

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年10月4日(04.10.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/133575 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/058225
- (22) 国際出願日: 2012年3月28日(28.03.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-072068 2011年3月29日(29.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社大塚製薬工場(OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.) [JP/JP]; 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115 Tokushima (JP). 学校法人自治医科大学(JICHI MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 Tochigi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小林 英司 (KOBAYASHI, Eiji) [JP/JP]; 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115 株式会社大塚製薬工場内 Tokushima (JP). 寺谷 工(TERATANI, Takumi) [JP/JP]; 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学医学部 先端医療技術開発センター内 Tochigi (JP). 野島 廣 (NOJIMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115 株式会社大塚製薬工場内 Tokushima (JP). 岩田 効志(IWATA, Koushi) [JP/JP]; 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥

原 1 1 5 株式会社大塚製薬工場内 Tokushima (JP).

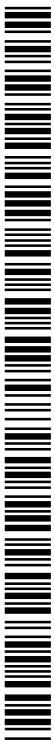
(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))



WO 2012/133575 A1

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING CELL DEATH OF MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞の細胞死抑制方法

(57) Abstract: The present invention provides an in vitro subculture method for mesenchymal stem cells, the method including washing mesenchymal stem cells detached from a cell culture container by proteolytic enzyme treatment with a physiological aqueous solution containing trehalose. Furthermore, the present invention provides an agent for washing mesenchymal stem cells detached from a cell culture container by proteolytic enzyme treatment in the in-vitro subculture of mesenchymal stem cells, the agent containing the physiological aqueous solution containing trehalose.

(57) 要約: 本発明は、間葉系幹細胞のインビトロ継代方法であって、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を、トレハロースを含有する生理的水溶液で洗浄することを含む、方法を提供する。更に本発明は、トレハロースを含有する生理的水溶液を含む、間葉系幹細胞のインビトロ継代において、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を洗浄するための剤を提供する。

明 細 書

発明の名称： 間葉系幹細胞の細胞死抑制方法

技術分野

[0001] 本発明は、間葉系幹細胞の細胞死を抑制しながら継代する方法、およびそれに用いる剤に関する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞は、哺乳類の骨髄等に存在し、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞等に分化する幹細胞として知られている。間葉系幹細胞は、その多分化能故に、多くの組織の再生医療のための移植材料として注目されている。すなわち、間葉系幹細胞を用いて、従来の治療方法では再生しなかった、疾病や障害により失った組織を再生し、機能を回復させる「細胞移植による再生医療」である。具体的には、例えば、下肢虚血（ビュルガー病）患者に対する骨髄間葉系幹細胞の移植、歯周病患部への骨髄間葉系幹細胞の移植、変形性関節症患者に対する骨髄間葉系幹細胞の移植等の治療が開始または計画されている。

[0003] しかしながら、間葉系幹細胞のポピュレーションは、極めて小さく、ひとつの個体から採取できる量は僅かである。従って、再生医療を実施するのに十分な数の間葉系幹細胞を提供するためには、これを安定的に、生存率の高い状態で維持培養して、増殖する必要がある。

[0004] 一方、トレハロースはグルコースが1，1-グリコシド結合してできた二糖の一種である。トレハロースは甘味を呈し、高い保水力を持つため、種々の食品や化粧品に用いられている。また、トレハロースは細胞膜を安定化し、細胞傷害を抑制する性質を有するため、臓器を移植する際の臓器保護液の有効成分として用いられている。ET-Kyoto液やNew ET-Kyoto液等のトレハロースを含有する優れた臓器保存液が開発されている（特許文献1及び2、非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特許第3253131号公報
特許文献2：国際公開第2007/043698号

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Yonsei Medical Journal, vol.45, No.6, p.1107-1114, 2004

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 間葉系幹細胞は接着細胞であるため、これを継代する際には、まずトリプシンにより細胞をプレートから剥離し、血清やトリプシンインヒビターなどを添加した培地や溶液によりトリプシンによるタンパク質分解を停止した後で、遠心分離により剥離した細胞を回収し、これをさらにPBS（-）や生理食塩水により洗浄することによって残存する不活化トリプシンや夾雑物を除去した後で、新鮮な培地に懸濁し、新たなプレートに播いていた。本発明者らは、この継代操作の前後における細胞生存率を詳細に解析した結果、トリプシン処理の後に行われる洗浄操作において間葉系幹細胞の生存率が大きく低下する問題点があることを見出した。
- [0008] 本発明は、間葉系幹細胞の細胞死を抑制しながらこれを継代する技術及び移植に必要な大量の生細胞を回収する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、鋭意検討の結果、間葉系幹細胞を洗浄する際にトレハロースを含有する生理的水溶液を用いると、間葉系幹細胞の細胞死が抑制されることを見出した。この知見に基づき、更に検討を加えた結果、本発明を完成させた。
- [0010] 即ち、本発明は以下に関する。

