

(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
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号

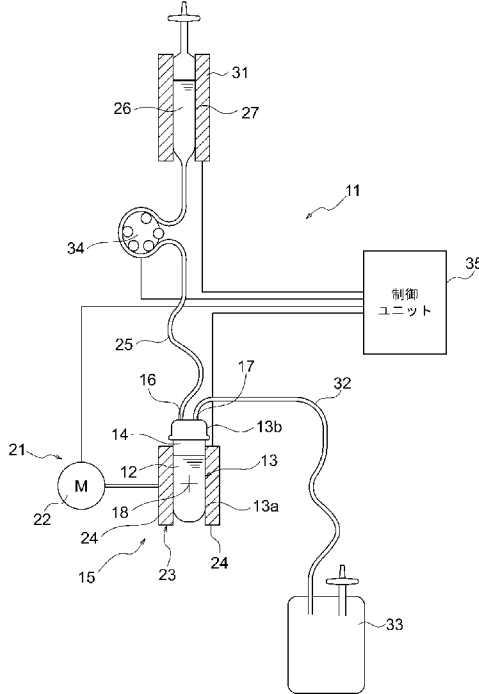
WO 2024/252753 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/010319
- (22) 国際出願日: 2024年3月15日(15.03.2024)
- (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 2023-094537 2023年6月8日(08.06.2023) JP
- (71) 出願人: ニ ッ タ 株 式 会 社 (NITTA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5560022 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 石井 大貴(ISHII Daiki); 〒5560022 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号 ニ ッ タ 株 式 会 社 内 Osaka (JP). 亀野 峻介(KAMENO Shunsuke); 〒5560022 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号 ニ ッ タ 株 式 会 社 内 Osaka (JP). 初田 雅弘(HATSUDA Masahiro); 〒5560022 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号 ニ ッ タ 株 式 会 社 内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 弁 理 士 法 人 ド ラ イ ト 国 際 特 許 事 務 所 (DORAIT IP LAW FIRM); 〒1600023 東京都新宿区西新宿六丁目15番1号 ラ・トゥール新宿411号 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,

(54) Title: FROZEN CELL THAWING DEVICE

(54) 発明の名称: 凍結細胞解凍装置

[図1]



35... Control unit

(57) Abstract: Provided is a frozen cell thawing device with which it is possible to avoid the effects of cryoprotectants to the greatest extent possible when thawing frozen cells. A frozen cell thawing device 11 comprises: an introduction pipe 25 for guiding a liquid culture medium 26; a melting unit 15 for holding a container 13 for introducing the culture medium 26 from the introduction pipe 25 while housing frozen cells 12 containing a freezing treatment liquid which contains a cryoprotectant, and applying melting heat to the frozen cells 12 from the culture medium in contact with the frozen cells

[続葉有]

WO 2024/252753 A1

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

12; a liquid flow unit 34 for generating relative movement of the culture medium with respect to the frozen cells 12; and a discharge pipe 32 that is connected to the container 13 and guides discharge of the culture medium containing the thawed cells. The concentration of the cryoprotectant in the culture medium when the thawed cells are dispersed in the culture medium is maintained at 3 vol% or less, preferably 1 vol% or less.

(57) 要約 : 凍結細胞の解凍にあたってできる限り凍結保護剤の影響を回避することができる凍結細胞解凍装置を提供する。凍結細胞解凍装置 1 1 は、液体の培地 2 6 を案内する導入配管 2 5 と、凍結保護剤を含む凍結処理液を含有する凍結細胞 1 2 を収容しながら導入配管 2 5 から培地 2 6 を導入する容器 1 3 を保持し、凍結細胞 1 2 に接触する培地から凍結細胞 1 2 に融解熱を加える融解ユニット 1 5 と、凍結細胞 1 2 に対して培地の相対移動を生み出す液流れユニット 3 4 と、容器 1 3 に接続されて、解凍された細胞を含む培地の排出を案内する排出配管 3 2 とを備え、解凍された細胞が培地に分散する際に培地中で凍結保護剤の濃度は 3 v o l % 以下、好ましくは 1 v o l % 以下に維持される。

明 細 書

発明の名称：凍結細胞解凍装置

技術分野

[0001] 本発明は、凍結細胞を解凍して細胞を回収する凍結細胞解凍装置に関する。

背景技術

[0002] 特許文献1は、バイアルを加熱するヒーターを備える凍結細胞解凍装置を開示する。細胞を含む懸濁液はバイアル内で凍結する。ヒーターからバイアルに凍結細胞の融解熱は伝達される。凍結細胞は外周から中心に向かって徐々に融解していく。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第6661616号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 細胞の凍結にあたって懸濁液には凍結保護剤が混ぜられる。凍結保護剤には一般にジメチルスルホキシド（DMSO）が含まれる。解凍後のジメチルスルホキシドは細胞にダメージを与えることから、できるだけ短時間で解凍は完了することが望まれる。とはいえ、細胞が42℃を超えた高温に曝されると、細胞は死滅してしまう。その一方で、低温の解凍に伴って細胞とジメチルスルホキシドとの接触時間が延びると、細胞は死滅してしまう。したがって、バイアルの加熱にあたって複雑かつ高度な温度制御が要求される。

[0005] 本発明は、凍結細胞の解凍にあたってできる限り凍結保護剤の影響を回避することができる凍結細胞解凍装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の凍結細胞解凍装置は、液体の培地を案内する導入配管と、凍結保護剤を含む凍結処理液を含有する凍結細胞を収容しながら前記導入配管から

前記培地を導入する容器を保持し、前記凍結細胞に接触する前記培地から前記凍結細胞に融解熱を加える融解ユニットと、前記凍結細胞に対して前記培地の相対移動を生み出す液流れユニットと、前記容器に接続されて、解冻された細胞を含む前記培地の排出を案内する排出配管とを備え、解冻された前記細胞が前記培地に分散する際に前記培地中で前記凍結保護剤の濃度は3 vol %以下に維持される。

