明　細　書

発明の名称 ： 幹細胞懸濁液

技術分野

[0001] 本発明は、哺乳動物幹細胞懸濁液及びそれを含む医薬製剤に関する。また、本発明は、哺乳動物の幹細胞の凝集を抑制するための剤及び哺乳動物の幹細胞の凝集の抑制方法に関する。更に、本発明は、哺乳動物の幹細胞の生存率低下を抑制するための剤、哺乳動物の幹細胞の生存率低下の抑制方法に関する。

背景技術

[0002] 近年の幹細胞研究の進歩により、幹細胞の臨床応用は、既に基礎的な研究段階から開発段階へ移行している。幹細胞による疾患の治療においては、ダメージを受けた患者の細胞や組織の機能を、幹細胞から新たに分化させた当該細胞や臓器により補う。ここで、幹細胞からの体細胞や組織への分化の態様により、幹細胞による治療は大きく２つに分けることができる。

[0003] そのうちの１つの態様は、インビトロにおいて幹細胞を特定の条件下で培養して所望の体細胞や組織へ分化させ、得られた体細胞や組織をレシピエントの体内へ移植するものである。例えば、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞等の多能性幹細胞は、これを直接生体内へ移植するとテラトーマを形成するおそれがあるので、通常はインビトロにおいて特定の体細胞や組織へ分化させ、テラトーマ形成能力を確実に消失させた上で、これを体内へ移植する。

[0004] もう１つの態様は、幹細胞を直接生体内へ移入するものである。この方法により、筋萎縮性側索硬化症、再生不良性貧血、パーキンソン病、多発性硬化症、膠原病、クローン病、潰瘍性大腸炎、アルツハイマー病、白血病、生活習慣病、ガン等の疾患に効果があることが報告されている。

[0005] 間葉系幹細胞は、哺乳類の骨髄等に存在し、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞等に分化する幹細胞として知られている。間葉系幹細胞は、その多分化能故に、多くの組織の再生医療のための移植材料として注目されている。すなわ

ち、間葉系幹細胞を用いて、従来の治療方法では再生しなかった、疾病や障害により失った組織を再生し、機能を回復させる「細胞移植による再生医療」である。具体的には、例えば、下肢虚血（ビュルガー病）患者に対する骨髄間葉系幹細胞の移植、歯周病患部への骨髄間葉系幹細胞の移植、変形性関節症患者に対する骨髄間葉系幹細胞の移植等の治療が開始または計画されている。

[0006] 一方、トレハロースはグルコースが１，１－グリコシド結合してできた二糖の一種である。トレハロースは甘味を呈し、高い保水力を持つため、種々の食品や化粧品に用いられている。また、トレハロースは細胞膜を安定化し、細胞傷害を抑制する性質を有するため、臓器を移植する際の臓器保護液の有効成分として用いられている。ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ液やＮｅｗ　ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ液等のトレハロースを含有する優れた臓器保存液が開発されている（特許文献１及び２、非特許文献１）。

[0007] ヒドロキシエチルデンプンは、エーテル化デンプンの１つであり、接着剤、乳化剤、糊料等として用いられる。

[0008] デキストランは、グルコースからなる多糖類の１種であり、増粘剤、保湿剤等として、医薬品、化粧品の分野で汎用されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特許第３２５３１３１号公報

特許文献2：国際公開第２００７／０４３６９８号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Yonsei Medical Journal, vol.45, No.6, p.1107-1114, 2004

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明者らは、幹細胞の生体内への移植をより安定且つスムースに行う条件について鋭意検討を行った。幹細胞の生体内への移入は、多くの場合、幹

細胞の懸濁液を生体内へ点滴注入することにより行われるが、点滴をしている間に、輸液バッグ内の懸濁液中の幹細胞同士が凝集し、カニューレ中に詰まったり、肺静脈等の細い血管中に塞栓を形成してしまうおそれがあることを見出した。更に、点滴を行っている間に、輸液バッグ内の幹細胞の生存率が徐々に低下してしまうおそれがあることを本発明者らは見出した。

[0012] 本発明は、幹細胞の移植時に、懸濁液中の幹細胞同士の凝集を抑制する技術を提供することを目的とする。

また、本発明は、懸濁液中の幹細胞の生存率の低下を抑制する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、鋭意検討の結果、幹細胞の懸濁液中にトレハロース等の多糖類を添加することにより、幹細胞の凝集を抑制できることを見出した。また、これらの多糖類が、幹細胞の生存率の低下を抑制できることを併せて見出した。更に、これらの多糖類のいくつかを組み合わせることにより、幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されることを見出した。これらの知見に基づき、更に検討を加えた結果、本発明を完成させた。

[0014] 即ち、本発明は以下に関する。

[１]哺乳動物幹細胞及びトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞懸濁液。

[２]トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む、[１]の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[３]幹細胞が付着性幹細胞である、[１]の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[４]付着性幹細胞が、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、[３]の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[５]哺乳動物幹細胞が単一細胞の状態にある哺乳動物幹細胞を含む、[１]の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[６]多糖類がトレハロースであり、且つトレハロースの濃度が４．５３～３

６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内である、[１]の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[７]多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内である、[１]の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[８]哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞懸濁液の製造方法。

[９]生理的水溶液がトレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む、[８]の製造方法。

[１０][１]～[７]のいずれかの哺乳動物幹細胞懸濁液を含む、哺乳動物幹細胞懸濁液製剤。

[１１]トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[１２]幹細胞が付着性幹細胞である、[１１]の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[１３]付着性幹細胞が間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、[１２]の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[１４]多糖類がトレハロースであり、且つ哺乳動物幹細胞懸濁液中のトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、[１１]の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[１５]多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、[１１]の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[１６]哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[１７]幹細胞が付着性幹細胞である、[１６]の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[１８]付着性幹細胞が間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、[１７]の哺乳

動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[１９]哺乳動物幹細胞が単一細胞の状態にある哺乳動物幹細胞を含む、[１６]の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[２０]多糖類がトレハロースであり、且つトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内である、[１６]の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[２１]多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内である、[１６]の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[２２]トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[２３]トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む、[２２]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[２４]幹細胞が付着性幹細胞である、[２２]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[２５]付着性幹細胞が、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、[２４]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[２６]多糖類がトレハロースであり、且つ哺乳動物幹細胞懸濁液中のトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、[２２]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[２７]多糖類がデキストランであり、且つ哺乳動物幹細胞懸濁液中のデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、[２２]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[２８]哺乳動物幹細胞を、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[２９]該生理的水溶液が、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或

いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む、[２８]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[３０]幹細胞が付着性幹細胞である、[２８]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[３１]付着性幹細胞が、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、[３０]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[３２]哺乳動物幹細胞が単一細胞の状態にある、[２８]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[３３]多糖類がトレハロースであり、且つトレハロースの濃度が１５．１～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内である、[２８]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[３４]多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内である、[２８]の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

発明の効果

[0015] 本発明を用いれば、幹細胞の移植時に、懸濁液中の幹細胞同士の凝集を抑制することができる。従って、幹細胞の凝集物が、カニューレ中に詰まったり、肺静脈等の細い血管中に塞栓を形成してしまうリスクが低減する。

更に、本発明を用いれば、懸濁液中の幹細胞の生存率の低下を抑制することができる。従って、より状態のよい幹細胞により治療を実施することができるので、治療効果の向上が期待できる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]各組成液中で２５℃にて１時間静置後のｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ６の形態及び生存率を示す。

[図2]各組成液中で２５℃にて１時間静置後のｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ８の形態及び生存率を示す。

[図3]各組成液中で２５℃にて静置後の生存率を示す。６本のバーは、左から、Ｓａｌｉｎｅ、Ｍｅｄｉｕｍ、ＥＴ－Ｋ、Ｓａｖｉｏｓｏｌ、ＨＥＳ７０

Ｋ及びＨＥＳ２００Ｋをそれぞれ示す。

[図4]各組成液中で２５℃にて静置後の生存率を示す。５本のバーは、左から、Ｓａｌｉｎｅ、Ｍｅｄｉｕｍ、ＥＴ－Ｋ、Ｓａｖｉｏｓｏｌ、ＥＴ－Ｋ＋Ｓａｖｉｏｓｏｌをそれぞれ示す。

[図5]デキストラン４０を含む緩衝液（６．５～１０（ｗ／ｖ）％）又は生理食塩水中でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を保存したときの、チューブの上、中、下層における各細胞数を示す。グラフ中央の数値は細胞全体の生存率を示す。

[図6]デキストラン４０を含む緩衝液（６．５～１０（ｗ／ｖ）％）又は生理食塩水中でヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を保存したときの、チューブの上、中、下層における各細胞数を示す。グラフ中央の数値は細胞全体の生存率を示す。

発明を実施するための形態

[0017] Ｉ．哺乳動物幹細胞懸濁液

本発明は、哺乳動物幹細胞及びトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞懸濁液を提供するものである。

[0018] 哺乳動物としては、例えば、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挙げることが出来る。哺乳動物は、好ましくはげっ歯類（マウス等）、有蹄目（ブタ等）又は霊長類（ヒト等）である。

[0019] 本明細書中、「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出来ないが、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。

[0020] 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出来る。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出来る。ＥＳ細胞の製造方法は、例えば、ＷＯ９６／２２３６２、ＷＯ０２／１０１０５７、ＵＳ５，８４３，７８０、ＵＳ６，２００，８０６、ＵＳ６，２８０，７１８等に記載されている。ＥＧ細胞は、始原生殖細胞を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出来る（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（必要に応じて更に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出来る（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）。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また好ましい（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)）。

[0021] 複能性幹細胞としては、間葉系幹細胞、造血系幹細胞、神経系幹細胞、骨髄幹細胞、生殖幹細胞等の体性幹細胞等を挙げることが出来る。複能性幹細

胞は、好ましくは間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞とは、骨芽細胞、軟骨芽細胞及び脂肪芽細胞の全て又はいくつかへの分化が可能な幹細胞を意味する。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出来る。例えば、間葉系幹細胞は、哺乳動物の骨髄、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出来る。例えば、骨髄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）。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出来る。

[0022] 本発明の懸濁液中に含まれる幹細胞は、好ましくは付着性である。付着性の幹細胞は懸濁液中で凝集しやすいが、本発明の懸濁液にはトレハロースが含まれるため、この凝集が効果的に抑制されるからである。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、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である。

[0023] 哺乳動物幹細胞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。

[0024] 本発明の懸濁液に含まれる哺乳動物幹細胞は、単離又は精製されていることが好ましい。本明細書中、「単離または精製」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。単離または精製された哺乳動物幹細胞の純度（全細胞数に対する、哺乳動物幹細胞数の割合）は、通常３０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは７０％以上、更に好ましくは９０％以上（例えば１００％）である。

