(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7248246号
(P7248246)

(45)発行日　令和5年3月29日(2023.3.29)

(24)登録日　令和5年3月20日(2023.3.20)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ	*1/04 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/04
Ｃ１２Ｎ	*5/0793(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0793
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10

ＦＩ

請求項の数　22　（全55頁）

(21)出願番号　特願2019-530626(P2019-530626)
(86)(22)出願日　平成30年7月20日(2018.7.20)
(86)国際出願番号　PCT/JP2018/027372
(87)国際公開番号　WO2019/017491
(87)国際公開日　平成31年1月24日(2019.1.24)
審査請求日　令和3年6月15日(2021.6.15)
(31)優先権主張番号　特願2017-141382(P2017-141382)
(32)優先日　平成29年7月20日(2017.7.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
（出願人による申告）平成２８年度、再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患・組織別実用化研究拠点（拠点Ａ）「視機能再生のための複合組織形成技術開発および臨床応用推進拠点」、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願
最終頁に続く

(73)特許権者　503359821
国立研究開発法人理化学研究所
埼玉県和光市広沢２番１号
(73)特許権者　000002912
住友ファーマ株式会社
大阪府大阪市中央区道修町二丁目６番８号
(74)代理人　100088155
弁理士　長谷川 芳樹
(74)代理人　100128381
弁理士　清水 義憲
(74)代理人　100140888
弁理士　渡辺 欣乃
(72)発明者　万代 道子
埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　神経組織の保存方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

連続上皮構造を有し、かつ視細胞前駆細胞を含む細胞層及び神経網膜前駆細胞を含む細胞層を有する網膜組織を、カリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満の保存液中で１２℃～２２℃の保存温度で保存することを含む、網膜組織の保存方法。

【請求項２】

保存温度が１７℃である、請求項１に記載の保存方法。

【請求項３】

網膜組織がヒト由来である、請求項１又は２に記載の保存方法。

【請求項４】

網膜組織が多能性幹細胞由来の組織である、請求項１～３のいずれか一項に記載の保存方法。

【請求項５】

網膜組織が移植に供されるための組織である、請求項１～４のいずれか一項に記載の保存方法。

【請求項６】

視細胞前駆細胞がＣｒｘ陽性細胞であり、神経網膜前駆細胞がＣｈｘ１０陽性細胞である、請求項１～５のいずれか一項に記載の保存方法。

【請求項７】

カリウムイオン濃度が０ｍＭ超６０ｍＭ未満である、請求項１～６のいずれか一項に記

載の保存方法。
【請求項８】
カリウムイオン濃度が０．１ｍＭ～１０ｍＭである、請求項７に記載の保存方法。
【請求項９】
４８時間以上の期間で保存することを特徴とする、請求項１～８のいずれか一項に記載の保存方法。
【請求項１０】
１４日以内の期間で保存することを特徴とする、請求項１～９のいずれか一項に記載の保存方法。
【請求項１１】
５日以内の期間で保存することを特徴とする、請求項１～９のいずれか一項に記載の保存方法。
【請求項１２】
保存液が、緩衝作用物質を含み、かつｐＨを６．０～８．６の範囲に緩衝する作用を有する水性溶液である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の保存方法。
【請求項１３】
保存液が、更にグリコサミノグリカン類を含む水性溶液である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の保存方法。
【請求項１４】
グリコサミノグリカン類の濃度が、０．１％（ｗ／ｖ）以上１０％（ｗ／ｖ）以下である、請求項１３に記載の保存方法。
【請求項１５】
グリコサミノグリカン類が、コンドロイチン硫酸及びヒアルロン酸からなる群から選択される１又は複数のグリコサミノグリカン類である、請求項１３又は１４に記載の保存方法。
【請求項１６】
連続上皮構造を有し、かつ視細胞前駆細胞を含む細胞層及び神経網膜前駆細胞を含む細胞層を有する網膜組織をカリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満の保存液中で１２℃～２２℃の保存温度で輸送することを含む、網膜組織の輸送方法。
【請求項１７】
保存温度が１７℃である、請求項１６に記載の輸送方法。
【請求項１８】
網膜組織がヒト多能性幹細胞由来の組織である、請求項１６又は１７に記載の輸送方法。
【請求項１９】
網膜組織が移植に供されるための組織である、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の輸送方法。
【請求項２０】
視細胞前駆細胞がＣｒｘ陽性細胞であり、神経網膜前駆細胞がＣｈｘ１０陽性細胞である、請求項１６～１９のいずれか一項に記載の輸送方法。
【請求項２１】
カリウムイオン濃度が０ｍＭ超６０ｍＭ未満である、請求項１６～２０のいずれか一項に記載の輸送方法。
【請求項２２】
カリウムイオン濃度が０ｍＭ超３０ｍＭ未満である、請求項２１に記載の輸送方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、神経組織の保存方法、神経組織の保存液及び神経組織の輸送方法に関し、特に神経組織を凍結せずに数時間～数週間保存する方法、そのための保存液及び神経組織を保存しながら輸送する方法に関するものである。本発明はまた、移植用組成物に関する。

【背景技術】
【０００２】
生体の神経組織では、１種類又は複数種類の神経系細胞が層構造を形成している。神経組織の一つである網膜組織は、主に視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、及び神経節細胞の５種類の神経細胞とグリア細胞によって構成され、立体的な層構造を形成している。神経疾患、例えば網膜変性疾患への治療法として、神経組織を用いた移植治療が有効であることが示唆されてきたが、ヒトの生体の神経組織を反映した層構造と機能を維持した組織を入手することが難しく、治療法として一般化することが難しかった。近年、神経組織（例えば網膜組織）を、多能性幹細胞から分化誘導することで安定的に製造することが可能となった（非特許文献１及び２）。そこで神経組織を用いた移植治療を実現するための次の課題として、製造した神経組織を品質試験又は移植施設への輸送に要する期間において安定に保存する技術を開発する必要があった。
【０００３】
神経組織の保存方法として凍結保存法が開発されてきたが（例えば特許文献１）、凍結すると組織の品質が劣化する場合もあり、また凍結保存には熟練した技術を要する場合もある。一方、肝臓の場合は、巨大な装置を用いて潅流を行い、かつ、２２℃で保存することで組織が保存できることが報告された（非特許文献３）。しかし、網膜組織のような１種類又は複数種類の細胞が層構造をなして構成される神経組織については、凍結以外の適切な保存方法がなく、数時間から数週間の保存に適した方法を確立することが課題であった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【文献】特許番号６０１２１６４号
【非特許文献】
【０００５】
【文献】Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，３，５１９－３２（２００８）
Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，６，６２８６（２０１５）
Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，５，９５６３（２０１５）
Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，７４，１４１４－９（２００２）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
本発明は、神経組織を凍結せずに数時間～数週間保存する方法、そのための保存液、並びにこれらの方法及び保存液を用いた神経組織の輸送方法、及び移植用組成物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】
【０００７】
本発明者らは、上記課題を解決すべく検討を重ねたところ、カリウムイオン濃度が１１５ｍＭより低い保存液中で、８℃～３０℃の保存温度で、神経組織の機能を維持したまま数日間保存できることを見出し、本発明に至った。
【０００８】
すなわち、本発明は以下に関する。
［１］神経組織をカリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満の保存液中で８℃～３０℃の保存温度で保存することを含む、神経組織の保存方法。
［２］保存温度が１２℃～２２℃である、［１］の保存方法。
［３］神経組織がヒト由来である、［１］又は［２］の保存方法。
［４］神経組織が多能性幹細胞由来の組織である、［１］～［３］のいずれかの保存方法。
［５］神経組織が移植に供されるための組織である、［１］～［４］のいずれかの保存方法。

［６］神経組織が層構造を有する細胞凝集体である、［１］～［５］のいずれかの保存方法。
［７］神経組織が神経上皮構造を有する細胞凝集体である、［６］の方法。
［８］神経上皮構造が、細胞凝集体表面に存在する連続上皮構造、及び／又は、細胞凝集体表面若しくは内部に存在するロゼット構造である、［７］の保存方法。
［９］神経組織が前脳組織、中脳組織及び網膜組織からなる群から選択される１又は複数の神経組織である、［１］～［８］のいずれかの保存方法。
［１０］１４日以内の期間で保存するための、［１］～［９］のいずれかの保存方法。
［１１］５日以内の期間で保存するための、［１］～［９］のいずれかの保存方法。
［１２］保存液が、緩衝作用物質を含み、かつｐＨを６．０～８．６の範囲に緩衝する作用を有する水性溶液である、［１］～［１１］のいずれかの保存方法。
［１３］保存液が、更にグリコサミノグリカン類を含む水性溶液である、［１］～［１２］のいずれかの保存方法。
［１４］グリコサミノグリカン類の濃度が、０．１％（ｗ／ｖ）以上１０％（ｗ／ｖ）以下である、［１３］に記載の保存方法。
［１５］グリコサミノグリカン類が、コンドロイチン硫酸及びヒアルロン酸からなる群から選択される１又は複数のグリコサミノグリカン類である、［１３］又は［１４］に記載の保存方法。
［１６］カリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満の、多能性幹細胞由来の神経組織を８℃～３０℃の保存温度で保存するための保存液。
［１７］保存温度が１２℃～２２℃である、［１６］の保存液。
［１８］神経組織が層構造を有する細胞凝集体である、［１６］又は［１７］の保存液。
［１９］神経組織が、神経上皮構造を有する細胞凝集体である、［１８］の保存液。
［２０］神経上皮構造が、細胞凝集体表面に存在する連続上皮構造、及び／又は、細胞凝集体表面若しくは内部に存在するロゼット構造である、［１９］の保存液。
［２１］神経組織をカリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満の保存液中で８℃～３０℃の保存温度で輸送することを含む、神経組織の輸送方法。
［２２］保存温度が１２℃～２２℃である、［２１］の輸送方法。
［２３］神経組織がヒト多能性幹細胞由来の組織である、［２１］又は［２２］の輸送方法。
［２４］神経組織が移植に供されるための組織である、［２１］～［２３］のいずれかの輸送方法。
［２５］神経組織が層構造を有する細胞凝集体である、［２１］～［２４］のいずれかの輸送方法。
［２６］神経組織が、神経上皮構造を有する細胞凝集体である、［２５］の輸送方法。
［２７］神経上皮構造が、細胞凝集体表面に存在する連続上皮構造、及び／又は、細胞凝集体表面若しくは内部に存在するロゼット構造である、［２６］の輸送方法。
［２８］神経組織が前脳組織、中脳組織及び網膜組織からなる群から選択される１又は複数の神経組織である、［２１］～［２７］のいずれかの輸送方法。
［２９］カリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満であり、緩衝作用物質によってｐＨが６．０～８．６の範囲に調整された水性溶液、及び多能性幹細胞由来のヒト神経組織を含む、１２℃～２２℃下の、移植用組成物。
［３０］神経組織が神経上皮構造層構造を有する細胞凝集体である、［２９］に記載の組成物。
［３１］神経上皮構造が、細胞凝集体表面に存在する連続上皮構造、及び／又は、細胞凝集体表面若しくは内部に存在するロゼット構造である、［３０］に記載の組成物。
［３２］神経組織が前脳組織、中脳組織及び網膜組織からなる群から選択される１又は複数の神経組織である、［２９］～［３１］のいずれかの組成物。
［３３］水性溶液が、更に０．１％（ｗ／ｖ）以上１０％（ｗ／ｖ）以下のグリコサミノグリカン類を含む水性溶液である、［２９］～［３２］のいずれかの組成物。

【発明の効果】
【０００９】
本発明によれば、例えば神経組織を生体から取り出してから、或いは多能性幹細胞から分化誘導してから移植に供するまでの期間、例えば、移植に供するまでの品質管理、並びに、輸送に要する期間において、凍結せず数週間まで保存することが可能となり、移植治療による神経組織の障害に基づく疾患又は神経組織の損傷状態の治療がより実現可能なものとなる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体を、明視野観察した結果を示す。
【図２】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、Ｃｈｘ１０の発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。
【図３】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、Ｃｒｘの発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。
【図４】ヒトＥＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、明視野観察した結果を示す。
【図５】ヒトＥＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、Ｃｈｘ１０の発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。
【図６】ヒトＥＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、Ｃｒｘの発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。
【図７】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、種々のタンパク質の発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。（上段）Ｃｈｘ１０及びＣｒｘ、（中段）Ｃｈｘ１０、（下段）Ｃｒｘ。
【図８】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存し、さらに３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、種々のタンパク質の発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。（上段）Ｒｅｃｏｖｅｒｉｎ、（中段）Ｒｘ、（下段）Ｋｉ６７。
【図９】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下（保存条件Ａ及びＢ）で保存した直後、及び、３７℃で７日間回復培養して得られた細胞凝集体に関し、明視野観察した結果を示す。
【図１０】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、保存前及び保存後にそれぞれ生細胞率を測定した結果を示す。
【図１１】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体に関し、種々の保存条件下（保存条件Ｂ～Ｆ）で保存した直後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上段）、３７℃で７日間回復培養した後における細胞凝集体を明視野観察した結果（中段）、及び回復培養後の細胞凝集体についてＣｒｘの発現を免疫組織染色により比較した結果（下段）を示す。
【図１２】図１１で示した結果について、Ｃｒｘ陽性細胞の数を定量し、グラフ化した結果を示す。
【図１３】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体に関し、種々の保存条件下（保存条件Ｂ～Ｆ）で保存した直後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上段）、３７℃で７日間回復培養した後における細胞凝集体を明視野観察した結果（中段）、

及び回復培養後の細胞凝集体についてＣｒｘの発現を免疫組織染色により比較した結果（下段）を示す。
【図１４】図１１で示した免疫組織染色の結果に関し、Ｃｒｘ陽性な細胞数を定量しグラフ化した結果を示す。
【図１５】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体に関し、種々の保存条件下（保存条件Ａ、Ｂ）で保存した直後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上段）、３７℃で７日間回復培養した後における細胞凝集体を明視野観察した結果（中段）、及び回復培養後の細胞凝集体についてＣｒｘの発現を免疫組織染色により比較した結果（下段）を示す。
【図１６】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体に関し、種々の保存条件下（保存条件Ａ、Ｂ）で保存した直後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上段）、３７℃で７日間回復培養した後における細胞凝集体を明視野観察した結果（中段）、及び回復培養後の細胞凝集体についてＣｒｘの発現を免疫組織染色により比較した結果（下段）を示す。
【図１７】ヒトｉＰＳ細胞から作製した前脳及び又は中脳組織を含む細胞凝集体に関し、種々の保存条件下（保存条件Ａ～Ｄ）で保存した直後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上段）、３７℃で７日間回復培養した後における細胞凝集体を明視野観察した結果（中段）、及び回復培養後の細胞凝集体についてＲｘ及びＯｔｘ２の発現を免疫組織染色により比較した結果（下段）を示す。
【図１８】図１７で示した免疫組織染色の結果に関し、各保存条件につき、Ｏｔｘ２陽性な細胞からなる管腔構造が見られた細胞凝集体の数が全細胞凝集体に対する割合を算出し、グラフ化した結果を示す。
【図１９】ヒトＥＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、保存なし（Ａ、Ｃで示す」又は保存あり（Ｂ，Ｄで示す」）の条件下で４８時間おき、網膜変性ヌードラットの網膜下移植した後、ヌードラット網膜の凍結切片の免疫組織染色像を示す。
【図２０】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体に関し、種々の保存条件下（保存条件Ａ～Ｄ）で保存した直後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上段）、３７℃で７日間回復培養した後における細胞凝集体を明視野観察した結果（上から２段目）、及び回復培養後の細胞凝集体について視細胞前駆細胞のマーカーＣｒｘ（下から２段目）及び網膜前駆細胞のマーカーＣｈｘ１０（下段）の発現を免疫組織染色により比較した結果を示す。
【図２１】ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を１７℃にてオプチゾール液中で９６時間おき、網膜変性ヌードラットの網膜下に移植した後、ヌードラット網膜の凍結切片の免疫組織染色像を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
本発明の神経組織の保存方法は、神経組織をカリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満の保存液中で８℃～３０℃の保存温度で保存することを含む。
【００１２】
本明細書における「組織」とは、形態及び性質が均一な一種類の細胞、又は、形態及び性質が異なる複数種類の細胞が、一定のパターンで立体的に配置した構造を有する細胞集団の構造体（「細胞凝集体」ともいう）を意味する。組織は、生体から採取するか、あるいは幹細胞を利用して人為的に作製することにより、生体外で単離した状態で維持される。
【００１３】
本発明において、細胞は、発生生物学上の細胞の形態学上の区分から、上皮細胞（ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌ）と間葉細胞（ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｃｅｌｌ）とを含む。上皮細胞は、細胞が頂端面（ａｐｉｃａｌ）－基底（ｂａｓａｌ）方向の極性を持つ。ａｐｉｃａｌ側が間腔側であることが多く、一方、ｂａｓａｌ側が基底膜（ｂａｓｅｍｅｎｔ ｍｅｍｂｒａｎｅ）を持ち、細胞外マトリクス（ｅｘｔｒａ－ｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ）に接する。上皮細胞は、ａｐｉｃａｌ側の接着結合（ａｄｈｅｒｅｎｃｅ

ｊｕｎｃｔｉｏｎ）又は密着結合（ｔｉｇｈｔ　ｊｕｎｃｔｉｏｎ）により上皮細胞同士が強固な結合をつくり、上皮組織（ｅｐｉｔｈｅｌｉｕｍ）を形成できる。上皮組織とは、上皮シートともいい、単層扁平上皮、単層円柱上皮、重層扁平上皮を含む。間葉細胞は、ａｐｉｃａｌ－ｂａｓａｌの極性が弱い細胞であり、接着結合及び／又は密着結合の寄与が弱く、シートを形成しにくい。間葉細胞は、生体内では細胞外マトリクスの中で星状に散在して存在することが多い。

【００１４】

本明細書において、「神経組織（Ｎｅｕｒａｌ　ｔｉｓｓｕｅ）」とは、神経系細胞によって構成され、一種類又は複数種類の神経系細胞が、層状で立体的に配列した組織を意味する。代表的な神経組織としては、前脳組織、中脳組織、網膜組織が挙げられるほか、大脳、小脳、間脳、後脳、終脳、脊髄等の組織が挙げられ、これらを構成する細胞及び／又は前駆細胞が、少なくとも複数種類、層状で立体的に配列した構造体、並びにこれら各組織の複数の組合せもこれに含まれる。神経組織は、光学顕微鏡（例えば、明視野顕微鏡、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、ホフマン干渉顕微鏡、実体顕微鏡）による顕鏡観察、ＰＳＡ－ＮＣＡＭ、Ｎ－ｃａｄｈｅｒｉｎ等の神経組織マーカーの発現を指標とすることで確認できる。

【００１５】

神経組織は、神経上皮構造と呼ばれる構造体を形成することがある。神経上皮構造とは、神経系細胞によって構成され、一種類又は複数種類の神経系細胞が、層状で立体的に配列した形態のことをいう。一態様において、神経上皮構造は、頂端面（ａｐｉｃａｌ）－基底（ｂａｓａｌ）方向の極性をもつ。

【００１６】

一部の態様において、神経上皮構造は細胞凝集体の表面を覆うように存在することがある。別の態様において、神経上皮構造が細胞凝集体の内部にも形成されうる。

【００１７】

一部の態様において、神経上皮構造が、細胞凝集体表面の後述の連続上皮構造、又は、細胞凝集体表面若しくは細胞凝集体内部の後述のロゼット構造（神経ロゼット、管腔構造ともいう）であることがある。

【００１８】

細胞凝集体中の神経上皮構造は光学顕微鏡を用いた明視野観察により存在量を評価することができる。

【００１９】

本発明において、「神経系細胞（Ｎｅｕｒａｌ　ｃｅｌｌ）」とは、外胚葉由来組織のうち表皮系細胞（例：表皮、髪、爪、皮脂腺等）以外の細胞を表す。すなわち、神経系前駆細胞、ニューロン（神経細胞）、グリア、神経幹細胞、ニューロン前駆細胞及びグリア前駆細胞等の細胞を含む。神経系細胞には、下述する網膜組織を構成する細胞（網膜細胞）、網膜前駆細胞、網膜層特異的神経細胞、神経網膜細胞、網膜色素上皮細胞も包含される。

【００２０】

神経細胞（Ｎｅｕｒｏｎ又はＮｅｕｒｏｎａｌ　ｃｅｌｌ）は、神経回路を形成し情報伝達に貢献する機能的な細胞であり、ＴｕＪ１、Ｄｃｘ、ＨｕＣ／Ｄ等の幼若神経細胞マーカー、及び／又は、Ｍａｐ２、ＮｅｕＮ等の成熟神経細胞マーカーの発現を指標に同定することができる。

【００２１】

グリア（ｇｌｉａ）としては、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミュラーグリア等が挙げられる。アストロサイトのマーカーとしてはＧＦＡＰ、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてはＯ４、ミュラーグリアのマーカーとしてはＣＲＡＬＢＰ等が挙げられる。

【００２２】

神経幹細胞とは、神経細胞及びグリア細胞への分化能（多分化能）と、多分化能を維持

した増殖能（自己複製能ということもある）を持つ細胞である。神経幹細胞のマーカーとしてはＮｅｓｔｉｎ、Ｓｏｘ２、Ｍｕｓａｓｈｉ、Ｈｅｓファミリー、ＣＤ１３３等が挙げられるが、これらのマーカーは前駆細胞全般のマーカーであり神経幹細胞特異的なマーカーとは考えられていない。神経幹細胞の数は、ニューロスフェアアッセイ又はクローナルアッセイ等により評価することができる。

【００２３】

ニューロン前駆細胞とは、増殖能をもち、神経細胞を産生し、グリア細胞を産生しない細胞である。ニューロン前駆細胞のマーカーとしては、Ｔｂｒ２、Ｔα１等が挙げられる。あるいは、幼若神経細胞マーカー（ＴｕＪ１、Ｄｃｘ、ＨｕＣ／Ｄ）陽性かつ増殖マーカー（Ｋｉ６７，ｐＨ３，ＭＣＭ）陽性の細胞を、ニューロン前駆細胞として同定することもできる。