発明の効果

[0007] 以上のように開示の凍結細胞解冻装置によれば、凍結細胞の解冻にあたってできる限り凍結保護剤の影響を回避できる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本発明の一実施形態に係る凍結細胞解冻装置の構成を概略的に示す全体図である。

[図2]凍結細胞の顕熱変化の様子を概略的に示す模式図である。

[図3]凍結細胞の潜熱変化の様子を概略的に示す模式図である。

[図4]凍結細胞解冻装置での解冻に費やされる時間のシミュレーションに用いた凍結細胞を収容した容器を説明する図である。

[図5]凍結細胞解冻装置での解冻における時間経過と解冻の様子の一例を示す図である。

[図6]凍結細胞解冻装置での解冻における時間経過と温度変化の一例を示す図である。

[図7]実施例に係る凍結細胞解冻装置での培地投入動作のパターンを示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、添付図面を参照しつつ本発明の一実施形態を説明する。

[0010] (凍結細胞解冻装置11の構成)

図1は本発明の一実施形態に係る凍結細胞解冻装置の構成を概略的に示す。凍結細胞解冻装置11は、凍結細胞12を収容する第1容器13を保持し、第1容器13に収容される凍結細胞12に第1容器13内の培地14から

融解熱を加える融解ユニット15を備える。ここでは、第1容器13は、例えばガラス製のバイアル13aと、バイアル13aの開口を塞ぐキャップ13bとで構成されることができる。バイアル13aに凍結細胞12は収容される。細胞の凍結にあたってバイアル13aには懸濁液が収容される。懸濁液はバイアル13aとともに凍結される。凍結細胞12の保存にあたって例えば凍結細胞12は液体窒素で冷却されることができる。このとき、凍結細胞12の温度はマイナス196℃付近まで低下する。キャップ13bには導入ポート16および排出ポート17が形成される。

[0011] 懸濁液は凍結処理液と当該凍結処理液に分散する細胞とで構成される。凍結処理液は培地と細胞凍結保存液とヒト血清アルブミンとを含有する。細胞凍結保存液には凍結保護剤として、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）が含有される。ジメチルスルホキシドの濃度は例えば凍結処理液の5vol%以上10vol%以下であり、具体的には5vol%に設定される。ジメチルスルホキシドは細胞の凍結にあたって細胞内で凝固する水分の膨張を防止することができる。ジメチルスルホキシドは良好に細胞の死滅を防止することができる。凍結保護剤としては、ジメチルスルホキシドの他にグリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール等が挙げられる。上記の凍結保護剤は細胞膜透過性であり、細胞内へ浸透し氷晶形成を抑制する効果がある反面、細胞内で代謝により有害物質へ変化し、生物学的毒性を発現することが知られている。

[0012] 第1容器13には、外側からバイアル13aを加熱する顕熱変化ユニット23が結合される。顕熱変化ユニット23は、例えば、凍結細胞12の融解温度未満でバイアル13aを加熱するヒーター24を備える。ヒーター24は、例えば、バイアル13aを受け止めバイアル13aを支持する形状を有することができる。ヒーター24の温度は凍結細胞12の融解温度未満に制限されることから、バイアル13aからの熱伝達で凍結細胞12の融解は回避されることができる。その一方で、凍結細胞12の温度は顕熱変化で可能な限り融解温度に近づくことができる。ここでは、ヒーター24の温度は例

例えばマイナス1℃に設定される。あるいは、ヒーター24の温度は、顕熱変化を早めるために細胞を死滅させない範囲の高温、例えば37℃～42℃、具体的には42℃に設定しても良い。

[0013] 顕熱変化ユニット23によって、凍結細胞12の温度は融解に先立って顕熱変化でできる限り高温まで加熱されることから、培地の熱エネルギーは効率的に潜熱変化に利用されることができ、培地に基づく凍結細胞12の解凍は促進されることができ、凍結細胞12の温度が培地の融解温度よりも低温であると、凍結細胞12に接触する培地は凍結してしまい、凍結細胞12の解凍に支障を来してしまうが、凍結細胞12の温度が高まれば、凍結細胞12に培地が接触しても培地の凍結は回避されることができ、培地は効率的に凍結細胞12を解凍することができる。

[0014] 第1容器13には水平軸線18回りに第1容器13の回転を生み出す傾斜ユニット21が結合される。傾斜ユニット21は、例えばヒーター24に接続されて、水平軸線18回りでヒーター24を駆動するモーター22を備える。モーター22は、例えば、電力の供給に応じて軸心回りで回転する駆動軸を備える。駆動軸の回転力は歯車機構を介してヒーター24に伝達されることができ、傾斜ユニット21の働きで第1容器13の姿勢は水平軸線18回りに変化することができる。第1容器13は、バイアル（円筒）13aの中心軸線が鉛直方向に一致する第1位置と、バイアル13aの底よりもキャップ13bが下方に位置する第2位置とで保持されることができ、第2位置では導入ポート16よりも排出ポート17は下方に位置する。

[0015] キャップ13bの導入ポート16には、1本の流路を区画する導入配管25の一端が連結される。導入配管25は例えば軟質樹脂製のチューブで構成されることができ、導入配管25の他端には、液体の培地26を保持する第2容器27が接続される。培地26には、凍結細胞12に含まれる細胞に適した培地が用いられる。培地26は例えば常温で細胞の生存環境を提供することができる。第1容器13には導入配管25から液体の培地26が導入される。導入された培地は凍結細胞12に接触する。こうして培地26から

凍結細胞 1 2 に融解熱は伝達される。

[0016] 第 2 容器 2 7 には第 2 容器 2 7 に收容される培地 2 6 を加熱する加温ユニット 3 1 が結合される。加温ユニット 3 1 の働きで第 2 容器 2 7 内の培地 2 6 は室温以上に温められることができる。培地 2 6 に熱エネルギーは供給される。培地 2 6 は第 1 容器 1 3 への導入に先立って加熱される。ただし、培地 2 6 の温度は細胞の死滅温度未満に維持される。ここでは、培地 2 6 の温度は 3 7 °C 以下に制限される。