[0025] 本発明の懸濁液に含まれる哺乳動物幹細胞は、単一細胞（シングルセル）の状態の哺乳動物幹細胞を含むことが好ましい。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幹細胞は、インビトロで培養した哺乳動物幹細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ等で酵素処理することにより調製することが出来る。哺乳動物幹細胞中に含まれる単一細胞の状態の哺乳動物幹細胞の割合は、通常７０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、更に好ましくは９９％以上（例えば１００％）である。単一細胞の状態の細胞の割合は、哺乳動物幹細胞を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、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出来る。

[0026] 本発明の懸濁液において、哺乳動物幹細胞は好ましくは浮遊している。本明細書において、「浮遊」とは、細胞が、懸濁液を収容した容器の内壁に接触することなく、懸濁液中に保持されていることをいう。

[0027] 本発明の懸濁液はトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む。後述の実施例に示すように、これらの多糖類は哺乳動物幹細胞の凝集を抑制する効果を有する。従って、好ましくは、本発明の懸濁液においては、哺乳動物幹細胞の凝集が抑制されている。本明細書において、「凝集」とは、２個以上の細胞が寄り集まって塊になる現象をいう。

[0028] 特に、付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態では凝集しやすいが、上記多糖類により、効果的に凝集を抑制し、単一細胞の状態を長時間維持することができる。

[0029] 理論に拘束されるものではないが、幹細胞懸濁液中に上記多糖類が含まれると、懸濁液中の細胞の浮遊状態が比較的長時間維持され、細胞の沈殿が抑制され、細胞同士の接触が抑制される。更に、一般に、付着性細胞は長時間浮遊状態に曝されると、細胞にストレスがかかるため、浮遊時間に依存してｄｉｓｈなどに接着しようと突起を出すことが知られているが、上記多糖類（特にトレハロース）は細胞に与えるストレスが軽微であるため、この突起の形成が抑制される。このような作用が相まって、上記多糖類は優れた哺乳動物幹細胞凝集抑制効果を奏すると考えられる。

[0030] また、後述の実施例に示すように、上記多糖類は、哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制する効果を有する。従って、好ましくは、本発明の懸濁液においては、哺乳動物幹細胞の生存率低下が抑制されている。特に、付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊した状態（とりわけ、懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態）ではダメージを受けやすく、生存率が低下しやすいが、上記多糖類の添加により、付着性幹細胞の生存率の低下を効果的に抑制することができる。

[0031] 本発明の懸濁液に用いることのできるトレハロースにはα，αートレハロース、α，βートレハロース及びβ，βートレハロースの３種が存在する。トレハロースの種類は、哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制し得る限り特に限定されないが、好ましくはα，αートレハロースが用いられる。

[0032] 本発明の懸濁液に用いることのできるヒドロキシエチルデンプンの重量平均分子量（Ｍｗ）は、哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制し得る限り特に限定されないが、通常５×１０^4～６７×１０^4、好ましくは７×１０^4～６０×１０^4、より好ましくは７×１０^4～２０×１０^{4}の範囲内である。

[0033] 哺乳動物幹細胞の哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制効果を強化する観点からは、比較的低い重量平均分子量（Ｍｗ）（例えば、５×１０^4～９×１０^4、好ましくは６×１０^4～８×１０^4（例、７×１０^4））のヒドロキシエチルデンプンを用いることが好ましい。

[0034] また、本発明の懸濁液に用いることができる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）も、哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制し得る限り特に限定されないが、通常０．４～０．８の範囲内である。

[0035] 本発明の懸濁液に用いることができるヒドロキシエチルデンプンの好適な例として、重量平均分子量（Ｍｗ）が７×１０^4、置換度が０．５０～０．５５のヒドロキシエチルデンプン、重量平均分子量（Ｍｗ）が２０×１０^4、置

換度が０．５０～０．５５のヒドロキシエチルデンプン等を挙げることが出来る。これらのヒドロキシエチルデンプンは、例えば、ヘスパンダー（登録商標）としてフレゼニウス カービ ジャパン株式会社より市販されている。

[0036] 本発明の懸濁液に用いることのできるデキストランは、Ｄ－グルコースからなる多糖（$C_6H_{10}O_5$）$_n$であって、α１→６結合を主鎖とするものである。デキストランの種類は、哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制し得る限り特に限定されない。デキストランの重量平均分子量（Ｍｗ）も、哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制し得る限り特に限定されないが、例えば、デキストラン４０（Ｍｗ＝４００００）、デキストラン７０（Ｍｗ＝７００００）等を好適な例として挙げることができる。

[0037] 本発明の懸濁液中の上記多糖類の濃度は、哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制するのに十分な濃度であれば、特に限定されない。上記多糖類の濃度が高いほど凝集及び／又は生存率低下を抑制する効果は高くなるが、該多糖類濃度が高すぎると、幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。

[0038] 例えば、上記多糖類としてトレハロースを用いる場合、本発明の懸濁液中のトレハロース濃度は、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、懸濁液中のトレハロース濃度は、通常３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のトレハロース濃度は、通常４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0039] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、幹細胞の凝集及び／又は生存率低下を抑制する効果を発揮し、且つ幹細胞の生存率への悪影響が抑制された濃度を適宜設定することができる。

[0040] 上記多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、本発明の懸濁液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回

避する観点から、懸濁液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0041] 上記多糖類としてデキストランを用いる場合、本発明の懸濁液中のデキストランの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、懸濁液中のデキストランの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のデキストランの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは３０～１００ｍｇ／ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0042] 本発明の懸濁液は、好ましくは、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む。ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをトレハロースと組み合わせることにより、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されることが期待できる。特に、懸濁液中に浮遊した付着性幹細胞（とりわけ、懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態の付着性幹細胞）の生存率の低下を効果的に抑制することが期待される。

[0043] トレハロースと、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランとを組み合わせて用いる場合における、本発明の懸濁液中の各多糖類の濃度は、好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをそれぞれ単独で用いた場合よりも、トレハロースと、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランとを組み合わせて用いた場合の方が、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されるように、設定される。

[0044] 本発明の懸濁液においては、哺乳動物幹細胞がトレハロース、ヒドロキシ

エチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中に懸濁されている。生理的水溶液は、好ましくは、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水、ＨＥＰＥＳ緩衝化生理食塩水、リンゲル液、５％グルコース水溶液、哺乳動物培養用の液体培地、等張剤（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）の水溶液等の等張水溶液である。本明細書において「等張」とは、浸透圧が２５０～３８０ｍＯｓｍ／ｌの範囲内であることを意味する。

[0045] 生理的水溶液は、更に安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、クエン酸、サリチレート）、溶解補助剤、保存剤、酸化防止剤等を含むことができる。

[0046] 本発明の懸濁液は、哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液（好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む等張水溶液）に懸濁することにより、製造することが出来る。当該生理的水溶液中の各多糖類の濃度は、上記本発明の懸濁液中の各多糖類の濃度と同様である。本発明は、このような哺乳動物幹細胞懸濁液の製造方法をも提供する。

[0047] 哺乳動物幹細胞を上記多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することには、哺乳動物幹細胞の懸濁液に上記多糖類を添加して、哺乳動物幹細胞及び上記多糖類を含む哺乳動物幹細胞懸濁液を得ることも包含される。

[0048] 哺乳動物幹細胞の上記多糖類を含む生理的水溶液中への懸濁は、ピペッ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実施することが出来る。

[0049] 本発明の懸濁液の温度は、通常０～３７℃、好ましくは０～２５℃の範囲内である。

[0050] 本発明の懸濁液中の哺乳動物幹細胞の密度は、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類による哺乳動物幹細胞の凝集及び／又は生存率の低下を抑制する効果が達成される限り特に限定されないが、通常１０^{3}～１０^{10}個／ｍｌの範囲内である。

[0051] 好ましい態様において、本発明の懸濁液では、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類により哺乳動物幹細胞の凝集が抑制されているので、これを用いて幹細胞移植を実施することにより、幹細胞の凝集物が、カニューレ中に詰まったり、肺静脈等の細い血管中に塞栓を形成してしまうリスクを低減することが出来る。また、好ましい態様において、本発明の懸濁液では、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類により、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率の低下が抑制されるので、本発明の懸濁液を用いれば、より状態のよい幹細胞により幹細胞移植を実施することができ、治療効果の向上が期待できる。従って、本発明は、上記本発明の懸濁液を含む、哺乳動物幹細胞懸濁液製剤をも提供するものである。

[0052] 本発明の哺乳動物幹細胞懸濁液製剤は、上記本発明の懸濁液を適切な滅菌容器内に収容することにより、製造することが出来る。該容器としては、ボトル、バイアル、シリンジ、輸液バッグ等の可塑性のバッグ、試験管等が挙げられる。これらの容器は、ガラス又はプラスチックのような各種の材料から形成し得る。これらの容器には、容器内の哺乳動物幹細胞懸濁液を患者に点滴注入可能とするように、カニューレ及び／又は注射針を接続することができる。

[0053] ＩＩ．哺乳動物幹細胞の凝集の抑制

（１．哺乳動物幹細胞凝集抑制剤）

本発明は、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞凝

集抑制剤を提供するものである。これらの多糖類により、特に、懸濁液中の哺乳動物幹細胞（即ち、浮遊した哺乳動物幹細胞）の凝集が抑制される。

[0054] 「トレハロース」、「ヒドロキシエチルデンプン」、「デキストラン」、「哺乳動物」、「幹細胞」、「付着性」、「単離又は精製」、「単一細胞の状態」、「浮遊」、「凝集」、「等張」、「生理的水溶液」、等の各用語の定義は、特にことわりのない限り、上記Ｉの項に記載した通りである。

[0055] 本発明の凝集抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、好ましくは付着性幹細胞である。付着性の幹細胞は懸濁液中では（即ち、浮遊した状態では）より凝集しやすいからである。付着性幹細胞は、好ましくは、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である。

[0056] 哺乳動物幹細胞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。

[0057] 本発明の凝集抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、単離又は精製されていることが好ましい。

[0058] 本発明の凝集抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、単一細胞（シングルセル）の状態の哺乳動物幹細胞を含むことが好ましい。哺乳動物幹細胞中に含まれる単一細胞の状態の哺乳動物幹細胞の割合は、通常７０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、更に好ましくは９９％以上（例えば１００％）である。

[0059] 本発明の凝集抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、好ましくは、該幹細胞の懸濁液中に浮遊している。

