

明 細 書

発明の名称： 哺乳動物細胞凍結保存液

技術分野

[0001] 本発明は、2.5～8.75 (v/v) %のプロピレングリコール（以下、「PG」ということがある）を含む哺乳動物細胞凍結保存液（以下、「本件凍結保存液」ということがある）や、哺乳動物細胞を含有する本件凍結保存液を、凍結保存する工程（a）を含む、哺乳動物細胞を凍結保存する方法（以下、「本件凍結保存方法」ということがある）等に関する。

背景技術

[0002] 細胞の凍結保存は、細胞生物学の研究において必要不可欠な技術として広く利用されてきた。近年、細胞凍結保存技術は、世界中の細胞バンクにて種々の株化細胞の保存のみならず、畜産業界における種の保存、家畜増産のための精子、卵子、又は受精卵の凍結保存や、生殖医療における生殖細胞の凍結保存等に応用されている。

[0003] 胚性幹細胞（Embryonic Stem cell；ES細胞）や人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem cell；iPS細胞）等の多能性幹細胞は、無限の増殖能力と多様な組織細胞への多分化能を有する細胞である。ヒト多能性幹細胞は、その性質を利用して再生医療への応用が期待されており、それを実現するためには質の高い細胞凍結技術、すなわち解凍後に高い細胞生存率や未分化性を保障する細胞凍結技術の確立は必須である。

[0004] 細胞の凍結保存方法は、一般に緩慢凍結法と急速凍結法（ガラス化法）に大別される。緩慢凍結法は、グリセリン、ジメチルスルホキシド（以下、「DMSO」ということがある）、ケラチン加水分解物、加水分解ゼラチン、血清、血清アルブミン等を凍結保護剤として含む凍結保存液（特許文献1～5）中に細胞を懸濁し、1分に1℃程度に温度を下げて徐々に凍結する方法である。緩慢に冷却することにより細胞内の水分子が凍結保護剤と置換し、脱水され、細胞内や細胞周辺部の氷結晶の成長が抑えられ、細胞膜及び細胞

内構造の損傷や、タンパク質の変性及び切断を防ぐ（非特許文献1）。最近では、胚を凍結保存する場合は除き、一般的な細胞を凍結保存する場合は、プログラムフリーザーを用いて温度調節を厳密に制御しなくても、発砲スチロールの箱や市販の細胞凍結ボックスを用いて緩慢に凍結できることがわかってきた。このような方法は簡便であることから、簡易緩慢凍結法とも呼ばれ、研究室や細胞バンク等で広く用いられている。

[0005] 他方、ガラス化法は、凍結による細胞内外の氷結晶生成を抑制するため、急速な冷却によりガラス状に凍結させる方法である。ガラス化法は、1937年に報告されてから実用化までの技術開発に長い期間を要したが、1985年に高濃度のDMSO、アセトアミド、PG、及びポリエチレングリコール（以下、「PEG」という）からなる凍結保護剤を含むガラス化保存液を用いる方法が開発された。この方法の開発により、マウス初期胚の凍結保存や、緩慢凍結法では困難であったウシ胚やブタ胚の凍結保存が可能となった。現在、胚バンクをはじめ多くの機関でガラス化法が用いられている。

[0006] 最近、ヒトES細胞やiPS細胞の凍結保存液の開発や、凍結保存方法の改良が盛んに行なわれている。例えば、ヒトES細胞を5%DMSO、10%ウシ胎児血清（Fetal bovine serum; FBS）、及び10%エチレングリコール（EG）を含む凍結保存液中に懸濁し、簡易緩慢凍結法を用いて凍結保存すると、融解後の細胞生存率が高まることが報告されている（非特許文献2）。また、ヒトES細胞やiPS細胞を凍結保存液（STEM-CELLBANKER [日本全薬工業社製]）中に懸濁し、簡易緩慢凍結法を用いて凍結保存すると、融解後の細胞生存率が高まることも報告されている（非特許文献3）。

[0007] また、トレハロース等の糖類と、PGを含み、かつ、DMSO、増粘剤、及び天然の動物由来成分を含まない細胞凍結保存用溶液が提案されている（特許文献6）。また、タウリン、グリシン、及びそれらの誘導体からなる群から選択される少なくとも一つと、DMSOを除く凍結保護剤と、水溶性多糖類と、オリゴ糖類とを含む動物細胞凍結保存液も提案されている（特許文献7）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2003/064634号パンフレット

特許文献2：特開平6-46840号公報

特許文献3：特開平7-255469号公報

特許文献4：特開平8-325101号公報

特許文献5：特開2002-233356号公報

特許文献6：国際公開第2019/172112号パンフレット

特許文献7：特開2021-00027号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：J. R. Dobrinsky, Theriogenology, 45, 17-26 (1996)

非特許文献2：Y. S. Ha et al., Human Reprod., 20, 1779-1785 (2005)

非特許文献3：F. Holm et al., Human Reprod., 25, 1271-1279 (2010)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の課題は、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死を効果的に抑制でき、かつ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができる細胞凍結保存液や、当該細胞凍結保存液を用いた哺乳動物細胞の凍結保存方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねる中で、2.5～5%のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5～5%のDMSOを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能が高いことを見いだした（例えば、後述する実施例の図1～3）。また、2.5～5%のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5～5%以外の濃度のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結

融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができることを確認した（例えば、後述する実施例の図4及び図8）。さらに、2.5～8.75%のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5～8.75%以外の濃度のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを確認した（例えば、後述する実施例の図7）。本発明は、これらの知見に基づき、完成するに至ったものである。

[0012] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 2.5～8.75（v/v）%のプロピレングリコールを含む哺乳動物細胞凍結保存液。

〔2〕 プロピレングリコールの濃度が2.5～5.0（v/v）%であり、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を高めるために用いられる、上記〔1〕に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔3〕 デキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩；及び、ヒドロキシエチルデンプン若しくはその誘導体又はそれらの塩；から選択される高分子化合物をさらに含む、上記〔1〕又は〔2〕に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔4〕 トレハロース若しくはその誘導体又はそれらの塩をさらに含む、上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔5〕 2.5～8.75（v/v）%のプロピレングリコールを含む等張液である、上記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔6〕 等張液が、乳酸リンゲル液、生理食塩水、リンゲル液、及び酢酸リンゲル液から選択される、上記〔5〕に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔7〕 哺乳動物細胞が、間葉系幹細胞、T細胞、又は造血系幹細胞である、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔8〕 哺乳動物細胞を含む、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔9〕 哺乳動物細胞が、間葉系幹細胞、T細胞、又は造血系幹細胞である、

上記〔８〕に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔１０〕臍帯血を含む、上記〔９〕に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。

〔１１〕上記〔８〕～〔１０〕のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液を、凍結保存する工程（ａ）を含む、哺乳動物細胞を凍結保存する方法。

〔１２〕工程（ａ）の後、哺乳動物細胞を凍結融解し、５日間以上培養する工程（ｂ）をさらに含む、上記〔１１〕に記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明によると、２．５～８．７５％のＰＧを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、２．５～８．７５％以外の濃度のＰＧを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死を効果的に抑制でき、かつ、２．５～５％のＰＧを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、２．５～５％以外の濃度のＰＧを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合や、２．５～５％のＤＭＳＯを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができるため、再生医療における良質な移植用哺乳動物細胞含有液を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図１]図１Ａは、１．２５～１０％のＤＭＳＯを含む、４種類の細胞凍結保存液（１．２５％のＤＭＳＯ、２．７％のトレハロース、及び４．５％のデキストラン含有ＬＲ〔図中の「１．２５％ＤＭＳＯ＋Ｔｒｅ＋Ｄ」〕；２．５％のＤＭＳＯ、２．７％のトレハロース、及び４．５％のデキストラン含有ＬＲ〔図中の「２．５％ＤＭＳＯ＋Ｔｒｅ＋Ｄ」〕；５％のＤＭＳＯ、２．７％のトレハロース、及び４．５％のデキストラン含有ＬＲ〔図中の「５％ＤＭＳＯ＋Ｔｒｅ＋Ｄ」〕；並びに、１０％のＤＭＳＯ、２．７％のトレハロース、及び４．５％のデキストラン含有ＬＲ〔図中の「１０％ＤＭＳＯ＋Ｔｒｅ＋Ｄ」〕）中にｈＡＤ－ＭＳＣを３１日間凍結保存し、融解後のｈＡＤ－ＭＳＣの細胞増殖能を解析した結果（平均値±ＳＤ、 $n=3$ ）を示す図

である。図中の「*」及び「**」は、「10% DMSO」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること ($p < 0.05$ 及び $p < 0.01$) を示す。図1Bは、1.25~10%のPGを含む、4種類の細胞凍結保存液 (1.25%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「1.25% PG+Tre+D」] ; 2.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「2.5% PG+Tre+D」] ; 5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「5% PG+Tre+D」] ; 並びに、10%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「10% PG+Tre+D」]) 中にhAD-MSCを31日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果 (平均値 $\pm$ SD、 $n=3$) を示す図である。図中の「*」及び「**」は、「10% PG」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること ($p < 0.05$ 及び $p < 0.01$) を示す。

[図2]図1の結果を基に、DMSOとPGが同じ濃度の細胞凍結保存液について比較した結果を示す図である。図中の「**」及び「***」は、培養日数が同じサンプル間で、それぞれ統計学的に有意差があること ($p < 0.01$ 及び $p < 0.001$) を示す。

[図3]4%のPG又は4%のDMSOを含むトレハロース及びデキストラン含有細胞凍結保存液 (4%のPG、2.88%のトレハロース、及び4.8%のデキストラン含有LR [図中の「4% PG+Tre+D」] ; 並びに、4%のDMSO、2.88%のトレハロース、及び4.8%のデキストラン含有LR [図中の「4% DMSO+Tre+D」]) 中にhAD-MSCを23日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能と、凍結保存しなかったhAD-MSC (図中の「-」) の細胞増殖能を解析した結果 (平均値 $\pm$ SD、 $n=6$) を示す図である。図中の「*」及び「***」は、培養日数が同じ「-」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること ($p < 0.05$ 及び $p < 0.001$) を示す。

[図4] 1. 25～10%のPGを含む、4種類の基液（LR [図4A]；デキストラン含有LR [図4B]；トレハロース含有LR [図4C]；並びに、トレハロース及びデキストラン含有LR [図4D]）中にhAD-MSCを44日間（図4A及び4B）又は29日間（図4C及び4D）凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果（平均値±SD、 $n=3$ ）を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、培養日数が同じサンプル間で、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$ ）を示す。

[図5] 5%のPGを含む、4種類の基液（生理食塩水 [PG/S]、リンゲル液 [PG/R]、酢酸リンゲル液 [PG/AR]、及び乳酸リンゲル液 [PG/LR]）中にhAD-MSCを凍結保存するか（それぞれ、図中の黒色棒グラフ）、又は、5%のPG及び4.75%のデキストランを含む、上記4種類の基液（それぞれ「PG+D/S」、「PG+D/R」、「PG+D/AR」、及び「PG+D/LR」）中にhAD-MSCを33日間凍結保存し、融解直後の細胞生存率（図5A）、生存細胞回収率（図5B）、及びアネキシンV陽性率（図5C）を解析した結果（平均値±SD、 $n=3$ ）を示す図である。図中の「*」は、それぞれに対応する「PG」に対して統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ ）を示す。

[図6] 図6Aは、5%のPGを含む生理食塩水（図中の「PG/S」）又は5%のPG及び4.75%のデキストランを含む生理食塩水（図中の「PG+D/S」）中にhAD-MSCを70日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果（平均値±SD、 $n=3$ ）を示す図である。図6Bは、5%のPGを含むリンゲル液（図中の「PG/R」）又は5%のPG及び4.75%のデキストランを含むリンゲル液（図中の「PG+D/R」）中にhAD-MSCを70日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果（平均値±SD、 $n=3$ ）を示す図である。図6Cは、5%のPGを含む酢酸リンゲル液（図中の「PG/AR」）又は5%のPG及び4.75%のデキストランを含む酢酸リンゲル液（図中の「

PG+D/LR」) 中にhAD-MSCを70日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果(平均値±SD、n=3)を示す図である。図6Dは、5%のPGを含む乳酸リンゲル液(図中の「PG/LR」)又は5%のPG及び4.75%のデキストランを含む乳酸リンゲル液(図中の「PG+D/LR」)中にhAD-MSCを70日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果(平均値±SD、n=3)を示す図である。

[図7] 1. 25~10%のPG及びデキストラン含有細胞凍結保存液、すなわち、8種類の細胞凍結保存液(1. 25%PG及び4.94%デキストラン含有LR[図中の「1. 25%」]; 2. 5%PG及び4.88%デキストラン含有LR[図中の「2. 5%」]; 3. 75%PG及び4.81%デキストラン含有LR[図中の「3. 75%」]; 5%PG及び4.75%デキストラン含有LR[図中の「5%」]; 6. 25%PG及び4.69%デキストラン含有LR[図中の「6. 25%」]; 7. 5%PG及び4.63%デキストラン含有LR[図中の「7. 5%」]; 8. 75%PG及び4.56%デキストラン含有LR[図中の「8. 75%」]; 並びに、10%PG及び4.5%デキストラン含有LR[図中の「10%」])中にhAD-MSCを40日間凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率(図7A)、生存細胞回収率(図7B)、及びアネキシンV陽性率(図7C)を解析した結果(平均値±SD、n=4)を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、「10%」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること($p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$)を示す。

[図8] 図7における8種類の細胞凍結保存液中にhAD-MSCを28日間凍結保存し、融解後のhAD-MSCの細胞増殖能を解析した結果(平均値±SD、n=3)を示す図である。図中の「*」及び「**」は、「10%PG及び4.5%デキストラン含有LR」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること($p<0.05$ 及び $p<0.01$)を示す。

[図9] 4%のPG及び0~9.6%のデキストラン含有細胞凍結保存液、すな

わち、6種類の細胞凍結保存液（4%のPG含有LR [図中の「0%」]；4%のPG及び1.2%のデキストラン含有LR [図中の「1.2%」]；4%のPG及び2.4%のデキストラン含有LR [図中の2.4%]；4%のPG及び4.8%のデキストラン含有LR [図中の4.8%]；4%のPG及び7.2%のデキストラン含有LR [図中の7.2%]；並びに、4%のPG及び9.6%のデキストラン含有LR [図中の9.6%]）中にhAD-MSCを38日間凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率（図9A）、生存細胞回収率（図9B）、及びアネキシンV陽性率（図9C）を解析した結果（平均値±SD、n=4）を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、「0%」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、及び $p < 0.001$ ）を示す。

[図10]6種類の細胞凍結保存液（4%のPG含有LR [図中の「4%PG」]；10%のPG含有LR [図中の「10%PG」]；4%のPG及び4.8%のデキストラン含有LR [図中の「4%PG+D」]；10%のPG及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「10%PG+D」]；4%のPG及び4.8%のHES含有LR [図中の「4%PG+HES」]；並びに、10%のPG及び4.5%のHES含有LR [図中の「10%PG+HES」]）中にhAD-MSCを24日間凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率（図10A）、生存細胞回収率（図10B）、及びアネキシンV陽性率（図10C）を解析した結果（平均値±SD、n=3）を示す図である。図中の「*」は、Dunnett's testにより統計学的に有意差があること（ $p < 0.05$ ）を示し、図中の「†」及び「††」は、Student's t testにより、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ ）を示す。

[図11]6種類の細胞凍結保存液（4%のPG及び2.88%のトレハロース含有LR [図中の「4%PG+Tre」]；10%のPG及び2.7%のトレハロース含有LR [図中の「10%PG+Tre」]；4%のPG、2.

