



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I640629 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：103122257

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 27 日

(51)Int. Cl. : C12N5/02 (2006.01)

C12N5/0775 (2010.01)

C12N5/0783 (2010.01)

(30)優先權：2013/06/28 日本

2013-137454

(71)申請人：日商大塚製藥工場股份有限公司 (日本) OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC. (JP)

日本

(72)發明人：西村益浩 NISHIMURA, MASUHIRO (JP)；和田圭樹 WADA, TAMAKI (JP)；白川智景 SHIRAKAWA, CHIKAGE (JP)；土居雅子 DOI, MASAKO (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 201226568A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：9 共 56 頁

(54)名稱

含有海藻糖及聚葡糖之哺乳動物細胞移植用溶液

(57)摘要

本發明的課題在於提供一種使用可有效抑制在保存哺乳動物細胞時的細胞死亡之細胞移植用溶液來長時間保存哺乳動物細胞的方法，以及前述之細胞移植用溶液。

本發明的特徵在於，在含有 2.0~6.0(w/v)%之海藻糖或其衍生物或該等之鹽類(海藻糖類)與 4.0~7.0(w/v)%之聚葡糖或其衍生物或該等之鹽類(聚葡糖類)的細胞移植用生理性水溶液中保存哺乳動物細胞。藉由細胞移植用生理性水溶液中所含之海藻糖類與葡聚糖類的效果，能夠抑制在長時間(至少 14 天)保存哺乳動物細胞時的細胞生存率下降。作為上述生理性水溶液，以選自乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液所成群者為佳，特別是以乳酸林格氏液或生理食鹽水可作為適合的例示。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

含有海藻糖及聚葡糖之哺乳動物細胞移植用溶液

【技術領域】

[0001] 本發明係關於在含有 2.0~6.0(w/v)%之海藻糖或其衍生物或該等之鹽類(以下係亦稱為「海藻糖類」)，以及 4.0~7.0(w/v)%之聚葡糖或其衍生物或該等之鹽類(以下係稱為「聚葡糖類」)的細胞移植用生理性水溶液(以下亦稱為「本案細胞移植用溶液」)中的，哺乳動物細胞保存方法及本案移植用溶液，以及含有哺乳動物細胞、海藻糖類及聚葡糖類之含移植用細胞生理性水溶液(以下亦稱為「本案含移植用細胞液」)。

【先前技術】

[0002] 近年來，由於幹細胞研究的急速發展，再生醫療的聲勢日趨高漲，其知識與了解已不再僅限於研究者，亦廣泛地普及至一般大眾。使用幹細胞之再生醫療，係利用幹細胞所持有的自我複製能力及多分化能力、或幹細胞分泌的因子，用以回復各式各樣因疾病而損傷的細胞或組織之機能為目的之醫療。白血病及再生不良性貧血等血液難治之症患者進行骨髓移植後，造血系幹細胞著生於患者體內，將近一生都可維持造血功能之事成為可能。此

外，最近多數研究者以將造血細胞以外之幹細胞用於臨床應用為目標，對中樞神經、末梢神經、骨髓、小腸等之中的幹細胞進行鑑定，並開始針對外傷性疾病或組織性疾病實踐組織幹細胞的移植治療(非專利文獻 1~3)。另一方面，癌症免疫細胞療法係將具有攻擊癌細胞功能的免疫細胞取出體外，強化其功能之後，再放回體內的最先進細胞醫療技術，並已實踐樹狀細胞疫苗療法、阿法·貝他 T 細胞療法($\alpha\beta$ T 細胞療法)、加馬·德爾塔 T 細胞療法($\gamma\delta$ T 細胞療法)、CTL 療法、自然殺手細胞療法(NK 細胞療法)等使用了 T 細胞的療法。

[0003] 在長期保存用於移植治療之幹細胞及 T 細胞時，在液體中保存時無法良好地保持細胞生存率。例如已提出將人類骨髓幹細胞冷藏保存(4°C)於生理食鹽水中後，細胞生存率在 48 小時後下降至 40%以下，在 72 小時後下降至 20%以下的報告(非專利文獻 4)。因此，在長期保存移植用幹細胞及移植用 T 細胞時，凍結保存是很常見的。可是，因為凍結保存液中通常添加了 DMSO、甘油等凍結保存劑，在凍結保存的幹細胞及 T 細胞解凍之後，在進行移植治療前必須先去除移植凍結保存劑，耗費工時已成為一種問題。再者，即使在凍結保存液中添加了凍結保存劑，在凍結時水的結晶化對細胞骨骼的損傷巨大，降低了凍結融解後的細胞生存率亦成為一種問題。因此，簡便性優異，並且能抑制細胞生存率下降之細胞保存液的開發成為了當務之急。

[0004] 海藻糖 (trehalose) 係一種葡萄糖以 1,1-糖苷鍵結而成的雙糖，海藻糖因為呈現甘甜且有高度保水力，已被使用於各式各樣的食物及化妝品。此外，因為海藻糖能使得細胞膜安定化，且具有抑制細胞傷害的性質，已被使用於臟器移植時作為臟器保護液的有效成分。例如，ET-Kyoto 液及 New ET-Kyoto 液等含有海藻糖的優異臟器保存液已被開發出來(專利文獻 1 及 2、非專利文獻 5)。

[0005] 聚葡糖 (dextran) 係由葡萄糖組成之多糖類的一種，作為增黏劑、保濕劑等已廣泛用於醫療品、化妝品的領域。

[0006] 本發明者們已報告了將透過蛋白質分解酵素處理自細胞培養容器剝離的間葉系幹細胞，以含有海藻糖的生理性水溶液洗淨後，抑制間葉系幹細胞之細胞死亡之事(專利文獻 3)。因為透過蛋白質分解酵素處理的細胞在受到損傷後，會誘發細胞死亡(細胞凋亡等)的途徑，該海藻糖的效果被認為是基於抑制細胞凋亡途徑，或者促進細胞損傷的修復機能。此外，本發明者們已報告了若於間葉系幹細胞的懸浮液中添加海藻糖或聚葡糖等糖類，可抑制短時間(30 分鐘~6 小時)保存時的間葉系幹細胞凝集及生存率下降(專利文獻 4)。然而，藉由併用海藻糖與聚葡糖，是否能夠效果相乘地抑制間葉系幹細胞等哺乳動物細胞的細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例之事尚屬不明。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[0007]

[專利文獻 1]日本特許第 3253131 號公報

[專利文獻 2]國際公開第 2007/043698 號手冊

[專利文獻 3]國際公開第 2012/133575 號手冊

[專利文獻 4]日本特開 2012-115253 號公報

[非專利文獻]

[0008]

[非專利文獻 1]Gage, F.H. Science 287 : 1433-1438

(2000)

[非專利文獻 2]Morrison, S.J. et al., Cell 96 :
737-749 (1999)

[非專利文獻 3]Batle, E. et al., Cell 111 : 251-
263 (2002)

[非專利文獻 4]Lane, T.A. et al., Transfusion
49 : 1471-1481 (2009)

[非專利文獻 5]Chem, F. et al., Yonsei Med. J.
45 : 1107-1114 (2004)

【發明內容】

[發明所欲解決的課題]

[0009] 本發明之課題係提供一種使用能有效地抑制在保存哺乳動物細胞時的細胞死亡之細胞移植用溶液，長

期保存哺乳動物細胞的方法，以及前述細胞移植用溶液。

[解決課題之手段]

[0010] 本發明者們如同上述，已報告了若將間葉系幹細胞短時間地(30 分鐘~6 小時)保存於添加了海藻糖或聚葡糖等糖類的溶液中，可抑制細胞生存率下降(專利文獻 4)。但是，專利文獻 4 記載的發明中，並沒有闡明海藻糖與聚葡糖併用的相乘效果。在為了解決上述課題而專心致志地反覆研究之中，發現了若將人類骨髓間葉系幹細胞(hMSC-BM)及人類末梢血 T 細胞(hPBT)保存於添加海藻糖及聚葡糖到特定濃度(分別為 2.0~6.0[w/v]% 及 4.0~7.0[w/v]%)的溶液中，可長時間(至少 14 天)效果相乘地抑制細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例，使本發明臻至完成。

[0011] 亦即，本發明係關於：

(1) 一種方法，其係於包含 2.0~6.0(w/v)%之海藻糖或其衍生物或該等之鹽與 4.0~7.0(w/v)%之聚葡糖或其衍生物或該等之鹽的細胞移植用生理性水溶液中保存哺乳動物細胞之方法。

(2) 如上述(1)之方法，其中，生理性水溶液係選自乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液所成群。

