(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
2021年2月11日(11.02.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/025017 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/029814

(22) 国際出願日： 2020年8月4日(04.08.2020)

(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 2019-143967 2019年8月5日(05.08.2019) JP

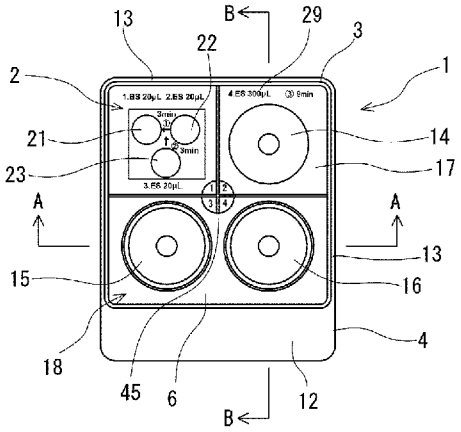
(71) 出願人: 株式会社北里コーポレーション(**KITAZATO CORPORATION**) [JP/JP]; 〒4160907 静岡県富士市中島８１番地 Shizuoka (JP).

(72) 発明者: 井上 太(**INOUE Futoshi**); 〒4160907 静岡県富士市中島８１番地 株式会社北里コーポレーション内 Shizuoka (JP). 加藤 恵一(**KATO Keiichi**); 〒1600023 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 Tokyo (JP). 藪内 晶子(**YABUUCHI Akiko**); 〒1600023 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 Tokyo (JP). 上野 智(**UENO Satoshi**); 〒1600023 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 Tokyo (JP).

(74) 代理人: あいそう特許業務法人(**AISO PATENT FIRM**); 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸

(54) **Title:** CELL CRYOPRESERVATION PRETREATMENT OPERATION PLATE

(54) 発明の名称： 細胞凍結前処理作業用プレート



(57) **Abstract:** This cell cryopreservation pretreatment operation plate 1 is provided with a tabular operation part 2, a first recessed part 14 for accommodating a treatment solution therein, a second recessed part 15 for accommodating a treatment solution therein, a third recessed part 16 for accommodating a treatment solution therein, and a fourth recessed part 18 for accommodating a waste treatment solution therein. The surface of the tabular operation part 2 has, in order to hold a treatment solution, a first circular compartment 21, a second circular compartment 22, a third circular compartment 23, an expanded first circular compartment 61 enclosing the first circular compartment 21, an expanded second circular compartment 62 enclosing the second circular compartment 22, and an expanded third circular compartment 63 enclosing the third circular compartment 23.

(57) 要約：細胞凍結前処理作業用プレート１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、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。

WO 2021/025017 A1

［続葉有］

の内二丁目１番３０号 丸の内オフィスフォーラム５Ｆ Aichi (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, IT, 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, 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, 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)）

明　細　書

発明の名称 ： 細胞凍結前処理作業用プレート

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、ＷＯ０２－０８５１１０　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] 特許文献1：特開２０００－１８９１５５

特許文献2：特開２００２－３１５５７３（WO　０２－０８５１１０　Ａ１）

特許文献3：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３ｂ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、第１の矢印表示付近に、第１のステップ順表示（１）を備え、第２の矢印表示付近に第２のステップ順表示（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４５（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、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１の凹部１４内のＶＳによる共洗いを行う。第１の凹部１４（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１の凹部１４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。

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。

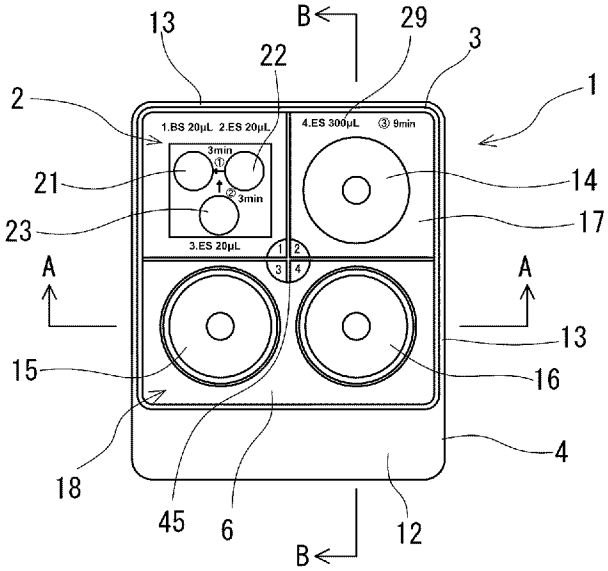
[請求項11] 前記作業用平板部は、前記第１の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第１の表示部と、前記第２の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第２の表示部と、前記第３の円状区画部に載置される処理液名および載置量表示を有する第３の表示部を有し、前記細胞凍結前処理作業用プレートは、前記第１の凹部に収納される処理液名および収納量表示を有する第４の表示部を有している請求項１０に記載の細胞凍結前処理作業用プレート。