88%のトレハロース、及び4.8%のデキストラン含有LR [図中の「4%PG+Tre+D」] ; 10%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「10%PG+Tre+D」] ; 4%のPG、2.88%のトレハロース、及び4.8%のHES含有LR [図中の「4%PG+Tre+HES」] ; 並びに、10%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のHES含有LR [図中の「10%PG+Tre+HES」]) 中にhAD-MSCを24日間凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率 (図11A)、生存細胞回収率 (図11B)、及びアネキシンV陽性率 (図11C) を解析した結果 (平均値±SD、n=3) を示す図である。図中の「*」及び「**」は、Dunnett's testにより、それぞれ統計学的に有意差があること ($p<0.05$ 及び $p<0.01$) を示し、図中の「†」は、Student's t testにより統計学的に有意差があること ($p<0.05$) を示す。

[図12] 3種類の細胞凍結保存液 (2.5%のPG含有乳酸リンゲル液 [図中の「PG」] ; 2.5%のPG及び2.925%のトレハロース含有乳酸リンゲル液 [図中の「PG+Tre」] ; 並びに2.5%のPG、2.925%のトレハロース、及び4.875%のデキストラン含有乳酸リンゲル液 [図中の「PG+Tre+D」]) 中にヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hAD-MSC) を28日間凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率 (図12A)、生存細胞回収率 (図12B)、及びアネキシンV陽性率 (図12C) を解析した結果 (平均値±標準偏差 [SD]、n=4) を示す図である。図中の「*」及び「***」は、「PG」に対してそれぞれ統計学的に有意差があること ($p<0.05$ 及び $p<0.001$) を示す。

[図13] 5種類の糖類 (グルコース、フルクトース、トレハロース、スクロース、又はラクトース) を含む、4%のPG含有細胞凍結保存液 (それぞれ、図中の「+Glu」、「+Fru」、「+Tre」、「+Suc」、及び「+Lac」) 、又はこれら糖類不含の4%のPG含有細胞凍結保存液 (図中の「-」) 中にhAD-MSCを35日間凍結保存し、融解直後のhAD-

MSCの細胞生存率（図13A）及び生存細胞回収率（図13B）を解析した結果（平均値±SD、 $n=4$ ）を示す図である。図中の「*」は、「-」に対して、統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ ）を示す。

[図14]4%のPG及び0~11.52%のトレハロース含有細胞凍結保存液、すなわち、6種類の細胞凍結保存液（4%のPG含有LR [図中の「0%」]；4%のPG及び0.72%のトレハロース含有LR [図中の「0.72%」]；4%のPG及び1.44%のトレハロース含有LR [図中の「1.44%」]；4%のPG及び2.88%のトレハロース含有LR [図中の「2.88%」]；4%のPG及び5.76%のトレハロース含有LR [図中の「5.76%」]；並びに、4%のPG及び11.52%のトレハロース含有LR [図中の「11.52%」]）中にhAD-MSCを32日間凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率（図14A）、生存細胞回収率（図14B）、及びアネキシンV陽性率（図14C）を解析した結果（平均値±SD、 $n=4$ ）を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、「0%」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$ ）を示す。

[図15]4%のPGを含む、3種類の基液（血清含有培養液 [図中の「PG+Med」]、トレハロース含有LR [図中の「PG+Tre」]、及びLR [図中の「PG」]）に懸濁したhCD8陽性T細胞について、凍結保存前の細胞生存率（図15A）と、46~167日間凍結保存し、融解直後（0時間）、融解後1時間、3時間、及び6時間の細胞生存率（図15A）並びに生存細胞回収率（図15B）とを解析した結果（平均値±SD、 $n=4$ ）を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、「PG+Med」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$ ）を示し、図中の「†」、「††」、及び「†††」は、「PG+Tre」と「PG」の2群比較において、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$ ）を示す。

[図16] 2～7. 5%のPG含有細胞凍結保存液、すなわち、5種類の細胞凍結保存液（2%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「2」]；3%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「3」]；4%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「4」]；5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「5」]；並びに、7.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR [図中の「7.5」]）に懸濁したhCD8陽性T細胞について、凍結保存前の細胞生存率（図16A）と、54～74日間凍結保存し、融解直後（0時間）及び融解後3時間の細胞生存率（図16A）及び生存細胞回収率（図16B）とを解析した結果（平均値±SD、n=4）を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、「2」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$ ）を示し、図中の「†」及び「†††」は、「7.5」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.05$ 及び $p<0.001$ ）を示す。

[図17] 図16で使用した2～7.5%のPG含有細胞凍結保存液中にhCD8陽性T細胞を46日間凍結保存し、融解直後のhCD8陽性T細胞の細胞生存率（図17A）、生存細胞回収率（図17B）、及びアネキシンV陽性率（図17C）を解析した結果（平均値±SD、n=3）を示す図である。図中の「**」及び「***」は、「2%」に対して、それぞれ統計学的に有意差があること（ $p<0.01$ 及び $p<0.001$ ）を示す。

[図18] 図16で使用した2～7.5%のPG含有細胞凍結保存液中にhCD4陽性T細胞を40～44日間凍結保存し、融解直後のhCD4陽性T細胞の細胞生存率（図18A）、生存細胞回収率（図18B）、及びアネキシンV陽性率（図18C）を解析した結果（平均値±SD、n=6）を示す図である。図中の「***」は、「2%」に対して、統計学的に有意差があること（ $p<0.001$ ）を示す。図中の「††」は、「7.5%」に対して、

統計学的に有意差があること ($p < 0.01$) を示す。

[図19]凍結保存前のhCD34陽性造血系幹細胞の細胞生存率及びCD34陽性率を解析するとともに、図16で使用した2～7.5%のPG含有細胞凍結保存液中にhCD34陽性造血系幹細胞を14日間凍結保存し、融解直後のhCD34陽性造血系幹細胞の細胞生存率及びCD34陽性率を解析し、細胞生存率(図19A)及びCD34陽性率の比(凍結保存前に対する凍結融解直後のCD34陽性率の比)(図19B)の結果(平均値±SD、 $n = 4$)を示す図である。図中の「*」は、「2%」に対して、統計学的に有意差があること ($p < 0.05$) を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の哺乳動物細胞凍結保存液は、「哺乳動物細胞を凍結保存するため」という用途に特定された、2.5～8.75 (v/v) %のプロピレングリコールを含む液(すなわち、本件凍結保存液)である。プロピレングリコールの濃度が2.5～5.0 (v/v) %である本件凍結保存液は、2.5～5.0 (v/v) %以外の濃度のプロピレングリコールを含む細胞凍結保存液中や、DMSOを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができる。このため、プロピレングリコールの濃度が2.5～5.0 (v/v) %である本件凍結保存液は、「凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を高めるため」という用途に特定されたものであってもよい。

[0016] また、本件凍結保存液(2.5～8.75 (v/v) %のプロピレングリコールを含む液)は、DMSOを含む細胞凍結保存液中や、2.5～8.75 (v/v) %以外の濃度のプロピレングリコールを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、解凍後の室温(1℃～30℃)保存において細胞生存率を高値に保つことができる。このため、本件凍結保存液は、「凍結融解後の哺乳動物細胞の細胞生存率を高めるため」という用途に特定されたものであってもよい。

[0017] 本発明の哺乳動物細胞を凍結保存する方法としては、哺乳動物細胞を含有

する本件凍結保存液を、凍結保存する（換言すると、哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に凍結保存する）工程（a）を含む方法（すなわち、本件凍結保存方法）であれば特に制限されず、かかる工程（a）において、哺乳動物細胞を、緩慢凍結法を用いて凍結し、その後保存してもよいし、急速凍結法（ガラス化法）を用いて凍結し、その後保存してもよい。かかる緩慢凍結法としては、例えば、哺乳動物細胞を含有する本件凍結保存液を、細胞保存用チューブやバイアルに移し、低温フリーザーや超低温フリーザー（通常 -20°C ～ -150°C の範囲内）中で凍結し、その後、液体窒素（通常 -150°C ～ -196°C の範囲内）中で保存する方法を挙げることができる。上記急速凍結法としては、例えば、哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に懸濁後、必要に応じてストロー内に移し、液体窒素（通常 -150°C ～ -196°C の範囲内）中で急速冷凍し、保存する方法を挙げることができる。

[0018] 本明細書において、プロピレングリコールの濃度としては、2.5～8.75（v/v）%の範囲内であればよく、例えば、2.5～7.5%、2.5～6.25%、2.5～5.0%、2.5～4.9%、2.5～4.8%、2.5～4.6%、2.5～4.4%、2.5～4.2%、2.5～4.0%、2.5～3.8%、2.5～3.6%、2.5～3.4%、2.5～3.2%、2.5～3.0%、2.5～2.8%、2.5～2.6%、2.6～8.75%、2.8～8.75%、3.0～8.75%、3.2～8.75%、3.4～8.75%、3.6～8.75%、3.8～8.75%、4.0～8.75%、4.2～8.75%、4.4～8.75%、4.6～8.75%、4.8～8.75%、5.0～8.75%、6.25～8.75%、7.5～8.75%、2.6～7.5%、2.6～6.25%、2.6～5.0%、2.6～4.9%、2.6～4.8%、2.6～4.6%、2.6～4.4%、2.6～4.2%、2.6～4.0%、2.6～3.8%、2.6～3.6%、2.6～3.4%、2.6～3.2%、2.6～3.0%、2.6～2.8%、2.8～7.5%、2.8～6.25%、2.8～5.0%、2.8～4.9%、2.8～4.8

%、2.8～4.6%、2.8～4.4%、2.8～4.2%、2.8～4.0%、2.8～3.8%、2.8～3.6%、2.8～3.4%、2.8～3.2%、2.8～3.0%、3.0～7.5%、3.0～6.25%、3.0～5.0%、3.0～4.9%、3.0～4.8%、3.0～4.6%、3.0～4.4%、3.0～4.2%、3.0～4.0%、3.0～3.8%、3.0～3.6%、3.0～3.4%、3.0～3.2%、3.2～7.5%、3.2～6.25%、3.2～5.0%、3.2～4.9%、3.2～4.8%、3.2～4.6%、3.2～4.4%、3.2～4.2%、3.2～4.0%、3.2～3.8%、3.2～3.6%、3.2～3.4%、3.4～7.5%、3.4～6.25%、3.4～5.0%、3.4～4.9%、3.4～4.8%、3.4～4.6%、3.4～4.4%、3.4～4.2%、3.4～4.0%、3.4～3.8%、3.4～3.6%、3.6～7.5%、3.6～6.25%、3.6～5.0%、3.6～4.9%、3.6～4.8%、3.6～4.6%、3.6～4.4%、3.6～4.2%、3.6～4.0%、3.6～3.8%、3.8～7.5%、3.8～6.25%、3.8～5.0%、3.8～4.9%、3.8～4.8%、3.8～4.6%、3.8～4.4%、3.8～4.2%、3.8～4.0%、4.0～7.5%、4.0～6.25%、4.0～5.0%、4.0～4.9%、4.0～4.8%、4.0～4.6%、4.0～4.4%、4.0～4.2%、4.2～7.5%、4.2～6.25%、4.2～5.0%、4.2～4.9%、4.2～4.8%、4.2～4.6%、4.2～4.4%、4.4～7.5%、4.4～6.25%、4.4～5.0%、4.4～4.9%、4.4～4.8%、4.4～4.6%、4.6～7.5%、4.6～6.25%、4.6～5.0%、4.6～4.9%、4.6～4.8%、4.8～7.5%、4.8～6.25%、4.8～5.0%、4.8～4.9%、4.9～7.5%、4.9～6.25%、4.9～5.0%、5.0～7.5%、5.0～6.25%、6.25～7.5%等を挙げることができる。

[0019] 本件凍結保存液としては、高分子化合物をさらに含むものが好ましい。本明細書において、高分子化合物とは、重量平均分子量（Mw）が 1×10^4 以上の化合物を意味する。かかる高分子化合物としては、例えば、デキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩（以下、「デキストラン類」ということがある）；ヒドロキシエチルデンプン（ヒドロキシエチルスターチともいう）若しくはその誘導体又はそれらの塩（以下、「ヒドロキシエチルデンプン類」ということがある）；アルブミン；カルボキシメチルセルロース又はその塩；キサンタンガム又はその塩；ゼラチン；アミロペクチン又はその塩；等から選択される高分子化合物を挙げることができ、これらの中でも、後述する本実施例においてその効果が実証されているため、デキストラン類及びヒドロキシエチルデンプン類から選択される高分子化合物を好適に例示することができる。本件凍結保存液としては、デキストラン類及びヒドロキシエチルデンプン類以外的高分子化合物を含むものであってもよいが、含まないものであってもよい。

[0020] 上記デキストラン類におけるデキストランとしては、D-グルコースからなる多糖 $(C_6H_{10}O_5)_n$ であって、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合を主鎖とするものであれば特に制限されず、デキストランの重量平均分子量（Mw）としては、例えば、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ の範囲内（例えば、デキストラン40 [Mw=40000]、デキストラン70 [Mw=70000]）を挙げることができる。これらデキストランは、化学合成、微生物による生産、酵素による生産等のいずれの公知の方法で製造することができるが、市販品を用いることもできる。例えば、デキストラン40（東京化成工業社製）、デキストラン70（東京化成工業社製）等の市販品を挙げることができる。

[0021] 上記デキストラン類におけるデキストラン誘導体としては、例えば、カルボキシル化デキストラン、ジエチルアミノエチル（DEAE）-デキストラン等を挙げることができる。

[0022] 上記ヒドロキシエチルデンプン類におけるヒドロキシエチルデンプンとしては、 α -D-グルコースが直鎖状に結合（ $\alpha-1, 4$ 結合）したアミロー

スト、分枝 ($\alpha-1, 6$ 結合) を有するアミロペクチンとの混合物であって、グルコースユニットの C 2、C 3、及び C 6 の 1 又は 2 以上がヒドロキシエチル化されている物質 (アミロペクチンの誘導体) であれば特に制限されず、ヒドロキシエチルデンプンの Mw としては、例えば、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ (例えば、 7×10^4 、 2×10^5) の範囲内を挙げることができる。また、上記ヒドロキシエチルデンプンの置換度 (1 グルコース単位当たりのヒドロキシエチル基数) としては、特に制限されず、例えば、0.4~0.8 の範囲内 (例えば、0.50~0.55) を挙げることができる。これらヒドロキシエチルデンプンは、化学合成、微生物による生産、酵素による生産等のいずれの公知の方法によっても製造することができるが、市販品を用いることもできる。例えば、HES (Fresenius Kabi Austria GmbH 社製) 等の市販品を挙げることができる。

[0023] 上記ヒドロキシエチルデンプン類におけるヒドロキシエチルデンプン誘導体としては、例えば、DEAE-ヒドロキシエチルデンプン等を挙げることができる。

[0024] 本件凍結保存液における高分子化合物の濃度としては、PG との併用効果が認められる限り特に制限されず、高分子化合物の濃度の下限値としては、例えば、1.0 (w/v) %、1.2 (w/v) %、1.4 (w/v) %、1.6 (w/v) %、1.8 (w/v) %、2.0 (w/v) %、2.2 (w/v) %、2.4 (w/v) %、2.6 (w/v) %、2.8 (w/v) %、3.0 (w/v) %、3.2 (w/v) %、3.4 (w/v) %、3.6 (w/v) %、3.8 (w/v) %、4.0 (w/v) %、4.2 (w/v) %、4.4 (w/v) %、4.6 (w/v) %、4.8 (w/v) % 等を挙げることができる。また、本件凍結保存液における高分子化合物の濃度の上限値としては、例えば、20 (w/v) %、16 (w/v) %、13 (w/v) %、10 (w/v) %、9.8 (w/v) %、9.6 (w/v) % 等を挙げることができる。

[0025] したがって、上記高分子化合物の濃度としては、例えば、

1. 0~20%、1. 2~20%、1. 4~20%、1. 6~20%、1. 8~20%、2. 0~20%、2. 2~20%、2. 4~20%、2. 6~20%、2. 8~20%、3. 0~20%、3. 2~20%、3. 4~20%、3. 6~20%、3. 8~20%、4. 0~20%、4. 2~20%、4. 4~20%、4. 6~20%、4. 8~20%、1. 0~16%、1. 2~16%、1. 4~16%、1. 6~16%、1. 8~16%、2. 0~16%、2. 2~16%、2. 4~16%、2. 6~16%、2. 8~16%、3. 0~16%、3. 2~16%、3. 4~16%、3. 6~16%、3. 8~16%、4. 0~16%、4. 2~16%、4. 4~16%、4. 6~16%、4. 8~16%、1. 0~13%、1. 2~13%、1. 4~13%、1. 6~13%、1. 8~13%、2. 0~13%、2. 2~13%、2. 4~13%、2. 6~13%、2. 8~13%、3. 0~13%、3. 2~13%、3. 4~13%、3. 6~13%、3. 8~13%、4. 0~13%、4. 2~13%、4. 4~13%、4. 6~13%、4. 8~13%、1. 0~10%、1. 2~10%、1. 4~10%、1. 6~10%、1. 8~10%、2. 0~10%、2. 2~10%、2. 4~10%、2. 6~10%、2. 8~10%、3. 0~10%、3. 2~10%、3. 4~10%、3. 6~10%、3. 8~10%、4. 0~10%、4. 2~10%、4. 4~10%、4. 6~10%、4. 8~10%、1. 0~9.8%、1. 2~9.8%、1. 4~9.8%、1. 6~9.8%、1. 8~9.8%、2. 0~9.8%、2. 2~9.8%、2. 4~9.8%、2. 6~9.8%、2. 8~9.8%、3. 0~9.8%、3. 2~9.8%、3. 4~9.8%、3. 6~9.8%、3. 8~9.8%、4. 0~9.8%、4. 2~9.8%、4. 4~9.8%、4. 6~9.8%、4. 8~9.8%、1. 0~9.6%、1. 2~9.6%、1. 4~9.6%、1. 6~9.6%、1. 8~9.6%、2. 0~9.6%、2. 2~9.6%、2. 4~9.6%、2. 6~9.6%、2. 8~9.6%、3. 0~9.6%、3. 2~9.6%、3. 4~9.6%、3. 6~9.6%、3. 8~9.6%

