(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7607339号
(P7607339)

(45)発行日　令和6年12月27日(2024.12.27)

(24)登録日　令和6年12月19日(2024.12.19)

(51)国際特許分類		FI		
C12M	*1/00 (2006.01)*	C12M	1/00	A
C12N	*1/04 (2006.01)*	C12N	1/04	

請求項の数　14　（全20頁）

(21)出願番号　特願2021-537319(P2021-537319)
(86)(22)出願日　令和2年8月4日(2020.8.4)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/029814
(87)国際公開番号　WO2021/025017
(87)国際公開日　令和3年2月11日(2021.2.11)
審査請求日　令和5年6月19日(2023.6.19)
(31)優先権主張番号　特願2019-143967(P2019-143967)
(32)優先日　令和1年8月5日(2019.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　509038108
株式会社北里コーポレーション
静岡県富士市柳島１００番地１０
(74)代理人　110003111
あいそう弁理士法人
(72)発明者　井上 太
静岡県富士市柳島１００番地１０ 株式会社北里コーポレーション内
(72)発明者　加藤 恵一
東京都新宿区西新宿７丁目２０番３号 ウエストゲート新宿ビル 加藤レディスクリニック内
(72)発明者　上野 智
東京都新宿区西新宿７丁目２０番３号 ウエストゲート新宿ビル 加藤レディス
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞凍結前処理作業用プレート

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞凍結前処理作業用プレートであって、前記プレートは、作業用平板部と、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液収納用の第１の凹部と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第２の凹部と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第３の凹部と、廃棄液収納用の第４の凹部とを備え、さらに、前記作業用平板部の表面には、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の第１の円状区画部と、前記低濃度処理液載置用の第２の円状区画部と、前記低濃度処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記第３の円状区画部は、互いに近接しており、さらに、前記作業用平板部の表面には、前記第１の円状区画部を取り囲む拡大第１円状区画部と、前記第２の円状区画部を取り囲む拡大第２円状区画部と、前記第３の円状区画部を取り囲む拡大第３円状区画部を有しており、前記拡大第１円状区画部、前記拡大第２円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記拡大第１円状区画部は、前記第１の円状区画部を前記拡大第１円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第２円状区画部は、前記第２の円状区画部を前記拡大第２円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第３円状区画部は、前記第３の円状区画部を前記拡大第３円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっていることを特徴とする細胞凍結前処理作業

用プレート。
【請求項２】
前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部とを有している請求項１に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項３】
前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記第１の凹部に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部を有している請求項１または２に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項４】
前記作業用平板部の表面には、前記第２の円状区画部より前記第１の円状区画部に向かって延びる第１の矢印表示と、前記第３の円状区画部より前記第１の矢印表示または前記第１の円状区画部に向かって延びる第２の矢印表示を有している請求項１ないし３のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項５】
前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記作業用平板部、前記第１の凹部、前記第２の凹部および前記第３の凹部を同時に被包する蓋を備えている請求項１ないし４のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項６】
前記細胞凍結前処理作業用プレートは、底部と、前記底部より上方に延びる環状側壁と、前記底部より上方に突出する突出部を備え、前記突出部に前記第２の凹部または前記第３の凹部を備え、前記突出部の側面と前記環状側壁の内面と前記底部により、前記第４の凹部が形成されている請求項１ないし５のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項７】
前記細胞凍結前処理作業用プレートは、底部と、前記底部より上方に延びる環状側壁と、前記底部より上方に突出する第１の突出部と、前記底部より上方に突出する第２の突出部とを備え、前記第１の突出部が、前記第２の凹部を備え、前記第２の突出部が前記第３の凹部を備え、前記突出部の側面と前記環状側壁の内面と前記底部により、前記第４の凹部が形成されている請求項１ないし６のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項８】
前記細胞凍結前処理作業用プレートは、第２の平板部を備え、前記第２の平板部に、前記第１の凹部が形成されている請求項１ないし７のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項９】
前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部および前記拡大第１円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部および前記拡大第２円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部および前記拡大第３円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部とを有している請求項１ないし８のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。
【請求項１０】
細胞凍結前処理作業用プレートであって、前記プレートは、作業用平板部と、処理液収納用の第１の凹部と、処理液収納用の第２の凹部と、処理液収納用の第３の凹部と、廃棄処理液収納用の第４の凹部とを備え、さらに、前記作業用平板部の表面には、処理液載置用の第１の円状区画部と、処理液載置用の第２の円状区画部と、処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記第３の円状区画部は、互いに近接しており、さらに、前記作業用平板部の表面には、前記第１の円状区画部を取り囲む拡大第１円状区画部と、前記第２の円状区画部を取り囲む拡大第２円状区画部と、前記第３の円状区画部を取り囲む拡大第３円状区画部を有しており、前記拡大

第１円状区画部、前記拡大第２円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記拡大第１円状区画部は、前記第１の円状区画部を前記拡大第１円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第２円状区画部は、前記第２の円状区画部を前記拡大第２円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第３円状区画部は、前記第３の円状区画部を前記拡大第３円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっていることを特徴とする細胞凍結前処理作業用プレート。

【請求項１１】

前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部を有し、前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記第１の凹部に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部を有している請求項１０に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

【請求項１２】

前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部および前記拡大第１円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部および前記拡大第２円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部および前記拡大第３円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部とを有している請求項１０または１１に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

【請求項１３】

前記作業用平板部の表面には、前記第２の円状区画部より前記第１の円状区画部に向かって延びる第１の矢印表示と、前記第３の円状区画部より前記第１の矢印表示または前記第１の円状区画部に向かって延びる第２の矢印表示を有している請求項１０ないし１２のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

【請求項１４】

前記拡大第１円状区画部の直径は、前記第１の円状区画部の直径の１．５倍～３倍であり、前記拡大第２円状区画部の直径は、前記第２の円状区画部の直径の１．５倍～３倍であり、前記拡大第３円状区画部の直径は、前記第３の円状区画部の直径の１．５倍～３倍である請求項１ないし１３のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、哺乳動物の卵子、胚などの卵、精子、造血幹細胞、多能性幹細胞等の幹細胞などの生体細胞を凍結保存する際に使用する細胞凍結前処理作業用プレートに関する。

【背景技術】

【０００２】

哺乳動物胚の凍結保存は、特定の系統や品種の遺伝資源の保存を可能とする。また、絶滅の危機に瀕している動物種の維持にも有効である。さらに、ヒトの不妊治療においても有用である。

【０００３】

哺乳動物胚の凍結保存方法としては、特開２０００－１８９１５５公報（特許文献１）において、哺乳動物胚または卵子を滅菌処理した凍結ストロー、凍結バイアルまたは凍結チューブ等の凍結保存用容器の内面に、これらの胚または卵子を包被するに充分な最少量のガラス化液で貼り付け、この凍結保存用容器を密封し、そしてこの容器を液体窒素に接触させて急速に冷却することが提案されている。

【０００４】

また、本願発明者は、特許文献２（特開２００２－３１５５７３、ＷＯ　０２－０８５

１１０　Ａ１）を提案している。特許文献２の卵凍結保存具１は、耐寒性材料により形成された本体部２と、本体部２の一端に取り付けられ、可撓性かつ透明性かつ液体窒素耐性材料により形成された卵付着保持用ストリップ３と、卵付着保持用ストリップ３を被包可能に本体部２に着脱自在に取り付けられる一端が封鎖され、かつ耐寒性材料により形成された筒状部材４とからなるものである。

