

(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
2018年5月31日(31.05.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/097225 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/02 (2006.01) *C07D 231/26* (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01) *C12N 1/04* (2006.01)

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/042159

(22) 国際出願日: 2017年11月24日(24.11.2017)

(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 2016-229269 2016年11月25日(25.11.2016) JP

(71) 出願人: テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡
ヶ谷二丁目4番1号 Tokyo (JP).

(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, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: 大山 賢二(OYAMA, Kenji); 〒2590151
神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500
番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 竹
内 涼平(TAKEUCHI, Ryohei); 〒2590151 神奈
川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地
テルモ株式会社内 Kanagawa (JP).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(74) 代理人: 葛 和 清 司 (KUZUWA, Kiyoshi);
〒1600023 東京都新宿区西新宿6丁目24
番1号 西新宿三井ビルディング17階 葛
和国際特許事務所 Tokyo (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) Title: PRESERVATIVE SOLUTION FOR LIVE CELLS OR COMPOSITION COMPRISING LIVE CELLS

(54) 発明の名称: 生細胞または生細胞を含む組成物の保存液

(57) Abstract: Provided are a preservation solution for live cells or a composition comprising live cells and a method for using the preservation solution to preserve live cells or a composition comprising live cells, the preservative solution being easy to prepare and exhibiting a high cytoprotective effect, especially during low-temperature storage. The present invention achieves the aforementioned matters by providing a preservative solution for live cells or a composition comprising live cells, the present solution containing vitamin C and/or vitamin E or Edaravone in a liquid, such as a physiological isotonic solution, which serves as the preservative solution.

(57) 要約: 簡便に調製でき、とくに低温保存時において高い細胞保護作用を示す、生細胞または生細胞を含む組成物の保存液、該保存液を用いた生細胞または生細胞を含む組成物の保存方法等を提供する。保存液のベースとなる液体、例えば生理的等張液に、ビタミンCおよび/もしくはビタミンEまたはエダラボンを含む、生細胞または生細胞を含む組成物の保存液を提供することにより、上記課題が解決された。



WO 2018/097225 A1

明 細 書

発明の名称： 生細胞または生細胞を含む組成物の保存液

技術分野

[0001] 本発明は、特定の成分、例えばビタミン、とくにビタミンCおよび／もしくはビタミンEまたはエダラボン、を含む生細胞または生細胞を含む組成物、例えば移植片、の保存液、当該保存液を用いて生細胞または生細胞を含む組成物を保存する方法、および当該保存液を用いてシート状細胞培養物を保存する工程を含む、シート状細胞培養物を製造する方法などに関する。

背景技術

[0002] 近年、損傷した組織等の修復のために、種々の細胞を移植する試みが行われている。例えば、狭心症、心筋梗塞などの虚血性心疾患や拡張型心筋症などにより損傷した心筋組織の修復のために、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、ES細胞等の利用が試みられている（非特許文献1～2）。

[0003] このような試みの一環として、スキャフォールドを利用して形成した細胞構造物や、細胞をシート状に形成したシート状細胞培養物が開発されてきた（特許文献1、非特許文献2）。

シート状細胞培養物の治療への応用については、火傷などによる皮膚損傷に対する培養表皮シートの利用、角膜損傷に対する角膜上皮シート状細胞培養物の利用、食道ガン内視鏡的切除に対する口腔粘膜シート状細胞培養物の利用などの検討が進められており、その一部は臨床応用の段階に入っている。

[0004] 移植による処置において、品質の低下を可能な限り抑えつつ移植片を保存することは、処置の成功に大きく影響する。例えばUW液、Euro-Collins液、ET-Kyoto液など、かかる目的で、保存する移植片の損傷を抑え、品質を保つための保存液が知られている。特許文献2には、特定の組成を有する、低温保存のための細胞非含有溶液が開示されている。また特許文献3には、有

効成分としてポリフェノールを含む細胞または臓器の保存剤、および従来の保存剤にポリフェノールを添加することにより、従来の保存剤の効果を改良することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2007-528755号公報

特許文献2：特表2002-520290号公報

特許文献3：特開2000-344602号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Haraguchi et al., Stem Cells Transl Med. 2012 Feb;1(2):136-41

非特許文献2：Sawa et al., Surg Today. 2012 Jan;42(2):181-4

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、簡便に調製でき、とくに低温保存時において高い細胞保護作用を示す、生細胞または生細胞を含む組成物の保存液を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、シート状細胞培養物を鋭意研究する中で、低栄養液に総合ビタミン剤やエダラボンなどの特定の成分を添加した場合に、シート状細胞培養物の保存性が格段に上昇するという知見を見出し、かかる知見に基づいてさらに研究を続けた結果、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明に下記に掲げるものに関する：

〔1〕 生理的等張液およびビタミンCを含む、移植片保存液。

〔2〕 生理的等張液にビタミンCを添加してなる、〔1〕の移植片保存液。

〔3〕 生理的等張液が、低栄養等張液である、〔1〕または〔2〕の保存液

。

〔４〕生理的等張液が、ハンクス平衡塩液である、〔１〕～〔３〕の保存液。

〔５〕移植片が、シート状細胞培養物である、〔１〕～〔４〕の保存液。

〔６〕移植片が、骨格筋芽細胞を含む移植片である、〔１〕～〔５〕の保存液。

〔７〕〔１〕～〔６〕の保存液に、シート状細胞培養物を浸漬することを含む、シート状細胞培養物の保存方法。

〔８〕保存時の温度が、２～８℃である、〔７〕の保存方法。

〔９〕保存が、２４～１２０時間の間行われる、〔７〕または〔８〕の保存方法。

〔１０〕（ａ）細胞を、実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度で培養基材に播種すること、

（ｂ）播種した細胞をシート化培養してシート状細胞培養物を形成すること、

（ｃ）形成したシート状細胞培養物を剥離すること、および

（ｄ）剥離したシート状細胞培養物を、請求項１～６のいずれか一項に記載の保存液に浸漬すること

を含む、シート状細胞培養物の製造方法。

[0010] 〔１１〕生理的等張液およびビタミンＥを含む、移植片保存液。

〔１２〕生理的等張液にビタミンＥを添加してなる、〔１１〕の移植片保存液。

〔１３〕生理的等張液が、低栄養等張液である、〔１１〕または〔１２〕の保存液。

〔１４〕生理的等張液が、ハンクス平衡塩液である、〔１１〕～〔１３〕の保存液。

〔１５〕移植片が、シート状細胞培養物である、〔１１〕～〔１４〕の保存液。

〔１６〕移植片が、骨格筋芽細胞を含む移植片である、〔１１〕～〔１５〕

の保存液。

[17] [11] ~ [16] の保存液に、シート状細胞培養物を浸漬することを含む、シート状細胞培養物の保存方法。

[18] 保存時の温度が、2 ~ 8℃である、[17] の保存方法。

[19] 保存が、24 ~ 120時間の間行われる、[17] または [18] の保存方法。

[20] (a) 細胞を、実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度で培養基材に播種すること、

(b) 播種した細胞をシート化培養してシート状細胞培養物を形成すること、

(c) 形成したシート状細胞培養物を剥離すること、および

(d) 剥離したシート状細胞培養物を、[11] ~ [16] の保存液に浸漬すること

を含む、シート状細胞培養物の製造方法。

[0011] [21] 生理的等張液、ビタミンCおよびビタミンEを含む、移植片保存液。

[22] 生理的等張液にビタミンCおよびビタミンEを添加してなる、[21] の移植片保存液。

[23] 生理的等張液が、低栄養等張液である、[21] または [22] の保存液。

[24] 生理的等張液が、ハンクス平衡塩液である、[21] ~ [23] の保存液。

[25] 移植片が、シート状細胞培養物である、[21] ~ [24] の保存液。

[26] 移植片が、骨格筋芽細胞を含む移植片である、[21] ~ [25] の保存液。

[27] [21] ~ [26] の保存液に、シート状細胞培養物を浸漬することを含む、シート状細胞培養物の保存方法。

〔28〕保存時の温度が、2～8℃である、〔27〕の保存方法。

〔29〕保存が、24～120時間の間行われる、〔27〕または〔28〕の保存方法。

〔30〕（a）細胞を、実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度で培養基材に播種すること、

（b）播種した細胞をシート化培養してシート状細胞培養物を形成すること、

（c）形成したシート状細胞培養物を剥離すること、および

（d）剥離したシート状細胞培養物を、〔21〕～〔26〕のいずれか一項に記載の保存液に浸漬すること

を含む、シート状細胞培養物の製造方法。

[0012] 〔31〕生理的等張液に総合ビタミン剤を含む、移植片保存液。

〔32〕生理的等張液に総合ビタミン剤を添加してなる、〔31〕の移植片保存液。

〔33〕生理的等張液が、低栄養等張液である、〔31〕または〔32〕の保存液。

〔34〕生理的等張液が、ハンクス平衡塩液である、〔31〕～〔33〕の保存液。

〔35〕移植片が、シート状細胞培養物である、〔31〕～〔34〕の保存液。

〔36〕移植片が、骨格筋芽細胞を含む移植片である、〔31〕～〔35〕の保存液。

〔37〕〔31〕～〔36〕の保存液に、シート状細胞培養物を浸漬することを含む、シート状細胞培養物の保存方法。

〔38〕保存時の温度が、2～8℃である、〔37〕の保存方法。

〔39〕保存が、24～120時間の間行われる、〔37〕または〔38〕の保存方法。

〔40〕（a）細胞を、実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形

成し得る密度で培養基材に播種すること、

(b) 播種した細胞をシート化培養してシート状細胞培養物を形成すること

、

(c) 形成したシート状細胞培養物を剥離すること、および

(d) 剥離したシート状細胞培養物を、[31]～[36]の保存液に浸漬すること

を含む、シート状細胞培養物の製造方法。

[0013] [41] 生細胞または生細胞を含む組成物を保存する保存液であって、エダラボンを含有する、前記保存液。

[42] 保存液が、生細胞を実質的に増殖させない程度に低栄養である、[41]の保存液。

[43] [41]または[42]の保存液であって、生細胞または生細胞を含む組成物をさらに含む、前記保存液。

[44] 生細胞または生細胞を含む組成物が、生体への移植用である、[41]～[43]の保存液。

[45] 生細胞または生細胞を含む組成物が、骨格筋芽細胞を含む、[41]～[44]の保存液。

[46] 生細胞を含む組成物が、シート状細胞培養物である、[41]～[45]の保存液。

[47] シート状細胞培養物が、6 cm²以上の面積を有する、[46]の保存液。

[48] 生細胞または生細胞を含む組成物を保存する方法であって、エダラボンを含有する保存液を用いる、前記方法。

[49] 保存液中で生細胞または生細胞を含む組成物を凍結させることなく保存する、[48]の方法。

[50] 生細胞または生細胞を含む組成物を製造する方法であって、エダラボンを含有する保存液に、生細胞または生細胞を含む組成物を浸漬することを含む、前記方法。

発明の効果

[0014] 本発明により、シート状細胞培養物を形成した後、簡便な組成によりシート状細胞培養物を長期間、品質を保ったまま保存することが可能となる。また、従来用いられていた移植片の保存液は、組成が複雑であったり、安定性が低かったりするという欠点があったが、本発明の保存液であれば、簡便に用時調製可能であるため、保存液そのものの安定性などはあまり考慮する必要がない。また、従来の保存液は、様々な成分を含むため、移植に用いる際に洗浄などにより保存液を洗い流す必要があるが、本発明の保存液であれば、医薬的な使用にも堪え得るグレードの成分で調製可能であるため、施術前の洗浄等、余計な手間を必要としない。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、生理食塩水ベースのビタミン添加保存液で、シート状ヒト骨格筋芽細胞培養物を3日間保存した際の、細胞生存率を表すグラフである。図中VCはビタミンCを、VEはビタミンEをそれぞれ表す。いずれのビタミンを添加した場合でも、無添加の生理食塩水よりも高い細胞生存率を示した。

[図2]図2は、生理食塩水ベースのエダラボン添加保存液で、シート状ヒト骨格筋芽細胞培養物を、5日間保存した際の、細胞生存率を表すグラフである。エダラボンの添加濃度にかかわらず、無添加の生理食塩水よりも高い細胞生存率を示した。

[図3]図3は、HBSS(+)ベースのビタミン添加保存液およびDMEM培地で、シート状ヒト骨格筋芽細胞培養物を3日間保存した際の、細胞生存率を表すグラフである。いずれの場合でも、HBSS(+)ベースビタミン添加保存液の方が、DMEM培地よりも高い細胞生存率を示した。

[図4]図4は、HBSS(+)ベースのエダラボン添加保存液で、シート状ヒト骨格筋芽細胞培養物を、7日間保存した際の、保存後3日後と7日後における細胞生存率を計測し、グラフ化したものである。エダラボン添加保存液は、エダラボン無添加のHBSS(+)と比較して、保存後3日後から7日

後にかけての生細胞数の低下が抑制された。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願、公開された出願および他の出版物は、その全体を参照により本明細書に援用する。また本明細書において参照された出版物と本明細書の記載に矛盾が生じた場合は、本明細書の記載が優先されるものとする。

[0017] 本発明において、「生細胞または生細胞を含む組成物」とは、生きている細胞またはそれを含む細胞集団、懸濁液、細胞混合物、構造物、組織などを意味し、生細胞は、好ましくは生体由来の細胞、より好ましくは生物個体から得られた初代細胞である。生細胞は初代細胞を一世代または複数世代培養して増殖させた細胞でもよい。生細胞は複数世代培養して増殖させた細胞がある生物学的または物理学的条件により増殖を止めた細胞でもよい。生細胞としては、これに限定するものではないが、例えば体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、血液細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などが挙げられる。また、幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）から分化させて得られた体細胞（上述の体細胞を含む）などが挙げられる。