％、4.0～9.6％、4.2～9.6％、4.4～9.6％、4.6～9.6％、4.8～9.6％等を挙げることができ、高分子化合物がデキストラン類の場合、1.2～9.6％が好ましく、2.4～9.6％がより好ましく、4.8～9.6％がさらに好ましい。

[0026] 高分子化合物をさらに含む本件凍結保存液におけるプロピレングリコール及び高分子化合物の重量比の範囲としては、例えば、1:0.1～1:10、1:0.1～1:8、1:0.1～1:6、1:0.1～1:4、1:0.2～1:10、1:0.2～1:8、1:0.2～1:6、1:0.2～1:4、1:0.3～1:10、1:0.3～1:8、1:0.3～1:6、1:0.3～1:4、1:0.4～1:10、1:0.4～1:8、1:0.4～1:6、1:0.4～1:4、1:0.5～1:10、1:0.5～1:8、1:0.5～1:6、1:0.5～1:4等を挙げることができ、高分子化合物がデキストラン類の場合、1:0.1～1:4が好ましく、1:0.3～1:4がより好ましく、1:0.5～1:4がさらに好ましい。

[0027] 本件凍結保存液としては、トレハロース若しくはその誘導体又はそれらの塩（以下、「トレハロース類」ということがある）をさらに含むものが好ましい。トレハロース類におけるトレハロースとしては、2つの α -グルコースが1,1-グリコシド結合した二糖類である α 、 α -トレハロースの他に、 α -グルコースと β -グルコースとが1,1-グリコシド結合した二糖類である α 、 β -トレハロースや、2つの β -グルコースが1,1-グリコシド結合した二糖類である β 、 β -トレハロースを挙げることができるが、これらの中でも α 、 α -トレハロースが好ましい。これらトレハロースは、化学合成、微生物による生産、酵素による生産等のいずれの公知の方法によっても製造することができるが、市販品を用いることもできる。例えば、トレハロース二水和物（富士フィルム和光純薬社製）等の市販品を挙げることができる。

[0028] 上記トレハロース類におけるトレハロース誘導体としては、二糖類のトレ

ハロースに 1 又は複数の糖単位が結合したグリコシルトレハロース類であれば特に制限されず、グリコシルトレハロース類には、グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトトリオシルトレハロース等が含まれる。

[0029] 本件凍結保存液におけるトレハロース類の濃度としては、P Gとの併用効果が認められる限り特に制限されず、トレハロース類の濃度の下限値としては、例えば、0.7 (w/v) %、0.8 (w/v) %、0.9 (w/v) %、1.0 (w/v) %、1.1 (w/v) %、1.2 (w/v) %、1.3 (w/v) %、1.4 (w/v) %等を挙げることができる。また、本件凍結保存液におけるトレハロース類の濃度の上限値としては、例えば、40 (w/v) %、35 (w/v) %、30 (w/v) %、25 (w/v) %、20 (w/v) %、15 (w/v) %、12 (w/v) %、6.0 (w/v) %等を挙げることができる。

[0030] したがって、上記トレハロース類の濃度としては、例えば、0.7~40%、0.8~40%、0.9~40%、1.0~40%、1.1~40%、1.2~40%、1.3~40%、1.4~40%、0.7~35%、0.8~35%、0.9~35%、1.0~35%、1.1~35%、1.2~35%、1.3~35%、1.4~35%、0.7~30%、0.8~30%、0.9~30%、1.0~30%、1.1~30%、1.2~30%、1.3~30%、1.4~30%、0.7~25%、0.8~25%、0.9~25%、1.0~25%、1.1~25%、1.2~25%、1.3~25%、1.4~25%、0.7~20%、0.8~20%、0.9~20%、1.0~20%、1.1~20%、1.2~20%、1.3~20%、1.4~20%、0.7~15%、0.8~15%、0.9~15%、1.0~15%、1.1~15%、1.2~15%、1.3~15%、1.4~15%、0.7~12%、0.8~12%、0.9~12%、1.0~12%、1.1~12%、1.2~12%、1.3~12%、1.4~12%、0.7~6.0%、0.8~6.0%、0.9~6.0%、1

、0～6.0%、1.1～6.0%、1.2～6.0%、1.3～6.0%、1.4～6.0%等を挙げることができる。

[0031] トレハロース類をさらに含む本件凍結保存液におけるプロピレングリコール及びトレハロース類の重量比の範囲としては、例えば、1:0.08～1:16、1:0.08～1:14、1:0.08～1:12、1:0.08～1:10、1:0.08～1:8、1:0.08～1:6、1:0.08～1:4、1:0.08～1:2.4、1:0.1～1:16、1:0.1～1:14、1:0.1～1:12、1:0.1～1:10、1:0.1～1:8、1:0.1～1:6、1:0.1～1:4、1:0.1～1:2.4、1:0.12～1:16、1:0.12～1:14、1:0.12～1:12、1:0.12～1:10、1:0.12～1:8、1:0.12～1:6、1:0.12～1:4、1:0.12～1:2.4、0.14～1:16、1:0.14～1:14、1:0.14～1:12、1:0.14～1:10、1:0.14～1:8、1:0.14～1:6、1:0.14～1:4、1:0.14～1:2.4、0.16～1:16、1:0.16～1:14、1:0.16～1:12、1:0.16～1:10、1:0.16～1:8、1:0.16～1:6、1:0.16～1:4、1:0.16～1:2.4等を挙げることができる。

[0032] 本件凍結保存液は、2.5～8.75 (v/v) %のプロピレングリコールを含む、哺乳動物細胞の凍結保存が可能な液（例えば、等張液、低張液、高張液）であり、2.5～8.75 (v/v) %のプロピレングリコールを含む等張液が好ましい。本明細書において「等張液」とは、体液や細胞液の浸透圧とほぼ同じ浸透圧を有する液を意味し、具体的には、250～380 mOsm/Lの範囲内の浸透圧を有する液を意味する。また、本明細書において「低張液」とは、体液や細胞液の浸透圧よりも低い浸透圧を有する液を意味し、具体的には、250 mOsm/L未満の浸透圧を有する液を意味する。かかる低張液としては、細胞が破裂しない程度の低張液（具体的には、100～250 mOsm/L未満の範囲内の浸透圧を有する液）が好ましい。

。また、本明細書において「高張液」とは、体液や細胞液の浸透圧よりも高い浸透圧を有する液を意味し、具体的には、浸透圧が 380 mOsm/L 超（好ましくは 380 mOsm/L 超～ 1000 mOsm/L の範囲内）を意味する。

[0033] 上記等張液としては、体液や細胞液の浸透圧とほぼ同じになるようにナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン等によって塩濃度や糖濃度等を調整した等張液であれば特に制限されず、具体的には生理食塩水、緩衝効果のある生理食塩水（例えば、PBS、トリス緩衝生理食塩水 [Tris Buffered Saline; TBS]、HEPES緩衝生理食塩水）、リンゲル液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液、5%グルコース水溶液、動物細胞培養用基礎培地（例えば、DMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199）、等張剤（例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンニトール、ラクトース、塩化ナトリウム）等を挙げることができ、これらの中でも、後述する本実施例においてその効果が実証されているため、乳酸リンゲル液、生理食塩水、リンゲル液、及び酢酸リンゲル液から選択される等張液を好適に例示することができる。等張液は、市販のものであっても、自ら調製したものであってもよい。市販のものとしては、大塚生食注（大塚製薬工場社製）（生理食塩液）、リンゲル液「オーツカ」（大塚製薬工場社製）（リンゲル液）、ラクテック（登録商標）注（大塚製薬工場社製）（乳酸リンゲル液）、ヴィーン（登録商標）F輸液（扶桑薬品工業社製）（酢酸リンゲル液）、大塚糖液5%（大塚製薬工場社製）（5%グルコース水溶液）、ピカネイト（登録商標）輸液（大塚製薬工場社製）（重炭酸リンゲル液）を挙げることができる。

[0034] 本件凍結保存液としては、PG以外の凍結保護成分（例えば、DMSO；グリセロール；エチレングリコール；PEG；セリシン；イソマルトオリゴ糖；ヒト、ウシ等由来の血清）を含むものであってもよいが、PG単独で、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができるため、PG以外の凍結保護成分を含まないものが好ましい。

- [0035] 本件凍結保存液としては、トレハロース類以外のオリゴ糖（例えば、スクロース、ラクトース、マルトース等の二糖類；マルトトリオース、ラフィノース、メレジトース等の三糖類；アカルボース、スタキオース等の四糖類）や、単糖類（例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース）を含むものであってもよいが、含まないものであってもよい。
- [0036] 本件凍結保存液には、通常、タウリン若しくはその誘導体又はそれらの塩；及び、グリシン若しくはその誘導体又はそれらの塩；から選択される物質は含まれない。かかるタウリン誘導体としては、例えば、N-置換タウリン（例えば、N-（2-アセトアミド）-2-アミノエタンスルホン酸、N，N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸、2-[4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸、2-モルフォリノエタンスルホン酸、ピペラジン-1，4-ビス（2-エタンスルホン酸）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸等）、ヒポタウリン、チオタウリンなどを挙げることができる。上記グリシン誘導体としては、例えば、サルコシン（N-メチルグリシン）、N-エチルグリシン、N-プロピルグリシン、N，N-ジエチルグリシン、N，N-ジメチルグリシン、N-アミジノグリシン、N-アミジノ-N-メチルグリシン、グリシルグリシン、フェナセツル酸、グリシンメチルエステル、グリシンエチルエステル、グリシンn-ブチルエステル、グリシンt-ブチルエステル、グリシンn-プロピルエステル、グリシンn-ペンチルエステル、グリシンベンジルエステル等を挙げることができる。タウリン、タウリン誘導体、グリシン、及びグリシン誘導体の「塩」としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、リン酸塩、硝酸塩、硫酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、トルエンスルホン酸塩、コハク酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、グリコール酸塩、メタンスルホン酸塩、酪酸塩、吉草酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩等の酸付加塩や、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の金属塩や、アンモニウム塩、アルキルアンモニウム

塩などを挙げることができる。

[0037] 本明細書において、（デキストラン、デキストラン誘導体、ヒドロキシエチルデンプン、ヒドロキシエチルデンプン誘導体、トレハロース、トレハロース誘導体、カルボキシメチルセルロース、キサンタンガム、及びアミロペクチン）の「塩」としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、リン酸塩、硝酸塩、硫酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、トルエンスルホン酸塩、コハク酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、グリコール酸塩、メタンスルホン酸塩、酪酸塩、吉草酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩等の酸付加塩や、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の金属塩や、アンモニウム塩、アルキルアンモニウム塩などを挙げることができる。なお、これらの塩は使用時において溶液として用いられ、その作用は、デキストラン、デキストラン誘導体、ヒドロキシエチルデンプン、ヒドロキシエチルデンプン誘導体、トレハロース、トレハロース誘導体、カルボキシメチルセルロース、キサンタンガム、及びアミロペクチンを用いた場合と同効なものが好ましい。（デキストラン、デキストラン誘導体、ヒドロキシエチルデンプン、ヒドロキシエチルデンプン誘導体、トレハロース、トレハロース誘導体、カルボキシメチルセルロース、キサンタンガム、及びアミロペクチン）の「塩」は、水和物又は溶媒和物を形成していてもよく、またいずれかを単独で又は2種以上を適宜組み合わせて用いることができる。

[0038] 本件凍結保存液における任意成分としては、例えば、ビタミン類（例えば、塩化コリン、パントテン酸、葉酸、ニコチンアミド、塩酸ピリドキサル、リボフラビン、塩酸チアミン、アスコルビン酸、ビオチン、イノシトール）、キレート剤（例えば、EDTA、EGTA、クエン酸、サリチレート）、抗生物質（例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン）、タンパク質、抗酸化物質（例えば、ポリフェノール、ケルセチン）等を挙げることができる。本明細書において「任意成分」とは、含んでもよいし含まなくてもよい成分のことを意味する。

[0039] 上記哺乳動物細胞の具体的な細胞としては、例えば、幹細胞（例えば、再生医療等に血管経由で投与される幹細胞）；膵島細胞（例えば、Ⅰ型糖尿病患者に経静脈投与される膵島細胞）；T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞等のリンパ球系細胞；単球、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞；好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞等の顆粒球；等を挙げることができ、後述する本実施例でその効果が実証されているため、T細胞を好適に例示することができる。かかるT細胞としては、アルファ・ベータT細胞、ガンマ・デルタT細胞、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、腫瘍浸潤T細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、NKT細胞を挙げることができる。T細胞は、哺乳動物の骨髓、末梢血、臍帯血等から公知の一般的な方法で採取することができる。

[0040] 本明細書において、「哺乳動物」としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の有蹄目、イヌ、ネコ等のネコ目、ヒト、サル、アカゲザル、カニクイザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を例示することができ、中でも、マウス、ブタ、ヒトを好適に例示することができる。

[0041] 上記「幹細胞」とは、自己複製能及び分化・増殖能を有する未熟な細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（pluripotent stem cell）、複能性幹細胞（multipotent stem cell）、単能性幹細胞（unipotent stem cell）等の亜集団が含まれる。多能性幹細胞とは、それ自体では個体になることができないが、生体を構成する全ての組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

[0042] 多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞）、EG細胞、iPS細胞等を挙げることができる。ES細胞は、内部細胞塊をフィーダー細胞上又はLIFを含む培地中で培養することにより製造することができる。ES細胞

の製造方法は、例えば、WO 96/22362、WO 02/101057、US 5,843,780、US 6,200,806、US 6,280,718等に記載されている。EG細胞は、始生殖細胞をmSCF、LIF及びbFGFを含む培地中で培養することにより製造することができる (Cell, 70:841-847, 1992)。iPS細胞は、体細胞 (例えば線維芽細胞、皮膚細胞等) にOct3/4、Sox2及びKlf4 (必要に応じてさらにc-Myc又はn-Myc) 等のリプログラミング因子を導入することにより製造することができる (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)。また、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した幹細胞も、多能性幹細胞として好ましい (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ら (Nature Genetics, 24, 109 (2000))。

[0043] 複能性幹細胞としては、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞等の細胞に分化可能な間葉系幹細胞；白血球、赤血球、血小板等の血球系細胞に分化可能な造血系幹細胞 (例えば、CD34、CD110、CD111、CD112、及びCD117から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカーが陽性の造血系幹細胞、好ましくはCD34陽性造血系幹細胞)；ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト等の細胞に分化可能な神経系幹細胞；骨髓幹細胞、生殖幹細胞等の体性幹細胞；等を挙げることができ、後述する本実施例においてその効果が実証されているため、間葉系幹細胞や造血系幹細胞を好適に例示することができる。複能性幹細胞は、自体公知の方法により、生体から単離することができる。例えば、間葉系幹細胞は、哺乳動物の骨髓、脂肪組織、末梢血、臍帯血等から公知の一般的な方法で採取することができる。

る。また、骨髓穿刺後の造血幹細胞等の培養、継代によりヒト間葉系幹細胞を単離することができる (Journal of Autoimmunity, 30 (2008) 163-171)。
例えば、造血系幹細胞は、哺乳動物の骨髓、末梢血、臍帯血等から公知の一般的な方法で採取することができる。複能性幹細胞は、上記多能性幹細胞を適切な誘導条件下で培養することによっても得ることができる。間葉系幹細胞は、好ましくはヒト脂肪由来の間葉系幹細胞である。また、造血系幹細胞は、好ましくはヒト由来のCD34陽性造血系幹細胞である。

[0044] 本件凍結保存液としては、哺乳動物細胞を含まない態様であっても、哺乳動物細胞を含む態様であってもよく、本件凍結保存方法を実施する場合、哺乳動物細胞を含む態様（すなわち、哺乳動物細胞を含有する本件凍結保存液）が好ましい。哺乳動物細胞を含有する本件凍結保存液は、任意の方法で調製することができ、例えば、1) 哺乳動物細胞含有液を、遠心処理により、上清（液）と沈殿（哺乳動物細胞）とに分離した後、上清（液）を除き、沈殿（哺乳動物細胞）に本件凍結保存液を添加することにより調製する方法や、2) 哺乳動物細胞含有液と混合したときに、本件凍結保存液に含まれる成分の終濃度が目的の濃度（例えば、PGの場合、2.5～8.75 (v/v) %）となるように調整した液を、哺乳動物細胞含有液と混合することにより調製する方法等を挙げることができる。哺乳動物細胞を含有する本件凍結保存液としては、臍帯血を含む本件凍結保存液が好ましい。臍帯血を含む本件凍結保存液は、例えば、上記2)の方法に従って、臍帯血（すなわち、造血系幹細胞等の哺乳動物細胞を含む液）と、PGを含む液とを任意の比率（例えば、10:1～1:10 [例えば、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10等]）で混合することにより調製することができる。

