(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7446619号
(P7446619)

(45)発行日　令和6年3月11日(2024.3.11)

(24)登録日　令和6年3月1日(2024.3.1)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　35/50　(2015.01)	Ａ６１Ｋ	35/50	ＺＮＡ	
Ａ６１Ｋ　47/22　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	47/22		
Ａ６１Ｋ　47/02　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	47/02		
Ａ６１Ｋ　47/26　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	47/26		
Ａ６１Ｋ　47/36　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	47/36		

ＦＩ

請求項の数　10　（全70頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-556307(P2020-556307)
(86)(22)出願日　平成31年4月9日(2019.4.9)
(65)公表番号　特表2021-523883(P2021-523883A)
(43)公表日　令和3年9月9日(2021.9.9)
(86)国際出願番号　PCT/SG2019/050197
(87)国際公開番号　WO2019/199229
(87)国際公開日　令和1年10月17日(2019.10.17)
審査請求日　令和4年4月8日(2022.4.8)
(31)優先権主張番号　62/655,198
(32)優先日　平成30年4月9日(2018.4.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　519096688
セルリサーチ コーポレイション プライベート リミテッド
シンガポール共和国 ０４８９４３ シンガポール マーケット ストリート １３７ グレース グローバル ラッフルズ ビルディング ＃０８－０２
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　輸送溶液によって間葉系幹細胞を輸送する方法および幹細胞を創傷に投与する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

疾患を有する対象を処置するための、臍帯の羊膜の単離された間葉系幹細胞集団を含む薬学的組成物であって、

該単離された間葉系幹細胞集団の細胞の少なくとも97％以上が、CD73、CD90およびCD105のそれぞれを発現し、ならびにCD34、CD45およびHLA-DRのそれぞれの発現を欠き、

該疾患が創傷であり、

該間葉系幹細胞集団が、

羊膜組織を、

最終濃度約55～65％（v/v）のDMEM、

最終濃度約5～15％（v/v）のF12、

最終濃度約15～30％（v/v）のM171、および

最終濃度約1～8％（v/v）のFBS

を含む培養培地中で培養することを含む方法により臍帯の羊膜から単離された間葉系幹細胞集団であり、ならびに

該間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に局所投与され、

回収後、該単離された間葉系幹細胞集団が、

i）トロロックス、

ii) Na^+、
iii) K^+、
iv) Cl^-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む液体担体と接触され、該液体担体と接触された該単離された間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団を投与する場所に輸送され、かつ
該間葉系幹細胞集団が、薬学的に許容される賦形剤中で細胞100,000個／1 cm^2の皮膚／創傷部位～細胞500,000個／1 cm^2の皮膚／創傷部位の用量で8週間まで週に1回または2回適用されるように用いられる、
前記薬学的組成物。
【請求項２】
間葉系幹細胞集団が、100万個の細胞の単位投与量で適用されるように用いられる、請求項1に記載の薬学的組成物。
【請求項３】
間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から72時間以内に、48時間以内に、24時間以内に、12時間以内に、6時間以内に、またはそれ未満で適用されるように用いられる、請求項1または2に記載の薬学的組成物。
【請求項４】
創傷が、熱傷、咬傷、外傷、手術、または疾患に起因する、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項５】
創傷が、糖尿病に起因する、請求項4に記載の薬学的組成物。
【請求項６】
創傷が、糖尿病性創傷である、請求項5に記載の薬学的組成物。
【請求項７】
創傷が、糖尿病性足部潰瘍である、請求項6に記載の薬学的組成物。
【請求項８】
間葉系幹細胞集団が、局所的に適用され、かつフィルムまたは包帯で覆われるように用いられる、請求項1乃至7のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項９】
担体が、HypoThermosol(登録商標)である、請求項1乃至8のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項１０】
ヒト臍帯組織の羊膜からのヒト間葉系幹細胞集団の単離が、
ａ）羊膜を組織外植片として
最終濃度約55～65％（v/v）のDMEM、
最終濃度約5～15％（v/v）のF12、
最終濃度約15～30％（v/v）のM171、および
最終濃度約1～8％（v/v）のウシ胎児血清（FBS）
を含む培養培地中で培養すること、および
ｂ）培養工程中に羊膜から成長した細胞を回収して初代単離間葉系幹細胞を提供すること、および

ｃ）初代単離間葉系幹細胞を培養培地中で継代培養して、ヒト間葉系幹細胞集団を提供すること、
を含む、請求項1乃至9のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、2018年4月9日に出願された米国仮特許出願第62/655,198号の優先権の恩典を主張し、その内容はすべての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられる。
【０００２】
発明の分野
本発明は、液体担体と接触させた幹細胞集団を輸送する段階を含む、幹細胞集団を輸送する方法に関する。加えて、本発明は、疾患を有する対象を処置する方法に関係し、該方法は、規定された間葉系幹細胞集団を対象に局所投与する段階を含み、ここで、間葉系幹細胞集団は、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に投与される。また、規定された間葉系幹細胞集団の約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞を含む単位投与量にも関係する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
臍帯の羊膜から単離された間葉系幹細胞およびその創傷治癒特性は、最初に米国特許出願2006/0078993（特許文献1）（登録された米国特許第9,085,755号（特許文献2）、米国特許第9,737,568号（特許文献3）、および米国特許第9,844,571号（特許文献4）につながる）ならびに対応する国際特許出願WO2006/019357（特許文献5）において報告された。それ以来、臍帯組織は、複能性細胞の供給源として注目を集めている；臍帯、および具体的には臍帯の羊膜から単離された幹細胞（「臍帯ライニング（cord lining）幹細胞」とも称される）は、広く入手可能であるため、再生医療用の細胞の優れた代替供給源と見なされている。Jeschke et al. Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences; The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal, 2011, 4, 21-27（非特許文献1）を参照されたい。
【０００４】
その後の研究では、臍帯の羊膜（臍帯ライニング（CL-MSC））、臍帯血（CB-MSC）、胎盤（P-MSC）、およびワルトン膠様質（WJ-MSC）に由来するヒト間葉系幹細胞（MSC）の表現型、増殖速度、遊走、免疫原性、および免疫調節能が比較された（Stubbendorf et al, Immunological Properties of Extraembryonic Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue, STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volume 22, Number 19, 2013, 2619-2629（非特許文献2））。Stubbendorfらは、胚外妊娠組織に由来するMSC集団が、免疫応答を回避する、および免疫調節効果を発揮する多様な能力を示すと結論づけた。CL-MSCが低い免疫原性を示し、また増殖能および遊走能の増強を示すため、これらの細胞が細胞ベースの療法の最も有望な可能性を示すことを、著者らはまた見出した。そのため、今後の研究は、CL-MSCが投与され得る最良の疾患モデルに焦点を合わせるべきである。
【０００５】
羊膜の間葉系幹細胞は、米国特許出願2006/0078993（特許文献1）および国際特許出願WO2006/019357（特許文献5）に記載されたプロトコールを用いて容易に得ることができるが、高度に均一でありしたがって臨床試験に使用され得る、これらの臍帯ライニ

ングMSCの集団を単離できるようにする方法が手元にあることは、これらの臍帯ライニングMSCを用いる臨床試験のために有利である。

【０００６】

臍帯の羊膜に由来する間葉系幹細胞のそのような高度に均一な集団は、2017年10月5日に出願された米国仮特許出願第62/404,582号（特許文献6）に対する優先権を主張する2018年10月5日に出願された同時係属中の米国特許出願第15/725,913号（特許文献7）（これらの両方の内容は全体として参照により本明細書に組み入れられる）において、および同様に2017年10月5日に出願された米国仮特許出願第62/404,582号（特許文献6）に対する優先権を主張する2018年10月5日に出願された同時係属中のPCT出願PCT/SG2017/050500（特許文献8）において初めて報告され、細胞療法に使用されるべき間葉系幹細胞の基準を満たす（米国特許出願第15/725,913号（特許文献7）の実験の項、Dominici et al, 「Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement」, Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317（非特許文献3）、またはSensebe et al,.「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a, review」, Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:66（非特許文献4）もまた参照されたい）。

【０００７】

しかしながら、上記の間葉系幹細胞などの幹細胞は、典型的にはそれらが生成された場所で患者に適用／投与されるわけではない。多くの場合、細胞の回収とさらなる利用との間には、かなりの時間が経過している。したがって、細胞の輸送または貯蔵のために典型的に使用される期間にわたって細胞を生存可能かつ健常に維持するある特定の担体を提供する必要性がある。

【０００８】

よって、この必要性を満たす、特に臍帯の羊膜に由来する間葉系幹細胞の集団の幹細胞を輸送／貯蔵する方法を提供することが、本発明の目的である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【文献】米国特許出願2006/0078993

【文献】米国特許第9,085,755号

【文献】米国特許第9,737,568号

【文献】米国特許第9,844,571号

【文献】WO2006/019357

【文献】米国仮特許出願第62/404,582号

【文献】米国特許出願第15/725,913号

【文献】PCT/SG2017/050500

【非特許文献】

【００１０】

【文献】Jeschke et al. Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences; The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal, 2011, 4, 21-27

【文献】Stubbendorf et al, Immunological Properties of Extraembryonic Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue, STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volume 22, Number 19, 2013, 2619-2629

【文献】Dominici et al, 「Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement」, Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317

【文献】Sensebe et al,.「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a, review」, Stem Cell Research & Thera

py 2013, 4:66
【発明の概要】
【００１１】
この目的は、独立請求項の特徴を有する方法および単位投与量によって達成される。
【００１２】
第1局面において、本発明は、幹細胞集団を輸送する方法を提供し、該方法は、
i) トロロックス、
ii) Na^+、
iii) K^+、
iv) Cl^-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む液体担体と接触させた該幹細胞集団を輸送する段階を含む。
【００１３】
第2局面において、本発明は、疾患を有する対象を処置する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を対象に局所投与する段階を含み、ここで、間葉系幹細胞集団は、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に投与される。
【００１４】
第3局面において、本発明は、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団の約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞を含む単位投与量を提供する。
【００１５】
第4局面において、本発明は、幹細胞集団を輸送するための液体担体の使用を提供し、該液体担体は、
i) トロロックス、
ii) Na+、
iii) K+、
iv) Cl-、
v) H2PO4-、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む。
[本発明1001]
i) トロロックス、
ii) Na^+、
iii) K^+、

iv) Cl^-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む液体担体と接触させた幹細胞集団を輸送する段階を含む、幹細胞集団を輸送する方法。

[本発明1002]
輸送が約7日またはそれ未満にわたって行われる、本発明1001の方法。

[本発明1003]
輸送が約6日、約5日、約4日、約3日、約2日、約1日、または約1日未満にわたって行われる、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]
輸送が約48時間もしくは約24時間またはそれ未満にわたって行われる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1005]
輸送が約-5℃～約15℃の温度で行われる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1006]
輸送が約2℃～約8℃の温度で行われる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1007]
輸送が、約-5℃を超える、約-10℃を超える、約-15℃を超える、または約-20℃を超える温度で実施される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1008]
幹細胞集団が、担体1 ml当たり約7000万個の細胞、担体1 ml当たり約6000万個の細胞、担体1 ml当たり約5000万個の細胞、担体1 ml当たり約4000万個の細胞、担体1 ml当たり約3000万個の細胞、担体1 ml当たり約2000万個の細胞、担体1 ml当たり約1000万個の細胞、担体1 ml当たり約500万個の細胞、担体1 ml当たり約400万個の細胞、担体1 ml当たり約300万個の細胞、担体1 ml当たり約200万個の細胞、担体1 ml当たり約100万個の細胞、担体1 ml当たり約50万個の細胞、担体1 ml当たり約10万個の細胞、または担体1 ml当たり10万個未満の細胞の濃度で輸送される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]
幹細胞集団が、担体1 ml当たり約1000万個の細胞から担体1 ml当たり約100万個の細胞の濃度で輸送される、本発明1008の方法。

[本発明1010]
幹細胞集団が、胚性幹細胞集団、成体幹細胞集団、間葉系幹細胞集団、または誘導多能性幹細胞集団である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1011]
幹細胞集団が、間葉系幹細胞集団、好ましくはヒト間葉系幹細胞集団である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]
間葉系幹細胞集団が、臍帯の羊膜の単離された間葉系幹細胞集団、好ましくは臍帯の羊膜の単離されたヒト間葉系幹細胞集団である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]
単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約90%またはそれ以上の細胞が、マーカーCD

73、CD90、およびCD105の各々を発現する、本発明1011または1012の方法。
[本発明1014]
単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上の細胞が、CD73、CD90、およびCD105の各々を発現する、本発明1013の方法。
[本発明1015]
単離された間葉系幹細胞の少なくとも約90%またはそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、マーカーCD34、CD45、およびHLA-DR（ヒト白血球抗原‐抗原D関連）の発現を欠いている、本発明1011～1014のいずれかの方法。
[本発明1016]
単離された間葉系幹細胞集団の細胞の少なくとも97%もしくはそれ以上、約98%もしくはそれ以上、または約99%もしくはそれ以上が、CD73、CD90、およびCD105の各々を発現し、かつCD34、CD45、およびHLA-DRの各々の発現を欠いている、本発明1015の方法。
[本発明1017]
幹細胞集団を、輸送前に担体と接触させる、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1018]
幹細胞集団を、その回収後に担体と接触させる、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1019]
幹細胞集団を、その回収の約0分後、約1分後、約5分後、約10分後、約30分後、約45分後、約60分後、またはそれより長い時間の後に、担体と接触させる、本発明1018の方法。
[本発明1020]
回収が、幹細胞集団を培養液から分離することを含む、本発明1018または1019の方法。
[本発明1021]
分離が、培養液中の幹細胞を遠心分離し、かつ該培養液をデカントすることによって行われる、本発明1020の方法。
[本発明1022]
接触が、幹細胞集団を、約7000万個／ml、約6000万個／ml、約5000万個／ml、約4000万個／ml、約3000万個／ml、約2000万個／ml、約1000万個／ml、約500万個／ml、約400万個／ml、約300万個／ml、約200万個／ml、約100万個／ml、約50万個／ml、約10万個／ml、または10万個未満の細胞の密度で担体中に懸濁することによって行われる、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1023]
接触が、幹細胞集団を約1000万個／mlの密度で担体中に懸濁することによって行われる、本発明1022の方法。
[本発明1024]
担体と接触させた幹細胞が、約50 ml、約20 ml、約10 ml、約5 ml、約4 ml、約3 ml、約2 ml、約1 ml、約0.5 ml、約0.25 ml、または0.25 ml未満の担体の体積でバイアルに分取される、本発明1022または1023の方法。
[本発明1025]
担体と接触させた幹細胞が、約1 mlの量でバイアルに分取される、本発明1022または1023の方法。
[本発明1026]
担体が輸送培地または賦形剤である、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1027]
解凍または凍結段階を含まない、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1028]
担体が、双極性非プロトン性溶媒、特にDMSOを含まない、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1029]
輸送前の生存幹細胞の量と比較して、前記集団の幹細胞の多くても約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約10%未満が輸送中に死滅する、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1030]
輸送後に、幹細胞集団が輸送前とほぼ同量のTGFベータ-1を分泌する、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1031]
PDGF-BBおよび／またはIL-10が、輸送前および／または輸送後に本質的に検出されない、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1032]
輸送後に、間葉系幹細胞集団が、輸送前とほぼ同量のVEGF、PDGF-AA、Ang-1、および／またはHGFを分泌する、前記本発明のいずれかの方法。
[本発明1033]
本発明1012～1016のいずれかにおいて規定される間葉系幹細胞集団の約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞を含む、単位投与量。
[本発明1034]
約1000万個、約900万個、約800万個、約700万個、約600万個、約500万個、約400万個、約300万個、約200万個、約100万個、約50万個、約25万個、または約10万個の細胞を含む、本発明1033の単位投与量。
[本発明1035]
約1000万個の細胞を含む、本発明1033または1034の単位投与量。
[本発明1036]
1 mlバイアル中に含まれる、本発明1033～1035のいずれかの単位投与量。
[本発明1037]
単位用量が液体担体中に含まれ、該液体担体が、
i) トロロックス、
ii) Na^+、
iii) K^+、
iv) Cl^-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む、本発明1033～1035のいずれかの単位投与量。
[本発明1038]
細胞が生存細胞である、本発明1033～1037のいずれかの単位投与量。
[本発明1039]
担体がHypoThermosolである、本発明1001～1032のいずれかの方法。
[本発明1040]
幹細胞集団を輸送するための液体担体の使用であって、該液体担体が、

i) トロロックス、
ii) Na+、
iii) K+、
iv) Cl-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む、前記使用。
[本発明1041]
疾患を有する対象を処置するための薬学的組成物の製造のための、本発明1012～1016のいずれかにおいて規定される臍帯の羊膜の単離された間葉系幹細胞集団である間葉系幹細胞集団の使用であって、
該間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に局所投与されること
を含む、前記使用。
[本発明1042]
間葉系幹細胞集団が、約1000万個の細胞の単位投与量で適用される、本発明1041の使用。
[本発明1043]
間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約72時間以内に、約48時間以内に、約24時間以内に、約12時間以内に、約6時間以内に、またはそれ未満で適用される、本発明1041または1042の使用。
[本発明1044]
前記疾患が、皮膚疾患または創傷である、本発明1041～1043のいずれかの使用。
[本発明1045]
創傷が、熱傷、咬傷、外傷、手術、または疾患に起因する、本発明1044の使用。
[本発明1046]
創傷が糖尿病に起因し、創傷が好ましくは糖尿病性創傷である、本発明1045の使用。
[本発明1047]
創傷が糖尿病性足部潰瘍である、本発明1046の使用。
[本発明1048]
約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量が、週に1回または2回投与される、本発明1041～1047のいずれかの使用。
[本発明1049]
約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量が、3週間、4週間、もしくは5週間、もしくは6週間、もしくは7週間、もしくは8週間、もしくは10週間、またはそれ以上の週の期間にわたって、週に1回または2回投与される、本発明1048の使用。
[本発明1050]
間葉系幹細胞集団が局所的に適用され、かつフィルムまたは包帯で覆われる、本発明1041～1049のいずれかの使用。

【図面の簡単な説明】
【００１６】
本発明は、非限定的な実施例および図面と併せて考慮した場合に、詳細な説明を参照してより良く理解されるであろう。
【００１７】
【図１－１】図1は、実験の項において本発明の培地（PTT-6）の実例を作製するために使用したDMEMのカタログ番号を含む、ダルベッコ改変イーグル培地に関するLonzaの技術情報シートを示す。
【図１－２】図1-1の説明を参照のこと。
【図２】ハムF12培地に関するLonzaの技術情報シートを示す。
【図３】実験の項において本発明の培地（PTT-6）の実例を作製するために使用したDMEM:F12（1:1）培地のカタログ番号を含む、DMEM:F12（1:1）培地に関するLonzaの技術情報シートを示す。
【図４－１】図4は、実験の項において本発明の培地（PTT-6）の実例を作製するために使用したM171培地のカタログ番号を含む、M171培地に関するLife Technologies Corporationの技術情報シートを示す。
【図４－２】図4-1の説明を参照のこと。
【図５】培地PTT-6を作製するために実験の項において使用した成分のリストを、それらの商業的供給業者およびカタログ番号を含めて示す。
【図６ａ】図6は、臍帯から単離された間葉系幹細胞を、間葉系幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105の発現について解析した、フローサイトメトリー実験の結果を示す。これらの実験のために、3種の異なる培養液中で臍帯組織を培養することにより、間葉系幹細胞を臍帯組織から単離し、続いて各培地中で間葉系幹細胞を継代培養した。これらの実験において、以下の3種の培養液を使用した：a）10％ FBS（v/v）を補充した90％（v/v/ DMEM、b）90％（v/v）CMRL1066および10％（v/v）FBSからなる、米国特許出願2006/0078993および対応する国際特許出願WO2006/019357に記載されている培養液PTT-4（WO2006/019357のパラグラフ［0183］を参照されたい）、ならびにc）本明細書においてその組成が記載される、本発明の培養液PTT-6。このフローサイトメトリー解析において、臍帯ライニング間葉系幹細胞（CLMC）集団の2つの異なる試料を、使用した3種の培養液の各々について解析した。結果を図6a～6cに示す。より詳細には、図6aは、DMEM/10％ FBS中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現する、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示し、図6bは、PTT-4中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現する、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示し、ならびに図6cは、PTT-6中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現する、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示す。
【図６ｂ】図6aの説明を参照のこと。
【図６ｃ】図6aの説明を参照のこと。
【図７ａ】図7は、臍帯から単離された間葉系幹細胞を、細胞療法に対する複能性ヒト間葉系幹細胞の適合性を規定するために使用される幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105、CD34、CD45、およびHLA-DR（ヒト白血球抗原‐抗原D関連）のそれらの発現について解析し、骨髄間葉系幹細胞によるこれらのマーカーの発現と比較した、フローサイトメトリー実験の結果を示す。この実験のために、本発明の培養液PTT-6中で臍帯組織を培養することにより、臍帯の羊膜の間葉系幹細胞を臍帯組織から単離する一方で、標準的なプロトコールを用いて、ヒト骨髄から骨髄間葉系幹細胞を単離した。図7aは、PTT-6培地中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現し、かつCD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示し、図7bは、CD73、CD90、およびCD105を発現し、かつCD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている、単離された骨髄間葉系幹細胞の割合を示す。

【図７ｂ】図7aの説明を参照のこと。
【図８】異なる担体の比較のための実験設定を示す。最初に、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を細胞培養フラスコ中で増殖させた。生存間葉系幹細胞の量を計数し、次いで細胞200万個／バイアルを、PlasmaLyte-A中またはHypoThermosol（商標）-FRS中のいずれかで様々な期間貯蔵した。貯蔵後、1～5日目に毎日、≦50μlの試料で細胞を計数し（液体取り出し総量250μl）、細胞をトリパンブルーで染色することにより生存率を調べた。さらに、1日目、3日目、および5日目に、≦80μlの試料を採取し解析した。加えて、上清を得て凍結した。次いで、PDGF-AA、PDGF-BB、VEGF、IL-10、Ang-1、HGF、およびTGFβ1を、FLEXMAP 3Dシステムにより測定した。
【図９】生存率データを要約する。左側のグラフからわかるように、HypoThermosol（商標）中での貯蔵の7日後に、貯蔵を開始した際の全細胞数（約95%）の73%がなお生存可能であった。それに反して、PlasmaLyte-A中での7日間の貯蔵後には、貯蔵を開始した際の全細胞数（約94%）の42%のみがなお生存可能であった。計数はすべて、互いに10%以内である2つ組の読み取り値に基づいた（SOP CR D2.600.1に従う）。計数中、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、滑らかでかつ明確な輪郭を有して、著しくより小さかった。対照的に、Plasmalyte-A中の細胞は様々なサイズで出現した。HypoThermosol（商標）は、6日間の期間にわたって、膜の完全性およびおそらくは生存を著しく支持する。同様の結果はまた、右側のグラフにおいても示される。
【図１０】細胞の細胞直径を測定した際に得られた結果を示す。HypoThermosol（商標）中で維持された場合の本明細書に記載される間葉系幹細胞集団は、PlasmaLyteA中で維持された細胞と比較して、直径範囲がより狭い。比較は3日間の貯蔵後に行った。
【図１１】HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、貯蔵の48時間後の上清中のTGFβ1濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合とほぼ同量のTGFβ1を分泌する。一般的に、時間経過と共に、分泌されるTGFβ1の量は減少した（右側のグラフ）。
【図１２】対照実験を示す。ここでは、PDGF-BB濃度を、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中で測定した。PDGF-BBは、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団によって通常分泌されないため、PDGF-BBはいずれの試料においても検出可能ではなかった。
【図１３】対照実験を示す。ここでは、IL-10濃度を、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中で測定した。IL-10は、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団によって通常分泌されないため、IL-10はいずれの試料においても検出可能ではなかった。
【図１４】HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中のVEGF濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目に、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された場合にほぼ同量のVEGFを分泌する。1日目および5日目には、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのVEGFを分泌した。注目すべきことには、3日間貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、より多くのVEGFを分泌した。したがって、貯蔵の3日目まで、HypoThermosol（商標）はPlasmaLyte-Aよりも優れている。より多くのVEGFが検出されればされるほど、培養物はより健常である。したがって、PlamsaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中での3日間の貯蔵後に、より多くのVEGFを分泌することによって、細胞はPlamsaLyte-A中よりもHypoThermosol（商標）中でより健常であった。5日目からは、PlasmaLyte中での貯蔵がより有利になると考えられるが、それは、その時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのVEGFを分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるVEGFの量は減少した（右側のグラフ）。
【図１５】HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記

載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中のPDGF-AA濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目に、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合とほぼ同量のPDGF-AAを分泌する。1日目および5日目には、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのPDGF-AAを分泌した。注目すべきことには、3日間貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、より多くのPDGF-AAを分泌した。したがって、貯蔵の3日後、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞よりもより健常である。5日間の貯蔵以降は、PlasmaLyteがより有利な担体になると考えられるが、それは、その時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのPDGF-AAを分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるPDGF-AAの量は減少した（右側のグラフ）。

【図１６】HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中のAng-1濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目および3日目に、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された場合にほぼ同量のAng-1を分泌する。5日目に、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのAng-1を分泌した。注目すべきことには、1日貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、はるかにより多くのAng-1を分泌した。したがって、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりも、3日間の貯蔵までは少なくとも48時間にわたって、より健常であると考えられる。5日目からは、PlasmaLyteがより有利な担体になると考えられるが、それは、この時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのAng-1を分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるAng-1の量は減少した（右側のグラフ）。

【図１７】HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、貯蔵の48時間後の上清中のHGF濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目に、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合と比較して、ほぼ同量のHGFを分泌する。3日目および5日目には、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのHGFを分泌した。注目すべきことには、1日貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、はるかにより多くのHGFを分泌した。したがって、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞よりも、3日間の貯蔵までは少なくとも1日（48時間）の間、より健常であると考えられる。3日以降は、PlasmaLyte-Aがより有利な担体になると考えられるが、それは、3日および5日の時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのHGFを分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるHGFの量は減少した（右側のグラフ）。

【図１８－１】図18は、本発明の間葉系幹細胞集団をブタに用いた前臨床試験から得られた写真である。ブタを120 mg/kgストレプトゾトシンを用いて糖尿病にし、45日間回復させてから、それらの背中に5 cm×5 cmの全層創傷を6個作製した。ブタ（n = 2）を、1 cm^2当たり10^5個の本明細書に記載されるヒト間葉系幹細胞集団で、週に2回、4週間にわたって処置した。2匹の対照ブタはPBSで処置した。術後0日目（PO 0日目）、および術後35日目まで7日ごとに、創傷を撮影した。創傷を、ImageJによって表面積サイズについて解析した。35日目までに、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団の添加により、PBS処置された対照創傷の12個中3個のみ（25%）と比較して、12個中10個の糖尿病性創傷（83%）が閉鎖した。創傷治癒の速度は、対照動物における0.6 cm^2／日と比較して、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を用いて0.8 cm^2／日であり、33%の改善であった。

【図１８－２】図18-1の説明を参照のこと。

【図１８－３】図18-1の説明を参照のこと。

【図１８－４】図18-1の説明を参照のこと。

【図１８－５】図18-1の説明を参照のこと。

【図１９－１】図19は、Tocrisから入手可能なトロロックスのデータシートである。
【図１９－２】図19-1の説明を参照のこと。
【図２０－１】図20は、Sigma Aldrichから入手可能なNaClのデータシートを示す。
【図２０－２】図20-1の説明を参照のこと。
【図２１】Sigma Aldrichから入手可能なKH_2PO_4のデータシートを示す。
【図２２－１】図22は、Sigma AldrichからのHEPESのデータシートを示す。
【図２２－２】図22-1の説明を参照のこと。
【図２３－１】図23は、COMBI-BLOCKSからのラクトビオン酸ナトリウムの製品シートを示す。
【図２３－２】図23-1の説明を参照のこと。
【図２３－３】図23-1の説明を参照のこと。
【図２４－１】図24は、Sigma Aldrichからのスクロースの製品シートを示す。
【図２４－２】図24-1の説明を参照のこと。
【図２５－１】図25は、avantorからのマンニトールの製品シートを示す。
【図２５－２】図25-1の説明を参照のこと。
【図２６】Sigma Aldrichからのグルコースの製品シートを示す。
【図２７－１】図27は、Sigma Aldrichからのデキストラン-40の製品シートを示す。
【図２７－２】図27-1の説明を参照のこと。
【図２８】Sigma Aldrichからのアデノシンの製品シートを示す。
【図２９】Sigma Aldrichからのグルタチオンの製品シートを示す。
【図３０】STEMCELL TechnologiesからのHypoThermosol（商標）-FRS (HTS-FRS)の製品シートを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
発明の詳細な説明
上記で説明したように、第1局面において、本発明は、幹細胞集団を輸送／貯蔵する方法を対象にし、該方法は、
i) トロロックス、
ii) Na^+、
iii) K^+、
iv) Cl^-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む液体担体と接触させた該幹細胞集団を輸送／貯蔵する段階を含む。
【００１９】
本明細書に記載される液体担体、および具体的にはHypoThermosol（商標）などの液体担体を使用することが、例えばPlasmaLyte（登録商標）などの他の薬学的に承認された担体と比較して幹細胞の優れた生存をもたらすことが、本出願において驚くべきことに見出された。例えば、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団をHypoThermosol（商標）中で7日間貯蔵した後、細胞の約70%がなお生存可能であった。反対に、PlasmaLyte（登録商標）中で7日間貯蔵した後では、細胞の約40%のみがなお生存可能であった（血球計算盤で測定した場合の、実施例を参照されたい）。このように、本明細書に記載される液体担体を使用することで、細胞の生存能を実質的に失うことなく、幹細胞をある期間に

わたって輸送／貯蔵することが可能になる。特に、実験の項において詳細に記載されているように、幹細胞は一般に、PlasmaLyte-A中で貯蔵した後よりも多くの因子を分泌したため、3日またはそれ未満のより短い期間にわたるHypoThermosol（商標）中での貯蔵は、特に有益であると考えられる。

【００２０】

本明細書で用いられる場合、「輸送」または「輸送する」という用語は、任意の輸送を意味する。そのような輸送は、自動車、電車、および飛行機などの任意の乗り物を用いて、または液体担体と接触させた幹細胞を含む容器をある場所から別の場所へ運搬／輸送する人によって行われ得る。1つの態様において、輸送は、関心対象の幹細胞集団が生成された場所から幹細胞を投与する場所へ（例えば、関心対象の幹細胞集団が生成されたGMP施設から、幹細胞集団を投与する場所、例えばクリニックまたは診療所へ）と実施される。しかしながら、「輸送する」という用語は、同じ場所でのある期間にわたる細胞の貯蔵に関することもまた想定される。例えば、幹細胞は、回収後、ある場所で対象に適用されるまで貯蔵してもよい。幹細胞を貯蔵または輸送することができる容器は、本発明の方法に適した任意の容器であってよい。