(3) 如上述(1)或(2)之方法，其中，於細胞移植用生理性水溶液中保存哺乳動物細胞 3~14 日。

(4) 如上述(1)~(3)中任一項之方法，其中，哺乳動物細胞係哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物 T 細胞。

(5) 如上述(4)之方法，其中，哺乳動物間葉系幹細胞係人類骨髓間葉系幹細胞，哺乳動物 T 細胞係人類末梢血 T 細胞。

[0012] 再者，本發明係關於：

(6) 一種細胞移植用生理性水溶液，其特徵為包含 2.0~6.0(w/v)% 之海藻糖或其衍生物或該等之鹽與 4.0~7.0(w/v)% 之聚葡萄糖或其衍生物或該等之鹽

(7) 如上述(6)之細胞移植用生理性水溶液，其中，生理性水溶液係選自乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液所成群。

(8) 如上述(6)或(7)之細胞移植用生理性水溶液，其中，哺乳動物細胞係哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物 T 細胞。

(9) 如上述(8)之細胞移植用生理性水溶液，其中，哺乳動物間葉系幹細胞係人類骨髓間葉系幹細胞，哺乳動物 T 細胞係人類末梢血 T 細胞。

[0013] 再者，本發明係關於：

(10) 一種含移植用細胞生理性水溶液，其特徵為包含哺乳動物細胞、與 2.0~6.0(w/v)% 之海藻糖或其衍生物或該等之鹽及 4.0~7.0(w/v)% 之聚葡萄糖或其衍生物或該等之鹽。

(11) 如上述(10)之含移植用細胞生理性水溶液，其

中，生理性水溶液係選自乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液所成群上述(10)。

(12) 如上述(10)或(11)之含移植用細胞生理性水溶液，其中，哺乳動物細胞係哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物 T 細胞。

(13) 如上述(12)之含移植用細胞生理性水溶液，其中，哺乳動物間葉系幹細胞係人類骨髓間葉系幹細胞，哺乳動物 T 細胞係人類末梢血 T 細胞。

[0014] 作為本發明的其他實施型態，可舉出使用用以保存哺乳動物細胞之生理性水溶液與海藻糖或其衍生物或該等之鹽類及聚葡糖或其衍生物或該等之鹽類的組合，或用以調製哺乳動物細胞移植用溶液的生理性水溶液與海藻糖或其衍生物或該等之鹽類、及聚葡糖或其衍生物或該等之鹽類的組合。更詳細來說，上述海藻糖或其衍生物或該等之鹽類及聚葡糖或其衍生物或該等之鹽類，係抑制細胞生存率下降的有效成分。

[發明的效果]

[0015] 若透過本發明，因為能抑制在長時間(至少 14 天)保存含有間葉系幹細胞等幹細胞或 T 細胞等白血球之細胞懸浮液時細胞生存率的下降，故使得再生醫療或癌症治療中優質移植用細胞懸浮液，不僅是細胞懸浮液的製造地區及其周邊地區，還可提供到較遠地區。此外，在醫藥品出貨時的品質保證檢查中有一項無菌試驗，根據日本藥

典，無菌檢查需要 14 天的工期，但即使製造上述細胞懸浮液並進行該無菌檢查後，仍可提供優質的細胞懸浮液。

【圖式簡單說明】

[0016]

[圖 1]顯示了使用 11 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S、LR、「LR+1%D」、「LR+3%D」、「LR+5%D」、「LR+7%D」、「LR+3%T」、「LR+3%T+1%D」、「LR+3%T+3%D」、「LR+3%T+5%D」及「LR+3%T+7%D」液，參照實施例 1 的「1-1-1 細胞移植用溶液」)，將 hMSC-BM 保存 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。並且，顯示作為對照組的保存前之 Dulbecco's 磷酸鹽緩衝食鹽水(D-PBS[-])(以下簡稱為「PBS」)溶液中的細胞生存率(圖中橫軸的「P」)。

[圖 2]顯示了使用 11 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S、LR、「LR+1%D」、「LR+3%D」、「LR+5%D」、「LR+7%D」、「LR+3%T」、「LR+3%T+1%D」、「LR+3%T+3%D」、「LR+3%T+5%D」及「LR+3%T+7%D」液[分別為圖中橫軸的「2~12」]，參照實施例 1 的「1-1-1 細胞移植用溶液」)，將 hMSC-BM 保存 3 天、7 天及 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。並且，顯示作為對照組的保存前(0 天後)之 PBS 溶液中的細

胞生存率(圖中橫軸的「1」)。

[圖 3]顯示了使用 13 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S、LR、「LR+1%T」、「LR+3%T」、「LR+5%T」、「LR+7%T」、「LR+10%T」、「LR+5%D」、「LR+5%D+1%T」、「LR+5%D+3%T」、「LR+5%D+5%T」、「LR+5%D+7%T」及「LR+5%D+10%T」液, 參照實施例 2 的「2-1-1 細胞移植用溶液」), 將 hMSC-BM 保存 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。並且, 顯示作為對照組的保存前之 PBS 溶液中的細胞生存率(圖中橫軸的「P」)。

[圖 4]顯示了使用 11 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S、LR、「LR+1%T」、「LR+3%T」、「LR+5%T」、「LR+7%T」、「LR+5%D」、「LR+5%D+1%T」、「LR+5%D+3%T」、「LR+5%D+5%T」及「LR+5%D+7%T」液[分別為圖中橫軸的「2~12」], 參照實施例 2 的「2-1-1 細胞移植用溶液」), 將 hMSC-BM 保存 3 天、7 天及 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。並且, 顯示作為對照組的保存前(0 天後)之 PBS 溶液中的細胞生存率(圖中橫軸的「1」)。

[圖 5]顯示了使用 11 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S、LR、LRD、LRTD、「LRD+GL」、「LRD+SR」、「LRD+MN」、「LRD+LC」、「LRD+RF」、「LRD+ML」及「LRD+SC」液, 參照

實施例 3 的「3-1-1 細胞移植用溶液」)，將 hMSC-BM 保存 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。圖中「*」係表示針對 LRD 以 Dunnett 檢定所發現的統計性顯著差異(P<0.05)。

[圖 6]顯示了使用 11 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S、LR、LRT、LRTD、「LRT+GL」、「LRT+SR」、「LRT+MN」、「LRT+LC」、「LRT+RF」、「LRT+ML」及「LRT+SC」液，參照實施例 4 的「4-1-1 細胞移植用溶液」)，將 hMSC-BM 保存 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。圖中「*」係表示針對 LRT 以 Dunnett 檢定有統計性顯著差異(P<0.05)。

[圖 7]顯示了使用 11 種的哺乳動物細胞移植用溶液(S[大塚生理食鹽水注射液]、LR[Lactec 注射液]、LRD[5(w/v)% 含聚葡萄糖 Lactec 注射液]、LRT[3(w/v)% 含海藻糖 Lactec 注射液]、「LR+GL」[含葡萄糖 Lactec 注射液]、「LR+SR」[含山梨糖醇 Lactec 注射液]、「LR+MN」[含甘露醇 Lactec 注射液]、「LR+LC」[含乳糖 Lactec 注射液]、「LR+RF」[含棉子糖含 Lactec 注射液]、「LR+ML」[含麥芽糖 Lactec 注射液]及「LR+SC」[含蔗糖 Lactec 注射液]液)，將 hMSC-BM 保存 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、

[n=4])。圖中「***」係表示針對 LR 以 Dunnett 檢定有統計性顯著差異 ($P < 0.001$)。

[圖 8]顯示了使用 10 種的哺乳動物細胞移植用溶液 (LR、LRTD、S、STD、5%糖、5%糖 TD、林格、林格 TD、VEEN 及 VEENTD 液，參照實施例 5 的「5-1-1 細胞移植用溶液」)，將 hMSC-BM 保存 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=4])。並且，顯示作為對照組的保存前之 PBS 溶液中的細胞生存率(圖中橫軸的「P」)。

[圖 9]顯示了使用 5 種的哺乳動物細胞移植用溶液 (S、LR、LRT、LRD 及 LRTD)，將 hPBT 保存 1 天、3 天、7 天及 14 天時之細胞生存率的解析結果圖。縱軸係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差、[n=6])。並且，顯示作為對照組的保存前(0 天後)之 PBS 溶液中的細胞生存率(圖中橫軸的「P」)。

【實施方式】

[0017] 本發明之保存哺乳動物細胞的方法，係在被限定於所謂「用以細胞移植」的用途，且於含有 2.0~6.0(w/v)%之海藻糖類與 4.0~7.0(w/v)%之聚葡糖類的生理性水溶液(本案細胞移植用溶液)之中，保存哺乳動物細胞的方法。更具體地說，本案細胞移植用溶液係含有作

