

(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
2014年8月28日(28.08.2014)



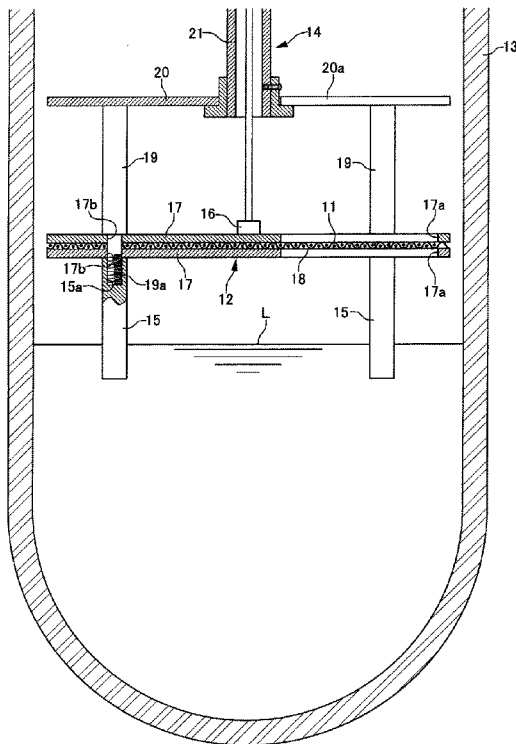
(10) 国際公開番号
WO 2014/129228 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) A61J 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/050313
- (22) 国際出願日: 2014年1月10日(10.01.2014)
- (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 2013-030751 2013年2月20日(20.02.2013) JP
- (71) 出願人: 大陽日酸株式会社(TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1428558 東京都品川区小山一丁目3番26号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 吉村 滋弘(YOSHIMURA, Shigehiro); 〒1428558 東京都品川区小山一丁目3番26号 大陽日酸株式会社内 Tokyo (JP). 武内 雅弘(TAKEUCHI, Masahiro); 〒1428558 東京都品川区小山一丁目3番26号 大陽日酸株式会社内 Tokyo (JP). 福田 明夏(FUKUDA, Sayaka); 〒1428558 東京都品川区小山一丁目3番26号 大陽日酸株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 木戸 一彦, 外(KIDO, Kazuhiko et al.); 〒1010044 東京都千代田区鍛冶町1丁目10番4号 丸石ビル 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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).

[続葉有]

(54) Title: PRELIMINARY FREEZING DEVICE

(54) 発明の名称: 予備凍結装置



(57) Abstract: Provided is a preliminary freezing device that is capable of carrying out preliminary freezing of a sheet-shaped biological sample for cryopreservation while maintaining the sheet shape and that comprises: a sample mounting member (12) that is provided with a sample mounting section (11) on which the sheet-shaped biological sample for cryopreservation is mounted; a holding member (14) that holds the sample mounting member within the gas phase of a low-temperature liquefied gas container (13); and a heat conduction member (15) that protrudes below the sample mounting member and that is inserted into the low-temperature liquefied gas within the low-temperature liquefied gas container. A sheet-shaped biological sample for cryopreservation that is mounted on the sample mounting member (12) is cooled and subjected to preliminary freezing by low-temperature gas without being brought into direct contact with the low-temperature liquefied gas.

(57) 要約: シート状に形成された凍結保存用生体試料を、シート状の形状を保ったまま予備凍結させることができる予備凍結装置であって、シート状に形成された凍結保存用生体試料を載置する試料載置部11を備えた試料載置部材12と、該試料載置部材を低温液化ガス容器13内の気相中に保持する保持部材14と、試料載置部材の下方に突出して低温液化ガス容器内の低温液化ガス中に挿入される熱伝導部材15とを備えている。シート状に形成された凍結保存用生体試料は、試料載置部材12に載置された状態で、低温液化ガスに直接接触することなく、低温のガスにより冷却されて予備凍結される。