[1] 間葉系幹細胞のインビトロ継代方法であって、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を、トレハロースを含有する生理的水溶液で洗浄することを含む、方法。

[2] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～10 (w/v) %である、[1]記載の方法。

[3] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～6 (w/v) %である、[1]記載の方法。

[4] トレハロースを含有する生理的水溶液を含む、間葉系幹細胞のインビトロ継代において、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を洗浄するための剤。

[5] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～10 (w/v) %である、[4]記載の剤。

[6] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～6 (w/v) %である、[4]記載の剤。

発明の効果

[0011] 本発明を用いれば、細胞死を抑制しながら間葉系幹細胞を継代することが可能である。したがって、本発明は再生医療における良質な間葉系幹細胞の提供に資する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]間葉系幹細胞の生存率に対するトレハロースの効果を示す。a)は直接生存率の測定結果を示す。b)は、剥離直後の生存率を100%とした場合の相対値を示す。c)は、PBS(-)洗浄処理群の生存率を100%とした場合の相対値を示す。

[図2]間葉系幹細胞の生存率に対するトレハロースの効果を示す。a)は、直接生存率を、トレハロース含有群とトレハロース不含群とで比較した結果を示す。b)は、直接生存率を、トレハロース含有量が3～6 (w/v) %の群と、6.5～10 (w/v) %の群とで比較した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、間葉系幹細胞のインビトロ継代方法であって、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を、トレハロースを含有する生理的水溶液で洗浄することを含む、方法を提供するものである。

- [0014] 「間葉系幹細胞」とは、未分化の状態増殖し、骨細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞の全て又はいくつかへの分化が可能な幹細胞又はその前駆細胞の集団を広義に意味する。
- [0015] 本発明の方法において用いられる間葉系幹細胞は、脊椎動物由来の細胞であれば特に限定されない。該脊椎動物としては、例えば、哺乳動物、鳥、魚、両生動物および爬虫類動物が挙げられる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げる事が出来る。鳥類としては、ニワトリ、ウズラ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、オーストリッチ、エミュ、ダチョウ、ホロホロ鳥、ハト等を挙げる事ができる。脊椎動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（ラット等）又は霊長類（ヒト等）である。
- [0016] 生体においては、間葉系幹細胞は骨髄、末梢血、臍帯血、脂肪組織中に低頻度で存在する。間葉系幹細胞は、これらの組織から公知の方法で単離又は精製することが出来る。「単離または精製」とは、天然に存在する状態とは異なる状態に人為的に置かれること、例えば、天然に存在する状態から、目的とする成分以外の成分を除去する操作が施されていることを意味する。例えば、ヒト間葉系幹細胞は、パーコールグラディエント法により骨髄液から単離することができる (Hum. Cell, vol.10, p.45-50, 1997)。或いは、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)。
- [0017] 間葉系幹細胞は、通常、シャーレ、プレート、ボトル等の培養容器中、適切な培地中で、接着培養される。間葉系幹細胞の培養に用いられる培地の基礎培地は、哺乳動物の接着細胞の維持又は培養に一般的に使用されているものを用いることができ、特に限定されないが、例えばDMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199等が挙

げられる。また、間葉系幹細胞培養用等に改変された培地を用いてもよく、上記基礎培地の混合物を用いてもよい。

[0018] 間葉系幹細胞の培養に用いられる培地は血清を含んでいてもよい。血清としては、哺乳動物由来の血清であれば特に限定されないが、好ましくは上記哺乳動物由来の血清（例えばウシ胎児血清、ヒト血清等）である。また血清の代替添加物（例えばKnockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen社製) 等）を用いてもよい。血清の濃度は特に限定されないが、通常、0.1～30 (v/v) %の範囲である。

[0019] 間葉系幹細胞の培養に用いられる培地は、自体公知の添加物を含むことができる。添加物としては、特に限定されないが、例えば成長因子（例えばインスリン等）、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、糖類（例えばグルコース等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）等が挙げられる。当該添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。