[0060] 特に、付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態では凝集しやすいが、本発明の凝集抑制剤により、効果的に凝集を抑制することができ、単一細胞の状態を長時間維持することができる。

[0061] 本発明の凝集抑制剤は、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される１、２又は３種の多糖類を含む。本発明の凝集抑制剤がこれらの群から選択される２種、３種の多糖類を含む場合における多糖類の組み合わせは、トレハロースとヒドロキシエチルデンプン

の組み合わせ、トレハロースとデキストランの組み合わせ、ヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせ又はトレハロースとヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせである。

[0062] 本発明の凝集抑制剤はトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類そのものであってもよいし、更に生理学的に許容される担体を含んでいてもよい。生理学的に許容される担体としては、例えば、生理的水溶液（例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水、ＨＥＰＥＳ緩衝化生理食塩水、リンゲル液、５％グルコース水溶液、哺乳動物培養用の液体培地、等張剤（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）の水溶液等の等張水溶液）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、クエン酸、サリチレート）、賦形剤、結合剤、溶解補助剤、保存剤、酸化防止剤等を含むことができる。本発明の凝集抑制剤は、好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液（生理的水溶液中の上記多糖類の溶液）であり、より好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む等張水溶液である。

[0063] 本発明の凝集抑制剤は、哺乳動物幹細胞の懸濁液に添加することにより用いることができる。あるいは、本発明の凝集抑制剤がトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液の場合には、本発明の凝集抑制剤により哺乳動物幹細胞を懸濁してもよい。哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な当該多糖類の濃度が達成されるように、本発明の凝集抑制剤が添加され、又は本発明の凝集抑制剤により哺乳動物幹細胞が懸濁される。

[0064] 上記多糖類としてトレハロースを用いる場合、懸濁液中の哺乳動物幹細胞

の凝集を抑制するのに十分なトレハロース濃度は、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、トレハロース濃度が高いほど凝集抑制効果は高くなるが、トレハロース濃度が高すぎると、幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。従って、この生存率への悪影響を回避する観点から、懸濁液中のトレハロース濃度は、通常３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のトレハロース濃度は、通常４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0065] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度を適宜設定することができる。

[0066] 上記多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分なヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、懸濁液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0067] 上記多糖類としてデキストランを用いる場合、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分なデキストランの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、懸濁液中のデキストランの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のデキストランの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に

好ましくは３０～１００ｍｇ／ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0068] また、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される２又は３種の多糖類を用いる場合においては、結果として懸濁液中の哺乳動物幹細胞の凝集が抑制されるように、本発明の凝集抑制剤が添加され、又は本発明の凝集抑制剤により哺乳動物幹細胞が懸濁される。

[0069] 本発明の凝集抑制剤中には、上記のように使用したときに、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な量のトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類が含有される。本発明の凝集抑制剤中の当該多糖類の含有量は、通常、０．００１～１００（ｗ／ｗ）％の範囲内である。

[0070] 本発明の凝集抑制剤が、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液である場合、当該水溶液中の該多糖類の濃度は、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度であれば特に限定されない。上記多糖類の濃度が高いほど凝集を抑制する効果は高くなるが、該多糖類濃度が高すぎると、幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。

[0071] 例えば、上記多糖類としてトレハロースを用いる場合、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を避けるため、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常、３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは、１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常、４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0072] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分なトレハロース濃度を適宜設定することができる。

[0073] 上記多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0074] 上記多糖類としてデキストランを用いる場合、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは３０～１００ｍｇ／ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0075] また、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される２又は３種の多糖類を用いる場合においても、結果として哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するように、当該水溶液に各多糖類が含まれる。

[0076] このような濃度に調製されたトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に哺乳動物幹細胞を懸濁することにより、簡便に哺乳動物幹細胞の凝集を抑制することが出来る。

[0077] （２．哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法）

本発明は、哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生

理的水溶液（好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む等張水溶液）に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法を提供するものである。これらの多糖類により、特に、懸濁液中の哺乳動物幹細胞（即ち、浮遊した哺乳動物幹細胞）の凝集が抑制される。

[0078] 哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することには、哺乳動物幹細胞の懸濁液にトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を添加して、当該多糖類を含む生理的水溶液中の哺乳動物幹細胞懸濁液を得ることも包含される。

[0079] 「トレハロース」、「ヒドロキシエチルデンプン」、「デキストラン」、「哺乳動物」、「幹細胞」、「付着性」、「単離又は精製」、「単一細胞の状態」、「浮遊」、「凝集」、「等張」、「生理的水溶液」、等の各用語の定義は、特にことわりのない限り、上記Ｉの項に記載した通りである。

[0080] 本発明の凝集抑制方法に用いる哺乳動物幹細胞は、好ましくは付着性幹細胞である。付着性の幹細胞は懸濁液中では（即ち、浮遊した状態では）より凝集しやすいからである。付着性幹細胞は、好ましくは、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である。

[0081] 哺乳動物幹細胞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。

[0082] 本発明の凝集抑制方法に用いる哺乳動物幹細胞は、単離又は精製されていることが好ましい。

[0083] 本発明の凝集抑制方法に用いる哺乳動物幹細胞は、単一細胞（シングルセル）の状態の哺乳動物幹細胞を含むことが好ましい。哺乳動物幹細胞中に含まれる単一細胞の状態の哺乳動物幹細胞の割合は、通常７０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、更に好ましくは９９％以上（例えば１００％）である。

[0084] 特に、付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態では凝集しやすいが、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類により、効果的に凝集を抑制することができ、単一細胞の状態を長時間維持することができる。

[0085] 本発明に用いる生理的水溶液には、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される１、２又は３種の多糖類を含む。該生理的水溶液がこれらの群から選択される２種又は３種の多糖類を含む場合における多糖類の組み合わせは、トレハロースとヒドロキシエチルデンプンの組み合わせ、トレハロースとデキストランの組み合わせ、ヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせ又はトレハロースとヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせである。

[0086] 本発明に用いる生理的水溶液には、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度の上記多糖類が含まれる。

[0087] 上記多糖類としてトレハロースを用いる場合、該生理的水溶液中のトレハロース濃度は、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度であれば、特に限定されないが、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を避けるため、該生理的水溶液中のトレハロース濃度は、好ましくは、３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは、１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、該生理的水溶液中のトレハロース濃度は、好ましくは、４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0088] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度を適宜設定することができる。

[0089] 上記多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、該生理的水溶液中のヒドロキシエチルデンプン濃度は、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度であれば、特に限定されないが、例えば、１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影

響を避けるため、該生理的水溶液中のヒドロキシエチルデンプン濃度は、例えば、５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは、１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、該生理的水溶液中のヒドロキシエチルデンプン濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0090] 上記多糖類としてデキストランを用いる場合、該生理的水溶液中のデキストラン濃度は、哺乳動物幹細胞の凝集を抑制するのに十分な濃度であれば、特に限定されないが、例えば、１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を避けるため、該生理的水溶液中のデキストラン濃度は、通常、５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは、２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、該生理的水溶液中のデキストラン濃度は、通常、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは３０～１００ｍｇ／ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0091] また、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される２又は３種の多糖類を用いる場合においても、結果として哺乳動物幹細胞の凝集を抑制し得るように、生理的水溶液中に各多糖類が含まれる。

[0092] 哺乳動物幹細胞を懸濁する際のトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液の温度は、通常０～３７℃、好ましくは０～２５℃の範囲内である。

[0093] 懸濁液中の哺乳動物幹細胞の密度は、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類による凝集抑制効果が達成される限り特に限定されないが、通常10^3～10^{10}個／ｍｌの範囲内である。

[0094] 哺乳動物幹細胞のトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキスト

ランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中への懸濁は、ピペッ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実施することが出来る。このような操作により、哺乳動物幹細胞が、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中を浮遊する。

[0095] ＩＩＩ．哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制

（１．哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤）

本発明は、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤を提供するものである。哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤がこれらの群から選択される２種又は３種の多糖類を含む場合、トレハロースとヒドロキシエチルデンプンの組み合わせ、トレハロースとデキストランの組み合わせ、ヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせ又はトレハロースとヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせにより、特に、懸濁液中の哺乳動物幹細胞（即ち、浮遊した哺乳動物幹細胞）の生存率の低下が抑制される。

[0096] 「トレハロース」、「ヒドロキシエチルデンプン」、「デキストラン」、「哺乳動物」、「幹細胞」、「付着性」、「単離又は精製」、「単一細胞の状態」、「浮遊」、「凝集」、「等張」、「生理的水溶液」、等の各用語の定義は、特にことわりのない限り、上記Ｉの項に記載した通りである。

[0097] 本発明の生存率低下の抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、好ましくは付着性幹細胞である。付着性の幹細胞は非付着性の細胞と比較して、懸濁液中では（即ち、浮遊した状態では）より生存率が低下しやすいからである。付着性幹細胞は、好ましくは、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である。

[0098] 哺乳動物幹細胞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。

[0099] 本発明の生存率低下の抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、単離又

は精製されていることが好ましい。

[0100] 本発明の生存率低下の抑制剤に用いる哺乳動物幹細胞は、単一細胞（シングルセル）の状態の哺乳動物幹細胞を含むことが好ましい。哺乳動物幹細胞中に含まれる単一細胞の状態の哺乳動物幹細胞の割合は、通常７０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、更に好ましくは９９％以上（例えば１００％）である。

[0101] 本発明の生存率低下の抑制剤の適用対象となる哺乳動物幹細胞は、好ましくは、該幹細胞の懸濁液中に浮遊しているものである。

[0102] 特に、付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態ではダメージを受けやすく、生存率が低下しやすいが、本発明の生存率低下の抑制剤により、生存率の低下を効果的に抑制することができる。

[0103] 本発明の生存率低下の抑制剤は、好ましくは、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む。ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをトレハロースと組み合わせることにより、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されることが期待できる。特に、懸濁液中に浮遊した付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊した状態（とりわけ、懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態の付着性幹細胞）の生存率の低下を効果的に抑制することが期待できる。

[0104] 本発明の生存率低下の抑制剤はトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類からなるものであってもよいし、これらの構成因子に加えて更に生理学的に許容される担体を含んでいてもよい。生理学的に許容される担体としては、例えば、生理的水溶液（例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水、ＨＥＰＥＳ緩衝化生理食塩水、リンゲル液、５％グルコース水溶液、哺乳動物培養用の液体培地、等張剤（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）の水溶液等の等張水溶液）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、キレ

