

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-220672

(P2016-220672A)

(43) 公開日 平成28年12月28日 (2016. 12. 28)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/04 (2006.01)		C 1 2 N 1/04	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/07 (2010.01)		C 1 2 N 5/07	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2016-23010 (P2016-23010)	(71) 出願人	304024430 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 石川県能美市旭台一丁目1番地
(22) 出願日	平成28年2月9日 (2016. 2. 9)	(74) 代理人	110000523 アクシス国際特許業務法人
(31) 優先権主張番号	特願2015-110473 (P2015-110473)	(74) 代理人	100127133 弁理士 小坂橋 浩之
(32) 優先日	平成27年5月29日 (2015. 5. 29)	(72) 発明者	松村 和明 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリ アルサイエンス研究科内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	鈴木 雅 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリ アルサイエンス研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤

(57) 【要約】

【課題】優れたガラス化能を有する動物細胞凍結保存液を提供する。

【解決手段】(a) - ポリ - L - リジンをブチル無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物 ; (b) - ポリ - L - リジンを、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物 ; 又は (c) - ポリ - L - リジンを、式 I で表される化合物と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物、からなる群から選択された両性高分子化合物を含む動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤、及び該ガラス化状態安定化剤を含有する動物細胞凍結保存液。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選択された、アミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物を含む、動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤：

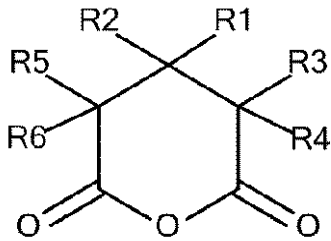
(a) - ポリ-L-リジンをブチル無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物；

(b) - ポリ-L-リジンを、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物； 又は

(c) - ポリ-L-リジンを、次の式 I：

10

【化 1】



式 (I)

(ただし、上記の式中、

20

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 1 及び R 2 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基であり；

R 3 及び R 4 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 3 及び R 4 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基であり；

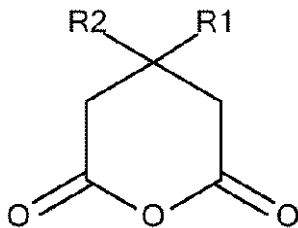
R 5 及び R 6 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 5 及び R 6 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基である) で表される化合物と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物。

【請求項 2】

式 I で表される化合物が、次の式 II：

【化 2】

30



式 (II)

(ただし、上記の式中、

40

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 1 及び R 2 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基である) で表される化合物である、請求項 1 に記載の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤

【請求項 3】

両性高分子化合物において、 - ポリ-L-リジンの側鎖のアミノ基のうち、カルボキシル化されたアミノ基の割合が、50% ~ 75% の範囲にある、請求項 1 又は請求項 2 に記載の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤。

【請求項 4】

- ポリ-L-リジンを、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物が、

50

- ポリ-L-リジンの側鎖のアミノ基のうち、無水コハク酸との反応によってカルボキシル化されたアミノ基の数 A に対する、

- ポリ-L-リジンの側鎖のアミノ基のうち、ブチル無水コハク酸との反応によってカルボキシル化されたアミノ基の数 B の比率 B / A が、

$2 / 30 \sim 40 / 30$ の範囲にある、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載された動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤を含有する生理溶液からなる、動物細胞凍結保存液。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載された動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤を、2 ~ 40 重量%で含有し、

エチレングリコール又はプロピレングリコールを、3 ~ 8 M の濃度で含有する、生理溶液からなる、動物細胞凍結保存液。

【請求項 7】

さらに、スクロースを、0.1 ~ 1 M の濃度で含有する、請求項 6 に記載の動物細胞凍結保存液。

【請求項 8】

動物細胞凍結保存液が、動物細胞ガラス化状態凍結保存液である、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存液。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存液中へ、動物細胞を浸漬する工程、動物細胞凍結保存液中の動物細胞を、降温して凍結する工程、を含む、動物細胞凍結保存方法。

【請求項 10】

動物細胞を、降温して凍結する工程の後に、凍結した、動物細胞凍結保存液中の動物細胞を、昇温して解凍する工程、を含む、請求項 9 に記載の動物細胞凍結保存方法。

【請求項 11】

動物細胞を、降温して凍結する工程が、動物細胞を、降温してガラス化状態で凍結する工程、である、請求項 9 ~ 10 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

【請求項 12】

動物細胞を、昇温して解凍する工程が、動物細胞を、昇温して再結晶化することなく解凍する工程、である、請求項 10 ~ 11 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

【請求項 13】

降温して凍結する工程が、降温速度 5 / 分 ~ 50 / 分で降温して凍結する工程、である、請求項 9 ~ 12 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

【請求項 14】

昇温して解凍する工程が、昇温速度 5 / 分 ~ 100 / 分で昇温して解凍する工程、である、請求項 10 ~ 13 のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤、及び該ガラス化状態安定化剤を含有する動物細胞凍結保存液に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

近年、再生医療の臨床応用への期待が高まっている。このための基本技術として、細胞、細胞シート、三次元形状の細胞構造体、組織を、凍結保存する技術が必要とされている。このような技術として、凍結保護物質を添加して、対象の損傷を防ぎつつ、凍結保存する技術がある。このような凍結保護物質として、ジメチルスルホキシド(DMSO)($O=S(CH_3)_2$)、グリセリンなどが知られている。

【0003】

DMSOやグリセリンは、分散した細胞に対する凍結保存での使用には、十分な実績がある。しかし、DMSOやグリセリンは、細胞シート、三次元形状の細胞構造体、組織などに対する凍結保存での使用では、解凍後にしばしば損傷した状態を生じて、ダメージを残してしまう。この損傷が、凍結時の氷晶形成や脱水収縮から生じるのではないかと考えて、氷の結晶化を制御して、アモルフォスの状態のままに固化させる、ガラス化法が、試みられている。

10

【0004】

ガラス化法は、受精卵の凍結手法として発展してきたものであり、従来のガラス化法は、一般に、急速な凍結速度と濃い溶質濃度によって、水溶液をガラス化させることを意図している。例えば、マウスの受精卵のガラス化溶液として、DAP213が知られている。DAP213は、DMSO 2M、アセトアミド 1M、プロピレングリコール 3Mの溶液であり、濃度が高く、毒性も高くなっている。典型的な使用法は、マウスの受精卵に含有されている水を、この溶液で置換し、液体窒素に直接浸漬して、ガラス化状態を得る手法である。しかし、このようなガラス化溶液によるガラス化では、細胞毒性が高く、さらに解凍時の再結晶化によるダメージも高いとされている。

20

【0005】

そこで、本発明者らは、凍結保護物質を検討して、ガラス化法を改良することを試みてきた(特許文献1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特許第5630979号公報

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

特許文献1に開示されたカルボキシル化ポリリジンを含む凍結保存液は、ガラス化能に優れた凍結保存液であるが、さらに優れたガラス化能を有する新規な凍結保存液が、求められている。

【0008】

したがって、本発明の目的は、優れたガラス化能を有する新規な動物細胞凍結保存液を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

40

本発明者は、鋭意研究の結果、以下に示す両性高分子化合物を動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤として使用した動物細胞凍結保存液によって、上記目的を達成できることを見いだして、本発明に到達した。

【0010】

したがって、本発明は次の(1)以下を含む。

(1)

以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選択された、アミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物を含む、動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤：

(a) -ポリ-L-リジンをブチル無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した

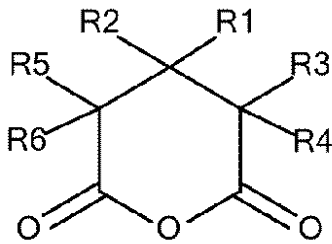
50

両性高分子化合物；

(b) - ポリ-L-リジンを、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物； 又は

(c) - ポリ-L-リジンを、次の式 I ；

【化 1】



式 (I)

10

(ただし、上記の式中、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 1 及び R 2 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基であり；

R 3 及び R 4 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 3 及び R 4 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基であり；

R 5 及び R 6 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 5 及び R 6 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基である)

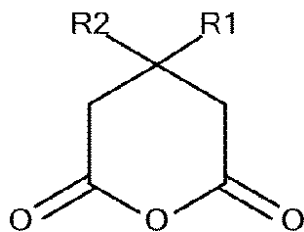
20

で表される化合物と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物。

(2)

式 I で表される化合物が、次の式 I I ；

【化 2】



式 (I I)

30

(ただし、上記の式中、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基であるか、あるいは R 1 及び R 2 が一体となって形成された C 1 ~ C 6 のアルカン-ジイル基である)

で表される化合物である、(1) に記載の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤。

(3)

両性高分子化合物において、- ポリ-L-リジンの側鎖のアミノ基のうち、カルボキシル化されたアミノ基の割合が、50% ~ 75% の範囲にある、(1) 又は (2) に記載の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤。

40

(4)

- ポリ-L-リジンを、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物が、

- ポリ-L-リジンの側鎖のアミノ基のうち、無水コハク酸との反応によってカルボキシル化されたアミノ基の数 A に対する、

- ポリ-L-リジンの側鎖のアミノ基のうち、ブチル無水コハク酸との反応によってカルボキシル化されたアミノ基の数 B の比率 B / A が、

2 / 30 ~ 40 / 30 の範囲にある、(1) ~ (3) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤。

(5)

50

(1) ~ (4) のいずれかに記載された動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤を含有する生理溶液からなる、動物細胞凍結保存液。

(6)

(1) ~ (4) のいずれかに記載された動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤を、2 ~ 40 重量% で含有し、

エチレングリコール又はプロピレングリコールを、3 ~ 8 M の濃度で含有する、生理溶液からなる、動物細胞凍結保存液。

(7)

さらに、スクロースを、0.1 ~ 1 M の濃度で含有する、(6) に記載の動物細胞凍結保存液。

(8)

動物細胞凍結保存液が、動物細胞ガラス化状態凍結保存液である、(5) ~ (7) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存液。

(9)

(5) ~ (8) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存液中へ、動物細胞を浸漬する工程、

動物細胞凍結保存液中の動物細胞を、降温して凍結する工程、を含む、動物細胞凍結保存方法。

(10)

動物細胞を、降温して凍結する工程の後に、凍結した、動物細胞凍結保存液中の動物細胞を、昇温して解凍する工程、を含む、(9) に記載の動物細胞凍結保存方法。

(11)