為抑制細胞生存率下降之活性成分的海藻糖類與聚葡糖類之溶液。本案細胞移植用溶液中保存的哺乳動物細胞密度，通常為 $10^3 \sim 10^{10}$ 個/ml 的範圍內。

[0018] 關於本案含移植用細胞液，係哺乳動物細胞被含於一般本案細胞移植用溶液之中。本案含移植用細胞液可藉由在本案細胞移植用溶液中添加哺乳動物細胞，或者藉由在含有哺乳動物細胞的生理性水溶液中添加海藻糖類至 2.0~6.0(w/v)%，並添加聚葡糖類至 4.0~7.0(w/v)% 來調製。

[0019] 作為本發明之哺乳動物，可以小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠等齧齒類，兔子等兔類，豬、牛、山羊、馬、綿羊等有蹄目，犬、貓等貓目，人、猴、恆河獼猴、食蟹猴、狨猿、紅毛猩猩、黑猩猩之類的靈長類等作為例證，其中又以小鼠、豬、人類可合適地作為例證。

[0020] 作為適用於本案細胞移植用溶液及本案含移植用細胞液的生理性水溶液，只要是以鈉或鈣等調整鹽濃度或糖濃度等成為與體液或細胞液的滲透壓幾乎相同之等張水溶液便無特別限制，具體上可舉出生理食鹽水或具有緩衝效果的生理食鹽水(磷酸緩衝生理食鹽水 [Phosphate buffered saline ; PBS]、Tris 緩衝生理食鹽水 [Tris Buffered Saline ; TBS]、HEPES 緩衝生理食鹽水等)、林格氏液、乳酸林格氏液、醋酸林格氏液、重碳酸林格氏液、5% 葡萄糖水溶液、動物細胞培養用基礎培養基 (DMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-

199 等)、等張劑(葡萄糖、D-山梨糖醇、D-甘露醇、乳糖、氯化鈉等),這些之中以從乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液組成的群組中所選擇的溶液為佳,特別是乳酸林格氏液或生理食鹽水可合適地作為例證。生理性水溶液不論是市售的還是自我調製的均可。作為市售的溶液,可舉出大塚生理食鹽注射液(大塚製藥工廠公司製)(生理食鹽液)、林格氏液「OTSUKA」(大塚製藥工廠公司製)(林格氏液)、LACTEC(註冊商標)注射液(大塚製藥工廠公司製)(乳酸林格氏液)、VEEN-F 輸液(興和興和創藥公司製)(醋酸林格氏液)、大塚糖液 5%(大塚製藥工廠公司製)(5%葡萄糖水溶液)、BICANATE 輸液(大塚製藥工廠公司製)(重碳酸林格氏液)。本說明書中所謂的「等張」,係指滲透壓在 250~380mOsm/l 的範圍內的意思。

[0021] 本案細胞移植用溶液或本案含移植用細胞液中,亦能應其需求適當補充安定劑(例如人類血清蛋白、聚乙二醇等)、緩衝劑、(例如磷酸鹽緩衝液、醋酸鈉緩衝液)、螯合劑(例如 EDTA、EGTA、檸檬酸、水楊酸)、胺基酸(例如麩醯胺、丙胺酸、天冬醯胺、絲胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸、脯胺酸、酪胺酸等的非必需胺基酸)、維他命類(例如氯化膽鹼、泛酸、葉酸、菸鹼醯胺、鹽酸吡哆醛、核黃素、鹽酸硫胺、抗壞血酸、生物素、肌醇等)、溶解輔助劑、保鮮劑、抗氧化劑等添加物。

[0022] 作為將哺乳動物細胞保存於本案細胞移植用

溶液中時的保存期間，只要是能抑制細胞生存率下降，並提高存活細胞比例的時間(期間)即可，例如是 12 小時以上、1 天以上、2 天以上、3 天以上、7 天以上。此外，由於哺乳動物細胞的保存期間太長的話，可能會對細胞的生存帶來不良影響，故從避免對細胞生存率之不良影響的觀點來看，通常是 21 天以下，較佳為 16 天以下，更佳為 14 天以下。因此，作為上述之保存期間，通常為 12 小時~21 天、1~21 天、2~21 天、3~21 天或 7~21 天；較佳為 12 小時~16 天、1~16 天、2~16 天、3~16 天或 7~16 天；更佳為 12 小時~14 天、1~14 天、2~14 天、3~14 天、或 7~14 天；最佳為 3~14 天。關於本案細胞移植用溶液中保存的哺乳動物細胞，其細胞死亡被抑制的狀況，可使用台盼藍(Trypan Blue)染色法、TUNEL 法、Nexin 法、FLICA 法等能夠檢出細胞死亡的周知方法來確認。

[0023] 將哺乳動物細胞保存於本案細胞移植用溶液中時的保存溫度，只要是不會使細胞移植用溶液凍結，並且能讓細胞生長的溫度即可，通常是 0~37℃，較佳為 0~25℃(室溫)的範圍內。

[0024] 作為上述海藻糖類之海藻糖，除了由 2 個 α -葡萄糖以 1,1-糖苷鍵結成的雙糖類 α,α -海藻糖以外，雖然還可舉出由 α -葡萄糖與 β -葡萄糖以 1,1-糖苷鍵結成的雙糖類 α,β -海藻糖，以及由 2 個 β -葡萄糖以 1,1-糖苷鍵結成的雙糖類 β,β -海藻糖，但此等之中還是以 α,α -海藻糖為佳。這些海藻糖雖能以化學合成、藉微生物生產、藉酵

素生產等任一種周知方法製造，但亦可使用市售品。例如可舉出 α,α -海藻糖(股份有限公司林原公司製)、 α,α -海藻糖(和光純藥公司製)等市售品。

[0025] 作為上述海藻糖類之海藻糖衍生物，只要是雙糖類的海藻糖和一個或複數個糖單位所鍵結成的糖苷基海藻糖類便無特別限制，糖苷基海藻糖類包含葡萄糖苷基海藻糖、麥芽糖基海藻糖及麥芽三糖基海藻糖等。

[0026] 作為上述海藻糖類之海藻糖及其衍生物的鹽類，可舉出例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽、丙酸鹽、甲苯磺酸鹽、琥珀酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、乙醇酸鹽、甲磺酸鹽、丁酸鹽、戊酸鹽、檸檬酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、蘋果酸鹽等的酸加成鹽，以及鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽等的金屬鹽，以及銨鹽、烷基銨鹽等。再者，此等鹽類在使用時是作為溶液使用，並以其作用與海藻糖同效者為佳。此等鹽類即使形成了水合物或溶劑合物亦可，並且可將任何鹽類以單獨 1 種或將 2 種以上適當地組合來使用。

[0027] 作為上述聚葡萄糖類之聚葡萄糖，只要是由 D-葡萄糖組成的多醣 $(C_6H_{10}O_5)_n$ ，並以 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 鍵結為主鏈者便無特別限制。作為聚葡萄糖的重量平均分子量(Mw)，可舉出例如聚葡萄糖 40 (Mw=40000)、聚葡萄糖 70 (Mw=70000) 等。此等聚葡萄糖雖能以化學合成、藉微生物生產、藉酵素生產等任一種周知方法製造，但亦可使用市售品。例如可舉出低分子聚葡萄糖 L 注射液(大塚製藥工廠公司製)、聚

葡糖 70(東京化成工業公司製)等市售品。

[0028] 作為上述聚葡糖類之聚葡糖衍生物，係包含了聚葡糖硫酸、羧化聚葡糖、二乙胺基乙基(DEAE)-聚葡糖等。

[0029] 作為上述聚葡糖類之聚葡糖及其衍生物的鹽，可舉出例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽、丙酸鹽、甲苯磺酸鹽、琥珀酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、乙醇酸鹽、甲磺酸鹽、丁酸鹽、戊酸鹽、檸檬酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、蘋果酸鹽等的酸加成鹽，以及鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽等的金屬鹽，以及銨鹽、烷基銨鹽等。再者，這些鹽類在使用時是作為溶液使用，並以其作用與聚葡糖同效者為佳。這些鹽類即使形成了水合物或溶劑合物亦可，並且可將任何鹽類以單獨 1 種或把 2 種以上適宜地組合來使用。