[0045] 本件凍結保存液中に保存する哺乳動物細胞として、付着性の細胞を例示することができる。本明細書中、「付着性」細胞とは、足場に接着することで生存、増殖、物質の生産を行なうことができる足場依存性の細胞を意味する

。付着性幹細胞としては、多能性幹細胞、間葉系幹細胞、神経系幹細胞、骨髄幹細胞、生殖幹細胞等を挙げることができる。付着性幹細胞は、好ましくは、間葉系幹細胞である。

[0046] 本件凍結保存液中に保存する哺乳動物細胞（集団）は、生体内から分離されたものであっても、インビトロで継代培養されたものであってもよいが、単離又は精製されていることが好ましい。本明細書中、「単離又は精製」とは、目的とする成分以外の成分を除去する操作が施されていることを意味する。単離又は精製された哺乳動物細胞の純度（全細胞数に対する、哺乳動物幹細胞数等の目的とする細胞の割合）は、通常30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば100%）である。

[0047] 本件凍結保存液中に保存する哺乳動物細胞（集団）は、単一細胞（シングルセル）の状態であることが好ましい。本明細書において、「単一細胞の状態」とは、他の細胞と寄り集まって塊を形成していないこと（即ち、凝集していない状態）を意味する。単一細胞の状態の哺乳動物細胞は、インビトロで培養した哺乳動物細胞をトリプシン／EDTA等で酵素処理した後、ピペティングやタッピング等の当該技術分野における周知の方法により細胞を懸濁することにより調製することができる。哺乳動物細胞中に含まれる単一細胞の状態の哺乳動物細胞の割合は、通常70%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは99%以上（例えば100%）である。単一細胞の状態の細胞の割合は、哺乳動物細胞をPBSに分散し、これを顕微鏡下で観察し、無作為に選択された複数個（例えば、1000個）の細胞について凝集の有無を調べることにより決定することができる。

[0048] 本件凍結保存方法としては、上記工程（a）の後、哺乳動物細胞を凍結融解し、培養する工程（b）をさらに含む方法が好ましい。培養期間としては、例えば、1日間以上、2日間以上、3日間以上、4日間以上、5日間以上、6日間以上、7日間以上、8日間以上等を挙げることができるが、5日間

以上が好ましい。

- [0049] 上記工程（b）において、哺乳動物細胞を凍結融解する方法としては特に制限されず、凍結した、哺乳動物細胞を含有する本件凍結保存液を含む容器（細胞保存用チューブ、細胞保存用バイアル、ストロー等）を、常温（例えば、10～28℃の範囲内）で自然解凍してもよいが、再凍結を防ぐ観点から、温水（例えば、30～40℃の範囲内の水）中に浸し、急速解凍することが好ましい。
- [0050] 上記工程（b）において、凍結融解後の哺乳動物細胞の培養は、適切な容器（培養プレート、培養ディッシュ、培養フラスコ等）内で適切な培養液の存在下で行う。かかる培養液としては、例えば、0.1～30（v/v）%の血清（FBS、CS等）を含む動物細胞培養用培養液（DMEM、EMEM、IMDM、RPMI 1640、 α MEM、F-12、F-10、M-199、AIM-V等）、MyeloCult H5100培地（STEMCELL Technologies社製、ST-05150）などを挙げることができる。また、血清不含の培養液（無血清培養液）としては、例えば、前述した、市販のB27サプリメント（ーインスリン）、N2サプリメント、B27サプリメント、Knockout Serum Replacement等の血清代替物を適量（例えば、1～30%）添加した上記動物細胞培養用培養液などを挙げることができる。
- [0051] 上記工程（b）において、凍結融解後の哺乳動物細胞の培養温度は、通常約30～40℃の範囲内であり、好ましくは37℃である。また、培養時のCO₂濃度は、通常約1～10%の範囲内であり、好ましくは約5%である。また、培養時の湿度は、通常約70～100%の範囲内であり、好ましくは約95～100%の範囲内である。また、培養時のO₂濃度は、正常酸素濃度（18～22%O₂）であっても、低酸素濃度（0～10%O₂）であってもよい。
- [0052] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1

[0053] 1. 方法

[検討1に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 10 (v/v) %のDMSO、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LRは、セルストアS（大塚製薬工場社製）（すなわち、3 (w/v) %のトレハロース及び5 (w/v) %のデキストラン含有乳酸リンゲル液）とCultureSure（登録商標）DMSO（富士フイルム和光純薬工業社製）を9：1の比率で混合することにより調製した。

2) 5 (v/v) %のDMSO、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR；2.5 (v/v) %のDMSO、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR；並びに、1.25 (v/v) %のDMSO、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR；は、上記「10%のDMSO、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」を、セルストアSにて2倍公比で希釈することにより調製した。

3) 10 (v/v) %のプロピレングリコール（PG）（丸石製薬社製）、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LRは、セルストアSとPGを9：1の比率で混合することにより調製した。

4) 5 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR；2.5 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR；並びに、1.25 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR；は、上記「10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」を、セルストアSにて2倍公比で希釈することにより調製した。

[0054] [検討2に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 4 (v/v) %のPG、2.88 (w/v) %のトレハロース、及び4.8 (w/v) %のデキストラン含有LRは、0.4 mLの上記PGと、9.6 mLのセルストアSを混合することにより調製した。

2) 4 (v/v) %のDMSO、2.88 (w/v) %のトレハロース、及び4.8 (w/v) %のデキストラン含有LRは、0.4 mLの上記DMSOと、9.6 mLのセルストアSを混合することにより調製した。

[0055] [検討3に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 10 (v/v) %のPG含有LRは、ラクテック注（大塚製薬工場社製）と上記PGを9：1の比率で混合することにより調製した。

2) 5 (v/v) %のPG含有LR、2.5 (v/v) %のPG含有LR、及び1.25 (v/v) %のPG含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG含有LR」をラクテック注にて2倍公比で希釈することにより調製した。

3) 10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LRは、まず、500 mgのデキストラン40 (Mw=40000、東京化成工業社製)を、10 mLのラクテック注に溶解し、5 (w/v) %のデキストラン含有LRを調製した後、5 (w/v) %のデキストラン含有LRと、上記PGを9：1の比率で混合することにより調製した。

4) 5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LR；2.5 (v/v) %のPG及び4.88 (w/v) %のデキストラン含有LR；並びに、1.25 (v/v) %のPG及び4.94 (w/v) %のデキストラン含有LR；は、上記「10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」を上記「5 (w/v) %のデキストラン含有LR」にて2倍公比で希釈することにより調製した。

5) 10 (v/v) %のPG及び2.7 (w/v) %のトレハロース含有LRは、0.5 mLの上記PGと、0.5 mLのセルストア（登録商標）W（大塚製薬工場社製）（すなわち、3 (w/v) %のトレハロース含有乳酸リンゲル液）を混合することにより調製した。

6) 5 (v/v) %のPG及び2.85 (w/v) %のトレハロース含有LR; 2.5 (v/v) %のPG及び2.925 (w/v) %のトレハロース含有LR; 並びに、1.25 (v/v) %のPG及び2.9625 (w/v) %のトレハロース含有LR; は、上記「10 (v/v) %のPG及び2.7 (w/v) %のトレハロース含有LR」をセルストアWにて2倍公比で希釈することにより調製した。

7) 10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LRは、前述した、検討1の3) で調製したものを用いた。

8) 5 (v/v) %のPG、2.85 (w/v) %のトレハロース、及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LR; 2.5 (v/v) %のPG、2.925 (w/v) %のトレハロース、及び4.875 (w/v) %のデキストラン含有LR; 並びに、1.25 (v/v) %のPG、2.9625 (w/v) %のトレハロース、及び4.9375 (w/v) %のデキストラン含有LR; は、上記「10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」をセルストアSにて2倍公比で希釈することにより調製した。

[0056] [検討4に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 5 (v/v) %のPGを含む4種類の基液（生理食塩水[S]、リンゲル液[R]、酢酸リンゲル液[AR]、及び乳酸リンゲル液[LR]）は、0.5 mLの上記PGと、9.5 mLの4種類の基液（大塚生食注[大塚製薬工場社製]、リンゲル液「オーツカ」[大塚製薬工場社製]、ヴィーンF輸液[扶桑薬品工業社製]、及びラクテック注）とを混合することにより調製した。

2) 5% (v/v) のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有Sは、まず、500 mgのデキストラン40 (Mw=40000、東京化成工業社製) を、10 mLのラクテック注に溶解し、5 (w/v) %のデキストラン含有LRを調製した後、0.5 mLの上記PGと、9.5 mLの上記「

5 (w/v) %のデキストラン含有LR」とを混合することにより調製した。

3) 5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有Rは、まず、500mgの上記デキストラン40を、10mLのリンゲル液「オーツカ」に溶解し、5 (w/v) %のデキストラン含有Rを調製した後、0.5mLの上記PGと、9.5mLの5 (w/v) %のデキストラン含有Rとを混合することにより調製した。

4) 5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有ARは、まず、500mgの上記デキストラン40を、10mLのヴィーンF輸液に溶解し、5 (w/v) %のデキストラン含有ARを調製した後、0.5mLの上記PGと、9.5mLの5 (w/v) %のデキストラン含有ARとを混合することにより調製した。

5) 5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LRは、まず、500mgの上記デキストラン40を、10mLのラクテック注に溶解し、5 (w/v) %のデキストラン含有LRを調製した後、0.5mLの上記PGと、9.5mLの5 (w/v) %のデキストラン含有LRとを混合することにより調製した。

[0057] [検討5に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR ; 5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LR ; 2.5 (v/v) %のPG及び4.88 (w/v) %のデキストラン含有LR ; 並びに、1.25 (v/v) %のPG及び4.94 (w/v) %のデキストラン含有LR ; は、上記[検討3に用いた細胞凍結保存液の調製]の3) 及び4) で調製したものを用了。

2) 7.5 (v/v) %のPG及び4.63 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LR」と、上記「10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」を1 : 1の比率で混合することにより調製した。

。

3) 3.75 (v/v) %のPG及び4.81 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「2.5 (v/v) %のPG及び4.88 (w/v) %のデキストラン含有LR」と、上記「5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LR」を1 : 1の比率で混合することにより調製した。

4) 6.25 (v/v) %のPG及び4.69 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「5 (v/v) %のPG及び4.75 (w/v) %のデキストラン含有LR」と、上記「7.5 (v/v) %のPG及び4.63 (w/v) %のデキストラン含有LR」を1 : 1の比率で混合することにより調製した。

5) 8.75 (v/v) %のPG及び4.56 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「7.5 (v/v) %のPG及び4.63 (w/v) %のデキストラン含有LR」と、上記「10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」を1 : 1の比率で混合することにより調製した。

[0058] [検討6に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 4 (v/v) %のPG含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG含有LR」とラクテック注を4 : 6の比率で混合することにより調製した。

2) 4 (v/v) %のPG及び9.6 (w/v) %のデキストラン含有LRは、まず、1gの上記デキストラン40を、10mLのラクテック注に溶解し、10 (w/v) %のデキストラン含有LRを調製した後、10 (w/v) %のデキストラン含有LRと上記PGを96 : 4の比率で混合することにより調製した。

3) 4 (v/v) %のPG及び4.8 (w/v) %のデキストラン含有LR ; 4 (v/v) %のPG及び2.4 (w/v) %のデキストラン含有LR ; 並びに、4 (v/v) %のPG及び1.2 (w/v) %のデキストラン含有LR ; は、上記「4 (v/v) %のPG及び9.6 (w/v) %のデキスト

ラン含有LR」を上記「4 (v/v) %のPG含有LR」にて2倍公比で希釈することにより調製した。

4) 4 (v/v) %のPG及び7.2 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「4 (v/v) %のPG及び4.8 (w/v) %のデキストラン含有LR」と上記「4 (v/v) %のPG及び9.6 (w/v) %のデキストラン含有LR」を1 : 1の比率で混合することにより調製した。

[0059] [検討7に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 10 (v/v) %のPG含有LRとして、上記[検討3に用いた細胞凍結保存液の調製]の1)で調製したものをを用いた。

2) 4 (v/v) %のPG含有LRは、上記[検討6に用いた細胞凍結保存液の調製]の1)で調製したものをを用いた。

3) 10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「5 (w/v) %のデキストラン含有LR」と上記PGを9 : 1の比率で混合することにより調製した。

4) 4 (v/v) %のPG及び4.8 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」と上記「5 (w/v) %のデキストラン含有LR」を4 : 6の比率で混合することにより調製した。

5) 10 (v/v) %のPG及び4.5 %のヒドロキシエチルデンプン (HES) 含有LRは、まず、500 mgのHES (Mw = 2220339 [実測値]) (Fresenius Kabi Austria GmbH社製) を、10 mLのラクテック注に溶解し、5 (w/v) %のHES含有LRを調製した後、5 (w/v) %のHES含有LRと上記PGを9 : 1の比率で混合することにより調製した。

6) 4 (v/v) %のPG及び4.8 (w/v) %のHES含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG及び4.5 (w/v) %のHES含有LR」と上記「5 (w/v) %のHES含有LR」を4 : 6の比率で混合することにより調製した。

7) 10 (v/v) %のPG及び2.7 (w/v) %のトレハロース含有LRは、上記「検討3に用いた細胞凍結保存液の調製」の5)で調製したものをを用いた。

8) 4 (v/v) %のPG及び2.88 (w/v) %のトレハロース含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG及び2.7 (w/v) %のトレハロース含有LR」とセルストアWを4:6の比率で混合することにより調製した。

。

9) 10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LRは、まず、500mgの上記デキストラン40を、10mLのセルストアWに溶解し、5 (w/v) %のデキストラン含有セルストアWを調製した後、5 (w/v) %のデキストラン含有セルストアWと上記PGを9:1の比率で混合することにより調製した。

10) 4 (v/v) %のPG、2.88 (w/v) %のトレハロース、及び4.8 (w/v) %のデキストラン含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のデキストラン含有LR」と上記「5 (w/v) %のデキストラン含有セルストアW」を4:6の比率で混合することにより調製した。11) 10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のHES含有LRは、まず、500mgの上記HESを、10mLのセルストアWに溶解し、5 (w/v) %のHES含有セルストアWを調製した後、5 (w/v) %のHES含有セルストアWと上記PGを9:1の比率で混合することにより調製した。

12) 4 (v/v) %のPG、2.88 (w/v) %のトレハロース、及び4.8 (w/v) %のHES含有LRは、上記「10 (v/v) %のPG、2.7 (w/v) %のトレハロース、及び4.5 (w/v) %のHES含有LR」と上記「5 (w/v) %のHES含有セルストアW」を4:6の比率で混合することにより調製した。

[0060] [検討8に用いた細胞凍結保存液の調製]

- 1) 2.5 (v/v) %のPG含有乳酸リンゲル液(LR)は、ラクテック注及びPGを39:1の比率で混合することにより調製した。
- 2) 2.5 (v/v) %のPG及び2.925 (w/v) %のトレハロース含有LRは、セルストアW及び上記PGを39:1の比率で混合することにより調製した。
- 3) 2.5 (v/v) %のPG、2.925 (w/v) %のトレハロース、及び4.875 (w/v) %のデキストラン含有LRは、セルストアS及び上記PGを39:1の比率で混合することにより調製した。

[0061] [検討9に用いた細胞凍結保存液の調製]

- 1) 4 (v/v) %のPG含有LRは、上記[検討6に用いた細胞凍結保存液の調製]の1)で調製したものを用了。
- 2) 4 (v/v) %のPG及び1.44 (w/v) %のグルコース含有LRは、まず、150mgのD(+)-グルコース(富士フィルム和光純薬工業社製)を10mLのラクテック注に溶解し、1.5 (w/v) %のグルコース含有LRを調製した後、0.4mLの上記PGと9.6mLの1.5 (w/v) %のグルコース含有LRを混合することにより調製した。
- 3) 4 (v/v) %のPG及び1.44 (w/v) %のフルクトース含有LRは、まず、150mgのD(-)-フルクトース(富士フィルム和光純薬工業社製)を10mLのラクテック注に溶解し、1.5 (w/v) %のフルクトース含有LRを調製した後、0.4mLの上記PGと9.6mLの1.5 (w/v) %のフルクトース含有LRを混合することにより調製した。
- 4) 4 (v/v) %のPG及び2.88 (w/v) %のトレハロース含有LRは、まず、332mgのトレハロース二水和物(富士フィルム和光純薬社製)を10mLのラクテック注に溶解し、3 (w/v) %のトレハロース含有LRを調製した後、0.4mLの上記PGと9.6mLの3 (w/v) %のトレハロース含有LRを混合することにより調製した。
- 5) 4 (v/v) %のPG及び2.88%のスクロース含有LRは、まず、