動物細胞を、降温して凍結する工程が、動物細胞を、降温してガラス化状態で凍結する工程、である、(9) ~ (10) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

(12)

動物細胞を、昇温して解凍する工程が、動物細胞を、昇温して再結晶化することなく解凍する工程、である、(10) ~ (11) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

(13)

降温して凍結する工程が、降温速度 5 / 分 ~ 50 / 分で降温して凍結する工程、である、(9) ~ (12) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

(14)

昇温して解凍する工程が、昇温速度 5 / 分 ~ 100 / 分で昇温して解凍する工程、である、(10) ~ (13) のいずれかに記載の動物細胞凍結保存方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、優れたガラス化能を有する動物細胞凍結保存液を得ることができる。この動物細胞凍結保存液を使用すれば、従来よりも遅い降温速度であっても結晶化が抑制されて、ガラス化状態を維持しつつ、凍結保存できる。また、昇温時においても、再結晶化が抑制されて、ガラス化状態が安定に維持されつつ、解凍することができる。そのため、本発明の動物細胞凍結保存液によれば、動物細胞を高い生存率で凍結解凍することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、昇温速度 50 / min での従来のガラス化液の DSC の測定の結果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 2 a】図 2 a は、COOH - PLL によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 2 b】図 2 b は、BSA - PLL によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 2 c】図 2 c は、BSA (35) - SA (30) - PLL によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 3 a】図 3 a は、BSA - PLL、EG 5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 3 b】図 3 b は、BSA - PLL、EG 4.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 4】図 4 は、BSA (35) - SA (30) - PLL、EG 5.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 5 a】図 5 a は、COOH - PLL によるガラス化液の DSC 測定による再結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 5 b】図 5 b は、BSA - PLL によるガラス化液の DSC 測定による再結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 5 c】図 5 c は、BSA (35) - SA (30) - PLL によるガラス化液の DSC 測定による再結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 6 a】図 6 a は、各ガラス化液による細胞生存率を示すグラフである。

【図 6 b】図 6 b は、各ガラス化液による細胞生存率を示すグラフである。

【図 7 a】図 7 a は、DMGA - PLL、EG 6 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 7 b】図 7 b は、DMGA - PLL、EG 5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 7 c】図 7 c は、DMGA - PLL、EG 4.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 7 d】図 7 d は、DMGA - PLL、EG 4 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、EG 6.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、COOH - PLL、EG 6.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 10 a】図 10 a は、COOH - PLL、EG 5.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 10 b】図 10 b は、COOH - PLL、EG 5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 11 a】図 11 a は、BSA - PLL、EG 5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 11 b】図 11 b は、BSA - PLL、EG 4.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 12 a】図 12 a は、DMGA - PLL、EG 4.5 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 12 b】図 12 b は、DMGA - PLL、EG 4 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 13 a】図 13 a は、COOH - PLL、EG 6 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 13 b】図 13 b は、BSA - PLL、EG 6 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

【図 13 c】図 13 c は、DMGA - PLL、EG 6 M によるガラス化液の DSC 測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図14a】図14aは、EG6Mによるガラス化液によって凍結解凍した細胞シートを二重染色した蛍光顕微鏡写真である。

【図14b】図14bは、COOH-PLL、EG6Mによるガラス化液によって凍結解凍した細胞シートを二重染色した蛍光顕微鏡写真である。

【図14c】図14cは、BSA-PLL、EG6Mによるガラス化液によって凍結解凍した細胞シートを二重染色した蛍光顕微鏡写真である。

【図14d】図14dは、DMGA-PLL、EG6Mによるガラス化液によって凍結解凍した細胞シートを二重染色した蛍光顕微鏡写真である。

【図15】図15は、各ガラス化液における凍結解凍後の細胞の生存率を示すグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0013】

具体的な実施の形態をあげて、以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、以下にあげる具体的な実施の形態に限定されるものではない。

【0014】

[動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤]

本発明の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤は、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選択された、アミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物を含む、動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤にある：

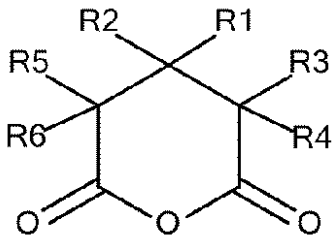
(a) -ポリ-L-リジンをブチル無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物；

20

(b) -ポリ-L-リジンを、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物； 又は

(c) -ポリ-L-リジンを、次の式I：

【化3】



式 (I)

30

(ただし、上記の式中、

R1及びR2は、それぞれ独立に、水素原子又はC1～C4のアルキル基であるか、あるいはR1及びR2が一体となって形成されたC1～C6のアルカン-ジイル基であり；

R3及びR4は、それぞれ独立に、水素原子又はC1～C4のアルキル基であるか、あるいはR3及びR4が一体となって形成されたC1～C6のアルカン-ジイル基であり；

R5及びR6は、それぞれ独立に、水素原子又はC1～C4のアルキル基であるか、あるいはR5及びR6が一体となって形成されたC1～C6のアルカン-ジイル基である)で表される化合物と反応させてカルボキシル化した両性高分子化合物。

40

【0015】

[-ポリ-L-リジン]

-ポリ-L-リジンは、公知の -ポリ-L-リジンを使用することができる。 -ポリ-L-リジンは、例えば分子量が100～100,000であり、好適な実施の態様において、微生物または酵素により生産される数平均分子量が例えば1000～2万、1000～1万の -ポリ-L-リジンを使用することができる。 -ポリ-L-リジンは、ストレプトマイセス属 (Streptomyces) に属する放線菌により生産されてもっぱら食品添加物として用いられており、重合度15～35のもの他、重合度が20以下のものの生産も試みられている。数平均分子量または数平均重合度の測定は、SDS

50

- PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動) 法により、例えば、アトー (株) 製の電気泳動装置及びデンシトグラフ (AE - 6920 V 型) を用いて容易に測定することができる。加熱処理による高分子量化により分子量 3 万以上として用いることもできる。末端のみにフリーのカルボキシル基を有するポリリジンは、側鎖に 1 級アミノ基を有しており、このアミノ基が、後述する反応によってカルボキシル化される。

【0016】

[- ポリ - L - リジンのアミノ基のカルボキシル化]

アミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物は、 - ポリ - L - リジンの側鎖のアミノ基のうち、カルボキシル化されたアミノ基の割合を、例えば 50 % ~ 75 %、60 % ~ 70 % の範囲とすることができる。

10

【0017】

[BSA - PLL]

ブチル無水コハク酸 (BSA) は、実施例に記載の化学反応式の通り、 - ポリ - L - リジン (PLL) の側鎖のアミノ基と反応して、カルボキシル化した両性高分子化合物 (BSA - PLL) を生成し、これはアミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物であり、本発明の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤である。

【0018】

[BSA - SA - PLL]

- ポリ - L - リジン (PLL) の側鎖のアミノ基が、ブチル無水コハク酸 (BSA) 及び無水コハク酸 (SA) と反応して、カルボキシル化した両性高分子化合物 (BSA - SA - PLL) は、アミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物であり、本発明の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤である。 - ポリ - L - リジンとの反応は、ブチル無水コハク酸及び無水コハク酸を、同時に反応させてもよく、前後して反応させてもよく、いずれを前又は後に反応させてもよい。 - ポリ - L - リジンの側鎖のアミノ基のうち、無水コハク酸との反応によってカルボキシル化されたアミノ基の数 A に対する、 - ポリ - L - リジンの側鎖のアミノ基のうち、ブチル無水コハク酸との反応によってカルボキシル化されたアミノ基の数 B の比率 B / A を、例えば、2 / 30 ~ 40 / 30 の範囲、10 / 30 ~ 40 / 30 の範囲、30 / 40 ~ 40 / 30 の範囲とすることができる。

20

30

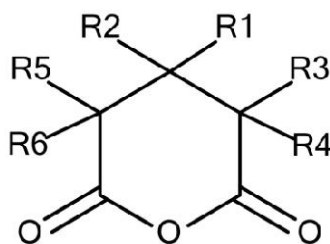
【0019】

[GA - PLL]

次の式 I で表される GA 誘導体 (グルタル酸無水物誘導体) は、 - ポリ - L - リジンの側鎖のアミノ基と反応して、カルボキシル化した両性高分子化合物 (GA - PLL) を生成し、これはアミノ基及びカルボキシル基を同一分子中に有する両性高分子化合物であり、本発明の動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤である。

【0020】

【化 4】



式 (I)

40

【0021】

ただし、上記の式中、R1 及び R2 は、それぞれ独立に、水素原子又は C1 ~ C4 のアルキル基とすることができ、あるいは R1 及び R2 が一体となって、C1 ~ C6 のアルカン - ジル基を形成することができる。C1 ~ C4 のアルキル基は、例えば C1 ~ C3、

50

C 1 ~ C 2 のアルキル基とすることができる。アルカン - ジイル基としては、例えば、C 1 ~ C 3 のアルカン - 1, 1 - ジイル基、C 4 ~ C 6 のアルキレン基をあげることができる。R 1 と R 2 の組み合わせとして、例えば、水素原子と水素原子、水素原子とメチル基、水素原子とエチル基、メチル基とメチル基、メチル基とエチル基、エチル基とエチル基をあげることができる。C 1 ~ C 3 のアルカン - 1, 1 - ジイル基として、例えば、メタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 1 - ジイル基をあげることができる。C 4 ~ C 6 のアルキレン基として、例えば、テトラメチレン基 (ブタン - 1, 4 - ジイル基)、ペンタメチレン基 (ペンタン - 1, 5 - ジイル基) をあげることができる。

【 0 0 2 2 】

上記の式中、R 3 及び R 4 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基とすることができる、あるいは R 3 及び R 4 が一体となって、C 1 ~ C 6 のアルカン - ジイル基を形成することができる。C 1 ~ C 4 のアルキル基は、例えば C 1 ~ C 3、C 1 ~ C 2 のアルキル基とすることができる。アルカン - ジイル基としては、例えば、C 1 ~ C 3 のアルカン - 1, 1 - ジイル基、C 4 ~ C 6 のアルキレン基をあげることができる。R 3 と R 4 の組み合わせとして、例えば、水素原子と水素原子、水素原子とメチル基、水素原子とエチル基、メチル基とメチル基、メチル基とエチル基、エチル基とエチル基をあげることができる。C 1 ~ C 3 のアルカン - 1, 1 - ジイル基として、例えば、メタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 1 - ジイル基をあげることができる。C 4 ~ C 6 のアルキレン基として、例えば、テトラメチレン基 (ブタン - 1, 4 - ジイル基)、ペンタメチレン基 (ペンタン - 1, 5 - ジイル基) をあげることができる。

