

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7006943号
(P7006943)

(45)発行日 令和4年1月24日(2022.1.24)

(24)登録日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	1/04 (2006.01)	C 1 2 N	1/04
C 1 2 N	5/077(2010.01)	C 1 2 N	5/077
A 0 1 N	1/02 (2006.01)	A 0 1 N	1/02

請求項の数 8 (全25頁)

(21)出願番号	特願2018-549071(P2018-549071)	(73)特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86)(22)出願日	平成29年11月2日(2017.11.2)	(74)代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
(86)国際出願番号	PCT/JP2017/039668	(74)代理人	100188558 弁理士 飯田 雅人
(87)国際公開番号	WO2018/084228	(74)代理人	100140774 弁理士 大浪 一徳
(87)国際公開日	平成30年5月11日(2018.5.11)	(72)発明者	長村 登紀子 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立 大学法人東京大学内
審査請求日	令和2年10月22日(2020.10.22)	(72)発明者	森 有加 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立 大学法人東京大学内
(31)優先権主張番号	特願2016-216346(P2016-216346)		
(32)優先日	平成28年11月4日(2016.11.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、「再生医療実用化研究事業」「臍帯血・臍帯由来間葉系細胞製剤を用いた新規免疫療法・再生医療の開発」委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液、凍結物、及び凍結保存方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

3.0 w / v %以上4.5 w / v %以下のデキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩、及び、ジメチルスルホキシドを含む凍害保護剤と、生理的水溶液と、から実質的になり、血清を含まない、間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液。

【請求項2】

前記ジメチルスルホキシドの含有量が1.0 v / v %以上15.0 v / v %以下である請求項1に記載の間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液。

【請求項3】

さらに、クエン酸若しくはその水和物又はそれらの塩を含み、pHが6.0以上8.0以下である請求項1又は2に記載の間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液。

【請求項4】

さらに、グルコースを含む請求項1～3のいずれか一項に記載の間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液。

【請求項5】

前記生理的水溶液が重炭酸リンガ液である請求項1～4のいずれか一項に記載の間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液。

【請求項6】

間葉系細胞及び間葉系幹細胞と、請求項1～5のいずれか一項に記載の間葉系細胞及び間

葉系幹細胞の凍結保存用溶液とを含む間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結物。

【請求項 7】

前記間葉系細胞及び間葉系幹細胞が臍帯又は臍帯血由来である請求項 6 に記載の間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液を用いる間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液、凍結物、及び凍結保存方法に関する。本願は、2016年11月4日に、日本に出願された特願2016-216346号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

一般に、細胞の凍結保存においては、ヒト若しくは非ヒト動物由来の血清、又は該血清由来のタンパク質成分とジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide; DMSO)とを含む凍害保護剤を用いて保存することが多い。しかしながら、再生医療用途で用いられる製品においては、ヒト若しくは非ヒト動物由来の血清、又は該血清由来のタンパク質成分等を含まないことが望ましい。

【0003】

特許文献1には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、DMSO、及びグルコースを含み、天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液が開示されている。

また、特許文献2には、トレハロースとデキストランとを含む細胞移植用生理的水溶液を用いて、哺乳動物細胞を保存する方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】特開2015-142559号公報
特開2016-034279号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

特許文献1に記載の凍結保存用溶液では、天然の動物由来成分を含まないが、カルボキシメチルセルロースナトリウムが含まれるため、再生医療等における臨床使用が難しい。

また、特許文献2に記載の細胞移植用生理的水溶液は、天然の動物由来成分及びカルボキシメチルセルロースナトリウム等の添加物を含まないが、保存温度が0~37であり、細胞の凍結における品質及び安全性が担保されていない。

【0006】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、細胞の生存率を保ちながら細胞を凍結可能であり、かつ天然の動物由来成分を含まない動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液、凍結物、及び凍結保存方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、特定の濃度のデキストラン及びDMSOを含む凍害保護剤を含む凍結保存用溶液を用いることで、細胞の生存率を保ちながら細胞を凍結できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

本発明の第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液は、3.0w/v

10

20

30

40

50

%以上4.5 w/v%以下のデキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩、及び、ジメチルスルホキシドを含む凍害保護剤と、生理的水溶液と、から実質的になり、血清を含まない。

【0009】

上記第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液において、前記ジメチルスルホキシドの含有量が1.0 v/v%以上15.0 v/v%以下であってもよい。

【0010】

上記第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液は、さらに、クエン酸若しくはその水和物又はそれらの塩を含み、pHが6.0以上8.0以下であってもよい。

【0011】

上記第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液は、さらに、グルコースを含んでもよい。

【0012】

上記第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液において、前記生理的水溶液が重炭酸リンガル液であってもよい。

【0013】

本発明の第2態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結物は、間葉系細胞及び間葉系幹細胞と、上記第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液とを含む。

【0014】

上記第2態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結物において、前記間葉系細胞及び間葉系幹細胞が臍帯又は臍帯血由来であってもよい。

【0015】

本発明の第3態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存方法は、上記第1態様に係る間葉系細胞及び間葉系幹細胞の凍結保存用溶液を用いる方法である。

【発明の効果】

【0024】

上記態様によれば、細胞の生存率を保ちながら細胞を凍結可能であり、かつ天然の動物由来成分を含まない動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液、凍結物、及び凍結保存方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】実施例1における凍結保存用溶液1を用いて凍結した臍帯由来細胞について解凍から0、2、及び4日培養後の細胞数を示すグラフである。

【図2】実施例2における凍結保存用溶液1～6を用いて凍結した臍帯由来細胞について解凍から0、2、及び4日培養後の細胞数を示すグラフである。

【図3】実施例3における凍結保存用溶液1、及び7～11の調製から0分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、及び6時間後でのpHの変動を示すグラフである。

【図4】実施例5における凍結保存用溶液12を用いて凍結し、解凍した臍帯由来間葉系(幹)細胞(Mesenchymal stem/stromal cell; MSC)の各種細胞表面マーカーを検出した結果を示すグラフである。

【図5】実施例5における凍結保存用溶液12を用いて凍結し、解凍した臍帯由来MSCから分化誘導された脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨芽細胞を示す顕微鏡像である。脂肪細胞のスケールバーは100 μmである。骨芽細胞のスケールバーは200 μmである。軟骨芽細胞のスケールバーは200 μmである。

【図6】実施例5における凍結保存用溶液12を用いて凍結し、解凍した臍帯由来MSCの免疫抑制能の確認試験の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

<動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液>

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明は、0.5 w/v%以上6.0 w/v%以下のデキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩、及び、ジメチルスルホキシドを含む凍害保護剤と、生理的水溶液と、から実質的になる動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液を提供する。

【0027】

本実施形態の動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液によれば、細胞の生存率を保ちながら、細胞を凍結することができる。また、本実施形態の凍結保存用溶液を用いて保存された動物細胞又は動物組織、特にヒト細胞又はヒト組織においては、天然の動物由来のタンパク質成分及びカルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリエチレングリコール等の増粘剤を含まないため、臨床使用において非常に有用である。

【0028】

なお、本明細書において、「～から実質的になる」とは、上記構成成分のみからなる、又は、上記構成成分の効果を損なわない程度にその他の構成成分を含むことを意味する。また、特に、本実施形態の凍結保存用溶液は、その他の構成成分として、天然の動物由来のタンパク質成分及び増粘剤を含まない。そのため、上述のとおり、臨床使用において非常に有用である。

【0029】

なお、「天然の動物由来成分」とは、例えば、血清、動物細胞培養用基礎培地等が挙げられる。血清としては、例えば、成牛血清、仔牛血清、新生仔牛血清、牛胎児血清等が挙げられる。動物細胞培養用基礎培地としては、DMEM、EMEM、RPMI-1640、-MEM、F-12、F-10、M-199等が挙げられる。

【0030】

本実施形態の凍結保存用溶液は、上記の天然の動物由来成分を含まない（特に、無血清である）ため、天然の動物由来成分のロット間での品質の違いの問題を生じることがない。また、血清に含まれる各種サイトカイン、増殖因子、及び、ホルモン等の本来細胞保存に不必要な成分による細胞の性質の変化の虞を回避でき、さらに、動物細胞培養用基礎培地に含まれる由来が不明な成分による影響も回避できる。そのため、天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液は、特に臨床使用において非常に有用である。

【0031】

また、本実施形態の凍結保存用溶液の適用対象となる細胞又は組織の由来となる動物、動物細胞の種類、及び、動物組織の種類については、後述の「<動物細胞又は動物組織の凍結物>」において例示されるとおりである。

【0032】

[凍害保護剤]

本実施形態の凍結保存用溶液は、凍害保護剤として、デキストランとジメチルスルホキシド（以下、「DMSO」と称する場合がある。）と、を含む。

【0033】

なお、一般に、「凍害保護剤」とは、細胞の機能や生存率をできるだけ維持するため、凍結に由来する様々な障害を防止する目的で使用される物質を意味する。従来から用いられている凍害保護剤としては、例えば、DMSO、グリセリン、トレハロース等が挙げられる。

