

## 明 細 書

発明の名称：

リンパ球の製造及び凍結保存方法、そのための洗浄液及び凍結保存液、並びに凍結保存したリンパ球からの移植用リンパ球の調製

### 技術分野

[0001] 本発明は、医療分野において有用なT細胞やナチュラルキラー細胞（以下、「NK細胞」と略記する場合がある）等のリンパ球の洗浄及び凍結保存方法、そのための洗浄液及び凍結保存液、当該方法又は溶液を用いて洗浄され、凍結保存されるリンパ球含有組成物、該リンパ球含有組成物のための移植用希釈液、該リンパ球含有組成物と該移植用希釈液を含む移植用リンパ球の調製用キット、それを用いた移植用リンパ球の調製方法、並びに当該方法により得られる移植用リンパ球製剤等に関する。当該洗浄液及び移植用希釈液は炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有し、当該凍結保存液は、生理的水溶液、好ましくは炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する。

### 背景技術

[0002] がん免疫に関与する細胞としては、T細胞、NK細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞などのリンパ球が挙げられる。近年、人工多能性幹細胞（iPS細胞）とその分化誘導法の開発、細胞の遺伝子改変法等の技術発展により、iPS細胞等の多能性幹細胞を遺伝子改変し目的の免疫細胞へ分化誘導することで、高い機能を付与された免疫細胞を製造することができるようになった。遺伝子改変された免疫細胞を含む細胞医薬品として、CD19を標的としたCAR-T細胞によるもの（Kymriah及びYescarta）が既に承認されている。一方、NK細胞はT細胞とは異なる独自の性質を有していることから、NK細胞を用いた免疫細胞療法にも期待が高まっており、実際に改変NK細胞を用いた細胞医薬品を対象とする様々な臨床試験が実施されている。

[0003] 免疫細胞を細胞医薬品として利用するには、大量の免疫細胞を調製する必要がある。多能性幹細胞からT細胞やNK細胞等のリンパ球を分化誘導する方法

やリンパ球を拡大培養する方法についても、数多くの報告がなされている。例えば、本出願人は、三次元浮遊培養により好適なサイズの多能性幹細胞スフェアを形成させ、培地交換を灌流により行う（連続的に三次元灌流培養する）ことで、該スフェアから造血前駆細胞を分化誘導し、得られた造血前駆細胞を三次元浮遊培養してNK細胞に分化させることにより、凍結・解凍後も高い活性が維持されるNK細胞を効率よく大量に製造し得る技術を開発し、特許出願している（特許文献10）。

[0004] 移植用細胞の培養はGMPレベルで実施する必要があるので、免疫細胞を細胞医薬品として利用する場合、細胞調製施設（CPC）で製造し凍結保存した細胞を病院に輸送し、病院内で解凍して移植用媒体に懸濁・希釈した後に、手術室に持ち込み移植を実施するのが一般的である。凍結保存液としては、細胞培養用の培地に凍害保護剤を添加したものが用いられていたが、数十種類にも及ぶ培地成分の中にはレシピエントに対して有害なものが含まれているおそれがあり、解凍後、移植に先立って細胞を洗浄することが必要になり、時間のロスや細胞の回収率及び生存率の低下といった問題があった。

[0005] それらの課題に対し、凍結前に細胞を洗浄して有害な成分を除去し、凍結・解凍後も高い細胞の回収率及び生存率を維持し得る洗浄液及び凍結保存液の開発が進められてきた。洗浄液及び凍結保存液として、生理食塩水やリンゲル液等の生理的水溶液をベースとする溶液を用いた報告がある。例えば、ヒト間葉系幹細胞の洗浄及び凍結保存工程で、ヒト血清アルブミン（HuSA）及び重炭酸リンゲル液を含む溶液を用いることにより、「各工程」における細胞の生存率の低下を抑制し得ることが報告されている（特許文献1）。また、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の高濃度で有害な凍結保護剤の使用の回避や、NK細胞等の凍結保存後の保存安定性が低い細胞への適用を目的として、グルコース及び／又はHuSAと重炭酸塩とを含む溶液を、細胞を非凍結状態（冷蔵ないし常温）で長時間保存するための保存液として使用することが報告されている（特許文献2、3）。しかしながら、リンパ球の凍結保存前の洗浄液として重炭酸塩溶液を用いた報告例はなく、また、洗浄後ではなく

、凍結解凍後の細胞の回収率や生存率への洗浄液の影響を調べた例は皆無であった。

[0006] リンパ球用の凍結保存液としては、DMSOの他、デキストラン、グルコース、HuSA、重炭酸塩及び生理的水溶液（例、生理食塩水、リンゲル液）のうちの一部を含有する溶液を用いた報告例がある（特許文献1、5－9）。しかしながら、前記のすべての成分を含有する又は該成分からなる凍結保存液は開示されていない。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2009/057537号  
特許文献2：特開2008-104407号公報  
特許文献3：国際公開第2013/115322号  
特許文献4：特開2018-138565号公報  
特許文献5：国際公開第2011/021618号  
特許文献6：特開2000-201672号公報  
特許文献7：特開2018-183161号公報  
特許文献8：国際公開第2018/084228号  
特許文献9：中国特許出願公開第112868642号公報  
特許文献10：国際公開第2023/145922号

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 上記のように、移植用リンパ球の製造のために、凍結・解凍後も高い細胞の回収率及び生存率を維持し得る洗浄液及び凍結保存液が鋭意開発されてきたが、必ずしも満足のものとはいえなかった。特に移植用リンパ球の洗浄工程に着目し、凍結・解凍後の高い細胞回収率および細胞生存率を維持・向上させることは想定されていなかった。従って、本発明の目的は、凍結・解凍後も高い細胞の回収率及び生存率を維持し、かつ高い生理活性を維持し

た移植用リンパ球を製造し得る、リンパ球の洗浄液及び凍結保存液を提供することである。また別の本発明の目的は、当該洗浄液及び凍結保存液を用いて得られた凍結リンパ球含有組成物を解凍後、移植までの間、室温保存しても高い細胞生存率を維持し得る移植用希釈液を提供し、該リンパ球含有組成物と該移植用希釈液とを含む移植用リンパ球の調製用キットを用いて、移植により適したリンパ球製剤を提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意検討を行った結果、維持増幅培養したリンパ球を、重炭酸リンゲル液等の炭酸水素イオンを含有する生理的水溶液に懸濁・静置（洗浄工程を模倣）した後、従来公知の凍結保存液にて凍結保存すると、驚くべきことに、凍結保存前に対する解凍後及び回復培養後の細胞回収率及び細胞生存率が、炭酸水素イオンを含有しない生理的水溶液に懸濁・静置した場合に比べて顕著に増大することを見出した。
- [0010] 次に、本発明者らは、維持増幅培養したリンパ球を、デキストラン、グルコース、DMSO、HuSA及び生理的水溶液（例、生理食塩水、重炭酸リンゲル液等）を種々の濃度で含有する凍結保存液に懸濁して凍結保存したところ、前記各成分をそれぞれ所定の濃度範囲で含有する凍結保存液は、汎用されている凍結保存液に比べて、解凍後の生細胞回収率を顕著に向上させた。また、生理的水溶液として重炭酸リンゲル液を含有する当該凍結保存液に懸濁後、凍結保存前に室温で0-4時間静置した場合、室温静置による経時的な解凍・回復培養後の生細胞回収率の低下が顕著に抑制された。
- [0011] さらに、本発明者らは、移植用媒体（希釈液）としての生理的水溶液の効果を検討すべく、凍結NK細胞を解凍後、細胞懸濁液を種々の生理的水溶液で希釈して室温で0-4時間静置したところ、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を用いた場合、当該イオンを含有しない生理的水溶液に比べて、生細胞の回収率が顕著に向上することを見出した。
- 本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち本発明は以下の通りである。

[項 1]

リンパ球を炭酸水素イオン含有生理的水溶液で洗浄することを含む、リンパ球の洗浄方法。

[項 2]

リンパ球がT細胞又はNK細胞である、項 1 に記載の方法。

[項 3]

炭酸水素イオン含有生理的水溶液が重炭酸リンゲル液である、項 1 又は 2 に記載の方法。

[項 4]

項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法により処理されたリンパ球を、生理的水溶液を含有する凍結保存液に懸濁し凍結することを含む、リンパ球の凍結保存方法。

[項 5]

生理的水溶液が炭酸水素イオン含有生理的水溶液である、項 4 に記載の方法。

[項 6]

炭酸水素イオン含有生理的水溶液が重炭酸リンゲル液である、項 5 に記載の方法。

[項 7]

炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有してなる、リンパ球用洗浄液。

[項 8]

炭酸水素イオン含有生理的水溶液、デキストラン、グルコース、DMSO及びヒト血清アルブミンを含有してなる、リンパ球用凍結保存液。

[項 9]

