

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年4月2日(02.04.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/067434 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/04 (2006.01) *C12N 5/07* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/038185
- (22) 国際出願日: 2019年9月27日(27.09.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2018-182447 2018年9月27日(27.09.2018) JP
- (71) 出願人:テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目4番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者:大山 賢二(OYAMA, Kenji); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 大橋 文哉(OHASHI, Fumiya); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 葛和 清司 (KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023 東京都新宿区西新宿6丁目2番1号 西新宿三井ビルディング17階 葛和国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR CRYOPRESERVING CELLS

(54) 発明の名称: 細胞の凍結保存方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a method that is for cryopreserving cells for transplantation and that can be suitably used in treatment of various diseases, particularly heart disease; a method for culturing the cells thawed after being cryopreserved; a production method for a transplant including a sheet-like cultured product containing the cells for transplantation; a transplant produced by the method; a composition and medical product containing the transplant; a method for treating a disease using the transplant; etc. This method is for cryopreserving cells and is characterized by freezing a cell suspension containing cells for transplantation on a culture base material. This method is for culturing cells for transplantation and is characterized by incubating a cell population in a medium containing a cryoprotectant.

(57) 要約: 種々の疾患、特に心臓疾患の処置において好適に用いることができる移植用細胞の凍結保存方法および凍結保存後解凍した当該細胞の培養方法、当該移植用細胞を含むシート状細胞培養物を含む移植片の製造方法、当該方法で製造された移植片、当該移植片を含む組成物および医療製品、当該移植片を用いた疾患の処置方法などの提供を目的とする。培養基材上で、移植用細胞を含む細胞懸濁液を凍結させることを特徴とする、細胞の凍結保存方法および凍結保護剤を含む培地で細胞集団をインキュベートすることを特徴とする、移植用細胞の培養方法により、上記課題が解決された。



WO 2020/067434 A1

明 細 書

発明の名称：細胞の凍結保存方法

技術分野

[0001] 本開示は、種々の疾患、特に心臓疾患の処置において好適に用いることができる移植用細胞の凍結保存方法、当該移植用細胞の培養方法、当該移植用細胞を含む移植片の製造方法、当該方法で製造されたシート状細胞培養物を含む移植片、当該移植片を含む組成物および医療製品、当該移植片を用いた疾患の処置方法などに関する。

背景技術

[0002] 近年、損傷した組織等の修復のために、種々の細胞を移植する試みが行われている。例えば、狭心症、心筋梗塞などの虚血性心疾患により損傷した心筋組織の修復のために、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、ES細胞、iPS細胞等の利用が試みられている（非特許文献1）。

[0003] このような試みの一環として、スキャフォールドを利用して形成した細胞構造物や、細胞をシート状に形成したシート状細胞培養物が開発されてきた（特許文献1、非特許文献2）。

シート状細胞培養物の治療への応用については、火傷などによる皮膚損傷に対する培養表皮シートの利用、角膜損傷に対する角膜上皮シート状細胞培養物の利用、食道ガン内視鏡的切除に対する口腔粘膜シート状細胞培養物の利用などの検討が進められており、その一部は臨床応用の段階に入っている。

[0004] かかるシート状細胞培養物を臨床的に利用するためには、無菌的に製造および輸送される必要がある。しかしながら現状では、シート状細胞培養物等を使用するためには、使用する医療機関内において、無菌的に管理された細胞調製施設（CPC）などの大型の施設で、シート状細胞培養物等を無菌的に製造するほかなく、そのような施設を持たない医療機関等において手軽に

シート状細胞培養物等を利用することは困難であるのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2007-528755号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Haraguchi et al., Stem Cells Transl Med. 2012 Feb;1(2):136-41

非特許文献2：Sawa et al., Surg Today. 2012 Jan;42(2):181-4

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本開示は、種々の疾患、特に心臓疾患の処置において好適に用いることができる移植用細胞の凍結保存方法および凍結保存後解凍した当該細胞の培養方法、当該移植用細胞を含むシート状細胞培養物を含む移植片の製造方法、当該方法で製造された移植片、当該移植片を含む組成物および医療製品、当該移植片を用いた疾患の処置方法などの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上述のとおり、シート状細胞培養物などの移植細胞を含む移植片を使用するためには、医療機関等においてCPCなどの施設を有している必要がある。本発明者らは、CPCなどの施設を有しなくてもシート状細胞培養物等の使用を可能にするために研究する中で、移植用細胞の凍結保存から培養、移植片の製造を移送可能な閉鎖系容器内で実現できれば、簡便にシート状細胞培養物等の移植片を利用できるようになることを着想したが、このような閉鎖系容器では細胞の洗浄などの一部操作が非常に煩雑となるという課題に直面した。かかる課題を解決すべくさらに研究を続ける中で、凍結保存細胞を解凍して得た細胞懸濁液に十分量の培地を加えて培養した場合であっても、医療グレードとして十分な細胞培養物を得ることができることを見出し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成させるに至った。

[0009] すなわち、本発明に下記に掲げるものに関する：

[1] 培養基材上で、移植用細胞を含む細胞懸濁液を凍結させることを特徴とする、細胞の凍結保存方法。

[2] 移植用細胞が、接着細胞である、[1]の方法。

[3] 移植用細胞が、筋芽細胞または心筋細胞である、[1]または[2]の方法。

[4] 培養基材が、細胞接着性の培養面を有する、[1]～[3]の方法。

[5] 培養基材が、温度応答性材料で被覆されている、[1]～[4]の方法。

[6] 培養基材が、スフェロイド形成用の培養面を有する、[1]～[3]の方法。

[7] 細胞懸濁液が、凍結保護剤を含む、[1]～[6]の方法。

[8] 細胞懸濁液が、5～20%の凍結保護剤を含む、[1]～[7]の方法。

[9] 細胞懸濁液が、培養基材の面積に対して、 $5\mu\text{L}/\text{cm}^2\sim 1000\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の密度で培養基材上に存在する、[1]～[8]のいずれか一項に記載の方法。

[10] 移植用細胞が、培養基材の面積に対して、 $7.5\times 10^5\text{個}/\text{cm}^2\sim 3.0\times 10^6\text{個}/\text{cm}^2$ の密度で細胞懸濁液中に存在する、[1]～[9]の方法。

[11] 細胞培養基材上で凍結された、凍結保存細胞。

[12] 凍結保護剤を含む培地で細胞集団をインキュベートすることを特徴とする、移植用細胞の培養方法。

[13] 以下のステップ；

(a) 培養基材上で凍結保存された細胞集団を解凍して凍結保護剤を含む細胞懸濁液を得るステップ、

(b) (a)で得られた細胞懸濁液に培養用の培地を添加して凍結保護剤を希釈するステップ、

(c) (b) で得られた細胞懸濁液を、前記培養基材上でインキュベートするステップ、

を含む、[12]の方法。

[14] 細胞集団が、接着細胞を含む、[12]または[13]方法。

[15] 細胞集団が、筋芽細胞または心筋細胞を含む、[12]～[14]の方法。

[16] 凍結保護剤が、DMSOである、[12]～[15]の方法。

[17] 培養基材が、細胞接着性の培養面を有する、[13]～[16]の方法。

[18] 培養基材が、温度応答性材料で被覆されている、[13]～[17]の方法。

[19] 培養基材が、スフェロイド形成用の培養面を有する、[13]～[16]の方法。

[20] 全ての工程が閉鎖系の容器内で実施される、[13]～[19]の方法。

[21] 以下のステップ；

(A) 培養基材上で凍結保存された移植用細胞を含む細胞集団を解凍して凍結保護剤を含む細胞懸濁液を得るステップ、

(B) (A) で得られた細胞懸濁液に培養用の培地を添加して凍結保護剤を希釈するステップ、

(C) (B) で得られた細胞懸濁液を、前記培養基材上で移植片形成培養するステップ、

を含む、移植片の製造方法。

[22] 移植片が、シート状細胞培養物である、[21]に記載の方法。

[23] 移植用細胞が、筋芽細胞または心筋細胞である、[21]または[22]の方法

[24] 移植用細胞が、培養基材の面積に対して、 7.5×10^5 個/cm²～ 3.0×10^6 個/cm²の密度で細胞懸濁液中に存在する、[21]～[

23]の方法。

[25]全ての工程が閉鎖系の容器内で実施される、[21]～[24]の方法。

[26]細胞培養基材および該細胞培養基材上で凍結された凍結保存細胞を封入した保存容器1と、該保存容器1と閉鎖的に連結可能な、細胞培養用培地を封入した保存容器2とを含む、移植片製造キット。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、シート状細胞培養物等に含有される移植用細胞を、簡便に保存および利用可能となる。このため、無菌的に移植片を製造および輸送するために煩雑な手順や設備を必要とすることなく、閉鎖系容器内で無菌的に製造および輸送することが可能となるため、かかる移植片を利用した医療の普及に貢献することが期待される。また、かかる移植片の製造においても大型の施設等を必要とすることがないため、大幅なコストダウンをすることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、凍結保存細胞を融解して回収した結果を表すグラフである。細胞回収率は、200 μ L以上の凍結保存液で懸濁した場合（ 1.0×10^7 個/mL以上の密度）であれば有意な差が見られなかった。バイアビリティは、いずれの密度の懸濁液であっても有意な差が見られなかった。