300 mgのスクロース（富士フィルム和光純薬社製）を10 mLのラクテック注に溶解し、3%のスクロース含有LRを調製した後、0.4 mLの上記PGと9.6 mLの3%のスクロース含有LRを混合することにより調製した。

6) 4 (v/v) %のPG及び2.88 (w/v) %のラクトース含有LRは、まず、316 mgのラクトース一水和物（富士フィルム和光純薬社製）を10 mLのラクテック注に溶解し、3 (w/v) %のラクトース含有LRを調製した後、0.4 mLの上記PGと9.6 mLの3 (w/v) %のラクトース含有LRを混合することにより調製した。

[0062] [検討10に用いた細胞凍結保存液の調製]

1) 4 (v/v) %のPG含有LRは、上記[検討6に用いた細胞凍結保存液の調製]の1)で調製したものを用いた。

2) 4 (v/v) %のPG及び11.52 (w/v) %のトレハロース含有LRは、まず、1.328 gの上記トレハロース二水和物を10 mLのラクテック注に溶解し、12 (w/v) %のトレハロース含有LRを調製した後、12 (w/v) %のトレハロース含有LRと上記PGを96 : 4の比率で混合することにより調製した。

3) 4 (v/v) %のPG及び5.76 (w/v) %のトレハロース含有LR ; 4 (v/v) %のPG及び2.88 (w/v) %のトレハロース含有LR ; 4 (v/v) %のPG及び1.44 (w/v) %のトレハロース含有LR ; 並びに、4 (v/v) %のPG及び0.72 (w/v) %のトレハロース含有LR ; は、上記「4 (v/v) %のPG及び11.52 (w/v) %のトレハロース含有LR」を上記「4 (v/v) %のPG含有LR」にて2倍公比で希釈することにより調製した。

[0063] [検討11に用いた細胞凍結保存液の調製]

4 (v/v) %のPGを含む、3種類の基液（血清含有培養液、トレハロース含有LR、及びLR）は、10%のFBS（Gibco社製）含有MEM α （Gibco社製）、セルストアW、及びラクテック注を、それぞれ上記PGと、2

4 : 1 の比率で混合することにより調製した。

[0064] [検討 1 2 ~ 1 5 に用いた細胞凍結保存液の調製]

2 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R ; 3 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R ; 4 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R ; 5 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R ; 並びに、7. 5 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R ; は、まず、セルストア S と上記 P G を 9 : 1 の比率で混合し、1 0 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R を調製した後、セルストア S と「1 0 (v/v) % の P G、2. 7 (w/v) % のトレハロース、及び 4. 5 (w/v) % のデキストラン含有 L R」をそれぞれ 4 : 1、7 : 3、3 : 2、及び 1 : 1 の比率で混合することにより調製した。

[0065] [h A D - M S C の培養 (検討 1 ~ 1 0)]

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (h A D - M S C) (Lonza Walkersville社製) の培養は、Lonza Walkersville社のヒト脂肪細胞由来幹細胞培養の手順書に従って行った。具体的には、h A D - M S C を 7 5 c m² フラスコに培地キット (PT-4505、ADSC BulletKit, Lonza Walkersville社製) から調製した培地 (以下、「M S C 培地」という) 1 5 m L を入れて播種し、3 7 °C、5 % C O₂ インキュベーター下で培養した。培地交換は 3 日又は 4 日ごとに行った。細胞は、9 0 % コンフルエント程度 (8 0 ~ 1 0 0 % コンフルエント) で継代し、2 ~ 5 回の継代後のフラスコを、以下の「h A D - M S C の調製 (検討 1 ~ 1 0) 」の項目に記載の方法に用いた。

[0066] [h A D - M S C の調製 (検討 1 ~ 1 0)]

以下の手順 [1] ~ [1 1] に従って、h A D - M S C を調製した。

〔１〕 パーソナルインキュベーター（PIC-100、アズワン社製）を 37°C に設定し、加温しておいた。

〔２〕 hAD-MSC を培養している 75 cm^2 フラスコを CO_2 インキュベーターから取り出した。

〔３〕 顕微鏡下で細胞の状態を観察し、 $80\% \sim 100\%$ コンフルエントのものを使用した。

〔４〕 MSC 培地を吸引し、PBS（－）（製品番号：14190-144、GIBCO社製）を各 75 cm^2 フラスコに 8 mL ずつ添加した。

〔５〕 PBS（－）を吸引後、トリプシン／EDTA（製品コード：CC-5012、Lonza Walkersville社製）をフラスコに 4 mL ずつ添加し、パーソナルインキュベーターにて $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下で 5 分間インキュベートした。

〔６〕 細胞が 90% 程度剥離するまで顕微鏡下で観察しながら、ゆっくりと揺らした。

〔７〕 TNS（trypsin neutralizing solution、製品コード：CC-5002、Lonza Walkersville社製）を 8 mL ずつ加えてトリプシン反応を停止させ、ピペティングにより細胞を剥離し、 50 mL プロテオセーブ（MS-52550、住友ベークライト社製）に移した。

〔８〕 $210 \times g$ 、 5 分間、室温で遠心して細胞を回収した。

〔９〕 上清を吸引し、セルストアWに懸濁した。

〔１０〕 $20\text{ }\mu\text{L}$ の細胞懸濁液をとり、 $20\text{ }\mu\text{L}$ の 0.4% トリパンブルー（商品番号：15250-061、gibco社製）と混合し、細胞計数盤（ワンセルカウンター、商品番号：0CC01、バイオメディカルサイエンス社製）で細胞数（生細胞及び死細胞）を計測した。なお、計測細胞数はワンセルカウンターを用いて 1 カ所のエリアの四隅のエリアの細胞数とした。

〔１１〕 全細胞濃度を以下の式にて算出した。式：全細胞濃度（cells / mL） = （計測した全細胞数 $\times 10^4$ ） / 4×2

[0067] [hCD8 陽性 T 細胞の培養（検討 11 及び 12）]

1. 5×10^6 個のヒト CD8 陽性 T 細胞（hCD8 陽性 T 細胞）（STEMCE

LL Technologies社製)を、Tリンパ球培養用培養液入りフラスコ(製品名: TLY CULTUREキット25、TLY-FK25、GCリンフォテック社製)に播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養を開始した。培養後3日目に、8枚又は10枚の25cm²のフラスコに移した。その後、培養後9日目のフラスコを、以下の[hCD8陽性T細胞の調製(検討11及び12)]の項目に記載の方法に用いた。

[0068] [hCD8陽性T細胞の調製(検討11及び12)]

以下の手順〔1〕～〔4〕に従って、hCD8陽性T細胞を調製した。

〔1〕hCD8陽性T細胞をフラスコから50mLプロテオセーブ(MS-52550、住友ベークライト社製)に移した。

〔2〕300×g、10分間、室温で遠心して細胞を回収した。

〔3〕上清を吸引し、ラクテック注に懸濁した。

〔4〕100μLの細胞懸濁液を分取し、Via2-Cassette (Chemometec社製)を用いてサンプリングし、ヌクレオカウンター (Chemometec社製)を用いて、全細胞数を測定した。

[0069] [hCD8陽性T細胞及びhCD4陽性T細胞の培養(検討13及び14)]

1. 5×10⁶個のヒトCD8陽性T細胞(hCD8陽性T細胞)(STEMCELL Technologies社製)又はヒトCD4陽性T細胞(hCD4陽性T細胞)(Lonza Walkersville社製)を、それぞれTリンパ球培養用培養液入りフラスコ(製品名: TLY CULTUREキット25、TLY-FK25、GCリンフォテック社製)に播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養を開始した。培養後3日目に、hCD8陽性T細胞又はhCD4陽性T細胞を3枚の75cm²フラスコにそれぞれ移した。培養後7日目及び9日目に、それぞれフラスコ1枚ずつを、以下の[hCD8陽性T細胞及びhCD4陽性T細胞の調製(検討13及び14)]の項目に記載の方法に用いた。さらに、培養後10日目に、残りの1枚のフラスコから細胞を回収し、3枚の75cm²のフラスコに分割し、それぞれのフラスコにT cell培地(製品名: X-VIV015無血清リンパ球培地

、04-418Q、Lonza Walkersville社製）を10 mLずつ添加した。その後、培養後11日目のフラスコ3枚を、以下の[hCD8陽性T細胞及びhCD4陽性T細胞の調製（検討13及び14）]の項目に記載の方法に用いた。

[0070] [hCD8陽性T細胞及びhCD4陽性T細胞の調製（検討13及び14）]

以下の手順〔1〕～〔5〕に従って、hCD8陽性T細胞を調製した。

〔1〕hCD8陽性T細胞又はhCD4陽性T細胞をフラスコから50 mLプロテオセーブ（MS-52550、住友ベークライト社製）に移した。

〔2〕300×g、10分間、室温で遠心して細胞を回収した。

〔3〕上清を吸引し、セルストアWに懸濁した。

〔4〕20 µLの細胞懸濁液をとり、20 µLの0.4%トリパンブルー（商品番号：15250-061、gibco社製）と混合し、細胞計数盤（ワンセルカウンター、商品番号：OCC01、バイオメディカルサイエンス社製）で細胞数（生細胞及び死細胞）を計測した。なお、計測細胞数はワンセルカウンターを用いて1カ所のエリアの四隅のエリアの細胞数とした。〔5〕全細胞濃度を以下の式にて算出した。式：全細胞濃度（cells/mL）＝（計測した全細胞数×10⁴）／4×2

[0071] [hCD34陽性造血系幹細胞の培養（検討15）]

2×10⁴ cells/mLの臍帯血由来ヒトCD34陽性造血系幹細胞（hCD34陽性造血系幹細胞）（タカラバイオ社製）を含む造血前駆細胞増殖培養液XF（タカラバイオ社製）を、75 cm²の浮遊培養用フラスコ（製品名：スーパークオリティ浮遊細胞培養用フラスコ75 cm²フィルターキャップ、MS-2325RS、住友ベークライト社製）に播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養を開始した。培養後2～3日目に、等量の造血前駆細胞増殖培養液XFを加え、さらに3日間培養した。1）培養液を50 mLプロテオセーブ（MS-52550、住友ベークライト社製）に移し、240×g、10分間、室温で遠心して細胞を回収した。2）上清を吸引し、新しい造血前駆細胞増殖培養液XFを加え、細胞を懸濁した後、新しい75 cm²の浮遊培

養用フラスコに播種した。2～3日毎に上記1)及び2)の操作を繰り返し、12日目のフラスコを、以下の[hCD34陽性造血系幹細胞の調製(検討15)]の項目に記載の方法に用いた。

[0072] [hCD34陽性造血系幹細胞の調製(検討15)]

以下の手順〔1〕～〔4〕に従って、hCD34陽性造血系幹細胞を調製した。

〔1〕hCD34陽性造血系幹細胞をフラスコから50mLプロテオセーブ(MS-52550、住友ベークライト社製)に移した。

〔2〕240×g、10分間、室温で遠心して細胞を回収した。

〔3〕上清を吸引し、ラクテック注に懸濁した。

〔4〕100μLの細胞懸濁液をとり、Via2-Cassette (Chemometec社製)を用いてサンプリングし、ヌクレオカウンター (Chemometec社製)を用いて、全細胞数を測定した。

[0073] [哺乳動物細胞の凍結保存]

以下の手順〔1〕～〔4〕に従って、4種類の哺乳動物細胞(hAD-MSC、hCD8陽性T細胞、hCD4陽性T細胞、及びhCD34陽性造血系幹細胞)を凍結保存した。

〔1〕セルストアW又はラクテック注に懸濁した各種哺乳動物細胞を15mLステムフル(品番MS-90150、サイズ15mL、住友ベークライト株式会社)に移した。

〔2〕遠心処理(hAD-MSCの場合、210×g、5分間、室温；hCD8陽性T細胞及びhCD4陽性T細胞の場合、300×g、10分間、室温；hCD34陽性造血系幹細胞の場合、240×g、10分間、室温)し、上清を吸引した。

〔3〕各種哺乳動物細胞を、各種細胞凍結保存液で 1.0×10^6 cells/mLとなるように再懸濁し、1mLずつバイアル(Nunc CryoTube Vials、品番375418、サイズ1.8mL、Thermo Fisher Scientific社製)に入れた。

〔4〕バイアルをバイセル(凍結処理容器)(日本フリーザー社製)に入れ

、 -80°C の冷凍庫で翌日まで保存し、その後、バイアルをバイセルからサンプルボックスに移して、液体窒素タンク（サーモラインローケータプラス液体窒素凍結保存容器タイプ509、CS509X21A-70、東栄社製）中に移して任意の期間保存した。

[0074] [凍結融解後の細胞のサンプル調製]

以下の手順〔1〕～〔6〕に従って、凍結融解後の4種類の哺乳動物細胞（hAD-MSC、hCD8陽性T細胞、hCD4陽性T細胞、及びhCD34陽性造血系幹細胞）の生存率を評価するためのサンプルを調製した。

〔1〕恒温槽（ウォーターバス）を 37°C に設定し、加温した。

〔2〕液体窒素タンクから、凍結した、各種哺乳動物細胞を含む各種細胞凍結保存液が入ったバイアルを取り出し、ドライアイスの入った容器に移動した。

〔3〕バイアルを素早く 37°C に設定した恒温槽に移し、軽く攪拌しながら少し氷のかけらが残る状態まで溶かした。

〔4〕素早くバイアル表面の水を除いた後、70%エタノールで拭き、安全キャビネットに移した。

〔5〕解凍後、チップの先を底から目視で5mm程度の位置まで挿入した状態で、懸濁（1mLのピペットを用いて、 $500\mu\text{L}$ の液量での緩やかに5回ピペティング）した。

〔6〕アネキシンV陽性率評価用細胞懸濁液及びトリパンブルー染色用細胞懸濁液として、それぞれ $50\mu\text{L}$ 及び $20\mu\text{L}$ を分取し、ヌクレオカウンタ―解析用細胞懸濁液として、 $100\mu\text{L}$ を分取し、CD34陽性率の評価用として、 $800\mu\text{L}$ のhCD34陽性造血系幹細胞懸濁液を分取した。なお、検討11及び12を実施するために、分取した細胞懸濁液を、室温で振盪保存（ 100rpm 、25mm）した。

[0075] [凍結融解後の哺乳動物細胞のアネキシンV陽性率]

以下の手順〔1〕～〔6〕に従って、凍結融解後の4種類の哺乳動物細胞（hAD-MSC、hCD8陽性T細胞、hCD4陽性T細胞、及びhCD

34陽性造血系幹細胞)のアネキシンV陽性率を評価した。

〔1〕アポトーシス検出キット (Annexin V-FITC Kit、nacalai tesque社製) に同梱されているAnnexin Binding Buffer(×10)を大塚蒸留水で10倍希釈し、アネキシンV染色用液を調整し、氷冷した。

〔2〕100μLの塩化Ca補正液(1mEq/mL)を、900μLの大塚蒸留水で10倍希釈し、塩化Ca希釈液を調整した。

〔3〕分取したアネキシンV陽性率評価用細胞懸濁液50μLをラウンドチューブに分取した。

〔4〕カルシウムイオン濃度が1.5mM以上となるように、塩化Ca希釈液3μLを各細胞懸濁液に添加した。

〔5〕1μLのAnnexin V-FITCを添加して混合し、氷上暗所で15分間染色した。

〔6〕染色後400μLのアネキシンV染色用液を加え、セルストレーナーを通して丸底スタンダードチューブに移し、速やかにフローサイトメトリー (Gallios、ベックマン・コールター社製) を用いてアネキシンV陽性率を評価した。アネキシンV陽性率は、Kaluza Analysis Software (Ver.1.5a、ベックマン・コールター社製)を用いて解析・算出した。

[0076] [トリパンプルー染色(検討2、4～10、13、及び14)]

分取したトリパンプルー染色用細胞懸濁液20μLと、トリパンプルー染色液20μLとを混合し、光学顕微鏡(ECLIPSE TS100、ニコン社製、及びOLYMPUS CKX53、オリンパス社製)を使用し、ワンセルカウンターにより全細胞数及び死細胞数を各々測定した。その上で、これら測定値を、それぞれ式(細胞生存率(%))=[全細胞数-死細胞数]/全細胞数×100)、及び式(生存細胞回収率(%))=凍結後の各ポイントにおける1mL中の生存細胞数/凍結前の1mL中の生存細胞数×100)に入力し、細胞生存率及び生存細胞回収率を算出した。

[0077] [ヌクレオカウンター解析(検討11、12、及び15)]