【００２１】

輸送／貯蔵は任意の期間にわたって行うことができる。例えば、輸送／貯蔵は、約7日またはそれ未満にわたって行うことができる。輸送／貯蔵が約6日、5日、4日、3日、2日、1日、またはそれ未満にわたって行われ得ることもまた想定される。したがって、輸送／貯蔵が約48時間もしくは約24時間またはそれ未満にわたって行われることが可能である。

【００２２】

輸送／貯蔵が、本発明の方法に適した任意の温度で行われることもまた企図される。例えば、輸送／貯蔵は約-5℃～約15℃の温度で行うことができる。したがって、輸送／貯蔵が約2℃～約8℃の温度で行われ得ることもまた想定される。輸送は、約-5℃を超える、約-10℃を超える、約-15℃を超える、または約-20℃を超える温度で実施することもできる。さらに、輸送／貯蔵が、20℃未満、18℃未満、15℃未満、12℃未満、または10℃未満の温度で行われることが想定される。

【００２３】

本発明の方法はまた、幹細胞集団が任意の適切な濃度で貯蔵されるまたは輸送されることを想定する。幹細胞集団は、例えば、担体1 ml当たり約7000万個の細胞、担体1 ml当たり約6000万個の細胞、担体1 ml当たり約5000万個の細胞、担体1 ml当たり約4000万個の細胞、担体1 ml当たり約3000万個の細胞、担体1 ml当たり約2000万個の細胞、担体1 ml当たり約1000万個の細胞、担体1 ml当たり約500万個の細胞、担体1 ml当たり約400万個の細胞、担体1 ml当たり約300万個の細胞、担体1 ml当たり約200万個の細胞、担体1 ml当たり約100万個の細胞、担体1 ml当たり約50万個の細胞、担体1 ml当たり約10万個の細胞、または担体1 ml当たり細胞10万個未満の細胞の濃度で輸送／貯蔵することができる。したがって、幹細胞集団は、担体1 ml当たり約1000万個の細胞から担体1 ml当たり約100万個の細胞の濃度で輸送／貯蔵することができる。

【００２４】

本発明の方法は、幹細胞の輸送／貯蔵に関係する。原則として、任意の幹細胞を本発明の方法において使用することができる。幹細胞の1つの特徴的な特性は、自己複製するその能力である。「自己複製」とは、未分化状態を維持しながら細胞分裂の多数の細胞周期を経る能力である。細胞が自己複製する能力を有するかどうかを試験するための方法は、当業者に公知である。例えば、自己複製は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30回、またはそれ以上の継代数を超えて細胞を継代培養することによって試験することができる。継代培養は、単一細胞懸濁液として再プレーティングする前に細胞を分割する段階を含む。幹細胞のさらなる特徴は、本明細書の他所にも記載されるように、その複能性または多能性である。原則として、複能性または多能性は、該幹細胞を異なる系列に分化させることによって試験する

ことができる。
【００２５】
特に、本発明の方法において使用される幹細胞集団は、胚性幹細胞集団、成体幹細胞集団、間葉系幹細胞集団、または誘導多能性幹細胞集団であってよい。
【００２６】
本明細書で用いられる場合、「胚性幹細胞集団」は「多能性幹細胞集団」である。本明細書で言及される場合の多能性細胞は、自己複製の能力および異なる細胞型に分化する可能性を有する細胞型に関する。多能性幹細胞は、ほぼすべての細胞、すなわち、外胚葉、内胚葉、および中胚葉の3つの一次胚葉のいずれかに由来する細胞に分化することができる。多能性幹細胞という用語はまた、胚盤胞として公知である初期胚の内部細胞塊に由来する幹細胞も包含する。注目すべきことに、胚性幹細胞研究の最近の進歩は、例えば、胚の発生能を妨げない割球生検ベースの技法を使用することによって、胚を破壊せずに新たな胚性幹細胞株を作出する可能性をもたらした(Klimanskaya (2006)「Embryonic stem cells from blastomeres maintaining embryo viability.」 Semin Reprod Med. 2013 Jan;31(1):49-55)。さらに、多数の樹立された胚性幹細胞株が当技術分野で利用可能である。したがって、胚の破壊を必要とせずに胚性幹細胞を扱うことが可能である。多能性幹細胞は、ヒト胚の破壊によって取得されたものではない胚性幹細胞であってよい。したがって、多能性幹細胞は、胚を破壊せずに胚から取得された胚性幹細胞である。
【００２７】
本明細書で用いられる場合、「成体幹細胞集団」は複能性幹細胞集団である。複能性幹細胞集団は、限定された数の細胞型を生じさせることができ、したがってそれらは体細胞の運命が限定されている。例えば、神経幹細胞は、神経細胞およびグリア細胞の両方を生じさせることができる。成体幹細胞は自己複製する能力を有し、任意の適切な供給源から取得され得る。例えば、成体幹細胞は、骨髄、末梢血、脳、脊髄、歯髄、血管、骨格筋、皮膚および消化器系の上皮、角膜、網膜、肝臓、または膵臓から取得され得る。
【００２８】
本発明の方法において使用される幹細胞集団はまた、間葉系幹細胞集団であり得る。これに関連して、本明細書において記載される培養液（例えばPTT-6）によって、間葉系幹／前駆細胞を分化させることなく間葉系幹／前駆細胞の細胞増殖を可能にする条件下で、羊膜から間葉系幹細胞集団（本明細書において「間葉系幹細胞」とも称される）を単離することが可能になることが留意される。したがって、本明細書に記載されるように羊膜から間葉系幹細胞を単離した後、単離された間葉系幹／前駆細胞集団は、例えば米国特許出願2006/0078993、米国特許第9,085,755号、国際特許出願WO2006/019357、米国特許第8,287,854号、またはWO2007/046775に記載されるように、複数の細胞型に分化する能力を有する。例えば米国特許出願2006/0078993に記載されるように、臍帯の羊膜の間葉系幹細胞は、紡錘形を有し、遺伝子POU5f1、Bmi-1、白血病抑制因子(LIF)を発現し、かつアクチビンAおよびフォリスタチンを分泌する。本発明において単離された間葉系幹細胞は、これらに限定されないが、脂肪細胞、皮膚線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、腱細胞、靱帯線維芽細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ムチン産生細胞、インスリン産生細胞（例えば、β島細胞）などの内分泌腺由来の細胞、または神経外胚葉細胞などの、間葉系細胞のいかなる型にも分化させることができる。本明細書において記載される方法に従って単離された幹細胞は、後に医療目的で分化細胞を使用するために、インビトロで分化させることができる。そのようなアプローチの実例は、間葉系幹細胞のインスリン産生β島細胞への分化であり、この細胞は次いで、糖尿病などのインスリン欠乏に罹患している患者に、例えば移植によって投与することができる（この点において、WO2007/046775もまた参照されたい）。あるいは、本明細書において記載される間葉系幹細胞は、例えば、熱傷または慢性糖尿病創傷の処置などの創傷治癒の目的で、細胞ベースの療法のために未分化状態で使用することができる。これらの治療適用において、本発明の間葉系幹細胞は、周囲の罹患組織と相互作用することによって創傷治癒を促進するのに役立ち得るか、またはそれぞれの皮膚細胞にも分化し得る（例えば、再度WO2007/

046775を参照されたい）。

【００２９】

これに関連して、本明細書において記載される間葉系幹細胞集団は、臍帯組織が羊膜（「臍帯ライニング」とも称される）を含有する限りにおいて、任意の臍帯組織から単離し培養することができる（すなわち、任意の臍帯組織に由来する）ことが留意される。よって、間葉系幹細胞集団は、本出願の実験の項に記載されているように、臍帯全体（からの小片）から単離することができる。したがってこの臍帯組織は、羊膜に加えて、臍帯の任意の他の組織／構成成分を含有してもよい。例えば、米国特許出願2006/0078993または国際特許出願WO2006/019357の図16に示されるように、臍帯の羊膜は、臍帯を覆っている、臍帯の最も外側の部分である。加えて、臍帯は、1本の静脈（酸素化し栄養分に富んだ血液を胎児に運ぶ）および2本の動脈（脱酸素化され栄養分が枯渇した血液を胎児から運び出す）を含有する。保護および機械的支持のために、これら3本の血管は、主にムコ多糖のゼラチン状物質であるワルトン膠様質内に包埋されている。よって、本明細書において用いられる臍帯組織はまた、この1本の静脈、2本の動脈、およびワルトン膠様質を含み得る。臍帯のそのような全体（無傷）部分の使用は、羊膜を臍帯の他の構成成分から分離する必要がないという利点を有する。これによって、単離段階が減少し、ひいては本明細書において記載される方法が、より簡便になり、より迅速になり、間違いが起こりにくくなり、かつより経済的になる‐これらはすべて、間葉系幹細胞の治療適用に必要なGMP生産の重要な局面である。したがって間葉系幹細胞の単離は、組織外植片から開始することができ、その後、より多くの量の間葉系幹細胞が例えば臨床試験において使用するために所望される場合には、単離された間葉系幹細胞を続いて継代培養（培養）することができる。あるいは、最初に臍帯の他の構成成分から羊膜を分離し、培養液、例えばPTT-6中で羊膜を培養することによって、羊膜から間葉系臍帯ライニング幹細胞を単離することもまた可能である。この培養はまた、組織外植片で行うこともでき、任意にその後、単離された間葉系幹細胞の継代培養が行われる。これに関連して、「組織外植片」または「組織外植片法」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味で用いられて、ひとたび回収された組織またはその組織片が、培養液（増殖培地）を含む細胞培養ディッシュ中に配置され、時間と共に幹細胞が組織からディッシュの表面上に遊走する方法を指す。次いでこれらの初代幹細胞を、本明細書においても記載されるように、大量増殖（micropropagation）（継代培養）により、さらに増大させ、新たなディッシュに移すことができる。これに関連して、治療目的のための細胞の生成の観点において、臍帯から羊膜間葉系幹細胞を単離する第1段階において、単離された間葉系幹細胞のマスター細胞バンクが得られ、その後の継代培養においてワーキング細胞バンクが得られ得ることが留意される。特定の態様において、幹細胞集団はしたがって間葉系幹細胞集団である。

【００３０】

間葉系幹細胞集団は、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）、F12（ハムF12培地）、M171（培地171）、およびFBS（ウシ胎仔血清）を含む培養液中で培養する段階を含む方法により、臍帯の羊膜から単離することができる。そのような培地を使用することにより、臍帯の羊膜から間葉系幹細胞集団が単離され、その細胞の90%超またはさらには99%もしくはそれ以上は3種の間葉系幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105に関して陽性であり、それと同時にこれらの幹細胞はCD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いており（実験の項を参照されたい）、このことは、この集団の99%またはさらにはそれ以上の細胞が幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現しながら、マーカーCD34、CD45、およびHLA-DRを発現しないことを意味する。そのような極めて均一でありかつ明確に規定された細胞集団は、2017年10月5日に出願された米国仮特許出願第62/404,582号に対する優先権を主張する2018年10月5日に出願された同時係属中の米国特許出願第15/725,913号（これらの両方の内容は全体として参照により本明細書に組み入れられる）において、および同様に2017年10月5日に出願された米国仮特許出願第62/404,582号に対する優先権を主張する2018年10月5日に出願された同時係属中のPCT出願PCT/SG2017/050500において初めて報告され、この幹細胞集団が、例えば、例えばDomini

ci et al,「Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement」, Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317、Sensebe et al,.「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a, review」, Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:66)、Vonk et al., Stem Cell Research & Therapy (2015) 6:94、またはKundrotas Acta Medica Lituanica. 2012. Vol. 19. No. 2. P. 75-79によって規定されるような、細胞療法に使用されるべきヒト間葉系幹細胞に関して一般に許容される基準を十分に満たすという理由で、臨床試験および細胞ベースの療法の理想的な候補である。また、Quantum細胞増殖システムなどのバイオリアクターを使用することで、1回の実行当たり3～7億個の間葉系幹細胞といった多数の間葉系幹細胞を得ることが可能である（実験の項もまた参照されたい）。したがって、本発明により、費用効率の高い様式で、創傷治癒における使用などの治療適用に必要な量の幹細胞を輸送／貯蔵することが可能になる。加えて、本発明の培養液を作製するために使用される構成成分はすべて、GMP品質で市販されている。よって、本発明は、GMP生産されかつ高度に均一な、臍帯の羊膜由来の間葉系幹細胞集団を輸送／貯蔵するためのルートを開く。

【００３１】

したがって、いくつかの態様において、間葉系幹細胞集団は、臍帯の羊膜の単離された間葉系幹細胞集団である。単離された幹細胞集団の少なくとも約90%またはそれ以上の細胞が、マーカーCD73、CD90、およびCD105の各々を発現することがさらに想定される。例えば、単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上の細胞が、CD73、CD90、およびCD105の各々を発現する。加えて、またはその代わりに、単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約90%またはそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、以下のマーカーの発現を欠いている：CD34、CD45、およびHLA-DR（ヒト白血球抗原‐抗原D関連）。

【００３２】

マーカーCD73は当業者に公知である。これに関して、CD73は、5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT) またはエクト-5'-ヌクレオチダーゼとしても公知である表面抗原分類73を指す。ヒトCD73タンパク質の配列は、SEQ ID NO. 1の配列を有し得る。マーカーCD90は当業者に公知である。これに関して、CD90は、胸腺細胞分化抗原1 (Thy-1) としても公知である表面抗原分類90を指す。ヒトCD90タンパク質の配列は、SEQ ID NO: 2の配列を有し得る。マーカーCD105は当業者に公知である。CD105は、エンドグリン (ENG) としても公知である。ヒトCD105タンパク質の配列は、SEQ ID NO: 3の配列を有し得る。

【００３３】

本発明の間葉系幹細胞集団（具体的には、そのうちの少なくとも約98%または99%が、マーカーCD73、CD90、およびCD105の各々を発現し、かつマーカーCD34、CD45、およびHLA-DRの各々の発現を欠いている、間葉系幹細胞の集団）が、臨床試験のためにまたは認可された治療として用いられる場合には、この目的のためにワーキング細胞バンクの細胞集団が典型的に用いられる。説明したように、間葉系幹細胞集団は、以下のマーカーの発現を欠き得る：CD34、CD45、およびHLA-DR。これに関連して、マーカーCD34、CD45、およびHLA-DRが当業者に公知であることが留意される。ヒトCD34タンパク質は、SEQ ID NO. 4の配列を有し得る。ヒトCD45タンパク質は、SEQ ID NO: 5の配列を有し得る。ヒトHLA-DRタンパク質は、SEQ ID NO: 6の配列を有し得る。

【００３４】

単離段階の幹細胞集団（マスター細胞バンクを構成し得る）および継代培養段階の幹細胞集団（ワーキング細胞バンクを構成し得る）はいずれも、例えば凍結保存形態で貯蔵す

ることができる。

【００３５】

上記のように、臍帯の羊膜から間葉系幹細胞を単離する本方法は、本発明の培養液中で使用される構成成分がすべてGMP品質で入手可能であり、したがって、間葉系幹細胞がその後の治療的投与のためにGMP条件下で単離される可能性をもたらすという利点を有する。

【００３６】

したがって、幹細胞集団はまた誘導多能性幹細胞集団であってもよい。「誘導多能性幹細胞」は、本明細書で用いられる場合、胚性幹細胞の決定的な特性を維持するのに重要な遺伝子および因子を強制的に発現させることによって、胚性幹細胞様の状態に遺伝的に再プログラミングされた成体体細胞を指す。したがって、誘導多能性幹細胞は、非多能性細胞から誘導／作製され得る。

【００３７】

誘導多能性幹細胞は、胚を使用せずに多能性幹細胞を取得することを可能にするため、幹細胞研究の重要な進歩である。マウスiPSCは2006年に初めて報告され (Takahashi, K; Yamanaka, S (2006). 「Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors」. Cell 126 (4): 663-76)、ヒトiPSC (hiPSC) は2007年に初めて報告された (Takahashi et al. (2007) 「Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.」 Cell; 131(5):861-72)。マウスiPSCは、幹細胞マーカーの発現、3つの胚葉すべてに由来する細胞を含む腫瘍を形成すること、および非常に初期の発生段階のマウス胚に注入されると多くの異なる組織に寄与し得ることを含め、多能性幹細胞の重要な特徴を示す。ヒトiPSCもまた、幹細胞マーカーを発現し、3つの胚葉すべてに特徴的な細胞を生成することができる。そのような幹細胞マーカーには、Oct3/4、Sox2、Nanog、アルカリホスファターゼ (ALP)、ならびに幹細胞特異的抗原3および4 (SSEA3/4) が含まれ得る。また、iPSCのクロマチンメチル化パターンも、胚性幹細胞のものと類似している (Tanabe, Takahashi, Yamanaka (2014) 「Induction of pluripotency by defined factors.」 Proc. Jpn. Acad., 2014, Ser. B 90)。

【００３８】

加えて、iPSCは、インビトロで自己複製し、3つの胚葉すべてに分化することができる。iPSCの多能性または異なる細胞型に分化する可能性は、例えば、神経細胞もしくはグリア細胞へのインビトロ分化、または胚盤胞注入による生殖系列キメラ動物の作製によって試験することができる。

【００３９】

ヒト誘導多能性幹細胞の作製方法は当業者に公知であり、例えばWO2009115295、WO2009144008、またはEP2218778に記載されている。したがって、当業者は任意の方法によってiPSCを取得することができる。原則として、誘導多能性細胞は、（対象の）任意の成体体細胞から取得され得る。例示的な体細胞には、血液由来の末梢血単核細胞 (PBMC)、または皮膚組織生検から取得された線維芽細胞が含まれる。

【００４０】

本発明の方法は、本明細書に記載される幹細胞集団を液体担体と接触させることを含む。本発明の方法において、本明細書に記載される幹細胞集団を、輸送／貯蔵の前に担体と接触させることが想定される。加えて、またはその代わりに、幹細胞集団は、その回収後に担体と接触させる。どのように回収が行われ得るかは、本明細書の他所におよび実験の項に詳細に記載される。例えば、幹細胞集団は、その回収の約0分後、約1分後、約5分後、約10分後、約30分後、約45分後、約60分後、またはそれより長い時間の後に、担体と接触させることができる。

【００４１】

回収は、幹細胞集団を培養液から、例えばPTT-6から分離することを含み得る。そのような分離に適切な技法は、当業者に公知である。例えば、分離は、培養液中の幹細胞を遠

心分離し、かつ培養液をデカントすることによって行うことができる。

【００４２】

幹細胞集団は、

i) トロロックス、

ii) Na^+、

iii) K^+、

iv) Cl^-、

v) $H_2PO_4^-$、

vi) HEPES、

vii) ラクトビオナート、

viii) スクロース、

ix) マンニトール、

x) グルコース、

xi) デキストラン-40、

xii) アデノシン、および

xiii)グルタチオン

を含む液体担体と接触させる。

【００４３】

「トロロックス」は、CAS番号53188-07-1の6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸を意味する。これはビタミンEの水溶性類似体であり、酸化ストレスまたは損傷を軽減することが示唆されている。図19は、Tocrisから入手可能なトロロックスのデータシートを示す。これはまたSigma Aldrichからも市販されている（製品番号：238813）。

【００４４】

Na^+およびCl^-はいずれも周知のイオンである。当業者は、これらを得る方法を知っている。例えば、これらのイオンはNaCl塩として担体に添加してもよい。GMP品質のNaClは、Sigma Aldrichから入手することができる。図20は、Sigma Aldrichから入手可能なNaClのデータシートを示す。

【００４５】

K^+および$H_2PO_4^-$（リン酸二水素）もまた、当業者に周知である。これは、例えばSigma Aldrichから入手可能なKH_2PO_4として使用することができる。図21は、Sigma Aldrichから入手可能なKH_2PO_4のデータシートを示す。

【００４６】

4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸（CAS番号7365-45-9）とも命名されているHEPESは、双性イオン性有機化学緩衝剤として一般的に使用される。当業者はまた、HEPESをどこで入手すべきかを知っており、それは市販されている。例えば、Sigma Aldrichからこれを入手することができる；図22に示される対応するデータシート。

【００４７】

ラクトビオナートは、ラクトビオン酸のカルボン酸陰イオンである。ラクトビオン酸（4-O-β-ガラクトピラノシル-D-グルコン酸）は、糖酸である。ラクトビオナートは、異なる方法で使用することができる。ラクトビオン酸カリウムとして使用される場合、それは、例えば浸透圧支持を提供し、細胞膨張を防ぐことができ、ナトリウムと組み合わせた場合には、それは保存機能を有し得る。あるいは、ラクトビオン酸のミネラル塩を、ミネラル補給のために使用することができる。薬学的適用のために、多くの場合、抗生物質エリスロマイシンはとりわけエリスロマイシンラクトビオナートとして使用することができる。当業者はまた、ラクトビオナート、例えばラクトビオン酸ナトリウム（Cas番号：27297-39-8）をどこで入手すべきかを知っており、すなわち例えばCOMBI-BLOCKSからであり、図23の製品シートを参照されたい。

【００４８】

D-Glc-(1→2)-β-D-Fru、α-D-グルコピラノシルβ-D-フラクトフラノシド、β-D-フラクトフラノシル-α-D-グルコピラノシド、D(+)-サッカロース、または糖（CAS番号57-50-1）としても公知であるスクロースは、他の物質と同じく商業的に入手することができ、当業者は同様にそれをどこで購入すべきかを知っている。Sigma Aldrichからのスクロースの対応する製品シートを図24に示す。

【００４９】

マンニトールは、糖アルコールの一種である（CAS登録番号：69-65-8）。当業者は、マンニトールを入手する方法を知っている。例えば、これはAvantorから入手することができる。それぞれの製品シートを図25に示す。

【００５０】

グルコース（CAS番号：50-99-7）もまた当業者に周知であり、市販されている。Sigma Aldrichのからのそれぞれの製品シートを図26に示す。

【００５１】

デキストランは、直鎖状α(1→6)結合グルコース単位およびα(1→3)結合開始枝から構成される分岐グルカンである。デキストランのサイズは、10,000～150,000 Kdの範囲である。デキストランは、体積増量剤、安定化剤、マトリックス構成成分、結合プラットフォーム、潤滑剤、および物理的構造構成成分などの多くの適用において使用される。本明細書に記載される担体中で使用されるデキストラン40（CAS番号：9004-54-0）は、典型的には、臓器移植用の新たな改良型保存溶液の開発において使用される。デキストラン40は、細胞の堅固性および細胞層を介する流動パラメータを決定するために使用することができる。デキストラン40はまた、コロイド血漿増量剤として使用することができる。デキストラン-40は市販されており、とりわけSigma Aldrichから入手することができる（図27に示される製品シート）。

【００５２】

アデノシン（CAS番号58-61-7）は、β-N_9-グリコシド結合を介してリボース糖分子（リボフラノース）部分に結合したアデニンの分子から構成されるプリンヌクレオシドである。アデノシンは、とりわけSigma-Aldrichから市販されている（対応する製品シートを図28に示す）。

【００５３】

グルタチオンは、(2S)-2-アミノ-4-{[(1R)-1-[(カルボキシメチル)カルバモイル]-2-スルファニルエチル]カルバモイル}ブタン酸としても公知である。この構成成分は市販されており、とりわけSigma Aldrichから入手することができる（図29に示される対応する製品シート）。

【００５４】

原則として、上記のi)～xiii)に列挙される物質を含む任意の液体担体を、本発明の方法において使用することができる。担体は液体担体である。したがって、溶液／懸濁液を形成するために、i)～xiii)に列挙される物質を液体中に溶解することが可能である。液体は、任意の適切な液体であってよい。例えば、液体は、培養液、水、緩衝液、または同様のものであってよい。

【００５５】

担体は、さらなるpH緩衝剤、エネルギー基質、フリーラジカルスカベンジャー、および浸透圧／膠質安定化剤を付加的に含んでもよく‐これらはすべて当業者に公知である。さらに、液体担体は、無血清および／またはタンパク質不含であってよい。液体担体は、例えばDMSOなどの双極性非プロトン性溶媒を含まなくてよい。特に、液体担体は、WO2010/064054に記載される担体であってよい。担体は、HypoThermosol（商標）またはHypoThermosol（商標）-FRS (HTS-FRS) であってよい。HypoThermosol（商標）-FRS (HTS-FRS)は、STEMCELL Technologiesから購入することができる（図30に示されるそれぞれの製品シートに従う）。

【００５６】

担体が輸送／貯蔵培地または賦形剤であることが、さらに想定される。輸送／貯蔵培地

は天然培地であってよく、これは、本明細書に記載されるようなi)～xiii)に列挙される物質を付加的に含む、天然に存在する生体液のみからなる。培地はまた、本明細書に記載されるようなi)～xiii)に列挙される物質、ならびに（さらなる）栄養素（有機および無機の両方）、ビタミン、塩類、O_2およびCO_2気相、血清タンパク質、炭水化物、ならびに／または補因子の添加を含むものであってよい。特定の態様において、培地は無血清および／またはタンパク質不含である。

【００５７】

担体はまた賦形剤であってもよい。「賦形剤」は、医薬品の有効成分と共に製剤化される物質である。本方法において、有効成分は幹細胞集団である。

【００５８】

担体は、生体適合性足場またはマイクロキャリアをさらに含み得る。足場またはマイクロキャリアは、例えば、生分解性高分子物質、最も好ましくはポリ(D,L乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA) であってよい。あるいは、足場またはマイクロキャリアは、ポリ-L-ラクチド(PLLA)、コラーゲン、フィブロネクチン、グリコサミノグリカン (GAG)、フィブリン、デンプン、セルロース アラビノガラクタン（カラマツガム）、アルギン酸、寒天、カラギーナン、キチン、ヒアルロン酸、デキストラン、ジェランガム、プルラン、ヒドロキシアパタイト、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)、ヒドロゲル、またはペプチドベースのナノ構造線維性足場などの他の自己集合性材料を含む物質を含む平滑構造、マクロ多孔性構造、または微孔性構造であってよい。

【００５９】

原則として、任意の量の幹細胞を任意の量の液体担体と接触させることができる。これに関して、接触は、幹細胞集団を、約7000万個／ml、約6000万個／ml、約5000万個／ml、約4000万個／ml、約3000万個／ml、約2000万個／ml、約1000万個／ml、約500万個／ml、約400万個／ml、約300万個／ml、約200万個／ml、約100万個／ml、約50万個／ml、約10万個／ml、または1 mlの担体中に10万個未満の細胞の密度で懸濁することによって行うことができる。いくつかの態様において、接触は、幹細胞集団を約1000万個／担体1 mlの密度で懸濁することによって行われる。

【００６０】

幹細胞集団を担体と接触させた後、担体と接触させた幹細胞は、約50 ml、約20 ml、約10 ml、約5 ml、約4 ml、約3 ml、約2 ml、約1 ml、約0.5 ml、約0.25 ml、または0.25 ml未満の担体の体積でバイアルに分取することができる。例えば、担体と接触させた幹細胞は、約1 mlの体積でバイアルに分取することができる。

【００６１】

本発明の方法が解凍または凍結段階を含まないことが、さらに想定される。このことは、回収後に、幹細胞集団を凍結および解凍する必要なく、幹細胞集団を輸送／貯蔵することを含み得る。

【００６２】

本明細書に記載される幹細胞集団を輸送／貯蔵する方法において使用される担体は、この目的に特に適している。この担体の1つの利点は、その中で輸送/貯蔵された実質的にすべての幹細胞が生存可能なままであることである。「生存細胞」とは、生存することができる細胞である。当業者は、生存細胞を検出する方法を知っている。1つのそのような方法は、色素トリパンブルーで細胞を染色することである。生存細胞はトリパンブルーでは陽性に染色されない。

【００６３】

これに関して、本発明の方法では、輸送／貯蔵前の生存幹細胞の数／量と比較して、集団の幹細胞の多くても約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約10%未満が輸送／貯蔵中に死滅する可能性がある。

【００６４】

本発明の方法はまた、幹細胞集団が、輸送／貯蔵後に任意の細胞直径を有することを企図する。当業者は、細胞の直径を測定する方法を知っている。例えば、細胞のサイズ／直

径は、顕微鏡画像を撮影し、二次ソフトウェアを使用して細胞の直径を測定することによって決定することができる。幹細胞集団中の幹細胞の大部分は、したがって輸送／貯蔵後に約9μm～約20μmの細胞直径を有し得る。幹細胞集団中の幹細胞の大部分が、輸送後に約12μm～約16μmの細胞直径を有することもまた想定される。

【００６５】

本明細書に記載される担体中で輸送／貯蔵された幹細胞は、生存幹細胞と同じタンパク質／因子を分泌する。例えば、本発明の方法は、輸送／貯蔵後に、（間葉系）幹細胞集団が輸送／貯蔵前とほぼ同量のTGFベータ1を分泌し得ることを企図する。TGFベータ1（トランスフォーミング増殖因子ベータ、TGF-β1）は、当業者に公知であり、SEQ ID NO. 7に示される配列を含み得る。加えて、またはその代わりに、輸送／貯蔵後に、（間葉系）幹細胞集団は、輸送／貯蔵前とほぼ同量のVEGF（血管内皮増殖因子）、PDGF-AA（血小板由来増殖因子サブユニットAA）、Ang-1（アンジオゲニン-1）、および／またはHGF（肝細胞増殖因子）を分泌し得る。VEGF、PDGF-AA、Ang-1、および／またはHGFはすべて、創傷治癒へのそれらの関与に関して当業者に公知である。特に、VEGFは、SEQ ID NO. 8に示される配列を含み得、PDGF-AAは、SEQ ID NO. 9に示される配列を有し得、Ang-1は、SEQ ID NO. 10に示される配列を有し得、一方HGFは、SEQ ID NO. 11に示される配列を有し得る。加えて、またはその代わりに、PDGF-BBおよび／またはIL-10は、輸送前および／または輸送後に本質的に検出されない。PDGF-BB（血小板由来増殖因子サブユニットBB）および／またはIL-10（インターロイキン-10）はいずれもまた、当業者に公知である。PDGF-BBは、SEQ ID NO. 12に示される配列を含み得、一方IL-10は、SEQ ID NO: 13に示される配列を含み得る。これらの因子の分泌は、任意の適切な方法で、例えば、幹細胞が担体中に分泌するタンパク質（例えば、PDGF-AA、PDGF-BB、VEGF、IL-10、Ang-1、HGF、またはTGFβ1）の量を測定することによって、決定することができる。タンパク質の量は、例えばFLEXMAP 3Dシステム（Luminex Corporation、Austin, Texas, USA）などのシステムを使用して、自動化様式で市販の抗体／免疫測定法によって測定することができる。これに関連して、タンパク質アンジオポエチン1 (Ang-1)、TGF-β1、VEGF、およびHGFの創傷治癒過程への関与が当業者に公知であることが留意される。アンジオポエチン1の創傷治癒への関与については、例えば、Li et al. Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:113 「Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 gene promote wound healing」を参照されたい。肝細胞増殖因子 (HGF) の創傷治癒、具体的には慢性／非治癒性創傷の治癒への関与については、例えば、Yoshida et al., 「Neutralization of Hepatocyte Growth Factor Leads to Retarded Cutaneous Wound Healing Associated with Decreased Neovascularization and Granulation Tissue FormationJ. Invest. Dermatol. 120:335-343, 2003、Li, Jin-Feng et al. 「HGF Accelerates Wound Healing by Promoting the Dedifferentiation of Epidermal Cells through βl-Integrin/ILK Pathway.」 BioMed Research International 2013 (2013):470418、または Conway et al, 「Hepatocyte growth factor regulation: An integral part of why wounds become chronic」. Wound Rep Reg (2007) 15 683-692を参照されたい。血管内皮成長因子 (VEGF) の創傷治癒、具体的には慢性／非治癒性創傷の治癒への関与については、例えば、Froget et al., Eur. Cytokine Netw., Vol. 14, March 2003, 60-64、またはBao et al., 「The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing」 J Surg Res. 2009 May 15; 153(2): 347-358を参照されたい。

