

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4824677号  
(P4824677)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int. Cl. F I  
A O I N 1/02 (2006.01) A O I N 1/02

請求項の数 26 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2007-522844 (P2007-522844)	(73) 特許権者	500049716 アムジエン・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成17年7月22日(2005.7.22)		アメリカ合衆国 シーエー 91320, サウザンド オークス, ワン アムジエン センター ドライブ
(65) 公表番号	特表2008-507563 (P2008-507563A)		
(43) 公表日	平成20年3月13日(2008.3.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/026301	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開番号	W02006/012613	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(87) 国際公開日	平成18年2月2日(2006.2.2)	(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
審査請求日	平成20年7月22日(2008.7.22)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(31) 優先権主張番号	60/590,437	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(32) 優先日	平成16年7月23日(2004.7.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シリンジでの大きな細胞塊の送付、および細胞を凍結保存する関連の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞を保存および送付するための装置であって、前記細胞は、装置内で凍結保存され、前記装置が、

開いた第1の端部および開いた第2の端部を有する本体と、  
開いた第1の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第1のキャップと、  
開いた第2の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第2のキャップと、  
本体内に収容され、前記開いた端部のうちの一方に隣接するプランジャ部と、  
プランジャ部へと接続されるように構成されたプランジャ棒と、  
を備え、  
少なくともその一部が生物学的適合性を有する材料で作られる、装置。

【請求項2】

プランジャ部が、外周に少なくとも1つのリブを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

第1および第2のキャップが、ねじ山によって本体に着脱可能に取り付けられるように構成される、請求項1に記載の装置。

【請求項4】

細胞を迅速に凍結させる方法であって、  
凍結保存のための所望の量の細胞を取得することと、  
取得した細胞を、浸透性の凍結防止剤を含有しており、0 ~ 4 の温度に冷却されて

いる凍結媒体へと懸濁させることと、

細胞および凍結媒体を、細胞を保存および送出的ように構成された請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の装置に配置することと、

細胞および冷却済みの凍結媒体を含む装置を、8 / 分の速度で - 1 3 0 以下の温度まで迅速に冷却することと、

を含む、方法。

【請求項 5】

浸透性の凍結防止剤が、DMSOである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

凍結媒体が、1 5 % ~ 2 5 %のDMSOを含有する、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

凍結保存された細胞を迅速に解凍する方法であって、

- 1 3 0 以下の温度を有する凍結媒体および細胞を含む請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の保存装置を取り出すことと、

凍結媒体および細胞を保存装置から3 7 の温度の成長培地を含む解凍容器へと移動させて、細胞を解凍することと、

を含む、方法。

【請求項 8】

細胞を凍結保存するための方法であって、

凍結保存のための所望の量の細胞を取得することと、

20

取得した細胞を、浸透性の凍結防止剤を含有する冷却済みの凍結媒体に配置することと、

細胞および凍結媒体を、細胞を保存および送出的ように構成された請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の装置に保存し、前記細胞は、装置内で凍結保存されることと、

装置を - 1 3 0 以下の温度まで冷却することと、

を含む、方法。

【請求項 9】

浸透性の凍結防止剤が、DMSOである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

凍結媒体が、1 5 % ~ 2 5 %のDMSOを含有する、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

細胞および凍結媒体を保存することが、 $1.5 \times 10^8$  個 / ml よりも大きい細胞密度で細胞および凍結媒体を保存することを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

凍結媒体が動物の血清を含んでおらず、細胞および凍結媒体を保存することが、 $3.0 \times 10^7$  個 / ml ~  $5.0 \times 10^8$  個 / ml の細胞密度で細胞および凍結媒体を保存することを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

凍結保存された細胞でバイオリアクタを接種するための方法であって、

凍結保存のための所望の量の細胞を取得することと、

40

取得した細胞を、浸透性の凍結防止剤を含有する冷却済みの凍結媒体に配置することと、

細胞および凍結媒体を、細胞を保存および送出的ように構成された請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の装置に保存され、前記細胞は、装置内で凍結保存されることと、

装置を - 1 3 0 以下の温度まで冷却することと、

装置を - 1 3 0 以下の温度まで冷却することの後で、凍結媒体および細胞を、装置から実質的に 0 よりも温かい温度の成長培地を含む解凍容器へと移動させることと、

解凍容器からの細胞でバイオリアクタを接種することと、

を含む、方法。

【請求項 14】

50

浸透性の凍結防止剤が、DMSOである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

凍結媒体が、15% ~ 25%のDMSOを含有する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

細胞および凍結媒体を保存することが、 $1.5 \times 10^8$ 個/mlよりも大きい細胞密度で細胞および凍結媒体を保存することを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

凍結媒体が動物の血清を含んでおらず、細胞および凍結媒体を保存することが、 $3.0 \times 10^7$ 個/ml ~  $5.0 \times 10^8$ 個/mlの細胞密度で細胞および凍結媒体を保存することを含む、請求項13に記載の方法。

10

【請求項18】

大きな細胞塊を高い密度で凍結させる方法であって、

大きな細胞塊を、浸透性の凍結防止剤を $1.5 \times 10^8$ 個/mlよりも大きい密度での細胞の保存を可能にするために十分な濃度で含む凍結媒体に、懸濁させることと、

細胞および凍結媒体を請求項1から3のいずれか一項に記載の保存装置に配置することと、

細胞および凍結媒体を -130 以下の温度まで冷却することと、

を含む、方法。

【請求項19】

凍結媒体が動物の血清を含む、請求項18に記載の方法。

20

【請求項20】

浸透性の凍結防止剤がDMSOである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

DMSOの濃度が、15% ~ 25%である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

細胞および凍結媒体を冷却することが、細胞を $1.5 \times 10^8$ 個/ml ~  $5.0 \times 10^8$ 個/mlの密度で保存することを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項23】