[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。

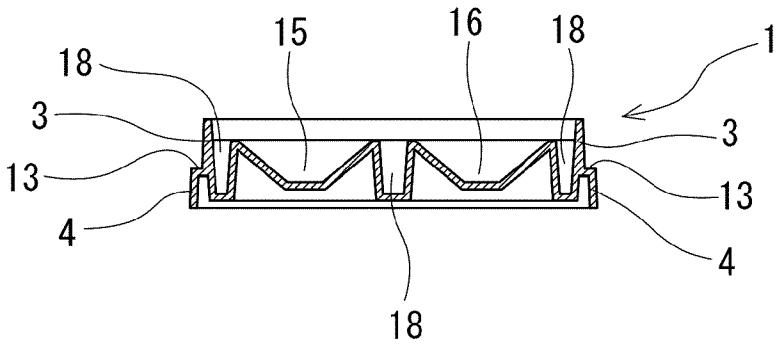
[請求項13] 前記作業用平板部の表面には、前記第２の円状区画部より前記第１の円状区画部に向かって延びる第１の矢印表示と、前記第３の円状区画

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。

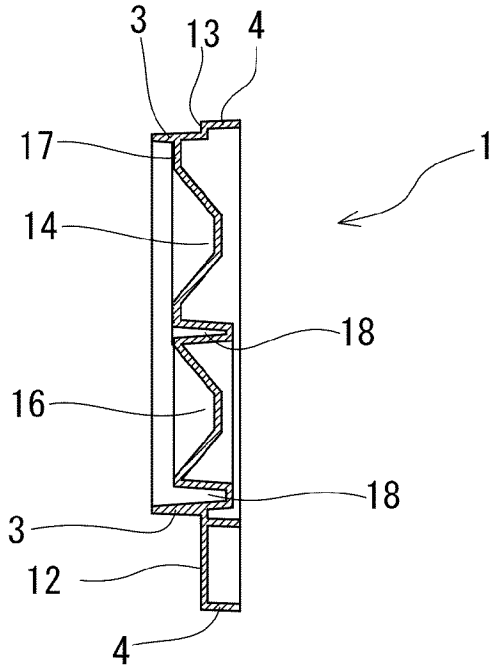
[図1]


13
B
29
3
22
1
2
1.BS 20μL 2.ES 20μL
4.ES 300μL ③ 9min
3min
①
②
3min
21
14
23
17
3.ES 20μL
1
2
3
4
A
A
13
15
16
4
18
45
6
12
B

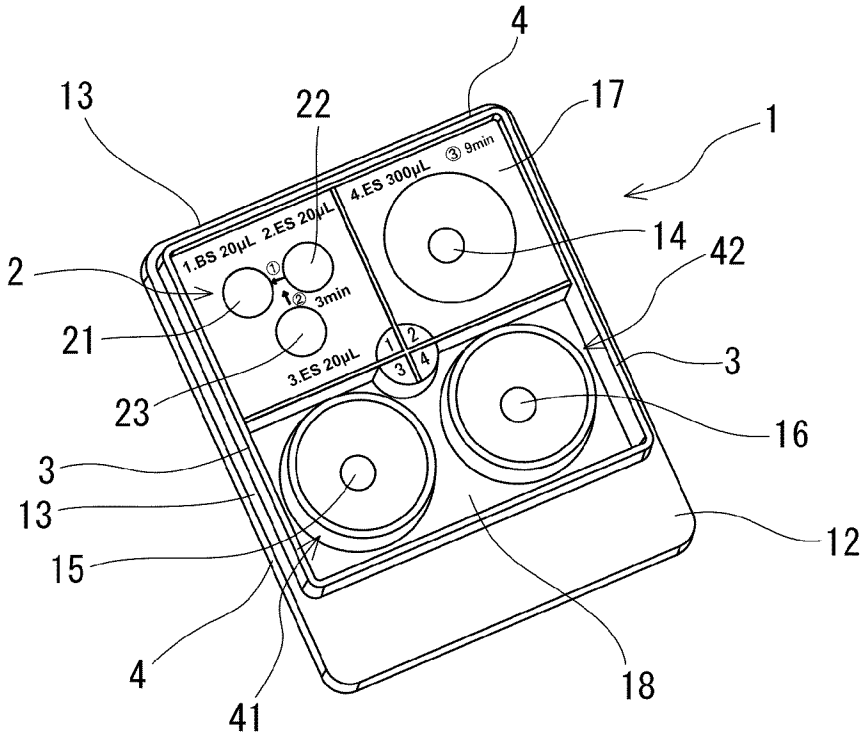
[図2]