【０００５】

特開２０１７－１１８８８４（特許文献３）には、移植直前の胚の処理等の、処理液を用いた細胞の処理に用いるための細胞処理容器が提案されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【文献】特開２０００－１８９１５５

【文献】特開２００２－３１５５７３（ＷＯ　０２－０８５１１０　Ａ１）

【文献】特開２０１７－１１８８８４（ＷＯ　２０１６－１９０３２２　Ａ１）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

そして、上記のような卵の凍結保存では、ガラス化保存法が用いられている。ガラス化保存法とは、グリセロールやエチレングリコールなどの耐凍剤を含む水溶液の凝固点降下により、氷点下でも氷晶ができにくくなる原理を利用するものである。この溶液を急速に液体窒素中で冷却すると、氷晶を生じさせないまま固体化させることができ、水分が結晶化することなくガラス状の固体になるもので、ガラス化と呼ばれている。ガラス化法により、卵を凍結するためには、卵の前処理が必要である。特許文献３の処理容器は、ガラス化凍結のための前処理用のものではなく、移植直前の胚の処理等のための容器である。

【０００８】

上述のガラス化凍結のための前処理を行うための専用の容器は従来提供されていない。そこで各クリニックは、通常のシャーレやマルチウェルシャーレ、センターウェルディッシュ等を用いてなるべく作業ミスがなく、移植作業の短時間処理ができるような対応を行っている現状がある。

【０００９】

本発明の目的は、ガラス化凍結のための前処理を手順間違いが少なく、かつ、容易に行うことができる細胞凍結前処理作業用プレートを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

上記目的を達成するものは、以下のものである。

細胞凍結前処理作業用プレートであって、前記プレートは、作業用平板部と、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液収納用の第１の凹部と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第２の凹部と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第３の凹部と、廃棄液収納用の第４の凹部とを備え、さらに、前記作業用平板部の表面には、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の第１の円状区画部と、前記低濃度処理液載置用の第２の円状区画部と、前記低濃度処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記第３の円状区画部は、互いに近接しており、さらに、前記作業用平板部の表面には、前記第１の円状区画部を取り囲む拡大第１円状区画部と、前記第２の円状区画部を取り囲む拡大第２円状区画部と、前記第３の円状区画部を取り囲む拡大第３円状区画部を有しており、前記拡大第１円状区画部、前記拡大第２円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記拡大第１円状区画部は、前記第１の円状区画部を前記拡大第１円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第２円状区画部は、前記第２の円状区

画部を前記拡大第２円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第３円状区画部は、前記第３の円状区画部を前記拡大第３円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっている細胞凍結前処理作業用プレート。

【００１１】

また、上記目的を達成するものは、以下のものである。

細胞凍結前処理作業用プレートであって、前記プレートは、作業用平板部と、処理液収納用の第１の凹部と、処理液収納用の第２の凹部と、処理液収納用の第３の凹部と、廃棄処理液収納用の第４の凹部とを備え、さらに、前記作業用平板部の表面には、処理液載置用の第１の円状区画部と、処理液載置用の第２の円状区画部と、処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記第３の円状区画部は、互いに近接しており、さらに、前記作業用平板部の表面には、前記第１の円状区画部を取り囲む拡大第１円状区画部と、前記第２の円状区画部を取り囲む拡大第２円状区画部と、前記第３の円状区画部を取り囲む拡大第３円状区画部を有しており、前記拡大第１円状区画部、前記拡大第２円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記拡大第３円状区画部の外縁は、環状溝となっており、前記拡大第１円状区画部は、前記第１の円状区画部を前記拡大第１円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第２円状区画部は、前記第２の円状区画部を前記拡大第２円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっており、前記拡大第３円状区画部は、前記第３の円状区画部を前記拡大第３円状区画部の内側かつ外縁に接する状態にて取り囲むものとなっている細胞凍結前処理作業用プレート。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】図１は、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートの基本的構成を備えた細胞凍結前処理作業用プレートの正面図である。

【図２】図２は、図１のＡ－Ａ線断面図である。

【図３】図３は、図１のＢ－Ｂ線断面図である。

【図４】図４は、図１に示した細胞凍結前処理作業用プレートの斜視図である。

【図５】図５は、図１に示した細胞凍結前処理作業用プレートに蓋を被せた状態の正面図である。

【図６】図６は、図５に示した細胞凍結前処理作業用プレートに被せられた蓋の斜視図である。

【図７】図７は、図１に示した細胞凍結前処理作業用プレートの平板部の拡大図である。

【図８】図８は、図７のＣ－Ｃ線拡大断面図である。

【図９】図９は、図７のＤ－Ｄ線拡大断面図である。

【図１０】図１０は、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートの基本的構成を備えた他の例の細胞凍結前処理作業用プレートの正面図である。

【図１１】図１１は、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートの基本的構成を備えた他の例の細胞凍結前処理作業用プレートの正面図である。

【図１２】図１２は、本発明の実施例の細胞凍結前処理作業用プレートの正面図である。

【図１３】図１３は、本発明の他の実施例の細胞凍結前処理作業用プレートの正面図である。

【図１４】図１４は、本発明の他の実施例の細胞凍結前処理作業用プレートの正面図である。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

本発明の細胞凍結前処理作業用プレートを図面に示す実施例を用いて説明する。

【００１４】

本発明の細胞凍結前処理作業用プレートの基本的構成を備えた細胞凍結前処理作業用プレートは、作業用平板部２と、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処

理液収納用の第１の凹部１４と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第２の凹部１５と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第３の凹部１６と、廃棄液収納用の第４の凹部１８とを備え、さらに、作業用平板部２の表面には、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の第１の円状区画部２１と、低濃度処理液載置用の第２の円状区画部と、低濃度処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、第１の円状区画部２１、第２の円状区画部２２および第３の円状区画部２３は、互いに近接したものとなっている。

【００１５】

また、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートの基本的構成を備えた細胞凍結前処理作業用プレートは、以下のようなものであってもよい。

この実施形態の細胞凍結前処理作業用プレートは、作業用平板部２と、処理液収納用の第１の凹部１４と、処理液収納用の第２の凹部１５と、処理液収納用の第３の凹部１６と、廃棄処理液収納用の第４の凹部１８とを備え、さらに、作業用平板部２の表面には、処理液載置用の第１の円状区画部２１と、処理液載置用の第２の円状区画部２２と、処理液載置用の第３の円状区画部２３とを備え、第１の円状区画部２１、第２の円状区画部２２および第３の円状区画部２３は、互いに近接したものとなっている。

【００１６】

また、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートの基本的構成を備えた細胞凍結前処理作業用プレートは、以下のようなものであってもよい。