【0034】

本実施形態の凍結保存用溶液において、DMSOは、細胞内凍害保護剤として働いており、細胞内に浸透し、氷晶の形成を抑制することで、凍結時における細胞へのダメージを軽減している。

【0035】

また、本実施形態の凍結保存用溶液において、デキストランは、細胞外凍害保護剤として働いており、細胞表面に吸着し、浸透圧差により細胞外に流出した水等による氷晶の形成を抑制し、細胞同士の凝集を抑制している。

【0036】

（デキストラン）

10

20

30

40

50

本実施形態の凍結保存用溶液に用いられるデキストランは、D - グルコースからなる多糖 ($C_6H_{10}O_5$)_n であり、1 - 6 結合を主鎖とするものであって、細胞内に浸透しない程度の分子量のものをを用いればよい。

【0037】

デキストランの重量平均分子量 (Mw) としては、例えば、デキストラン 40 (Mw = 40000)、デキストラン 70 (Mw = 70000) 等を挙げられ、これらに限定されない。

【0038】

これらのデキストランは、化学合成、微生物による生産、酵素による生産等のいずれの公知の方法で製造してもよく、市販品を用いてもよい。デキストランの市販品としては、例えば、デキストラン 40 (大塚製薬工場社製)、デキストラン 70 (東京化成工業社製) 等の市販品が挙げられる。

10

【0039】

デキストラン誘導体としては、例えば、デキストラン硫酸、カルボキシル化デキストラン、ジエチルアミノエチル (DEAE) - デキストラン等が挙げられる。

【0040】

デキストラン又はその誘導体の塩としては、例えば、無機酸との酸付加塩、有機酸との酸付加塩、金属塩、塩基性塩を挙げられ、これらに限定されない。

【0041】

前記無機酸との酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、リン酸塩、硝酸塩、硫酸塩、酢酸塩等が挙げられる。

20

【0042】

前記有機酸との酸付加塩としては、例えば、プロピオン酸塩、トルエンシルホン酸塩、コハク酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、グリコール酸塩、メタンシルホン酸塩、酪酸塩、吉草酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩等が挙げられる。

【0043】

前記金属塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。

【0044】

前記塩基性塩としては、例えば、アンモニウム塩、アルキルアンモニウム塩等が挙げられる。

30

【0045】

なお、これらの塩は使用時において溶液として用いられ、その作用は、デキストランの場合と同効なものが好ましい。これらの塩類は、水和物又は溶媒和物を形成していてもよく、またいずれかを単独で又は2種以上を適宜組み合わせ用いてもよい。

【0046】

本実施形態の凍結保存用溶液におけるデキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩の含有量としては、0.5 w/v % 以上 6.0 w/v % 以下であることが好ましく、1.0 w/v % 以上 5.0 w/v % 以下であることがより好ましく、3.0 w/v % 以上 4.5 w/v % 以下であることがさらに好ましい。

【0047】

デキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩の含有量が上記下限値以上であることにより、細胞外凍害保護剤としての機能をより効果的に果たすことができる。一方、デキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩の含有量が上記上限値以下であることにより、細胞同士の凝集をより効果的に抑制することができる。

40

【0048】

(ジメチルスルホキシド)

本実施形態の凍結保存用溶液に用いられるジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide; DMSO) は、細胞への影響からなるべく純度の高いものを用いることが好ましい。

【0049】

50

本実施形態の凍結保存用溶液におけるDMSOの含有量としては、1.0 v/v%以上15.0 v/v%以下であることが好ましく、5.0 v/v%以上12.5 v/v%以下であることがより好ましく、7.5 v/v%以上10.0 v/v%以下であることがさらに好ましい。

【0050】

DMSOの含有量が上記下限値以上であることにより、細胞内により効果的に浸透し、氷晶の形成を抑制することで、凍結時における細胞へのダメージを軽減することができる。一方、DMSOの含有量が上記上限値以下であることにより、細胞毒性をより効果的に抑制することができる。

【0051】

[生理的水溶液]

本実施形態の凍結保存用溶液に用いられる生理的水溶液としては、体液や細胞液の浸透圧とほぼ同じになるようにナトリウムやカリウム等によって塩濃度や糖濃度等を調整した等張水溶液であればよい。前記生理的水溶液としては、例えば、生理食塩水、緩衝効果のある生理食塩水（リン酸緩衝生理食塩水 [Phosphate buffered saline; PBS]、トリス緩衝生理食塩水 [Tris Buffered Saline; TBS]、HEPES緩衝生理食塩水等）、リンゲル液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液、5%グルコース水溶液、等張剤（ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンニトール、ラクトース、塩化ナトリウム等）等を挙げられ、これらに限定されない。中でも、重炭酸リンゲル液であることが好ましい。

【0052】

一般に、「重炭酸リンゲル液」は、マグネシウム、カリウム、カルシウム、ナトリウム、及び重炭酸イオン等を含む等張水溶液であって、血小板の洗浄及び保存用途で用いられている。マグネシウム、カリウム、カルシウム、ナトリウム、及び重炭酸イオンの各濃度については、体液や細胞液と近い浸透圧となる濃度であれば、特別限定されない。

【0053】

生理的水溶液は、市販品を使用してもよく、自ら調製してもよい。前記市販品としては、例えば、大塚生食注（大塚製薬工場社製）（生理食塩液）、リンゲル液「オツカ」（大塚製薬工場社製）（リンゲル液）、ラクテック（登録商標）注（大塚製薬工場社製）（乳酸リンゲル液）、ヴィーンF輸液（興和興和創薬社製）（酢酸リンゲル液）、大塚糖液5%（大塚製薬工場社製）（5%グルコース水溶液）、ピカネイト（登録商標）輸液（大塚製薬工場社製）（重炭酸リンゲル液）、ピカーボン（登録商標）輸液（エイワイファーマ社製）等が挙げられ、これらに限定されない。

【0054】

なお、本明細書において、「等張」とは、浸透圧が250 mOsm/L以上380 mOsm/L以下であることを意味する。

【0055】

本実施形態の凍結保存用溶液における生理的水溶液の含有量としては、例えば30 v/v%以上98.5 v/v%以下とすることができ、例えば30 v/v%以上95 v/v%以下であればよく、例えば40 v/v%以上90 v/v%以下とすることができる。

【0056】

[その他構成成分]

(pH調整剤)

本実施形態の凍結保存用溶液のpHは、生体内に近い値であればよく、具体的には、6.0以上8.0以下であることが好ましい。

pHが上記範囲であることにより、解凍後、そのまま安全に生体内（例えば、静脈内等）に投与することができる。

【0057】

本実施形態の凍結保存用溶液は、上記pHとなるように調整するために、さらに、pH調整剤を含むことが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

pH調整剤としては、酸及びその塩であることが好ましく、pHを調整できるものであれば、特に制限はない。例えば、酸としては、クエン酸、乳酸、リン酸、酢酸、グルコン酸、コハク酸、炭酸、塩酸、硫酸、硝酸、シュウ酸、ホウ酸、又はそれらの水和物等が挙げられる。

【 0 0 5 9 】

また、前記酸の塩としては、pHを上記範囲内に保ち、還元型生体分子を酸化する作用を有さないものであればよく、前記酸と同じ種類の酸由来の塩であることが好ましい。

【 0 0 6 0 】

前記酸の塩としては、例えば、クエン酸塩、乳酸塩、リン酸塩、酢酸塩、グルコン酸塩、コハク酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、ホウ酸塩、及び、これら酸のうち2種以上の酸との塩等が挙げられ、これらに限定されない。

10

【 0 0 6 1 】

前記クエン酸塩としては、例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、及びこれらの水和物等が挙げられる。

【 0 0 6 2 】

前記乳酸塩としては、例えば、乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウム等が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

前記リン酸塩としては、例えば、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム等が挙げられる。

20

【 0 0 6 4 】

前記酢酸塩としては、例えば、酢酸ナトリウム等が挙げられる。

【 0 0 6 5 】

前記グルコン酸塩としては、例えば、グルコン酸ナトリウム等が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

前記コハク酸塩としては、例えば、コハク酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、及びこれらの水和物等が挙げられる。

【 0 0 6 7 】

前記炭酸塩としては、例えば、炭酸アンモニウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸マグネシウム等が挙げられる。

30

【 0 0 6 8 】

前記重炭酸塩としては、例えば、炭酸水素アンモニウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素カルシウム、炭酸水素ナトリウム（重曹）等が挙げられる。

【 0 0 6 9 】

前記塩酸塩としては、例えば、塩化アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム等が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

