

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年5月15日(15.05.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/100528 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) A01N 1/10 (2025.01)

SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/039820

(22) 国際出願日: 2024年11月8日(08.11.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-192618 2023年11月10日(10.11.2023) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 (JP).

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

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(72) 発明者: 黒田 浩介 (KURODA, Kosuke); 〒9201192 石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内 (JP). 平田 英周(HIRATA, Eishu); 〒9201192 石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内 (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人アルガ特許事務所 (ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

(54) Title: ZWITTERION-CONTAINING COMPOSITION, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 双性イオン含有組成物及びその使用

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a composition with which it becomes possible to improve the recovery rate of spheroids after storage by minimizing the damage to the spheroids under non-cryopreservation. The present invention relates to a composition for non-cryopreservation of a multicell cluster, the composition containing one or more types of aprotic zwitterionic compounds (A) and two or more types of additives (X) that are compatible with the components (A).

(57) 要約: 本発明の課題は、非凍結保存下でのスフェロイドのダメージを最小限に抑えることで保存後の回復率を高くできる組成物を提供することにある。本発明は、1種又は2種以上の非プロトン性双性イオン化合物(A)、及び成分(A)と相溶し得る2種類以上の添加剤(X)を含有する、多細胞群の非凍結保存用組成物に関する。



WO 2025/100528 A1

明 細 書

発明の名称： 双性イオン含有組成物及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、多細胞群の培養細胞系であるスフェロイド、オルガノイド、組織等を非凍結保存するために用いられる組成物及びその使用に関する。

背景技術

[0002] 心筋梗塞、脳卒中、肝硬変を始めとする難治性疾患の治療においては再生医療が期待されている。再生医療の一つの態様として、再生させたい患部に細胞を移植することが考えられるが、一細胞で移植するよりもスフェロイドで移植した方が、アポトーシスが起こりにくいことから定着率が上がることが期待されている。また、膵臓ランゲルハンス島の α 細胞と β 細胞を共存させたスフェロイドからはインスリンの産生が大幅に向上したことが報告されている。また、オルガノイドは、スフェロイドよりもより臓器に近い機能を有することが期待されていることから、より再生医療への活用に注目が集まっている。

また、再生医療のみならず、現状において動物実験に対する制限が増していることから、創薬においてスフェロイドやオルガノイドを用いることも検討されている。また、制がん剤などの選択にあたって、患者の部位から細胞群を取り出して有効な治療薬を選択する試みも行われている。

現状、再生医療においては、スフェロイドなどを自家移植することにより行われている。すなわち、現時点での再生医療では、病院にて患者の細胞からiPS細胞を作りスフェロイドを作製して移植することが行われている。そのため、この作業は最新の技術を持つ細胞培養施設が併設されているような限られた大病院でのみ治療が可能である。さらに、この作業に要する時間は、数か月かかる場合もありコスト的にも負担が大きく、スフェロイドの移植には期待があるものの、未だ汎用的に用いられる状況に至っていない。

このような自家移植は、免疫応答などを考えると安全な方法であるとも言

えるが、コスト的な代償も大きく、必ずしも工業的に汎用な技術とは言えない。再生医療をさらに推進するためには、スフェロイドの他家移植を行なうことが考えられるが、そのためにはスフェロイドを工業的に生産していくことが必要になる。そうすれば、世界各地に拠点施設を設けてスフェロイドを製造し、必要に応じてスフェロイドを病院に送り届けることができる。実現すれば、期間を短縮して必要な時期にスフェロイド治療を受けることができるようになり、かつ、大幅に再生医療のコストを下げるができる。

[0003] このことを可能にするためには、スフェロイド等を一定期間保存することが課題の一つとして挙げられる。スフェロイドを保存する方法として、細胞や微生物を長期間保存するために低温凍結保存をすることが挙げられる。凍結保存にはジメチルスルホキシド（DMSO）などの冷凍保存剤及びビタミンEなどの添加剤を用いて、スフェロイドの保存を -196°C で凍結保存を行なう発明が知られている（特許文献1）。ここで、DMSOは、the United States Food and Drug Administration（FDA）やthe International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use（ICH）によってエタノールなどと同等のclass 3に分類され、それほど毒性はない、あるいはあっても微弱であるとされてきたものの、有機溶媒として相対的に有害であることが知られている（非特許文献1）。そのため、DMSOなどの使用量を削減する方策として、アミノ酸系界面活性剤を用いることが提案されている（特許文献2）。本発明者らは、既に、冷凍保存用の非イオン性双性イオン化合物を提案している（特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第98／35021号明細書

特許文献2：特開2023-112417号公報

特許文献3：国際公開第2020／230721号明細書

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：Tuncer, S. et al. Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. Sci. Rep. 8, 14828 (2018).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 世界の各所のスフェロイド生産拠点においてスフェロイドを製造し、地域の医療拠点にオーダーメイドのスフェロイドを提供する再生医療を実現するためには、冷凍で凍結保存をするよりも、 -25°C という汎用冷凍温度においてスフェロイドを非凍結保存する方が、スフェロイドそのものに対するダメージが少ないのみならず、社会インフラの普及状況を考えても有用である。

本発明の課題は、保存期間としては1ヶ月間保存することができ、非凍結保存下でのスフェロイドのダメージを最小限に抑えることで保存後の生細胞の回収率を90%以上とすることである。

このような目的に利用できる非凍結保存培地を形成し得る低温保存用組成物は知られていない。

課題を解決するための手段

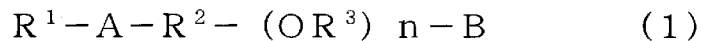
- [0007] 本発明者らは、 -25°C 以下においても凍結しない組成物であって、保存温度において融点を持たず、ガラス化せず、過冷却を起こさない組成物が、上記課題を解決する候補となり得るとの着想の下、非プロトン性双性イオン化合物と2種以上の特定の添加剤を組み合わせ用いれば、保存温度において融点を持たず、ガラス化せず、過冷却を起こさない、 -25°C 以下においても凍結しない、多細胞群の非凍結保存用組成物が得られることを見出し、本発明を完成させた。

- [0008] 本発明は、次の発明[1]～[4]を提供するものである。

[1] 1種又は2種以上の非プロトン性双性イオン化合物(A)、及び成分(A)と相溶し得る2種類以上の添加剤(X)を含有する、多細胞群の非凍結保存用組成物。

[2] 前記非プロトン性化合物(A)が、一般式(1)

[0009] [化1]



[0010] (R^1 は、炭素数1～8の直鎖アルキル基、炭素数2～8のアルケニル基、又はC1～8直鎖アルキル-(OC_2H_4) $_m$ -を示し；

Aは、双性イオンのカチオン部であり、イミダゾリウムカチオン、ホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオン、スルホニウムカチオン、ピラゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン、モルホリニウムカチオン、シクロプロペニウムカチオン及びピペリジニウムカチオンから選ばれるカチオンを示し；

R^2 は、炭素数1～4のアルキレン基を示し；

R^3 は、炭素数2～4のアルキレン基を示し；

m は、1又は2の数を示し；

n は、0～10の数を示し；

Bは、 $-SO_3-$ 、 $-COO-$ 、 $-OP=O(H)O-$ 、 $-OP=O(CH_3)O-$ 、 $-OP=O(OR_4)O-$ 、及び $-OP=O(OH)O-$ から選ばれるアニオンを示し；

R_4 は炭素数1～8のヘテロ原子を有していても良いアルキル基を示す)

で表される非プロトン性双性イオン化合物である[1]記載の非凍結保存用組成物。

[3] 前記添加剤Xが、

(i) 水酸基を有しない小分子化合物又は平面性を有する化合物、

(ii) 水酸基を1個以上有する化合物、

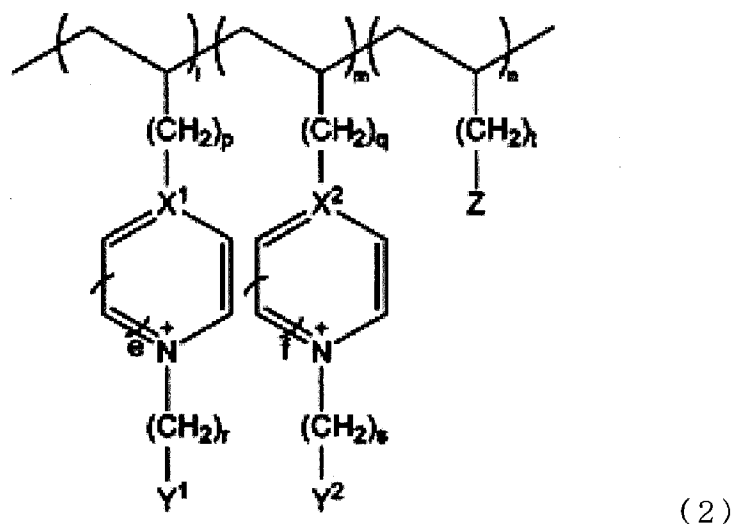
(iii) ペプチド又はタンパク質、

(iv) 高分子化合物、

(v) 界面活性剤、及び

(v i) 次の一般式(2)で表される双性イオンポリマー又は双性イオンオリゴマーから選ばれる添加剤である、[1]又は[2]記載の非凍結保存用組成物。

[0011] [化2]



[0012] (式中、

X^1 及び X^2 は、同一でも異なってもよく、炭素原子又は窒素原子を示し；

Y^1 及び Y^2 は、同一でも異なってもよく、 $-COO-$ 、 $-SO_3-$ 、 $-OP=O(H)O-$ 、 $-OP=O(CH_3)O-$ 及び $-OP=O(OR^5)O-$ から選ばれるアニオンを示し(ここで、 R^5 は、水素原子又はメチル基を示す)；

Z は、水素原子、アルキル基が置換していてもよい炭素数6～10の芳香族炭化水素基、アルキル基が置換していてもよい5～6員の芳香族複素環式基、アルキル基が置換していてもよい窒素含有複素環式アンモニウム塩、テトラアルキルアンモニウム塩、テトラフェニルホスホニウム塩、テトラアルキルホスホニウム塩、トリアルキルスルホニウム塩、又は分子鎖中に1～3個の酸素原子を有していてもよい炭素数1～22の直鎖又は分岐アルキル基を示し；

e 及び f は、それぞれ0又は1の整数を示し；

l 、 m 及び n は、それぞれ各繰り返し単位の含有比率を示す数であって、0

$0 < l \leq 1$ 、 $0 \leq m < 1$ 、 $0 \leq n < 1$ 、 $l + m + n = 1$ を満たす数を示し；

p 、 q 、 r 、 s 及び t は、それぞれ0～6の整数を示す)

[4] [1]～[3]のいずれかに記載の組成物を用いる、多細胞群を非凍結下で保存する方法。

発明の効果

[0013] 本発明の非凍結保存用組成物を用いれば、保存温度において融点を持たず、ガラス化せず、過冷却を起こさず、 -25°C 以下においても凍結しないため、多細胞群を非凍結状態で保存できる。従って、多細胞群を用いる再生医療が工業的に可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ の比率を10/5/5、10/10/10、10/15/15、10/20/20、10/25/25を変えて作製した組成物のDSCチャートである。

[図2] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ により、 -25°C 、3日間保存をした場合のMAF1スフェロイドの生存細胞の回収率(recovery)と、保存後の生存細胞の死細胞を含めた細胞群に対する生存率(viability)である。

[図3] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20)、 $\text{C}_1\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20)、及び $\text{C}_4\text{imC}_3\text{S}$ (20/20/20)の組成物を用いてMAF1スフェロイドを -25°C で20日間保存したときの生存細胞の回収率(recovery)と、保存後の生存細胞の死細胞を含めた細胞群に対する生存率(viability)を示す図である。

[図4] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}$ からなる組成物においてMAF1を -25°C で3日間保存した後の回収率について、組成物が保存温度で固体(S)となると回収率が悪く、液体(L)であると回収率が高くなることを示す図である。

[図5] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}$ からなる組成物において、10/10、10/20、10/30、10/40、10/50の組成物を作製し、MAF1

スフェロイドを -25°C で3日間保存した後の回収率を示す図である。

[図6] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20) の組成物を用いてMAF1スフェロイドを -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図7] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20) の組成物を用いて5555スフェロイドを -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図8] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20) の組成物を用いてBOSCスフェロイドを -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図9] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20) の組成物を用いてMAF1一細胞を -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図10] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20) の組成物を用いて5555細胞を -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図11] $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}/\text{DMSO}/\text{EG}$ (10/20/20) の組成物を用いてBOSC細胞を -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図12] 双性イオン液体の代わりに0.9%NaClを用いた組成物によりMAF1スフェロイドを -25°C で30日間保存したときの生細胞の回収率の推移を示す図である。

[図13] MDA-MB-231細胞を10質量% $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ 水溶液中 -80°C で保存したときの光学顕微鏡写真(右)、及びMAF1細胞のスフェロイドを培地中に常温保存したときの光学顕微鏡写真(左)を示す。

[図14] DMSO (20wt%) と EG (20wt%) に加えて、 $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$ 、 $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{S}$ 、 $\text{C}_1\text{imC}_3\text{C}$ 、 $\text{C}_1\text{imC}_3\text{S}$ の異なる組成を含む被験溶液を用いてMAF1スフェロイドを -25°C で10日間保存したときの細胞

回収率の相異を示す図である。

[図15] DMSO (20wt%) と EG (20wt%) に加えて、 OE_2imC_3 C、 OE_2imC_3S 、 C_1imC_3C 、 C_1imC_3S の異なる組成を含む被験溶液を用いて MAF1 スフェロイドを 0℃ で 1 時間処理したときの細胞回収率の相異を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明において、「多細胞群」とは、スフェロイド、オルガノイド、細胞シート、組織構造体、臓器の切片、臓器、などの細胞の集まりを言う。

本発明において「スフェロイド」とは、1 種類又は数種類の細胞の 3 次元構造体をいう。本発明におけるスフェロイドは球状であり、その直径は 0.01 ~ 0.1 mm である。iPS 細胞のスフェロイドを形成した後スフェロイドを分化させ、または iPS 細胞を分化させた後にスフェロイド形成させ、そのスフェロイドを患者に移植する。

スフェロイドは、一細胞を単独で、または複数一緒にして三次元培養することで得ることができる。細胞と細胞の間には一細胞の培養では見られなかった細胞外マトリックスの形成が認められ、時に細胞間相互作用が見られるなど、細胞を 2 次元で培養する場合より生体内の組織に近いとされる。これらのマトリックスは、細胞が生体組織内で動くように、スフェロイド内で細胞が動く足場となる。したがって、スフェロイドは、細胞移動、分化、生存、及び増殖のための改良された培養のモデルとして活用することもできる。さらに、二次元の培養では、細胞は部分的にしか分極しないが、三次元細胞培養では、細胞の分極が全体に見られる場合がある。三次元で増殖した細胞は、二次元で増殖した細胞とは異なる遺伝子発現を示すとも言われる。

本発明において「オルガノイド」とは、細胞の三次元構造体が、臓器であればより臓器に近い構造を示すものをいう。スフェロイドでは比較的単純な細胞外マトリックスしか存在しないが、オルガノイドでは、細胞外マトリックスを介してより複雑な細胞間の相互作用が観察される。

本発明において「組織構造体」とは、細胞及び組織からなるものをいう。

腎臓、肝臓、精巣などに由来する臓器の切片はこれに当たり、オルガノイドを形成させる上で材料に相当するものである場合もある。

[0016] 本発明は、スフェロイドを形成する拠点と使用する拠点が距離的に離れていたり、社会インフラ的に高度な冷凍保存設備がない地域であっても、低温での凍結保存を行う必要がなく、非凍結保存を行うことができる非凍結保存用組成物を提供する。

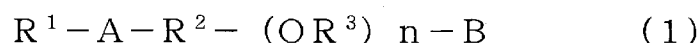
本発明においては、「非凍結下で保存」（「非凍結保存という」）とは、細胞群の周辺の培養液中の水も細胞群の内部の水も、凍結した状態にない状態での保存のことをいう。非凍結保存は、液体窒素温度 $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは -85°C $\sim$ 室温、さらに好ましくは -50°C $\sim 0^{\circ}\text{C}$ の保存空間で行われる。食品のコールドチェーンの活用を考えると、 -85°C $\sim 4^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは -30°C $\sim -4^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは -30°C $\sim -15^{\circ}\text{C}$ において非凍結であることが良い。また、静置状態で非凍結であっても運搬中の振動などによって氷の結晶が析出することがある。そのため、本発明に用いられる組成物は、保存温度で過冷却でないことが必要となる。

[0017] 本発明の一態様は、1種又は2種以上の非プロトン性双性イオン化合物（A）、及び成分（A）と相溶し得る2種類以上の添加剤（X）を含有する、多細胞群の非凍結保存用組成物である。以下、各成分について説明する。

[0018] （非プロトン性双性イオン化合物（A））

本発明に用いられる前記非プロトン性双性イオン化合物（A）としては、一般式（1）

[0019] [化3]



[0020] （ R^1 は、炭素数1 $\sim$ 8の直鎖アルキル基、炭素数2 $\sim$ 8のアルケニル基、又はC1 $\sim$ 8直鎖アルキル $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-$ を示し；

Aは、双性イオンのカチオン部であり、イミダゾリウムカチオン、ホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオン、スルホニウムカチオン、ピラゾリウ

ムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン、モルホリニウムカチオン、シクロプロペニウムカチオン及びピペリジニウムカチオンから選ばれるカチオンを示し；

R^2 は、炭素数 1 ～ 4 のアルキレン基を示し；

R^3 は、炭素数 2 ～ 4 のアルキレン基を示し；

m は、1 又は 2 の数を示し；

n は、0 ～ 10 の数を示し；

B は、 $-SO_3-$ 、 $-COO-$ 、 $-OP=O(H)O-$ 、 $-OP=O(CH_3)O-$ 、 $-OP=O(OR_4)O-$ 、及び $-OP=O(OH)O-$ から選ばれるアニオンを示し；

R_4 は炭素数 1 ～ 8 のヘテロ原子を有していても良いアルキル基を示す)

で表される非プロトン性双性イオン化合物が挙げられる。

[0021] 本発明において、双性イオンとは、1 分子内に正電荷と負電荷の両方を持つ分子である。本発明の双性イオンでは、 A で示されるカチオン部分と、 B で示されるアニオン部分とを有する。そして、本発明の双性イオンは、 A で示されるカチオン部と B で示されるアニオン部との間にオキシアルキレン基を1 個又は複数有していてもよい。このようにカチオン部分とアニオン部分の間に、回転可能なオキシアルキレン構造を1 個又は複数有することによって、カチオンとアニオンがそれぞれ独立して自由な位置をとることができるようになり、融点が下がり、かつ粘性が下がるものと考えられる。カチオン部とアニオン部との間の回転可能なオキシアルキレン構造の個数は、オキシエチレン構造の繰り返し数 n は 1 ～ 10 であるものが好ましく用いられ、 n が 1 ～ 6 の場合がより好ましく、 n が 1 ～ 3 の場合がさらに好ましい。

[0022] 本発明において、アルキル基とは、飽和の鎖状炭化水素基であり、直鎖アルキル基及び分岐鎖アルキル基が含まれる。好ましくは炭素数 1 ～ 8 のアルキル基であり、炭素数 1 ～ 8 の直鎖又は分岐鎖アルキル基が含まれる。さらに好ましくは炭素数 1 ～ 6 の直鎖又は分岐鎖アルキル基であり、より好ましくは炭素数 1 ～ 4 の直鎖又は分岐鎖アルキル基である。

これらのアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、*n*−プロピル基、イソプロピル基、*n*−ブチル基、イソブチル基、*sec*−ブチル基、*tert*−ブチル基、*n*−ペンチル基、*n*−ヘキシル基、*n*−ヘプチル基、*n*−オクチル基などが挙げられる。

本発明において、アルケニル基とは、2重結合を1個有する不飽和の鎖状炭化水素基であり、直鎖アルケニル基及び分岐鎖アルケニル基が含まれる。好ましくは炭素数2〜8の直鎖又は分岐鎖アルケニル基が含まれる。さらに好ましくは炭素数2〜6の直鎖又は分岐鎖アルケニル基であり、より好ましくは炭素数2〜4の直鎖又は分岐鎖アルケニル基である。

これらのアルケニル基の具体例としては、ビニル基、1−プロペニル基、2−プロペニル基（アリル基）、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基などが挙げられる。

本発明において、アルキレン基とは、二価の飽和の鎖状炭化水素基であり、直鎖及び分岐鎖のアルキレン基が含まれる。好ましくは、炭素数1〜4の直鎖又は分岐鎖のアルキレン基であり、より好ましくは炭素数2〜4の直鎖又は分岐鎖のアルキレン基である。具体的には、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基が挙げられる。

[0023] R^1 は、炭素数1〜8の直鎖アルキル基、炭素数2〜8のアルケニル基、又はC1−8直鎖アルキルー（ OC_2H_5 ） m −を示す。

炭素数1〜8の直鎖アルキル基としては、好ましくは炭素数1〜6の直鎖アルキル基であり、より好ましくは炭素数1〜4の直鎖アルキル基である。

これらのアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、*n*−プロピル基、*n*−ブチル基、イソブチル基、*n*−ペンチル基、*n*−ヘキシル基、*n*−ヘプチル基、*n*−オクチル基などが挙げられる。このうち、メチル基、エチル基、*n*−プロピル基、*n*−ブチル基、*n*−ペンチル基、*n*−ヘキシル基が好ましく、メチル基、エチル基、*n*−プロピル基、*n*−ブチル基がより好ましい。

炭素数2〜8のアルケニル基としては、炭素数2〜8の直鎖又は分岐鎖ア

ルケニル基が挙げられる。好ましくは炭素数 2～6 の直鎖又は分岐鎖アルケニル基であり、より好ましくは炭素数 2～4 の直鎖又は分岐鎖アルケニル基である。このうち、ビニル基、プロペニル基、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基が好ましく、ビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基（アリル基）、ブテニル基がより好ましい。

C 1-8 直鎖アルキル- (OCH_2CH_2)_m-で示される基における、C 1-8 直鎖アルキル基としては、好ましくは炭素数 1～6 の直鎖アルキル基であり、より好ましくは炭素数 1～4 の直鎖アルキル基である。

これらのアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基などが挙げられる。このうち、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基が好ましく、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基がより好ましい。

m は、1 又は 2 の数である。

[0024] R^2 は、炭素数 1～4 のアルキレン基を示し、炭素数 1～4 の直鎖又は分岐鎖アルキレン基が含まれる。具体的には、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基が挙げられる。

[0025] R^3 としては、炭素数 2～4 の直鎖又は分岐鎖のアルキレン基が挙げられ、具体的には、エチレン基、トリメチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基が挙げられる。従って、 OR^3 としては、オキシエチレン基、オキシトリメチレン基、オキシプロピレン基、オキシテトラメチレン基が好ましい。

n としては、0～10 の数であればよいが、1～10 の数が好ましく、1～8 がより好ましく、1～6 がさらに好ましく、1～4 がよりさらに好ましい。

B は、双性イオンのアニオン部であり、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{H})\text{O}^-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{CH}_3)\text{O}^-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{OR}^4)\text{O}^-$ 、及び $-\text{OP}=\text{O}(\text{OH})\text{O}^-$ から選ばれるアニオンを示し、 R^4 は炭素数 1～8 のヘテロ原子を

有していても良いアルキル基である。

ここで、 R^4 としては、メチル基、エチル基等が好ましい。

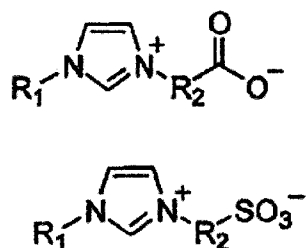
このうち、 $-COO^-$ 、 $-SO_3^-$ 、及び $-OP=O(OH)O^-$ から選ばれるアニオンが好ましく、さらに $-COO^-$ が好ましい。

[0026] Aは、双性イオンのカチオン部であり、イミダゾリウムカチオン、ホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオン、スルホニウムカチオン、ピラゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン、モルホリニウムカチオン、シクロプロペニウムカチオン及びピペリジニウムカチオンから選ばれるカチオンを示す。

これらのカチオンのうち、イミダゾリウムカチオン、アンモニウムカチオン、ピラゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン、モルホリニウムカチオン又はピペリジニウムカチオンが好ましく、イミダゾリウムカチオン、ピラゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン又はピペリジニウムカチオンがより好ましく、イミダゾリウムカチオンがよりさらに好ましい。

また、イミダゾリウムカチオン、ピラゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン又はピペリジニウムカチオンは、 R^1 又は R^2 の官能基の少なくとも1方が窒素上に置換してカチオン化しており、このときに生成するカチオンは R^2 の置換基の酸性基とベタイン構造を形成する。このような構造のカチオンとしては具体的には、

[0027] [化4]



[0028] を挙げることができる。

[0029] (添加剤(X))

本発明に用いられる添加剤（X）としては、成分（A）と相溶し得る２種類以上であればよいが、具体的には、次の（i）～（Vi）から２種類以上を選択して用いることができる。（i）～（Vi）のうち、同じ分類から複数選択することもできる。ここで相溶とは、かならずしも成分（A）と相溶する必要はなく、水などの溶媒および複数の添加剤（X）を加えた後に相溶していれば構わない。

（i）水酸基を有しない小分子化合物、

（ii）水酸基を１個以上有する化合物、

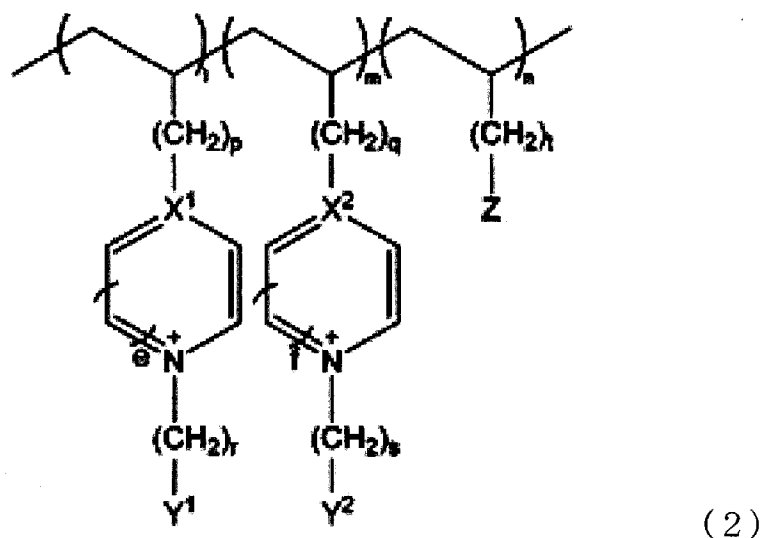
（iii）ペプチド、

（iv）高分子化合物

（v）界面活性剤、

（vi）次の一般式（２）で表される双性イオンポリマー又は双性イオンオリゴマー。

[0030] [化5]



[0031] (式中、

X¹及びX²は、同一でも異なってもよく、炭素原子又は窒素原子を示し；

Y¹及びY²は、同一でも異なってもよく、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{SO}_3-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{H})\text{O}-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{CH}_3)\text{O}-$ 及び $-\text{OP}=\text{O}(\text{OR}^5)\text{O}-$ から選ばれるアニオンを示し（ここで、R⁵は、水素原子又はメチル基を示す）；

Zは、水素原子、アルキル基が置換していてもよい炭素数6～10の芳香族炭化水素基、アルキル基が置換していてもよい5～6員の芳香族複素環式基、アルキル基が置換していてもよい窒素含有複素環式アンモニウム塩、テトラアルキルアンモニウム塩、テトラフェニルホスホニウム塩、テトラアルキルホスホニウム塩、トリアルキルスルホニウム塩、又は分子鎖中に1～3個の酸素原子を有していてもよい炭素数1～22の直鎖又は分岐アルキル基を示し；

e及びfは、それぞれ0又は1の整数を示し；

l、m及びnは、それぞれ各繰り返し単位の含有比率を示す数であって、 $0 < l \leq 1$ 、 $0 \leq m < 1$ 、 $0 \leq n < 1$ 、 $l + m + n = 1$ を満たす数を示し；

p、q、r、s及びtは、それぞれ0～6の整数を示す）

[0032] (i) 水酸基を有しない小分子化合物又は平面性を有する化合物

この小分子化合物としては、水酸基以外の極性官能基のある小分子化合物（好ましくは分子量120以下の化合物）や平面性を有する化合物が好適に用いられ、細胞膜を通り抜けて細胞浸透性を示す化合物が好ましい。

中でも、ジメチルスルホキシド（DMSO）は細胞浸透性があり、細胞内に浸透して自由水の結晶化を抑えていることが考えられる。本発明においては、DMSOを単独で用いるよりも、他の添加剤（X）と組み合わせることで、DMSOの毒性が抑制されている可能性が示唆されている。

他にも、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、メチルアセトアミド、アセトアミド、アクリルアミド、プロピオンアミド、メタクリルアミド、イソブチルアミド、ラクトアミド、ニコチンアミド、イソフタルアミドなどのアミド化合物、ヘキサン、ベンゼン、トルエン、 β -バロラクトンなどの有機溶媒、ヨウ化プロピジウムのような芳香族を含む（蛍光色素）分子、コレステロールなどのステロイド系化合物が挙げられる。

[0033] (ii) 水酸基を1個以上有する化合物

水酸基を1個以上有する化合物としては、一価アルコール、多価アルコール、単糖類、2糖類、オリゴ糖などが挙げられる。

一価アルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール、*t*-ブタノール、オクタノール、フェノールなどが挙げられる。

多価アルコールとしては、2価又は3価の多価アルコールが好ましく、具体的にはエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジグリセリンなどが挙げられ、このうち、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンがより好ましい。

単糖類としては、カルボニル基による分類であるアルドース及びケトースを含み、炭素数による分類であるトリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトースを含む、また糖アルコールを含む。具体的には、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトン、エリトロース、エリトルロース、リボース、リブロース、グルコース、フルクトース、セドヘプツロースなどを挙げることができる。また、アルデヒドやケトンがアルコールに還元されているエリトリトール、ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコールも単糖類に含まれる。具体的には、グルコース、フルクトースなどの単糖類、エリトリトール、ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコールがさらに好ましい。

2糖類としては、マルトース、セロビオース、ラクトース、スクロース、イソマルトース、トレハロースなどを挙げることができる。

オリゴ糖としては、3個以上連結したものとしてラフィノース、パノース、マルトトリオース、セロトリオース、メレジトース、ゲンチアノースなどが、4個以上連結したものとしてスタキオース、セロテトラオースなどが挙げられる。

これらの多価アルコール及び糖類のうち、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどの多価アルコール、グルコース、フルクトースなどの単糖類、エリトリトール、ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコール、マルトース、セロビオース、ラクトース、スクロース、イソマル

トース、トレハロースなどの2糖類がより好ましい。

これらの多価アルコールや糖類は、スフェロイド等の最外部の細胞表面に付着することで保存時の保護作用が高められていると考えられる。

[0034] (iii) ペプチド又はタンパク質

ペプチドはアミノ酸が2～50個程度連結されたものであり、ホエイペプチド、魚肉ペプチド、大豆ペプチド、イワシペプチド、コラーゲンペプチドなどが挙げられる。ペプチドはスフェロイド等の表面の細胞と静電的相互作用することで保存時の保護作用が高められていると考えられる。不凍タンパクと呼ばれる、氷晶形成抑制能をもつポリペプチドも挙げられる。

[0035] (iv) 高分子化合物

高分子化合物としては、天然、非天然を問わないが、天然のものとしては、デンプン、グリコーゲン、セルロースのほかアルギン酸、ペクチン、アガロース、カラギナンなどを挙げることが出来る。非天然高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコールやビニルアルコールオリゴマーなども挙げられる。また、セルロースナノファイバーが培養に用いられることもあり、連続的に保存培地として用いることも出来る。浸透圧の調節として有益であり、スフェロイド等の表面の細胞を保護する機能がある。

[0036] (v) 界面活性剤

界面活性剤としては、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン系界面活性剤が挙げられる。好ましくは、非イオン系界面活性剤が用いられる。非イオン系界面活性剤としては、エステル型、エーテル型、エステル・エーテル型、その他脂肪酸アルカノールアミド型が挙げられる。エステル型は、多価アルコールと脂肪酸がエステル結合した構造が特徴であり、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、蔗糖脂肪酸エステルを挙げることができる。エーテル型としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールを挙げることができる。エステル・エーテル型は、多価アルコールと脂肪酸とからなるエステルに

酸化エチレンを付加してポリエチレンエーテル側鎖を導入したものである。
いずれのものも、浸透圧を調節し、スフェロイドの最外層の細胞を保護する。
。

[0037] (v i) 前記一般式 (2) で表される双性イオンポリマー又は双性イオンオリゴマー

この双性イオンポリマー (2) は、少なくとも l 個の繰り返し単位の側鎖に、非プロトン性双性イオン、すなわち、カチオン部分とアニオン部分とを有する。当該双性イオン構造は、一般式 (2) 中の X^1 及び窒素原子 (N) を含む複素環式カチオンと Y^1 のアニオンとで形成される。また、 m 個の繰り返し単位の側鎖に、 X^2 及び窒素原子 (N) を含む複素環式カチオンと Y^2 のアニオンとで形成される双性イオン構造を有していてもよい。

本発明において双性イオン構造とは、正電荷と負電荷を同一分子内の隣り合わない位置に持ち、正電荷を持つ原子に解離しうる水素が結合しておらず、分子全体としては電荷を持たない化合物 (分子内塩) の総称である。

このように、双性イオンポリマー (2) の繰り返し単位の側鎖に双性イオンを有することにより、細胞膜に対する保護作用を示し、非凍結保存剤として機能するもの考えられる。また、双性イオンポリマー (2) は、前記 (i) ~ (v) から選ばれる 1 種以上の添加剤と併用することにより、前記側鎖の双性イオンにより会合していた状態から分散状態になるため、細胞膜に作用して非凍結保存機能を示すものと考えられる。

[0038] 一般式 (2) において、 l 、 m 及び n は、それぞれ各繰り返し単位の含有比率を示す数であって、 $0 < l \leq 1$ 、 $0 \leq m < 1$ 、 $0 \leq n < 1$ 、 $l + m + n = 1$ を満たす数を示す。

$m = n = 0$ のときは、一般式 (2) は側鎖に双性イオン構造の官能基を持つホモポリマーを表す。 m が 0 を超える数を示し、 $n = 0$ のときは、一般式 (2) は 2 種類の双性イオン構造を有するランダム又はブロック共重合体であることを表す。 $m = 0$ であり、 n が 0 を超える数を示すときは、一般式 (2) は、側鎖に双性イオン構造の官能基を持つ繰り返し単位と、側鎖に Z を

有する繰り返し単位とを有するランダム又はブロック共重合体であることを表す。m及びnが0を超える数を示すときは、一般式(2)は三元系のランダム又はブロック共重合体であることを表す。

p、q及びtは、それぞれ独立して0～6の整数を示す。具体的には、この部分は、単結合又は炭素数1～6の直鎖アルキレン基であり、単結合、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基が好ましい。また、この部分は、生体試料の凍結保護作用の観点から、単結合、メチレン基又はエチレン基がより好ましく、単結合又はメチレン基がさらに好ましい。

p、q及びtは、同一でも異なってもよい。

r及びsは、それぞれ独立して0～6の整数を示し、1～6の整数が好ましい。この部分は、炭素数1～6の直鎖アルキレン基が好ましく、具体的には、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基が好ましい。r及びsは、同一でも異なってもよい。

一般式(2)において、 X^1 及び X^2 は、同一でも異なってもよく、炭素原子又は窒素原子を示す。

一般式(2)中、 X^1 及び窒素原子(N)を含む複素環式カチオンとしては、イミダゾリウムカチオン($X^1=N$ 、 $e=0$)、ピリジニウムカチオン($X^1=C$ 、 $e=1$)、ピロリニウムカチオン($X^1=C$ 、 $e=0$)、ピラジニウムカチオン($X^1=N$ 、 $e=1$)が挙げられる。このうち、イミダゾリウムカチオン($X^1=N$ 、 $e=0$)、ピリジニウムカチオン($X^1=C$ 、 $e=1$)が好ましい。

一般式(1)中、 X^2 及び窒素原子(N)を含む複素環式カチオンとしては、イミダゾリウムカチオン($X^2=N$ 、 $f=0$)、ピリジニウムカチオン($X^2=C$ 、 $f=1$)、ピロリニウムカチオン($X^2=C$ 、 $f=0$)、ピラジニウムカチオン($X^2=N$ 、 $f=1$)が挙げられる。このうち、イミダゾリウムカチオン($X^2=N$ 、 $f=0$)、ピリジニウムカチオン($X^2=C$ 、 $f=1$)が好ましい。

Y^1 及び Y^2 は、同一でも異なってもよく、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{H})\text{O}^-$ 、 $-\text{OP}=\text{O}(\text{CH}_3)\text{O}^-$ 及び $-\text{OP}=\text{O}(\text{OR}^1)\text{O}^-$ から選ばれるアニオンを示す。 Y^1 及び Y^2 としては、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 及び $-\text{OP}=\text{O}(\text{OH})\text{O}^-$ から選ばれるアニオンが好ましく、 $-\text{COO}^-$ 及び $-\text{SO}_3^-$ から選ばれるアニオンがより好ましく、 $-\text{COO}^-$ がさらに好ましい。

Zは、水素原子、アルキル基が置換していてもよい炭素数6～10の芳香族炭化水素基、アルキル基が置換していてもよい5～6員の芳香族複素環式基、アルキル基が置換していてもよい窒素含有複素環式アンモニウム塩、テトラアルキルアンモニウム塩、テトラフェニルホスホニウム塩、テトラアルキルホスホニウム塩、トリアルキルスルホニウム塩、又は分子鎖中に1～3個の酸素原子を有していてもよい炭素数1～22の直鎖又は分岐アルキル基を示す。

具体的には、水素原子、フェニル基、ナフチル基、C1～C22アルキル置換フェニル基、C1～C22アルキル置換ナフチル基、イミダゾリル基、トリアゾリル基、ピリジル基、ピロリル基、ピラジニル基、フリル基、チエニル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、ピリジニウムクロリド、C1～C22アルキルピリジニウムクロリド、イミダゾリニウムクロリド、C1～C22アルキルイミダゾリニウムクロリド、ピリジニウムブロミド、C1～C22アルキルピリジニウムブロミド、イミダゾリニウムブロミド、C1～C22アルキルイミダゾリニウムブロミド、ピロリジニウムクロリド、C1～C22アルキルピロリジニウムクロリド、ピロリジニウムブロミド、C1～C22アルキルピロリジニウムブロミド、テトラメチルアンモニウムクロリド、C2～C22アルキルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラメチルアンモニウムブロミド、C2～C22アルキルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラフェニルホスホニウムクロリド、テトラフェニルホスホニウムブロミド、トリメチルスルホニウムクロリド、トリメチルスルホニウムブロミド、C1～C22直鎖又は分岐鎖アルキル基、エトキシエチル基、エトキシエトキシエチル基等が挙げられる。