ート剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、クエン酸、サリチレート）、賦形剤、結合剤、溶解補助剤、保存剤、酸化防止剤等を含むことができる。本発明の生存率低下の抑制剤は、好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される１種、２種又は３種の多糖類を含む生理的水溶液（生理的水溶液中の上記多糖類溶液）であり、より好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される１種、２種又は３種の多糖類を含む等張水溶液である。

[0105] 本発明の生存率低下の抑制剤は、哺乳動物幹細胞の懸濁液に添加することにより用いることができる。あるいは、本発明の生存率低下の抑制剤がトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液の場合には、本発明の生存率低下の抑制剤により哺乳動物幹細胞を懸濁してもよい。哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分な上記多糖類の濃度が達成されるように、本発明の生存率低下の抑制剤が添加され、又は本発明の生存率低下の抑制剤により哺乳動物幹細胞が懸濁される。

[0106] 多糖類としてトレハロースを用いる場合、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分なトレハロース濃度は、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、トレハロース濃度が高いほど生存率低下を抑制する効果は高くなるが、トレハロース濃度が高すぎると、逆に幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。従って、この悪影響を回避する観点から、懸濁液中のトレハロース濃度は、通常３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のトレハロース濃度は、通常４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0107] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制するのに十分なトレハロース濃度を適宜設定することができる。

[0108] 多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分なヒドロキシエチルデンプン濃度は、通常、１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、ヒドロキシエチルデンプン濃度が高いほど生存率低下を抑制する効果は高くなるが、ヒドロキシエチルデンプン濃度が高すぎると、逆に幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。従って、この悪影響を回避する観点から、懸濁液中のヒドロキシエチルデンプン濃度は、通常５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のヒドロキシエチルデンプン濃度は、通常１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0109] 多糖類としてデキストランを用いる場合、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分なデキストラン濃度は、通常、１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、デキストラン濃度が高いほど生存率低下を抑制する効果は高くなるが、デキストラン濃度が高すぎると、逆に幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。従って、この悪影響を回避する観点から、懸濁液中のデキストラン濃度は、通常５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、懸濁液中のデキストラン濃度は、通常１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは３０～１００ｍｇ／ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0110] また、多糖類として、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン；トレハロース及びデキストラン；或いはトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランを含む組み合わせを用いる場合においては、懸濁液中の各多糖類の濃度は、好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをそれぞれ単独で用いた場合よりも、これらの組み合わせ

を用いた場合の方が、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されるように、設定される。

[0111] 本発明の生存率低下の抑制剤中には、上記の様に使用したときに、哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分な量のトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類が含有される。本発明の生存率低下の抑制剤中の当該多糖類の含有量は、通常、０．００１～１００（ｗ／ｗ）％の範囲内である。

[0112] 多糖類として、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを用いる場合には、本発明の生存率低下の抑制剤中のトレハロースの含有量は、通常、０．００１～９９．９９９（ｗ／ｗ）％の範囲内であり、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランの含有量は、通常、０．００１～９９．９９９（ｗ／ｗ）％の範囲内である。

[0113] 多糖類として、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランを含む組み合わせを用いる場合には、本発明の生存率低下の抑制剤中の各多糖類の含有量は、それぞれ、通常、０．００１～９９．９９７（ｗ／ｗ）％の範囲内である。

[0114] 本発明の生存率低下の抑制剤が、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液である場合、当該水溶液中の該多糖類の濃度は、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制するのに十分な濃度であれば特に限定されない。上記多糖類の濃度が高いほど、生存率の低下を抑制する効果は高くなるが、該多糖類濃度が高すぎると、幹細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性がある。

[0115] 例えば、多糖類としてトレハロースを用いる場合、当該水溶液中のトレハロース濃度は、哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分なように、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、悪影響を避けるため、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常

、３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは、１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常、４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0116] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制するのに十分な濃度を適宜設定することができる。

[0117] 上記多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、悪影響を回避する観点から、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0118] 上記多糖類としてデキストランを用いる場合、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、悪影響を回避する観点から、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは３０～１００ｍｇ／ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0119] また、多糖類として、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン；トレハロース及びデキストラン；或いはトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランを含む組み合わせを用いる場合においては、当該水溶液中の各多糖類の濃度は、好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをそれぞれ単独で用いた場合よりも、これらの組み合

わせを用いた場合の方が、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されるように、設定される。

[0120] このような濃度に調整されたトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に哺乳動物幹細胞を懸濁することにより、簡便に哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制することが出来る。

[0121] （２．哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法）

本発明は、哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される１種、２種又は３種多糖類を含む生理的水溶液（好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される１種、２種又は３種の多糖類を含む等張水溶液）に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法を提供するものである。２種又は３種の多糖類組み合わせて用いる場合、トレハロースとヒドロキシエチルデンプンの組み合わせ、トレハロースとデキストランの組み合わせ、ヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせ又はトレハロースとヒドロキシエチルデンプンとデキストランの組み合わせにより、特に、懸濁液中の哺乳動物幹細胞（即ち、浮遊した哺乳動物幹細胞）の生存率の低下が抑制される。

[0122] 哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することには、哺乳動物幹細胞の懸濁液にトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を添加して、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中の哺乳動物幹細胞懸濁液を得ることも包含される。

[0123] 「トレハロース」、「ヒドロキシエチルデンプン」、「デキストラン」、「哺乳動物」、「幹細胞」、「付着性」、「単離又は精製」、「単一細胞の状態」、「浮遊」、「凝集」、「等張」、「生理的水溶液」、等の各用語の

定義は、特にことわりのない限り、上記Ｉの項に記載した通りである。

[0124] 本発明の生存率低下の抑制方法に用いる哺乳動物幹細胞は、好ましくは付着性幹細胞である。付着性の幹細胞は非付着性の細胞と比較して、懸濁液中では（即ち、浮遊した状態では）より生存率が低下しやすいからである。付着性幹細胞は、好ましくは、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である。

[0125] 哺乳動物幹細胞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。

[0126] 本発明の生存率低下の抑制方法に用いる哺乳動物幹細胞は、単離又は精製されていることが好ましい。

[0127] 本発明の生存率低下の抑制方法に用いる哺乳動物幹細胞は、単一細胞（シングルセル）の状態の哺乳動物幹細胞を含むことが好ましい。哺乳動物幹細胞中に含まれる単一細胞の状態の哺乳動物幹細胞の割合は、通常７０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、更に好ましくは９９％以上（例えば１００％）である。

[0128] 特に、付着性幹細胞は懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態ではダメージを受けやすく、生存率が低下しやすいが、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類により、生存率の低下を効果的に抑制することができる。

[0129] 本発明に用いる生理的水溶液には、好ましくは、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせが含まれる。ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをトレハロースと組み合わせることにより、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されることが期待できる。特に、懸濁液中に浮遊した付着性幹細胞（とりわけ、懸濁液中に浮遊し、且つ単一細胞の状態の付着性幹細胞）の生存率の低下を効果的に抑制することが期待できる。

[0130] トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中の該多糖類の濃度は、哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分な濃度であれば、特

に限定されない。

[0131] 多糖類としてトレハロースを用いる場合、当該水溶液中のトレハロース濃度は、哺乳動物幹細胞の生存率低下を抑制するのに十分なように、通常、４．５３ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１５．１ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を避けるため、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常、３６２．４ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは、１８１．２ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のトレハロース濃度は、通常、４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１５．１～１８１．２ｍｇ／ｍｌである。

[0132] トレハロース以外の上記多糖類を用いる場合にも、トレハロースに準じて、懸濁液中の哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制するのに十分な濃度を適宜設定することができる。

[0133] 上記多糖類としてヒドロキシエチルデンプンを用いる場合、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のヒドロキシエチルデンプンの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0134] 上記多糖類としてデキストランを用いる場合、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば１ｍｇ／ｍｌ以上、好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ以上、より好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ以上、更に好ましくは６５ｍｇ／ｍｌ以上である。また、幹細胞の生存率への悪影響を回避する観点から、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば５００ｍｇ／ｍｌ以下、好ましくは２００ｍｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１２５ｍｇ／ｍｌ以下、更に好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ以下である。従って、当該水溶液中のデキストランの濃度は、例えば、１～５００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１０～２００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは３０～１２５ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは３０～１００ｍｇ／

ｍｌ、更により好ましくは６５～１００ｍｇ／ｍｌである。

[0135] また、多糖類として、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン；トレハロース及びデキストラン；或いはトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランを含む組み合わせを用いる場合においては、当該水溶液中の各多糖類の濃度は、好ましくは、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン又はデキストランをそれぞれ単独で用いた場合よりも、これらの組み合わせを用いた場合の方が、哺乳動物幹細胞の生存率の低下を抑制する効果が増強されるように、設定される。

[0136] 哺乳動物幹細胞を懸濁する際のトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液の温度は、通常０～３７℃、好ましくは０～２５℃の範囲内である。

[0137] 懸濁液中の哺乳動物幹細胞の密度は、トレハロースによる凝集抑制効果が達成される限り特に限定されないが、通常10^3～10^{10}個／ｍｌの範囲内である。

[0138] 哺乳動物幹細胞のトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中への懸濁は、ピペッ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実施することが出来る。このような操作により、哺乳動物幹細胞が、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液中を浮遊する。

[0139] 刊行物、特許文献等を含む、本明細書に引用されたすべての参考文献は、引用により、それらが個々に具体的に参考として援用されかつその内容全体が具体的に記載されているのと同程度まで、本明細書に援用される。

[0140] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

[0141] [実施例１]

１．ブタ皮下脂肪由来間葉系幹細胞（Ｐｉｇ　ＡＴ－ＭＳＣ）の調製

（１）ブタ組織の調製

ブタ皮下脂肪をそけい部より採取後、視認可能な血管や筋など脂肪組織と異なる組織をマイクロ鋏で除去し、その後、細切とＨＢＳＳ（ハンクス溶液）での洗浄を数回繰り返した。視覚的に、血球（または血塊）の除去および筋などの膜状浮遊物質の除去が確認出来るまで洗浄作業を続けた。得られたブタ皮下脂肪をはさみにより細切した。

細切された組織を同量のＨＢＳＳと混ぜた。混合物を緩やかに振とう後、静置することにより２層に分離させた。上層のみを回収した。回収された上層に０．２％コラゲナーゼ（ＴｙｐｅＩ）／ＨＢＳＳを加え、３７℃下で緩やかに脂肪が完全に液状になるまで振とうした（最大９０分間）。反応液に１０％牛胎児血清（ＦＢＳ）を含むαＭＥＭをコラゲナーゼ反応液量に対して等量以上加えて混合後、混合物を遠心分離することにより３層に分離させた（下から有核細胞・溶液・脂肪）。下層のみを回収し、ＨＢＳＳにて再懸濁した。この操作を３回繰り返し、最後に１０％ＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁した細胞懸濁液を培養皿へ移し、培養した。ＭＳＣは培養皿の底面へ接着した。