[0030] 作為本發明之哺乳動物細胞，除了對再生醫療等進行經由血管投予的哺乳動物幹細胞外，尚可以對 I 型糖尿病患者進行經靜脈投予的哺乳動物胰島細胞，以及對癌症患者進行靜脈投予的哺乳動物樹狀細胞、自然殺手(NK)細胞、阿法·貝他($\alpha\beta$)T 細胞、加馬·德爾塔($\gamma\delta$)T 細胞、細胞毒性 T 細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)、助手 T 細胞等的 T 細胞、巨噬細胞、嗜中性球、嗜酸性球等的白血球作為例示，較佳為 T 細胞。此等細胞可由周知的一般方法單離。例如白血球、T 細胞、助手 T 細胞、細胞毒性 T 細胞及 $\gamma\delta$ T 細胞的單離，可從已溶血處理的末梢血

或臍帶血樣品，藉由使用了針對白血球之細胞表面標誌物 (CD45)、T 細胞之細胞表面標誌物 (CD3)、助手 T 細胞之細胞表面標誌物 (CD4)、細胞毒性 T 細胞 (CD8)、 $\gamma\delta$ T 細胞之細胞表面標誌物 (CD39) 的抗體之螢光活性化細胞分選儀 (FACS)，以及使用了針對已用螢光物質、生物素及抗生物素蛋白等標記物質進行標記之上述細胞表面標誌物的抗體，和針對該標記物質的抗體與 MACS 珠 (磁珠) 之結合抗體的自動磁性細胞分離裝置 (autoMACS) 來執行。作為上述螢光物質，可舉出別藻藍蛋白 (APC)、藻紅蛋白 (PE)、FITC (fluorescein isothiocyanate)、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700、PE-Texas Red、PE-Cy5、PE-Cy7 等。

[0031] 此外上述所謂之「幹細胞」，係指擁有自我複製能力及分化、增值能力的未成熟細胞。相應於其分化能力，幹細胞包含多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)、複能性幹細胞 (multipotent stem cell)、單能性幹細胞 (unipotent stem cell) 等亞集團。所謂多能性幹細胞，係指雖不能自成個體，但有能力分化成為所有構成生體之組織及細胞的細胞。所謂複能性幹細胞，係指雖不是所有種類，但有能力分化成複數種類之組織及細胞的細胞。所謂單能性幹細胞，係指有能力分化成特定之組織及細胞的細胞。

[0032] 作為多能性幹細胞，可舉例胚性幹細胞 (ES 細胞)、EG 細胞、iPS 細胞等。ES 細胞可透過將內部細胞塊

在餵養細胞(feeder cell)上或於含有 LIF 的培養基中培養的方式製造。ES 細胞的製造方法，例如 WO96/22362、WO02/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718 等均有記載。EG 細胞可透過在含有 mSCF、LIF 及 bFGF 的培養基中培養原生殖細胞的方式製造(Cell,70 : 841-847,1992)。iPS 細胞可透過將 Oct3/4、Sox2 及 Klf4(因應必要時再加入 c-Myc 或 n-Myc)等重編程因子(reprogramming factor)導入體細胞(例如纖維母細胞、皮膚細胞等)內的方式製造(Cell, 126 : p.663-676, 2006; Nature, 448 : p.313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26; p.101-106, 2008; Cell 131 : p.861-872, 2007; Science, 318 : p.1917-1920, 2007; Cell Stem Cells 1 : p.55-70, 2007; Nat Biotechnol, 25 : p.1177-1181, 2007; Nature, 448 : p.318-324, 2007; Cell Stem Cells 2 : p.10-12, 2008; Nature 451 : p.141-146, 2008; Science, 318 : p.1917-1920, 2007)。藉由培養將體細胞的核經核移植所製作而成之初期胚而樹立的幹細胞，作為多能性幹細胞亦佳(Nature, 385, 810 (1997); Science, 280, 1256 (1998); Nature Biotechnology, 17, 456 (1999); Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999)); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)、Rideout III 等(Nature Genetics, 24, 109 (2000))。

[0033] 作為複能性幹細胞，可舉例能夠分化成為脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等細胞的間葉系幹

細胞，能夠分化成為白血球、紅血球、血小板等血球系細胞的造血系幹細胞，能夠分化成為神經元、星狀細胞、寡樹突細胞等細胞的神經系幹細胞，骨髓幹細胞、生殖幹細胞等之體性幹細胞等。複能性幹細胞以間葉系幹細胞較佳。所謂間葉系幹細胞，係指能夠分化成為成骨細胞、軟骨母細胞及脂肪母細胞中全部或數種的幹細胞。機能性幹細胞能夠以眾所週知的方法自生體單離。例如間葉系幹細胞，能自哺乳動物骨髓、脂肪組織、末梢血、臍帶血等以週知的一般方法採集。例如透過骨髓穿刺後的造血系幹細胞等之培養、繼代，能夠單離人類間葉系幹細胞(*Journal of Autoimmunity*, 30(2008)163-171)。複能性幹細胞也可以透過在適當的誘導條件下培養上述多能性幹細胞的方式獲得。間葉系幹細胞較佳為來自人類骨髓之間葉系幹細胞。

[0034] 作為本發明之哺乳動物細胞，可以附著性細胞作為例示。本說明書中所謂的「附著性」細胞，係指藉由接著於立基點，能夠進行生存、增殖、生產物質的立基點依附性細胞。作為附著性幹細胞，可舉出多能性幹細胞、間葉系幹細胞、神經系幹細胞、骨髓幹細胞及生殖幹細胞等。附著性幹細胞之中，較佳為間葉系幹細胞或多能性幹細胞。

[0035] 本發明之哺乳動物細胞(集團)，雖然是從活體內被分離者亦可，或在體外被繼代培養者亦可，但是以經單離或精製為佳。本說明書中所謂的「單離或精製」，係指已實施了去除目標成分以外之成分的操作。經單離或精

製之哺乳動物細胞的純度(相對於全細胞數，哺乳動物幹細胞數等目標細胞的比例)通常為 30%以上，較佳為 50%以上，更佳為 70%以上，在更佳為 90%以上(例如 100%)。

[0036] 保存於本案細胞移植用溶液中的哺乳動物細胞(集團)，係以單一細胞(Single Cell)狀態為佳。本說明書中所謂的「單一細胞狀態」，係指未與其他細胞聚集而形成塊狀(即未凝集的狀態)的狀態。單一細胞狀態的哺乳動物細胞，可透過將體外培養的哺乳動物細胞以胰蛋白酶/EDTA 等酵素處理的方式調製。哺乳動物細胞中所含單一細胞狀態之哺乳動物細胞的比例，通常為 70%以上，較佳為 90%以上，更佳為 95%以上，再更佳為 99%以上(例如 100%)。單一細胞狀態細胞的比例，能將哺乳動物細胞分散於 PBS，在顯微鏡下觀察這些細胞，再以隨機抽樣選擇複數個(例如 1000 個)細胞來調查是否凝集來決定的。

[0037] 保存於本案細胞移植用溶液中的哺乳動物細胞(集團)係呈浮游狀態為佳。本說明書中所謂的「浮游」，係指細胞在不接觸裝載移植用溶液的容器內壁下保持於移植用溶液中。

[0038] 在保存於本案細胞移植用溶液中的哺乳動物細胞已經凝集或沉澱時，最好在移植前先藉由移液及輕敲等的該技術領域中周知的方法讓細胞懸浮。

[0039] 以下雖透過實施例來更具體地說明本發明，但本發明的技術範圍並不限定於這些例示中。

[實施例 1]

[0040] 1.本案細胞移植用溶液具有抑制細胞生存率下降之相乘效果的確認 1(海藻糖的濃度固定於 3(w/v)%，評估聚葡糖的濃度變化與相乘效果的關係)。

1-1 材料

1-1-1 細胞移植用溶液

S : 大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR : Lactec(註冊商標)注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR+1%D : 含有 1(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+3%D : 含有 3(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+5%D : 含有 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+7%D : 含有 7(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+3%T : 含有 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+3%T+1%D : 含有 3(w/v)%海藻糖及 1(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+3%T+3%D : 含有 3(w/v)%海藻糖及 3(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+3%T+5%D : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LR+3%T+7%D : 含有 3(w/v)%海藻糖及 7(w/v)%聚葡

糖的 Lactec 注射液

[0041]

1-1-2 細胞移植用溶液的調製

1)含有 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液(「LR+3%T」液)，係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)添加、溶解於 Lactec 注射液(LR 液)中來調製的。

2)含有 3(w/v)%海藻糖及 10(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LR+3%T+10%D」液)，係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)添加、溶解於低分子聚葡糖 L 注射液(含有 10[w/v]%聚葡糖的 Lactec 注射液)(大塚製藥工廠公司製)(「LR+10%D」液)中來調製的。