[0018] 「生細胞を含む組成物」は、好ましくは生体から得られた、血液、骨髓液、リンパ液などを含む生体液体、心臓、肝臓、腎臓などを含む臓器、および／または角膜、軟骨、皮膚などを含む組織などを含み得る。

[0019] また、生細胞を含む組成物には、細胞の培養物も含まれ得る。細胞の培養

物としては、これに限定するものではないが、例えば細胞ゲル混合物、シート状細胞培養物（単層シートまたはシート積層体）、スフェアなどを含む細胞塊、細胞懸濁液などが挙げられる。

また、生細胞を含む組成物には、細胞の懸濁液も含まれ得る。細胞の懸濁液としては、培養細胞を懸濁した懸濁液のほか、生体から採取した細胞を懸濁した懸濁液なども含まれる。細胞の懸濁液の態様で用い得る細胞としては、これに限定するものではないが、例えば筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髓、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等のほか、iPS細胞から分化させた幹細胞や体細胞、例えばiPS細胞から分化させた心筋細胞、iPS細胞から分化させた間葉系幹細胞なども包含される。

[0020] 本発明において、「移植片」とは、生体に移植されるための細胞組成物であって、細胞同士が連結して構造物を構成しているものを意味する。したがって移植片としては、臓器などの生体組織のほか、シート状細胞培養物、生体組織様の三次元構造体（例えば心筋シートなど）などの移植用の細胞構造物も含まれ得る。

[0021] 本発明において「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子などの細胞要素を介するものを含む）および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも物理的（機械的）に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞培養物を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも物理的（機械的）に連

結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層（多層）、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。

[0022] シート状細胞培養物は、好ましくはスキャフォールド（支持体）を含まない。本発明の一態様において、シート状細胞培養物は、実質的にスキャフォールド（支持体）を含まない。スキャフォールドは、その表面上および／またはその内部に細胞を付着させ、シート状細胞培養物の物理的一体性を維持するために当該技術分野において用いられることがあり、例えば、ポリビニリデンジフルオリド（P V D F）製の膜等が知られているが、本発明におけるシート状細胞培養物は、かかるスキャフォールドがなくともその物理的一体性を維持することができるものであってもよい。また、シート状細胞培養物は、好ましくは、細胞培養物を構成する細胞由来の物質のみからなり、それら以外の物質を含まない。

[0023] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、i P S（induced pluripotent stem）細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、i P S（induced pluripotent stem）細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等から分化させた体細胞であってもよい。特に、i P S（induced pluripotent stem）細胞から分化させた体細胞が好ましい。i P S（induced pluripotent stem）細胞から分化させた体細胞として、心筋細胞が挙げられる。シート状細胞培養物を構成する細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髄、脂肪

組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、i P S細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。

[0024] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物による治療が可能な任意の生物に由来し得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギなどが含まれる。また、シート状細胞培養物を構成する細胞の種類数は特に限定されず、通常は1種類のみであってもよいが、2種類以上の細胞を用いたものであってもよい。シート状細胞培養物を形成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、シート状細胞培養物の形成終了時において、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%以上である。

[0025] シート状細胞培養物を形成する細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」は、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、サルやブタに由来する細胞などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、特に移植に用いる場合には好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用する場合は、

拒絶反応を抑制するため、免疫抑制処置が必要となることがある。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と総称することもある。本発明の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本発明の一態様において、細胞は自家細胞である。本発明の別の態様において、細胞は他家細胞である。シート状細胞培養物を形成する細胞は自家細胞または他家細胞を免疫抑制処置なしで使用する事ができる。

[0026] シート状細胞培養物は、既知の任意の方法（例えば、特許文献1、特開2010-226991、特開2010-081829、特開2011-110368など参照）で製造することができる。シート状細胞培養物の製造方法は、典型的には、細胞を培養基材上に播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含むが、これに限定されない。細胞を培養基材上に播種するステップの前に、細胞を凍結するステップおよび細胞を解凍するステップを行ってもよい。さらに、細胞を解凍するステップの後に細胞を洗浄するステップを行ってもよい。これら各ステップは、シート状細胞培養物の製造に適した既知の任意の手法で行うことができる。本発明の製造方法は、シート状細胞培養物を製造するステップを含んでもよく、その場合、シート状細胞培養物を製造するステップは、サブステップとして上記シート状細胞培養物の製造方法に係るステップの1または2以上を含んでもよい。ある一態様において、細胞を解凍するステップの後、細胞を培養基材上に播種するステップの前に細胞を増殖させるステップを含まない。

[0027] 本発明の一態様によれば、シート状細胞培養物を低栄養状態で培養することにより、培養基材（例えば、培養皿、好ましくは温度応答性培養皿）から剥離されたシート状細胞培養物の培養基材に付着していた面（培養基材から剥離された面であり、培養基材に付着していた面）を保存（保護）することができる。同様に、シート状細胞培養物の付着面の反対側の面（非付着面）を保存（保護）することができる。培養基材から剥離されたシート状細胞

胞培養物は表面積が低減するように収縮するが、シート状細胞培養物を低栄養状態で培養することにより、シート状細胞培養物の収縮した付着面を保存（保護）することができる。同様に、シート状細胞培養物の付着面の収縮した反対側の面（収縮した非付着面）を保存（保護）することができる。シート状細胞培養物の各々の面を保存（保護）することにより、シート化の目的とする細胞の細胞生存率を向上させることができる。シート状細胞培養物を培養する低栄養状態はこの後に述べる等張な状態で提供することができる。このようにして得られたシート状細胞培養物の付着面または非付着面を臓器に接触するようにして生体に移植することができる。好ましくは、付着面を臓器に接触するようにして生体に移植することができる。

[0028] 「等張」という語は、二種の液体の浸透圧が同等である状態を意味するが、本発明においては別段の記載のない限り「生理的等張」を意味し、細胞内液や血液などの生理的液体と同等の浸透圧を有することをいう。したがって本発明において、「等張液」は別段の記載のない限り「生理的等張液」と同義であり、細胞内液や血液などの生理的液体と同等の浸透圧を有する液体を意味する。等張液としては、これに限定するものではないが、例えばハンクス平衡塩液、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、基礎培地などが挙げられる。

[0029] 本発明において、「低栄養」または「低栄養状態」とは、その条件下におかれた細胞集団の細胞数が、所定の期間増殖も死滅もせず維持される条件であること、すなわち所定の期間細胞数が実質的に変化しない条件であることを意味する。「細胞数が実質的に変化しない」とは、ある時点における細胞数Aと、所定の期間経過後の別の時点における細胞数Bに実質的な差がないことを意味し、具体的には、例えば細胞数Aが細胞数Bの約70%、約80%、約90%、約95%、約100%、約105%、約110%、約120%、約130%などである場合が挙げられる。2つの時点は任意に選択されてよいが、通常の培養条件下で培養した場合には細胞の増殖が確認できる程度の間隔が空いていることが好ましい。かかる間隔としては、例えば3日、

4日、5日、6日、7日などである。

[0030] 低栄養状態は、様々な条件により達成でき、当業者であれば対象の細胞に合わせて適宜低栄養状態を作り出すことができる。低栄養状態の要件としては、典型的には例えば、細胞の生命維持に必要なエネルギーは供給可能であること、および／または細胞の分裂に必要な要素に欠けていること、などが挙げられる。具体的には例えば、代謝に必要な糖分などのエネルギーが供給可能である環境、および／または細胞分裂に必要な必須アミノ酸が供給不可能である環境などが挙げられる。低栄養状態は栄養状態を調整することにより、上述の等張液（例えばハンクス平衡塩液、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、基礎培地）において実現することができる。

[0031] 本発明において「低栄養等張液」とは、等張液のうち低栄養のものを意味する。典型的には例えば、所定量の炭水化物を含む等張液および／または必須アミノ酸を供給できない等張液であり、具体的には例えば、所定量の糖を含むがアミノ酸（とくに必須アミノ酸）を含まない等張液、所定量の糖および必須アミノ酸の合成阻害剤を含む等張液などが挙げられる。低栄養等張液に含まれ得る炭水化物は、典型的には糖であり、これに限定するものではないが、例えばグルコース、ショ糖、マルトース、フルクトース、ガラクトースなどが挙げられ、対象の細胞種などに応じて適宜選択することができる。糖の所定含有量は、含まれる糖の種類や細胞の必要維持期間（浸漬時間）により異なり得る。例えばグルコースの場合、細胞の生命維持の必要量という観点から、例えば約100mg/L以上、約500mg/L以上、約1000mg/L以上、約1500mg/L以上、約2000mg/L以上などが挙げられる。また、等張性の維持という観点から、例えば約50000mg/L以下、約40000mg/L以下、約30000mg/L以下、約25000mg/L以下、約20000mg/L以下、約15000mg/L以下、約10000mg/L以下、約5000mg/L以下、約4500mg/L以下などが挙げられる。したがってグルコースの含有量の範囲としては、これら上限値および下限値の任意の組み合わせであってよく、これに限定

するものではないが、例えば約100～500000mg/L、約500～25000mg/L、約500～4500mg/L、約1500～4500mg/L、約500～1500mg/Lの範囲などが挙げられる。当業者であれば、含まれる糖の種類に従って所定の含有量を算出可能である。

[0032] 低栄養等張液としては、例えばハanks平衡塩液、アール平衡塩液、ブドウ糖等張液など、所定量の糖を含み、かつアミノ酸を含まない組成として知られる等張液の他、例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液などの、炭水化物およびアミノ酸を含まない組成として知られる等張液に、所定量の炭水化物を添加したものであってもよい。一態様において、低栄養等張液には、UW液、Euro-Collins液、ET-Kyoto液、Hypothermosol（登録商標）など、従来臓器の冷蔵保存用溶液として知られた保存液は含まない。

[0033] 「ビタミン」という語は、一般的には生物の生存、生育に必要な微量栄養素のうち、炭水化物、タンパク質、脂質以外の有機化合物を意味するが、本発明における「ビタミン」という語には、それらの誘導体およびビタミン様物質も包含される。ビタミンの誘導体は、元の物質の生物学的活性を維持したまま、置換基の修飾などにより、例えば脂溶性と水溶性を変化させるなど、特性を変化させたものを意味する。例えば脂溶性ビタミンであるビタミンEは、トコフェロールとしても知られているが、これを水溶性に変化させたトロロックスもまた、ビタミンEの誘導体として、本発明のビタミンEに包含される。

[0034] 本発明におけるビタミンとしては、これに限定するものではないが例えば以下のものが挙げられる：

- ・ビタミンA：レチノール、レチナール、レチノイン酸および／またはその誘導体
- ・ビタミンB1：チアミンおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンB2：リボフラビンおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンB3：ナイアシンおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンB5：パントテン酸および／またはその誘導体

- ・ビタミンB6：ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンB7：ビオチンおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンB9：葉酸および／またはその誘導体
- ・ビタミンB12：シアノコバラミンおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンC：アスコルビン酸および／またはその誘導体
- ・ビタミンD：エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロールおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンE：トコフェロールおよび／またはその誘導体
- ・ビタミンK：フィロキノン、メナキノンおよび／またはその誘導体。

[0035] 本発明において、「保存する」とは、対象物である生細胞または生細胞を含む組成物の所望の機能および効果を損なわない程度に、その対象物に含まれる生細胞の生存を維持し、および／または生細胞が有する機能を維持することを意味する。したがって本発明において「保存液」とは、保存の用に供する液体、すなわち生細胞または生細胞を含む組成物を浸漬した場合に、上記の保存の効果を有する液体を意味する。「保存液」には、保存対象の生細胞または組成物を含む態様も、保存対象を含まない態様も包含される。生細胞からなるシート状細胞培養物をその機能と効果を損なわない程度に含まれている生細胞の生存を維持し、および／または生細胞が有する機能を維持することを含む。生細胞の生存の維持および／または生細胞が有する機能の維持はシート状細胞培養物の場合、付着面および／または非付着面において発揮される。シート状細胞培養物の付着面および／または非付着面の細胞生存率を向上させることができ、細胞生存率の向上によってシート状細胞培養物の保護（保存）の期間を長くすることができる。また、シート状細胞培養物の保護（保存）期間におけるシート状細胞培養物の治療効果の低減を防止することができる。

[0036] <1>ビタミン含有保存液

本発明は、一側面において、生理的等張液、好ましくは低栄養等張液にビ

タミンCおよび／またはEを含む、移植片を保存するための保存液に関する。

本発明の保存液は、生理的等張液に特定のビタミン、特にビタミンCおよび／またはビタミンEを含むものであり、当該液に生細胞または生細胞を含む組成物、例えば移植片を浸漬した状態で保存すると、移植片中の生細胞の残存量を大幅に向上させ、長期に亘り移植片を高品質に保つことが可能となる。

[0037] 本発明の保存液に含まれ得るビタミンとしては、これに限定するものではないが、例えばビタミンA、ビタミンB 1、ビタミンB 2、ビタミンB 3、ビタミンB 5、ビタミンB 6、ビタミンB 7、ビタミンB 9、ビタミンB 12、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKなどが挙げられる。したがって一態様において、本発明の保存液は、ビタミンA、ビタミンB 1、ビタミンB 2、ビタミンB 3、ビタミンB 5、ビタミンB 6、ビタミンB 7、ビタミンB 9、ビタミンB 12、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンEおよびビタミンKからなる群から選択される1または2以上のビタミンを含む。