【００１７】

この細胞凍結前処理作業用プレートは、作業用平板部２と、処理液収納用の第１の凹部１４と、処理液収納用の第２の凹部１５と、処理液収納用の第３の凹部１６と、廃棄処理液収納用の第４の凹部１８とを備え、さらに、作業用平板部２の表面には、処理液載置用の第１の円状区画部２１と、処理液載置用の第２の円状区画部２２と、処理液載置用の第３の円状区画部２３とを備え、第１の円状区画部２１、第２の円状区画部２２および第３の円状区画部２３は、互いに近接しており、さらに、作業用平板部２は、第１の円状区画部２１に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部２６と、第２の円状区画部２２に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部２７と、第３の円状区画部２３に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部２８とを備え、さらに、細胞凍結前処理作業用プレート１は、第１の凹部１４に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部２９を有している。

【００１８】

図１ないし図４に示す細胞凍結前処理作業用プレート１は、下部環状壁４と、下部環状壁４より上方に延びる環状側壁３と、環状側壁３内に位置する底部６と、下部環状壁４の一端部に設けられた上面部１２とを備えている。また、この実施例のプレート１では、下部環状壁４は、略矩形状のものとなっており、環状側壁３より大きく、環状側壁３より突出した部分の下部環状壁４の上面に、横長の上記の上面部１２と、環状側壁３の両側部および奥側の下端と下部環状壁４の上端を繋ぐ幅の狭いコの字型の平坦部１３が設けられている。

【００１９】

下部環状壁４は、角部が湾曲した矩形状の環状壁となっている。下部環状壁の一端部、具体的には、図１における下端部（手前側）には、下部環状壁４の上端と連接した上面部１２が設けられている。上面部１２は、平坦部となっており、その表面に筆記具にて、文字等を記載可能となっている。また、上面部１２の表面は、粗面、具体的には、梨地表面となっていることが好ましい。このようにすることにより、筆記具等による記載がより容易となり、かつ、記載した文字等の視認も容易となる。

【００２０】

また、細胞凍結前処理作業用プレート１は、上面部１２を除く部分の下部環状壁４より上方に延びる環状側壁３を有している。また、環状側壁３の両側部および奥側の下端と下部環状壁４の上端を繋ぐ幅の狭いコの字型の平坦部１３が設けられている。このため、下

部環状壁４と環状側壁３間には、上面部１２および平坦部１３により段部が形成されている。この段部の上面が蓋５の載置部となっている。図３に示すように、環状側壁３は、上面部１２よりも高く形成されている。この実施例では、環状側壁３は、図１ないし図４に示すように、角部が湾曲した矩形状の環状壁となっている。

そして、環状側壁３の内部に、作業用平板部２と、処理液収納用の第１の凹部１４と、処理液収納用の第２の凹部１５と、処理液収納用の第３の凹部１６と、廃棄処理液収納用の第４の凹部１８が設けられている。

【００２１】

この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図４に示すように、作業用平板部２は、環状側壁３の上端より、若干下方となる位置に設けられており、略矩形状の平板部となっている。また、この実施例では、第２の平板部１７を備え、第２の平板部１７に、第１の凹部１４が形成されている。具体的には、第２の平板部１７は、作業用平板部２と隣り合うように、形成されており、その上面は、作業用平板部２の上面とほぼ同じ高さとなっている。

【００２２】

そして、第２の平板部１７の中央部には、第１の凹部１４が形成されている。第１の凹部１４は、平坦かつ小円上の底面と、底面に向かって縮径するテーパ状側面を有するものとなっている。このため、第１の凹部１４は、逆円錐台状（底面に向かって断面積が減少する）となっている。第１の凹部１４は、細胞処理液収納用の凹部であり、具体的には、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液収納用の凹部である。

【００２３】

また、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１ないし図４に示すように、環状側壁３の内部の底部６より上方に突出する第１の突出部４１を備え、第１の突出部４１に第２の凹部１５が形成されている。さらに、この実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１では、環状側壁３の内部の底部６より上方に突出する第２の突出部４２を備え、第２の突出部４２に第３の凹部１６が形成されている。第２の凹部１５および第３の凹部１６は、平坦かつ小円上の底面と、底面に向かって縮径するテーパ状側面を有するものとなっている。このため、第２の凹部１５および第３の凹部１６は、逆円錐台状（底面に向かって断面積が減少する）となっている。

環状側壁３の高さ、言い換えれば、環状側壁３の上端と、作業用平板部２，第２の平板部１７、第１の突出部４１（第１の凹部１５）の上端、第２の突出部４２（第１の凹部１６）の上端間の距離は、１～５ｍｍが好ましく、特に、１．５～４ｍｍが好ましい。

【００２４】

第２の凹部１５は、細胞処理液収納用の凹部であり、具体的には、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の凹部である。同様に、第３の凹部１６は、細胞処理液収納用の凹部であり、具体的には、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の凹部である。なお、第２の凹部１５および第３の凹部１６に収納される処理液における細胞膜透過性凍結保護物質の濃度は、異なるものであってもよい。

【００２５】

さらに、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１ないし図４に示すように、廃棄液収納用の第４の凹部１８を備えている。具体的には、突出部４１、４２の側面と環状側壁の内面と底部６により形成された凹部が、第４の凹部１８となっている。

そして、作業用平板部２の表面には、図７に示すように、処理液載置用の第１の円状区画部２１と、処理液載置用の第２の円状区画部２２と、処理液載置用の第３の円状区画部２３とを備えている。

【００２６】

第１の円状区画部２１は、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の円状区画部であり、第２の円状区画部２２は、細胞膜透過性凍結保護物質低濃度処理液載置用の円状区画部であり、第３の円状区画部２３は、細胞膜透過性凍結保護物質低濃度処理液載置用

の円状区画部である。各円状区画部２１，２２，２３の大きさ（直径）は、３～８ｍｍが好ましく、特に、４～７ｍｍが好ましい。また、各円状区画部２１，２２，２３の面積は、７～５０ｍｍ^{2}が好ましく、特に、１２～４０ｍｍ^{2}が好ましい。

【００２７】

各円状区画部２１，２２，２３は、ほぼ同じ大きさであることが好ましいが、個々に異なるものであってもよい。また、各円状区画部２１，２２，２３には、所定量の処理液が載置可能であることが好ましい。載置可能処理液量としては、１０～５０μＬが好ましく、特に、１５～２５μＬが好ましい。

【００２８】

また、第１の円状区画部２１、第２の円状区画部２２および第３の円状区画部２３は、互いに近接したものとなっている。第１の円状区画部２１と第２の円状区画部２２間の距離は、１～５ｍｍが好ましく、特に、１．５～３ｍｍが好ましい。また、第３の円状区画部２３は、図７に示すように、第１の円状区画部２１および第２の円状区画部２２に近接するとともに、それらよりほぼ等距離離間していることが好ましい。具体的には、図７に示すように、第１の円状区画部２１と第２の円状区画部２２の中間部の手前側に位置することが好ましい。第１の円状区画部２１および第２の円状区画部２２と第３の円状区画部２３間の距離は、１～５ｍｍが好ましく、特に、１．５～３ｍｍが好ましい。

【００２９】

また、図７ないし図９に示すように、第１の円状区画部２１の外縁２１ａ、第２の円状区画部２２の外縁２２ａ、第３の円状区画部２３の外縁２３ａは、環状溝となっていることが好ましい。なお、上記の外縁２１ａ，２２ａ，２３ａは、環状リブであってもよい。