【００６６】

トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF-β1、TGF-β2、およびTGF-β3を含む）の創傷治癒、具体的には慢性／非治癒性創傷の治癒への関与については、例えば、Ramirez et al.「The Role of TGFb Signaling in Wound Epithelialization」 Advances In Wound Care, Volume 3, Number 7, 2013, 482-491、またはPakyari et al., Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing, Advances In Wound Care, Volume 2, Number 5, 2012, 215-224を参照さ

れたい。

【００６７】

ここで本発明において使用される培養液に目を向けると、培養液は、間葉系臍帯ライニング幹細胞の単離または培養のために、最終濃度約55～65％（v/v）のDMEM、最終濃度約5～15％（v/v）のF12、最終濃度約15～30％（v/v）のM171、および最終濃度約1～8％（v/v）のFBSを含み得る。本明細書で用いられる「％（v/v）」という値は、培養液の最終体積に対する個々の構成成分の体積を指す。これは、DMEMが例えば最終濃度約55～65％（v/v）で培養液中に存在するのであれば、1リットルの培養液が約550～650 ml DMEMを含有することを意味する。

【００６８】

他の態様において、培養液は、最終濃度約57.5～62.5％（v/v）のDMEM、最終濃度約7.5～12.5％（v/v）のF12、最終濃度約17.5～25.0％（v/v）のM171、および最終濃度約1.75～3.5％（v/v）のFBSを含み得る。さらなる態様において、培養液は、最終濃度約61.8％（v/v）のDMEM、最終濃度約11.8％（v/v）のF12、最終濃度約23.6％（v/v）のM171、および最終濃度約2.5％（v/v）のFBSを含み得る。

【００６９】

上記の構成成分に加えて、培養液は、間葉系臍帯ライニング幹細胞の培養に有利な補充物質を含み得る。本発明の培養液は、例えば上皮増殖因子（EGF）を含み得る。存在する場合には、EGFは最終濃度約1 ng/ml～約20 ng/mlで培養液中に存在し得る。これらの態様のいくつかにおいて、培養液は最終濃度約10 ng/mlのEGFを含み得る。

【００７０】

培養液はまた、インスリンを含み得る。存在する場合には、インスリンは最終濃度約1μg/ml～10μg/mlで存在し得る。これらの態様のいくつかにおいて、培養液は最終濃度約5μg/mlのインスリンを含み得る。

【００７１】

培養液は、以下の補充物質のうちの少なくとも1つをさらに含み得る：アデニン、ヒドロコルチゾン、および3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩（T3）。そのような態様において、培養液は、アデニン、ヒドロコルチゾン、および3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩（T3）の3つすべてを含み得る。これらの態様において、培養液は、最終濃度約0.05～約0.1μg/mlのアデニン、最終濃度約1～約10μg/mlのヒドロコルチゾン、および／または最終濃度約0.5～約5 ng/mlの3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩（T3）を含み得る。

【００７２】

1つの態様においては、本明細書において記載され使用される高度に精製された間葉系幹細胞集団を得るために、間葉系幹細胞をPTT6培地中で培養する。これに関連して、本明細書に記載されるPTT6培地は、最終体積500 mlの培養液を得るために、

i. DMEM 250 ml
ii. M171 118 ml
iii. DMEM/F12 118 ml
iv. 最終濃度2.5％（v/v）に達するためのウシ胎仔血清（FBS）12.5 ml
v. 最終濃度10 ng/mlのEGF
vi. 最終濃度5μg/mlのインスリン
vii. インスリン0.175 ml（最終濃度5μg/ml）

を混合することによって得られることが留意される。

【００７３】

「DMEM」とは、1969年に開発され、基本培地イーグル（BME）の改変物であるダルベッコ改変イーグル培地を意味する（Lonzaから入手可能なDMEMのデータシートを示す図1を参照されたい）。最初のDMEM処方は1000 mg/Lのグルコースを含有し、胚性マウス細胞の培養について初めて報告された。それ以来DMEMは細胞培養のための標準的な培地となり、ほんの数例の供給業者を挙げると、ThermoFisher Scientific（カタログ番号

11965-084）、Sigma Aldrich（カタログ番号D5546）、またはLonzaなどの、様々な供給源から市販されている。したがって、いかなる市販のDMEMも、本発明において使用することができる。好ましい態様において、本明細書で用いられるDMEMは、Lonzaからカタログ番号12-604Fで入手可能なDMEM培地である。この培地は、4.5 g/L グルコースおよびL-グルタミンが補充されているDMEMである。別の好ましい態様において、本明細書で用いられるDMEMは、Sigma Aldrichカタログ番号D5546のDMEM培地であり、これは1000 mg/L グルコースおよび炭酸水素ナトリウムを含有するが、L-グルタミンを含まない。

【００７４】

「F12」培地とは、ハムF12培地を意味する。この培地もまた標準的な細胞培養液であり、ホルモンおよびトランスフェリンと組み合わせて血清と共に使用された場合に、幅広い種類の哺乳動物細胞およびハイブリドーマ細胞を培養できるように、当初設計された栄養混合物である（LonzaからのハムF12培地のデータシートを示す図2を参照されたい）。いかなる市販のハムF12培地（例えば、ほんの数例の供給業者を挙げると、ThermoFisher Scientific（カタログ番号11765-054）、Sigma Aldrich（カタログ番号N4888）、またはLonzaからのもの）も、本発明において使用することができる。好ましい態様では、LonzaからのハムF12培地が用いられる。

【００７５】

「DMEM/F12」または「DMEM:F12」とは、DMEMとハムF12培養液の1:1混合物を意味する（LonzaからのDMEM: F12 (1:1) 培地のデータシートを示す図3を参照されたい）。DMEM/F12 (1:1) 培地は、多くの異なる哺乳動物細胞の増殖を支持するために広く使用されている基本培地であり、ThermoFisher Scientific（カタログ番号11330057）、Sigma Aldrich（カタログ番号D6421）、またはLonzaなどの様々な供給業者から市販されている。いかなる市販のDMEM:F12培地も、本発明において使用することができる。好ましい態様において、本明細書で用いられるDMEM:F12培地は、Lonzaからカタログ番号12-719Fで入手可能なDMEM/F12 (1:1)培地（L-グルタミン、15 mM HEPES、および3.151 g/Lグルコースを伴うDMEM: F12である）である。

【００７６】

「M171」とは、正常ヒト乳腺上皮細胞の培養および増殖のための基本培地として開発された培養液171を意味する（Life Technologies CorporationからのM171培地のデータシートを示す図4を参照されたい）。この基本培地は広く使用されており、例えばThermoFisher ScientificまたはLife Technologies Corporation（カタログ番号M171500）などの供給業者から市販されている。いかなる市販のM171培地も、本発明において使用することができる。好ましい態様において、本明細書で用いられるM171培地は、Life Technologies Corporationからカタログ番号M171500で入手可能なM171培地である。

【００７７】

「FBS」とは、ウシ胎仔血清（ウシ胎児血清とも称される）、すなわち、天然の血液凝固後に残存し、続いて遠心分離によっていかなる残存赤血球も除去された血液画分を意味する。ウシ胎仔血清は、非常に低レベルの抗体を有し、より多くの増殖因子を含有し、多くの異なる細胞培養適用における多用途性を可能にするという理由で、真核細胞のインビトロ細胞培養のために最も広く使用されている血清補充物質である。FBSは、その主眼が、適切な起源追跡管理、表示の真実性、ならびに適切な規格化および監視を通した血清および動物由来製品の安全性および安全使用であるInternational Serum Industry Association (ISIA) のメンバーから入手することが好ましい。ISIAメンバーであるFBSの供給業者には、少し記述するだけでも、Abattoir Basics Company、Animal Technologies Inc.、Biomin Biotechnologia LTDA、GE Healthcare、Gibco by Thermo Fisher Scientific、およびLife Science Productionが含まれる。現在好ましい態様において、FBSはGE Healthcareからカタログ番号A15-151で得られる。

【００７８】

上記のように、本発明において使用される間葉系幹細胞集団を単離するための培養液を

作製する方法は、最終体積500 mlの培養液を得るために、
i. DMEM 250 ml
ii. M171 118 ml
iii. DMEM/F12 118 ml
iv. 最終濃度2.5% (v/v) に達するためのウシ胎仔血清 (FBS) 12.5 ml
を混合する段階を含む。

【００７９】

上記で説明したように、DMEM/F12培地は、DMEMとハムF12培地の1:1混合物である。したがって、DMEM/F12培地118 mlは、DMEM 59 mlおよびF12 59 mlを含有する。よって、培養液を作製するこの方法を用いた場合、全体積500 mlにおける最終濃度 (v/v) は以下の通りである：

- DMEM：250 ml + 59 ml = 309 ml、309/500 = 61.8 % (v/v) に相当する。
- M171：118 ml、118/500 = 23.6 % (v/v) に相当する。
- F12：59 ml、59/500 = 11.8 % (v/v) に相当する。

【００８０】

培養液を作製する本方法の態様は、
v. 最終EGF濃度10 ng/mlを達成するためのEGF保存溶液 (5 μg/ml) 1 ml、および
vi. 最終インスリン濃度5 μg/mlを達成するためのインスリン保存溶液 (14.28 mg/ml) 0.175 ml
を添加する段階をさらに含む。

【００８１】

これらの態様において、これらの構成成分i～viの上記の体積が、最終体積499.675 mlの培養液をもたらすことが、本明細書において留意される。さらなる構成成分が培養液に添加されない場合、残りの0.325 ml（合計して500 mlの体積とするため）は、例えば、DMEM、M171、DMEM/F12、またはFBSのいずれかを意味する、構成成分i～ivのいずれかであってよい。あるいは、培養液の全体積が500 mlとなるように、EGFまたはインスリンの保存溶液の濃度を当然ながら調整することもできる。加えて、構成成分i～ivは、必ずしもそれらが列挙されている順に添加しなければならないわけではなく、本発明の培養液に達するように、任意の順序を用いてこれらの構成成分を混合することも当然ながら可能であることもまた留意される。このことは、例えば、M171とDMEM/F12を共に混合し、次いでDMEMおよびFBSと組み合わせて、本明細書に記載される最終濃度、すなわち、DMEMの最終濃度 約55～65% (v/v)、F12の最終濃度 約5～15% (v/v)、M171の最終濃度 約15～30% (v/v)、およびFBSの最終濃度 約1～8% (v/v) とすることができることを意味する。

【００８２】

他の態様において、本方法は、補充物質であるアデニン、ヒドロコルチゾン、および3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3) のうちの1つまたは複数を0.325 mlの体積でDMEMに添加し、それによって全体積500 mlの培養液とする段階をさらに含む。この態様において、DMEM中のこれらの補充物質の最終濃度は、以下の通りであってよい：
約0.05～0.1 μg/mlのアデニン、例えば約0.025 μg/mlのアデニン、
約1～10 μg/mlのヒドロコルチゾン、
約0.5～5 ng/mlの3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3)、例えば1.36 ng/mlの3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3)。

【００８３】

上記の開示と一致して、本明細書で用いられる細胞培養液は、本明細書に記載される培地を作製する方法によって取得可能である、または得られる。

【００８４】

加えて、臍帯の羊膜から間葉系幹細胞を単離する方法であって、本方法によって調製された培養液中で羊膜組織を培養する段階を含む方法が、本明細書に記載される。

【００８５】

したがって、本発明はまた、
- 最終濃度約55～65% (v/v) のDMEM、
- 最終濃度約5～15% (v/v) のF12、
- 最終濃度約15～30% (v/v) のM171、および
- 最終濃度約1～8% (v/v) のFBS

を含む細胞培養液（の使用）を対象にする。

【００８６】

本明細書において記載される培養液のある特定の態様において、培地は、最終濃度約57.5～62.5% (v/v) のDMEM、最終濃度約7.5～12.5% (v/v) のF12、最終濃度約17.5～25.0% (v/v) のM171、および最終濃度約1.75～3.5% (v/v) のFBSを含む。他の態様において、培養液は、最終濃度約61.8% (v/v) のDMEM、最終濃度約11.8% (v/v) のF12、最終濃度約23.6% (v/v) のM171、および最終濃度約2.5% (v/v) のFBSを含み得る。

【００８７】

加えて、培養液は、最終濃度約1 ng/ml～約20 ng/mlの上皮増殖因子 (EGF) をさらに含み得る。ある特定の態様において、培養液は最終濃度約10 ng/mlのEGFを含む。本明細書に記載される培養液は、最終濃度約1μg/ml～10μg/mlのインスリンをさらに含み得る。そのような態様において、培養液は最終濃度約5μg/mlのインスリンを含み得る。

【００８８】

細胞培養液は、以下の補充物質のうちの少なくとも1つをさらに含み得る：アデニン、ヒドロコルチゾン、および3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3) 。ある特定の態様において、培養液は、アデニン、ヒドロコルチゾン、および3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3) の3つすべてを含む。存在する場合には、培養液は、最終濃度約0.01～約0.1μg/mlアデニンもしくは約0.05～約0.1μg/mlアデニンのアデニン、最終濃度約0.1～約10μg/mlヒドロコルチゾンもしくは約1～約10μg/mlヒドロコルチゾンのヒドロコルチゾン、および／または最終濃度約0.5～約5 ng/mlの3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3) を含み得る。

【００８９】

細胞培養液の態様において、本発明の細胞培養液500 mlは、
i. DMEM 250 ml
ii. M171 118 ml
iii. DMEM/F12 118 ml
iv. ウシ胎仔血清 (FBS) 12.5 ml（最終濃度2.5%）
を含む。さらなる態様において、細胞培養液は、
v. 最終濃度10 ng/mlのEGF、および
vi. 最終濃度5μg/mlのインスリン
をさらに含み得る。インスリンおよびEGFはいずれも、培養液の全体積が500 mlを超えないように、最適な保存溶液を用いて培養液に添加することができる。

【００９０】

特定の例において、本発明において使用される培養液の構成成分i～viは、図5に示される構成成分であり、これは、それらが図5に示されるカタログ番号を用いて各製造業者から入手されることを意味する。図5に示されるような構成成分i～viを混合して得られる培地は、本明細書において「PTT-6」とも称される。これに関連して、任意の他の商業的供給業者の、構成成分i～vi、および抗生物質などの任意の他の成分が、本発明の培地を作製する上で使用され得ることが再度留意される。

【００９１】

加えて、本発明の細胞培養液は、最終濃度約0.01～約0.1μg/mlアデニンもしくは約0.05～約0.1μg/mlアデニンのアデニン、最終濃度約0.1～10μg/ml、約0.5～約10μg/ml、もしくは約1～約10μg/mlヒドロコルチゾンのヒドロコルチゾン、および／または最終濃度約0.1～約5 ng/mlもしくは約0.5～約5 ng/mlの3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3) を含み得る。

【００９２】
本明細書において記載される間葉系幹細胞集団を得るために、臍帯組織を、適切な数の（初代）間葉系臍帯ライニング幹細胞が組織から増殖するまで培養することができる。典型的な態様では、臍帯組織を、羊膜の間葉系幹細胞の細胞増殖が約70～約80%の集密度に達するまで培養する。本明細書において、「集密度」または「集密」という用語は、細胞培養の技術分野におけるその通常の意味で用いられ、細胞によって覆われた表面の割合を参照した、培養ディッシュまたはフラスコ中の接着細胞の数の推定値／指標を意味することが留意される。例えば、50パーセントの集密とは、表面のおよそ半分が覆われており、細胞が増殖する余地がなお存在することを意味する。100パーセントの集密とは、表面が細胞によって完全に覆われており、細胞が単層として増殖する余地が残されていないことを意味する。

【００９３】
ひとたび適切な数の初代細胞（間葉系臍帯ライニング幹細胞）が組織外植片による臍帯ライニング組織から得られたならば、培養に使用した培養容器から間葉系幹細胞を取り出す。そうすることによって、羊膜の（初代）単離間葉系幹細胞を含有するマスター細胞バンクを得ることができる。典型的には、間葉系幹細胞は接着細胞であるため、取り出しは標準的な酵素処理を用いて行われる。例えば、酵素処理は、国際米国特許出願2006/0078993、国際特許出願WO2006/019357、または国際特許出願WO2007/046775に記載されているようにトリプシン処理を含んでよく、これは、増殖している細胞をさらなる増大のためにトリプシン処理（0.125%トリプシン／0.05% EDTA）によって回収できることを意味する。回収された間葉系幹細胞が、例えばマスター細胞バンクを作製するために用いられる場合には、本明細書において以下に説明されるように、細胞を凍結保存し、さらなる使用のために貯蔵することもできる。

【００９４】
ひとたび回収されたならば、間葉系幹細胞を継代培養用の培養容器に移すことができる。継代培養はまた、凍結された初代細胞から、すなわちマスター細胞バンクから開始することもできる。継代培養のために、任意の適切な量の細胞を、細胞培養プレートなどの培養容器中に播種することができる。間葉系幹細胞を、この目的のために、例えば約0.5×10^6細胞／ml～約5.0×10^6細胞／mlの濃度で、継代培養用の適切な培地（最も好都合には、培養液PTT-6）中に懸濁することができる。1つの態様では、細胞を、継代培養のために約1.0×10^6細胞／mlの濃度で懸濁する。継代培養は、単純な培養フラスコ中で培養することによって行うこともできるが、例えば、インキュベーター内で積み重ねることができる、CellStack（Corning、Corning, NY, USA）またはCellfactory（Nunc、Thermo Fisher Scientific Inc.の一部、Waltham, MA, USA）などの多層システム中で培養することによって行うこともできる。あるいは、継代培養はまた、バイオリアクターなどの閉鎖自己完結型システムで行うこともできる。様々なデザインのバイオリアクターが当業者に周知であり、例えば、平行平板、中空繊維、またはマイクロ流体バイオリアクターがある。例えば、Sensebe et al.「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review」、前記を参照されたい。市販の中空繊維バイオリアクターの実例は、例えば、臨床試験のための骨髄間葉系幹細胞の増大に使用されているQuantum（登録商標）細胞増殖システム (Terumo BCT, Inc) である（Hanley et al, Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum Cell Expansion System, Cytotherapy. 2014 August ; 16(8): 1048-1058を参照されたい）。本発明の間葉系幹細胞集団の継代培養に使用され得る市販のバイオリアクターの別の例は、GE Heathcareから入手可能なXuri細胞増殖システムである。Quantum（登録商標）細胞増殖システムなどの自動化システムにおける間葉系幹細胞の培養は、治療適用のためのワーキング細胞バンクがGMP条件下で生成されるべきであり、多数の細胞が必要である場合に、特に有効である。

【００９５】
本明細書において記載される間葉系臍帯ライニング幹細胞の継代培養は、PTT-6培地な

どの本明細書において記載される培養液中で行われる。よって、PTT-6などの培養液は、羊膜からの間葉系幹細胞の単離、および継代培養による単離初代細胞のその後の培養の両方のために使用され得る。継代培養についても同様に、間葉系幹細胞は、適切な数の細胞が増殖するまで培養することができる。例証的な態様において、間葉系幹細胞は、それらが約70～約80%の集密度に達するまで継代培養される。

【００９６】

間葉系臍帯ライニング幹細胞の集団の単離／培養は、哺乳動物細胞を培養するための標準的な条件下で行われ得る。典型的には、間葉系臍帯ライニング幹細胞の集団を単離する本発明の方法は典型的に、その細胞の由来元の種の細胞を培養するために通常用いられる条件（温度、雰囲気）で行われる。例えば、ヒト臍帯組織および間葉系臍帯ライニング幹細胞はそれぞれ、通常は5% CO_2を含む空気雰囲気中で37℃で培養される。これに関連して、間葉系細胞は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ヒツジ、サル、またはヒトなどの任意の哺乳動物種に由来してよく、1つの態様においてはヒト起源の間葉系幹細胞が好ましいことが留意される。

【００９７】

ひとたび所望の／適切な数の間葉系臍帯ライニング幹細胞が継代培養から得られたならば、継代培養に使用した培養容器から間葉系幹細胞を取り出すことにより、それらを回収することができる。間葉系幹細胞の回収は典型的には、この場合も同様に、細胞のトリプシン処理を含む酵素処理によって行われる。単離された間葉系幹細胞をその後収集し、直接使用するかまたはさらなる使用のために保存する。典型的に、保存は凍結保存によって行われる。「凍結保存」という用語は、本明細書においてその通常の意味で用いられて、間葉系幹細胞が、（典型的に）-80℃または-196℃（液体窒素の沸点）などの氷点下の温度まで冷却することによって保存される過程を表す。凍結保存は、当業者に公知のように行うことができ、臍帯の細胞中の氷晶の形成を遅らせる、ジメチルスルホキシド（DMSO）またはグリセロールなどの凍結保護剤の使用を含み得る。

【００９８】

本明細書において記載される単離方法によって得られた間葉系臍帯ライニング幹細胞の単離された集団は、高度に明確でありかつ高度に均一である。本方法の典型的な態様において、単離された間葉系幹細胞の少なくとも約90%またはそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、以下のマーカーを発現する：CD73、CD90、およびCD105。加えて、これらの態様において、単離された間葉系幹細胞の少なくとも約90%またはそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、以下のマーカーの発現を欠き得る：CD34、CD45、およびHLA-DR。特定の態様において、単離された間葉系幹細胞集団の約97%もしくはそれ以上、約98%もしくはそれ以上、または約99%もしくはそれ以上が、CD73、CD90、およびCD105を発現しながら、CD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている。

【００９９】

したがって、上記の開示と一致して、臍帯の羊膜から単離された間葉系幹細胞集団であって、該幹細胞集団の少なくとも約90%またはそれ以上の細胞は以下のマーカーの各々を発現する：CD73、CD90、およびCD105。好ましい態様において、単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上の細胞が、CD73+、CD90+、かつCD105+であり、このことは、単離された細胞集団のこの割合が、CD73、CD90、およびCD105の各々を発現することを意味し（本出願の実験の項を参照されたい）、本明細書において使用され得る。加えて、単離された間葉系幹細胞の少なくとも約90%また

はそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、以下のマーカーの発現を欠き得る。特定の態様において、単離された間葉系幹細胞集団の約97%もしくはそれ以上、約98%もしくはそれ以上、または約99%もしくはそれ以上の細胞が、CD73、CD90、およびCD105を発現しながら、CD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている。臍帯の羊膜に由来する間葉系幹細胞のそのように高度に均一な集団は、2016年10月5日に出願された米国仮特許出願第62/404,582号、および2017年10月5日に出願された同時係属中の米国特許出願第15/725,913号、および同様に2017年10月5日に出願された同時係属中のPCT出願PCT/SG2017/050500において初めて報告され、細胞療法に使用されるべき間葉系幹細胞の基準を満たす（実験の項、および例えばSensebe et al.「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review」、前記もまた参照されたい）。これに関連して、この間葉系幹細胞集団は、本発明の単離方法によって得ることができるが、必要に応じて、細胞選別などの異なる方法によって得ることもできることが留意される。

【０１００】

本明細書において記載される間葉系幹細胞を単離するための培養液を作製する方法は、最終体積500 mlの培養液を得るために、

i. DMEM 250 ml
ii. M171 118 ml
iii. DMEM/F12 118 ml
iv. 最終濃度2.5% (v/v) に達するためのウシ胎仔血清 (FBS) 12.5 ml

を混合する段階を含む。

【０１０１】

上記で説明したように、DMEM/F12培地は、DMEMとハムF12培養液の1:1混合物である。

【０１０２】

したがって、DMEM/F12培地118 mlは、DMEM 59 mlおよびF12 59 mlを含有する。よって、培養液を作製するこの方法を用いた場合、全体積500 mlにおける最終濃度 (v/v) は以下の通りである：

DMEM：250 ml + 59 ml = 309 ml、309/500 = 61.8 % (v/v) に相当する。
M171：118 ml、118/500 = 23.6 % (v/v) に相当する。
F12：59 ml、59/500 = 11.8 % (v/v) に相当する。

【０１０３】

本発明はまた、疾患を有する対象を処置する方法に関し、該方法は、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を対象に局所投与する段階を含み、ここで、間葉系幹細胞集団は、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に投与される。

【０１０４】

同様に、本発明はまた、対象の疾患を処置する方法において使用するための本明細書に記載される間葉系幹細胞集団に関し、ここで、間葉系幹細胞集団は、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に局所投与される。

【０１０５】

処置されようとする対象は、任意の適切な対象であってよい。対象は、脊椎動物、より好ましくは哺乳動物であってよい。哺乳動物には、家畜、競技用動物、ペット、霊長類、イヌ、ウマ、マウス、およびラットが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物はまた、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、マウス、ラット等であってもよい。したがって、1つの態様において、対象は脊椎動物である。対象はまた、ヒト対象であってもよい。したがって、対象は処置を必要とする対象であってよい。そういうものとして、対象は、本明細書の他所に記載される疾患に罹患している可能性がある。いくつかの態様において、対象は、慢性足部潰瘍を伴うI型またはII型糖尿病に罹患している。好ましくは、対象は、間

葉系幹細胞集団に対するHLA抗体について陰性である。

【０１０６】

間葉系幹細胞集団は、任意の投与量で適用することができる。投与量は、治療的に有効であってよい。「治療的に有効な量／投与量」は、当業者に明らかなように、使用される細胞の活性、患者の体内での細胞の安定性、緩和されるべき状態の重症度、処置されようとする患者の年齢および感受性、有害事象、ならびに同様のものを含むがこれらに限定されない因子によって変動し得る。様々な因子が経時的に変化するにつれて、投与の量を調製することができる。

【０１０７】

間葉系幹細胞が適用される投与量はまた、単位投与量であってもよい。例えば、間葉系幹細胞集団は、約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量で適用することができる。特定の態様において、間葉系幹細胞集団は、約1000万個の細胞の単位投与量で適用される。

【０１０８】

間葉系幹細胞は、同一対象に対して数回適用することができる。例えば、幹細胞は、週に1回、2回、3回、またはそれ以上適用される。原則として、間葉系幹細胞の任意の単位投与量を、疾患を治癒または緩和するのに適した回数だけ適用することができる。例えば、間葉系幹細胞集団は、週に1回、2回、3回、またはそれ以上適用することができる。間葉系幹細胞集団はまた、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、またはそれ以上にわたって適用することができる。

【０１０９】

したがって、約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量が、週に1回または2回投与される。約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量を、3週間、4週間、もしくは5週間、もしくは6週間、もしくは7週間、もしくは8週間、もしくは10週間、またはそれ以上の週の期間にわたって、週に1回または2回投与することもできる。

【０１１０】

間葉系幹細胞集団が細胞約1000個／cm^2～細胞約500万個／cm^2の投与量で適用されることもまた、本発明の処置の方法によって企図される。ここで、cm^2という表現は、幹細胞が適用される創傷／皮膚の面積を意味する。間葉系幹細胞集団が、約100,000個の細胞／cm^2、300,000個の細胞／cm^2、または500,000個の細胞／cm^2の投与量で適用されることもまた想定される。間葉系幹細胞集団はまた、細胞約100,000個／cm^2、細胞約300,000個／cm^2、または細胞約500,000個／cm^2の投与量で、約8週間にわたって週に2回適用することができる。

【０１１１】

間葉系幹細胞集団は、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に投与される。どのように回収が行われ得るかは、本明細書の他所に記載される。間葉系幹細胞集団は、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約72時間以内に、約48時間以内に、約24時間以内に、約12時間以内に、約6時間以内に、またはそれ未満で適用されることもまた可能である。回収時と適用時との間に、間葉系幹細胞集団は、本発明の輸送／貯蔵の方法によって輸送または貯蔵され得る。したがって、本出願の輸送／貯蔵の方法について記載される局面は、必要な変更を加えて、本発明の処置の方法に等しく関連する。

【０１１２】

本発明の処置の方法は、対象が罹患する疾患を緩和するのに役立つ。原則として、本明

細書に記載される間葉系幹細胞集団によって処置され得る任意の疾患がここでは意味される。特に、疾患は皮膚疾患または創傷であってよい。創傷は、任意の原因に、例えば、熱傷、咬傷、外傷、手術、または疾患に起因し得る。創傷はまた、糖尿病によっても生じ得る。したがって、創傷はまた糖尿病性創傷であってもよい。創傷はまた、糖尿病性足部潰瘍であってもよい。注目すべきことには、間葉系幹細胞集団を、例えば、熱傷または糖尿病創傷などの創傷上に直接配置してもよい（国際特許出願WO2007/046775を参照されたい）。

【０１１３】

本明細書に記載されるように、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団の回収と対象へのそれらの適用との間に、該細胞は、本明細書において規定される担体中で輸送／貯蔵することができる。したがって、対象を処置する本発明の方法はまた、間葉系幹細胞集団を対象に投与する前に、間葉系幹細胞集団を担体から分離する段階を含み得る。当業者は、担体から細胞の分離を行う方法を知っている。例えば、間葉系幹細胞集団の担体からの分離は、遠心分離を含み得る。加えて、またはその代わりに、間葉系幹細胞集団の担体からの分離は、シリンジによってバイアルから細胞集団を取り出す段階を含み得る。