[0020] 培養温度は通常約30～40℃の範囲であり、好ましくは約37℃である。CO₂濃度は通常約1～10%の範囲であり、好ましくは約5%である。湿度は通常約70～100%の範囲であり、好ましくは約95～100%である。

[0021] 間葉系幹細胞の継代時には、まず、アスピレーター等により培地を除去する。次に、培地中に含まれるタンパク質は、タンパク質分解酵素の活性を阻害する可能性があるため、タンパク質を含まない生理的水溶液で間葉系幹細胞を洗浄し、残存する培地を除去する。生理的水溶液としては、タンパク質分解酵素の活性を阻害せず、間葉系幹細胞に対して毒性を有していない限り特に制限されないが、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水、HEPES緩衝化生理食塩水、リンゲル液、5%グル

コース水溶液、哺乳動物培養用の液体培地、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）の水溶液等の等張水溶液等が挙げられる。好ましくはPBSが用いられる。間葉系幹細胞の剥離を促進するため、生理的水溶液は、カルシウムイオンを含まないことが好ましい。

[0022] 次に、培養容器表面に接着した間葉系幹細胞をタンパク質分解酵素で処理することにより培養容器表面から剥離する。タンパク質分解酵素による間葉系幹細胞の処理は、タンパク質分解酵素を含有する生理的水溶液に、間葉系幹細胞を接触させることにより行う。タンパク質分解酵素としては、トリプシン、プロナーゼ、ペプシン、エラスターゼ、コラゲナーゼ等を挙げることができるが、好ましくは、トリプシンが用いられる。生理的水溶液としては、上述のものが挙げられるが、好ましくはPBSが用いられる。間葉系幹細胞の剥離を促進するため、生理的水溶液は、カルシウムイオンを含まないことが好ましい。生理的水溶液中のタンパク質分解酵素の濃度は、タンパク質分解酵素の種類に応じて、適宜間葉系幹細胞を剥離するのに十分な濃度を設定することができるが、通常0.1～1（w/v）%の範囲内である。

[0023] タンパク質分解酵素を含有する生理的水溶液に、カルシウムイオンキレーターを更に含有させ、カルシウムイオンを除去することにより、間葉系幹細胞の剥離を促進することができる。カルシウムイオンキレーターとしては、EDTA、EGTA等を挙げることができるが、好ましくはEDTAである。カルシウムイオンキレーターの濃度は、通常0.1～2 mMの範囲内である。

[0024] タンパク質分解酵素処理時の温度は、通常20～37℃の範囲内である。タンパク質分解酵素による処理時間は、細胞を培養容器から剥離するのに十分な時間であれば特に限定されないが、通常15秒～15分、好ましくは、30秒～10分である。長い時間にわたって間葉系幹細胞をタンパク質分解酵素により処理すると、細胞がダメージを受けて、生存率が低下するおそれがあるので、肉眼や、顕微鏡により細胞の状態を観察しながらタンパク質分

解酵素による処理を行い、細胞の剥離が確認できたら、できるだけ短時間のうちに、次の工程に進むことが好ましい。

[0025] タンパク質分解酵素処理により、間葉系幹細胞を培養容器表面から剥離した後に、得られた間葉系幹細胞の懸濁液に、タンパク質分解酵素の活性を抑制するのに十分な量のタンパク質を含有する生理的水溶液を加えることにより、タンパク質分解酵素の活性を抑制する。タンパク質を含有する生理的水溶液としては、例えば、上述の血清を含有する、間葉系幹細胞の培養用の培地を挙げることができる。得られた間葉系幹細胞の懸濁液を、遠心分離に付し、上清を捨てることにより、剥離した間葉系幹細胞を分離する。

[0026] トレハロースを含有する生理的水溶液による、剥離した間葉系幹細胞の洗浄は、トレハロースを含有する生理的水溶液で分離した間葉系幹細胞を懸濁し、得られた懸濁液を遠心分離に付し、上清を捨てることにより行う。生理的水溶液としては、間葉系幹細胞に対して毒性を有していない限り特に制限されないが、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水、H E P E S 緩衝化生理食塩水、リンゲル液、5%グルコース水溶液、哺乳動物培養用の液体培地、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）の水溶液等の等張水溶液、上述の培地等を挙げるができる。

[0027] 生理的水溶液中のトレハロースの含有量は、間葉系幹細胞の生存率を上昇させる限り限定されないが、通常3~10 (w/v) %、好ましくは3~6 (w/v) %である。トレハロース濃度が高すぎると、間葉系幹細胞の細胞が小さくなる等の細胞形態に影響する可能性があり、トレハロース濃度が低すぎると、間葉系幹細胞の生存率を上昇させる効果が十分に奏されなくなる可能性がある。