[0142] （２）実験に用いる細胞（Ｐｉｇ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ６）の調製

（１）の操作で、培養皿へ接着したＭＳＣは増殖を続け、５～７日後に培養皿底面はぎっしり細胞で埋まった。コンフルエントに到達するとＭＳＣは増殖停止または細胞死が誘導されるので、コンフルエント到達前に、ＭＳＣを培養皿からはがし、新しい培養皿へ低密度で播種した。培養皿の底面に接着しているＭＳＣをＰＢＳで３回洗浄後、トリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）を加え、ＭＳＣを培養皿からはがした後、細胞が低密度になるような量の１０％のＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁し、新しい培養皿へ移した。この操作を６回繰り返した（６回継代＝Ｐ６）。

[0143] （３）各液による細胞の懸濁

（２）で得たＰｉｇ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ６を実験に用いた。

１０ｃｍ　ディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシンーＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、各溶液｛ＥＴ－ｋｙｏｔｏ（ＥＴ－Ｋ、大塚製薬工場社製）、ＨＢＳＳ、ＭＳＣＭ（ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ）｝にて再度、馴化洗浄を１回行った。なお、ＥＴ－Ｋ中には４５．３ｍｇ／ｍｌの濃度のトレハロースが含まれる。その後、各溶液を用いて２．５ｘ１０^{5}　ｃｅｌｌｓ／５０μＬとなるように懸濁した。

懸濁液を各温度（０、２５、３７℃）にて静置し、０、３０、６０、１２０、２４０分後に２０μＬピペットマンにて数回ピペッティングし、１０μＬをディッシュに移した。

ディッシュ上の懸濁液の最下面に実体顕微鏡の焦点を合わせ、観察を行った。

顕微鏡下にて隣接し合う細胞塊を形成しているものを、細胞凝集塊とした。細胞凝集塊は、ｄｉｓｈを顕微鏡のステージ上で揺らし、明らかに塊として動いている事を確認した。

[0144] ２．細胞生存率の検討

各条件の細胞生存率への影響を検討した。

５０μＬあたりに生存している細胞数をトリパンブルー染色にて算出し、スタートの時点で５０μＬ中に生存していた細胞数（２．５ｘ１０^{5}個）と比較することにより、細胞の生存率を算出した。結果を表１に示す。

[0145]

[表1]

各種細胞懸濁溶液におけるMSCの生存率

30分

	0	25	37
MSCM	88.3	90	90.2
HBSS	82.5	91.4	93.3
ETK	97.2	95	93.8

60分

	0	25	37
MSCM	84.4	83.9	82
HBSS	85.7	79.2	88.1
ETK	89.8	86	84.8

120分

	0	25	37
MSCM	78.5	82.3	75.4
HBSS	79	80.4	77.8
ETK	86.8	84.7	82.1

240分

	0	25	37
MSCM	83.1	74.5	55.6
HBSS	79	84.4	59.6
ETK	84.5	78.7	72.5

[0146] ＭＳＣＭ又はＨＢＳＳを用いた場合には、時間の経過とともに顕著な細胞生存率の低下が認められたが、ＥＴ－Ｋでは生存率の低下が抑えられた。

[0147] ３．細胞の凝集状態の検討

ＭＳＣＭを用いた場合には、２５℃及び３７℃においては、試験開始３０分後から細胞凝集塊の形成が認められた。０℃においても、試験開始６０分後から細胞凝集塊の形成が認められた。

ＨＢＳＳを用いた場合には、２５℃及び３７℃においては、試験開始１２０分後から細胞凝集塊の形成が認められた。０℃においても、試験開始２４０分後には細胞凝集塊の形成が認められた。

一方、ＥＴ－Ｋを用いた場合には、２５℃及び３７℃においては、試験開始１２０分後までは細胞凝集塊の形成は認められず、試験開始２４０分後に若干の細胞凝集塊の形成が認められた。０℃においては、試験開始２４０分後でも細胞凝集塊の形成は認められなかった。いずれの温度においても、ＥＴ－Ｋを用いた場合には、細胞の浮遊状態が試験開始２４０分後まで維持されていた。

[0148] ４．細胞の形態の検討

ＭＳＣＭを用いた場合には、突起を出す細胞が若干確認された。膨張した細胞の出現率は低かった。

ＨＢＳＳを用いた場合には、突起を出す細胞の割合が経時的に増加した。また、膨張した細胞の出現率が高かった。

一方、ＥＴ－Ｋを用いた場合には、突起を出す細胞の割合は、ＭＳＣＭ及びＨＢＳＳと比較して少なかった。膨張した細胞の出現率も、ＭＳＣＭ及びＨＢＳＳと比較して低かった。

一般に、付着性細胞は浮遊時間に依存してｄｉｓｈなどに接着しようと突起を出すことが知られている。これは、浮遊状態が細胞にストレスを与えるためである。また、細胞の膨張は、細胞質内外の浸透圧調節力が低下していることを示していると考えられる。以上の細胞形態の観察結果から、ＥＴ－Ｋは他の組成液と比較して細胞に与えるストレスが軽微であると考えられた。

[0149] ［実施例２］

実施例１で調製したブタ皮下脂肪由来間葉系幹細胞を２回継代して得られた細胞（Ｐｉｇ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ２）を１０ｃｍディッシュ３枚に播いた。１０ｃｍディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシンーＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞（１．７ｘ１０^{6}個、生存率：９４．１％）を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、５ｍＬのＥＴ－ｋｙｏｔｏ（ＥＴ－Ｋ、大塚製薬工場社製）に懸濁した。ＥＴ－Ｋ中の細胞懸濁液を１０本の１５ｍＬチューブに５００μＬずつ分注し、１０分間室温（２５℃）にて静置した。適量の生理食塩水を各チューブに加えることにより、ＥＴ－Ｋ中の細胞懸濁液を２～１０倍に希釈し、更に３０分静置した。その後、実施例１と同様に、生存率を算出し、細胞凝集塊の有無を観察した。結果を表２に示す。

[0150] [表2]

希釈倍率	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
細胞数	1.25	1	1.25	0.92	1	1	1.25	0.92	1	0.92
生存率	91.5	92.3	90.2	92.3	82.3	88.3	93.1	90.1	90.5	83.5
凝集個数	0	0	0	2	2	2～3	2	2～3	2～3	2～3
凝集率	0	0	0	1以下	1以下	1以下	1以下	1以下	1以下	1以下
総液量	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
トレハロース濃度(mg/ml)	45.3	22.65	15.1	11.33	9.06	7.55	6.47	5.66	5.03	4.53

[0151] （細胞凝集性）

ＥＴ－Ｋの原液、その２倍希釈液及び３倍希釈液を用いた場合には、細胞凝集塊は観察されなかった。ＥＴ－Ｋを４倍以上希釈すると、細胞が２～３個結合した凝集塊が僅かに認められた。従って、少なくとも１５．１ｍｇ／ｍｌ以上のトレハロース濃度において、幹細胞の凝集抑制効果が発揮されることが示唆された。

[0152] （細胞浮遊性）

細胞凝集性を観察後、細胞を再度懸濁し、室温（２５℃）にて１０分間静置後、顕微鏡下にて細胞の浮遊性を観察した。ＥＴ－Ｋの原液、その２倍希釈液及び３倍希釈液を用いた場合には、細胞は安定して浮遊していた。一方、ＥＴ－Ｋを８倍以上希釈すると、ＭＳＣＭやＨＢＳＳとほとんど変化なく、細胞は沈殿した。従って、少なくとも１５．１ｍｇ／ｍｌ以上のトレハロース濃度において、幹細胞が安定して浮遊することが示唆された。

[0153] （細胞形態及び生存率）

ＥＴ－Ｋを生理食塩水により希釈しても、試験した希釈率の範囲内においては、細胞形態及び生存率の有意な変化は認められなかった。

[0154] ［実施例３］

実施例１で調製したブタ皮下脂肪由来間葉系幹細胞を１０回継代して得られた細胞（Ｐｉｇ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ１０）を１０ｃｍディッシュに播いた。１０ｃｍディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞（３．３ｘ１０^{8}個、生存率：９８．５％）を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心により細胞を回収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、５ｍＬのＥＴ－Ｋｙｏｔｏ（ＥＴ－Ｋ、大塚製薬工場社製）に懸濁した。ＥＴ－Ｋ中の細胞懸濁液を、４℃にて５時間又は２７時間静置した。その後、実施例１と同様に、生存率を算出し、細胞凝集塊の有無を観察した。結果を表２に示す。５時間又は２７時間の静置後、更に細胞を２４時間培養し、その後、細胞の形態を顕微鏡下で観察した。

[0155]（細胞凝集性）

ディッシュから剥離後、ＥＴ－Ｋに懸濁した状態で細胞を４℃にて静置した結果、５時間及び２７時間後のいずれの時点でも細胞凝集の形成は起こらず、シングルセルの状態が維持されていた。従って、ＥＴ－Ｋによる細胞凝集抑制効果は４℃においても発揮されることが示された。

[0156]（生存率）

５時間後の生存率は７８．７％であり、２７時間後の生存率は６５．９％であった。０時間から５時間までは３．９６％／ｈｒ、５時間～２７時間までは０．５８％／ｈｒの生存率低下が確認された。

[0157]（細胞の形態）

５時間又は２７時間の静置後、更に細胞を２４時間培養すると、生存率に一致してプレートに接着した細胞が確認された。しかし、２７時間保存細胞では異形態の細胞が約１０％確認された。５時間保存した細胞では異形態の細胞の割合は１％以下であった。

[0158]［実施例４］

（１）ヒト骨髄由来MSC（ｈＢＭ－ＭＳＣ）の調製

２０～３０mLの骨髄細胞を６０００Unitヘパリンを含むシリンジによりヒト腸骨から採取した。骨髄細胞は、PBS（－）で一度洗浄し、９００ｇ、２０分間の遠心により細胞を回収し、もう一度繰り返した。１０％FBSを含むαＭＥＭに懸濁し、培養皿に移して接着培養を行った。

（２）実験に用いる細胞（ｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ３）の調製

（１）の操作で、培養皿へ接着したＭＳＣは増殖を続け、５～７日後に培養皿底面はぎっしり細胞で埋まった。コンフルエントに到達するとＭＳＣは増殖停止または細胞死が誘導されるので、コンフルエント到達前に、ＭＳＣを培養皿からはがし、新しい培養皿へ低密度で播種した。培養皿の底面に接着しているＭＳＣをＰＢＳで３回洗浄後、トリプシンーＥＤＴＡ（０．０５％　トリプシン，０．５３ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）を加え、ＭＳＣを培養皿からはがした後、細胞が低密度になるような量の１０％のＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁し、新しい培養皿へ移した。この操作を３回繰り返した（３回継代＝Ｐ３）。