【００２４】

グリア前駆細胞とは、増殖能をもち、グリア細胞に分化し、神経細胞に分化しない細胞である。

【００２５】

神経系前駆細胞（Ｎｅｕｒａｌ　Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ　ｃｅｌｌ）は、神経幹細胞、ニューロン前駆細胞及びグリア前駆細胞を含む前駆細胞の集合体であり、増殖能とニューロン及びグリア分化能をもつ。神経系前駆細胞はＮｅｓｔｉｎ、ＧＬＡＳＴ、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ１、Ｍｕｓａｓｈｉ、Ｐａｘ６等をマーカーとして同定することができる。あるいは、神経系細胞のマーカー陽性かつ増殖マーカー（Ｋｉ６７、ｐＨ３、ＭＣＭ）陽性の細胞を、神経系前駆細胞として同定することもできる。

【００２６】

本明細書において、「脳組織」とは神経組織のうちの前後軸方向で前方の領域のことをいう。生体の脳は、胎児期の脳組織から発生する。脳組織は、前後軸方向で前脳、中脳、及び後脳にわけられる。

【００２７】

本明細書において、「前脳組織（Ｆｏｒｅｂｒａｉｎ　ｔｉｓｓｕｅ）」とは、脳組織のうちの前後軸方向で前方の領域のことをいう。前脳組織は、発生の段階が進んだ、終脳組織、間脳組織、大脳組織、間脳組織、大脳皮質組織、視床下部組織、視床等を含む。本明細書において、「前脳組織」には前述の組織から発生する組織も包含される。具体的には、網膜組織は間脳組織から発生するため、網膜組織は前脳組織に包含される。一部の態様において、培養皿上の前脳組織は、神経上皮構造を形成することがある。一部の態様において、培養皿上の前脳組織は、連続上皮構造及び又はロゼット構造を有することがある。

【００２８】

本明細書において、「中脳組織（Ｍｉｄｂｒａｉｎ　ｔｉｓｓｕｅ）」とは、脳組織のうち、前後軸方向で前脳より後方でかつ後脳より前方の領域のことをいう。中脳組織は、被蓋、上丘、下丘、黒質、赤核、大脳脚等を含む。一部の態様において、培養皿上の中脳組織は、神経上皮構造を形成することがある。一部の態様において、培養皿上の中脳組織は、連続上皮構造及び又はロゼット構造を有することがある。

【００２９】

脳組織のうち、いずれの領域の脳組織かを調べるには、公知文献（Ｓｈｉｒａｉｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　２０１７）に記載のマーカー遺伝子の発現で調べることができる。

【００３０】

マーカー遺伝子としては、Ｓｉｘ３（前脳の前方）、ＦｏｘＧ１（前脳の前方部の終脳）、Ｒｘ（前脳うちの終脳より後方）、Ｏｔｘ２（前脳と中脳の一部）、Ｏｔｘ２陽性かつＲｘ陰性（前脳又は中脳であって網膜組織でない領域）、Ｉｒｘ３（中脳又は後脳）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３１】

本明細書において、「網膜組織（Ｒｅｔｉｎａｌ　ｔｉｓｓｕｅ）」とは、視細胞、水

平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞、これらの前駆細胞、又は網膜前駆細胞等の細胞が、一種類又は少なくとも複数種類、層状で立体的に配列した組織を意味する。それぞれの細胞がいずれの層を構成する細胞であるかは、公知の方法、例えば当業者に周知の細胞マーカー（Ｃｈｘ１０（網膜前駆細胞又は双極細胞）、Ｌ７（双極細胞）、ＴｕＪ１（網膜神経節細胞）、Ｂｒｎ３（網膜神経節細胞）、Ｃａｌｒｅｔｉｎｉｎ（アマクリン細胞）、Ｃａｌｂｉｎｄｉｎ（水平細胞）、Ｒｅｃｏｖｅｒｉｎ（視細胞）、Ｒｈｏｄｏｐｓｉｎ（視細胞）、ＲＰＥ６５（網膜色素上皮細胞）、Ｍｉｔｆ（網膜色素上皮細胞）等）の発現有無若しくはその程度等により確認できる。

【００３２】

本明細書における「網膜層」とは、網膜を構成する各層を意味し、具体的には、網膜色素上皮層及び神経網膜層が挙げられ、神経網膜層には外境界膜、視細胞層（外顆粒層）、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、神経線維層及び内境界膜が含まれる。

【００３３】

本明細書における「網膜前駆細胞」とは、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞、網膜色素上皮細胞等のいずれの成熟な網膜細胞にも分化しうる前駆細胞をいう。網膜前駆細胞のマーカーとして、Ｒｘ（Ｒａｘとも言う）、ＰＡＸ６及びＣｈｘ１０等が挙げられる。

【００３４】

本明細書において、「幹細胞」とは、分化能及び増殖能（特に自己複製能）を有する未分化な細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）、複能性幹細胞（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）、単能性幹細胞（ｕｎｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）等の亜集団が含まれる。多能性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）及び／又は胚体外組織に属する細胞系譜すべてに分化しうる能力（分化多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ））を有する幹細胞をいう。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織若しくは細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織若しくは細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。

【００３５】

「多能性幹細胞」は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、組織内幹細胞、体細胞等から誘導することができる。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ＥＳ細胞：Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）、ＥＧ細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｇｅｒｍ ｃｅｌｌ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞：ｉｎｄｕｃｅｄ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）等を挙げることが出来る。間葉系幹細胞（ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ；ＭＳＣ）から得られるＭｕｓｅ細胞（Ｍｕｌｔｉ－ｌｉｎｅａｇｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｎｇ ｓｔｒｅｓｓ ｅｎｄｕｒｉｎｇ ｃｅｌｌ）、及び、生殖細胞（例えば精巣）から作製されたＧＳ細胞も多能性幹細胞に包含される。

【００３６】

１９９８年にヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。胚性幹細胞は、内部細胞凝集体をフィーダー細胞上又はｂＦＧＦを含む培地中で培養することにより製造することが出来る。胚性幹細胞の製造方法は、例えば、ＷＯ９６／２２３６２、ＷＯ０２／１０１０５７、ＵＳ５，８４３，７８０、ＵＳ６，２００，８０６、ＵＳ６，２８０，７１８等に記載されている。胚性幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２及びＫｈＥＳ－３は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。ヒト胚性幹細胞であるCrx：：Venus株（ＫｈＥＳ－１由来）は国立研究開発法人理化学研究所より入手可能である。

【００３７】

本明細書における「人工多能性幹細胞」とは、体細胞を、公知の方法等により初期化（ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ）することにより、多能性を誘導した細胞である。

【００３８】
人工多能性幹細胞は、２００６年、山中らによりマウス細胞で樹立された（Ｃｅｌｌ，２００６，１２６（４），ｐｐ．６６３－６７６）。人工多能性幹細胞は、２００７年にヒト線維芽細胞でも樹立され、胚性幹細胞と同様に多能性と自己複製能を有する（Ｃｅｌｌ，２００７，１３１（５），ｐｐ．８６１－８７２；Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００７，３１８（５８５８），ｐｐ．１９１７－１９２０；Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２００８，２６（１），ｐｐ．１０１－１０６）。
【００３９】
人工多能性幹細胞は、具体的には、線維芽細胞、末梢血単核球等分化した体細胞をＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｍｙｃ（ｃ－Ｍｙｃ、Ｎ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃ）、Ｇｌｉｓ１、Ｎａｎｏｇ、Ｓａｌｌ４、ｌｉｎ２８、Ｅｓｒｒｂ等を含む初期化遺伝子群から選ばれる複数の遺伝子の組合せのいずれかの発現により初期化して多分化能を誘導した細胞が挙げられる。好ましい初期化因子の組み合わせとしては、（１）Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、及びＭｙｃ（ｃ－Ｍｙｃ又はＬ－Ｍｙｃ）、（２）Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｌｉｎ２８及びＬ－Ｍｙｃ（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ， ２０１３；３１：４５８－４６６）を挙げることが出来る。
【００４０】
人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加等により体細胞より人工多能性幹細胞を誘導することもできる（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１３，３４１，ｐｐ．６５１－６５４）。
【００４１】
また、株化された人工多能性幹細胞を入手する事も可能であり、例えば、京都大学で樹立された２０１Ｂ７細胞、２０１Ｂ７－Ｆｆ細胞、２５３Ｇ１細胞、２５３Ｇ４細胞、１２０１Ｃ１細胞、１２０５Ｄ１細胞、１２１０Ｂ２細胞、１２３１Ａ３細胞等のヒト人工多能性細胞株が、京都大学及びｉＰＳアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたＦｆ－Ｉ０１細胞及びＦｆ－Ｉ１４細胞が、京都大学より入手可能である。
【００４２】
本明細書において、多能性幹細胞は、好ましくは胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞であり、より好ましくは人工多能性幹細胞である。
【００４３】
本明細書において、多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であり、好ましくはげっ歯類（例、マウス、ラット）又は霊長類（例、ヒト、サル）の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞、更に好ましくはヒト人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）又はヒト胚性幹細胞（ＥＳ細胞）である。
【００４４】
ヒトｉＰＳ細胞等の多能性幹細胞は、当業者に周知の方法で維持培養及び拡大培養に付すことができる。
【００４５】
本明細書において、神経組織は、好ましくはヒト由来であり、また、多能性幹細胞由来であることが好ましい。多能性幹細胞由来の神経組織としては、具体的には、例えば、胚性幹細胞若しくは人工多能性幹細胞由来の神経組織が挙げられる。すなわち、神経組織として、好ましくは、多能性幹細胞、具体的には胚性幹細胞若しくは人工多能性幹細胞を原料とし、分化誘導させる工程を経て製造される神経組織が挙げられる。
【００４６】
本明細書において、網膜組織は、好ましくは、多能性幹細胞由来である。多能性幹細胞由来の網膜組織としては、具体的には、例えば、胚性幹細胞若しくは人工多能性幹細胞由来の網膜組織が挙げられる。すなわち、網膜組織として、好ましくは、多能性幹細胞、具体的には胚性幹細胞若しくは人工多能性幹細胞を原料とし、分化誘導させる工程を経て製造される網膜組織が挙げられる。

【００４７】
多能性幹細胞を用いて、当業者に周知の方法で、網膜組織等の神経組織を製造することができる。当該方法としては、例えば、ＷＯ２０１１／０５５８５５、ＷＯ２０１１／０２８５２４、ＷＯ２０１３／０７７４２５、ＷＯ２０１５／０２５９６７、ＷＯ２０１６／０６３９８５及びＷＯ２０１６／０６３９８６に記載された方法等を挙げることができる。また、当該方法として非特許文献：Ｎａｔｕｒｅ　４７２，ｐｐ５１－５６（２０１１）、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．１１１（２３）：８５１８－８５２３（２０１４）、Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ．５：４０４７（２０１４）、Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，６，６２８６（２０１５）、Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ．（２０１７）；ｄｏｉ：１０．１００２／ｓｔｅｍ．２５８６等に記載された方法等を挙げることができる。
【００４８】
多能性幹細胞を用いて、当業者に周知の方法で、前脳組織及び中脳組織を製造することができる。当該方法としては、例えば、Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ，３，５１９－３２（２００８）、ＷＯ２００９／１４８１７０、ＷＯ２０１６／０６３９８５等が挙げられる。
【００４９】
多能性幹細胞から製造する方法以外にも、生体由来の神経前駆細胞、神経網膜前駆細胞等の細胞を分離した後に再凝集させ、多層の神経組織、網膜組織を製造する事ができる。
【００５０】
上述の方法により製造された神経組織又は網膜組織は細胞凝集体を形成し、一態様において、当該凝集体は、（１）丸く、（２）表面が滑らかで、（３）形が崩れておらず、（４）凝集体の内部が密である等の特徴を示す。
【００５１】
本明細書において、「細胞凝集体」（Ｃｅｌｌ　Ａｇｇｒｅｇａｔｅ）とは、複数の細胞同士が接着して形成された塊を意味し、特に限定されない。胚様体（Ｅｍｂｒｙｏｉｄ　ｂｏｄｙ）、スフェア（Ｓｐｈｅｒｅ）、スフェロイド（Ｓｐｈｅｒｏｉｄ）、オルガノイド（Ｏｒｇａｎｏｉｄ）も細胞凝集体に包含される。細胞凝集体は、増殖細胞、非増殖細胞（増殖停止した細胞）又はその両方を含む。
【００５２】
一態様において、「細胞凝集体」は、前述の神経上皮構造をもつ。一態様において、当該細胞凝集体は、１あるいは複数の神経上皮構造をもつ。
【００５３】
上記の方法により製造された網膜組織は、一態様において、網膜系細胞が、一種類又は少なくとも複数種類、層状で立体的に配列した構造（小胞性層状形態）を有する。
【００５４】
網膜組織が小胞性層状形態を有するかどうかは、当業者であれば明視野顕微鏡下で網膜組織を観察する事で判別する事ができる。具体的には、網膜組織の凝集体の周囲が明るく、小胞又はカップ状の構造を有する事を確認すればよい。
【００５５】
本明細書における神経組織は、神経上皮構造を有する場合、一態様において、連続上皮構造を有する。ここで、連続上皮構造とは、上皮組織が連続している状態のことである。上皮組織が連続しているとは、例えば、上皮組織に対する接線方向に１０細胞～１０００００００細胞、好ましくは接線方向に３０細胞～１０００００００細胞、更に好ましくは１００細胞～１０００００００細胞、並んでいる状態のことである。
【００５６】
例えば、網膜組織において形成される連続上皮構造は、網膜組織が上皮組織に特有の頂端面を持ち、頂端面が神経網膜層を形成する各層のうち、少なくとも視細胞層（外顆粒層）等と概ね平行に、かつ連続的に網膜組織の表面に形成される。例えば、多能性幹細胞より作製した網膜組織を含む細胞凝集体の場合、凝集体の表面に頂端面が形成され、表面に

対して接線方向に１０細胞以上、好ましくは３０細胞以上、より好ましくは１００細胞以上、更に好ましくは４００細胞以上の視細胞又は視細胞前駆細胞が規則正しく連続して配列する。

【００５７】

本明細書において、上皮組織に対する接線方向とは、上皮組織において一つ一つの細胞が一定方向に並んでいる場合の細胞が並んでいる方向のことをいい、上皮組織（又は上皮シート）に対して平行方向又は横方向のことをいう。

【００５８】

上述の方法により製造された網膜組織は、一態様において、ロゼット様構造を有する。本明細書において、網膜組織における「ロゼット様構造」とは、中心部の管腔を囲むように放射状又はらせん状に細胞が配列した構造を指す。ロゼット様構造を形成した網膜組織においては、その中心部（管腔）に沿って頂端面及び視細胞、又は視細胞前駆細胞が存在する状態となり、頂端面はロゼット様構造毎に分断されている。

【００５９】

本明細書において、「頂端面（ａｐｉｃａｌ）」とは、上皮組織において、ムコ多糖に富み（ＰＡＳ染色陽性）、ラミニン及びＩＶ型コラーゲンを多く含む５０－１００ｎｍの、上皮細胞が産生した基底（ｂａｓａｌ）側の層（基底膜）が存在する基底膜側とは反対側に形成される表面（表層面）のことをいう。一態様において、視細胞又は視細胞前駆細胞が認められる程度に発生段階が進行した網膜組織においては、外境界膜が形成され、視細胞、視細胞前駆細胞が存在する視細胞層（外顆粒層）に接する面のことをいう。また、このような頂端面は、頂端面のマーカー（例：ａｔｙｐｉｃａｌ－ＰＫＣ（以下、「ａＰＫＣ」と略す）、Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ、Ｎ－ｃａｄｈｅｒｉｎ）に対する抗体を用いて、当業者に周知の免疫染色法等で同定することができる。

【００６０】

神経組織が連続上皮構造を有するかどうかは、神経組織が有する頂端面の連続性（すなわち、分断されていない形態）により確認する事ができる。頂端面の連続性は、例えば、頂端面のマーカーであるａＰＫＣ、Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ、Ｎ－ｃａｄｈｅｒｉｎの免疫染色、又は細胞核の染色（ＤＡＰＩ染色、ＰＩ染色、Ｈｏｅｃｈｓｔ染色、又は細胞核に局在するマーカータンパク（Ｒｘ、Ｃｈｘ１０、Ｋｉ６７、Ｃｒｘ等）の染色等が挙げられる）にて判別できる。

【００６１】

網膜組織の場合、具体的には、頂端面のマーカー（例：ａＰＫＣ、Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ、Ｎ－ｃａｄｈｅｒｉｎ）、頂端面側に位置する視細胞又は視細胞前駆細胞のマーカー（例：Ｃｒｘ又はリカバリン）を免疫染色し、取得した画像等について頂端面と視細胞層、及び各網膜層の位置関係を解析することにより判定できる。頂端面及び視細胞層（外顆粒層）以外の網膜層については、細胞核を染色するＤＡＰＩ染色、ＰＩ染色、Ｈｏｅｃｈｓｔ染色、又は細胞核に局在するマーカータンパク（Ｒｘ、Ｃｈｘ１０、Ｋｉ６７、Ｃｒｘ等）等による免疫染色等により同定できる。

【００６２】

神経組織がロゼット様構造を有するかどうかは、細胞凝集体を４％パラホルムアルデヒドで固定する等した後凍結切片を作製し、頂端面マーカーであるａＰＫＣ、Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ、Ｎ－ｃａｄｈｅｒｉｎに対する抗体、或いは、核を特異的に染色するＤＡＰＩ等を用いて通常実施される免疫染色等によりロゼット様構造の異形成（例：分断された頂端面又は頂端面の細胞凝集体内への侵入）を観察することで決定できる。

【００６３】

上述の方法により製造された神経組織には、上述の神経系細胞が存在する。特定の神経系細胞の割合は、分化段階に応じて異なる。

【００６４】

上述の方法により製造された前脳組織の一部は、Ｏｔｘ２陽性な管腔を持つ凝集体として存在する。

【００６５】
上述の方法により製造された中脳組織の一部は、Ｏｔｘ２陽性な管腔を持つ凝集体として存在する。
【００６６】
上述の方法により製造された網膜組織には、Ｃｈｘ１０陽性の神経網膜前駆細胞、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞等が存在する。それらの細胞の割合は、分化段階に応じて異なる。一態様において、一定の分化段階における網膜組織においては、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が視細胞層として網膜組織の表層（ａｐｉｃａｌ面側）に層状に存在し、その内側にＣｈｘ１０陽性の神経網膜前駆細胞が層状に存在する前駆細胞層（Ｎｅｕｒｏｂｌａｓｔｉｃ　ｌａｙｅｒともいう）として存在する。
【００６７】
本明細書において神経組織の保存又は輸送に用いられる「保存液」は、０ｍＭ超１１５ｍＭ未満カリウムイオン濃度を有する。保存液は動物細胞又は動物組織の生存に適した水性溶液であれば、特に限定されないが、好ましく緩衝作用物質を含む。
【００６８】
緩衝作用とは、弱酸とその共役塩基又は弱塩基とその共役酸を混合した際の、水素イオン濃度を一定に保つ作用を意味する。すなわち、緩衝作用とは、水性溶液中の外的因子が変化してもｐＨを一定範囲内に保つ作用を意味する。外的因子の変化が起こり得る状況としては、例えば、少量の酸性又は塩基性の物質を水性溶液中に添加する操作、液体の希釈、大気中のCO_2濃度の変化、細胞又は組織からの代謝産物の産生、温度の変化等が挙げられる。
【００６９】
緩衝作用物質とは、水性溶液中で他の成分と相互に作用することでｐＨを一定範囲内に保つ物質をさし、水性溶液に対して緩衝作用をもたらす物質のことをいう。すなわち、本明細書における保存液とはｐＨを６．０～８．６の範囲内に緩衝する作用を有する水性溶液である。保存液のｐＨは好ましくは６．２～８．４の範囲内であり、より好ましくは６．７～７．９の範囲内であり、より好ましくは７．２～７．８の範囲内であり、さらに好ましくは７．２～７．４の範囲内である。
【００７０】
本明細書において、保存液中に含まれる緩衝作用物質としては、水性溶液を上述のｐＨの範囲内に保つことができれば特に限定はなく、弱酸とその共役塩基の組み合わせ（例えば、ナトリウム若しくはカリウム等のアルカリ金属塩、カルシウム若しくはマグネシウム等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩）、又は、弱塩基とその共役酸（例えば、アミン化合物と塩酸塩）の組み合わせが挙げられる。当業者に周知の１若しくは複数の物質を組み合わせて適宜用いることができる。例えば、炭酸緩衝液（炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム）、リン酸緩衝液（リン酸、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸三カリウム）、グッドバッファー（ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、ＰＩＰＥＳ等）、トリス、クエン酸緩衝液（クエン酸三ナトリウム）、酢酸緩衝液（酢酸ナトリウム、酢酸カリウム）、ホウ酸緩衝液（ホウ酸ナトリウム、四ホウ酸ナトリウム）、酒石酸（酒石酸ナトリウム）、アミノ酸の緩衝液（ヒスチジン、タウリン、アスパラギン酸）等が挙げられるが、これらに限定されない。一態様においては、複数の緩衝作用物質から適宜選択される１以上の緩衝作用物質の組合せが保存液中に含まれ得る。緩衝作用物質として、好ましくは、炭酸水素ナトリウム、リン酸緩衝液（リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム）、ＨＥＰＥＳ等が挙げられる。また、一態様においては、保存液中に含まれる緩衝作用物質として、炭酸水素ナトリウムと併せて、その他の緩衝作用物質から適宜選択される１以上の緩衝作用物質を含んでもよい。
【００７１】
本明細書における水性溶液とは、水（H_2O）を基本溶媒とする溶液のことをいい、細胞の生存に影響しない程度の水溶性の液体を少量含んでいてもよい。