炭酸水素イオン含有生理的水溶液で処理されたリンパ球と、項 8 に記載の凍結保存液とを含有してなる、リンパ球含有組成物。

[項 10]

項 9 に記載のリンパ球含有組成物と、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液とを含む、移植用リンパ球の調製用キット。

[項 1 1]

項 9 に記載のリンパ球含有組成物のための移植用希釈液であって、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有してなる、移植用希釈液。

[項 1 2]

凍結保存後解凍した項 9 に記載のリンパ球含有組成物を、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液で希釈することを含む、移植用リンパ球の調製方法。

[項 1 3]

項 1 2 に記載の方法により得られる、移植用リンパ球製剤。

## 発明の効果

- [0013] 本発明の洗浄液及び凍結保存液によれば、凍結・解凍後も高い細胞の回収率及び生存率を維持し、かつ高い生理活性を維持した移植用リンパ球（例、NK細胞、T細胞等）を製造することができる。また、本発明のリンパ球含有組成物と移植用希釈液によれば、解凍後、移植までの間、室温保存しても高い細胞生存率を維持することができ、移植により適したリンパ球製剤を提供することができる。

## 発明を実施するための形態

- [0014] 「1」 本発明の洗浄方法及び本発明の洗浄液

本発明は、リンパ球を炭酸水素イオン含有生理的水溶液で洗浄することを含む、リンパ球の洗浄方法（以下、「本発明の洗浄方法」という場合がある。）を提供する。

- [0015] 本明細書において「洗浄」とは、洗浄前の細胞の周辺環境（例、培養液）内に存在する物質（例、培地成分）を除去するために、該細胞を液体（即ち、洗浄液）に懸濁する操作を意味する。細胞の洗浄は、例えば、洗浄前の細胞の分散媒の除去（例、遠心分離、ろ過等）と回収された細胞の洗浄液への懸濁（必要に応じて当該操作を繰り返す）により行うこともできるし、ある

いは、例えば自動濃縮洗浄装置を用いて洗浄前の分散媒を洗浄液と置換することにより行うこともでき、その様式は特に制限されない。

[0016] (A) リンパ球

本発明の洗浄方法に供されるリンパ球は特に制限されず、例えば、NK細胞、T細胞（例、細胞傷害性T細胞（CTL）、ヘルパーT細胞、制御性T細胞等）、B細胞などが挙げられるが、好ましくはNK細胞及びT細胞、より好ましくはNK細胞である。リンパ球は、ヒト又は他の哺乳動物（好ましくは、ヒト）から採取した血液（例、末梢血、臍帯血等）やそこから分離した単核細胞から、フローサイトメトリー等の常法を用いて、目的のリンパ球で特異的に発現する表面抗原マーカー（例、T細胞の場合、CD3、CD4、CD8等、NK細胞の場合、CD56等）の発現を指標にして単離することができる。

[0017] 好ましい実施態様においては、多能性細胞を含むリンパ球の前駆細胞から各種リンパ球を分化誘導することができる。そのようなリンパ球の前駆細胞としては、例えば、iPS細胞、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、胚性腫瘍細胞（EC細胞）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）、造血幹細胞、自己複製能を失った多能性前駆細胞（multipotent progenitor：MPP）、ミエロリンフォイド共通前駆細胞（MLP）、ミエロイド系前駆細胞（MP）、顆粒球単核前駆細胞（GMP）、マクロファージ樹状細胞前駆細胞（MDP）、樹状細胞前駆細胞（DCP）などが挙げられる。好ましくは、ES細胞やiPS細胞等の多能性幹細胞が挙げられる。

[0018] 前記の前駆細胞をリンパ球へ分化誘導する方法としては、種々の公知の分化誘導方法を適宜選択して用いることができる。例えば、ヒト多能性幹細胞からT細胞への公知の分化誘導方法としては、例えば、Timmermans, F. et al., J. Immunol., 2009, 182, 68879-68888に記載の方法が挙げられる。また、例えば、Nishimura, T. et al. Cell Stem Cell, 2013, 12, 114-126に記載の方法により、ヒト末梢血Tリンパ球より樹立したヒトiPS細胞をT細胞に分化誘導することができる。また、ヒト多能性幹細胞からNK細胞への公知の分化誘導方法としては、例えば、WO 2020/086889、Biochem Biophys Res Commun.

515(1): 1-8 (2019)、Methods Mol Biol. 2048: 107-119 (2019) に記載の方法が挙げられる。

[0019] PBMC等のT細胞含有試料やリンパ球前駆細胞から分化誘導したT細胞から、常法によりT細胞を活性化・拡大増殖させることができる。例えば、T細胞含有試料に、T細胞の表面分子と相互作用してT細胞の活性化及び／又は増殖を促進する分子を培地に添加して培養することができる。当該分子としては、TCRと共役してTCRを介したシグナル伝達を担うCD3や、T細胞活性化の共刺激因子として知られる表面分子CD28、ICOS、CD137、OX40、CD27、GITR、BAFFR、TACI、BMCA、CD40L等に特異的に結合して、活性化／増殖シグナルや共シグナルを、T細胞内に伝達する機能を有する分子が挙げられる。好ましくは、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体が挙げられる。これらの分子は単独で用いてもよいし、担体（例：Dynabeads（登録商標）（ThermoFisher Scientific））に結合させた複合体（例：TransAct（Milteny Biotech）、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28（ThermoFisher Scientific））で用いてもよい。抗CD3抗体及び／又は抗CD28抗体を用いてT細胞に増殖刺激を施す際には、IL-2、IL-7、IL-15等のサイトカインを更に培地に加えてもよい。

[0020] PBMC等のT細胞含有試料やリンパ球前駆細胞から分化誘導したNK細胞から、常法によりNK細胞を活性化・拡大増殖させることができる。当該方法として、例えば、WO 2020/086889、Biochem Biophys Res Commun. 515(1): 1-8 (2019)、Methods Mol Biol. 2048: 107-119 (2019) に記載の方法が挙げられるが、それらに限定されない。

[0021] 前述のとおり、本出願人は、連続的に三次元灌流培養することで、多能性幹細胞スフェアから造血前駆細胞を分化誘導し、得られた造血前駆細胞を三次元浮遊培養してNK細胞に分化させることにより、凍結・解凍後も高い活性が維持されるNK細胞を効率よく大量に製造し得る方法を開発した（特願2022-013646）。より具体的には、当該方法は、

（１）第一の培地中で、平均粒径200  $\mu$ m以上の多能性幹細胞スフェアを形成する工程；

(2) 工程(1)で形成した多能性幹細胞スフェアを、第二の培地を用いた三次元培養により造血前駆細胞を含む細胞集団に誘導する工程；及び

(3) 工程(2)で得られた造血前駆細胞を含む細胞集団を、第三の培地を用いた三次元培養によりNK細胞を含む細胞集団に誘導する工程；

を含み、工程(1)ないし(3)を三次元灌流培養法で行うことを特徴とする。

[0022] 三次元浮遊培養法は細胞培養法のひとつであり、浮遊細胞、スフェア（スフェロイド）、若しくは細胞を接着させた三次元培養用の担体を攪拌翼若しくは振盪器を用いて三次元的に展開させながら培養することを特徴とする。また、灌流培養法は連続培養法の一つであり、培養容器内の培養液に一定量の新しい培地を供給しながら同時に一定量の培地を抜き取ることで、連続的に培地交換の目的である新しい栄養成分の供給と老廃物の除去を達成することが可能である。当該方法において、灌流培養は連続的に行うことがこのましい。「連続的に灌流培養する」とは、各工程間において膜交換を行うだけで培地交換時に通常行われる洗浄工程を挟むことなく、前工程の培地を抜き取りながら次工程の培地を供給することをいう。

[0023] 灌流培養の際に使用する分離膜は、目的の細胞集団を培養系外に逃さないような一定の細孔径、及び特性（例えば、疎水性度等）を有するものであることが望ましいが、適切な細孔径として、工程(1)について細孔径15～75  $\mu\text{m}$ であり、工程(2)について細孔径45～225  $\mu\text{m}$ であり、工程(3)について細孔径0.2～10  $\mu\text{m}$ が挙げられる。

[0024] 工程(1)における第一の培地は、多能性幹細胞の維持培養に用いられる培養液であれば特に限定されないが、例えばフィーダーフリー培養可能な培地が用いられる。好ましくは、フィーダーフリー培養可能な培地にROCK阻害剤を含む培地が挙げられる。

工程(2)における第二の培地としては、多能性幹細胞を造血前駆細胞に誘導することができる培地であれば特に限定されないが、例えば、血管内皮増殖因子（VEGF）、骨形成タンパク質4（BMP4）及びグリコーゲン合成酵素3