前記硫酸塩としては、例えば、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム等が挙げられる。

40

【 0 0 7 1 】

前記硝酸塩としては、例えば、硝酸アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム等が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

前記シュウ酸塩としては、例えば、シュウ酸アンモニウム、シュウ酸ナトリウム等が挙げられる。

【 0 0 7 3 】

前記ホウ酸塩としては、例えば、メタホウ酸ナトリウム、四ホウ酸ナトリウム等が挙げられる。

【 0 0 7 4 】

50

前記 2 種以上の酸との塩としては、乳酸グルコン酸カルシウム等が挙げられる。

【 0 0 7 5 】

中でも、pH調整剤としては、生体内に存在する化合物であることから、クエン酸若しくはその水和物又はそれらの塩であることが好ましく、クエン酸水和物又はクエン酸ナトリウム水和物であることがより好ましい。

【 0 0 7 6 】

pH調整剤は、市販品を使用してもよく、自ら調製してもよい。前記市販品としては、例えば、生物学的製剤基準血液保存液 A 液（以下、「ACD - A 液」と称する場合がある。）等が挙げられ、これらに限定されない。

【 0 0 7 7 】

本実施形態の凍結保存用溶液における pH調整剤の含有量としては、0.01w/v%以上 1.0w/v%以下であることが好ましく、0.05w/v%以上 0.5w/v%以下であることがより好ましい。

pH調整剤の含有量が上記範囲であることにより、凍結保存用溶液の pHを生体内に近い範囲に収めることができる。

【 0 0 7 8 】

（糖類）

本実施形態の凍結保存用溶液は、さらに、糖類を含んでいてもよい。糖類としては、特に限定はなく、例えば、多糖類、少糖類、二糖類、単糖類等が挙げられる。

【 0 0 7 9 】

前記多糖類としては、例えば、デンプン、グリコーゲン等が挙げられる。

【 0 0 8 0 】

前記少糖類としては、例えば、ラフィノース、スタキオース等が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

前記二糖類としては、例えば、スクロース、マルトース等が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

前記単糖類としては、例えば、六炭糖、五炭糖等が挙げられる。

【 0 0 8 3 】

前記六炭糖としては、例えば、アルドヘキソース、ケトヘキソース、デオキシ糖等が挙げられる。

【 0 0 8 4 】

前記アルドヘキソースとしては、例えば、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース等が挙げられる。

【 0 0 8 5 】

前記ケトヘキソースとしては、例えば、プリコース、フルクトース、ソルボース、タガロース等が挙げられる。

【 0 0 8 6 】

前記デオキシ糖としては、例えば、フコース、フクロース、ラムノース等が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

前記五炭糖としては、例えば、リブロース、キシロース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース等が挙げられる。

【 0 0 8 8 】

中でも、糖類は、解凍後、動物細胞又は動物組織の生育に必要なエネルギー源となることから、グルコースであることが好ましい。

【 0 0 8 9 】

本実施形態の凍結保存用溶液における糖類の含有量としては、0.5w/v%以上 10.0w/v%以下であることが好ましく、1.05w/v%以上 10.0w/v%以下であることがより好ましく、2.05w/v%以上 8.0w/v%以下であることがさらに好ましく、2.05w/v%以上 5.0w/v%以下であることが特に好ましい。

糖類の含有量が上記範囲であることにより、解凍後、動物細胞又は動物組織の生育に必要な

10

20

30

40

50

なエネルギー源を十分に供給することができる。

【0090】

<動物細胞又は動物組織の凍結物>

一実施形態において、本発明は、動物細胞又は動物組織と、上述の動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液とを含む動物細胞又は動物組織の凍結物を提供する。

【0091】

本実施形態の動物細胞又は動物組織の凍結物によれば、天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液を使用しているため、解凍後、そのまま臨床使用が可能である。

【0092】

本実施形態において、細胞又は組織の由来となる動物としては、哺乳動物であることが好ましい。

10

【0093】

前記哺乳動物としては、例えば、げっ歯類、ウサギ目、有蹄目、ネコ目、霊長類等が挙げられ、これらに限定されない。

【0094】

前記げっ歯類としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等が挙げられる。

【0095】

前記ウサギ目としては、例えば、ウサギ等が挙げられる。

【0096】

前記有蹄目としては、例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等が挙げられる。

20

【0097】

前記ネコ目としては、例えば、イヌ、ネコ等が挙げられる。

【0098】

前記霊長類としては、例えば、ヒト、サル、アカゲザル、カニクイザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジー等が挙げられる。

【0099】

中でも、実験又は臨床用途で用いられることから、動物は、マウス及びヒトが好ましい。

【0100】

また、本実施形態において、動物細胞としては、例えば、再生医療等に血管経由で投与される幹細胞、I型糖尿病患者に経静脈投与される膵島細胞、がん患者に経静脈投与される樹状細胞、単球、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞(例えば、アルファ・ベータ()T細胞、ガンマ・デルタ()T細胞、細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)、ヘルパーT細胞等)、B細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、間葉系細胞等が挙げられる。

30

【0101】

なお、上記細胞のうち、NK細胞、T細胞、B細胞を合わせて「リンパ球」と称する場合があります。さらに、単球、及びリンパ球を合わせて、「単核球」と称する場合があります。

【0102】

これら細胞は、公知の一般的な方法で単離することができる。例えば、白血球、T細胞、ヘルパーT細胞、細胞障害性T細胞、及び、 T細胞の単離は、例えば、溶血処理した末梢血又は臍帯血試料から、細胞表面マーカに対する抗体を用いた蛍光活性化セルソーター(FACS)により行うことができる。又は、例えば、溶血処理した末梢血又は臍帯血試料から、細標識物質で標識した細胞表面マーカに対する抗体と、かかる標識物質に対する抗体とMACSビーズ(磁性ビーズ)とのコンジュゲート抗体と、を用いた自動磁気細胞分離装置(autoMACS)により行うことができる。

40

【0103】

前記細胞表面マーカとしては、例えば、白血球の細胞表面マーカ(CD45)、T細胞の細胞表面マーカ(CD3)、ヘルパーT細胞の細胞表面マーカ(CD4)、細胞障害性T細胞(CD8)、 T細胞の細胞表面マーカ(CD39)等が挙げられる。

50

【0104】

前記標識物質としては、例えば、蛍光物質、ビオチン、アビジン等が挙げられる。

【0105】

前記蛍光物質としては、例えば、アロフィコシアニン (APC)、フィコエリトリン (PE)、FITC (fluorescein isothiocyanate)、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700、PE-Texas Red、PE-Cy5、PE-Cy7等が挙げられる。

【0106】

また、本明細書において、「幹細胞」とは、自己複製能、並びに分化及び増殖能を有する未熟な細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)、複能性幹細胞 (multipotent stem cell)、単能性幹細胞 (unipotent stem cell) 等の亜集団が含まれる。

10

【0107】

「多能性幹細胞」とは、それ自体では個体になることができないが、生体を構成する全ての組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

【0108】

「複能性幹細胞」とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

【0109】

「単能性幹細胞」とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

20

【0110】

多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞 (ES細胞)、EG細胞、iPS細胞等が挙げられる。

【0111】

ES細胞は、内部細胞塊をフィーダー細胞上又はLIFを含む培地中で培養することにより製造することができる。ES細胞の製造方法は、例えば、WO96/22362、WO02/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718等に記載されている。

【0112】

EG細胞は、始原生殖細胞をmSCF、LIF、及びbFGFを含む培地中で培養することにより製造することができる (Cell, 70:841-847, 1992)。

30

【0113】

iPS細胞は、体細胞 (例えば線維芽細胞、皮膚細胞等) にOct3/4、Sox2、及びKlf4 (必要に応じて更にc-Myc又はn-Myc) 等のリプログラミング因子を導入することにより製造することができる (Cell, 126:p.663-676, 2006; Nature, 448:p.313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26;p.101-106, 2008; Cell 131:p.861-872, 2007; Science, 318:p.1917-1920, 2007; Cell Stem Cells 1:p.55-70, 2007; Nat Biotechnol, 25:p.1177-1181, 2007; Nature, 448:p.318-324, 2007; Cell Stem Cells 2:p.10-12, 2008; Nature 451:p.141-146, 2008; Science, 318:p.1917-1920, 2007)。

40

【0114】

体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した幹細胞も、多能性幹細胞としてまた好ましい (Nature, 385, 810 (1997); Science, 280, 1256 (1998); Nature Biotechnology, 17, 456 (1999); Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. A

50

cad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)), Rideout IIIら (Nature Genetics, 24, 109 (2000))。

【0115】

複能性幹細胞としては、例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等の細胞に分化可能な間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC)、白血球、赤血球、血小板等の血球系細胞に分化可能な造血系幹細胞、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト等の細胞に分化可能な神経系幹細胞、骨髄幹細胞、生殖幹細胞等の体性幹細胞等が挙げられる。