[0017] キャップ 1 3 b の排出ポート 1 7 には、1 本の流路を区画する排出配管 3 2 の一端が連結される。排出配管 3 2 の他端には、解凍された細胞を回収する第 3 容器 3 3 が接続される。排出配管 3 2 は、第 1 容器 1 3 から第 3 容器 3 3 に、解凍された細胞を含む培地の排出を案内する。第 3 容器 3 3 には、解凍されて培地で希釈化された懸濁液が流れ込む。

[0018] 導入配管 2 5 には第 2 容器 2 7 から第 1 容器 1 3 に向かって培地を動かすポンプ 3 4 が結合される。ポンプ 3 4 は第 1 容器 1 3 内で凍結細胞 1 2 に対して培地の相対移動を生み出す液流れユニットとして機能することができる。ポンプ 3 4 には例えばチューブポンプが用いられることができる。第 1 容器 1 3 は密閉されることから、ポンプ 3 4 の圧力は第 1 容器 1 3 から希釈化された懸濁液の排出を促すことができる。ポンプ 3 4 の働きに応じて、培地の流量は調整されることができる。こうして流量が調整されることで、第 1 容器 1 3 内で解凍された細胞が培地に分散する際に培地中でジメチルスルホキシドの濃度は 3 v o l % 以下に維持されることができる。解凍された細胞は 3 v o l % 以下の濃度でジメチルスルホキシドを含む培地に接触するので、培地との接触時間に関係なくジメチルスルホキシドに基づく細胞の死滅は低減されることができる。細胞は良好に解凍されることができる。

[0019] 凍結細胞解凍装置 1 1 では、解凍された細胞が培地に分散する際に培地中でジメチルスルホキシドの濃度は、好ましくは 1 v o l % 以下に維持される。細胞の死滅はさらに低減され、細胞は良好に解凍されることができる。

[0020] モーター 2 2、ヒーター 2 4、加温ユニット 3 1 およびポンプ 3 4 には制

御ユニット35が接続される。制御ユニット35は、モーター22、ヒーター24、加温ユニット31およびポンプ34にそれぞれ制御信号を供給する。モーター22は制御信号の供給に応じて第1位置および第2位置の間で水平軸線18回りに第1容器13を駆動する。ヒーター24は制御信号の供給に応じて制御信号で特定される温度で第1容器13に接触する。制御信号は、例えば、バイアル13aに装着される温度センサーの出力に基づき生成されることができる。加温ユニット31は制御信号の供給に応じて制御信号で特定される温度で第2容器27に接触する。制御信号は、例えば、第2容器27に組み込まれて培地26の温度を検出する温度センサーの出力に基づき生成されることができる。制御ユニット35は例えばマイクロプロセッサユニット(MPU)から構成されることができる。このとき、制御ユニット35の動作は制御ユニット35内のメモリーに格納されるソフトウェアに基づき実現されることができる。

[0021] 次に凍結細胞解凍装置11の動作を説明する。凍結細胞12は準備される。凍結細胞12は懸濁液の凝固体に相当する。懸濁液は第1容器13に収容されて第1容器13ともども凍結される。懸濁液の調製にあたって凍結処理液に細胞は混入される。凍結処理液は、例えば、50vol%の培地、34vol%の細胞凍結保存液および16vol%のヒト血清アルブミンで形成される。ここでは、凍結処理液は5vol%の濃度でジメチルスルホキシドを含有する。ジメチルスルホキシドは細胞の凍結時に良好に細胞の死滅を防止することができる。凍結細胞12の保存にあたって凍結細胞12を収容する第1容器13は例えば液体窒素で冷却される。

[0022] 凍結細胞12の第1容器13は融解ユニット15にセットされる。第1容器13は例えばヒーター24に装着され支持される。キャップ13bの導入ポート16には導入配管25が結合される。導入配管25は第1容器13に第2容器27を接続する。キャップ13bの排出ポート17には排出配管32が結合される。排出配管32は第1容器13に第3容器33を接続する。制御ユニット35は傾斜ユニット21を制御する。ここでは、第1容器13

は水平軸線 1 8 回りに第 1 位置に位置決めされる。

[0023] 第 2 容器 2 7 には液体の培地 2 6 が保持される。制御ユニット 3 5 は加温ユニット 3 1 を制御する。加温ユニット 3 1 には制御ユニット 3 5 から制御信号が供給される。加温ユニット 3 1 は第 2 容器 2 7 内の培地 2 6 を加熱する。培地 2 6 は室温よりも高温に温められることができる。ここでは、加温ユニット 3 1 は例えば 3 7 °C に維持される。

[0024] 制御ユニット 3 5 は顕熱変化ユニット 2 3 を制御する。ヒーター 2 4 には制御ユニット 3 5 から制御信号が供給される。ヒーター 2 4 はバイアル 1 3 a 内の凍結細胞 1 2 を加熱する。図 2 に示されるように、凍結細胞 1 2 にはバイアル 1 3 a から熱エネルギーが伝達される。凍結細胞 1 2 では顕熱変化が実現される。凍結細胞 1 2 の温度は上昇していく。凍結細胞 1 2 は融解温度未満まで温められる。凍結細胞 1 2 の温度は融解温度未満で維持される。