15
16
18
1
18
3
3
13
13
4
4
18

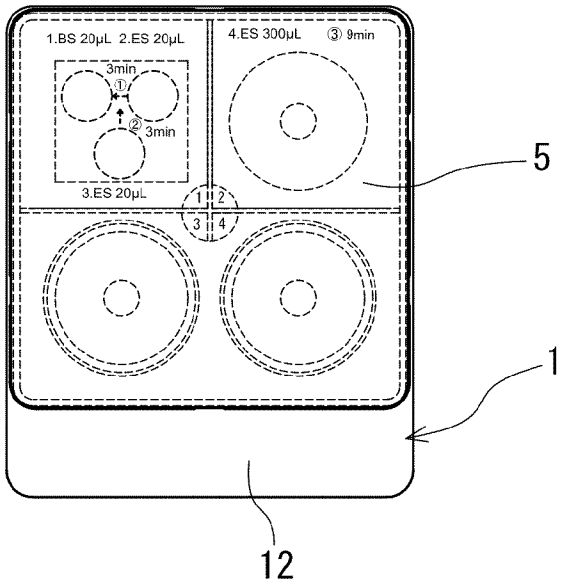
[図3]


3
13
4
17
1
14
18
16
18
3
12
4

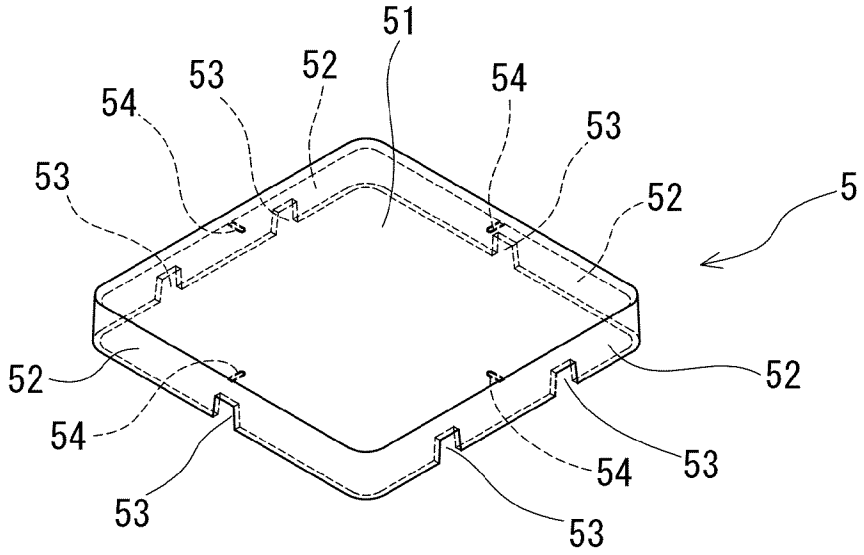
[図4]


4
13
22
17
1
1.BS 20μL 2.ES 20μL
4.ES 300μL
③ 9min
14
42
2
① 3min
② 3min
21
3.ES 20μL
1
2
3
4
3
23
16
3
13
12
15
4
18
41