細胞および凍結媒体を冷却することが、細胞を $3.0 \times 10^8$ 個/mlの密度で保存することを含む、請求項18に記載の方法。

30

【請求項24】

凍結防止剤の濃度が、少なくとも3.0  $\times 10^8$ 個/mlの密度での細胞の保存を可能にするために十分である、請求項18に記載の方法。

【請求項25】

大きな凍結済みの細胞塊を迅速に解凍する方法であって、

凍結した細胞塊および凍結媒体を含む請求項1から3のいずれか一項に記載の保存装置を取り出すことと、

凍結した細胞塊および凍結媒体を、保存装置から37 の温度の成長培地を含む解凍容器へと移動させて、細胞を解凍することと、

を含む、方法。

40

【請求項26】

大きな細胞塊を高い密度で凍結させる方法であって、

大きな細胞塊を、20%のDMSOを含み、動物の血清を含んでおらず、DMSOの濃度が $3.0 \times 10^7$ 個/mlよりも大きい密度での細胞の保存を可能にするために十分である凍結媒体に、懸濁させることと、

細胞および凍結媒体を請求項1から3のいずれか一項に記載の保存装置に配置することと、

細胞および凍結媒体を -130 以下の温度まで冷却することと、

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

この出願は、2004年7月23日に出願された米国特許仮出願第60/590,437号明細書にもとづく米国特許法第119条に規定の優先権を主張する。この米国特許仮出願の開示の全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

本発明の実施形態は、概して、凍結保存された細胞の大きな細胞塊を細胞の膨張を必要とすることなくバイオリアクタへと届けるためのシリンジの使用方法に関し、バイオテクノロジーの分野において生物学的に活性な材料を保存する関連の方法に関する。さらに詳しくは、本明細書において説明されるプロセスの実施形態は、例えば生物学的材料の長い時間期間にわたる凍結保存に関し、凍結保存された材料による実質的に直接的なバイオリアクタの接種を容易にすることができる。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

バイオテクノロジーの分野には、生物学的に有効な産物を生み出すうえで役に立つ新たな細胞株を生成するための哺乳類の細胞などといった、生態組織の操作および/または遺伝子操作が含まれる。それらの産物としては、これらに限られるわけではないが、ホルモン、成長因子、インターロイキン、サイトカイン、および免疫グロブリンを挙げることができる。操作および/または遺伝子操作による新たな細胞株の開発は、通常は、多大な時間および資源の投資を必要とする。したがって、新たに開発された細胞および細胞株を上手く保存することが、多数の生物学的産物の研究および開発のために重要である。さらに、細胞保存のプロセスそのものが、細胞を傷めたり、破壊したりすることがあってはならない。

20

## 【0004】

したがって、新規に開発された細胞株を保存する細胞バンクの確立が、バイオテクノロジーの分野において重要である。新規に開発された細胞株を保存するための手段としての細胞バンクシステムは、細胞株が保存されること、その完全性が維持されること、および使用のために細胞株の十分な供給が容易に得られることを保証する。さらには、細胞バンクは、保存されている細胞株を、とりわけ遺伝的な不安定性に起因する遺伝子型のずれ、老化、変態、選択および分化に起因する表現型の不安定性、ウイルスまたは細菌による汚染、および他の細胞株による交差汚染から保護するがゆえに、好ましいと考えられる。

30

## 【0005】

従来からの細胞の保存方法は、凍結保存として知られる技法を含む。凍結保存は、保存および当該物質の凍結前の生きている状態への将来の復帰を目的として、生体構造および生化学的分子の温度を、物理的または化学的变化の生じない凍結点またはそれを越える温度まで下げることとして、広く定義することができる。現在の実務においては、細胞が収穫され、保存溶液に懸濁させられ、次いで保存のために凍結される。細胞が必要とされる時、それらは解凍され、37の成長培地で再度培養される。凍結保存時の細胞にとっての課題は、凍結での保存に耐える能力ではなく、むしろ中間領域の温度(例えば、-15~-60)における致死率であり、細胞はこの温度領域を2回通過しなければならない。Peter Mazurの「Freezing of living cells: mechanisms and implications」、247 AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 125, 142 (1984)を参照されたい。細胞が約-5まで冷却されるとき、細胞および周囲の媒体の両者は、未だ凍結しないまま氷点下まで冷却されている。細胞がさらに冷却されるとき、約-5~-15において、外側の媒体において氷の形成が始まる。しかしながら、細胞の中身は、未だ凍結しないまま氷点下まで冷却されている。細胞内で氷点下まで冷却された水は、当然ながら、途中まで凍結した細胞外の溶液の水に比べ、より大きな化学的ポテンシャルを有している。したがって、水が浸透圧によって細胞から流れ出て、細胞の外で凍結する。細胞内における次の

40

50

物理的事象は、冷却の速度に依存して決まる。急速な冷却は、氷が均一に形成されるため溶質の濃度の影響を最小限にするが、細胞内の氷がより多くなることにつながる。対照的に、ゆっくりした冷却は、より多くの水が細胞から失われ、内部の氷が少なくなる結果となるが、溶質の影響は大きくなる。毎分1 という最適な均質的な冷却速度が、通常は選択されている。

#### 【0006】

細胞を凍結保存するために現在使用されている方法の少なくともいくつかは、凍結媒体 / 細胞保存液へと動物の血清（例えば、ウシ胎児血清（FCS））ならびに凍結防止剤（CPA）を添加するという実務を含む。伝統的に、動物の血清は、細胞膜を安定化させ、細胞内の中身を高い溶質効果から保護するため、細胞の保存に使用されてきた。しかしながら、牛海綿状脳症（すなわち、狂牛病）などといった動物の疾病を取り巻く懸念ゆえ、動物の血清の添加は、ある場合には、保存される細胞を望ましくない汚染の源にさらすことになりうる。