$\beta$  (GSK3 $\beta$ ) 阻害剤を含む培地、幹細胞因子 (SCF) 及びトランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) /Smad阻害剤を含む培地、SCF及びFlt3リガンド (Flt3L) を含む培地等が挙げられる。

工程 (3) における第三の培地としては、造血前駆細胞をNK細胞に誘導することができる培地であれば特に限定されないが、例えばIL-15およびSCFを含む培地が挙げられる。

[0025] 工程 (1) のスフェア平均粒子径は、通常200  $\mu\text{m}$ 以上、具体的には200～600  $\mu\text{m}$ の範囲で適宜調整される。スフェア化に要する培養期間としては、例えば細胞播種から2～10日程度が好ましく、4～7日程度がより好ましい。

工程 (2) における培養期間は、通常5～20日であり、好ましくは10～18日程度である。

工程 (3) における培養期間は、通常20～60日であり、好ましくは25～40日程度である。

[0026] 工程 (3) の後に、工程 (4) として得られたNK細胞の増幅培養工程、あるいはNK細胞の成熟工程をさらに実施することができる。増幅培養工程、あるいは成熟工程は、公知の方法を適宜適用することができる。

[0027] 尚、上記方法において、工程 (3) の代わりに、自体公知の、造血幹細胞からT細胞に分化誘導する方法を実施することにより、多能性幹細胞からT細胞を誘導することもできる。

[0028] (B) 炭酸水素イオン含有生理的水溶液

本明細書において「生理的水溶液」とは、体液（例えば血漿）や細胞液の浸透圧とほぼ同じになるように、ナトリウムやカリウムなどによって塩や糖濃度等を調整した等張液を意味し、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、トリス緩衝化生理食塩水 (TBS)、HEPES緩衝化生理食塩水、リンゲル液、ハンクス平衡塩溶液 (HBSS)、5% グルコース水溶液などの等張液を挙げることができる。本明細書において「等張」とは、浸透圧が250～380 mOsm/Lの範囲内であることを意味する。

本発明の洗浄方法において用いられる炭酸水素イオン含有生理的水溶液 (

以下、「本発明の洗浄液」という場合がある。)としては、炭酸水素イオンと種々の陽イオンとの塩を含有する任意の生理的水溶液を挙げることができる。そのような炭酸水素塩としては、例えば、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素アンモニウム、炭酸水素カルシウム等が挙げられる。好ましくは、炭酸水素イオン含有生理的水溶液として、重炭酸リンゲル液、H BSS等を挙げることができる。より好ましくは、重炭酸リンゲル液である。

[0029] 本明細書における「重炭酸リンゲル液」は、電解質として、炭酸水素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン及び塩素イオンを含有し、炭酸水素イオン濃度が22～31 mEq/L、ナトリウムイオン濃度が120～150 mEq/Lである生理的水溶液である。重炭酸リンゲル液のpHは6.8～7.8であり得る。生理食塩水に対する浸透圧比は0.9～1.1であり得るが、それらに限定されない。重炭酸リンゲル液は、電解質として、マグネシウムイオン及び／又はクエン酸イオンをさらに含有してもよい。重炭酸リンゲル液がマグネシウムイオン及びクエン酸イオンを含有する場合、各電解質の濃度は、例えば以下のとおりであり得るが、それらに限定されない。

|           |               |
|-----------|---------------|
| ナトリウムイオン  | 120～150 mEq/L |
| カリウムイオン   | 3.6～4.4 mEq/L |
| カルシウムイオン  | 2.7～3.3 mEq/L |
| マグネシウムイオン | 0.9～2.2 mEq/L |
| 塩素イオン     | 100～125 mEq/L |
| 炭酸水素イオン   | 22～ 31 mEq/L  |
| クエン酸イオン   | 3.6～5.5 mEq/L |

そのような重炭酸リンゲル液の具体例として、市販のピカネイト（登録商標；株式会社大塚製薬工場）及びピカーボン（登録商標；エイワイファーマ株式会社）を挙げることができる。それらにおける各電解質の濃度は以下のとおりである。また、これらの重炭酸リンゲル液の各成分（塩）の組成（w/v %）は、表8に示すとおりである。

（ピカネイト（登録商標））

|           |           |
|-----------|-----------|
| ナトリウムイオン  | 130 mEq/L |
| カリウムイオン   | 4 mEq/L   |
| カルシウムイオン  | 3 mEq/L   |
| マグネシウムイオン | 2 mEq/L   |
| 塩素イオン     | 109 mEq/L |
| 炭酸水素イオン   | 28 mEq/L  |
| クエン酸イオン   | 4 mEq/L   |

(ピカーボン (登録商標) )

|           |           |
|-----------|-----------|
| ナトリウムイオン  | 135 mEq/L |
| カリウムイオン   | 4 mEq/L   |
| カルシウムイオン  | 3 mEq/L   |
| マグネシウムイオン | 1 mEq/L   |
| 塩素イオン     | 113 mEq/L |
| 炭酸水素イオン   | 25 mEq/L  |
| クエン酸イオン   | 5 mEq/L   |

[0030] HBSSとしては、電解質として、炭酸水素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオン及びリン酸イオンを含有し、表1に示される電解質組成のHBSS(-)、さらにカルシウムイオン及びマグネシウムイオンを含有し、表1に示される電解質組成のHBSS(+))を挙げることができる。より好ましくはHBSS(+))である。

[0031] 本発明の洗浄液は、上記の電解質以外の成分を含んでもよい。そのような成分として、例えば、リン酸イオン、乳酸イオン、酢酸イオン等の上記以外の電解質 (緩衝剤)、グルコース、ガラクトース、フルクトース、マンノース、マルトース、スクロース等の糖類、血清アルブミン (例、HuSA、BSA等)、血清グロブリン等の生体由来タンパク質などが挙げられる。

しかしながら、好ましい実施態様においては、本発明の洗浄液は、リン酸イオン、乳酸イオン、酢酸イオン等の緩衝剤、糖類 (例、グルコース等)、生体由来タンパク質 (例、HuSA等) を含有しない、炭酸水素イオン含有生理

的水溶液である。

[0032] (C) 洗浄方法

本発明の洗浄方法において、リンパ球を本発明の洗浄液で洗浄する方法は特に制限されず、例えば、洗浄前のリンパ球の分散媒（例、培養液）を遠心分離やろ過等により除去し、回収したリンパ球を本発明の洗浄液に懸濁する（必要に応じて当該操作を繰り返す）ことにより行うことができる。好ましい実施態様においては、例えば、中空糸膜モジュール等で構成される細胞ろ過器を回路内に含み、細胞懸濁液と洗浄液とを該回路内に送液できる自動濃縮洗浄装置を用い、プライミング（回路内を洗浄液で満たす）、濃縮（回路内に細胞懸濁液を送液し、中空糸膜内を循環させながら培地成分（例、低分子、タンパク質等）を膜外に除去する）、洗浄（回路内に洗浄液とを送液し、培地成分と置換する）、及び回収（培地成分が除去された細胞濃縮液を回収する）の一連の操作を閉鎖系にて行うことにより、細胞の損傷やコンタミネーションリスクを低減しつつ、分散状態で細胞の洗浄（培地成分の除去）が可能となる。そのような自動濃縮洗浄装置は市販されており、例えば、Kaneka細胞濃縮洗浄システム（株式会社カネカ製）等を用いることができる。

[0033] 当該洗浄工程は、約4℃乃至室温にて行うことができる。例えば、3 L容のバイオリアクターを用いて拡大培養を行ったリンパ球を、自動濃縮洗浄装置を用いて洗浄する場合、培養後の細胞回収から洗浄工程の完了まで約2時間を要すると想定されるが、本発明の洗浄方法によれば、リンパ球を本発明の洗浄液中に懸濁し、室温で4時間静置しても、凍結解凍後及び回復培養後の生細胞回収率及び細胞生存率の低下が、生理食塩水等の炭酸水素イオンを含有しない生理的水溶液に懸濁した場合に比べて顕著に抑制される。従って、本発明の洗浄液及び洗浄方法は、拡大培養後のリンパ球の洗浄工程（培地成分の除去工程）に用いるのにきわめて有用である。

[0034] 〔I I〕 本発明の凍結保存方法及び本発明の凍結保存液

本発明の洗浄方法により得られたリンパ球を、生理的水溶液を含有する凍結保存液に懸濁し凍結保存すると、STEM-CELLBANKER（登録商標）やCryoStor

CS10等の汎用される市販の凍結保存液にて凍結保存した場合に比べて、解凍後の生細胞回収率が顕著に向上する。従って、本発明はまた、上記本発明の洗浄方法により処理されたリンパ球を、生理的水溶液を含有する凍結保存液に懸濁し凍結することを含む、リンパ球の凍結保存方法（以下、「本発明の凍結保存方法」という場合がある。）を提供する。