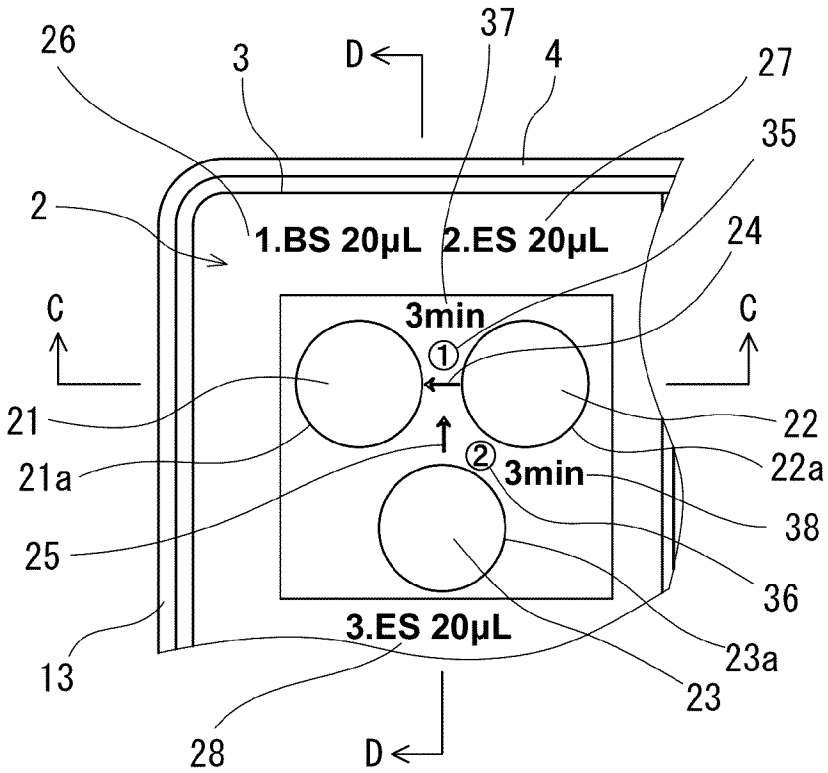
[図5]


1.BS 20μL 2.ES 20μL
4.ES 300μL
③ 9min
3min
①
② 3min
3.ES 20μL
1
2
3
4
5
1
12

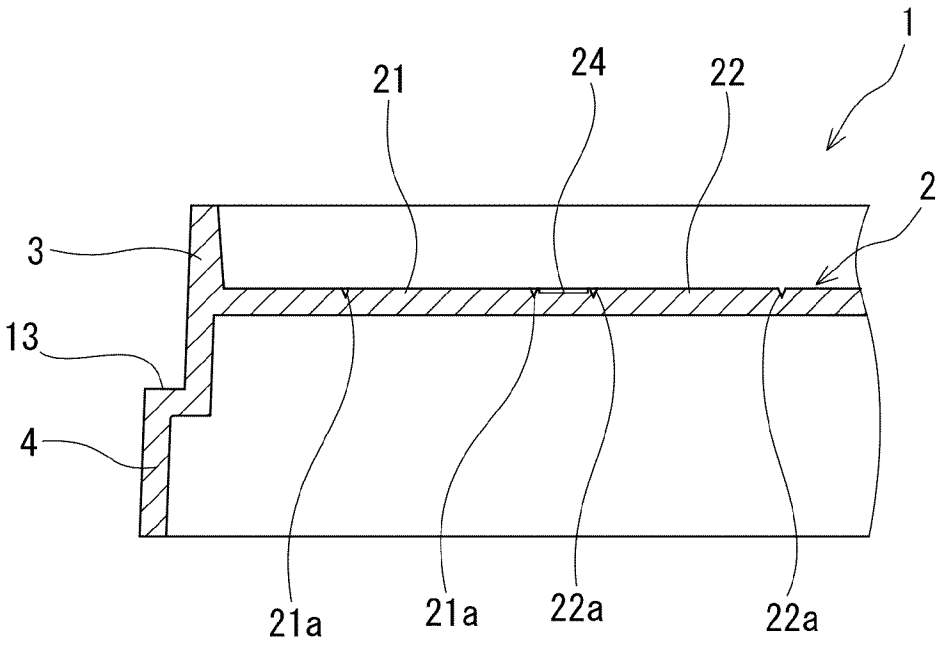
[図6]