【0116】

複能性幹細胞は、好ましくは間葉系幹細胞である。

10

【0117】

「間葉系幹細胞」とは、骨芽細胞、軟骨芽細胞、及び、脂肪芽細胞の全て又はいくつかへの分化が可能な幹細胞を意味する。

【0118】

複能性幹細胞は、自体公知の方法により、生体から単離することができる。例えば、間葉系幹細胞は、哺乳動物の骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯、臍帯血等から公知の一般的な方法で採取することができる。例えば、骨髄穿刺後の造血幹細胞等の培養、継代によりヒト間葉系幹細胞を単離することができる (Journal of Autoimmunity, 30 (2008) 163-171)。複能性幹細胞は、前記多能性幹細胞を適切な誘導条件下で培養することによっても得ることができる。

20

【0119】

中でも、動物細胞は、臍帯又は臍帯血由来であることが好ましく、臍帯又は臍帯血由来の間葉系 (幹) 細胞、又は、臍帯血由来の単核球であることがより好ましい。

【0120】

なお、本明細書において、「間葉系 (幹) 細胞」とは、分化型細胞である間葉系 (中胚葉性組織) に属する細胞 (すなわち、間葉系細胞) と上記間葉系幹細胞とを包含する。

【0121】

また、本実施形態において、動物組織としては、上述の動物細胞を含む組織であればよく、例えば、骨髄、脂肪組織、臍帯、胎盤等が挙げられ、これらに限定されない。

【0122】

中でも、動物組織は、臍帯由来、すなわち臍帯組織であることが好ましい。

30

【0123】

本実施形態の凍結物は、解凍後に良好な数の生細胞を回収することができ (後述の実施例を参照)、例えば、2週間経過後において、凍結していない動物細胞又は動物組織から回収される生細胞数の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは100%以上の数の生細胞を回収することができる。

【0124】

また、本実施形態の凍結物は、1ヶ月経過後、3ヶ月経過後、6ヶ月経過後、1年経過後、3年経過後、5年経過後、若しくは10年経過後において、又はそれ以上経過後において (半永久的に)、凍結していない動物細胞又は動物組織から回収される生細胞数の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは100%以上の数の生細胞を回収し得る。

40

【0125】

本実施形態の凍結物は、後述の回収方法を用いて生細胞が回収されてもよい。回収された生細胞は、医療又は研究等に用いることができる。

【0126】

<動物細胞又は動物組織の凍結保存方法>

一実施形態において、本発明は、上述の動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液を用いる動物細胞又は動物組織の凍結保存方法を提供する。

【0127】

50

本実施形態の凍結保存方法によれば、細胞の生存率を保ちながら、細胞を凍結することができる。また、天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液を使用しているため、解凍後、そのまま臨床使用が可能である。

本実施形態の凍結保存方法について、以下に詳細に説明する。

【0128】

まず、上述の凍結保存用溶液に動物細胞又は動物組織を浸漬する。浸漬する動物細胞又は動物組織は、由来となる動物から採取されてからの時間が短いほど、生細胞の数が多いため、好ましい。例えば、由来となる動物から採取されてから48時間以内のものをを用いることが好ましく、36時間以内のものをを用いることがより好ましく、24時間以内のものをを用いることがさらに好ましい。例えば、動物組織が臍帯組織である場合、出産後の母体から採取された胎盤及び臍帯から、臍帯血を採血後に胎盤から切離して得ることができる。

10

【0129】

浸漬する温度は特に限定されないが、酵素活性を低く抑え、細菌感染を防止する観点から0以上15以下であることが好ましく、1以上7以下であることがより好ましい。

【0130】

浸漬する時間は特に限定されないが、下限値は、1時間以上であることが好ましく、一方、上限値は、細胞のエピジェネティクスへの影響を低減する観点からは18時間以下であることが好ましく、6時間以下であることがより好ましい。

浸漬する圧力は特に限定されず、例えば、常圧で行えばよい。

【0131】

浸漬する際に、凍結保存用溶液及び動物細胞又は動物組織を入れる容器は、特に限定されない。例えば、耐寒性の容器内で浸漬を行い、容器毎凍結を行えば、手間が省けるため好ましい。耐寒性の程度は、動物細胞又は動物組織を保存する温度に耐え得るものであれば特に限定されないが、例えば-80に耐え得る材料であることが好ましく、例えば-200に耐え得る材料であることが好ましい。

20

【0132】

耐寒性の容器としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネイト、フッ化エチレンプロピレン等の合成樹脂製の容器が挙げられ、容器の形態としては、バッグ及びチューブ等が挙げられる。

【0133】

容器は、凍結保存用溶液及び動物細胞又は動物組織を入れた後に密封できるものが好ましく、また内部が滅菌されていることが好ましい。

30

【0134】

次いで、動物細胞又は動物組織を凍結保存用溶液に浸漬した状態で凍結する。最終的な凍結温度は特に限定されないが、-80以下が好ましく、-150以下がより好ましく、-196.5以下がさらに好ましい。冷却速度は特に限定されないが、緩速で冷却することが好ましい。緩速で冷却する場合、例えば、バイセル等を用いればよい。例えば、-80付近で保存したい場合、0.5時間以上5時間以下の時間をかけて当該温度まで冷却することが好ましい。また、-80付近で保存した動物細胞又は動物組織を-200以上-180以下（例えば、液体窒素中等）に移して保存してもよい。動物細胞又は動物組織を耐寒性の容器に入れて凍結することが好ましい。

40

【0135】

本実施形態の凍結保存方法を用いて凍結保存された動物細胞又は動物組織は、解凍後に良好な数の生細胞を回収することができる（後述の実施例を参照）。生細胞の回収は、例えば、後述の「[凍結保存動物細胞又は動物組織からの生細胞の回収方法]」に従って行うことができる。

【0136】

本実施形態の凍結保存方法を用いて凍結保存された動物細胞又は動物組織は、例えば、2週間経過後において、凍結していない動物細胞又は動物組織から回収される生細胞数の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは100

50

%以上の数の生細胞を回収することができる。

【0137】

また、本実施形態の凍結保存方法を用いて凍結保存された動物細胞又は動物組織は、1ヶ月経過後、3ヶ月経過後、6ヶ月経過後、1年経過後、3年経過後、5年経過後、若しくは10年経過後において、又はそれ以上経過後において（半永久的に）、凍結していない動物細胞又は動物組織から回収される生細胞数の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは100%以上の数の生細胞を回収し得る。

【0138】

したがって、本実施形態の凍結保存方法を用いて動物細胞又は動物組織を凍結保存しておけば、将来自他の医療の際に、解凍して用いることができる。また、現在の技術では分取
10
されていない可能性のある未知の細胞が将来的に単離可能になった際に、有効に用いることができる。例えば、現在治療法がない疾患であっても、将来的に治療法が開発された際に、凍結保存しておいた動物細胞又は動物組織を利用することが可能となる。また、先天性遺伝子疾患等においては、遺伝子治療用の自家細胞ソースとして利用することもできる。

【0139】

[凍結保存動物細胞又は動物組織からの生細胞の回収方法]

一実施形態において、本発明は、凍結保存動物細胞又は動物組織からの生細胞の回収方法
20
であって、上述の凍結保存方法を用いて凍結保存されている動物細胞又は動物組織を解凍する解凍工程を備える方法を提供する。

【0140】

本実施形態の回収方法によれば、天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液を使用し
20
ているため、解凍後、動物細胞又は動物組織をそのまま臨床使用が可能である。

【0141】

解凍工程における温度は特に限定されないが、10 以上40 以下であることが好ましく、30 以上40 以下であることがより好ましい。解凍は急速に行うことが好ましく、例えば、37 以上38 以下のウォーターバスを用いて解凍すればよい。上述の凍結保存方法において動物細胞又は動物組織を格納した容器から動物細胞又は動物組織を取り出して解凍を行ってもよいが、容器ごと解凍を行うことが好ましい。

【0142】

本実施形態の回収方法は、解凍した動物細胞又は動物組織に付着している凍結保存用溶液
30
を除去する洗浄工程を含んでいてもよい。

【0143】

洗浄工程で用いる液体はその後の処理内容及び細胞の使用用途に応じて適宜選択すればよく、例えば、上述の生理的溶液等を用いて洗浄すればよい。洗浄工程は、解凍工程後すぐに行うことが好ましい。

【0144】

次いで、凍結保存されたものが動物組織である場合、解凍工程又は洗浄工程の後に、解凍した動物組織から生細胞を回収する細胞回収工程を備えていてもよい。

【0145】

細胞を回収する方法は特に限定されない。例えば、動物組織から細胞を回収するための公知の方法を用いることができる。その一例として、エクスプラント法による細胞培養を行う方法が挙げられる。
40