10

#### 【0007】

細胞についての凍結保存の臨床的および商業的適用は、多数の生きている細胞を回復できる能力によって制限されうる。例えば、現在の細胞の凍結保存方法によって得られる細胞の数は、20リットルのバイオリアクタを直接接種するためには不十分である。凍結保存された細胞の解凍から回収される生きている細胞の数が不十分であるため、20リットルのバイオリアクタの接種に十分な細胞が存在するまで、さらなる細胞を生み出すべく細胞に細胞培養膨張を加えなければならない。リアクタなどの接種に先立つ細胞培養膨張の現在のプロセスは、細胞株に応じ、約2週間から4週間の時間を要している。膨張プロセスは、時間を消費し、労働集約的であり、汚染の源であると考えられることから、大きな細胞塊の貯蓄および保存が、バイオテクノロジーの分野においてますます重要になってきている。

20

#### 【0008】

多数の細胞を保存する現在の方法は、凍結の際に細胞を収納するクライオバッグ（cryobag）の使用を含む。クライオバッグは、より多くの量の細胞を従来からの密度にて保存するために使用されている。しかしながら、クライオバッグは、細胞の凍結保存に使用される場合には、それらの汎用性を制限する多くの欠点を有している。例えば、クライオバッグは、潜在的に直面する試料を横切る温度勾配にさらされ、これが不均一な冷却速度につながる。均一な冷却速度は、保存プロセスの成功に不可欠である。さらに、クライオバッグの冷凍は、冷却の際の素材の熱衝撃およびバッグの破れを防止するため、特別な速度制御付きの冷凍機において行われなければならない。また、ひとたびバッグの素材のガラス転移点を超えて温度が下げられると脆くなり、取り扱いおよび保存の際の破損または破れにつながる可能性がある。クライオバッグは、通常は水槽にて解凍されるが、これが望ましくない細胞の損傷および / または汚染につながる可能性がある。

30

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

したがって、凍結の際に細胞を安定化させ、細胞を損傷から保護し、毒性がなく、高い密度での細胞の凍結を可能にし、凍結させた細胞の迅速な回収を可能にし、外部からの汚染の可能性を少なくし、幅広くさまざまな細胞培養および臨床の用途において幅広い範囲の細胞種に適している凍結保存プロセスについて、ニーズが存在している。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明の実施形態は、大量の細胞、例えば約  $3.0 \times 10^8$  個 ~ 約  $5.0 \times 10^9$  個の細胞塊を凍結および解凍するための装置および手順であって、解凍時の迅速な膨張に適した装置および手順を提供する。さらに本発明は、動物の血清あり、およびなしの両者において、大量の細胞のより高密度（例えば、約  $3.0 \times 10^7$  個 / ml ~ 約  $5.0 \times 10^8$  個 / ml）での凍結保存を可能にする。そのような密度での凍結は、浸透性の凍結防止剤

50

を凍結媒体へと、通常よりも多く、あるいは高濃度で添加することによって達成される。さらに、本発明は、凍結された細胞でのバイオリアクタの実質的な直接接種を可能にする。

【0011】

本発明の一態様によれば、凍結保存される細胞を収納および送出手のための装置が、開いた第1の端部および開いた第2の端部を有している本体と、開いた第1の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第1のキャップと、開いた第2の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第2のキャップと、本体内に收容され、上記開いた端部のうちの一方に隣接するプランジャ部と、プランジャ部へと接続されるように構成されたプランジャ棒とを含み、少なくとも装置の一部が生物学的適合性を有する材料で作られている。

10

【0012】

本発明の他の態様は、細胞を迅速に凍結させる方法を含む。この方法は、凍結保存のための所望の量の細胞を取得すること、取得した細胞を、浸透性の凍結防止剤を含有しており、約0 ~ 4 の温度に冷却されている凍結媒体へと懸濁させること、細胞および凍結媒体を、凍結保存される細胞を収納および送出手のように構成された装置であって、少なくとも一部が生物学的適合性を有する材料で作られている装置へと配置すること、細胞および冷却済みの凍結媒体を含む装置を、約8 / 分の速度で - 130 以下の温度まで迅速に冷却することを含む。

【0013】

本発明のさらに他の態様は、凍結保存された細胞を迅速に解凍する方法を含む。この方法は、約 - 130 以下の温度を有している凍結媒体および細胞を含む保存装置を取り出すこと、ならびに凍結媒体および細胞を保存装置から約37 の温度の成長培地を含む解凍容器へと移動させて細胞を解凍することを含む。

20

【0014】

本発明のさらなる態様は、細胞を凍結保存する方法を含む。この方法は、凍結保存のための所望の量の細胞を取得すること、取得した細胞を、浸透性の凍結防止剤を含有している冷却済みの凍結媒体に配置すること、ならびに細胞および凍結媒体を、凍結保存される細胞を収納および送出手のように構成された凍結保存に適した装置であって、開いた第1の端部および開いた第2の端部を有している本体と、開いた第1の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第1のキャップと、開いた第2の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第2のキャップと、本体内に收容されて上記開いた端部のうちの一方に隣接するプランジャ部と、プランジャ部へと接続されるように構成されたプランジャ棒とを含んでおり、少なくとも一部が生物学的適合性を有する材料で作られている装置へと収納すること、を含む。さらにこの方法は、装置を約 - 130 以下の温度まで冷却するステップを含む。