好ましいZとしては、アルキル基が置換していてもよい5～6員の芳香族複素環式基又はアルキル基が置換していてもよい窒素含有複素環式アンモニウム塩が挙げられ、より好ましくは、イミダゾリル基、トリアゾリル基、ピリジル基、ピロリル基、ピラジニル基、フリル基、チエニル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、ピリジニウムクロリド、C1～C22アルキルピリジニウムクロリド、イミダゾリニウムクロリド、C1～C22アルキルイミダゾリニウムクロリド、ピリジニウムブロミド、C1～C22アルキルピリジニウムブロミド、イミダゾリニウムブロミド、C1～C22アルキルイミダゾリニウムブロミド、ピロリジニウムクロリド、C1～C22アルキルピロリジニウムクロリド、ピロリジニウムブロミド、C1～C22アルキルピロリジニウムブロミドが挙げられる。

さらに好ましくは、イミダゾリル基、ピリジル基、ピリジニウムクロリド、C1～C22アルキルピリジニウムクロリド、イミダゾリニウムクロリド、C1～C22アルキルイミダゾリニウムクロリド、ピリジニウムブロミド、C1～C22アルキルピリジニウムブロミド、イミダゾリニウムブロミド、C1～C22アルキルイミダゾリニウムブロミドが挙げられる。

双性イオンポリマー（2）の分子量は、主鎖の構造、側鎖の構造や全体に占める比率などから考慮する必要があり、それぞれの特徴を反映した公知の測定手法を用いることが出来る。さらに、双性イオンポリマーの場合は、双性イオンの種類によりpHやNaClなどの電解質濃度により主鎖のコンフォメーションが変化することが知られている。

[0039] 双性イオンポリマー（2）の主鎖の構造は、星形、櫛形、架橋構造などが考えられ、いずれの構造のものであっても本発明の目的に用いることが可能であるが、主鎖のコンフォメーションは側鎖の種類によって異なる。主鎖が直鎖状のポリマーの場合には、NaClなどの電解質等の添加によりポリマーを広げることで、水への分散性を高めることができる。また、双性イオンポリマー（2）は、側鎖に存在する双性イオン構造により、細胞膜の構造や細胞透過性の観点から、および細胞外における氷晶の形成、難溶性物質の溶

解性に関係することから、その分子量は、一定程度の大きさであることが好ましい。分子鎖を電解質により広げた状態において、ポリエチレンオキサイド換算で、 M_w が1万以上、 M_n が5000以上が好ましく、 M_w が1万以上200万以下、 M_n が5000以上150万以下がより好ましい。さらに、ポリマーの分子量分布も考慮される。

[0040] 双性イオンポリマー(2)は細胞内に侵入しないため細胞の外側でマトリックスを形成し細胞の外側の細胞膜周辺に集積する。その理由の一つとして双性イオン分子がベタイン構造を有することから電荷を有し、双性イオンポリマーとして細胞膜に侵入することができないことが考えられる。そして、ポリマー側鎖に細胞膜と親和性が高い疎水性の官能基が存在し、その官能基が細胞膜に細胞の外側から差し込まれた形になると、親水性ポリマーが細胞の外側で細胞膜に繫留され、ポリマーが細胞の外側の細胞膜周辺に集積されることになることが考えられる。このような性質をスフェロイドなどの多細胞集合体で考えると、最も外層の細胞を保護することにより、細胞集合体を保護する役割が期待される。このような集積に寄与する官能基としては、一般式(2)中のカチオンとアニオンとの間にアルキレン基を有することが挙げられる。また、ZがC1～C22のアルキル基、さらにC3～C18のアルキル基を有する場合も好ましい。また、そのような置換基の存在比は、ポリマー全体に対して0.001から10モル%、0.01～1モル%、より好ましくは0.1～0.5モル%であることが好ましい。

[0041] 添加剤(X)は、前記(i)～(vi)記載の添加剤から2種類以上を選択して用いられる。好ましい組み合わせは、(i)から選ばれる2種以上の組み合わせ(例えば、DMSOとジメチルアセトアミドの組み合わせ、DMSOとアセトアミドの組み合わせ、DMSOとジメチルホルムアミドの組み合わせなど)；(ii)から選ばれる2種以上の組み合わせ(例えば、メタノールとプロピレングリコールの組み合わせ、グリセロールとプロピレングリコールの組み合わせ、エタノールとエチレングリコールとスクロースの組み合わせなど)；(i)から選ばれる1種以上と、(ii)～(vi)から

選ばれる1種以上との組み合わせ；(i i)から選ばれる1種以上と、(i)、(i i i)～(v i)から選ばれる1種以上との組み合わせ；(i)から選ばれる1種以上と、(i i)から選ばれる1種以上と、(i i i)～(v i)から選ばれる1種以上との組み合わせ（例えば、DMSOとアセトアミドとプロピレングリコールとポリビニルアルコールと不凍タンパクとpoly ZIの組み合わせなど）が挙げられる。

より具体的には、(1) DMSOと、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどの多価アルコール、グルコース、フルクトースなどの単糖類、エリトリトール、ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコール、及びマルトース、セロビオース、ラクトース、スクロース、イソマルトース、トレハロースなどの2糖類から選ばれる1種以上の水酸基含有化合物との組み合わせ；(2) DMSOと、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどの多価アルコール、グルコース、フルクトースなどの単糖類、エリトリトール、ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコール、及びマルトース、セロビオース、ラクトース、スクロース、イソマルトース、トレハロースなどの2糖類から選ばれる1種以上の水酸基含有化合物と、ペプチド、高分子化合物、界面活性剤及び双性イオンポリマー(2)から選ばれる1種以上との組み合わせ；(3) エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどの多価アルコール、グルコース、フルクトースなどの単糖類、エリトリトール、ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコール、及びマルトース、セロビオース、ラクトース、スクロース、イソマルトース、トレハロースなどの2糖類から選ばれる1種以上の水酸基含有化合物と、ペプチド、高分子化合物、界面活性剤及び双性イオンポリマー(2)から選ばれる1種以上との組み合わせ；(4) DMSOとジメチルアセトアミドとエチレングリコール又はプロピレングリコールの組み合わせなどが挙げられる。

[0042] (組成物)

本発明の多細胞群の非凍結保存用組成物は、1種又は2種以上の非プロト

ン性双性化合物（A）、及び成分（A）を含む溶液と相溶し得る2種類以上の添加剤（X）を含有する。ここで相溶とは、かならずしも成分（A）と相溶する必要はなく、水などの溶媒及び複数の添加剤（X）を加えた後に相溶していれば構わない。非凍結保存に用いる場合、非プロトン性双性イオン化合物（A）と添加剤（X）は、質量換算で1：0.1～1：50の比率で用いるのが好ましく、1：0.5～1：5の割合で用いるのがより好ましく、1：1～1：4の割合で用いるのがさらに好ましい。

また、本発明の組成物には、非プロトン性双性イオン化合物（A）と2種以上の添加剤（X）以外に、水、細胞培養用の培地、生理食塩水成分を含んでいてもよい。この場合、本発明の組成物は、質量換算で、非プロトン性双性イオン化合物（A）：水が0.1：10～4：10の割合で用いるのが好ましく、0.5：10～3：10の割合で用いることがより好ましく、0.5：10～2：10の割合で用いることがさらに好ましい。非プロトン性双性イオン化合物（A）は培地全体で水と混合することで低温での不凍性を増大させており、添加剤（X）は、浸透圧の調節、スフェロイド全体の保護、細胞内に浸透した場合は細胞内の自由水の不凍性を増大させていることが考えられる。しかしながら、スフェロイド等の場合、集合体表面の細胞は培地と直接接するが、スフェロイドになることで生成する細胞外マトリックスがバリアとなることから必ずしも内部の細胞にまで浸透するかどうかは不明の点はあるが、一部の非プロトン性双性イオン化合物（A）や添加剤（X）は、細胞間マトリクス内の自由水の不凍化に役立っていると考えられる。ただし、高分子量の添加剤（X）は思うようには細胞間に入り込むができないので、スフェロイド等全体の保護や浸透圧の調節の役割をしているものと考えられる。このような点から、添加剤（X）を2種以上選択する場合、異なる機能を有すると思われるものを選択することが好ましい。従って、添加剤（X）の2種以上の組み合わせは、前述の組み合わせが好ましい。

[0043] i P S細胞のスフェロイド化して分化させたスフェロイド、又はi P S細胞を分化させてスフェロイド化したものを再生医療に適用するにあたっては

、スフェロイドを製造する場所と、再生医療を行う場所が別々の場所にあつて運搬するということから、低温保存であっても刺激により培地の水が結晶化しないことが重要である。そのために考えられる条件としては、保存温度以上において、融点がなく、ガラス転移点がなく、培地が過冷却になっていないことが重要である。融点及びガラス転移点は、示差走査熱量測定（DSC）によって調べることが出来る。また、過冷却になっているかどうかは、保存温度で培地を観察しながら刺激をして結晶化が起こらないかどうかを調べることで知ることができる。

[0044] 本発明の別の一態様は、本発明の非凍結保存用組成物を用いる、多細胞群を非凍結下で保存する方法である。

本発明方法の非凍結保存対象は、多細胞群である。多細胞群には、前記のように、スフェロイド、オルガノイド、細胞シート、組織構造体、臓器の切片、臓器、生体・個体が含まれるが、スフェロイド、オルガノイド、細胞シート、細胞構造体が好ましく、スフェロイドがより好ましい。

具体的には、本発明の組成物に多細胞群を添加し、非凍結下で保存すればよい。非凍結保存は、液体窒素温度 $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは -85°C $\sim$ 室温、さらに好ましくは -50°C $\sim 0^{\circ}\text{C}$ の保存空間で行われる。食品のコールドチェーンの活用を考えると、 -85°C $\sim 4^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは -30°C $\sim -4^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは -30°C $\sim -15^{\circ}\text{C}$ において非凍結であることが良い。

実施例

[0045] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

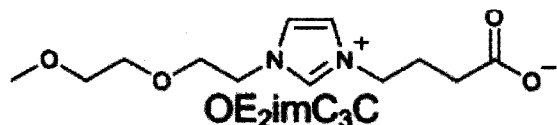
[0046] （評価物質）

本発明に用いられる非プロトン性双性イオンはJ. Am. Chem. Soc. 139, 16052–16055 (2017)を参考に製造することができる。

[0047] （合成例1） $\text{OE}_2\text{imC}_3\text{C}$

[0048]

[化6]



[0049] 15.7 g (656 mmol) の NaH (関東化学株式会社) を 50 mL のテトラヒドロフラン (富士フィルム和光純薬株式会社) に懸濁させ、13.8 g (202 mmol) のイミダゾール (東京化成工業株式会社) を添加し、室温で 24 時間攪拌した。37.0 g (202 mmol) の 1-ブローモ-2-(2-メトキシエトキシ)エタン (東京化成工業株式会社) を加え、70℃で 6 時間攪拌した。白色の析出物を濾別し、ろ液を濃縮後、蒸留 (125℃、1 mmHg) により 1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)イミダゾールを得た。これを 250 mL のアセトニトリルに溶解し、29 g (150 mmol) のエチル 4-ブロモブチレートを加え、80℃で 16 時間還流した。ジエチルエーテルで洗浄後、アニオン交換樹脂 (Amberlite IRN 78A) のカラムに付した。溶出液を減圧留去することで OE₂imC₃C を得た。

NMR データ: δ = 2.13–2.27 (4H, m, CH₂CO and CH₂CH₂CO), 3.37 (3H, s, CH₃O), 3.51–3.65 (4H, m, CH₃OCH₂CH₂), 3.86 (2H, t, J = 3.6 Hz, OCH₂CH₂N), 4.40 (2H, t, J = 6.7 Hz, NCH₂CH₂CH₂COO), 4.66 (2H, t, J = 3.7 Hz, OCH₂CH₂N), 7.29 and 7.49 (2H, t, J = both 1.6 Hz, NCHCHN), 11.00 (1H, s, NCHN).

¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃; Me₄Si) δ = 27.20 and 34.30 (NCH₂CH₂CH₂COO), 48.94 (OCH₂CH₂N), 49.47 (NCH₂CH₂CH₂COO), 58.65 (CH₃O), 69.19 (OCH₂CH₂N), 69.93 and 71.29 (OCH₂CH₂O), 121.22 and 122.58 (NCHCHN), 138.7

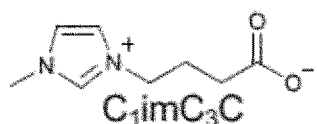
3 (NCHN), 176.63 (CH₂COO).

Elemental analysis: OE₂imC₃C · 2.5 H₂O (Found: C, 48.0; H, 8.4; N, 9.3.

Calc. for C₁₂H₂₅N₂O_{6.5}: C, 47.8; H, 8.4; N, 9.3%).

[0050] (合成例2) C₁imC₃C

[0051] [化7]



[0052] 22.2 g (270 mmol) の1-メチルイミダゾールと (53.7 g : 270 mmol) のエチル4-ブロモブチレートとを、20 mLのアセトニトリルに溶解させ、50℃で5 hr 撹拌した。析出物を除去後、減圧乾燥し、ジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧乾燥した。残渣を陰イオン交換樹脂に付しC₁imC₃Cを得た。

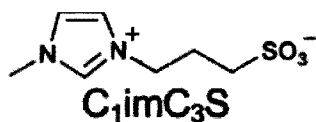
¹H NMR (400 MHz; DMSO-d₆; Me₄Si) δ = 1.77 (2H, t, J = 6.4 Hz, CH₂CO), 1.86 (2H, J = 7.3 Hz, quin, CH₂CH₂CO), 3.82 (3H, s, CH₃N), 4.13 (2H, t, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₂), 7.66 and 7.76 (2H, t, J = both 1.6 Hz, NCHCHN), 9.50 (1H, s, NCHN).

¹³C NMR (100 MHz; DMSO-d₆; Me₄Si) δ = 27.80 (CH₂CH₂CO), 35.36 (CH₂CO), 36.10 (CH₃N), 49.61 (NCH₂CH₂), 122.91 and 123.89 (NCHCHN), 137.700 (NCHN), 174.02 (CH₂COO).

[0053] (合成例3) C₁imC₃S

[0054]

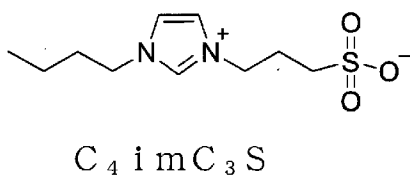
[化8]



[0055] 合成例2において、エチル4-ブロモブチレートの代わりに、1,3-プロパンスルトンを用いた以外は合成2と同様な操作を行い、C₁i m C₃Sを得た。

[0056] (合成例4) C₄i m C₃S

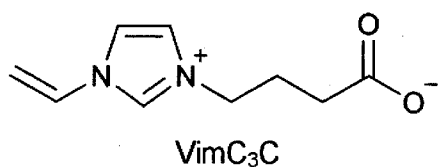
[0057] [化9]



[0058] 合成例2において、1-メチルイミダゾールの代わりに4-ブチルイミダゾールを用い、エチル4-ブロモブチレートの代わりに、1,3-プロパンスルトンを用いた以外は合成例2と同様の操作を行い、C₄i m C₃Sを得た。

[0059] (合成例5) V i m C₃C

[0060] [化10]

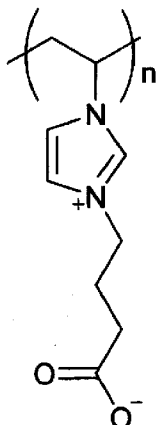


[0061] 合成例2において、1-メチルイミダゾールの代わりに、ビニルイミダゾール（東京化成工業株式会社）を用いた以外は、合成例2と同様の操作を行いV i m C₃Cを得た。

[0062] (合成例6)

[0063]

[化11]



[0064] 10 mLの純水に、3 g (0.014 mmol) の VimC_3C を添加し、重合開始剤として 22.83 g (0.0014 mmol) の 2, 2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (東京化成工業株式会社) を加え、80℃で16時間攪拌した。純水で透析、減圧乾燥することで $\text{Poly}(\text{VimC}_3\text{C})$ を得た。

[0065] 合成例7 ($\text{C}_1\text{imC}_2\text{OE}_3\text{C}$ ($\text{R}^1=\text{CH}_3$ 、 $\text{A}=\text{イミダゾリウムカチオン}$ 、 $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{R}^3=\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $n=3$ 、 $\text{B}=-\text{COO}^-$) の合成)

[原料]

benzenesulfonyl chloride、p-toluenesulfonyl chloride、1-methylimidazole、sodium hydroxide、ジエチルエーテルは東京化成工業株式会社より購入した。トルエン、ジクロロメタン、MeOH、chloroform- d_1 , 99.8 atom% D with 0.03 vol%

TMSは関東化学株式会社より購入した。tetrahydrofuran with stabilizer、hydrochloric acidはFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporationより購入した。aluminum oxide (active, basic, Brockmann 1)はSigma-Aldrich社より購入した。Amberlite IRN-78, ion ex

change resin, nuclear gradeはAlfa Aesar社より購入した。tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateはAccela ChemBio社より購入した。

[0066] (1) p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) の合成

50 mLのナスフラスコにtert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate 4.9 gを入れ、ジクロロメタン (DCM) 30 mLを加えて溶解させた。その後、ナスフラスコを氷冷し、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して3.5 equiv. (モル当量) となるように、NaOH 2.45 gを加えて氷冷撹拌した。さらに、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して1.3 equiv. となるように、氷冷中撹拌のナスフラスコへp-toluenesulfonyl chloride 4.4 gを少しずつ滴下した。全量滴下後、室温で28時間撹拌し、反応させた。28時間撹拌後、濾紙 (5C, ADVANTEC) を用いて固体不純物を除去した。濾過後の生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填し、DCM 60 mLで共洗いをを行った。その後、水を加えて、分液後の水層のpHとナトリウム濃度を測定し、pHが7になるまで、かつ、ナトリウム濃度が実測値で0 ppmを示すまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥して生成物を得た。生成物の構造は¹H NMRにより確認し、生成物は精製せず次の原料として用いた。

[0067] (2) p-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a) の合成

200 mLナスフラスコに合成したp-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl esterを入れ、p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl esterに対し

て25 equiv. となるように36% HCl aq. 45 gを加え、室温で3時間攪拌し、反応させた。3時間攪拌後、生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填し、DCM 120 mLで共洗いを行った。その後、水を加えて、分液後の水層のpHが7になるまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥して生成物を得た。生成物の構造は¹H NMRにより確認し、生成物は精製せず次の原料として用いた。

[0068] (3) imidazolium p-toluenesulfonate (3a) の合成

200 mLナスフラスコに合成したp-toluenesulfonyl PEG4 acidを入れ、aluminum oxide (active, basic, Brockmann 1) で精製したテトラヒドロフラン 20 mLを加えて溶解させた。その後、ナスフラスコを氷冷し、1-methylimidazole 1.77 gを加えて氷冷攪拌した後、還流冷却器を用いて70℃で45時間還流し、反応させた。45時間還流後、反応溶液の減圧乾燥を行い、得られた生成物を含む200 mLナスフラスコにジエチルエーテルを加えて洗浄を行った(40 mL, 4 h, 3 times)。洗浄後、減圧乾燥して生成物を得た。生成物の構造は¹H NMRにより確認し、生成物は精製せず次の原料として用いた。

[0069] (4) imidazolium hydroxide (4a) 及びC₁imC₂O E₃Cの合成

合成したimidazolium p-toluenesulfonateをH₂O/MeOH (1/2 : w/w) 溶媒600 mLに溶解させ、1 Lビンへ移した。その後、アニオン交換樹脂(Amberlite IRN-78、交換容量1.1 eq/L) 35 mLを加え、室温で10日間攪拌してimidazolium hydroxideを生成した。

アニオン交換後、濾紙(5C, ADVANTEC)を用いてアニオン交換樹脂を除去し、20 mLナスフラスコに反応溶液を移した。得られた反応溶液を濃縮し、中和反応及びC₁imC₂O E₃Cの生成反応を進行させた。その後

、生成物を含む20 mLナスフラスコにジエチルエーテルを加えて洗浄を行った(20 mL, 1 day, 3 times)

。洗浄後、減圧乾燥して油状の生成物を得た(純度98%)。tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateからの収率は56%であった。

[0070] ^1H NMR (400 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) δ = 2.424 (2H, t, J = 4.0 Hz, CH_2COO), 3.538–3.644 (8H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 3.790 (2H, t, J = 11.6 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$), 3.919 (2H, t, J = 9.6 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$), 3.980 (3H, s, CH_3N), 4.499 (2H, t, J = 9.6 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7.238 and 7.243 (1H, m, NCHCHN), 10.465 (1H, s, NCHN) .