【0146】

エクスプラント法による細胞培養では、動物組織を細切し、細胞培養用ディッシュに組織片を張り付けて9日以上21日以下程度培養を行う。その後、トリプシンで細胞を組織片ごと剥離してメッシュ（セルストレーナー等も用いればよい）を用いて組織片を除いてから、細胞のみを回収する。

【0147】

したがって、本実施形態の回収方法の一実施形態では、細胞回収工程の前に、エクスプラント法による細胞培養を行う培養工程を備える。
50

【 0 1 4 8 】

その他、コラゲナー等の酵素を用いて細切した組織片を分離して細胞を得る方法も挙げられる。培養工程の前に洗浄工程を行うことが好ましい。

【 0 1 4 9 】

また、上述のように本実施形態の凍結保存方法は半永久的に良好な状態で保存し得るため、将来的に開発される細胞回収方法に用いられることができる。

【 0 1 5 0 】

本実施形態の回収方法によって回収される生細胞は特に限定されず、上述の「＜動物細胞又は動物組織の凍結物＞」において例示された動物細胞と同様のものが挙げられる。又は、現在では分離できていない未知の細胞であり得る。

10

【 0 1 5 1 】

なお、回収される生細胞は、動物組織に含まれるオリジナルの細胞に限らず、培養工程において増殖した細胞（すなわち、オリジナルの細胞のコピー）であってもよい。回収された生細胞は、医療又は研究等に用いることができる。

【 0 1 5 2 】

本実施形態の凍結保存方法及び回収方法を用いれば、幹細胞又は前駆細胞のような分化の程度が低い細胞をその状態で回収し得る（後述の実施例を参照）。

【 0 1 5 3 】

そのため、一実施形態において、本発明は、上述の回収方法を用いて回収された生細胞又はそれを継代培養した細胞を、所望の細胞に分化させる分化方法を提供する。継代培養及び所望の細胞への分化方法は、例えば、公知の方法に従えばよい。

20

【 0 1 5 4 】

＜動物細胞又は動物組織の凍結保存用キット＞

一実施形態において、本発明は、上述の凍結保存用溶液と、前記凍結保存用溶液及び動物細胞又は動物組織を格納可能な耐寒性の容器と、を備える動物細胞又は動物組織の凍結保存用キットを提供する。

【 0 1 5 5 】

本実施形態の凍結保存用キットによれば、細胞の生存率を保ちながら、細胞を凍結することができる。また、天然の動物由来成分を含まない凍結保存用溶液を使用しているため、解凍後、そのまま臨床使用が可能である。

30

【 0 1 5 6 】

また、本実施形態の凍結保存用キットは、上述の「＜動物細胞又は動物組織の凍結保存方法＞」に好適に用いられる。

【 0 1 5 7 】

容器は、凍結保存用溶液及び動物細胞又は動物組織を格納可能であり、かつ耐寒性であれば、特に限定されない。容器の大きさは、格納する動物細胞又は動物組織の大きさに応じて適宜選択すればよく、例えば、一辺が1 cm以上10 cm以下の箱型の容器であってもよく、一辺が3 cm以上15 cm以下のバッグであってもよい。また、細胞及び組織片の凍結保存時に通常使用される凍結チューブであってもよい。

【 0 1 5 8 】

耐寒性の程度は、動物細胞又は動物組織を保存する温度に耐え得るものであれば特に限定されないが、例えば - 80 に耐え得る材料であることが好ましく、例えば - 200 に耐え得る材料であることが好ましい。そのような容器として具体的には、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネイト、フッ化エチレンプロピレン等の合成樹脂製の容器が挙げられる。

40

【 0 1 5 9 】

本実施形態の凍結保存用キットは、さらに、キットの使用説明書を備えていてもよい。キットの使用説明書には、上記「＜動物細胞又は動物組織の凍結保存方法＞」で説明した、本実施形態の凍結保存方法の内容が記録されている。また、キットの使用説明書には、さらに、上記「[凍結保存動物細胞又は動物組織からの生細胞の回収方法]」で説明した、

50

本実施形態の回収方法の内容が記録されていてもよい。

【実施例】

【0160】

以下、実施例及び比較例等を挙げて本発明をさらに詳述するが、本発明はこれらの実施例等に限定されるものではない。

【0161】

[実施例1]

(1) 凍結保存用溶液1の調製

ブドウ糖加デキストラン40注射液(大塚製薬工場社製) 45w/v%(デキストラン濃度としては4.5w/v%、及びグルコース濃度としては2.25w/v%含有)、ピカネイト(登録商標)(大塚製薬工場社製) 45w/v%、並びにDMSO 10v/v%を含む滅菌した凍結保存用溶液1を調製した。なお、凍結保存用溶液1は、天然の動物由来成分を含んでいない。

10

【0162】

(2) 臍帯由来の間葉系(幹)細胞の凍結

次いで、臍帯由来の間葉系(幹)細胞 1.0×10^6 細胞/mL及び(1)で調製した凍結保存用溶液1 1mLをチューブに入れてキャップを閉めて密封した。次いで、ミスターフロスティーに入れて-80の冷凍後で凍結した。翌日、窒素タンク(-196)に移動して保管した。

【0163】

(3) 臍帯由来の間葉系(幹)細胞の解冻

次いで、凍結開始から2週間後に(2)において凍結した臍帯由来の間葉系(幹)細胞を37以上38以下のウォーターバスに入れて解冻した。解冻後、無血清培地(RM)(ロート製薬社製)で洗浄後、4にて1,800rpm、10分間遠心分離した。次いで、上清を除去し、ペレットに無血清培地(RM)(ロート製薬社製)1mLを添加し、懸濁した。次いで、実体顕微鏡(XN-100)下にてワンセルカウンターを用いて全細胞数を測定した。また、トリパンブルー染色法を用いて全細胞数と死細胞数とを測定し、生細胞率を計算したところ、95.4%と高く、これは従来の凍結保存用溶液を用いた場合と同程度の生細胞率であった。なお、トリパンブルーとは、生細胞の細胞膜を透過できず、死細胞のみ浸透して青色に染色する。トリパンブルーは、市販品の0.4~0.5w/v%を利用した。

20

【0164】

(4) 凍結解冻後の臍帯由来の間葉系(幹)細胞の増殖試験

次いで、凍結解冻後の臍帯由来の間葉系(幹)細胞を 1.0×10^4 細胞/ウェルずつ6穴ディッシュに播種し、2日毎に細胞を回収し生細胞数を測定し、増殖曲線を作成した。結果を図1に示す。

【0165】

図1から、凍結解冻後の臍帯由来の間葉系(幹)細胞は問題なく増殖することが確かめられた。また、増殖速度は、図示しないが従来の凍結保存用溶液を用いた場合と同程度であった。

30

40

【0166】

[実施例2]

(1) 凍結保存用溶液1~6の調製

デキストラン、グルコース、ピカネイト、DMSO、及びヒト血清アルブミンの含有率が、以下の表1の値となるように凍結保存用溶液1~6を調製した。なお、凍結保存用溶液6は、樹来のテムセルHS注(ヒト骨髓由来間葉系(幹)細胞含有静注用製剤)の溶液の組成と同様のものである。

【0167】

50

【表 1】

凍結保存用溶液	デキストラン含有率 (w/v%)	グルコース含有率 (w/v%)	ビカネイト含有率 (v/v%)	DMSO含有率 (v/v%)	ヒト血清アルブミン含有率 (w/v%)
1	4.50	2.25	45.00	10.00	0.00
2	6.00	3.00	30.00	10.00	0.00
3	3.00	1.50	60.00	10.00	0.00
4	1.00	0.50	80.00	10.00	0.00
5	0.00	0.00	90.00	10.00	0.00
6	0.00	0.00	64.50	10.00	5.00

10

【0168】

(2) 臍帯由来の間葉系(幹)細胞の凍結

次いで、臍帯由来の間葉系(幹)細胞 1.0×10^6 細胞/mL 及び(1)で調製した凍結保存用溶液 1 1 mL をチューブに入れてキャップを閉めて密封した。次いで、ミスターフロスティーに入れて -80 の冷凍後で凍結した。翌日、窒素タンク(-196)に移動して保管した。

【0169】

(3) 臍帯由来の間葉系(幹)細胞の解凍

次いで、凍結開始から2週間後に(2)において凍結した臍帯由来の間葉系(幹)細胞を 37 以上 38 以下のウォーターバスに入れて解凍した。解凍後、無血清培地(RM)(ロート製薬社製)で洗浄後、4 にて 1,200 rpm、5 分間遠心分離した。次いで、上清を除去し、ペレットに無血清培地(RM)(ロート製薬社製) 1 mL を添加し、懸濁した。次いで、トリパンプルー法により、カウンテスを用いて、全細胞数と死細胞数とを測定した。1 mL あたりの生細胞数、及び全細胞数と死細胞数とから計算された生細胞率を以下の表 2 に示す。また、凍結前の生細胞数 (1×10^6 / mL) に対する凍結後の生細胞数から回収率を計算し、以下の表 2 に示す。