30

【0015】

本発明の他の態様は、凍結保存された細胞でバイオリアクタを接種するための方法を含む。この方法は、凍結保存のための所望の量の細胞を取得すること、取得した細胞を、浸透性の凍結防止剤を含有している冷却済みの凍結媒体に配置すること、細胞および凍結媒体を、凍結保存される細胞を収納および送出手のように構成された装置であって、開いた第1の端部および開いた第2の端部を有している本体と、開いた第1の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第1のキャップと、開いた第2の端部へと着脱可能に取り付けられるように構成された第2のキャップと、本体内に收容されて上記開いた端部のうちの一方に隣接するプランジャ部と、プランジャ部へと接続されるように構成されたプランジャ棒とを含み、少なくとも一部が生物学的適合性を有する材料で作られている装置へと収納すること、を含む。この方法は、さらに、装置を約 - 130 以下の温度まで冷却すること、装置を約 - 130 以下の温度まで冷却することの後で、凍結媒体および細胞を装置から実質的に0 よりも温かい温度の成長培地を含む解凍容器へと移動させること、および解凍容器からの細胞でバイオリアクタを接種することを含む。

40

50

## 【0016】

本発明のさらに他の態様は、大きな細胞塊を高い密度で凍結保存するための組成物を含む。この組成物は、浸透性の凍結防止剤を、 $1.5 \times 10^8$  個/ml よりも大きい密度での細胞の保存を可能にするために十分な濃度で含む凍結媒体、および保存されるべき約  $3.0 \times 10^8$  個 ~ 約  $5.0 \times 10^9$  個の大量の細胞を含む。

## 【0017】

本発明の他の態様は、大きな細胞塊を高い密度で凍結させる方法を含む。この方法は、大きな細胞塊を、浸透性の凍結防止剤を  $1.5 \times 10^8$  個/ml よりも大きい密度での細胞の保存を可能にするための十分な濃度で含む凍結媒体に懸濁させること、細胞および凍結媒体を保存装置に配置すること、ならびに細胞および凍結媒体を約 -130 以下の温度まで冷却することを含む。

10

## 【0018】

本発明のさらなる態様は、大きな凍結済みの細胞塊を迅速に解凍する方法を含む。この方法は、凍結した細胞塊および凍結媒体を含む保存装置を取り出すこと、ならびに凍結した細胞塊および凍結媒体を保存装置から約 37 の温度の成長培地を含む解凍容器へと移動させて細胞を解凍することを含む。

## 【0019】

本発明の他の態様は、大きな細胞塊を高い密度で凍結保存するための組成物を含む。この組成物は、20%のジメチルスルホキシド(DMSO)を含み、動物の血清を含んでおらず、DMSOの濃度が  $3.0 \times 10^7$  個/ml よりも大きい密度での細胞の保存を可能にするために十分である凍結媒体、および保存されるべき大量の細胞を含む。

20

## 【0020】

本発明のさらに他の態様は、大きな細胞塊を高い密度で凍結させる方法を含む。この方法は、大きな細胞塊を、20%のDMSOを含有し、動物の血清を含んでおらず、DMSOの濃度が  $3.0 \times 10^7$  個/ml よりも大きい密度での細胞の保存を可能にするために十分である凍結媒体に懸濁させること、細胞および凍結媒体を保存装置に配置すること、ならびに細胞および凍結媒体を約 -130 以下の温度まで冷却することを含む。

## 【0021】

本発明のさらなる目的および利点は、一部は以下の説明に記載され、一部は本明細書から自明であり、あるいは本発明を実行することによって確認することができる。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘される要素および組み合わせによって実現および達成される。

30

## 【0022】

以上の全般的な説明および以下の詳細な説明の両者が、あくまで例示かつ説明のためのものであり、特許請求の範囲に記載される本発明を限定するものではないことを、理解すべきである。

## 【0023】

添付の図面は、本明細書に組み込まれ本明細書の一部を構成するものであるが、本発明の一実施形態を示しており、本明細書と協働して本発明の原理を説明すべく機能する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

40

## 【0024】

ここで、その例が添付の図面に示されている本発明の実施形態を詳しく参照する。可能な限り、すべての図面を通して、同じ参照符号が同じまたは同様の部品を指し示すために使用されている。

## 【0025】

本発明は、細胞の凍結および解凍を、解凍時の迅速な膨張に適した大きな体積にて行うための装置およびプロセスを提供する。本発明による方法を使用して凍結および解凍された大体積の細胞は、少なくとも60%~90%の生存率を有しており、これは大きな細胞塊のための従来からの凍結保存に比べて顕著に高い。

## 【0026】

50

さらに本発明は、動物の血清を必要とせずに、より高い密度（例えば、1 ml 当たり約  $3.0 \times 10^7$  個の細胞 ~ 1 ml 当たり約  $5.0 \times 10^8$  個の細胞）にて、大きな体積の細胞の凍結保存を可能にする。そのような密度での凍結は、浸透性の凍結防止剤を凍結媒体へと通常よりも多く、あるいは高濃度で添加することによって達成される。

【0027】

さらに、本発明は、凍結された細胞でのバイオリアクタの実質的な直接接種を可能にする。具体的には、凍結後の細胞培養膨張の必要性がなくなる。これは、時間を節約し、汚染の可能性を低減する。

【0028】

本発明の一態様によれば、大きな細胞塊を高い密度で凍結させるための方法および装置が提供される。本明細書において具現化されるように、細胞がそれらの先の培地から分離され、例えば比較的大きな力での遠心分離（すなわち、当技術分野において「ハードスピニング」として知られているプロセス）によって、密にパックされる。次いで、凍結の準備において、パックされた細胞が、適切な量の生物学的に適合する凍結媒体へと再度懸濁させられる。