[0028] トレハロースを含有する生理的水溶液の好適な具体例として、E T - K y o t o 液（特許第3253131号）を挙げるができる。E T - K y o t o 液は、株式会社大塚製薬工場より市販されている。E T - K y o t o 液中のトレハロース含有量は4.53 (w/v) %である。

- [0029] トレハロースを含有する生理的水溶液による、剥離した間葉系幹細胞の洗浄操作の回数は、1回のみであってもよいし、複数回（たとえば2～4回）行ってもよい。洗浄回数が多すぎると、かえって間葉系幹細胞の生存率が低下してしまうおそれがあるため、洗浄回数は、通常1～2回、好ましくは1回である。
- [0030] 上記洗浄後の間葉系幹細胞は、新鮮な上述の培地中に適切な濃度に懸濁され、新たな培養容器中に播かれる。
- [0031] また、本発明は、上述のトレハロースを含有する生理的水溶液を含む、間葉系幹細胞のインビトロ継代において、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を洗浄するための剤を提供するものである。本発明の剤を用いて、上記本発明の方法により間葉系幹細胞のインビトロ継代を行うことにより、継代の間葉系幹細胞の生存率の低下を最小限に抑制することができる。
- [0032] 刊行物、特許文献等を含む、本明細書に引用されたすべての参考文献は、引用により、それらが個々に具体的に参考として援用されかつその内容全体が具体的に記載されているのと同程度まで、本明細書に援用される。
- [0033] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

[0034] [実施例1]

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（継代数6）（ 1.3×10^6 個）を培養ディッシュ上で10（w/v）%FBS（GIBCO）を含有する α MEM（GIBCO）中で培養した。培地を除去し、PBSにより間葉系幹細胞表面を洗浄した後に、0.25（w/v）%トリプシン（GIBCO）をディッシュに滴下し、室温にて静置した。細胞がディッシュから剥離したのを確認した後、直ちに10（w/v）%FBSを含有する α MEMを加え、ピペティングすることにより、トリプシンによる分解を停止し、細胞を回収した。一部をトリパンブルー染色用に取り、残りの細胞懸濁液を12本の15m

1 遠心チューブに分注し、室温、1000 rpmにて3分間遠心分離し、上清を除去した。細胞のペレットをほぐし、以下の各洗浄用溶液にて細胞を懸濁した。

- ・ PBS (2価イオン不含)
- ・ 乳酸リンゲル液
- ・ 乳酸リンゲル液中のトレハロース溶液 (トレハロース含有量：3～10 (w/v) %)

細胞懸濁液を、室温、1000 rpmにて3分間遠心分離し、上清を除去した。細胞のペレットをほぐし、再び、同一の洗浄用溶液にて細胞を懸濁した。細胞の一部を採取し、トリパンブルーにより染色し、生存率を評価した。

[0035] 結果を図1および2に示す。乳酸リンゲル液に3～10 (w/v) %のトレハロースを添加することにより、間葉系幹細胞の生存率の低下が抑制された。トレハロース含有量が3～6 (w/v) %の範囲内では細胞の形態に大きな変化はなかったが、6.5～10 (w/v) %では、生存率自体は3～6 (w/v) %のものと同様であったが、細胞が全体的に小さくなる傾向が確認された。従って、トレハロースは、少なくとも3～10 (w/v) %の範囲内で間葉系幹細胞の生存率の低下を抑制し、3～6 (w/v) %が好ましい濃度範囲であることが示唆された。