【００７２】
本明細書において神経組織の保存に用いられる保存液は、緩衝作用物質以外に無機塩を含んでいてもよい。
【００７３】
保存液に含まれる無機塩としては、哺乳類の生体に含有される成分、又は細胞の生存に有用な成分として知られる無機塩が挙げられ、具体的に言えば、硝酸、硫酸、塩酸等の金属塩が挙げられる。尚、本明細書において、水性溶液に対して緩衝作用をもたらす無機塩は、緩衝作用物質として扱う。当該金属塩としては、安定な無機塩を形成し、かつ細胞の生存に有用な金属塩であれば特に限定はなく、アルカリ金属（ナトリウム、カリウム）塩、アルカリ土類金属（カルシウム、マグネシウム）塩、銅、亜鉛、鉄等の塩が挙げられる。具体的には、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩が挙げられ、具体的には、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硝酸鉄、塩化マグネシウム等があげられる。
【００７４】
本明細書における保存液はカリウム塩を緩衝作用物質又はそれ以外の無機塩として含んでいてもよく、当該保存液中に含まれるカリウムイオン濃度は、０ｍＭ超であって１１５ｍＭよりも低い濃度であれば特に限定されない。好ましくは、６０ｍＭ、より好ましくは３０ｍＭ、さらに好ましくは１０ｍＭより低い濃度である。上記カリウムイオン濃度は、好ましくは０ｍＭ～６０ｍＭ、より好ましくは０ｍＭ～３０ｍＭ、さらに好ましくは０．０１ｍＭ～２０ｍＭ、さらに好ましくは０．１ｍＭ～１０ｍＭ、更に好ましくは１ｍＭ～８ｍＭを挙げることができる。
【００７５】
また、本明細書において、保存液中に含まれるナトリウムイオン濃度に対するカリウムイオン濃度の比は好ましくは０．８倍よりも低く、更に好ましくは０．５倍、より好ましくは０．４倍、０．３倍、０．２倍、０．１倍さらに好ましくは０．０５倍より低い割合である。
【００７６】
本明細書において、「カリウムイオン濃度」は、保存液中に存在する全ての塩がイオンに解離した場合の上記無機イオンの濃度を意味し、カリウム塩が保存液中で解離しているか否かには依存しない値である。例えば、保存液中にリン酸カリウム（K_3PO_4）と塩化カリウム（ＫＣｌ）が共に含まれる場合、カリウムイオン（Ｋ＋）とリン酸イオン（PO_4^{3-}）が完全に解離しており、さらにカリウムイオン（Ｋ＋）と塩化物イオン（Ｃｌ－）も完全に解離しているものと想定し、両塩に由来するカリウムイオン濃度を合わせたものを、本保存液中に含まれるカリウムイオン濃度と定義する。
【００７７】
本明細書において、保存液が満たすべき重要な特性の一つとして浸透圧を挙げることができる。緩衝作用物質及びそれ以外の無機塩の濃度は、保存液の浸透圧に影響を与える因子の一つとして挙げられる。保存液の浸透圧は、保存期間中に、保存対象である神経組織が膨張又は収縮しない程度に調節されていることが好ましい。一態様において、保存液とは、保存対象である神経組織が膨張又は収縮しない程度の浸透圧を有する水性溶液である。保存液は、好ましくは、ｐＨを６．０～８．６の範囲内に維持するように調製された緩衝する作用を有し、かつ、保存対象である神経組織が膨張又は収縮しない程度の浸透圧を有する水性溶液である。
【００７８】
神経組織が保存中に膨張又は収縮しない程度の浸透圧としては、具体的には、２００～５００ｍＯｓｍ／ｋｇ、例えば２００～４００ｍＯｓｍ／ｋｇ、又は２５０～３６０ｍＯｓｍ／ｋｇが挙げられる。保存液の浸透圧は、保存液に含有されるイオンを含む全物質の濃度により定まる。保存液の浸透圧は、保存液に含まれるイオン等の含有量を変化させることにより、適宜調整することができ、あるいは浸透圧調整剤（例えば、ヒドロキシエチル澱粉等）を添加してもよい。浸透圧は、例えば、市販の浸透圧測定装置を用いて測定す

る事ができる。

【００７９】

本明細書において、保存液には、神経組織に含まれる細胞が生存可能であって、神経組織の保存が可能である範囲において、上述の緩衝作用物質及びそれ以外の無機塩以外に、アミノ酸、ビタミン類、糖類、核酸塩基、ピルビン酸塩類等の栄養剤、抗生物質（例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、アムホテリシン）、コレステロール等のステロイド、２－メルカプトエタノール、血清及び血清代替物等から適宜選択される１以上の添加物が含まれ得るが、添加物はこれらに限定されない。具体的には本明細書表１～表９に記載の培地に含まれる成分を例示することができる。

【００８０】

保存液として、上記の条件を満たす市販の細胞若しくは生体組織用の保存液、培地等を適宜用いることができる。本明細書における保存液は、神経組織の形態及び性状を変化させずに維持する能力が高いほど好ましく、その意味で、細胞を増殖又は分化させる能力が低い方が好ましい。保存液中で細胞が増殖するか否かは、細胞増殖マーカーであるＫｉ６７の免疫染色、或いは、核酸アナログ（トリチウム標識品、ＢｒｄＵ、ＣｌｄＵ、ＩｄＵ、ＥｄＵ等）の取り込み率等の当業者に周知の方法により確認する事ができる。

【００８１】

一態様において、上記保存液は、グリコサミノグリカン類を含有することができる。グリコサミノグリカン類としては、アミノ糖とウロン酸とを含む基本骨格を有する直鎖の多糖類が挙げられる。本明細書において保存液中に用いられるグリコサミノグリカン類としては、水に溶解可能であり、神経組織の生存などに悪影響を与えない物質であれば、特に限定されない。本明細書において、当該グリコサミノグリカン類として、好ましくはコンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸が挙げられる。グリコサミノグリカン類を含有する利点の一つとして、保存液に粘性が付加されることにより輸送による振動を低減することができる。

【００８２】

ここで、保存液中のグリコサミノグリカン類の濃度は、全グリコサミノグリカン類の濃度が、例えば１０％（ｗ／ｖ）以下、４％（ｗ／ｖ）以下、３％（ｗ／ｖ）以下、又は２．５％（ｗ／ｖ）以下である。また、全グリコサミノグリカン類の濃度が、例えば、０．１％（ｗ／ｖ）以上、０．２％（ｗ／ｖ）以上、０．５％（ｗ／ｖ）以上、又は０．７％（ｗ／ｖ）以上である。また、全グリコサミノグリカン類の濃度として、例えば、０．１％（ｗ／ｖ）以上１０％（ｗ／ｖ）以下、０．２％（ｗ／ｖ）以上４％（ｗ／ｖ）以下、０．５％（ｗ／ｖ）以上３％（ｗ／ｖ）以下、及び０．７％（ｗ／ｖ）以上２．５％（ｗ／ｖ）以下を挙げることができる。

【００８３】

グリコサミノグリカン類としてコンドロイチン硫酸を保存液に含む場合、コンドロイチン硫酸の濃度は、コンドロイチン硫酸エステルナトリウムとして、例えば、１０％（ｗ／ｖ）以下、４％（ｗ／ｖ）以下、３％（ｗ／ｖ）以下、又は２．５％（ｗ／ｖ）以下である。また、コンドロイチン硫酸の濃度は、コンドロイチン硫酸エステルナトリウムとして、例えば、０．１％（ｗ／ｖ）以上、０．２％（ｗ／ｖ）以上、０．４％（ｗ／ｖ）以上、又は０．５％（ｗ／ｖ）以上である。また、コンドロイチン硫酸の濃度はコンドロイチン硫酸エステルナトリウムとして、例えば、０．１％（ｗ／ｖ）以上１０％（ｗ／ｖ）以下、０．２％（ｗ／ｖ）以上４％（ｗ／ｖ）以下、０．４％（ｗ／ｖ）以上３％（ｗ／ｖ）以下、及び０．５％（ｗ／ｖ）以上２．５％（ｗ／ｖ）以下を挙げることができる。

【００８４】

グリコサミノグリカン類は一種類の単独使用もできるが、複数種のグリコサミノグリカン類を組み合わせて用いることも可能であり、例えば、コンドロイチン硫酸及びヒアルロン酸を、１：１～３：１、又は、２：１～３：１の重量比で用いることができる。

【００８５】

一態様において、上記保存液は、細胞の代謝を促進する活性が低くてもよい。細胞の代

謝の状態は、代謝経路物質（例えば、出発物質、中間体、最終代謝物、等）の量を測定することで評価できる。代謝経路物質の量は、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、ゲル濾過、ＮＭＲ、質量分析機、ＵＶ分光計、ＩＲ分光計、等の分析機器あるいはそれら分析機器の組み合わせで測定することができる。

【００８６】

一態様において、上記保存液は、血清及び又は血清代替物を含み得るが、その濃度は低くてもよい。保存液に含まれる血清及び又は血清代替物の濃度が低い場合に、細胞の増殖及び又は細胞の代謝が低くなる効果が期待できる。

【００８７】

保存液として、細胞又は組織の維持培養に用いられる培地を用いることもできる。細胞又は組織の培養用の培地、好ましくは動物細胞又は動物組織の培養に用いる培地として市販されている水性溶液であっても、本発明における保存温度で実質的に神経組織の形態が変化するような細胞増殖若しくは分化が起こらない限り本発明の保存液として使用可能である。上記培地とは、例えば、ＢＭＥ培地、ＢＧＪｂ培地、ＣＭＲＬ　１０６６培地、Ｇｌａｓｇｏｗ　ＭＥＭ　（ＧＭＥＭ）培地、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ　Ｚｉｎｃ　Ｏｐｔｉｏｎ培地、ＩＭＤＭ培地、Ｍｅｄｉｕｍ　１９９培地、Ｅａｇｌｅ　ＭＥＭ培地、αＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ培地、Ｆ－１２培地、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地、ＩＭＤＭ／Ｆ１２培地、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ　ｍｅｄｉｕｍ培地、ハム培地、ＲＰＭＩ　１６４０培地、Ｆｉｓｃｈｅｒ’ｓ培地、又はこれらの混合培地等、動物細胞の培養に用いることのできる培地を挙げることができる。好ましくは、ＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ　ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）、又はこれらの混合培地を挙げることができる。これらは、細胞又は組織の維持培養に際しては、血清、血清代替物、抗生物質等を適宜添加して用いることも可能である。一方、血清、血清代替物及び／又は抗生物質は保存液の必須の成分でないため、本発明において保存液として用いる際には、保存液中での品質管理項目を少なくするという観点から、好ましくはこれらを添加しないか、添加するとしても通常の細胞培養と比べて低い濃度で添加する。一態様において、保存液としては、緩衝作用物質及び無機塩を含み、アミノ酸、ビタミン類、糖類を含まないＤ－ＰＢＳ等を用いることも可能である。

【００８８】

一態様において、上記保存液として、好ましくは、緩衝作用物質及び無機塩を含み、かつ、アミノ酸及び／又はビタミン類を含んでもよい。保存液としてより好ましくは、緩衝作用物質、アミノ酸及びビタミン類を含む水性溶液が挙げられる。具体的には、ＨＢＳＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒから購入可能）、ＤＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒから購入可能）、ＤＭＥＭ－ｎｏ－ｇｌｕｃｏｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒから購入可能）、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ　ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒから購入可能）、下記表１の組成を有する角膜保存液（米国特許５，１０４，７８７；　５，４０７，６６９を参照）、又はＯｐｔｉｓｏｌ（Ｂａｕｓｃｈ　ａｎｄ　Ｌｏｍｂから購入可能）が挙げられ、より好ましくは、Ｏｐｔｉｓｏｌが挙げられる。

【表１】

無機塩	(mg/L)	(mM)
塩化カルシウム（$CaCl_2$）	200	1.80
硝酸鉄 $Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$	0.5	0.00124
塩化カリウム（KCl）	400	5.33
硫酸マグネシウム（$MgSO_4$ $7H_2O$）	200	0.813
塩化ナトリウム（NaCl）	6800	117
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）	2200	26.2
リン酸二水素ナトリウム（NaH_2PO_4 H_2O）	140	1.01

上記以外に含有される主な成分

アミノ酸類、ビタミン類、アデニン硫酸塩、コレステロール、グルコース、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、２－メルカプトエタノール、コンドロイチン硫酸、ゲンタマイシン、デキストラン等

【００８９】

一態様において、本発明は、保存液及びヒト神経組織を含む、１２℃～２２℃下、好ましくは１５℃～２０℃の移植用組成物、すなわち、１２℃～２２℃、又は１５℃～２０℃に温度調節された移植用組成物を提供する。

【００９０】

ここにおいて、保存液として、カリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満であり、緩衝作用物質によってｐＨが６．０～８．６の範囲に調整された水性溶液が挙げられる。当該水性溶液は、更にアミノ酸及びビタミン類を含んでいてもよい。当該水性溶液として、カリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭ未満であり、緩衝作用物質によってｐＨが６．０～８．６の範囲に調整された細胞や組織の維持若しくは培養用の水性溶液が挙げられる。具体的には、Ｏｐｔｉｓｏｌ、ＨＢＳＳ、ＤＭＥＭ、ＤＭＥＭ－ｎｏ－ｇｌｕｃｏｓｅ、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ　ｍｅｄｉｕｍ、表１の組成を有する角膜保存液を例示することができる。

【００９１】

当該水性溶液は、好ましくは、更にグリコサミノグリカン類、具体的にはコンドロイチン硫酸、及び／又はヒアルロン酸を含む。ここでグリコサミノグリカン類の濃度としては、前述のとおりである。

【００９２】

ヒト神経組織として、多能性幹細胞由来のヒト神経組織、例えば、神経上皮構造を有する細胞凝集体であるヒト神経組織が挙げられる。

【００９３】

細胞凝集体として、具体的には、細胞凝集体表面に存在する連続上皮構造を有する網膜組織、又は細胞凝集体表面若しくは内部に存在する連続上皮構造及び／又はロゼット構造を有する前脳・中脳組織が挙げられる。網膜組織として、上述の網膜組織が挙げられ、例えば、ＣＲＸ及び／又はＮ－カドヘリン陽性細胞を含む連続上皮構造を有する神経網膜組織が挙げられる。前脳・中脳組織として、例えば、Ｏｔｘ２陽性細胞を含む連続上皮構造、及び／又は、ロゼット（管腔）構造を有する前脳・中脳組織が挙げられる。

【００９４】

本発明の保存方法又は輸送方法に用いる保存液は、神経組織の保存が可能である範囲において、保存期間の途中で組成を変更してもよい。また、保存の途中に、同一の組成の保存液と交換してもよい。交換としては半量交換、８割量交換、全量交換が挙げられるがこれらに限定されない。

【００９５】

本発明の保存方法又は輸送方法において用いられる容器は、特に限定されず、当業者で

あれば適宜決定することが可能である。このような容器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、培養皿（ディッシュ）、ペトリデッシュ（シャーレ）、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、チューブ、スクリューキャップ式チューブ、バイアル、トレイ、培養バック、が挙げられる。これらの容器は、神経組織の浮遊保存を可能とするために、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の容器としては、容器の内側表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、基底膜標品、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等によるコーティング処理、又は、正電荷処理等の表面加工）されていないもの等を使用できる。細胞非接着性の容器としては、容器の表面が、細胞との接着性を低下させる目的で人工的に処理（例えば、ＭＰＣポリマー等の超親水性処理、タンパク低吸着処理等）されたもの等を使用できる。容器の素材としては、ポリスチレン、ポリプロピレン等が挙げられるが、これらに限定されない。容器の底面は、平底でもよいし、凹凸があってもよい。

【００９６】

一態様において、上記容器は、無菌であることが好ましい。容器を滅菌して無菌化する方法としては、当業者が周知の方法を用いることができる。また、無菌の容器を購入して用いてもよい。

【００９７】

一態様において、上記容器として、細胞保存用チューブを用いてもよい。上記細胞保存用チューブとして、例えば、クライオチューブ、コニカルチューブ、遠心管、プラスチック製チューブ等が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９８】

本発明の保存方法又は輸送方法において、神経組織は、８℃以上若しくは１２℃以上、３０℃以下若しくは２２℃以下の保存温度で保存する。８℃から３０℃、好ましくは１２℃から２２℃、より好ましくは約１７℃（１５℃から１９℃又は１６℃から１８℃）の保存温度で保存する。保存温度を制御する目的では、後述する温度維持装置を用いてもよい。

【００９９】

一態様において、保存温度とは、保存液の温度を温度計等で実測した値でもよいし、温度維持装置内の温度を実測した値でもよいし、温度維持装置において設定された温度であってもよい。温度を実測する場合に、例えば温度計を用いることができる。

【０１００】

上記温度維持装置は、密閉された気相、あるいは液相を上記の範囲の温度に保つ機能があれば特に限定されない。具体的には、細胞培養用のCO_2インキュベーター、冷蔵庫、遠心機、恒温水槽、恒温槽、ブロックインキュベーター、保温ゲル等を用いることができる。当業者であれば、保存する組織等に応じて、その他の設定（酸素濃度、二酸化炭素濃度等）を適宜行う事ができる。

【０１０１】

神経組織は、施設間（例：神経組織の製造施設から移植施設へ輸送）を輸送される事があるが、当該期間も適切に保存されることが好ましく、本明細書の保存方法を適用可能である。輸送方法は特に限定されず、車両、船舶、又は航空機等のいずれの方法であってもよい。従って、輸送手段において適切な温度維持装置が備わっているか、あるいは、温度維持装置を含めて輸送できることが好ましい。また、温度維持装置は、輸送による振動が内部の保存液に伝わらない構造を有している方が好ましい。従って、カリウムイオン濃度が０ｍＭ超１１５ｍＭより低い保存液中、８℃～３０℃、好ましくは１２℃から２２℃、より好ましくは約１７℃（１５℃から１９℃又は１６℃から１８℃）の保存温度で、神経組織を輸送する方法もまた本発明の範疇である。

【０１０２】

本明細書において、神経組織の保存は、神経組織を上述した範囲内の温度に設定された温度維持装置内に置く事により開始され、神経組織を当該温度維持装置から出す事により

終了する。

【０１０３】

本発明の保存液を使用することにより、神経組織は１４日を超えない期間、５日を超えない期間、又は３日を超えない期間保存され得る。当該期間は、移植に供するまでの品質管理又は輸送に要するため、通常２時間以上である。本明細書において、「Ｘ日を超えない期間」とは、保存を開始した日を０日目とし、Ｘ日目までの期間をいう。一態様において、神経組織の品質が落ちる可能性はあるが、当該方法で神経組織を例えば１カ月を超えない期間保存してもよい。

【０１０４】

本発明の保存方法又は輸送方法において、神経組織の保存は培養工程と区別される。神経組織の培養工程（例えば、維持培養又は分化誘導培養）の場合には、細胞の代謝、増殖、運命決定、分化、成熟化、移動等が断続的に起こり得る。上記培養工程（例えば、維持培養、分化誘導培養）の際には、神経細胞の生存及び増殖若しくは分化誘導に適した条件で培養する。当該条件としては、培地組成（糖類、アミノ酸、ビタミン類等の栄養成分を含む）、温度（通常３６～３７℃）、湿度（通常９５％）、二酸化炭素濃度（通常５～１０％）、酸素濃度（通常２～６０％）等の条件が挙げられる。

【０１０５】

一方、本発明における保存温度は、３０℃以下であり、培養工程（例えば、神経組織の維持培養又は分化誘導培養）の至適温度とは異なる。本発明において保存する際、培地中の栄養成分、湿度及び二酸化炭素濃度の維持及び調整は必須ではない。

【０１０６】

本明細書における神経組織の保存とは、細胞の増殖及び分化を実質的に伴わず、保存前後における神経組織の状態が実質的に同等である事が好ましい。例えば、神経組織を移植に用いる場合、製造した神経組織の品質検査を行う場合があるが、当該品質検査には、その内容に応じて数時間～数日の期間を要する。保存前と保存後で神経組織が同等であることは、当業者が設定可能な品質試験を行うことで実証することができる。一態様において、保存前と保存後で神経組織が実質的に同等であることは、動物モデルに移植したときの効果を比較することで実証することができる。

【０１０７】

また、神経組織が、ＣＰＣ細胞培養センター等の製造設備で製造された場合、移植を必要とする患者（レシピエント）の医療機関へ輸送する必要があるが、遠隔地の場合距離に応じて、輸送に数時間～数日間を要することも想定される。

【０１０８】

そのため、当該品質検査若しくは輸送に要する期間、神経組織の状態が実質的に同等である事は重要である。

【０１０９】

一態様において、神経組織の「保存」は、細胞増殖を伴う「培養」と区別される。維持培養又は分化誘導の際には、細胞の増殖又は分化が断続的に行われ、神経細胞の生存及び増殖若しくは分化誘導に適した、培地組成（糖類、アミノ酸、ビタミン類等の栄養成分を含む）と温度（通常３７℃）、湿度（通常９５％）、二酸化炭素濃度（通常５％）等の外部環境等の条件が求められる。本明細書における「保存」は、細胞の増殖及び分化を実質的に伴わず、細胞凝集体の性状が変化することなく保持される、すなわち実質的な同等性が保たれることを意味する。

【０１１０】

一態様において、神経組織の「保存」は、組織の形態変化を伴う「培養」と区別される。組織を「培養」する際には、組織の形態変化（例えば、伸長、陥入、反転）が起きることがあり、組織の「培養」に適した、培地組成（糖類、アミノ酸、ビタミン類等の栄養成分を含む）と温度（通常３７℃）、湿度（通常９５％）、二酸化炭素濃度（通常５％）等の外部環境等の条件が求められる。

【０１１１】

本発明の保存方法における保存温度は３０℃以下であり、細胞の増殖又は分化の至適温度とは異なる。

【０１１２】

一態様において、本明細書の方法で保存する事により、神経組織中に含まれる神経系細胞の保存前後における生細胞率は同等であることが好ましい。ここで、生細胞率が同等とは、本発明の保存液に接触させる前の生細胞率に対する保存後の生細胞率の割合が実質的に変化しない、具体的には、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上である事を意味する。