【 0 0 2 3 】

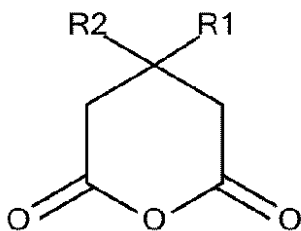
上記の式中、R 5 及び R 6 は、それぞれ独立に、水素原子又は C 1 ~ C 4 のアルキル基とすることができる、あるいは R 5 及び R 6 が一体となって、C 1 ~ C 6 のアルカン - ジイル基を形成することができる。C 1 ~ C 4 のアルキル基は、例えば C 1 ~ C 3、C 1 ~ C 2 のアルキル基とすることができる。アルカン - ジイル基としては、例えば、C 1 ~ C 3 のアルカン - 1, 1 - ジイル基、C 4 ~ C 6 のアルキレン基をあげることができる。R 5 と R 6 の組み合わせとして、例えば、水素原子と水素原子、水素原子とメチル基、水素原子とエチル基、メチル基とメチル基、メチル基とエチル基、エチル基とエチル基をあげることができる。C 1 ~ C 3 のアルカン - 1, 1 - ジイル基として、例えば、メタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 1 - ジイル基をあげることができる。C 4 ~ C 6 のアルキレン基として、例えば、テトラメチレン基 (ブタン - 1, 4 - ジイル基)、ペンタメチレン基 (ペンタン - 1, 5 - ジイル基) をあげることができる。

【 0 0 2 4 】

好適な実施の態様において、上記の式中、R 1 及び R 2 を上述の基として、R 3、R 4、R 5、R 6 を水素原子とすることができる。すなわち、次の式 I I で表される G A 誘導体とすることができる。

【 0 0 2 5 】

【 化 5 】



式 (I I)

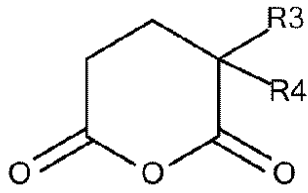
【 0 0 2 6 】

好適な実施の態様において、上記の式中、R 3 及び R 4 を上述の基として、R 1、R 2、R 5、R 6 を水素原子とすることができる。すなわち、次の式で表される G A 誘導体とすることができる。この G A 誘導体は、言うまでもなく、上記の式中、R 5 及び R 6 を上

述の基として、R 1、R 2、R 3、R 4 を水素原子とした G A 誘導体と等価である。

【 0 0 2 7 】

【 化 6 】



式 (111)

10

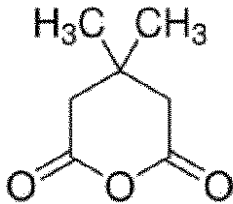
【 0 0 2 8 】

このような G A 誘導体として、具体的には、例えば、以下の構造の化合物をあげることができる：

【 0 0 2 9 】

3, 3 - ジメチルグルタル酸無水物 (D M G A) :

【 化 7 】

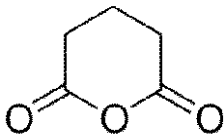


20

【 0 0 3 0 】

グルタル酸無水物 (G A) :

【 化 8 】

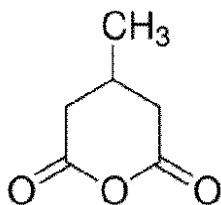


30

【 0 0 3 1 】

3 - メチルグルタル酸無水物 (M G A) :

【 化 9 】

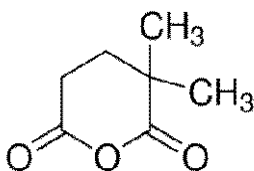


40

【 0 0 3 2 】

2, 2 - ジメチルグルタル酸無水物 :

【 化 1 0 】

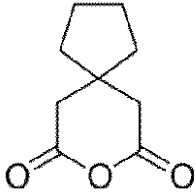


【 0 0 3 3 】

3, 3 - テトラメチレングルタル酸無水物 :

50

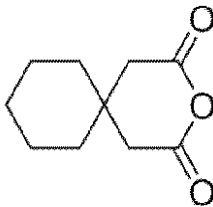
【化 1 1】



【 0 0 3 4】

3 - オキサスピロ [5 , 5] ウンデカン - 2 , 4 - ジオン (3 , 3 - ペンタメチレングルタル酸無水物) : 10

【化 1 2】



【 0 0 3 5】

20

[DMGA - PLL]

好適な実施の態様において、3,3-ジメチルグルタル酸無水物 (DMGA) が、ポリ - L - リジンの側鎖のアミノ基と反応して、カルボキシル化した両性高分子化合物 (DMGA - PLL) を得ることができる。

【 0 0 3 6】

[動物細胞凍結保存液]

本発明の動物細胞凍結保存液は、上記動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤を含有する生理溶液である。生理溶液としては、特に制限はなく、例えば、公知の組成の生理食塩水、PBS、細胞培養培地等をあげることができる。動物細胞凍結保存液に含有される動物細胞凍結保存液用ガラス化状態安定化剤は、例えば2~40重量%、3~30重量%、5~20重量%とすることができる。あるいは、両性高分子の分子量が2000~20000の場合に、例えば1~100mM、5~50mM、10~30mMの濃度とすることができる。 30

【 0 0 3 7】

[スクロース]

好適な実施の態様において、動物細胞凍結保存液には、スクロースが、含有される。スクロースの含有量は、例えば0.1~1M、0.3~0.6Mの範囲とすることができる。

【 0 0 3 8】

[エチレングリコール、プロピレングリコール]

好適な実施の態様において、動物細胞凍結保存液には、エチレングリコール (EG) 又はプロピレングリコール (PG) が含有され、好ましくはエチレングリコールが含有される。エチレングリコール等は、動物細胞凍結保存液において有効な成分であるが、その含有量は細胞毒性の観点から少ないほうが好ましい。本発明によれば、この含有量を低減しつつ、十分に優れたガラス化能を実現することができるために、エチレングリコール濃度を、例えば3~8M、4~7M、4.5~7M、5~7M、4M以上、4.5M以上などの範囲から選択して使用することができる。 40

【 0 0 3 9】

[動物細胞凍結保存方法]

本発明の動物細胞凍結保存方法は、動物細胞凍結保存液中へ、動物細胞を浸漬する工程、動物細胞凍結保存液中の動物細胞を、降温して凍結する工程、を含む方法によって実施 50

することができる。

【0040】

好適な実施の態様において、動物細胞を、降温して凍結する工程の後に、凍結した、動物細胞凍結保存液中の動物細胞を、昇温して解凍する工程、を行うことができる。

【0041】

[降温と結晶化]

動物細胞の損傷を防ぐためには、降温して凍結する際に、凍結保存液に結晶化が生じることなく、ガラス化状態（アモルフォス状態）を維持したままで、凍結できることが好ましい。降温速度を大きくすれば結晶化が生じにくくなるが、降温速度の増大には、細胞の取り扱いについての制約の増大が伴うために、熱容量が大きく熱伝導が不均一な三次元細胞構造体、組織、臓器等では、降温速度の増大によるひび割れ、クラックの形成などによる組織の破壊などのため、困難な選択肢となる。本発明によれば、例えば5 /分～50 /分、10 /分～30 /分の範囲の降温速度から選択して、結晶化を生じることなく、ガラス化状態で凍結することができる。結晶化の発生の有無は、実施例に示すDSC測定によって、検出することができる。

10

【0042】

[昇温と再結晶化]

動物細胞をいったんガラス化状態で凍結しても、昇温して解凍する際に、ガラス化状態が破れて、凍結保存液の再結晶化が生じてしまうことがあり、動物細胞の凍結保存による損傷を防ぐためには、この再結晶化を防いで、解凍できることが好ましい。昇温速度を大きくすれば再結晶化が生じにくくなるが、昇温速度の増大には、降温速度と同様に、細胞の取り扱いについての制約の増大が伴うために、熱容量が大きく熱伝導が不均一な三次元細胞構造体、組織、臓器等では、昇温速度の増大によるひび割れ、クラックの形成などによる組織の破壊などのため、困難な選択肢となる。本発明によれば、例えば5 /分～100 /分、5 /分～50 /分、10 /分～50 /分の範囲の昇温速度から選択して、再結晶化を生じることなく、ガラス化状態を維持して解凍することができる。再結晶化の発生の有無は、実施例に示すDSC測定によって、検出することができる。

20

【0043】

[ガラス化能]

本発明におけるガラス化能とは、ガラス状態を維持して結晶化を防ぐ能力であり、例えば、降温時に結晶化を防ぐ能力、あるいは昇温時に再結晶化を防ぐ能力のいずれであってもよく、両方であってもよい。降温時又は昇温時のいずれかにおける能力が優れていれば、優れたガラス化能を有することとなる。優れたガラス化能を備えた動物細胞凍結保存液を使用すれば、熱容量が大きく熱伝導が不均一な三次元細胞構造体、組織、臓等に対しても、良好な凍結保存を可能とするので、本発明の動物細胞凍結保存液は、三次元細胞構造体、組織、臓器等の形態の動物細胞に対する使用に好適なものである。そのために、本発明の動物細胞凍結保存液によれば、動物細胞を高い生存率で、凍結することができ、保存することができ、解凍することができる。

30

【実施例】

【0044】

以下に実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。本発明は、以下に例示する実施例に限定されるものではない。なお、実施例中、特にことわりのない限り「%」及び「部」はそれぞれ重量%及び重量部を示す。

40

【0045】

[COOH-PLLの合成]