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：予備凍結装置

技術分野

[0001] 本発明は、予備凍結装置に関し、詳しくは、シート状に形成された試料を低温液化ガスによって常温から凍結保存温度付近まで冷却するための予備凍結装置に関する。

背景技術

[0002] 一般的に、生体試料を凍結保存する際の前処理として緩慢凍結法が知られている。この緩慢凍結法では、常温でアンプルなどの容器に凍結保存用生体試料を封入した後、常温と凍結保存温度との間の適当な温度までゆっくりと冷却して予備凍結させ、予備凍結後の容器を極低温の液体窒素を貯留した凍結保存容器内に収容して凍結保存するようにしている（例えば、特許文献1参照。）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2011-19564号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、従来の緩慢凍結法に用いる装置では、アンプルなどの容器に凍結保存用生体試料を封入したものに対しては有効であるが、シート状に形成された凍結保存用生体試料を予備凍結することができなかった。

[0005] そこで本発明は、シート状に形成された試料を確実に予備凍結させることができる予備凍結装置を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0006] 上記目的を達成するため、本発明の予備凍結装置は、低温液化ガスを収容した低温液化ガス容器内の気相中で、シート状に形成された凍結保存用生体試料を予備凍結させるための予備凍結装置であって、前記シート状に形成さ

れた凍結保存用生体試料を載置する試料載置部を備えた試料載置部材と、該試料載置部材を前記低温液化ガス容器内の気相中に保持する保持部材と、前記試料載置部材の下方に突出して前記低温液化ガス容器内の前記低温液化ガス中に挿入される熱伝導部材とを備えていることを特徴としている。

[0007] さらに、本発明の予備凍結装置は、前記試料載置部が通気性を有する部材により形成されていること、また、前記試料載置部材の温度あるいは前記試料載置部材の周辺温度を測定する温度センサを備えていること、加えて、前記低温液化ガス容器内に前記試料載置部材を昇降させる電動昇降手段を備えるとともに、前記試料載置部材を前記低温液化ガス容器内に下降させたときに、前記温度センサの測定温度があらかじめ設定された冷却温度範囲より高いときには前記試料載置部材を下降させる方向に前記電動昇降手段を作動させ、測定温度が前記冷却温度範囲より低いときには前記試料載置部材を上昇させる方向に前記電動昇降手段を作動させる制御部を備えていることを特徴としている。

発明の効果

[0008] 本発明の予備凍結装置によれば、シート状に形成された凍結保存用生体試料を試料載置部材の試料載置部に載置した状態で、保持部材によって試料載置部材を低温液化ガスを収容した低温液化ガス容器内に挿入し、試料載置部材を気相中に保持するとともに、熱伝導部材を液相中に挿入することにより、生体試料を低温液化ガスに直接接触させることなく、かつ、低温液化ガスの冷熱を熱伝導部材から試料載置部材を介して凍結保存用生体試料に伝達することができるので、シート状に形成された凍結保存用生体試料を、シート状に保ったまま確実に予備凍結することができる。また、熱伝導部材の液相中への挿入量を適切に設定することにより、低温液化ガスが過剰に沸騰してシート状の凍結保存用生体試料に損傷を与えることもなく、低温液化ガスの損失を抑えられるとともに、周辺環境への悪影響も抑えることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図2の1-1断面図である。