[0025] 制御ユニット 3 5 はポンプ 3 4 を制御する。液体の培地 2 6 は第 2 容器 2 7 から第 1 容器 1 3 に流入する。図 3 に示されるように、第 1 容器 1 3 内で培地 3 8 は凍結細胞 1 2 の表面に接触する。凍結細胞 1 2 の表面には培地 3 8 から熱エネルギー（融解熱） 3 9 が伝達される。凍結細胞 1 2 は融解する。解凍された懸濁液はすぐさま培地 3 8 に分散することができる。融解した懸濁液は培地 3 8 で希釈化される。細胞 4 1 は培地 3 8 に分散する。培地 3 8 の流れで懸濁液は凍結細胞 1 2 の表面から押し除けられることから、凍結保護剤の濃度は良好な範囲で規制されることができる。こうして細胞 4 1 に対してできる限り凍結保護剤の影響は回避されることができる。解凍の継続時間に関係なく、凍結保護剤に基づく細胞 4 1 の死滅は低減されることができる。細胞 4 1 は良好に解凍されることができる。培地 3 8 の導入に先立って培地 3 8 は室温よりも高温に温められることができる。凍結細胞 1 2 の融解は促進されることができる。

[0026] ここでは、制御ユニット 3 5 は凍結細胞 1 2 の温度に応じてポンプ 3 4 の動作を制御する。ポンプ 3 4 には制御ユニット 3 5 から制御信号が供給される。制御信号は、培地 3 8 の対流熱伝達で融解する懸濁液の容量に基づき

ンプ34の動作量を特定する。ポンプ34の動作量は培地38の流量を決定する。決定された流量に基づき、解凍された細胞41が培地38に分散する際に培地38中でジメチルスルホキシドの濃度は1vol%以下に維持される。解凍された細胞41は3vol%以下、好ましくは1vol%以下の濃度でジメチルスルホキシドを含む培地38に接触するので、培地38との接触時間に関係なく凍結保護剤に基づく細胞41の死滅は低減されることができる。細胞41は良好に解凍されることができる。

[0027] 解凍された細胞41を含有する培地38は第1容器13から第3容器33に流入する。こうして細胞41は第3容器33に回収される。細胞41は例えば遠心分離機の働きで培地38から分離されることができる。凍結細胞12の解凍中に制御ユニット35は傾斜ユニット21を制御してもよい。制御に応じて第1容器13は水平軸線18回りで第2位置に位置決めされることができる。第2位置ではキャップ13bの排出ポート17は凍結細胞12よりも下方に位置することから、解凍された細胞41の排出は促進されることができる。

[0028] 本実施形態では、顕熱変化ユニット23のヒーター24は凍結細胞12の融解温度未満でバイアル13aを加熱する。ヒーター24からの熱伝達に基づく凍結細胞12の融解は回避されることができる。希釈化から分離された凍結細胞12の融解は阻止されることができる。こうして細胞41は高濃度の凍結保護剤から良好に保護されることができる。凍結保護剤に基づく細胞の死滅は低減されることができる。その一方で、凍結細胞12の温度は融解に先立って顕熱変化でできる限り高温まで加熱されることから、培地38の熱エネルギー39は効率的に潜熱変化に利用されることができる。培地38に基づく凍結細胞12の解凍は促進されることができる。しかも、凍結細胞12の温度ができる限り高まれば、凍結細胞12に培地38が接触しても培地38の凍結は回避されることができる。培地38は効率的に凍結細胞12を解凍することができる。凍結細胞12の温度が培地38の融解温度よりも低温であると、凍結細胞12に接触する培地38は凍結してしまう。凍結細胞

胞12の解凍に支障を来してしまう。

[0029] 凍結細胞12の解凍にあたって「細胞の解凍に十分な熱量を持つ温度」は次式で表される。ただし、 M_i は凍結細胞12の質量[kg]、 θ_i は凍結細胞の初期温度[°C]、 C_i は凍結細胞の比熱[J/(kg·K)]、 L は凍結細胞の潜熱[J/kg]、 M_w は培地の質量[kg]、 θ_w は培地の初期温度[°C]、および、 C_w は培地の比熱[J/(kg·K)]である。

[0030] [数1]

$$C_i(0[^\circ\text{C}] - \theta_i)M_i + LM_i \leq C_w(\theta_w - 0[^\circ\text{C}])M_w$$

[0031] [数2]

$$\theta_w \geq \frac{L - C_i\theta_i}{C_w} \cdot \frac{1}{M_w/M_i}$$

[0032] [数2]に基づき表1に示す「細胞の解凍に十分な熱量を持つ温度」が算出された。

[0033]

[表1]

| 「細胞の解凍に十分な熱量を持つ温度」 | | | | |
|--------------------|--------|----------|----------|---------|
| | | 培地希釈率 | | |
| | | 5 倍希釈 | 10 倍希釈 | 20 倍希釈 |
| 凍結細胞の 温度 | -20°C | 22.4°C以上 | 10.0°C以上 | 4.7°C以上 |
| | -80°C | 29.7°C以上 | 13.2°C以上 | 6.3°C以上 |
| | -150°C | 38.3°C以上 | 17.0°C以上 | 8.1°C以上 |
| | -180°C | 41.9°C以上 | 18.6°C以上 | 8.8°C以上 |

[0034] ここでは、比熱 $C_i = 2040$ [J / (kg · K)] (氷 0 [°C] の比熱)、比熱 $C_w = 4180$ [J / (kg · K)] (水 20 [°C] の比熱)、および、潜熱 $L = 3.336 \times 10^5$ [J / kg] に設定された。

[0035] 次に、凍結細胞を収容した容器に培地を供給した状況を想定し、解凍に費やされる時間をシミュレーションしたところ、表 2 に示す計算結果が得られた。

[0036]