20

【0170】

【表 2】

凍結保存用溶液	生細胞率 (%)	凍結解凍後の生細胞数 ($\times 10^5$ / mL)	回収率 (%)
1	98.90	9.40	94.00
2	98.70	7.80	78.00
3	95.30	8.15	81.50
4	94.70	8.05	80.50
5	93.30	7.60	76.00
6	99.50	9.85	98.50

30

【0171】

(4) 凍結解凍後の臍帯由来の間葉系(幹)細胞の増殖試験

次いで、凍結解凍後の臍帯由来の間葉系(幹)細胞を 1.0×10^4 細胞/ウェルずつ 24 ウェルプレートに播種し、2 日毎に細胞を回収し生細胞数を測定し、増殖曲線を作成した。結果を図 2 に示す。

【0172】

表 2 から、いずれの凍結保存用溶液を用いた細胞においても、生細胞率が 90% 以上となり、良好であった。一方、回収率は、デキストラン濃度が 4.5 w/v% である凍結保存用溶液 1 が最も良好であり、テムセル HS 注の溶液の組成である凍結保存用溶液 6 と同様であった。また、デキストラン濃度が 0、又は高濃

40

50

度では、生細胞の回収率が悪かった。

【0173】

また、図2から、デキストランを含有する凍結保存用溶液1～4では、テムセルHS注の溶液の組成である凍結保存用溶液6と増殖速度が同程度であった。一方、デキストラン濃度が0である凍結保存用溶液5では、同数の生細胞を播種したにも関わらず、増殖速度の低下がみられた。

【0174】

[実施例3]

(1) 凍結保存用溶液1、7～11の調製

デキストラン、グルコース、ピカネイト、DMSO、及び生物学的製剤基準血液保存液A液(ACD-A液)(テルモ社製)由来のクエン酸水和物及びクエン酸ナトリウム水和物の含有率が、以下の表3の値となるように凍結保存用溶液1、7～11を調製した。なお、ACD-A液は、クエン酸ナトリウム水和物2.20w/v%、クエン酸水和物0.80w/v%、及びグルコース2.20w/v%含有するものを用いた。

【0175】

【表3】

凍結保存用溶液	デキストラン含有率(w/v%)	グルコース含有率(w/v%)	ピカネイト含有率(v/v%)	DMSO含有率(v/v%)	クエン酸水和物及びクエン酸Na水和物含有率(w/v%)
1	4.50	2.25	45.00	10.00	0.00
7	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
8	4.50	2.25	55.00	0.00	0.00
9	4.50	2.75	42.75	10.00	0.68
10	0.00	0.50	97.75	0.00	0.68
11	4.50	2.75	52.75	0.00	0.68

【0176】

(2) 凍結保存用溶液1、7～11のpH測定

次いで、調製から0分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、及び6時間後の凍結保存用溶液1、7～11、それぞれのpHを測定した。各凍結保存用溶液のpHの経時変化を図3に示す。

【0177】

図3から、ACD-A液を添加した凍結保存用溶液では、pHが7.5以下であり、時間が経過しても安定していた。

【0178】

(3) 臍帯由来の間葉系(幹)細胞の凍結及び解凍

次いで、上記表3の凍結保存用溶液9を用いて、上記実施例1の(2)及び(3)と同様の方法を用いて、異なる3ドナー由来の間葉系(幹)細胞を凍結保存し、2週間後に細胞を解凍した。次いで、トリパンブルー染色法により、カウテスを用いて、全細胞数と死細胞数とを測定した。測定された全細胞数及び死細胞数より計算された生細胞率は、平均90%(92%、87%、及び90%)と良好であった。

【0179】

さらに、解凍後の冷蔵保存した場合における生存率の変化を以下の表4に示す。

【0180】

10

20

30

40

50

【表 4】

経過時間 (時間)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
生細胞率 (%)	94	90	92	92	93	90	96

【0181】

表 4 から、時間が経過しても、90%以上の生細胞率が保たれることが確かめられた。

【0182】

[実施例 4]

(1) 凍結保存用溶液 1、2、5 の調製

デキストラン、グルコース、ピカネイト、及び DMSO の含有率が、上記の表 1 の値となるように凍結保存用溶液 1、2、5 を調製した。

【0183】

(2) 臍帯血由来単核球の凍結

次いで、ヒト臍帯血サンプルから、Ficoll 密度勾配遠心法を用いて、臍帯血由来単核球 (Mononuclear Cells; MNC) を分離した。次いで、臍帯血由来の MNC 1.0×10^7 細胞/mL 及び (1) で調製した凍結保存用溶液 1、2、及び 5 各 1 mL をチューブに入れてキャップを閉めて密封した。次いで、ミスターフロスターに入れて -80 の冷凍後で凍結した。翌日窒素タンク (-196) に移動し、凍結開始から約 1 ヶ月間凍結保存した。

【0184】

(3) 臍帯血由来単核球の解凍

次いで、凍結開始から約 1 ヶ月後に (2) において凍結した臍帯血由来単核球を 37 以上 38 以下のウォーターバスに入れて解凍した。解凍後、RPMI 1640 培地 (10% ウシ胎児血清含有) で洗浄後、4 にて 1,800 rpm、10 分間遠心分離した。次いで、上清を除去し、ペレットに RPMI 1640 培地 (10% ウシ胎児血清含有) 1 mL を添加し、懸濁した。次いで、多項目自動血球分析装置シスメックス (XN-1000) を用いて、全細胞数を測定した。また、AO/EB 法を用いて全細胞数と死細胞数とを測定した。なお、AO とは、acridine orange を示し、生細胞及び死細胞いずれも染色する。また、EB とは、ethidium bromide を示し、生細胞の細胞膜を透過できず、死細胞のみ浸透して染色し、生細胞は緑、死細胞はオレンジに染色される。

1 mL あたりの生細胞数、及び全細胞数と死細胞数とから計算された生細胞率を以下の表 5 に示す。また、凍結前の生細胞数 (1×10^7 / mL) に対する凍結後の生細胞数から回収率を計算し、以下の表 5 に示す。

【0185】

【表 5】

凍結保存用溶液	生細胞率 (%)	凍結解凍後の 生細胞数 ($\times 10^6$ / mL)	回収率 (%)
1	91.60	8.90	89.0
2	93.30	8.80	88.0
5	90.70	8.20	82.0

【0186】

表 5 から、デキストランを含む凍結保存用溶液では、生細胞率が 90% 以上、回収率が 85% 以上と良好であった。一方、デキストランを含まない凍結保存用溶液では、生細胞率が 90% 以上であるが、回収率が 82% と 85% 未満であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

以上のことから、デキストランを特定の濃度含む凍結保存用溶液では、細胞の生存率を保ちながら、細胞を凍結することができ、さらに、細胞解凍後の増殖速度も良好であることが確かめられた。

【 0 1 8 8 】

[実施例 5]

(1) 凍結保存用溶液 1 2 の調製

デキストラン、ピカネイト、DMSO、並びに、生物学的製剤基準血液保存液 A 液 (A C D - A 液) (テルモ社製) 由来のクエン酸水和物、クエン酸ナトリウム水和物グルコース及びグルコースの含有率が、以下の表 6 の値となるように凍結保存用溶液 1 2 を調製した。なお、A C D - A 液は、クエン酸ナトリウム水和物 2 . 2 0 w / v %、クエン酸水和物 0 . 8 0 w / v %、及びグルコース 2 . 2 0 w / v % 含有するものを用いた。

10

【 0 1 8 9 】

【 表 6 】

凍結保存用溶液	デキストラン含有率 (w/v%)	グルコース含有率 (w/v%)	ピカネイト含有率 (v/v%)	DMSO含有率 (v/v%)	クエン酸水和物及びクエン酸Na水和物含有率 (w/v%)
12	4.50	0.02475	43.875	10.00	0.03375

20

【 0 1 9 0 】

(2) 臍帯由来間葉系 (幹) 細胞の凍結

次いで、凍結していた臍帯を解凍し、E x p l a n t 法を用いて、間葉系 (幹) 細胞 (M e s e n c h y m a i s t e m / s t r o m a l c e l l ; M S C) を回収した。次いで、回収した M S C を培養し、7 0 ~ 8 0 % コンフルエントになった段階で、細胞を回収した。次いで、回収した細胞を再度凍結し、その後解凍した。解凍した細胞を培養した。継代を重ね、P 4 ~ P 5 まで培養した。次いで、継代培養した M S C、及び、(1) で調製した凍結保存用溶液 1 2 をチューブに入れてキャップを閉めて密封した。次いで、ミスターフロスターに入れて - 8 0 の冷凍庫で凍結した。次いで、翌日窒素タンク (- 1 9 6) に移動して保管し、凍結開始から約 1 ヶ月間凍結保存した。