[図2]本発明の予備凍結装置の一形態例を示す平面図である。

発明を実施するための形態

- [0010] 本形態例に示す予備凍結装置は、シート状に形成された2枚の凍結保存用生体試料（以下、シート状試料と記載するときがある。）を載置する試料載置部11を2箇所備えた試料載置部材12と、シート状試料を試料載置部11に載置した試料載置部材12を低温液化ガス容器13の内部の気相中に保持するための保持部材14と、試料載置部材12の下方に突出して低温液化ガス容器13の内部の低温液化ガス中に挿入される熱伝導部材15とを備えるとともに、試料載置部材12の温度を測定する温度センサ16を備えている。
- [0011] 試料載置部材12は、熱伝導性が良好で耐食性にも優れたアルミニウム、銅、ステンレス鋼などの金属製薄板からなる2枚の円盤状部材17と、2枚の円盤状部材17の間に挟持される通気性を有する部材、例えば、網状部材18とで形成されている。2枚の円盤状部材17には、中心を挟んで対向する位置に、バッグやトレイに収容したシート状試料の外径より大きな内径を有する円形の開口部17aがそれぞれ形成され、該開口部17aの内周に位置する網状部材18の上面部分が前記試料載置部11となっている。
- [0012] 保持部材14は、前記試料載置部材12の外周部で、前記開口部17aを避けた位置から上方に突出した4本の棒状の連結部材19と、該連結部材19の上端部がそれぞれ固着された保持板20と、該保持板20の中央部から上方に突出した筒状吊持部材21とで形成されている。前記保持板20は、前記試料載置部11の上方に位置する部分に、シート状試料の取り扱いを容易に行えるようにするための切欠部20aが設けられており、筒状吊持部材21の内部には、前記温度センサ16が挿通されている。この温度センサ16は、試料載置部材12の上面に当接する位置あるいは近接した位置で、試料載置部11に載置されたシート状試料の周囲の温度を測定できるように配置されている。この温度センサ16には、応答性が良好なシース熱電対を使用することが好ましい。

[0013] 熱伝導部材 15 は、前記円盤状部材 17 と同様に、熱伝導性が良好で耐食性にも優れたアルミニウム、銅、ステンレス鋼などの金属製棒状部材で形成されている。本形態例では、前記連結部材 19 の下端に設けた小径軸部に雄ネジ 19a を形成するとともに、熱伝導部材 15 の上端に雌ネジ 15a を形成し、円盤状部材 17 に形成した小通孔 17b に挿通した小径軸部の雄ネジ 19a と雌ネジ 15a とを螺着することにより、熱伝導部材 15 を試料載置部材 12 の下面に固着するとともに、試料載置部材 12 の外周部分の 4 箇所を連結部材 19 と熱伝導部材 15 とによって挟み込むことにより、試料載置部材 12 を安定した状態で保持できるようにしている。この熱伝導部材 15 の長さは任意であるが、熱伝導部材 15 の先端部を低温液化ガス中に挿入したときに、沸騰した低温液化ガスから発生するガスの噴出によって試料載置部 11 に載置したシート状試料が物理的な悪影響を受けない長さに設定すべきである。

[0014] 網状部材 18 は、該網状部材 18 を通過する低温のガスと、前記熱伝導部材 15 から円盤状部材 17 を介して冷却された網状部材 18 の冷熱とによってシート状試料の冷却を促進するものであって、バッグやトレイに収容したシート状試料を低温雰囲気中で載置できる強度を有するとともに、熱伝導性が良好なアルミニウム、銅、ステンレス鋼などからなる金網を使用することが好ましい。また、シート状試料を収容したバッグやトレイが網状部材 18 に張り付くおそれがある場合は、フッ素樹脂やポリプロピレンなどの合成樹脂で網状部材 18 を形成することもできる。網状部材 18 の大きさは、開口部 17a より大きく、円盤状部材 17 より小さければ、任意の大きさ及び形状とすることができる。また、網状部材 18 と円盤状部材 17 とを接着剤などで固着しておくこともできる。

[0015] このように形成した予備凍結装置を使用して、シート状に形成された凍結保存用生体試料を予備凍結する際には、まず、常温でシート状試料を試料載置部 11 の網状部材 18 上に載置した後、保持部材 14 の筒状吊持部材 21 で試料載置部材 12 を吊持した状態で、低温液化ガス L を貯留した低温液化