3)含有特定濃度(1、3、5 及 7[w/v]%)聚葡糖的 Lactec 注射液(「LR+1、3、5、及 7%D」液)，係將「LR+10%D」液以 LR 液稀釋來調製的。

4)含有 3(w/v)%海藻糖及特定濃度(1、3、5 及 7[w/v]%)聚葡糖的 Lactec 注射液(「LR+3%T+1、3、5 及 7%D」液)，係將「LR+3%T+10%D」液以「LR+3%T」液稀釋來調製的。

[0042]

1-1-3 哺乳動物細胞的調製

將人類骨髓間葉系幹細胞(Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow[hMSC-BM])(Lonza 公司製)以依照以下〔1〕~〔8〕所示的順序來調製，並用於本實驗中。

〔1〕將 hMSC-BM 在使用了 75cm² 培養瓶之人類間

葉系幹細胞專用培養基套件(Lonza 公司)(以下稱為「MSC 培養基」)的存在下，於 37°C、5%CO₂ 的培養箱中進行培養。在顯微鏡下觀察細胞的狀態，並培養至約 80%滿的程度

[2] 以吸氣器移除 MSC 培養基，每瓶培養瓶以 8mL 的 PBS(Invitrogen 公司製)沖洗 hMSC-BM。

[3] 以吸氣器移除 PBS，每瓶培養瓶加入 3.75mL 的胰蛋白酶-EDTA(Lonza 公司製)，在室溫中靜置 5 分鐘。

[4] 在顯微鏡下觀察並同時輕微地搖晃，直到將 hMSC-BM 剝離 90%的程度為止。

[5] 每瓶培養瓶加入 3.75mL 的 MSC 培養基，使胰蛋白酶反應停止，以移液手法回收 hMSC-BM，並轉移到 50mL 離心管中

[6] 以 600×g，5 分鐘，25°C 進行離心分離。

[7] 以吸氣器移除作為上清液的 MSC 培養基，在每一個培養瓶中加入 4mL 的 PBS(Invitrogen 公司製)，使 hMSC-BM 團塊 (沉澱物)懸浮。

[8] 採集 10μL 的 hMSC-BM 懸浮液，用細胞計數盤計算測量細胞數量，並添加 PBS(Invitrogen 公司製)使濃度成為 5×10^5 cells/mL 後，冰鎮之。

[0043]

1-2 方法

為了確認本案細胞移植用溶液具有抑制細胞生存率下降的相乘效果，以依照以下 [1] ~ [3] 所示的順序來進

行實驗。

[1] 將以上述「1-1-3 哺乳動物細胞的調製」的步驟 [7] 所調製的 hMSC-BM 懸浮液，使用 FINPIPETTE(100-1000 μ L)分注到 15mL 的 Conical 離心管中(conical centrifuge tube)，並以 600 \times g，5 分鐘，25 $^{\circ}$ C 進行離心處理。

[2] 吸取、清除離心處理後的上清液，並懸浮於上述的 11 種細胞移植用溶液中後，在冷藏庫(4 $^{\circ}$ C 條件下)中保存 14 天。再者，為了測量保存前的細胞生存率，在吸取、清除離心處理後的上清液後，將其懸浮於 PBS(Invitrogen 公司製)中後立即採集其中一部份(20 μ L)，並與 20 μ L 台盼藍染色液(Gibco 公司製)混合後，在顯微鏡下使用細胞計數盤(OneCell Counter)進行全細胞數與死細胞數的測量，並進行存活細胞率的評估(參照圖 1 的「P」)。

[3] 將 hMSC-BM 在細胞移植用溶液中保存 14 天後，將吸頭前端插入到自底部目視 5mm 左右位置的狀態下，緩緩地攪拌(以 500 μ L 的液量移液 5 回)使細胞懸浮的狀態下，採集其中一部分(20 μ L)到 1.5mL 微量離心管中，並與 20 μ L 台盼藍染色液(Gibco 公司製)混合後，在顯微鏡下使用細胞計數盤(OneCell Counter)進行全細胞數與死細胞數的測量，並進行存活細胞率的評估。

[0044]

1-3 結果

存活細胞率的評估結果如表 1 及圖 1 所示。相對於將 hMSC-BM 保存於 S 液及 LR 液中時，幾乎未確認到存活的 hMSC-BM(S 液中為未達 1%，LR 液中為 1%)，將 hMSC-BM 保存於「LR+1、3、5 及 7%D」液中時，存活 hMSC-BM 的比例分別上升至 4%、9%、12%及 20%(表 1、圖 1)。再者，將 hMSC-BM 保存於「LR+3%T」液中時，存活 hMSC-BM 的比例亦上升到了 4%(表 1、圖 1)。這些結果顯示了若將 hMSC-BM 等的哺乳動物細胞長期保存於生理食鹽水或乳酸林格氏液等的生理性水溶液中，雖然細胞幾乎死絕，但藉由使用含有聚葡萄糖或海藻糖的生理性水溶液，能抑制細胞死亡，並提高存活細胞的比例。

再者，將 hMSC-BM 保存於「LR+3%T+1、3、5 及 7%D」液中時，存活 hMSC-BM 的比例分別為 11%、33%、57%及 50%(表 1、圖 1)，亦較將 hMSC-BM 保存於「LR+3%T」液中時更為上升。進而，在使用「LR+3%T」及「LR+1%D」液時的細胞生存率分別為 4%，相較於兩者之值相加後的 8%，在使用「LR+3%T+1%D」液時的細胞生存率顯示高達 11%之值(1.4 倍)。同樣的，相對於在使用「LR+3%T」及「LR+3%D」液時的細胞生存率之數值相加後的 13%，在使用「LR+3%T+3%D」液時的細胞生存率顯示高達 33%之值(2.5 倍)。又，相對於在使用「LR+3%T」及「LR+5%D」液時的細胞生存率之數值相加後的 16%，在使用「LR+3%T+5%D」液時的細胞生存率顯示高達 57%之

值 (3.6 倍)。又，相對於在使用「LR+3%T」及「LR+7%D」液時的細胞生存率之數值相加後的 24%，在使用「LR+3%T+7%D」液時的細胞生存率顯示高達 50% 之值 (2.1 倍)。這些結果顯示，藉由併用 3% 海藻糖與 5% 前後 (4~7%) 的聚葡糖，可效果相乘地抑制在長期保存 hMSC-BM 等哺乳動物細胞時的細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例。

[0045]

[表 1]

表1 保存14天後的細胞生存率 (%)

細胞移植用溶液	細胞生存率 (%)
S	0 ± 1
LR	1 ± 1
LR+1%D	4 ± 4
LR+3%D	9 ± 3
LR+5%D	12 ± 2
LR+7%D	20 ± 7
LR+3%T	4 ± 1
LR+3%T+1%D	11 ± 3
LR+3%T+3%D	33 ± 7
LR+3%T+5%D	57 ± 11
LR+3%T+7%D	50 ± 17

上述表中的「細胞生存率(%)」係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差，[n=4])。再者，保存前的細胞生存率為「93 ± 2(%)」。關於上述表中的 11 種「細胞移植用溶液」，係參照實施例 1 的「1-1-1 細胞移植用溶液」。

[0046] 更進一步地，將 hMSC-BM 之細胞移植用溶液中的保存期間，換成 14 天以外的 3 天及 7 天來探討，其

結果如圖 2 所示。和將 hMSC-BM 保存 14 天的情況相同，在將 hMSC-BM 保存 3 天及 7 天的情況中，亦闡明了藉由併用 3%海藻糖與 5%前後(4~7%)的聚葡糖，可效果相乘地抑制在長期保存 hMSC-BM 時的細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例。

[實施例 2]

[0047] 2.本案細胞移植用溶液具有抑制細胞生存率下降之相乘效果的確認 2(聚葡糖的濃度固定於 5(w/v)%，評估海藻糖的濃度變化與相乘效果的關係)。

2-1 材料

2-1-1 細胞移植用溶液

S : 大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR : Lactec 注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR+1%T : 含有 1(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+3%T : 含有 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+5%T : 含有 5(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+7%T : 含有 7(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

液

LR+10%T : 含有 10(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射

液

LR+5%D : 含有 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射

液

LR+5%D+1%T : 含有 5(w/v)%聚葡糖及 1(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+5%D+3%T : 含有 5(w/v)%聚葡糖及 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+5%D+5%T : 含有 5(w/v)%聚葡糖及 5(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+5%D+7%T : 含有 5(w/v)%聚葡糖及 7(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LR+5%D+10%T : 含有 5(w/v)%聚葡糖及 10(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

[0048]