30

【 0 1 9 1 】

(3) 臍帯由来 M S C の解凍

次いで、凍結開始から約 1 ヶ月後に (2) において凍結した臍帯由来 M S C を 3 7 以上 3 8 以下のウォーターバスに入れて解凍した。解凍後、無血清培地 (R M) (ロート製薬社製) で洗浄後、4 にて 1 , 8 0 0 r p m、1 0 分間遠心分離した。次いで、上清を除去し、ペレットに R M 1 m L を添加し、懸濁した。

【 0 1 9 2 】

(4) 細胞表面マーカーの検出

次いで、各種細胞表面マーカーに対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより、細胞表面マーカーを検出した。検出対象とした細胞表面マーカーは、C D 7 3、C D 1 0 5、C D 9 0、C D 4 4、H L A - A B C、C D 4 5、H L A - D R、C D 3 4、C D 1 1 b、及び、C D 1 9 である。結果を図 4 に示す。

40

【 0 1 9 3 】

図 4 から、凍結保存用溶液 1 2 を用いて凍結及び解凍を行った M S C において、各種細胞表面マーカーが検出された。具体的には、当該凍結及び解凍を行った細胞では、C D 7 3、C D 1 0 5、C D 9 0、C D 4 4、及び、H L A - A B C 陽性であり、且つ、C D 4 5、H L A - D R、C D 3 4、C D 1 1 b、及び、C D 1 9 陰性であり、凍結前の細胞の性状及び M S C の定義に当てはまるものであった。

50

【0194】

(5) MSCの分化能の確認

次いで、(3)において解凍した細胞について、公知の方法を用いて、脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨芽細胞への分化を誘導した。具体的には、以下に示す手順で行った。

【0195】

(5-1) 脂肪細胞への分化誘導及びオイルレッドO染色

・脂肪細胞への分化誘導

5 × 10⁴ cells/mLのMSCの細胞懸濁液を調製し、12ウェルプレートに1 mL/ウェルずつ添加して、予め培養しておいた。また、予め、以下の表7に示す組成の分化誘導培地10 mLを調製しておいた。次いで、細胞が80%コンフルエントになったら、以下の表7に示す組成の分化誘導培地に培地を交換し、3~4週間培養して、脂肪細胞へ分化誘導させた。なお、培地は、3日毎に交換した。

10

【0196】

【表7】

組成	終濃度	量	メーカー名/型番
α MEM (10%FBS 及び抗生物質含有)	—	10mL	Wako 135-15175
Indomethacin	100 μ M	18 μ L	Wako 093-02473
Dexamethasonne	1 μ M	100 μ L	Wako 047-18863
IBMX	0.5 μ M	5 μ L	Sigma 15879-100MG
insulin	10 μ g/mL	10 μ L	Sigma

20

【0197】

・オイルレッドO染色

培養中、顕微鏡で細胞の中の脂肪滴様嚢胞が確認されたら、培地を吸引除去した。次いで、PBS 1 mLで2回洗浄した。次いで、10%ホルマリン1 mLを添加し、10分間静置した。次いで、PBS 1 mLで2回洗浄した。次いで、60%イソプロパノール1 mLを添加し、1分間静置後、除去した。次いで、染色液1 mLを添加した。

【0198】

なお、染色液は以下に示す手順で調製した。まず、30 mgのオイルレッドOに99%イソプロパノールを10 mL加えて混和して、オイルレッドO溶液を調製した。次いで、オイルレッドO溶液6 mLと超純水4 mLとを混和し、ボルテックスによりさらに振盪混和させた。次いで、2.2 mLフィルターを通し、染色液を得た。染色液は、使用するまで、アルミホイルで遮光した。

30

【0199】

次いで、染色液を加えたプレートをアルミホイルで遮光しながら、20~30分間静置した。次いで、60%イソプロパノール1 mLで洗浄し、さらに、PBS 1 mLで2回洗浄した。次いで、顕微鏡を用いて観察した。結果を図5に示す。図5の脂肪細胞において、脂肪滴が赤く染色されていることが、確認された。なお、図5において、脂肪細胞のスケールバーは100 μ mである。

40

【0200】

(5-2) 骨芽細胞への分化誘導及びアリザリン染色

・骨芽細胞への分化誘導

予め、骨分化誘導培地(Gibco社製、「StemPro(登録商標)Osteocyte/Chondrocyte」(商品名)、型番:A10072-01)を解凍して、終濃度が1 v/v%となるように抗生物質(gibco社製、型番:15240-062)を添加して10 mLずつ分注し、要時まで凍結した。3 × 10⁴ cells/mLのMSCの細胞懸濁液を調製し、12ウェルプレートに1 mL/ウェルずつ添加して、培養した。次いで、細胞が80%コンフルエントになったら、分注凍結しておいた分化誘導培地に培地を交換し、9日間培養して、骨芽細胞へ分化誘導させた。

50

【0201】

・アリザリン染色

顕微鏡で、黒いカルシウムの沈殿様のものを培養細胞上に確認できたら、培地を吸引除去して、PBSで洗浄した。次いで、固定液（室温）を加えて、30秒間固定させた。

【0202】

なお、固定液は以下に示す手順で調製した。まず、1.5Mクエン酸一水和物に、1.5Mクエン酸三ナトリウム二水和物を加えて、pHを3.0に調整して、1.5Mのクエン酸緩衝液（pH3.0）を作製して4℃で保存した。次いで、1.5Mのクエン酸緩衝液（pH3.0）400μLに超純水20mLを加えて希釈し、クエン酸希釈標準溶液を調製した。次いで、18mLのアセトンに、12mLのクエン酸希釈標準溶液（室温）を加えて、固定液を得た。

10

【0203】

次いで、固定液を除去した。次いで、超純水を添加して、45秒間静置した後に、超純水を除去して細胞を洗浄した。次いで、1mLの染色液を添加し、室温及び遮光条件で30分間静置して、細胞を染色した。

【0204】

なお、染色液は以下に示す手順で調製した。まず、FAST BLUE RR SALT (Sigma社製) 3~5mgに超純水9.6mLを加えて混和した。そこに、Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution (Sigma社製) 0.4mLを加えて、染色液を得た。染色液は、使用するまで、アルミホイルで遮光した。

20

【0205】

次いで、染色液を除去した。次いで、超純水を添加して、2分間静置した後に、超純水を除去して細胞を洗浄した。次いで、再度超純水を添加して、顕微鏡を用いて観察した。結果を図5に示す。図5の骨芽細胞において、沈着したカルシウムが赤色に染色されているのが観察された。なお、図5において、骨芽細胞のスケールバーは200μmである。

【0206】

(5-3) 軟骨芽細胞への分化誘導及びトルイジンブルー染色

・軟骨芽細胞への分化誘導

予め、軟骨分化誘導培地 (Miltenyi Biotec社製、「NH Chondro Diff Medium」(商品名)、型番: 130-091-679) に終濃度が1v/v%となるように抗生物質 (gibco社製、型番: 15240-062) を添加しておいた。次いで、軟骨分化誘導培地を用いて、 2.5×10^5 cells/mLのMSCの細胞懸濁液を調製した。次いで、15mLコニカルチューブ (ポリプロピレン製) に細胞懸濁液1mLを移した。次いで、室温で、 $150 \times g$ 、5分間遠心した。次いで、上清を除去し、ペレットを崩さないように、軟骨分化誘導培地1mLを加えた。再度、室温で、 $150 \times g$ 、5分間遠心し、上清を除去し、軟骨分化誘導培地1mLを加えた。次いで、CO₂インキュベーターで24日間培養して、軟骨芽細胞へ分化誘導させた。なお、培地は3日毎に交換した。24日後に、軟骨芽細胞塊のサイズについて、幅が1.7mm、高さが1.5mmであることが確かめられた (図5参照)。

30

40

【0207】

・トルイジンブルー染色

次いで、公知の方法で軟骨芽細胞塊の薄切片を作製してプレパラートに固定し、トルイジンブルー染色を行い、異調染色を顕微鏡で観察した。結果を図5に示す。なお、図5において、軟骨芽細胞のスケールバーは200μmである。

【0208】

図5から、MSCから、脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨芽細胞へ分化誘導されたことが確かめられた。これにより、凍結保存用溶液12を用いて凍結及び解凍を行ったMSCにおいて、分化能が保持されていることが確かめられた。

【0209】

50

(6) MSCのインビトロにおける免疫抑制能の確認

次いで、(3)において解凍した細胞と、ResponderとしてのCFSE染色単核球と、Stimulatorとしての樹状細胞とを、共培養した(以下、「R+S+MSC(DBA-D)」と称する場合がある)。また、(3)において解凍した細胞と、CFSE染色単核球とを、フィトヘマグルチニンL(PHA-L)を含む培地を用いて共培養した(以下、「R+PHA-L+MSC(DBA-D)」と称する場合がある)。

