

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程（１）及び工程（２）を含む、立体構造を有する神経系細胞を含む細胞凝集体を凍結する方法：
- （１）立体構造を有する神経系細胞を含む細胞凝集体を、凍結前に 0℃以上 30℃以下で、保存液に接触させ、保存液に浸された細胞凝集体を調製する工程、及び；
- （２）工程（１）で得られる保存液に浸された細胞凝集体を、少なくとも、該保存液の凝固点よりも約 5℃高い温度から、凝固点よりも約 5℃低い温度まで、平均 2～7℃／分の温度低下速度で冷却し、凍結させる工程。
- [請求項2] 工程（２）における温度低下速度が、平均 3～7℃／分である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 工程（１）において、細胞凝集体を 15 分間～90 分間、好ましくは 15 分間～60 分間保存液に接触させる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- [請求項4] 保存液の凝固点が、－1℃～－10℃である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 保存液が、7%～12%のジメチルスルホキシド及び/又はプロピレングリコールを含む水性液体であり、工程（２）が、0±5℃から－30±5℃まで、平均 2～5℃／分の温度低下速度で冷却する工程である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 工程（２）における温度低下速度が、平均 3～5℃／分である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 更に、以下の工程（３）を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法：
- （３）工程（２）で得られる凍結した細胞凝集体を、－50℃以下に冷却する工程。
- [請求項8] 神経系細胞を含む細胞凝集体が、多能性幹細胞由来の神経系細胞を

含む細胞凝集体である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 神経系細胞を含む細胞凝集体が、FOXA2、TH及びNURR1の少なくとも 1 つが陽性の細胞を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 神経系細胞を含む細胞凝集体が、FOXA2陽性かつLMX1A陽性の細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

[請求項11] 神経系細胞を含む細胞凝集体が、FOXA2陽性、TH陽性、かつNURR1陽性細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

[請求項12] 神経系細胞を含む細胞凝集体が、FOXA2陽性かつLMX1A陽性の細胞を全細胞数の 40%以上含み、TH陽性かつNURR1陽性の細胞を全細胞数の 40%以下含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] 神経系細胞を含む細胞凝集体が、ドパミン産生神経前駆細胞及び／又はドパミン産生神経細胞を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項14] 細胞凝集体が、500個～150000個の細胞を含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項15] 保存液中に含まれる細胞数が80000～5000000 cells/mLであり、細胞凝集体の円相当径が150～1000 μ mである、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 細胞凝集体及び保存液の体積が0.25 mL～2 mLである、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項17] 細胞凝集体及び保存液が、0.5 mL～1.5 mLの容器に充填されている、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項18] 請求項 1 ～ 17 のいずれかに記載の方法で得られる凍結した細胞凝集体を、 -80°C 以下で保持することを含む、立体構造を有する神経系細胞を含む細胞凝集体の長期保存方法。

[請求項19] 解凍後に回復のための培養を行うことを要しない、凍結された細胞凝集体を得ることを特徴とする、請求項 1 ～ 18 のいずれかに記載の

方法。

- [請求項20] 請求項1～19のいずれか一項に記載の方法で凍結または長期保存された細胞凝集体を有効成分として含有する移植用組成物。
- [請求項21] 多能性幹細胞由来のドパミン産生神経前駆細胞及びドパミン産生神経細胞を60%以上含む、円相当径150 μ m～1000 μ mであって、500個～150000個の細胞を含む細胞凝集体、及び7%～12%のジメチルスルホキシドもしくはプロピレングリコールを含む凝固点が-1℃～-10℃の凍結保存液を含み、以下の性質：
(1) 解凍後に全細胞数の約60%以上が生存している、
(2) 凍結前と比較して、50%以上の神経突起伸長活性を有する、
(3) 解凍後に生存している細胞におけるFOXA2、LMX1A、NURR1およびTHの陽性率の変化が±10%以内である、を示す、凍結された移植用組成物。
- [請求項22] 細胞数が80000～5000000 cells/mLであり、FOXA2陽性かつLMX1A陽性の細胞を全細胞数の40%以上含み、TH陽性かつNURR1陽性の細胞を全細胞数の40%以下含む、請求項20又は21に記載の移植用組成物。
- [請求項23] 細胞凝集体の円相当径が150～1000 μ mである、請求項20～22のいずれか一項に記載の移植用組成物。
- [請求項24] 解凍後に回復のための培養を行うことを要しないことを特徴とする、請求項20～23のいずれか一項に記載の移植用組成物。
- [請求項25] 細胞凝集体を8～192個/mL含み、かつ、当該細胞凝集体の円相当径が150 μ m～1000 μ mであり、容器当たりの細胞数が80000～240000個である、請求項20～24のいずれか一項に記載の移植用組成物。
- [請求項26] 細胞凝集体及び保存液の体積が0.25mL～2mLである、請求項20～25のいずれか一項に記載の移植用組成物。
- [請求項27] 0.5mL～15mLの容器に充填されている、請求項20～26

のいずれか一項に記載の移植用組成物。

[請求項28] 請求項1～17のいずれか一項に記載の方法で、細胞数が80000～500000 cells/mLであり、FOXA2陽性かつLMX1A陽性の細胞を全細胞数の40%以上含み、TH陽性かつNURR1陽性の細胞を全細胞数の40%以下含む、円相当径150 μ m～1000 μ mの細胞凝集体を凍結することを含む、ドパミン産生神経前駆細胞を有効成分として含有する移植用組成物の製造方法。

[請求項29] 当該細胞凝集体の円相当径が150～1000 μ mである細胞凝集体の集団を含み、容器当たりの細胞数が80000～240000個であり、細胞凝集体及び保存液の体積が0.25 mL～2 mLである、0.5 mL～1.5 mLの容器に充填されている、神経系細胞の凝集体を有効成分として含有する請求項28に記載の移植用組成物の製造方法。

[請求項30] 以下の工程を含む、ドパミン産生神経の再生を必要とする疾患の治療方法：

(1) 請求項20～27のいずれか一項に記載の移植用組成物を30℃～40℃、好ましくは37℃ $\pm$ 3℃において解凍する工程、

(2) (1)で得られた移植用組成物を、患者の線条体領域に移植する工程。

[請求項31] 解凍後に、培養を行うことなく、凍結保存液を投与媒体に置換し、工程(2)を行うことを特徴とする、請求項30に記載の方法。