【０１１４】

幹細胞を担体から分離した後、または間葉系幹細胞を回収した後、または任意の他の方法によって本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を得た後、これらの細胞は対象に局所的に適用される。原則として、局所投与の任意の方法が本明細書において意味される。間葉系幹細胞集団の投与は、シリンジによって行うことができる。しかしながら、間葉系幹細胞を対象に適用する前に、間葉系幹細胞をクリーム、軟膏、ゲル、懸濁液、または任意の他の適切な物質中に接触させることも可能である。対象に適用した後の間葉系幹細胞集団は、例えばTegaderm（登録商標）ドレッシング材などのドレッシング材およびTegaderm（登録商標）ドレッシング材を覆うためのクレープ包帯によって、所定の位置に保持してもよい。細胞のより均一な分布のために、適用部位を優しくマッサージしてもよい。

【０１１５】

本発明はまた、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団の約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または細胞25万個未満の細胞を含む単位投与量に関する。

【０１１６】

単位投与量が、約1000万個、約900万個、約800万個、約700万個、約600万個、約500万個、約400万個、約300万個、約200万個、約100万個、約50万個、約25万個、または約10万個の細胞を含むこともまた想定される。好ましくは、単位投与量は約1000万個の細胞を含む。単位投与量が約1000個の細胞～約500万個の細胞を含むことがさらに想定される。単位投与量は、約100,000個の細胞、300,000個の細胞、または500,000個の細胞の投与量で適用することができる。本明細書に記載されるように、単位投与量は局所的に適用され得る。例えば、単位投与量は、1 cm^2当たりに局所的に適用され得る。

【０１１７】

単位投与量は、週に1回、2回、3回、またはそれ以上適用することができる。例えば、単位投与量は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、またはそれ以上にわたって適用することができる。約100,000個の細胞、約300,000個の細胞、または約500,000個の細胞を含む単位投与量は、好ましくは1 cm^2に対して、8週間にわたって週に2回適用することができる。

【０１１８】

単位投与量は、任意の適切な容器中に含まれ得る。例えば、単位投与量は1 mlバイアル中に含まれ得る。そのような場合、例えばバイアルの0.1 mlを対象に対して、好ましくは1 cm^2当たりに適用することができる。単位投与量はあるいは、シリンジ中に含まれてもよい。

【０１１９】

本発明の単位投与量では、細胞は、本明細書において規定される液体担体と接触していてよい。この場合には、間葉系幹細胞は、投与前に担体から分離される。例えば、対象に投与する前に、細胞を遠心分離し、単離することができる。担体は、HypoThermosol（商標）またはHypothermosol（商標）-FRSなどの、本明細書に記載される任意の担体であってよい。

【０１２０】

本発明の処置の方法および単位投与量は、生存細胞の利用を含み得る。生存率がどのように試験され得るかは、本明細書の他所に記載される。

【０１２１】

本発明は、以下の非限定的な実験実施例によってさらに例証される。

【０１２２】

本明細書で用いられた配列を、以下の表1に示す。

【０１２３】

（表１）本明細書で用いられた配列

SEQ ID NO.	説明	配列
1	CD73 Uniprotの識別子P21589、1991年5月1日時点のバージョン番号1：	MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSEDS SKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVY KGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIK AKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFED EITALQPEVDKLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHS NTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIE FDERGNVISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVY LDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNGGG IRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYG QSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDE VYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYP AVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ
2	CD90 Uniprotの識別子P04216、2002年5月2日時点のバージョン番号2：	MNLAISIALLLTVLQVSRGQKVTSLTACLVDQSLRLDCRHENTSSSPIQY EFSLTRETKKHVLFGTVGVPEHTYRSRTNFTSKYNMKVLYLSAFTSKDE GTYTCALHHSGHSPPISSQNVTVLRDKLVKCEGISLLAQNTSWLLLLLLS LSLLQATDFMSL
3	CD105 Uniprotの識別子P17813、1998年7月15日時点のバージョン番号2：	MDRGTLPLAVALLLASCSLSPTSLAETVHCDLQPVGPERGEVTYTTSQVS KGCVAQAPNAILEVHVLFLEFPTGPSQLELTLQASKQNGTWPREVLLVL SVNSSVFLHLQALGIPLHLAYNSSLVTFQEPPGVNTTELPSFPKTQILEWA AERGPITSAAELNDPQSILLRLGQAQGSLSFCMLEASQDMGRTLEWRPRT PALVRGCHLEGVAGHKEAHILRVLPGHSAGPRTVTVKVELSCAPGDLDA VLILQGPPYVSWLIDANHNMQIWTTGEYSFKIFPEKNIRGFKLPDTPQGL LGEARMLNASIVASFVELPLASIVSLHASSCGGRLQTSPAPIQTTPPKDTC SPELLMSLIQTKCADDAMTLVLKKELVAHLKCTITGLTFWDPSCEAEDR GDKFVLRSAYSSCGMQVSASMISNEAVVNILSSSSPQRKKVHCLNMDSL SFQLGLYLSPHFLQASNTIEPGQQSFVQVRVSPSVSEFLLQLDSCHLDLGP EGGTVELIQGRAAKGNCVSLLSPSPEGDPRFSFLLHFYTVPIPKTGTLSCT VALRPKTGSQDQEVHRTVFMRLNIISPDLSGCTSKGLVLPAVLGITFGAF LIGALLTAALWYIYSHTRSPSKREPVVAVAAPASSESSSTNHSIGSTQSTP CSTSSMA
4	CD34 Uniprotの識別子P28906、1998年7月15日時点のバージョン番号2：	MLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGT FSNVSTNVSYQETTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVIT SVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTS LATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKK DRGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEI SSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTLIALVTSGALLA VLGITGYFLMNRRSWSPTGERLGEDPYYTENGGGQGYSSGPGTSPEAQG KASVNRGAQENGTGQATSRNGHSARQHVVADTEL
5	CD45 Uniprotの識別子P08575、2003年7月19日時点のバージョン番号2：	MYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAKMPSVPLSSDPLPT HTTAFSPASTFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLDNASAFNTTGVSS VQTPHLPTHADSQTPSAGTDTQTFSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERS TASTFPTDPVSPLTTTLSLAHHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASETT TLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVN ENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEK FQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIK

SEQ ID NO.	説明	配列
		LENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQ GVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYV LSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVK CRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTF KAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDL HKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLF LAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQNKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAG SNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTR CEEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNK KEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVH CSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVE AQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQ RLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESE HDSDESSDDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQ MIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEGKQTYGDIEVDLKDTDKS STYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVK QKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVV DIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQE DKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEH SVNGPASPALNQGS
6	HLA-DR Uniprotの 識別子P01903、 1986年7月21日 時点の バージョン 番号1：	MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMFDF DGDEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASFEAQGALANIAVDKANLEIMT KRSNYTPITNVPPEVTVLTNSPVELREPNVLICFIDKFTPPVVNVTWLRNG KPVTTGVSETVFLPREDHLFRKFHYLPFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLL KHWEFDAPSPLPETTENVVCALGLTVGLVGIIIGTIFIIKGVRKSNAAERR GPL
7	ヒトTGFβ1 Uniprot番号： P36897 1994年6月1日 時点の バージョン 番号1	MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCV DGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCN DHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVIH HRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLKDLIYDMTTSGSGSGLPLLVQRTIARTIVLQ ESIGKGRFGEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRHEN LGFIAADNKDNGTWTQLWLVSDYHEHGSLFDYLNRYTVTVEGMIKLALST ASGLAHLHMEIVGTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVRHD ATDTIDIAPNHRVGTKRYMAPEVLDDSINMKHFESFKRADIYAMGLVFWE ARRCSIGGIHEDYQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKLRPNIPNRWQSCE ALRVMAKIMRECWYANGAARLTALRIKKTLSQLSQQEGIKM
8	ヒトVEGFA Uniprot番号： P15692 2001年11月16日 時点の バージョン 番号2	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVY QRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEES NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKQ QKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDP TCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
9	ヒト血小板由来 増殖因子 受容体α	MGTSHPAFLVLGCLLTGLSLILCQLSLPSILPNENEKVVQLNSSFSLRCFGES EVSWQYPMSEEESSDVEIRNEENNSGLFVTVLEVSSASAAHTGLYTCYYNH TQTEENELEGRHIYIYVPDPDVAFVPLGMTDYLVIVEDDDSAIIPCRTTDPET PVTLHNSEGVVPASYDSRQGFNGTFTVGPYICEATVKGKKFQTIPFNVYAL

SEQ ID NO.	説明	配列
	Uniprot番号：P16234、1990年4月1日時点のバージョン番号1	KATSELDLEMEALKTVYKSGETIVVTCAVFNNEVVDLQWTYPGEVKGKG TMLEEIKVPSIKLVYTLTVPEATVKDSGDYECAARQATREVKEMKKVTISV HEKGFIEIKPTFSQLEAVNLHEVKHFVVEVRAYPPPRISWLKNNLTLIENLT ITTDVEKIQEIRYRSKLKLIRAKEEDSGHYTIVAQNEDAVKSYTFELLTQVP SILDLVDDHHGSTGGQTVRCTAEGTPLPDIEWMICKDIKKCNNETSWTILA NVSNIITEIHSRDRSTVEGRVTFAKVEETIAVRCLAKNLLGAENRELKLVAP LRSELTVAAAVLVLLVIVIISLIVLVVIWKQKPRYEIRWRVIESISPDGHEYIY VDPMQLPYDSRWEFPRDGLVLGRVLGSGAFGKVVEGTAYGLSRSQPVMK VAVKMLKPTARSSEKQALMSELKIMTHLGPHLNIVNLLGACTKSGPIYIITE YCFYGDLVNYLHKNRDSFLSHHPEKPKKELDIFGLNPADESTRSYVILSFEN NGDYMDMKQADTTQYVPMLERKEVSKYSDIQRSLYDRPASYKKKSMLDS EVKNLLSDDNSEGLTLLDLLSFTYQVARGMEFLASKNCVHRDLAARNVLL AQGKIVKICDFGLARDIMHDSNYVSKGSTFLPVKWMAPESIFDNLYTTLSD VWSYGILLWEIFSLGGTPYPGMMVDSTFYNKIKSGYRMAKPDHATSEVYE MVKCWNSEPEKRPSFYHLSEIVENLLPGQYKKSYEKIHLDFLKSDHPAVAR MRVDSDNAYIGVTYKNEEDKLKDWEGGLDEQRLSADSGYIIPLPDIDPVPE EEDLGKRNRHSSQTSEESAIETGSSSSTFIKREDETIEDIDMMDDIGIDSSDLV EDSFL
10	ヒトAng-1 Uniprot番号：Q15389 1998年1月1日時点のバージョン番号2	MTVFLSFAFLAAILTHIGCSNQRRSPENSGRRYNRIQHGQCAYTFILPEHD GNCRESTTDQYNTNALQRDAPHVEPDFSSQKLQHLEHVMENYTQWLQ KLENYIVENMKSEMAQIQQNAVQNHTATMLEIGTSLLSQTAEQTRKLTD VETQVLNQTSRLEIQLLENSLSTYKLEKQLLQQTNEILKIHEKNSLLEHKI LEMEGKHKEELDTLKEEKENLQGLVTRQTYIIQELEKQLNRATTNNSVL QKQQLELMDTVHNLVNLCTKEGVLLKGGKREEEKPFRDCADVYQAGF NKSGIYTIYINNMPEPKKVFCNMDVNGGGWTVIQHREDGSLDFQRGWK EYKMGFGNPSGEYWLGNEFIFAITSQRQYMLRIELMDWEGNRAYSQYD RFHIGNEKQNYRLYLKGHTGTAGKQSSLILHGADFSTKDADNDNCMCK CALMLTGGWWFDACGPSNLNGMFYTAGQNHGKLNGIKWHYFKGPSYS LRSTTMMIRPLDF
11	ヒトHGF Uniprot番号：P14210 1991年8月1日時点のバージョン番号2	MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTL IKIDPALKIKTKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWF PFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQ PWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEVRYE VCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTPHRHKFLPE RYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMND TDVPLETTECIQGQGEGYRGTVNTIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENF KCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYR GNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYC RNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKT KQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR DLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLAR PAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYI MGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKM RMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS
12	PDGFBヒト Uniprot番号：P01127 1986年7月21日時点のバージョン番号1	MNRCWALFLSLCCYLRLVSAEGDPIPEELYEMLSDHSIRSFDDLQRLLHG DPGEEDGAELDLNMTRSHSGGELESLARGRRSLGSLTIAEPAMIAECKTR TEVFEISRRLIDRTNANFLVWPPCVEVQRCSGCCNNRNVQCRPTQVQLR PVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCETVAAARPVTRSPGGSQEQ RAKTPQTRVTIRTVRVRRPPKGKHRKFKHTHDKTALKETLGA

SEQ ID NO.	説明	配列
13	ヒトIL-10 Uniprot番号：P22301 1991年8月1日時点のバージョン番号1	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFS RVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQ AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAF NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

【実施例】
【０１２４】
実験実施例
1. 間葉系幹細胞を単離する前の臍帯組織の凍結保存
臍帯組織（臍帯は、母親のインフォームドコンセントを得て供与された）を、臍帯の羊膜から間葉系幹細胞をその後単離するために、以下のように処理した。
【０１２５】
1.1 臍帯組織試料の洗浄：
a. 外科用メスを保護カバーから外す。
b. 鉗子を用いて臍帯をしっかりと保持し、外科用メスを用いて臍帯を10 cm長の小片に切断する。未使用の臍帯は、元の組織カップに戻す。
c. 10 cm長の臍帯小片を新たな150 mm培養ディッシュに移す。150 mm培養ディッシュをカップの代わりに使用することもできる。
d. 150 mm培養ディッシュのカバーを、鉗子および外科用メスの置き場所として使用する。
e. 30 mlシリンジでPlasmalyte A（Baxter、カタログ# 2B2543Q）25 mlを取り出す。片手でシリンジを45°の角度に保持し、Plasmalyte Aを臍帯組織上に直接分注する。
f. 培養ディッシュをわずかな角度で保持しながら、30 mlシリンジおよび鈍針でPlasmalyte Aを除去する。
g. 使用済みのPlasmalyte Aを、廃物容器となる300 mlトランスファーバッグ中に収集し、それをバイオハザードゴミ箱中に処分する。
h. 必要に応じて各洗浄につき新たな培養ディッシュを用いて、洗浄手順を繰り返す。表面上の血塊がすべて除去されたことを確認する。組織の清浄化が必要である場合には、さらなるPlasmalyte Aを使用することができる。
i. 組織をラベル付きの新たな組織培養ディッシュに入れて、組織の切断を継続する。切断中に組織が乾燥しないように、20 mlのPlasmalyte Aをディッシュ中に入れる。
j. 臍帯を同等のおよそ1-cm切片になるよう切断し、合計で10個の切片とする。
k. 各1 cm切片を、切片当たりおよそ0.3 cm×0.3 cm～0.5 cm×0.5 cmのより小さな小片になるようさらに切断する。
l. ディッシュ中のPlasmalyte Aをすべて除去する。
m. 元のPlasmalyte Aバッグから30 mlシリンジでPlasmalyte A 25 mlを引き出しし、臍帯組織片上に直接分注する。
n. 培養ディッシュを斜めに保持して、組織の洗浄に使用したすべてのPlasmalyte Aを片側に収集し、シリンジおよび鈍針でそれを除去する。
o. 洗浄をもう一度繰り返す。いかなる血塊も残ってはならない。
【０１２６】
注記：臍帯を直ちに凍結しない場合には、凍結直前まで臍帯組織をPlasmalyte A中で維持する。
【０１２７】
1.2 臍帯組織の凍結保存：
a. 凍結保存溶液を調製する：
i. 60% Plasmalyte A、30%の5%ヒト血清アルブミン、および10%ジメチルスルホキシド（DMSO）からなる凍結溶液 50mlを調製する。
ii. 150 mlトランスファーバッグに「組織凍結溶液」のラベルを貼り、無菌技法を用いて血漿トランスファーセットをポートに取り付ける。
iii. 元のPlasmalyte Aバッグから30 mlシリンジでPlasmalyte A 30 mlを取り出し、溶液の作製日時と共に「組織凍結溶液」のラベルが貼られたトランスファーバッグ中に移す。
iv. 20 mlシリンジで15 mlの5%ヒト血清アルブミンを取り出し、それをラベル付きのトランスファーバッグ中に移す。
v. DMSO 5 mlをトランスファーバッグに添加する。

vi. 十分に混合し、凍結溶液の混合を記録する。
b. 凍結溶液を添加する前に、組織からPlasmalyte Aを除去する。
c. 60 mlシリンジを用いて、全50 mlの凍結溶液をシリンジ中に引き出し、臍帯組織を含む150 mm細胞培養ディッシュに凍結溶液およそ30 mlを添加する。鈍針をシリンジ上に取り付けて、それを無菌状態に保つ。
d. 組織および凍結溶液を含む培養ディッシュを10分間にわたって1分ごとに旋回させる。
e. 鉗子を用いて、ランダムに選択された切片8個を選び、それらを4本の4 mlクライオバイアルの各々に入れる。ランダムに選択された切片4個を選び、それらを1本の1.8 mlクライオバイアルに入れる。これらの切片は、血塊を含んではならない。
f. 臍帯組織を含む各クライオバイアルに、残っている凍結溶液を、4 mlチューブについては3.6 ml充填線まで、および1.8 ml Nuncバイアルについては1.8 ml線まで満たす。
g. Bactec Lytic/10 - Anaerobic/Fボトル1本およびBactec Pluc Aerobic/Fボトル1本に組織IDのラベルを貼る。
h. シリンジおよび鈍針で培養ディッシュから凍結溶液20 mlを取り出し、Bactecバイアルをアルコール綿で拭いた後、鈍針を18g針に交換し、好気性および嫌気性Bactecボトルにそれぞれ10 mlを接種する。
i. 制御速度フリーザーを起動する。
j. 制御速度フリーザーが完了した後、ユニットをさらなる使用時まで連続温度モニター付き液体窒素フリーザー中に置いておく。

【０１２８】

2. 臍帯組織からの間葉系臍帯ライニング幹細胞の単離

2.1. 臍帯組織からMSCを処理するための培地の調製：

a. PTT6（培養液／増殖培地） 500 mlを作製するため、以下のものを列挙されている順に添加する：
i. DMEM 250 ml
ii. M171 118 ml
iii. DMEM F12 118 ml
iv. FBS 12.5 ml（最終濃度2.5%）
v. EGF 1 ml（最終濃度10 ng/ml）
vi. インスリン0.175 ml（最終濃度5μg/ml）。

【０１２９】

構成成分i～viの上記の体積は、最終体積499.675 mlの培養液をもたらす。さらなる構成成分が培養液に添加されない場合、残りの0.325 ml（合計して500 mlの体積とするため）は、例えば、DMEM、M171、DMEM/F12、またはFBSのいずれかを意味する、構成成分i～ivのいずれかであってよい。あるいは、培養液の全体積が500 mlとなるように、EGFまたはインスリンの保存溶液の濃度を当然ながら調整することもできる。あるいは、ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシンなどの抗生物質の保存溶液を、最終体積500 mlとなるように添加することもできる。補充物質であるアデニン、ヒドロコルチゾン、および3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (T3) のうちの1つまたは複数を0.325 mlの体積で培養液に添加し、それによって全体積500 mlの培養液とすることも可能である。

【０１３０】

vii. ボトルに、培地の調製日、操作者のイニシャル、および「有効期限」という語句とそれに続く有効期限日と共に、「PTT6」のラベルを貼る。有効期限日は、構成成分のいずれかの最も早い有効期限日か、または調製日から1ヵ月後かの、いずれか早い方である。

【０１３１】

b. リンス培地（カルシウムおよびマグネシウム不含かつ5% FBS含有ハンクス緩衝塩類溶液 (HBSS)）を作製するため、50 ml遠心管中のHBSS 47.5 mlにFBS 2.5 mlを添加する。チューブに、操作者のイニシャルおよび培地の作製日と共に、「リンス培地」のラベルを貼る。

c. Bactec Lytic/10 - Anaerobic/F (Becton Dickinson & Company) およびBactec Plus + Aerobic/F (Becton Dickinson & Company) を用いて、すべての培地を無菌性について試験する。調製済みの培地20 mlを各ボトルに注入する。

【０１３２】

2.2 MSC回収のための臍帯組織の解凍：

a. 操作者がクリーンルーム内で試料を処理する準備ができた時点で、解凍を開始する。バイアルが同じドナーに由来する場合を除いて、一度に2本以上のバイアルを解凍してはならない。

b. ウォーターバスを消毒剤および続いて70%イソプロパノールで拭き、これを滅菌水1 Lで満たす。ウォーターバスを36～38℃まで加熱する。

c. クリーンルーム内のバイオセーフティキャビネット下で、70%～90% PlasmaLyte Aからなるリンス培地10 mlを調製する。10 mlシリンジに取り付けられた0.2-μmシリンジフィルターでこの溶液を滅菌濾過し、使用時まで溶液を冷蔵して維持する。

d. 50 mlコニカルチューブに処理ラベルを貼る。

e. ウォーターバス温度が36～38℃であることを確認する。

f. 液体窒素貯蔵から組織のバイアルを取り出し、滅菌水1 Lで満たされた37℃ウォーターバス内で迅速に解凍する。Mr. Frosty Nalgene Cryo 1℃凍結容器のバイアルホルダーは、バイアルを所定の位置に収めて浮遊し、試料を解凍する場合に浮遊ラックとして使用することができる。

g. ウォーターバスからバイアルを取り出し、それらに70%イソプロパノール溶液をスプレーする。ウォーターバスからバイアルを引き上げるのに適したタイミングは、バイアル中に小さな氷が浮いているのが見える時である‐バイアルの内部温度が37℃未満であることを示唆する。

h. バイアルをパススルーに置き、クリーンルーム処理技術者に知らせる。

【０１３３】

2.3 組織処理の準備：

a. 臍帯組織処理は、環境モニター (EM) クリーンルーム内で行わなければならない。各シフトの終了時には、部屋およびフードの完全な清掃を行う。

b. バイオセーフティキャビネットを準備／清掃する。

c. バイオセーフティキャビネット内での作業中は、生物粒子計数を行う。

d. 包装の破損および有効期限日についてそれぞれチェックしながら、必要な物品をすべてバイオセーフティキャビネット内に集める。シリンジ、血清用ピペット、滅菌鉗子、外科用メス、組織プレート、および針を取り扱う場合には、滅菌生成物と接触するであろう表面に決して触れないようにする。注射筒、管類、プランジャーチップ、および／または針のキャップもしくはケースの外部のみ、安全に取り扱ってもよい。表面に触れるか、または表面が非滅菌表面に触れた場合には、物品を廃棄する。

e. 使用するすべての試薬および物品のロット番号および有効期限日（該当する場合）を記録する。

f. 70%アルコールで湿らせたリントフリーワイプでバイアルを清浄化してから、バイオセーフティキャビネット内に移動させることにより、解凍バイアルを受け取る。

g. シリンジに装着した吸引用針を用いて、バイアルからできるだけ多くの液体を抜き取る。組織を吸引しないようにする。

h. 滅菌鉗子を用いて、組織を滅菌100 mmペトリ皿に移す。

i. 組織断片に一定分割量5 mlのリンス培地を添加する。

j. 内容物を15～30秒間旋回させ、次いでピペットまたは吸引針付きシリンジでリンス培地を除去する。このリンス過程を2回繰り返す。

k. 組織が乾燥しないように、リンス培地 2 mLを組織に添加する。

【０１３４】

2.4. 組織からのMSC増殖の開始：

a. 6ウェルプレートの底に、MSCロット番号または臍帯組織IDおよび増殖の開始日と共に

、「増殖1」のラベルを貼る。60 mm組織培養ディッシュを使用する場合には、ディッシュの底にグリッドを描いて、プレートを4つの区分に分割する。
b. 滅菌使い捨て鉗子を用いて、3×3 mm～5×5 mmの組織1個を各ウェルに入れる。60 mm組織培養ディッシュを使用する場合には、組織を各区分の中央に置いて組織を離しておく（互いに1 cm超）。
c. 各ウェルをPTT6 3 mlで満たす。
d. 30 mlシリンジに連結した吸引用針を用いて、組織をかろうじて覆う程度に十分な培地を抜き取る。プレートを傾けてはならない。吸引針でウェルの底を触れてはならない。
e. 倒立光学顕微鏡を用いて、細胞増殖を毎日観察する（24±6時間）。光学顕微鏡の代わりに、リアルタイム細胞培養イメージングシステムを使用してもよい。
f. 培地を毎日交換する。必ず使用前に培地を室温に平衡化する。
i. 培地を吸引除去する。
ii. PTT6 3 mlを添加する。
iii. 組織が培地中にかろうじて浸っている状態まで、吸引する。
g. 組織から細胞増殖が観察された時点で、プレートに「増殖2」のラベルを貼ることを除いて上記の4.a～4.eと同じ手順を用いて、組織を新たな6ウェルプレートに移す。PTT6 2 mlを各ウェルに添加することにより、「増殖1」プレート中の細胞増殖を維持する。集密度について毎日観察する。培地を2～3日ごとに置換する（必ず使用前に培地を室温に平衡化する）。
h. 「増殖2」プレート中で細胞増殖が観察された時点で、プレートに「増殖3」のラベルを貼ることを除いて段階4.a～4.eを繰り返す。PTT6 2 mlを各ウェルに添加することにより、「増殖2」プレート中の細胞増殖を維持する。集密度について毎日観察する。培地を2～3日ごとに置換する（必ず使用前に培地を室温に平衡化する）。
i. 「増殖3」プレート中で増殖が観察された時点で、組織を廃棄する。組織が非常に小さく、細胞増殖を妨げないようであれば、継代培養の際に組織を処分する。
j. 細胞が40～50%の集密度に達した時点で、細胞を毎日観察して過剰な増大を防ぐ。
k. 細胞が70～80%の集密度に達した時点で、細胞を継代培養する。細胞を80%の集密を超えるまで増大させてはならない。

【０１３５】

組織外植片のサイズが約1～3 mmであり、組織外植片／細胞の培養が175 mm角型培養ディッシュ中で行われる場合、外植片から回収される間葉系幹細胞の平均数は、典型的に細胞約4,000～6,000個／外植片である。よって、間葉系幹細胞を外植片48個から同時に増殖させる場合、約300,000個の細胞が回収時に得られ得る。外植片から収集されたこれら300,000個の間葉系幹細胞は次いで、以下の実施例2.5に記載されるように、175 cm^2細胞培養フラスコにそのような300,000個の細胞を播種することにより、継代培養に使用することができる（これは継代1代目と称され得る）。次いでこの継代1代目から得られた間葉系幹細胞を用いて、以下の実施例2.5に記載されるように、再度175 cm^2フラスコに播種し（継代2代目）、細胞を増大させることができる。継代1代目および継代2代目の両方から得られた細胞を凍結保存によって「バンク化」することができ、継代2代目後に得られた間葉系幹細胞がマスターセルバンクを表すと見なし、これは、以下の実施例2.7において説明されるように、例えばバイオリアクター中で間葉系幹細胞をさらに増大させるためのものとなる。

【０１３６】

<u>2.5. 細胞培養ディッシュ中でのMSCの継代培養</u>

a. バイオセーフティキャビネット内での作業中は、生物粒子計数を行う。使用前にすべての培地を室温に平衡化する。
b. 細胞増殖が約70～80%の集密度に達した時点で、細胞を継代培養する。
i. ペトリ皿からPTT6を除去する。
ii. カルシウムおよびマグネシウム不含HBSSでリンスする。
iii. 1×TrypLE-EDTA 0.2 mlを添加し、1～2分間旋回させる。

iv. ディッシュを30～45°傾けて、細胞が重力流により下方に移動できるようにする。プレートの側面を穏やかにタッピングして、脱離を促進させる。
v. PTT6 1 mlを添加する。ピペットで穏やかに上下させ、次いで細胞を15 ml遠心管に移す。各ウェルごとに清潔なピペットチップを使用する。全6ウェルからの細胞を単一の15 mlチューブ中にプールする。
vi. 1200 rpmで10分間遠心分離する。
vii. 上清を除去し、PTT6 5 mlで細胞を再懸濁する。
c. MSCを継代培養する。
i. 細胞懸濁液50μlを分取し、トリパンブルー排除アッセイによりTNCおよび生存率についてアッセイする。
ii. 血球計算盤を用いて細胞を計数する。細胞20～100個／区画を計数するよう予測する。数が100よりも多い場合には、元の試料を1:5に希釈し、血球計算盤を用いてトリパンブルー法を繰り返す。
iii. 生存細胞／mlおよび全生存細胞を計数する：
1. 生存細胞／ml = 生存細胞数×希釈係数×10^4
2. 全生存細胞 = 生存細胞数×希釈係数×全体積×10^4
iv. %生存率を計数する：
1. %生存率= 生存細胞数×100 /（生存細胞数 + 死細胞数）
v. 細胞懸濁液を1.0×10^6細胞／mlに希釈する：
1. 「X」体積 = 全生存細胞／10^6細胞／ml
2. 例えば、全生存細胞数が1.0×10^7個である場合；
3. 「X」= 10^7/10^6細胞／ml、すなわち10 mlであり、したがって、細胞懸濁液（5 mlである）に5 mlを添加することにより、全細胞体積を10 mlにする。
vi. 細胞懸濁液が10^6個／ml未満である場合には、各150 mmペトリ皿または175 cm^2フラスコに細胞2×10^6個を播種するのに必要な体積を決定する。
1. 細胞2×10^6個に対する体積 = 細胞2×10^6個÷生存細胞／ml
2. 例えば、生存細胞／mlが8×10^5細胞／mlである場合、細胞2×10^6個÷8×10^5細胞／ml、すなわち2.5 mlが必要である。
vii. MSCマーカー解析のために0.5 mlを取り分けておく。
viii. 細胞2×10^6個をPTT6 30 mlで各150 mmペトリ皿または175 cm^2フラスコに播種する。
ix. 接着、コロニー形成、集密について、3日ごとに観察する。細胞が40～50%の集密に達した時点で、細胞を毎日～2日ごとに観察して過剰な増大を防ぐ。細胞を80%の集密を超えるまで増大させてはならない。光学顕微鏡の代わりに、リアルタイム細胞培養モニタリングシステムを使用することができる。
x. 培地を2～3日ごとに置換する。
【０１３７】
<u>2.6 MSC細胞の凍結保存</u>
a. バイオセーフティキャビネット内での作業中は、生物粒子計数を行う。
b. 細胞が70～80%の集密に達した時点で、各150 mmペトリ皿または175 cm^2フラスコに対して1×TrypLE-EDTA 2 mlを用いて細胞を脱離させる。
i. ペトリ皿からPTT6を除去する。
ii. カルシウムおよびマグネシウム不含のHBSSまたはPBS 5 mlで洗浄する。
iii. 1×TrypLE-EDTA 2 mlを添加し、1～2分間旋回させる。
iv. ディッシュを30～45°傾けて、細胞が重力流により下方に移動できるようにする。ペトリ皿の側面を穏やかにタッピングして、脱離の促進を助ける。
v. PTT6 10 mlを添加して、TrypLEを不活性化する。十分に混合して、細胞塊を解離させる。
vi. パスツールピペットを用いて、細胞を15 ml遠心管に移す。
vii. 1200 rpmで10分間遠心分離する。

viii. 培地を吸引し、PTT6 10 mlで再懸濁する。
ix. 50μlを分取し、上記のように全生存細胞数および%生存率を決定する。細胞が凝集し始める可能性があるため、細胞計数は15分以内に行う必要がある。
c. 凍結保存用の細胞を調製する。
i. 細胞懸濁培地および凍結保存培地を調製し、細胞を凍結させる。
【０１３８】
2.7. Quantumバイオリアクター (Terumo BTC, Inc.) 中でのMSCの継代培養（増大）
Quantumバイオリアクターを用いてMSCを増大させることも可能である。Quantumバイオリアクター中で増大させるための出発細胞数は、1回の実行当たり2000～3000万個の細胞であるべきである。1回の実行当たりの典型的な収量は、回収時に3～7億個のMSCである。バイオリアクターは、製造業者のプロトコールに従って操作される。そのようにして得られた間葉系幹細胞は典型的に凍結保存され（以下を参照されたい）、ワーキング細胞バンクとなる。
【０１３９】
材料／試薬：
1. Quantum増大セット
2. Quantum廃液バッグ
3. Quantum培地バッグ
4. Quantumインレットバッグ
5. PTT6
6. PBS
7. フィブロネクチン
8. TrypLE
9. 3 mlシリンジ
10. グルコース試験紙
11. 乳酸試験紙
12. 60 ml細胞培養プレートまたはその同等物
13. 医療等級5% CO_2気体混合物
14. 50 mlコンビチップ
【０１４０】
装置：
1. バイオセーフティキャビネット
2. グルコース測定器（Bayer Healthcare／Ascensia Contour血糖測定器）
3. Lactate Plus (Nova Biomedical)
4. ヘッドを備えた蠕動ポンプ
5. 遠心分離機、Eppendorf 5810
6. 滅菌チューブコネクター
7. M4連続ピペッター
8. RFシーラー
【０１４１】
手順：
1. Quantumバイオリアクターの準備
a) Quantumバイオリアクターの事前準備
b) バイオリアクターのコーティング：
1) バイオセーフティキャビネット内でフィブロネクチン溶液を調製する。
1) 凍結乾燥フィブロネクチンを室温に順化させる（室温で≧15分）。
2) 滅菌蒸留水5 mlを添加する；旋回も撹拌もしてはならない。
3) 30分間かけてフィブロネクチンを溶液の状態にする。
4) 18g針を取り付けた10 mlシリンジを用いて、PBS 95 mlを含む細胞インレットバッグにフィブロネクチン溶液を移す。