[0035] 重炭酸リンゲル液（但し、グルコース等の糖類及び／又はHuSAを含む）を用いて培養後の細胞を洗浄することにより、洗浄工程による細胞の回収率及び生存率の低下を抑制することは知られていたが、炭酸水素イオン含有生理的水溶液（好ましくは、糖類もHuSAも含まない）を用いてリンパ球を洗浄することにより、その後同じ条件でリンパ球を凍結保存した場合でも、炭酸水素イオンを含有しない生理的水溶液を用いて洗浄した場合に比べて、解凍後及び回復培養後の細胞の回収率及び生存率が向上することは、本発明者らが初めて見出した驚くべき知見である。即ち、本発明の洗浄方法により得られたリンパ球は、従来の洗浄方法により得られたリンパ球に対して、新規かつ格別顕著な固有の特徴を有しているが、両者を構造又は物性により区別することは、不可能もしくはおよそ非実際的である。

[0036] 本発明の凍結保存方法に用いられる生理的水溶液は、本発明の洗浄方法により得られたリンパ球を、該生理的水溶液を含有する凍結保存液に懸濁し凍結保存した場合に、解凍後の生細胞の回収率を向上させるものである限り特に制限はなく、本発明の洗浄方法において例示されたような任意の生理的水溶液が挙げられるが、好ましくは、生理食塩水又は炭酸水素イオン含有生理的水溶液が挙げられ、生理的食塩水又は重炭酸リンゲル液がより好ましい。

[0037] 本発明の凍結保存方法に用いられる凍結保存液中の生理的水溶液の濃度は、例えば生理食塩水の場合、例えば25～50% (v/v)、好ましくは30～45% (v/v)、より好ましくは32～41% (v/v)であるが、それらに限定されない。また、生理的水溶液が重炭酸リンゲル液の場合、凍結保存液中のその濃度は、例えば35～75% (v/v)、好ましくは40～70% (v/v)、より好ましくは43～67% (v/v)であるが、それらに限定されない。

- [0038] 本発明の凍結保存方法に用いられる凍結保存液は、1以上の凍害保護剤を含有することが好ましい。凍害保護剤としては、例えば、デキストラン、DMSO、ハイドロキシエチルスターチ（HES）、エチレングリコール、グリセロール、トレハロース等が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくは、デキストラン及びDMSOを挙げることができる。
- [0039] デキストランは、D-グルコースからなり、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合を主鎖とする多糖( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>である。デキストランの分子量は細胞内に浸透しない程度であれば特に制限はないが、例えば、重量平均分子量（Mw）として、40,000（デキストラン40）乃至70,000（デキストラン70）が挙げられる。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自体公知の方法で製造することができ、また、市販品を用いてもよい。デキストランの市販品としては、例えば、デキストラン40（名糖産業社製）、デキストラン70（東京化成工業社製）等が挙げられる。
- [0040] あるいは、例えば、デキストラン硫酸、カルボキシル化デキストラン、ジエチルアミノエチル（DEAE）-デキストラン等の誘導体を用いることもできる。
- デキストラン又はその誘導体は、フリー体であっても塩の形態であってもよい。それらの塩としては、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、酢酸塩等無機酸との酸付加塩、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、リンゴ酸塩等の有機酸との酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の金属塩、アンモニウム塩、アルキルアンモニウム塩等の塩基性塩などが挙げられる。これらの塩は、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用いてもよい。
- [0041] 凍結保存液中に含まれるデキストランの濃度としては、例えば3～12%（w/v）、好ましくは3～11%（w/v）、より好ましくは3.5～10.5%（w/v）であるが、それらに限定されない。また、好ましい濃度範囲は用いる生理的水溶液の種類

に応じて変動し得る。

[0042] DMSOは、細胞への悪影響を避けるため、なるべく高純度のものを用いることが好ましい。凍結保存液中に含まれるDMSOの濃度としては、例えば3～15% (w/v)、好ましくは5～12% (w/v)、より好ましくは7.5～12% (w/v)であるが、それらに限定されない。また、好ましい濃度範囲は用いる生理的水溶液の種類に応じて変動し得る。

[0043] 本発明の凍結保存方法に用いられる凍結保存液は、1以上の糖類を含有することができる。糖類としては、例えば、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、プリコース、フルクトース、ソルボース、タガロース、フコース、フクロース、ラムノース等の6炭糖、リブロース、キシロース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース等の5炭糖等の単糖類、スクロース、マルトース等の二糖類、ラフィノース、スタキオース等の少糖類、デンプン、グリコーゲン等の多糖類が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくはグルコースである。

[0044] 凍結保存液中に含まれる糖類の濃度としては、例えば0.03～1.2% (w/v)、好ましくは0.04～0.8% (w/v)、より好ましくは0.05～0.7% (w/v)であるが、それらに限定されない。また、好ましい濃度範囲は用いる生理的水溶液の種類に応じて変動し得る。

[0045] 本発明の凍結保存方法に用いられる凍結保存液は、1以上のタンパク質を含有することができる。タンパク質としては、例えば、血清アルブミン（例、HuSA、ウシ血清アルブミン（BSA））、血清グロブリン等の血漿由来タンパク質が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくはHuSAである。血漿由来タンパク質は動物血漿から精製されたものでもよいし、組換え生産されたものであってもよい。

[0046] 凍結保存液中に含まれるタンパク質の濃度としては、例えば0.5～5% (w/v)、好ましくは1～4% (w/v)、より好ましくは1.2～3.5% (w/v)であるが、それらに限定されない。また、好ましい濃度範囲は用いる生理的水溶液の種類に

応じて変動し得る。

[0047] 好ましい一実施態様において、本発明の凍結保存方法に用いられる凍結保存液は、生理食塩水又は重炭酸リンゲル液から選ばれる生理的水溶液、デキストラン、DMSO、グルコース及びHuSAを含有する。

生理的水溶液が生理食塩水の場合、凍結保存液の組成は、

|        |                 |
|--------|-----------------|
| 生理食塩水  | 30～45% (v/v)    |
| デキストラン | 7～11% (w/v)     |
| グルコース  | 0.04～0.8% (w/v) |
| DMSO   | 5～12% (v/v)     |
| HuSA   | 1～ 4% (w/v) ;   |

好ましくは、

|        |                 |
|--------|-----------------|
| 生理食塩水  | 32～41% (v/v)    |
| デキストラン | 8～10% (w/v)     |
| グルコース  | 0.04～0.7% (w/v) |
| DMSO   | 5～11% (v/v)     |
| HuSA   | 1.5～3% (w/v)    |

であり得る。

一方、生理的水溶液が重炭酸リンゲル液の場合、凍結保存液の組成は、

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 重炭酸リンゲル液 | 40～70% (v/v)    |
| デキストラン   | 3～11% (w/v)     |
| グルコース    | 0.04～0.8% (w/v) |
| DMSO     | 5～12% (v/v)     |
| HuSA     | 1～ 4% (w/v) ;   |

好ましくは、

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 重炭酸リンゲル液 | 43～67% (v/v)    |
| デキストラン   | 3.5～10.5% (w/v) |
| グルコース    | 0.05～0.7% (w/v) |
| DMSO     | 7.5～12% (v/v)   |

HuSA 1.2～3.54% (w/v)

であり得る。

[0048] 前述のとおり、リンパ球用の凍結保存液としては、DMSO、デキストラン、グルコース、HuSA、重炭酸塩及び生理的水溶液（例、生理食塩水、リンゲル液）のうちの一部を含有する溶液を用いた報告例はあるが、前記のすべての成分を含有する又は該成分からなる凍結保存液は未だ開示されていない。

従って、本発明はまた、炭酸水素イオン含有生理的水溶液、デキストラン、グルコース、DMSO及びHuSAを含有してなる、リンパ球用凍結保存液（以下、「本発明の凍結保存液」という場合がある。）を提供する。

[0049] 本発明の凍結保存液の成分である炭酸水素イオン含有生理的水溶液、デキストラン、グルコース、DMSO及びHuSAとしては、本発明の凍結保存方法についてそれぞれ記載したとおりのものを使用することができる。炭酸水素イオン含有生理的水溶液としては、好ましくは重炭酸リンゲル液である。

[0050] 炭酸水素イオン含有生理的水溶液が重炭酸リンゲル液である場合、本発明の凍結保存液の組成としては、好ましくは以下のとおりである。

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 重炭酸リンゲル液 | 40～70% (v/v)    |
| デキストラン   | 3～11% (w/v)     |
| グルコース    | 0.04～0.8% (w/v) |
| DMSO     | 5～12% (v/v)     |
| HuSA     | 1～4% (w/v) ;    |

より好ましくは、

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 重炭酸リンゲル液 | 43～67% (v/v)    |
| デキストラン   | 3.5～10.5% (w/v) |
| グルコース    | 0.05～0.7% (w/v) |
| DMSO     | 7.5～12% (v/v)   |
| HuSA     | 1.2～3.5% (w/v)  |