[図2]図2は、各密度の凍結保存細胞を回収、播種して作成したシート状細胞培養物の写真図である。いずれの場合も問題なくシート化できていた。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本開示を詳細に説明する。

本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願、公開された出願および他の出版物は、その全体を参照により本明細書に援用する。また本明細書において参照された出版物と本明細書の記載に矛盾が生じた場合は、本明細書の記載が

優先されるものとする。

[0013] 本開示において、「移植用細胞」は、生体内へ移植するための細胞を意味する。本開示において「移植片」は、生体内へ移植するための構造物を意味し、特に前記移植用細胞を構成成分として含む移植用構造物を意味する。移植片において細胞同士は接着して全体としてある形状を形成している状態を少なくとも一つ含み、一つ一つの細胞が全てバラバラに遊離して存在している、いわゆる懸濁状態は、本開示の「移植片」には含まれない。好ましい一態様においては、移植片は、細胞および細胞由来の物質以外の構造物（例えばスキャフォールドなど）を含まない移植用構造物である。本開示における移植片としては、これに限定するものではないが、例えばシート状細胞培養物、スフェロイド、細胞凝集塊、細胞懸濁物、フィブリンゲルを含む細胞懸濁物、ナノファイバーを用いた細胞培養物などが挙げられ、好ましくはシート状細胞培養物またはスフェロイド、より好ましくはシート状細胞培養物である。

[0014] 本開示において、「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。本開示において、「スフェロイド」は細胞が互いに連結して略球状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子などの細胞要素を介するものを含む）および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも物理的（機械的）に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、シート状細胞培養物やスフェロイドを構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも物理的（機械的）に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層体（多層）、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。また、シート状細胞培養物は、細胞が明確な層構造を示すことなく、細胞1個分の厚みを超える厚みを有する3次元構造を有してもよい。例

例えば、シート状細胞培養物の垂直断面において、細胞が水平方向に均一に整列することなく、不均一に（例えば、モザイク状に）垂直方向に複数の細胞が配置された状態で存在していてもよい。

[0015] シート状細胞培養物などの移植片を構成する細胞（移植用細胞）は、移植片を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、特にiPS細胞から分化させたもの（iPS細胞由来接着細胞）であってもよい。移植片を構成する細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。iPS細胞由来接着細胞の非限定例としては、iPS細胞由来の心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

[0016] 本開示において「筋芽細胞」は、横紋筋細胞の前駆細胞であり、骨格筋芽細胞および心筋芽細胞を含む。

本開示において「骨格筋芽細胞」は、骨格筋に存在する筋芽細胞を意味する。骨格筋芽細胞は当該技術分野でよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開2007-89442号公報に記載の方法など）に

より調製することもできるし、商業的に入手することもできる（例えば、Lonza、Cat# CC-2580）。骨格筋芽細胞は、限定されずに、例えば、CD56、 $\alpha 7$ インテグリン、ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIb、ミオシン重鎖IIc（IIx）、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン、PAX3などのマーカーにより同定することができる。特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。さらに特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。骨格筋芽細胞は、骨格筋を有する任意の生物、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に由来してもよい。一態様において、骨格筋芽細胞は哺乳動物の骨格筋芽細胞である。特定の態様において、骨格筋芽細胞はヒト骨格筋芽細胞である。

[0017] 本開示において「心筋芽細胞」は、心筋に存在する筋芽細胞を意味する。心筋芽細胞は当該技術分野でよく知られており、Is11などのマーカーにより同定することができる。心筋芽細胞は、心筋を有する任意の生物、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に由来してもよい。一態様において、心筋芽細胞は哺乳動物の心筋芽細胞である。特定の態様において、心筋芽細胞はヒト心筋芽細胞である。

本開示において「心筋細胞」は、心筋細胞の特徴を有する細胞を意味し、心筋細胞の特徴としては、限定されずに、例えば、心筋細胞マーカーの発現、自律的拍動の存在などが挙げられる。心筋細胞マーカーの非限定例としては、例えば、c-TNT (cardiac troponin T)、CD172a (別名SIRPAまたはSHPS-1)、KDR (別名CD309、FLK1またはVEGFR2)、PDGFRA、EMILIN2、VCAMなどが挙げられる。心筋細胞としては、iPS細胞由来の心筋細胞が好ましく例示される。

[0018] 移植片を構成する細胞は、移植片による治療が可能な任意の生物に由来し

得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギなどが含まれる。また、移植片を構成する細胞の種類数は特に限定されず、1種類のみ細胞で構成されていてもよいが、2種類以上の細胞を用いたものであってもよい。移植片を形成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、移植片の形成終了時において、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%以上である。

[0019] 本開示のシート状細胞培養物は、好ましくはスキャフォールド（支持体）を含まない。スキャフォールドは、その表面上および／またはその内部に細胞を付着させ、シート状細胞培養物の物理的一体性を維持するために当該技術分野において用いられることがあり、例えば、ポリビニリデンジフルオリド（PVDf）製の膜等が知られているが、本開示のシート状細胞培養物は、かかるスキャフォールドがなくともその物理的一体性を維持することができる。また、本開示のシート状細胞培養物は、好ましくは、シート状細胞培養物を構成する細胞由来の物質（細胞外マトリックスなど）のみからなり、それら以外の物質を含まない。

[0020] 細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」は、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、サルやブタに由来する細胞などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、本開示においては好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種

非自己由来細胞を利用する場合は、拒絶反応を抑制するため、免疫抑制処置が必要となることがある。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と総称することもある。本開示の一態様において、細胞は自家細胞 (autologous cells) または他家細胞 (allogeneic cells) である。本開示の一態様において、細胞は自家細胞 (自家 i P S 細胞に由来する自家細胞、自家 i P S 細胞を分化誘導して得られた自家分化誘導細胞を含む) である。本開示の別の態様において、細胞は他家細胞 (他家 i P S 細胞に由来する他家細胞、他家 i P S 細胞を分化誘導して得られた他家分化誘導細胞を含む) である。

[0021] シート状細胞培養物は、既知の任意の方法 (例えば、特許文献 1、特許文献 2、特開 2010-081829、特開 2011-110368 など参照) で製造することができる。シート状細胞培養物の製造方法は、典型的には、細胞を培養基材上に播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含むが、これに限定されない。細胞を培養基材上に播種するステップの前に、細胞を凍結するステップおよび細胞を解凍するステップを行ってもよい。さらに、細胞を解凍するステップの後に細胞を洗浄するステップを行ってもよい。これら各ステップは、シート状細胞培養物の製造に適した既知の任意の手法で行うことができる。本開示の製造方法は、シート状細胞培養物を製造するステップを含んでもよく、その場合、シート状細胞培養物を製造するステップは、サブステップとして上記シート状細胞培養物の製造方法に係るステップの 1 または 2 以上を含んでもよい。ある一態様において、細胞を解凍するステップの後、細胞を培養基材上に播種するステップの前に細胞を増殖させるステップを含まない。

[0022] スフェロイドは、既知の任意の方法 (例えば、特許 5523830 など参照) で製造することができる。スフェロイドの製造方法は、典型的には、細胞を、凹状部を有する培養基材上に播種するステップ、播種した細胞をスフェロイド化するステップ、形成されたスフェロイドを培養基材から取得する

ステップを含むが、これに限定されない。例えば、スフェロイドとしては多能性幹細胞由来の心筋細胞を1000個ずつ直径0.2mmの球状に形成した移植片などが挙げられる。