2）バッグを「試薬」ラインに接続する。
3）気泡をチェックする（気泡は、「IC空気の除去」または「EC空気の除去」を使用することにより、およびインレット供給源として「洗浄」を使用することにより、除去することができる）。
4）バイオリアクターのコーティングのプログラムを開くまたは設定する（図1、段階3～5）。
5）プログラムを実行する。
6）プログラムを実行してバイオリアクターをコーティングしている間に、PTT6培地4Lの培地バッグを準備する。
7）滅菌チューブコネクターを用いて、培地バッグをIC培地ラインに接続する。
8）バイオリアクターのコーティング段階が完了した時点で、RFシーラーを用いて、フィブロネクチン溶液に使用した細胞インレットバッグを取り外す。
c）過剰なフィブロネクチンの洗浄除去
d）培地によるバイオリアクターの馴化
2．Quantumバイオリアクター中での細胞の培養
a）均一な懸濁液を用いた細胞の負荷および接着：
b）細胞の栄養補給および培養
1）培地流速を選択して細胞に栄養を補給する。
2）乳酸およびグルコースについて毎日サンプリングする。
3）乳酸レベルが上昇するにつれて、培地の流速を調整する。実際の最大の許容乳酸濃度は、細胞の由来元のフラスコ培養物によって規定される。十分なPTT6培地が培地バッグ中に入っているかを確認する。必要に応じて、PTT6培地バッグを新たなPTT6培地バッグと交換する。
4）流速が所望の値に達した時点で、乳酸レベルを8～12時間ごとに測定する。乳酸レベルが低下しない場合、または乳酸レベルが上昇し続ける場合、細胞を回収する。
3．Quantumバイオリアクターからの細胞の回収
a）乳酸濃度が低下しない時点で、乳酸およびグルコースについて最後にサンプリングした後、細胞を回収する。
b）細胞の回収：
1）滅菌チューブコネクターを用いて、TrypLE 100 mlで満たした細胞インレットバッグを「試薬」ラインに接続する。
2）十分なPBSがPBSバッグ中に入っていることを確かめる。そうでない場合には、滅菌チューブコネクターを用いて、少なくとも1.7リットルのPBSが入った新たなバッグを「洗浄」ラインに接続する。
3）回収プログラムを実行する。
4．細胞の凍結保存
1）ひとたび細胞が回収されたならば、細胞を50 ml遠心管に移して、細胞をペレット化する。
2）冷細胞懸濁溶液25 mlを用いて再懸濁する。SysmexまたはBiorad細胞計数器を用いて、細胞を計数する。細胞数レポートを各Quantum処理バッチ記録に添付する。
3）細胞濃度を2×10^{7}個／mlに調整する。
4）等体積の凍結保存溶液を添加し、十分に混合する（振盪もボルテックスもしてはならない）。
5）連続ピペッターを用いて、凍結保存剤中の細胞懸濁液1 mlを各1.8 mlバイアル中に添加する。制御速度フリーザーを用いて、SOP D6.100 CB凍結保存に記載されているように、CRFプログラムを用いて凍結保存する。
6）バイアルを指定の液体窒素貯蔵スペース内に貯蔵する。
7）CRF実行レポートを各MSC P3-Quantum処理バッチ記録の用紙に添付する。
【０１４２】
3．異なる培養液を用いて臍帯組織から単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞集団におけ

る幹細胞マーカー発現の解析

フローサイトメトリー実験を実施して、臍帯から単離された間葉系幹細胞を間葉系幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105の発現について解析した。

【０１４３】

これらの実験のために、実施例2に記載されるように、3種の異なる培養液中で臍帯組織を培養することにより、間葉系幹細胞を臍帯組織から単離し、続いて各培地中で間葉系幹細胞を継代培養した。

【０１４４】

これらの実験において、以下の3種の培養液を使用した：a) 10% FBS (v/v) を補充した90% (v/v/ DMEM、b) 90% (v/v) CMRL1066および10% (v/v) FBSからなる、米国特許出願US2008/0248005および対応する国際特許出願WO2007/046775に記載されている培養液PTT-4（WO2007/046775のパラグラフ [0183] を参照されたい）、ならびにc) 本明細書においてその組成が記載される、本発明の培養液PTT-6。このフローサイトメトリー解析において、臍帯ライニング間葉系幹細胞 (CLMC) 集団の2つの異なる試料を、使用した3種の培養液の各々について解析した。

【０１４５】

フローサイトメトリー解析のために以下のプロトコールを使用した。

【０１４６】

材料および方法

機器名	会社名	シリアル名
BD FACS CANDO	BD	V07300367
倒立顕微鏡, CKX41SF	Olympus	4K40846
遠心分離機、 卓上用マイクロスピン	Biosan	010213-1201-0003

試薬リスト	会社名	カタログ番号
10 Xトリプシン	Biowest	X0930-100
10 X PBS	Lonza	17-517Q
DMEM	Lonza	12-604F
ウシ胎仔血清	GE healthcare	A11-151

抗体リスト	会社名	カタログ番号
ヒトCD73 精製 AD2 0.1mg	BD	550256
ヒトCD90 精製 5E10 1mL	BD	550402
ヒトCD105 精製 266 0.1mg	BD	555690
Alexa Fluor 647 ヤギ抗マウス IgG (H+L) *2 mg/mL*	BD	A21235

試薬名	組成
1 X PBS (1L)	10×PBS 100 ml + 滅菌蒸留H20 900 ml
1x PBA (50ml)	1×PBS 49.5 ml + FBS 0.5 ml

【０１４７】

手順

a) 臍帯ライニング膜からの細胞の単離および培養

1. 実施例2で説明されているように、外植片組織試料を細胞培養プレート内でインキュベートし、各培地中に浸漬させ、次いで37℃のCO_2インキュベーター内でこれを維持した。

2. 3日ごとに培地を交換した。

3. 組織培養外植片からの細胞増殖を光学顕微鏡下でモニターした。

4. 約70%の集密の時点で、細胞をトリプシン処理（0.0125%トリプシン／0.05% EDTA）によってディッシュから分離し、フローサイトメトリー実験に使用した。

b) 実験用の細胞のトリプシン処理

1. 細胞培養プレートから培地を除去する。

2. FBSはトリプシンの酵素作用を妨げるため、滅菌1×PBSで穏やかにリンスして微量のFBSを除去する。

3. 1Xトリプシンを細胞培養プレートに添加し、37℃で3～5分間インキュベートする。

4. 顕微鏡下で細胞を観察して、それらが除去されたことを確実にする。FBSを含有する完全培地（10% FBSを含むDMEM）を添加することにより、トリプシンを中和する。

5. ピペットを使用して、培地中でプレートの壁に対して細胞をピペッティングすることによって細胞塊を破壊する。細胞懸濁液を収集し、50 ml遠心管に移す。

6. 滅菌1×PBSをプレートに添加しこれをリンスし、細胞懸濁液を同じ遠心管に収集する。

7. これを1800 rpmで10分間遠心分離する。

8. 上清を廃棄し、細胞ペレットをPBA培地で再懸濁する。

c) 細胞の計数

1. 好ましくは血球計算盤およびそのカバーガラスを70%エタノールで洗浄し、乾燥させてからキムワイプ（リントフリー紙）で拭くことにより、それらが清潔でかつ乾燥していることを確実にする。

2. 懸濁状の少量の細胞を微量遠心管に分取し、BSCフードから取り出す。

3. 等体積のトリパンブルーで懸濁状の細胞を染色する、例えば、懸濁液500μlに対してトリパンブルー500μlを添加する（希釈係数 = 2X、0.2%トリパンブルー溶液となる）。

4. トリパンブルーは毒性であり、非生存細胞の増加につながり、偽細胞数を生じるため、細胞をトリパンブルーに30分よりも長く曝露しないようにする。

5. 細胞懸濁液混合物20μlを血球計算盤の各チャンバーに添加し、光学顕微鏡下で見る。

a. 上部および下部チャンバー内の合計8つの区分について、血球計算盤の各区分内の生存細胞（明るい細胞；非生存細胞は容易にトリパンブルーを取り込み、したがって色が濃い）の数を計数する。全細胞数は、（平均細胞数／区分）×10^4細胞／mlとして与えられる。

d) 細胞の染色

i. 細胞を染色する前の準備

・それぞれ50,000個の細胞を含有する細胞懸濁液を、2つ組で3本のチューブ（CD73、CD90、CD105）および2本のチューブ（陰性対照）に分取する。

ii. 一次抗体（Ab）による染色

・一次抗体1μl [0.5 mg/ml Ab] を細胞懸濁液100 ulに添加する、4℃で45分間インキュベートする。

・PBAで1 mlに合わせる。

・8000 rpm、4℃で5分間遠心分離する。

・上清を除去する。

・PBA 1 mlを添加し、ペレットを再懸濁する。

・8000 rpm、4℃で5分間遠心分離する。

・上清を除去する。

・PBA 100 ul中に再懸濁する。

iii. 二次Abによる染色－暗下で

・二次抗体1 ul [0.5 mg/ml ab] を細胞懸濁液100 ulに添加する、4℃で30分間インキュベートする。

・PBAで1 mlに合わせる。

・8000 rpm、4℃で5分間遠心分離する。

・上清を除去する。

・PBA 1 mlを添加し、ペレットを再懸濁する。

・8000 rpm、4℃で5分間遠心分離する。

・上清を除去する。
・フローサイトメトリー解析のために、PBA 200～300 ul中に再懸濁する。
・BD FACS CANDOフローサイトメトリーで読み取るために、細胞をFACSチューブに移す。

【０１４８】

フローサイトメトリー解析の結果を図6a～図6cに示す。図6aは、DMEM/10% FBS中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現する、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示し、図6bは、PTT-4中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現する、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示し、ならびに図6cは、PTT6-中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現する、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞の割合を示す。図6aからわかるように、培養液培養としてDMEM/10% FBSを用いて単離された集団は、約75% CD73+細胞、78% CD90+細胞、および80% CD105+細胞（2つの実験の平均値）を有するのに対して、PTT-4培養液を用いて臍帯組織を単離／培養した後の（図6bを参照されたい）、CD73陽性、CD90陽性、およびCD105陽性である間葉系幹細胞の数は、2つの実験の平均値で約87%（CD73+細胞）、93% /CD90+細胞）、および86%（CD105+細胞）である。本発明のPTT-6培地中で培養することによって得られた間葉系幹細胞集団の純度は、3つすべてのマーカー（CD73、CD90、CD105）について少なくとも99.0%であり、このことは、この細胞集団の純度が、PTT-4培地またはDMEM/10% FBSを用いた培養の場合よりも有意に高いことを意味する。加えて、およびさらにより重要なことには、PTT-6中で培養することによって得られた間葉系幹細胞集団は、本質的に100%純粋でかつ明確な幹細胞集団である。これにより、本発明の幹細胞集団は、幹細胞ベースの療法の理想的な候補となる。したがって、間葉系臍帯ライニング幹細胞のこの集団は、そのような幹細胞ベースの治療アプローチの至適基準になり得る。

【０１４９】

図6に示される知見は、図7aおよび図7bに示されるフローサイトメトリー解析の結果によってさらに裏付けられる。図7aは、PTT-6培地中で臍帯組織から単離し培養した後の、幹細胞マーカーCD73、CD90、およびCD105を発現し、かつCD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている、単離された間葉系臍帯ライニング幹細胞（臍帯の羊膜の間葉系幹細胞）の割合を示す。図7aに示されるように、間葉系幹細胞集団は97.5%の生存細胞を含有し、そのうちの100%がCD73、CD90、およびCD105の各々を発現するのに対して（「CD73+CD90+」および「CD73+CD105+」の列を参照されたい）、幹細胞集団の99.2%がCD45を発現せず、かつ幹細胞集団の100%がCD34およびHLA-DRを発現しなかった（「CD34-CD45-」および「CD34-HLA-DR-」の列を参照されたい）。したがって、PTT-6培地中で培養することによって得られた間葉系幹細胞集団は、間葉系幹細胞が細胞療法に使用されることを実現させるための基準（幹細胞集団の95%またはそれ以上がCD73、CD90、およびCD105を発現する一方で、幹細胞集団の98%またはそれ以上がCD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている、Sensebe et al.「Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review」、前記を参照されたい）を満たす、本質的に100%純粋でかつ明確な幹細胞集団である。本明細書において、本発明の羊膜の間葉系幹細胞が標準的な培養条件においてプラスチックに対して接着性であり、インビトロで骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨芽細胞に分化し、米国特許第9,085,755号、米国特許第8,287,854号、またはWO2007/046775を参照されたい、したがって細胞療法における間葉系幹細胞の使用に関して一般に許容される基準を満たすことが留意される。

【０１５０】

図7bは、CD73、CD90、およびCD105を発現し、かつCD34、CD45、およびHLA-DRの発現を欠いている、単離された骨髄間葉系幹細胞の割合を示す。図7bに示されるように、骨髄間葉系幹細胞集団は94.3%の生存細胞を含有し、そのうちの100%がCD73、CD90

、およびCD105の各々を発現するのに対して（「CD73+CD90+」および「CD73+CD105+」の列を参照されたい）、骨髄幹細胞集団の62.8%のみがCD45の発現を欠き、かつ幹細胞集団の99.9%がCD34およびHLA-DRの発現を欠いていた（「CD34-CD45-」および「CD34-HLA-DR-」の列を参照されたい）。したがって、間葉系幹細胞の至適基準であると見なされる骨髄間葉系幹細胞は、本出願の（臍帯の羊膜の）間葉系幹細胞集団よりも、幹細胞マーカーに関して均一性／純度がはるかに低い。この知見から、本発明の幹細胞集団が、幹細胞ベースの療法の理想的な候補となり得、幹細胞ベースの治療アプローチの至適基準になり得ることもまた示される。

【０１５１】

本発明の間葉系幹細胞集団がHypoThermosol（商標）中で輸送／貯蔵され得ることを示す実験:

異なる貯蔵または輸送担体中の本明細書に記載される間葉系幹細胞の健常性および生存率を解析するために、2つの異なる担体を互いに比較した。すなわち、担体HypoThermosol（商標）-FRSを担体PlasmaLyte-Aと比較した。両方とも市販されている。HypoThermosol（商標）-FRSの製品シートは図30に示され、その組成は本明細書の他所に記載される。PlasmaLyte各100 mLは、526 mgの塩化ナトリウム、USP (NaCl)；502 mgのグルコン酸ナトリウム ($C_6H_{11}NaO_7$)；368 mgの酢酸ナトリウム三水和物、USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$）；37 mgの塩化カリウム、USP (KCl)；および30 mgの塩化マグネシウム、USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) を含有する。PlasmaLyteは抗菌剤を含有しない。PlasmaLyteのpHは、水酸化ナトリウムで7.4（6.5～8.0）に調整される。

【０１５２】

比較のための実験設定を図8に示す。最初に、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を細胞培養フラスコ中で増殖させた。生存間葉系幹細胞の数を計数し、次いで細胞200万個／バイアルを、PlasmaLyte-A中またはHypoThermosol（商標）-FRS中のいずれかで様々な期間貯蔵した。貯蔵後、1～5日目に毎日、≦50μlの試料で細胞を計数し（液体取り出し総量250μl）、細胞をトリパンブルーで染色することにより生存率を調べた。さらに、1日目、3日目、および5日目に、≦80μlの試料を採取し解析した。加えて、上清を得て凍結した。次いで、PDGF-AA、PDGF-BB、VEGF、IL-10、Ang-1、HGF、およびTGFβ1を、FLEXMAP 3Dシステムにより測定した。

【０１５３】

図9は生存率データを要約する。左側のグラフからわかるように、HypoThermosol（商標）中での貯蔵の7日後に、貯蔵を開始した全細胞（約95%）の73%がなお生存可能であった。それに反して、PlasmaLyte-A中での7日間の貯蔵後には、貯蔵を開始した全細胞（約94%）の42%のみがなお生存可能であった。計数はすべて、互いに10%以内である2つ組の読み取り値に基づいた（SOP CR D2.600.1に従う）。計数中、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、滑らかでかつ明確な輪郭を有して、著しくより小さかった。対照的に、Plasmalyte-A中の細胞は様々なサイズで出現した。HypoThermosol（商標）は、1週間の期間（6日間）にわたって、膜の完全性およびおそらくは生存を著しく支持する。同様の結果はまた、右側のグラフにおいても示される。

【０１５４】

図10は、細胞の細胞直径を測定した際に得られた結果を示す。HypoThermosol（商標）中で維持された場合の本明細書に記載される間葉系幹細胞集団は、PlasmaLyteA中で維持された細胞と比較して、直径範囲がより狭い。比較は3日間の貯蔵後に行った。

【０１５５】

図11は、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、貯蔵の48時間後の上清中のTGFβ1濃度を示す。右側のグラフからわかるように、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合とPlasmaLyte-A中で貯蔵された場合とでは、細胞はほぼ同量のTGFβ1を分泌する。一般的に、時間経過と共に、分泌されるTGFβ1の量は減少した（右側のグラフ）。

【０１５６】

図12および13は対照実験を示す。ここでは、PDGF-BBおよびIL-10濃度を、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中で測定した。PDGF-BBもIL-10も、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団によって通常分泌されないため、PDGF-BBもIL-10も、いずれの試料においても検出可能ではなかった。

【０１５７】

図14は、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中のVEGF濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目に、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された場合にほぼ同量のVEGFを分泌する。1日目および5日目には、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのVEGFを分泌した。注目すべきことには、3日間貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、より多くのVEGFを分泌した。したがって、貯蔵の3日後、HypoThermosol（商標）はPlasmaLyte-Aよりも優れている。より多くのVEGFが検出されればされるほど、培養物はより健常である。したがって、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中での3日間の貯蔵後に、より多くのVEGFを分泌することによって、細胞はPlasmaLyte-A中よりもHypoThermosol（商標）中でより健常である。5日間の貯蔵以降は、PlasmaLyteがより有利な担体になると考えられるが、それは、5日の時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのVEGFを分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるVEGFの量は減少した（右側のグラフ）。

【０１５８】

図15は、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中のPDGF-AA濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目に、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合と比較して、ほぼ同量のPDGF-AAを分泌する。1日目および5日目には、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのPDGF-AAを分泌した。注目すべきことには、3日間貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、より多くのPDGF-AAを分泌した。したがって、貯蔵の3日後、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞よりもより健常である。5日間の貯蔵以降は、PlasmaLyteがより有利な担体になると考えられるが、それは、5日の時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのPDGF-AAを分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるPDGF-AAの量は減少した（右側のグラフ）。

【０１５９】

図16は、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、48時間の上清中のAng-1濃度を示す。右側のグラフからわかるように、細胞は、0日目および3日目に、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された場合にほぼ同量のAng-1を分泌する。5日目に、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのAng-1を分泌した。注目すべきことには、1日貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、はるかにより多くのAng-1を分泌した。したがって、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりも、3日間の貯蔵までは少なくとも48時間にわたって、より健常であると考えられる。5日間の貯蔵以降は、PlasmaLyteがより有利な担体になると考えられるが、それは、この時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのAng-1を分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるAng-1の量は減少した（右側のグラフ）。

【０１６０】

図17は、HypoThermosol（商標）またはPlasmaLyte-A中で貯蔵された本明細書に記載される間葉系幹細胞集団からの、貯蔵の48時間後の上清中のHGF濃度を示す。右側のグ

ラフからわかるように、細胞は、0日目に、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合と比較して、ほぼ同量のHGFを分泌する。3日目および5日目には、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合に、より多くのHGFを分泌した。注目すべきことには、1日貯蔵された場合、細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された場合よりもHypoThermosol（商標）中で貯蔵された場合に、はるかにより多くのHGFを分泌した。したがって、HypoThermosol（商標）中で貯蔵された細胞は、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞よりも、3日間の貯蔵までは少なくとも1日（48時間）の間、より健常であると考えられる。3日以降は、PlasmaLyte-Aがより有利な担体になると考えられるが、それは、3日および5日の時点で、PlasmaLyte-A中で貯蔵された細胞がより多くのHGFを分泌したからである。一般的に、時間経過と共に、分泌されるHGFの量は減少した（右側のグラフ）。

【０１６１】

上記のデータから要約すると、HypoThermosol（商標）中での本発明の間葉系幹細胞集団の貯蔵は、特に最初の3日間の貯蔵に関して、PlasmaLyte-A中での貯蔵よりも優れていると結論づけることができる。

【０１６２】

ブタの局所処置によって、本発明の間葉系幹細胞集団が創傷治癒特性を有することを示す実験:

10週齢の雌のヨークシャー・ランドレースブタ (50 kg) を用いて、前臨床試験もまた行った。処置は、シンガポールのSingHealth Experimental Medicine Centreで行われた。ブタを120 mg/kgストレプトゾトシンを用いて糖尿病にし、45日間回復させてから、それらの背中に5 cm×5 cmの全層創傷を6個作製した（図18を参照されたい）。ブタ (n = 2) を、1 cm^2当たり10^5個の本明細書に記載されるヒト間葉系幹細胞集団で、週に2回、4週間にわたって処置した。2匹の対照ブタはPBSで処置した。術後0日目（PO 0日目）、および術後35日目まで7日ごとに、創傷を撮影した。創傷を、ImageJによって表面積サイズについて解析した。35日目までに、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団の添加により、PBS処置された対照創傷の12個中3個のみ (25%) と比較して、12個中10個の糖尿病性創傷 (83%) が閉鎖した。創傷治癒の速度は、対照動物における0.6 cm^2／日と比較して、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を用いて0.8 cm^2／日であり、33%の改善であった。本試験の結果を図18に要約する。

【０１６３】

ブタモデルは自然発生的ではないが、皮膚構造はヒトに最も酷似している。このデータにより、本発明の臍帯ライニング間葉系幹細胞集団が、重篤な有害副作用のリスクなしに創傷治癒を改善することが示唆される。したがってこれらのデータにより、本明細書に記載されるヒト臍帯ライニング間葉系幹細胞集団が、炎症を抑制し、血管新生を促進することによって、慢性創傷の治癒を促進することができるという仮説が強く支持される。さらに、異種間葉系幹細胞をマウスまたはブタのいずれに使用しても、炎症の徴候は明らかに存在せず、したがって、同種間葉系幹細胞がヒトにおいて任意の重篤な有害作用をもたらす可能性は非常に低い。

【０１６４】

本明細書に記載される間葉系幹細胞がヒトの局所処置において有効であることを示す実験：

本明細書に記載される間葉系幹細胞がヒトの局所処置において有効であることを示す実験は、WO 2007/046775に記載されている。特に、WO 2007/046775の実施例23～26に説明されているように、臍帯の羊膜の間葉系幹細胞 (UCMC) は、全層性熱傷（実施例23）、部分層創傷（実施例24）、非治癒性の放射線創傷（実施例25）、ならびに非治癒性の糖尿病性創傷および非治癒性の糖尿病性足創傷（実施例26）を緩和することができた。注目すべきことには、WO 2007/046775の実施例2に従って、間葉系幹細胞はPTT-4培地中に再懸濁された。

【０１６５】

注目すべきことには、図6bおよび図6cにおいて示されるように、PTT6（本明細書で使

用された）培養液を使用した場合の培養によって得られた幹細胞集団は、PTT4培地（WO 2007/046775において使用された）を使用することによって得られた細胞の集団よりも、顕著により均一である。WO 2007/046775の実施例23～26では、PTT-4が間葉系幹細胞のための培地として使用されたため、PTT-6（本明細書で使用された）中での培養後に単離された、さらにより均一な間葉系幹細胞集団が、全層性熱傷、部分層創傷、非治癒性の放射線創傷、ならびに非治癒性の糖尿病性創傷および非治癒性の糖尿病性足創傷などの創傷治癒適用において同様の有益な効果を有することは明らかである。

【０１６６】

本明細書に記載される間葉系幹細胞がヒトの局所処置において有効であることを示す実験：

これは、Aurora, ColoradoのUniversity of Colorado Anschutz Medical Campusにおいて行われた、本明細書に記載されるように得られた間葉系幹細胞集団の漸増用量の計画試験である。本試験の目的は、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団（ヒト臍帯ライニング間葉系幹細胞）の安全な用量を決定することである。これは、3つの用量レベルのそれぞれに5名の被験者を登録して合計15名の被験者を対象とする、単一施設の用量漸増試験である。患者5名の第1群は、MSC 100,000個／cm^2（皮膚／創傷領域）を8週間にわたって週に2回受ける。患者5名の第2群は、MSC 300,000個／cm^2を8週間にわたって週に2回受ける。患者5名の第3群は、MSC 500,000個／cm^2を8週間にわたって週に2回受ける。このスケジュールは、最高用量に到達するまで、または用量レベルにおける少なくとも2名の被験者が、本明細書において得られた間葉系幹細胞集団に関連していると疑われる≧グレード2のアレルギー反応を起こすか、または用量レベルにおける2名もしくはそれ以上の被験者が、本明細書に記載されるように得られた間葉系幹細胞集団の初回用量後14日以内に、予期せぬ、処置に関連した重篤な有害事象もしくは用量制限毒性を経験するまで、継続される。患者全員を、処置の30日後に、抗HLA抗体の産生および創傷閉鎖について評価する。現時点では、HLA抗体の産生が特定の用量の絶対的な禁忌であると見なしてはいないが、それは安全性の総合的な評価の要因となる。これは非盲検試験であり、すべての被験者が試験薬を服用し、すべての試験担当者はそれぞれの被験者が受ける用量を知ることになる。本試験の二次エンドポイントは、創傷の状態の有意な改善である。このエンドポイントは、Silhouette Wound Measurement and Documentation Systemを使用して測定された創傷閉鎖の速度、創傷面積が順調に閉鎖された割合、および創傷が完全に閉鎖された割合に基づいている。この装置は、この目的のためにFDAによって承認されている。

【０１６７】

被験者集団

少なくとも30日間の従来の治療の後でも治癒していない慢性足部潰瘍を伴うI型またはII型糖尿病患者で、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団に対するHLA抗体について陰性である患者。患者は、登録時に開始される最初の2週間は従来の創傷治処置を継続し、その時点で既に、30日間治癒していない糖尿病性足部潰瘍のスクリーニングを受けている。この時点で、創傷パラメータの写真記録および測定を開始する。最初の2週間は、従来のドレッシング材交換を週に2回行い、その後、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団を、指定された濃度で週に2回創傷に適用する。本明細書に記載される間葉系幹細胞集団で処置した創傷はまた、Tegaderm（登録商標）およびクレープドレッシング材で覆う。

【０１６８】

用量レベル

本試験の目的は、さらなる試験のために、本明細書に記載されるヒト臍帯ライニング間葉系幹細胞の安全な用量を決定することである。患者を、3つの用量：細胞100,000個／1cm^2の皮膚／創傷部位、細胞300,000個／cm^2、または細胞500,000個／cm^2のうちの1つで、8週間にわたって週に2回処置する。それぞれ細胞100,000個の用量は、HypoThermosol中に細胞100万個／mlを含むバイアルからの、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団0.1 mlを表す。

【０１６９】

投与計画

これは、本明細書に記載される間葉系幹細胞の漸増用量の安全性および忍容性試験である。本試験の目的は、さらなる試験のために、本明細書に記載されるヒト臍帯ライニング間葉系幹細胞の安全な用量を決定することである。3つの用量レベルのそれぞれに5名の被験者を登録する。患者5名の第1群は、MSC 100,000個／1 cm^2の皮膚／創傷部位を8週間にわたって週に2回受ける。患者5名の第2群は、MSC 300,000個／cm^2を8週間にわたって週に2回受ける。患者5名の第3群は、MSC 500,000個／cm^2を8週間にわたって週に2回受ける。このスケジュールは、最高用量に到達するまで、または用量レベルにおける少なくとも2名の被験者が、本明細書に記載される間葉系幹細胞に関連していると疑われる≧グレード2のアレルギー反応を起こすか、または用量レベルにおける2名もしくはそれ以上の被験者が、本明細書に記載される間葉系幹細胞集団の初回用量後30日以内に、予期せぬ、処置に関連した重篤な有害事象もしくは用量制限毒性を経験するまで、継続される。患者全員を、処置の30日後に、抗HLA抗体の産生および創傷閉鎖の程度について評価する。現時点では、HLA抗体の産生が特定の用量の絶対的な禁忌であると見なしてはいないが、それは安全性の総合的な評価の要因となる。これは非盲検試験であり、すべての被験者が試験薬を服用し、すべての試験担当者はそれぞれの被験者が受ける用量を知ることになる。