[0038] 本発明の保存液には、特に含まれるビタミンとして脂溶性ビタミンを含む場合などにおいて、さらに可溶化剤などの追加の成分を含んでよい。本発明の保存液に含まれ得る可溶化剤としては、脂溶性ビタミンを水に溶解し得るものであればいかなるものを用いてもよく、典型的には両親媒性の可溶化剤、例えば界面活性剤、プロピレングリコールなどの両親媒性化合物、ポリソルベート20、ポリソルベート80などの両親媒性ポリマーなどが挙げられる。

[0039] 本発明の保存液は、保存液の保存効果を阻害しない限り、さらに任意の追加成分を含んでよい。追加の成分としては、本発明の保存液の効果を増強し得る成分が好ましい。かかる成分としては、例えばエダラボンなどのラジカルスカベンジャーなどが挙げられる。好ましい一態様において、本発明の保存液は、生理的等張液（好ましくは低栄養等張液）、ビタミンおよび任意に

可溶化剤以外の成分を含まない。

[0040] 好ましい一態様において、本発明の保存液は、ビタミンとしてビタミンCおよび／またはEを含む。以下本明細書において、ビタミンCおよび／またはビタミンEを「必須ビタミン」と称する。かかる態様において、必須ビタミン以外のビタミン（以下「任意ビタミン」と称する）は、含んでも含まなくてもよい。したがってある態様において、本発明の保存液は、必須ビタミンのみを含み、例えばビタミンCのみ、ビタミンEのみまたはビタミンCおよびビタミンEのみを含む。

[0041] 本発明は、ビタミン、特に必須ビタミンを生理的等張液に加えた液を保存液として用いると、生細胞の生存を好適に維持することができるという知見に基づくものである。必須ビタミンを含む生理的等張液が高い保存効果を発揮する理由としては、これらに拘束されるものではないが、必須ビタミンが抗酸化剤またはラジカルスカベンジャーとして機能することにより、細胞を傷害する成分を除去しているため、などが考えられる。また、ビタミンCおよびビタミンEの併用により、さらに高い保存効果を発揮することが可能であることも見出された。これはビタミンCおよびビタミンEが保存効果を発揮する作用が異なる可能性を示唆する。

[0042] 任意ビタミンとしては、これに限定するものではないが、例えばビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKなどが挙げられる。ある態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKからなる群から選択される1または2以上のビタミンのみを含む。

[0043] 例えばある態様においては、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDま

たはビタミンKのいずれか1種のみを含む。別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか2種のみを含む。

[0044] 別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか3種のみを含む。別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか4種のみを含む。

[0045] 別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか5種のみを含む。別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか6種のみを含む。

[0046] 別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか7種のみを含む。別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるい

ずれか8種のみを含む。

[0047] 別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか9種のみを含む。別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択されるいずれか10種のみを含む。

[0048] 別の一態様において、本発明の保存液は、任意ビタミンとして、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKのみを含む。

したがって一態様において、本発明の保存液は、必須ビタミンとしてビタミンCのみ、ビタミンEのみまたはビタミンCおよびEのみと、任意ビタミンとしてビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKから選択される1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種または11種のビタミンとの任意の組み合わせのみを含む。

[0049] 具体的には、例えば本発明の保存液に必須ビタミンとしてビタミンCのみを含む場合、任意ビタミンの組み合わせとしては、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKのみを含む場合のほか、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンDおよびビタミンKのうち、ビタミンAのみ、ビタミンB1のみ、ビタミンB2のみ、ビタミンB3のみ、ビタミンB5のみ、ビタミン

B 6のみ、ビタミンB 7のみ、ビタミンB 9のみ、ビタミンB 1 2のみ、ビタミンDのみ、ビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6のみ、ビタミンAおよびビタミンB 7のみ、ビタミンAおよびビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 3のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 3およびビタミンB 5のみ、ビタミンB 3およびビタミンB 6のみ、ビタミンB 3およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 3およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 3およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 3およびビタミンDのみ、ビタミンB 3およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 5およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 6およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 6およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 6およびビタミンDのみ、ビタミンB 6およびビタミンKのみ、ビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビ

ミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、
ビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンDおよびビタミンKのみ、
[0050] ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 のみ、ビタミンAおよび
ビタミンB 1 およびビタミンB 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およ
びビタミンB 3 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 5 の
み、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 6 のみ、ビタミンAお
よびビタミンB 1 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1
およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB
1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンDのみ、ビタミン
AおよびビタミンB 1 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB
2 およびビタミンB 3 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2 およびビタミン
B 5 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2 およびビタミンB 6 のみ、ビタミ
ンAおよびビタミンB 2 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンAおよびビタミ
ンB 2 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2 およびビタ
ミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2 およびビタミンDのみ、ビ
タミンAおよびビタミンB 2 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタ
ミンB 3 およびビタミンB 5 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3 およびビ
タミンB 6 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3 およびビタミンB 7 のみ、
ビタミンAおよびビタミンB 3 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよび
ビタミンB 3 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3 お
よびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3 およびビタミンKのみ
、ビタミンAおよびビタミンB 5 およびビタミンB 6 のみ、ビタミンAおよ
びビタミンB 5 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5 お
よびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5 およびビタミンB 1
2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5 およびビタミンDのみ、ビタミンA
およびビタミンB 5 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6
およびビタミンB 7 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6 およびビタミンB
9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミ

ンAおよびビタミンB 6 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 7 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 7 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 7 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0051] ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 5 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 6 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 のみ、

ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0052] ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB7のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB6のみ、ビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB7のみ、ビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB7のみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB9およびビタミン

B 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0053] ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB9のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7のみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9のみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0054] ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 12のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 12のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7

およびビタミンDのみ、ビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB5およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0055] ビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0056] ビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB12およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0057] ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3のみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5のみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB6のみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB7のみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB2およびビタミ

[illegible]

びビタミンB 1 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンA およびビタミンB 1 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンA およびビタミンB 1 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0058] ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5のみ、
 、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6の
 み、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB7
 のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB
 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミン
 B12のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタ
 ミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB3およびビタ
 ミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB5およびビタ
 ミンB6のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB5およびビ
 タミンB7のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB5および
 ビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB5およ
 びビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB5
 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB5
 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB6
 およびビタミンB7のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミンB
 6およびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタミン
 B6およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタ
 ミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタ
 ミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビタ
 ミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およびビ
 タミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB2およ
 びビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およ
 びビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB2およ
 びビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB2
 およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB2

およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 2
およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB
2およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミン
B 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0059] ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 6のみ
、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 7の
み、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 9
のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB
1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミン
Dのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミン
Kのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミン
B 7のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビ
タミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビ
タミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6およ
びビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6およ
びビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 7およ
びビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 7お
よびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB
7およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB
7およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB
9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミ
ンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミ
ンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミ
ンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビ
タミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビ
タミンDおよびビタミンKのみ、

[0060] ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7のみ
、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9の

み、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンKのみ、

[0061] ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、
 ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2
 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンD
 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンK
 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB
 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミン
 Dのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミン
 Kのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミン
 Dのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビ
 タミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンDおよびビ
 タミンKのみ、

[0062] ビタミンAおよびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンKの

み、ビタミンAおよびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB12およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0063] ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB7のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB9のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB12のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンDのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンKのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB6のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB7のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB9のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンB12のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンDのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB5およびビタミンKのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB7のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB9のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB9のみ

ンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、 ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、
 ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、
 ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0065] ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 5およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0066] ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB

9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0067] ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0068] ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 6のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 2およびビタミン

ンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2および
ビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およ
びビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 2お
よびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミン
B 2およびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、 vitam
ンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、 vitam
ンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、
ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 1 2およびビタミンKの
み、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンDおよびビタミンKの
み、

[0069] ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7の
み、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB
9のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびvitami
ンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6および
ビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およ
びビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7お
よびビタミンB 9のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB
7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびvitam
ンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびvitam
ンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5および
ビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5
およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB
5およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびvitamin
B 5およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびvitam
ンB 5およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2および
ビタミンB 5およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0070] ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9の
み、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB

12のみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0071] ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB12およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0072] ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB7のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB9のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビ

ミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5および
 ビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB5および
 ビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB5
 およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB
 5およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミン
 B5およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタ
 ミンB5およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB3および
 ビタミンB5およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0073] ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0074] ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB9およびビタミン

ンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 3およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0075] ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0076] ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0077] ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビ

タミンDのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0078] ビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0079] ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 2および

ビタミンB 5 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 および
ビタミンB 2 およびビタミンB 5 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよび
ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 の
み、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 6
およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB
2 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミ
ンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 6 およびビタミンDのみ、ビタ
ミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 6 およびビ
タミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビ
タミンB 7 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 および
ビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAお
よびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンD
のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB
7 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB
2 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミ
ンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタ
ミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 9 およびビ
タミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビ
タミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 および
ビタミンB 2 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよ
びビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンDおよびビタミンKのみ
、

[0080] ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およ
びビタミンB 6 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 3 お
よびビタミンB 5 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1
およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンB 9 のみ、ビタミン
AおよびビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミ
ンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビ

タミンB5およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB1および
 ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンKのみ、ビタミンAおよび
 ビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7のみ
 、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンB6お
 よびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB3
 およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミン
 B1およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミ
 ンAおよびビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタ
 ミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB3およびビタ
 ミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビタミンB1および
 ビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよ
 びビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンB7およびビタミンDの
 み、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンB7
 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB3
 およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンAおよびビタミン
 B1およびビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミ
 ンAおよびビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンB9およびビタ
 ミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB3およびビタ
 ミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB1および
 ビタミンB3およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンAおよ
 びビタミンB1およびビタミンB3およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0081] ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビ

ミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンAおよびビ
 タミンB1およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB12の
 み、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB5およびビタミンB7
 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB5
 およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB1
 およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミ
 ンAおよびビタミンB1およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタ
 ミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB5およびビタ
 ミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタ
 ミンB5およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビ
 タミンB1およびビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンKのみ
 、ビタミンAおよびビタミンB1およびビタミンB5およびビタミンDおよ
 びビタミンKのみ、

[0082] ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0083] ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンAおよびビタミンB 1 およびビタミンB 7

およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1
およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンA
およびビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミン
Dのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミン
B 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタ
ミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミ
ンB 1およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビ
タミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およ
びビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1およびビタミンB 9およ
びビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 1および
ビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0084] ビタミンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およ
びビタミンB 6のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3お
よびビタミンB 5およびビタミンB 7のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2
およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 9のみ、ビタミン
AおよびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミ
ンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビ
タミンB 5およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビ
タミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビ
タミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7のみ
、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6お
よびビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3
およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミン
B 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンDのみ、ビタミ
ンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタ
ミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタ
ミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 2およびビ
タミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよ

タミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、
ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2お
よびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 6お
よびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3
およびビタミンB 6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0090] ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9およ
びビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 7
およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3
およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンA
およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミ
ンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミ
ンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタ
ミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミ
ンB 3およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビ
タミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およ
びビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およびビタミンB 9およ
びビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 3およ
びビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0091] ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およ
びビタミンB 9のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 6お
よびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB
5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミン
AおよびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミ
ンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミ
ンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビ
タミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビ
タミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、
ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2お

よびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0092] ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0093] ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 6および

ビタミンB 1 2 およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0094] ビタミンAおよびビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンAおよびビタミンB 7およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンAおよびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0095] ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 5 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およ

びビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB1およびビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[illegible]

[0097] ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0098] ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 7 およびビタミンD およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 2 およびビタミンB 1 2 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[illegible]

[0100] ビタミンB 1およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 12のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 12のみ、ビタミンB 1およびビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミ

ンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 6 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0101] ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 7 およびビタミンD およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 9 およびビタミンD およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 3 およびビタミンB 1 2 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0102] ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタミ

ンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 6 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0103] ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 7 およびビタミンD およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 5 およびビタミンB 1 2 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0104] ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 9 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 7 およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB

1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 およびビタミンDのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンB 1 2 およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 9 およびビタミンD およびビタミンKのみ、ビタミンB 1 およびビタミンB 6 およびビタミンB 1 2 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0105] ビタミンB 1およびビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 1およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0106] ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB7のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB6およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3および

びビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0107] ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB9のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB2およびビタミンB3およびビタミンB6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0108] ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビ

ミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 3およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0109] ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0110] ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタ

ミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 5およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0111] ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0112] ビタミンB 2およびビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 2およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0113] ビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9のみ、ビタミンB 3およびビタミンB 5およびビタミンB