Mass spectrometry with fast atom bombardment ionization: in positive mode, m/z = 287.1610 ($\text{M}+\text{H}^+$, found) and 287.1607 ($\text{M}+\text{H}^+$, calculated); and in negative mode, m/z = 285.1452 ($\text{M}-\text{H}^+$, found) and 285.1450 ($\text{M}-\text{H}^+$) (calculated) .

[0071] 合成例8 ($\text{OE}_2\text{imC}_2\text{OE}_3\text{C}$ ($\text{R}^1=\text{H}_3\text{C}$ (OCH_2CH_2)₂, $\text{A}=\text{イミダゾリウムカチオン}$, $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{R}^3=\text{CH}_2\text{CH}_2$, $n=3$, $\text{B}=-\text{COO}^-$) の合成)

[原料]

benzenesulfonyl chloride、p-toluenesulfonyl chloride、imidazole、diethylene glycol monomethyl ether、sodium hydroxide、ジエチルエーテルは東京化成工業株式会社より購入した。トルエン、ジクロロメタン、MeOH、chloroform—

d_1 , 99.8 atom% D with 0.03 vol% TMSは関東化学株式会社より購入した。tetrahydrofuran with stabilizer、hydrochloric acidはFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporationより購入した。aluminum oxide (active, basic, Brockmann 1)はSigma-Aldrich社より購入した。Amberlite IRN-78, ion exchange resin, nuclear gradeはAlfa Aesar社より購入した。tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateはAngene International Limited社より購入した。

[0072] (1) p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) の合成

50 mLのナスフラスコにtert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate 3.72 gを入れ、DCM 10 mLを加えて溶解させた。その後、ナスフラスコを氷冷し、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して6.2 equiv. (モル当量)となるように、NaOH 3.38 gを加えて氷冷撹拌した。さらに、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して1.3 equiv. となるように、氷冷中撹拌のナスフラスコへp-toluenesulfonyl chloride 3.3 gを少しずつ滴下した。全量滴下後、室温で17時間撹拌し、反応させた。17時間撹拌後、濾紙(5C, ADVANTEC)を用いて固体不純物を除去した。濾過後の生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填し、DCM 60 mLで共洗いをを行った。その後、水を加えて、分液後の水層のpHとナトリウム濃度を測定し、pHが6になるまで、かつ、ナトリウム濃度が実測値で0 ppmを示すまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥

して生成物を得た。生成物の構造は ^1H NMRにより確認し、次の反応に用いた。

[0073] (2) *p*-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a) の合成

200 mL ナスフラスコに合成した *p*-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester を入れ、*p*-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester に対して 25 equiv. となるように 36% HCl aq. 34.4 g を加え、室温で 3 時間攪拌し、反応させた。3 時間攪拌後、生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填し、DCM 50 mL で共洗いをを行った。その後、水を加えて、分液後の水層の pH が 7 になるまで分液操作を行った。分液後、DCM 層を減圧乾燥して生成物を得た。生成物の構造は ^1H NMRにより確認し、次の反応に用いた。

[0074] OE₂im の合成

Cellulose, 29, 3017-3024 を参考に作製した。

ジエチレングリコールモノメチルベンゼンスルホン酸塩を合成するために、水酸化ナトリウム (2.5 当量、55 g、1.38 mol) と等量の水 (55 g) を混合し、その溶液をトルエン (1000 mL) 中のジエチレングリコールモノメチルエーテル (1 当量、60 g、0.5 mol) の溶液に加え、さらに、ジエチレングリコールモノメチルエーテルを加えた。触媒量の水酸化ベンジルトリメチルアンモニウム (10 mL) を加え、氷浴中で攪拌した。その後、塩化ベンゼンスルホン (97 g、0.6 mol) を攪拌下で滴下し、70°C で 6 時間還流した。トルエンを蒸発させた後、得られた溶液をジクロロメタンに溶かし、水 (3000 mL) で一度洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させて、生成物を得た。

1-(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)イミダゾール (OE₂im) を合成するために、水酸化ナトリウム (2.5 当量、56.4 g、1.4 mol) 及び等量の水 (57 g) を用いて水酸化ナトリウムの水溶液を調製

した。この塩基をトルエン（1000 mL）中のイミダゾール（1当量、32 g, 0.5 mol）の溶液に加え、続いて触媒量のベンジルトリメチルアンモニウムヒドロキッド（10 mL）を添加した。その後、氷浴で冷却しながらジエチレングリコールモノメチルベンゼンスルホネート（123 g, 0.5 mol）をゆっくりと加え、70℃で6時間加熱して無色粘稠な液体を得た。トルエンを蒸発させた後、減圧下（1 Pa）、160℃で蒸留し、OE₂imを得た（収率：92%）。生成物の構造は¹H NMRにより確認し、次の反応に用いた。

[0075] (3) oligoether imidazolium p-toluenesulfonate (3b) の合成

200 mL ナスフラスコに合成した p-toluenesulfonyl PEG4 acid を入れ、トルエン 40 mL を加えて溶解させた。その後、OE₂im 2.3 g を加えて攪拌した後、還流冷却器を用いて 80℃ で 27 時間還流し、反応させた。27 時間還流後、反応溶液の減圧乾燥を行い、得られた生成物を含む 200 mL ナスフラスコにジエチルエーテルを加えて洗浄を行った（50 mL, 1 day, 3 times）。洗浄後、減圧乾燥して生成物を得た。生成物の構造は¹H NMRにより確認し、次の反応に用いた。

[0076] (4) oligoether imidazolium hydroxide (4b) 及び OE₂imC₂OE₃C の合成

合成した imidazolium p-toluenesulfonate を H₂O/MeOH（1/3 : w/w）溶媒 400 mL に溶解させ、1 L ビンへ移した。その後、過剰のアニオン交換樹脂（Amberlite IRN-78、交換容量 1.1 eq/L）27 mL を加え、室温で 10 日間攪拌して oligoether imidazolium hydroxide を生成した。

最後に、OE₂imC₂OE₃C の合成を行った。アニオン交換後、濾紙（5C, ADVANTEC）を用いてアニオン交換樹脂を除去し、50 mL ナスフ

ラスコに反応溶液を移した。得られた反応溶液を濃縮し、中和反応及び $\text{OEt}_2\text{imC}_2\text{OE}_3\text{C}$ の生成反応を進行させた。その後、生成物を含む 50 mL ナスフラスコにジエチルエーテルを加えて洗浄を行った (30 mL, 1 day, 3 times)。洗浄後、減圧乾燥して液状の生成物を得た。純度は 98% であり、収率は、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate に対して約 50% であった。

[0077] ^1H NMR (400 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) δ = 2.428 (2H, t, J = 10.8 Hz, CH_2COO), 3.354 (3H, s, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.498–3.654 (6H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ and $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 3.782 (2H, t, J = 11.6 Hz, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.875 (2H, t, J = 9.6 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 4.474 (2H, t, J = 9.6 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 4.563 (2H, t, J = 9.2 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 7.242 and 7.395 (1H, m, NCHCHN), 10.659 (1H, s, NCHN).

Mass spectrometry with fast atom bombardment ionization: in positive mode m/z = 375.2129 ($\text{M}+\text{H}^+$, found) and 375.2131 (calculated); and in negative mode, m/z = 373.1977 ($\text{M}-\text{H}^+$ found) and 373.1975 (calculated).

[0078] 合成例 9 ($\text{C}_2\text{imOE}_3\text{C}$ ($\text{R}^1=\text{C}_2\text{H}_5$, $\text{A}=\text{イミダゾリウムカチオン}$, $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{R}^3=\text{CH}_2\text{CH}_2$, $n=3$, $\text{B}=-\text{COO}^-$) の合成)

[原料]

tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate は Angene 社より購入した。p-tolu

enesulfonyl chloride、sodium hydroxide、ジエチルエーテルは東京化成工業株式会社より購入した。1-エチルイミダゾール、トルエン、ジクロロメタン、メタノール、chloroform-d₁, 99.8 atom% D with 0.03 vol% TMS、Dimethyl sulfoxide-d₆, 99.9 atom % D with 0.03 vol% TMSは関東化学株式会社より購入した。hydrochloric acidはFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporationより購入した。Amberlite LRN-78, ion exchange resin, nuclear gradeはAlfa Aesar社より購入した。

[0079] (1) p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) の合成

50 mL のナスフラスコに tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate 3.7 g を入れ、ジクロロメタン (DCM) 40 mL を加えて溶解させた。その後、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate に対して 6 equiv. (モル当量) の NaOH 3.8 g を加えた。さらに、ナスフラスコを氷冷し、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate に対して 1.5 equiv. の p-toluenesulfonyl chloride 5.0 g を少しずつ滴下した。全量滴下後、室温で 34 時間攪拌して反応させ、濾紙 (5C, ADVANTEC) を用いて固体不純物を除去した。濾過後の生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填した。その後、水を加え、ナトリウム濃度計を用いて水層のナトリウム濃度を測定し、ナトリウム濃度が実測値で 0 ppm を示すまで分液操作を行った。分液後、DCM 層を減圧乾燥して p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) を得た (性状: 液体)。

[0080] (2) p-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a)

の合成

200 mL ナスフラスコに *p*-toluenesulfonyl PEG 4 *tert*-butyl ester を入れ、*p*-toluenesulfonyl PEG 4 *tert*-butyl ester に対して過剰量の 36% HCl aq. 9.0 g を加え、室温で 3 時間攪拌して反応させ、生成物を含む反応溶液を DCM に溶解させ、分液ロートに充填した。その後、水を加え、pH 試験紙を用いて pH を測定し、水層の pH が 6 を示すまで分液操作を行った。分液後、減圧乾燥した DCM 層を 300 mL ナスフラスコへ移し、過剰量の水 100 mL を加え、60°C で 1 時間攪拌して未反応 *p*-toluenesulfonyl chloride を分解させた。反応溶液を DCM に溶解させ、分液ロートに充填して水を加え、pH 試験紙を用いて pH を測定し、水層の pH が 6 を示すまで分液操作を行った。分液後、DCM 層を減圧乾燥して *p*-toluenesulfonyl PEG 4 acid (2a) を得た（性状：液体、収率：初期原料投入量に対して 20%）。

[0081] (3) ethylimidazolium *p*-toluenesulfonate (3a) の合成

50 mL ナスフラスコに *p*-toluenesulfonyl PEG 4 acid を入れ、トルエン 10 mL を加えて溶解させた。さらに、ナスフラスコを氷冷し、*p*-toluenesulfonyl PEG 4 acid に対して 1.05 equiv. の 1-エチルイミダゾール 0.27 g を少しずつ滴下した。全量滴下後、還流冷却器を用いて 80°C で 20 時間反応させ、未反応物を含む上層と生成物を含む下層に層分離させた。上層をデカンテーションで廃棄し、生成物を含む下層にジエチルエーテルを加えて洗浄を行った（20 mL, 1 h, 3 times）。洗浄後、減圧乾燥して ethylimidazolium *p*-toluenesulfonate (3a) を得た（性状：液体）。

[0082] (4) ethylimidazolium hydroxide (4a) お

よび C_2imOE_3C の合成

110 mL バイアルに *ethylimidazolium p-toluenesulfonate* を入れ、メタノール 70 mL を加えて溶解させた。さらに、強アニオン交換樹脂 *Amberlite IRN-78* (交換容量 1.1 eq./L) 9 mL を加えて室温で 5 日間攪拌して *ethylimidazolium hydroxide* (4a) を生成させた。反応溶液を 50 mL フラスコに濃縮し、中和反応を進行させた。その後、生成物を含むナスフラスコにジエチルエーテルを加えて洗浄を行った (20 mL, 30 min, 3 times)。洗浄後、減圧乾燥して C_2imOE_3C を得た (性状: 液体)。

[0083] C_2imOE_3C : ^1H NMR (400 MHz; DMSO; Me_4Si) δ = 1.380 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, NCH_2CH_3), 1.970 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, CH_2COO), 3.325–3.497 (10H, m, $NCH_2H_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2COO$), 3.750 and 4.320 (2H, t, $J = both\ 5.0$ Hz, $NCH_2CH_2OCH_2$), 4.199 (2H, q, NCH_2CH_3), 7.747 and 7.826 (1H, m, $NCHCHN$), 9.613 (1H, s, $NCHN$).

[0084] 合成例 10 ($AimOE_3C$ ($R^1 = -CH_2-CH=CH_2$, $A =$ イミダゾリウムカチオン, $R^2 = CH_2CH_2$, $R^3 = CH_2CH_2$, $n = 3$, $B = -COO^-$) の合成)

[原料]

tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate は Angene 社より購入した。*p-toluenesulfonyl chloride*、*sodium hydroxide*、ジエチルエーテルは東京化成工業株式会社より購入した。1-アリルイミダゾール、トルエン、ジクロロメタン、メタノール、*chloroform-d1*, 99.8 atom% D with 0.03 vol% TMS、*Dimethyl sulfoxide-d6*, 99.9 atom% D

with 0.03 vol% TMSは関東化学株式会社より購入した。hydrochloric acidはFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporationより購入した。Amberlite IRN-78, ion exchange resin, nuclear gradeはAlfa Aesar社より購入した。

[0085] (1) p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) の合成

50 mLのナスフラスコにtert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate 3.0 gを入れ、DCM 30 mLを加えて溶解させた。その後、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して3.7 equiv. (モル当量) のNaOH 1.6 gを加えた。さらに、ナスフラスコを氷冷し、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して1.3 equiv. のp-toluenesulfonyl chloride 2.6 gを少しずつ滴下した。全量滴下後、室温で24時間攪拌して反応させ、濾紙(5C, ADVANTEC)を用いて固体不純物を除去した。濾過後の生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填した。その後、水を加え、ナトリウム濃度計を用いて水層のナトリウム濃度を測定し、ナトリウム濃度が実測値で0 ppmを示すまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥してp-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) を得た(性状: 液体)。

[0086] (2) p-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a) の合成

200 mLナスフラスコにp-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl esterを入れ、p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl esterに対して過剰量の36% HCl aq. 9.0 gを加え、室温で3時間攪拌して反応させ、生

成物を含む反応溶液をDCMに溶解させ、分液ロートに充填した。その後、水を加え、pH試験紙を用いてpHを測定し、水層のpHが6を示すまで分液操作を行った。分液後、減圧乾燥したDCM層を300mLナスフラスコへ移し、過剰量の水100mLを加え、60℃で1時間攪拌して未反応p-toluenesulfonyl chlorideを分解させた。反応溶液をDCMに溶解させ、分液ロートに充填して水を加え、pH試験紙を用いてpHを測定し、水層のpHが6を示すまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥してp-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a)を得た（性状：液体、収率：初期原料投入量に対して39%）。

[0087] (3) allylimidazolium p-toluenesulfonate (3b) の合成

50mLナスフラスコにp-toluenesulfonyl PEG4 acid 1.16gを入れ、トルエン10mLを加えて溶解させた。さらに、ナスフラスコを氷冷し、p-toluenesulfonyl PEG4 acidに対して1.1equiv. の1-アリルイミダゾール0.36gを少しずつ滴下した。全量滴下後、還流冷却器を用いて80℃で21時間反応させ、未反応物を含む上層と生成物を含む下層に層分離させた。上層をデカンテーションで廃棄し、生成物を含む下層にジエチルエーテルを加えて洗浄を行った（20mL, 1h, 3times）。洗浄後、減圧乾燥してallylimidazolium p-toluenesulfonate (3b)を得た（性状：液体）。

[0088] (4) allylimidazolium hydroxide (4b) 及びAimOE₃Cの合成

110mLバイアルにallylimidazolium p-toluenesulfonateを入れ、メタノール80mLを加えて溶解させた。さらに、強アニオン交換樹脂Amberlite IRN-78（交換容量1.1eq./L）11mLを加えて室温で6日間攪拌してallyli

imidazolium hydroxide (4b) を生成させた。反応溶液を50mLフラスコに濃縮し、中和反応を進行させた。その後、生成物を含むナスフラスコにジエチルエーテルを加えて洗浄を行った(20mL, 30min, 3times)。洗浄後、減圧乾燥して AimOE_3C を得た(性状: 液体)。

[0089] AimOE_3C : ^1H NMR (400MHz; DMSO; Me_4Si) δ = 2.009 (3H, t, J = 7.0Hz, CH_2COO), 3.390–3.548 (10H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 3.797 and 4.380 (2H, t, J = 5.0 and 4.8Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$), 4.915 (2H, d, $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.249–5.357 (2H, m, $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$), 6.016–6.114 (1H, m, $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2$), 7.775 and 7.823 (1H, m, NCHCHN), 9.656 (1H, s, NCHN).