【0029】

凍結プロセスの際の細胞の懸濁および保護に使用される凍結媒体の組成の選択および割合は、いくつかの要因の考慮を含む。凍結媒体は、これらに限られるわけではないが、動物の血清（例えば、ウシ胎児血清（FCS）またはウシ胎児血清（FBS））および凍結防止剤（すなわち、高い水溶性および低い毒性を有する物質）などといった、1つ以上の添加物を含むことができる。凍結媒体へと導入される凍結防止剤は、凍結および解凍のプロセスの際に細胞の損傷を抑制または防止することによって、細胞の生存を向上させることができる。

【0030】

凍結防止剤、凍結の際の損傷を低減するための化学物質は、通常は、細胞膜を横切って拡散できる能力にもとづいて、2つの広い分類に分離される。浸透性の凍結防止剤が細胞膜を横切って移動できるのに対し、非浸透性の物質は、細胞膜を横切って移動することはできない。浸透性の物質は、通常は、小さな分子量および大きな細胞膜透過性を有し、冷却の初期の段階において細胞の脱水を促進することによって機能すると考えられる。冷却が進むとき、浸透性の物質は細胞内への拡散を続け、束一的な効果によって細胞内の凝固点を押し下げる。細胞内への拡散および細胞内の水の置換が、高い浸透圧から保護し、細胞の骨格がつぶれることがないように保護する。さらに、浸透性の物質は、たんぱく質の表面の残りの水と一緒にガラス状になることによって、細胞たんぱく質を変性から保護する殻を形成する。

【0031】

非浸透性の凍結防止剤は、高い氷点下温度における細胞の脱水によって機能し、迅速な冷却を可能にして、ゆっくりした冷却の不利な影響を回避する。これらの化合物は、一般的には、水と広範囲にわたる水素結合を形成して水の活動を少なくするポリマーである。

【0032】

凍結のプロセスにおいては、溶質は細胞懸濁液の固相から排除され、溶液の液体部分の濃度に急激な変化が生み出される。換言すると、細胞懸濁液（すなわち、凍結媒体中に懸濁させた細胞）の凍結が氷の形成につながり、細胞膜の片側において、他方の側に比べて劇的な水の濃度の変化を引き起こす。この劇的な濃度の変化が、浸透圧の差を生み出しうる。生物学的細胞は、自身が脱水して細胞内の溶液と細胞外の溶液との間の新たな平衡状態に達することによって、この膜貫通の圧力差に応答できる。冷却速度が低速であると、細胞が長い時間期間にわたって高い氷点下温度にさらされる可能性があり、細胞が徐々に脱水されるようになり、これが細胞の損傷につながる可能性がある。換言すると、細胞を離れる液体が多すぎる場合、細胞が収縮して死にいたる可能性がある。

【0033】

さらに、高い冷却速度における平衡の維持は、水が細胞から拡散できる速度よりもはる

10

20

30

40

50



かに大きな速度で温度が下げられるため、困難であると考えられる。したがって、温度が低下を続けるとき、細胞から拡散することができない液体が、細胞内で凍結し始めると考えられる。細胞内での氷の形成は、細胞にかなりの機械的損傷を生じる可能性がある。

#### 【0034】

したがって、浸透性の凍結防止剤を、凍結保存の際に細胞の損傷の発生を抑えるとともに細胞の生存を向上させるために使用することができる。DMSOは、細胞膜に対する浸透性が高いため、好ましいと考えられる。DMSOは、凍結および解凍の際に細胞へと容易に進入および退出が可能であり、したがって凍結による損傷の発生を低減することができる。

#### 【0035】

凍結防止剤を、通常であると考えられているよりも高い濃度で添加することによって、細胞の損傷の発生が抑制され細胞の生存が向上するだけでなく、FCSなどの動物の血清を使用することなく、大きな細胞塊を比較的小さな体積にて(すなわち、高い密度で)保存できるようになる。現在のところ、細胞は、通常は、例えば20%のFCSおよび10%のDMSOを含有する溶液において、 $1.0 \times 10^7$  個/ml ~  $5.0 \times 10^7$  個/mlの密度で凍結されている。Nobutaka Ninomiyaらの「Large-Scale, High Density Freezing of Hybridomas and Its Application to High-Density Culture」、38 BIOTECHNOLOGY and BIOENGINEERING 1110, 1110 (1991)を参照されたい。しかしながら、FCSなどの物質が望ましくない汚染源を呈するという懸念が増大しており、FCSなどの物質を使用することなく大きな細胞塊を高い密度で凍結することが望ましいと考えられる。

#### 【0036】

本発明は、大きな細胞塊(例えば、約10ミリリットル中に約 $3.0 \times 10^8$  個~約 $5.0 \times 10^9$  個の総細胞数)を高い細胞密度(例えば、現行の方法によって達成される密度よりも少なくとも10倍高い密度で大きな細胞塊を凍結させる)で、少なくとも60%、好ましくは約90%の生存率で保存する方法を提供する。この方法は、FCSなどの物質を用いても、用いなくても使用可能である。例えば $3.0 \times 10^7$  個/ml ~  $5.0 \times 10^8$  個/mlなどといった高い密度での大きな細胞塊の凍結を、FCSなどの物質を使用することなく達成するため、細胞が、凍結防止剤を従来からの方法において使用される凍結防止剤の濃度よりも高い濃度で含む凍結媒体において、凍結させられる。例えば、従来の方法は、凍結媒体が20%のFCSで補われている場合にのみ、細胞を高い濃度(例えば $1.5 \times 10^8$  個/ml)で凍結させることができる。Nobutaka Ninomiyaらの「Large-Scale, High Density Freezing of Hybridomas and Its Application to High-Density Culture」、38 BIOTECHNOLOGY and BIOENGINEERING 1110, 1110 (1991)を参照されたい。さらに、動物の血清の使用を回避した方法は、10%のDMSO内で $5.0 \times 10^7$  個/mlの密度での細胞の凍結に成功しているにすぎない。対照的に、本発明の方法は、例えば15%~25%、好ましくは20%のDMSO濃度を使用する。