[0023] 培養基材は、細胞がその上で細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、種々の材質および／または形状の容器、容器中の固形もしくは半固形の表面などを含む。容器は、培養液などの液体を透過させない構造・材料が好ましい。かかる材料としては、限定することなく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ナイロン6,6、ポリビニルアルコール、セルロース、シリコン、ポリスチレン、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、金属（例えば、鉄、ステンレス、アルミニウム、銅、真鍮）等が挙げられる。また、容器は、少なくとも1つの平坦な面を有することが好ましい。かかる容器の例としては、限定することなく、例えば、細胞培養物の形成が可能な培養基材で構成された底面と、液体不透過性の側面とを備えた培養容器が挙げられる。かかる培養容器の特定の例としては、限定されずに、細胞培養皿、細胞培養ボトルなどが挙げられる。容器の底面は透明であっても不透明であってもよい。容器の底面が透明であると、容器の裏側から細胞の観察、計数などが可能となる。また、容器は、その内部に固形もしくは半固形の表面を有してもよい。固形の表面としては、上記のごとき種々の材料のプレートや容器などが、半固形の表面としては、ゲル、軟質のポリマーマトリックスなどが挙げられる。培養基材は、上記材料を用いて作製してもよいし、市販のものを利用してよい。

好ましい培養基材としては、限定することなく、例えば、シート状細胞培養物の形成に適した、接着性の表面を有する基材、スフェロイドの形成に適した、低接着性の表面を有する基材および／または均一なウェル状構造を有する基材などが挙げられる。具体的には、シート状細胞培養物の形成の場合であれば、例えば、コロナ放電処理したポリスチレン、コラーゲンゲルや親水性ポリマーなどの親水性化合物を該表面にコーティングした基材、さらに

は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外マトリックスや、カドヘリンファミリー、セレクチンファミリー、インテグリンファミリーなどの細胞接着因子などを表面にコーティングした基材などが挙げられる。また、かかる基材は市販されている（例えば、Corning^(R) TC-Treated Culture Dish、Corningなど）。またスフェロイドの形成の場合であれば、例えば軟寒天、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PIPAAM）をポリエチレングリコール（PEG）で架橋した温度応答性ゲル（市販名：メビオールゲル）、ポリメタクリル酸ヒドロキシエチル（ポリHEMA）、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリスコリン（MPC）ポリマーなどのハイドロゲルなどの非細胞接着性化合物を表面にコーティングした基材および／または均一な凹凸構造を表面に有する基材などが挙げられる。かかる基材もまた市販されている（例えば、EZSPHERE^(R)など）。培養基材は全体または部分が透明であっても不透明であってもよい。

- [0024] 培養基材は、刺激、例えば、温度や光に応答して物性が変化する材料で表面が被覆されていてもよい。かかる材料としては、限定されずに、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド等）、N,N-ジアルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N,N-ジメチル（メタ）アクリルアミド、N,N-エチルメチルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド等）、環状基を有する（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-プロ

ロペニル) - モルホリン、1 - (1 - オキソ - 2 - メチル - 2 - プロペニル) - ピロリジン、1 - (1 - オキソ - 2 - メチル - 2 - プロペニル) - ピペリジン、4 - (1 - オキソ - 2 - メチル - 2 - プロペニル) - モルホリン等)、またはビニルエーテル誘導体(例えば、メチルビニルエーテル)のホモポリマーまたはコポリマーからなる温度応答性材料、アゾベンゼン基を有する光吸収性高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体、および、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲル等の光応答性材料などの公知のものを用いることができる(例えば、特開平2-211865、特開2003-33177参照)。これらの材料に所定の刺激を与えることによりその物性、例えば、親水性や疎水性を変化させ、同材料上に付着した細胞培養物の剥離を促進することができる。温度応答性材料で被覆された培養皿は市販されており(例えば、CellSeed Inc.のUpCell^(R))、これらを本開示の製造方法に使用することができる。

[0025] 培養基材は、種々の形状であってもよい。また、その面積は特に限定されないが、例えば、約1 cm²~約200 cm²、約2 cm²~約100 cm²、約3 cm²~約50 cm²などであってもよい。例えば、培養基材として直径10 cmの円形の培養皿が挙げられる。この場合、面積は56.7 cm²となる。培養表面は平坦であってもよいし、凹凸構造を有していてもよい。凹凸構造を有する場合、均一な凹凸構造であることが好ましい。

[0026] 培養基材は血清でコート(被覆またはコーティング)されていてもよい。血清でコートされた培養基材を用いることにより、より高密度のシート状細胞培養物を形成することができる。「血清でコートされている」とは、培養基材の表面に血清成分が付着している状態を意味する。かかる状態は、限定されずに、例えば、培養基材を血清で処理することにより得ることができる。血清による処理は、血清を培養基材に接触させること、および、必要に応じて所定期間インキュベートすることを含む。

[0027] 血清としては、異種血清および/または同種血清を用いることができる。

異種血清は、シート状細胞培養物を移植に用いる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ウシやウマに由来する血清、例えば、ウシ胎仔血清（FBS、FCS）、仔ウシ血清（CS）、ウマ血清（HS）などが異種血清に該当する。また、「同種血清」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト血清が同種血清に該当する。同種血清は、自己血清（自家血清ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する血清、およびレシピエント以外の同種個体に由来する同種他家血清を含む。なお、本明細書中で、自己血清以外の血清、すなわち、異種血清と同種他家血清を非自己血清と総称することもある。

培養基材をコートするための血清は、市販されているか、または、所望の生物から採取した血液から定法により調製することができる。具体的には、例えば、採取した血液を室温で約20分～約60分程度放置して凝固させ、これを約1000×g～約1200×g程度で遠心分離し、上清を採取する方法などが挙げられる。

[0028] 培養基材上でインキュベートする場合、血清は原液で用いても、希釈して用いてもよい。希釈は、任意の媒体、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSSなど）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI 1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0.5%～約100%（v/v）、好ましくは約1%～約60%（v/v）、より好ましくは約5%～約40%（v/v）である。

[0029] インキュベート時間も、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約1時間～約72時間、好ましくは約2時間～約48時間、より好ましくは約2時間～約24時間、さらに好ましくは約2時

間～約12時間である。インキュベート温度も、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0℃～約60℃、好ましくは約4℃～約45℃、より好ましくは室温～約40℃である。

[0030] インキュベート後に血清を廃棄してもよい。血清の廃棄手法としては、ピペットなどによる吸引や、デカンテーションなどの慣用の液体廃棄手法を用いることができる。本開示の好ましい態様においては、血清廃棄後に、培養基材を無血清洗浄液で洗浄してもよい。無血清洗浄液としては、血清を含まず、培養基材に付着した血清成分に悪影響を与えない液体媒体であれば特に限定されず、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSSなど）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の培養基材洗浄手法、例えば、限定することなく、培養基材上に無血清洗浄液を加えて所定時間（例えば、約5秒～約60秒間）攪拌後、廃棄する手法などを用いることができる。

[0031] 本開示において、培養基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」は、細胞の増殖を、それがない場合に比べて促進する任意の物質を意味し、例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）などを含む。成長因子による培養基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、例えば、約0.0001μg/mL～約1μg/mL、好ましくは約0.0005μg/mL～約0.05μg/mL、より好ましくは約0.001μg/mL～約0.01μg/mLである以外は、基本的に血清と同じである。

[0032] 本開示において、培養基材を、ステロイド剤でコートしてもよい。ここで「ステロイド剤」は、ステロイド核を有する化合物のうち、生体に、副腎皮質機能不全、クッシング症候群などの悪影響を及ぼし得るものをいう。かか

る化合物としては、限定されずに、例えば、コルチゾール、プレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン等が含まれる。ステロイド剤による培養基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、デキサメタゾンとして、例えば、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0033] 培養基材は、血清、成長因子およびステロイド剤のいずれか1つでコートしても、これらの任意の組み合わせ、すなわち、血清と成長因子、血清とステロイド剤、血清と成長因子とステロイド剤、または、成長因子とステロイド剤の組み合わせでコートしてもよい。複数の成分でコートする場合、これらの成分を混合して同時にコートしてもよいし、別々のステップでコートしてもよい。

[0034] <1>本開示の凍結保存方法

本開示の一側面は、移植用細胞を凍結保存する方法に関する。本開示の凍結保存方法は、培養基材上で、移植用細胞を含む細胞懸濁液を凍結させることを特徴とする。従来は、細胞を凍結保存する場合、細胞懸濁液を凍結保存バイアル等の凍結保存容器に封入し、それを凍結させることにより凍結保存していたが、本開示の方法は、凍結保存容器ではなく培養基材上で直接細胞懸濁液を凍結させることにより、移植用細胞を凍結保存するものである。したがって本開示の凍結保存方法により製造される凍結保存細胞、典型的には細胞培養基材上で凍結された凍結保存細胞も、本開示の発明に包含される。