6 およびビタミンB7 およびビタミンB12のみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンB7 およびビタミンDのみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンB7 およびビタミンKのみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンB9 およびビタミンB12のみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンB9 およびビタミンDのみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンB9 およびビタミンKのみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンB12 およびビタミンDのみ、ビタミンB3 およびビタミンB5 およびビタミンB6 およびビタミンD およびビタミンKのみ、

[0114] ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンB12のみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB9およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB7およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンDのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンB12およびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB3およびビタミンB5およびビタミンB12およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0115] ビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 3およびビタミンB 6およびビタミン

B 7 およびビタミン B 9 およびビタミン D のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 7 およびビタミン B 9 およびビタミン K のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 7 およびビタミン B 1 2 およびビタミン D のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 7 およびビタミン B 1 2 およびビタミン K のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 7 およびビタミン B 9 およびビタミン B 1 2 およびビタミン D のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 9 およびビタミン B 1 2 およびビタミン K のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 9 およびビタミン D およびビタミン K のみ、ビタミン B 3 およびビタミン B 6 およびビタミン B 1 2 およびビタミン D およびビタミン K のみ、

[0116] ビタミンB 3およびビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 3およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 3およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0117] ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2のみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタ

ミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 6およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0118] ビタミンB 5およびビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 5およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、

[0119] ビタミンB 6およびビタミン7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 7およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみ、ビタミンB 6およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみまたはビタミンB 7およびビタミンB 9およびビタミンB 1 2およびビタミンDおよびビタミンKのみを含むあるいは含まない場合が挙げられる。

[0120] 本発明の保存液に必須ビタミンとしてビタミンEのみを含む場合、ならびにビタミンCおよびビタミンEを含む場合においても、含まれ得る任意ビタミンの組み合わせとしては、必須ビタミンとしてビタミンCのみを含む場合について上記した任意ビタミンの組み合わせと同一の組み合わせがそれぞれ挙げられる。

[0121] 上記必須ビタミンおよび任意ビタミンの組み合わせとして、総合ビタミン剤を用いてもよい。本発明において「総合ビタミン剤」とは、日本標準商品

分類番号の中分類 87「医薬品及び関連製品」中の分類 873179「混合ビタミン剤（ビタミン A・D 混合製剤を除く）」に分類されるものを意味し、医薬品グレードとして市販されるものを含む。総合ビタミン剤は液剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤など様々な剤型で市販されているが、混合の容易さの観点から、好ましくは液剤である。

[0122] 総合ビタミン剤に含まれ得るビタミンとしては、例えばビタミン A、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B3、ビタミン B5、ビタミン B6、ビタミン B7、ビタミン B9、ビタミン B12、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E およびビタミン K などが挙げられ、これらのビタミンを任意に組み合わせ合わせて配合される。配合されるビタミンの例としては、例えばビタミン A、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B3、ビタミン B5、ビタミン B6、ビタミン B7、ビタミン B9、ビタミン B12、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E およびビタミン K のみからなる 13 種、ビタミン A、ビタミン B5、ビタミン B7、ビタミン B9、ビタミン B12、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E およびビタミン K のみからなる 9 種、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B3、ビタミン B5、ビタミン B6、ビタミン B7、ビタミン B9、ビタミン B12 およびビタミン C のみからなる 9 種、ビタミン A、ビタミン D、ビタミン E およびビタミン K のみからなる 4 種、ビタミン B5 およびビタミン C のみからなる 2 種などが挙げられる。

[0123] 本発明に用いられる総合ビタミン剤としては、好ましくは必須ビタミン、すなわちビタミン C、ビタミン E またはビタミン C および E を含むものである。かかる総合ビタミン剤の例としては、これに限定するものではないが、例えばビタジェクト（登録商標）注（テルモ）、オーツカ MV 注（大塚製薬工場）、シナール（登録商標）配合顆粒（塩野義製薬）、シーピー配合顆粒（東和薬品）、ダイメジン・マルチ注（日医工）、デラキシー（登録商標）配合顆粒（丸石製薬）、ネオラミン・マルチ V（登録商標）注射用（日本化薬）、マルタミン（登録商標）注射用（エイワイファーマ）などが挙げられる。ビタジェクト注（テルモ）に含まれるビタミンは、A 液として、レチノ

ールパルミチン酸エステル（ビタミンA）、エルゴカルシフェロール（ビタミンD）、トコフェロール酢酸エステル（ビタミンE）、フィトナジオン（ビタミンK）、シアノコバラミン（ビタミンB₁₂）、葉酸（ビタミンB₉）、ビオチン（ビタミンB₇）、パンテノール（パントテン酸として、ビタミンB₅）およびアスコルビン酸（ビタミンC）であり、B液として、チアミン塩化物塩酸塩（ビタミンB₁）、リボフラビンリン酸エステルナトリウム（リボフラビンリン酸として、ビタミンB₂）、ピリドキシン塩酸塩（ビタミンB₆）およびニコチン酸アミド（ビタミンB₃）である。本発明の総合ビタミン剤としてビタジェクト注を用いる態様には、ビタジェクト注A液とB液とを組み合わせる用いる態様、およびビタジェクト注のA液のみ用いB液を用いない態様が含まれる。

[0124] 本発明の保存液に含まれる必須ビタミンの量は、保存する生細胞または生細胞を含む組成物の生存を維持し、悪影響を与えない程度の量であれば特に限定されない。したがって一態様において、本発明の保存液は、生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物を保存するのに有効な量の必須ビタミンを含む。上述のとおり、本発明の保存液において必須ビタミンはラジカルスカベンジャーとして機能していると推測される。したがって一態様において、本発明の保存液は、ラジカルスカベンジャーとして有効な量の必須ビタミンを含む。

[0125] 必須ビタミンの具体的な配合量としては、例えば必須ビタミンがビタミンCの場合、下限値として例えば0.1 mM、0.2 mM、0.5 mM、1 mM、2 mM、5 mM、10 mMなどであってよく、上限値として2 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、30 mM、50 mM、100 mMなどであってよい。したがってビタミンCの含有量の範囲としては、これらの数値の任意の組み合わせであってよく、これに限定するものではないが、例えば0.1 mM～2 mM、0.2 mM～2 mM、0.5 mM～2 mM、1 mM～2 mM、0.2 mM～5 mM、1 mM～5 mM、2 mM～5 mM、0.2 mM～10 mM、2 mM～10 mMなどが挙げられる。

[0126] 必須ビタミンがビタミンEの場合、配合量の下限值として例えば5 μ M、10 μ M、20 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M、500 μ Mなどであってよく、上限値として100 μ M、200 μ M、500 μ M、1 mM、2 mM、5 mMなどであってよい。したがってビタミンEの含有量の範囲としては、これらの数値の任意の組み合わせであってよく、これに限定するものではないが、例えば0.5 μ M~100 μ M、10 μ M~100 μ M、20 μ M~100 μ M、50 μ M~100 μ M、100 μ M~200 μ M、5 μ M~200 μ M、10 μ M~200 μ M、10 μ M~500 μ M、100 μ M~5 mMなどが挙げられる。

[0127] 必須ビタミンがビタミンCおよびビタミンEの場合、それぞれのビタミンの配合量は、上記ビタミンCおよびビタミンEにおけるそれぞれの下限值および上限値の任意の組み合わせであってよい。上述のとおり、ビタミンCとビタミンEは併用することで、より高い保存効果を発揮することができ、その効果は互いの効果を阻害しないと考えられるため、併用する場合であってもそれぞれの含有量は独立して設定することができる。

[0128] 本発明の一態様において、生理的等張液に必須ビタミンを添加することにより、本発明の保存液を調製することができる。したがって、生細胞または生細胞を含む組成物、例えばシート状細胞培養物などの移植片、が浸漬された状態の生理的等張液に、必須ビタミンを添加することによって、本発明の保存液に生細胞または生細胞を含む組成物を浸漬した状態とすることができる。添加するビタミンとしては必須ビタミンさえ添加されればよく、必須ビタミンのみを添加してもよいし、必須ビタミンに加えて任意ビタミンを添加してもよい。また、必須ビタミンに加えてさらに他のラジカルスカベンジャー、例えばエダラボンなど、を添加してもよい。

必須ビタミンの添加量は、本発明の保存液について上記した必須ビタミンの含有量に準ずる。すなわち、上記含有量となるように、必須ビタミンを添加する。ビタミンの組み合わせとして総合ビタミン剤を用いる態様においても、用いる総合ビタミン剤に含まれる必須ビタミンの量を基準として総合ビ

タミン剤の添加量を計算する。

[0129] 本態様の生理的等張液は、ビタミンを含んでいても含んでいなくてもよい。好ましい一態様において、本態様の生理的等張液は、ビタミンを含まない。また、本発明の一態様において、生理的等張液として低栄養等張液を用いる。低栄養等張液とすることにより、生理食塩水やリンゲル液など糖を含まない等張液や、基礎培地などの高栄養な等張液を用いる場合よりも高い保存性を発揮することができる。低栄養等張液の中でも、調製の簡便さなどの観点から、特にハンクス平衡塩液（HBSS）が好ましい。ハンクス平衡塩液は、グルコースを1000mg/Lの濃度で含む等張液として、その組成が当該技術分野において公知である。ハンクス平衡塩液には、マグネシウムやカルシウムなどの2価のカチオンを含むHBSS（+）およびそれらを含まないHBSS（-）があるが、本発明においてより好ましくはHBSS（+）である。

[0130] 本発明の保存液は、上述のとおり、医薬品グレードの剤を組み合わせることで調製することができるため、移植片を保存液から取り出した後、洗浄することなく移植の用に供することができるという利点を有する。すなわち本発明は、物理的に洗浄が困難な移植片、例えば脆弱なシート状細胞培養物などにおいて特に好適に用いることができる。したがって本発明の一態様において、本発明の保存液は、シート状細胞培養物の保存に用いられる。

[0131] シート状細胞培養物は、種々の疾患、特に組織の異常に関連する疾患の処置に有用である。したがって、一態様において、シート状細胞培養物は、組織の異常に関連する疾患の処置に用いるためのものである。処置の対象となる組織としては、限定されずに、例えば、心筋、角膜、網膜、食道、皮膚、関節、軟骨、肝臓、膵臓、歯肉、腎臓、甲状腺、骨格筋、中耳、骨髄などが挙げられる。また、処置の対象となる疾患としては、限定されずに、例えば、心疾患（例えば、心筋傷害（心筋梗塞、心外傷）、心筋症（拡張型心筋症など）、心筋虚血など）、角膜疾患（例えば、角膜上皮幹細胞疲弊症、角膜損傷（熱・化学腐食）、角膜潰瘍、角膜混濁、角膜穿孔、角膜瘢痕、スティ

ーブンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘡など）、網膜疾患（例えば、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症など）、食道疾患（例えば、食道手術（食道ガン除去）後の食道の炎症・狭窄の予防など）、皮膚疾患（例えば、皮膚損傷（外傷、熱傷）など）、関節疾患（例えば、変形性関節炎など）、軟骨疾患（例えば、軟骨の損傷など）、肝疾患（例えば、慢性肝疾患など）、脾臓疾患（例えば、糖尿病など）、歯科疾患（例えば、歯周病など）、腎臓疾患（例えば、腎不全、腎性貧血、腎性骨異常栄養症など）、甲状腺疾患（例えば、甲状腺機能低下症など）、筋疾患（例えば、筋損傷、筋炎など）、中耳疾患（例えば、中耳炎など）、骨髓疾患（例えば、白血病、再生不良性貧血、免疫不全疾患など）が挙げられる。

[0132] シート状細胞培養物は、処置の対象となる組織に適用し、これを修復、再生するために使用することもできるが、ホルモンなどの生理活性物質の給源として、処置の対象となる組織以外の部位（例えば、皮下組織など）に移植することもできる。

シート状細胞培養物は、細胞培養物を含む医薬組成物の製造に使用することができる。かかる医薬組成物は、種々の追加分、例えば、薬学的に許容し得る担体や、細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などを含んでいてもよい。かかる追加分としては、既知の任意のものを使用することができ、当業者はこれらの追加分について精通している。また、医薬組成物は、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などと併用することができる。

[0133] 本発明の一態様において、シート状細胞培養物は、心疾患の処置のために用いられるシート状細胞培養物である。心疾患の処置のために用いられるシート状細胞培養物としては、これに限定するものではないが、例えば骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物、心筋細胞を含むシート状細胞培養物、血管内皮細胞を含むシート状細胞培養物、間葉系幹細胞を含むシート状細胞培養物などが挙げられる。好ましくは、骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養

物、心筋細胞を含むシート状細胞培養物および血管内皮細胞を含むシート状細胞培養物である。

[0134] 骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物に含まれ得る他の構成細胞としては、例えば線維芽細胞、血管内皮細胞、および／またはそれらに分化し得る細胞（例えば幹細胞、前駆細胞）などが挙げられる。心筋細胞を含むシート状細胞培養物に含まれ得る他の構成細胞としては、例えば血管内皮細胞、平滑筋細胞、および／またはそれらに分化し得る細胞（例えば幹細胞、前駆細胞）などが挙げられる。血管内皮細胞を含むシート状細胞培養物に含まれ得る他の構成細胞としては、例えば骨格筋芽細胞、線維芽細胞、心筋細胞および／またはそれらに分化し得る細胞（例えば幹細胞、前駆細胞）などが挙げられる。間葉系幹細胞を含むシート状細胞培養物に含まれ得る他の構成細胞としては、例えば脂肪細胞、骨格筋芽細胞、線維芽細胞、心筋細胞および／またはそれらに分化し得る細胞（例えば幹細胞、前駆細胞）などが挙げられる。