2-1-2 細胞移植用溶液的調製

1) 含有 5(w/v)% 聚葡糖的 Lactec 注射液 (「LR+5%D」液), 係將低分子聚葡糖 L 注射液(含有 10[w/v]%聚葡糖的 Lactec 注射液)(大塚製藥工廠公司製)(「LR+10%D 液」)用 Lactec 注射液(LR 液)稀釋來調製的。

2) 含有 10(w/v)% 海藻糖的 Lactec 注射液 (「LR+10%T」液), 係將海藻糖(股份有限公司林原公司

製)添加、溶解於 LR 液中來調製的。

3)含有 5(w/v)%聚葡糖及 10(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液(「LR+5%D+10%T」液),係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)添加、溶解於「LR+5%D」液中來調製的。

4)含有特定濃度(1、3、5及7[w/v]%)海藻糖的 Lactec 注射液(「LR+1、3、5、及7%T」液),係將「LR+10%T」液用 LR 液稀釋來調製的。

5)含有 5(w/v)%聚葡糖及特定濃度(1、3、5及7[w/v]%)海藻糖的 Lactec 注射液(「LR+5%D+1、3、5、及7%T」液),係將「LR+5%D+10%T」液用「LR+5%D」液稀釋來調製的。

[0049]

2-2 結果

將 hMSC-BM 以實施例 1 之「1-1-3 哺乳動物細胞的調製」所示的方法調製後,使用上述的 13 種細胞移植用溶液,並依照實施例 1 之「1-2 方法」所示的順序進行實驗,其結果如表 2 及圖 3 所示。如同實施例 1 的結果,將 hMSC-BM 保存於 S 液及 LR 液中時,幾乎或完全未確認到存活之 hMSC-BM(S 液中為 1%、LR 液中為 0%)。相對於將 hMSC-BM 保存於「LR+1、3、5、7 及 10%T」液中時,存活之 hMSC-BM 的比例分別為 2%、6%、7%、5%及 3%,將 hMSC-BM 保存於「LR+5%D+1、3、5、7 及 10%T」液中時,存活之 hMSC-BM 的比例分別為 30%、48%、49%、30%及 14%,比例已大幅地提升(表 2、圖

3)。特別是，使用「LR+5%D」及「LR+1%T」液時之細胞生存率分別為 11%及 2%，相對於兩者之值相加為 13%，使用「LR+5%D+1%T」液時之細胞生存率顯示高達 30%之值(2.3 倍)。同樣地，相對於在使用「LR+5%D」及「LR+3%T」液時的細胞生存率之數值相加後的 17%，在使用「LR+5%D+3%T」液時的細胞生存率顯示高達 48%之值(2.8 倍)。又，相對於在使用「LR+5%D」及「LR+5%T」液時的細胞生存率之數值相加後的 18%，在使用「LR+5%D+5%T」液時的細胞生存率顯示高達 49%之值(2.7 倍)。又，相對於在使用「LR+5%D」及「LR+7%T」液時的細胞生存率之數值相加後的 16%，在使用「LR+5%D+7%T」液時的細胞生存率顯示高達 30%之值(1.9 倍)。這些結果顯示，藉由併用 3%前後(2~6%)海藻糖與 5%的聚葡糖，可效果相乘地抑制在長期保存 hMSC-BM 等哺乳動物細胞時的細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例。

[0050]

[表 2]

表2 保存14天後的細胞生存率 (%)

細胞移植用溶液	細胞生存率 (%)
S	1 ± 1
LR	0 ± 0
LR+1%T	2 ± 1
LR+3%T	6 ± 2
LR+5%T	7 ± 2
LR+7%T	5 ± 3
LR+10%T	3 ± 2
LR+5%D	11 ± 4
LR+5%D+1%T	30 ± 5
LR+5%D+3%T	48 ± 3
LR+5%D+5%T	49 ± 4
LR+5%D+7%T	30 ± 7
LR+5%D+10%T	14 ± 5

上述表中的「細胞生存率(%)」係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差，[n=4])。再者，保存前的細胞生存率為「95 ± 2(%)」。關於上述表中的 13 種「細胞移植用溶液」，係參照實施例 2 的「2-1-1 細胞移植用溶液」。

[0051] 更進一步地，將 hMSC-BM 之細胞移植用溶液中的保存期間，換成 14 天以外的 3 天及 7 天來探討，其結果如圖 4 所示。和將 hMSC-BM 保存 14 天的情況相同，在將 hMSC-BM 保存 3 天及 7 天的情況中，亦闡明了藉由併用 3%前後(2~6%)的海藻糖與 5%聚葡萄糖，可效果相乘地抑制在長期保存 hMSC-BM 時的細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例。

[0052] 總結實施例 1 及 2 的結果後，其闡明了藉由併用 3%前後(2~6%)的海藻糖與 5%前後(4~7%)的聚葡萄糖，可效果相乘地抑制在長期間(至少 14 天)保存 hMSC-BM 等

之哺乳動物細胞時的細胞生存率下降，並效果相乘地提高存活細胞的比例。

[實施例 3]

[0053]

3. 在使用了併用聚葡萄糖與其他糖類的細胞移植用溶液時的抑制細胞生存率下降之效果的探討

3-1 材料

3-1-1 細胞移植用溶液

S : 大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR : Lactec 注射液(大塚製藥工廠公司製)

LRD : 含有 5(w/v)%聚葡萄糖的 Lactec 注射液

LRTD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡萄糖的 Lactec 注射液

LRD+GL : 含有 5(w/v)%聚葡萄糖及 1.6(w/v)%葡萄糖的 Lactec 注射液

LRD+SR : 含有 5(w/v)%聚葡萄糖及 1.6 (w/v)%山梨糖醇的 Lactec 注射液

LRD+MN : 含有 5(w/v)%聚葡萄糖及 1.6 (w/v)%甘露醇的 Lactec 注射液

LRD+LC : 含有 5(w/v)%聚葡萄糖及 3.0(w/v)%乳糖的 Lactec 注射液

LRD+RF : 含有 5(w/v)%聚葡萄糖及 4.8(w/v)%棉子糖的

Lactec 注射液

LRD+ML：含有 5(w/v)%聚葡糖及 3.0(w/v)%麥芽糖的

Lactec 注射液

LRD+SC：含有 5(w/v)%聚葡糖及 3.0(w/v)%蔗糖的

Lactec 注射液

[0054]

3-1-2 細胞移植用溶液的調製

1)含有 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRD」液)與含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRTD」液)，係依照實施例 1 之「1-1-2 細胞移植用溶液的調製」中記載的方法來調製。

2)含有 5(w/v)%聚葡糖及 1.6(w/v)%葡萄糖的 Lactec 注射液(「LRD+GL」液)，係將葡萄糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

3)含有 5(w/v)%聚葡糖及 1.6(w/v)%山梨糖醇的 Lactec 注射液(「LRD+SR」液)，係將山梨糖醇(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

4)含有 5(w/v)%聚葡糖及 1.6(w/v)%甘露醇的 Lactec 注射液(「LRD+MN」液)，係將甘露醇(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

5)含有 5(w/v)%聚葡糖及 3.0(w/v)%乳糖的 Lactec 注射液(「LRD+LC」液)，係將乳糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

6)含有 5(w/v)%聚葡糖及 4.8(w/v)%棉子糖的 Lactec

注射液(「LRD+RF」液),係將棉子糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

7)含有 5(w/v)%聚葡糖及 3.0(w/v)%麥芽糖的 Lactec 注射液(「LRD+ML」液),係將麥芽糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

8)含有 5(w/v)%聚葡糖及 3.0(w/v)%蔗糖的 Lactec 注射液(「LRD+SC」液),係將蔗糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRD」液中來調製的。

並且,對上述的 7 種糖類(葡萄糖、山梨糖醇、甘露醇、乳糖、棉子糖、麥芽糖及蔗糖)進行濃度調整,以成為和 3(w/v)%海藻糖相同的滲透壓。

[0055]

3-2 結果

將 hMSC-BM 以實施例 1 之「1-1-3 哺乳動物細胞的調製」所示的方法調製後,使用上述的 11 種細胞移植用溶液,並依照實施例 1 之「1-2 方法」所示的順序進行實驗,其結果如圖 5 所示。和實施例 1 及 2 的結果相同,顯示了若將海藻糖與聚葡糖併用,會效果相乘地抑制在 hMSC-BM 保存 14 天時的細胞生存率下降,並提升存活細胞率(圖 5 之「LRTD」與「LRD」或「LR」或「S」的比較)。另一方面,在使用代替海藻糖的 7 種糖類(葡萄糖、山梨糖醇、甘露醇、乳糖、棉子糖、麥芽糖及蔗糖)與聚葡糖併用時,其細胞生存率相較於單獨使用聚葡糖時,幾乎沒有變化(圖 5 之「LRD」與「LRD+GL」或