【０１７０】

投与経路

本明細書に記載される間葉系幹細胞集団は、創傷清拭した糖尿病性足部潰瘍に局所適用し、Tegaderm（登録商標）包帯によって所定の位置に保持する。

【０１７１】

投与手順

必要に応じて適切な創傷清拭の後に、患者を腹臥位にし、罹患した脚を90°の角度で曲げる。本明細書に記載される間葉系幹細胞集団のこのバイアルを、細胞の均等な分布を確実にするために穏やかに旋回させる。次いで、滅菌シリンジを用いてバイアルから1 cm^2当たり100,000個 (0.1 ml)～500,000個 (0.5 ml) の細胞を取り出し、それを創傷の中心に配置することにより、高くした足を処置する。次いで、創傷をTegaderm（登録商標）膜で密封し、細胞を均一に分布させるために優しくマッサージする。細胞が定着して付着するように、足を高い状態で5分間維持する。次いで、Tegaderm（登録商標）ドレッシング材を覆うように、足にクレープ包帯を巻く。

【０１７２】

本発明は、以下の項目によってさらに特徴づけられる。

1. i) トロロックス、
ii) Na^+、
iii) K^+、
iv) Cl^-、
v) $H_2PO_4^-$、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む液体担体と接触させた幹細胞集団を輸送する段階を含む、幹細胞集団を輸送する方法。

2. 輸送が約7日またはそれ未満にわたって行われる、項目1の方法。

3. 輸送が約6日、約5日、約4日、約3日、約2日、約1日、または約1日未満にわたって行

われる、項目1または2の方法。
4. 輸送が約48時間もしくは約24時間またはそれ未満にわたって行われる、前記項目のいずれか一つの方法。
5. 輸送が約-5℃～約15℃の温度で行われる、前記項目のいずれか一つの方法。
6. 輸送が約2℃～約8℃の温度で行われる、前記項目のいずれか一つの方法。
7. 輸送が、約-5℃を超える、約-10℃を超える、約-15℃を超える、または約-20℃を超える温度で実施される、前記項目のいずれか一つの方法。
8. 幹細胞集団が、担体1 ml当たり約7000万個の細胞、担体1 ml当たり約6000万個の細胞、担体1 ml当たり約5000万個の細胞、担体1 ml当たり約4000万個の細胞、担体1 ml当たり約3000万個の細胞、担体1 ml当たり約2000万個の細胞、担体1 ml当たり約1000万個の細胞、担体1 ml当たり約500万個の細胞、担体1 ml当たり約400万個の細胞、担体1 ml当たり約300万個の細胞、担体1 ml当たり約200万個の細胞、担体1 ml当たり約100万個の細胞、担体1 ml当たり約50万個の細胞、担体1 ml当たり約10万個の細胞、または担体1 ml当たり細胞10万個未満の細胞の濃度で輸送される、前記項目のいずれか一つの方法。
9. 幹細胞集団が、担体1 ml当たり約1000万個の細胞から担体1 ml当たり約100万個の細胞の濃度で輸送される、項目8の方法。
10. 幹細胞集団が、胚性幹細胞集団、成体幹細胞集団、間葉系幹細胞集団、または誘導多能性幹細胞集団である、前記項目のいずれか一つの方法。
11. 幹細胞集団が、間葉系幹細胞集団である、前記項目のいずれか一つの方法。
12. 間葉系幹細胞集団が、臍帯の羊膜の単離された間葉系幹細胞集団である、前記項目のいずれか一つの方法。
13. 単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約90%またはそれ以上の細胞が、マーカーCD73、CD90、およびCD105の各々を発現する、項目11または12の方法。
14. 単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上の細胞が、CD73、CD90、およびCD105の各々を発現する、項目13の方法
15. 単離された間葉系幹細胞の少なくとも約90%またはそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、マーカーCD34、CD45、およびHLA-DR（ヒト白血球抗原‐抗原D関連）の発現を欠いている、項目11～14のいずれか一つの方法。
16. 幹細胞集団を、輸送前に担体と接触させる、前記項目のいずれか一つの方法。
17. 幹細胞集団を、その回収後に担体と接触させる、前記項目のいずれか一つの方法。
18. 幹細胞集団を、その回収の約0分後、約1分後、約5分後、約10分後、約30分後、約45分後、約60分後、またはそれより長い時間の後に、担体と接触させる、項目17の方法。
19. 回収が、幹細胞集団を培養液から分離することを含む、項目17または18の方法。
20. 分離が、培養液中の幹細胞を遠心分離し、かつ該培養液をデカントすることによって行われる、項目19の方法。
21. 接触が、幹細胞集団を、約7000万個／ml、約6000万個／ml、約5000万個／ml、約4000万個／ml、約3000万個／ml、約2000万個／ml、約1000万個／ml、約500万個／ml、約400万個／ml、約300万個／ml、約200万個／ml、約100万個／ml、約50万個／ml、約10万個／ml、または10万個未満の細胞の密度で担体中に懸濁することによって行われる、前記項目のいずれか一つの方法。
22. 接触が、幹細胞集団を約1000万個／mlの密度で担体中に懸濁することによって行われる、項目21の方法。
23. 担体と接触させた幹細胞が、約50 ml、約20 ml、約10 ml、約5 ml、約4 ml、約3 ml、約2 ml、約1 ml、約0.5 ml、約0.25 ml、または0.25 ml未満の担体の体積でバイアルに分取される、項目21または22の方法。

24. 担体と接触させた幹細胞が、約1 mlの量でバイアルに分取される、項目21または22の方法。
25. 担体が輸送培地または賦形剤である、前記項目のいずれか一つの方法。
26. 解凍または凍結段階を含まない、前記項目のいずれか一つの方法。
27. 担体が、双極性非プロトン性溶媒、特にDMSOを含まない、前記項目のいずれか一つの方法。
28. 輸送前の生存幹細胞の量と比較して、前記集団の幹細胞の多くても約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約10%未満が輸送中に死滅する、前記項目のいずれか一つの方法。
29. 幹細胞集団中の幹細胞の大部分が、輸送後に約9μm～約20μmの細胞直径を有する、前記項目のいずれか一つの方法。
30. 幹細胞集団中の幹細胞の大部分が、輸送後に約12μm～約16μmの細胞直径を有する、前記項目のいずれか一つの方法。
31. 輸送後に、幹細胞集団が輸送前とほぼ同量のTGFベータ-1を分泌する、前記項目のいずれか一つの方法。
32. PDGF-BBおよび／またはIL-10が、輸送前および／または輸送後に本質的に検出されない、前記項目のいずれか一つの方法。
33. 輸送後に、間葉系幹細胞集団が、輸送前とほぼ同量のVEGF、PDGF-AA、Ang-1、および／またはHGFを分泌する、前記項目のいずれか一つの方法。
34. 項目12～15のいずれか一項において規定される間葉系幹細胞集団を対象に局所投与する段階を含む、疾患を有する対象を処置する方法であって、間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約96時間以内に投与される、前記方法。
35. 間葉系幹細胞集団が、約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量で適用される、項目34の方法。
36. 間葉系幹細胞集団が、約1000万個の細胞の単位投与量で適用される、項目34または35の方法。
37. 間葉系幹細胞集団が、該間葉系幹細胞集団が回収された時点から約72時間以内に、約48時間以内に、約24時間以内に、約12時間以内に、約6時間以内に、またはそれ未満で適用される、項目34～36のいずれか一つの方法。
38. 疾患が皮膚疾患または創傷である、項目34～37のいずれか一つの方法。
39. 創傷が、熱傷、咬傷、外傷、手術、または疾患に起因する、項目38の方法。
40. 創傷が糖尿病に起因し、創傷が好ましくは糖尿病性創傷である、項目39の方法。
41. 創傷が糖尿病性足部潰瘍である、項目40の方法。
42. 約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量が、週に1回または2回投与される、項目34～41のいずれか一つの方法。
43. 約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞の単位投与量が、3週間、4週間、もしくは5週間、もしくは6週間、もしくは7週間、もしくは8週間、もしくは10週間、またはそれ以上の週の期間にわたって、週に1回または2回投与される、項目42の方法。
44. 間葉系幹細胞集団が局所的に適用され、かつフィルムまたは包帯で覆われる、項目34～43のいずれか一つの方法。
45. 間葉系幹細胞集団が細胞約1000個／cm^2～細胞約500万個／cm^2の投与量で適用される、項目34～44のいずれか一つの方法。
46. 間葉系幹細胞集団が、細胞約100,000個／cm^2、細胞約300,000個／cm^2、または細胞約500,000個／cm^2の投与量で適用される、項目34～45のいずれか一つの方法。

47. 間葉系幹細胞集団が、週に1回、2回、またはそれ以上の回数で適用される、項目34～46のいずれか一つの方法。
48. 間葉系幹細胞集団が、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、またはそれ以上にわたって適用される、項目34～47のいずれか一つの方法。
49. 間葉系幹細胞集団が、細胞約100,000個／cm^2、細胞約300,000個／cm^2、または細胞約500,000個／cm^2の投与量で、約8週間にわたって週に2回適用される、項目34～48のいずれか一つの方法。
50. 間葉系幹細胞集団を担体から分離した後、間葉系幹細胞集団が対象に投与される、項目34～49のいずれか一つの方法。
51. 間葉系幹細胞集団の担体からの分離が遠心分離を含む、項目50の方法。
52. 間葉系幹細胞集団の担体からの分離が、シリンジによってバイアルから細胞集団を取り出すことを含む、項目50および51の方法。
53. シリンジによって間葉系幹細胞集団を投与する段階を含む、項目34～52のいずれか一つの方法。
54. 項目12～15のいずれか一項において規定される間葉系幹細胞集団の約2000万個の細胞、約1500万個の細胞、約1000万個の細胞、約500万個の細胞、約400万個の細胞、約300万個の細胞、約200万個の細胞、約100万個の細胞、約50万個の細胞、約25万個の細胞、または25万個未満の細胞を含む、単位投与量。
55. 約1000万個、約900万個、約800万個、約700万個、約600万個、約500万個、約400万個、約300万個、約200万個、約100万個、約50万個、約25万個、または約10万個の細胞を含む、項目54の単位投与量。
56. 約1000万個の細胞を含む、項目54または55の単位投与量。
57. 約1000個の細胞～約500万個の細胞を含む、項目54～56のいずれか一つの単位投与量。
58.約100,000個の細胞、300,000個の細胞、または500,000個の細胞の投与量で適用される、項目54～57のいずれか一つの単位投与量。
59. 局所的に適用される、項目54～58のいずれか一つの単位投与量。
60. 1 cm^2当たりに局所的に適用される、項目54～59のいずれか一つの単位投与量。
61. 週に1回、2回、3回、またはそれ以上の回数で適用される、項目54～60のいずれか一つの単位投与量。
62. 1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、またはそれ以上にわたって適用される、項目54～61のいずれか一つの単位投与量。
63. 項目のいずれか一つの約100,000個の細胞、約300,000個の細胞、または約500,000個の細胞を含む単位投与量が、8週間にわたって週に2回適用される、項目54～62のいずれか一つの単位投与量。
64. 1 mlバイアル中に含まれる、項目54～63のいずれか一つの単位投与量。
65. バイアルの0.1 mlが適用される、項目64の単位投与量。
66. 細胞が、項目1において規定される液体担体と接触している、項目54～65のいずれか一つの単位投与量。
67. 細胞が、対象への投与前に遠心分離され単離される、項目54～66のいずれか一つの単位投与量。
68. 担体がHypoThermosol（商標）である、項目54～67のいずれか一つの単位投与量。
69. 細胞が生存細胞である、項目34～53のいずれか一つの方法および項目54～68のいずれか一つの単位投与量。
70. 担体がHypoThermosolである、項目1～33のいずれか一つの方法。
71. 幹細胞集団を輸送するための液体担体の使用であって、該液体担体が、
i) トロロックス、
ii) Na^+、

iii) K+、
iv) Cl-、
v) H2PO4-、
vi) HEPES、
vii) ラクトビオナート、
viii) スクロース、
ix) マンニトール、
x) グルコース、
xi) デキストラン-40、
xii) アデノシン、および
xiii)グルタチオン
を含む、前記使用。
72. 輸送が約7日またはそれ未満にわたって行われる、項目71の使用。
73. 輸送が約6日、約5日、約4日、約3日、約2日、約1日、または約1日未満にわたって行われる、項目71または72の使用。
74. 輸送が約48時間もしくは約24時間またはそれ未満にわたって行われる、前記項目71～73のいずれか一つの使用。
75. 輸送が約-5℃～約15℃の温度で行われる、前記項目71～74のいずれか一つの使用。
76. 輸送が約2℃～約8℃の温度で行われる、前記項目71～75のいずれか一つの使用。
77. 輸送が、約-5℃を超える、約-10℃を超える、約-15℃を超える、または約-20℃を超える温度で実施される、前記項目71～76のいずれか一つの使用。
78. 幹細胞集団が、担体1 ml当たり約7000万個の細胞、担体1 ml当たり約6000万個の細胞、担体1 ml当たり約5000万個の細胞、担体1 ml当たり約4000万個の細胞、担体1 ml当たり約3000万個の細胞、担体1 ml当たり約2000万個の細胞、担体1 ml当たり約1000万個の細胞、担体1 ml当たり約500万個の細胞、担体1 ml当たり約400万個の細胞、担体1 ml当たり約300万個の細胞、担体1 ml当たり約200万個の細胞、担体1 ml当たり約100万個の細胞、担体1 ml当たり約50万個の細胞、担体1 ml当たり約10万個の細胞、または担体1 ml当たり10万個未満の細胞の濃度で輸送される、前記項目71～77のいずれか一つの使用。
79. 幹細胞集団が、担体1 ml当たり約1000万個の細胞から担体1 ml当たり約100万個の細胞の濃度で輸送される、項目78の使用。
80. 幹細胞集団が、胚性幹細胞集団、成体幹細胞集団、間葉系幹細胞集団、または誘導多能性幹細胞集団である、前記項目71～79のいずれか一つの使用。
81. 幹細胞集団が、間葉系幹細胞集団である、前記項目71～80のいずれか一つの使用。
82. 間葉系幹細胞集団が、臍帯の羊膜の単離された間葉系幹細胞集団である、前記項目71～81のいずれか一つの使用。
83. 単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約90%またはそれ以上の細胞が、マーカーCD73、CD90、およびCD105の各々を発現する、項目81または82の使用。
84. 単離された間葉系幹細胞集団の少なくとも約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上の細胞が、CD73、CD90、およびCD105の各々を発現する、項目83の使用。
85. 単離された間葉系幹細胞の少なくとも約90%またはそれ以上、約91%またはそれ以上、約92%またはそれ以上、約93%またはそれ以上、約94%またはそれ以上、約95%またはそれ以上、約96%またはそれ以上、約97%またはそれ以上、約98%またはそれ以上、約99%またはそれ以上が、マーカーCD34、CD45、およびHLA-DR（ヒト白血球抗原‐抗原D関連）の発現を欠いている、項目81～84のいずれか一つの使用。
86. 幹細胞集団を、輸送前に担体と接触させる、前記項目71～85のいずれか一つの使用。
87. 幹細胞集団を、その回収後に担体と接触させる、前記項目71～86のいずれか一つの使用。

88. 幹細胞集団を、その回収の約0分後、約1分後、約5分後、約10分後、約30分後、約45分後、約60分後、またはそれより長い時間の後に、担体と接触させる、項目87の使用。
89. 回収が、幹細胞集団を培養液から分離することを含む、項目87または88の使用。

【０１７３】

本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示された本発明に対して種々の置き換えおよび修正を行うことができることは、当業者に容易に明白であろう。

【０１７４】

本明細書において言及されるすべての特許および出版物は、本発明が関連する当技術分野における当業者のレベルを示す。特許および出版物はすべて、個々の出版物が具体的にかつ個別に参照により組み入れられることが示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【０１７５】

本明細書において例示的に記載された発明は、本明細書において具体的に開示されていない任意の1つまたは複数の要素、1つまたは複数の制限の不在下で適切に行うことができる。したがって、例えば、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「含有する」等の用語は、包括的にかつ非限定的に読み取られるものとする。さらに、本明細書において使用される用語および表現は、限定の用語ではなく説明の用語として使用されており、そのような用語および表現の使用には、示されかつ説明された特徴またはその一部のいかなる等価物も除外する意図はなく、特許請求される本発明の範囲内で様々な修正が可能であることが認識される。したがって、本発明を好ましい態様および任意選択の特徴によって具体的に開示してきたが、本明細書において開示されているその中で具体化された発明の修正および変更が、当業者に委ねられてよいこと、ならびにそのような修正および変更が本発明の範囲内であると見なされることが理解されるべきである。本発明は、本明細書において幅広くかつ総称的に記載されている。総称的な開示の範囲内に入るより狭い種および亜属集団の各々もまた、本発明の一部を形成する。これには、除かれた題材が本明細書において具体的に挙げられているか否かにかかわらず、任意の主題を属から除外する条件付きのまたは負の限定を用いた本発明の総称的記載も含まれる。加えて、本発明の特徴または局面がマーカッシュ群の観点から記載されている場合、当業者は、本発明がまたそれにより、そのマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの観点からも記載されていることを認識するであろう。本発明のさらなる態様は、添付の特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【０１７６】

本明細書で用いられる場合、「約」という用語は、各値または範囲（pH、濃度、割合、モル濃度、アミノ酸の数、時間等）において、所与の値の5%まで、10%まで、15%まで、またはこれを含め20%までであってよい変動が存在し得ることを意味すると理解される。例えば、製剤が約5 mg/mlの化合物を含むとすると、これは、製剤が4～6 mg/ml、好ましくは4.25～5.75 mg/ml、より好ましくは4.5～5.5 mg/ml、およびさらにより好ましくは4.75～5.25 mg/mlを有してよく、最も好ましくは5 mg/mlであることを意味すると理解される。本明細書で用いられる場合、「X～Y」と規定される間隔は、「XとYとの間」と規定される間隔と同等と見なす。いずれの間隔も、上限およびまた下限を明確に含む。これは、例えば「5 mg/ml～10 mg/ml」または「5 mg/mlと10 mg/mlの間」という間隔は、5、6、7、8、9、および10 mg/ml、ならびに任意の所与の中間値の濃度を含むことを意味する。

【図面】

【図１－１】

Lonza

www.lonza.com
U.S. 科学サポート: 800-521-0390
scientific.support@lonza.com
EU/ROW 科学サポート +49-221-99199-400
scientific.support.eu@lonza.com
書類番号TS-12-604-3 08/11
© 2011 Lonza Walkersville, Inc.

ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)

製品使用

ダルベッコ改変イーグル培地は1969年に開発され、
基本培地イーグル（BME）の改変物であり、
これは以下の特徴によってBMEおよびMEMと異なる：

- ビタミンがMEMよりも4倍多い。
  ビタミンおよびアミノ酸がBMEよりも多い
- アミノ酸の種類および量がMEMおよびBMEよりも多い
- 鉄（硝酸第二鉄）

説明

12-604　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有
12-614　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含
12-707　1.0 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含
12-708　1.0 g/L グルコースおよび25 mM HEPES緩衝液含有、
L-グルタミン不含
12-709　4.5 g/L グルコースおよび25 mM HEPES緩衝液含有、
L-グルタミン不含
12-733　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含、
ピルビン酸ナトリウム不含
12-741　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、
ピルビン酸ナトリウム不含
12-914　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含、
ハイブリドーマ増殖の支持についてスクリーニング済み
12-917　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミンおよび
フェノールレッド不含
15-604　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、
ピルビン酸ナトリウム不含、粉末
15-614　4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミンおよび
ピルビン酸ナトリウム不含、粉末
（粉末製剤は、49.3 ml/L のNaHCO$_3$ 7.5%溶液または
3.70 g/L のNaHCO$_3$粉末の添加を必要とする）

早見表

	グルコース	L-グルタミン	フェノールレッド	HEPES緩衝液	ピルビン酸ナトリウム
12-604	4.5 g/L	+	+	-	+
12-614	4.5 g/L	-	+	-	+
12-707	1.0 g/L	-	+	-	+
12-708	1.0 g/L	-	+	+	+
12-709	4.5 g/L	-	+	+	+
12-733	4.5 g/L	-	+	-	-
12-741	4.5 g/L	+	+	-	-
12-914	4.5 g/L	-	+	-	+
12-917	4.5 g/L	-	-	-	+

本書における商標はすべて、Lonzaグループまたは
その子会社の商標である。

【図１－２】

Lonza

仕様

	無菌性	pH	浸透圧 (mOsm)	細胞増殖の促進（対照に対する%）	エンドトキシン (EU/ml)
12-604	陰性	7.0-7.4	324-352	≥75%	FIO
12-614	陰性	7.0-7.4	324-352	≥75%	FIO
12-707	陰性	7.0-7.4	306-346	≥75%	FIO
12-708	陰性	7.03-7.27	300-326	≥75%	FIO
12-709	陰性	7.0-7.4	321-351	≥75%	FIO
12-733	陰性	7.0-7.4	318-360	≥75%	FIO
12-741	陰性	7.0-7.4	318-360	≥75%	FIO
12-914	陰性	7.0-7.4	324-352	≥85% **	FIO
12-917	陰性	7.0-7.4	329-343	≥75%	FIO
15-604 ***	-	5.5-7.0	235-265	≥75%	≤1.0
15-614 ***	-	5.5-7.0	235-265	≥75%	≤1.0

FIO – 参考まで
** 機能試験の結果
*** 含水量 #1.0

貯蔵

2℃ ～ 8℃

製品使用上の注意

これらの製品は研究用途に限定される。
ヒトおよび動物への使用、ヒトおよび動物への応用、
ならびに臨床およびインビトロ手順における使用は
認められていない。

オーダー情報

カタログ番号	説明	サイズ
12-604F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有	500 ml
12-604Q	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有	1 L
12-614F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含	500 ml
12-614Q	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含	1 L
12-707F	DMEM、1.0 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含	500 ml
12-708F	DMEM、1.0 g/L グルコースおよび25 mM HEPES緩衝液含有、L-グルタミン不含	500 ml
12-709F	DMEM、4.5 g/L グルコースおよび25 mM HEPES緩衝液含有、L-グルタミン不含	500 ml
12-733F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含、ピルビン酸ナトリウム不含	500 ml
12-733Q	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、ピルビン酸ナトリウム不含	1 L
12-741F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、ピルビン酸ナトリウム不含	500 ml
12-914F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン不含、ハイブリドーマ増殖の支持についてスクリーニング済み	500 ml
12-917F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミンおよびフェノールレッド不含	500 ml
15-604D	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、ピルビン酸ナトリウム不含、粉末	1 x 10L
15-604F	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウム不含、粉末	1 X 50L
15-614D	DMEM、4.5 g/L グルコース含有、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウム不含、粉末	1 x 10L

本書における商標はすべて、Lonzaグループまたは
その子会社の商標である。

【図２】

Lonza

Lonza Walkersville, Inc.
www.lonza.com
biotechserv@lonza.com
技術サービス: 800-521-0390
書類番号 TS 12 615-2 11/08
Walkersville, MD 21793-0127 USA
© 2008 Lonza Walkersville, Inc.

ハムF12培地

製品使用

ハムF12培地は、ホルモンおよびトランスフェリンと組み合わせて
血清と共に使用された場合に、幅広い種類の
哺乳動物細胞およびハイブリドーマ細胞を
培養できるよう設計された栄養混合物である。

仕様

無菌性	pH	浸透圧 (mOsm)
陰性	7.07-7.40	286-305

細胞増殖の発生	エンドトキシン (EU/ml)
対照に対して≧75%	FIO

貯蔵

2℃ ～ 8℃

製品使用上の注意

これらの製品は研究用途に限定される。
ヒトおよび動物への使用、ヒトおよび動物への応用、
ならびに臨床およびインビトロ手順における使用は
認められていない。

オーダー情報

カタログ番号	説明	サイズ
12-615F	ハムF12培地、L-グルタミン含有	500 ml

本書における商標はすべて、Lonzaグループまたは
その子会社の商標である。

【図３】

Lonza

www.lonza.com
U.S. 科学サポート: 800-521-0390
scientific.support@lonza.com
EU/ROW 科学サポート: +49-221-99199-400
scientific.support.eu@lonza.com
書類番号 TS-12-719-3 08/11
© 2011 Lonza Walkersville, Inc.

DMEM: F12 (1:1) 培地

製品使用

ハムF12と組み合わせたDMEMは、標的組織に及ぼす
様々なホルモンおよび増殖因子の効果を実証するために、
広く使用されている。

説明

12-719 L-グルタミン、15 mM HEPES、および
3.151 g/L グルコース含有
15-719 粉末 - L-グルタミン、15 mM HEPES、
および3.151 g/L グルコース含有。
粉末培地は、16.0 ml/L の $NaHCO_3$、7.5%溶液
または1.2 g/L の $NaHCO_3$ 粉末の添加を必要とする
04-687 3.151 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、
HEPES不含

仕様

	無菌性	pH	浸透圧 (mOsm)
12-719	陰性	7.0-7.4	286-356
15-719*	陰性	4.5-6.5	260-290
04-687	陰性	FIO	FIO

	細胞増殖の促進	エンドトキシン (EU/ml)	水分
12-719	対照に対して≧75%	FIO	--
15-719*	対照に対して≧75%	≤ 1 EU/ml	≤ 2%
04-687	--	FIO	--

*pH、浸透圧、エンドトキシン、および水分は、
$NaHCO_3$ なしの場合；$NaHCO_3$ は、細胞増殖試験のために
添加される。

貯蔵

2℃ ～ 8℃

製品使用上の注意

これらの製品は研究用途に限定される。
ヒトおよび動物への使用、ヒトおよび動物への応用、
ならびに臨床およびインビトロ手順における使用は
認められていない。

オーダー情報

カタログ番号	説明	サイズ
12-719F	DMEM: F12、L-グルタミン、15 mM HEPES、および3.151 g/L グルコース含有	500 ml
12-719Q	DMEM: F12、L-グルタミン、15 mM HEPES、および3.151 g/L グルコース含有	1 L
15-719D	DMEM: F12粉末 - L-グルタミン、15 mM HEPES、および3.151 g/L グルコース含有。粉末培地は、16.0 ml/L の $NaHCO_3$、7.5%溶液または1.2 g/L の $NaHCO_3$ 粉末の添加を必要とする	1 x 10L
04-687Q	DMEM: F12、3.151 g/L グルコース含有、L-グルタミン含有、HEPES不含	1 L

本書における商標はすべて、Lonzaグループまたは
その子会社の商標である。

【図４－１】

Cascade Biologics™
invitrogen cell culture

GIBCO®
invitrogen cell culture

培地171、培地171PRF、およびMEGS

培地 171

M-171-500

500 ml

培地171PRF
（フェノールレッド不含）

M-171PRF-500

500 ml

製品説明

培地171および培地171PRFは、正常ヒト乳腺上皮細胞の
増殖のための完全な培養環境において1つの
構成成分として使用することが意図される無菌の
液体組織培養液である。培地171は、必須および
非必須アミノ酸、ビタミン、他の有機化合物、
微量ミネラル、ならびに無機塩類を含有する
基本培地である。培地171PRFは、培地171の
フェノールレッド不含バージョンである。
これらの培地は、抗生物質、抗真菌剤、ホルモン、
増殖因子、およびタンパク質を含有していない。
これらの培地は、HEPESおよび重炭酸塩で緩衝化され、
5% CO_2 /95%空気の雰囲気を有するインキュベーター内で
使用するように設計されている。正常ヒト乳腺上皮細胞の
プレーティングおよび長期増殖を支持するために、
これらの培地には乳腺上皮増殖補充物質
（MEGS、カタログ番号S-015-5）を補充しなければならない。

使用目的

培地171は、正常ヒト乳腺上皮細胞の日常的な
培養における使用が意図される。培地171PRFは、
フェノールレッドの非存在化で正常ヒト乳腺上皮細胞を
増殖することを望む研究者による使用が意図される。
MEGSが補充された場合、これらの培地は、
2.5×10^3個細胞/cm^2～8×10^4個細胞/cm^2の密度の
正常ヒト乳腺上皮細胞のプレーティングおよび増殖を
支持する。***本製品は研究用途に限定される。
動物、ヒト、および診断手順において
使用してはならない。***

***注意：不適切に取り扱った場合、本製品のいくつかの
構成成分は健康被害を示す恐れがある。
本製品を取り扱う場合には、防護服および防護眼鏡の
着用を含め、適切な予防策を講じること。
適切に廃棄すること。***

貯蔵および安定性

培地171および培地171PRFは当社の施設内で4℃で
貯蔵されており、外気温で輸送される。
受け取ったならば、これらの培地は4℃で
貯蔵すべきであり、凍結すべきではない。
遮光すること。これらの組織培養液のいくつかの
構成成分は光不安定であり、当社は、培地を
長期にわたって光に曝露しないことを推奨する。
使用前に培地を加温する場合、37℃を超えてはならない。
暗下、4℃で貯蔵する場合、製品はラベル上の
有効期限まで安定である。

補充された培地171の調製

1. MEGSのボトル1本を解凍する。培地のボトル1本を
低温貯蔵から取り出す。容器のキャップが
締まっていることを確認する。
2. 補充物質のボトルを穏やかに旋回させる。
補充物質がボトルのキャップまで
飛び散らないようにし、かつ補充物質を
泡立てないようにする。
3. 容器の外側を70%エタノールまたは
イソプロパノールなどの消毒溶液で拭く。
4. 層流培養フード内で無菌技法を用いて、
補充物質のボトルの全内容物を
培地のボトルに移す。
5. 補充された培地のボトルのキャップを
しっかりと締め、内容物を旋回させて確実に均一な
溶液にする。培地を泡立てないようにする。

補充された培地171の貯蔵および安定性

ひとたび培地171または培地171PRFにMEGSが
補充されたならば、補充された培地は暗下、
4℃で貯蔵すべきであり、凍結すべきではない。
暗下、4℃で貯蔵する場合、補充された培地は
1ヵ月間安定である。

選択された参考文献

培地171の製剤化は、培地MCDB 170に基づき、
これに修正を加えている。
Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81:5435-5439, 1984

【図４－２】

Cascade Biologics™
invitrogen cell culture

GIBCO®
invitrogen cell culture

MEGS
乳腺上皮増殖補充物質

カタログ番号 S-015-5

5 ml

製品説明

乳腺上皮増殖補充物質（MEGS）は、正常
ヒト乳腺上皮細胞の増殖のための
完全な培養環境においてI つの構成成分として
使用することが意図される無菌の
濃縮（100×）溶液である。MEGSの5 mlボトルはそれぞれ、
正常ヒト乳腺上皮細胞の培養に必要な増殖因子、
ホルモン、および組織抽出物のすべてを含有しており、
培地171または培地171PRFの500 mlボトルに対して
的確な量の補充物質 である。MEGSは、
ウシ下垂体抽出物（BPE）、ウシインスリン、
ヒドロコルチゾン、および組換えヒト上皮増殖因子を
含有するイオン平衡溶液である。培地171または
培地171PRFの500 mlボトルにMEGSが補充された場合、
補充された培地中の構成成分の最終濃度は、BPE、
0.4% v/v；ウシインスリン、5μg/ml；ヒドロコルチゾン、
0.5μg/ml；および組換えヒト上皮増殖因子、3 ng/mlである。

使用目的

MEGSは、正常ヒト乳腺上皮細胞の日常的な
無血清培養のための、培地171または培地171PRFとの
併用が意図される。***本製品は研究用途に限定される。
動物、ヒト、および診断手順において
使用してはならない。***

***注意：不適切に取り扱った場合、本製品の
いくつかの構成成分は健康被害を示す恐れがある。
本製品を取り扱う場合には、防護服および
防護眼鏡の着用を含め、適切な予防策を
講じること。適切に廃棄すること。***

貯蔵および安定性

MEGSは当社の施設内で-20℃で貯蔵されており、
ドライアイス上で輸送される。受け取ったならば、
製品は、自動除霜しないフリーザー内で-20℃で
貯蔵すべきである。-20℃で貯蔵する場合、
製品はラベル上に示される有効期限まで安定である。

-20℃での長期貯蔵後、MEGSは少量の沈殿物を
含有する場合がある。この沈殿物は、MEGSのBPE構成成分の
悪冷不溶性物質から形成されたものであり、
製品の性能に影響を及ぼすものではない。

解凍

解凍するには、製品を37℃ウォーターバスに入れるか、
または4℃で一晩置いておく。ウォーターバス内で
解凍する場合、製品が解凍した後、製品を37℃で
放置してはならない。培地171へのMEGSの添加に関する
説明については、基本培地に添付の説明書を参照されたい。

選択された参考文献

MEGSの製剤化は、培地MCDB 170の発表された補足に基づき、
これに修正を加えている。
Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR; PNAS 81:5435-5439, 1984.