51
52
53
54
5
52
53
54
53
54
52
53
54
53

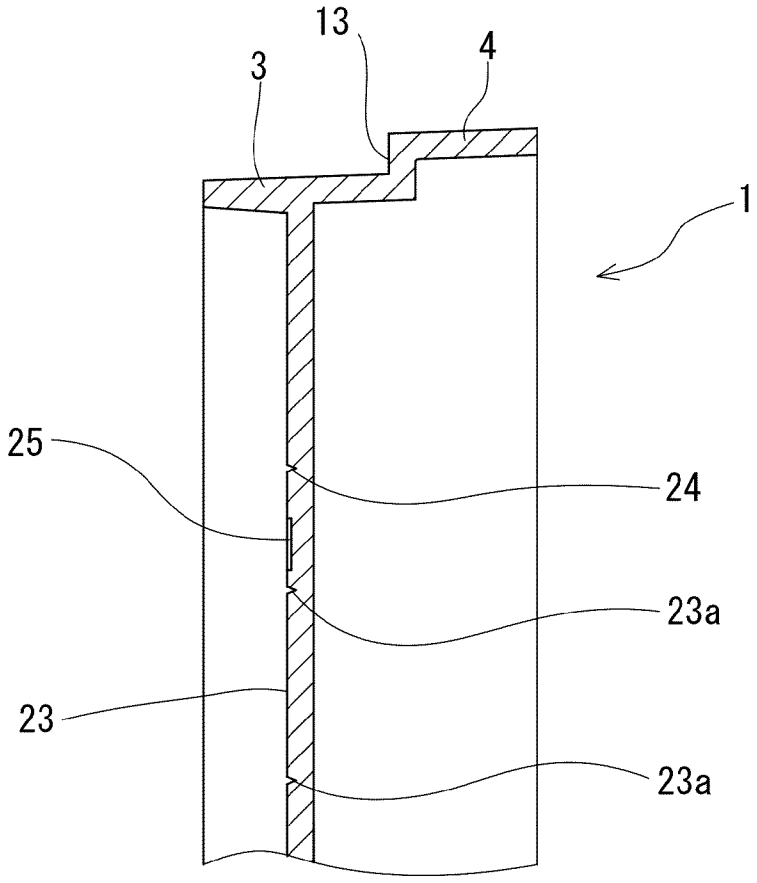
[図7]


26
3
D
37
4
27
35
2
1.BS 20μL
2.ES 20μL
24
C
3min
①
C
21
22
21a
②
3min
22a
38
25
36
3.ES 20μL
23a
13
23
28
D

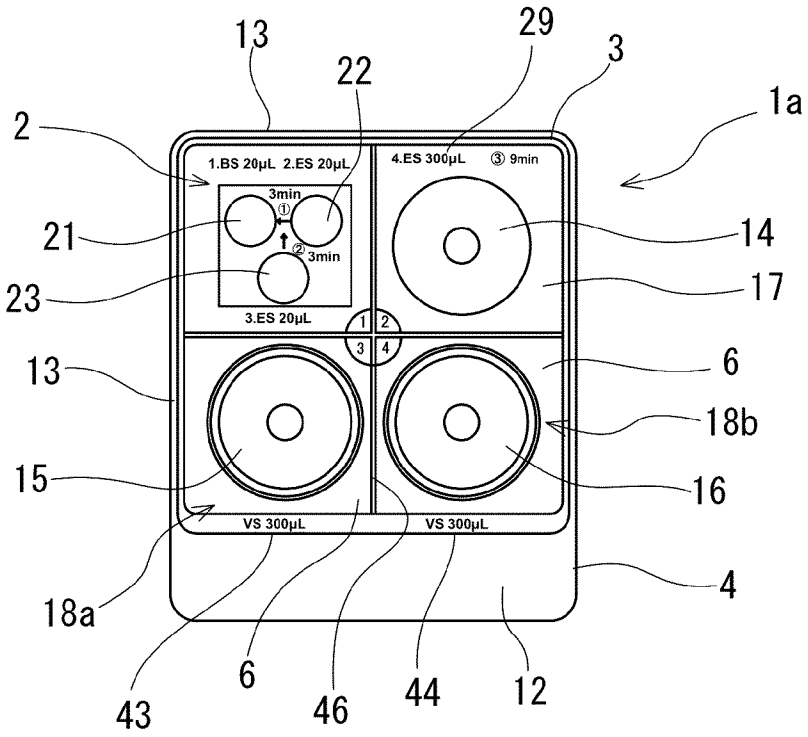
[図8]