[0135] 本発明の好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞および線維芽細胞を含む。さらに好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞および線維芽細胞ならびに骨格筋芽細胞または線維芽細胞から分化した細胞以外の細胞を含まない。本発明の別の好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、心筋細胞および血管内皮細胞を含む。さらに好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、心筋細胞および血管内皮細胞ならびに血管内皮細胞から分化した細胞以外の細胞を含まない。本発明の別の好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞を含む。さらに好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞ならびに骨格筋芽細胞、線維芽細胞または血管内皮細胞から分化した細胞以外の細胞を含まない。本発明の別の好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、間葉系幹細胞を含む。さらに好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、間葉系幹細胞および間葉系幹細胞から分化した細胞以外の細胞を

含まない。本発明の別の好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、間葉系幹細胞および骨格筋芽細胞を含む。さらに好ましい一態様において、シート状細胞培養物は、間葉系幹細胞および骨格筋芽細胞ならびに間葉系幹細胞または骨格筋芽細胞から分化した細胞以外の細胞を含まない。

[0136] 移植片を保存する際の温度、すなわち本発明の保存液を使用する際の温度は、移植片に損傷を与えない範囲で、適宜選択することができる。一態様において、保存は凍結させずに行われる。一態様において、保存は室温で行われる。また別の態様において、保存は冷蔵条件、例えば約2℃～8℃で行われる。したがって保存時の温度条件の非限定例としては、約2～40℃、約2～35℃、約2～30℃、約2～25℃、約2～20℃、約2～15℃、約2～10℃、約2～8℃、約2～4℃、約8～40℃、約10～40℃、約15～40℃、約20～40℃、約25～40℃、約30～40℃、約35～40℃、約8～35℃、約8～30℃、約8～25℃、約15～40℃などが挙げられる。保存時間が長くなる場合、移植片への損傷を低減できるという観点から、冷蔵条件が好ましい。

[0137] 移植片の保存時間、すなわち本発明の保存液で保存可能な時間は、移植片に損傷を与えない範囲であれば特に限定されないが、保存液に低栄養等張液を用いる態様においては、あまり長時間の浸漬は好ましくない。保存時間の上限としては、これに限定するものではないが、例えば2日（48時間）以下、3日（72時間）以下、100時間以下、5日（120時間）以下、150時間以下、1週間（168時間）以下、200時間以下などが挙げられる。また、保存時間の下限としては、これに限定するものではないが、例えば24時間以上、12時間以上、10時間以上、8時間以上、6時間以上、4時間以上などが挙げられる。したがってシート状細胞培養物の浸漬時間の範囲としては、これら上限値および下限値の任意の組み合わせであってよく、これに限定するものではないが、例えば4～200時間、6～200時間、8～200時間、10～200時間、12～200時間、24～200時間、4～168時間、6～168時間、8～168時間、10～168時間

、 12～168時間、24～168時間、4～150時間、6～150時間、8～150時間、10～150時間、12～150時間、24～150時間、4～120時間、6～120時間、8～120時間、10～120時間、12～120時間、24～120時間、4～100時間、6～100時間、8～100時間、10～100時間、12～100時間、24～100時間、4～72時間、6～72時間、8～72時間、10～72時間、12～72時間、24～72時間、4～48時間、6～48時間、8～48時間、10～48時間、12～48時間、24～48時間などが挙げられる。

[0138] 本発明の保存液は、上述のとおり、保存対象である生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物を包含していてもよい。すなわち、保存対象を浸漬させた状態の保存液も本発明の保存液に包含される。したがって、一態様において本発明の保存液は、保存液中に生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物を含む。

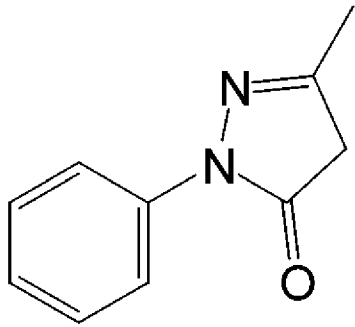
[0139] <2>エダラボン含有保存液

本発明は一側面において、エダラボンを含有する、生細胞または生細胞を含む組成物を保存する保存液に関する。

本発明の保存液は、例えば生理的等張液など、細胞を傷害しない液体にエダラボンを含むものであり、当該液に生細胞または生細胞を含む組成物、例えば移植片を浸漬した状態で保存すると、移植片中の生細胞の残存量を大幅に向上させ、長期に亘り移植片を高品質に保つことが可能となる。

[0140] エダラボンは、以下の一般式：

[化1]



で表される化合物、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンの別称であり、強力なフリーラジカルスカベンジャーとして知られており、脳梗塞急性期に使用される脳保護剤の成分として用いられている。エダラボンは、脳虚血時や血流再開時に発生するフリーラジカルを除去することにより細胞の障害を抑えて、脳保護作用を示すことが知られている。

[0141] 本発明者らにより、例えば生理的等張液など、細胞を傷害しない液体にエダラボンを添加した液体中に、生細胞を含む組成物、例えばシート状細胞培養物を浸漬して保存すると、エダラボンを添加していないものに浸漬して保存した場合と比較して、該組成物中の生細胞数の減少を大幅に抑えることができることが見出された。

[0142] 本発明の保存液は、エダラボンを含有せしめるという簡潔な構成により、生細胞等の保存において従来公知の保存液に代替可能な程度の効果を生じさせ、しかも数日間という比較的長期の保存を可能とするものである。本発明の保存液がかかる効果を奏することができる理由の一つとしては、エダラボンの有する上記フリーラジカル除去能が関係していると考えられる。本発明の保存液は、エダラボンを有効成分として用いることによって、従来公知の保存液のような複雑な組成を要さず、また、安定性が高く取り回しが容易な、簡単な組成の保存液を実現せしめたものである。

[0143] 本発明の一態様において、エダラボンとしては、エダラボンを有効成分とする市販の製剤、例えば、エダラボン含有水性製剤「ラジカット（登録商標）注」（田辺三菱製薬）、「エダラボン点滴静注30mg「NP」」（ニブ

ロ)などが用いられる。

本発明の一態様において、エダラボンを生体や細胞に対して悪影響を及ぼさない液体に添加することにより、本発明の保存液を調製することができる。生体や細胞に対して悪影響を及ぼさない液体としては、例えば生理的等張液などが挙げられる。好ましい一態様において、本発明の保存液は、例えばハンクス平衡塩液、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、基礎培地などの生理的等張液に、エダラボンを含有せしめたものである。

[0144] 好ましい一態様において、保存液は、医薬品としての使用に堪え得る等張液、例えばハンクス平衡塩液および生理食塩水などをベースとして、該等張液にエダラボンを添加することによって調製することができる。かかる態様においては、医薬品としての使用に堪え得る等張液に、医薬品グレードのエダラボンを添加することによって保存液を調製することができるため、医薬品グレードの保存液を実現することが可能である。その場合、保存液の成分が保存対象中に残存した場合であっても生体への適用において問題がなく、例えばその保存対象を移植や実験、医薬組成物への加工などに使用する際に、保存液から取り出した後洗浄によって保存液の残存成分を除去する必要がなくなる。

[0145] かかる態様の保存液は、生細胞を含む組成物の中でも洗浄が困難なものにも使用することができるという利点がある。例えば、シート状細胞培養物は、臓器などと異なり機械的に脆弱であり、洗浄時の水流などにより容易に破壊される可能性があるため、洗浄により保存液の成分を完全に除去することは困難であるが、本態様の保存液を用いることにより、そのような問題を解決することができる。したがって臨床への適用に用いられる生細胞または組成物の保存に用いる場合に安全性上の利点がある。

[0146] 本発明の一態様において、保存液は、生細胞を実質的に増殖させない程度に低栄養、すなわち保存液のベースとして低栄養等張液を用いる。本態様の保存液のベースとして用い得る低栄養等張液としては、これに限定するものではないが、例えばハンクス平衡塩液、アール平衡塩液、ブドウ糖等張液な

どが挙げられる。

[0147] 上述のとおり、本発明の保存液には、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物を含む態様が包含される。したがって本発明の一態様において、保存液は、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物を含む。かかる態様において、本発明の保存液は、液中に保存対象である生細胞または生細胞を含む組成物を浸漬した状態の保存液である。すなわち、エダラボンを含有する保存液と、該保存液に保存された状態の生細胞または組成物との組合せもまた、本発明に包含される。

[0148] 本発明の好ましい一態様において、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物は、生体への移植用である。ここで「移植用」とは、生体内に導入することを目的としたものであることを意味する。移植の方法は限定されない。生体への移植用の生細胞またはそれを含む組成物としては、例えばシート状細胞培養物、細胞塊などの生細胞を含む移植片、生細胞を含む医薬組成物などが挙げられる。一態様において本発明の生細胞を含む組成物は、実質的に生細胞のみからなる組成物である。ここで、「実質的に生細胞のみからなる」とは、生細胞および当該生細胞に由来する細胞または物質（例えば、生細胞から分化した細胞、生細胞から分泌された細胞外マトリクスなど）のみから構成されることを意味する。

[0149] 本発明の好ましい一態様において、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物は、骨格筋芽細胞を含む。かかる保存対象は、例えば、骨格筋芽細胞を含む細胞集団や、骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物などの組成物であり得る。かかる態様において、生細胞または生細胞を含む組成物は、実質的に骨格筋芽細胞のみを含むものであっても、骨格筋芽細胞とそれ以外の細胞とを含むものであってもよい。骨格筋芽細胞とともに生細胞の細胞集団または組成物に含まれ得る他の構成細胞は、＜1＞において、骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物について上記したとおりである。別の一態様において、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物は、心筋細胞、血管内皮細胞、および間葉系幹細胞から選択される1種または2種以上を含む。かかる

保存対象としては、例えば、心筋細胞、血管内皮細胞、および間葉系幹細胞から選択される１種または２種以上を含む細胞集団や、心筋細胞、血管内皮細胞および間葉系幹細胞から選択される１種または２種以上を含むシート状細胞培養物などの組成物であり得る。かかる態様において、生細胞または生細胞を含む組成物は、実質的に心筋細胞および／または血管内皮細胞のみを含むものであっても、実質的に間葉系幹細胞のみを含むものであっても、心筋細胞、血管内皮細胞、および間葉系幹細胞から選択される１種または２種以上とそれ以外の細胞とを含むものであってもよい。心筋細胞、血管内皮細胞および／または間葉系幹細胞とともに生細胞の細胞集団または組成物に含まれ得る他の構成細胞は、＜１＞において、心筋細胞、血管内皮細胞または間葉系幹細胞を含むシート状細胞培養物について上記したとおりである。

[0150] 一態様において、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物は、シート状細胞培養物などの構造物を形成したものであってもよい。かかる構造物は、生細胞により構成された構造物か、または、生細胞を少なくとも一部に含有する構造物である。生細胞により構成された構造物は、生細胞が互いに連結して、例えば、シート状、層状、その他生体内の組織に近い三次元形状などの特定の形状および／または機械的構造を有するものである。生細胞により構成された構造物の例としては、シート状細胞培養物が挙げられる。生細胞を少なくとも一部に含有する構造物の例としては、スキャフォールド（支持体）を有する細胞シート、培養基材に定着した状態の細胞などが挙げられる。好ましい一態様において、保存対象の生細胞または生細胞を含む組成物は、シート状細胞培養物である。かかる態様におけるシート状細胞培養物は、＜１＞において上記したとおりである。

[0151] 本発明の一態様において、保存対象のシート状細胞培養物は、下記＜３＞において詳述するとおり、培養基材上で形成された後、剥離されずに、本発明の保存液または本発明の保存液のベースとなる生理的等張液、例えば生理食塩水またはハンクス平衡塩液などに浸漬される。この場合、剥離時に用いる媒体として本発明の保存液または本発明の保存液のベースとなる生理的等

張液を用いることができる。かかる態様の具体例としては、例えば培養基材上で形成されたシート状細胞培養物に低栄養等張液を加えて浸漬させてそのまま冷却されるか、または冷却した低栄養等張液を加え、剥離した後エダラボンを添加し、そのまま浸漬された後、回収されて使用に供される。

別の一態様において、シート状細胞培養物は、培養基材上で形成された後、培養基材から剥離され、剥離後に本発明の保存液に浸漬される。シート状細胞培養物は、培養基材から剥離されるとある程度収縮することが知られている。かかる収縮の程度は、シート状細胞培養物を構成する細胞種や含有比率、形成条件などにより異なる。例えば骨格筋芽細胞を含む細胞集団を、シート形成培養により形成した場合、その収縮割合としては、例えばシートの径が約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%程度となる。本発明の一態様において、剥離された（すなわち収縮した）シート状細胞培養物は、その面積が約1 cm²以上、約3 cm²以上、好ましくは約6 cm²以上、さらに好ましくは約10 cm²以上であり得る。一態様において、本発明の保存液に含まれるシート状細胞培養物の面積は、約6 cm²以上である。

[0152] 本側面の保存液についての他の態様、例えば本側面の保存液を用いる際の保存条件や、他の含有成分など、上記<2>において明示されていない構成については、上記<1>に準ずる。したがって、例えば本側面の保存液は、さらにビタミン、好ましくは必須ビタミンを含んでよい。

[0153] <3>生細胞または生細胞を含む組成物の保存方法

本発明は一側面において、上記<1>または<2>の保存液を用いて、生細胞または生細胞を含む組成物を保存する方法に関する。

本発明の保存方法は、本発明の保存液に保存対象である生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物、を浸漬する工程を含む。