#### 【0037】

本発明において使用される凍結防止剤の濃度(例えば、20%のDMSO)は、凍結防止剤の濃度によって細胞内の溶液と細胞外の溶液との間の浸透圧の差の増大が引き起こされるため、より高い細胞密度での細胞の保存を可能にする。この圧力差は、細胞の水含有量の約70%~90%を取り去ることによって、細胞を脱水すべく機能する。また、凍結防止剤の濃度を高めることで、細胞の凝固点が押し下げられ、適度な細胞の脱水が促進される。さらに、凍結防止剤の濃度を高めることは、細胞内のたんぱく質を変性から保護するうえで役に立つ。したがって、細胞内での凍結および氷の形成の発生が少なくなり、細胞内の氷によって傷つけられる細胞が少なくなる。

#### 【0038】

通常であると考えられる濃度よりも高い濃度のDMSOは、生物学的材料に対して毒性のリスクを呈する可能性があるが、本発明の方法は、そのような潜在的リスクを、通常であると考えられる速度よりも高速で細胞の冷却および解凍を行うことによって補償している。

【0039】

さらには、凍結防止剤の濃度を従来の方法において使用されている濃度よりも高めることによって、本発明による方法は、凍結媒体からの動物の血清の除去も補償することができる。動物の血清の喪失は、場合によっては、凍結媒体に少量の非浸透性の凍結防止剤を添加することによって、さらに補償することができる。

【0040】

一工程での急速凍結を含むプロセスなど、いくつかの実施形態においては、少濃度（例えば、1%～5%）の非浸透性の凍結防止剤をさらに含むことが望ましい場合がある。非浸透性の凍結防止剤は、より高い温度での細胞の脱水に役立ち、細胞膜の保護のために使用されることがある。非浸透性の凍結防止剤の例としては、これらに限られるわけではないが、糖類、デキストラン、エチレングリコール、ポリビニルピロリドン、およびヒドロキシエチルスターチが挙げられる。

【0041】

いくつかの場合には、凍結防止剤が、通常の温度において細胞に対して毒性を有する可能性がある。例えば、DMSOの毒性は、温度の関数であり、温度が高くなる（例えば、4℃超）につれ、より毒性が大きくなる。したがって、冷却前のDMSO含有凍結媒体は、細胞の凍結の直前に、すなわち細胞の温度が約4℃にまで下げられたときに、細胞へと迅速に添加することが好ましいと考えられる。

【0042】

凍結保存を目的とする細胞を凍結媒体に再び懸濁させた後、溶液全体を、凍結保存に適した装置へと公知の任意のプロセスによって移すことができる。例えば、溶液を、実験室フードの下で、例えばシクロ-オレフィン-ポリマーまたはシクロ-オレフィン-コポリマーなど、高い純度ならびに急速冷凍および長期凍結保存に適した物理的特性を有する、適切な生体適合性の材料で製作された容器へと移すことができる。

【0043】

シクロ-オレフィン-ポリマーおよびシクロ-オレフィン-コポリマーは、気体および水蒸気をあまり通さないため、細胞との不都合な相互作用を最小限にする。これらの材料はガラス転移点を有さず、凍結で脆くなり、あるいは壊れやすくなることがないため、好ましいと考えられる。シクロ-オレフィン-ポリマーおよびシクロ-オレフィン-コポリマーなどの材料を使用する他の典型的な利点は、それらの熱伝導係数が小さく、一工程での凍結、急速冷凍、または気相への直接冷凍など、種々の冷凍プロセスにおける使用に適合できる点にある。

【0044】

一実施形態においては、凍結保存の際に細胞を入れる容器は、シリンジであってよい。図1から図3は、そのようなシリンジ1の例示的な実施形態のあるいくつかの構成を示している。本明細書において具現化され、図2および図3に示されているように、シリンジ1は、第1および第2の開放端を有する中空円筒状の本体10を備えており、一方の開放端につまみフランチ19を備えている。さらにシリンジ1は、第1のキャップ11、第2のキャップ12、および本体10の内側で本体の一端付近に配置されるプランジャ13を備えている。図1および図2に示されているように、第2のキャップ12は、プランジャ13とプランジャ棒14との間の接続を容易にするための開口20を、備えてもよく、備えていなくてもよい。プランジャ13は、第1の端部15と第2の端部16とを有するプランジャ棒14とともに使用されるように構成されている。プランジャ13は、ハロ-ブチル合成ゴムなどのエラストマーから製作することができる。このエラストマー部分を、例えばエチレンテトラフルオロエチレン(ETFE)フィルムなど、エラストマー部分を覆う保護フィルムによって、シリンジの内容物との直接接触から保護することができる。

10

20

30

40

50

さらにこのフィルムで、シリンジ本体 10 内でのプランジャ 13 の移動（すなわち、摩擦の克服）を容易にすることができる。シリンジの内容物の絶縁が望まれる実施形態においては、プランジャ 13 が、プランジャ 13 とシリンジ 1 との間の密封を改善するためのリブ 22 を備えてもよい。リブ 22 は、約 1.5 ～ 3 mm ～ 1.5 ～ 4 mm の外径を有することができる。