ヒト骨髄細胞由来ＭＳＣを１０ｃｍディッシュに播き培養した。１０ｃｍディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシンーＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、以下の組成液に懸濁し、２４０分及び４８０分静置後、細胞の凝集の有無を観察した。

ＮＳ：生理食塩水（大塚製薬工場）

Ｈ：ヘスパンダー（杏林製薬）

１×Ｔ＆ＮＳ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース（和光純薬）を含有する生理食塩水

１×Ｔ＆Ｈ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース（和光純薬）を含有するヘスパンダー（杏林製薬）

１×Ｔ＆Ｈ＆ＴＲａｓｅ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース

（和光純薬）及びトレハラーゼ（ＳＩＧＭＡ）（２Ｕｎｉｔ／ｍＬ）を含有するヘスパンダー（杏林製薬）

[0159] 尚、トレハロースはＥＴ－Ｋの主要な成分であり、４５．３ｍｇ／ｍＬはＥＴ－Ｋに含まれるトレハロースの濃度である。また、ヘスパンダーは、ヒドロキシエチルデンプン（重量平均分子量（Ｍｗ） 約７００００、置換度０．５０～０．５５）を６（ｗ／ｖ）％含有する、ヒドロキシエチルデンプン製剤である。

[0160] その結果、ＮＳ及びＨを用いた場合には、試験開始２４０分後から細胞凝集塊の形成が認められた。一方、１×Ｔ＆ＮＳ及び１×Ｔ＆Ｈを用いた場合には、試験開始２４０分後及び４８０分後のいずれにおいても、細胞凝集塊の形成は認められなかった。しかしながら、トレハラーゼによりトレハロースを分解すると、細胞凝集塊の形成が認められた。

[0161] 以上の結果から、ＥＴ－Ｋの細胞凝集抑制効果はトレハロースによるものであることが示された。

[0162] ［実施例５］

（１）ヒト脂肪由来MSC（ｈＢＭ－ＭＳＣ）の調製

ヒト皮下脂肪を採取後、視認可能な血管や筋など脂肪組織と異なる組織をマイクロ鋏で除去し、その後、細切とＨＢＳＳ（ハンクス溶液）での洗浄を数回繰り返した。視覚的に、血球（または血塊）の除去および筋などの膜状浮遊物質の除去が確認出来るまで洗浄作業を続けた。得られたヒト皮下脂肪をはさみにより細切した。

細切された組織を同量のＨＢＳＳと混ぜた。混合物を緩やかに振とう後、静置することにより２層に分離させた。上層のみを回収した。回収された上層に０．０５％コラゲナーゼ（Ｔｙｐｅ Ⅰ）／ＨＢＳＳを加え、３７℃下で緩やかに脂肪が完全に液状になるまで振とうした。反応液に１０％牛胎児血清（ＦＢＳ）を含むαＭＥＭを混合後、混合物を遠心分離することにより２層に分離させた。下層のみを回収し、ＨＢＳＳにて再懸濁した。この操作を３回繰り返し、最後に１０％ＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁した細胞懸濁液を

培養皿へ移し、培養した。ＭＳＣは培養皿の底面へ接着した。

（２）実験に用いる細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ３）の調製

（１）の操作で、培養皿へ接着したＭＳＣは増殖を続け、５～７日後に培養皿底面はぎっしり細胞で埋まった。コンフルエントに到達するとＭＳＣは増殖停止または細胞死が誘導されるので、コンフルエント到達前に、ＭＳＣを培養皿からはがし、新しい培養皿へ低密度で播種した。培養皿の底面に接着しているＭＳＣをＰＢＳで３回洗浄後、トリプシンーＥＤＴＡ（０．０５％　トリプシン，０．５３ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）を加え、ＭＳＣを培養皿からはがした後、細胞が低密度になるような量の１０％のＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁し、新しい培養皿へ移した。この操作を３回繰り返した（３回継代＝Ｐ３）。

ｈＡＴ－ＭＳＣ及びｈＢＭ－ＭＳＣを３回継代して得られた細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ３及びｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ３）を１０ｃｍ　ディッシュに播いた。１０ｃｍ　ディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシンーＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，　１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ３：１．０ｘ１０^{5}個、生存率：９８．４％／ｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ３：１．２５ｘ１０^{5}個、生存率：９６．８％）を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、以下の組成液１００μＬに懸濁し、室温（約２５℃）にて２４０分又は２４時間静置後、細胞の生存率を測定し、細胞の凝集及び形態を観察した。更に、２４０分又は２４時間静置後、更に細胞を１２時間培養し、細胞の形態を観察した。

０．１×Ｔ＆Ｈ：４．５３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース（和光純薬）を含有するヘスパンダー（杏林製薬）

０．１×Ｔ＆ＮＳ：４．５３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有する生理食塩水（大塚製薬工場）

１×Ｔ＆Ｈ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有するヘ

スパンダー

１×Ｔ＆ＮＳ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有する生理食塩水

２×Ｔ＆Ｈ：９０．６ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有するヘスパンダー

２×Ｔ＆ＮＳ：９０．６ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有する生理食塩水

ＥＴ－Ｋ：ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ（大塚製薬工場）

Ｈ：ヘスパンダー

ＮＳ：生理食塩水

ＭＳＣＭ：１０％ＦＢＳを含有するαＭＥＭ

[0163] （細胞生存率）

結果を表３に示す。

[0164] [表3]

240分 (%)

	AT	BM
0.1x T & H	70	71.8
0.1x T & NS	61.5	50
1x T & H	75	77.8
1x T & NS	58.3	54.5
2x T & H	83.3	80
2x T & NS	64.3	45.5
ET-K	81.8	80
H	72.7	75
NS	58.3	40
MSCM	36.4	46.2

24時間 (%)

	AT	BM
0.1x T & H	61.4	54.3
0.1x T & NS	50	46.2
1x T & H	66.7	64.3
1x T & NS	35.7	41.2
2x T & H	73.3	76.9
2x T & NS	27.3	33.3
ET-K	66.7	64.3
H	43.8	36.4
NS	21.4	27.3
MSCM	12.5	16.7

[0165] トレハロース又はヒドロキシエチルデンプン（ヘスパンダー）をそれぞれ単独で添加することにより、細胞生存率の上昇が認められた。トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン（ヘスパンダー）の両方を添加することにより、細胞生存率は大幅に上昇した。

[0166] （細胞の凝集及び形態）

０．１×Ｔ＆ＮＳにおいては、試験開始から２４０分後に細胞凝集塊の形

成がＡＴ及びＢＭの双方について若干認められたが、組成液中にトレハロースを含むその他の群（０．１×Ｔ＆Ｈ、１×Ｔ＆Ｈ、１×Ｔ＆ＮＳ、２×Ｔ＆Ｈ、２×Ｔ＆ＮＳ及びＥＴ－Ｋ）においては、細胞凝集塊の形成は認められなかった。組成液中にトレハロースを含む群においては、細胞の変形は認められなかった。

組成液中にトレハロースもヒドロキシエチルデンプンも含まない群（ＮＳ、ＭＳＣＭ）においては、顕著に細胞凝集塊及び細胞変形が認められた。ヒドロキシエチルデンプンのみを含む群（Ｈ）においては、細胞凝集塊が認められたが、細胞変形はわずかであった。

[0167]（静置後の培養）

トレハロース添加の有無に関係なく、生存率に一致した接着細胞数の増減が確認された。０．１×Ｔを含む群及びトレハロース無添加群の一部では、細胞形態の異常が確認された。一方、ＮＳと比較してＨでは細胞形態が良好であり、生存率に一致した細胞接着数の増減が確認された。

[0168] 以上の結果から、トレハロースは細胞の凝集を抑制し、細胞の生存率を高め、細胞形態や機能を維持し得ることが示された。また、ヒドロキシエチルデンプンは、細胞の生存率を高め、細胞形態や機能を維持し得ることが示された。更に、トレハロースとヒドロキシエチルデンプンとを組み合わせることにより、細胞の生存率が顕著に上昇することが示された。

[0169]［実施例６］

ｈＡＴ－ＭＳＣ及びｈＢＭ－ＭＳＣを３回継代して得られた細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ３及びｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ３）を１０ｃｍディッシュに播いた。１０ｃｍディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ３：４．２５ｘ１０^{5}個、生存率：９７．５％／ｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ３：５．０ｘ１０^{5}個、生存率：９８．２％）を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回

収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、以下の組成液１００μＬに懸濁し、室温（約２５℃）にて８時間又は３６時間静置後、細胞の生存率を測定し、細胞の凝集を観察した。

１×Ｔ＆Ｈ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース（和光純薬）を含有するヘスパンダー（杏林製薬）

２×Ｔ＆Ｈ：９０．６ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有するヘスパンダー

４×Ｔ＆Ｈ：１８１．２ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有するヘスパンダー

８×Ｔ＆Ｈ：３６２．４ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有するヘスパンダー

ＥＴ－Ｋ：ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ（大塚製薬工場）

Ｈ：ヘスパンダー

１×Ｔ＆Ｈ＆ＴＲａｓｅ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース及びトレハラーゼ（ＳＩＧＭＡ）（２Ｕｎｉｔ／ｍＬ）を含有するヘスパンダー

[0170]（細胞の凝集）

組成液中にトレハロースを含む群（１×Ｔ＆Ｈ、２×Ｔ＆Ｈ、４×Ｔ＆Ｈ、８×Ｔ＆Ｈ及びＥＴ－Ｋ）においては、ｈＡＴ－ＭＳＣ及びｈＢＭ－ＭＳＣの双方について、試験開始から８時間後の細胞凝集塊の形成は認められなかった。一方、トレハロースを含まないヘスパンダー（Ｈ）を用いた場合には、ｈＡＴ－ＭＳＣ及びｈＢＭ－ＭＳＣの双方について、試験開始から８時間後に細胞凝集塊の形成が認められた。更に、トレハラーゼによりトレハロースを分解すると、細胞凝集塊の形成が認められた（１×Ｔ＆Ｈ＆ＴＲａｓｅ）。以上の結果から、トレハロースが細胞凝集抑制効果を有することが示された。

[0171]（細胞生存率）

試験開始３６時間後の細胞生存率を表４に示す。

[0172] [表4]