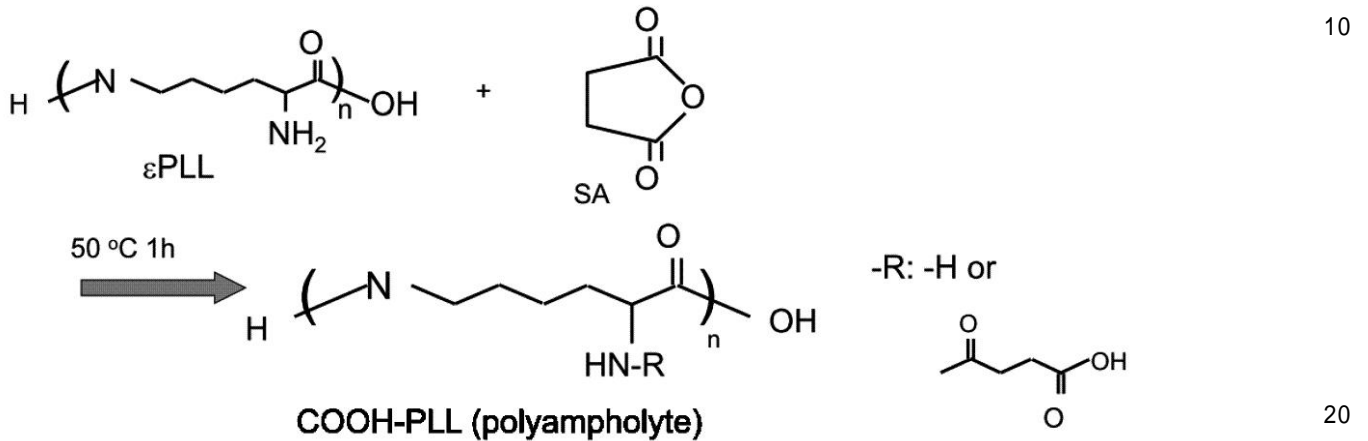
無水コハク酸(SA、東京化成)を、ポリリジン(25%水溶液、JNC、平均分子量4000)のアミノ基に対して、15～50mol%(あるいは15～65mol%)となるように添加し、50 で1時間反応させ、カルボキシル化ポリリジン(COOH-PLL)を作成した。なお、出発材料であるポリリジン(PLL)の量に換算して10重量%の濃度で使用した場合に、PLLの平均分子量4000の値から25mMに相

50

当するので、例えば、COOH-PLLの濃度の表記としてPLL換算10重量%となる場合には、以下では25mMと表記することがある。このカルボキシル化ポリリジンは、以下において、SA-PLL、又はCOOH-PLLと記載することがある。特に記載がない場合には、COOH-PLLのカルボキシル基導入量はポリリジンの側鎖のアミノ基に対して65%であり、これをPLL(0.65)又はSA(65)-PLLと記載することがある。このCOOH-PLLの合成の反応式を、以下に示す。

【0046】

【化13】



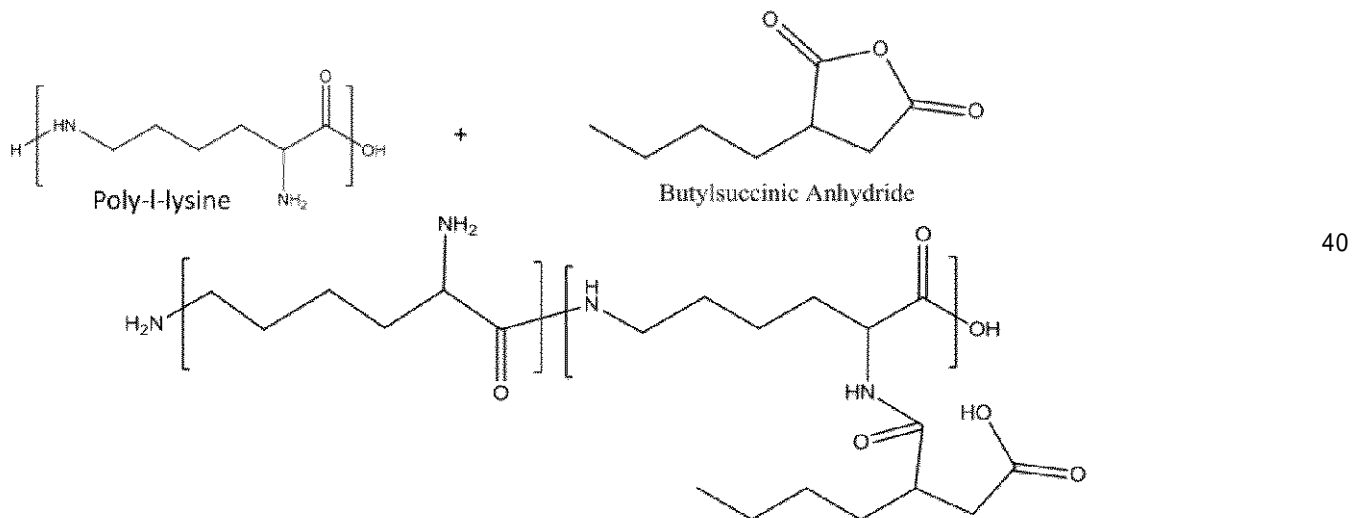
【0047】

【BSA-PLLの合成】

ブチル無水コハク酸(BSA、東京化成)を、ポリリジン(25%水溶液、JNC、平均分子量4000)のアミノ基に対して、15~50mol%(あるいは15~65mol%)となるように添加し、50で1時間反応させ、ブチルカルボキシル化ポリリジン(BSA-PLL)を作成した。なお、出発材料であるポリリジン(PLL)の量に換算して10重量%の濃度で使用した場合に、PLLの平均分子量4000の値から25mMに相当するので、例えば、BSA-PLLの濃度の表記としてPLL換算10重量%となる場合には、以下では25mMと表記することがある。このBSA-PLLの合成の反応式を、以下に示す。上段が反応物、下段が生成物である。

【0048】

【化14】



【0049】

【BSA-SA-PLLの合成】

ポリリジン（25%水溶液、JNC、平均分子量4000）のアミノ基に対して、上記ブチル無水コハク酸によるブチル化に加えて、上記無水コハク酸（SA）によるカルボキシル化を行って、ブチルカルボキシル化 - カルボキシル化 - ポリリジン（BSA - SA - PLL）を作成した。後述する略号中のカッコ内の数字は、ポリリジンのアミノ基に対するそれぞれのカルボキシル基の導入率を示す。例えばBSA（35） - SA（30） - PLLは、ポリリジンのアミノ基のうち、35%をBSAと反応させ、30%をSAと反応させた両性電解質ポリマーを示す。トータルカルボキシル基導入量を65%とした。他にBSA（15） - SA（50） - PLL、BSA（50） - SA（15） - PLLも合成した。なお、単にBSA - PLLと表記した場合には、50%をBSA - PLLのみ置換したBSA（50） - PLLであり、SAと反応させていないものである。なお、出発材料であるポリリジン（PLL）の量に換算して10重量%の濃度で使用した場合に、PLLの平均分子量4000の値から25mMに相当するので、例えば、BSA - SA - PLLの濃度の表記としてPLL換算10重量%となる場合には、以下では25mMと表記することがある。

10

【0050】

[DMGA - PLLの合成]

3,3-ジメチルグルタル酸無水物（DMGA、シグマアルドリッチ）を、ポリリジン（25%水溶液、JNC、平均分子量4000）のアミノ基に対して、15 - 50mol%（あるいは15 - 65mol%）となるように添加し、50℃で1時間反応させ、ジメチルグルタルカルボキシル化ポリリジン（DMGA - PLL）（3,3ジメチル無水グルタル化ポリリジン）を作成した。なお、出発材料であるポリリジン（PLL）の量に換算して10重量%の濃度で使用した場合に、PLLの平均分子量4000の値から25mMに相当するので、例えば、DMGA - PLLの濃度の表記としてPLL換算10重量%となる場合には、以下では25mMと表記することがある。この3,3-ジメチルグルタル酸無水物（DMGA）の構造式を以下に示す。（このDMGA - PLLの合成の反応式を、以下に示す。なお、DMGA - PLLの構造式中の2種類の繰り返し単位は、

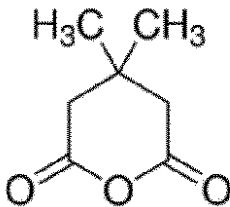
20

ポリリジンの鎖中にDMGAによる修飾反応がなされた結果として、必ずしも規則的あるいは周期的に出現するものではなく、ポリマーの鎖中に存在する割合のみを規定することが通常であることを当業者は理解している。つまり、繰り返しの値X及びYは、分子内における各部分構造のモル分率を意味する。Y / (X + Y)の比率は、DMGAによって修飾された繰り返し単位の含有率であり、例えば0.5 ~ 0.70、0.5 ~ 0.65の範囲とすることができる。)