[0035] 細胞懸濁液を凍結させる方法は、当該技術分野において公知のいかなる方法を用いてもよく、例えば、液体窒素に浸す、プログラムフリーザーで冷却するなどの方法が挙げられる。細胞懸濁液を凍結させるまでの時間は特に限定されないが、細胞にダメージが少なく、また細胞の状態に変化がないことが好ましい。例えば細胞接着性の培養基材上で接着細胞を凍結保存する場合、該接着細胞が培養基材に接着し始める前に凍結させることが好ましい。し

たがって凍結開始から終了までの時間は、これに限定するものではないが、例えば約24時間以内、約12時間以内、約10時間以内、約8時間以内、約6時間以内、約5時間以内、約4時間以内、約3時間以内、約2時間以内、約1時間以内、約30分以内などであってよい。

[0036] 本開示の方法で凍結保存される細胞は、移植の用に供する細胞であれば特に限定されず、任意の移植用細胞を用いることができる。移植用細胞は、上記において詳述したとおりである。好ましい態様において、移植用細胞は接着細胞であり、より好ましい態様において、移植用細胞は筋芽細胞または心筋細胞である。

凍結保存される細胞を懸濁する媒体は、当該技術分野において細胞の凍結保存に用いる媒体であればいかなるものを用いてもよく、これに限定するものではないが、例えばDMEM、MEM、F12、DME、RPMI1640、MCDB (MCDB102、104、107、120、131、153、199など)、L15、SkBM、RITC80-7、DMEM/F12などの基礎培地、ハンクス平衡塩液 (HBSS)、アール平衡塩液 (EBSS)、リン酸緩衝液 (PBS) などの緩衝液、などが挙げられる。

[0037] 本開示の方法により凍結保存される移植用細胞は、その後解凍され、そのまま培養に供される。したがって本開示の方法に用いられる培養基材は、凍結処理に耐えられ、かつ移植用細胞を好適に培養可能な培養基材であれば特に限定されない。例えば移植用細胞が接着細胞であれば、培養基材は細胞接着性の培養面を有するものであることが好ましい。また、移植用細胞の用途によっても培養基材は異なり得る。例えば移植用細胞からシート状細胞培養物を製造する目的であれば、培養基材は細胞接着性の、好ましくは温度応答性材料でコーティングされた培養面を有することが好ましく、スフェロイドを形成する目的であれば、培養基材はスフェロイド形成用の培養面、例えば低接着性の表面および／または均一なウェル状構造を有する培養面を有する培養基材が好ましい。当業者であれば、凍結保存される移植用細胞およびその用途等に鑑みて、適切な性質を有する培養基材を選択することができる。

[0038] 本開示の方法により移植用細胞を凍結保存する場合、支持体やスキャフォールドなど（以下合わせて「支持体等」と称する）と一緒に凍結保存されてよい。したがって、移植用細胞の細胞懸濁液には、支持体等を含んでよい。かかる支持体等は、移植片の形成に有利なものであればいかなるものであってもよい。かかる支持体等の材質としては、生体内に移植した場合に悪影響のないものが好ましく、より好ましくは生分解性のものであり、例えばポリ乳酸、フィブリンゲルなどが挙げられる。したがってかかる支持体等としては、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトンなどの生分解性ポリマーからなるフィルムや支持体、フィブリンゲルなどの生体由来成分からなる支持体などが挙げられる。

[0039] 培養基材上で凍結保存される細胞懸濁液は、凍害防止のため、好ましくは凍結保護剤を含んでいる。本開示の凍結保存方法に用い得る凍結保護剤としては、移植用細胞の保存という点に鑑みて血清などの製造工程不純物を含まないものであれば、当該技術分野において通常用いられているものを用いることができ、これに限定するものではないが、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロールなどの多価アルコール、トレハロースなどの糖類、ポリリジンなどのポリアミノ酸、などが挙げられる。凍結保護剤の含有量は、凍結の際に細胞をダメージから保護でき、かつ細胞に悪影響を与えなければ特に限定されず、これに限定するものではないが、例えば約1～20%、約5～15%、約7～12%などが挙げられる。

[0040] 凍結保存される細胞懸濁液の量は、培養基材上で好適に凍結可能な量であれば特に限定されない。細胞懸濁液が多すぎる場合、凍結に時間がかかってしまい、凍害が起こりやすくなってしまうため、適量以上の細胞懸濁液は好ましくない。細胞懸濁液の量は、好ましくは、培養基材の面積に対して、約5～1000 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 程度、より好ましくは約10～300 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 程度である。

[0041] 凍結保存される細胞の量は、培養基材の大きさによって変化し得、また解凍後の培養目的に鑑みて決定され得る。解凍後、増殖培養に供される場合、

細胞懸濁液中の細胞量は、培養基材の面積に対して、例えば約 7.5×10^5 個/cm² ~ 3.0×10^6 個/cm² 程度であり得る。

[0042] 一態様において凍結保存細胞は、解凍後、移植片形成培養に供される。本開示において「移植片形成培養」は、培養細胞を移植片として形成するための培養を意味し、特に移植片がシート状細胞培養物である場合、「シート化培養」と称する。細胞のシート化は、既知の任意の手法および条件で行うことができる。かかる手法の非限定例は、例えば、特開2010-081829、特開2010-226991、特開2011-110368、特開2011-172925、WO 2014/185517などに記載されている。細胞の移植片形成（例えばシート化）は、細胞同士が接着分子や、細胞外マトリックスなどの細胞間接着機構を介して互いに接着することにより達成されることが考えられている。したがって、移植片形成培養は、例えば、細胞を、細胞間接着を形成する条件下で培養することにより達成することができる。かかる条件は、細胞間接着を形成することができればいかなるものであってもよいが、通常は一般的な細胞培養条件と同様の条件であれば細胞間接着を形成することができる。かかる条件としては、例えば、約37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。また、培養は通常の大気圧下（非加圧下）で行うことができる。移植片形成培養（シート化培養）においては、細胞間接着が形成されればよいから、必ずしも細胞が増殖する必要はない。好ましい一態様において、移植片形成培養（シート化培養）は、細胞を増殖させずに行われる。

[0043] 凍結保存細胞を解凍後、移植片形成培養に供する場合、凍結保存細胞（すなわち移植用細胞）の量としては、これに限定するものではないが、例えば培養基材の培養面の面積に対して、約 5.0×10^5 個/cm² ~ 約 1.0×10^7 個/cm²、約 5.0×10^5 個/cm² ~ 約 5.0×10^6 個/cm²、約 5.0×10^5 個/cm² ~ 約 3.0×10^6 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm² ~ 約 1.0×10^7 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm² ~ 約 5.0×10^6 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm² ~ 約 3.0×10^6 個/cm²、約 1.5×10^6 個/cm² ~ 約 1.0×10^7 個/cm²、約 1.5×10^6

個/cm²～約5.0×10⁶個/cm²、約1.5×10⁶個/cm²～約3.0×10⁶個/cm²、約2.0×10⁶個/cm²～約1.0×10⁷個/cm²、約2.0×10⁶個/cm²～約5.0×10⁶個/cm²、約2.0×10⁶個/cm²～約3.0×10⁶個/cm²などであり得る。好ましい一態様において、約7.5×10⁵個/cm²～3.0×10⁶個/cm²であり、別の好ましい一態様においては、約1.76×10⁶個/cm²～約2.33×10⁶個/cm²である。

[0044] 細胞懸濁液の容量は、上記細胞量を懸濁可能な用量であれば特に限定されないが、多すぎる場合は培養基材の大きさも相対的に大きくなる必要があるため、多すぎないことが好ましい。細胞懸濁液の容量の非限定例は、約10 mL、約11 mL、約12 mL、約13 mL、約14 mL、約15 mL、約16 mL、約17 mL、約18 mL、約19 mL、約20 mL、約21 mL、約22 mL、約23 mL、約24 mL、約25 mL、約26 mL、約27 mL、約28 mL、約29 mL、約30 mLなどであり得る。

[0045] 細胞を凍結保存する培養基材の容量は、細胞を収容できる限り特に限定されないが、その後培地を添加することに鑑みると、細胞懸濁液の容量より大きいことが好ましい。一態様において、培養基材の容量は、細胞懸濁液の約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍であり得る。

[0046] 本開示の凍結保存細胞は、解凍後、培養基材上でそのまま培養に供されてよい。解凍後そのまま培養に供される場合、解凍して得られた細胞懸濁液に、培養に用いる培地を加えてから培養に供される。培養についての詳細は、後述の培養方法に記載されたとおりである。好ましい一態様において、移植片形成培養の際、凍結した細胞を解凍した後、移植片形成培養するまでに細胞を洗浄する（細胞培養液を置換する）ステップは含まない。