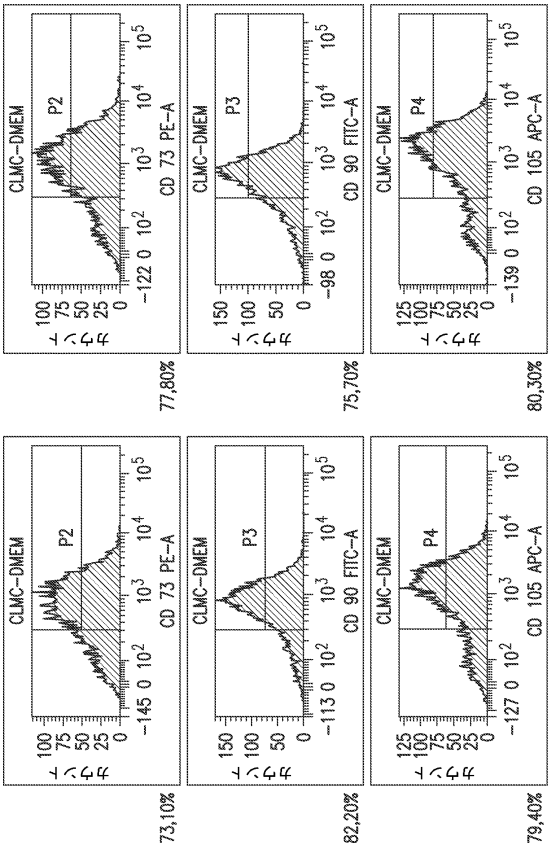
限定使用ラベルライセンスNo. 5：Invitrogenの技術
本製品の購入により、購入者には、購入された数量の製品および製品の構成成分を、購入者によって実施される研究において使用する、譲渡不可の権利が与えられる（購入者は学術機関または営利団体を問わない）。購入者は、(a) 本製品、(b) その構成成分、または (c) 本製品もしくはその構成成分を用いて作製された物質を、第三者に販売またはその他の方法で譲渡することはできず、あるいはさもなくば、本製品もしくはその構成成分、または本製品もしくはその構成成分を用いて作製された物質を商業目的に使用することもできない。
購入者は、本製品の使用を通して作製された情報または物質を科学共同研究者に譲渡することができる：ただし、そのような譲渡が決して商業目的ではなく、かつそのような共同研究者が、(a) そのような物質をいかなる第三者にも譲渡しない、ならびに (b) そのような譲渡された物質および／または情報を研究にのみ使用し、商業目的で使用しないという書面に同意することを条件とする。
商業目的とは、対価を得るための当事者によるあらゆる行為を意味し、以下を含み得るがこれらに限定されない：(1) 製造における製品もしくはその構成成分の使用；(2) サービス、情報、もしくはデータを提供するための製品もしくはその構成成分の使用；(3) 治療、診断、もしくは予防を目的とした製品もしくはその構成成分の使用；または (4) そのような製品もしくはその構成成分が研究における使用のために再販されるか否かを問わない、製品もしくはその構成成分の再販。複数の限定使用ラベルライセンスの対象である製品に関しては、最も限定的な限定使用ラベルライセンスの条件が優先されるものとする。Life Technologies Corporationは、本製品またはその構成成分が使用された、購入者による研究において開発された治療、臨床、診断、ワクチン、または予防製品の製造、使用、または販売に基づいて、本製品をカバーする Life Technologies Corporation所有または支配の特許権の侵害の、購入者に対する申し立てを行使することはない：ただし、本製品もその構成成分のいかなるものも、そのような製品の製造において使用されないかつたことを条件とする。購入者がこの限定使用声明の限定を受け入れたくない場合、Life Technologiesは全額返金による製品の返品を受け入れる。研究以外の目的での本製品のライセンスの購入に関する情報については、Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.
電話（760）603-7200. ファックス（760）602-6500. Eメール outlicensing@invitrogen.com に問い合わせのこと。
(著作権)2009 Life Technologies Corporation. 版権所有。
研究用途に限定される。動物およびヒトへのいかなる治療用途および診断用途も意図されない。

【図５】

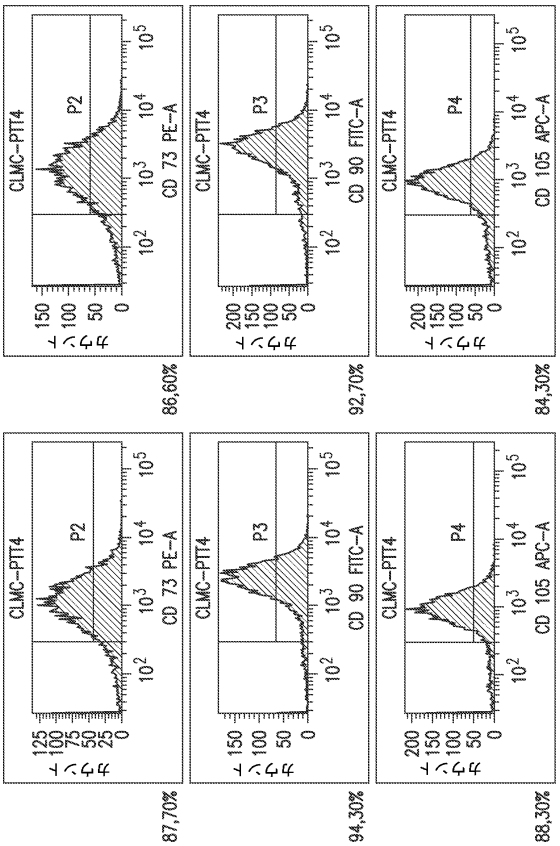
PTT6 培地成分リスト

培地組成物リスト	会社名	カタログ番号
基礎培地		
DMEM（本明細書では、PTT6基本培地とも称する）	Lonza	12-604F
DMEM/F12	Lonza	12-719F
M171	Life technologies	M171500
血清		
ウシ胎仔血清	GE Healthcare	A15-151
抗生物質		
ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシンB	Lonza	17-745E
補充物質		
アデニン（任意）	Sigma	A8626-25G
ヒドロコルチゾン（任意）	Sigma	H-0888
上皮増殖因子	Millipore	GF-144
T3（3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩）（任意）	Sigma	200-223-5
組換えヒトインスリンAOF	Life Technologies	A11382IJ

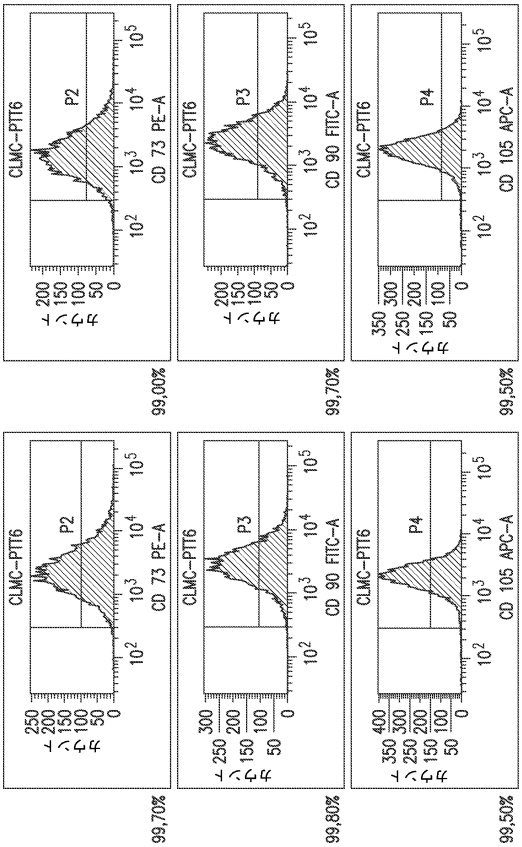
【図６ａ】



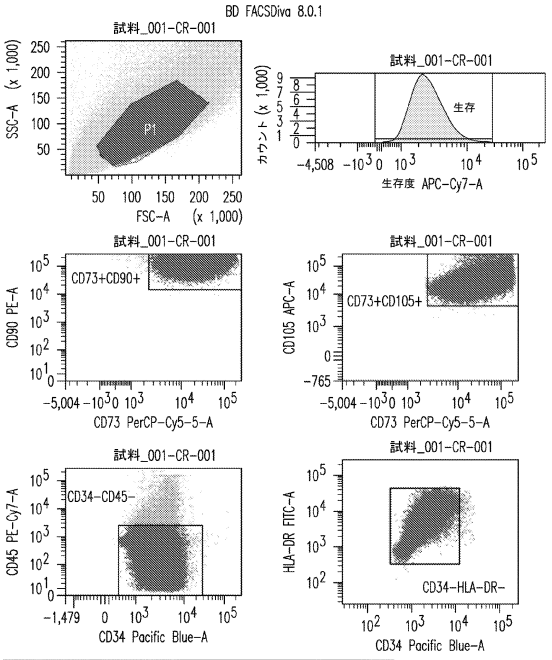
【図６ｂ】



【図６ｃ】

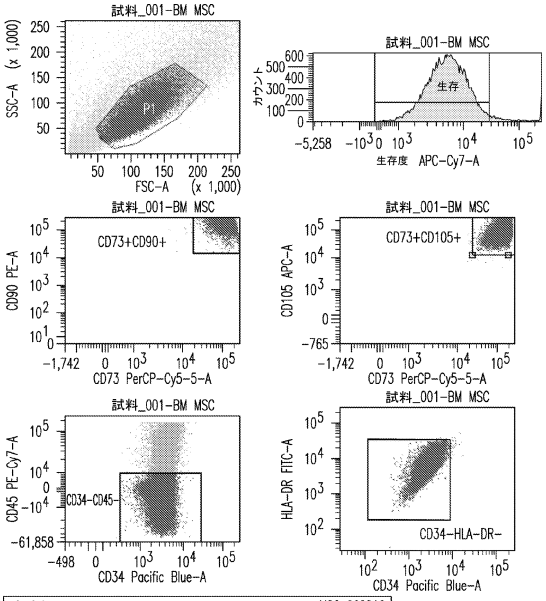


【図７ａ】



チューブ：CR-001 集団	イベント数	元に対する%	全体に対する%
全イベント	540.988	####	100.0
P1	425.093	78.6	78.6
生存	414.643	97.5	76.6
CD73+CD90+	414.554	100.0	76.6
CD73+CD105+	414.490	100.0	76.6
CD34-CD45-	411.206	99.2	76.0
CD34-HLA-DR	411.061	100.0	76.0

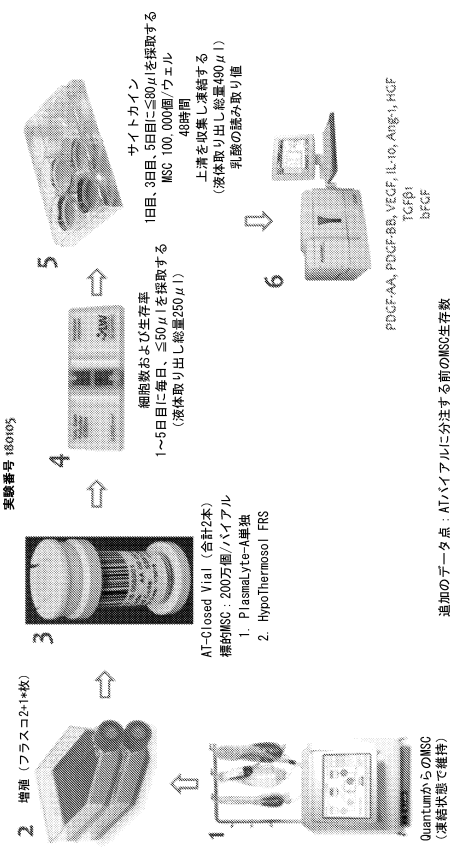
【図７ｂ】



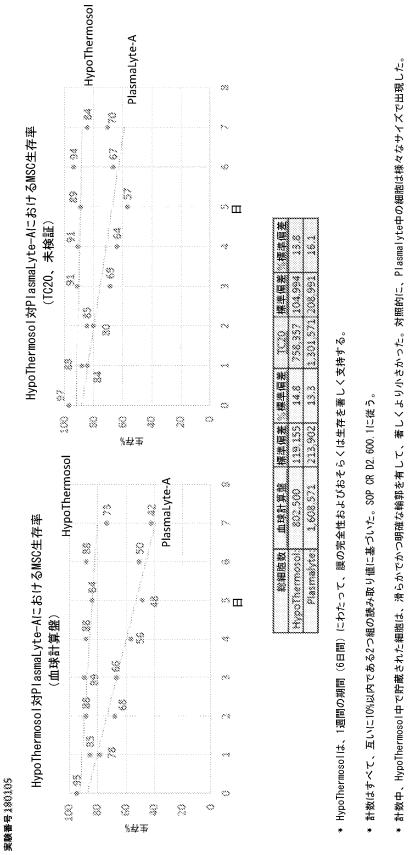
実験名： 試料名： チューブ名：	MSC 062216 試料_001 BM MSC
集団	イベント数 / 元に対する%
CD34-HLA-DR-	21.128 / 99.9

集団	イベント数	元に対する%	全体に対する%
全イベント	77.022	####	100.0
P1	35.780	46.5	46.5
生存	33.741	94.3	43.8
CD73+CD90+	33.729	100.0	43.8
CD73+CD105+	33.710	99.9	43.8
CD34-CD45-	21.155	62.8	27.5
CD34-HLA-DR	21.128	99.9	27.4

【図８】



【図９】



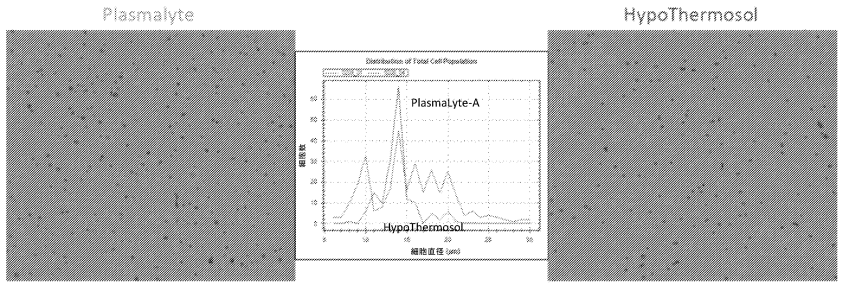
総細胞数	血球計算盤	標準偏差	標準偏差%	TC20	標準偏差	標準偏差%
HypoThermosol	802,500	119,155	14.8	756,357	104,994	13.8
PlasmaLyte	1,608,571	213,902	13.3	1,301,571	208,993	16.1

- HypoThermosolは、1週間の期間（6日間）にわたって、膜の完全性およびおそらくは生存率を著しく支持する。
- 計数はすべて、互いに10%以内である2つ組の値み取り値に基づいた。SOP OR D2.600.1に従う。
- 計数中、HypoThermosol中で存続された細胞は、淋らかでかつ明度な輪郭を有して、著しくより小さかった。対照的に、PlasmaLyte中の細胞は様々なサイズで出現した。

実験番号180105

【図１０】

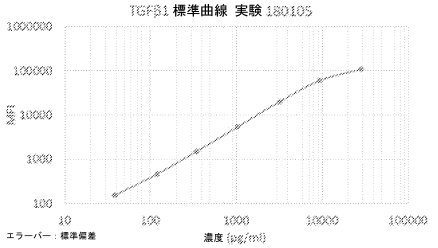
3日目 TC20画像

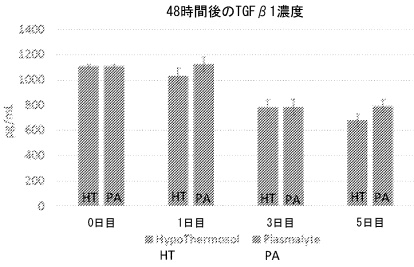


- TC20により、HypoThermosol中で維持された細胞の直径範囲が狭いことが確認される（本実施例において、比較は3日間の貯蔵後）。

【図１１】

HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のTGFβ1濃度

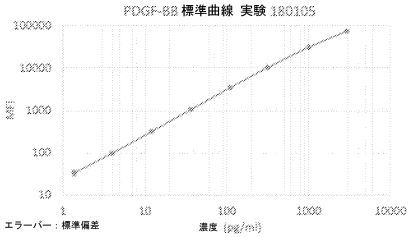




CR001Cの安定性（-80℃で貯蔵） ℃):					
貯蔵日数	2	137	140	143	332
濃度 (pg/mL)	1046 ± 34	830 ± 33	952 ± 22	1154 ± 38	1046 ± 34

【図１２】

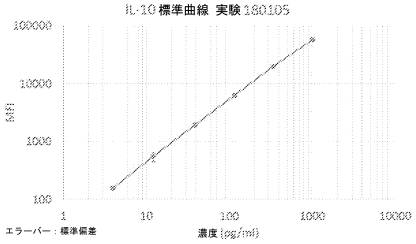
HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のPDGF-BB濃度



PDGF-BBはいずれの試料においても検出されなかった。

【図１３】

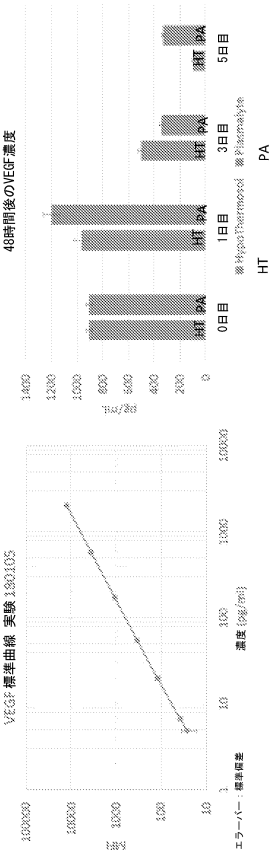
HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のIL-10濃度



IL-10はいずれの試料においても検出されなかった。

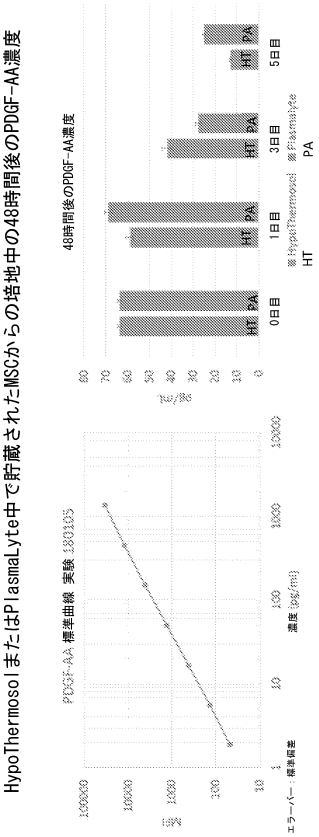
【図１４】

HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のVEGF濃度



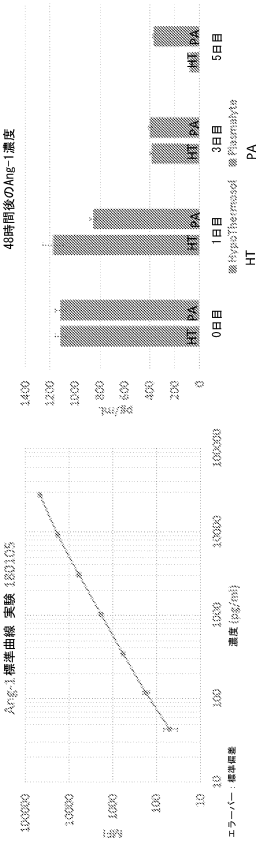
【図１５】

HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のPDGF-AA濃度



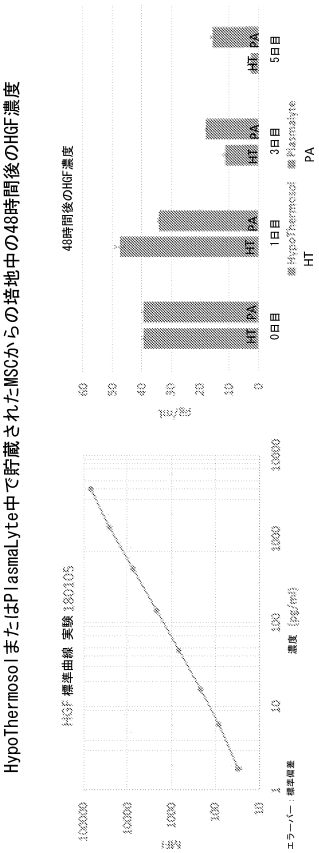
【図１６】

HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のAng-1濃度

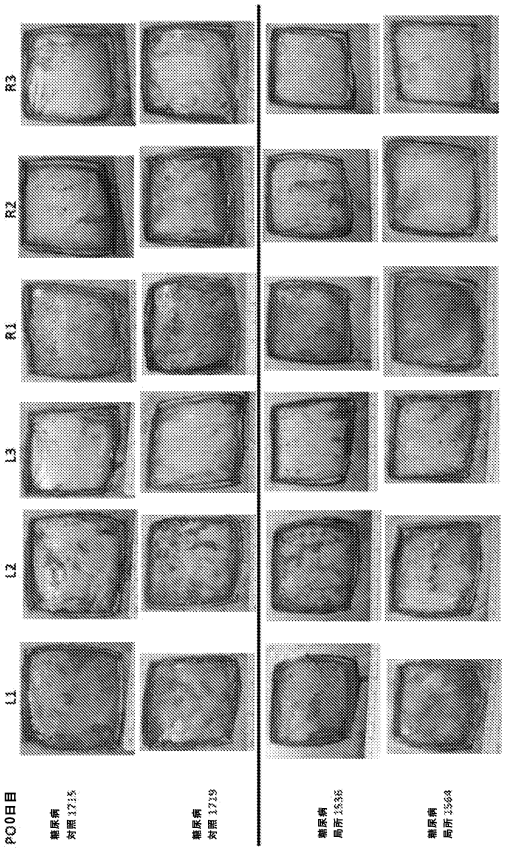


【図１７】

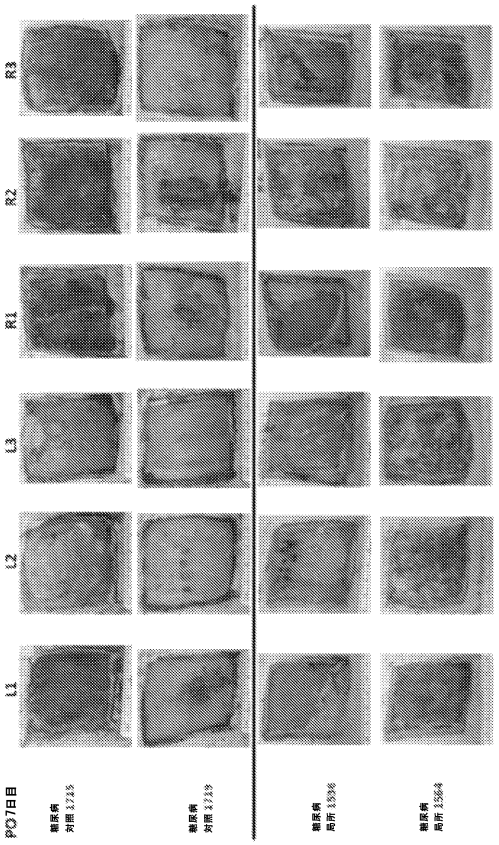
HypoThermosolまたはPlasmaLyte中で貯蔵されたMSCからの培地中の48時間後のHGF濃度



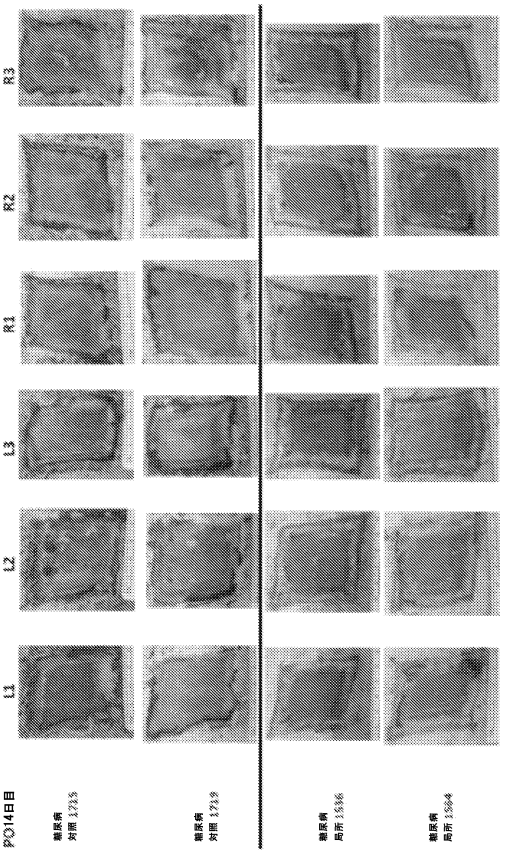
【図１８－１】



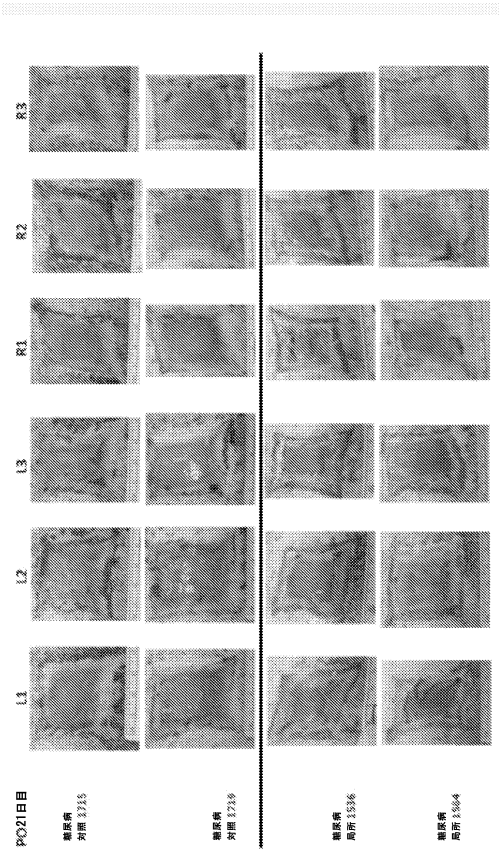
【図１８－２】



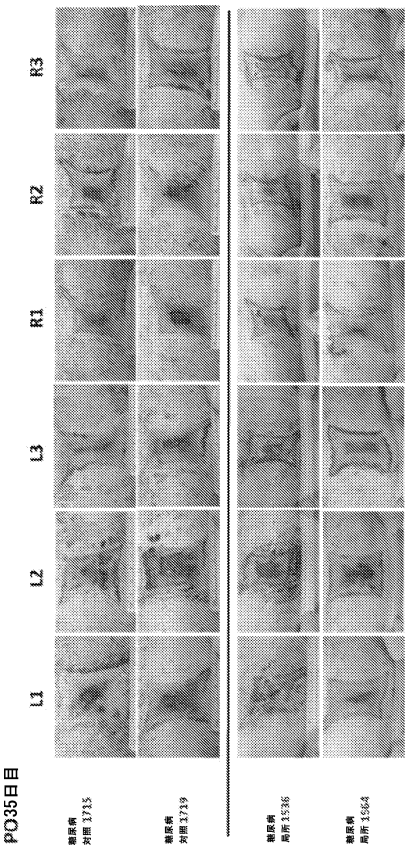
【図１８－３】



【図１８－４】



【図１８－５】



【図１９－１】

TOCRIS a bio-techne brand

印刷日：2016年9月16日

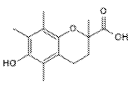
分析証明書

www.tocris.com

製品名： トロロックス　　カタログ番号:6002　　バッチ番号:1
CAS 番号： 53188-07-1
IUPAC 名： 3,4-ジヒドロ-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル-2H-1-ベンゾピラン-2-カルボン酸

1. 物理的および化学的性質

バッチ分子式： $C_{14}H_{18}O_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$
バッチ分子量： 259.3
物理的外観： ベージュの固体
溶解性： DMSOで100 mMまで
エタノールで100 mMまで
保管： +4℃で保管
バッチ分子構造：



2. 分析データ

HPLC: 純度99.7%を示す
^{1}H NMR: 構造と一致する
質量スペクトル： 構造と一致する
微量分析：

	炭素	水素	窒素
理論値	64.85	7.39	
実測値	64.72	7.58	

注意 - 十分に試験されていない・研究用途に限定される・ヒトまたは動物への使用のためのものではない

bio-techne.com
info@bio-techne.com
techsupport@bio-techne.com

北アメリカ
電話:(800) 343 7475

中国
info.cn@bio-techne.com
電話:+86 (21) 52380373

ヨーロッパ、中東、アフリカ
電話:+44 (0)1235 529449

世界のその他の地域
www.tocris.com/distributors
電話:+1 612 379 2956

【図１９－２】

TOCRIS a bio-techne brand

印刷日：2016年9月16日

製品情報

www.tocris.com

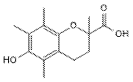
製品名： トロロックス　　カタログ番号: 6002　　バッチ番号: 1
CAS 番号： 53188-07-1
IUPAC 名： 3,4-ジヒドロ-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル-2H-1-ベンゾピラン-2-カルボン酸

説明:
抗酸化ビタミンE誘導体；破骨細胞形成を抑制し、IL-1誘導性の破骨細胞骨量減少を阻害する。細胞透過性および水溶性。

物理的および化学的性質：
バッチ分子式：$C_{14}H_{18}O_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$
バッチ分子量：259.3
物理的外観：ベージュの固体

最低純度：>98%

バッチ分子構造：



保管：+4℃で保管

溶解性および使用情報：
DMSOで100 mMまで
エタノールで100 mMまで

安定性および溶解性に関する助言：
溶液によっては得るのが困難な場合があり、急速な攪拌、超音波処理、または穏やかな加温（45～60℃のウォーターバス中）によって促進することができる。
特に溶液中での製品の安定性に関する情報はほとんど報告されておらず、ほとんどの場合、当社は一般的な指針を提供することしかできない。当社の標準的な推奨は以下の通りである：
固体：保管が製品ラベルに記載されている通りであり、バイアルがしっかりと密封されて維持されるという条件で、製品は受領日から最大6ヶ月間保管することができる。
液体：一度調製した保存溶液は、しっかりと密封されたバイアル中に分取した状態で-20℃以下で保管し、1ヶ月以内に使用することを推奨する。可能な限り、溶液は作製し同日中に使用すること。

参考文献：

Lee *et al* (2009) Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. J.Biol.Chem. ***284*** 13725. PMID: 19299513.