30

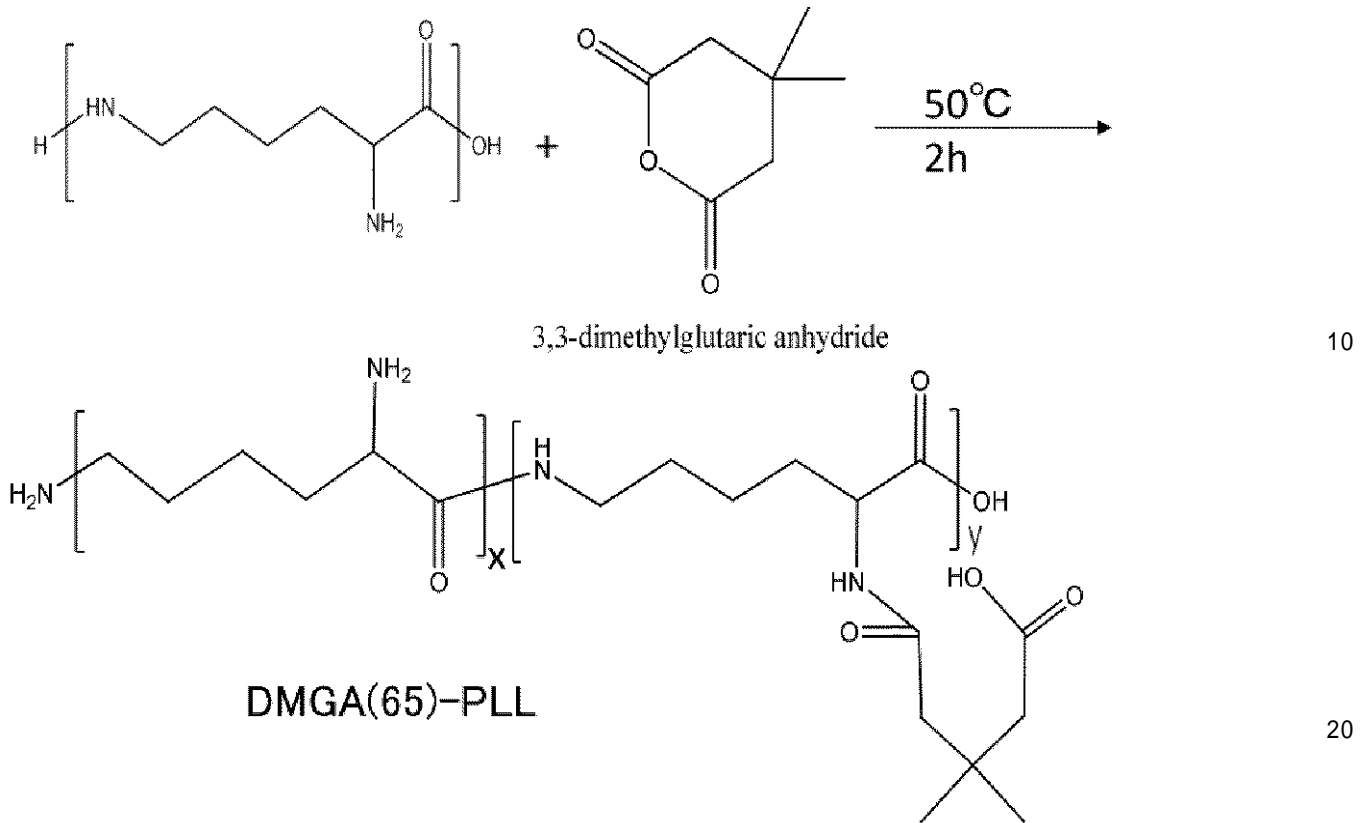
【0051】

【化15】



40

【0052】



10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

[ガラス化液の調製]

エチレングリコール (EG) とスクロースの混合溶液 (リン酸緩衝液 PBS 溶液) をベースとし、各カルボキシル化ポリリジン を最終 12.5 mM となるように調整したガラス化液を作成した。スクロースの濃度は 0.5 M で固定し、EG の濃度を 4 - 6.5 M まで変えた。

【 0 0 5 4 】

[DSC 測定]

示差走査熱量計 (DSC) (セイコーインスツル社製、製品名 DSC6200) による各ガラス化液の評価を以下のように行った。

【 0 0 5 5 】

各ガラス化液を、10 μ L、DSC 用のアルミパンに乗せ、液体窒素によって、10 / min で温度を -120 度まで下げていき、DSC 測定のグラフのピークの有無から結晶化の有無を確認した。さらにそこから 10 / min で室温まで昇温し、DSC 測定のグラフのピークの有無から再結晶化の有無を確認した。

【 0 0 5 6 】

[比較例 1]

[DSC による従来のガラス化液の再結晶化評価]

従来のガラス化液の特性を、液体窒素でいったん凍結した後に、上記の DSC 測定の手順で、ただし 50 / min の昇温速度として、評価した。従来のガラス化液としては、以下のものを使用した。これらの DSC 測定結果を図 1 に示す。

- ・ DAP213 : DMSO 2 M、アセトアミド 1 M、プロピレングリコール 3 M を含む水溶液
- ・ EG 6.5 M - Suc 0.75 M : エチレングリコール 6.5 M、スクロース 0.75 M を含む水溶液
- ・ EG 6.5 M - Suc 0.75 M - PLL (0.65) 10% : エチレングリコール 6.5 M、スクロース 0.75 M、SA (65) - PLL 10 重量% を含む水溶液

【 0 0 5 7 】

図1は昇温速度50 /minでの従来のガラス化液のDSCの測定の結果を示すグラフである。DAPは再結晶化が生じたことを示す発熱ピークが観察された。EG6.5M - Suc0.75Mでも、同様に再結晶化が生じたことを示す発熱ピークが観察された。グラフにおいて確認の便宜のために、これらの発熱のピークを楕円で囲んだ。PLL(0.65)を添加したガラス化液、すなわちEG6.5M - Suc0.75M - PLL(0.65)10%では、再結晶化が生じたことを示す発熱ピークが観察されなかった。

【0058】

[実施例1]

[DSCによるガラス化液の結晶化試験]

各ガラス化液の結晶化の特性を、上記のDSC測定の手順(ただし、降温速度10 /min、昇温速度10 /min)によって、評価した。ガラス化液としては、以下のものを使用した。DSC測定結果を、図2a(COOH-PLL)、図2b(BSA-PLL)、図2c(BSA(35)-SA(30)-PLL)にそれぞれ示す。

・COOH-PLL: SA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6M、スクロース 0.5M を含む水溶液

・BSA-PLL: BSA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6M、スクロース 0.5M を含む水溶液

・BSA(35)-SA(30)-PLL: BSA(35)-SA(30)-PLL 25mM、エチレングリコール 6M、スクロース 0.5M を含む水溶液

【0059】

図2aは、COOH-PLLによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程(グラフの上半分)において、-70 ~ -80 付近で、結晶化を示すピークが観察された。すなわち、降温によって結晶化が生じた。

【0060】

図2bは、BSA-PLLによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程(グラフの上半分)において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

【0061】

図2cは、BSA(35)-SA(30)-PLLによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程(グラフの上半分)において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

【0062】

[実施例2]

[DSCによるガラス化液の結晶化試験]

各ガラス化液の結晶化の特性を、上記のDSC測定の手順(ただし、降温速度10 /min、昇温速度10 /min)によって、評価した。ガラス化液としては、以下のものを使用した。これらは、実施例1のBSA-PLLにおいて、エチレングリコール濃度を、6Mから、それぞれ5M及び4.5Mへと減少させたガラス化液である。DSC測定結果を、図3a(BSA-PLL、EG5M)、図3b(BSA-PLL、EG4.5M)にそれぞれ示す。

・BSA-PLL、EG5M: BSA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

・BSA-PLL、EG4.5M: BSA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 4.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

【0063】

図3aは、BSA-PLL、EG5Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程(グラフの上半分)において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

10

20

30

40

50

【0064】

図3bは、BSA-PLL、EG4.5Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程（グラフの上半分）において、結晶化を示すピークが観察された。

【0065】

[実施例3]

[DSCによるガラス化液の結晶化試験]

各ガラス化液の結晶化の特性を、上記のDSC測定の手順（ただし、降温速度10/min、昇温速度10/min）によって、評価した。ガラス化液としては、以下のものを使用した。これらは、実施例1のBSA(35)-SA(30)-PLLにおいて、エチレングリコール濃度を、6Mから、5.5Mへと減少させたガラス化液である。DSC測定結果を、図4(BSA(35)-SA(30)-PLL、EG5.5M)に示す。
 ・BSA(35)-SA(30)-PLL： BSA(35)-SA(30)-PLL 25mM、エチレングリコール 5.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

10

【0066】

図4は、BSA(35)-SA(30)-PLL、EG5.5Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程（グラフの上半分）において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

20

【0067】

[実施例4]

[DSCによるガラス化液の再結晶化試験]

各ガラス化液の結晶化の特性を、上記のDSC測定の手順（ただし、降温速度10/min、昇温速度40/min）によって、評価した。ガラス化液としては、以下のものを使用した。DSC測定結果を、図5a(COOH-PLL)、図5b(BSA-PLL)、図5c(BSA(35)-SA(30)-PLL)にそれぞれ示す。

・COOH-PLL： SA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

・BSA-PLL： BSA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6M、スクロース 0.5M を含む水溶液

30

・BSA(35)-SA(30)-PLL： BSA(35)-SA(30)-PLL 25mM、エチレングリコール 6.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

【0068】

図5aは、COOH-PLLによるガラス化液のDSC測定による再結晶化評価の結果を示すグラフである。昇温過程（グラフの下半分）において、-50~-20付近で、再結晶化を示すピークが観察された。すなわち、昇温によって再結晶化が生じた。

【0069】

図5bは、BSA-PLLによるガラス化液のDSC測定による再結晶化評価の結果を示すグラフである。昇温過程（グラフの下半分）において、再結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、昇温によって再結晶化が生じることなく、ガラス化状態から液体状態へと移行した。

40

【0070】

図5cは、BSA(35)-SA(30)-PLLによるガラス化液のDSC測定による再結晶化評価の結果を示すグラフである。昇温過程（グラフの下半分）において、再結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、昇温によって再結晶化が生じることなく、ガラス化状態から液体状態へと移行した。

【0071】

[実施例5]

[細胞生存率試験]

各ガラス化液の細胞毒性を以下の細胞生存率試験によって評価した。

50

【0072】

MSC (間葉系幹細胞) (理研バイオリソースセンター) をシャーレで培養して、細胞シートを調製した。次に、調製した細胞シートを以下に示す各ガラス化液に0 で20分間浸漬した。その後、細胞シートをTripa Blue染色した後に、倒立位相差顕微鏡で観察して、生存率を測定した。

【0073】

次のガラス化液について得られた結果を図6aに示す。

- ・BSA-PLL: BSA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 5M、スクロース 0.5M を含む水溶液
- ・COOH-PLL: SA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液
- ・Control: エチレングリコール 5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

10

【0074】

次のガラス化液について得られた結果を図6bに示す。

- ・BSA-SA-PLL: BSA(35)-SA(30)-PLL 25mM、エチレングリコール 5.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液
- ・COOH-PLL: SA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6.5M、スクロース 0.5M を含む水溶液
- ・Control: エチレングリコール 5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

20

【0075】

図6a及び図6bは、各ガラス化液による細胞生存率を示すグラフである。BSA-SA-PLLは、BSA-PLLよりも細胞生存率が向上して、COOH-PLL及びControlを超える値となっていた。

【0076】

[実施例1~5及び比較例1の結果のまとめ]

無水コハク酸のみで65%カルボキシル化したCOOH-PLLでは、降温過程で結晶化を抑制するのに必要なEGの濃度は6.5M必要であったが、BSA-PLLではEGを5Mまで下げてもガラス化が可能であった。BSA-PLLのガラス化能の高さが確認された。