[0047] <2>本開示の培養方法

本開示の一側面は、凍結保護剤を含む培地で細胞をインキュベートすることを特徴とする、移植用細胞の培養方法に関する。本開示の培養方法において、凍結保護剤および移植用細胞については、上記<1>で詳述したとおり

である。かかる培養方法は、典型的には上記<1>に記載の凍結保存方法により凍結保存された細胞を解凍後に実施できる。

[0048] 以下に、<1>の凍結保存方法で凍結保存された細胞を培養する場合を例として、本発明を詳述する。

本開示の培養方法は、典型的な一態様において、以下の工程を含む：

(a) 培養基材上で凍結保存された細胞集団を解凍して凍結保護剤を含む細胞懸濁液を得る工程；

(b) (a) で得られた細胞懸濁液に培養用の培地を添加して凍結保護剤を希釈する工程；および

(c) (b) で得られた細胞懸濁液を、前記培養基材上でインキュベートする工程。

[0049] 工程 (a) において、培養基材上で凍結保存された凍結保存細胞を解凍する。解凍には、凍結保存細胞に必要以上のダメージを与えるものでない限り、当該技術分野において公知のいかなる方法を用いてもよく、例えば水浴、湯浴、自然解凍、加温した培地を添加して急速解凍などの方法により実施することができる。かかる工程により、凍結保存液に分散された細胞懸濁液を得ることができる。

[0050] 工程 (b) において、工程 (a) で得られた細胞懸濁液に、培養用の培地を添加する。これにより、(a) で得られた細胞懸濁液中に含まれる凍結保護剤を希釈する。培養用の培地は、当該技術分野において通常用いられるものであれば特に限定されず、例えば、生理食塩水、種々の生理緩衝液（例えば、PBS、HBSS等）、種々の細胞培養用の基礎培地をベースにしたものなどを使用してもよい。かかる基礎培地には、限定されずに、例えば、DMEM、MEM、F12、DME、RPMI 1640、MCDB (MCDB 102、104、107、120、131、153、199など)、L15、SkBM、RITC80-7、DMEM/F12などが含まれる。これらの基礎培地の多くは市販されており、その組成も公知となっている。基礎培地は、標準的な組成のまま（例えば、市販されたままの状態）用いてもよ

いし、細胞種や細胞条件に応じてその組成を適宜変更してもよい。したがって、本発明に用いる基礎培地は、公知の組成のものに限定されず、1または2以上の成分が追加、除去、増量もしくは減量されたものを含む。移植片形成媒体は、通常血清（例えば、ウシ胎仔血清などのウシ血清、ウマ血清、ヒト血清等）、種々の成長因子（例えば、FGF、EGF、VEGF、HGF等）などの添加物を含んでもよいが、シート状細胞培養物をゼノフリー条件下で製造する場合、特にウシ血清、ウマ血清などの異種血清を含まないことが好ましい。本開示は、細胞接着性成分を含む移植片形成媒体を用いて移植片形成培養することを特徴とし、これにより移植片形成媒体が無血清であっても高品質で移植片形成可能であるという効果を奏するものである。したがって好ましい一態様において、移植片形成媒体は血清を含まない。

[0051] 添加する培地の量は、凍結保存した細胞を培養するのに十分な濃度まで凍結保護剤を希釈可能な量であれば特に限定されない。例えば直径10cmの円形の培養皿に、約 7.5×10^5 個/cm²～ 3.0×10^6 個/cm²程度の細胞が凍結保存されていた場合、加える培地の量は約5～30mLであり得、好ましい一態様においては、5～10mLとなり得る。凍結保存液の希釈率は2倍～100倍であり得、好ましい一態様においては、5倍～15倍となり得る。

[0052] 工程(c)において、(b)で培養用培地を添加された細胞懸濁液を、培養基材上でインキュベートする。本開示の培養方法における培養は、一般的な細胞を増殖させるための培養だけでなく、例えば細胞集団から移植片を形成するための移植片形成培養（典型的にはシート化培養）などの、細胞数が実質的に変化しない培養も含まれる。

[0053] 本開示の培養方法は、任意の細胞集団に対して用いることができるが、好ましい一態様において、培養される細胞集団は、移植用細胞を含む。本開示の培養方法において用いられる移植用細胞は、上記において詳述したとおりである。したがって好ましい一態様において、細胞集団は接着細胞を含み、より好ましい一態様において、細胞集団は筋芽細胞または心筋細胞を含む。

[0054] 本開示の培養方法においては、培養用の培地に凍結保護剤を含む媒体（細胞懸濁液）を加えてもよいし、凍結保護剤を含む媒体に培養用の培地を加えてもよい。典型的には上述のとおり、凍結保護剤を含む媒体（細胞懸濁液）に培養用の培地を加える。凍結保護剤は、上記<1>において詳述したとおりである。好ましい一態様において、凍結保護剤は、DMSOである。

[0055] 本開示の培養方法においては、典型的には<1>の方法で凍結保存された細胞集団をそのまま培養に用いる。したがって本開示の培養方法に用いられる培養基材は、上記<1>において詳述したものと同一である。すなわち、本開示の培養方法に用いられる培養基材は、好ましい一態様において細胞接着性の培養面を有し、より好ましい一態様において温度応答性材料で被覆された培養面を有するものである。また、別の好ましい一態様において、培養基材は、スフェロイド形成用の培養面を有している。このような培養基材は上述のとおり当該技術分野において公知であり、市販されている。

[0056] 上述のとおりインキュベートは、実質的に細胞数に変化のないインキュベートであってもよく、かかるインキュベートは典型的には移植片形成培養である。したがって本開示の特に好ましい一態様において、工程（c）は移植片形成培養をする工程である。工程（c）が移植片形成培養であれば、その結果として得られる細胞培養物は、移植片となる。したがって本開示の好ましい一態様は、以下の工程：

（A）培養基材上で凍結保存された移植用細胞を含む細胞集団を解凍して凍結保護剤を含む細胞懸濁液を得る工程；

（B）（A）で得られた細胞懸濁液に培養用の培地を添加する工程；および

（C）（B）で得られた細胞懸濁液を、前記培養基材上で移植片形成培養する工程；

を含む、移植片の製造方法に関する。

[0057] 本開示の移植片の製造方法において、工程（A）および（B）については、上記培養方法における工程（a）および（b）について詳述したとおりである

工程（C）における移植片形成培養は、典型的にはシート化培養である。シート化培養の詳細は、上述したとおりである。したがって本開示の移植片の製造方法の好ましい一態様においては、移植片はシート状細胞培養物である。工程（C）における移植片形成培養は、スフェロイドを形成するための培養であってもよい。工程（C）における移植片形成培養の後に、移植片形成培養中の凍結保護剤をさらに希釈する工程または移植片形成培養から凍結保護剤を除去するための洗浄の工程をさらに含んでもよい。

[0058] かかる移植片の製造方法において、移植用細胞は、移植片を形成可能な細胞であれば特に限定されず、典型的には接着細胞である。好ましい一態様において、移植用細胞は筋芽細胞または心筋細胞である。心筋細胞はiPS細胞由来の心筋細胞であってよい。

[0059] 移植片、特にシート状細胞培養物を形成するための培養においては、細胞が高密度、例えばコンフルエントに達する密度、すなわち播種した際に細胞が培養容器の接着表面一面を覆うことが想定される程度の密度で存在することが好ましい。「コンフルエントに達する密度」とは、典型的には、細胞が互いに接触することが想定される程度の密度、接触阻害が発生する密度、または接触阻害により細胞の増殖を実質的に停止する密度あるいはそれ以上であり得る。かかる密度としては、これに限定するものではないが、例えば約 5.0×10^5 個/cm²～約 1.0×10^7 個/cm²、約 5.0×10^5 個/cm²～約 5.0×10^6 個/cm²、約 5.0×10^5 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm²～約 1.0×10^7 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm²～約 5.0×10^6 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²、約 1.5×10^6 個/cm²～約 1.0×10^7 個/cm²、約 1.5×10^6 個/cm²～約 5.0×10^6 個/cm²、約 1.5×10^6 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²、約 2.0×10^6 個/cm²～約 1.0×10^7 個/cm²、約 2.0×10^6 個/cm²～約 5.0×10^6 個/cm²、約 2.0×10^6 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²などが挙げられる。好ましい一態様において、約 7.5×10^5 個/cm²～

3. 0×10^6 個/cm²であり、別の好ましい一態様においては、約 1.76×10^6 個/cm²～約 2.33×10^6 個/cm²である。

[0060] 本開示の培養方法および移植片の製造方法においては、上述のとおり、典型的には上記<1>で詳述した凍結保存方法により凍結保存された細胞を用いる。したがって本開示の培養方法および移植片の製造方法は、工程(a)または工程(A)の前に、上記<1>で詳述した凍結保存方法を含んでよい。