	AT	BM
1xT & H	60	62.5
2xT & H	70	71.4
4xT & H	75.9	75
8xT & H	39.1	40.4
H	34.4	23.3
1xT & H & TR	28.6	22.6
ET-K	52.8	45.8

[0173] 表４に示される通り、いずれの濃度のトレハロースを添加しても、細胞の生存率はヘスパンダー単独（Ｈ）と比較して上昇した。１８１．２ｍｇ／ｍＬ（４×Ｔ）の濃度のトレハロースの添加までは、細胞生存率の顕著な上昇を示したが、３６２．４ｍｇ／ｍＬ（８×Ｔ）までトレハロース添加濃度を高くすると、その効果は逆に減弱した。従って、細胞生存率を上昇させる観点からは、トレハロース濃度は１８１．２ｍｇ／ｍＬ（４×Ｔ）以下が好ましいことが示唆された。

[0174] ［実施例７］

ｈＡＴ－ＭＳＣ及びｈＢＭ－ＭＳＣを６又は８回継代して得られた細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ８及びｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ６）を１０ｃｍディッシュに播いた。１０ｃｍディッシュあたり、５ｍｌのヘスパンダー（杏林製薬）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞（ｈＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ８：２．４ｘ１０^{6}個／ｈＢＭ－ＭＳＣ　Ｐ６：２．３ｘ１０^{6}個）を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回収し、以下の組成液に懸濁し、室温（約２５℃）にて１時間静置後、細胞の生存率を測定し、細胞の凝集を観察した。

１×Ｔ＆Ｈ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース（和光純薬）を含有するヘスパンダー

０．５×Ｔ＆Ｈ：２２．６５ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有

するヘスパンダー

０．１×Ｔ＆Ｈ：４．５３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロースを含有するヘスパンダー

１×Ｔ＆Ｆ＆Ｈ：４５．３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース及び１０μｇ／ｍｌ　フコイダン（焼津水産化学工業）を含有するヘスパンダー

０．５×Ｔ＆Ｆ＆Ｈ：２２．６５ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース及び１０μｇ／ｍｌ　フコイダンを含有するヘスパンダー

０．１×Ｔ＆Ｆ＆Ｈ：４．５３ｍｇ／ｍＬ　Ｄ－（＋）－トレハロース及び１０μｇ／ｍｌ　フコイダンを含有するヘスパンダー

Ｆ＆Ｈ：１０μｇ／ｍｌ　フコイダンを含有するヘスパンダー

ＥＴ－Ｋ：ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ（大塚製薬工場）

Ｈ：ヘスパンダー

ＭＳＣＭ：１０％ＦＢＳを含有するαＭＥＭ

[0175]　試験結果を図１及び２に示す。

[0176]（細胞生存率）

いずれの濃度のトレハロースを添加しても、細胞の生存率はヘスパンダー単独（Ｈ）と比較して上昇した。一方、フコイダンを添加すると、細胞生存率が低下したことから、フコイダンは細胞毒性を有することが示唆された。トレハロースは、フコイダンの細胞毒性を抑制する傾向を示した。

[0177]（細胞の凝集）

ｈＡＴ－ＭＳＣ及びｈＢＭ－ＭＳＣの双方について、トレハロースの添加により、細胞浮遊効果及び細胞凝集抑制効果が観察された。一方、フコイダンは、細胞浮遊を阻害する傾向が認められ、細胞凝集抑制効果は認められなかった。ヘスパンダーのみよりも、トレハロースを添加した方が、細胞の突起形成が抑制され、細胞の形態がよかった。０．５×Ｔ＆Ｈによる細胞凝集抑制効果はＥＴ－Ｋと同程度であった。細胞浮遊効果は、ＥＴ－Ｋの方が０．５×Ｔ＆Ｈよりも若干優れていた。０．１×Ｔ＆Ｈでは、若干細胞表面に突起が観察された。

[0178] ［実施例８］

実施例１で調製したブタ皮下脂肪由来間葉系幹細胞を７回継代して得られた細胞（Ｐｉｇ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ７）を１０ｃｍディッシュ上で培養した。１０ｃｍディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にし、ＥＴ－Ｋ液に懸濁した。得られた細胞懸濁液を以下の試験に用いた。

[0179] （輸液バッグ内壁への接着性の評価）

ソルデム３ＡＧ輸液バッグ（ＴＥＲＵＭＯ）を細断し、断片を５０ｍｌチューブの壁面に設置した。細胞懸濁液でチューブを満たし、チューブを横にしてクリーンベンチ内で室温（２５℃）にて３０分静置した。その後、輸液バッグ断片をＰＢＳにより洗浄し、輸液バッグ内壁への細胞の接着の有無を、顕微鏡観察により評価した。

[0180] ＰＢＳによる洗浄前においては、ＭＳＣｓの一部（目算で１０％以下）の輸液バッグ内壁への接着が認められたが、ＰＢＳ洗浄により、接着したＭＳＣｓの大部分（目算で９０％以上）が除去された。従って、トレハロースにより、輸液バッグ内壁への細胞の接着を回避できる可能性が示された。

[0181] （カテーテル通過試験）

ＣＶカテーテルキット（日本シャーウッド）を用いた。１８Ｇ注射針をカテーテル先端に接続した。５ｍＬシリンジで細胞懸濁液を吸入した。カテーテルにシリンジをセットし、細胞懸濁液を押し出した。この操作を規定回数繰り返した後に、細胞生存率を測定し、また顕微鏡下で観察した。顕微鏡観察の前に、５ｍＬのＰＢＳでカテーテルを洗浄した。

[0182] 結果を表５に示す。

[0183]

[表5]

カテーテル通過回数	0	5	１０
細胞数（×１０^5）	３．５	３．５	３．５
生存率（%）	８５．７	８５．７	８５．７

[0184] 少なくとも１０回までは通過回数に関係なく、細胞生存率は不変であった。カテーテルの内壁にごく僅かのＭＳＣｓとＥＴ－Ｋ液の残存が観察されたが、カテーテル通過後の細胞数が不変であり、ＰＢＳ洗浄後には接着細胞は確認されなかった。従って、トレハロースにより、カテーテル内壁への細胞の接着を回避できる可能性が示された。

[0185] [実施例９]

ブタ間葉系幹細胞を１０ｃｍディッシュ上で培養した。トリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５％ トリプシン，１ｍＭ ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞を、以下の組成液に懸濁し、室温（約２５℃）にて３６０分間静置後、細胞の生存率を測定し、細胞の凝集を観察した。

ＮＳ：生理食塩水

ＭＳＣＭ：１０％ＦＢＳを含有するαＭＥＭ

ＥＴ－Ｋ：ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ（大塚製薬工場）

Ｓａｖｉｏｓｏｌ：サヴィオゾール（大塚製薬工場）

Ｄｅｘｔｒａｎ：低分子デキストランＬ注（大塚製薬工場）

[0186] 尚、サヴィオゾールは重量平均分子量が４００００のデキストラン（デキストラン４０）を３０ｍｇ／ｍｌの濃度で含有する、乳酸リンゲル液である。低分子デキストランＬ注は、重量平均分子量が４００００のデキストラン（デキストラン４０）を１００ｍｇ／ｍｌの濃度で含有する、乳酸リンゲル液である。

[0187] （細胞生存率）

試験開始３０分後及び３６０分後の細胞生存率を表６に示す。

[0188] [表6]

	30分	360分
NS	8.3%	0.0%
MSCM	87.5%	73.3%
ET-K	83.3%	70.6%
Saviosol	93.3%	62.5%
Dextran	85.7%	73.3%

[0189] 表６に示される通り、いずれの組成物を使用した場合であっても、細胞の生存率は生理食塩水を使用した場合と比較して顕著に高かった。

[0190] （細胞の凝集）

試験開始から３６０分後に顕微鏡下で細胞凝集の有無を観察した。生理食塩水又はＭＳＣＭ中で保存した場合には、大きな細胞凝集塊の形成が観察されたが、ＥＴ－Ｋ、Ｓａｖｉｏｓｏｌ又はＤｅｘｔｒａｎにおいては、細胞凝集塊の形成が抑制され、細胞の分散状態が維持されていた。

[0191] [実施例１０]

（１）ラット組織の調製

ラット皮下脂肪をそけい部より採取後、視認可能な血管や筋など脂肪組織と異なる組織をマイクロ鋏で除去し、その後、細切とＨＢＳＳ（ハンクス溶液）での洗浄を数回繰り返した。視覚的に、血球（または血塊）の除去および筋などの膜状浮遊物質の除去が確認出来るまで洗浄作業を続けた。得られたラット皮下脂肪をはさみにより細切した。

細切された組織を同量のＨＢＳＳと混ぜた。混合物を緩やかに振とう後、静置することにより２層に分離させた。上層のみを回収した。回収された上層に０．２％コラゲナーゼ（Ｔｙｐｅ Ｉ）／ＨＢＳＳを加え、３７℃下で緩

やかに脂肪が完全に液状になるまで振とうした（最大９０分間）。反応液に１０％牛胎児血清（ＦＢＳ）を含むαＭＥＭをコラゲナーゼ反応液量に対して等量以上加えて混合後、混合物を遠心分離することにより３層に分離させた（下から有核細胞・溶液・脂肪）。下層のみを回収し、ＨＢＳＳにて再懸濁した。この操作を３回繰り返し、最後に１０％ＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁した細胞懸濁液を培養皿へ移し、培養した。ＭＳＣは培養皿の底面へ接着した。

[0192] （２）実験に用いる細胞（Ｒａｔ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ６）の調製

（１）の操作で、培養皿へ接着したＭＳＣは増殖を続け、５～７日後に培養皿底面はぎっしり細胞で埋まった。コンフルエントに到達するとＭＳＣは増殖停止または細胞死が誘導されるので、コンフルエント到達前に、ＭＳＣを培養皿からはがし、新しい培養皿へ低密度で播種した。培養皿の底面に接着しているＭＳＣをＰＢＳで３回洗浄後、トリプシンーＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）を加え、ＭＳＣを培養皿からはがした後、細胞が低密度になるような量の１０％のＦＢＳを含むαＭＥＭで懸濁し、新しい培養皿へ移した。この操作を６回繰り返した（６回継代＝Ｐ６）。

[0193] （３）各液による細胞の懸濁

（２）で得たＲａｔ　ＡＴ－ＭＳＣ　Ｐ６を実験に用いた。

１０ｃｍ　ディッシュあたり、５ｍｌのＰＢＳ（－）で３回洗浄後、１ｍｌのトリプシンーＥＤＴＡ（０．２５％　トリプシン，１ｍＭ　ＥＤＴＡ・４Ｎａ）で２０秒処理することにより細胞をはがし、シングルセルの状態にした。得られた細胞を１５ｍｌ容量のファルコンチューブへ移し、遠心することにより細胞を回収し、ＰＢＳ（－）にて２回洗浄後、以下の各溶液にて再度、馴化洗浄を１回行った。