30

【0077】

BSA(35)-SA(30)-PLLを使用した場合、EGの濃度が5.5Mまで下げてもガラス化を確認できた。BSAが多い方がガラス化能は高いが、細胞生存率がやや減少する(細胞毒性がやや大きくなる)傾向にあるが、BSA(35)-SA(30)-PLLは十分に細胞生存率が大きかった。

【0078】

昇温過程では、40/minにすると、COOH-PLLでは再結晶化が見られていたところ、BSA-PLLでは再結晶化のピークも消失した。このように、BSA-PLLでは、再結晶化も抑制されることが分かり、ガラス状態の安定性が確認された。

【0079】

[実施例6]

40

[DSCによるガラス化液の結晶化試験]

各ガラス化液の結晶化の特性を、上記のDSC測定の手順(ただし、降温速度10/min、昇温速度10/min)によって、評価した。ガラス化液としては、以下のものを使用した。DSC測定結果を、図7a(DMGA-PLL、EG6M)、図7b(DMGA-PLL、EG5M)、図7c(DMGA-PLL、EG4.5M)、図7d(DMGA-PLL、EG4M)にそれぞれ示す。

- ・DMGA-PLL、EG6M: DMGA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 6M、スクロース 0.5M を含む水溶液
- ・DMGA-PLL、EG5M: DMGA(65)-PLL 25mM、エチレングリコール 5M、スクロース 0.5M を含む水溶液

50

・DMGA-PLL、EG 4.5 M : DMGA (65) - PLL 25 mM、エチレングリコール 4.5 M、スクロース 0.5 M を含む水溶液

・DMGA-PLL、EG 4 M : DMGA (65) - PLL 25 mM、エチレングリコール 4 M、スクロース 0.5 M を含む水溶液

【0080】

図7aは、DMGA-PLL、EG 6 Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程（グラフの上半分）において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

【0081】

図7bは、DMGA-PLL、EG 5 Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程（グラフの上半分）において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

【0082】

図7cは、DMGA-PLL、EG 4.5 Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程（グラフの上半分）において、結晶化を示すピークは観察されなかった。すなわち、降温によって結晶化が生じることなく、ガラス化状態が得られた。

【0083】

図7dは、DMGA-PLL、EG 4 Mによるガラス化液のDSC測定による結晶化評価の結果を示すグラフである。降温過程（グラフの上半分）において、-50 ~ -60 付近で、結晶化を示すピークが観察された。

【0084】

[実施例7]

実施例7として、後述する実験を行った。特に記載のない限り、その他の条件は実施例1と同様にして行った。

【0085】

[ガラス化液の調製]

エチレングリコール(EG)とスクロースの混合溶液(PBS)をベースとし、各カルボキシル化ポリリジン(PLL)を最終25mMになるように調整したガラス化液を作成した。スクロース(Su)の濃度は0.5Mで固定し、EGの濃度を4Mから6.5Mまで変えた。使用したガラス化液の組成は、以下の通りである：

- ・Control : Su0.5M, EG6.5M : 図8
- ・SA-PLL (COOH-PLL) 25mM, Su0.5M, EG6.5M : 図9
- ・COOH-PLL25mM, Su0.5M, EG5.5M : 図10a
- ・COOH-PLL25mM, Su0.5M, EG5M : 図10b
- ・BSA-PLL25mM, Su0.5M, EG5M : 図11a
- ・BSA-PLL25mM, Su0.5M, EG4.5M : 図11b
- ・DMGA-PLL 25mM, Su0.5M, EG4.5M : 図12a
- ・DMGA-PLL 25mM, Su0.5M, EG4M : 図12b
- ・COOH-PLL 25mM, Su0.5M, EG6M : 図13a
- ・BSA-PLL 25mM, Su0.5M, EG6M : 図13b
- ・DMGA-PLL 25mM, Su0.5M, EG6M : 図13c

【0086】

[DSC測定]

各ガラス化液の評価を以下の様に行った。

各ガラス化液を10 μ L、DSC用のアルミパンに載せ、液体窒素によって10 /minで温度を-170 まで下げていき、結晶化およびガラス化の有無を確認した。さらにそこから10 /minで室温まで昇温し、再結晶化の有無を確認した。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 7 】

図 8 はガラス化液としてポリマー無しのEG6.5M、スクロース0.5Mの溶液、図 9 はガラス化液としてCOOH-PLL25mM、EG6.5M、スクロース0.5M溶液を10 /minで降温、昇温した時のDSCカーブである。図 8 より、ポリマーが無い時は-90 付近に結晶化のピークが、-30 付近に融解のピークが見られた。一方、COOH-PLLを添加した際は、結晶化のピークが見られず、-130 付近にガラス転移点が見られ、ガラス化していることが示された。また、昇温時には-60 付近に再結晶化のピークも確認された。

【 0 0 8 8 】

図 1 0 a と図 1 0 b は、COOH-PLL添加ガラス化液のEGの濃度を5.5Mおよび5.0Mに低下させた時の結果であるが、5.5Mではガラス化が確認されたが、5Mでは結晶化のピークが見られた。COOH-PLLの結晶化抑制効果はEG5.5M以上で発揮されることが確認できた。

10

【 0 0 8 9 】

一方で、図 1 1 a、図 1 1 b からBSA-PLLの結晶化抑制EG濃度は5Mであり、図 1 2 a、図 1 2 b よりDMGA-PLLの結晶化抑制EG濃度は4.5Mとなった。BSA-PLLの結晶化抑制効果はEG5M以上で発揮されることが確認できた。一方、DMGA-PLLの結晶化抑制効果はEG4.5M以上で発揮されることが確認できた。これらの結果から、合成して比較したポリマー中で、DMGA-PLLが最も高い結晶化抑制効果を持つことが確認できた。

【 0 0 9 0 】

図 1 3 a、図 1 3 b、図 1 3 c に、3種のポリマーのEG6.0M、スクロース0.5M溶液のDSC結果を示す。すべてのポリマーにおいてこの濃度のEGでは結晶化は起こらず、ガラス化していることが確認される。一方、図 1 3 a、図 1 3 b から、COOH-PLLとBSA-PLLでは昇温時に再結晶化が見られたのに対し、図 1 3 c からはDMGA-PLLでは再結晶化も見られなかった。これらの結果より、DMGA-PLLでは結晶化抑制効果、再結晶化抑制効果ともに、他のポリマーよりも効果が高いことが確認された。

20

【 0 0 9 1 】

[実施例 8]

[細胞生存率試験]

次に、これらポリマーを使用したガラス化液でヒト間葉系幹細胞(MSC)(理研バイオリソースセンター)シートをガラス化保存して、細胞の生存率を確認する実験を、後述の手順で行った。この実験の手順の概要を示す説明図を、スキーム 1 として示す。使用したガラス化液の組成は、以下の通りである：

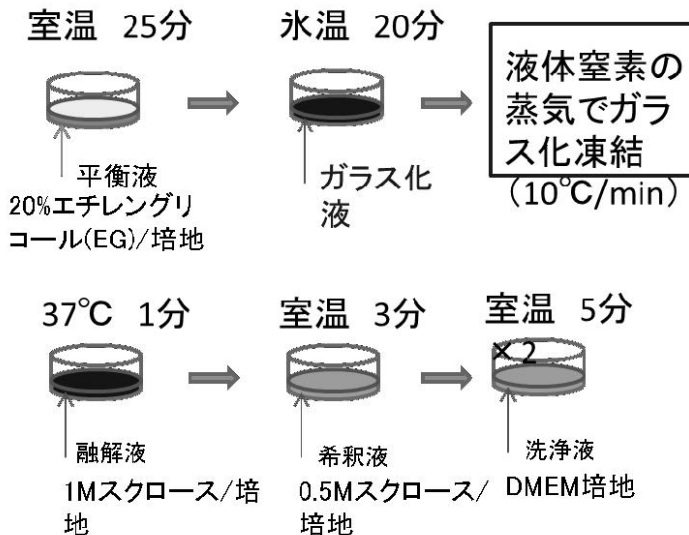
30

- ・ control: EG6M, Su0.5M : 図 1 4 a
- ・ COOH-PLL: COOH-PLL25mM, EG6M, Su0.5M : 図 1 4 b
- ・ BSA-PLL: BSA-PLL25mM, EG6M, Su0.5M : 図 1 4 c
- ・ DMGA-PLL: DMGA-PLL25mM, EG6M, Su0.5M : 図 1 4 d
- ・ control: EG6M, Su0.5M : 図 1 5 の a
- ・ COOH-PLL: COOH-PLL25mM, EG6M, Su0.5M : 図 1 5 の b
- ・ BSA-PLL: BSA-PLL25mM, EG6M, Su0.5M : 図 1 5 の c
- ・ DMGA-PLL: DMGA-PLL25mM, EG6M, Su0.5M : 図 1 5 の d

【 0 0 9 2 】

スキーム 1 :

40



10

【0093】

MSCは10%ウシ胎児血清添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を使用し、37 °C のインキュベータ中で培養した。3.5cm細胞培養用シャーレ (IWAKI) にコンフルエントになった後、1週間継続して培養した細胞シートを実験に用いた。

培養液を除去した後、MSCシートに20% EG/DMEM溶液を2mL添加し、室温で25分放置し、平衡化させた。その後、溶液を除去した後、氷温で各ガラス化液を500 μ L添加し、20分放置後、液体窒素蒸気から1cmの地点にシャーレを維持し、凍結した。このときの液体窒素蒸気からの距離で凍結スピードを制御することが可能であり、蒸気から1cmの地点では約10 $^{\circ}$ C/minの凍結スピードが得られることが分かっている。その後、蒸気雰囲気下で10分放置し、十分固化した後、液体窒素の浸漬し、凍結を完了させた。続いて解凍操作にうつった。解凍は、液体窒素から取り出したMSCシート培養ディッシュに37 $^{\circ}$ C に暖めた1Mスクロース/DMEMを3mL加え、1分後に除去した。次に0.5Mスクロース/DMEM溶液を3mL加え、3分後に除去した。続いてDMEMを3mL加え、5分後に除去を2回くり返し、最後はDMEMを2 mL添加して37 $^{\circ}$ C のインキュベーター中で培養にうつった。翌日、Live/Deadアッセイにより生存率を評価した。