[0051] 本発明の凍結保存方法ではまず、上記本発明の洗浄方法を行うことにより得られたリンパ球の細胞濃縮液から洗浄液を除去するとともに、上記のい

れかの凍結保存液に再懸濁させる。例えば、細胞濃縮液を遠心チューブなどに回収し、細胞を遠心してペレット化した後、凍結保存液を加えて懸濁することができる。あるいは、凍結保存液を送液しながら同時に洗浄液を抜き取ることにより、連続的に洗浄液を凍結保存液に置換することができる。

得られた細胞懸濁液を凍結保存チューブに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーにて凍結後、気相もしくは液相の窒素タンクにて保存することができるが、それに限定されない。例えば、自動分注装置を用いて細胞懸濁液を凍結保存バイアルに分注し、例えば、冷却速度を制御できるフリーザーを用いてプログラム凍結を行うことにより、凍結処理を最適化することができる。

[0052] 例えば、3 L容のバイオリアクターを用いて拡大培養を行ったリンパ球を、本発明の洗浄方法に供して得られた細胞濃縮液の洗浄液を凍結保存液に置換し、得られた細胞懸濁液を凍結保存容器に分注し、凍結処理を開始するまでに要する時間は約2時間と想定される。当該操作は約 $4^{\circ}\text{C}$ 乃至室温にて行われる。従って、凍結保存液は、凍結保存中や解凍時の細胞のダメージから細胞を保護するだけでなく、洗浄後、細胞を凍結保存液に再懸濁させて凍結処理を開始するまでの時間、約 $4^{\circ}\text{C}$ 乃至室温で安定に細胞を保存できることが求められる。後述の実施例に示されるとおり、洗浄処理後のリンパ球を凍結保存液に懸濁し、室温で4時間静置した際の経時的な生細胞回収率の低下が、重炭酸リンゲル液を含む凍結保存液を用いて凍結保存を行うと、既存の凍結保存液であるSCBに比べて顕著に抑制される。従って、本発明の凍結保存方法及び凍結保存液は、リンパ球の凍結保存において極めて有用である。

[0053] [ 1 1 1 ] 本発明のリンパ球含有組成物、本発明の移植用希釈液、それらを含むキット、それを用いた移植用リンパ球調製方法、並びにそれにより得られる移植用リンパ球製剤

上記本発明の凍結保存方法により得られる凍結リンパ球含有組成物は、解凍後及び回復培養後の生細胞の回収率及び細胞生存率が、既存の凍結保存液を用いた場合と比較して顕著に向上する。即ち、当該リンパ球含有組成物は、移植用リンパ球として有利な効果を奏する。従って、本発明はまた、炭酸

水素イオン含有生理的水溶液で処理されたリンパ球と、上記本発明の凍結保存液とを含有してなる、リンパ球含有組成物（以下、「本発明のリンパ球含有組成物」という場合がある。）を提供する。

[0054] 後述の実施例に示されるとおり、本発明の洗浄方法及び凍結保存方法を介して得られた凍結リンパ球含有組成物を解凍後、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液で希釈し、室温で4時間静置した後回復培養を行い、培養後の細胞生存率を評価したところ、炭酸水素イオンを含有しない生理的水溶液（例、生理食塩水、酢酸リンゲル）で希釈した場合に比べて、高い細胞生存率が得られた。即ち、炭酸水素イオン含有生理的水溶液は、移植用媒体としてきわめて有用である。従って、本発明はまた、本発明のリンパ球含有組成物のための移植用希釈液であって、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有してなる、移植用希釈液を提供する。炭酸水素イオン含有生理的水溶液としては、前記本発明の洗浄液に用いられる溶液を適宜選択して用いることができるが、好ましくは重炭酸リンゲル液である。さらにまた、本発明は、本発明のリンパ球含有組成物と、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液とを含む、移植用リンパ球の調製用キットを提供する。

[0055] 前記移植用リンパ球の調製用キットにおいて、リンパ球含有組成物は凍結状態で提供され得る。例えば、CPCから凍結状態で病院内に輸送され、解凍後、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液により希釈懸濁され、移植用リンパ球製剤として調製することができ、移植手術までの間、室温にて安定に維持することができる。あるいは、別の態様によれば、CPCで凍結リンパ球含有組成物を解凍した直後に、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液に希釈懸濁し、室温下、非凍結状態でリンパ球を病院に輸送し、到着後速やかに移植手術を実施することもできる。

従って、本発明はまた、凍結保存後解凍した本発明のリンパ球含有組成物を、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液で希釈することを含む、移植用リンパ球の調製方法を提供する。さらに、本発明は当該方

法により得られる移植用リンパ球製剤を提供する。

このようにして得られた移植用リンパ球製剤は、自体公知の方法、例えば養子免疫療法やドナーリンパ球輸注療法等で使用される投与形態、用法用量により、患者、例えば、がん患者等に投与することができる。

[0056] 以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、それらは単なる例示であって、本発明はそれらに何ら限定されない。

## 実施例

[0057] [実施例 1] iPS細胞由来NK細胞の製造

ヒト臍帯血由来iPS細胞ストックを解凍し、フラスコに播種、37℃、5% CO<sub>2</sub>環境において培養した後に細胞を回収し、三次元培養装置に播種した。播種後、膜ろ過フィルターを介して灌流培養を実施し、一定サイズの3Dスフェアを形成させた。その後、これにBMP4等添加因子を含む分化誘導培地を加え、灌流培養による3D培養を12-17日間継続することによってHPCを誘導した。さらに得られたHPCに対し、NK分化誘導培地 (AIM V Serum Free Medium (Thermo Fisher scientific) にFBSを5%濃度で加えた培地に、IL-15, IL-7, SCF, およびFlt3Lを終濃度50 ng/mLとなるように添加した培地) を用い、三次元培養装置に播種し、約40日間灌流培養することによって、高い生理活性を有する大量のNK細胞を作製した。

[0058] [実施例 2] リンパ球洗浄工程における洗浄液の比較

### (1) NK細胞の調製

実施例 1 で得られたNK細胞を300xgで5分間遠心後、培地上清を除いて回収し、さらに $2.2 \times 10^6$  cells/mLとなるように、5種の生理的水溶液 [(1) 生理食塩水 (大塚製薬工場社製)、(2) ヴィーンF (酢酸リンゲル液; 扶桑薬品社製)、(3) ヘスパンダー (ヒドロキシエチルデンプン・ブドウ糖添加 乳酸リンゲル液; 大塚製薬工場社製)、(4) HBSS (+) (平衡塩溶液)、(5) HBSS (-) (平衡塩溶液)] に懸濁した (各生理的水溶液の電解質組成を表 1 に示す)。NK細胞懸濁液は15 mL遠沈管に入れて、室温で静置した。静置処理は濃縮洗浄工程のプロセス時間の模擬とし、0時間は比較例、2時間及び4時間は実施

例として設定した。

[0059] [表1]

| 電解質濃度<br>mmol/L | 大塚生食注<br>(0.9%生理<br>食塩水) | ヴィーンF<br>(酢酸リン<br>ゲル液) | ヘスバンダー<br>(ヒドロキシエ<br>チルデンプン・<br>ブドウ糖添加 乳<br>酸リンゲル液) | HBSS (+)<br>(平衡塩溶<br>液) | HBSS (-)<br>(平衡塩<br>溶液) |
|-----------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Na              | 154                      | 130                    | 105.6                                               | 142.77                  | 142.77                  |
| K               | —                        | 4                      | 4                                                   | 5.77                    | 5.77                    |
| Ca              | —                        | 1.5                    | 1.35                                                | 1.26                    | —                       |
| Mg              | —                        | —                      | —                                                   | 0.90                    | —                       |
| Cl              | 154                      | 109                    | 92.3                                                | 146.77                  | 143.26                  |
| 乳酸              | —                        | —                      | 20                                                  | —                       | —                       |
| 酢酸              | —                        | 28                     | —                                                   | —                       | —                       |
| 炭酸水素            | —                        | —                      | —                                                   | 4.17                    | 4.17                    |
| リン酸             | —                        | —                      | —                                                   | 0.78                    | 0.78                    |

[0060] 表1に示されるとおり、平衡塩溶液HBSS組成中の炭酸水素イオンは、「生理食塩水」、「酢酸リンゲル液」、「ヒドロキシエチルデンプン・ブドウ糖添加 乳酸リンゲル液」の中には含まれていない。

[0061] (2) 静置処理後NK細胞サンプルの凍結保存

静置0時間（懸濁直後）、2時間、4時間後に、NK細胞懸濁液を300xgで5分間遠心処理し、上清を除き、 $5.0 \times 10^6$  cells/mLとなるようにSTEM-CELLBANKER（登録商標）GMP grade（SCB、ゼノジェンファーマ社製）に再懸濁し、細胞懸濁液を凍結容器に分取し、凍結保存容器のBICELL（日本フリーザー社製）に移し、-80℃で凍結保存した。