#### 【0045】

プランジャ棒 14 の第 1 の端部 15 を、公知の任意の手段によってプランジャ 13 へと取り付けられるように構成することができる。プランジャ棒 14 の第 2 の端部 16 を、プランジャ棒 14 の長手方向の移動を容易にするように構成することができる。例えば、プランジャ棒 14 の第 1 の端部 15 にねじ山を備えることができ、プランジャ 13 に設けられる対をなすねじ山 23 に受け入れられるように構成することができる。プランジャ棒 14 の第 2 の端部 16 に、平たい円形の表面、またはプランジャ棒を動かすために適した任意の寸法の任意の他の形状を備えることができる。

10

#### 【0046】

シリンジ 1 およびその構成部品は、凍結および長期の凍結保存に適した公知の任意の生物学的適合材料から製造することができ、任意の所望の断面形状および/または構成を有することができる。例えば、シリンジ 1 は、実質的に円形の断面を有することができる。また、シリンジ 1 は、自身の長さに沿って 1 つ以上の断面形状および/または構成、ならびに凍結保存および/または任意の後続のプロセスに適した任意の所望の寸法を有することができる。一実施形態においては、シリンジ 1 が、例えば約 84 mm の全長、19 mm の外径を有する本体、および約 1.5 mm の壁厚など、バイオリアクタまたは同種の装置の接種に合わせた寸法を有することができる。シリンジ 1 を、細胞の保存および/または 1 つの源から他の源へと移動を必要とする任意のプロセスのために使用できることを、理解すべきである。さらに、シリンジ 1 を、所望の任意の種類の細胞について使用することができ、比較的流体で満たされた環境、または比較的乾燥した環境において使用することができる。

20

#### 【0047】

例として、シリンジの第 1 のキャップ 11 を、例えばねじ 24 を備える任意の適切な公知の手段によって、あるいは嵌まり込みの要素によって、本体 10 へと取り付けることができる。キャップ 11 と本体 10 との間の封止は、これらに限られるわけではないが、Oリング、ガスケット、ならびに栓および面取りシールなど、公知の任意の適切な手段によってもたすことができる。次いで、本体 10 を、凍結保存を目的とする細胞を含んだ溶液で満たすことができる。続いて、第 2 のキャップ 12 およびプランジャ 13 を、公知の任意の適切な手段によって、本体 10 へと取り付けることができる。

30

#### 【0048】

代案として、プランジャ 13 を前もって本体 10 内に配置し、キャップ 11 または 12 を本体 10 へと取り付けてもよい。次いで、シリンジを、残りのキャップ 11 または 12 の取り付けに先立って、凍結保存を目的とする細胞を含んだ溶液で満たすことができる。実質的に無菌で本体 10 を満たすことができる他の任意の方法も、使用可能である。

#### 【0049】

凍結保存を目的とする細胞を含んだ溶液を、凍結保存に適した保存容器（例えば、シリンジまたは他のバイアル）に配置した後、凍結プロセスを開始することができる。例えば、凍結媒体中に細胞を含む 1 つ以上の容器を、スタイロフォーム箱または速度制御付きの冷凍機など、冷却用の適切な保存容器に配置することができる。次いで容器を、凍結保存および/または凍結保管に適した適切な温度へと冷却することができる。例えば、まず容器を、約 1 / 分の速度など、制御された冷凍速度にて、約 - 80 の温度まで冷却することができる。次いで、これら試料を、保存のための気相液体窒素へと移し、約 - 130 以下の温度へとさらに冷却することができる。

40

#### 【0050】

他の場合においては、ここに開示した例示的な方法を、当該方法の 1 つ以上の工程の組

50

み合わせおよび/または削除によって変更することが望まれる場合がある。例えば、選択した容器の寸法(すなわち、壁厚)および/または伝導率にもとづき、最初に容器を約-80の温度まで冷却する工程を、省略することが考えられる。そのような場合、容器は、低い熱伝導率を有していなければならず、約84mmの全長、19mmの外径を有する本体、および約1.5mmの壁厚を有することができる。2段階の冷凍プロセスを加える代わりに、容器を、内部に収容した試料とともに、約-130以下の温度まで直接冷却することができる。このような方法においては、冷却速度は2段階式のプロセスよりも速く、例えば約8/分である。

【0051】

試料の冷却を、任意の適切な手段および/または当技術分野において公知の手段によって達成できることが、理解されよう。例えば、細胞を、冷凍機に配置することができ、あるいは冷却用の流体(例えば、窒素の蒸気)を含むタンクに配置することができる。

【0052】

本発明の他の態様によれば、凍結保存された細胞を迅速に解凍する方法が説明される。

【0053】

凍結保存された細胞の使用が求められるとき、凍結している試料を、任意の適切な手段および/または当技術分野において公知の手段によって解凍することができる。例えば、試料を冷凍機または液体窒素から取り出すことができ、解凍プロセスを開始すべく容器をドライアイス上に配置することができる。

【0054】

図1から図3に示したシリンジに細胞が保存されている実施形態においては、シリンジの外側に、アルコールまたは保存容器の外表面の消毒および/または殺菌に適した任意の他の物質を噴き付けることができる。次に、凍結しているシリンジの中身が、例えば37の成長培地を含む例えば攪拌培養(*spinner culture*)などの解凍用容器へと、例えばキャップ11を取り外し、キャップ12に設けられた開口20を通してプランジャ棒14をプランジャ13に接続し、凍結している細胞をシリンジからスピナー(*spinner*)へと排出すべくプランジャを動かすことによって、直接移される。あるいは、汚染の可能性を少なくするため、キャップ12に開口20を設けなくてもよい(図2を参照されたい)。そのような場合には、プランジャ棒14をプランジャ12へと接続する前に、まずはキャップ12を取り除かなければならない。