[0061] 好ましい一態様において、本開示の培養方法および移植片の製造方法は、少なくとも一部の工程を閉鎖系の容器内で実施することができる。典型的には、<1>の方法で凍結保存された細胞集団を、閉鎖系の容器内に無菌的に封入し、該凍結保存された細胞集団を閉鎖系容器内で解凍し、本開示の培養方法または移植片の製造方法を行うことができる。したがって好ましくは、本開示の培養方法および移植片の製造方法は、全ての工程が閉鎖系の容器内で実施される。

[0062] <3>本開示の移植片

本開示の別の側面は、本開示の製造方法により製造された移植片に関する。本開示の移植片は、移植片の適用により改善される疾患、例えば、組織の異常に関連する種々の疾患の処置に有用である。したがって、一態様において、本開示の移植片は、移植片の適用により改善される疾患、特に、組織の異常に関連する疾患の処置に用いるためのものである。本開示の移植片は、従来の移植片に比べて高い機械的強度を有する以外は、これと同様の構成細胞固有の性質を有しているため、少なくとも従来の筋芽細胞または線維芽細胞を含む移植片による処置が可能な組織や疾患に適用することができる。処置の対象となる組織としては、限定されずに、例えば、心筋、角膜、網膜、食道、皮膚、関節、軟骨、肝臓、膵臓、歯肉、腎臓、甲状腺、骨格筋、中耳、骨髄、胃、小腸、十二指腸、大腸などの消化管などが挙げられる。また、処置の対象となる疾患としては、限定されずに、例えば、心疾患（例えば、心筋傷害（心筋梗塞、心外傷）、心筋症など）、角膜疾患（例えば、角膜上

皮幹細胞疲弊症、角膜損傷（熱・化学腐食）、角膜潰瘍、角膜混濁、角膜穿孔、角膜瘢痕、スティーブンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘡など）、網膜疾患（例えば、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症など）、食道疾患（例えば、食道手術（食道ガン除去）後の食道の炎症・狭窄の予防など）、皮膚疾患（例えば、皮膚損傷（外傷、熱傷）など）、関節疾患（例えば、変形性関節炎など）、軟骨疾患（例えば、軟骨の損傷など）、肝疾患（例えば、慢性肝疾患など）、膵臓疾患（例えば、糖尿病など）、歯科疾患（例えば、歯周病など）、腎臓疾患（例えば、腎不全、腎性貧血、腎性骨異常栄養症など）、甲状腺疾患（例えば、甲状腺機能低下症など）、筋疾患（例えば、筋損傷、筋炎など）、中耳疾患（例えば、中耳炎など）、骨髄疾患（例えば、白血病、再生不良性貧血、免疫不全疾患など）が挙げられる。本開示の移植片が上記疾患に有用であることは、例えば、特許文献1、非特許文献1、Tanaka et al., J Gastroenterol. 2013;48(9):1081-9.などに記載されている。本開示の移植片は、注射可能な大きさに断片化し、これを処置が必要な部位に注射することで、単細胞懸濁液による注射よりも高い効果を得ることもできる（Wang et al., Cardiovasc Res. 2008;77(3):515-24）。したがって、本開示の移植片についても、このような利用法が可能である。

[0063] <4>本開示の治療方法

本開示の別の側面は、本開示の方法により製造された移植片の有効量を、それを必要とする対象に適用することを含む、前記対象における疾患を処置する方法に関する。処置の対象となる疾患は、上記したとおりである。

[0064] 本開示において、用語「処置」は、疾患の治癒、一時的寛解または予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的および／または治療的介入を包含するものとする。例えば、「処置」の用語は、組織の異常に関連する疾患の進行の遅延または停止、病変の退縮または消失、当該疾患発症の予防または再発の防止などを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0065] 本開示の処置方法においては、移植片の生存性、生着性および／または機

能などを高める成分や、対象疾患の処置に有用な他の有効成分などを、本開示の移植片等と併用することができる。

[0066] 本開示の処置方法は、本開示の製造方法に従って、本開示の移植片を製造するステップをさらに含んでもよい。本開示の処置方法は、移植片を製造するステップの前に、対象から移植片を製造するための細胞（iPS細胞を用いる場合は、例えば、皮膚細胞、血球等）または細胞の供給源となる組織（iPS細胞を用いる場合は、例えば、皮膚組織、血液等）を採取するステップをさらに含んでもよい。一態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、細胞培養物、組成物、または移植片等の投与を受ける対象と同一の個体である。別の態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、細胞培養物、組成物、または移植片等の投与を受ける対象とは同種の別個体である。別の態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、移植片等の投与を受ける対象とは異種の個体である。

[0067] 本開示において、有効量とは、例えば、疾患の発症や再発を抑制し、症状を軽減し、または進行を遅延もしくは停止し得る量（例えば、シート状細胞培養物のサイズ、重量、枚数等）であり、好ましくは、当該疾患の発症および再発を予防し、または当該疾患を治癒する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、例えば、マウス、ラット、イヌまたはブタなどの実験動物や疾患モデル動物における試験などにより適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。また、処置の対象となる組織病変の大きさは、有効量決定のための重要な指標となり得る。

[0068] 投与方法としては、例えば、静脈投与、筋肉内投与、骨内投与、髄腔内投与、組織への直接的な適用などが挙げられる。投与頻度は、典型的には1回の処置につき1回であるが、所望の効果が得られない場合には、複数回投与することも可能である。組織に適用する際、本発明の細胞培養物、組成物、またはシート状細胞培養物等を対象の組織に縫合糸やステープルなどの係止

手段により固定してもよい。

[0069] <5>本開示のキット

本開示の一側面は、本開示の凍結保存方法および培養方法（移植片の製造方法）を用いて移植片を製造するための移植片製造キットに関する。本開示の移植片製造キットは、細胞培養基材および該細胞培養基材上で凍結された凍結保存細胞を封入した保存容器1と、該保存容器1と閉鎖的に連結可能な、細胞培養用培地を封入した保存容器2とを含むものである。以下、骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物を製造する場合を例として、本開示のキットおよびその使用方法を詳述する。

[0070] 本開示のキットは、保存容器1および保存容器2を有し、これらの容器は閉鎖的に連結可能な構造となっている。「閉鎖的に連結可能」であるとは、各容器内の閉鎖性を保ったまま両容器を一つの閉鎖系として接続することを言う。したがって両容器は、無菌性を保ったまま接続し、また脱離することが可能である。

[0071] 保存容器1には、細胞培養基材（例えば温度応答性材料で被覆された培養皿）および該培養基材上に凍結保存された移植用細胞（例えば骨格筋芽細胞）が、保存容器2には移植用細胞を培養可能な培地（例えばシート化培養に使用可能な培地、例えばDMEM/F12など）が無菌的に封入されている。移植用細胞を凍結保存する場合、培養基材上で凍結保存された後に保存容器1に無菌的に封入されてもよいし、保存容器1に無菌的に封入された状態の培養基材（細胞培養皿）上の移植用細胞を保存容器ごと凍結させてもよい。

[0072] 本開示のキットを使用する場合、まず凍結保存された細胞を解凍する。これにより細胞培養基材上（細胞培養皿内）に細胞懸濁液が解凍されることになる。かかる細胞懸濁液は、典型的には凍結保護剤を含んでいる。次に、保存容器1および保存容器2を閉鎖的に連結させ、保存容器2に無菌的に封入されている培地を、保存容器1内の細胞培養基材に添加する。これにより、細胞培養基材は、凍結保護剤を含む培地に細胞集団が懸濁された懸濁液が入

っている状態となる。次にかかる懸濁液を、保存容器ごと移植片形成培養（例えばシート化培養）して、シート状細胞培養物などの移植片を得る。こうして無菌的に移植片を形成することが可能である。

[0073] 本開示のキットにおいて用いられる凍結保護剤、培地、培養基材などの部材や手法などは、全て上記において詳述されているものを用いることができる。

実施例

[0074] 本開示を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これは本開示の特定の具体例を示すものであり、本開示はこれらに限定されるものではない。