【０１１３】

ここで、例えば移植に用いられる神経組織中に含まれる神経系細胞の生細胞率が、本発明の保存液に接触させる前に９５％以上であった場合、本発明の方法において保存された、すなわち、当該保存液中で数時間～１４日間保存後の当該組織中の神経系細胞の生細胞率は、保存期間及び保存条件に依存するが、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上で維持される。

【０１１４】

一態様において、本発明の方法で網膜組織を含む細胞凝集体を保存する事により、保存前後において、当該細胞凝集体中のＣＲＸ陽性細胞数は同等である。ここで、ＣＲＸ陽性細胞数が同等とは、本発明の保存液に接触させる前のＣＲＸ陽性細胞数に対する、当該保存液中で数時間～１４日間保存後のＣＲＸ陽性細胞数の割合が、保存期間及び保存条件に依存するが、７０％以上、８０％以上、又は９５％以上で維持される事を意味する。

【０１１５】

一態様において、本発明の方法で神経組織を含む細胞凝集体を保存する事により、保存前後において、Ｏｔｘ２陽性のロゼット構造（管腔）を持つ凝集体数は同等である。ここで、Ｏｔｘ２陽性のロゼット構造を持つ凝集体数が同等とは、本発明の保存液に接触させる前のＯｔｘ２陽性のロゼット構造を持つ凝集体数に対する、当該保存液中で数時間～１４日間保存後のＯｔｘ２陽性な管腔を持つ凝集体数の割合が、保存期間及び保存条件に依存するが、５０％以上、８０％以上、又は９０％以上で維持される事を意味する。

【０１１６】

一態様において、本発明の方法で保存する事により、保存前後において、実質的に同等の神経組織の凝集体に特有の層構造又は立体的な細胞配置を維持することができる。例えば、神経網膜層を含む網膜組織の場合、具体的には、連続上皮構造、小胞性層状形態、及びＣｒｘ陽性細胞が表層に層状に存在し、その内側にＣｈｘ１０陽性細胞が層状に存在する細胞配置等が挙げられる。「実質的に同等の層構造又は立体的な細胞配置を維持する」とは、本発明の保存液に接触させる前の、特定の性状を呈する層構造又は立体的な細胞配置を有する凝集体の数に対する、当該保存液中で数時間～１４日間保存後の、当該層構造又は立体的な細胞配置を有する凝集体数の割合が、８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上である事を意味する。別の態様として、特定の性状を呈する層構造又は立体的な細胞配置が同等とは、凝集体の外周中に含まれる当該層構造又は立体的な細胞配置を示す部分の割合が、本発明の保存前と接触させる前と比べて、保存期間及び保存条件に依存するが、７０％以上、８０％以上、又は９５％以上で維持される事を意味する。

【０１１７】

当該保存方法により保存された神経組織は、速やかに目的の使用、具体的には品質検査及び患者（レシピエント）への移植手術に供する事ができる。保存期間の後に、神経組織を培地中で短期間（例えば、３時間～７日間）あるいは長期間（８日間～数か月）の回復培養を行ってもよく、回復培養は当業者に周知の方法で行うことができ、例えば３７℃に設定されたCO_2インキュベーター内で行われる。一態様において、回復培養は、通常の分化培養又は成熟培養と全く同じ条件で行ってもよい。

【０１１８】

本発明の保存又は輸送方法により保存された神経組織、具体的には、前脳組織、中脳組

織又は網膜組織等は、例えば、生体（レシピエント）への移植に用いることができる。
【０１１９】
一態様において、上記保存された神経組織を、具体的には、前脳組織、中脳組織又は網膜組織等を、生体へ移植する際、保存液から取り出された後に、直接移植してもよい。一態様において、上記保存された神経組織は、組織又は細胞を含む医薬に通常使用される、保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を用いて洗浄し、これらを担体として移植してもよい。
【０１２０】
本発明の保存又は輸送方法により保存される神経組織（例、網膜組織、前脳組織、中脳組織）は、当該神経組織の障害に基づく疾患の移植医療に有用である。そこで、本発明は、本発明保存方法により保存される神経組織を含む、当該神経組織の障害に基づく疾患の治療薬を提供する。当該神経組織の障害に基づく疾患の治療薬として、或いは、当該神経組織の損傷状態において、該当する損傷部位を補充するために、本発明保存方法により保存される神経組織を用いることが出来る。移植を必要とする、神経組織の障害に基づく疾患、又は神経組織の損傷状態の患者に、本発明保存方法により保存される神経組織を移植し、当該障害又は損傷を受けた神経組織自体を補充することにより、神経組織の障害に基づく疾患、又は神経組織の損傷状態を治療することが出来る。例えば、神経組織の障害に基づく疾患としては、例えば、神経変性疾患（例えば、脳虚血障害、脳梗塞、パーキンソン氏病、脊髄損傷、脳血管障害、脳／脊髄外傷性障害（例、脳梗塞、頭部外傷／脳挫傷（ＴＢＩ）、脊髄損傷多系統萎縮症）、典型的な神経変性疾患（筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、パーキンソン氏病（ＰＤ）、パーキンソン症候群 、アルツハイマー型痴呆 、 進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、ハンチントン病 、多系統萎縮症（ＭＳＡ）、脊髄小脳変性症（ＳＣＤ））、脱髄疾患、神経筋疾患（多発性硬化症（ＭＳ）、急性散在性脳脊髄炎（ＡＤＥＭ）、炎症性広汎性硬化症（Ｓｃｈｉｌｄｅｒ病）、亜急性硬化症全脳炎、進行性多巣性白質脳症、低酸素脳症、橋中心髄鞘破壊症、Ｂｉｎｓｗａｎｇｅｒ病、ギラン・バレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎、脊髄空洞症、脊髄小脳変性症、黒質線条体変性症（ＳＮＤ）、オリーブ橋小脳萎縮症（ＯＰＣＡ）、シャイ・ドレーガー症候群（Ｓｈｙ－Ｄｒａｇｅｒ症候群））、眼科疾患（黄斑変性症、加齢黄斑変性、網膜色素変性、白内障、緑内障、角膜疾患、網膜症）、難治性てんかん、進行性核上性麻痺、脊髄空洞症、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）、球脊髄性筋萎縮症（ＳＢＭＡ）、原発性側索硬化症（ＰＬＳ）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、大脳皮質基底核変性症（ＣＢＤ）、ハンチントン病（ＨＤ）、有棘赤血球舞踏病、脊髄空洞症、前頭側頭葉変性症、Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ ｄｉｓｅａｓｅ病、ジストニア、Ｐａｎｔｏｔｈｅｎａｔｅ ｋｉｎａｓｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｎｅｕｒｏｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ、家族性認知症、パーキンソン症候群、老人性失認症、痙性対麻痺、レビー小体型認知症、下垂体機能低下症、脳腫瘍の外科的摘出術によって生じた機能不全等が挙げられる。例えば、大脳組織又は大脳関連細胞の障害に基づく疾患としては、例えば、神経変性疾患（例えば、脳虚血障害、脳梗塞、運動ニューロン病、ＡＬＳ、アルツハイマー病、ポリグルタミン病、大脳皮質基底核変性症）が挙げられる。網膜組織又は網膜関連細胞の障害に基づく疾患としては、例えば、網膜変性症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症、有機水銀中毒、クロロキン網膜症、緑内障、糖尿病性網膜症、新生児網膜症、等が挙げられる。さらに、神経組織の損傷状態としては、神経組織摘出後の患者、神経組織内腫瘍への放射線照射後の患者、外傷が挙げられる。
【実施例】
【０１２１】
以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。
実施例１：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存した例（保存温度及び保存液のスクリーニング実験）
【０１２２】

ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，４，３５９４（２０１４）に記載の方法に準じてフィーダーフリー培養した。フィーダーフリー培地としてはＳｔｅｍＦｉｔ培地（ＡＫ０３Ｎ、味の素社製）、フィーダーフリー足場にはＬａｍｉｎｉｎ５１１－Ｅ８（ニッピ社製）を用いた。

【０１２３】

具体的な維持培養操作としては、まずサブコンフレントになったヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株）を、ＰＢＳにて洗浄後、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて単一細胞へ分散した。その後、上記単一細胞へ分散されたヒトｉＰＳ細胞を、Ｌａｍｉｎｉｎ５１１－Ｅ８にてコートしたプラスチック培養ディッシュに播種し、Ｙ２７６３２（ＲＯＣＫ阻害物質、１０μＭ）存在下、ＳｔｅｍＦｉｔ培地にてフィーダーフリー培養した。上記プラスチック培養ディッシュとして、６ウェルプレート（イワキ社製、細胞培養用、培養面積９．４ｃｍ^2）を用いた場合、上記単一細胞へ分散されたヒトｉＰＳ細胞の播種細胞数は１．０×１０^{4}とした。播種した１日後に、Ｙ２７６３２を含まないＳｔｅｍＦｉｔ培地に交換した。以降、１日～２日に一回Ｙ２７６３２を含まないＳｔｅｍＦｉｔ培地にて培地交換した。その後、播種した６日後に、サブコンフレント（培養面積の６割が細胞に覆われる程度）になるまで培養した。

【０１２４】

分化誘導操作としては、ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株）を、ＳｔｅｍＦｉｔ培地を用いて、サブコンフレント１日前（培養面積の５割が細胞に覆われる程度）になるまでフィーダーフリー培養した。当該サブコンフレント１日前のヒトｉＰＳ細胞を、ＳＢ４３１５４２（５μＭ）及びＳＡＧ（３００ｎＭ）の存在下、１日間フィーダーフリー培養した（Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理）。

【０１２５】

Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理したヒトｉＰＳ細胞を、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）で処理し、更にピペッティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトｉＰＳ細胞を非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ ９６Ｖ底プレート、住友ベークライト社製）の１ウェルあたり１．２×１０^{4}細胞になるように１００μｌの無血清培地に浮遊させ、３７℃、５％CO_2で浮遊培養した。その際の無血清培地（ｇｆＣＤＭ＋ＫＳＲ）には、Ｆ－１２培地とＩＭＤＭ培地の１：１混合液に１０％ＫＳＲ、４５０μＭ １－モノチオグリセロール、１×Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時（浮遊培養開始後０日目）に、無血清培地にＩＷＲ－１ｅ（終濃度３μＭ）、Ｙ２７６３２（終濃度２０μＭ）及びＳＡＧ（終濃度３０ｎＭ）を添加した。浮遊培養開始後３日目に、Ｙ２７６３２及びＳＡＧを含まず、ＩＷＲ－１ｅ及びヒト組み換えＢＭＰ４（Ｒ＆Ｄ社製）を含む培地にて、外来性のヒト組み換えＢＭＰ４の終濃度が１．５ｎＭ（５５ｎｇ／ｍｌ）になり、かつ、ＩＷＲ－１ｅの終濃度３μＭになるように新しい上記無血清培地を５０μｌ添加した。

【０１２６】

その３日後（浮遊培養開始６日後）に、Ｙ２７６３２及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まず、ＩＷＲ－１ｅを含む上記無血清培地にて半量培地交換した。その４日後（浮遊培養開始１０日後）に、外来性のＩＷＲ－１ｅの濃度が培地交換前に比べて３％以下になるように、ＩＷＲ－１ｅ、Ｙ２７６３２及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まない上記無血清培地を用いて８０％培地交換操作を２回行った。その後、２～４日に一回、ＩＷＲ－１ｅ、Ｙ２７６３２及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まない上記無血清培地にて半量培地交換した。半量培地交換操作としては、培養器中の培地を体積の半分量即ち７５μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を７５μｌ加え、培地量は合計１５０μｌとした。

【０１２７】

このようにして得られた浮遊培養開始後１７日目の細胞凝集体を、Ｗｎｔシグナル伝達経路作用物質であるＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ）及びＦＧＦシグナル伝達経路阻害物質であるＳＵ５４０２（５μＭ）を含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１％Ｎ２

ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔが添加された培地）で３日間即ち浮遊培養開始後２０日目まで培養した。

【０１２８】

更に、Ｗｎｔシグナル伝達経路作用物質及びＦＧＦシグナル伝達経路阻害物質を含まない血清培地として、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１０％牛胎児血清、１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、０．５μＭレチノイン酸、及び１００μＭタウリンが添加された培地（以下、「Ｒｅｔｉｎａ培地」と呼ぶ）を作製し、当該浮遊培養開始後２０日目の細胞凝集体をＲｅｔｉｎａ培地で、６５日間即ち浮遊培養開始後８５日目まで浮遊培養した。浮遊培養開始後２０日目から８５日目までの間、２～４日に一回、Ｒｅｔｉｎａ培地にて半量程度を培地交換した。

【０１２９】

このようにして得られた浮遊培養開始後８５日目の細胞凝集体について、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察したところ、細胞凝集体が立体の神経組織を含んでおり、その一部が連続上皮構造を含んでいることが確認できた。

【０１３０】

検討した保存液は以下の３種類であった（表２～４参照）。

・Ｒｅｔｉｎａ培地：ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１０％牛胎児血清、１％Ｎ２ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、０．５μＭレチノイン酸、及び１００μＭタウリンが添加された培地

・Ｈａｎｋ´ｓ ｂａｌａｎｃｅｄ ｓａｌｔ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｇｉｂｃｏ社製、以下「ＨＢＳＳ」と称す）

・Ｏｐｔｉｓｏｌ－ＧＳ（登録商標）（Ｂａｕｓｃｈ ａｎｄ Ｌｏｍｂ社製、以下「Ｏｐｔｉｓｏｌ」又は「オプチゾール」と称す）

【０１３１】

【表２】

表２　ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地の成分

無機塩類(濃度)	(mg/L)	(mM)
塩化カルシウム（$CaCl_2$）（無水和物）	117	1.05
硫酸銅（$CuSO_4$-$5H_2O$）	0.0013	0.0000052
硝酸鉄（$Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$）	0.05	0.000124
硫酸鉄（$FeSO_4$-$7H_2O$）	0.417	0.0015
塩化マグネシウム($MgCl_2$)（無水和物）	28.6	0.301
硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）（無水和物）	48.8	0.407
塩化カリウム（KCl）	311	4.16
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）	2438	29.0
塩化ナトリウム（NaCl）	7000	121
リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)（無水和物）	71.02	0.500
リン酸二水素ナトリウム（NaH_2PO_4-H_2O）	62.5	0.453
硫酸亜鉛（$ZnSO_4$-$7H_2O$）	0.432	0.00150

上記以外に含有される成分

アミノ酸,ビタミン類、グルコース、ヒポキサンチンナトリウム、リノレン酸、リポ酸、フェノールレッド、プトレシン二塩酸塩、ピルビン酸ナトリウム、チミジン

（Thermo Fisher Scientific社ウェブページより抜粋：
https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.58.html）

【０１３２】

【表３】

表3 HBSSの成分

無機塩類(濃度)	(mg/L)	(mM)
塩化カリウム（KCl）	400	5.33
リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）	60	0.441
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）	350	4.17
塩化ナトリウム（NaCl）	8000	138
リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)（無水和物）	48	0.338

上記以外に含有される成分

グルコース

（Thermo Fisher Scientific社ウェブページより抜粋：
https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.156.html）

【０１３３】

【表４】

表4 Optisolの成分

無機塩類

塩化カルシウム（$CaCl_2$）(無水和物)
硝酸鉄 $Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$
塩化カリウム（KCl）
硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）
塩化ナトリウム（NaCl）
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）
リン酸二水素ナトリウム（NaH_2PO_4 H_2O）

上記以外に含有される主な成分

アミノ酸類、ビタミン類、アデニン硫酸塩、コレステロール、グルコース、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、２－メルカプトエタノール、コンドロイチン硫酸、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、デキストラン等

（American journal of ophthalmology, 114, 345-356, (1992),
Bausch and Lomb社製Ｏｐｔｉｓｏｌ　ＧＳ　安全性情報シートより抜粋）

【０１３４】

検討した保存温度は、以下の３点であった。

・３７℃（インキュベーター、５％CO_2条件、パナソニック社製）

・１７℃（インキュベーター、５％CO_2条件、アステック社製）

・４℃（冷蔵庫、密封条件、パナソニック社製）

【０１３５】

検討した保存容器は、いずれも６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）であった。

【０１３６】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ～Ｉであった。

・保存条件Ａ（通常の培養条件）．保存液がＲｅｔｉｎａ培地、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｂ．保存液がＲｅｔｉｎａ培地、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｃ．保存液がＲｅｔｉｎａ培地、保存温度が４℃、保存容器が低接着プレート

（密封）
・保存条件Ｄ．保存液がＨＢＳＳ、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｅ．保存液がＨＢＳＳ、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｆ．保存液がＨＢＳＳ、保存温度が４℃、保存容器が低接着プレート（密封）
・保存条件Ｇ．保存液がオプチゾール、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｈ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｉ．保存液がオプチゾール、保存温度が４℃、保存容器が低接着プレート（密封）

【０１３７】
上記浮遊培養開始後８５日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ～Ｉで４８時間、保存した。保存直後（浮遊培養開始後８７日目）の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した。
その結果、保存条件Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈの保存直後の細胞凝集体では、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。保存条件Ｄ、Ｉでは、立体組織の形態が保持される細胞凝集体はあったものの、形態が崩れた凝集体が多かった。一方で、保存条件Ｃでは、ほとんど全ての細胞凝集体で立体組織の形態が大きく崩れた。

【０１３８】
次に、保存後の細胞凝集体に含まれる細胞が、正常に培養できるか、及び、分化細胞が細胞死を起こす等の異常が起きないかを検証するために、回復培養操作を行った。具体的には、保存条件Ａ～Ｉにて４８時間保存後の細胞凝集体を、Ｒｅｔｉｎａ培地中で、低接着プレートを用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０１３９】
得られた回復培養後の細胞凝集体について、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１）。

【０１４０】
その結果、保存条件Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。保存条件Ｄ、Ｉでは、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が観察された細胞凝集体はあったものの、約７割の細胞凝集体で、図１に示すように細胞凝集体（立体網膜）の形態が崩れていた。平均的には図１におけるＤ、Ｉの形態を示した。一方で、保存条件Ｃでは、図１におけるＣに示されるとおり、ほとんど全ての細胞凝集体において立体組織の形態が大きく崩れる傾向があった。

【０１４１】
得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、網膜組織マーカーの１つであるＣｈｘ１０（抗Ｃｈｘ１０抗体、Ｅｘａｌｐｈａ社、ヒツジ）、及び、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）について免疫染色を行った。ＤＡＰＩで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図２及び図３）。

【０１４２】
そして、免疫染色像を形態的に解析した。すなわちＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に層状に存在し、かつ、その内側にＣｈｘ１０陽性の神経網膜前駆細胞が層状に存在するという特徴をもつ神経網膜組織があるか調べた。さらに、上記神経網膜組織が凝集体の外周を接線方向に１００μｍ以上連続する、連続上皮構造を形成しているかを調べた（以下、「神経網膜組織の連続上皮構造」と呼ぶ）。

【０１４３】
その結果、保存条件Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈの回復培養後の細胞凝集体では、神経網膜組織の連続上皮構造がほとんどの細胞凝集体で存在することが分かった（図２及び図３）。保存条件Ｄ、Ｉでも、神経網膜組織の連続上皮構造が観察された細胞凝集体はあったものの、７割方の細胞凝集体で、図に示すように立体網膜の形態が崩れていた。一方で、保存条件Ｃでは、ほとんどの細胞凝集体において神経網膜組織の連続上皮構造がほとんど検出されなかった。
【０１４４】
これらの結果から、通常の培養条件と同じ保存条件Ａと比べて、保存条件Ｂ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈで、細胞凝集体が神経網膜組織の連続上皮構造を維持したまま、４８時間保存できることがわかった。また、保存条件Ｄ、Ｉでも、神経網膜組織の連続上皮構造を部分的に維持できることがわかった。
【０１４５】
そして、保存条件Ｂ、Ｅ、Ｈ、すなわち保存温度が１７℃の条件で、様々な保存液で、安定して保存できることがわかった。
【０１４６】
実施例２：ヒトＥＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、種々の保存条件下で保存した例（保存温度及び保存液のスクリーニング実験）
Ｃｒｘ：：ＶｅｎｕｓノックインヒトＥＳ細胞（ＫｈＥＳ－１由来；Ｎａｋａｎｏ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２０１２，１０（６），７７１－７８５；京都大学より入手、理研ＣＤＢにて樹立して使用）を、実施例１記載の方法で、ＳｔｅｍＦｉｔ培地にて、サブコンフレント１日前になるまでフィーダーフリー条件下で培養した。当該サブコンフレント１日前のヒトＥＳ細胞を、ＳＢ４３１５４２（５μＭ）及びＳＡＧ（３００ｎＭ）の存在下、１日間フィーダーフリー培養した（Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理）。
【０１４７】
Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理されたヒトＥＳ細胞を、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて細胞分散液処理し、更にピペッティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトｉＰＳ細胞を非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ ９６Ｖ底プレート、住友ベークライト社製）の１ウェルあたり１．２×１０^{4}細胞になるように１００μｌの無血清培地に浮遊させ、３７℃、５％CO_2で浮遊培養した（浮遊培養開始後０日目）。その際の無血清培地（ｇｆＣＤＭ＋ＫＳＲ）には、Ｆ－１２培地とＩＭＤＭ培地の１：１混合液に１０％ＫＳＲ、４５０μＭ １－モノチオグリセロール、１×Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを添加した無血清培地を用いた。
【０１４８】
浮遊培養開始時（浮遊培養開始後０日目）に、上記無血清培地にＹ２７６３２（終濃度２０μＭ）及びＳＡＧ（３０ｎＭ）を添加した。浮遊培養開始後３日目に、Ｙ２７６３２及びＳＡＧを含まず、ヒト組み換えＢＭＰ４（商品名：Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＢＭＰ－４、Ｒ＆Ｄ社製）を含む培地を、ヒト組み換えＢＭＰ４の、終濃度が１．５ｎＭ（５５ｎｇ／ｍｌ））になるように５０μＬ添加した。
【０１４９】
このようにして調製された細胞を浮遊培養開始後６日目に、培地を６０μＬ除去し、新たに９０μＬ培地を添加した。浮遊培養開始後９、１２、及び１５日目に培地を８５μＬ除去し、新たに９０μＬの培地を加え、浮遊培養開始後１８日目まで培養した。
【０１５０】
当該浮遊培養開始後１８日目の凝集体を、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ）及びＳＵ５４０２（５μＭ）を含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔが添加された培地）で３日間即ち浮遊培養開始後２１日目まで培養した。