【００３０】

さらに、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１および図７に示すように、作業用平板部２は、第１の円状区画部２１に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部２６を有している。表示部２６における「ＢＳ」は、「Basic Solution」簡略表示で、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液を示しており、第１の円状区画部２１に載置される処理液が、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液であることを作業者に伝える表示となっており、その横に付された「２０μＬ」は、載置量を作業者に伝える表示となっている。

【００３１】

ＢＳ（細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液）としては、従来より用いられているものが好適に使用される。例えば、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液としては、細胞培養基礎液（例えば、ＨＥＰＥＳ［4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid］含有細胞培養液）に、細胞膜透過性凍結保護物質を含有させず、必要と考える化合物、例えば、シュークロース、トレハロース、パーコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ウシ血清アルブミン、フィコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロースからなる群より選択された少なくとも一種の水溶性セルロースなどから選択される１種または２種以上の細胞膜非透過性凍結保護物質、ゲンタマイシンのような抗生物質を含有するものが好適である。

【００３２】

また、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１および図７に示すように、第２の円状区画部２２に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部２７を有している。表示部２７における「ＥＳ」は、「Equilibration Solution」簡略表示で、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液を示しており、第２の円状区画部２２に載置される処理液が、低濃度処理液であることを作業者に伝える表示となっており、その横に付された「２０μＬ」は、載置量を作業者に伝える表示となっている。

【００３３】

また、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１および図７に示すように、第３の円状区画部２３に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部２８を有

している。表示部２８における「ＥＳ」は、「Equilibration Solution」簡略表示で、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液を示しており、第３の円状区画部２３に載置される処理液が、低濃度処理液であることを作業者に伝える表示となっており、その横に付された「２０μＬ」は、載置量を作業者に伝える表示となっている。

【００３４】

ＥＳ（細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液）としては、従来より用いられているものが好適に使用される。例えば、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液としては、細胞培養基礎液（例えば、ＨＥＰＥＳ［4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid］含有細胞培養液）に、グリセロール、プロピレングリコール、ジメチルスルホサイド（ＤＭＳＯ）、エチレングリコール、ブタンジオールなどの細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度となるように添加するとともに、シュークロース、トレハロース、パーコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ウシ血清アルブミン、フィコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロースなどの細胞膜非透過性凍結保護物質を含有するものが好適である。さらに、このＥＳにおいても、ゲンタマイシンのような抗生物質を含有してもよい。なお、このＥＳにおける細胞膜透過性凍結保護物質の含有率は、後述する「ＶＳ」（細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液）における細胞膜透過性凍結保護物質の含有率の２０～７０％であることが好ましく、特に、３０～６０％であることが好ましい。

【００３５】

また、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１に示すように、第１の凹部１４に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部２９を有している。表示部２９における「ＥＳ」は、「Equilibration Solution」簡略表示で、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液を示しており、第１の凹部１４に収納（注入）される処理液が、低濃度処理液であることを作業者に伝える表示となっており、その横に付された「３００μＬ」は、注入量を作業者に伝える表示となっている。

【００３６】

また、細胞凍結前処理作業用プレートは、図１０に示すプレート１ａのように、第２の凹部１５に収納される処理液名および収納量表示を有する第５の表示部４３、第３の凹部１６に収納される処理液名および収納量表示を有する第６の表示部４４を有するものであってもよい。

【００３７】

また、細胞凍結前処理作業用プレートは、図１０に示すプレート１ａのように、第４の凹部は、仕切部４６により、第２の凹部側となる凹部１８ａと、第３の凹部側となる凹部１８ｂに区分されていてもよい。

【００３８】

表示部４３，４４における「ＶＳ」は、「Vitrification Solution」簡略表示で、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液を示しており、第２の凹部１５，第３の凹部１６に収納（注入）される処理液が、高濃度処理液であることを作業者に伝える表示となっており、その横に付された「３００μＬ」は、注入量を作業者に伝える表示となっている。

【００３９】

ＶＳ（細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液）としては、従来より用いられているものが好適に使用される。例えば、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液としては、細胞培養基礎液（例えば、ＨＥＰＥＳ［4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid］含有細胞培養液）に、グリセロール、プロピレングリコール、ジメチルスルホサイド（ＤＭＳＯ）、エチレングリコール、ブタンジオールなどの細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度となるように添加するとともに、シュークロース、トレハロース、パーコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ウシ血清アルブミン、フィコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプ

ロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロースなどの細胞膜非透過性凍結保護物質を含有するものが好適である。さらに、このＶＳにおいても、ゲンタマイシンのような抗生物質を含有してもよい。なお、このＶＳにおける細胞膜透過性凍結保護物質の含有率は、上述した「ＥＳ」（細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液）における細胞膜透過性凍結保護物質の含有率の１．５～３倍であることが好ましく、特に、１．７～２．５倍であることが好ましい。

【００４０】

また、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１および図７に示すように、作業用平板部２の表面には、第２の円状区画部２２より第１の円状区画部２１に向かって延びる第１の矢印表示２４と、第３の円状区画部２３より第１の矢印表示２４に向かって延びる第２の矢印表示２５を有している。第２の矢印表示２５は、第１の円状区画部２１に向かって延びるものであってもよい。

【００４１】

また、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１および図７に示すように、作業用平板部２の表面には、図７に示すように、第１の矢印表示付近に、第１のステップ順表示３５（１）を備え、第２の矢印表示付近に第２のステップ順表示３６（２）を備え、さらに、図１に示すように、第２の平板部１７には、第３のステップ順表示（３）を備えている。さらに、この実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１では、第１のステップ順表示（１）付近に、第１のステップ時間表示３７を、第２のステップ順表示（２）付近に、第２のステップ時間表示３８を、第３のステップ順表示（３）付近に、第３のステップ時間表示を備えている。

【００４２】

そして、この細胞凍結前処理作業用プレート１では、図１および図４に示すように、作業用平板部２の隣（右側）に第１の凹部１４を備える第２の平板部１７が位置し、作業用平板部２および第２の平板部１７の手前側に、第２の凹部１５，第３の凹部１６および第４の凹部１８が位置するものとなっており、それらにより、矩形状作業面が形成されている。そして、矩形状作業面の中央部は、作業用平板部２、第１の凹部１４、第２の凹部１５，第３の凹部１６の作業順を示す作業順表示（１，２，３，４）が設けられている。なお、作業順表示の３，４は、逆であってもよい。

【００４３】

そして、細胞凍結前処理作業用プレートは、図５および図６に示すように、作業用平板部２、第１の凹部１４、第２の凹部１５および第３の凹部１６を同時に被包する蓋５を備えていることが好ましい。図６に示すように、この実施例の蓋５は、上述した矩形状作業面の全体を被覆するものとなっており、蓋５を被嵌した状態において、上面部１２は露出するものとなっている。このため、蓋５は、上面部１２への文字記載などの作業の障害とならない。また、この実施例の蓋５は、天板部５１と天板部５１のより下方に延びる環状側壁５２を有する。環状側壁５２には、側面に向かい合う複数の組のスリット５３を備えている。さらに、蓋５の内側上面には、向かい合うリブ５４が設けられている。