[0075] 例1：シート状細胞培養物の調製

ヒト骨格筋から定法により調製した骨格筋芽細胞（線維芽細胞を含む）を、600、300、200、100および50 μ Lの10%DMSOを含むMCDB131培地に、それぞれ 2×10^7 個含まれるように懸濁し、 -150°C にて凍結保存した。凍結保存した細胞を 37°C の温水中で融解して細胞懸濁液を得た後、10 mLの20%ヒト血清含有DMEM/F12培地（Thermo Fisher Scientific Inc.）を加えて希釈し、温度応答性培養皿（UpCell^(R) 3.5 cm、セルシード）に播種した。その際、10 μ L細胞懸濁液をサンプリングし、トリパンブルーにて染色後セルカウントを実施した。その後 37°C 、5%CO₂下で12~26時間シート化培養を行った。シート化培養後、培地を除去し、1000 μ Lの冷却したHBSS（+）（Thermo Fisher Scientific Inc.）を加えて10分静置し、その後静かにピペティングしてシート状細胞培養物を完全に剥離させた。

[0076] 結果を図1および図2に示す。

細胞の凍結保存液量としては200 μ L以上（すなわち 1.0×10^7 個/mL以下の密度）であれば回収率が低下しない傾向が見られた。また、すべての条件でシート化できたことから、凍結保存液が含まれていたとしてもシート化できることがわかった。

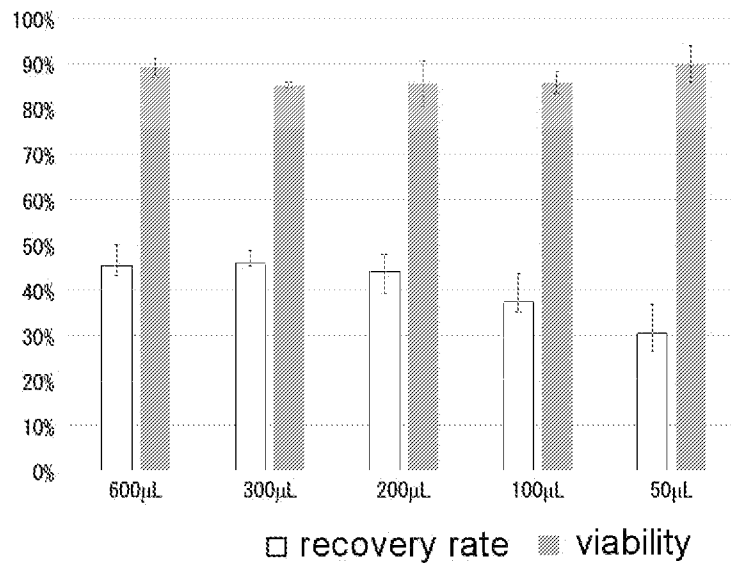
産業上の利用可能性

[0077] 本開示の方法およびキットによれば、医療グレードに耐え得るシート状細胞培養物などの移植片を、効率的に製造可能である。特に本開示のキットを用いることにより、CPCなどの大型設備を有しない医療機関などでも、移植片の材料を無菌的に輸送し、無菌的に移植片を製造することが可能となるため、移植片を利用した再生医療の普及に貢献することが期待される。

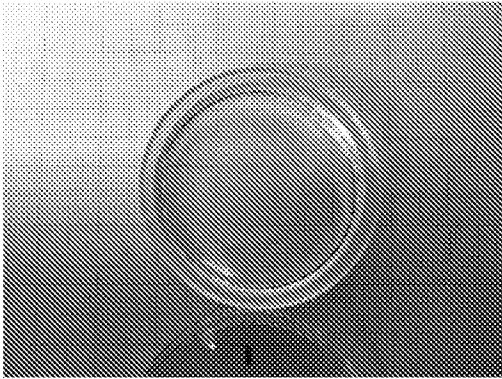
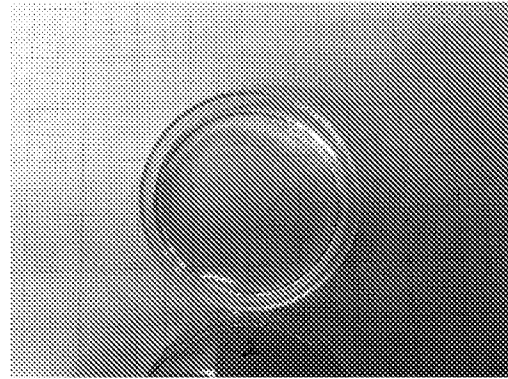
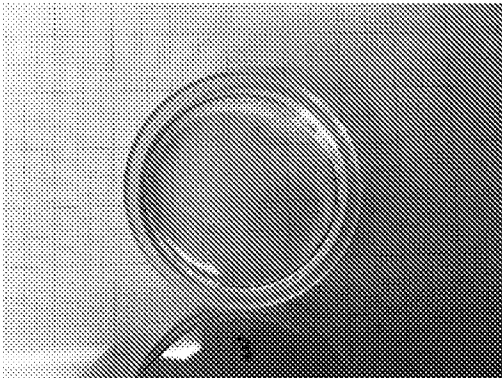
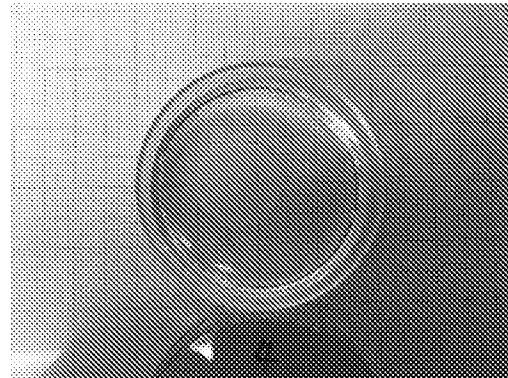
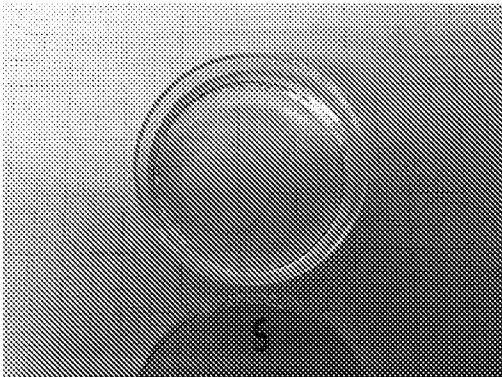
請求の範囲

- [請求項1] 培養基材上で、移植用細胞を含む細胞懸濁液を凍結させることを特徴とする、細胞の凍結保存方法。
- [請求項2] 移植用細胞が、接着細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 移植用細胞が、筋芽細胞または心筋細胞である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 培養基材が、細胞接着性の培養面を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 培養基材が、温度応答性材料で被覆されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 培養基材が、スフェロイド形成用の培養面を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 細胞懸濁液が、凍結保護剤を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 細胞懸濁液が、5～20%の凍結保護剤を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 細胞懸濁液が、培養基材の面積に対して、 $5\mu\text{L}/\text{cm}^2\sim 1000\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の密度で培養基材上に存在する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 移植用細胞が、培養基材の面積に対して、 $7.5\times 10^5\text{個}/\text{cm}^2\sim 3.0\times 10^6\text{個}/\text{cm}^2$ の密度で細胞懸濁液中に存在する、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 細胞培養基材上で凍結された、凍結保存細胞。

[図1]



[図2]

600 μ L300 μ L200 μ L100 μ L50 μ L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/038185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N1/04 (2006.01) i, C12N5/07 (2010.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N1/04, C12N5/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-115058 A (TERUMO CORP.) 16 June 2011, claims 1, 5, paragraphs [0002], [0011], [0015], [0026], examples (Family: none)	1-11
Y		1-11
X	JP 2007-306856 A (JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) 29 November 2007, claims, paragraph [0040] (Family: none)	1-11
Y		1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“I” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 December 2019 (05.12.2019)

Date of mailing of the international search report
17 December 2019 (17.12.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/038185