[0062] (3) 解凍及び回復培養後の細胞回収率及び細胞生存率の測定

NK細胞を解凍し、NK細胞の製造に用いた培地（AIM V Serum Free Medium（Thermo Fisher scientific）にFBSを5%濃度で加えた培地に、IL-15、IL-7、SCF、およびFlt3Lを終濃度50 ng/mLとなるように添加した培地）を用いて、6-wellプレートに $1.0 \times 10^6$  cells/mLとなるように再播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下、インキュベーター中で4日間の回復培養を行った。その後well内の生細胞密度を測定し、生細胞回収率（式(I)参照）及び細胞生存率を算出した。

生細胞回収率＝（解凍後・培養終了後の総生細胞数／凍結保存総生細胞数）×100 (I)

結果を表2に示す。

[0063] [表2]

| 洗浄液種類                                               | 静置時間 | 解凍直後 Day0  |           | 培養終了 Day4  |           |
|-----------------------------------------------------|------|------------|-----------|------------|-----------|
|                                                     |      | 生細胞回収率 (%) | 細胞生存率 (%) | 生細胞回収率 (%) | 細胞生存率 (%) |
| 生理食塩水                                               | 0hr  | 65.7%      | 96.9%     | 59.6%      | 96.0%     |
|                                                     | 2hr  | 61.0%      | 92.3%     | 29.6%      | 88.8%     |
|                                                     | 4hr  | 47.4%      | 83.2%     | 25.4%      | 88.9%     |
| グリーンD<br>(酢酸リンゲル液)                                  | 0hr  | 60.8%      | 97.1%     | 41.8%      | 94.1%     |
|                                                     | 2hr  | 65.0%      | 96.7%     | 38.2%      | 93.5%     |
|                                                     | 4hr  | 63.8%      | 96.6%     | 45.4%      | 96.8%     |
| ヘスパンダー<br>(ヒドロキシエチル<br>デンプン・ブドウ糖<br>添加 乳酸リンゲル<br>液) | 0hr  | 43.2%      | 95.3%     | 39.2%      | 96.2%     |
|                                                     | 2hr  | 39.2%      | 92.4%     | 16.8%      | 93.0%     |
|                                                     | 4hr  | 46.5%      | 94.4%     | 24.4%      | 95.9%     |
| HBSS (+)<br>(平衡塩溶液)                                 | 0hr  | 67.8%      | 97.4%     | 49.4%      | 96.1%     |
|                                                     | 2hr  | 66.6%      | 97.6%     | 47.3%      | 95.3%     |
|                                                     | 4hr  | 63.0%      | 95.3%     | 53.6%      | 95.3%     |
| HBSS (-)<br>(平衡塩溶液)                                 | 0hr  | 61.9%      | 96.4%     | 55.7%      | 95.8%     |
|                                                     | 2hr  | 60.4%      | 95.3%     | 50.9%      | 96.4%     |
|                                                     | 4hr  | 54.0%      | 92.9%     | 36.7%      | 94.1%     |

[0064] 表2の結果から、生理食塩水に懸濁したNK細胞では、4時間静置処理における解凍直後と培養終了後NK細胞の生細胞回収率及び細胞生存率は、0時間（静置処理なし）と2時間静置処理より顕著に低下することがわかった。なお、実務上において、細胞回収及び洗浄工程のプロセス時間は約2時間以内に設定するが、さらに凍結保存液を加えて、凍結保存処理までのプロセス時間は約4時間と想定される。4時間静置処理したNK細胞の回復培養終了後の生細胞回収率及び細胞生存率を比較すると、生理食塩水に懸濁したNK細胞に対し、HBSS等平衡塩溶液に懸濁したNK細胞は高い生細胞回収率及び細胞生存率を有することを確認した。

上記の結果により、回収後のNK細胞を含む懸濁液のバッファー置換あるいは洗浄工程では、炭酸水素イオンを有する溶液がNK細胞の回収及び生存率の

維持に適していると考えられた。

[0065] [実施例3] リンパ球濃縮洗浄工程における洗浄液の比較

(1) NK細胞懸濁液の調製及び静置処理

実施例1で得られたNK細胞を300xgで5分間遠心後、培地上清を除いて回収し、さらに $2.2 \times 10^6$  cells/mLとなるように、3種の生理的水溶液 [(1) 生理食塩水、(2) ラクテック (乳酸リンゲル液; 大塚製薬工場社製)、(3) ビカネイト (重炭酸リンゲル液; 大塚製薬工場社製)] に懸濁した (各生理的水溶液の電解質組成を表3に示す)。NK細胞懸濁液は15mL遠沈管に入れて、室温で静置した。静置処理は濃縮洗浄工程のプロセス時間の模擬とし、0時間は比較例、2時間及び4時間は実施例として設定した。

表3に示されるように、重炭酸リンゲル液であるビカネイトは炭酸水素イオンを有する。

[0066] [表3]

| 電解質濃度<br>mmol/L | 大塚生食注<br>(0.9%生理食塩水) | ラクテック<br>(乳酸リンゲル液) | ビカネイト<br>(重炭酸リンゲル液) |
|-----------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Na              | 154                  | 130                | 130                 |
| K               | -----                | 4                  | 4                   |
| Ca              | -----                | 1.5                | 1.5                 |
| Mg              | -----                | -----              | 1                   |
| Cl              | 154                  | 109                | 109                 |
| 乳酸              | -----                | 28                 | -----               |
| 酢酸              | -----                | -----              | -----               |
| 炭酸水素<br>リン酸     | -----                | -----              | 28<br>-----         |

[0067] (2) 静置処理後NK細胞サンプルの凍結保存

静置0時間 (懸濁直後)、2時間、4時間後に、NK細胞懸濁液を300xgで5分間遠心処理し、上清を除き、 $5.0 \times 10^6$  cells/mLとなるようにSTEM-CELLBANKER (登録商標) GMP grade (SCB) に再懸濁した。細胞懸濁液を凍結容器に分取し、凍結保存容器のBICELLに移し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

[0068] (3) 解凍及び回復培養後の生細胞回収率及び細胞生存率の測定

NK細胞を解凍し、実施例1におけるNK細胞の製造に用いた培地 (AIM V Ser

um Free Medium (Thermo Fisher scientific)にFBSを5%濃度で加えた培地に、IL-15、IL-7、SCFおよびFlt3Lを終濃度50 ng/mLとなるように添加した培地で6-wellプレートに $1.0 \times 10^6$  cells/mLとなるように再播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下、インキュベーター中で3日間の回復培養を行った。その後well内の生細胞密度を測定し、生細胞回収率（式(I)参照）及び細胞生存率を算出した。結果を表4に示す。

[0069] [表4]

| 洗浄液種類               | 静置時間 | 解凍直後 Day0  |           | 培養終了 Day3  |           |
|---------------------|------|------------|-----------|------------|-----------|
|                     |      | 生細胞回収率 (%) | 細胞生存率 (%) | 生細胞回収率 (%) | 細胞生存率 (%) |
| 生理食塩水               | 0hr  | 79.0%      | 97.5%     | 53.0%      | 97.8%     |
|                     | 2hr  | 77.8%      | 97.1%     | 61.4%      | 99.3%     |
|                     | 4hr  | 57.1%      | 84.4%     | 30.4%      | 96.9%     |
| ラクテック<br>(乳酸リングル液)  | 0hr  | 74.2%      | 98.4%     | 66.3%      | 98.8%     |
|                     | 2hr  | 74.9%      | 97.8%     | 45.8%      | 97.9%     |
|                     | 4hr  | 66.3%      | 91.7%     | 32.1%      | 96.6%     |
| ピカネイト<br>(重炭酸リングル液) | 0hr  | 83.4%      | 98.9%     | 52.5%      | 98.8%     |
|                     | 2hr  | 77.4%      | 98.8%     | 71.7%      | 98.8%     |
|                     | 4hr  | 75.4%      | 99.2%     | 68.5%      | 99.1%     |

[0070] 表4に示された結果から、生理食塩水に懸濁したNK細胞では、4時間静置処理における解凍直後と培養終了後NK細胞の生細胞回収率及び細胞生存率は、0時間（静置処理なし）と2時間静置処理より顕著に低下することがわかった。

4時間静置した場合において、回復培養終了後の生細胞回収率及び細胞生存率について比較すると、生理食塩水に懸濁したNK細胞に対し、重炭酸リングル液であるピカネイトに懸濁したNK細胞は、高い生細胞回収率及び細胞生存率を有することを確認した。