【００４４】

細胞凍結前処理作業用プレート１および蓋５は、合成樹脂材料により形成される。細胞凍結前処理作業用プレート１および蓋５は、透明性が高いことが望ましく、透明性硬質合成樹脂が好適である。透明性硬質合成樹脂としては、ポリスチレン，ＳＢＳなどのスチレン系樹脂、ポリカーボネート、アクリロニトリル系樹脂、ポリプロピレン、ポリエチレンなどのポリオレフィン、ポリ塩化ビニル、ＰＭＭＡ（ポリメチルメタアクリレート）ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレートなどのポリエステル樹脂等を用いることが好ましい。

【００４５】

次に、図１１に示す細胞凍結前処理作業用プレート１ｂについて説明する。このプレート１ｂの基本構成は、上述したプレート１と同じである。両者の相違点は、作業用平板部２および第１の凹部１４に対する第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８

の配置位置である。

【００４６】

この細胞凍結前処理作業用プレート１ｂでは、作業用平板部２の隣（右側）に第１の凹部１４を備える第２の平板部１７が位置し、第２の平板部１７の隣（右側）に、第２の凹部１５，第３の凹部１６および第４の凹部１８が位置するものとなっており、それらにより、横長矩形状作業面が形成されている。このため、プレート１ｂでは、下部環状壁４ａ、環状側壁３ａも横長矩形状となっており、上面部１２も横長のものとなっている。プレート１ｂにおいても、環状側壁３ａの両側部および奥側の下端と下部環状壁４ａの上端を繋ぐ幅の狭い平坦部１３が設けられている。そして、このプレート１ｂにおいても、作業用平板部２、第１の凹部１４、第２の凹部１５，第３の凹部１６の作業順を示す作業順表示（１，２，３，４）が設けられている。

【００４７】

次に、図１２に示す本発明の実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１ｃについて説明する。このプレート１ｃの基本構成は、上述したプレート１と同じである。両者の相違点は、作業用平板部２の構成、作業用平板部２、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８の配置位置である。

【００４８】

この実施例のプレート１ｃでは、図１２に示すように、作業用平板部２ａは、上述したプレート１の作業用平板部２より大きいものとなっている。そして、作業用平板部２ａの表面には、第１の円状区画部２１、第２の円状区画部２２、第３の円状区画部２３、第１の円状区画部２１を取り囲む拡大第１円状区画部６１、第２の円状区画部２２を取り囲む拡大第２円状区画部６２、第３の円状区画部２３を取り囲む拡大第３円状区画部６３を有している。第１の円状区画部２１、第２の円状区画部２２，第３の円状区画部２３の大きさ、配置等は、上述したプレート１と同じである。

【００４９】

拡大第１円状区画部６１は、第１の円状区画部２１より直径が大きく、第１の円状区画部２１を中心ではなく、第１の円状区画部２１を拡大第１円状区画部６１の内側かつ外縁に近接もしくは外縁に接する状態にて取り囲むものとなっている。拡大第２円状区画部６２も、第２の円状区画部２２より直径が大きく、第２の円状区画部２２を中心ではなく、第２の円状区画部２２を拡大第２円状区画部６２の内側かつ外縁に近接もしくは外縁に接する状態にて取り囲むものとなっている。拡大第３円状区画部６３も、第３の円状区画部２３より直径が大きく、第３の円状区画部２３を中心ではなく、第３の円状区画部２３を拡大第３円状区画部６３の内側かつ外縁に近接もしくは外縁に接する状態にて取り囲むものとなっている。

【００５０】

第１の円状区画部２１、拡大第１円状区画部６１、第２の円状区画部２２、拡大第２円状区画部６２、第３の円状区画部２３、拡大第３円状区画部６３の外縁２１ａ，２２ａ，２３ａ，６１ａ，６２ａ，６３ａは、環状溝となっている。なお、上記の外縁は、環状リブでもよい。

【００５１】

拡大第１円状区画部６１は、 細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の円状区画部であり、拡大第２円状区画部６２は、細胞膜透過性凍結保護物質低濃度処理液載置用の円状区画部であり、拡大第３円状区画部６３は、細胞膜透過性凍結保護物質低濃度処理液載置用の円状区画部である。各拡大円状区画部６１，６２，６３の直径は、各円状区画部２１，２２，２３の直径の１．５倍～３倍であることが好ましく、特に、１．７倍～２．５倍であることが好ましい。同様に、各拡大円状区画部６１，６２，６３の面積は、各円状区画部２１，２２，２３の面積の２倍～１０倍であることが好ましく、特に、３倍～７倍であることが好ましい。

【００５２】

この実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１ｃは、図１２に示すように、作業用平板

部２ａには、第１の円状区画部２１および拡大第１円状区画部６１に載置される処理液名および載置量表示（２つの表示）を有する第１の表示部２６ａを有している。表示部２６ａにおける「ＢＳ」は、「Basic Solution」簡略表示で、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液を示しており、その付近に付された「２０μＬ」は第１の円状区画部２１への載置量を、「１００μＬ」は、拡大第１円状区画部６１への載置量を作業者に伝える表示となっている。複数の細胞を同時に処理する場合には、拡大第１円状区画部６１が用いられ、単独細胞処理の場合には、第１の円状区画部２１が用いられる。

【００５３】

さらに、この実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１ｃは、図１２に示すように、作業用平板部２ａには、第２の円状区画部２２および拡大第２円状区画部６２に載置される処理液名および載置量表示（２つの表示）を有する第２の表示部２７ａを有している。表示部２７ａにおける「ＥＳ」は、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液を示しており、その付近に付された「２０μＬ」は、第２の円状区画部２２への載置量を、「１００μＬ」は、拡大第２円状区画部６２への載置量を作業者に伝える表示となっている。複数の細胞を同時に処理する場合には、拡大第２円状区画部６２が用いられ、単独細胞処理の場合には、第２の円状区画部２２が用いられる。

【００５４】

さらに、この実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１ｃは、図１２に示すように、作業用平板部２ａには、第３の円状区画部２３および拡大第３円状区画部６３に載置される処理液名および載置量表示（２つの表示）を有する第３の表示部２８ａを有している。表示部２８ａにおける「ＥＳ」は、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液を示しており、その付近に付された「２０μＬ」は、第３の円状区画部２３への載置量を、「１００μＬ」は、拡大第３円状区画部６３への載置量を作業者に伝える表示となっている。複数の細胞を同時に処理する場合には、拡大第３円状区画部６３が用いられ、単独細胞処理の場合には、第３の円状区画部２３が用いられる。

【００５５】

そして、この実施例のプレート１ｃでは、作業用平板部２ａの手前側に、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８が配置されている。そして、この実施例のプレート１ｃにおいても、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６に収納（注入）される処理液名および収納量表示を備えている。そして、作業用平板部２、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８は、環状側壁３ｂにより囲まれており、それらの上面は、環状側壁３ｂの上端より、若干下方に位置するものとなっている。また、この実施例のプレート１ｃにおいても、下部環状壁４ｂは、略矩形状のものとなっており、プレート１と同様に、環状側壁３ｂより大きく、環状側壁３ｂより突出した部分の下部環状壁４ｂの上面に、横長の上面部１２と、環状側壁３ｂの両側部および奥側の下端と下部環状壁４ｂの上端を繋ぐ幅の狭い平坦部１３を有している。

【００５６】

次に、図１３に示す実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１ｄについて説明する。このプレート１ｄの基本構成は、上述したプレート１ｃと同じである。両者の相違点は、作業用平板部２ｂ、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８の配置位置である。