Ｓａｌｉｎｅ：生理食塩水

Ｍｅｄｉｕｍ：１０％ＦＢＳを含有するαＭＥＭ

ＥＴ－Ｋ：ＥＴ－Ｋｙｏｔｏ（大塚製薬工場）

Ｓａｖｉｏｓｏｌ：サヴィオゾール（大塚製薬工場）

ＨＥＳ７０Ｋ：６（ｗ／ｖ）％　ヒドロキシエチルデンプン（重量平均分子量７００００）＋０．９（ｗ／ｖ）％　ＮａＣｌ（ドイツ・ブラウン社）

ＨＥＳ２００Ｋ：６（ｗ／ｖ）％　ヒドロキシエチルデンプン（重量平均分子量２００００）＋０．９（ｗ／ｖ）％　ＮａＣｌ（ドイツ・フレゼニウス・カビー社）

ＥＴ－Ｋ＋Ｓａｖｉｏｓｏｌ：ＥＴ－ＫとＳａｖｉｏｓｏｌの混合液（体積比で１：１）

その後、各溶液を用いて２．５ｘ１０^{5}　ｃｅｌｌｓ／５０μＬとなるように懸濁した。

懸濁液を各温度（０、２５、３７℃）にて静置し、３０～３６０分後に２０μＬピペットマンにて数回ピペッティングし、１０μＬをディッシュに移した。

ディッシュ上の懸濁液の最下面に実体顕微鏡の焦点を合わせ、観察を行った。

顕微鏡下にて隣接し合う細胞塊を形成しているものを、細胞凝集塊とした。細胞凝集塊は、ｄｉｓｈを顕微鏡のステージ上で揺らし、明らかに塊として動いている事を確認した。

[0194]（細胞生存率）

試験開始３０～３６０分後の細胞生存率を図３及び４に示す。これらの図に示されるように、いずれの組成物を使用した場合であっても、細胞の生存率は生理食塩水を使用した場合と比較して顕著に高かった。細胞の生存率低下を抑制する効果はＨＥＳ２００ＫよりもＨＥＳ７０Ｋの方が高かった。

[0195]（細胞の凝集）

試験開始から３６０分後に顕微鏡下で細胞の凝集性を観察した。結果を表７に示す。

[0196]

[表7]

	凝集性
生理食塩水	+
培地	+++
ETK	−
Saviosol	−
HES70K	−
HES200K	+
ETK+Saviosol	−

[0197] 培地中で保存した場合と比較して、その他の条件においては、細胞凝集塊の形成が抑制された。細胞凝集を抑制する効果はＨＥＳ２００ＫよりもＨＥＳ７０Ｋの方が高かった。ＥＴ－Ｋ、Ｓａｖｉｏｓｏｌ、ＨＥＳ７０Ｋ、及びＥＴ－Ｋ＋Ｓａｖｉｏｓｏｌにおいては、細胞凝集の形成が認められず、細胞の分散がよく維持されていた。

[0198] ［実施例１１］

ヒトから分離精製された骨髄由来間葉系幹細胞（継代回数８回目）と脂肪組織由来間葉系幹細胞（継代回数８回目）の各細胞を、Ｎｕｎｃ社製の細胞皿の底面を約９０％覆うまで培養した。ＴａＫａＲａ社製のＰＢＳ（－）で培養皿を３回洗浄し、ＧＩＢＣＯ社製のトリプシン溶液にて各間葉系幹細胞を培養皿より剥離し、アシスト社製の１５ｍＬ遠心チューブに細胞を回収した。１０００ｒｐｍ、５分間の遠心操作により、遠心チューブの底に細胞塊を形成させ、アスピレーターにて上澄み液を破棄した。指で弾いて細胞塊を解し、ＴａＫａＲａ社製のＰＢＳ（－）を加え、数回ピペット操作にて更に細胞を解し、１０００ｒｐｍ、５分間遠心した。遠心チューブの底に細胞塊が形成されたことを確認し、アスピレーターにて上澄み液を破棄した。このＰＢＳ（－）による洗浄操作を後２回繰り返した。血球計算盤で細胞数を測定し、アシスト社製の１．５ｍＬチューブに１．０ｘ１０^{6}個／チューブの条

件で細胞を移した。１０００ｒｐｍ、５分間の遠心操作により、チューブの底に細胞塊を形成させ、上澄み液をマイクロピペットにて除去した。各チューブに

（１）生理食塩水（大塚製薬工場社製）　１ｍＬ

（２）サヴィオゾール（大塚製薬工場社製）　５００μＬとデキストランＬ注（大塚製薬工場社製）　５００μＬの混合液（デキストラン４０　６．５（ｗ／ｖ）％）

（３）サヴィオゾール（大塚製薬工場社製）　２５０μＬとデキストランＬ注（大塚製薬工場社製）　７５０μＬの混合液（デキストラン４０　８．２５（ｗ／ｖ）％）

（４）デキストランＬ注（大塚製薬工場社製）（デキストラン４０　１０（ｗ／ｖ）％）　１ｍＬ

の計４種類の液をそれぞれ加え、ボルテックスミキサーにて数秒間、混合した。テルモ製の３０Ｇ注射針と１ｍＬのシリンジを用いて、細胞のシングル化操作を行い、室温（約２５℃）にてチューブ立てを用いて静置した。静置３０分後と６０分後に、各チューブより、１０μＬの液を取り、ＧＩＢＣＯ製のトリパンブルー液と等量混合した液を血球計算盤にて細胞数と生存率を測定した。尚、評価した液は、各チューブの液面中心（上）、液中間中心（中）及びチューブの底中心（下）の３箇所から静かに分取した。上、中、下の各細胞数の合計値を１００％とし、それぞれの細胞数を分子に、合計細胞数を分母として割合で細胞の分布状況を算出した。また、細胞全体の生存率を別途算出した。

[0199]　結果を図５及び６に示す。デキストランを含む緩衝液（６．５～１０（ｗ／ｖ）％）中で間葉系幹細胞を保存した場合には、間葉系幹細胞の由来に関わらず、チューブの上、中、下における細胞数に大きな差は認められず、細胞の均一な分散が維持されていることが示された。また、この場合、細胞の生存率は１００％で不変であった。一方、生理食塩水を用いた場合には、細胞はチューブの下に沈み、６０分間保存後の細胞の生存率は８０％にまで低

下した。

産業上の利用可能性

[0200] 本発明を用いれば、幹細胞の移植時に、懸濁液中の幹細胞同士の凝集を抑制することができる。従って、幹細胞の凝集物が、カニューレ中に詰まったり、肺静脈等の細い血管中に塞栓を形成してしまうリスクが低減する。

更に、本発明を用いれば、懸濁液中の幹細胞の生存率の低下を抑制することができる。従って、より状態のよい幹細胞により治療を実施することができるので、治療効果の向上が期待できる。

従って、本発明は幹細胞を利用した移植医療分野で有用である。

本出願は日本で出願された特願２０１０－２５１２７３（出願日：２０１０年１１月９日）及び特願２０１０－２９３９０８（出願日：２０１０年１２月２８日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] 哺乳動物幹細胞及びトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項2] トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む、請求項１記載の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項3] 幹細胞が付着性幹細胞である、請求項１記載の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項4] 付着性幹細胞が、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、請求項３記載の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項5] 哺乳動物幹細胞が単一細胞の状態にある哺乳動物幹細胞を含む、請求項１記載の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項6] 多糖類がトレハロースであり、且つトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内である、請求項１記載の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項7] 多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内である、請求項１記載の哺乳動物幹細胞懸濁液。

[請求項8] 哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞懸濁液の製造方法。

[請求項9] 生理的水溶液がトレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む、請求項８記載の製造方法。

[請求項10] 請求項１～７のいずれかの哺乳動物幹細胞懸濁液を含む、哺乳動物幹細胞懸濁液製剤。

[請求項11] トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからな

る群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[請求項12] 幹細胞が付着性幹細胞である、請求項１１記載の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[請求項13] 付着性幹細胞が間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、請求項１２記載の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[請求項14] 多糖類がトレハロースであり、且つ哺乳動物幹細胞懸濁液中のトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、請求項１１記載の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[請求項15] 多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、請求項１１記載の哺乳動物幹細胞凝集抑制剤。

[請求項16] 哺乳動物幹細胞をトレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[請求項17] 幹細胞が付着性幹細胞である、請求項１６記載の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[請求項18] 付着性幹細胞が間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、請求項１７記載の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[請求項19] 哺乳動物幹細胞が単一細胞の状態にある哺乳動物幹細胞を含む、請求項１６記載の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[請求項20] 多糖類がトレハロースであり、且つトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内である、請求項１６記載の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[請求項21] 多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内である、請求項１６記載の哺乳動物幹細胞の凝集の抑制方法。

[請求項22] トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む、哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[請求項23] トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む、請求項２２記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[請求項24] 幹細胞が付着性幹細胞である、請求項２２記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[請求項25] 付着性幹細胞が、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、請求項２４記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[請求項26] 多糖類がトレハロースであり、且つ哺乳動物幹細胞懸濁液中のトレハロースの濃度が４．５３～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、請求項２２記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[請求項27] 多糖類がデキストランであり、且つ哺乳動物幹細胞懸濁液中のデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内となるように使用される、請求項２２記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制剤。

[請求項28] 哺乳動物幹細胞を、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン及びデキストランからなる群から選択される少なくとも１つの多糖類を含む生理的水溶液に懸濁することを含む、哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[請求項29] 該生理的水溶液が、トレハロース及びヒドロキシエチルデンプン、或いはトレハロース及びデキストランを含む組み合わせを含む、請求項２８記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[請求項30] 幹細胞が付着性幹細胞である、請求項２８記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

[請求項31] 付着性幹細胞が、間葉系幹細胞又は多能性幹細胞である、請求項３０記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

［請求項32］ 哺乳動物幹細胞が単一細胞の状態にある、請求項２８記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

［請求項33］ 多糖類がトレハロースであり、且つトレハロースの濃度が１５．１～３６２．４ｍｇ／ｍｌの範囲内である、請求項２８記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。

［請求項34］ 多糖類がデキストランであり、且つデキストランの濃度が３０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲内である、請求項２８記載の哺乳動物幹細胞の生存率低下の抑制方法。