【０１５１】
得られた浮遊培養開始後２１日目の細胞凝集体を、下記の培養液については下記［１］、［２］及び［３］に示した血清培地を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後８０日目まで培養した。
［１］浮遊培養開始後２１日目から４０日目まで：ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１０％牛胎児血清、１％Ｎ２　ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、及び１００μＭタウリンが添加された培地（以下「Ａ培地」という）。
［２］浮遊培養開始後４０日目から６０日目まで：Ａ培地と、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（表５を参照）に、１０％牛胎児血清、２％Ｂ２７　ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、２００ｍＭｇｌｕｔａｍｉｎｅ及び１００μＭタウリンが添加された培地（以下「Ｂ培地」という）を１：３の比率で混合した培地。
［３］浮遊培養開始後６０日目以降：Ｂ培地。
【０１５２】
得られた浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。
【０１５３】
検討した保存液は以下の４種類であった。
・上記Ｂ培地
・ＨＢＳＳ（実施例１記載）
・オプチゾール（実施例１記載）
・Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ液（商品名ビアスパン，アステラス製薬より販売、以下「ＵＷ液」と称す。表６を参照）
【表５】
表５　Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地の成分

無機塩類(濃度)	(mg/L)	(mM)
塩化カルシウム（$CaCl_2$）（無水和物）	200	1.80
硝酸鉄 $Fe(NO_3)_3\ 9H_2O$	0.1	0.000248
塩化マグネシウム($MgCl_2$)（無水和物）	77.3	0.814
塩化カリウム（KCl）	400	5.33
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）	2200	26.2
塩化ナトリウム（NaCl）	3000	51.7
リン酸二水素ナトリウム（$NaH_2PO_4\ H_2O$）	125	0.906
硫酸亜鉛（$ZnSO_4$-$7H_2O$）	0.194	0.000674

上記以外に含有される成分

アミノ酸、ビタミン類、グルコース、ＨＥＰＥＳ，フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム

（Thermo Fisher Scientific社ウェブページより抜粋：
https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.251.html）

【表６】

表6 UW液の成分

無機イオン類(濃度)	(mM)
ナトリウム（Na）	30
カリウム（K）	120
マグネシウム（Mg）	5
硫酸イオン	5
リン酸イオン	25
ラクトビオン酸イオン	100

上記以外に含有される成分

ラフィノース、ヒドロキシルエチル澱粉、グルタチオン

（論文より抜粋：World J Transplant. 2015 Dec 24; 5(4): 154-164.）

【０１５４】

検討した保存温度は、以下の３点であった。

・３７℃（インキュベーター、５％CO_2条件、パナソニック社製）

・１７℃（インキュベーター、５％CO_2条件、アステック社製）

・４℃（冷蔵庫、密封条件、パナソニック社製）

【０１５５】

検討した保存容器は、いずれも６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）であった。

【０１５６】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ～Ｈであった。

・保存条件Ａ（通常の培養条件）．保存液がＢ培地、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｂ．保存液がＢ培地、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｃ．保存液がＨＢＳＳ、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｄ．保存液がＨＢＳＳ、保存温度が４℃、保存容器が低接着プレート（密封）

・保存条件Ｅ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｆ．保存液がオプチゾール、保存温度が４℃、保存容器が低接着プレート（密封）

・保存条件Ｇ．保存液がＵＷ液、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｈ．保存液がＵＷ液、保存温度が４℃、保存容器が低接着プレート（密封）

【０１５７】

上記浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ～Ｈで４８時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した。

【０１５８】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅの保存直後の細胞凝集体では、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。保存条件Ｄ、Ｆでは、立体組織の形態が保持される細胞凝集体はあったものの、形態が崩れた細胞凝集体が多かった。一方で、ＵＷ液を用いた保存条件Ｇ，Ｈでは、ほとんど全ての細胞凝集体で立体組織の形態が大きく崩れた。

【０１５９】
次に、保存条件Ａ～Ｈにて保存後の細胞凝集体を、Ｂ培地中で、低接着プレートを用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。
【０１６０】
得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図４）。
【０１６１】
その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が高い頻度で観察された。保存条件Ｄ、Ｆでは、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が一部の細胞凝集体で観察された。一方で、ＵＷ液を用いた保存条件Ｇ，Ｈでは、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が大きく崩れる傾向があった。
【０１６２】
得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、網膜組織マーカーの１つであるＣｈｘ１０（抗Ｃｈｘ１０抗体、Ｅｘａｌｐｈａ社、ヒツジ）、及び、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）について免疫染色を行った。ＤＡＰＩで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図５及び図６）。さらに、神経網膜組織の連続上皮構造が形成されているかを実施例１記載の方法で調べた。
【０１６３】
その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。保存条件Ｄ、Ｆでは、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が観察された細胞凝集体はあったものの、約７割の細胞凝集体で、図５及び図６に示すようにロゼット構造が多く形成され、細胞凝集体（立体網膜）の形態が崩れていた。平均的には、図５及び図６におけるＤ、Ｉの形態を示した。一方で、ＵＷ液を用いた保存条件Ｇ，Ｈでは、図５及び図６におけるＧ、Ｈに示されるとおり、ほとんど全ての細胞凝集体において、立体網膜の形態が大きく崩れる傾向があった。
【０１６４】
これらの結果から、通常の培養条件と同じ保存条件Ａと比べて、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅ、すなわち保存温度が１７℃の条件では、様々な保存液を用いて、細胞凝集体が神経網膜組織の連続上皮構造を維持したまま、４８時間保存できることがわかった。
【０１６５】
一方で、保存液としてＵＷ液を用いた保存条件Ｇ，Ｈでは、神経網膜組織の連続上皮構造がほとんど維持されないことがわかった。
【０１６６】
実施例３：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、保存液としてオプチゾールを用いて１７℃で保存した例
ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例１記載の方法で、フィーダーフリー培養し、分化誘導し、浮遊培養開始後２０日目の細胞凝集体を作製した。
【０１６７】
得られた浮遊培養開始後２０日目の細胞凝集体を、実施例２記載の方法で、血清培地［１］、［２］及び［３］を用いて、浮遊培養開始後９７日目まで培養した。得られた浮遊培養開始後９７日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。
【０１６８】
浮遊培養開始後９７日目の細胞凝集体を、下記保存条件Ａ～Ｃで保存した。
・保存条件Ａ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（

５％ＣＯ$_2$）、保存期間が４８時間
・保存条件Ｂ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％ＣＯ$_2$）、保存期間が７２時間
・保存条件Ｃ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％ＣＯ$_2$）、保存期間が１２０時間
【０１６９】
保存条件Ａ～Ｃで保存した細胞凝集体を、実施例２記載の方法で、Ｂ培地を用いて、７日間回復培養した。
【０１７０】
得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、網膜組織マーカーの１つであるＣｈｘ１０（抗Ｃｈｘ１０抗体、Ｅｘａｌｐｈａ社、ヒツジ）、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）、視細胞マーカーの１つであるＲｅｃｏｖｅｒｉｎ（抗Ｒｅｃｏｖｅｒｉｎ抗体、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ社、ウサギ）、網膜組織のマーカーの１つであるＲｘ（抗Ｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、モルモット）、増殖中の細胞のマーカーの１つであるＫｉ６７（抗Ｋｉ６７抗体、ＢＤ社、マウス）について免疫染色を行った。ＤＡＰＩで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図７及び図８）。そして、神経組織の連続上皮構造が存在するかを調べた。
【０１７１】
その結果、保存条件Ａ～Ｃのいずれの条件で保存した細胞凝集体でも、神経組織の連続上皮構造が高い頻度で存在することが分かった。そして、保存条件Ａ～Ｃのいずれの神経組織の連続上皮構造においても、表面（ａｐｉｃａｌ面側）にＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞、その内側にＣｈｘ１０陽性の神経網膜前駆細胞が存在することがわかった。連続切片の解析から、Ｃｈｘ１０陽性細胞層とＫｉ６７陽性細胞層は重なることがわかった。さらに、また、Ａ～Ｃのいずれの神経組織の連続上皮構造においても、表面（ａｐｉｃａｌ面側）にＲｅｃｏｖｅｒｉｎ陽性の視細胞が存在することがわかった。
【０１７２】
これらの結果から、保存温度が１７℃の条件で、保存期間が４８時間、７２時間、１２０時間のいずれの保存条件でも、凝集体の表面（ａｐｉｃａｌ面側）にＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞及びＲｅｃｏｖｅｒｉｎ陽性の視細胞を共に含む視細胞層が存在し、その内側にＣｈｘ１０陽性の神経網膜前駆細胞及びＫｉ６７陽性の増殖細胞を共に含む神経網膜前駆細胞層が存在し、さらのその内側にＣｒｘ陽性の視細胞がｂａｓａｌ側に存在する特徴をもつ、神経組織の連続上皮構造が維持されることが実証できた。
【０１７３】
実施例４：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、５％ＣＯ$_2$存在下あるいは非存在下で保存した例
ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例１記載の方法でフィーダーフリー培養した。フィーダーフリー培地としてはＳｔｅｍＦｉｔ培地（ＡＫ０３Ｎ、味の素社製）、フィーダーフリー足場にはＬａｍｉｎｉｎ５１１－Ｅ８（ニッピ社製）を用いた。
【０１７４】
分化誘導操作としては、ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株）を、ＳｔｅｍＦｉｔ培地を用いて、サブコンフレント１日前（培養面積の５割が細胞に覆われる程度）になるまでフィーダーフリー培養した。当該サブコンフレント１日前のヒトｉＰＳ細胞を、ＳＢ４３１５４２（５μＭ）及びＳＡＧ（３００ｎＭ）の存在下、１日間フィーダーフリー培養した（Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理）。
【０１７５】
Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理したヒトｉＰＳ細胞を、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて細胞分散液処理し、更にピペッティ

ング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトｉＰＳ細胞を非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６Ｖ底プレート、住友ベークライト社製）の１ウェルあたり１．３×１０^{4}細胞になるように１００μｌの無血清培地に浮遊させ、３７℃、５％CO_2で浮遊培養した。その際の無血清培地（ｇｆＣＤＭ＋ＫＳＲ）には、Ｆ－１２培地とＩＭＤＭ培地の１：１混合液に１０％ＫＳＲ、４５０μＭ　１－モノチオグリセロール、１×Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　ｄｅｆｉｎｅｄ　ｌｉｐｉｄ　ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時（浮遊培養開始後０日目）に、無血清培地にＩＷＲ－１ｅ　（終濃度３μＭ）、Ｙ２７６３２（終濃度２０μＭ）及びＳＡＧ（終濃度３０ｎＭ）を添加した。浮遊培養開始後３日目に、Ｙ２７６３２及びＳＡＧを含まず、ＩＷＲ－１ｅ及びヒト組み換えＢＭＰ４（Ｒ＆Ｄ社製）を含む培地にて、外来性のヒト組み換えＢＭＰ４の終濃度が１．５ｎＭ（５５ｎｇ／ｍｌ）になり、かつ、ＩＷＲ－１ｅの　終濃度３μＭになるように新しい上記無血清培地を５０μｌ添加した。

【０１７６】

３日後（浮遊培養開始６日後）に、培養器中の培地を６０μｌ廃棄し、Ｙ２７６３２及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まず、ＩＷＲ－１ｅ（終濃度３μＭ）を含む上記無血清培地を９０μｌ加えた（培地量は合計１８０μｌ）。

【０１７７】

４日後（浮遊培養開始後１０日目）に、外来性のＩＷＲ－１ｅの濃度が培地交換前に比べて１０％以下になるように、ＩＷＲ－１ｅ、Ｙ２７６３２及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まない上記無血清培地を用いて６７％培地交換操作を２回行った。その後、２～４日に一回、Ｙ２７６３２、ヒト組み換えＢＭＰ４及びＩＷＲ－１ｅを含まない上記無血清培地にて半量培地交換した。半量培地交換操作としては、培養器中の培地を体積の半分量即ち９０μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を９０μｌ加えた（培地量は合計１８０μｌ）。

【０１７８】

このようにして得られた浮遊培養開始後２２日目の細胞凝集体を、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ）及びＳＵ５４０２（５μＭ）を含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１％Ｎ２　ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔが添加された培地）で３日間、浮遊培養開始後２５日目まで培養した。

【０１７９】

得られた浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体を、実施例２記載の方法で、血清培地［１］、［２］及び［３］を用いて、浮遊培養開始後６６日目まで培養した。浮遊培養開始後６６日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。

【０１８０】

得られた浮遊培養開始後６６日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０１８１】

検討した保存液は、いずれもオプチゾール（実施例１記載）であった。

【０１８２】

検討した保存温度及び周辺条件は、以下の２点であった。

・１７℃：インキュベーター（５％CO_2条件、アステック社製）
・１７℃：遠心機（大気圧、密封条件、日立社製）

【０１８３】

検討した保存容器は、以下の２点であった。

・６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）
・２．０mLクライオバイアル（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）

【０１８４】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ、Ｂであった。

・保存条件Ａ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃（インキュベーター）、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｂ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃（遠心機、日立社製）、保存容器が２．０ｍＬクライオバイアル（大気圧で密封）。当該条件では、遠心機は温度管理をする目的で、遠心せずに使用した。保存期間中、遠心機内の温度が１６．２　～１７．８℃で維持されていたことを温度ロガーを用いて測定して確認した。

【０１８５】

上記浮遊培養開始後６６日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ、Ｂで７２時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図９、上段）。

【０１８６】

その結果、保存条件Ａと保存条件Ｂの保存直後の細胞凝集体では、立体組織の形態が同等の頻度で保持される傾向があった。

【０１８７】

次に、保存条件Ａ、Ｂにて保存後の細胞凝集体を、実施例２記載のＢ培地中で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６Ｕ底プレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０１８８】

回復培養開始７日後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図９、下段）。

【０１８９】

その結果、保存条件Ａと保存条件Ｂの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮が高い頻度で観察された。また倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）を用いて、ホフマン干渉像での顕微鏡検査を行った結果、保存条件Ａ及び保存条件Ｂのいずれの条件でも、層構造をもった連続上皮をもつ神経網膜組織が高い頻度で存在することが確認できた。

【０１９０】

これらの結果から、大気中で密栓保存した保存条件Ｂでは、５％CO_2の保存条件Ａと比べて実質的に差がない水準で、立体の神経組織を、連続上皮構造を維持したまま、７２時間保存できることがわかった。

【０１９１】

実施例５：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、保存液としてオプチゾールを用いて、１７℃で保存した後、生細胞率を測定した例

ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例１記載の方法で、フィーダーフリー培養し、分化誘導し、浮遊培養開始後２０日目の細胞凝集体を作製した。

【０１９２】

得られた浮遊培養開始後２０日目の細胞凝集体を、実施例２記載の方法で、血清培地［１］、［２］及び［３］を用いて、浮遊培養開始後９１日目まで培養した。その後、以下の条件Ａ（保存なし），条件Ｂ（保存あり）で調製した。

・条件Ａ（保存なし）：浮遊培養開始後９１日目の細胞凝集体を２個、培地としてＢ培地を用いて、３７℃、５％CO_2で７２時間培養した。

・条件Ｂ（保存あり）：浮遊培養開始後９１日目の細胞凝集体を２個、保存液としてオプチゾールを用いて、保存装置として１７℃インキュベーター（和研ビーテック社製）を用いて、１７℃、大気圧（密封）条件で、７２時間保存した。

【０１９３】

このようにして調製した条件Ａ（保存なし）及び条件Ｂ（保存あり）の細胞凝集体をそれぞれ神経細胞分散液（パパイン系、和光純薬社製）を用いて分散し、細胞懸濁液を調製した。さらに、得られた細胞懸濁液をヌクレオカウンター（ＣｈｅｍｏＭｅｔｅｃ社製）で生細胞率を測った（図１０）。

【０１９４】

その結果、条件Ａ（保存なし）の細胞凝集体２個の生細胞率は９９．８％と９９．１％

であった。一方、条件Ｂ（保存あり）の細胞凝集体２個の生細胞率は、９９．３％と９８．２％であった。すなわち、保存後の凝集体でも生細胞率が９８％以上と非常に高い生細胞率であり、保存の有無で生細胞率に実質的な差がないことがわかった。

【０１９５】

これらの結果から、神経組織を保存した条件であっても、神経組織を保存していない条件と比べて、生細胞率に実質的に差がないことを実証できた。

【０１９６】

実施例６：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を用いた、保存温度の検討例（１）

ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例４記載の方法で、フィーダーフリー培養し、Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理し、分化誘導し、ＣＨＩＲ９９０２１及びＳＵ５４０２を作用させ、「浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体」を作製した。

【０１９７】

得られた浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体を、実施例２記載の血清培地［１］、［２］及び［３］を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後７３日目まで培養した。浮遊培養開始後７３日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。

【０１９８】

得られた浮遊培養開始後７３日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０１９９】

検討した保存液は、いずれもオプチゾール（実施例１記載）であった。

【０２００】

検討した保存温度は、以下の５点であった。

・４℃：冷蔵庫（密封、パナソニック社製）
・８℃：遠心機（密封、日立社製）
・１７℃：遠心機（密封、日立社製）
・３０℃：恒温槽（密封、アズワン社製）
・３７℃：インキュベーター（密封又は５％CO_2、パナソニック社製）

【０２０１】

検討した保存容器は、以下の２点であった。

・６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）
・２．０mLクライオバイアル（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）

【０２０２】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ～Ｆであった。

・保存条件Ａ（通常の培養条件）．保存液がＢ培地、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｂ．保存液がオプチゾール、保存温度が４℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｃ．保存液がオプチゾール、保存温度が８℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｄ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｅ．保存液がオプチゾール、保存温度が３０℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｆ．保存液がオプチゾール、保存温度が３７℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）

【０２０３】

上記浮遊培養開始後７３日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ～Ｆで７２時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ Ｔｉ）

で明視野像（位相差像）を観察した（図１１、上段）。

【０２０４】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｄの保存直後の細胞凝集体では、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅでは、立体組織の形態が保持される細胞凝集体はあったものの、形態が崩れた凝集体が多かった。一方で、保存条件Ｆでは、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が大きく崩れた。

【０２０５】

さらに回復培養処理として、保存条件Ａ～Ｆにて保存後の細胞凝集体を、実施例２記載のＢ培地中で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６Ｕ底プレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０２０６】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１１、中段）。

【０２０７】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｄの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が観察された細胞凝集体はあったものの、約５割の細胞凝集体で、図に示すように細胞凝集体（立体網膜）の形態が崩れていた。平均的には図１１におけるＢ、Ｃ、Ｅの形態を示した。一方で、保存条件Ｆでは、図１１におけるＦに示されるとおり、ほとんど全ての細胞凝集体において立体組織の形態が大きく崩れる傾向があった。

【０２０８】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）について免疫染色を行った。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図１１、下段）。そして、実施例１記載の方法で、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に層状に存在し、神経網膜組織の連続上皮構造が存在するかを調べた。

【０２０９】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｄの回復培養後の細胞凝集体では、神経網膜組織の連続上皮構造がほとんどの細胞凝集体で存在することが分かった。一方で、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅでも、神経網膜組織の連続上皮構造が観察された細胞凝集体はあったものの、約５割の細胞凝集体で、図に示すように立体網膜の形態が崩れていた。さらに、保存条件Ｆでは、ほとんどの細胞凝集体においてＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に存在せず、連続上皮構造がなく、ロゼットが形成されていた。

【０２１０】

さらに保存条件Ａ～ＥにおけるＣｒｘ陽性細胞の数を定量した。Ｃｒｘ陽性細胞の数の定量には、各凝集体につきＣｒｘ陽性細胞が観察される箇所をキーエンス倒立顕微鏡（ＢＺ－Ｘ７１０）２０倍レンズで撮像した画像から、４００×４００ピクセルの大きさで切り出した画像を使用し、画像全体の陽性細胞数を比較した（図１２）。保存条件Ｆについては、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が多く見られたものの、これらの細胞が表層に存在せず、連続上皮構造がなく、細胞凝集体の形態も大きく崩れていたため、調べなかった。その結果、保存条件Ｄで保存した細胞凝集体におけるＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞の数は、保存条件Ａと比べて多かった。一方で、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅで保存した細胞凝集体におけるＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞の数は、保存条件Ａと比べて少なかった。

【０２１１】

これらの結果から、保存条件Ｄすなわち保存温度１７℃で保存した細胞凝集体において、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。一方で、保存条件Ｂ、Ｃ、Ｅすなわち保存温度４、８、３０℃で保存した細胞凝集体においては、立体組織の形態が保持

される細胞凝集体はあったものの、形態が崩れた凝集体が多いことがわかった。また、保存条件Ｆすなわち保存温度が３７℃の条件では、ほとんど全ての細胞凝集体で立体組織の形態が大きく崩れた。

【０２１２】

実施例７：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を用いた、保存温度の検討例（２）

ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例４記載の方法で、フィーダーフリー培養し、Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理し、分化誘導し、ＣＨＩＲ９９０２１及びＳＵ５４０２を作用させ、「浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体」を作製した。

【０２１３】

得られた浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体を、実施例２記載の血清培地［１］、［２］及び［３］を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後８０日目まで培養した。浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。