20

30

【0094】

この実験の結果を図14a、図14b、図14c、図14dに示す。図14a~14dはそれぞれのガラス液を使用して上記手順で凍結解凍した細胞シートを二重染色した蛍光顕微鏡写真であり、視野の右下のバーは100 μ mを示す。Live/Deadアッセイによって、生細胞はCalseinAMで緑色に染色されており、死細胞はエチジウムホモダイマーで赤色に染色されている。図14a、図14b、図14c、図14dの視野中の生細胞 (緑色染色細胞) と死細胞 (赤色染色細胞) の数をそれぞれカウントして生存率を求めた。ポリマー無しのガラス化液 (図14a) では30%程度の生存率であったのに対し、COOH-PLLの系 (図14b) では75%、BSA-PLL系 (図14c) では55%、DMGA-PLL系 (図14d) では93%であった。この値を棒グラフにして、図15として示す。図15の横軸のa、b、c、dは、それぞれ図14のa、b、c、dに対応する。この結果から、DMGA-PLLの効果が高いことが確認された。

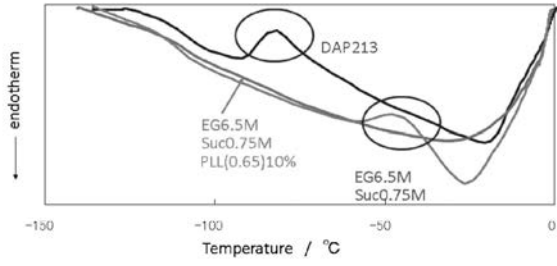
40

【産業上の利用可能性】

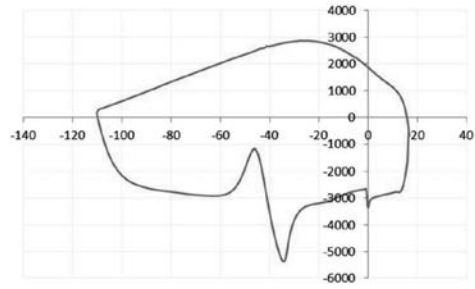
【0095】

本発明によれば、優れたガラス化能を有する動物細胞凍結保存液を得ることができる。本発明は産業上有用な発明である。

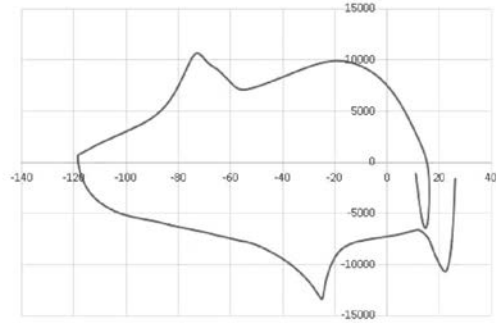
【 図 1 】



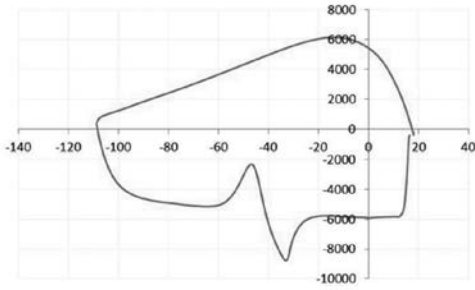
【 図 2 b 】



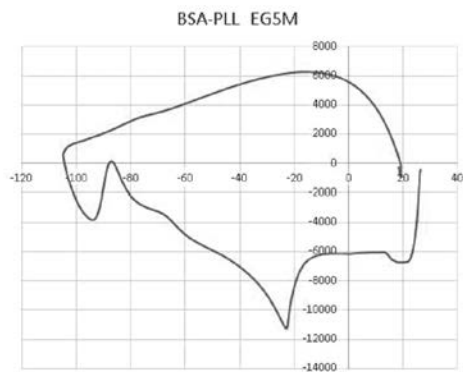
【 図 2 a 】



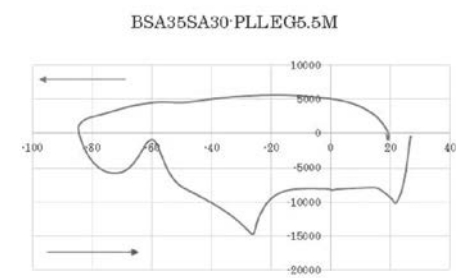
【 図 2 c 】



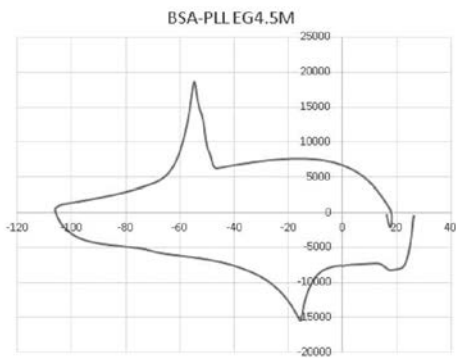
【 図 3 a 】



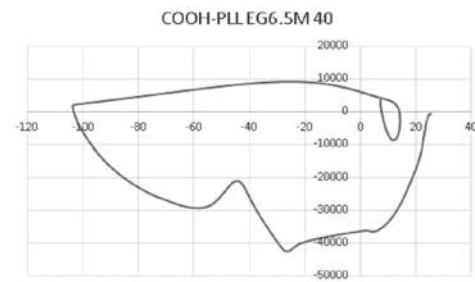
【 図 4 】



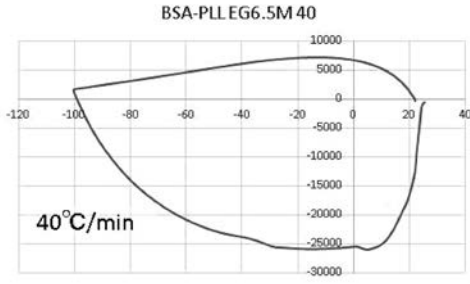
【 図 3 b 】



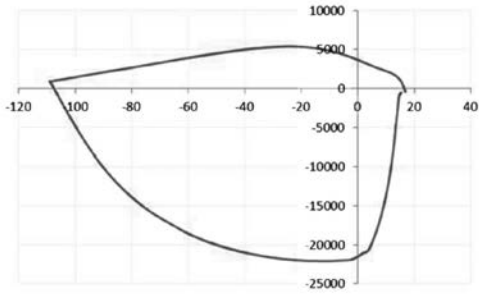
【 図 5 a 】



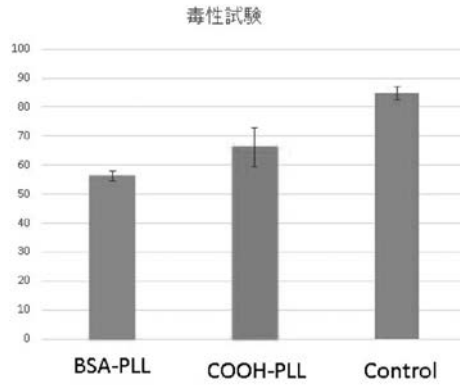
【 図 5 b 】



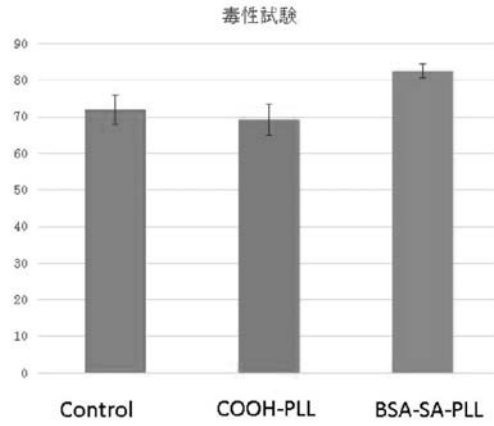
【 図 5 c 】