上記の結果により、緩衝作用がない生理食塩水、炭酸水素イオンを含まない乳酸リングル液と比較し、緩衝作用を有しかつ炭酸水素イオンを含む重炭酸リングル液によるNK細胞懸濁液のバッファー置換、あるいは洗浄によって、NK細胞の生細胞回収率及び生存率が最適化されることがわかった。

## [0071] [実施例4] リンパ球用の凍結保存液

## (1) NK細胞懸濁液と凍結保存液の混合と凍結

実施例1で得られたNK細胞を含有する培養液を300xgで5分間遠心後、培地上清を除いた。NK細胞の沈殿をタッピングにより解して生理食塩水もしくは重炭酸リンゲル液に懸濁した後、表5又は表6に示した各組成の凍結保存液を加えてよく混合した。凍結保存液を加えた後、それぞれの細胞懸濁液を凍結容器に分取し、Mr. Frosty (Nalgene社製) もしくはBICELLなどの凍結保存容器に移して、-80℃で凍結した。凍結保存液の性能比較のために、STEM-CELLBANKER (登録商標) GMP grade (SCB) に懸濁した細胞を調製し、対照サンプルとして凍結保存した。

## [0072] [表5]

生理食塩水含有凍結保存液の組成と生細胞回収率 (SCB 相対値)

| 凍結保存液 | SCB | CS10 | 生理食塩水 | Dex40 | Glucose | DMSO | HuSA | 生細胞回収率 (SCB 相対値) |
|-------|-----|------|-------|-------|---------|------|------|------------------|
| SCB   | 100 | -    | -     | -     | -       | -    | -    | 1.00             |
| CS10  | -   | 100  | -     | -     | -       | -    | -    | 0.89             |
| H-16  | -   | -    | 36.8  | 8.06  | 0.090   | 10.0 | 2.75 | 1.16             |
| H-33  | -   | -    | 32.7  | 9.68  | 0.360   | 9.1  | 1.75 | 1.15             |
| H-35  | -   | -    | 37.0  | 8.72  | 0.675   | 9.1  | 1.75 | 1.24             |
| H-38  | -   | -    | 40.8  | 8.72  | 0.360   | 6.0  | 1.75 | 1.21             |
| H-39  | -   | -    | 36.5  | 9.68  | 0.045   | 6.0  | 1.75 | 1.23             |
| H-64  | -   | -    | 37.7  | 8.72  | 0.360   | 9.1  | 1.75 | 1.25             |

SCB 相対値: (各サンプルの生細胞回収率/SCB の生細胞回収率) x100

## [0073] [表6]

重炭酸リンゲル液含有凍結保存液の組成と生細胞回収率 (SCB 相対値)

| 凍結保存液 | SCB | 生理食塩水 | 重炭酸リンゲル液 | Dex40 | Glucose | DMSO | HuSA  | 生細胞回収率 (SCB 相対値) |
|-------|-----|-------|----------|-------|---------|------|-------|------------------|
| SCB   | 100 | -     | -        | -     | -       | -    | -     | 1.00             |
| H-16  | -   | 36.8  | -        | 8.06  | 0.09    | 10   | 2.75  | 1.08             |
| H-49  | -   | -     | 53.3     | 6.72  | 0.1     | 8.5  | 2.5   | 1.16             |
| H-51  | -   | -     | 66.1     | 3.60  | 0.2     | 11   | 1.875 | 1.24             |
| H-53  | -   | -     | 54       | 5.76  | 0       | 12   | 2.5   | 1.05             |
| H-55  | -   | -     | 68       | 4.32  | 0.25    | 7.5  | 1.5   | 1.03             |
| H-59  | -   | -     | 44       | 7.44  | 0.25    | 11   | 3.375 | 1.11             |
| H-88  | -   | -     | 60.2     | 4.30  | 0.09    | 9.9  | 2.95  | 1.15             |

SCB 相対値: (各サンプルの生細胞回収率/SCB の生細胞回収率) x100

## [0074] (2) 凍結保存後のNK細胞の解凍及び回復培養

上記工程(1)で得られた凍結NK細胞を解凍した後、実施例1におけるNK細胞の製造に用いた培地(AIM V Serum Free Medium (Thermo Fisher scientific))にFBSを5%濃度で加えた培地に、IL-15, IL-7, SCF, およびFlt3Lを終濃度50 ng/mLとなるように添加した培地)に懸濁し、12-wellプレートに $1.0 \times 10^6$  cells/mLとなるように再播種した。次いで37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下、インキュベーター中で3日間の回復培養を行った。その後well内の生細胞密度及び細胞生存率を測定し、それぞれの凍結保存液における生細胞回収率(式(I)参照)を、SCBを用いて凍結した細胞の生細胞回収率に対する相対値(SCB相対値)として算出した。

生理食塩水を含む凍結保存液で行った結果を表5(培養終了Day3 SCB相対値)に、また重炭酸リンゲル液を含む凍結保存液で行った結果を表6(培養終了Day3 SCB相対値)に示した。

## [0075] (3) 結果

## (3-1) 生理食塩水を含む凍結保存液の場合

生理食塩水を含む凍結保存液を用いて実施例1で調製したNK細胞の凍結保存を行う場合、既存の凍結保存液であるSCBやCryoStor CS10(CS10; Charles River Laboratories Cell Solutions, Inc社製)に比べて、解凍後の生細胞回収率が顕著に高い組成を複数得ることができた。好ましい組成は、生理食塩水; 32.7~40.8% (v/v)、Dextran40 (Dex40; 名糖産業社製); 8.06~9.68% (w/v)、Glucose (テルモ社製); 0.045~0.675% (w/v)、CryoSure DMSO (DMSO; WAK-Chemie Medical GmbH社製); 6.0~10.0% (v/v)、ヒト血清アルブミン; (HuSA; 日本血液製剤機構製); 1.75~2.75% (w/v)であった。(表5)

## [0076] (3-2) 重炭酸リンゲル液を含む凍結保存液の場合

重炭酸リンゲル液を含む凍結保存液を用いて実施例1で調製したNK細胞の凍結保存を行う場合、既存の凍結保存液であるSCBに比べて、解凍後の生細胞回収率が顕著に高い組成を複数得ることができた。好ましい組成は、重炭酸リンゲル液; 44.0~66.1% (v/v)、Dextran40; 3.60~7.44% (w/v)、Glucose

; 0.09~0.25% (w/v)、DMSO ; 8.5~11.0% (v/v)、HuSA ; 1.875~3.375% (w/v)  
)であった。(表6)

[0077] [実施例5] NK細胞の時間安定性における凍結保存液検討

(1) NK細胞懸濁液と凍結保存液の混合と凍結作業

実施例1で調製したNK細胞を含有する培養液を300xgで5分間遠心後、培地上清を除いた。NK細胞の沈殿をタッピングにより溶解して生理食塩水もしくは重炭酸リンゲル液に懸濁した後、表7に示す各組成の凍結保存液を加えてよく混合した。凍結保存液を加えた細胞懸濁液を凍結容器に分取し、目的の時間(1, 2, 4時間)室温で静置した後、凍結保存容器(Mr. FrostyもしくはBICELL)に移して、-80℃で凍結した。

[0078] (2) 凍結保存後のNK細胞の解凍及び回復培養

NK細胞を解凍した後、実施例1のNK細胞拡大培養用の培地を用いて、12-wellプレートに $1.0 \times 10^6$  cells/mLとなるように再播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下、インキュベーター中で3日間の回復培養を行った。その後well内の生細胞密度及び細胞生存率を測定し、生細胞回収率(式(I)参照)をSCB相対値として算出した。結果を表7(培養終了Day3 SCB相対値)に示す。

[0079]

[表7]

表 7 凍結保存液の組成と室温静置における安定性 (SCB 相対値)

| 凍結保存液 | 凍結保存液の組成 |       |          |        |         |       |      | 各静置時間における生細胞回収率 (SCB 相対値) |      |      |      |
|-------|----------|-------|----------|--------|---------|-------|------|---------------------------|------|------|------|
|       | SCB      | 生理食塩水 | 重炭酸リンゲル液 | Dex-40 | Glucose | DMSO  | HuSA | 0h                        | 1h   | 2h   | 4h   |
| SCB   | 100      | —     | —        | —      | —       | —     | —    | 1.00                      | 0.70 | 0.45 | 0.35 |
| H-95  | —        | 25.22 | 20       | 8.06   | 0.09    | 10    | 2.75 | 1.03                      | 0.79 | 0.57 | 0.39 |
| H-88  | —        | —     | 60.20    | 4.30   | 0.09    | 9.90  | 2.95 | 1.11                      | 0.94 | 0.73 | 0.51 |
| H-90  | —        | —     | 46.59    | 9.68   | 0.05    | 6.00  | 1.75 | 0.96                      | 0.77 | 0.60 | 0.37 |
| H-51  | —        | —     | 66.10    | 3.60   | 0.20    | 11.00 | 1.88 | 1.08                      | 0.89 | 0.64 | 0.51 |
| H-98  | —        | —     | 52.71    | 6.18   | 0.09    | 9.95  | 2.85 | 1.13                      | 0.81 | 0.57 | 0.46 |
| H-99  | —        | —     | 51.34    | 6.93   | 0.32    | 10.75 | 2.10 | 1.06                      | 0.79 | 0.56 | 0.40 |
| H-100 | —        | —     | 43.22    | 10.06  | 0.41    | 8.05  | 1.50 | 1.13                      | 0.82 | 0.58 | 0.40 |
| H-101 | —        | —     | 44.59    | 9.31   | 0.18    | 7.25  | 2.25 | 1.02                      | 0.90 | 0.64 | 0.37 |