「LRD+SR」或「LRD+MN」或「LRD+LC」或「LRD+RF」或「LRD+ML」或「LRD+SC」的比較)。該結果顯示了上述的 7 種糖類與海藻糖不同，不具有抑制在長期間保存 hMSC-BM 等之哺乳動物細胞時的細胞死亡，並提高細胞移植用溶液中之存活細胞率的效果。

[實施例 4]

[0056]

4. 在使用了併用海藻糖與其他糖類的細胞移植用溶液時的抑制細胞生存率下降之效果的探討

4-1 材料

4-1-1 細胞移植用溶液

S : 大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR : Lactec 注射液(大塚製藥工廠公司製)

LRT : 含有 3(w/v)%海藻糖含有 Lactec 注射液

LRTD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡萄糖的 Lactec 注射液

LRT+GL : 含有 3(w/v)%海藻糖及 1.6(w/v)%葡萄糖的 Lactec 注射液

LRT+SR : 含有 3(w/v)%海藻糖及 1.6(w/v)%山梨糖醇的 Lactec 注射液

LRT+MN : 含有 3(w/v)%海藻糖及 1.6(w/v)%甘露醇的 Lactec 注射液

LRT+LC：含有 3(w/v)%海藻糖及 3.0(w/v)%乳糖的 Lactec 注射液

LRT+RF：含有 3(w/v)%海藻糖及 4.8(w/v)%棉子糖的 Lactec 注射液

LRT+ML：含有 3(w/v)%海藻糖及 3.0 (w/v)%麥芽糖的 Lactec 注射液

LRT+SC：含有 3(w/v)%海藻糖及 3.0 (w/v)%蔗糖的 Lactec 注射液

[0057]

4-1-2 細胞移植用溶液的調製

1)含有 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液(「LRT」液)與含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRTD」液)，係依照實施例 1 之「1-1-2 細胞移植用溶液的調製」中記載的方法來調製。

2)含有 3(w/v)%海藻糖及 1.6(w/v)%葡萄糖的 Lactec 注射液(「LRT+GL」液)，係將葡萄糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

3)含有 3(w/v)%海藻糖及 1.6(w/v)%山梨糖醇的 Lactec 注射液(「LRT+SR」液)，係將山梨糖醇(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

4)含有 3(w/v)%海藻糖及 1.6(w/v)%甘露醇的 Lactec 注射液(「LRT+MN」液)，係將甘露醇(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

5)含有 3(w/v)%海藻糖及 3.0(w/v)%乳糖的 Lactec 注

射液(「LRT+LC」液)，係將乳糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

6)含有 3(w/v)%海藻糖及 4.8(w/v)%棉子糖的 Lactec 注射液(「LRT+RF」液)，係將棉子糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

7)含有 3(w/v)%海藻糖及 3.0(w/v)%麥芽糖的 Lactec 注射液(「LRT+ML」液)，係將麥芽糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

8)含有 3(w/v)%海藻糖及 3.0(w/v)%蔗糖的 Lactec 注射液(「LRT+SC」液)，係將蔗糖(和光純藥工業股份有限公司製)添加、溶解於「LRT」液中來調製的。

並且，對上述的 7 種糖類(葡萄糖、山梨糖醇、甘露醇、乳糖、棉子糖、麥芽糖及蔗糖)進行濃度調整，以成為和 5(w/v)%聚葡糖相同的滲透壓。

[0058]

4-2 結果

將 hMSC-BM 以實施例 1 之「1-1-3 哺乳動物細胞的調製」所示的方法調製後，使用上述的 11 種細胞移植用溶液，並依照實施例 1 之「1-2 方法」所示的順序進行實驗，其結果如圖 6 所示。和實施例 1~3 的結果相同，顯示了若將海藻糖與聚葡糖併用，會效果相乘地抑制在細胞保存 14 天時的細胞生存率下降，並提升存活細胞率(圖 6 之「LRTD」與「LRT」或「LR」或「S」的比較)。另一方面，在使用代替聚葡糖的 7 種糖類(葡萄糖、山梨糖醇、

甘露醇、乳糖、棉子糖、麥芽糖及蔗糖)與海藻糖併用時，其細胞生存率相較於單獨使用海藻糖時，幾乎沒有變化(圖 6 之「LRT」與「LRT+GL」或「LRT+SR」或「LRT+MN」或「LRT+LC」或「LRT+RF」或「LRT+ML」或「LRT+SC」的比較)。該結果顯示了上述的 7 種糖類與聚葡萄糖不同，不具有抑制在長期間保存 hMSC-BM 等之哺乳動物細胞時的細胞死亡，並提高細胞移植用溶液中之存活細胞率的效果。

進而，不將 7 種糖類(葡萄糖、山梨糖醇、甘露醇、乳糖、棉子糖、麥芽糖及蔗糖)與海藻糖及聚葡萄糖併用，進行在單獨使用情況的實驗，結果確認到上述之 7 種糖類均不具有抑制在長期間保存 hMSC-BM 等之哺乳動物細胞時的細胞死亡，並提高細胞移植用溶液中之存活細胞率的效果(圖 7)。

[實施例 5]

[0059]

5.本案細胞移植用溶液中的生理性水溶液之探討。

5-1 材料

5-1-1 細胞移植用溶液

LR : Lactec 注射液(大塚製藥工廠公司製)

LRTD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡萄糖的
Lactec 注射液

S : 大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司)

製)

STD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的大塚生理食鹽水注射液

5%糖 : 大塚糖液 5%(大塚製藥工廠公司製)

5%糖 TD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的大塚糖液 5%

林格 : 林格氏液「OTSUKA」(大塚製藥工廠公司製)

林格 TD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的林格氏液「OTSUKA」

VEEN : VEENF 輸液(興和興和創藥公司製)

VEENTD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 VEENF 輸液

[0060]

5-1-2 細胞移植用溶液的調製

1)含有 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRD」液)與含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRD」液),係依照實施例 1 之「1-1-2 細胞移植用溶液的調製」中記載的方法來調製。

2)含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的大塚生理食鹽水注射液(「STD」液),係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)及聚葡糖 40(名糖產業股份有限公司製)添加、溶解於大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)中來調製的。

3)含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的大塚糖液 5%(「5%糖 TD」液)，係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)及聚葡糖 40(名糖產業股份有限公司製)添加、溶解於大塚糖液 5%(大塚製藥工廠公司製)中來調製的。

4)含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的林格氏液「OTSUKA」(「林格 TD」液)，係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)及聚葡糖 40(名糖產業股份有限公司製)添加、溶解於林格氏液「OTSUKA」(大塚製藥工廠公司製)中來調製的。

5)含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 VEENF 輸液(「VEENTD」液)，係將海藻糖(股份有限公司林原公司製)及聚葡糖 40(名糖產業股份有限公司製)添加、溶解於 VEENF 輸液(興和興和創藥公司製)中來調製的。

[0061]

5-2 結果

將 hMSC-BM 以實施例 1 之「1-1-3 哺乳動物細胞的調製」所示的方法調製後，使用上述的 10 種細胞移植用溶液，並依照實施例 1 之「1-2 方法」所示的順序進行實驗，其結果如圖 8 所示。作為細胞移植用溶液中的生理性水溶液，在使用大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)或林格氏液「OTSUKA」(大塚製藥工廠公司製)或 VEENF 輸液(興和興和創藥公司製)的情形與使用 Lactec 注射液(大塚製藥工廠公司製)的情形相同，顯示會抑制在 hMSC-BM 保存 14 天時的細胞死亡，並提升細胞移植用溶

液中的存活細胞率(圖 8 中的「S」與「STD」的比較，「林格」與「林格 TD」的比較，「VEEN」與「VEENTD」的比較)。另一方面，在使用大塚糖液 5%(大塚製藥工廠公司製)時，並未確認到抑制在 hMSC-BM 保存 14 天時的細胞死亡(圖 8 中的「5%糖」與「5%糖 TD」的比較)。由以上的結果顯示，透過併用海藻糖與聚葡萄糖的抑制存活細胞率下降之效果，至少在使用生理食鹽液、乳酸林格氏液、林格氏液及醋酸林格氏液作為生理性水溶液的情況中有被確認到。

[實施例 6]

[0062]