【００５７】

この実施例のプレート１ｄでは、作業用平板部２ｂの側部（具体的には、右側）に、奥側から、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６の順に配置され、第２の凹部１５および第３の凹部１６を取り囲むように、第４の凹部１８が設けられている。この実施例のプレート１ｄにおいても、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６に収納（注入）される処理液名および収納量表示を備えている。そして、作業用平板部２ｂ、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８は、環状側壁３ｃにより囲まれており、それらの上面は、環状側壁３ｃの上端より、若干下方に位置する

ものとなっている。この実施例のプレート１ｄにおいても、下部環状壁４ｃは、略矩形状のものとなっており、プレート１と同様に、下部環状壁４ｃは、環状側壁３ｃより大きく、環状側壁３ｃより突出した部分の下部環状壁４ｃの上面に、横長の上面部１２、環状側壁３ｃの両側部および奥側の下端と下部環状壁４ｃの上端を繋ぐ幅の狭い平坦部１３を有している。

【００５８】

次に、図１４に示す実施例の細胞凍結前処理作業用プレート１ｅについて説明する。このプレート１ｅの基本構成は、上述したプレート１ｃと同じである。両者の相違点は、作業用平板部２ｃ、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８ａ，１８ｂの配置位置である。この実施例のプレート１ｅでは、下部環状壁４ｄおよび環状側壁３ｄは、奥側が略三角形状となった略五角形状となっており、プレート１と同様に、下部環状壁４ｄは、環状側壁３ｄより大きく、環状側壁３ｄより突出した部分の下部環状壁４ｄの上面に、横長の上面部１２、環状側壁３ｂの両側部および奥側の下端と下部環状壁４ｂの上端を繋ぐ幅の狭い平坦部１３を有している。

【００５９】

この実施例のプレート１ｅでは、作業用平板部２ｃの奥側に、第１の凹部１４が配置され、作業用平板部２ｃの一方（左側）の手前側側部に、第２の凹部１５および第４の凹部１８ａが配置され、作業用平板部２ｃの他方（右側）の手前側側部に、第３の凹部１６および第４の凹部１８ｂが配置されている。

【００６０】

この実施例のプレート１ｅにおいても、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６に収納（注入）される処理液名および収納量表示を備えている。そして、作業用平板部２ｃ、第１の凹部１４、第２の凹部１５、第３の凹部１６および第４の凹部１８ａ，１８ｂは、環状側壁３ｄにより囲まれており、それらの上面は、環状側壁３ｄの上端より、若干下方に位置するものとなっている。

【００６１】

次に、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートを用いた細胞凍結前処理作業について、図１および図４を用いて説明する。

最初に、凍結対象細胞（例えば、胚）、ＢＳ（細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液）、ＥＳ（細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液）、ＶＳ（細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液）を準備する。そして、プレート１の第１の凹部１４への表示２９に従った所定量（３００μＬ）のＥＳを注入、第２の凹部１５および第３の凹部１６への所定量（３００μＬ）のＶＳを注入、第１の円状区画部２１への表示部２６に従った適量（２０μＬ）のＢＳの載置（ドロップ）、第２の円状区画部２２への表示部２７に従った適量（２０μＬ）のＥＳの載置（ドロップ）、第３の円状区画部２３への表示部２８に従った適量（２０μＬ）のＥＳの載置（ドロップ）を行う。これにより、細胞凍結前処理準備が完成する。

【００６２】

最初に、マイクロピペット等により、凍結対象細胞を採取し、第１の円状区画部２１に載置されたＢＳに移植する。続いて、図４に示されている作業用平板部２の表示（１）３５および矢印表示２４に従い、移植に用いた部材（例えば、ピペット）にて、第２の円状区画部２２と第１の円状区画部２１を接続する。これにより、第２の円状区画部２２と第１の円状区画部２１は連通する。そして、表示部３７に従い、３分間放置する。この操作により、第１の円状区画部２１の細胞が移植されたＢＳに、ＥＳが徐々に混ざり合い、細胞を取り囲む処理液中の低濃度処理液濃度が増加した混合部となる。

【００６３】

続いて、図４に示されている作業用平板部２の表示（２）３６および矢印表示２５に従い、移植に用いた部材（例えば、ピペット）にて、第３の円状区画部２３を上記の混合部に接続する。これにより、第２の円状区画部２２と第１の円状区画部２１と第３の円状区画部２３が連通する。そして、表示部３８に従い、３分間放置する。この操作により、対

象細胞を取り囲む処理液の低濃度処理液濃度が徐々にかつさらに増加する。このようにすることにより、凍結対象細胞を取り囲む処理液は、徐々に細胞膜透過性凍結保護物質濃度が上昇するため、細胞に損傷を与えることなく、対象細胞の平衡化処理を進めることができる。上記の操作にて、平衡化第１ステップ処理が完了する。

【００６４】

特に、この実施例のプレート１では、作業用平板部２の表面に、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の第１の円状区画部２１と、低濃度処理液載置用の第２の円状区画部２２と、低濃度処理液載置用の第３の円状区画部２３とを備え、第１の円状区画部、第２の円状区画部および第３の円状区画部は、互いに近接しているので、上記の平衡化のための準備、さらには、その作業を容易かつ確実に行うことができる。

【００６５】

そして、上記のように作業用平板部２での平衡化第１ステップ処理された細胞をマイクロピペット等により吸引採取し、第１の凹部１４に注入されているＥＳの液面上に載置した後、９分間放置する。ＥＳ表面に置かれた細胞が、胚の場合、３０秒以内に沈降しながら収縮していくのが観察でき、さらに、一度大きく収縮した胚の体積が完全に回復するのを待つ。これにより、平衡化第２ステップが完了する。

【００６６】

続いて、第１の凹部１４内の細胞をマイクロピペット等により吸引採取し、ＶＳが注入されている第２の凹部１５の表面に置く。なお、この作業において、ＥＳ液の第２の凹部１５のＶＳ液への持ちこみを最小なものとする。細胞載置後、マイクロピペット内のＥＳは、廃棄処理液収納用の第４の凹部１８に廃棄する。続いて、第２の凹部１５の縁部より、新鮮なＶＳの吸引および廃棄を行い、マイクロピペットを第２の凹部１５内のＶＳによる共洗いを行う。第２の凹部１５（ＶＳ）内で３箇所ほど場所を変えながら十分なピペッティング（胚をピペットからＶＳ内に勢いよく排出し、胚周辺をすばやく数回かき混ぜる。ＥＳによるかげろうが見えなくなるまで細胞を第２の凹部１５内のＶＳに置換する。これにより、平衡化第３ステップが完了する。

【００６７】

続いて、マイクロピペット内のＶＳを廃棄処理液収納用の第４の凹部１８に廃棄し、第３の凹部１６に注入されている新鮮なＶＳを吸引する。そして、新鮮なＶＳを吸引したマイクロピペットにて、第２の凹部１５内の細胞を吸引し、ＶＳが注入されている第３の凹部１６に投入する。２箇所ほど場所を変えながら十分なピペッティング（胚をピペットからＶＳ内に勢いよく排出し、胚周辺をすばやく数回かき混ぜる）する。脱水により細胞が扁平に収縮したのを確認する。これにより、平衡化が完了する。