[0090] 合成例11 (VimOE_3C (($\text{R}^1 = -\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{A} = \text{イミダゾリウムカチオン}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{R}^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2$, $n = 3$, $\text{B} = -\text{COO}^-$)) 前駆体-Vinylimidazolium p-toluenesulfonateの合成)

[原料]

tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateはAngene社より購入した。p-toluenesulfonyl chloride、sodium hydroxide、ジエチルエーテルは東京化成工業株式会社より購入した。1-ビニルイミダゾール、トルエン、ジクロロメタン、メタノール、 chloroform-d_1 , 99.8atom% Dwith 0.03vol%TMS、Dimethyl sulfoxide- d_6 , 99.9atom% Dwith 0.03vol%TMSは関東化学株式会社より購入した。hydrochloric acidはFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporationより購入した。Amberlite

IRN-78, ion exchange resin, nuclear gradeはAlfa Aesar社より購入した。

[0091] (1) p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) の合成

50 mLのナスフラスコにtert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoate 3.0 gを入れ、DCM 30 mLを加えて溶解させた。その後、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して3.7 equiv. (モル当量) のNaOH 1.6 gを加えた。さらに、ナスフラスコを氷冷し、tert-butyl 12-hydroxy-4, 7, 10-trioxadodecanoateに対して1.3 equiv. のp-toluenesulfonyl chloride 2.6 gを少しずつ滴下した。全量滴下後、室温で24時間攪拌して反応させ、濾紙(5C, ADVANTEC)を用いて固体不純物を除去した。濾過後の生成物を含む反応溶液を分液ロートに充填した。その後、水を加え、ナトリウム濃度計を用いて水層のナトリウム濃度を測定し、ナトリウム濃度が実測値で0 ppmを示すまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥してp-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl ester (1a) を得た(性状: 液体)。

[0092] (2) p-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a) の合成

200 mLナスフラスコにp-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl esterを入れ、p-toluenesulfonyl PEG4 tert-butyl esterに対して過剰量の36% HCl aq. 9.0 gを加え、室温で3時間攪拌して反応させ、生成物を含む反応溶液をDCMに溶解させ、分液ロートに充填した。その後、水を加え、pH試験紙を用いてpHを測定し、水層のpHが6を示すまで分液操作を行った。分液後、減圧乾燥したDCM層を300 mLナスフラスコ

へ移し、過剰量の水100mLを加え、60℃で1時間攪拌して未反応p-toluenesulfonyl chlorideを分解させた。反応溶液をDCMに溶解させ、分液ロートに充填して水を加え、pH試験紙を用いてpHを測定し、水層のpHが6を示すまで分液操作を行った。分液後、DCM層を減圧乾燥してp-toluenesulfonyl PEG4 acid (2a)を得た（性状：液体、収率：初期原料投入量に対して39%）。

[0093] (3) vinylimidazolium p-toluenesulfonate (3c) の合成

50mLナスフラスコにp-toluenesulfonyl PEG4 acid 0.5gを入れ、トルエン10mLを加えて溶解させた。さらに、ナスフラスコを氷冷し、p-toluenesulfonyl PEG4 acidに対して1.2equiv. の1-ビニルイミダゾール0.15gを少しずつ滴下した。全量滴下後、還流冷却器を用いて80℃で17時間反応させ、未反応物を含む上層と生成物を含む下層に層分離させた。上層をデカンテーションで廃棄し、生成物を含む下層にジエチルエーテルを加えて洗浄を行った（20mL, 1h, 3times）。洗浄後、下減圧乾燥してvinylimidazolium p-toluenesulfonate (3b)を得た（性状：液体）。

[0094] Vinylimidazolium p-toluenesulfonate: ^1H NMR (400MHz; DMSO; Me_4Si) δ =2.286 (3H, s, CHCCH_3), 2.430 (2H, t, $J=6.4$, CH_2COOH), 3.465–3.631 (10H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.798 and 4.379 (2H, t, $J=\text{both } 5.0\text{ Hz}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$), 5.431 (1H, dd, $J=2.8$ and 2.4 Hz , NCHCH_2), 5.963 (1H, dd, $J=2.4\text{ Hz}$, NCHCH_2), 7.121 and 7.490 (2H, d, $J=\text{both } 7.6\text{ Hz}$, $\text{SO}_2\text{CHCHCCH}_3\text{CHCH}$),

7. 274 – 7. 350 (1H, m, NCHCH₂), 7. 880 and 8. 199 (1H, m, NCHCHN), 9. 408 (1H, s, NCHN), 12. 181 (1H, s, CH₂COOH).

[0095] (細胞の培養)

ヒトメラノーマ繊維芽細胞 (MAF1) : ルシフェラーゼおよび／または蛍光蛋白 (mEGFP or mCherry) が導入されたMAF1は、Erik Sahai教授 (France-Click Institute) から供与された細胞を使用した。

マウスメラノーマ細胞 (5555) : 同上

ヒト腎臓細胞 (BOSC) : BOSCは、松田道幸教授 (京都大学) から供与された細胞を使用した。

細胞は、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシンーアンフォテリシンB懸濁液 (富士フィルム和光株式会社) を含む培地 (レグルタミンおよびフェノールレッドを含む高グルコース、富士フィルム和光株式会社) を用いて、37℃、加湿された5%CO₂雰囲気中で培養した。トリプシン溶液 (0.5w/v%トリプシンー5.3mmol/L EDTA・4Na溶液、フェノールレッド不含、富士フィルム和光社製) で小分けした。

[0096] (一細胞の保存実験と保存前後における生存する細胞の割合)

1.0×10⁶個の細胞を1.5mLチューブに集め、遠心した (100g、室温で5分間)。上清を除去した後、100μLのCPA溶液C (双性イオン／DMSO／EG／水の混合溶液) を加えてピペティングした。得られたサンプルは直ちに−25℃の冷蔵庫で3～30日間保存した。1mLの培地とともに37℃で解凍し、遠心分離 (100G、5分間、室温) した。上清を除去後、トリパンプルー (富士フィルム和光純薬株式会社製) を用い、血球計数装置 (深江化成株式会社製、ワトソン株式会社製) を用いて細胞生存率をカウントした。

一般にある細胞集団において全細胞中における生存している細胞の割合を生存率という場合があるが、死細胞のカウントが難しく同じ細胞集団を継続

的に観察するとばらつきが大きくなることが多いため、本明細書においては保存前後における生存する細胞数により冷蔵保存効果を評価した。この値を細胞回収率、あるいは単に回収率と記す場合がある。

保存前後における生存する細胞の割合
＝細胞回収率（％）
＝（保存後の生細胞数（サンプル））／（保存前の細胞数（サンプル））×
100

[0097] （一細胞に対する培地の毒性）

1. 0×10^6 個の細胞を1.5 mLチューブに集め、遠心した（100 G、室温で5分間）。上清を除去した後、100 μ LのCPA溶液を加えてピペティングした。37℃1時間培養後、血球計数器とトリパンブルーを用いて細胞生存率を数えた。

[0098] （スフェロイド）

スフェロイドはハンギングドロップ法により調製した。スフェロイドを得るために培養した2. 0×10^6 個の細胞に、培地及び1 mLの1.2 w/v %メチルセルロース（シグマアルドリッチ社）／DMEM（富士フイルム和光株式会社）を加えて2 mLとし、培養プレートの蓋の裏に20 μ L滴下した。その後培養プレート本体をPBS（富士フイルム和光株式会社）で満たし、培養プレートの蓋をした。細胞は、37℃、5%CO₂雰囲気加湿されたインキュベーター内にて静置培養し、スフェロイドを得た。

[0099] （スフェロイドの保存実験と保存前後における生存する率の測定）

4個のスフェロイドを1.5 mLのチューブに集め、1 mLのPBSで洗浄した。上清を除去した後、100 μ Lの被検溶液を加えた。サンプルは-25℃の冷蔵庫で3～30日間保存した。保存後、37℃の培地を1 mL加え、上清を除いた。1 mLのPBSで3分間洗浄し、上清を除去した。50 μ Lのトリプシン溶液を加え、37℃で30分間インキュベートした。50 μ Lの培地を加え、ピペティングでスフェロイドを崩壊させた。10 μ Lの細胞懸濁液を1.5 mLチューブに加え、10 μ Lのトリパンブルー（富

士フィルム和光)と混合した。スフェロイド由来の細胞の生存は、血球計数器を用いてカウントし、以下の式を用いて計算した。保存前後におけるスフェロイドを構成して生存する細胞数からスフェロイドの細胞回収率を求めた。単に細胞回収率あるいは回収率と記す場合がある。

保存前後におけるスフェロイドを構成する生存していた細胞の割合

=スフェロイドの細胞回収率 (%)

= (スフェロイドに由来する保存後の生細胞数 (サンプル)) / (スフェロイドに由来する保存前の細胞数 (サンプル)) × 100

[0100] 37℃、5%CO₂雰囲気で加湿されたインキュベーター内にて、回収したスフェロイドを24時間培養した。そのときの培地は10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン-アンフォテリシンB懸濁液(富士フィルム和光株式会社)を含む培地(レグルタミンおよびフェノールレッドを含む高グルコース、富士フィルム和光株式会社)を用いた。24時間後のスフェロイドの細胞回復率は、以下の式で算出した。細胞数は上記と同様にトリプシンで細胞を崩壊させて評価した。

細胞回復率 (%) = (24時間培養後の生細胞数 (サンプル)) / (24時間培養後の生細胞数 (非凍結)) × 100

[0101] (スフェロイドへの毒性)

4個のスフェロイドを1.5mLのチューブに集め、1mLのPBSで洗浄した。上清を除去した後、100μLの溶液を加えた。その後、血球計数器とトリパンプルーを用いてスフェロイドの細胞回収率をカウントした。

[0102] (DSC)

示差走査熱量計(DSC60-A; 島津製作所)を用いて溶液の融点と凝固点を測定した。溶液(10μL)をアルミパンに加え、熱量計の試料室にセットした。試料は1℃/分で-100℃まで冷却し、5℃/分で25℃まで昇温した。

[0103] (過冷却の確認)

DSCの結果から、過冷却になっているかを判断した。

[0104] (F T - I R)

赤外 (I R) スペクトルの測定にはニコレット 10 (Thermo Fisher scientific) を用いた。

[0105] (実施例 1)

(O E₂ i m C₃ C / D M S O / E G の物性評価)

組成物は、

O E ₂ i m C ₃ C	10 質量部
D M S O	5 質量部
E G	5 質量部
水	80 質量部
合計	100 質量部

のように調製し、D M S O と E G の比率が 1 : 1 となるように製造した。具体的には、O E₂ i m C₃ C / D M S O / E G の質量比率は、10 / 5 / 5、10 / 10 / 10、10 / 15 / 15、10 / 20 / 20、10 / 25 / 25 であり、これは組成物を表 1 に示した。

[0106] (T m, T f, 凍結状態、過冷却の結果)

D S C により、T m 及び T f を測定した。D S C チャートを図 1 に、凝固点 (T f / °C) 及び融点 (T m / °C) を表 1 に示した。

また、保存温度 (-25 °C) において、凍結があったかどうか (凍結しない○、凍結下×、ロットにより異なった△)、過冷却があったかどうかについて、表 1 にまとめた。

[0107]

[表1]

実施例	双性イオン化合物(A)		添加剤(X)		重量比			物理化学的性状				生物学的評価				
	枝番	A1	X1	X2	A1	X1	X2	水	Tf ／℃	Tm ／℃	凍結 ○ なし × あり	過冷却 ○ なし × あり	スフェロイド	保存温度 ／℃	保存日数 ／日	生存率 ／％
1	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	80	-27	-3	×	×	MAF1	-25	3	3.5
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70	-31	-10	△	×	MAF1	-25	3	64.8
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	60	-39	-20	△	×	MAF1	-25	3	97.3
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50	-62	-35	○	○	MAF1	-25	3	104.8
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	40	<-100	<-100	○	○	MAF1	-25	3	64.4
	6	OE ₂ imC ₃ C	—	—	10	—	—	90					MAF1	-25	3	0.2
	7	(DAP213)											MAF1	-25	3	75.0
	8	(Culture Sure)											MAF1	-25	3	64.4
2		C ₁ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					MAF1	-25	20	73.0
	3	C ₄ imC ₃ S	DMSO	EG	10	20	20	50					MAF1	-25	20	43.3
		OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					MAF1	-25	20	98.9

[0108] (非凍結保存の効果)

組成物の比を変えてMAF1スフェロイドを -25°C で3日間保存し、保存後の細胞回収率(recovery)と生存率(viability)を調べた。

結果を表1及び図2に示す。保存温度においてTmを持たず目視でも凍結が見られず過冷却もない組成物において良好な結果が得られた。

なお、この場合の生存率(viability)は、評価する試料において(評価する細胞群のうち生きている細胞数) / (評価する細胞群のうち生きている細胞数 + 評価する細胞群のうち死んでる細胞) $\times 100\%$ で表される。

[0109] (実施例2) $\text{C}_1\text{i m C}_3\text{C} / \text{DMSO} / \text{EG}$ の物理化学的性状及び生物学的評価

実施例1において、 $\text{O E}_2\text{i m C}_3\text{C}$ の代わりに $\text{C}_1\text{i m C}_3\text{C}$ を用いた組成物を調製し、MAF1スフェロイドを -25°C で20日間保存し、保存後の物理化学的性状および生物学的評価を行った。結果を表1及び図3に示す。

なお、表1中、実施例番号を付与していないが、 $\text{O E}_2\text{i m C}_3\text{C} / \text{DMSO} / \text{EG}$ (10 / 20 / 20) の組成物を用いて、同様の実施を行った結果も表1及び図3に示す。

(実施例3) $\text{C}_4\text{i m C}_3\text{S} / \text{DMSO} / \text{EG}$ の物性評価

実施例2において、 $\text{C}_1\text{i m C}_3\text{C}$ の代わりに $\text{C}_4\text{i m C}_3\text{S}$ (20 / 20 / 20) の組成物を用いてMAF1スフェロイドを -25°C で20日間保存したときの回収率と生存率を表1及び図3に示す。生存率の考え方は実施例2と同様な方法で計算した。

[0110] (参考例1、2)

$\text{O E}_2\text{i m C}_3\text{C} / \text{DMSO}$ (添加剤(X)が1種のみ) の物性評価

(1) $\text{O E}_2\text{i m C}_3\text{C} / \text{DMSO}$ からなる組成物においてMAF1を -25°C で3日間保存した後の回収率について、組成物が保存温度で固体(S)になると回復率が悪くなることを表2及び図4に示す。

(2) $\text{O E}_2\text{i m C}_3\text{C} / \text{DMSO}$ からなる組成物において、10 / 10、10 / 20、10 / 30、10 / 40、10 / 50の組成物を作製し、MAF1

スフェロイドを -25°C で3日間保存した後の回収率を図5に示す。

双性イオンと添加剤の比は $10/40$ であり、実施例2, 3で標準的に用いられている $10/20/20$ の時と、双性イオンと添加剤の比は変わらないが、生存率、回収率が悪い。これは、EGを添加することでDMSOの濃度が相対的に低下したことが一つの理由ではないかと考えている。

[0111]

[表2]

参考例	枝番	双性イオン化合物(A)	添加剤(X)		重量比				物理化学的性状				生物学的評価			
			X1	X2	A1	X1	X2	A1	Tf /°C	Tm /°C	凍結 ○ なし × あり	過冷却 ○ なし × あり	スフェロイド	保存温度 /°C	保存日数 /日	生存率 /%
1	1	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	20	—	70			×		MAF1	-25	3	0.0
	2	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	20	—	70			×		MAF1	-25	3	0.6
	3	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	20	—	70			○		MAF1	-25	3	87.5
	4	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	30	—	60			○		MAF1	-25	3	103.1
	5	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	30	—	60			○		MAF1	-25	3	93.1
	6	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	30	—	60			×		MAF1	-25	3	1.9
2	1	OE ₂ ImC ₃ C	—	—	10	—	—	90			×		MAF1	-25	3	0.2
	2	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	10	—	80			×		MAF1	-25	3	0.2
	3	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	20	—	70			△		MAF1	-25	3	29.4
	4	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	30	—	60			△		MAF1	-25	3	66.0
	5	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	40	—	50			○		MAF1	-25	3	40.2
	6	OE ₂ ImC ₃ C	DMSO	—	10	50	—	40			○		MAF1	-25	3	1.5
	7	(DAP213) (Culture Sure)											MAF1	-25	3	104.6
												MAF1	-25	3	66.0	

[0112] (実施例4)

OE₂imC₃C/DMSO/EG(10/20/20)の組成物を用いてMAF1スフェロイドを-25℃で30日間保存したときの細胞回収率の推移を表3及び図6に示す。

[0113] (実施例5)

OE₂imC₃C/DMSO/EG(10/20/20)の組成物を用いて555スフェロイドを-25℃で30日間保存したときの細胞回収率の推移を表3及び図7に示す。

[0114] (実施例6)

OE₂imC₃C/DMSO/EG(10/20/20)の組成物を用いてBOSCスフェロイドを-25℃で30日間保存したときの細胞回収率の推移を表3及び図8に示す。

[0115]

[表3]

実施例	双性イオン化合物(A)	添加剤(X)			重量比				物理化学的性状			生物学的評価				
		X1	X2		A1	X1	X2	水	Tf /℃	Tm /℃	凍結 ○ なし × あり	過冷却 ○ なし × あり	スフェロイド	保存温度 /℃	保存日数 /日	生存率 /%
4	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					MAF1	-25	10	93.3
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					MAF1	-25	20	70.3
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					MAF1	-25	30	61.6
	4	(DAP213)											MAF1	-25	10	15.9
	5	(DAP213)											MAF1	-25	20	1.8
	6	(DAP213)											MAF1	-25	30	3.9
	7	(Culture Sure)											MAF1	-25	10	15.1
	8	(Culture Sure)											MAF1	-25	20	2.2
	9	(Culture Sure)											MAF1	-25	30	1.6
5	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					5555	-25	10	92.6
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					5555	-25	20	117.1
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					5555	-25	30	77.0
	4	(DAP213)											5555	-25	10	51.0
	5	(DAP213)											5555	-25	20	38.6
	6	(DAP213)											5555	-25	30	27.0
	7	(Culture Sure)											5555	-25	10	44.6
	8	(Culture Sure)											5555	-25	20	40.5
	9	(Culture Sure)											5555	-25	30	21.8
6	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					BOSC	-25	10	97.0
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					BOSC	-25	20	101.4
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50					BOSC	-25	30	57.7
	4	(DAP213)											BOSC	-25	10	66.0
	5	(DAP213)											BOSC	-25	20	47.0
	6	(DAP213)											BOSC	-25	30	26.3
	7	(Culture Sure)											BOSC	-25	10	45.1
	8	(Culture Sure)											BOSC	-25	20	46.7
	9	(Culture Sure)											BOSC	-25	30	19.1

[0116] (実施例7)

OE₂imC₃C/DMSO/EG (10/20/20) の組成物を用いてMAF1細胞を−25℃で30日間保存したときの細胞回収率の推移を表4及び図9に示す。

[0117] (実施例8)

OE₂imC₃C/DMSO/EG (10/20/20) の組成物を用いて555細胞を−25℃で30日間保存したときの細胞回収率の推移を表4及び図10に示す。

[0118] (実施例9)

OE₂imC₃C/DMSO/EG (10/20/20) の組成物を用いてBOSC細胞を−25℃で30日間保存したときの細胞回収率の推移を表4及び図11に示す。

[0119]

[表4]