[表2]

| | | | 例 1 | 例 2 | 例 3 | 例 4 | 例 5 | 例 6 |
|----|-------------|--|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| 条件 | 容器寸法 | 内径[Φmm] | 10 | 10 | 20 | 30 | 50 | 50 |
| | | 断面積[mm ²] | 78.5 | 78.5 | 314.2 | 706.9 | 1963.5 | 1963.5 |
| | 凍結細胞 | 温度[°C] | -80 | -80 | -80 | -80 | -80 | -80 |
| | | 容量[mL] | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 高さ[mm] | 38.2 | 38.2 | 9.55 | 4.24 | 1.53 | 1.53 |
| | 培地 | 温度[°C] | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 |
| | | 容量[mL] | 27 | 12 | 27 | 27 | 27 | 12 |
| | | 高さ[mm] | 343.8 | 152.8 | 85.9 | 38.2 | 13.8 | 6.11 |
| | 希釈率 | (培地容量[mL] +凍結細胞容量 [mL]) ÷ 凍結細胞 容量[mL] | 10 倍 | 5 倍 | 10 倍 | 10 倍 | 10 倍 | 5 倍 |
| | 計算パラ メータ | 節点間距離 Δx[mm] | 7.64 | 3.82 | 1.91 | 0.848 | 0.306 | 0.1528 |
| | | 時間ステップ Δt[sec] | 5 | 5 | 0.2 | 0.2 | 0.01 | 0.005 |
| | 計算 結果 | 解凍時間[sec] | 17595 | 17265 | 1071.2 | 218.6 | 28.25 | 27.48 |

[0037] 図4に示されるように、円筒形の容器に凍結細胞および培地は収容された。なお、計算にあたって容器は断熱と仮定された。対流熱伝達は考慮されなかった。熱伝導に基づく温度変化（顕熱変化）および相変化（潜熱変化）のみが考慮された。円柱の半径方向に温度勾配はないものと仮定され一元的に計算は実施された。図5に示されるように、例1では単位時間あたりの融解量は概ね一定に維持されることが算出された。図6に示されるように、時間の経過に拘わらず凍結細胞の表面では温度は概ね一定に維持されることが算出された。

[0038] (凍結細胞解凍装置11の作用・効果)

本実施形態の凍結細胞解凍装置11において、凍結細胞12には凍結細胞12に接触する培地から融解熱が伝達される。解凍された懸濁液はすぐさま培地に分散することができる。融解した懸濁液は培地で希釈化されることができる。培地の流れで懸濁液は凍結細胞12から押し出されることから、

細胞凍結保存液に含有されるジメチルスルホキシドの濃度は良好な範囲で規制されることができる。このようにして、凍結細胞の解凍にあたってできる限り凍結保護剤の影響を回避することができる。解凍の継続時間に関係なく、凍結保護剤に含有されるジメチルスルホキシドに基づく細胞の死滅は低減され、細胞は良好に解凍されることができる。

[0039] (実施例)

本発明者は虹彩色素上皮細胞の懸濁液を調製した。細胞の濃度は凍結処理液中で $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ [live cells/mL] に設定された。凍結処理液は、50 vol%の培地、34 vol%の細胞凍結保存液および16 vol%のヒト血清アルブミンで形成された。凍結処理液は5 vol%の濃度でジメチルスルホキシドを含有した。懸濁液は5 [mL]の保存容器に封入された。保存容器はマイナス80°Cのフリーザーで緩慢冷却された。保存容器内で細胞は凍結した。凍結細胞および培地の総量は30 [mL]に調整された。図7に示されるように、培地はいくつかのパターンで保存容器に導入された。実施例7では2つの保存容器が直接に接続された。本検証では顕熱変化ユニット23に代えて加温ユニットが用いられた。実験条件及び結果を表3に示す。

[0040] [表3]

| | | 実施例1 | 実施例2 | 実施例3 | 実施例4 | 実施例5 | 実施例6 | 実施例7 |
|----|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 条件 | 凍結細胞容量 | 3mL | 3mL | 3mL | 3mL | 2mL | 4mL | 10mL (5mL×2) |
| | 顕熱変化ユニット 設定温度 | 37°C | 37°C | 37°C | 42°C | 37°C | 37°C | 37°C |
| | 培地容量 | 27mL | 27mL | 27mL | 27mL | 28mL | 26mL | 40mL |
| | 加温ユニット 設定温度 | 37°C | 37°C | 37°C | 37°C | 37°C | 37°C | 37°C |
| | 培地投入パターン (解凍時間) | パターンA (115sec) | パターンC (470sec) | パターンB (205sec) | パターンA (115sec) | パターンB (205sec) | パターンB (205sec) | パターンD (305sec) |
| | 容器傾け開始 | 100sec | 440sec | 190sec | 100sec | 190sec | 190sec | 280sec |
| 結果 | 細胞生存率 | 94% | 57% | 87% | 86% | 92% | 95% | 63% |
| | 細胞収率 | 40% | 56% | 86% | 83% | 91% | 94% | 63% |

[0041] 表3中、「細胞生存率」では、残存する凍結細胞も含んで生存する細胞の総数が計数され、「細胞収率」では、排出配管32から排出された培地内に含まれる細胞が計数された。