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2012-512637 A (GE HEALTHCARE UK LIMITED) 07 June 2012, claims 1, 8, paragraphs [0062], [0073] & US 2011/0250632 A1 (claims 1, 8, paragraphs [0094], [0095], [0120]) & GB 2477698 A & WO 2010/079058 A2 & EP 2369918 A1 & CA 2747675 A & CN 102256481 A & KR 10-2011-0100625 A & AU 2009336729 A & SG 172255 A & HK 1161530 A	1-11 1-11
X Y	JP 2015-198604 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF FUKUI) 12 November 2015, claims 3, 6, paragraphs [0030], [0041] (Family: none)	1-4, 6-11 1-11
X Y	WO 2016/121767 A1 (UBE INDUSTRIES, LTD.) 04 August 2016, claims 1, 23, paragraphs [0003], [0048], [0103] & US 2017/0369838 A1 (claims 1, 23, paragraphs [0003], [0135], [0214]) & EP 3252145 A1 & CA 2974276 A & CN 107208046 A & KR 10-2017-0093250 A & SG 11201706009P A & BR 112017015130 A	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2016-67330 A (RIKEN, INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) 09 May 2016, claims 1, 5, paragraph [0028] (Family: none)	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2012-517823 A (NATURIN GMBH & CO.) 09 August 2012, claims 1, 9, 10, 13 & US 2012/0077181 A1 (claims 1, 9, 10, 13) & WO 2010/094747 A1 & EP 2221362 A1 & CA 2751985 A & KR 10-2011-0127185 A & AU 2010215506 A & CN 102317445 A & SG 173740 A & MX 2011008373 A	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2017-535259 A (LIFELINE SCIENTIFIC, INC.) 30 November 2017, claim 6, paragraphs [0038], [0039], example 3 & US 2016/0116454 A1 (claim 6, paragraphs [0043], [0044], example 3) & WO 2016/065363 A1 & EP 3209127 A1 & CN 107109360 A & CA 3002963 A & BR 112017008149 A	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2004-254597 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 16 September 2004, claims 1, 2, examples (Family: none)	11 1-11
X Y	JP 2004-57031 A (SANYO ELECTRIC CO., LTD.) 26 February 2004, claim 1 (Family: none)	11 1-11
X Y	JP 2006-314276 A (TOYO SEIKAN CO., LTD.) 24 November 2006, paragraph [0029] (Family: none)	11 1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/038185

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 5-77389 B2 (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 26 October 1993, claim 1, example 1 (Family: none)	11 1-11
X Y	JP 2002-253205 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 10 September 2002, claim 1, paragraph [0009] (Family: none)	11 1-11
X Y	WO 2009/157585 A1 (JAPAN AGENCY FOR MARINE-EARTH SCIENCE AND TECHNOLOGY) 30 December 2009, claims 1, 10 (Family: none)	11 1-11
X Y	JP 6-209767 A (JAPAN VILENE COMPANY, LTD.) 02 August 1994, claim 1, example 1 (Family: none)	11 1-11
X Y	US 2001/0036665 A1 (YOUNG, S. M. et al.) 01 November 2001, claim 1, paragraphs [0032], [0036], [0045], [0053] & WO 2000/054584 A1 & AU 3889400 A	11 1-11
X Y	MALPIQUE, R. et al., "Cryopreservation of Adherent Cells: Strategies to Improve Cell Viability and Function After Thawing", TISSUE ENGINEERING: PART C, 09 January 2009, vol. 15, no. 3, pp. 373-386, abstract	11 1-11
X A	WO 2016/167332 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 20 October 2016, claims & US 2018/0042220 A1 (claims)	11 1-10
Y	WO 03/064634 A1 (ASAHI TECHNO GLASS CORPORATION) 07 August 2003, claims 1, 5, examples & US 2005/0026133 A1 (claims 1, 5, examples) & EP 1471140 A1 & CA 2474968 A & NZ 534428 A & AU 2003238620 B	1-11
Y	大橋 文哉 ほか著, 臨床応用に向けたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の凍結 保存法の開発, 再生医療 日本再生医療学会雑誌, 01 February 2017, vol. 16, suppl, p. 362, entire text, non- official translation (OHASHI, Fumiya et al., "Development of cryopreservation method for human iPS cell-derived cardiomyocytes for clinical application", Regenerative medicine)	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N1/04(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N1/04, C12N5/07											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2019年										
日本国実用新案登録公報	1996-2019年										
日本国登録実用新案公報	1994-2019年										
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	JP 2011-115058 A (テルモ株式会社) 2011.06.16, 請求項1、請求項5、段落 [0002]、段落 [0011]、段落 [0015]、段落 [0026]、実施例 (ファミリーなし)	1-11									
Y		1-11									
X	JP 2007-306856 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2007.11.29, 特許請求の範囲、段落 [0040] (ファミリーなし)	1-11									
Y		1-11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献						
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 05.12.2019		国際調査報告の発送日 17.12.2019									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 牧野 晃久	4 B 4 4 3 8								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2012-512637 A (ジーイー・ヘルスケア・ユーケイ・リミテッド) 2012.06.07, 請求項1、請求項8、段落 [0062]、段落 [0073] & US 2011/0250632 A1(請求項1、請求項8、段落 [0094]、段落 [0095]、 段落 [0120]) & GB 2477698 A & WO 2010/079058 A2 & EP 2369918 A1 & CA 2747675 A & CN 102256481 A & KR 10-2011-0100625 A & AU 2009336729 A & SG 172255 A & HK 1161530 A	1-11 1-11
X Y	JP 2015-198604 A (国立大学法人福井大学) 2015.11.12, 請求項3、 請求項6、段落 [0030]、段落 [0041] (ファミリーなし)	1-4, 6-11 1-11
X Y	WO 2016/121767 A1 (宇部興産株式会社) 2016.08.04, 請求項1、請 求項23、段落 [0003]、段落 [0048]、段落 [0103] & US 2017/0369838 A1 (請求項1、請求項23、段落 [0003]、段落 [0135]、段落 [0214]) & EP 3252145 A1 & CA 2974276 A & CN 107208046 A & KR 10-2017-0093250 A & SG 11201706009P A & BR 112017015130 A	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2016-67330 A (国立研究開発法人理化学研究所) 2016.05.09, 請 求項1、請求項5、段落 [0028] (ファミリーなし)	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2012-517823 A (ナチュラルン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユ レンクテル・ハフツング・ウント・コムパニー) 2012.08.09, 請求 項1、請求項9、請求項10、請求項13 & US 2012/0077181 A1(請求 項1、請求項9、請求項10、請求項13) & WO 2010/094747 A1 & EP 2221362 A1 & CA 2751985 A & KR 10-2011-0127185 A & AU 2010215506 A & CN 102317445 A & SG 173740 A & MX 2011008373 A	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2017-535259 A (ライフライン サイエンティフィック インコ ーポレイテッド) 2017.11.30, 請求項6、段落 [0038]、段落 [0039]、 実施例3 & US 2016/0116454 A1(請求項6、段落 [0043]、段落 [0044]、 実施例3) & WO 2016/065363 A1 & EP 3209127 A1 & CN 107109360 A & CA 3002963 A & BR 112017008149 A	1-4, 6-11 1-11
X Y	JP 2004-254597 A (住友ベークライト株式会社) 2004.09.16, 請求 項1、請求項2、実施例 (ファミリーなし)	11 1-11
X Y	JP 2004-57031 A (三洋電機株式会社) 2004.02.26, 請求項1 (ファ ミリーなし)	11 1-11
X Y	JP 2006-314276 A (東洋製罐株式会社) 2006.11.24, 段落 [0029] (フ ァミリーなし)	11 1-11

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 5-77389 B2 (理化学研究所) 1993. 10. 26, 請求項 1、実施例 1 (ファミリーなし)	11 1-11
X Y	JP 2002-253205 A (住友ベークライト株式会社) 2002. 09. 10, 請求項 1、段落 [0009] (ファミリーなし)	11 1-11
X Y	WO 2009/157585 A1 (独立行政法人海洋研究開発機構) 2009. 12. 30, 請求項 1、請求項 10 (ファミリーなし)	11 1-11
X Y	JP 6-209767 A (日本バイリーン株式会社) 1994. 08. 02, 請求項 1、実施例 1 (ファミリーなし)	11 1-11
X Y	US 2001/0036665 A1 (YOUNG, S. M. et al.) 2001. 11. 01, 請求項 1、段落 [0032]、段落 [0036]、段落 [0045]、段落 [0053] & WO 2000/054584 A1 & AU 3889400 A	11 1-11
X Y	MALPIQUE, R. et al., Cryopreservation of Adherent Cells: Strategies to Improve Cell Viability and Function After Thawing, TISSUE ENGINEERING: PART C, 2009. 01. 09, Vol. 15, No. 3, p. 373-386, Abstract	11 1-11
X A	WO 2016/167332 A1 (国立大学法人大阪大学) 2016. 10. 20, 特許請求の範囲 & US 2018/0042220 A1 (請求の範囲)	11 1-10
Y	WO 03/064634 A1 (旭テクノグラス株式会社) 2003. 08. 07, 請求項 1、請求項 5、実施例 & US 2005/0026133 A1 (請求項 1、請求項 5、実施例) & EP 1471140 A1 & CA 2474968 A & NZ 534428 A & AU 2003238620 B	1-11
Y	大橋 文哉 ほか著, 臨床応用に向けたヒト i P S 細胞由来心筋細胞の凍結保存法の開発, 再生医療 日本再生医療学会雑誌, 2017. 02. 01, Vol. 16, Suppl, p. 362, 全文	1-11