実施例	双性イオン化合物(A)	添加剤(X)		重量比			物理化学的性状			生物学的評価							
		株番	A1	X1	X2	A1	X1	X2	水	Tf /℃	Tm /℃	凍結 ○ なし × あり	過冷却 ○ なし × あり	一細胞	保存温度 /℃	保存日数 /日	生存率 /%
7	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	5	80							MAF1	-25	10	8.8
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	5	70							MAF1	-25	30	7.3
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	70							MAF1	-25	10	4.3
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	70							MAF1	-25	30	15.1
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	60							MAF1	-25	10	49.3
	6	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	50							MAF1	-25	30	21.3
	7	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	40							MAF1	-25	10	31.5
	8	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	80							MAF1	-25	30	6.3
	9	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	50							MAF1	-25	10	0.0
	10	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	40							MAF1	-25	30	0.0
	11	(DAP213)												MAF1	-25	10	0.2
	12	(DAP213)												MAF1	-25	30	4.0
	13	(Culture Sure)												MAF1	-25	10	79.5
	14	(Culture Sure)												MAF1	-25	30	38.0
8	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	5	80							5555	-25	10	29.0
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	5	70							5555	-25	30	3.8
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	70							5555	-25	10	58.8
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	70							5555	-25	30	29.2
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	60							5555	-25	10	40.7
	6	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	50							5555	-25	30	27.0
	7	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	40							5555	-25	10	10.2
	8	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	80							5555	-25	30	12.3
	9	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	50							5555	-25	10	8.2
	10	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	40							5555	-25	30	3.7
	11	(DAP213)												5555	-25	10	13.3
	12	(DAP213)												5555	-25	30	6.0
	13	(Culture Sure)												5555	-25	10	61.3
	14	(Culture Sure)												5555	-25	30	31.8
9	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	5	80							BOSC	-25	10	46.2
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	5	70							BOSC	-25	30	44.2
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	70							BOSC	-25	10	48.0
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	70							BOSC	-25	30	45.8
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	60							BOSC	-25	10	84.8
	6	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	50							BOSC	-25	30	50.7
	7	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	40							BOSC	-25	10	43.0
	8	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	80							BOSC	-25	30	30.5
	9	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	50							BOSC	-25	10	62.2
	10	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	40							BOSC	-25	30	16.8
	11	(DAP213)												BOSC	-25	10	18.8
	12	(DAP213)												BOSC	-25	30	12.3
	13	(Culture Sure)												BOSC	-25	10	56.7
	14	(Culture Sure)												BOSC	-25	30	60.2

[0120] (参考例3)

双性イオン液体の代わりに0.9%NaClを用いた組成物によりMAF1スフェロイドを-25℃で30日間保存したときの回収率の推移を図12に示す。

[0121] (参考例4)

双性イオン液体の代わりにスクロースを用いた組成物によりMAF1スフェロイドを -25°C で30日間保存したときの回収率を測定したところ、凍結してしまい、回復率が低かった。

[0122] (参考例5)

MDA-MB-231細胞を10質量%OE₂imC₃C水溶液中で -80°C で保存したときの光学顕微鏡写真(図13中の右)、及びMAF1細胞のスフェロイドを培地中に常温保存したときの光学顕微鏡写真(図13中の左)を図13に示す。

図13の左から、スフェロイドは10~数百 μm 程度の直径の三次元の細胞塊であるため、凍結保存の状態で畝が発生するとスフェロイドが損傷し保存状態が悪くなる。また、図13の右から、50 μm 間隔で見える畝は氷の結晶であり、一細胞保存のときはこの畝の間に細胞が存在することができるため凍結保存が可能である。

[0123] (実施例10)

DMSO(20wt%)とEG(20wt%)に加えて、OE₂imC₃C、OE₂imC₃S、C₁imC₃C、C₁imC₃Sの各双性イオン化合物の組成物の割合を変えた異なる組成を含む被験溶液を用いてMAF1スフェロイドを -25°C で10日間保存し、各双性イオン化合物の組成物の割合を変えた時の細胞回収率の相異を調べた。結果を表5、図14に示した。

[0124]

[表5]

実施例		双性イオン化合物(A)	添加剤(X)		重量比			物理化学的性状			生物学的評価					
枝番		A1	X1	X2	A1	X1	X2	水	Tf /℃	Tm /℃	凍結 ○ なし × あり	過冷却 ○ なし × あり	一細胞	保存温度 /℃	保存日数 /日	生存率 /%
7	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	80					MAF1	-25	10	8.8
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	70					MAF1	-25	30	7.3
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70					MAF1	-25	10	4.3
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70					MAF1	-25	30	15.1
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	60					MAF1	-25	10	49.3
	6	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	50					MAF1	-25	30	21.3
	7	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	40					MAF1	-25	10	31.5
	8	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	80					MAF1	-25	30	6.3
	9	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	50					MAF1	-25	10	0.0
	10	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	40					MAF1	-25	30	0.0
	11	(DAP213)											MAF1	-25	10	0.2
	12	(DAP213)											MAF1	-25	30	4.0
	13	(Culture Sure)											MAF1	-25	10	79.5
	14	(Culture Sure)											MAF1	-25	30	38.0
8	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	80					5555	-25	10	29.0
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	70					5555	-25	30	3.8
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70					5555	-25	10	58.8
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70					5555	-25	30	29.2
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	60					5555	-25	10	40.7
	6	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	50					5555	-25	30	27.0
	7	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	40					5555	-25	10	10.2
	8	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	80					5555	-25	30	12.3
	9	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	50					5555	-25	10	8.2
	10	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	40					5555	-25	30	3.7
	11	(DAP213)											5555	-25	10	13.3
	12	(DAP213)											5555	-25	30	6.0
	13	(Culture Sure)											5555	-25	10	81.3
	14	(Culture Sure)											5555	-25	30	31.8
9	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	80					BOSC	-25	10	46.2
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	5	5	70					BOSC	-25	30	44.2
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70					BOSC	-25	10	48.0
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	10	10	70					BOSC	-25	30	45.8
	5	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	60					BOSC	-25	10	84.8
	6	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	15	15	50					BOSC	-25	30	90.7
	7	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	40					BOSC	-25	10	43.0
	8	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	80					BOSC	-25	30	30.5
	9	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	50					BOSC	-25	10	62.2
	10	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	25	25	40					BOSC	-25	30	16.8
	11	(DAP213)											BOSC	-25	10	18.8
	12	(DAP213)											BOSC	-25	30	12.3
	13	(Culture Sure)											BOSC	-25	10	56.7
	14	(Culture Sure)											BOSC	-25	30	60.2

[0125] (実施例11)

DMSO (20wt%) とEG (20wt%) に加えて、OE₂imC₃C、OE₂imC₃S、C₁imC₃C、C₁imC₃Sの各双性イオン化合物の組成物の割合を変えた異なる組成を含む被験溶液を用いてMAF1スフェロイドを0

℃で1時間処理し、各双性イオン化合物の組成物の割合を変えた時の細胞回収率の相異を調べた。結果を表6、図15に示した。

[0126]

[表6]

枝番	双性イオン化合物(A)	添加剤(X)		重量比			物理化学的性質				生物学的評価				
		X1	X2	A1	X1	X2	水	Tf /°C	Tm /°C	凍結 ○ なし × あり	過冷却 ○ なし × あり	スフェロイド	試験温度 /°C	試験時間 /hr	生存率 /%
14	1	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	5	20	20	55				MAF1	0	1	95.6
	2	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50				MAF1	0	1	97.7
	3	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	15	20	20	45				MAF1	0	1	38.1
	4	OE ₂ imC ₃ C	DMSO	EG	20	20	20	40				MAF1	0	1	10.2
15	1	OE ₂ imC ₃ S	DMSO	EG	5	20	20	55				MAF1	0	1	84.8
	2	OE ₂ imC ₃ S	DMSO	EG	10	20	20	50				MAF1	0	1	108.8
	3	OE ₂ imC ₃ S	DMSO	EG	15	20	20	45				MAF1	0	1	79.4
	4	OE ₂ imC ₃ S	DMSO	EG	20	20	20	40				MAF1	0	1	71.1
16	1	C ₁ imC ₃ C	DMSO	EG	5	20	20	55				MAF1	0	1	86.4
	2	C ₁ imC ₃ C	DMSO	EG	10	20	20	50				MAF1	0	1	72.3
	3	C ₁ imC ₃ C	DMSO	EG	15	20	20	45				MAF1	0	1	36.1
	4	C ₁ imC ₃ C	DMSO	EG	20	20	20	40				MAF1	0	1	4.5
17	1	C ₁ imC ₃ S	DMSO	EG	5	20	20	55				MAF1	0	1	18.8
	2	C ₁ imC ₃ S	DMSO	EG	10	20	20	50				MAF1	0	1	93.9
	3	C ₁ imC ₃ S	DMSO	EG	15	20	20	45				MAF1	0	1	90.1
	4	C ₁ imC ₃ S	DMSO	EG	20	20	20	40				MAF1	0	1	13.9

[0127] (実施例 1 2)

DMSO (20 wt %) と EG (20 wt %) に加えて、 OE_2imC_3C 、 OE_2imC_3S 、 C_1imC_3C 、 C_1imC_3S の各双性イオン化合物の組成物の割合を変えた異なる組成を含む被験溶液を用いて、MAF1 スフェロイドを $-85^{\circ}C$ で 30 日間保存したときの回収率を検討した。その結果、本発明の組成物用いれば、 $-85^{\circ}C$ においても凍結しない組合わせのあることを確認した。

産業上の利用可能性

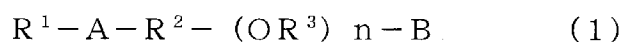
[0128] 本発明の非凍結保存用組成物を用いれば、保存温度において融点を持たず、ガラス化せず、過冷却を起こさず、 $-25^{\circ}C$ 以下においても凍結しないため、多細胞群を非凍結状態で保存できる。従って、多細胞群を用いる再生医療が工業的に可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 1種又は2種以上の非プロトン性双性イオン化合物（A）、及び成分（A）と相溶し得る2種類以上の添加剤（X）を含有する、多細胞群の非凍結保存用組成物。

[請求項2] 前記非プロトン性双性イオン化合物（A）が、一般式（1）

[化1]



（R¹は、炭素数1～8の直鎖アルキル基、炭素数2～8のアルケニル基、又はC₁～8直鎖アルキル-（OCH₂CH₂）_m-を示し；

Aは、双性イオンのカチオン部であり、イミダゾリウムカチオン、ホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオン、スルホニウムカチオン、ピラゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン、ピロリジニウムカチオン、モルホリニウムカチオン、シクロプロペニウムカチオン及びピペリジニウムカチオンから選ばれるカチオンを示し；

R²は、炭素数1～4のアルキレン基を示し；

R³は、炭素数2～4のアルキレン基を示し；

mは、1又は2の数を示し；

nは、0～10の数を示し；

Bは、-SO₃-, -COO-, -OP=O(H)O-, -OP=O(CH₃)O-, -OP=O(OR₄)O-, 及び-OP=O(OH)O-から選ばれるアニオンを示し；

R₄は炭素数1～8のヘテロ原子を有していても良いアルキル基を示す)

で表される非プロトン性双性イオン化合物である請求項1記載の非凍結保存用組成物。

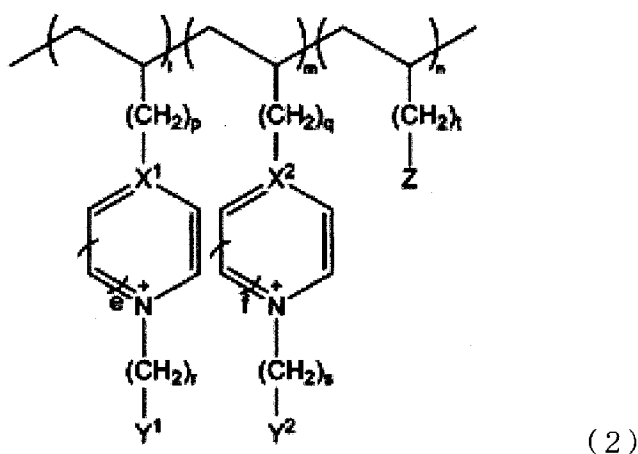
[請求項3] 前記添加剤Xが、

(i) 水酸基を有しない小分子化合物又は平面性を有する化合物、

(ii) 水酸基を1個以上有する化合物、

- (i i i) ペプチド又はタンパク質、
- (i v) 高分子化合物、
- (v) 界面活性剤、及び
- (v i) 次の一般式(2)で表される双性イオンポリマー又は双性イオンオリゴマーから選ばれる添加剤である、請求項1記載の非凍結保存用組成物。

[化2]



(式中、

X^1 及び X^2 は、同一でも異なってもよく、炭素原子又は窒素原子を示し；

Y^1 及び Y^2 は、同一でも異なってもよく、 $-COO-$ 、 $-SO_3-$ 、 $-OP=O(H)O-$ 、 $-OP=O(CH_3)O-$ 及び $-OP=O(OR^5)O-$ から選ばれるアニオンを示し(ここで、 R^5 は、水素原子又はメチル基を示す)；

Z は、水素原子、アルキル基が置換していてもよい炭素数6～10の芳香族炭化水素基、アルキル基が置換していてもよい5～6員の芳香族複素環式基、アルキル基が置換していてもよい窒素含有複素環式アンモニウム塩、テトラアルキルアンモニウム塩、テトラフェニルホスホニウム塩、テトラアルキルホスホニウム塩、トリアルキルスルホニウム塩、又は分子鎖中に1～3個の酸素原子を有していてもよい炭

素数 1 ～ 22 の直鎖又は分岐アルキル基を示し；

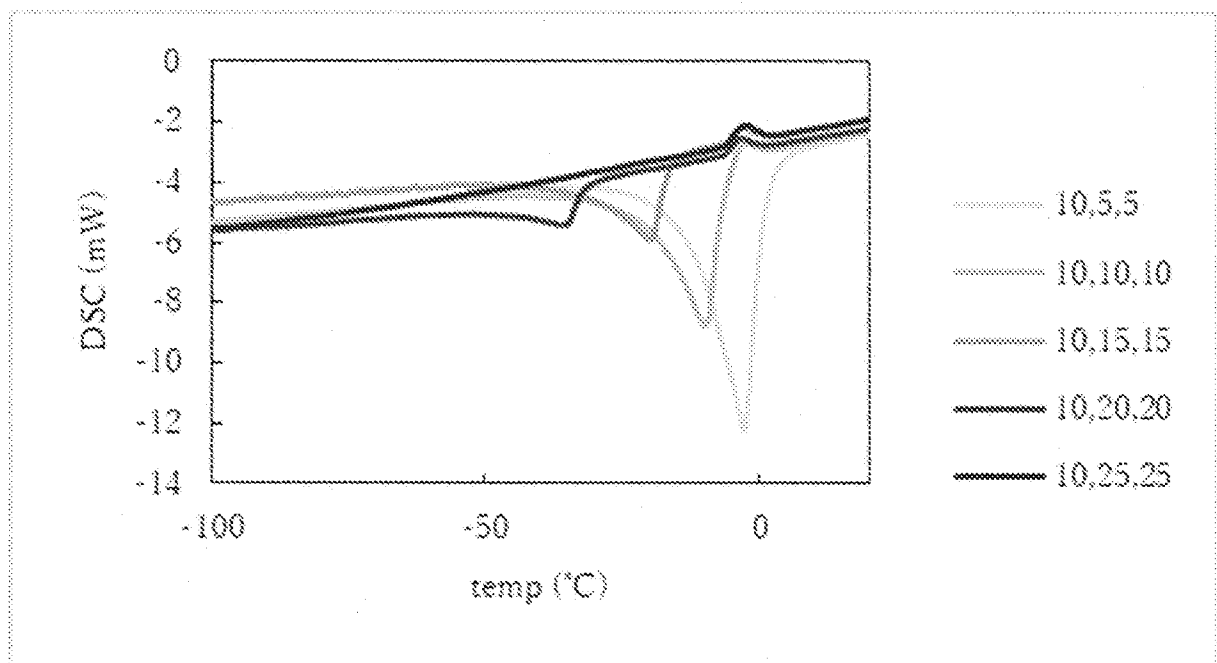
e 及び f は、それぞれ 0 又は 1 の整数を示し；

l、m 及び n は、それぞれ各繰り返し単位の含有比率を示す数であって、 $0 < l \leq 1$ 、 $0 \leq m < 1$ 、 $0 \leq n < 1$ 、 $l + m + n = 1$ を満たす数を示し；

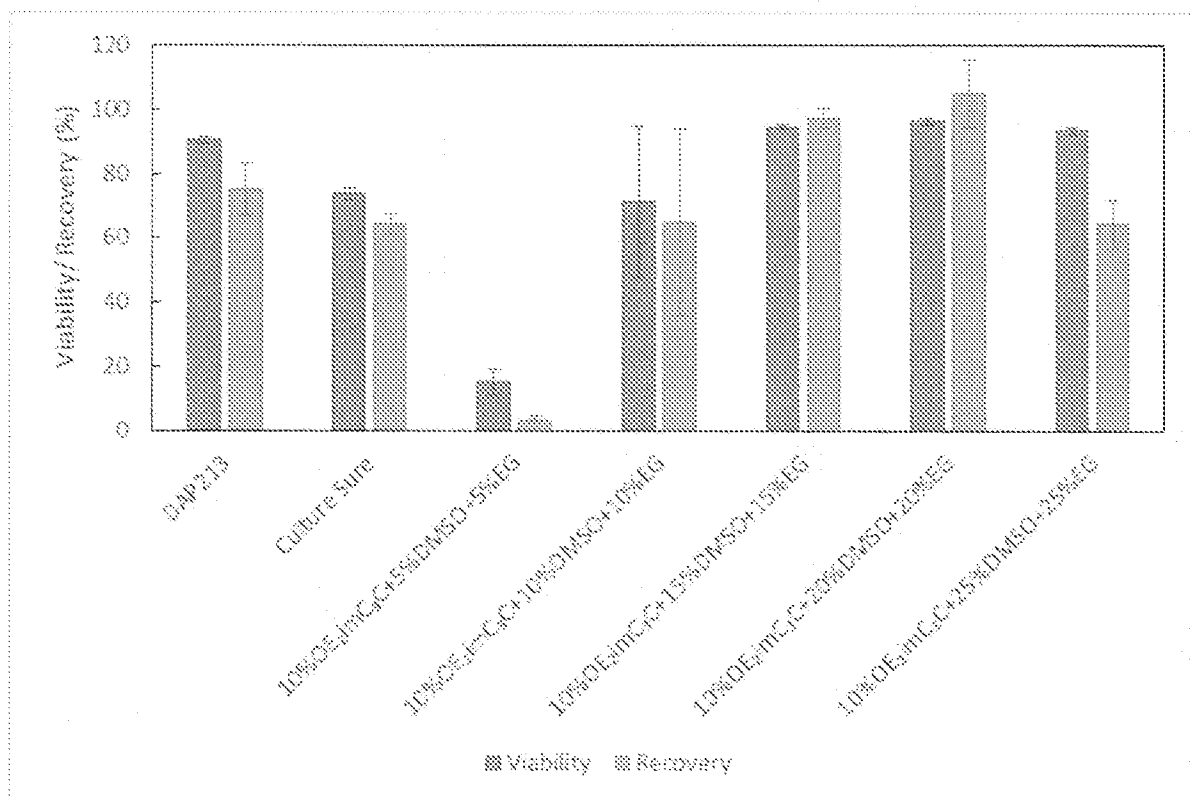
p、q、r、s 及び t は、それぞれ 0 ～ 6 の整数を示す)

[請求項4] 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の組成物を用いる、多細胞群を非凍結下で保存する方法。