【0055】

ひとたびスピナーに移されると、成長培地が速やかにDMSOを希釈し、DMSOおよび細胞が解凍される際のDMSOの毒性を打ち消す。続いて、細胞が凍結媒体から分離され、バイオリアクタの接種のための使用など、さらなる処理のための準備ができた状態となる。凍結している10ミリリットルの細胞および媒体が、約43秒で解凍され、これは他の従来からの方法における解凍時間よりも大幅に高速である。この高速解凍の方法は、細胞の保存のためのシリンジ容器の使用に関連して説明されているが、細胞を凍結保存し、その後に凍結状態で取り出すことができる他の任意の適切な容器を、使用することが可能である。

【0056】

凍結保存された細胞を解凍するために本発明による方法を使用する1つの典型的な利点は、解凍の際の細胞内および/または細胞外の溶液の再結晶の発生を少なくすることにある。本発明の解凍方法は、損傷を引き起こす可能性がある氷の結晶の形成および/または成長を、迅速な温度上昇速度を使用することによって防止する。迅速な温度上昇速度は、現在の方法と比べ、凍結プロセスの際に形成されている可能性がある小さな氷の結晶について、有害な大きな氷の結晶への成長(すなわち、再結晶)を、約-60~約-15の臨界領域の通過に要する時間を短くすることによって困難にする。

【0057】

凍結保存剤(例えば、DMSO)は、通常は、例えば輸血されるとき、後の使用において有毒となることなく認容できる生存を保証するための十分な濃度で溶液中に使用される

10

20

30

40

50

。また、使用される凍結保存剤の量は、保存される細胞の種類に依存して決まる。さらに、適切なバッファまたは細胞培地による保存前または保存後の希釈などの処理条件が望ましい可能性がある。

【0058】

以上の詳細な説明においては、本明細書の一部を構成しており、本発明を実施できるいくつかの特定の実施形態をあくまで例として示している、添付の図面を参照した。これらの実施形態は、当業者が本発明を実行することができるように十分に詳しく説明されており、本発明の技術的思想および技術的範囲から逸脱することなく、他の実施形態も使用可能であり、論理的、機械的、および化学的変更を加えることが可能であることを、理解されたい。本発明を当業者にとって実施可能にするために必ずしも必要でない細部を避けるため、明細書においては、当業者にとって公知の特定の情報を省略している。

10

【0059】

本発明の他の実施形態は、本明細書を検討し、本明細書に開示の発明を実行することによって、当業者にとって明らかになるであろう。本明細書および実施例は、あくまで例として考えるべきものであり、本発明の真の技術的範囲および技術的思想は、以下の特許請求の範囲によって示される。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】本発明の一実施形態によるシリンジの部分分解図である。

【図2】本発明の他の実施形態によるシリンジの部分分解図である。

20

【図3】部分的に組み立てた構成の図1の装置の概略図である。

【図1】

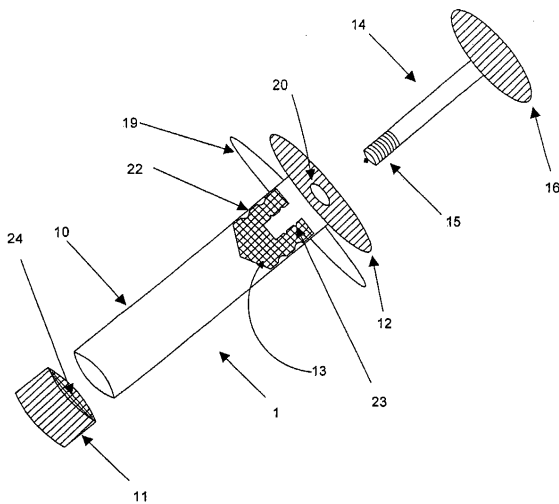


FIG. 1

【図2】

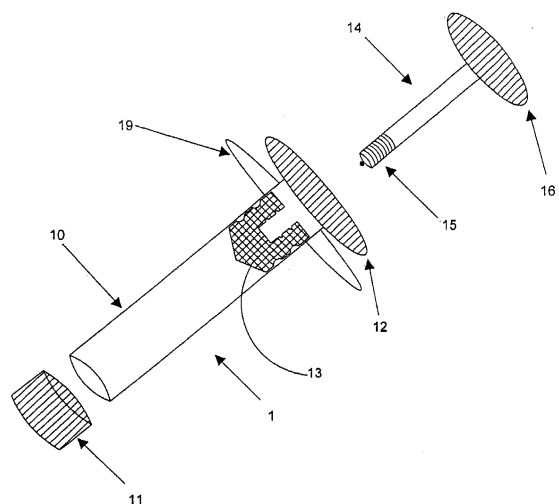


FIG. 2

【 図 3 】

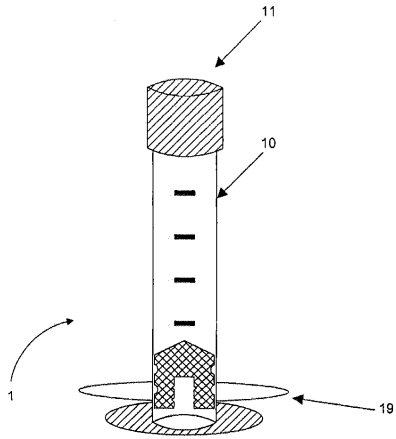


FIG. 3

---

フロントページの続き

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ヤフマー, サミーフ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、サウザンド・オークス、パチーノ・サークル・1  
5 1 0、ナンバー・イー

審査官 太田 千香子

(56)参考文献 特開2004-018504(JP, A)

KASAI S, CRYOBIOLOGY, 米国, ACADEMIC PRESS INC, 1993年 2月, V30 N1, P1-11  
N NINOMIYA, BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 1991年, V38, P1110-1113

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01N 1/02