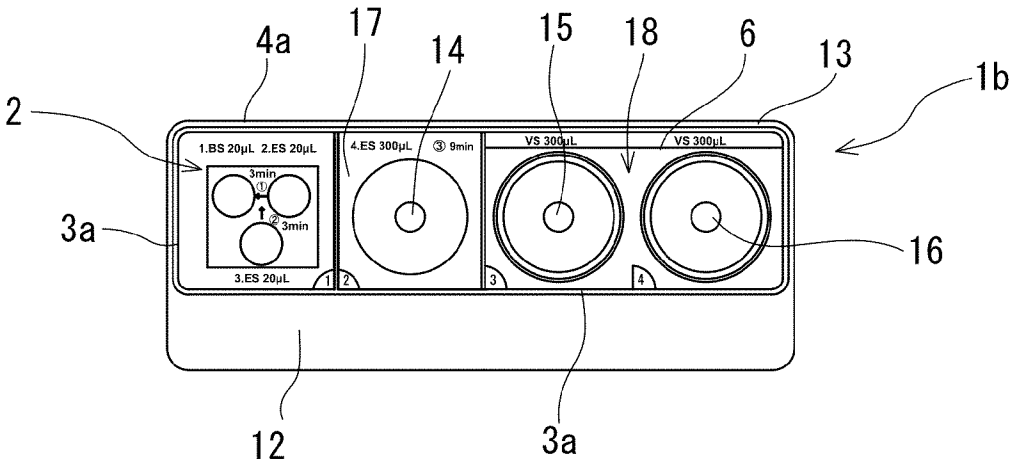
[図9]



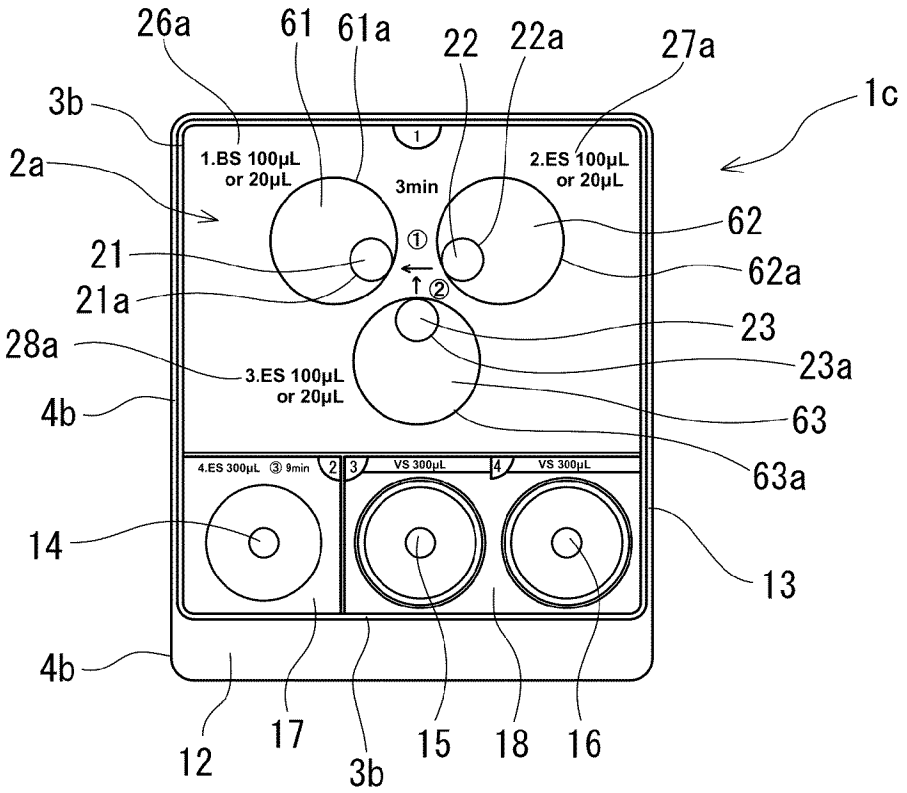
[図10]