【0210】

また、対照群1として、CFSE染色単核球のみを培養したもの(以下、「R」と称する場合がある)を準備した。対照群2として、CFSE染色単核球及び樹状細胞を共培養したもの(以下、「R+S」と称する場合がある)を準備した。対照群3として、CFSE染色単核球を、PHA-Lを含む培地を用いて培養したもの(以下、「R+PHA-L」と称する場合がある)を準備した。

10

【0211】

培養後の各細胞を、細胞表面マーカーとしてCD4及びCD8に対する抗体を用いて染色した後、フローサイトメトリーにより、CD4及びCD8を検出した。結果を図6に示す。図6において、「R」は、ResponderとしてのCFSE染色単核球を示す。「S」は、Stimulatorとしての樹状細胞を示す。「MSC(DBA-D)」は、凍結保存用溶液12を用いて凍結し、解凍した臍帯由来MSCを示す。「PHA-L」はフィトヘマグルチニンL(PHA-L)を示す。

【0212】

図6において、Responderのみ(対照群1、「R」)では、増殖分裂しないため、CFSE染色したResponderのCD4+細胞及びCD8+細胞は、ピークが一つである。しかし、ResponderのCD4+細胞及びCD8+細胞は、「S」と混合されることによって活性化及び増殖するため、CFSEの蛍光輝度が細胞分裂とともに半減し、ピークが左に段階的にシフトしていた(対照群2、「R+S」)。そこに、(3)において解凍した細胞(MSC)と共培養(「R+S+MSC(DBA-D)」)すると、ピークが対照群1(「R」)と同じ位置にとどまっており、ResponderのCD4+細胞及びCD8+細胞では、増殖が抑えられたことが確認された。同様に、ResponderのCD4+細胞及びCD8+細胞は、PHA-Lを加えると活性化及び増殖し、ピークが左に段階的にシフトしていた(対照群3、「R+PHA-L」)。そこに、(3)において解凍した細胞(MSC)と共培養(「R+PHA-L+MSC(DBA-D)」)すると、ピークが対照群(「R」)と同じ位置にとどまっており、ResponderのCD4+細胞及びCD8+細胞では、増殖が抑えられたことが確認された。

20

30

【0213】

以上のことから、凍結保存用溶液12を用いて凍結及び解凍を行ったMSCの免疫抑制能が確認された。

【産業上の利用可能性】

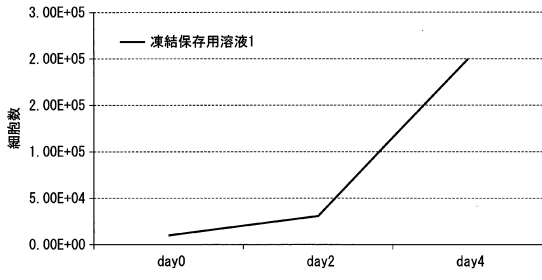
【0214】

本実施形態の動物細胞又は動物組織の凍結保存用溶液によれば、細胞の生存率を保ちながら、細胞を凍結することができる。また、本実施形態の凍結保存用溶液を用いて保存された動物細胞又は動物組織、特にヒト細胞又はヒト組織においては、天然の動物由来のタンパク質成分及びカルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリエチレングリコール等の増粘剤を含まないため、臨床使用において非常に有用である。

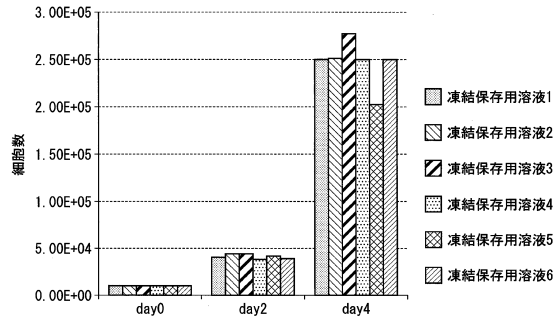
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】

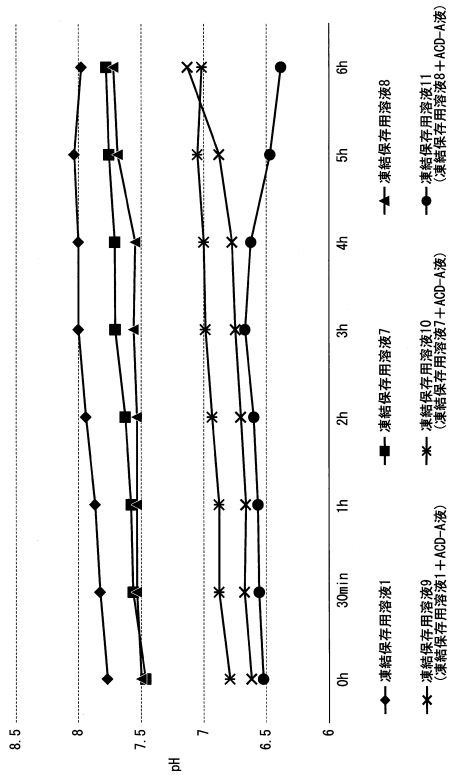


【 図 2 】

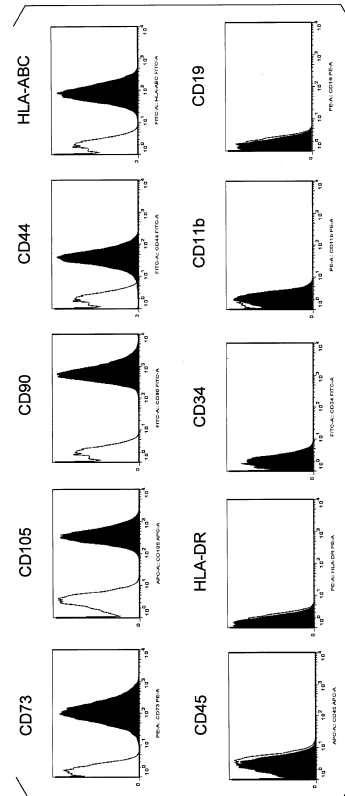


10

【 図 3 】



【 図 4 】



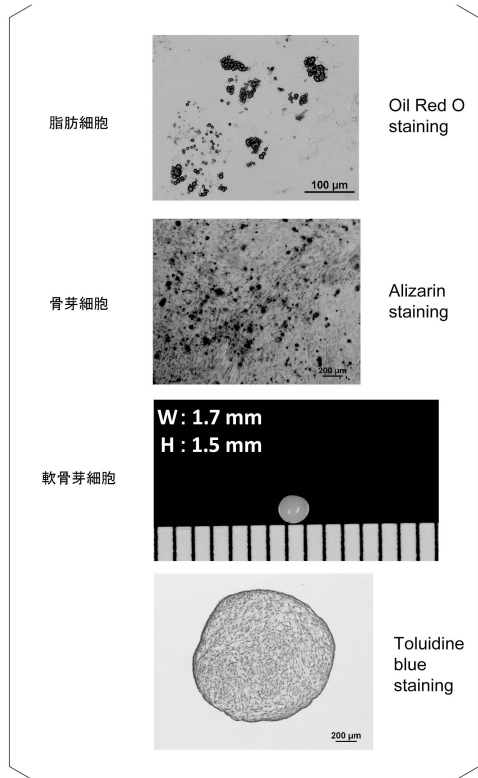
20

30

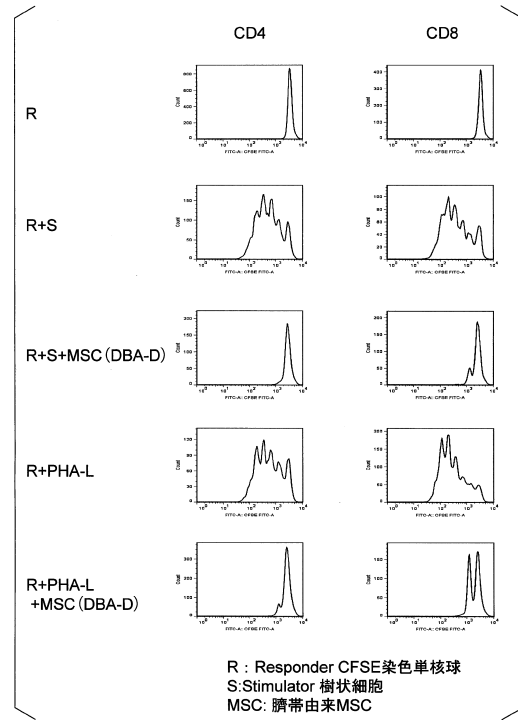
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 島津 貴久

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 中村 勇介

(56)参考文献

特開平06-046840(JP,A)

国際公開第2015/066551(WO,A2)

特開2015-142559(JP,A)

国際公開第2009/057537(WO,A1)

特開平07-023780(JP,A)

低温医学, Vol.25, No.1, 1999年, p.54-58

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)