【０２１４】

得られた浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０２１５】

検討した保存液は、いずれもオプチゾール（実施例１記載）であった。

【０２１６】

検討した保存温度は、以下の５点であった。

・４℃：冷蔵庫（密封、パナソニック社製）
・１２℃：遠心機（密封、日立社製）
・１７℃：遠心機（密封、日立社製）
・２２℃：遠心機（密封、日立社製）
・３７℃：インキュベーター（密封又は５％CO_2、パナソニック社製）

【０２１７】

検討した保存容器は、以下の２点であった。

・６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）
・２．０mLクライオバイアル（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）

【０２１８】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ～Ｆであった。

・保存条件Ａ（通常の培養条件）．保存液がＢ培地、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｂ．保存液がオプチゾール、保存温度が４℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｃ．保存液がオプチゾール、保存温度が１２℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｄ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｅ．保存液がオプチゾール、保存温度が２２℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）
・保存条件Ｆ．保存液がオプチゾール、保存温度が３７℃、保存容器が２．０mＬクライオバイアル（密封）

【０２１９】

上記浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ～Ｆで７２時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１３、上段）。

【０２２０】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｃ、Ｄ、Ｅの保存直後の細胞凝

集体では、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。保存条件Ｂでは、立体組織の形態が保持される細胞凝集体はあったものの、形態が崩れた凝集体が多かった。一方で、保存条件Ｆでは、ほとんど全ての細胞凝集体で立体組織の形態が大きく崩れた。

【０２２１】

次に、保存条件Ａ～Ｆにて保存後の細胞凝集体を、実施例２記載のＢ培地中で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６Ｕ底プレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０２２２】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１３、中段）。

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｃ、Ｄ、Ｅの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。保存条件Ｂの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が観察された細胞凝集体はあったものの、約５割の細胞凝集体で、図１３に示すように細胞凝集体（立体網膜）の形態が崩れていた。一方で、保存条件Ｆの回復培養後の細胞凝集体では、図１３におけるＦに示されるとおり、ほとんど全ての細胞凝集体において立体組織の形態が大きく崩れる傾向があった。

【０２２３】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）について免疫染色を行った。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図１２、下段）。そして、実施例１記載の方法で、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に層状に存在し、神経網膜組織の連続上皮構造を形成しているかを調べた。

【０２２４】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）と、保存条件Ｃ、Ｄ、Ｅの回復培養後の細胞凝集体では、神経網膜組織の連続上皮構造がほとんどの細胞凝集体で存在することがわかった（図１３、下段）。一方で、保存条件Ｂでも、神経網膜組織の連続上皮構造が観察された細胞凝集体はあったものの、５割方の細胞凝集体で、図に示すように立体網膜の形態が崩れていた。さらに、保存条件Ｆでは、ほとんどの細胞凝集体において、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に存在せず、ロゼットを形成していた。

【０２２５】

さらに保存条件Ａ～Ｅにおける Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞の数を定量した。Ｃｒｘ陽性細胞の数の定量には、各凝集体につきＣｒｘ陽性細胞が観察される箇所をキーエンス倒立顕微鏡（ＢＺ－Ｘ７１０）２０倍レンズで撮像した画像から、４００×４００ピクセルの大きさで切り出した画像を使用し、画像全体の陽性細胞数を比較した（図１４）。保存条件Ｆについては、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が多く見られたものの、これらの細胞が表層に存在せず、細胞凝集体の形態も大きく崩れていたため、調べなかった。その結果、保存条件Ｄ、Ｅで保存した細胞凝集体におけるＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞の数は、保存条件Ａと比べて多かった。一方で、保存条件Ｃで保存した細胞凝集体におけるＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞の数は、保存条件Ａとほぼ同等であった。また、保存条件Ｂで保存した細胞凝集体におけるＣｒｘ陽性の視細胞前駆細胞の数は、保存条件Ａと比べて少なかった。

【０２２６】

これらの結果から、保存条件Ｄ、Ｅすなわち保存温度１７、２２℃で保存した細胞凝集体において、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。また、保存条件Ｃすなわち保存温度１２℃で保存した細胞凝集体においては、１７、２２℃と比べてほぼ同等の頻度で連続上皮構造が観察されるものの、視細胞前駆細胞の数が１７、２２℃と比べて少ないことがわかった。また、保存条件Ｂすなわち保存温度４℃で保存した細胞凝集体においては、連続上皮構造が観察される頻度が少なかった。

保存条件Ｆすなわち保存温度が３７℃の条件では、連続上皮構造のみならず、細胞凝集体自体が崩れてしまう傾向があることがわかった。すなわち、神経組織の保存温度としては、１７～２２℃が最も好ましく、保存温度１２℃も好ましいことがわかった。

【０２２７】

実施例８：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を用いた、カリウムイオン濃度の検討例

前述のＵＷ液は、膵島等内胚葉組織の臓器移植のために実際に臨床で使われている保存液であり、移植治療の業界ではゴールデンスタンダードとされている。一方で、実施例２の結果から、ＵＷ液が神経組織の保存に不適であることが示唆された。ＵＷ液は、塩化カリウム（ＫＣｌ）濃度が１２０ｍＭと、他の保存液よりも高いことが知られている（表６）。そこで、保存液として好ましい条件がなにかを調べる目的で、塩化カリウムが保存に与える影響を調べた。

【０２２８】

ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例４記載の方法で、フィーダーフリー培養し、Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理し、分化誘導し、ＣＨＩＲ９９０２１及びＳＵ５４０２を作用させ、「浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体」を作製した。

【０２２９】

得られた浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体を、実施例２記載の血清培地［１］、［２］及び［３］を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後９９日目まで培養した。浮遊培養開始後９９日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。

【０２３０】

得られた浮遊培養開始後９９日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０２３１】

検討した保存液は、以下の２点であった。

・オプチゾール（実施例１記載）

・高濃度カリウムイオンを含有したオプチゾール（オプチゾールに、塩化カリウムをカリウムイオン終濃度が１２０ｍＭになるよう加えたもの。）

【０２３２】

検討した保存温度は、いずれも１７℃（インキュベーター、５％CO_2、アステック社製）であった。

【０２３３】

検討した保存容器は、いずれも６０ｍｍ低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）であった。

【０２３４】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ、Ｂであった。

・保存条件Ａ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｂ．保存液が高濃度カリウムイオンを含有したオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

【０２３５】

上記浮遊培養開始後９９日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ及びＢで、１２０時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥＴｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１５、上段）。

【０２３６】

その結果、保存条件Ａの保存直後の細胞凝集体では、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が維持された。一方で、保存条件Ｂでは、立体組織の形態が保持される細胞凝集体はあったものの、表層の形態が崩れた凝集体が多かった。

【０２３７】

次に、保存条件Ａ、Ｂにて保存後の細胞凝集体を、実施例２記載のＢ培地中で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６Ｕ底プレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０２３８】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１５、中段）。

【０２３９】

その結果、保存条件Ａの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮が高い頻度で観察された。一方で、保存条件Ｂでは、一部の細胞凝集体で立体網膜の構造が崩れる傾向があった。

【０２４０】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）について免疫染色を行った。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図１５、下段）。そして、実施例６記載の方法で、細胞凝集体が神経網膜組織の連続上皮構造を形成しているかを調べた。

【０２４１】

その結果、保存条件Ａの回復培養後の細胞凝集体では、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。一方で、保存条件Ｂの回復培養後の細胞凝集体では、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞がほとんど観察されず、それらが層状に存在する様子が見られなかった。

【０２４２】

これらの結果から、カリウムイオン濃度がＵＷ液と同等の１２０ｍＭである保存液中では、立体網膜の形態が崩れ、視細胞前駆細胞を死滅することがわかった。すなわち、神経組織の保存液としては、カリウムイオン濃度が１２０ｍＭより低いことが重要であることが実証できた。

【０２４３】

実施例９：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体の保存例

ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株、京都大学より入手）を、実施例４記載の方法で、フィーダーフリー培養し、Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理し、分化誘導し、ＣＨＩＲ９９０２１及びＳＵ５４０２を作用させ、「浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体」を作製した。

【０２４４】

得られた浮遊培養開始後２５日目の細胞凝集体を、実施例２記載の血清培地［１］、［２］及び［３］を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後９９日目まで培養した。浮遊培養開始後９９日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。

【０２４５】

得られた浮遊培養開始後９９日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０２４６】

検討した保存液は、以下の２点であった（各保存液の組成は、表７に記載）。

・ＤＭＥＭ，ｎｏ　ｇｌｕｃｏｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）

・ＤＭＥＭ，ｎｏ　ｇｌｕｃｏｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に、終濃度が１ｍＭになるようピルビン酸ナトリウム溶液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を加えたもの

【表７】

表７　ＤＭＥＭ，ｎｏ　ｇｌｕｃｏｓｅの成分表

無機塩類(濃度)	(mg/L)	(mM)
塩化カルシウム($CaCl_2$)（無水和物）	200	1.80
硝酸鉄 $Fe(NO_3)_3\ 9H_2O$	0.100	0.000248
硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）（無水和物）	97.7	0.814
塩化カリウム（KCl）	400	5.33
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）	3700	44.0
塩化ナトリウム（NaCl）	6400	110
リン酸二水素ナトリウム（$NaH_2PO_4\ H_2O$）	125	0.906

上記以外に含有される成分

フェノールレッド、アミノ酸、ビタミン類

（Thermo Fisher Scientific 社ウェブページより抜粋:
https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.49.html）

【０２４７】

検討した保存温度は、いずれも１７℃（インキュベーター、５％CO_2、アステック社製）であった。

【０２４８】

検討した保存容器は、いずれも６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）であった。

【０２４９】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ、Ｂであった。

・保存条件Ａ．保存液がＤＭＥＭ，ｎｏ　ｇｌｕｃｏｓｅ、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

・保存条件Ｂ．保存液がＤＭＥＭ，ｎｏ　ｇｌｕｃｏｓｅに、終濃度が１ｍＭになるようピルビン酸ナトリウム溶液を加えたもの、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

【０２５０】

上記浮遊培養開始後９９日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ、Ｂで１２０時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１６、上段）。

【０２５１】

その結果、保存条件Ａ、Ｂの保存直後の細胞凝集体は、共に、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。

【０２５２】

次に、保存条件Ａ、Ｂにて保存後の細胞凝集体を、実施例２記載のＢ培地中で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６Ｕ底プレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０２５３】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ　Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１６、中段）。

【０２５４】

その結果、保存条件Ａ、Ｂの回復培養後の細胞凝集体は、共に、層構造をもった連続上皮が高い頻度で観察された。

【０２５５】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）について免疫染色を行った。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図１６、下段）。そして、実施例６記載の方法で、細胞凝集体が神経網膜組織の連続上皮構造を形成しているかを調べた。

【０２５６】

その結果、保存条件Ａ、Ｂの回復培養後の細胞凝集体は、共に、層構造をもった連続上皮構造を持つ神経組織が、ほとんどの細胞凝集体で観察された。

【０２５７】

これらの結果から、細胞培養用培地であるＤＭＥＭ中においても、１７℃で保存すれば、網膜組織を、その形態及び表層の連続上皮構造を崩すことなく保存することができることが分かった。

【０２５８】

実施例１０：ヒトｉＰＳ細胞から作製した前中脳を含む細胞凝集体を用いた保存例

実施例１記載の方法で、ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株）を、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ， ４， ３５９４ （２０１４）に記載の方法に準じてフィーダーフリー培養した。フィーダーフリー培地としてはＳｔｅｍ Ｆｉｔ培地（ＡＫ０３；味の素社製）、フィーダーフリー足場にはＬａｍｉｎｉｎ５１１－Ｅ８（ニッピ社製）を用いた。

【０２５９】

分化誘導操作としては、ヒトｉＰＳ細胞（１２３１Ａ３株）を、ＳｔｅｍＦｉｔ培地を用いて、サブコンフレント１日前（培養面積の５割が細胞に覆われる程度）になるまでフィーダーフリー培養した。当該サブコンフレント１日前のヒトｉＰＳ細胞を、ＳＢ４３１５４２（５μＭ）及びＳＡＧ（３００ｎＭ）の存在下、１日間フィーダーフリー培養した（Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理）。

【０２６０】

Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理したヒトｉＰＳ細胞を、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて細胞分散液処理し、更にピペッティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトｉＰＳ細胞を非細胞接着性の９６穴培養プレート（スミロン スフェロイド Ｖ底プレートＰｒｉｍｅ Ｓｕｒｆａｃｅ ９６Ｖ底プレート，住友ベークライト社）の１ウェルあたり１．０×10^4細胞になるように１００μｌの無血清培地に浮遊させ、３７℃、５％CO_2で浮遊培養した。その際の、無血清培地（ＧＭＥＭ＋ＫＳＲ）には、ＧＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に２０％ＫＳＲ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、０．１ｍＭ ２－メルカプトエタノール、１ｘ非必須アミノ酸（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、及び１ｍＭピルビン酸（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を添加した無血清培地を用いた。

【０２６１】

浮遊培養開始時（浮遊培養開始後０日目）に、上記無血清培地に、Ｗｎｔシグナル伝達経路阻害物質（ＩＷＲ－１－ｅｎｄｏ、３μＭ）、ＴＧＦβＲ阻害剤（ＳＢ４３１５４２、５μＭ）、及びＹ２７６３２（２０μＭ）を上記無血清培地に加えて培養した。

【０２６２】

浮遊培養開始後４日目に、Ｙ２７６３２を含まず、Ｗｎｔシグナル伝達経路阻害物質（ＩＷＲ－１－ｅｎｄｏ、３μＭ）及びＴＧＦβＲ阻害剤（ＳＢ４３１５４２、５μＭ）を含む無血清培地を８０μｌ加え、培地量は合計１８０μｌとした。その後、浮遊培養開始後１７日目まで、２～４日に一回、Ｙ２７６３２を含まず、Ｗｎｔシグナル伝達経路阻害物質（ＩＷＲ－１－ｅｎｄｏ、３μＭ）及びＴＧＦβＲ阻害剤（ＳＢ４３１５４２、５μＭ）を含む上記無血清培地にて半量培地交換した。

【０２６３】

このようにして得られた浮遊培養開始後１７日目の細胞凝集体を、１％Ｎ２ ｓｕｐｐ

ｌｅｍｅｎｔ及び１％ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地）を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後４５日目まで培養した。浮遊培養開始後４５日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経上皮組織を含んでいた。

【０２６４】

得られた浮遊培養開始後４５日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０２６５】

検討した保存液は、以下の４点であった（各保存液の組成は、上記記載のとおり）。

・１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ及び１％ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地）
・オプチゾール（実施例１記載）
・ＨＢＳＳ（実施例１記載）
・ＵＷ液（実施例２記載）

【０２６６】

検討した保存温度は、下記の２点であった。

・３７℃：インキュベーター、５％CO_2、パナソニック社製
・１７℃：インキュベーター、５％CO_2、アステック社製

【０２６７】

検討した保存容器は、いずれも６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）であった。

【０２６８】

具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ～Ｄであった。

・保存条件Ａ（通常の培養条件）．保存液が１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ及び１％ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地）、保存温度が３７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｂ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｃ．保存液がＨＢＳＳ、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｄ．保存液がＵＷ液、保存温度が１７℃、保存容器が低接着プレート（５％CO_2）

【０２６９】

上記浮遊培養開始後４５日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ～Ｄで７２時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１７、上段）。保存直後はどの保存条件の細胞凝集体においても神経上皮組織が観察された。

【０２７０】

次に、保存条件Ａ～Ｄにて保存後の細胞凝集体を、１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ及び１％ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地）で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ ９６Ｕ底プレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件下で、浮遊培養を行った（回復培養）。

【０２７１】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ニコン社製、ＥＣＬＩＰＳＥ Ｔｉ）で明視野像（位相差像）を観察した（図１７、中段）。

【０２７２】

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）、及び保存条件Ｂ、Ｃの回復培養後の細胞凝

集体では、一部の細胞凝集体で神経上皮組織が観察された。一方で、保存条件Ｄの回復培養後の細胞凝集体では、神経上皮組織を有する細胞凝集体は全く見られなかった。

【０２７３】

得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、網膜組織マーカーの１つであるＲｘ（抗Ｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社製、モルモット）と前脳及び又は中脳のマーカーの１つであるＯｔｘ２（抗Ｏｔｘ２抗体、Ａｂｃａｍ社製、ウサギ）について免疫染色を行った。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図１７、下段）。そして、Ｒｘが陰性で、かつＯｔｘ２が陽性の、網膜組織を含まず、前脳組織及び又は中脳組織からなる管腔構造（神経ロゼット）の有無を調べた。

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）、及び保存条件Ｂ、Ｃの回復培養後の細胞凝集体では、一部の細胞凝集体で上記管腔構造が観察された。一方で、保存条件Ｄの回復培養後の細胞凝集体では、上記管腔構造を有する細胞凝集体は全く見られなかった。

【０２７４】

網膜組織を含まず、前脳及び／又は中脳組織からなる管腔構造を有する細胞凝集体の数を調べた（図１８）。

その結果、保存条件Ａ（通常の培養条件）の回復培養後の細胞凝集体では、６つの細胞凝集体のうち４つの細胞凝集体で上記管腔構造が見られた。保存条件Ｂの回復培養後の細胞凝集体では、６つの細胞凝集体のうち２つの細胞凝集体で上記管腔構造が見られ、保存条件Ｃの回復培養後の細胞凝集体では、６つの細胞凝集体のうち３つの細胞凝集体で上記管腔構造が見られた。一方で、保存条件Ｄの回復培養後の細胞凝集体では、６つの細胞凝集体のうち上記管腔構造が見られた細胞凝集体は１つもなかった。

【０２７５】

これらの結果から、通常の培養条件と同じ保存条件Ａと比べて、保存温度が１７℃の保存条件Ｂ、Ｃでは、保存液としてオプチゾール又はＨＢＳＳを用いた条件で、前脳及び又は中脳組織からなる管腔構造をもつ細胞凝集体の形態を維持したまま、７２時間保存できることがわかった。

【０２７６】

一方で、ＵＷ液を用いた保存条件Ｄでは、上記管腔構造がほとんど維持されないことがわかった。

【０２７７】

この結果は、実施例２及びにおける神経網膜組織での保存結果とほぼ同様であった。

【０２７８】

以上の結果から、神経組織が、神経上皮構造として連続上皮構造をもつ神経網膜組織の場合でも、神経上皮構造として管腔構造をもつ前中脳組織の場合でも、保存温度が１７℃付近であれば、神経上皮構造を維持したまま保存できることがわかった。また、保存液の組成については、カリウムイオン濃度が１２０ｍＭであるＵＷ液は、前中脳組織を保存する場合でも不適であることがわかった。

【０２７９】

実施例１１：ヒトＥＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、保存した後、網膜変性ラットに移植した例

ヒトＥＳ細胞（ＫｈＥＳ１株、京都大学より入手、理研ＣＤＢにて使用）を、実施例２記載の方法で、フィーダーフリー培養し、Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理し、分化誘導し、ＣＨＩＲ９９０２１及びＳＵ５４０２を作用させ、浮遊培養開始後２１日目の細胞凝集体を作製した。

【０２８０】

得られた浮遊培養開始後２１日目の細胞凝集体を、実施例２記載の方法で、血清培地［１］、［２］及び［３］を用いて、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後８０日目まで培養した。

【０２８１】

得られた浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を用いて、以下の条件Ａ（保存なし），条件Ｂ（保存あり）で、細胞凝集体を調製した。
・条件Ａ（保存なし）。浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を、培地として上記Ｂ培地を用いて、３７℃で４８時間、５％CO_2で培養した。
・条件Ｂ（保存あり）。浮遊培養開始後８０日目の細胞凝集体を、保存液としてオプチゾールを用いて、保存装置として１７℃インキュベーター（５％CO_2条件、アステック社製）を用いて、１７℃で４８時間保存、５％CO_2で培養した。

【０２８２】

検討した保存容器は、いずれも６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）であった。

【０２８３】

条件Ａ（保存なし）及び条件Ｂ（保存あり）の細胞凝集体を、公知文献（Ｓｈｉｒａｉ ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ １１３，Ｅ８１－Ｅ９０）に記載の方法で注射器を用いて視細胞変性モデルである網膜変性ヌードラット（ＳＤ－Ｆｏｘｎ１ Ｔｇ（Ｓ３３４ｔｅｒ）３Ｌ ａｖＲｒｒｃ ｎｕｄｅ ｒａｔ）の網膜下へ移植した。

【０２８４】

浮遊培養開始後２４０日相当齢の眼組織をパラホルムアルデヒド固定（ＰＦＡ固定）してスクロース置換した。固定された眼組織を、クライオスタットを用いて凍結切片を作製した。これらの凍結切片を、桿体視細胞のマーカーの１つであるＲｈｏｄｏｐｓｉｎ（抗ＲｅｔＰ１抗体、Ｓｉｇｍａ社、マウス）、錐体視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＳ＋Ｍ＋Ｌ ｏｐｓｉｎ（抗Ｓ＋Ｍ＋Ｌ ｏｐｓｉｎ抗体、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社、ウサギ）について免疫染色を行った。Ｃｒｘの発現は、Ｃｒｘ：：Ｖｅｎｕｓの蛍光像で観察した。免疫染色した凍結切片を、共焦点レーザー顕微鏡（商品名：ＴＣＳ ＳＰ８、ライカ社製）を用いて蛍光観察を行った（図１９）。

【０２８５】

まず、当該ラットでは、移植した細胞凝集体由来ヒト細胞が存在していない領域では、視細胞はほとんど全く観察されなかった。条件Ａ（保存なし）の細胞凝集体を移植したラットの網膜では、Ｒｈｏｄｏｐｓｉｎ陽性の桿体視細胞及びＳ＋Ｍ＋Ｌ ｏｐｓｉｎ陽性の錐体視細胞がロゼット構造を形成して生着し、成熟化していることが観察された。そして、条件Ｂ（保存あり）の細胞凝集体を移植した移植したラットの網膜でも、Ｒｈｏｄｏｐｓｉｎ陽性の桿体視細胞及びＳ＋Ｍ＋Ｌ ｏｐｓｉｎ陽性の錐体視細胞がロゼット構造を形成して生着し、成熟化していることが観察された。さらに広い領域を顕微鏡検査したところ、条件Ａ（保存なし）でも条件Ｂ（保存あり）ほとんど同じ頻度で視細胞ロゼットが生着し、成熟化していたことがわかった。

