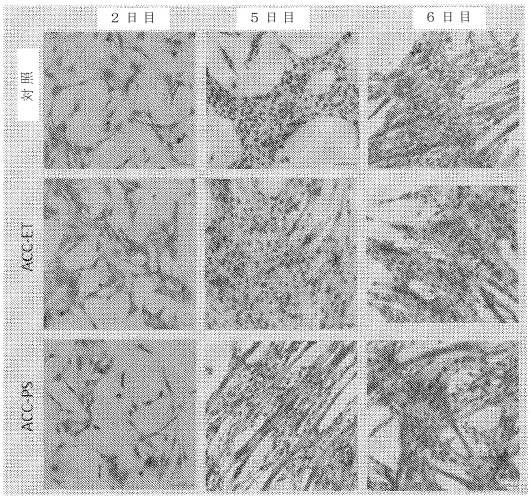
【図２Ｂ】



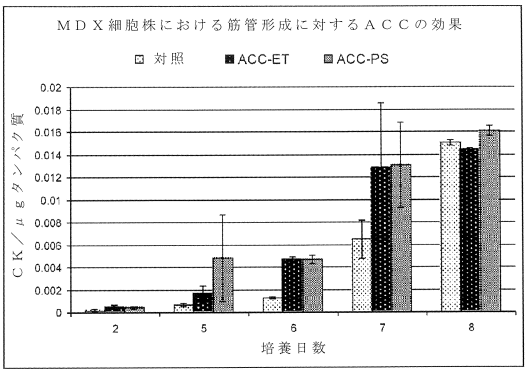
【図３】



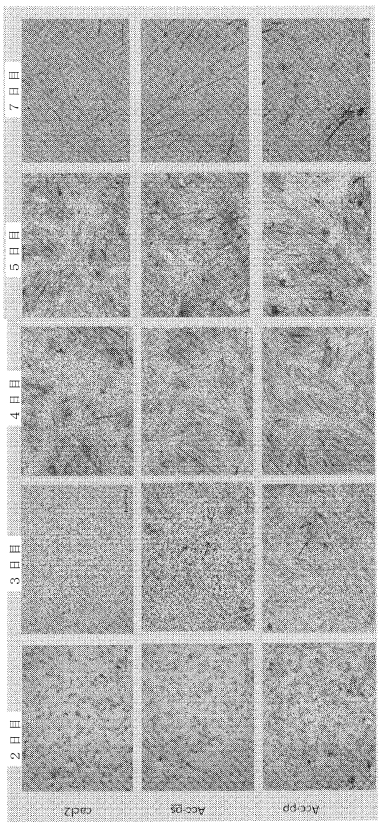
【図４】


２日目
５日目
６日目
対照
ACC-ET
ACC-PS

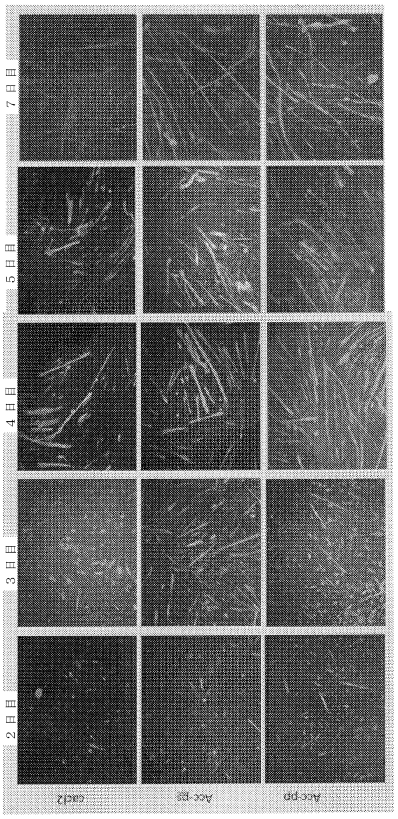
【図５】


ＭＤＸ細胞株における筋管形成に対するＡＣＣの効果
対照
ACC-ET
ACC-PS
ＣＫ／μｇタンパク質
0.02
0.018
0.016
0.014
0.012
0.01
0.008
0.006
0.004
0.002
0
2
5
6
7
8
培養日数