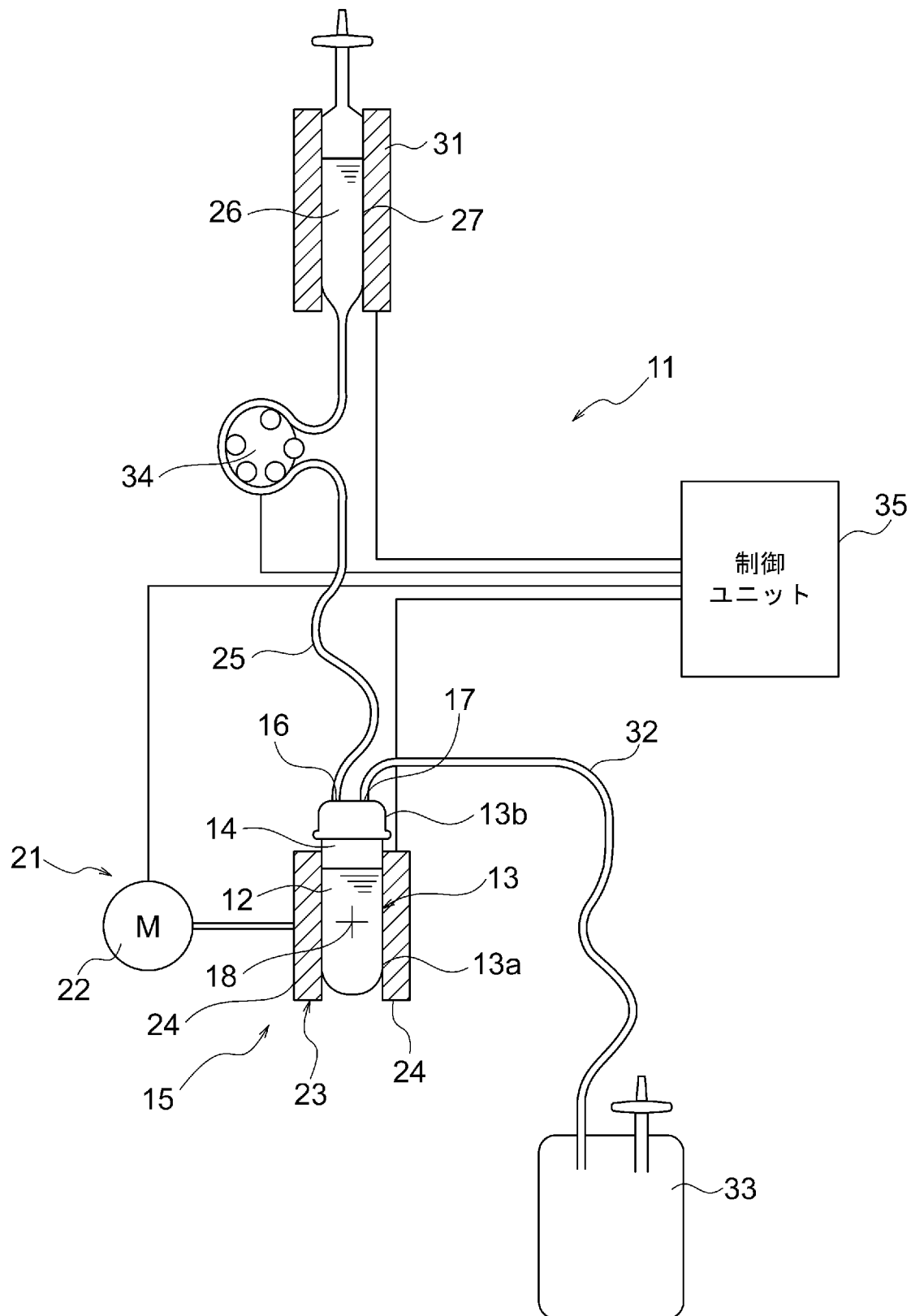
符号の説明

- [0042] 11 凍結細胞解凍装置
12 凍結細胞
13 容器（第1容器）
15 融解ユニット
23 顕熱変化ユニット
25 導入配管
26 （第2容器内の）培地
31 加温ユニット
32 排出配管
34 液流れユニット（ポンプ）
38 （第1容器内の）培地

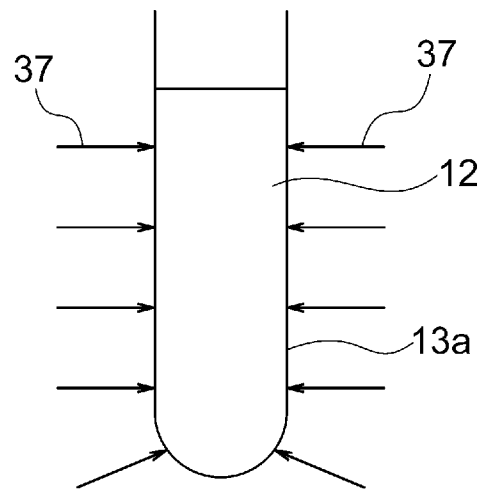
請求の範囲

- [請求項1] 液体の培地を案内する導入配管と、
凍結保護剤を含む凍結処理液を含有する凍結細胞を収容しながら前記導入配管から前記培地を導入する容器を保持し、前記凍結細胞に接触する前記培地から前記凍結細胞に融解熱を加える融解ユニットと、
前記凍結細胞に対して前記培地の相対移動を生み出す液流れユニットと、
前記容器に接続されて、解凍された細胞を含む前記培地の排出を案内する排出配管と
を備え、
解凍された前記細胞が前記培地に分散する際に前記培地中で前記凍結保護剤の濃度は3 vol %以下に維持される
凍結細胞解凍装置。
- [請求項2] 前記凍結細胞は、前記凍結保護剤を5 vol %以上10 vol %以下で含有する
請求項1に記載の凍結細胞解凍装置。
- [請求項3] 解凍された前記細胞が前記培地に分散する際に前記培地中で前記凍結保護剤の濃度は1 vol %以下に維持される
請求項1に記載の凍結細胞解凍装置。
- [請求項4] 前記容器への導入に先立って前記培地を加熱する加温ユニットを備える
請求項1に記載の凍結細胞解凍装置。
- [請求項5] 前記容器に接続されて、前記容器を加熱する顕熱変化ユニットを備える
請求項1に記載の凍結細胞解凍装置。
- [請求項6] 前記凍結保護剤は、ジメチルスルホキシドを含有する
請求項1に記載の凍結細胞解凍装置。

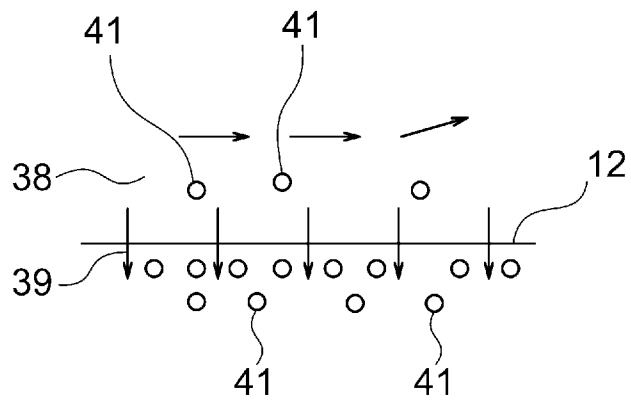
[図1]