【０２８６】

これらの結果から、保存した網膜組織を移植した場合でも、保存していない網膜組織と実質的に差がない水準で、生着し、成熟化することがわかった。すなわち、本願で発明した方法を用いれば、移植に適した神経組織を保存できることを実証できた。

【０２８７】

実施例１２：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞塊におけるコンドロイチン硫酸濃度の検討

ヒトｉＰＳ細胞（ＴＦＨ－ＨＡ株、大日本住友製薬にて樹立）は、市販されているセンダイウイルスベクター（Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、ＫＬＦ４、ｃ－Ｍｙｃの４因子、ＩＤ Ｐｈａｒｍａ社製サイトチューンキット）を用いて、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社の公開プロトコル（ｉＰＳ ２．０ Ｓｅｎｄａｉ Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ Ｋｉｔ， Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ ＭＡＮ０００９３７８， Ｒｅｖｉｓｉｏｎ １．０）、及び、京都大学の公開プロトコル（フィーダーフリーでのヒトｉＰＳ細胞の樹立・維持培養、ＣｉＲＡ＿Ｆｆ－ｉＰＳＣ＿ｐｒｏｔｏｃｏｌ＿ＪＰ＿ｖ１４０３１０、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｉｒａ．ｋｙｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ｊ／ｒｅｓｅａｒｃｈ／ｐｒｏｔｏｃｏｌ．ｈｔｍｌ）記載の方法を基に、ＳｔｅｍＦｉｔ

培地（ＡＫ０３；味の素社製）、Ｌａｍｉｎｉｎ５１１－Ｅ８（ニッピ社製）を用いて樹立した。

【０２８８】

当該ヒトｉＰＳ細胞（ＴＦＨ－ＨＡ株）を、実施例１記載の方法で、ＳｔｅｍＦｉｔ培地にて、サブコンフレント１日前になるまでフィーダーフリー条件下で培養した。当該サブコンフレント１日前のヒトｉＰＳ細胞（ＴＦＨ－ＨＡ株）を、ＳＢ４３１５４２（５μＭ）及びＳＡＧ（３００ｎＭ）の存在下、１日間フィーダーフリー培養した（Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理）。

【０２８９】

Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理したヒトｉＰＳ細胞を、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて細胞分散液処理し、更にピペッティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトｉＰＳ細胞を非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ ９６Ｖ底プレート、住友ベークライト社製）の１ウェルあたり１．３ ｘ １０^{4}細胞になるように１００μｌの無血清培地に浮遊させ、３７℃、５％ＣＯ２で浮遊培養した。その際の無血清培地（ｇｆＣＤＭ＋ＫＳＲ）には、Ｆ－１２培地とＩＭＤＭ培地の１：１混合液に１０％ＫＳＲ、４５０μＭ １－モノチオグリセロール、１×Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時（浮遊培養開始後０日目）に、無血清培地にＹ２７６３２（終濃度２０μＭ）及びＳＡＧ（終濃度１０ｎＭ）を添加した。浮遊培養開始後３日目に、Ｙ２７６３２及びＳＡＧを含まず、ヒト組み換えＢＭＰ４（Ｒ＆Ｄ社製）を含む培地にて、外来性のヒト組み換えＢＭＰ４の終濃度が１．５ｎＭ（５５ｎｇ／ｍｌ）になるように新しい上記無血清培地を５０μｌ添加した。

【０２９０】

その４日後（浮遊培養開始７日後）に、Ｙ２７６３２、ヒト組み換えＢＭＰ４を含まない上記無血清培地にて培地交換した。培地交換の操作としては、培養器中の培地を６０μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を９０μｌ加える操作を実施し、培地量は合計１８０μｌとなるようにした。その後、２～４日に一回、Ｙ２７６３２及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まない上記無血清培地にて半量培地交換した。半量培地交換操作としては、培養器中の培地を体積の半分量即ち９０μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を９０μｌ加え、培地量は合計１８０μｌとした。

【０２９１】

このようにして得られた浮遊培養開始後１７日目の細胞塊を、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ）及びＳＵ５４０２（５μＭ）を含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔが添加された培地）で３日間即ち浮遊培養開始後２０日目まで培養した。

【０２９２】

得られた浮遊培養開始後２０日目の細胞凝集体を、下記の培養液については下記［１］、［２］及び［３］に示した血清培地を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後８４日目まで培養した。

［１］浮遊培養開始後２０日目から４０日目まで：Ａ培地。

［２］浮遊培養開始後４０日目から６０日目まで：Ａ培地とＢ培地を１：３の比率で混合した培地。

［３］浮遊培養開始後６０日目以降：Ｂ培地。

【０２９３】

得られた浮遊培養開始後８４日目の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（ＥＶＯＳ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で観察したところ、神経組織の連続上皮構造を含んでいた。浮遊培養開始後８４日目の細胞凝集体を用いて、保存条件の検討を行った。

【０２９４】

検討した保存液は以下の４種類であった（表４、８～９参照）。
・上記Ｂ培地
・オプチゾール（２．５％コンドロイチン硫酸含有）
・１％コンドロイチン硫酸含有培地（ＤＭＥＭ，ｌｏｗ ｇｌｕｃｏｓｅとディスコビスクとを３：１で混合した液。ＤＭＥＭ，ｌｏｗ ｇｌｕｃｏｓｅはＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｒｉｃ社製（型番：１１８８５－０８４）のものを、ディスコビスクは日本アルコン社製（販売名コード：１３１９８１８Ｑ１０２５）のものを、それぞれ使用した。）
・０．５％コンドロイチン硫酸含有培地（ＤＭＥＭ ｌｏｗ ｇｌｕｃｏｓｅとディスコビスクとを７：１で混合した液）

【表８】

表８ ＤＭＥＭ，ｌｏｗ ｇｌｕｃｏｓｅの成分表

無機塩類(濃度)	(mg/L)	(mM)
塩化カルシウム($CaCl_2$)（無水和物）	200	1.80
シュウ酸鉄 $Fe(NO_3)_3\ 9H_2O$	0.100	0.000248
硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）（無水和物）	97.7	0.814
塩化カリウム（KCl）	400	5.33
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）	3700	44.0
塩化ナトリウム（NaCl）	6400	110
リン酸二水素ナトリウム（$NaH_2PO_4\ H_2O$）	125	0.906

上記以外に含有される成分

フェノールレッド、D-グルコース、ピルビン酸ナトリウム

【表９】

表９ ディスコビスクの成分

	(mg/mL)
ヒアルロン酸ナトリウム	16.5
コンドロイチン硫酸エステルナトリウム	40

上記以外に含有される成分

リン酸二水素ナトリウム水和物（$NaH_2PO_4\ H_2O$）、無水リン酸一水素ナトリウム（Na_2HPO_4）、等張化剤、ｐＨ調整剤２成分

【０２９５】
検討した保存温度は、以下の２点であった。
・３７℃（インキュベーター、５％CO_2条件、パナソニック社製）
・１７℃（恒温槽、大気圧、密封条件、ワケンビーテック社製）

【０２９６】
検討した保存容器は、以下の２点であった。
・６０mm低接着プレート（低接着プレート、住友ベークライト社製）
・２．０mLクライオバイアル（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）

【０２９７】
具体的に検討したのは、下記の保存条件Ａ～Ｄであった。
・保存条件Ａ（通常の培養条件）．保存液がＢ培地、保存温度が３７℃（インキュベーター）、保存容器が６０mm低接着プレート（５％CO_2）
・保存条件Ｂ．保存液がオプチゾール、保存温度が１７℃（恒温槽）、保存容器が２．０

ｍＬクライオバイアル（大気圧で密封）
・保存条件Ｃ．保存液が１％コンドロイチン硫酸含有培地、保存温度が１７℃（恒温槽）、保存容器が２．０ｍｌクライオバイアル（大気圧で密封）
・保存条件Ｄ．保存液が０．５％コンドロイチン硫酸含有培地、保存温度が１７℃（恒温槽）、保存容器が２．０ｍｌクライオバイアル（大気圧で密封）
【０２９８】
上記浮遊培養開始後８４日目の細胞凝集体を用いて、以上の保存条件Ａ～Ｄで７２時間、保存した。保存直後の細胞凝集体を倒立顕微鏡（オリンパス社製、ＩＸ８３）で明視野像（位相差像）を観察した（図２０　上段）。その結果、どの保存条件においても、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。
【０２９９】
さらに回復培養処理として、保存条件Ａ～Ｄにて保存後の細胞凝集体を、Ｂ培地中で、非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ　９６スリットウェルプレート、住友ベークライト社製）を用いて、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2の条件で、浮遊培養を行った（回復培養）。
【０３００】
得られた回復培養後の細胞凝集体を、倒立顕微鏡（オリンパス社製、ＩＸ８３）で明視野像（位相差像）を観察した（図２０　上から２段目）。その結果、どの保存条件においても、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持され、神経上皮構造が観察された。
【０３０１】
得られた回復培養後の細胞凝集体を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、視細胞前駆細胞のマーカーの１つであるＣｒｘ（抗Ｃｒｘ抗体、Ｔａｋａｒａ社、ウサギ）及びＣｈｘ１０（抗Ｃｈｘ１０抗体、Ｅｘａｌｐｈａ社、ヒツジ）について免疫染色を行った。これらの染色された切片を、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した（図２０、下から２段目及び下段）。そして、実施例１記載の方法で、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に層状に存在し、神経網膜組織の連続上皮構造が存在するかを調べた。その結果、Ｃｒｘ陽性の視細胞前駆細胞が表層に層状に存在することがわかった（図２０、下から２段目）。さらに、Ｃｈｘ１０陽性細胞の神経網膜前駆細胞が表層のＣｒｘ陽性細胞層の内側に層状で存在することがわかった（図２０、下段）。これらの結果、どの保存条件においても、神経網膜組織の連続上皮構造が高い頻度で存在することがわかった。
【０３０２】
これらの結果から、どの保存条件においても、ほとんどの細胞凝集体で立体組織の形態が保持された。すなわち、コンドロイチン硫酸濃度が０．５～２．５％である液中で、立体網膜を低温保存できた。
【０３０３】
また、実施例１でＨＢＳＳを、実施例９でＤＭＥＭを用いて、それぞれ４８時間、１２０時間細胞凝集体を保存することができた。これらの溶液はコンドロイチン硫酸を含まないことから、立体網膜の形態を保持可能なコンドロイチン硫酸濃度は、０～２．５％であることが実証された。
【０３０４】
実施例１３：ヒトｉＰＳ細胞から作製した網膜組織を含む細胞凝集体を、保存した後、網膜変性ラットに移植した例
ヒトｉＰＳ細胞（ＤＳＰ－ＳＥ株、大日本住友製薬にて樹立）は、センダイウイルスベクター（Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、ＫＬＦ４、ｃ－Ｍｙｃの４因子、ＩＤＰｈａｒｍａ社製サイトチューンキット）を用いて、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社の公開プロトコル（ｉＰＳ　２．０　Ｓｅｎｄａｉ　Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ　Ｋｉｔ，　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｕｍｂｅｒ　ＭＡＮ０００９３７８，　Ｒｅｖｉｓｉｏｎ　１．０）、及び、京都大学の公開プロトコル（フィーダーフリーでのヒトｉＰＳ細胞の樹立・維持培養、ＣｉＲＡ＿Ｆｆ－ｉＰＳＣ＿ｐｒｏｔｏｃｏｌ＿ＪＰ＿ｖ１４０３１

０，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｉｒａ．ｋｙｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ｊ／ｒｅｓｅａｒｃｈ／ｐｒｏｔｏｃｏｌ．ｈｔｍｌ）記載の方法を基に、ＳｔｅｍＦｉｔ培地（ＡＫ０３Ｎ；味の素社製）、Ｌａｍｉｎｉｎ５１１－Ｅ８（ニッピ社製）を用いて樹立した。

【０３０５】

当該ヒトｉＰＳ細胞（ＤＳＰ－ＳＥ株）を、実施例１記載の方法で、ＳｔｅｍＦｉｔ培地にて、サブコンフレント１日前になるまでフィーダーフリー条件下で培養した。

【０３０６】

分化誘導操作としては、サブコンフレント１日前のヒトｉＰＳ細胞（ＤＳＰ－ＳＥ株）を、ＳＢ４３１５４２（５μＭ）及びＳＡＧ（３００ｎＭ）でさらに１日間フィーダーフリー培養した（Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理）。

【０３０７】

Ｐｒｅｃｏｎｄｉｔｉｏｎ処理したヒトｉＰＳ細胞を、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて細胞分散液処理し、更にピペッティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトｉＰＳ細胞を非細胞接着性の９６穴培養プレート（ＰｒｉｍｅＳｕｒｆａｃｅ ９６Ｖ底プレート、住友ベークライト社製）の１ウェルあたり１．３ ｘ １０^{4}細胞になるように１００μｌの無血清培地に浮遊させ、３７℃、５％ＣＯ２で浮遊培養した。その際の無血清培地（ｇｆＣＤＭ＋ＫＳＲ）には、Ｆ－１２培地とＩＭＤＭ培地の１：１混合液に１０％ＫＳＲ、４５０μＭ １－モノチオグリセロール、１×Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｌｉｐｉｄ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅを添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時（浮遊培養開始後０日目）に、無血清培地にＩＷＲ－１ｅ（終濃度３μＭ）、Ｙ２７６３２（終濃度２０μＭ）及びＳＡＧ（終濃度１０ｎＭ）を添加した。浮遊培養開始後３日目に、Ｙ２７６３２及びＳＡＧを含まず、ヒト組み換えＢＭＰ４（Ｒ＆Ｄ社製）及びＩＷＲ－１ｅ（終濃度３μＭ）を含む培地にて、外来性のヒト組み換えＢＭＰ４の終濃度が１．５ｎＭ（５５ｎｇ／ｍｌ）になるように新しい上記無血清培地を５０μｌ添加した。

【０３０８】

その３日後（浮遊培養開始６日後）に、Ｙ２７６３２、ＳＡＧ、ヒト組み換えＢＭＰ４、及びＩＷＲ－１ｅを含まない上記無血清培地にて培地交換した。培地交換の操作としては、外来性のＩＷＲ－１ｅの濃度が培地交換前に比べて１０％以下になるように、培養器中の培地を１００μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を１３０μｌ加える操作を実施した後に、さらに培養器中の培地を１３０μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を１３０μｌ加える操作を実施し、培地量は合計１８０μｌとなるようにした。その後、２～４日に一回、ＩＷＲ－１ｅ、Ｙ２７６３２、ＳＡＧ及びヒト組み換えＢＭＰ４を含まない上記無血清培地にて半量培地交換した。半量培地交換操作としては、培養器中の培地を体積の半分量即ち９０μｌ廃棄し、新しい上記無血清培地を９０μｌ加え、培地量は合計１８０μｌとした。

【０３０９】

このようにして得られた浮遊培養開始後１３日目の細胞塊を、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ）及びＳＵ５４０２（５μＭ）を含む無血清培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に、１％Ｎ２ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔが添加された培地）で３日間即ち浮遊培養開始後１６日目まで培養した。

【０３１０】

得られた浮遊培養開始後１６日目の細胞凝集体を、下記の培養液については下記［１］、［２］及び［３］に示した血清培地を使用し、５％CO_2条件下で、浮遊培養開始後８２日目まで培養した。

［１］浮遊培養開始後２１日目から４０日目まで：Ａ培地。

［２］浮遊培養開始後４０日目から６０日目まで：Ａ培地とＢ培地を１：３の比率で混合した培地。

［３］浮遊培養開始後６０日目以降：Ｂ培地。

【０３１１】

得られた浮遊培養開始後８２日目の細胞凝集体を用いて、保存液としてオプチゾールを用いて、保存装置として１７℃恒温槽（大気圧、密封条件、ワケンビーテック社製）を用いて、１７℃で９６時間保存した。

【０３１２】

検討した保存容器は、１．５ｍＬエッペンドルフチューブ（エッペンドルフ社製）であった。

【０３１３】

上記の細胞凝集体を、公知文献（Ｓｈｉｒａｉ ｅｔ ａｌ． ＰＮＡＳ １１３，Ｅ８１－Ｅ９０）記載の方法で注射器を用いて視細胞変性モデルである網膜変性ヌードラット（ＳＤ－Ｆｏｘｎ１ Ｔｇ（Ｓ３３４ｔｅｒ）３ＬａｖＲｒｒｃ ｎｕｄｅ ｒａｔ）の網膜下へ移植した。

【０３１４】

浮遊培養開始後２９４日相当齢の眼組織をパラホルムアルデヒド固定（ＰＦＡ固定）してスクロース置換した。固定された眼組織を、クライオスタットを用いて、凍結切片を作製した。これらの凍結切片を、桿体視細胞のマーカーの１つであるＲｈｏｄｏｐｓｉｎ（抗ＲｅｔＰ１抗体、Ｓｉｇｍａ社、マウス）、錐体視細胞のマーカーの１つであるｃｏｎｅ ａｒｒｅｓｔｉｎ（抗ｃｏｎｅ ａｒｒｅｓｔｉｎ抗体、Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ社、ヤギ）、視細胞外節のマーカーの１つであるＰＲＰＨ２（抗Ｐｅｒｉｐｈｅｒｉｎ－２抗体、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ社、ウサギ）、ヒト核のマーカーの１つであるｈｕｍａｎ ｎｕｃｌｅｉ（抗Ｋｕ８０抗体、Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ社、ヤギ）について免疫染色を行った。免疫染色した凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡（商品名：ＴＣＳ ＳＰ８、ライカ社製）を用いて蛍光観察を行った（図２１ Ａ－Ｅ）。

【０３１５】

まず、当該ラットでは、移植した細胞凝集体由来ヒト細胞が存在していない領域では、視細胞はほとんど全く観察されなかった。一方で、１７℃で９６時間保存した細胞凝集体を移植したラットの網膜で、Ｒｈｏｄｏｐｓｉｎ陽性の桿体視細胞がロゼット構造を形成して生着し、成熟化していることが観察された。さらにＣｏｎｅ ａｒｒｅｓｔｉｎ陽性の錐体視細胞及びＰＲＰＨ２陽性の視細胞外節も検出され、移植した網膜組織が生着し、成熟化することがわかった。

【０３１６】

これらの結果から、９６時間低温保存した網膜組織も移植後に生着し、成熟化することがわかった。すなわち、本願で発明した方法を用いれば、移植に適した神経組織を４日間保存できることを実証できた。

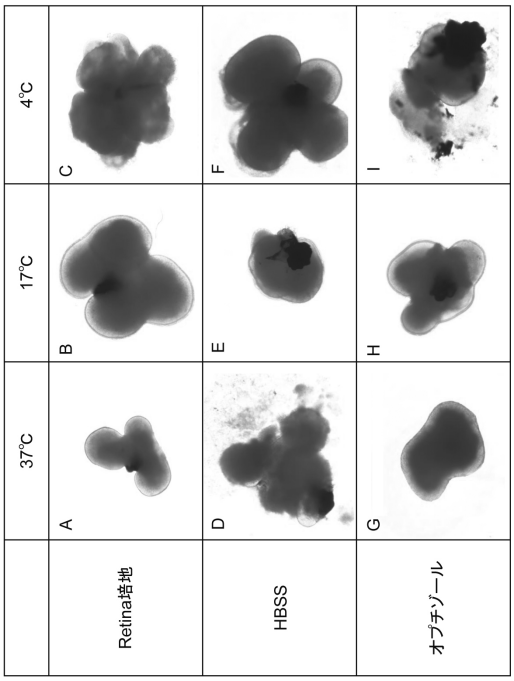
【産業上の利用可能性】

【０３１７】

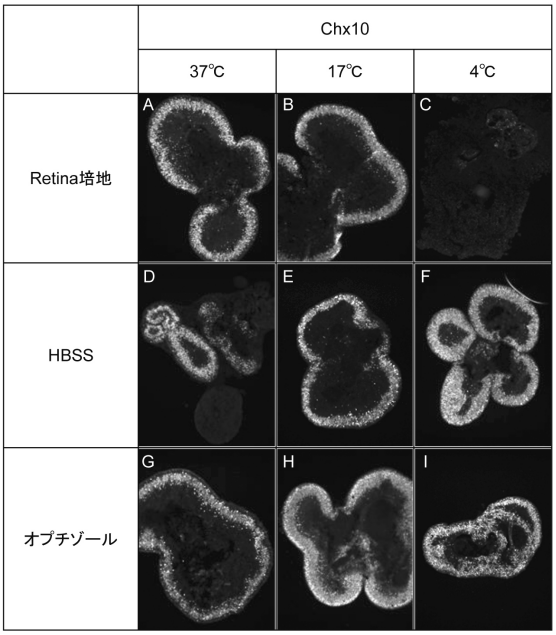
本発明によれば、生体から取り出した神経組織、及び多能性幹細胞から作製した神経組織を凍結せず２週間を超えない期間保存することが可能となる。それによって、移植治療による神経変性疾患の治療がより実現可能なものとなる。