分取したヌクレオカウンター解析用細胞懸濁液100μLを、Via2-Cassett

te (Chemometec社製) を用いてサンプリングし、ヌクレオカウンター (Chemometec社製) を用いて、全細胞数及び死細胞数を各々測定した。その上で、これら測定値を、それぞれ式 (細胞生存率 (%)) = $[\text{全細胞数} - \text{死細胞数}] / \text{全細胞数} \times 100$ 、及び式 (生存細胞回収率 (%)) = $\text{凍結後の各ポイントにおける } 1 \text{ mL 中の生存細胞数} / \text{凍結前の } 1 \text{ mL 中の生存細胞数} \times 100$) に入力し、細胞生存率及び生存細胞回収率を算出した。

[0078] [凍結融解後の h A D - M S C の細胞増殖能]

凍結融解直後の h A D - M S C を、6 ウェルプレートに 5.6×10^3 細胞 / cm^2 (5.0×10^4 細胞 / 9 cm^2 / ウェル) の密度で播種し、M S C 培地を使用して培養した。培地交換は、播種後 24 時間以内、及びその後 3 ~ 4 日目に行った。播種から 1 日目、3 日目、5 日目、及び 7 日目に、h A D - M S C を培養した 6 ウェルプレートを P B S (-) で洗浄し、トリプシン / E D T A で酵素処理し、T N S でトリプシン反応を停止し、ワンセルカウンターにより再培養後の細胞数を計測し、凍結融解後の h A D - M S C の細胞増殖能を評価した。

[0079] [h C D 3 4 陽性造血系幹細胞の C D 3 4 陽性率の評価]

以下の手順 [1] ~ [9] に従って、凍結融解後の h C D 3 4 陽性造血系幹細胞の C D 3 4 陽性率を評価した。

[1] $800 \mu\text{L}$ の h C D 3 4 陽性造血系幹細胞懸濁液を、 $500 \mu\text{L}$ (染色用サンプル) と $300 \mu\text{L}$ (コントロール用サンプル) に分け、 1.5 mL プロテオセーブ (MS4265M、住友ベークライト社製) に分取した。

[2] 遠心処理 ($240 \times g$ 、10 分間、室温) し、上清を吸引した。

[3] Stain Buffer (F B S) を、染色用サンプル及びコントロール用サンプルに、それぞれ $49 \mu\text{L}$ 及び $30 \mu\text{L}$ 添加し、懸濁した。

[4] $1 \mu\text{L}$ の P E - C D 3 4 抗体 (Milteny社製) を染色用サンプルに添加して混合した。

[5] 冷蔵庫、遮光下で 10 分間インキュベート (抗原抗体反応) した。

[6] 染色用サンプル及びコントロール用サンプルに、それぞれ 1 mL の Sta

in Buffer (FBS) を加え、遠心処理 ($240 \times g$ 、10分間、 4°C) した。

〔7〕上清を吸引後、染色用サンプル及びコントロール用サンプルに、それぞれ1 mLのStain Buffer (FBS) を加え、遠心処理 ($240 \times g$ 、10分間、 4°C) した。

〔8〕上清を吸引後、 $500 \mu\text{L}$ のStain Buffer (FBS) を加えて懸濁し、セルストレーナーを通して丸底スタンダードチューブに移した。

〔9〕フローサイトメーター (Gallios、ベックマン・コールター社製) を用いて、PE由来の蛍光シグナルが陽性の細胞 (すなわち、hCD34陽性造血系幹細胞) を検出し、解析ソフトウェアKaluza (Ver.1.5a、ベックマン・コールター社製) を用いて、全細胞数に対するCD34陽性細胞の割合 (CD34陽性率) を算出した後、凍結保存前の細胞におけるCD34陽性率を1としたときの相対値 (図19Bの縦軸の値) を算出した。

[0080] 〔計算方法及び統計処理〕

各群の平均値±標準偏差を求めた。統計解析は、SAS 9.4 (EXSUS Version 10.0) を用いて行った。必要に応じて、Student's t test、Dunnett's test 及びTukey's testを行い、有意水準5%未満を有意と判定した。

[0081] 2. 結果

2-1 検討1

DMSOを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と、PGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合で、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能に違いがあるかどうかを検討するために、1. 25~10%のDMSOを含む基液 (2. 7%のトレハロース及び4. 5%のデキストラン含有LR) 中と、1. 25~10%のPGを含む上記基液中のそれぞれにhAD-MSCを凍結保存し、凍結融解後のhAD-MSCを1~7日間培養し、細胞数の経時的変化を解析した。

[0082] その結果、培養5日目以降において、1. 25~10%のDMSOを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCは、DMSOの濃度の違い

による細胞増殖効率に違いは認められなかった（図 1 A 及び表 1）。一方、2.5～5%のPGを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCは、10%のPGを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCと比べ、有意に効率よく増殖することが示された（図 1 B 及び表 1）。また、2.5～5%のPGを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCは、2.5～5%のDMSOを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCと比べ、有意に効率よく増殖することが示された（図 2 B 及び 2 C）。

[0083] これらの結果は、2.5～5%のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5～5%以外の濃度のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合や、DMSO、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができることを示している。

[0084] [表1]

細胞凍結保存液	細胞数 (×10 ⁴ cells/well)				
	凍結融解直後	凍結融解後			
		1 日 目	3 日 目	5 日 目	7 日 目
基液 (トレハロース及びデキストラン含有LR)					
1. 25%DMSO	5.2±0.0	4.2±0.9	12.8±1.4	25.6±2.0	25.3±0.5
2. 5%DMSO	5.1±0.2	6.0±0.4	17.8±2.6	22.6±1.7	24.1±1.5
5%DMSO	5.1±0.2	6.0±0.1	16.7±0.4	23.5±0.9	22.4±2.3
10%DMSO	5.1±0.3	6.3±0.8	16.4±0.8	22.4±3.2	23.8±1.0
1. 25%PG	5.1±0.1	2.3±0.5	11.0±2.8	23.5±4.6	26.2±3.7
2. 5%PG	5.2±0.0	5.1±0.4	16.5±1.2	39.9±3.4	42.8±3.1
5%PG	5.0±0.1	5.6±1.0	18.4±0.9	41.9±5.7	43.5±4.8
10%PG	5.0±0.2	5.1±1.3	15.9±3.1	24.8±1.6	27.0±3.1

表 1 の結果を基に、図 1 を作成した。

[0085] 2-2 検討 2

2.5～5%のPGを含む細胞凍結保存液の基液として、トレハロース及びデキストラン含有LRを用いた場合の効果を、DMSOを含む細胞凍結保

存液と比較・検討するために、４％のＰＧ又は４％のＤＭＳＯを含むトレハロース及びデキストラン含有細胞凍結保存液（４％のＰＧ、２．８８％のトレハロース、及び４．８％のデキストラン含有ＬＲ；並びに、４％のＤＭＳＯ、２．８８％のトレハロース、及び４．８％のデキストラン含有ＬＲ）中にｈＡＤ－ＭＳＣを凍結保存し、凍結融解直後のｈＡＤ－ＭＳＣの細胞生存率及び生存細胞回収率と、凍結融解後の細胞増殖能を解析した。なお、比較対照として、凍結保存しなかったｈＡＤ－ＭＳＣの細胞増殖能についても同様に解析した。

[0086] その結果、凍結融解直後のｈＡＤ－ＭＳＣの細胞生存率及び生存細胞回収率は、いずれの細胞凍結保存液中にｈＡＤ－ＭＳＣを凍結保存した場合においても高かった（表２）。

[0087] [表2]

細胞凍結保存液	凍結保存前	凍結融解直後
基液（トレハロース及びデキストラン含有LR）		
細胞生存率（％）		
4％PG	98.8±0.7	94.7±1.7
4％DMSO		96.1±1.8
生存細胞回収率（％）		
4％PG	100.0	94.5±5.5
4％DMSO		95.5±6.4

[0088] また、凍結融解後のｈＡＤ－ＭＳＣを１～７日間培養し、細胞数の経時的変化を解析した結果、４％のＰＧを含むトレハロース及びデキストラン含有細胞凍結保存液（４％のＰＧ、２．８８％のトレハロース、及び４．８％のデキストラン含有ＬＲ）中に凍結保存したｈＡＤ－ＭＳＣは、凍結保存しなかったｈＡＤ－ＭＳＣと比べ、同レベルかそれ以上効率で増殖することが示された（図３及び表３）。一方、４％のＤＭＳＯを含むトレハロース及びデキストラン含有細胞凍結保存液（４％のＤＭＳＯ、２．８８％のトレハロース、及び４．８％のデキストラン含有ＬＲ）中に凍結保存したｈＡＤ－ＭＳＣは、凍結保存しなかったｈＡＤ－ＭＳＣと比べ、培養３日目以降から有意

に増殖レベルが低下することが示された（図3及び表3）。

[0089] これらの結果は、4%のPGを含む細胞凍結保存液と4%のDMSOを含む細胞凍結保存液は共に、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死抑制効果は同レベルで発揮するものの、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を高める効果は、4%のPGを含む細胞凍結保存液の方が高いことを示している。

[0090] [表3]

	細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)				
	0日目	1日目	3日目	5日目	7日目
—	5.0 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 1.0	22.9 $\pm$ 1.6	37.0 $\pm$ 2.9	45.6 $\pm$ 2.4
細胞凍結保存液（凍結融解直後）					
基液（トレハロース及びデキストラン含有LR）					
4%PG	5.0 $\pm$ 0.4	5.5 $\pm$ 0.9	20.8 $\pm$ 2.7	43.5 $\pm$ 6.9	47.6 $\pm$ 5.7
4%DMSO	4.9 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 1.0	19.1 $\pm$ 2.3	28.8 $\pm$ 2.7	28.3 $\pm$ 2.3

表3の結果を基に、図3を作成した。

[0091] 2-3 検討3

2. 5～5%のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と、2. 5～5%以外の濃度のPGを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合で、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能に違いがあるかどうかを検討するために、1. 25～10%のPGを含む、4種類の基液（LR；デキストラン含有LR；トレハロース含有LR；並びに、トレハロース及びデキストラン含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存し、凍結融解後のhAD-MSCを1～7日間培養し、細胞数の経時的変化を解析した。

[0092] その結果、検討1の結果と同様に、いずれの基液を用いた場合でも、2. 5～5%のPGを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCは、10%のPGを含む細胞凍結保存液中に凍結保存したhAD-MSCと比べ、効率よく増殖することが示された（図4及び表4）。特に、3種類の基液（デキストラン含有LR；トレハロース含有LR；並びに、トレハロース及びデキストラン含有LR）を用いた場合、hAD-MSCの細胞増殖能が有

意に高かった（図4B～D及び表4）。

[0093] これらの結果は、2.5～5%のPG含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5～5%以外の濃度のPG含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能をより効果的に高めることができることを示している。

[0094] [表4]

細胞凍結保存液	細胞数 (×10 ⁴ cells/well)				
	凍結融解直後	凍結融解後			
		1 日目	3 日目	5 日目	7 日目
基液 (L R)					
1. 2 5 % P G	5.0±0.5	0.9±0.7	4.5±3.3	18.8±13.0	20.4±9.2
2. 5 % P G	5.2±0.4	3.0±0.8	11.9±2.2	33.3±7.3	38.9±2.4
5 % P G	5.3±0.3	3.3±0.7	16.1±0.7	35.2±3.0	39.6±4.1
1 0 % P G	5.5±0.3	3.4±0.5	15.2±1.6	29.9±1.2	30.7±2.3
基液 (デキストラン含有 L R)					
1. 2 5 % P G	5.3±0.3	1.8±0.5	9.5±5.3	27.3±8.1	33.2±3.3
2. 5 % P G	5.5±0.2	3.8±0.5	16.5±0.3	45.5±3.5	46.8±6.3
5 % P G	5.1±0.3	3.9±0.3	19.2±2.9	41.6±2.2	46.4±3.2
1 0 % P G	5.3±0.3	4.1±0.5	18.2±3.2	33.8±1.7	32.3±0.4
基液 (トレハロース含有 L R)					
1. 2 5 % P G	4.8±0.3	0.9±0.1	5.1±1.0	18.9±4.7	24.7±1.7
2. 5 % P G	5.1±0.2	2.3±0.8	7.9±1.4	27.3±4.6	31.3±2.3
5 % P G	5.1±0.1	3.6±0.6	12.8±2.0	33.1±4.0	35.3±3.4
1 0 % P G	5.0±0.1	3.6±0.5	14.4±0.6	22.2±1.1	24.1±1.7
基液 (トレハロース及びデキストラン含有 L R)					
1. 2 5 % P G	5.2±0.2	2.4±1.1	11.2±1.2	28.3±3.3	30.6±2.8
2. 5 % P G	5.3±0.0	4.7±0.6	15.7±0.7	39.3±3.5	40.7±4.2
5 % P G	5.1±0.1	5.4±0.5	19.0±0.5	38.0±5.4	42.6±4.0
1 0 % P G	4.9±0.2	3.9±0.4	13.6±1.7	24.6±2.0	26.9±0.7

表4の結果を基に、図4を作成した。

[0095] 2-4 検討4

PGを含む細胞凍結保存液における基液について検討するために、8種類の細胞凍結保存液（5%のPGを含む、4種類の基液〔生理食塩水、リンゲル液、酢酸リンゲル液、及び乳酸リンゲル液〕、並びに、5%のPG及び4.75%のデキストランを含む、上記4種類の基液）中にhAD-MSCを凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率、生存細胞回収率、ア

ネキシンV陽性率、及び細胞増殖能を解析した。

[0096] その結果、h A D－M S Cの細胞生存率、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率の全ての測定結果において、5 %のP Gを含む細胞凍結保存液と、5 %のP G及び4. 7 5 %のデキストランを含む細胞凍結保存液を用いた場合、共に上記4 種類の基液の間に有意な差は見られなかった（図5 及び表5）。また、5 %のP G及び4. 7 5 %のデキストランを含む細胞凍結保存液を用いた場合のh A D－M S Cの細胞生存率は、上記4 種類の基液共に、5 %のP Gを含む細胞凍結保存液を用いた場合のh A D－M S Cの細胞生存率と比べ、高く、特に基液としてリンゲル液及び酢酸リンゲル液を用いた場合、有意に高かった（図5 A 及び表5）。h A D－M S Cの生存細胞回収率も同様の傾向があり、特に基液として酢酸リンゲル液を用いた場合、有意に高かった（図5 B 及び表5）。一方、5 %のP G及び4. 7 5 %のデキストランを含む細胞凍結保存液を用いた場合のh A D－M S CのアネキシンV陽性率は、上記4 種類の基液共に、5 %のP Gを含む細胞凍結保存液を用いた場合の細胞生存率と比べ、低かった（図5 C 及び表5）。

[0097] これらの結果は、P Gとデキストランとを併用した場合の効果（すなわち、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死抑制効果）は、細胞凍結保存液の基液の種類に関わらず、発揮されることを示している。

[0098]

[表5]

細胞凍結保存液	凍結融解直後
	細胞生存率 (%)
P G / S	81.7 ± 11.4
P G / R	79.9 ± 7.2
P G / A R	66.6 ± 12.3
P G / L R	77.5 ± 16.7
P G + D / S	91.9 ± 5.2
P G + D / R	96.0 ± 1.0
P G + D / A R	92.7 ± 0.9
P G + D / L R	94.1 ± 1.7
	生存細胞回収率 (%)
P G / S	88.6 ± 13.8
P G / R	72.1 ± 11.1
P G / A R	71.6 ± 9.3
P G / L R	86.1 ± 15.2
P G + D / S	96.2 ± 6.3
P G + D / R	85.4 ± 9.7
P G + D / A R	100.9 ± 7.1
P G + D / L R	104.0 ± 8.3
	アネキシンV陽性率 (%)
P G / S	24.2 ± 7.6
P G / R	30.9 ± 9.7
P G / A R	29.6 ± 13.2
P G / L R	25.3 ± 7.4
P G + D / S	12.6 ± 0.9
P G + D / R	16.5 ± 4.8
P G + D / A R	15.6 ± 3.5
P G + D / L R	14.7 ± 6.2

表5の結果を基に、図5を作成した。

[0099] また、凍結融解後のh A D - M S Cを1～7日間培養し、細胞数の経時的変化を解析した結果、5%のP G及び4.75%のデキストランを含む、上記4種類の基液中に凍結保存したh A D - M S Cは、5%のP Gを含む、上記4種類の基液中に凍結保存したh A D - M S Cと比べ、効率よく増殖することが示された（図6及び表6）。

[0100] この結果は、PGとデキストランとを併用した場合の効果（すなわち、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を高める効果）は、細胞凍結保存液の基液の種類に関わらず、発揮されることを示している。

[0101] [表6]