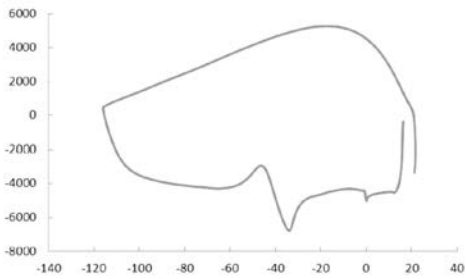
【 図 6 a 】



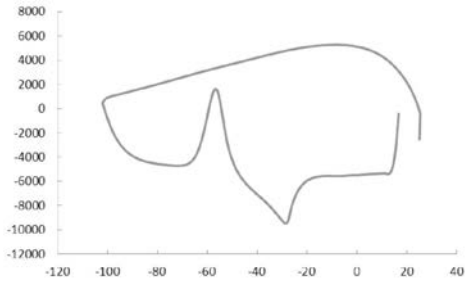
【 図 6 b 】



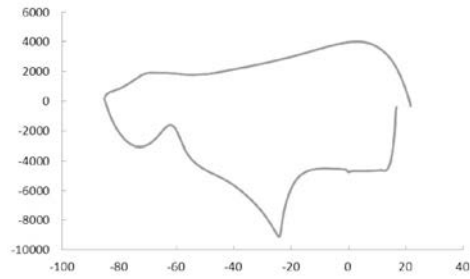
【 図 7 a 】



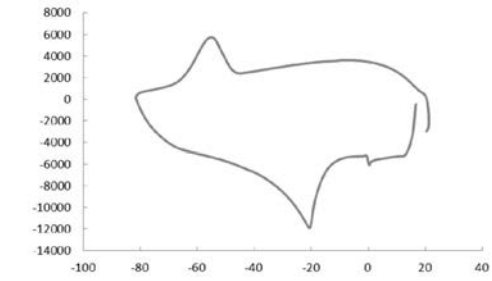
【 図 7 b 】



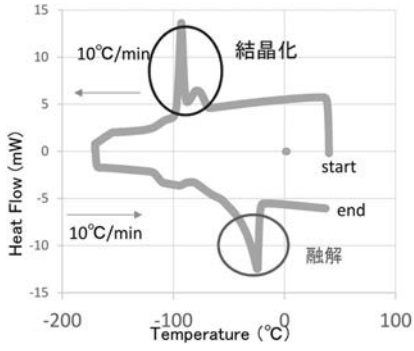
【 図 7 c 】



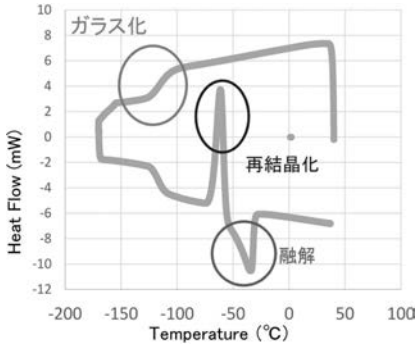
【 図 7 d 】



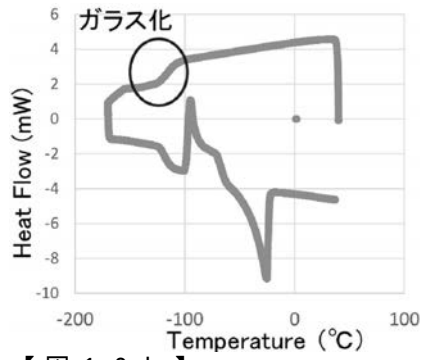
【 図 8 】



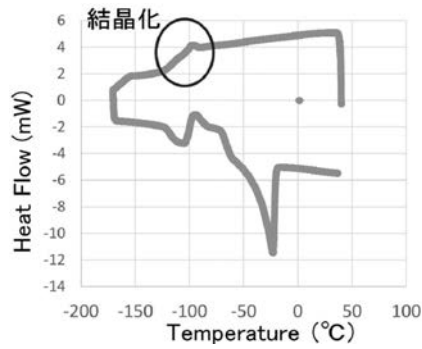
【 図 9 】



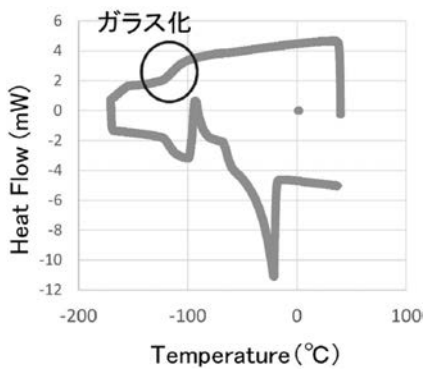
【 図 10 a 】



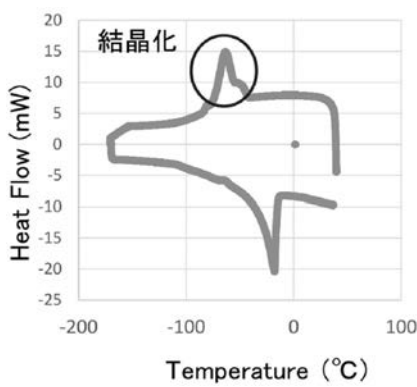
【 図 10 b 】



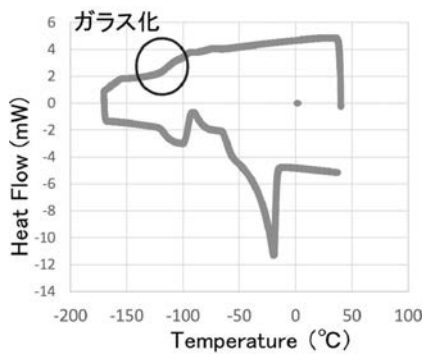
【 図 11 a 】



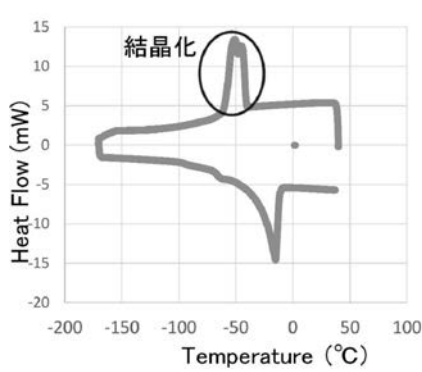
【 図 11 b 】



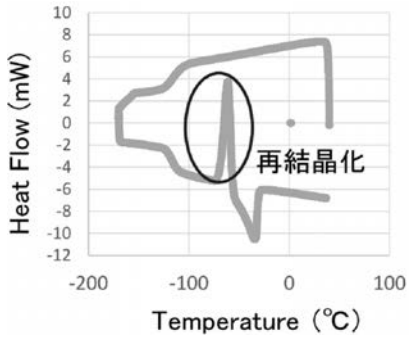
【 図 12 a 】



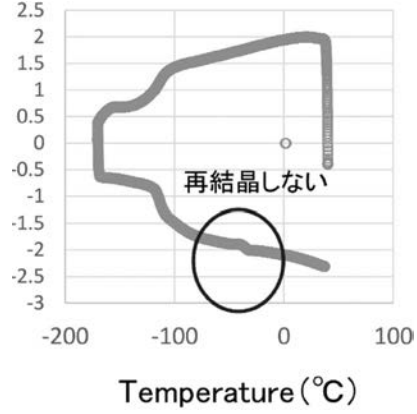
【 図 12 b 】



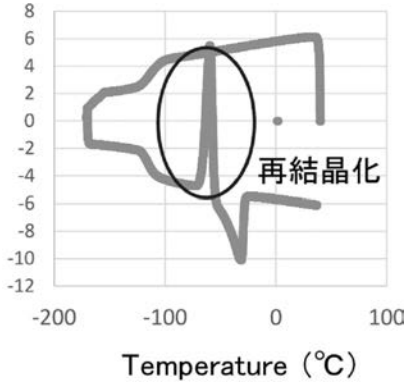
【 図 1 3 a 】



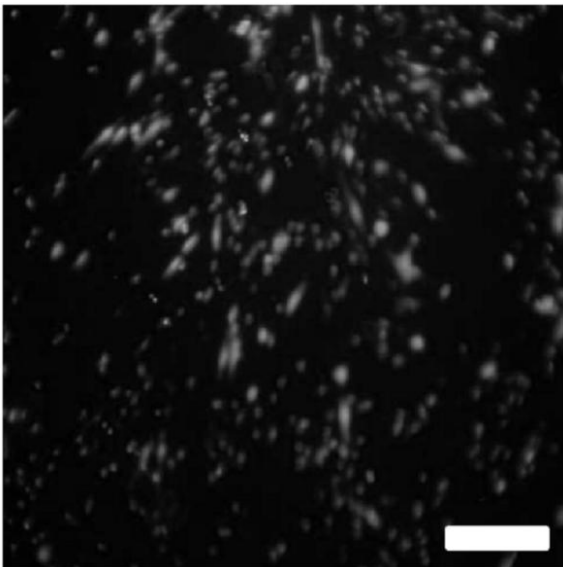
【 図 1 3 c 】



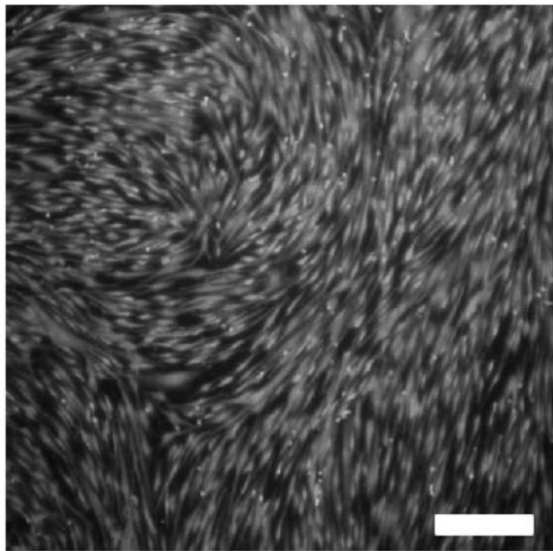
【 図 1 3 b 】



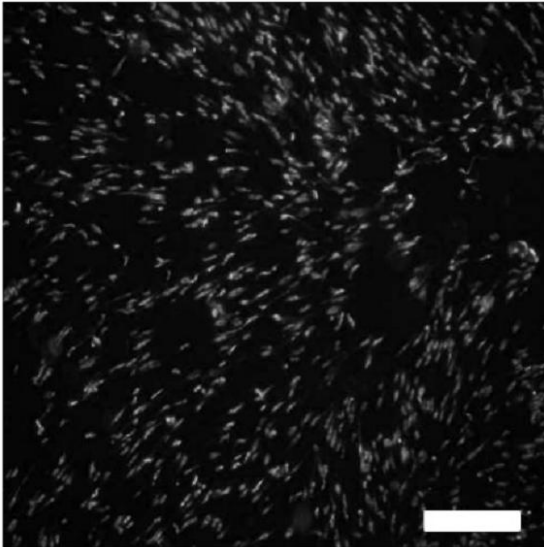
【 図 1 4 a 】



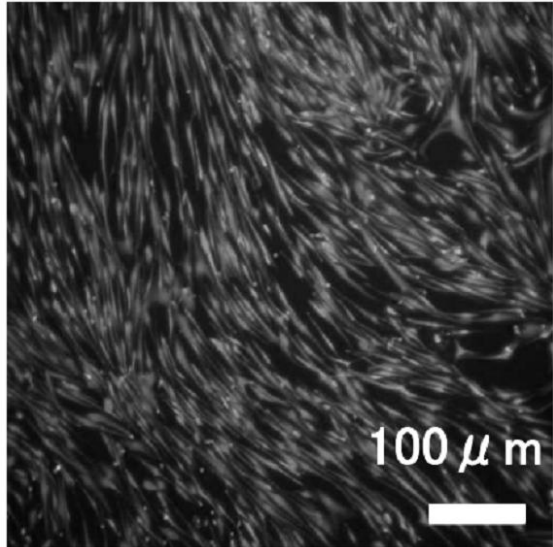
【 図 1 4 b 】



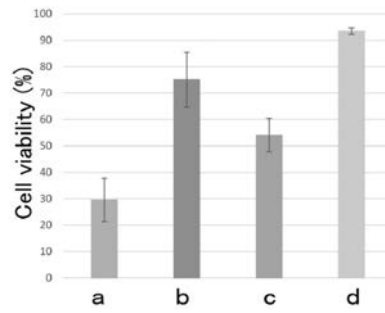
【 図 1 4 c 】



【 図 1 4 d 】



【 図 1 5 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B065 AA90X BD12 BD27 BD32 BD36 BD40 CA44