本発明の保存方法において用いられる保存液については、上記<1>または<2>において記載したとおりである。また、浸漬する工程における浸漬

条件、すなわち浸漬する際の温度および浸漬時間についても、上述の保存温度および保存時間についての記載のとおりである。

[0154] 生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物の本発明の保存液への浸漬において、上述の浸漬における条件の任意の組み合わせであってよい。生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物を本発明の保存液に浸漬する際の条件は、浸漬する生細胞または生細胞を含む組成物および保存液の種類により変化し得、当業者であれば至適な条件を適宜選択することができる。例えば骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物を低栄養等張液ベースとした本発明の保存液に浸漬する場合の非限定例としては、約2～8℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約4～200時間程度、約2～8℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約8～150時間程度、約2～8℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約12～120時間程度、約2～8℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約24～72時間程度、約15～30℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約4～200時間程度、約15～30℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約8～150時間程度、約15～30℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約12～120時間程度、約15～30℃で、ハンクス平衡塩液ベースの保存液に約24～72時間程度、約2～8℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約4～200時間程度、約2～8℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約8～150時間程度、約2～8℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約12～120時間程度、約2～8℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約24～72時間程度、約15～30℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約4～200時間程度、約15～30℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約8～150時間程度、約15～30℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約12～

120時間程度、約15～30℃で、グルコース濃度4500mg/Lの低栄養等張液ベースの保存液に約24～72時間程度などが挙げられる。

[0155] 本発明の保存方法における浸漬する工程には、保存対象である生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物に本発明の保存液を加えることにより浸漬する態様、本発明の保存液に保存対象である生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物を入れることにより浸漬する態様その他、保存対象である生細胞または生細胞を含む組成物、好ましくは移植片、より好ましくはシート状細胞培養物、を浸漬させた生理的等張液、好ましくは低栄養等張液、にエダラボンおよび／またはビタミンを添加して本発明の保存液を調製する態様も含まれる。これらにはエダラボンおよびビタミンを含む態様、エダラボンのみ含みビタミンを含まない態様、およびエダラボンを含まずビタミンのみ含む態様がある。

[0156] 保存対象がシート状細胞培養物である一態様において、シート状細胞培養物は、培養基材上で形成された後、剥離されずに本発明の保存液または本発明の保存液のベースとなる生理的等張液に浸漬され、その後剥離される。この場合、剥離時に用いる媒体として本発明の保存液または本発明の保存液のベースとなる生理的等張液を用いてもよい。本発明の保存液を剥離時に用いる媒体として用いる場合は、本発明の保存液を直接加えてシート状細胞培養物を浸漬してもよいし、低栄養等張液を加えて浸漬させた後、剥離前にエダラボンおよび／またはビタミンを添加することにより本発明の保存液を調製し、その後剥離してもよい。かかる態様の具体例としては、例えば培養基材上で形成されたシート状細胞培養物に低栄養等張液を加えて浸漬させてそのまま冷却されるか、または冷却した低栄養等張液を加え、剥離した後エダラボンおよび／またはビタミンを添加し、そのまま浸漬された後、回収されて使用に供される。

[0157] 別の一態様において、シート状細胞培養物は、培養基材上で形成された後、培養基材から剥離され、剥離後に本発明の保存液に浸漬される。シート状

細胞培養物は、培養基材から剥離されるとある程度収縮することが知られている。かかる収縮の程度は、シート状細胞培養物を構成する細胞種や含有比率、形成条件などにより異なる。例えば骨格筋芽細胞を含む細胞集団を、本願発明のシート形成培養を用いて形成した場合、その収縮割合としては、例えばシートの径が約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%程度となる。本発明の一態様において、剥離された（すなわち収縮した）シート状細胞培養物は、その面積が約1 cm²以上、約3 cm²以上、好ましくは約6 cm²以上、さらに好ましくは約10 cm²以上であり得る。

[0158] <4>シート状細胞培養物の製造方法

本発明の一側面において、シート状細胞培養物を製造する方法が提供される。

本発明のシート状細胞培養物の製造方法は、以下の工程（a）～（d）を含む：

（a）細胞を、実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度で培養基材に播種する工程、

（b）播種した細胞をシート化培養してシート状細胞培養物を形成する工程、

（c）形成したシート状細胞培養物を剥離する工程、および

（d）剥離したシート状細胞培養物を、本発明の保存液に浸漬する工程。

[0159] 工程（a）において、播種される細胞には、上記シート状細胞培養物を構成する細胞から選択される1種または2種以上の細胞が含まれる。2種以上の細胞が含まれる場合、シート状細胞培養物を形成する2種類以上の細胞のうち、最も多い細胞の含有比率（純度）は、シート状細胞培養物の形成終了時において、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%以上である。一態様において、本発明の製造方法は、細胞を播種する前に、細胞を凍結する工程および該凍結細胞を解凍する工程を含む。前記態様において、解凍して得られた細胞は、その後細胞を増殖させたうえで播種してもよいが、好ましい一態様において、凍結細胞を

解凍する工程と工程（a）との間に細胞を増殖させる工程を含まない。かかる態様で製造されたシート状細胞培養物は、凍結細胞を解凍する工程と工程（a）との間に細胞を増殖させる工程を含む態様で製造されたシート状細胞培養物より、例えば、サイトカイン産生能、生着能、血管誘導能および組織再生能などの活性が高い。ここで、活性が高いとは、比較対象のシート状細胞培養物の活性を基準として、限定されずに、例えば、５％以上、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上または１００％以上、活性が高いことを意味する。

[0160] 本発明の製造方法により製造されるシート状細胞培養物は、好ましくは心疾患の処置のために用いられるシート状細胞培養物である。したがって、本発明の好ましい一態様において、播種される細胞集団は、骨格筋芽細胞を含む。本発明の別の好ましい一態様において、播種される細胞集団は、心筋細胞を含む。本発明の別の好ましい一態様において、播種される細胞集団は、血管内皮細胞を含む。本発明の別の好ましい一態様において、播種される細胞集団は、骨格筋芽細胞および線維芽細胞を含む。さらに好ましい一態様において、播種される細胞集団は、実質的に骨格筋芽細胞および線維芽細胞のみからなる。本発明の別の好ましい一態様において、播種される細胞集団は、心筋細胞および血管内皮細胞を含む。さらに好ましい一態様において、播種される細胞集団は、実質的に心筋細胞および血管内皮細胞のみからなる。本発明の別の好ましい一態様において、播種される細胞集団は、骨格筋芽細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞を含む。さらに好ましい一態様において、播種される細胞集団は、実質的に骨格筋芽細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞のみからなる。本発明の別の好ましい一態様において、播種される細胞集団は間葉系幹細胞を含む。さらに好ましい一態様において、播種される細胞集団は、実質的に間葉系幹細胞のみからなる。

[0161] 「実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度」とは、成長因子を実質的に含まない非増殖系の培養液で培養した場合に、シート

状細胞培養物を形成することができる細胞密度を意味する。この播種密度は、成長因子を含む培養液を用いる手法におけるものよりも高いものであり、細胞がコンフルエントに達する密度以上であってもよい。かかる密度としては、これに限定するものではないが、例えば、 1.0×10^5 個/ cm^2 以上である。播種密度の上限は、細胞培養物の形成が損なわれず、細胞が分化に移行しなければ特に制限されないが、例えば、 3.4×10^6 個/ cm^2 未満であってもよい。一態様において、「細胞が実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度」は、細胞がコンフルエントに達する密度もしくはそれ以上、または、コンフルエント密度以上である。この密度を生物学的または物理学的条件に含む。

[0162] 「細胞が実質的に増殖することなくシート状細胞培養物を形成し得る密度」は、ある態様では $1.0 \times 10^5 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、別の態様では $3.0 \times 10^5 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では $3.5 \times 10^5 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では $1.0 \times 10^6 \sim 3.4 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では $3.0 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^6$ 個/ cm^2 、別の態様では $3.5 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^6$ 個/ cm^2 、さらに別の態様では $1.0 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^6$ 個/ cm^2 である。上記範囲は、上限が 3.4×10^6 個/ cm^2 未満である限り、上限および下限の両方、または、そのいずれか一方を含んでもよい。したがって、上記密度は、例えば、 3.0×10^5 個/ cm^2 以上 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限を含み、上限は含まない）、 3.5×10^5 個/ cm^2 以上 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限を含み、上限は含まない）、 1.0×10^6 個/ cm^2 以上 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限を含み、上限は含まない）、 1.0×10^6 個/ cm^2 超 3.4×10^6 個/ cm^2 未満（下限も上限も含まない）、 1.0×10^6 個/ cm^2 超 1.7×10^6 個/ cm^2 以下（下限は含まないが、上限は含む）であってもよい。

[0163] 培養基材は、細胞がその上でシート状細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、当該技術分野において通常用いられるものをを用い得る。

かかる基材としては、これに限定するものではないが、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ナイロン6, 6、ポリビニルアルコール、セルロース、シリコン、ポリスチレン、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、金属（例えば、鉄、ステンレス、アルミニウム、銅、真鍮）等が挙げられる。培養基材には、培養容器の一面（例えば容器の底面）の他、細胞培養用スキャフォールドの表面などが含まれ得る。

[0164] 培養基材の表面は、細胞接着性を高めるための加工、剥離を容易にするための加工などを含む、シート状細胞培養物の製造において有利となるような加工が施されていてもよい。このような加工としては、これに限定するものではないが、例えばコロナ放電処理、紫外線照射処理、コラーゲンゲルや親水性ポリマーなどの親水性化合物によるコーティング、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外マトリックスや、カドヘリンファミリー、セ렉チンファミリー、インテグリンファミリーなどの細胞接着因子などによるコーティング、例えば温度や光などの刺激に応答して物性が変化する材料によるコーティングなどが挙げられる。

[0165] 温度や光などの刺激に応答して物性が変化する材料としては、これに限定するものではないが、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド等）、N, N-ジアルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N, N-ジメチル（メタ）アクリルアミド、N, N-エチルメチルアクリルアミド、N, N-ジエチルアクリルアミド等）、環状基を

有する（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-プロペニル）-モルホリン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-モルホリン等）、またはビニルエーテル誘導体（例えば、メチルビニルエーテル）のホモポリマーまたはコポリマーからなる温度応答性材料、アゾベンゼン基を有する光吸収性高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体、および、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲル等の光応答性材料などの公知のものをを用いることができる（例えば、特開平2-211865、特開2003-33177参照）。これらの材料に所定の刺激を与えることによりその物性、例えば、親水性や疎水性を変化させ、同材料上に付着した細胞培養物の剥離を促進することができる。温度応答性材料で被覆された培養皿は市販されており（例えばUpCell^(R)、セルシード）、これらを本発明の製造方法に使用することができる。

[0166] 上記培養基材は、種々の形状であってもよく、任意の大きさおよび形状の容器で行うことができるが、平坦であることが好ましい。また、その面積は特に限定されないが、典型的には、約1 cm²～約200 cm²、好ましくは約2 cm²～約100 cm²、より好ましくは約3 cm²～約50 cm²である。

[0167] 工程（b）において、播種した細胞をシート化培養することでシート状細胞培養物を形成する。「シート化培養」は、培養基材に播種した細胞を、シート状細胞培養物を形成する（すなわち、シート化する）ように培養することを意味する。シート化培養は、典型的には、培養基材にシート状細胞培養物を形成し得る細胞を播種し、所定の期間（例えば、8～48時間、10～36時間、11～30時間、12～26時間など）、細胞間接着を形成する条件下で培養して細胞同士を相互作用させ、細胞同士を連結させることによ

り行う。培養される期間は、シート状細胞培養物が形成されるのに十分な期間であれば特に限定されない。播種される細胞集団に未分化細胞が含まれる場合、所定の期間は、好ましくは細胞が分化に移行しない期間内である。したがって、この態様において、細胞は、培養期間中、未分化の状態に維持される。細胞の分化への移行は、当業者に知られた任意の方法で評価することができる。例えば、骨格筋芽細胞の場合は、MHCの発現や、細胞の多核化を分化の指標とすることができる。

[0168] 細胞間接着を形成する条件は、細胞間接着を形成することができる任意の条件を含み、これには、限定されずに、例えば、一般的な細胞培養条件が含まれる。かかる条件としては、例えば、37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。また、培養期間は、細胞間接着を形成するのに十分な期間という観点から、これに限定するものではないが、例えば8時間以上、9時間以上、10時間以上、11時間以上、12時間以上であり、細胞分化防止の観点から、これに限定するものではないが、例えば48時間以内、40時間以内、36時間以内、30時間以内、26時間以内、24時間以内である。したがって培養期間としては、これら上限および下限の任意の組み合わせを例示することができる、これに限定するものではないが、例えば8～48時間、9～48時間、10～48時間、11～48時間、12～48時間、8～40時間、9～40時間、10～40時間、11～40時間、12～40時間、8～36時間、9～36時間、10～36時間、11～36時間、12～36時間、8～30時間、9～30時間、10～30時間、11～30時間、12～30時間、8～26時間、9～26時間、10～26時間、11～26時間、12～26時間、8～24時間、9～24時間、10～24時間、11～24時間、12～24時間などである。当業者であれば、播種する細胞の種類に応じて最適な条件を選択することができる。シート化培養の非限定例は、例えば、特許文献1、特開2010-081829、特開2010-226991、特開2011-110368、特開2011-172925、WO2014/185517などに記載されている。