細胞凍結保存液	細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)				
	凍結融解直後	凍結融解後			
		1日目	3日目	5日目	7日目
PG/S	4.7 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 1.4	18.3 $\pm$ 4.4	32.1 $\pm$ 1.3	33.6 $\pm$ 6.0
PG/R	5.1 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 1.7	13.6 $\pm$ 3.3	27.9 $\pm$ 2.5	30.9 $\pm$ 3.9
PG/AR	4.9 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 1.2	12.9 $\pm$ 5.5	28.8 $\pm$ 3.4	30.9 $\pm$ 1.6
PG/LR	5.3 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 3.1	30.1 $\pm$ 7.6	30.9 $\pm$ 3.3
PG+D/S	5.0 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 1.2	21.2 $\pm$ 0.6	36.3 $\pm$ 2.4	39.6 $\pm$ 1.8
PG+D/R	4.9 $\pm$ 0.7	4.1 $\pm$ 0.9	17.6 $\pm$ 1.9	35.8 $\pm$ 4.8	34.8 $\pm$ 1.2
PG+D/AR	5.2 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 1.2	18.3 $\pm$ 5.0	36.8 $\pm$ 9.7	35.5 $\pm$ 3.4
PG+D/LR	4.9 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.8	18.3 $\pm$ 2.6	34.0 $\pm$ 2.2	38.6 $\pm$ 3.8

表6の結果を基に、図6を作成した。

[0102] 2-5 検討5

PGを含む細胞凍結保存液におけるPGの最適な濃度を解析するために、8種類の細胞凍結保存液（1. 2.5%PG及び4.94%デキストラン含有LR；2. 5%PG及び4.88%デキストラン含有LR；3. 7.5%PG及び4.81%デキストラン含有LR；5%PG及び4.75%デキストラン含有LR；6. 2.5%PG及び4.69%デキストラン含有LR；7. 5%PG及び4.63%デキストラン含有LR；8. 7.5%PG及び4.56%デキストラン含有LR；並びに、1.0%PG及び4.5%デキストラン含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存し、凍結融解直後のhAD-MSCの細胞生存率、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率と、凍結融解後の細胞増殖能を解析した。

[0103] その結果、2.5～8.75%のPGを含む、6種類の細胞凍結保存液（2.5%PG及び4.88%デキストラン含有LR；3.75%PG及び4.81%デキストラン含有LR；5%PG及び4.75%デキストラン含有LR；6.25%PG及び4.69%デキストラン含有LR；7.5%PG及び4.63%デキストラン含有LR；並びに、8.75%PG及び4.5

6%デキストラン含有LR)中にhAD-MSCを凍結保存すると、1.25%のPGを含む細胞凍結保存液(1.25%PG及び4.94%デキストラン含有LR)や、10%のPGを含む細胞凍結保存液(10%PG及び4.5%デキストラン含有LR)中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhAD-MSCの細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、特に、細胞凍結保存液におけるPGの濃度が2.5~6.25%のとき、細胞生存率が有意に高かった(図7A及び7B、表7)。

[0104] また、2.5~8.75%のPGを含む、上記6種類の細胞凍結保存液中にhAD-MSCを凍結保存すると、1.25%のPGを含む細胞凍結保存液や、10%のPGを含む細胞凍結保存液中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhAD-MSCのアネキシンV陽性率が低く、特に、細胞凍結保存液におけるPGの濃度が2.5~6.25%のとき、有意に低かった(図7C、表7)。

[0105] これらの結果は、2.5~8.75%(特に、2.5~6.25%)のPG及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5~8.75%(特に、2.5~6.25%)以外の濃度のPG及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示している。

[0106]

[表7]

PG+Dにおける PGの濃度	凍結融解直後
	細胞生存率 (%)
1.25%	77.6±6.4
2.50%	93.1±2.8
3.75%	93.9±3.2
5.00%	94.1±2.3
6.25%	92.2±3.1
7.50%	91.8±2.5
8.75%	89.8±3.2
10.0%	85.1±0.7
	生存細胞回収率 (%)
1.25%	81.8±10.7
2.50%	101.4±3.1
3.75%	100.4±3.5
5.00%	96.2±6.7
6.25%	92.5±7.7
7.50%	93.5±4.7
8.75%	89.8±10.5
10.0%	91.6±7.8
	アネキシンV陽性率 (%)
1.25%	70.4±5.9
2.50%	17.0±3.9
3.75%	13.3±2.6
5.00%	14.0±2.2
6.25%	14.2±3.0
7.50%	15.8±2.3
8.75%	18.5±3.8
10.0%	22.6±3.5

表7の結果を基に、図7を作成した。

[0107] また、凍結融解後のhAD-MSCを1～7日間培養し、細胞数の経時的変化を解析した結果、培養5日目以降において、2.5～7.5%のPGを含む、5種類の細胞凍結保存液（2.5%PG及び4.88%デキストラン含有LR；3.75%PG及び4.81%デキストラン含有LR；5%PG及び4.75%デキストラン含有LR；6.25%PG及び4.69%デキ

ストラン含有LR；及び7.5%PG及び4.63%デキストラン含有LR）中に凍結保存したhAD-MSCは、10%のPGを含む細胞凍結保存液（10%PG及び4.5%デキストラン含有LR）中に凍結保存したhAD-MSCと比べ、効率よく増殖することが示され、特に、細胞凍結保存液におけるPGの濃度が2.5～5%のとき、有意に増殖することが示された（図8及び表8）。

[0108] この結果は、2.5～5%のPG及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、2.5～5%以外の濃度のPG及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができることを示している。

[0109] [表8]

PG+Dにおける PGの濃度 (%)	細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)				
	凍結融解直後	凍結融解後			
		1日目	3日目	5日目	7日目
1.25%	4.9 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 3.9	30.3 $\pm$ 10.7	40.1 $\pm$ 8.4
2.50%	5.1 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 1.2	18.3 $\pm$ 3.0	44.8 $\pm$ 5.5	53.8 $\pm$ 4.7
3.75%	4.8 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 1.2	19.3 $\pm$ 1.6	51.0 $\pm$ 6.5	56.1 $\pm$ 8.4
5.00%	4.8 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.8	20.0 $\pm$ 2.2	50.4 $\pm$ 1.4	51.6 $\pm$ 1.3
6.25%	4.8 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.7	18.6 $\pm$ 3.3	41.3 $\pm$ 2.8	43.3 $\pm$ 4.1
7.50%	4.8 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.8	19.5 $\pm$ 2.4	39.5 $\pm$ 2.4	41.8 $\pm$ 3.8
8.75%	4.7 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.8	17.6 $\pm$ 0.6	36.1 $\pm$ 1.7	37.8 $\pm$ 1.4
10.0%	4.9 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.6	15.1 $\pm$ 1.4	34.8 $\pm$ 1.5	37.9 $\pm$ 5.2

表8の結果を基に、図8を作成した。

[0110] 2-6 検討6

2.5～5%のPG及びデキストランを含む細胞凍結保存液におけるデキストランの最適な濃度を検討するために、6種類の細胞凍結保存液（4%のPG含有LR；4%のPG及び1.2%のデキストラン含有LR；4%のPG及び2.4%のデキストラン含有LR；4%のPG及び4.8%のデキストラン含有LR；4%のPG及び7.2%のデキストラン含有LR；並びに、4%のPG及び9.6%のデキストラン含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率、生存細胞回収率、及

びアネキシンV陽性率を解析した。

[0111] その結果、4%のPG及び1.2~9.6%のデキストラン含有細胞凍結保存液（4%のPG及び1.2%のデキストラン含有LR；4%のPG及び2.4%のデキストラン含有LR；4%のPG及び4.8%のデキストラン含有LR；4%のPG及び7.2%のデキストラン含有LR；並びに、4%のPG及び9.6%のデキストラン含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存すると、デキストラン不含の4%のPG含有細胞凍結保存液（4%のPG含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhAD-MSCの細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、特に、細胞凍結保存液におけるデキストランの濃度が1.2~9.6%のとき、細胞生存率が有意に高く、また、細胞凍結保存液におけるデキストランの濃度が2.4~9.6%のとき、生存細胞回収率が有意に高かった（図9A及び9B、表9）。

[0112] また、4%のPG及び1.2~9.6%のデキストラン含有細胞凍結保存液中にhAD-MSCを凍結保存すると、デキストラン不含の4%のPG含有細胞凍結保存液中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhAD-MSCのアネキシンV陽性率が低く、特に、細胞凍結保存液におけるデキストランの濃度が4.8~9.6%のとき、有意に低かった（図9A及び9B、表9）。

[0113] これらの結果は、2.5~5%のPG及び少なくとも1.2%（特に、少なくとも2.4% [例えば、2.4~9.6%、4.8~9.6%]）のデキストランを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、デキストラン不含の2.5~5%のPG含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示している。

[0114]

[表9]

細胞凍結保存液 (4%PG+DにおけるDの濃度)	凍結融解直後
	細胞生存率 (%)
0.0%	73.7±9.2
1.2%	85.7±5.1
2.4%	91.5±3.5
4.8%	95.6±1.5
7.2%	95.8±0.8
9.6%	96.2±0.4
	生存細胞回収率 (%)
0.0%	61.3±10.9
1.2%	76.4±6.6
2.4%	90.6±9.9
4.8%	99.4±5.3
7.2%	98.7±9.2
9.6%	96.4±8.0
	アネキシンV陽性率 (%)
0.0%	27.8±3.7
1.2%	26.5±3.2
2.4%	23.7±3.8
4.8%	19.1±2.9
7.2%	15.3±3.8
9.6%	14.9±3.5

表9の結果を基に、図9を作成した。

[0115] 2-7 検討7

デキストラン以外の高分子化合物として、HESをPGと併用した場合にも、デキストランとPGを併用したときと同様の効果が発揮されるかどうかを検討するために、6種類の細胞凍結保存液(4%のPG含有LR; 10%のPG含有LR; 4%のPG及び4.8%のデキストラン含有LR; 10%のPG及び4.5%のデキストラン含有LR; 4%のPG及び4.8%のHES含有LR; 並びに、10%のPG及び4.5%のHES含有LR)中にhAD-MSCを凍結保存し、凍結融解直後のhAD-MSCの細胞生存率

、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率を解析した。

[0116] その結果、PG及びHESを含む細胞凍結保存液（4%のPG及び4.8%のHES含有LR；並びに、10%のPG及び4.5%のHES含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存すると、PG及びデキストランを含む細胞凍結保存液（4%のPG及び4.8%のデキストラン含有LR；並びに10%のPG及び4.5%のデキストラン含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存した場合と同様に、PGのみを含む細胞凍結保存液（4%のPG含有LR；及び10%のPG含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhAD-MSCの細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、また、アネキシンV陽性率が低かった（図10及び表10）。同様に、PG及びHESを含む細胞凍結保存液におけるPGの濃度が4%のとき、PGの濃度が10%のときと比べ、凍結融解直後のhAD-MSCの細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、また、アネキシンV陽性率が低かった（図10及び表10）。

[0117] これらの結果は、PGとHES（デキストランと同じ高分子化合物）を含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、PG及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と同様に、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死を効果的に抑制できることを示している。

[0118]

[表10]

細胞凍結保存液	凍結融解直後 細胞生存率 (%)
4 % P G	78.4±16.9
1 0 % P G	70.1±3.8
4 % P G + D	92.3±2.8
1 0 % P G + D	86.0±7.8
4 % P G + H E S	95.3±1.3
1 0 % P G + H E S	84.3±5.5

	生存細胞回収率 (%)
4 % P G	74.5±14.9
1 0 % P G	67.2±2.0
4 % P G + D	87.4±8.3
1 0 % P G + D	82.6±7.0
4 % P G + H E S	89.3±1.6
1 0 % P G + H E S	73.4±7.0

	アネキシンV陽性率 (%)
4 % P G	35.7±8.6
1 0 % P G	43.4±2.9
4 % P G + D	18.4±0.9
1 0 % P G + D	41.3±8.2
4 % P G + H E S	18.2±2.6
1 0 % P G + H E S	39.8±7.6

表 1 0 の結果を基に、図 1 0 を作成した。

[0119] また、凍結融解後の h A D - M S C を 1 ～ 7 日間培養し、細胞数の経時的変化を解析した結果、トレハロースを含む、上記 6 種類の細胞凍結保存液、すなわち、4 % の P G 及び 2 . 8 8 % のトレハロース含有 L R ; 1 0 % の P G 及び 2 . 7 % のトレハロース含有 L R ; 4 % の P G 、 2 . 8 8 % のトレハロース、及び 4 . 8 % のデキストラン含有 L R ; 1 0 % の P G 、 2 . 7 % のトレハロース、及び 4 . 5 % のデキストラン含有 L R ; 4 % の P G 、 2 . 8 8 % のトレハロース、及び 4 . 8 % の H E S 含有 L R ; 並びに、1 0 % の P G 、 2 . 7 % のトレハロース、及び 4 . 5 % の H E S 含有 L R を用いて解析した場合も同様に、H E S と P G との併用効果が確認された (図 1 1 及び表

11)。

[0120] これらの結果は、PGと高分子化合物（デキストラン、HES等）とを併用した場合の効果（すなわち、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を高める効果）は、トレハロースを併用した場合にも発揮されることを示している。

[0121] [表11]

細胞凍結保存液	凍結融解直後 細胞生存率 (%)
4%PG+Tre	81.6±6.9
10%PG+Tre	64.9±9.0
4%PG+Tre+D	91.9±3.2
10%PG+Tre+D	85.9±4.2
4%PG+Tre+HES	90.8±7.0
10%PG+Tre+HES	87.1±3.0
生存細胞回収率 (%)	
4%PG+Tre	77.6±4.8
10%PG+Tre	58.3±9.2
4%PG+Tre+D	90.1±8.1
10%PG+Tre+D	81.6±1.2
4%PG+Tre+HES	96.0±11.0
10%PG+Tre+HES	83.3±2.6
アネキシンV陽性率 (%)	
4%PG+Tre	28.1±2.8
10%PG+Tre	39.9±7.6
4%PG+Tre+D	16.3±3.7
10%PG+Tre+D	28.0±4.9
4%PG+Tre+HES	13.1±2.9
10%PG+Tre+HES	23.8±3.8

表11の結果を基に、図11を作成した。

[0122] 2-8 検討8

細胞凍結保存液において、PGと、トレハロースやデキストランとを併用した場合の効果を確認するために、3種類の細胞凍結保存液（2.5%のPG含有LR；2.5%のPG及び2.925%のトレハロース含有LR；並びに2.5%のPG、2.925%のトレハロース、及び4.875%のデ

キストラン含有LR) 中にhAD-MSCを凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率を解析した。

[0123] その結果、2.5%のPG及び2.925%のトレハロース含有LR;又は2.5%のPG、2.925%のトレハロース、及び4.875%のデキストラン含有LR;中にhAD-MSCを凍結保存すると、2.5%のPG含有LR中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、特に、2.5%のPG、2.925%のトレハロース、及び4.875%のデキストラン含有LRを用いた場合は、有意にこれらの値が高かった(図12A及び1B、表12)

。

[0124] また、2.5%のPG及び2.925%のトレハロース含有LR;又は2.5%のPG、2.925%のトレハロース、及び4.875%のデキストラン含有LR;中にhAD-MSCを凍結保存すると、2.5%のPG含有LR中にhAD-MSCを凍結保存した場合と比べ、融解直後のhAD-MSCのアネキシンV陽性率が有意に低かった(図12C、表12)。

[0125] これらの結果は、PGと、トレハロースやデキストランとを含む乳酸リンゲル液からなる細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、PGのみを含む乳酸リンゲル液からなる細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死を効果的に抑制する作用があることを示している。

[0126]

[表12]

細胞凍結保存液	凍結保存前	凍結融解直後
細胞生存率 (%)		
P G		33.2±11.9
P G+T r e	97.6±1.4	44.0±15.0
P G+T r e+D		80.8±5.9
生存細胞回収率 (%)		
P G		32.2±11.4
P G+T r e	100.0	42.0±14.4
P G+T r e+D		82.5±6.8
アネキシンV陽性率 (%)		
P G		63.3±5.9
P G+T r e		52.7±5.4
P G+T r e+D		28.2±5.0

表12の結果を基に、図12を作成した。

[0127] 2-9 検討9

検討8の結果から、P Gとトレハロースの併用効果が認められたため、トレハロース以外の糖類との併用効果が認められるかどうかを検討するために、5種類の糖類（1.44%のグルコース、1.44%のフルクトース、2.88%のトレハロース、2.88%のスクロース、又は2.88%のラクトース）を含む、4%のP G含有L R中にh A D-M S Cを凍結保存し、融解直後のh A D-M S Cの細胞生存率及び生存細胞回収率を解析した。なお、比較対照として、これら糖類不含の4%のP G含有L Rを用いて同様に解析した。また、各糖類のモル濃度は全て0.08Mで同じである。

[0128] その結果、トレハロース以外の4種類の糖類（グルコース、フルクトース、スクロース、又はラクトース）含む、4%のP G含有細胞凍結保存液中にh A D-M S Cを凍結保存しても、4%のP G含有細胞凍結保存液中にh A D-M S Cを凍結保存した場合と、凍結融解直後のh A D-M S Cの細胞生存率及び生存細胞回収率はほとんど変わらなかった（図13及び表13）。