【００６８】

続いて、マイクロピペットの先端に凍結対象細胞を採取し、顕微鏡下において、生体細胞凍結保存具（図示せず）の生体細胞保持部（図示せず）を少量のＶＳとともに配置させる。細胞が付着した生体細胞凍結保存具の生体細胞保持部をあらかじめ準備しておいた液体窒素に浸漬し凍結（ガラス化）させる。そして、筒状部材（図示せず）に、細胞が付着した生体細胞凍結保存具を挿入し、収納容器（図示せず）内に、生体細胞凍結保存具を収納した筒状収納部材を収納させ、続いて、収納容器を液体窒素タンク内に入れ保存する。

【産業上の利用可能性】

【００６９】

本発明の細胞凍結前処理作業用プレートは、以下のものである。

（１）　細胞凍結前処理作業用プレートであって、前記プレートは、作業用平板部と、細胞膜透過性凍結保護物質を低濃度にて含有する低濃度処理液収納用の第１の凹部と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第２の凹部と、細胞膜透過性凍結保護物質を高濃度にて含有する高濃度処理液収納用の第３の凹部と、廃棄液収納用の第４の凹部とを備え、さらに、前記作業用平板部の表面には、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の第１の円状区画部と、前記低濃度処理液載置用の第２の円状区画部と、前記低濃度処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、前記第１の円状区画

部、前記第２の円状区画部および前記第３の円状区画部は、互いに近接しており、さらに、前記作業用平板部の表面には、前記第１の円状区画部を取り囲む拡大第１円状区画部と、前記第２の円状区画部を取り囲む拡大第２円状区画部と、前記第３の円状区画部を取り囲む拡大第３円状区画部を有している細胞凍結前処理作業用プレート。

【００７０】

このプレートでは、第１の円状区画部に適量の細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液を載置（ドロップ）し、第２の円状区画部に適量の低濃度処理液を載置（ドロップ）し、第３の円状区画部に適量の低濃度処理液を載置（ドロップ）する。そして、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液に、凍結対象細胞を移植し、続いて、移植に用いた部材（例えば、ピペット）にて、第２の円状区画部と第１の円状区画部を接続することにより、低濃度処理液が徐々に非含有処理液と混ざり合い、対象細胞を取り囲む処理液中の低濃度処理液濃度が増加する。さらに、移植に用いた部材（例えば、ピペット）にて、第３の円状区画部を上記の非含有液と低濃度処理液の混合部に接続することにより、低濃度処理液が徐々に混合部と混ざり合い、対象細胞を取り囲む処理液の低濃度処理液濃度が徐々に増加する。このようにすることにより、凍結対象細胞を取り囲む処理液は、徐々に細胞膜透過性凍結保護物質濃度が上昇するため、良好な細胞膜透過性凍結保護物質により対象細胞の平衡化処理を行うことができる。

【００７１】

特に、作業用平板部の表面に、細胞膜透過性凍結保護物質非含有処理液載置用の第１の円状区画部と、低濃度処理液載置用の第２の円状区画部と、低濃度処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、第１の円状区画部、第２の円状区画部および第３の円状区画部は、互いに近接しているので、上記の平衡化のための準備、さらには、良好な平衡化処理を容易かつ確実に行うことができる。

さらに、複数の細胞を同時に処理する場合には、拡大円状区画部が用いられ、単独細胞処理の場合には、拡大円状区画部内に位置する小さい円状区画部が用いられる。このため、処理細胞数によって、使い分けることができる。

【００７２】

そして、上記の細胞凍結前処理作業用プレートの実施態様は、以下のものである。

（２）　前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部とを有している上記（１）に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（３）　前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記第１の凹部に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部を有している上記（１）または（２）に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（４）　前記作業用平板部の表面には、前記第２の円状区画部より前記第１の円状区画部に向かって延びる第１の矢印表示と、前記第３の円状区画部より前記第１の矢印表示または前記第１の円状区画部に向かって延びる第２の矢印表示を有している上記（１）ないし（３）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（５）　前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記作業用平板部、前記第１の凹部、前記第２の凹部および前記第３の凹部を同時に被包する蓋を備えている上記（１）ないし（４）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（６）　前記細胞凍結前処理作業用プレートは、底部と、前記底部より上方に延びる環状側壁と、前記底部より上方に突出する突出部を備え、前記突出部に前記第２の凹部または前記第３の凹部を備え、前記突出部の側面と前記環状側壁の内面と前記底部により、前記第４の凹部が形成されている上記（１）ないし（５）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（７）　前記細胞凍結前処理作業用プレートは、底部と、前記底部より上方に延びる環状側壁と、前記底部より上方に突出する第１の突出部と、前記底部より上方に突出する第

２の突出部とを備え、前記第１の突出部が、前記第２の凹部を備え、前記第２の突出部が前記第３の凹部を備え、前記突出部の側面と前記環状側壁の内面と前記底部により、前記第４の凹部が形成されている上記（１）ないし（６）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（８） 前記細胞凍結前処理作業用プレートは、第２の平板部を備え、前記第２の平板部に、前記第１の凹部が形成されている上記（１）ないし（７）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（９） 前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部および前記拡大第１円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部および前記拡大第２円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部および前記拡大第３円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部とを有している上記（１）ないし（８）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

【００７３】

また、本発明の細胞凍結前処理作業用プレートは、以下のものである。

（１０） 細胞凍結前処理作業用プレートであって、前記プレートは、作業用平板部と、処理液収納用の第１の凹部と、処理液収納用の第２の凹部と、処理液収納用の第３の凹部と、廃棄処理液収納用の第４の凹部とを備え、さらに、前記作業用平板部の表面には、処理液載置用の第１の円状区画部と、処理液載置用の第２の円状区画部と、処理液載置用の第３の円状区画部とを備え、前記第１の円状区画部、前記第２の円状区画部および前記第３の円状区画部は、互いに近接しており、さらに、前記作業用平板部の表面には、前記第１の円状区画部を取り囲む拡大第１円状区画部と、前記第２の円状区画部を取り囲む拡大第２円状区画部と、前記第３の円状区画部を取り囲む拡大第３円状区画部を有している細胞凍結前処理作業用プレート。

【００７４】

そして、上記の細胞凍結前処理作業用プレートの実施態様は、以下のものである。

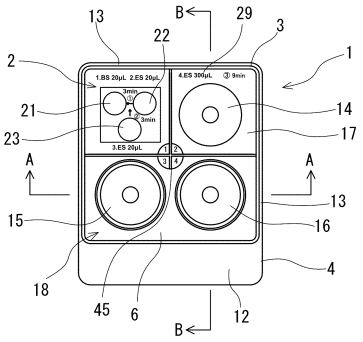
（１１） 前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部を有し、前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記第１の凹部に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部を有している上記（１０）に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

（１２） 前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部および前記拡大第１円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部および前記拡大第２円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部および前記拡大第３円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部とを有している上記（１０）または（１１）に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

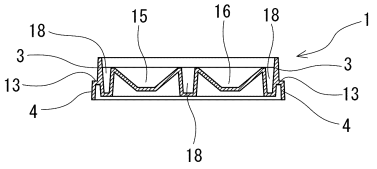
（１３） 前記作業用平板部の表面には、前記第２の円状区画部より前記第１の円状区画部に向かって延びる第１の矢印表示と、前記第３の円状区画部より前記第１の矢印表示または前記第１の円状区画部に向かって延びる第２の矢印表示を有している上記（１０）ないし（１２）のいずれかに記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