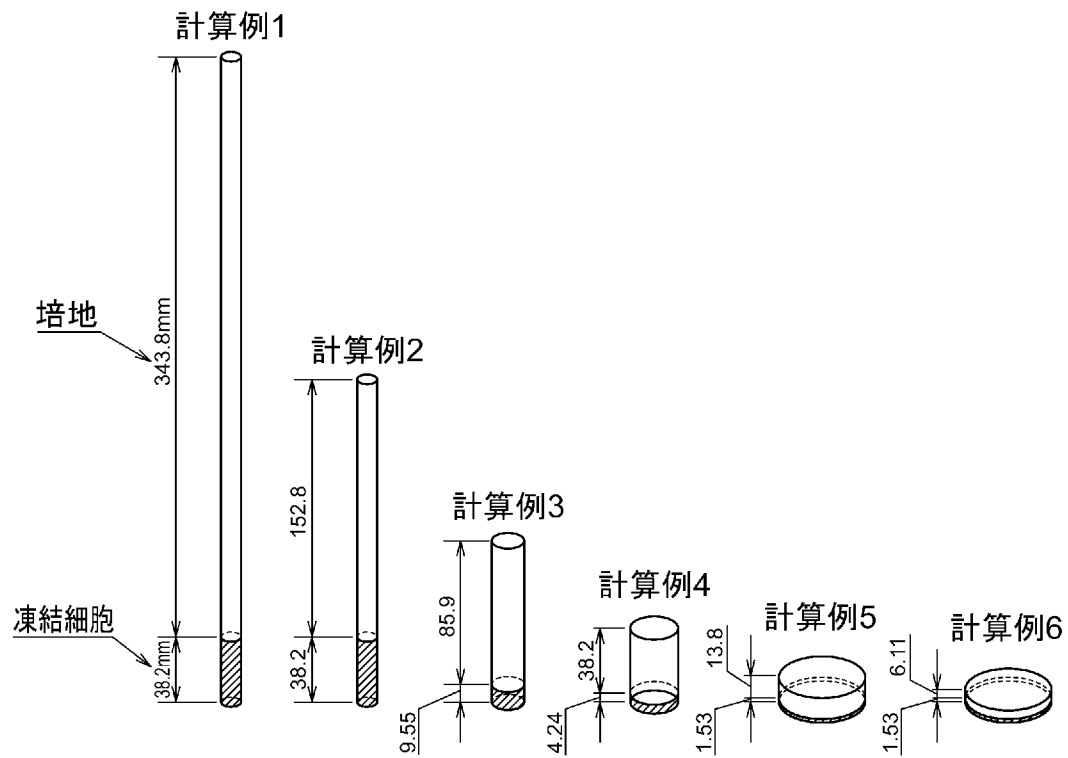
[図2]



[図3]

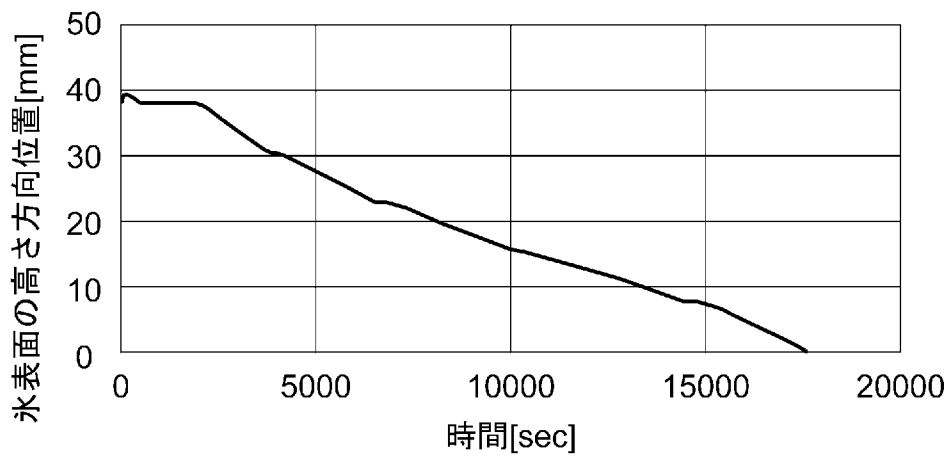


[図4]