[0169] シート化に用いるシート化媒体としては、細胞のシート化を誘導し得るものであれば特に限定されず、例えば、生理食塩水、種々の生理緩衝液（例えば、PBS、HBSS等）、種々の細胞培養用の基礎培地をベースにしたものなどを使用することができる。かかる基礎培地には、限定されずに、例えば、DMEM、MEM、F12、DME、RPMI1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7、DMEM/F12などが含まれる。これらの基礎培地の多くは市販されており、その組成も公知となっている。基礎培地は、標準的な組成のまま（例えば、市販されたままの状態）用いてもよいし、細胞種や培養条件に応じてその組成を適宜変更してもよい。したがって、基礎培地は、公知の組成のものに限定されず、1または2以上の成分が追加、除去、増量もしくは減量されたものを含む。シート化媒体は、血清（例えば、ウシ胎仔血清などのウシ血清、ウマ血清、ヒト血清等）、種々の成長因子（例えば、FGF、EGF、VEGF、HGF等）などの添加物を含んでもよい。

[0170] また、上述のとおり、細胞は実質的に増殖しない密度で播種されるため、従来の方法のように細胞培養物が所望の大きさに成長するのを待つことなく、所望の大きさおよび形状のシート状細胞培養物を短期間で得ることが可能である。シート状細胞培養物の大きさや形状は、培養基材の細胞付着面の大きさ・形状を調整すること、または、培養容器の細胞付着面に、所望の大きさ・形状の型枠を設置し、その内部で細胞を培養することなどにより任意に調節することができる。

[0171] 工程（c）において、形成したシート状細胞培養物を剥離する。剥離には、シート状細胞培養物の構造を保ったまま培養基材から剥離できれば特に限定されず、当該技術分野において知られた方法を用いることができる。具体的には例えば、タンパク質分解酵素（例えばトリプシンなど）による酵素処理、ピペッティングなどの機械的処理、支持体を用いた物理的な剥離などによって行うことができる。また、培養基材に温度や光などの刺激に応答して

物性が変化する材料で表面を被覆した培養基材を用いた場合には、所定の刺激を加えることで、非酵素的に遊離することもできる。例えば低温で接着性が低下する温度応答性の材料で表面を被覆した培養基材を用いた場合、剥離用の媒体（上記シート化媒体と同じであってもよいし、生理的等張液や本発明の保存液であってもよい）を加えて冷却し、または冷却した剥離用媒体を加えることで接着性を低下させ、剥離することができる。

[0172] シート状細胞培養物は、培養基材から剥離されるとある程度収縮することが知られている。かかる収縮の程度は、シート状細胞培養物を構成する細胞種や含有比率、形成条件などにより異なる。例えば骨格筋芽細胞および線維芽細胞を含む細胞集団を、本願発明のシート形成培養を用いて形成した場合、その収縮割合としては、例えばシートの径が約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%程度となる。本発明の一態様において、剥離された（すなわち収縮した）シート状細胞培養物は、その面積が約1 cm²以上、約3 cm²以上、好ましくは約6 cm²以上、さらに好ましくは約10 cm²以上であり得る。

かかる剥離工程の詳細は、上記<3>において、保存対象がシート状細胞培養物である態様について記載したとおりである。

[0173] 工程（d）において、剥離したシート状細胞培養物を、上記<1>または<2>に記載の保存液に浸漬する。したがって、シート状細胞培養物は、収縮した状態で本発明の保存液に浸漬される。かかる浸漬工程の詳細は、上記<3>において、保存対象がシート状細胞培養物である態様について記載したとおりである。また、剥離用媒体として本発明の保存液を用いる場合、工程（c）にて剥離した後、そのまま剥離用媒体（すなわち本発明の保存液）に浸漬させることで工程（d）としてもよい。また、剥離媒体として生理的等張液、好ましくは低栄養等張液を用いる場合、工程（c）にて剥離した後、エダラボンおよび／またはビタミンを添加することで剥離媒体を本発明の保存液とし、そのまま浸漬させることで工程（d）としてもよい。

[0174] 本発明において、適切に温度等の浸漬条件をコントロールすることができ

る限り、シート状細胞培養物を低栄養等張液に浸漬した状態で輸送することができる。また、本発明の方法により改変されたシート状細胞培養物は、低栄養等張液から取り出した後すぐに移植に使用することができる。したがって本発明の一態様において、シート状細胞培養物を製造し、低栄養等張液に浸漬し、その状態で輸送および保存した後、取り出して使用してもよい。

[0175] 本発明のシート状細胞培養物は、上述のとおり、医薬組成物の製造のために用いることができる。したがって本発明には、本発明のシート状細胞培養物を含む医薬組成物および本発明のシート状細胞培養物またはそれを含む医薬組成物を用いて上記各種疾患を処置する方法も包含される。

本発明の処置方法は、シート状細胞培養物またはそれを含む医薬組成物の有効量を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。処置方法の対象となる組織や疾患は、シート状細胞培養物について上記したとおりである。また、かかる処置方法においては、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などを、細胞培養物と併用することができる。

[0176] 本明細書に記載された種々の特徴は様々に組み合わせることができ、そのような組合せにより得られる態様は、本明細書に具体的に記載されていない組合せも含め、すべて本発明の範囲内である。また、当業者は、本発明の精神から逸脱しない多数の様々な改変が可能であることを理解しており、かかる改変を含む均等物も本発明の範囲に含まれる。したがって、本明細書に記載された態様は例示にすぎず、これらが本発明の範囲を制限する意図をもって記載されたものではないことを理解すべきである。以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

実施例

[0177] 例1. 細胞生存率確認試験

(1) シート状細胞培養物の調製

ヒト骨格筋から定法により調製した骨格筋芽細胞（線維芽細胞を含む）を用いてシート状細胞培養物を調製した。温度応答性培養皿（UpCell^(R) 12穴マ

ルチウエル、セルシード)に、20%ヒト血清含有DMEM/F12培地(Thermo Fisher Scientific Inc.)に懸濁したヒト骨格筋芽細胞およびヒト線維芽細胞の細胞混合物を、 3.7×10^6 個/ウェルとなるように播種し、37℃、5%CO₂下で12~26時間シート化培養を行った。シート化培養後、培地を除去し、700μLの4℃に冷却したHBSS(+) (Thermo Fisher Scientific Inc.)を加えて10分静置し、その後静かにピペティングしてシート状細胞培養物を完全に剥離させた。剥離したシート状細胞培養物は自然に収縮した。

[0178] シート状細胞培養物を完全に剥離した後、HBSS(+)を除去し、新たに常温のHBSS(+)を加えてリンスした。かかる洗浄工程を4回行った。HBSS(+)を除去した後、シート状細胞培養物を含むウェル中にエダラボンまたはビタミンを含有する各保存液を1.55mL加え、2~8℃の冷蔵条件で72~168時間静置した。

[0179] (2) 細胞生存率評価

(1)において冷蔵条件で静置したシート状細胞培養物について、細胞生存率を測定した。保存液中で所定の期間静置したシート状細胞培養物をトリプシン様蛋白分解酵素で解離させた後、FACSチューブに 3.0×10^5 個となるように細胞を分注し、遠心処理を行い、上清を廃棄した。これに0.5%BSA含PBS液を3mL加え、ボルテックスして細胞をリンスした後遠心処理して上清を取り除き、0.5%BSA含PBS液で最終濃度0.6μg/mLに調製したヨウ化プロピジウム(PI、ベクトンディッキンソン)溶液を500μL添加し混和した。混和後、直ちに遮光下にて室温で約5分間反応させ、反応後0.5%BSA含PBS液を加え、ボルテックスして細胞をリンスした後遠心処理して上清を取り除き、0.5%BSA含PBS液を500μL加え解析に供した。解析はフローサイトメーター(ベクトン・ディッキンソン)を用い、PIを混和した全細胞に含まれるPI未染色細胞の割合を計測した。

[0180] 例2. 生理食塩水ベースの保存液による試験

(1) ビタミン添加保存液

例1 (1) において、保存液として生理食塩水をベースに、ビタミン無添加、0.2 mMまたは2 mMのビタミンC（武田薬品工業）、10 μ Mまたは100 μ MのビタミンE（和光純薬）、0.2 mMのビタミンCおよび10 μ MのビタミンE、2 mMのビタミンCおよび100 μ MのビタミンEならびに1.5%のビタジェクト注をそれぞれ添加した保存液を作製し、シート状細胞培養物を含むウエル中に加え、2℃から8℃の冷蔵条件で静置期間を3日間として試験した。ビタジェクト注の組成は下表のとおりである。

[表1-1]

A液			1シリンジ5mL中
有効成分	脂溶性	レチノールパルミチン酸エステル エルゴカルシフェロール トコフェロール酢酸エステル フィトナジオン	3300 ビタミンA単位 10 μ g 15 mg 2 mg
	水溶性	シアノコバラミン 葉酸 ビオチン パンテノール (パントテン酸として) アスコルビン酸	10 μ g 0.4 mg 0.1 mg 14.04mg (15 mg) 100 mg
添加物		プロピレングリコール (溶解補助剤) ポリソルベート80 (可溶剤) 水酸化ナトリウム (pH調節剤) クエン酸 (pH調節剤)	1.0 g 80 mg 適量 適量

[表1-2]

B 液			1シリンジ5mL中
有効成分	水溶性	チアミン塩化物塩酸塩	3 mg
		リボフラビンリン酸エステルナトリウム (リボフラビンとして)	5.08mg (4 mg)
		ピリドキシン塩酸塩	4 mg
		ニコチン酸アミド	40 mg
添加物		希塩酸 (pH調節剤)	適量

[0181] 結果を図1に示す。いずれの場合もビタミン無添加の場合と比較して細胞生存率は上昇していた。ビタミン無添加の場合と比較してビタミンCは添加量に依存して細胞生存率が向上（0.2 mMの場合は約63%であったのに対し、2 mMの場合は約85%）していた。ビタミンEは添加量と細胞生存率向上に相関を示さずにビタミン無添加の場合と比較して細胞生存率が上昇した（いずれの場合も約65%）。ビタミンCとビタミンEを併用した場合、0.2 mMのビタミンCおよび10 μ MのビタミンEを加えた保存液はそれぞれビタミンCまたはビタミンE単独で使用的場合と同様の効果を示した（併用では約64%）。2 mMのビタミンCおよび100 μ MのビタミンEを添加した場合は、それぞれビタミンCまたはビタミンEを単独で使用的場合と比較してさらに細胞生存率が向上（併用では約93%）していた。また、1.5%のビタジェクト（必須ビタミン量は、2 mMのビタミンCおよび100 μ MのビタミンEに相当）を用いた場合はさらに細胞生存率が向上（約95%）していた。

[0182] (2) エダラボン添加保存液

例1 (1) において、保存液として生理食塩水をベースに、エダラボン無添加、1 μ Mまたは10 μ Mのエダラボン（ニプロ）をそれぞれ添加した保存液を作製し、静置期間を5日間として2℃～8℃の冷蔵条件で試験した。

結果を図2に示す。いずれの場合もエダラボン無添加の場合と比較して細

胞生存率は上昇（ $1\ \mu\text{M}$ の場合は約95%、 $10\ \mu\text{M}$ の場合は約97%）していた。

[0183] 例3. ハンクス平衡塩液ベースの保存液

（1）ビタミン添加保存液

例1（1）において、保存液としてHBSS（+）をベースに、0.75%のビタジェクト注（テルモ）A液または0.75%のビタジェクト注A液および0.75%のビタジェクト注B液をそれぞれ添加した保存液を作製し、静置期間を3日間として $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ の冷蔵条件で試験した。比較対象として、DMEM培地（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いた。

結果を図3に示す。いずれのビタミン添加保存液も、DMEM培地と比較して高い細胞生存率を示した。

[0184] （2）エダラボン添加保存液

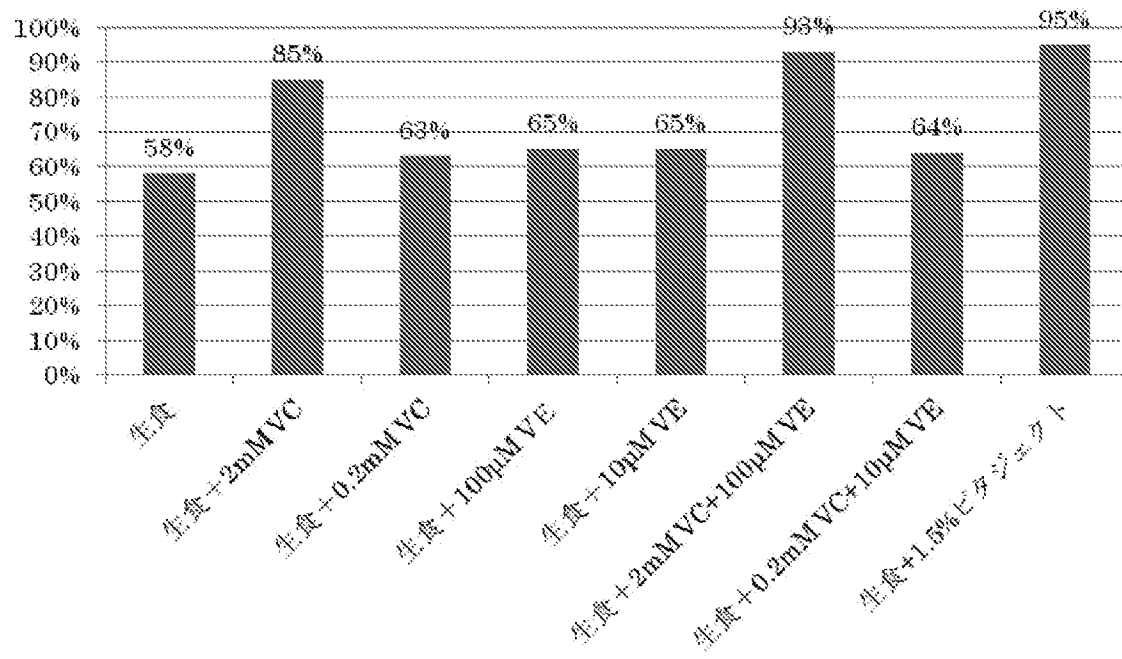
例1（1）において、保存液としてHBSS（+）をベースに、 $100\ \mu\text{M}$ のエダラボンを添加した保存液を作製し、静置期間を3日間および7日間として $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ の冷蔵条件で試験した。