【図面】

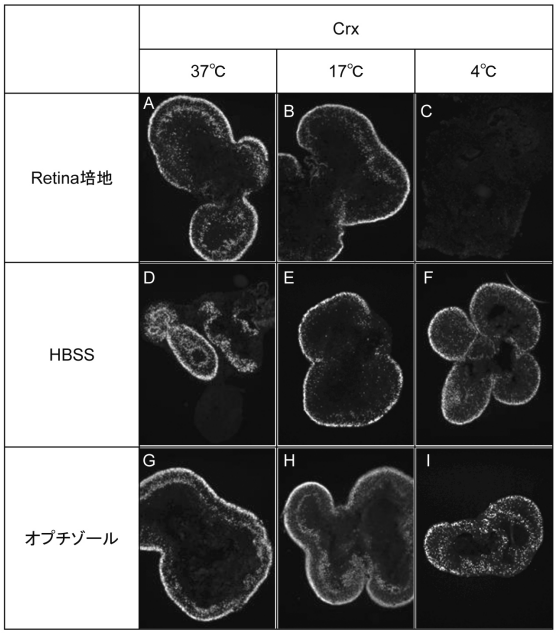
【図１】


4℃
17℃
37℃
C
F
I
B
E
H
A
D
G
Retina培地
HBSS
オプチゾール

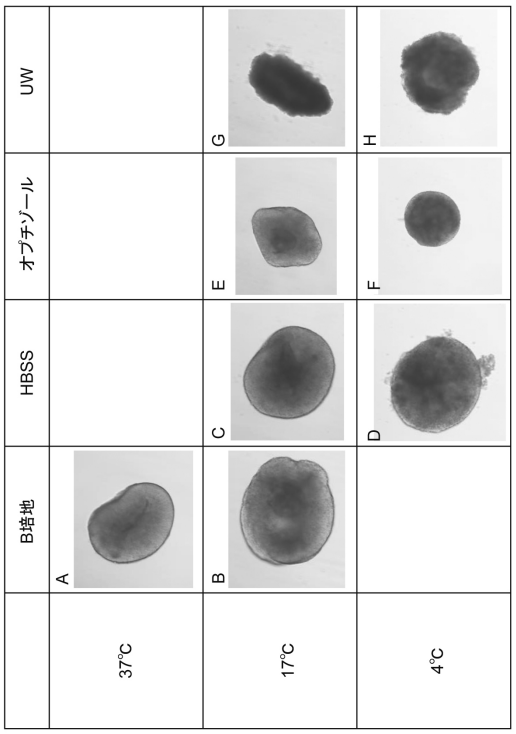
【図２】


Chx10
37℃
17℃
4℃
Retina培地
HBSS
オプチゾール
A
B
C
D
E
F
G
H
I

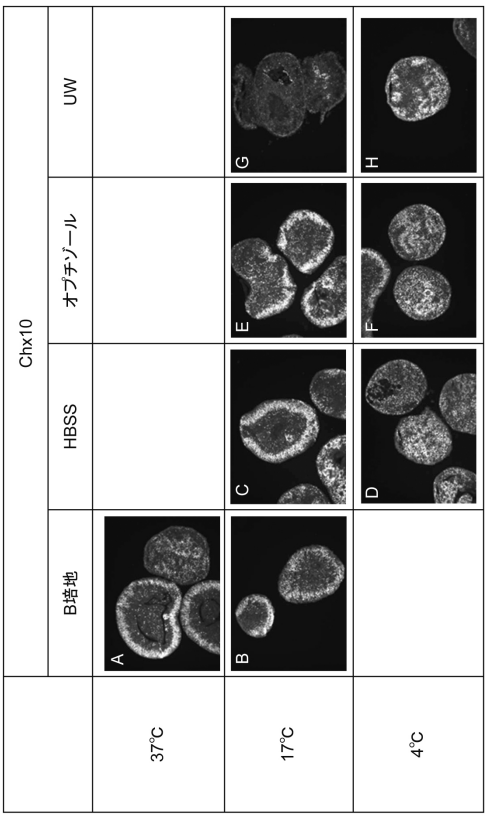
【図３】


Crx
37℃
17℃
4℃
Retina培地
HBSS
オプチゾール
A
B
C
D
E
F
G
H
I

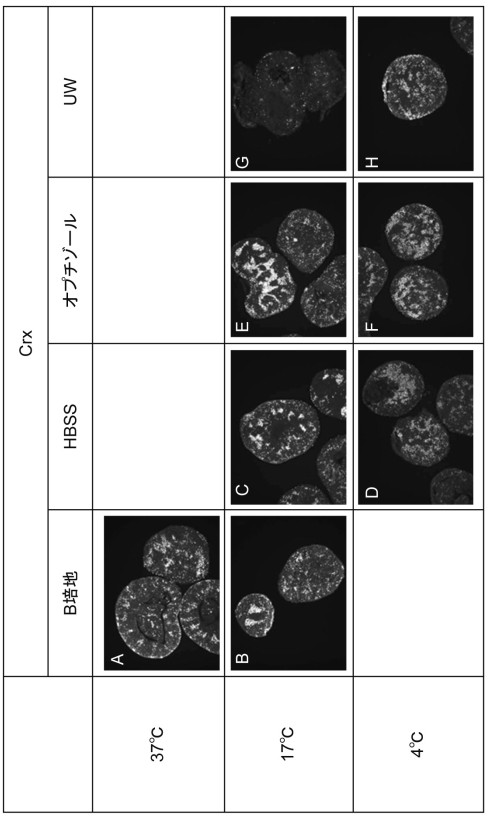
【図４】


UW
オプチゾール
HBSS
B培地
G
H
E
F
C
D
A
B
37℃
17℃
4℃

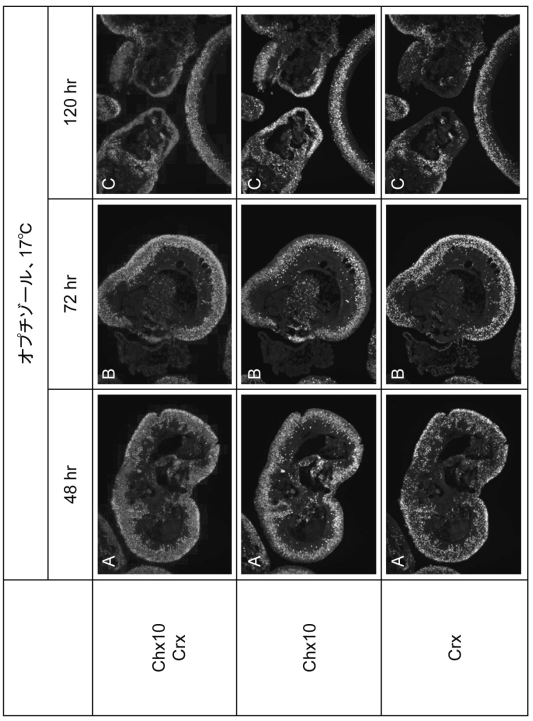
【図５】


Chx10
B培地
HBSS
オプチゾール
UW
37°C
17°C
4°C
A
B
C
D
E
F
G
H

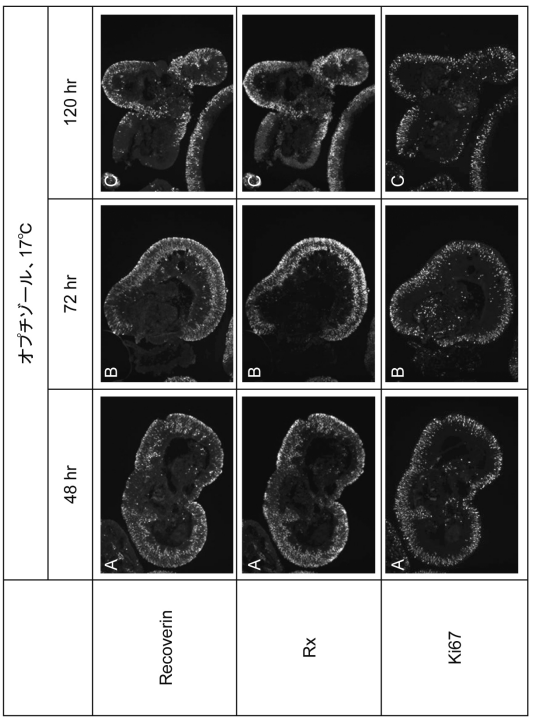
【図６】


Crx
B培地
HBSS
オプチゾール
UW
37°C
17°C
4°C
A
B
C
D
E
F
G
H

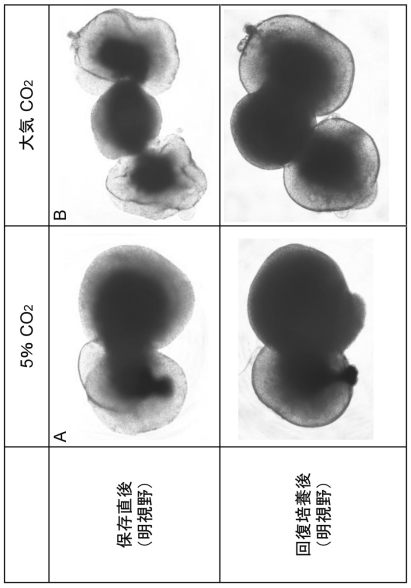
【図７】


オプチゾール、17°C
48 hr
72 hr
120 hr
Chx10
Crx
Chx10
Crx
A
B
C

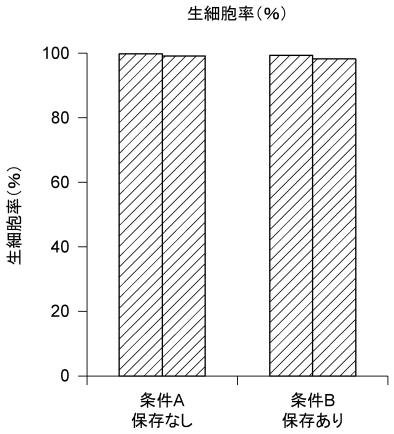
【図８】


オプチゾール、17°C
48 hr
72 hr
120 hr
Recoverin
Rx
Ki67
A
B
C

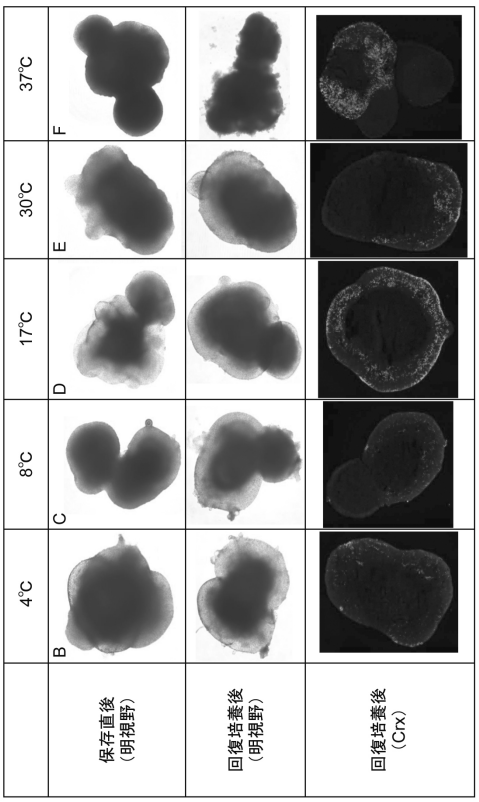
【図９】



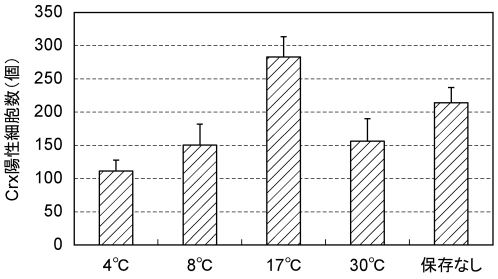
【図１０】



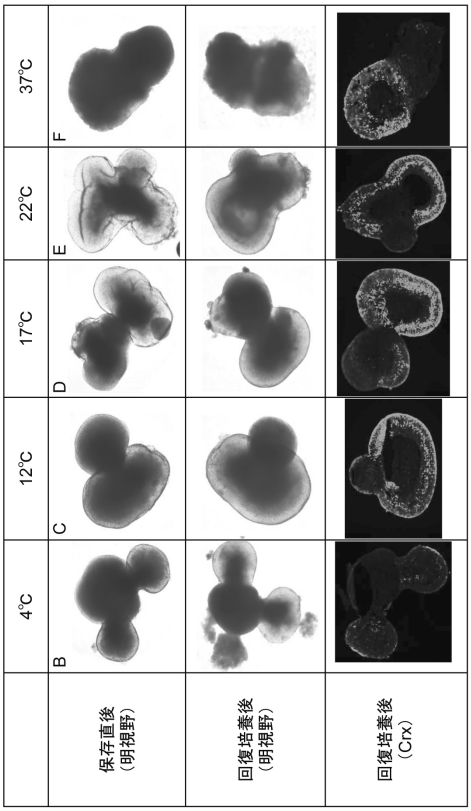
【図１１】



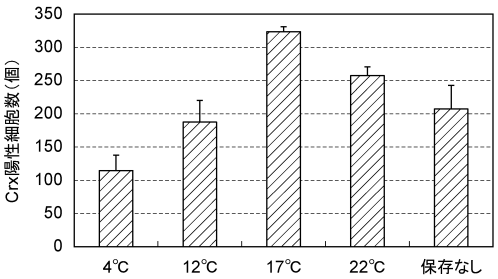
【図１２】



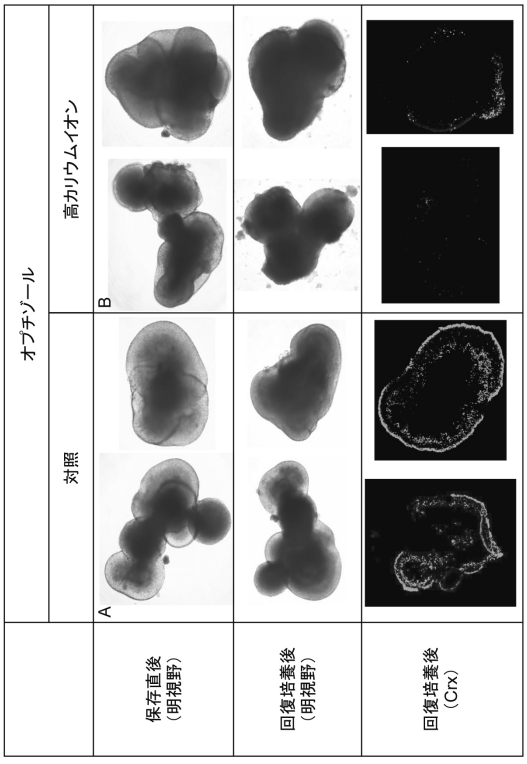
【図１３】



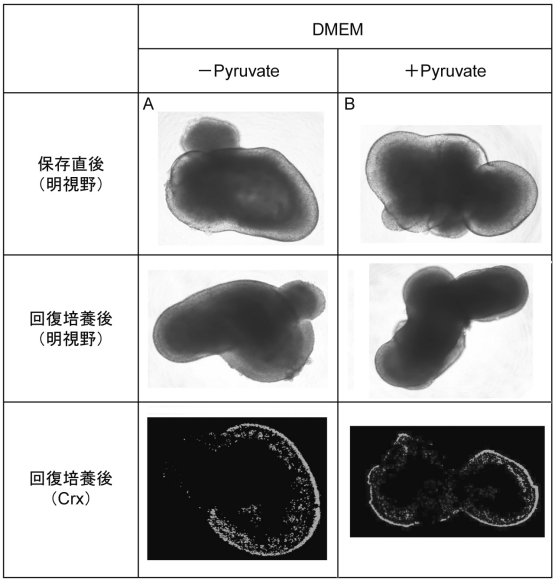
【図１４】



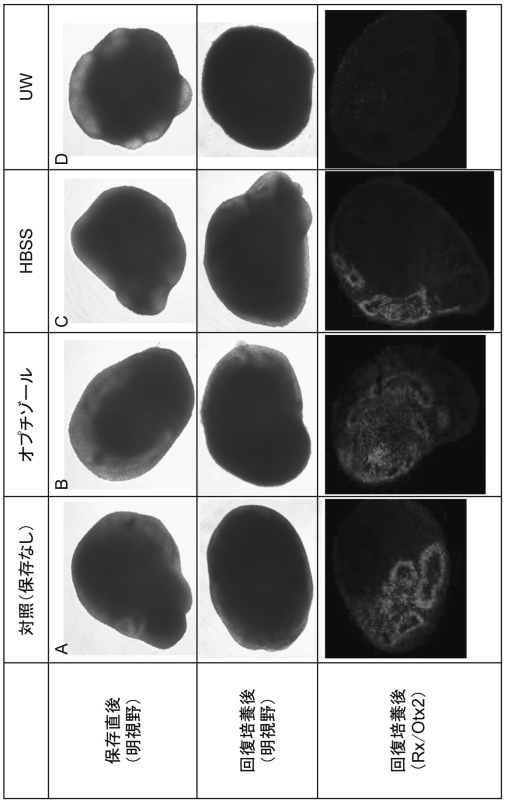
【図１５】



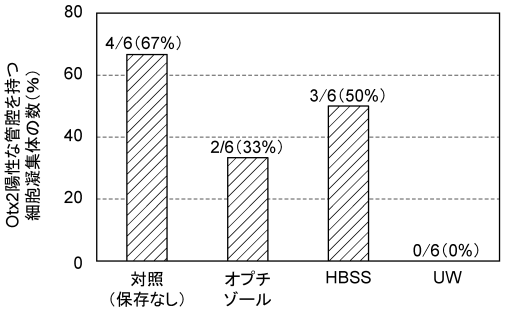
【図１６】



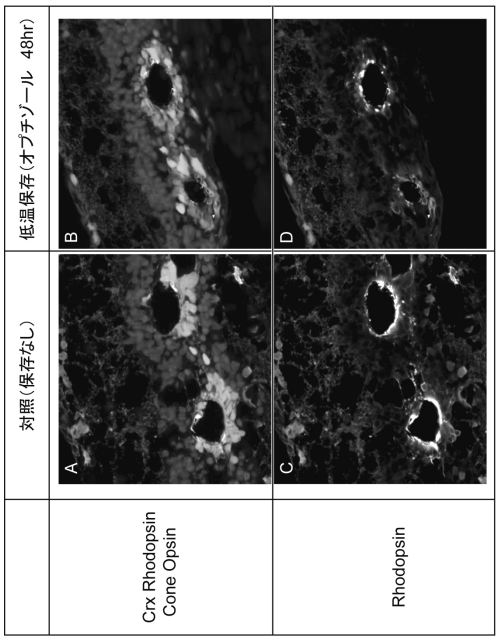
【図１７】



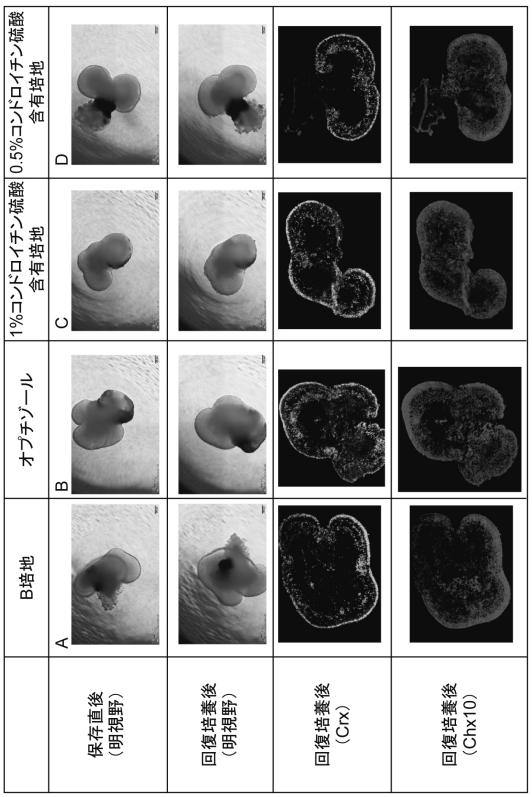
【図１８】



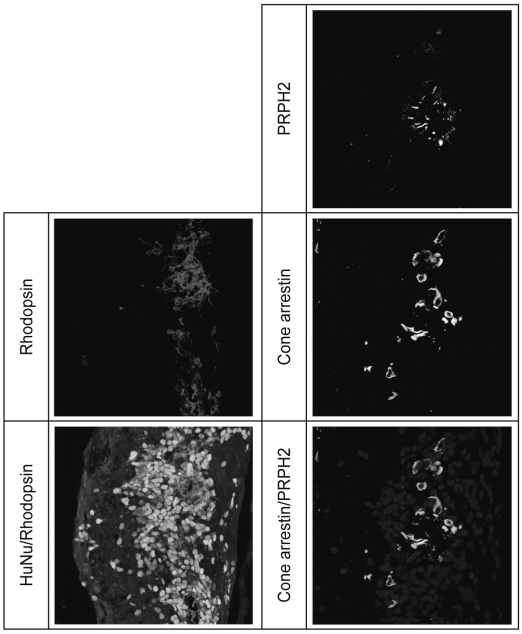
【図１９】



【図２０】



【図２１】


PRPH2
Rhodopsin
Cone arrestin
HuNu/Rhodopsin
Cone arrestin/PRPH2

フロントページの続き

早期審査対象出願

発法人理化学研究所内
(72)発明者　高橋 政代
埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開発法人理化学研究所内
(72)発明者　桑原 篤
兵庫県神戸市中央区港島南町１－５－２神戸キメックセンタービル５Ｆ 大日本住友製薬株式会社内
(72)発明者　渡 健治
兵庫県神戸市中央区港島南町１－５－２神戸キメックセンタービル５Ｆ 大日本住友製薬株式会社内
(72)発明者　松下 恵三
東京都中央区京橋一丁目１３番１号 大日本住友製薬株式会社内

審査官　山本 匡子

(56)参考文献
国際公開第２０１５／０２５９６７（WO，Ａ１）
特表２０１０－５２８９８３（ＪＰ，Ａ）
特開２０１２－１１６８２３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１７／１８３７３２（WO，Ａ１）
DILORETO JR. D., et al.，Cyclosporine Treatment Promotes Survival of Human Fetal Neural Retina Transplanted to the Subretinal Space of the Light-Damaged Fischer 344 Rat ，Experimental Neurology，1996年，Vo.140，p.37-42
TACHIBANA A., et al.，Development of Novel Corneal Storage Medium: First Report. Examinations of Rabbit Cornea，Jpn J Ophthalmol，2002年，Vol.46，p.377-383

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１／００－５／２８
Ｃ１２Ｑ
Ａ０１Ｎ
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＣＡＰＬＵＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）