SCB 相対値 : (各サンプルの生細胞回収率 / SCB の生細胞回収率) × 100

[0080] 凍結保存液との混合後に室温で0h～4hの間静置したときの経時的な生細胞回収率の低下に対し、重炭酸リンゲル液を含む凍結保存液を用いて凍結保存を行う場合、既存の凍結保存液であるSCBに比べて顕著に高い生細胞回収率を維持できた。特に、好ましい組成は、重炭酸リンゲル液 ; 43.2～66.10% (v/v)、Dextran40 ; 3.60～10.06% (w/v)、Glucose ; 0.05～0.41% (w/v)、DMSO ; 6.0～11.0% (v/v)、HuSA ; 1.50～2.95% (w/v)であった。(表7)

[0081] [実施例6] NK細胞の凍結融解後の希釈液

NK細胞を解凍した後、0.1 mLの細胞懸濁液を10倍量のそれぞれの生理的水溶液に希釈懸濁し、室温で1、2、4時間静置後の安定性を評価した。生理的水溶液の対照として回復培養用の培地を用いた。静置後の細胞懸濁液は300xg、

5分の遠心分離で上清を除去後、実施例1のNK細胞拡大培養用の培地2 mLに再懸濁し、12-wellプレートに1.9 mL播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下、インキュベーター中で3日間の回復培養を行った。その後well内の生細胞密度を測定し、生細胞数を計測した。生理的水溶液として、生理食塩水（大塚製薬工場社製）、ヴィーンD（酢酸リンゲル液；扶桑薬品社製）、ヴィーンF（酢酸リンゲル液；扶桑薬品社製）、ピカネイト（重炭酸リンゲル液；大塚製薬工場社製）、ピカーボン（重炭酸リンゲル液；エイワイファーマ社製）を用いて検討した（各生理的水溶液の組成を表8に示す）。

[0082] [表8]

| 組成(%)          | 生理食塩水 | ヴィーンF | ヴィーンD | ピカネイト | ピカーボン  |
|----------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| ブドウ糖           |       | ----  | 5     | ----  | ----   |
| 塩化ナトリウム        | 0.9   | 0.6   | 0.6   | 0.584 | 0.614  |
| 塩化カリウム         |       | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.03   |
| 塩化カルシウム<br>水和物 | ----  | 0.02  | 0.02  | 0.022 | 0.022  |
| 酢酸ナトリウム<br>水和物 |       | 0.38  | 0.38  | ----  | ----   |
| 塩化マグネシウム       | ----  | 適量    | 適量    | 0.02  | 0.0102 |
| 炭酸水素ナトリウム      | ----  | ----  | ----  | 0.235 | 0.21   |
| クエン酸ナトリウム      | ----  | ----  | ----  | 0.02  | 0.049  |
| 塩酸             | ----  | 適量    | 適量    | ----  | ----   |
| 二酸化炭素          | ----  | ----  | ----  | ----  | 適量     |

[0083] 生理食塩水、ヴィーンF及びヴィーンDを用いた実験の結果を表9に、生理食塩水及びピカネイトを用いた実験の結果を表10に、生理食塩水、ピカネイト及びピカーボンを用いた実験の結果を表11に、それぞれ示した。

[0084]

[表9]

| 生理的水溶液 | 静置時間(時間) | 生細胞数<br>( $\times 10^5$ cells/mL) |
|--------|----------|-----------------------------------|
| 培地     | 0        | 8.06                              |
| 生理食塩水  | 0        | 6.67                              |
|        | 1        | 5.31                              |
|        | 2        | 4.8                               |
|        | 4        | 3.7                               |
| ヴィーンF  | 0        | 7.18                              |
|        | 1        | 6.3                               |
|        | 2        | 5.26                              |
|        | 4        | 3.99                              |
| ヴィーンD  | 0        | 4.74                              |
|        | 1        | 2.52                              |
|        | 2        | 1.49                              |
|        | 4        | 0.87                              |

[0085] [表10]

| 生理的水溶液 | 静置時間(時間) | 生細胞数<br>( $\times 10^5$ cells/mL) |
|--------|----------|-----------------------------------|
| 培地     | 0        | 9.69                              |
| 生理食塩水  | 0        | 8.85                              |
|        | 1        | 5.29                              |
|        | 2        | 6.2                               |
|        | 4        | 4.25                              |
| ピカネイト  | 0        | 9.79                              |
|        | 1        | 8.82                              |
|        | 2        | 8.04                              |
|        | 4        | 7.12                              |

[0086]

[表11]

| 生理的水溶液 | 静置時間(時間) | 生細胞数<br>( $\times 10^3$ cells/mL) |
|--------|----------|-----------------------------------|
| 培地     | 0        | 7.07                              |
| 生理食塩水  | 0        | 6.71                              |
|        | 1        | 5.59                              |
|        | 2        | 4.5                               |
|        | 4        | 4.39                              |
| ピカネイト  | 0        | 7.28                              |
|        | 1        | 6.82                              |
|        | 2        | 7.19                              |
|        | 4        | 5.18                              |
| ピカーボン  | 0        | 7.04                              |
|        | 1        | 7.33                              |
|        | 2        | 7.06                              |
|        | 4        | 5.71                              |

[0087] 表9-11に示されるとおり、実施例4の方法により凍結保存NK細胞を融解後、生理的水溶液に10倍希釈懸濁し、静置した後、経時的な生細胞数の回収の低下を評価したところ、重炭酸リンゲル液であるピカネイトやピカーボンを用いた場合、生理食塩水、ヴィーンDやヴィーンFを用いた場合に比べて顕著に高い生細胞数の回収を得た。重炭酸リンゲル液はNK細胞凍結製剤の患者への投与時の希釈液として、高い生細胞数の維持効果を有していることが明らかとなった。

### 産業上の利用可能性

[0088] 本発明の洗浄方法及び凍結保存方法によれば、凍結・解凍後も高い細胞の回収率及び生存率を維持し、かつ高い生理活性を維持した移植用リンパ球（例、NK細胞、T細胞等）を製造することができる。また、本発明のリンパ球含有組成物と移植用希釈液によれば、解凍後、移植までの間、室温保存しても高い細胞生存率を維持することができ、移植により適したリンパ球製剤を提供することができる。従って、本発明は、がん免疫療法をはじめとするリンパ球による細胞免疫療法において極めて有用である。

[0089] （関連出願の相互参照）

本出願は、2022年11月18日付で日本国に出願された特願2022-185201を基礎

としており、ここで参照することによってその内容全体が本明細書に組み込まれる。

### 請求の範囲

- [請求項1] リンパ球を炭酸水素イオン含有生理的水溶液で洗浄することを含む、リンパ球の洗浄方法。
- [請求項2] リンパ球がT細胞又はNK細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 炭酸水素イオン含有生理的水溶液が重炭酸リンゲル液である、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 請求項1に記載の方法により処理されたリンパ球を、生理的水溶液を含有する凍結保存液に懸濁し凍結することを含む、リンパ球の凍結保存方法。
- [請求項5] 生理的水溶液が炭酸水素イオン含有生理的水溶液である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 炭酸水素イオン含有生理的水溶液が重炭酸リンゲル液である、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有してなる、リンパ球用洗浄液。
- [請求項8] 炭酸水素イオン含有生理的水溶液、デキストラン、グルコース、DM S0及びヒト血清アルブミンを含有してなる、リンパ球用凍結保存液。
- [請求項9] 炭酸水素イオン含有生理的水溶液で処理されたリンパ球と、請求項8に記載の凍結保存液とを含有してなる、リンパ球含有組成物。
- [請求項10] 請求項9に記載のリンパ球含有組成物と、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液とを含む、移植用リンパ球の調製用キット。
- [請求項11] 請求項9に記載のリンパ球含有組成物のための移植用希釈液であって、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有してなる、移植用希釈液。
- [請求項12] 凍結保存後解凍した請求項9に記載のリンパ球含有組成物を、炭酸水素イオン含有生理的水溶液を含有する移植用希釈液で希釈することを含む、移植用リンパ球の調製方法。

[請求項13]           請求項 1 2 に記載の方法により得られる、移植用リンパ球製剤。