6.本案細胞移植用溶液具有抑制細胞生存率下降之相乘效果的確認 3(使用 hMSC-BM 以外的哺乳動物細胞進行評估)。

對於本案細胞移植用溶液具有的抑制細胞生存率下降之效果，在使用 hMSC-BM 以外的其他哺乳動物細胞時，是否亦同樣地被認同之事進行了確認。

6-1 材料

6-1-1 細胞移植用溶液

S : 大塚生理食鹽水注射液(大塚製藥工廠公司製)

LR : Lactec 注射液(大塚製藥工廠公司製)

LRT : 含有 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液

LRD : 含有 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液

LRTD : 含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的

Lactec 注射液

[0063]

6-1-2 細胞移植用溶液的調製

含有 3(w/v)%海藻糖的 Lactec 注射液(「LRT」液)、含有 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRD」液)、或含有 3(w/v)%海藻糖及 5(w/v)%聚葡糖的 Lactec 注射液(「LRTD」液), 係依照實施例 1 之「1-1-2 細胞移植用溶液的調製」中記載的方法來調製。

[0064]

6-2 方法

[1] 添加 18mL 的室溫之 RPMI 培養基(Gibco 公司製)到 50mL 的 Conical 離心管中。

[2] 將凍結保存了人類末梢血 T 細胞(Human Peripheral Blood T Cells ; hPBT)(CELL APPLICATIONS, INC.公司製)的保存容器(細胞小管)的瓶蓋鬆開, 洩放壓力, 再將瓶蓋關上。

[3] 在 37°C 恆溫槽中邊輕輕地攪拌邊使其融解。

[4] 將融解的細胞移至添加了上述 RPMI 培養基的 Conical 離心管中。

[5] 以 400×g, 5 分鐘, 25°C 進行離心處理, 吸除上清液後回收細胞, 每細胞小管以 10mL 的 PBS(Invitrogen

公司製)懸浮。

[6] 使用細胞計數盤 (OneCell Counter)測量細胞數，並添加 PBS(Invitrogen 公司製)使濃度成為 5×10^5 cells/mL 後，冰鎮之。

[7] 使用 FINPIPETTE(100-1000 μ L)，在 12 個 15mL 的 Conical 離心管中每個分別注入細胞懸浮液 0.5mL，以 $400 \times g$ ，5 分鐘， $25^\circ C$ 進行離心處理，並回收細胞。

[8] 吸取、去除上清液，將 hPBT 懸浮於上述的 5 種細胞移植用溶液中後，以冷藏庫($4^\circ C$ 條件下)保存。再者，為了測量保存前的細胞生存率，在吸取、清除離心處理後的上清液後，將其懸浮於 PBS(Invitrogen 公司製)中後立即採集其中一部份(20 μ L)，並與 20 μ L 台盼藍染色液(Gibco 公司製)混合後，在顯微鏡下使用細胞計數盤 (OneCell Counter)進行全細胞數與死細胞數的測量，並進行存活細胞率的評估(參照圖 9 的「P」)。

[9] 將 hPBT 保存在細胞移植用溶液中後，在第 1 天、第 3 天、第 7 天及第 14 天時將吸頭前端插入到自底部目視 5mm 左右位置的狀態下，緩緩地攪拌(以 250 μ L 的液量移液 5 次)使細胞懸浮的狀態下，採集其中一部分(20 μ L)到 1.5mL 微量離心管中，並與 20 μ L 的台盼藍染色液(Gibco 公司製)混合後，在顯微鏡下使用細胞計數盤 (OneCell Counter)進行全細胞數與死細胞數的測量，並進行存活細胞率的評估。

[0065]

6-3 結果

存活細胞率的評估結果如表 3 及圖 9 所示。hPBT 在 S 液及 LR 液中保存 1 天時的細胞生存率已分別降低至 18%及 29%(表 3 及圖 9 之 1 天後的「S」及「LR」)。此外，雖然 hPBT 在 LRT 液及 LRD 液中保存 1 天時的細胞生存率分別改善成 37%及 49%，但未確認到顯著差異(表 3 及圖 9 之 1 天後的「LRT」及「LRD」)。另一方面，hPBT 在 LRTD 液中保存 1 天時的細胞生存率顯示高達 82%的同時，與在 LR 液中保存時的情況相比，確認到顯著差異(表 3 及圖 9 之 1 天後的「LRTD」)。由此等結果顯示，將海藻糖與聚葡糖併用後，可有效地抑制 hPBT 的細胞生存率下降。

[0066] 透過上述海藻糖與聚葡糖併用的效果，在 hPBT 保存 3 天、7 天及 14 天時變得更加顯著。亦即，相較於單獨使用海藻糖及聚葡糖的情況，海藻糖與聚葡糖併用的情況下細胞生存率高 2 倍以上，又，確認到了透過海藻糖與聚葡糖併用的相乘效果(表 3 及圖 9 之 3 天後、7 天後及 14 天後的「LRTD」)。特別是在保存 7 天時，在 LRT 液及 LRD 液中存活之 hPBT 的比例分別是 13%及 17%，相較於兩者之值相加後的 30%，LRTD 液中存活之 hPBT 的比例顯示高達 57%之值(1.9 倍)，確認到了透過海藻糖與聚葡糖併用的高相乘效果。由此等結果顯示，透過海藻糖與聚葡糖併用的抑制存活細胞率下降之效果，在使用 hMSC-BM 以外的哺乳動物細胞(hPBT)時亦同樣地被認

同。

[0067]

[表 3]

表3 保存hPBT的細胞生存率 (%)

細胞移植用溶液	1日後	3日後	7日後	14日後
S	18 ± 12	4 ± 4	1 ± 1	0 ± 0
LR	29 ± 21	22 ± 15	8 ± 5	4 ± 3
LRT	37 ± 17	22 ± 11	13 ± 7	11 ± 6
LRD	49 ± 13	25 ± 18	17 ± 7	16 ± 7*
LRTD	82 ± 7***	66 ± 19***	57 ± 14***	32 ± 8***

上述表中的「細胞生存率(%)」，係將存活細胞相對於全細胞數的比例以細胞生存率(%)表示(平均值±標準差，[n=6])。圖中「*」及「***」係表示針對LR以Dunnett檢定有統計性顯著差異(分別為P<0.05及P<0.001)。此外，保存前之細胞生存率為「92 ± 3(%)」。關於上述表中的5種「細胞移植用溶液」，可參照實施例6的「6-1-1 細胞移植用溶液」。

[產業上的利用可能性]

[0068] 根據本發明，由於可抑制在長期保存含有MSC等的幹細胞及T細胞等的白血球之細胞懸浮液時生存率的下降，並提供優質的細胞懸浮液，故在再生醫療等的移植醫療領域及癌症治療領域是有用的。

發明摘要

※申請案號：103122257

※申請日：103 年 06 月 27 日

※IPC 分類：

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

【發明名稱】(中文/英文)

含有海藻糖及聚葡萄糖之哺乳動物細胞移植用溶液

【中文】

本發明的課題在於提供一種使用可有效抑制在保存哺乳動物細胞時的細胞死亡之細胞移植用溶液來長時間保存哺乳動物細胞的方法，以及前述之細胞移植用溶液。

本發明的特徵在於，在含有 2.0~6.0(w/v)%之海藻糖或其衍生物或該等之鹽類(海藻糖類)與 4.0~7.0(w/v)% 之聚葡萄糖或其衍生物或該等之鹽類(聚葡萄糖類)的細胞移植用生理性水溶液中保存哺乳動物細胞。藉由細胞移植用生理性水溶液中所含之海藻糖類與葡聚糖類的效果，能夠抑制在長時間(至少 14 天)保存哺乳動物細胞時的細胞生存率下降。作為上述生理性水溶液，以選自乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液所成群者為佳，特別是以乳酸林格氏液或生理食鹽水可作為適合的例示。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種保存方法，其係於包含 2.0~6.0(w/v)%之海藻糖或其鹽與 4.0~7.0(w/v)%之聚葡萄糖或其鹽的細胞移植用生理性水溶液中保存哺乳動物細胞之保存方法，其特徵為將前述哺乳動物細胞在前述細胞移植用生理性水溶液中保存 1~14 日。

2. 如請求項 1 之保存方法，其中，生理性水溶液係選自乳酸林格氏液、生理食鹽水、林格氏液及醋酸林格氏液所成群。

3. 如請求項 1 或 2 之保存方法，其中，於細胞移植用生理性水溶液中保存哺乳動物細胞 3~14 日。

4. 如請求項 1 或 2 之保存方法，其中，哺乳動物細胞係哺乳動物間葉系幹細胞或哺乳動物 T 細胞。

5. 如請求項 4 之保存方法，其中，哺乳動物間葉系幹細胞係人類骨髓間葉系幹細胞，哺乳動物 T 細胞係人類末梢血 T 細胞。