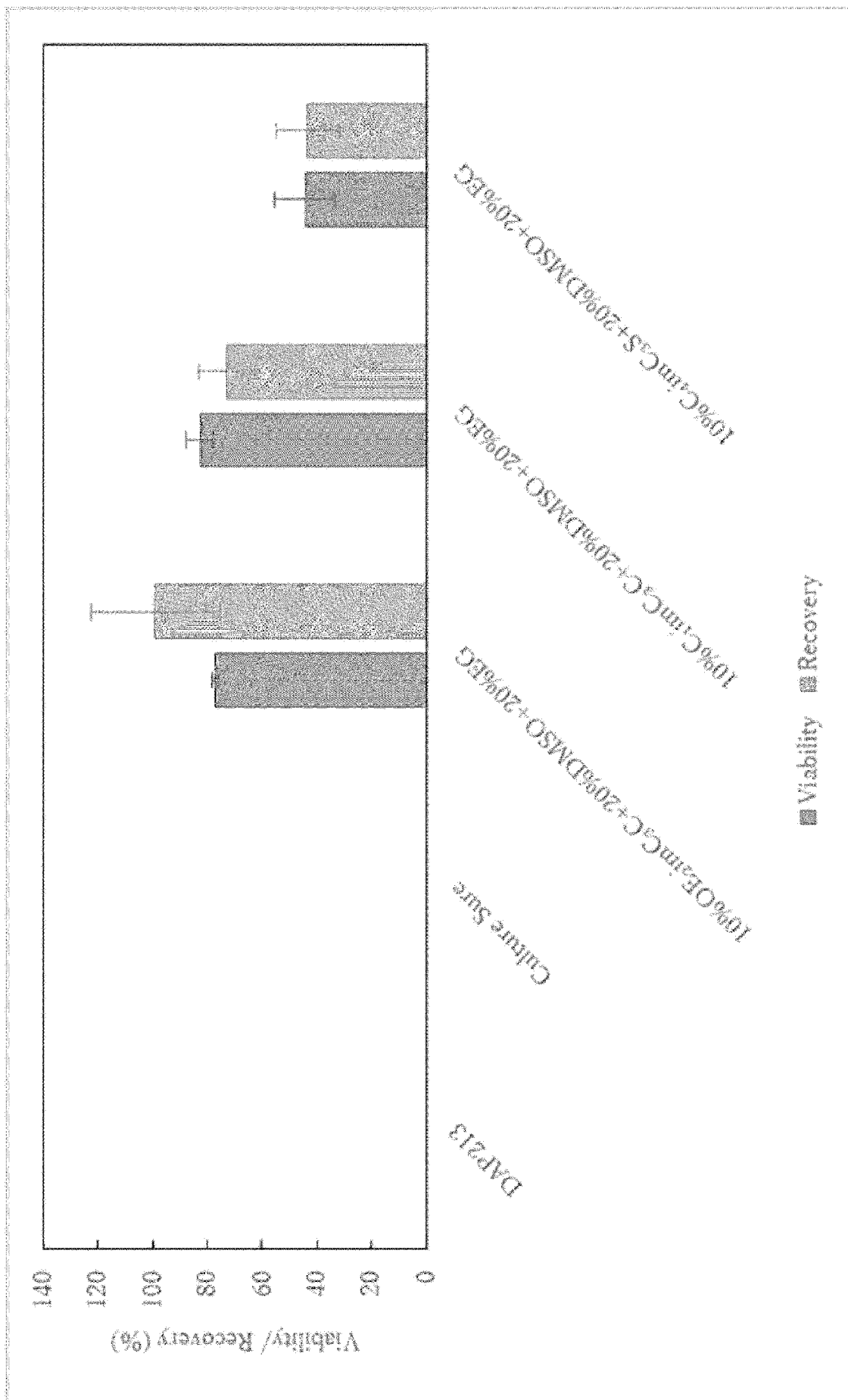
[図1]



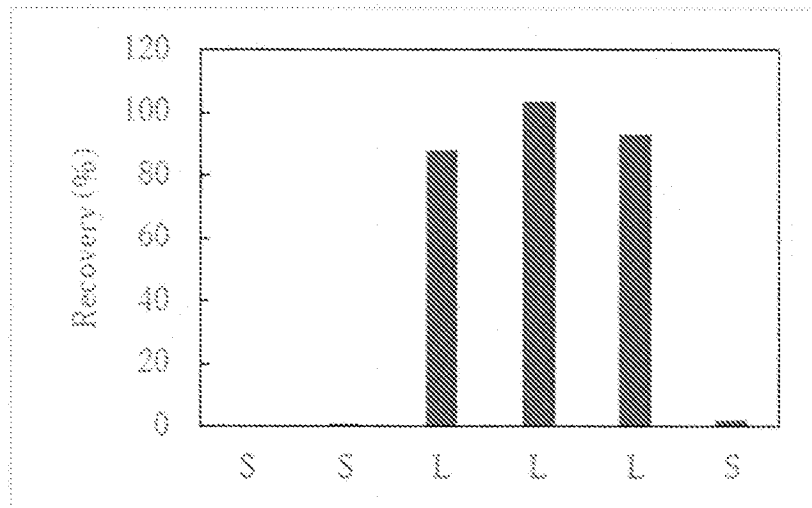
[図2]



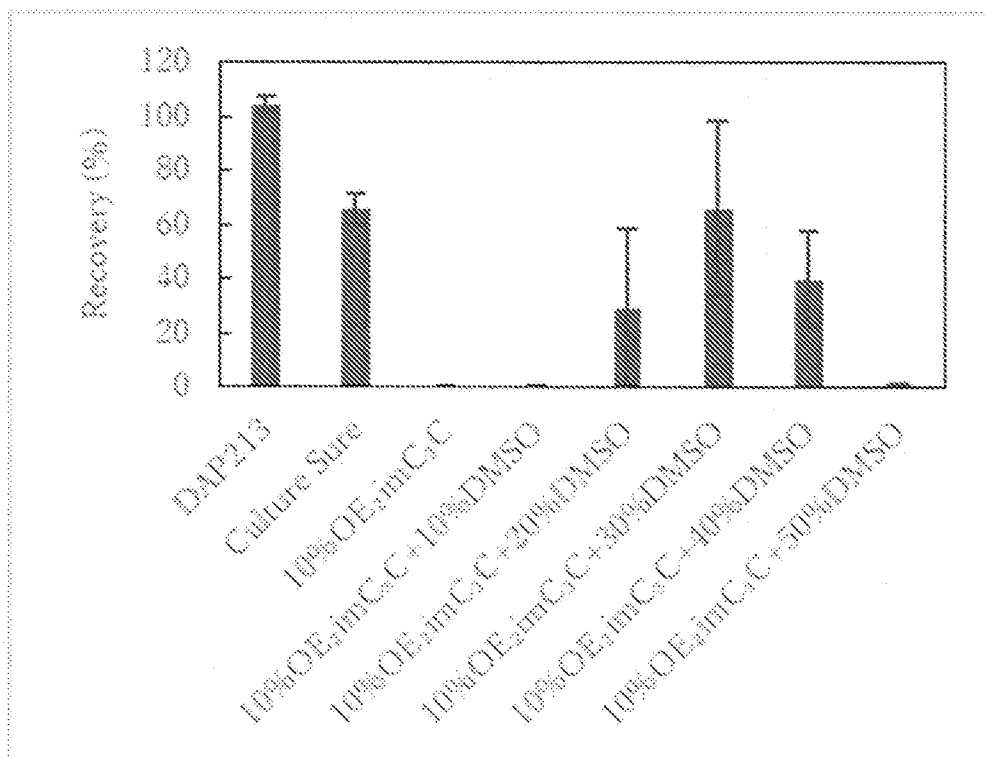
[図3]



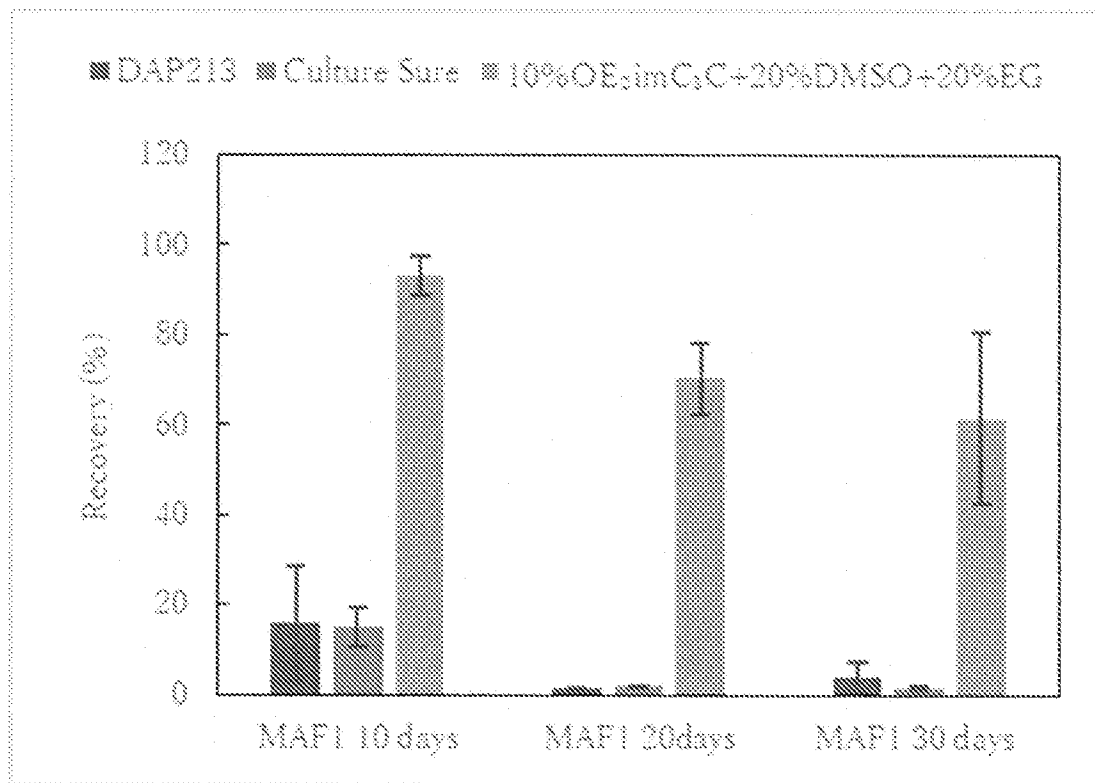
[図4]



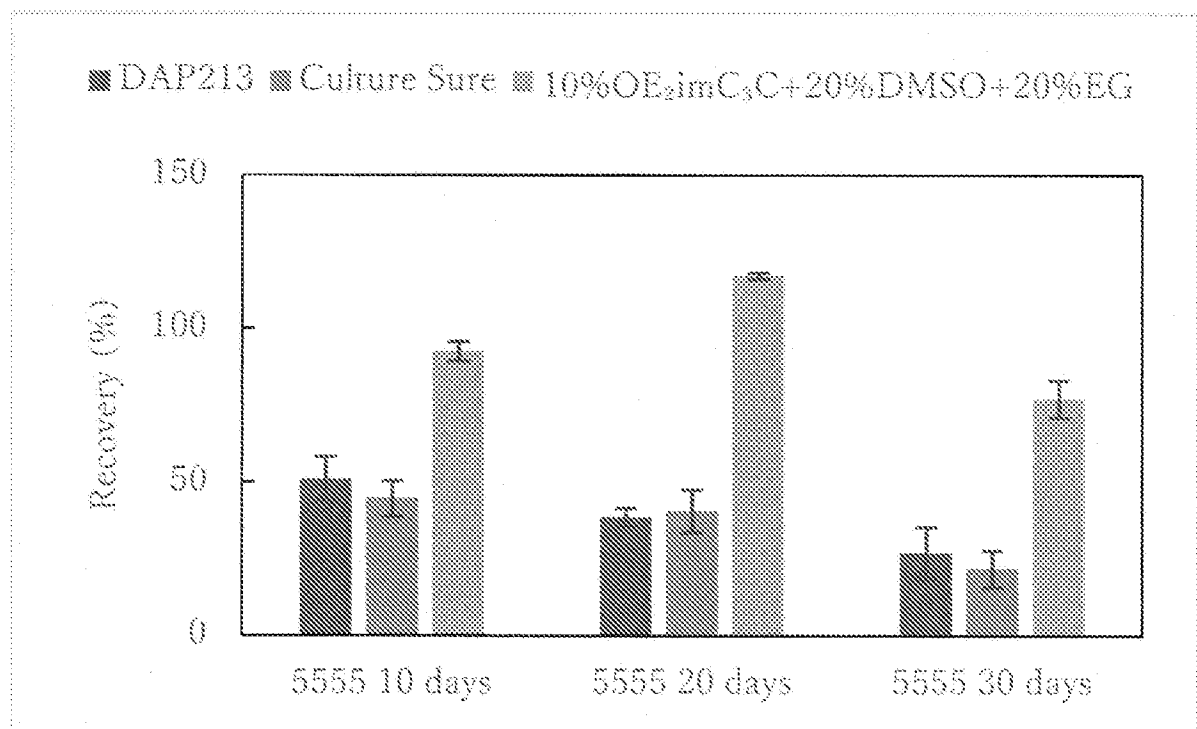
[図5]



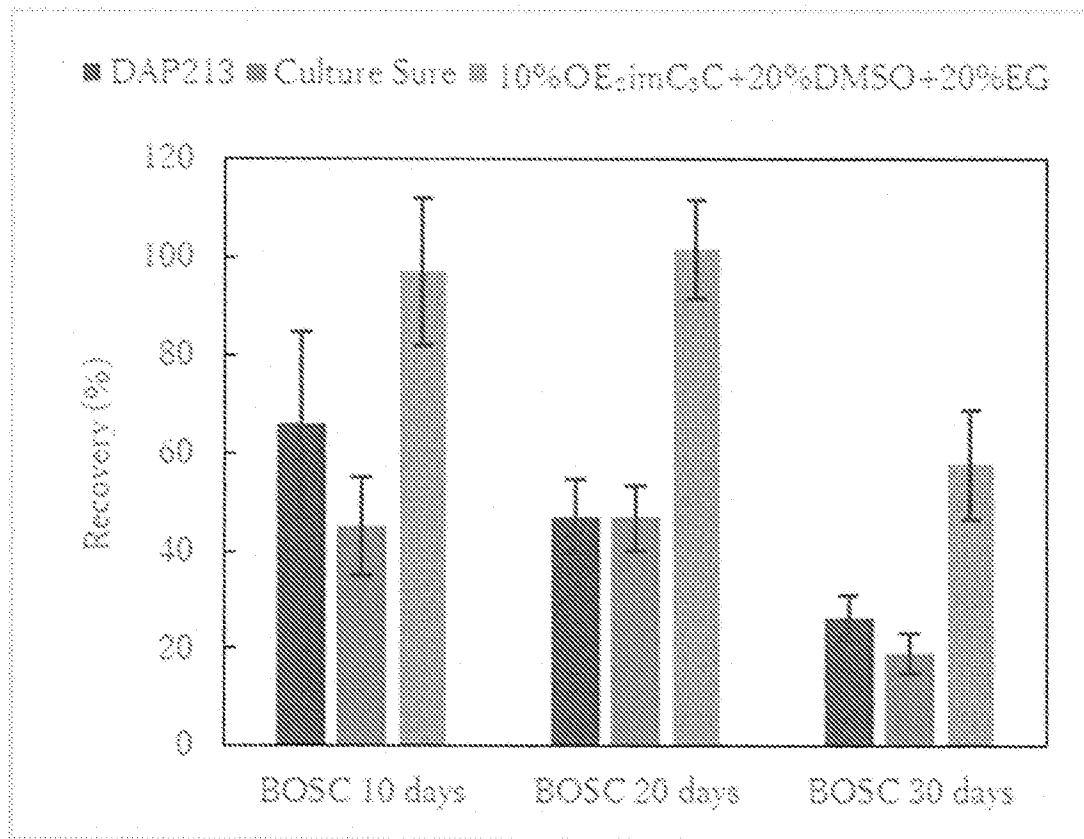
[図6]



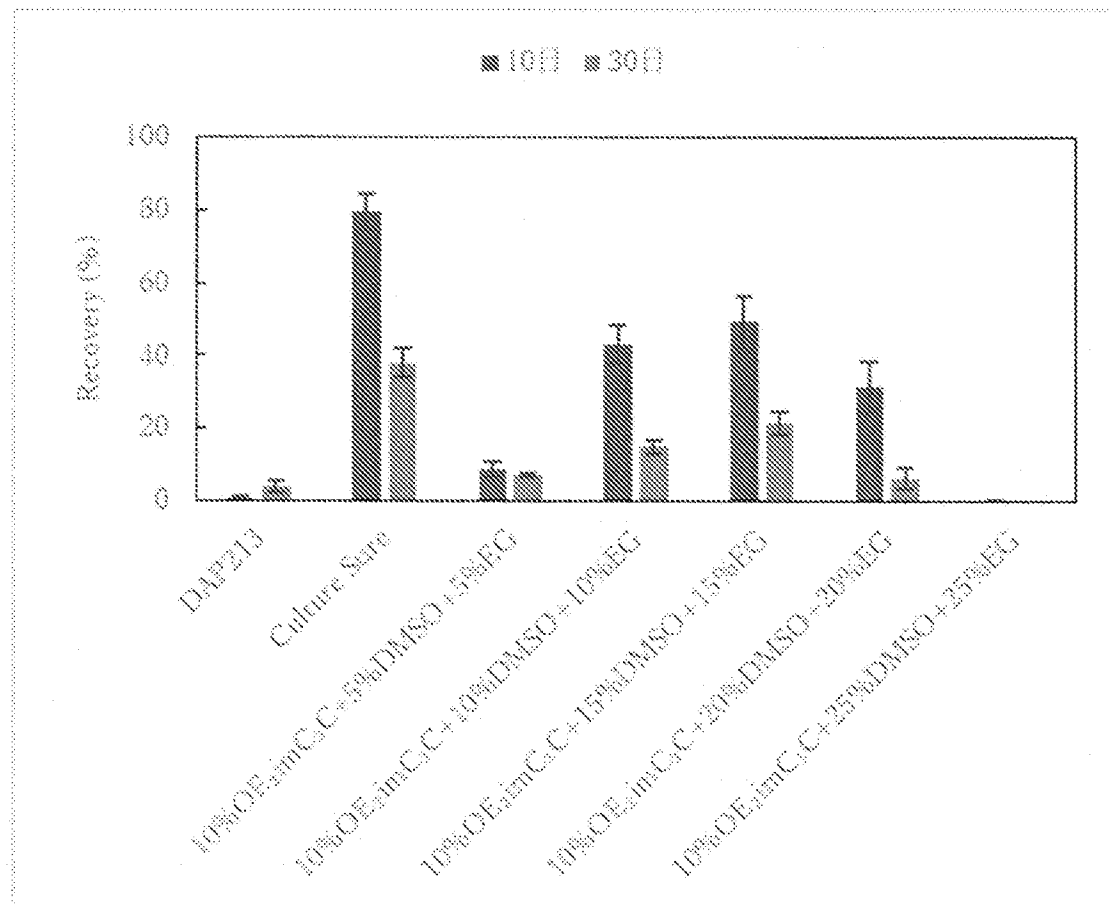
[図7]