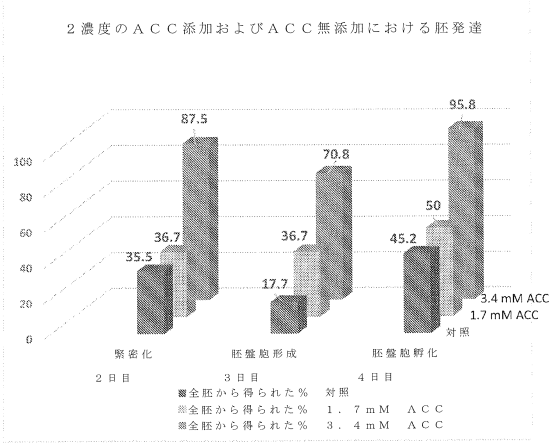
【図６】


７日目
５日目
４日目
３日目
２日目

【図７】


７日目
５日目
４日目
３日目
２日目

【図８】



【図９Ａ】

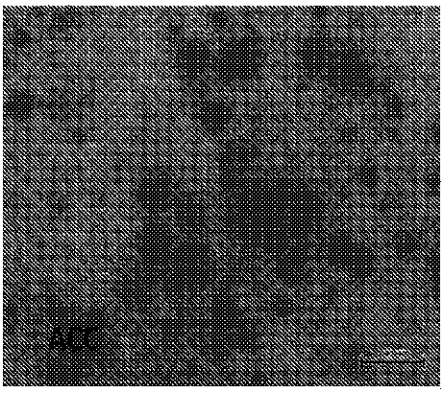


FIG. 9 A

【図９Ｂ】

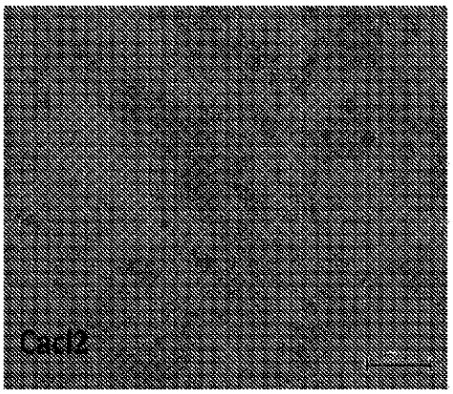


FIG. 9B

【図９Ｃ】

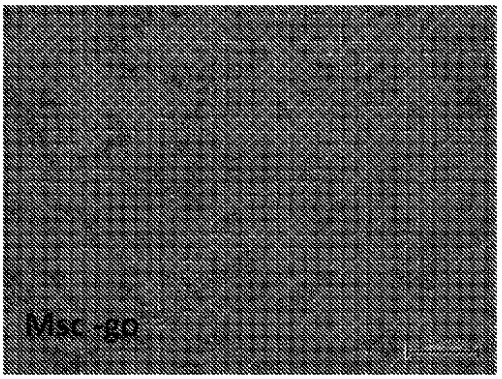


FIG. 9 C

【図１０Ａ】

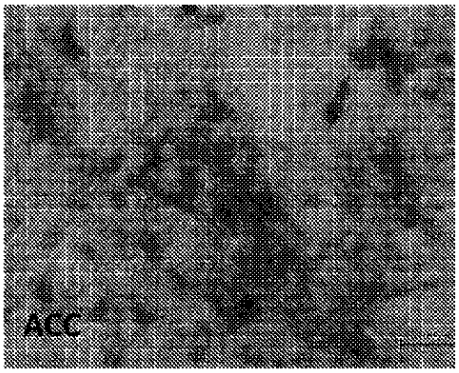


FIG. 10 A

【図１０Ｂ】

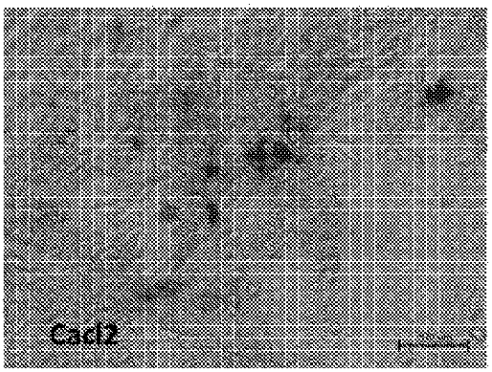


FIG. 10 B

【図１０Ｃ】

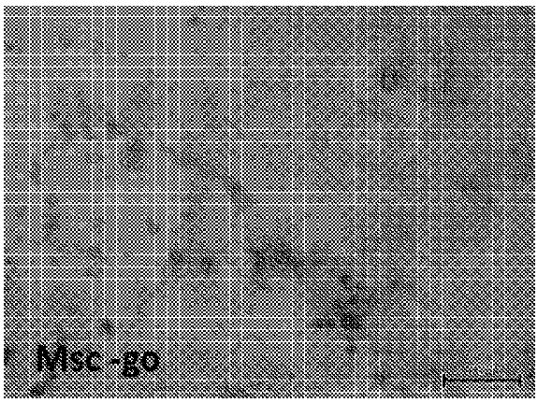


FIG. 10 C

【図１１Ａ】

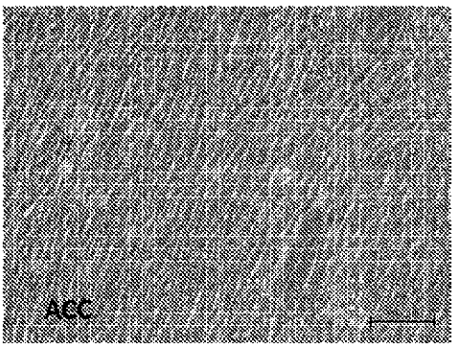


FIG. 11 A

【図１１Ｂ】

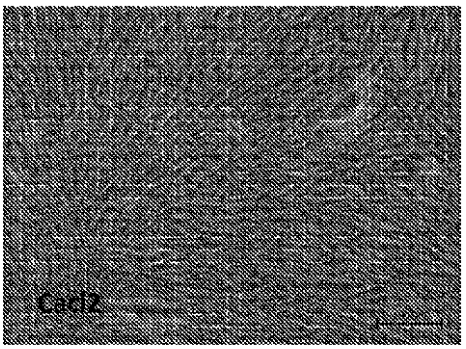


FIG. 11 B