Giulivi *et al* (1993) Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, Trolox C. Arch.Biochem.Biophys. ***303*** 152. PMID: 8489259.

注意 - 十分に試験されていない・研究用途に限定される・ヒトまたは動物への使用のためのものではない

bio-techne.com
info@bio-techne.com
techsupport@bio-techne.com

北アメリカ
電話:(800) 343 7475

中国
info.cn@bio-techne.com
電話:+86 (21) 52380373

ヨーロッパ、中東、アフリカ
電話:+44 (0)1235 529449

世界のその他の地域
www.tocris.com/distributors
電話:+1 612 379 2956

【図２０－１】

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
ウェブサイト： www.sigmaaldrich.com
Eメール USA： techserv@sial.com
USA以外： eurtechserv@sial.com

製品仕様書

製品名：
塩化ナトリウム - PharmaGrade、USP、医薬品またはバイオ医薬品製造のために適切なGMP管理下で製造。

製品番号： RES0926S-A7
CAS 番号： 7647-14-5

化学式： NaCl
式量： 58.44 g/mol

試験	仕様
外観（色）	白色
外観（形状）	粉末
溶液の外観（濁度）	透明
20%水溶液	
溶液の外観（色）	無色
20%水溶液	
重金属（USPによる）	≤ 5 ppm
識別	合格
ヨウ化物	合格
鉄(Fe)	≤ 2.0 µG/g
臭化物限度	≤ 0.010 %
リン酸限度	≤ 0.0025 %
カリウム限度	≤ 0.05 %
乾燥減量 (USP)	≤ 0.5 %
酸性度またはアルカリ度	合格
アルミニウム (Al)	≤ 0.2 µG/g
ヒ素 (As)	≤ 1.0 µG/g
アッセイ	99.0 - 100.5 %
乾燥基準	
バリウム (USP)	合格
塩化物	合格
フェロシアン化物	合格
マグネシウム/アルカリ土類金属	合格
亜硝酸塩	合格
硝酸塩 (SO4)	≤ 0.020 %

Sigma-Aldrichは、品質公開時またはその後の再試験日において、本製品が本書に含まれる情報に適合したことを保証する。
最新の仕様書は、Sigma-Aldrich.comで入手可能である。さらなる問い合わせについては、テクニカルサービスに連絡してください。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の販売取引条件については、送り状の裏面または梱包票を参照のこと。

【図２０－２】

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
ウェブサイト： www.sigmaaldrich.com
Eメール USA: techserv@sial.com
USA以外： eurtechserv@sial.com

製品仕様書

製品名：
塩化ナトリウム - PharmaGrade、USP、医薬品またはバイオ医薬品製造のために適切なGMP管理下で製造。

製品番号： **RES0926S-A7**
CAS 番号： 7647-14-5

化学式： NaCl
式量： 58.44 g/mol

試験	仕様

仕様：PRD.0.ZQ5.10000051146

Sigma-Aldrichは、品質公開時またはその後の再試験日において、本製品が本書に含まれる情報に適合したことを保証する。
最新の仕様書は、Sigma-Aldrich.comで入手可能である。さらなる問い合わせについては、テクニカルサービスに連絡してください。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の販売取引条件については、送り状の裏面または梱包票を参照のこと。

【図２１】

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
ウェブサイト： www.sigmaaldrich.com
Eメール USA: techserv@sial.com
USA以外： eurtechserv@sial.com

製品仕様書

製品名：
リン酸二水素カリウム - 99.99% 微量金属基準

製品番号： **229806**
CAS 番号： 7778-77-0
MDL: MFCD00011401
化学式： H2KO4P
式量： 136.09 g/mol

KH_2PO_4

試験	仕様
外観（色）	要件と適合する
白色または無色	
外観（形状）	粉末または結晶
純度（NaOHによる滴定）	22.3 - 23.2 %
% P	
ICP主要分析	確認済み
カリウムおよびリン成分を確認	
微量金属分析	≤ 150.0 ppm
純度	要件を満たす
微量金属分析に基づいて99.99%	

仕様：PRD.2.ZQ5.10000038396

Sigma-Aldrichは、品質公開時またはその後の再試験日において、本製品が本書に含まれる情報に適合したことを保証する。
最新の仕様書は、Sigma-Aldrich.comで入手可能である。さらなる問い合わせについては、テクニカルサービスに連絡してください。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の販売取引条件については、送り状の裏面または梱包票を参照のこと。

【図２２－１】

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
ウェブサイト： www.sigmaaldrich.com
Eメール USA: techserv@sial.com
USA以外： eurtechserv@sial.com

製品仕様書

製品名：
HEPES - PharmaGrade、医薬品またはバイオ医薬品製造における原料として使用するために適切な管理下で製造、細胞培養に適する

製品番号： **RES6003H-B7**
CAS 番号： 7365-45-9

化学式： C8H18N2O4S
式量： 238.3 g/mol

試験	仕様
外観（色）	白色
外観（形状）	流動性粉末
赤外スペクトル	参照と適合する
溶解性（濁度）	透明
1.0M 水溶液	
溶解性（色）	無色
1.0M 水溶液	
溶解性（形状）	溶液
1.0M 水溶液	
水分（カール・フィッシャーによる）	≤ 0.5 %
NaOHによる滴定	≥ 99.5 %
細胞毒性	合格
DNase - ニッカーゼ	合格
DNase - エンド/エキソヌクレアーゼ	合格
RNase検出	合格
pH	4.7 - 5.3
1.0% 水溶液	
エンドトキシン	≤ 50 EU/g
酵母およびカビ	≤ 100 CFU/g
生物汚染度	≤ 100 CFU/g
プロテアーゼ検出	合格
強熱残分	≤ 0.1 %
ヒ素 (As)	≤ 3.0 ppm
鉄 (Fe)	≤ 5.0 ppm
亜鉛 (Zn)	≤ 5.0 ppm

Sigma-Aldrichは、品質公開時またはその後の再試験日において、本製品が本書に含まれる情報に適合したことを保証する。
最新の仕様書は、Sigma-Aldrich.comで入手可能である。さらなる問い合わせについては、テクニカルサービスに連絡してください。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の販売取引条件については、送り状の裏面または梱包票を参照のこと。

【図２２－２】

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
ウェブサイト： www.sigmaaldrich.com
Eメール USA: techserv@sial.com
USA以外： eurtechserv@sial.com

製品仕様書

製品名：
HEPES - PharmaGrade、医薬品またはバイオ医薬品製造における原料として使用するために適切な管理下で製造、細胞培養に適する

製品番号： **RES6003H-B7**
CAS 番号： 7365-45-9

化学式： C8H18N2O4S
式量： 238.3 g/mol

試験	仕様
ニッケル (Ni)	≤ 5.0 ppm
マグネシウム (Mg)	≤ 5.0 ppm
カルシウム (Ca)	≤ 30.0 ppm
鉛 (Pb)	≤ 5.0 ppm
ビスマス (Bi)	≤ 5.0 ppm
リチウム (Li)	≤ 5.0 ppm
モリブデン (Mo)	≤ 5.0 ppm
アルミニウム (Al)	≤ 5.0 ppm
アンチモン (Sb)	≤ 5.0 ppm
バリウム (Ba)	≤ 5.0 ppm
コバルト (Co)	≤ 5.0 ppm
クロム (Cr)	≤ 5.0 ppm
カドミウム (Cd)	≤ 5.0 ppm
銅 (Cu)	≤ 5.0 ppm
マンガン (Mn)	≤ 5.0 ppm
UV 吸光度 260nm	≤ 0.05 Abs UN
1.0M 水溶液	
UV 吸光度 280nm	≤ 0.04 Abs UN
1.0M 水溶液	

仕様：PRD.0.ZQ5.10000050458

Sigma-Aldrichは、品質公開時またはその後の再試験日において、本製品が本書に含まれる情報に適合したことを保証する。
最新の仕様書は、Sigma-Aldrich.comで入手可能である。さらなる問い合わせについては、テクニカルサービスに連絡してください。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の販売取引条件については、送り状の裏面または梱包票を参照のこと。

【図２３－１】

安全性データシート

1. 物質の特定

製品名： ラクトビオン酸ナトリウム
同義語：
カタログ番号： QW-1395
供給業者： Combi-Blocks, Inc., 7949 Silverton Ave # 915, San Diego, CA 92126, USA. Tel: 858-635-8950

2. 危険有害性の特定

公知の危険有害性はない

3. 組成/成分情報

成分名： ラクトビオン酸ナトリウム
CAS 番号： 27297-39-8

4. 応急措置

皮膚接触： 汚染された衣服および靴を脱ぎ、直ちに大量の水で少なくとも15分間皮膚を洗う。刺激が続く場合は、医師の診察を受けること。
眼接触： 直ちに大量の水で少なくとも15分間皮膚を洗う。まぶたを指で開いて、目の十分な洗浄を確実にする。刺激が続く場合は、医師の診察を受けること。
吸入： 新鮮な空気の場所に移す。重篤な場合または症状が続く場合は、医師の診察を受けること。
経口摂取： 大量の水で少なくとも15分間、口内を洗浄する。医師の診察を受けること。

5. 火災時の措置

単独でまたは他の物質と組み合わせてこの物質が関与する火災が発生した場合には、乾燥粉末または炭酸ガス消火器を使用すること。防護服および自給式呼吸器を着用すること。

6. 漏出時の措置

人体に対する注意事項： 十分に機能し、地域/州/国の基準を満たす、適切な個人用保護具を着用する。

呼吸器に対する注意事項：	認可されたマスク/防護マスクを着用する
手に対する注意事項：	適切な手袋/作業用手袋を着用する
皮膚の保護：	適切な防護服を着用する
眼の保護：	適切な保護眼鏡を着用する

除去方法： 砂または同様の不活性吸収剤と混合し、掃き取り、しっかりと密閉された容器に入れて廃棄する。12項を参照のこと。
環境に対する注意事項： 物質を排水管または水路に流入させない。

7. 取扱いおよび保管

取扱い： 本製品は、潜在的に有害な化学物質の取り扱いおよび使用について適切な資格をもつ者のみが、またはその厳重な管理下で取り扱うべきであり、その者は、本シートに提供される火災、健康、および化学物質危険有害性データを考慮すべきである。
保管： 密閉容器中で保管する。

8. 曝露防止/保護措置

工学管理： 化学ドラフト内でのみ使用する。
個人用保護具： 実験着、化学物質耐性手袋、および安全ゴーグルを着用する。
一般的衛生措置： 取扱い後は十分に洗浄する。汚染された服は、再使用の前に洗浄する。

【図２３－２】

9. 物理的および化学的性質

外観： 特定されない
沸点： データなし
融点： データなし
引火点： データなし
密度： データなし
分子式： $C_{12}H_{21}O_{12}.Na$
分子量： 380.3

10. 安定性および反応性

回避すべき条件： 熱源、炎、および火花
回避すべき物質： 酸化剤
予想される有害な燃焼生成物： 一酸化炭素、窒素酸化物

11. 有害性情報

急性毒性： 入手可能なデータなし
皮膚刺激性/腐食性： 入手可能なデータなし
眼の損傷/刺激性： 入手可能なデータなし
呼吸器または皮膚感作性： 入手可能なデータなし
生殖細胞変異原性： 入手可能なデータなし
発がん性： 本物質の発がん性に関する分類データは、EPA、IARC、NTP、OSHA、またはACGIHから入手できない。
生殖毒性： 公知の影響なし
特定標的臓器毒性 - 反復曝露： 公知の影響なし
特定標的臓器毒性 - 単回曝露： 入手可能なデータなし
吸引性呼吸器有害性： 入手可能なデータなし
追加情報： 当社が知る限りでは、本物質の化学的、物理的、および毒性学的性質は十分に調査されていない。

12. 環境影響情報

毒性： 入手可能なデータなし
残留性および分解性： 入手可能なデータなし
生物蓄積性： 入手可能なデータなし
土壌内の移動性： 入手可能なデータなし
PBTおよびvPvB評価の結果： PBT: 該当なし、vPvB: 該当なし
その他の有害作用： 入手可能なさらなる関連情報はない。

13. 廃棄上の注意

国および地域の規制に従って、地域の廃棄物処理当局と協議の上、許可を受けた処理業者よって、特殊廃棄物として処分を手配する。

14. 輸送情報

航空輸送および陸上輸送について公知の危険有害性はない。

15. 規制情報

本物質中に含まれる化学物質は、SARA Title III, Section 302の報告要件の対象となっていないか、または SARA Title III, Section 313によって確立された閾値報告レベルを超える公知のCAS番号を有していない。

【図２３－３】

16. その他の情報

本MSDSは、発行日時点で当社が知る限りにおいて正確であるが、すべてを包括していることを意味せず、手引きとしてのみ用いることとする。Combi-Blocksは、上記製品の取り扱いまたは上記製品との接触によるいかなる傷害または損害についても責任を負わないこととする。

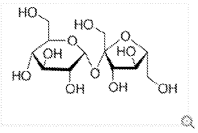
【図２４－１】

SIGMA-ALDRICH

ARK2196B SIGMA-ALDRICH

スクロース、低エンドトキシン

PharmaGrade、USP/NF、医薬品またはバイオ医薬品製造のために適切なGMP管理下で製造。



性質

関連する カテゴリー	生化学品および試薬、タンパク質安定化用の界水化物、タンパク質および誘導体、タンパク質安定化用の試薬
生物学的起源	植物
等級	Ph Eur USP/NF
InChIキー	CZMRCDWAGMRECN-UGDUZNRGBA-N
製品種目	PharmaGrade
形状	粉末
不純物	エンドトキシン：試験済み、亜硫酸塩：試験済み
mp	185-187 °C(lit.)
適合性	製造用途に適する 性質の表示数を減らす

説明

一般的な説明
PharmaGrade製品は、医薬品またはバイオ医薬品の製造における原料として使用するために、適切な管理下で製造されている。PharmaGradeプログラムに関するさらなる情報については、sigma-aldrich.com/safc-pharmagradeまで。

連携
PharmaGradeスクロース、低エンドトキシンの品質文書

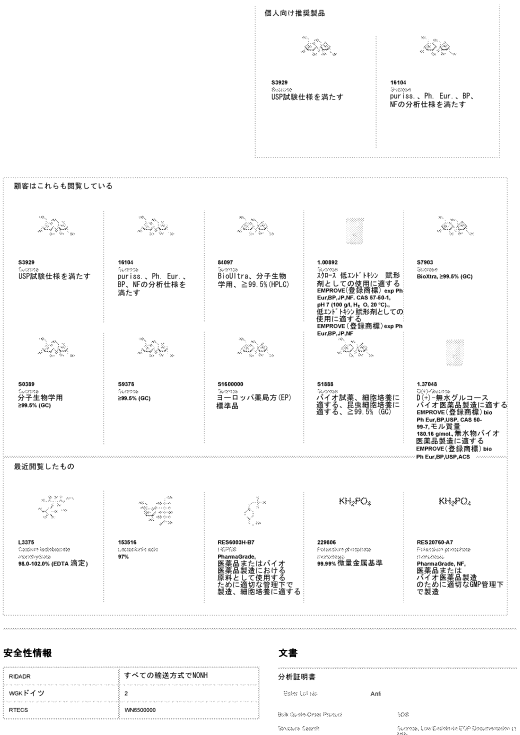
価格および在庫

SKU包装サイズ	在庫	価格 (USD)	数量
ARK2196B-25KG	Estimated to ship on 05/05/15	5,590.70	0
ARK2196B-1KG	Only 2 left in stock (more on the way) - ETA:	376.70	0
ARK2196B-10KG	Estimated to ship on 04/12/15	2,688.70	0
ARK2196B-100G	Only 3 left in stock (more on the way) - ETA:	292.00	0

大量注文?

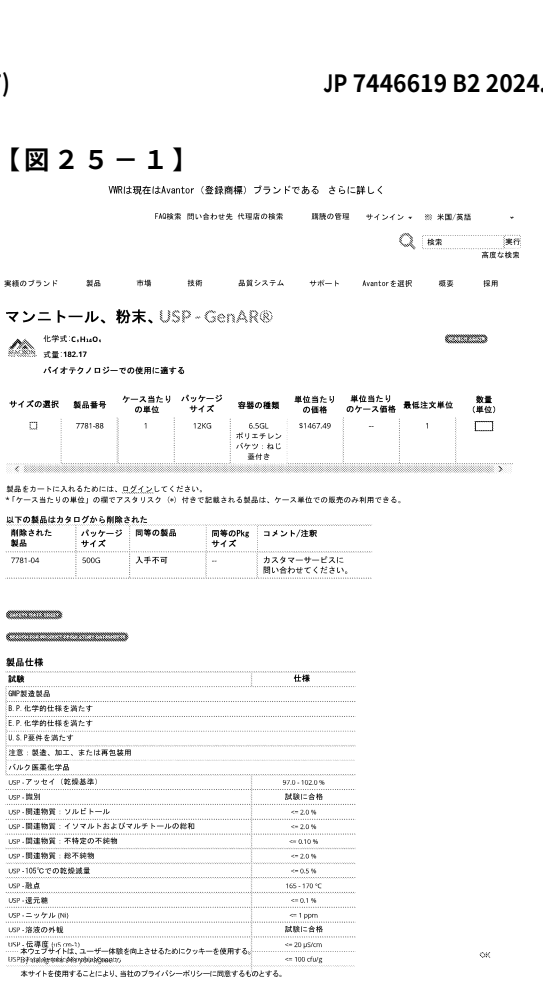
カートに入れる

【図２４－２】



https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/ark2195b?lang=en&region=US 30.03.2018

【図２５－１】



https://www.avantorinc.com/commerce/product.aspx?id=21474846759 30.03.2018

【図２５－２】



https://www.avantorinc.com/commerce/product.aspx?id=21474846759 30.03.2018

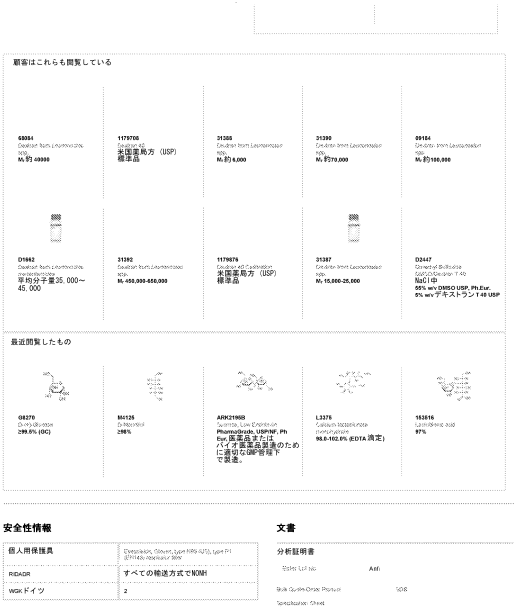
【図２６】



【図２７－１】



【図２７－２】



安全性情報

個人用保護具	Eyeshields, Gloves, type N95 (US), type P1 (EN143), Dust mask type
RIDADR	すべての輸送方式でNONH
WGKドイツ	2

文書

分析証明書
Batch / Lot no. Add
Bulk Custom Order Product No
Specification Sheet

記事

デキストランおよび関連多糖
歴史的に、デキストランは、製糖およびその他の食品生産における炭雑物として長い間認識されていた。ワイン中のデキストランの形成は、パスツールによって、微生物の活性によるものであることが示された...
Vicki Callagan
BioFiles 2008, 3 (1), 17
キーワード：付着、選択、クロマトグラフィー、臨床、乾燥品、誘導体化、拡散、ろ過、固定化、工業、イオン交換、リガンド、細胞膜、分子生物学、分子生物学的技法、核磁気共鳴分光法、核酸ハイブリダイゼーション、医薬品、沈殿、精製、分離、サイズ排除クロマトグラフィー、分光法、硫化物塩

査読付き論文

本製品を論文中で使用しましたか？ 使用した場合は、ここをクリック。

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/31389?lang=en&region=US&g... 30.03.2018

【図２８】

Product Information

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

アデノシン

製品番号 **A9251**
保管温度 2-8 °C

製品説明
分子式： $C_{10}H_{13}N_5O_4$
分子量： 267.2
CAS 番号： 58-61-7
比旋光度：-61.7°（7 mg/水100 ml）[1]
pK_a：3.5 および12.5.[2]
消衰係数：$E^{1\%}_{1cm}$ = 15.4 (0.01 M PO_4, pH 7 中での 259 nm)[3]

アデノシンは、自然界に広く分布するヌクレオシド、プリンリボシドである。アデノシンは、AMPの分解産物である。

使用上の注意および免責事項
実験室での使用に限る。薬物、家庭用、または
その他の用途に使用しない。

調製指示
水に可溶性（7 mg/ml）。[1]

保管/安定性
アデノシンは、希薄な鉱酸中で容易に加水分解されてアデニンおよびD-リボースになる。亜硝酸は脱アミノ化を起こす。[2]

参考文献

1. The Merck Index, 11th ed., Entry# 143
2. Dawson, R.M. C., et al., Data for Biochemical Research, 3rd ed., p. 77., Oxford University Press, New York, (1986).
3. Specifications and Criteria for Biochemical Compounds, 3rd ed., p. 157.

MES/ 8/08

Sigmaブランドの製品は、Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売される。
Sigma-Aldrich, Inc.は、その製品が本書およびその他のSigma-Aldrich出版物に含まれる情報に適合していることを保証する。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の取引条件が適用される場合がある。送り状の裏面または梱包票を参照してください。

【図２９】

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
ウェブサイト： www.sigmaaldrich.com
Eメール USA： techserv@sial.com
USA以外： eurtechserv@sial.com

製品仕様書

製品名：
酸化型L-グルタチオン - PharmaGrade、医薬品またはバイオ医薬品製造における原料として使用するために適切な管理下で製造。

製品番号： G2299
CAS 番号： 27025-41-8



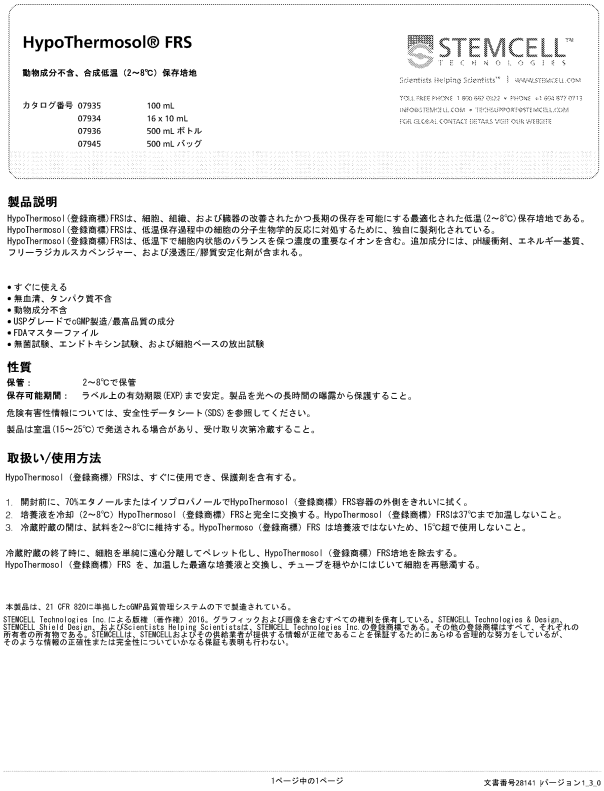
化学式： C20H32N6O12S2
式量： 612.63 g/mol
保管温度： 2 - 8 °C

試験	仕様
外観（色）	白色
外観（形状）	粉末
溶解性（色）	無色
溶解性（濃度）	透明
10 mg/ml, H2O	
赤外スペクトル	構造と適合する
水分（カール・フィッシャーによる）	≤ 6 %
窒素（無水物）	13.4 - 14.0 %
純度（HPLC）	≥ 98 %
不純物	≤ 2 %
HPLCによる還元型グルタチオン	
推奨される再試験期間	----------
3年間	

仕様：PRD.0.ZQ5.10000041806

Sigma-Aldrichは、品質公開時またはその後の再試験日において、本製品が本書に含まれる情報に適合したことを保証する。
最新の仕様書は、Sigma-Aldrich.comで入手可能である。さらなる問い合わせについては、テクニカルサービスに連絡してください。
購入者は、製品のその特定用途への適合性を判断する必要がある。追加の販売取引条件については、送り状の裏面または梱包票を参照のこと。

【図３０】



HypoThermosol® FRS

動物成分不含、合成低温（2～8℃）保存培地

STEMCELL™ TECHNOLOGIES
Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM
TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713
INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM
FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

カタログ番号	07935	100 mL
	07934	16 x 10 mL
	07936	500 mL ボトル
	07945	500 mL バッグ

製品説明

HypoThermosol（登録商標）FRSは、細胞、組織、および臓器の改善されたかつ長期の保存を可能にする最適化された低温（2～8℃）保存培地である。
HypoThermosol（登録商標）FRSは、低温保存過程中の細胞の分子生物学的反応に対処するために、独自に製剤化されている。
HypoThermosol（登録商標）FRSは、低温下で細胞内状態のバランスを保つ濃度の重要なイオンを含む。追加成分には、pH緩衝剤、エネルギー基質、フリーラジカルスカベンジャー、および浸透圧/膠質安定化剤が含まれる。

- すぐに使える
- 無血清、タンパク質不含
- 動物成分不含
- USPグレードでcGMP製造/最高品質の成分
- FDAマスターファイル
- 無菌試験、エンドトキシン試験、および細胞ベースの放出試験

性質

保管： 2～8℃で保管
保存可能期間： ラベル上の有効期限（EXP）まで安定。製品を光への長時間の曝露から保護すること。

危険有害性情報については、安全性データシート（SDS）を参照してください。

製品は室温（15～25℃）で発送される場合があり、受け取り次第冷蔵すること。

取扱い/使用方法

HypoThermosol （登録商標）FRSは、すぐに使用でき、保護剤を含有する。

1. 開封前に、70%エタノールまたはイソプロパノールでHypoThermosol （登録商標）FRS容器の外側をきれいに拭く。
2. 培養液を冷却（2～8℃）HypoThermosol （登録商標）FRSと完全に交換する。HypoThermosol （登録商標）FRSは37℃まで加温しないこと。
3. 冷蔵貯蔵の間は、試料を2～8℃に維持する。HypoThermoso （登録商標）FRS は培養液ではないため、15℃超で使用しないこと。

冷蔵貯蔵の終了時に、細胞を単純に遠心分離してペレット化し、HypoThermosol （登録商標）FRS培地を除去する。
HypoThermosol （登録商標）FRS を、加温した最適な培養液と交換し、チューブを穏やかにはじいて細胞を再懸濁する。

本製品は、21 CFR 820に準拠したcGMP品質管理システムの下で製造されている。

STEMCELL Technologies Inc.による版権（著作権）2016。グラフィックおよび画像を含むすべての権利を保有している。STEMCELL Technologies & Design、STEMCELL Shield Design、およびScientists Helping Scientists は、STEMCELL Technologies Inc.の登録商標である。その他の登録商標はすべて、それぞれの所有者の所有物である。STEMCELLは、STEMCELLおよびその長前者者が提供する情報が正確であることを検証するために あらゆる合理的な努力をしているが、そのような情報の正確性または完全性についていかなる保証も表明も行わない。

【配列表】

0007446619000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
A61K 47/20 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 5/0775(2010.01)
A01N 1/02 (2006.01)

FI
A61K 47/20
A61P 17/02
C12N 1/04
C12N 5/0775
A01N 1/02

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ファン トアン タン
シンガポール共和国 ０４８９４３ シンガポール マーケット ストリート １３７ グレース グローバル ラッフルズ ビルディング ＃０８－０２
(72)発明者 フリード ブライアン エム.
アメリカ合衆国 ８００４５ コロラド州 オーロラ イースト モントビュー ブールバード １２７０５ スイート ２５０ ユニバーシティ オブ コロラド アンシュッツ メディカル キャンパス ディヴィジョン オブ アラージー アンド クリニカル イミュノロジー

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表２００８－５０９６９９（ＪＰ，Ａ）
J. Vis. Exp.，2017年，122，Article.e55224，〈DOI:10.3791/55224〉
日大医誌，2016年，75, [2]，p.61-66

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３５／００－３５／７６８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）