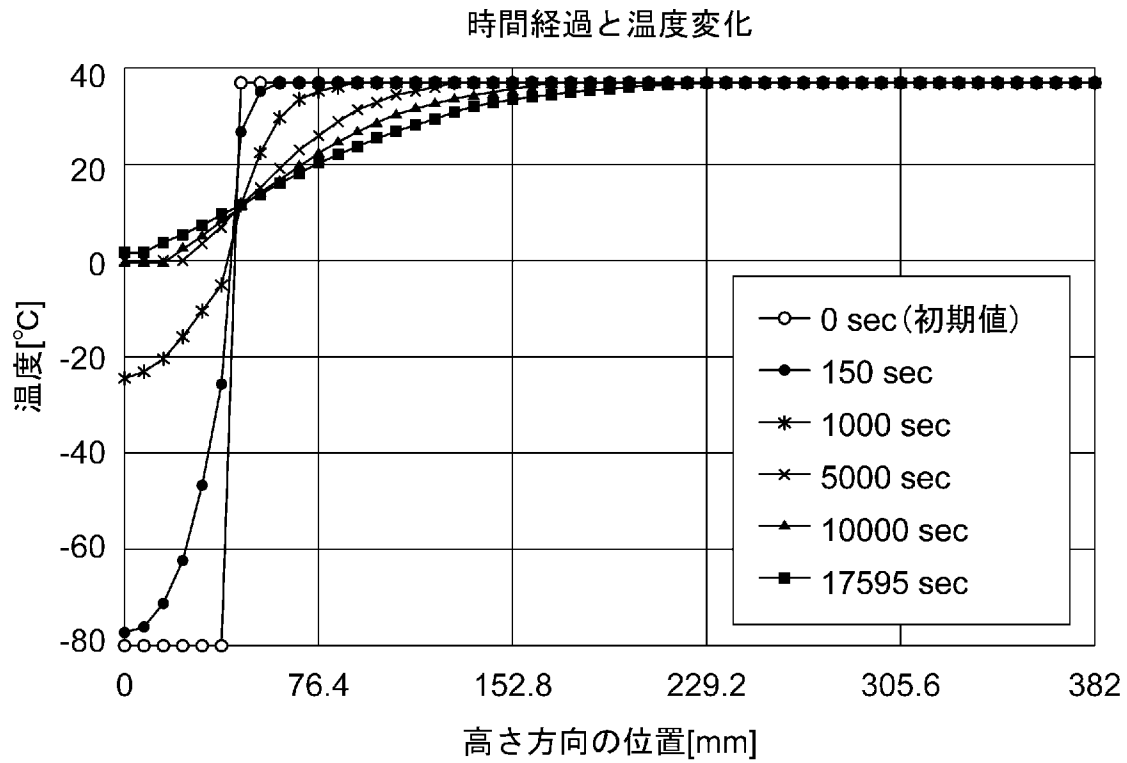


[図5]

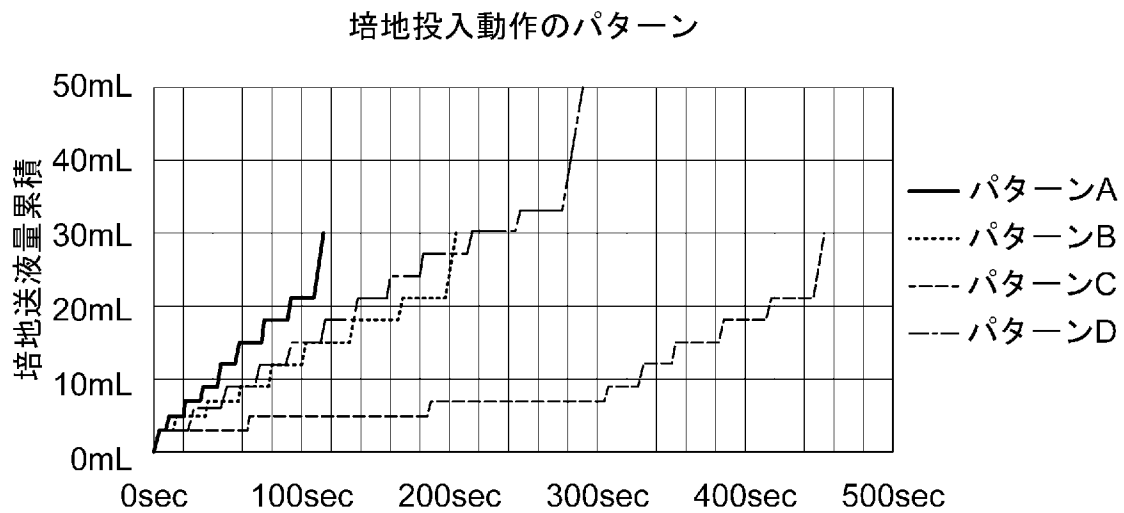
時間経過と解凍（氷の大きさの時間変化）



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/010319

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|---|--|
| C12M 1/00(2006.01)i FI: C12M1/00 Z | | |
| 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) C12M1/00 | | |
| 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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JP 2019-006695 A (UNIV. MEIJI) 17 January 2019 (2019-01-17) claims 1, 2, paragraphs [0026], [0052], [0054], [0056], [0073] | 1-6 |
| A | JP 2019-154761 A (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) 19 September 2019 (2019-09-19) | 1-6 |
| A | WO 2015/159950 A1 (TOKYO ELECTRON LIMITED) 22 October 2015 (2015-10-22) | 1-6 |
| A | JP 2009-189362 A (PANASONIC CORPORATION) 27 August 2009 (2009-08-27) | 1-6 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 "T" 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 20 May 2024 | | Date of mailing of the international search report 28 May 2024 |
| Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/010319

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| JP 2019-006695 A | 17 January 2019 | (Family: none) | |
| JP 2019-154761 A | 19 September 2019 | (Family: none) | |
| WO 2015/159950 A1 | 22 October 2015 | (Family: none) | |
| JP 2009-189362 A | 27 August 2009 | (Family: none) | |

| | | |
|--|--|--------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i FI: C12M1/00 Z | | |
| 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）） C12M1/00 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 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) | | |
| 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 2019-006695 A (学校法人明治大学) 17.01.2019 (2019 - 01 - 17) 請求項1, 2, 段落[0026], [0052], [0054], [0056], [0073] | 1-6 |
| A | JP 2019-154761 A (テルモ株式会社) 19.09.2019 (2019 - 09 - 19) | 1-6 |
| A | WO 2015/159950 A1 (東京エレクトロン株式会社) 22.10.2015 (2015 - 10 - 22) | 1-6 |
| A | JP 2009-189362 A (パナソニック株式会社) 27.08.2009 (2009 - 08 - 27) | 1-6 |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 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 “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵触するものではなく、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 | 20.05.2024 | 国際調査報告の発送日 28.05.2024 |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 権限のある職員（特許庁審査官） 市島 洋介 4N 5804 電話番号 03-3581-1101 内線 3891 | |

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/010319

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|-------------------|------------|-------------|-----|
| JP 2019-006695 A | 17.01.2019 | (ファミリーなし) | |
| JP 2019-154761 A | 19.09.2019 | (ファミリーなし) | |
| WO 2015/159950 A1 | 22.10.2015 | (ファミリーなし) | |
| JP 2009-189362 A | 27.08.2009 | (ファミリーなし) | |