【図１１Ｃ】

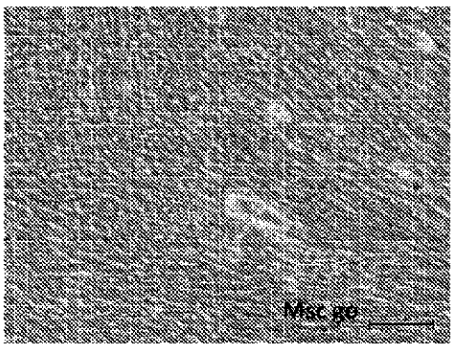


FIG. 11 C

【図１１Ｄ】

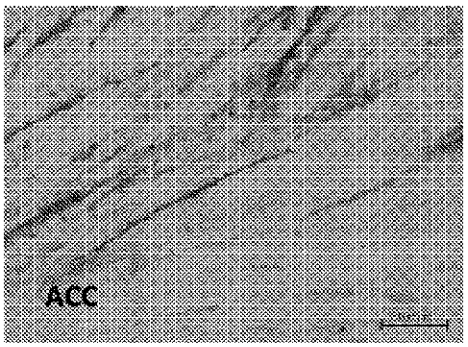


FIG. 11 D

【図１１Ｅ】

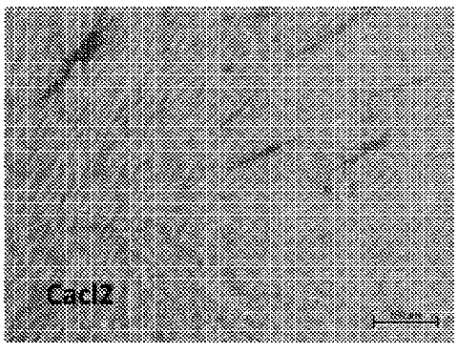
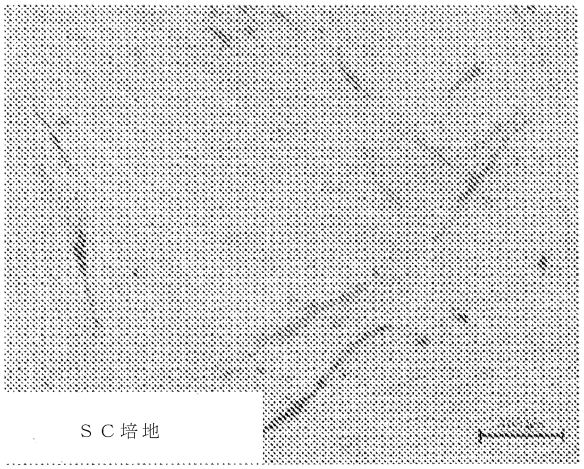


FIG. 11 E

【図１１】



【図１２Ａ】

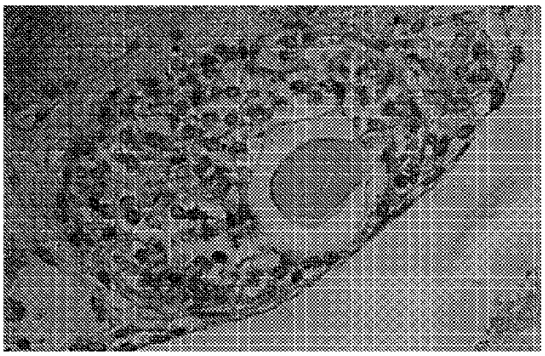


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

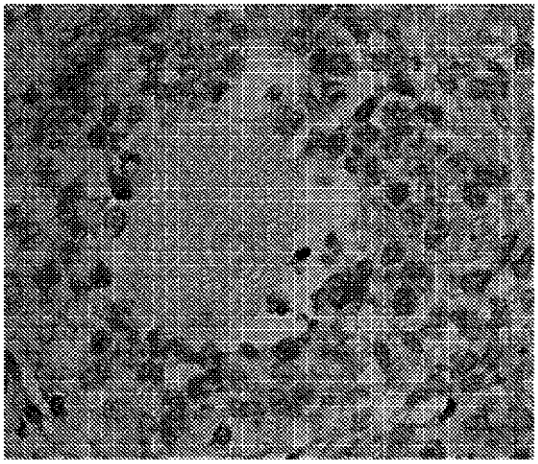


FIG. 12B

フロントページの続き

米国(US)
(31)優先権主張番号　62/279,844
(32)優先日　平成28年1月18日(2016.1.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/279,845
(32)優先日　平成28年1月18日(2016.1.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/376,428
(32)優先日　平成28年8月18日(2016.8.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/434,453
(32)優先日　平成28年12月15日(2016.12.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(72)発明者　シャハル，アブラハム
イスラエル国，７６３５４０１　レホヴォト，アパートメント　３４，ヘンキン　ストリート，１
(72)発明者　アラブ，アミール
イスラエル国，６２２６６１８　テル　アビブ，５９　シュロムジオン　ストリート
合議体
審判長　長井　啓子
審判官　飯室　里美
審判官　牧野　晃久
(56)参考文献　国際公開第２０１４／１２２６５８（WO，Ａ１）
Ｊ．Ｍａｔｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｂ，２０１６年，Ｖｏｌ．４，ｐ．３７６－３８６
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N1/00-7/08
ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＣＡｐｌｕｓ／ＥＭＢＡＳＥ（ＳＴＮ）