13
29
22
3
2
1a
1.BS 20μL 2.ES 20μL
4.ES 300μL ③ 9min
3min
①
②3min
21
14
23
17
3.ES 20μL
1
2
3
4
13
6
18b
15
16
VS 300μL
VS 300μL
4
18a
43
6
46
44
12

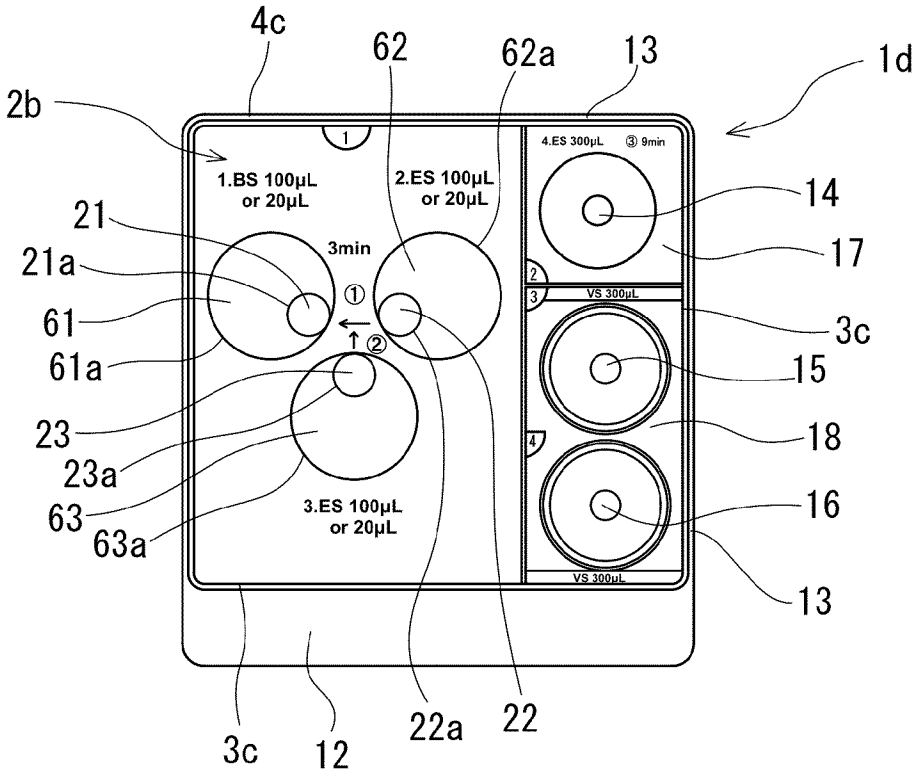
[図11]


4a
17
14
15
18
6
13
1b
2
1.BS 20μL 2.ES 20μL
4.ES 300μL ③ 9min
VS 300μL
VS 300μL
3min
①
②3min
3a
16
3.ES 20μL
1
2
3
4
12
3a

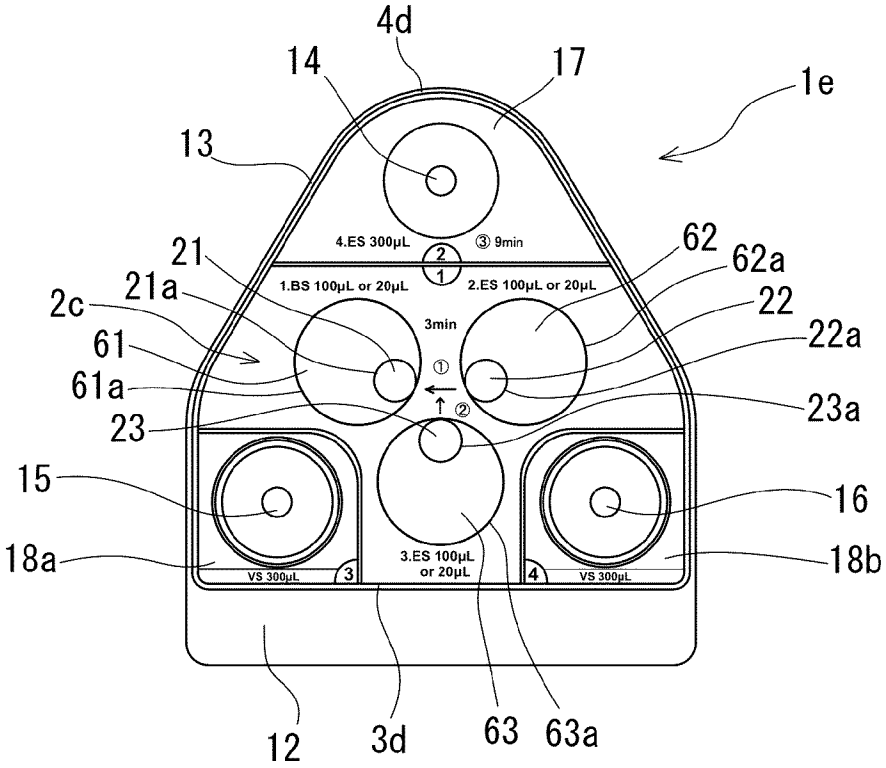
[図12]