産業上の利用可能性

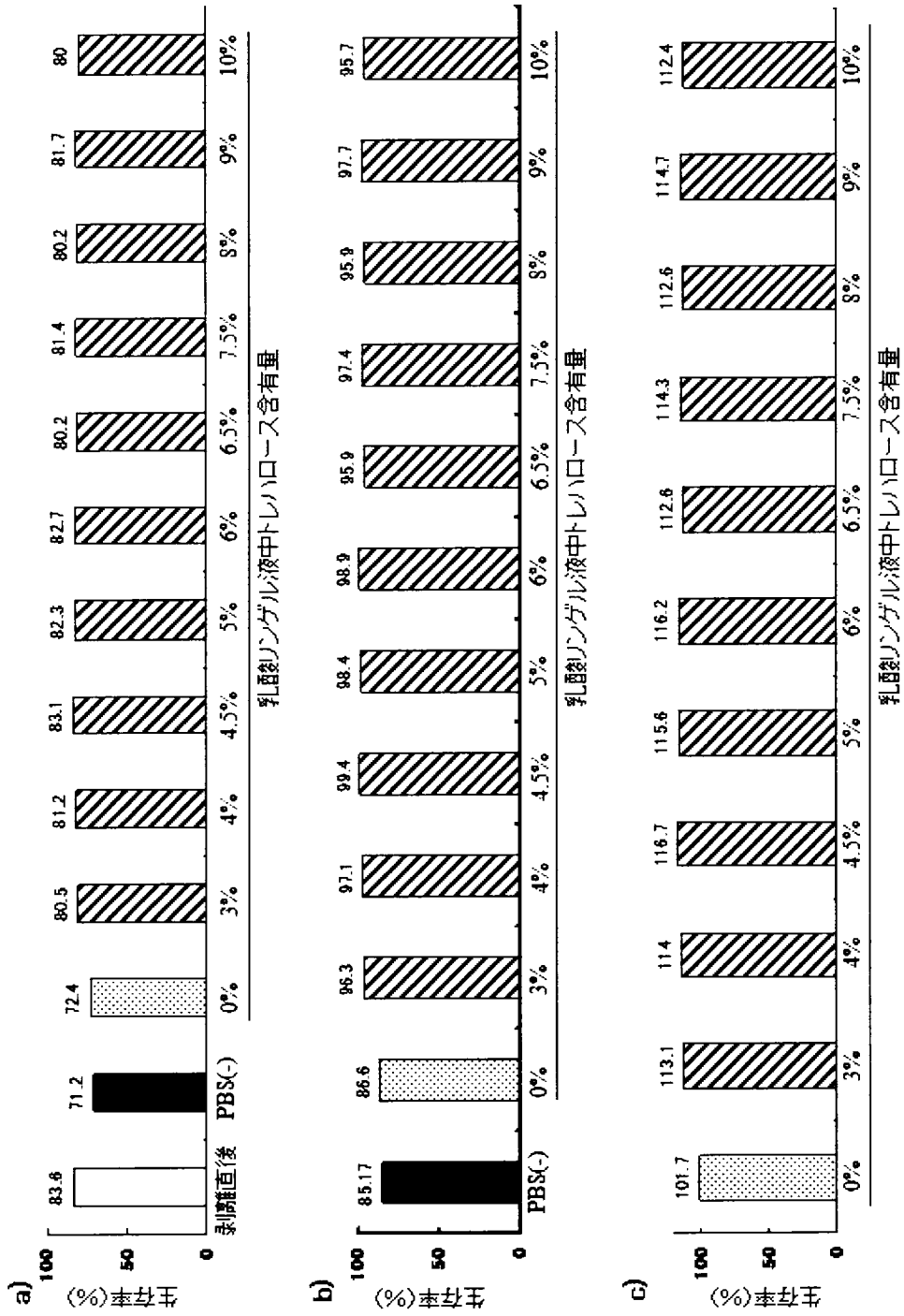
[0036] 本発明を用いれば、細胞死を抑制しながら間葉系幹細胞を回収及び継代することが可能である。したがって、本発明は再生医療における良質な間葉系幹細胞の提供に資する。

[0037] 本出願は日本で出願された特願2011-072068 (出願日：2011年3月29日) を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

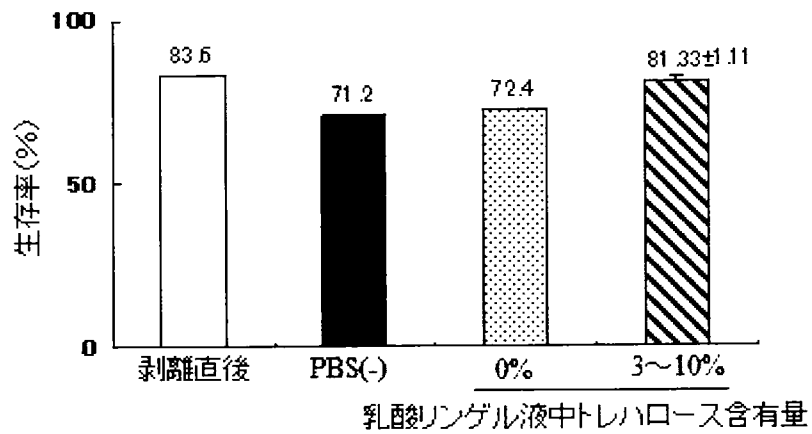
- [請求項1] 間葉系幹細胞のインビトロ継代方法であって、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を、トレハロースを含有する生理的水溶液で洗浄することを含む、方法。
- [請求項2] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～10 (w/v) %である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～6 (w/v) %である、請求項1記載の方法。
- [請求項4] トレハロースを含有する生理的水溶液を含む、間葉系幹細胞のインビトロ継代において、タンパク質分解酵素処理により細胞培養容器から剥離した間葉系幹細胞を洗浄するための剤。
- [請求項5] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～10 (w/v) %である、請求項4記載の剤。
- [請求項6] 生理的水溶液中のトレハロース濃度が3～6 (w/v) %である、請求項4記載の剤。