[0129] この結果は、P Gとの併用効果は、トレハロース以外の糖類では認められないことを示している。

[0130]

[表13]

細胞凍結保存液	凍結融解直後 細胞生存率 (%)
4 % P G	79.8±5.6
4 % P G + G l u	83.3±6.5
4 % P G + F l u	84.2±2.1
4 % P G + T r e	89.4±4.6
4 % P G + S u c	80.1±8.0
4 % P G + L a c	82.5±4.5
	生存細胞回収率 (%)
4 % P G	76.8±5.0
4 % P G + G l u	79.0±12.3
4 % P G + F l u	90.7±3.3
4 % P G + T r e	99.0±6.2
4 % P G + S u c	83.0±3.5
4 % P G + L a c	88.6±10.5

表13の結果を基に、図13を作成した。

[0131] 2-10 検討10

2. 5～5%のPG及びトレハロースを含む細胞凍結保存液におけるトレハロースの最適な濃度を検討するために、6種類の細胞凍結保存液（4%のPG含有LR；4%のPG及び0.72%のトレハロース含有LR；4%のPG及び1.44%のトレハロース含有LR；4%のPG及び2.88%のトレハロース含有LR；4%のPG及び5.76%のトレハロース含有LR；並びに、4%のPG及び11.52%のトレハロース含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存し、融解直後のhAD-MSCの細胞生存率、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率を解析した。

[0132] その結果、4%のPG及び0.72～11.52%のトレハロース含有細胞凍結保存液（4%のPG及び0.72%のトレハロース含有LR；4%のPG及び1.44%のトレハロース含有LR；4%のPG及び2.88%のトレハロース含有LR；4%のPG及び5.76%のトレハロース含有LR；並びに、4%のPG及び11.52%のトレハロース含有LR）中にhAD-MSCを凍結保存すると、トレハロース不含の4%のPG含有細胞凍結

保存液（４％のＰＧ含有ＬＲ）中にｈＡＤ－ＭＳＣを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のｈＡＤ－ＭＳＣの細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、特に、細胞凍結保存液におけるトレハロースの濃度が１．４４～２．８８％及び１１．５２％のとき、細胞生存率が有意に高く、また、細胞凍結保存液におけるトレハロースの濃度が０．７２～５．７６％のとき、生存細胞回収率が有意に高かった（図１４Ａ及び１４Ｂ、表１４）。

[0133] また、４％のＰＧ及び０．７２～１１．５２％のトレハロース含有細胞凍結保存液中にｈＡＤ－ＭＳＣを凍結保存すると、トレハロース不含の４％のＰＧ含有細胞凍結保存液中にｈＡＤ－ＭＳＣを凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のｈＡＤ－ＭＳＣのアネキシンＶ陽性率が低かった（図１４Ｃ、表１４）。

[0134] これらの結果は、２．５～５％のＰＧ及び少なくとも０．７２％（例えば、１．４４～１１．５２％、０．７２～５．７６％）のトレハロースを含む細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、トレハロース不含の２．５～５％のＰＧ含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示している。

[0135]

[表14]

細胞凍結保存液 (4%PG+Treに おけるTreの濃度)	凍結融解直後
	細胞生存率 (%)
0.00%	72.9±10.1
0.72%	82.1±3.7
1.44%	85.5±1.7
2.88%	87.8±3.6
5.76%	82.5±5.2
11.52%	86.4±5.1
	生存細胞回収率 (%)
0.00%	61.6±6.7
0.72%	81.7±11.2
1.44%	91.2±9.4
2.88%	95.0±8.0
5.76%	83.2±8.9
11.52%	76.9±11.4
	アネキシンV陽性率 (%)
0.00%	29.1±6.0
0.72%	25.2±3.4
1.44%	24.0±2.3
2.88%	28.0±3.6
5.76%	23.7±6.7
11.52%	23.0±5.4

表14の結果を基に、図14を作成した。

[0136] 2-11 検討11

hAD-MSC以外の哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に凍結保存した場合にも、PGとトレハロースの併用効果が発揮されることを確認するために、hCD8陽性T細胞を、3種類の細胞凍結保存液（4%のPGを含む血清含有培養液；4%のPGを含むトレハロース含有LR；及び4%のPGを含むLR）中に凍結保存し、融解直後、融解後1時間、3時間、及び6時間のhCD8陽性T細胞の細胞生存率及び生存細胞回収率を解析した。

[0137] その結果、4%のPGを含む血清含有培養液や、4%のPGを含むトレハロース含有LR中にhCD8陽性T細胞を凍結保存すると、4%のPGを含

むLRにhCD8陽性T細胞を凍結保存した場合と比べ、融解直後又はその後のhCD8陽性T細胞の細胞生存率及び生存細胞回収率が高かった（図15及び表15）。

[0138] この結果は、PGを含むトレハロース含有乳酸リンゲル液は、PGを含む血清含有培養液と同程度の細胞保存効果があることを示すとともに、PGを含むトレハロース含有乳酸リンゲル液は、PGを含む乳酸リンゲル液よりも細胞保存効果が高いことも示しており、上記検討7及び8の結果を支持している。

[0139] [表15]

細胞凍結保存液	凍結保存前	凍結保存し、融解後			
		0 時間	1 時間	3 時間	6 時間
細胞生存率 (%)					
P G + M e d	87.0±1.7	52.5±5.6	49.1±8.8	50.7±4.2	47.3±5.2
P G + T r e	79.7±1.1	59.5±2.4	43.6±6.7	55.8±4.7	51.4±3.9
P G	78.6±1.0	48.0±11.7	22.5±6.1	30.6±4.4	35.7±8.3
生存細胞回収率 (%)					
P G + M e d	—	60.1±6.4	54.9±8.2	56.9±8.5	49.3±6.6
P G + T r e	—	67.2±8.3	48.6±14.5	72.9±12.2	68.9±17.2
P G	—	50.7±18.0	23.6±8.9	36.3±5.4	44.5±12.3

表15の結果を基に、図15を作成した。

[0140] 2-12 検討12

hAD-MSC以外の哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に凍結保存した場合にも、上記検討1～10で示す効果が発揮されることを確認するために、hCD8陽性T細胞を、5種類の細胞凍結保存液（2%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；3%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；4%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；並びに、7.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR）中に凍結保存し、融解直後及び融解後3時間のhCD8陽性T細胞の細胞生存率及び生存細胞回収率を解析した。

[0141] その結果、3～7.5%のPGを含む、4種類の細胞凍結保存液（3%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；4%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；並びに、7.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR）中にhCD8陽性T細胞を凍結保存すると、2%のPGのPGを含む細胞凍結保存液（2%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR）中にhCD8陽性T細胞を凍結保存した場合と比べ、融解直後又はその後のhCD8陽性T細胞の細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、特に細胞凍結保存液におけるPGの濃度が3～5%のとき細胞生存率が高く、また、細胞凍結保存液におけるPGの濃度が4～5%のとき生存細胞回収率が高かった（図16及び表16）。

[0142] この結果は、3～7.5%（特に、3～5%、さらに4～5%）のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、3～7.5%（特に、3～5%、さらに4～5%）以外の濃度のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示しており、上記検討1～10の結果を支持している。

[0143]

[表16]

細胞凍結保存液 (PG+T r e +Dに おけるPGの濃度)	凍結保存前	凍結保存し、融解後	
		0 時間	3 時間
細胞生存率 (%)			
2%	80.3±1.2	62.3±10.4	63.1±2.0
3%	80.0±1.4	73.5±2.6	73.7±0.9
4%	78.4±2.0	75.6±3.4	74.8±1.5
5%	79.2±0.8	75.9±3.4	75.0±1.2
7.5%	79.2±1.8	68.6±4.3	72.9±3.6
生存細胞回収率 (%)			
2%	—	68.8±19.9	73.8±5.5
3%	—	77.8±11.7	87.7±6.6
4%	—	88.1±22.1	91.0±10.6
5%	—	83.2±23.6	90.4±8.0
7.5%	—	57.9±8.9	80.7±9.3

表16の結果を基に、図16を作成した。

[0144] 2-13 検討13

検討12に続き、hAD-MSC以外の哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に凍結保存した場合にも、上記検討1～10で示す効果が発揮されることを確認するために、hCD8陽性T細胞を、検討12で使用した5種類の細胞凍結保存液中に凍結保存し、融解直後のhCD8陽性T細胞の細胞生存率、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率を解析した。

[0145] その結果、3～7.5%のPGを含む、4種類の細胞凍結保存液（3%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；4%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；並びに、7.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR）中にhCD8陽性T細胞を凍結保存すると、2%のPGのPGを含む細胞凍結保存液（2%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR）中にhCD8陽性T細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhCD8陽性T細胞の細胞生存率及び生存細胞回収率が高く、特に細胞凍結保存液におけるPGの濃度が4～5%のと

き細胞生存率が高く、また、細胞凍結保存液におけるPGの濃度が3～5%のとき生存細胞回収率が高かった（図17A及び17B、表17）。

[0146] また、3～7.5%のPGを含む、上記4種類の細胞凍結保存液中にhCD8陽性T細胞を凍結保存すると、2%のPGのPGを含む上記細胞凍結保存液中にhCD8陽性T細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhCD8陽性T細胞のアネキシンV陽性率が有意に低く、特に細胞凍結保存液におけるPGの濃度が4～5%のとき最も低かった（図17C及び表17）

[0147] これらの結果は、3～7.5%（特に、3～5%、さらに4～5%）のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、3～7.5%（特に、3～5%、さらに4～5%）以外の濃度のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示しており、上記検討1～10の結果を支持している。

[0148]

[表17]

細胞凍結保存液 (PG+Tre+Dに おけるPGの濃度)	凍結融解直後 細胞生存率 (%)
2%	77.4±5.0
3%	83.0±7.9
4%	86.1±3.0
5%	86.9±4.3
7.5%	82.5±3.8

	生存細胞回収率 (%)
2%	86.8±8.5
3%	99.3±14.5
4%	102.4±6.4
5%	96.6±14.4
7.5%	88.8±8.2

	アネキシンV陽性率 (%)
2%	42.3±1.9
3%	31.9±1.7
4%	26.8±2.5
5%	26.0±0.8
7.5%	31.0±4.8

表17の結果を基に、図17を作成した。

[0149] 2-14 検討14

検討12及び13に続き、hAD-MSC以外の哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に凍結保存した場合にも、上記検討1～10で示す効果が発揮されることを確認するために、hCD4陽性T細胞を、検討12及び13で利用した5種類の細胞凍結保存液中に凍結保存し、融解直後のhCD4陽性T細胞の細胞生存率、生存細胞回収率、及びアネキシンV陽性率を解析した。

[0150] その結果、3～7.5%のPGを含む、4種類の細胞凍結保存液（3%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；4%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有

L R ; 並びに、7.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR) 中にhCD4陽性T細胞を凍結保存すると、2%のPGのPGを含む細胞凍結保存液(2%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR) 中にhCD4陽性T細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhCD4陽性T細胞の細胞生存率及び生存細胞回収率が有意に高く、特に細胞凍結保存液におけるPGの濃度が4~5%のとき、最も高かった(図18A及び18B、表18)。

[0151] また、3~7.5%のPGを含む、上記4種類の細胞凍結保存液中にhCD4陽性T細胞を凍結保存すると、2%のPGのPGを含む上記細胞凍結保存液中にhCD4陽性T細胞を凍結保存した場合と比べ、凍結融解直後のhCD4陽性T細胞のアネキシンV陽性率が有意に低く、特に細胞凍結保存液におけるPGの濃度が4~5%のとき最も低かった(図18C及び表18)

[0152] これらの結果は、3~7.5%(特に、3~5%、さらに4~5%)のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、3~7.5%(特に、3~5%、さらに4~5%)以外の濃度のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示しており、上記検討1~13の結果を支持している。

[0153]

[表18]

細胞凍結保存液 (PG+Tre+Dに おけるPGの濃度)	凍結融解直後 細胞生存率 (%)
2%	58.8±12.4
3%	80.4±4.8
4%	85.3±5.6
5%	89.0±4.8
7.5%	78.7±9.4

	生存細胞回収率 (%)
2%	60.8±12.7
3%	95.1±5.5
4%	102.0±7.8
5%	104.6±5.1
7.5%	84.2±12.1

	アネキシンV陽性率 (%)
2%	40.1±8.7
3%	24.2±4.9
4%	21.0±4.1
5%	20.0±3.1
7.5%	24.8±4.5

表18の結果を基に、図18を作成した。

[0154] 2-15 検討15

検討12～14に続き、hAD-MSC以外の哺乳動物細胞を本件凍結保存液中に凍結保存した場合にも、上記検討1～10で示す効果が発揮されることを確認するために、hCD34陽性造血系幹細胞（凍結保存前の細胞生存率は73.3±1.2%）を、検討12～14で使用した5種類の細胞凍結保存液中に凍結保存し、融解直後のhCD4陽性T細胞の細胞生存率及びCD34陽性率を解析した。

[0155] その結果、3～7.5%のPGを含む、4種類の細胞凍結保存液（3%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；4%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR；5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有

L R ; 並びに、7.5%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR) 中にhCD34陽性造血系幹細胞を凍結保存すると、2%のPGのPGを含む細胞凍結保存液(2%のPG、2.7%のトレハロース、及び4.5%のデキストラン含有LR) 中にhCD34陽性造血系幹細胞を凍結保存した場合と比べ、融解直後のhCD34陽性造血系幹細胞の細胞生存率が高く、特に細胞凍結保存液におけるPGの濃度が3~5%のとき細胞生存率が高かった(図19A及び表19)。

[0156] この結果は、3~7.5%(特に、3~5%)のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存すると、3~7.5%(特に、3~5%)以外の濃度のPG、トレハロース、及びデキストラン含有細胞凍結保存液中に哺乳動物細胞を凍結保存した場合と比べ、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死をより効果的に抑制できることを示しており、上記検討1~14の結果を支持している。

[0157] また、凍結保存後のhCD34陽性造血系幹細胞におけるCD34陽性率は、凍結保存前のhCD34陽性造血系幹細胞におけるCD34陽性率とほとんど変わらなかったことから(図19B及び表19)、細胞凍結保存液に含まれるPG、トレハロース、及びデキストランは、hCD34陽性造血系幹細胞の性質に影響を及ぼすものではないことがわかった。

[0158]

[表19]

細胞凍結保存液 (PG+Tre+Dに おけるPGの濃度)	凍結保存前の 細胞生存率 (%)	凍結融解直後の 細胞生存率 (%)
2%		45.0±8.5
3%		54.4±5.7
4%	73.3±1.2	51.0±4.6
5%		54.8±6.6
7.5%		51.1±8.1
細胞凍結保存液 (PG+Tre+Dに おけるPGの濃度)	凍結保存前に対する凍結融解直後のCD 34陽性率の比	
2%		1.0±0.4
3%		0.9±0.4
4%		1.0±0.3
5%		1.3±0.2
7.5%		1.2±0.7

表19の結果を基に、図19を作成した。

産業上の利用可能性

[0159] 本発明によると、哺乳動物細胞の凍結融解により生じる細胞死を効果的に抑制でき、かつ、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を効果的に高めることができるため、再生医療等における移植医療分野やがん治療分野で有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 2. 5～8. 7 5 (v / v) %のプロピレングリコールを含む哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項2] プロピレングリコールの濃度が2. 5～5. 0 (v / v) %であり、凍結融解後の哺乳動物細胞の増殖能を高めるために用いられる、請求項1に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項3] デキストラン若しくはその誘導体又はそれらの塩；及び、ヒドロキシエチルデンプン若しくはその誘導体又はそれらの塩；から選択される高分子化合物をさらに含む、請求項1に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項4] トレハロース若しくはその誘導体又はそれらの塩をさらに含む、請求項1に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項5] 2. 5～8. 7 5 (v / v) %のプロピレングリコールを含む等張液である、請求項1に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項6] 等張液が、乳酸リンゲル液、生理食塩水、リンゲル液、及び酢酸リンゲル液から選択される、請求項5に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項7] 哺乳動物細胞が、間葉系幹細胞、T細胞、又は造血系幹細胞である、請求項1～6のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項8] 哺乳動物細胞を含む、請求項1～6のいずれかに記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項9] 哺乳動物細胞が、間葉系幹細胞、T細胞、又は造血系幹細胞である、請求項8に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項10] 臍帯血を含む、請求項9に記載の哺乳動物細胞凍結保存液。
- [請求項11] 請求項8に記載の哺乳動物細胞凍結保存液を、凍結保存する工程（a）を含む、哺乳動物細胞を凍結保存する方法。
- [請求項12] 工程（a）の後、哺乳動物細胞を凍結融解し、5日間以上培養する工程（b）をさらに含む、請求項11に記載の方法。