結果を図4に示す。エダラボンを添加した場合、無添加のHBSS（+）と比較して、3～7日において高い細胞生存率を示した。

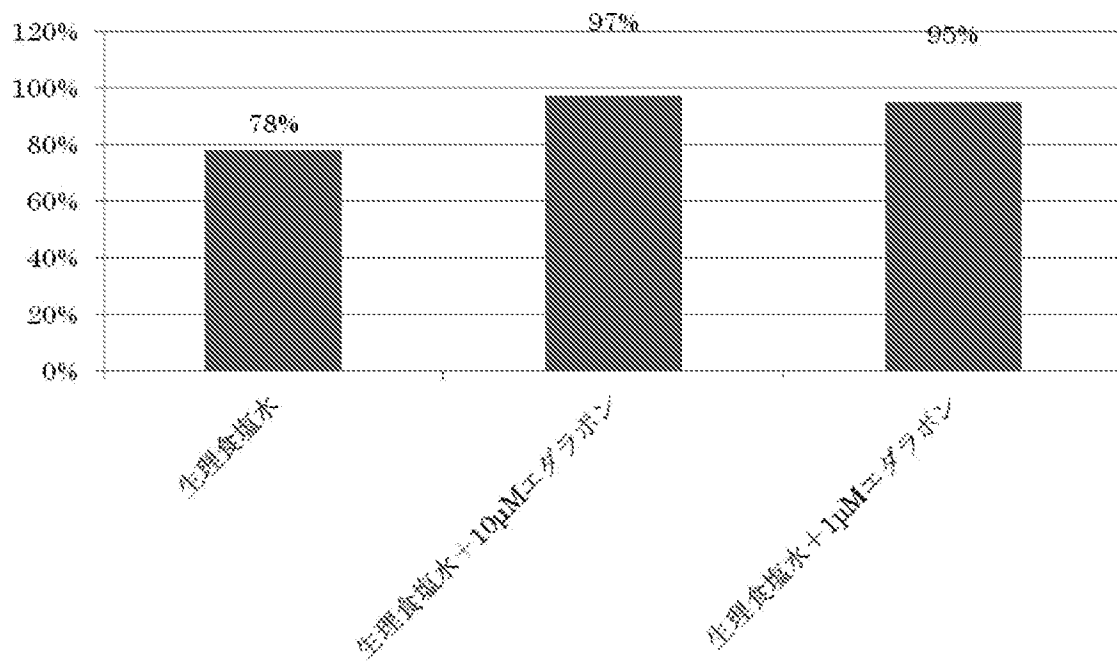
請求の範囲

- [請求項1] 生細胞または生細胞を含む組成物を保存する保存液であって、エダラボンを含有する、前記保存液。
- [請求項2] 保存液が、生細胞を実質的に増殖させない程度に低栄養である、請求項1に記載の保存液。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の保存液であって、生細胞または生細胞を含む組成物をさらに含む、前記保存液。
- [請求項4] 生細胞または生細胞を含む組成物が、生体への移植用である、請求項1～3のいずれか一項に記載の保存液。
- [請求項5] 生細胞または生細胞を含む組成物が、骨格筋芽細胞を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の保存液。
- [請求項6] 生細胞を含む組成物が、シート状細胞培養物である、請求項1～5のいずれか一項に記載の保存液。
- [請求項7] シート状細胞培養物が、6 c m²以上の面積を有する、請求項6に記載の保存液。
- [請求項8] 生細胞または生細胞を含む組成物を保存する方法であって、エダラボンを含有する保存液を用いる、前記方法。
- [請求項9] 保存液中で生細胞または生細胞を含む組成物を凍結させることなく保存する、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 生細胞または生細胞を含む組成物を製造する方法であって、エダラボンを含有する保存液に、生細胞または生細胞を含む組成物を浸漬することを含む、前記方法。

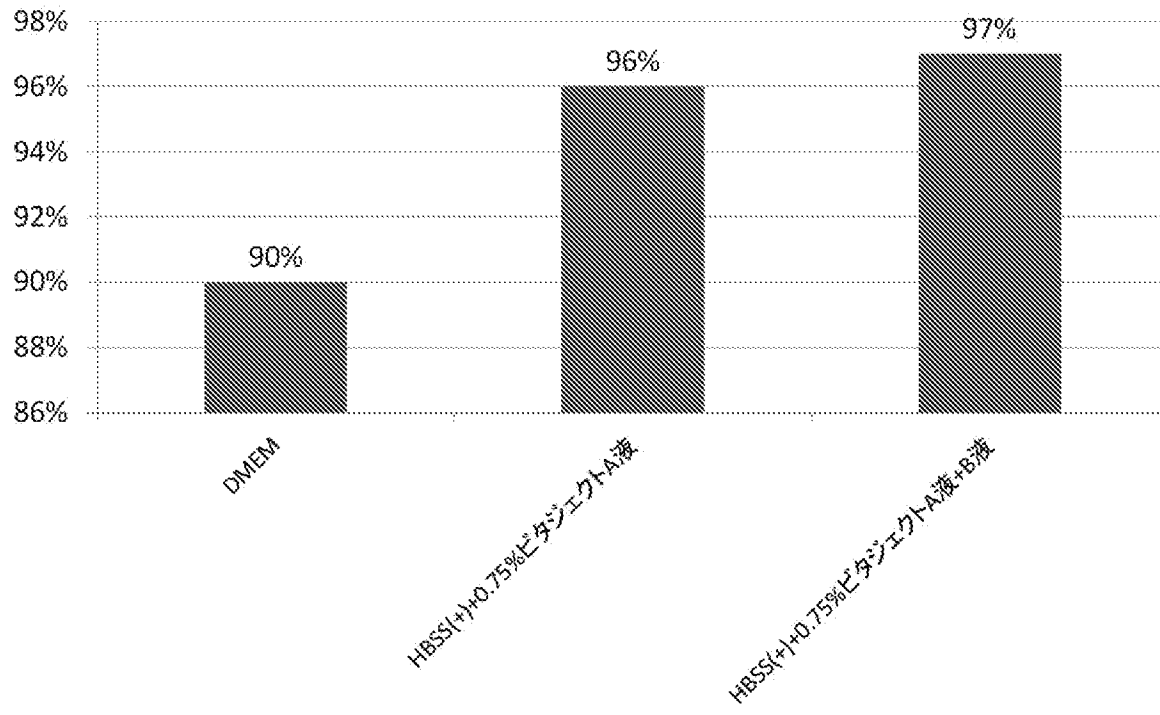
[図1]



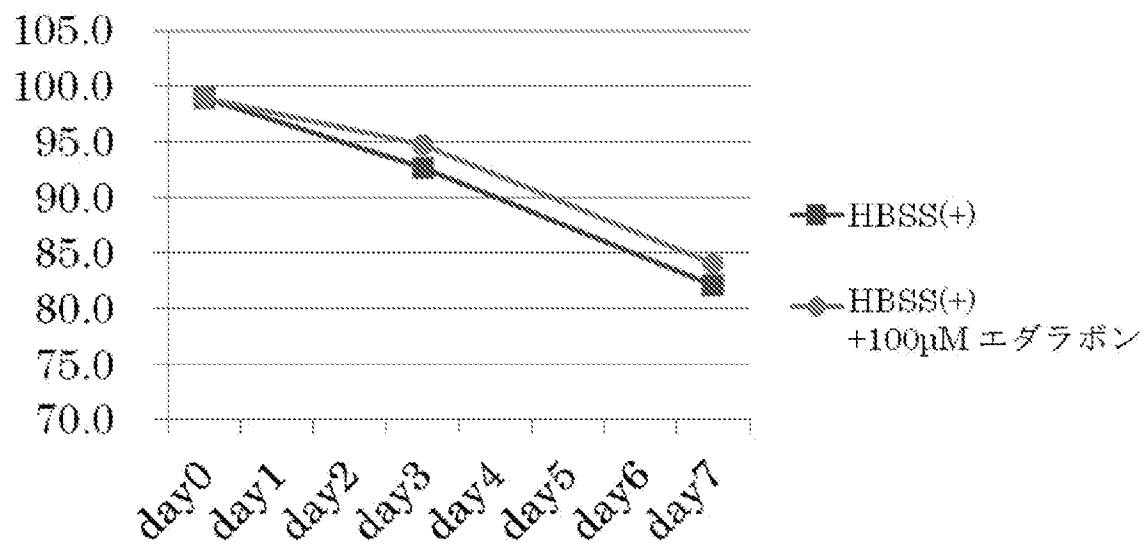
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/042159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N5/02 (2006.01) i, A01N1/02 (2006.01) i, C07D231/26 (2006.01) i,
C12N1/04 (2006.01) 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)

Int.Cl. C12N5/02, A01N1/02, C07D231/26, C12N1/04

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/067979 A1 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) 21 August 2003, claims, page 21, lines 10-18, page 22, lines 5-7 (Family: none)	1-10



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

29 January 2018 (29.01.2018)

Date of mailing of the international search report

13 February 2018 (13.02.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/042159

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	宮澤恒持, 外 7 名, “ブタを用いた心停止ドナーからの肝移植モデルにおけるエダラボンの効果に関する検討”, 移植 (2015), vol. 50 (suppl), p. 394, 0-196, ISSN: 0578-7947 text, lines 3-5, 7-12, non-official translation (MIYAZAWA, Koji, et al., “Review of edaravone effect in liver transplant model from cardiac arrest donor using pig”, Transplant (2015))	1-10 1-10
Y	JP 2002-520290 A (BIOLIFE SOLUTIONS, INC.) 09 July 2002, claims, paragraph [0044] & US 6045990 A1, claims, paragraph [0016], lines 36-38 & EP 1093377 A1 & WO 2000/002572 A1	1-10
Y	DOI K., et al., "Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat kidney", Kidney International (2004), vol. 65, pp. 1714-1723, ISSN: 0085-2538 page 1714, left column, abstract, page 1714, right column, paragraph [0002], page 1722, fig. 7	1-10
Y	NAKANISHI T., et al., "Analysis of skeletal muscles during regeneration due to reduced circulation in ob/ob mice and effect of edaravone for oxidative stress on C2C12 myoblast", Journal of Orthopaedic Research (March 2016), vol. 34, Issue S1, abstract Number: 0672, ISSN: 1554-527X text, lines 37-38	1-10
Y	JP 2007-528755 A (CARDIO INCORPORATED) 18 October 2007, paragraph [0087], example 2 & US 2007/0092492 A1, paragraph [0188], example 2 & EP 1659979 A1 & WO 2005/011524 A1	5-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/02(2006.01)i, A01N1/02(2006.01)i, C07D231/26(2006.01)i, C12N1/04(2006.01)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 (I P C))

Int.Cl. C12N5/02, A01N1/02, C07D231/26, C12N1/04

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 8 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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

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
X	W0 2003/067979 A1 (三菱ウェルファーマ株式会社) 2003.08.21, 特許請求の範囲, 第 21 頁第 10 行ー第 18 行, 第 22 頁第 5 行ー 第 7 行 (ファミリーなし)	1-10

☑ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

の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

2 9 . 0 1 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 2 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

藤澤 雅樹

4 B

5 8 0 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
X Y	宮澤恒持, 外 7 名, “ブタを用いた心停止ドナーからの肝移植モデルにおけるエダラボ ンの効果に関する検討”, 移植 (2015), Vol.50(suppl), p. 394, 0-196, ISSN:0578-7947 本文第 3 行—第 5 行、第 7 行—12 行	1-10 1-10
Y	JP 2002-520290 A (バイオライフ・ソリューションズ・インコーポ レイテッド) 2002.07.09, 特許請求の範囲, 【0044】 & US 6045990 A1, 特許請求の範囲, 第 16 段第 36 行—第 38 行, & EP 1093377 A1 & WO 2000/002572 A1	1-10
Y	DOI K., et al., “Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat kidney”, Kidney International (2004), Vol.65, pp.1714-1723, ISSN:0085-2538 第 1714 頁左欄要約, 第 1714 頁右欄第 2 段落, 第 1722 頁図 7	1-10
Y	NAKANISHI T., et al., “Analysis of skeletal muscles during regeneration due to reduced circulation in ob/ob mice and effect of edaravone for oxidative stress on C2C12 myoblast”, Journal of Orthopaedic Research (2016.03), Vol.34, Issue S1, Abstract Number:0672, ISSN:1554-527X 本文第 37 行—第 38 行	1-10
Y	JP 2007-528755 A (株式会社カルディオ) 2007.10.18, 【0087】, 実施例 2 & US 2007/0092492 A1, [0188], 実施例 2 & EP 1659979 A1 & WO 2005/011524 A1	5-7