【図面】

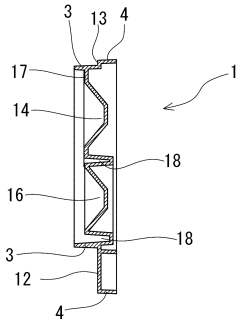
【図１】



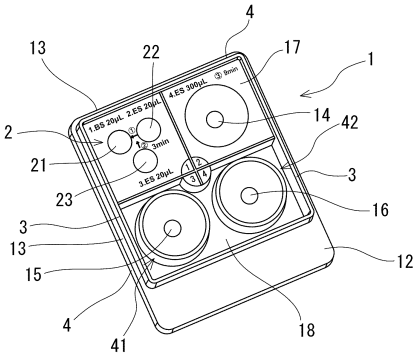
【図２】



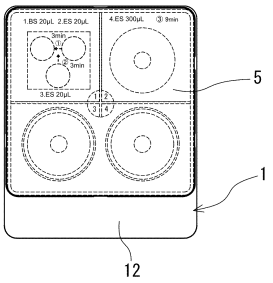
【図３】



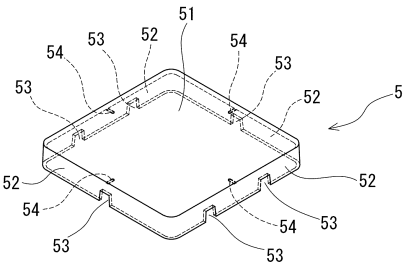
【図４】



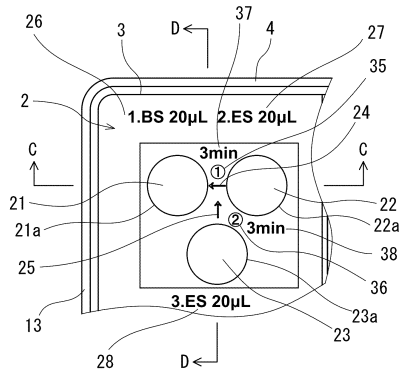
【図５】



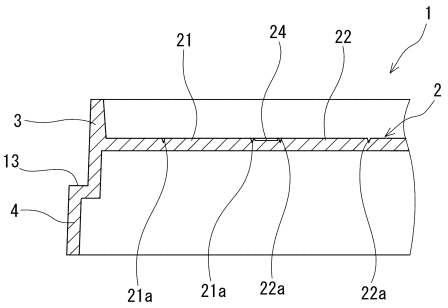
【図６】



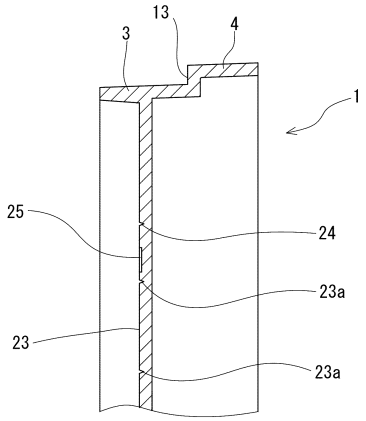
【図７】



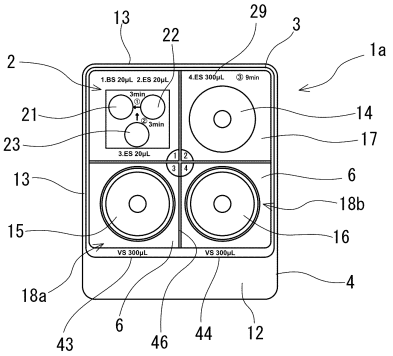
【図８】



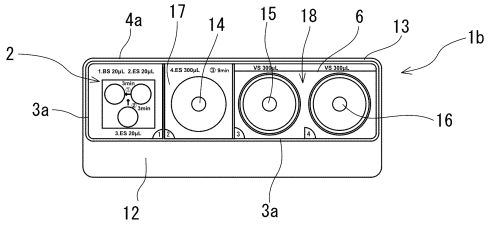
【図９】



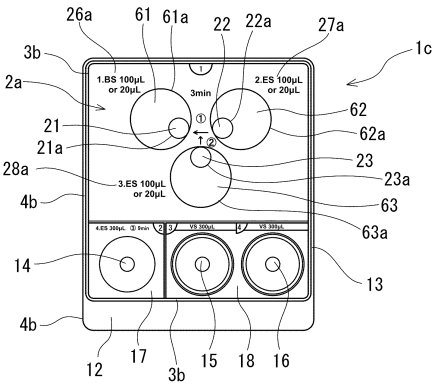
【図１０】



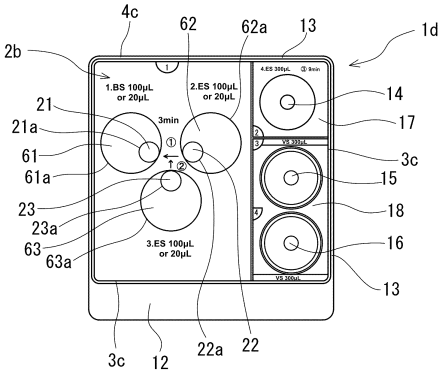
【図１１】



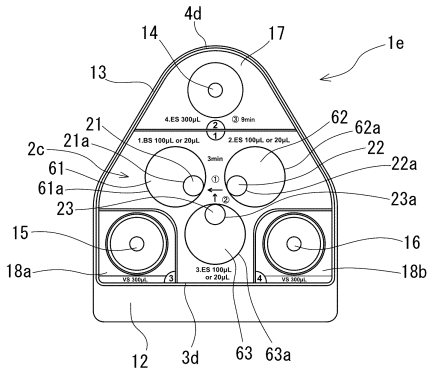
【図１２】



【図１３】


4c
62
62a
13
1d
2b
1.BS 100μL
or 20μL
2.ES 100μL
or 20μL
4.ES 300μL
③ 9min
14
21
3min
17
21a
61
3c
61a
15
23
18
23a
3.ES 100μL
or 20μL
63
16
63a
13
3c
12
22a
22

【図１４】


4d
14
17
1e
13
62
62a
21
4.ES 300μL
③ 9min
1.BS 100μL or 20μL
2.ES 100μL or 20μL
22
21a
2c
3min
22a
61
61a
23a
23
15
16
18a
18b
3.ES 100μL
or 20μL
12
3d
63
63a

フロントページの続き

クリニック内
審査官　市島 洋介

(56)参考文献　特開２０１６－０９９５４７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－０５３８７６（ＪＰ，Ａ）
特開２０１７－０６０４２８（ＪＰ，Ａ）
J. Clin. Embryologist，2017年，Vol. 19, No. 2，pp.130-133
"KITAZATO OOCYTE CRYO PLATE"，[online], 2019.2.13, 株式会社北里コーポレーション, [2020.9.16検索]，インターネット〈URL: https://www.kitazato.co.jp/ja/pdf/cryo/Flyer-JPOocyte% 20Cryo%20Plate20190213%20for%20mail.pdf〉

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ　１／００－３／１０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）