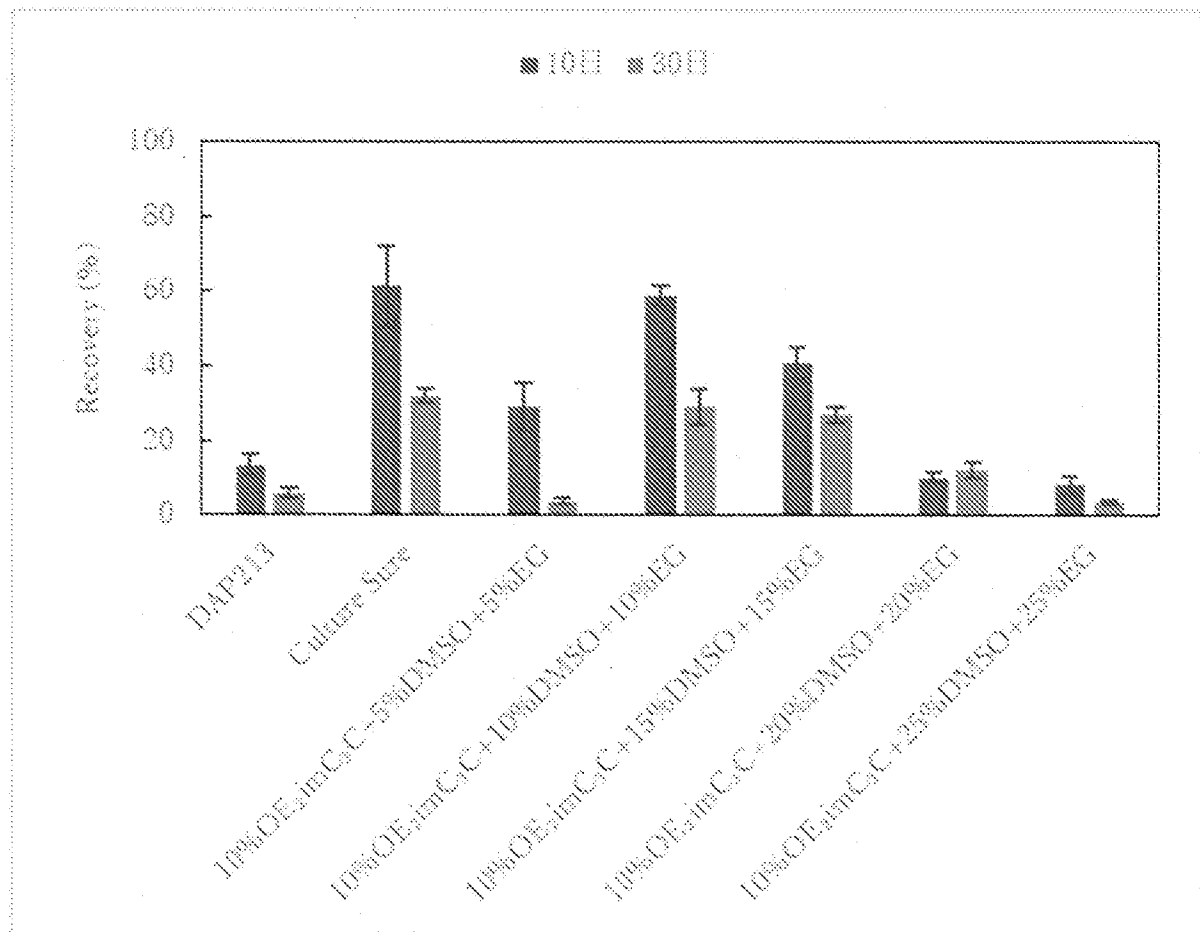
[図8]



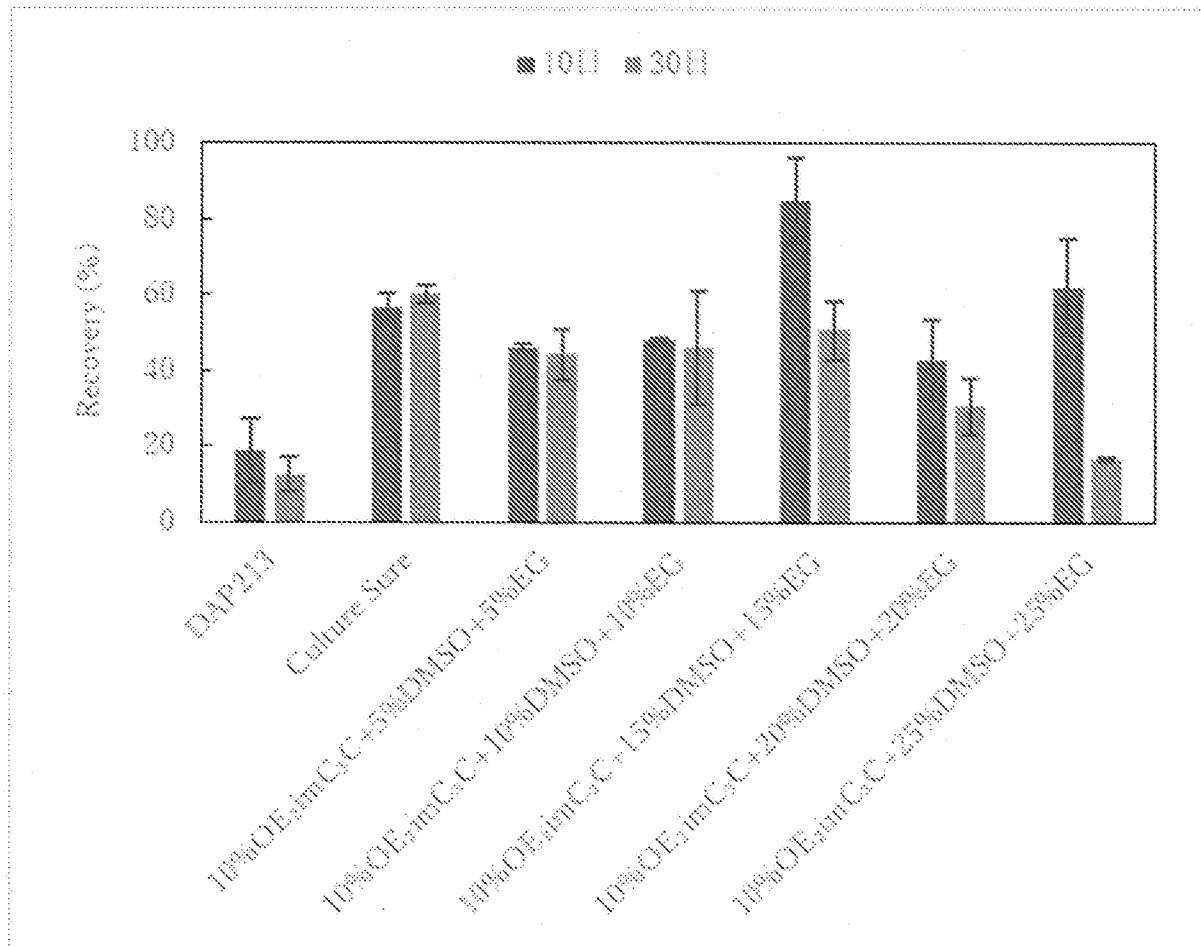
[図9]



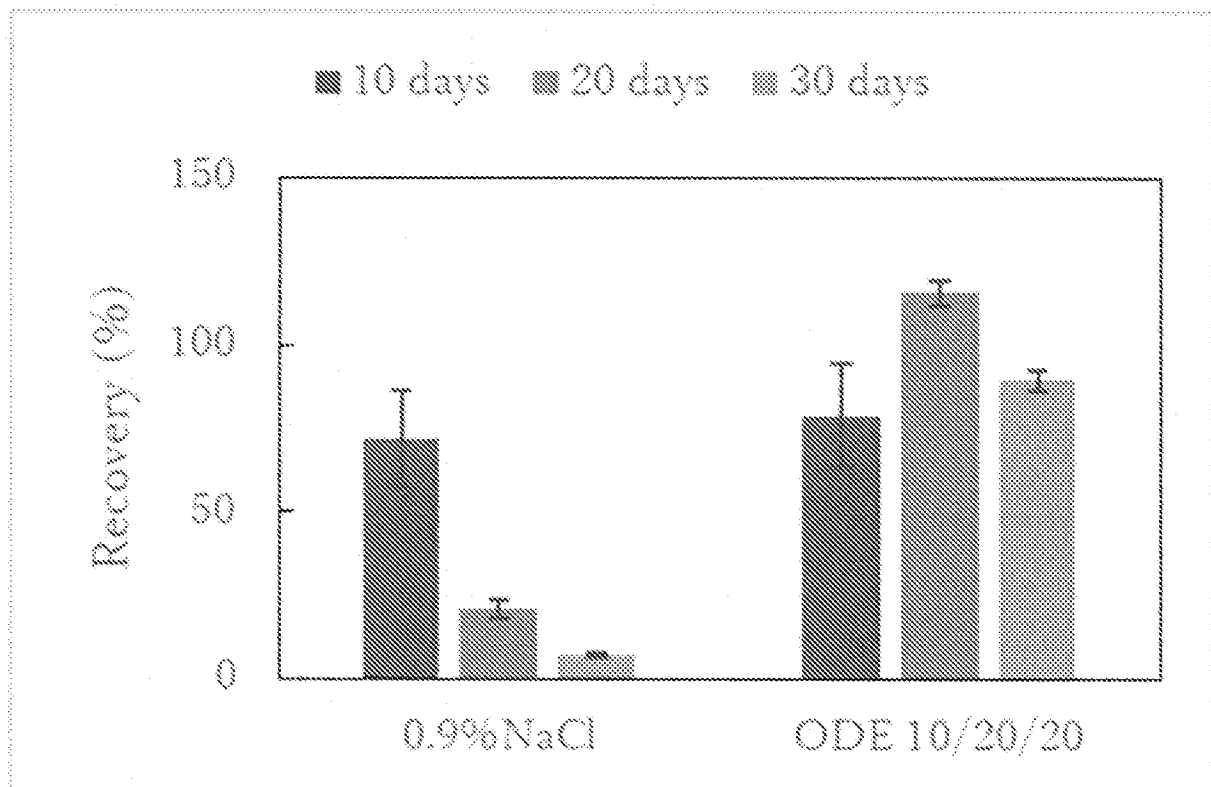
[図10]



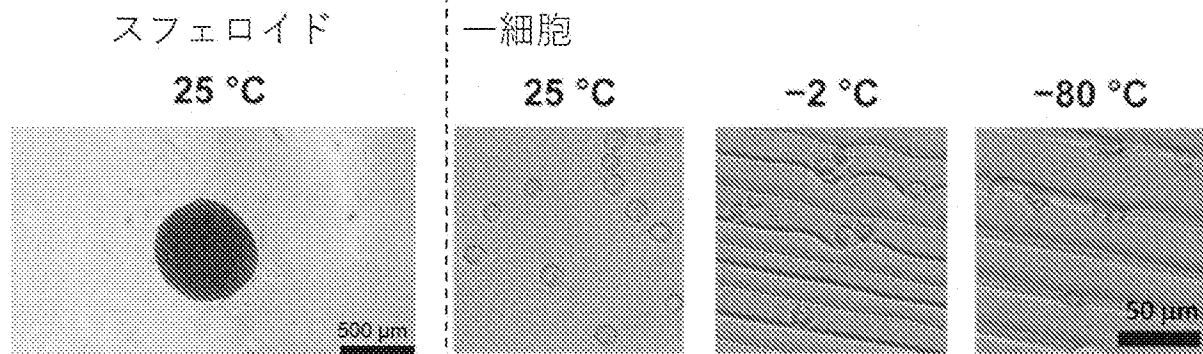
[図11]



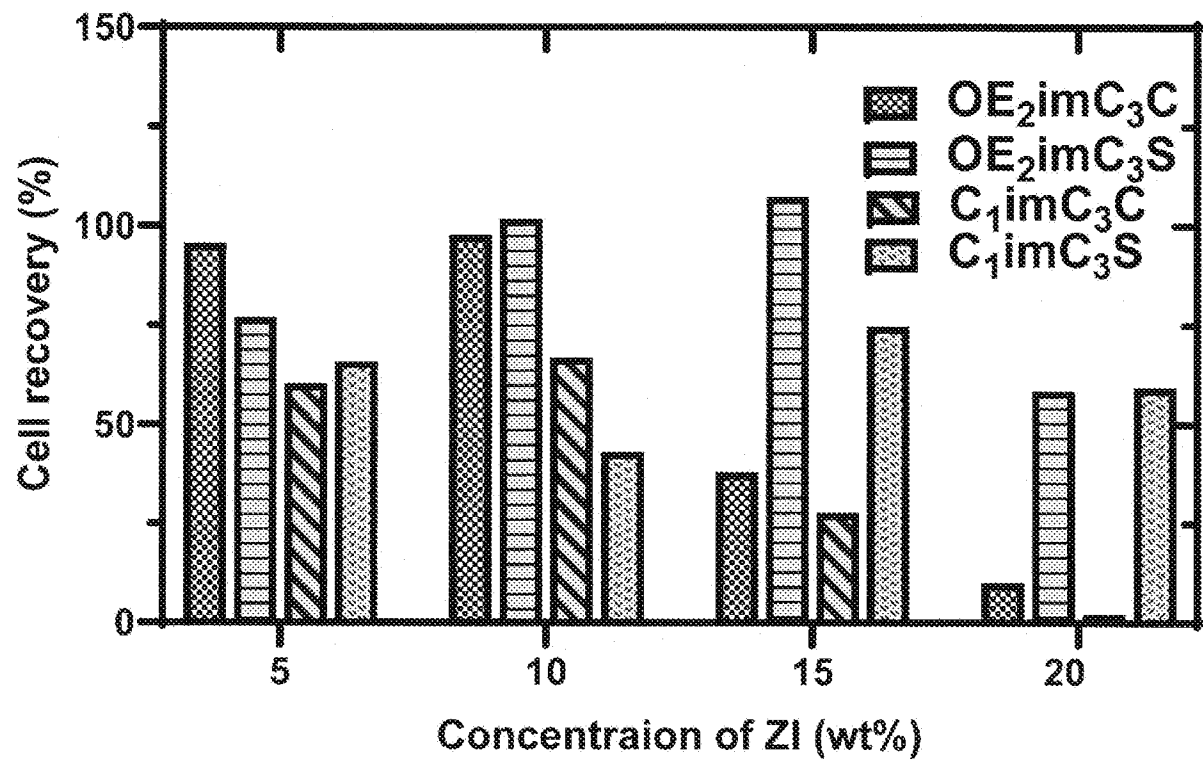
[図12]



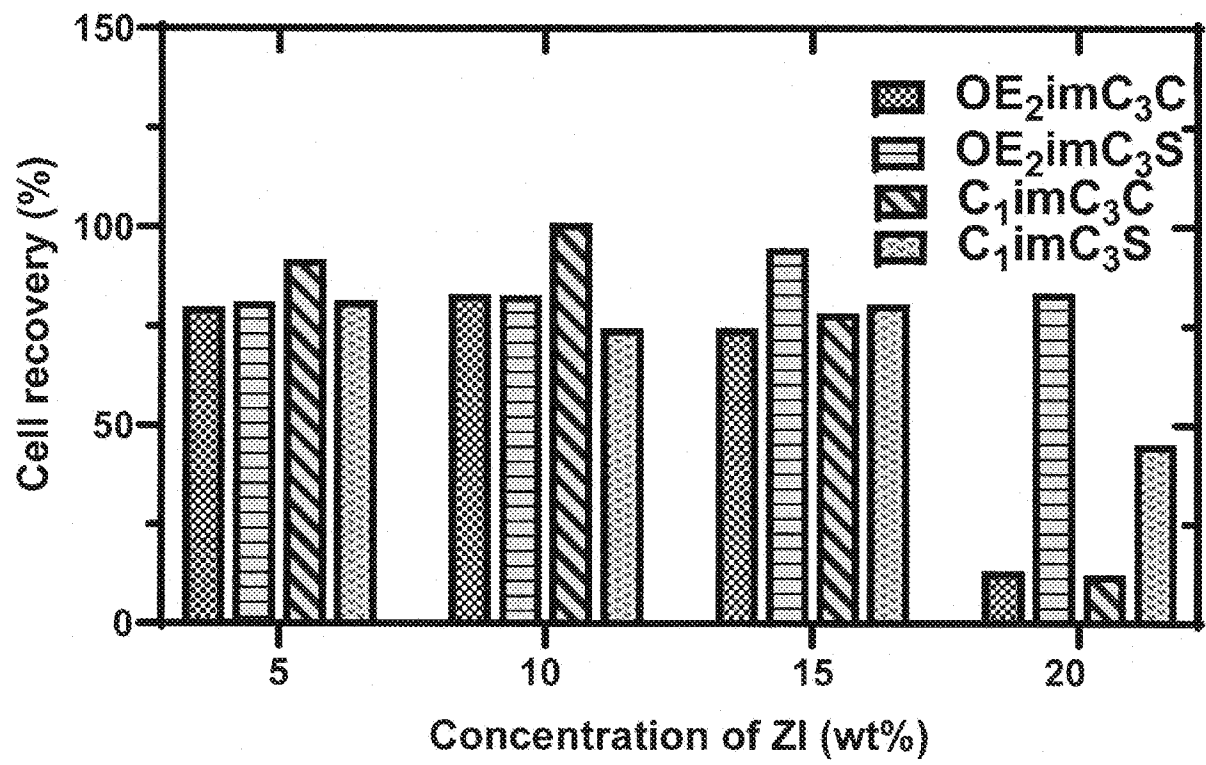
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/039820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 5/00*(2006.01)i; *A01N 1/10*(2025.01)i

FI: C12N5/00; A01N1/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00; A01N1/02

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024

Registered utility model specifications of Japan 1996-2024

Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-512625 A (BIOSTORE NEW ZEALAND LIMITED) 26 September 2000 (2000-09-26) example 1, fig. 1-4	1-4
Y	八川祥子 ほか, 双性イオンを用いた一般的な冷凍庫での細胞の非凍結保存, 日本化学会 第102春季年会(2022) 予稿集, [online], 2022, B203-4am-06, [retrieved on 22 November 2024], Internet:<URL:https://confit.atlas.jp/guide/event-img/csj102nd/B203-4am-06/public/pdf?type=in>, (HACHIKAWA, Sachiko et al., Preservation of cells in liquid state using zwitterions at -25 degreeC in a general freezer), non-official translation (Preprints of the 102nd CSJ Annual Meeting (2022)) entire text, fig. 1	1-4
Y	JP 5-038284 A (HOKUREN FEDERATION OF AGRICULT COOP.) 19 February 1993 (1993-02-19) example 4, paragraph [0030]	1-4
A	WO 2020/230721 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 19 November 2020 (2020-11-19)	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

“D” document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2025

Date of mailing of the international search report

28 January 2025

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/039820

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2000-512625	A	26 September 2000	WO 1997/047192 A1 example 1, fig. 1-4 EP 1018866 A1	
JP	5-038284	A	19 February 1993	(Family: none)	
WO	2020/230721	A1	19 November 2020	US 2022/0287294 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 5/00(2006.01)i; A01N 1/10(2025.01)i

FI: C12N5/00; A01N1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N5/00; A01N1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922 - 1996年

日本国公開実用新案公報

1971 - 2024年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2000-512625 A (バイオストア ニュージーランド リミテッド) 26.09.2000 (2000 - 09 - 26) 例 1、図 1～4	1-4
Y	八川祥子 ほか、双性イオンを用いた一般的な冷凍庫での細胞の非凍結保存, 日本化学会 第102春季年会 (2022) 予稿集, [online], 2022, B203-4am-06, [検索日 2024.11.22], インターネット: <URL: https://confit.atlas.jp/guide/event-img/cs.jl02nd/B203-4am-06/public/pdf?type=in> 全文、図 1	1-4
Y	JP 5-038284 A (ホクレン農業協同組合連合会) 19.02.1993 (1993 - 02 - 19) 実施例 4、[0030]	1-4
A	WO 2020/230721 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 19.11.2020 (2020 - 11 - 19)	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.01.2025

国際調査報告の発送日

28.01.2025

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

三須 大樹 4H 7883

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/039820

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2000-512625	A	26.09.2000	WO	1997/047192	A1	
				例 1、図 1 ～ 4			
				EP	1018866	A1	

JP	5-038284	A	19.02.1993	(ファミリーなし)			

WO	2020/230721	A1	19.11.2020	US	2022/0287294	A1	