26a
61
61a
22
22a
27a
3b
1c
2a
1.BS 100μL
or 20μL
3min
2.ES 100μL
or 20μL
62
21
62a
21a
23
28a
3.ES 100μL
or 20μL
23a
4b
63
63a
4.ES 300μL ③ 9min
VS 300μL
VS 300μL
14
13
4b
12
17
3b
15
18
16

[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
VS 300μL
61
3c
61a
15
23
18
23a
63
16
3.ES 100μL
or 20μL
63a
VS 300μL
13
3c
12
22a
22

[図14]


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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/029814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M 1/00(2006.01)i
FI: C12M1/00 A

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	上野 智 ほか, ヒト胚および卵子のガラス化保存 ～Cryotop 法による胚／卵子の凍結・融解～, J. Clin. Embryologist, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 130-133, pp. 132-133	1,6-8,10
Y	pp. 132-133, non-official translation (UENO, Satoshi et al., "Vitrification of human embryos and ovum -Freezing and thawing embryos and ovum by the Cryotop method-")	1-13
Y	"KITAZATO OOCYTE CRYO PLATE", [online], 13 February 2019, KITAZATO CORPORATION, [retrieved on 16 September 2020], Internet<URL: https://www.kitazato.co.jp/ja/pdf/cryo/Flyer-JP-Oocyte%20Cryo%20Plate20190213%20for%20mail.pdf>, entire text	1-13

☒ 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
"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 16 September 2020 (16.09.2020)	Date of mailing of the international search report 13 October 2020 (13.10.2020)
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/JP2020/029814

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-099547 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 30.05.2016 (2016-05-30) paragraph [0046]	1-13
Y	JP 2015-053876 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 23.03.2015 (2015-03-23) claim 1, paragraph [0013]	1-13
Y	JP 2017-060428 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 30.03.2017 (2017-03-30) paragraph [0048]	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/029814

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2016-099547 A	30 May 2016	(Family: none)	
JP 2015-053876 A	23 Mar. 2015	(Family: none)	
JP 2017-060428 A	30 Mar. 2017	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/029814

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 A

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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	上野　智　ほか，ヒト胚および卵子のガラス化保存～Cryotop法による胚／卵子の凍結・融解～，J. Clin. Embryologist, 2017, Vol. 19, No. 2, pp.130-133 第132-133頁	1, 6-8, 10
Y	第132-133頁	1-13
Y	"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-JP-Oocyte%20Cryo%20Plate20190213%20for%20mail.pdf> 全文	1-13
Y	JP 2016-099547 A (大日本印刷株式会社) 30.05.2016 (2016-05-30) 段落[0046]	1-13
Y	JP 2015-053876 A (大日本印刷株式会社) 23.03.2015 (2015-03-23) 請求項1，段落[0013]	1-13
Y	JP 2017-060428 A (大日本印刷株式会社) 30.03.2017 (2017-03-30) 段落[0048]	1-13

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ 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
"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	国際調査報告の発送日
16.09.2020	13.10.2020

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 3448

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/JP2020/029814

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-099547 A	30.05.2016	（ファミリーなし）	
JP 2015-053876 A	23.03.2015	（ファミリーなし）	
JP 2017-060428 A	30.03.2017	（ファミリーなし）	