[図1]

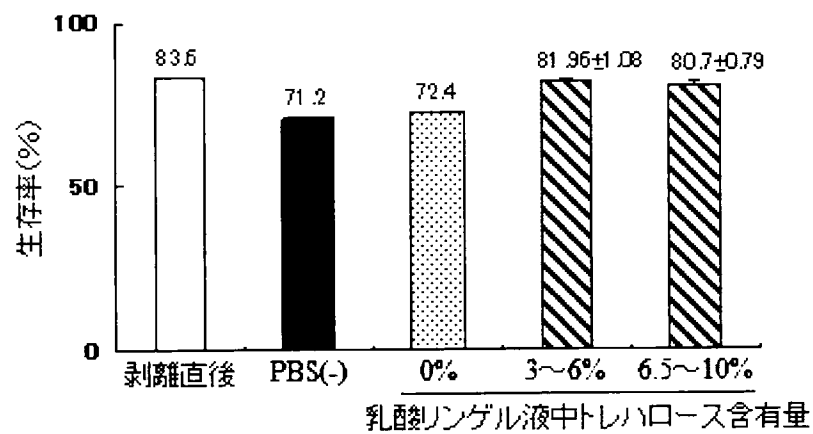


[図2]

a)



b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/0775(2010.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/0775

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, Wiley InterScience, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Atsushi OHATA, et al., "Usagi Mocho Fukuheki Sakka Model o Mochiita Trehalose Seizai no Yuchaku Keigen Koka", Journal of abdominal emergency medicine, 17 February 2011 (17.02.2011), vol.31, no.2, page 434, P-64	1-6
A	Chikako SOMEI, et al., "Effect of the tooth cryopreservation for the cell activity of periodontal membrane - Hozon Eki to shite no Trehalose no Koka -", Japanese Society of Conservative Dentistry 2009 Nendo Shunki Gakujutsu Taikai (Dai 130 Kai) Program, Koen Shorokushu, 11 June 2009 (11.06.2009), page 204, title P126	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 April, 2012 (12.04.12)Date of mailing of the international search report
24 April, 2012 (24.04.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/058225

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU, Y., et al., Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions, <i>Biotechnology Progress</i> , 2010.11, Vol.26, No.6, p.1635-1643	1-6
P,A	DI, G., et al., Development and evaluation of a trehalose-contained solution formula to preserve hUC-MSCs at 4°C, <i>Journal of Cellular Physiology</i> [online], Vol. 227, No. 3, Wiley Online Library, 2011.12.14, p. 879-884, URL < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.23066/abstract >	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/0775		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Wiley InterScience, CiNii		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	大畑淳, 他, ウサギ盲腸・腹壁擦過モデルを用いたトレハロース製材の癒着軽減効果, 日本腹部救急医学会雑誌, 2011.02.17, Vol. 31, No. 2, p. 434, P-64	1-6
A	染井千佳子, 他, 歯の凍結保存が歯根膜細胞活性に与える影響—保存液としてのトレハロースの効果—, 特定非営利活動法人日本歯科保存学会 2009年度春季学術大会 (第130回) プログラムおよび講演抄録集, 2009.06.11, p. 204, 演題 P126	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 12.04.2012	国際調査報告の発送日 24.04.2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 太田 雄三 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3959

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	LIU, Y., et al., Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions, Biotechnology Progress, 2010.11, Vol. 26, No. 6, p. 1635-1643	1-6
P,A	DI, G., et al., Development and evaluation of a trehalose-contained solution formula to preserve hUC-MSCs at 4° C, Journal of Cellular Physiology [online], Vol. 227, No. 3, Wiley Online Library, 2011.12.14, p. 879-884, URL < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.23066/abstract >	1-6