ガス容器 1 3 の内部に試料載置部材 1 2 をゆっくりと下降させ、熱伝導部材 1 5 の下端部を低温液化ガス中に挿入した状態とする。この予備凍結中の状態で、温度センサ 1 6 の測定温度を適宜確認し、測定温度があらかじめ設定された予備凍結用の冷却温度範囲内に収まるように試料載置部材 1 2 の上下方向位置を微調整する。これにより、低温液化ガス容器 1 3 内の気相中で、シート状試料を、所定の冷却速度、例えば毎分 -1°C 程度の速度で緩やかに冷却したり、比較的高い冷却速度で急速に冷却したりすることができる。

[0016] 予備凍結中は、シート状試料を気相中に保持しているので、低温液化ガスの沸騰などでシート状試料が物理的な損傷を受けることはなく、例えば、再生医療などに使用するために培養した細胞をシート状に形成した試料をシート状を保った状態で確実に予備凍結して凍結保存することが可能となる。また、低温液化ガス容器 1 3 内の低温液化ガス中に下端部を挿入する熱伝導部材 1 5 を備えているので、シート状試料を保持した試料載置部材 1 2 を効果的に冷却することができ、試料載置部材 1 2 における熱伝導部材 1 5 の位置や設置数を適切に設定することにより、試料載置部 1 1 に載置したシート状試料の全体を均一に冷却して所定の低温状態に保つことができる。これにより、シート状試料の一部が急速に冷却されて部分的な収縮が発生し、この部分的な収縮によってシート状試料が破損することもない。

[0017] 前記冷却温度範囲での保持を、あらかじめ設定された時間行った後、試料載置部材 1 2 を上昇させて試料載置部 1 1 から予備凍結したシート状試料を取り出し、所定の凍結保存容器内に移すことにより、シート状試料の凍結保存を行うことができる。

[0018] 低温液化ガス容器 1 3 内への試料載置部材 1 2 の昇降は、適宜な電動昇降手段の昇降部に筒状吊持部材 2 1 を連結することによって行うことができる。手動で試料載置部材 1 2 を昇降させる場合、例えば、電動昇降手段の下降用スイッチをオンにして電動昇降手段のモータを下降方向に回転させ、試料載置部材 1 2 を下降させながら温度センサ 1 6 の測定温度を確認し、測定温度が前記冷却温度範囲内になった位置で下降用スイッチをオフとし、温度セ

ンサ 16 の測定温度の変動に応じて下降用又は上昇用スイッチを操作することにより、試料載置部材 12 の上下方向位置を微調整すればよい。

[0019] 一方、自動で試料載置部材 12 を昇降させる場合は、温度センサ 16 の温度信号を電動昇降手段に設けた制御部に取り込み、温度センサ 16 の測定温度が前記冷却温度範囲より高いと判断したときは、電動昇降手段のモータを下降方向に回転させ、測定温度が冷却温度範囲より低いと判断したときはモータを上昇方向に回転させるように設定すればよい。

[0020] このような構造を有する予備凍結装置は、シート状試料の大きさや処理枚数に応じて試料載置部材 12 を適切に形成することにより、少数のシート状試料を扱う研究用の小型装置から、大量のシート状試料を扱う大型装置にまで適用することが可能である。

[0021] なお、試料載置部材や試料載置部の形状は円形に限るものではなく、シート状試料の形状に合わせて角形に形成することも可能であり、一つの試料載置部材に設ける試料載置部の数も任意である。また、試料載置部には、パンチングプレート（多孔板）を使用することもでき、シート状試料の状態によっては、布を用いることも可能である。さらに、試料載置部を含む試料載置部材の全体をパンチングプレートで形成することもでき、熱伝導部材の形状も任意であり、保持部材の構造も任意である。

[0022] また、低温液化ガス容器として透明ガラス製デュワー瓶を使用した場合は、温度センサを設けずに、低温液化ガス中への熱伝導部材の挿入量を外部から視認して試料載置部材を所定位置に保持し、この状態で予備凍結を行うことも可能である。さらに、温度センサを低温液化ガス容器内の適宜な位置に設け、温度センサの位置と試料載置部材の位置とを比較して試料載置部材の保持位置を調節することも可能である。

符号の説明

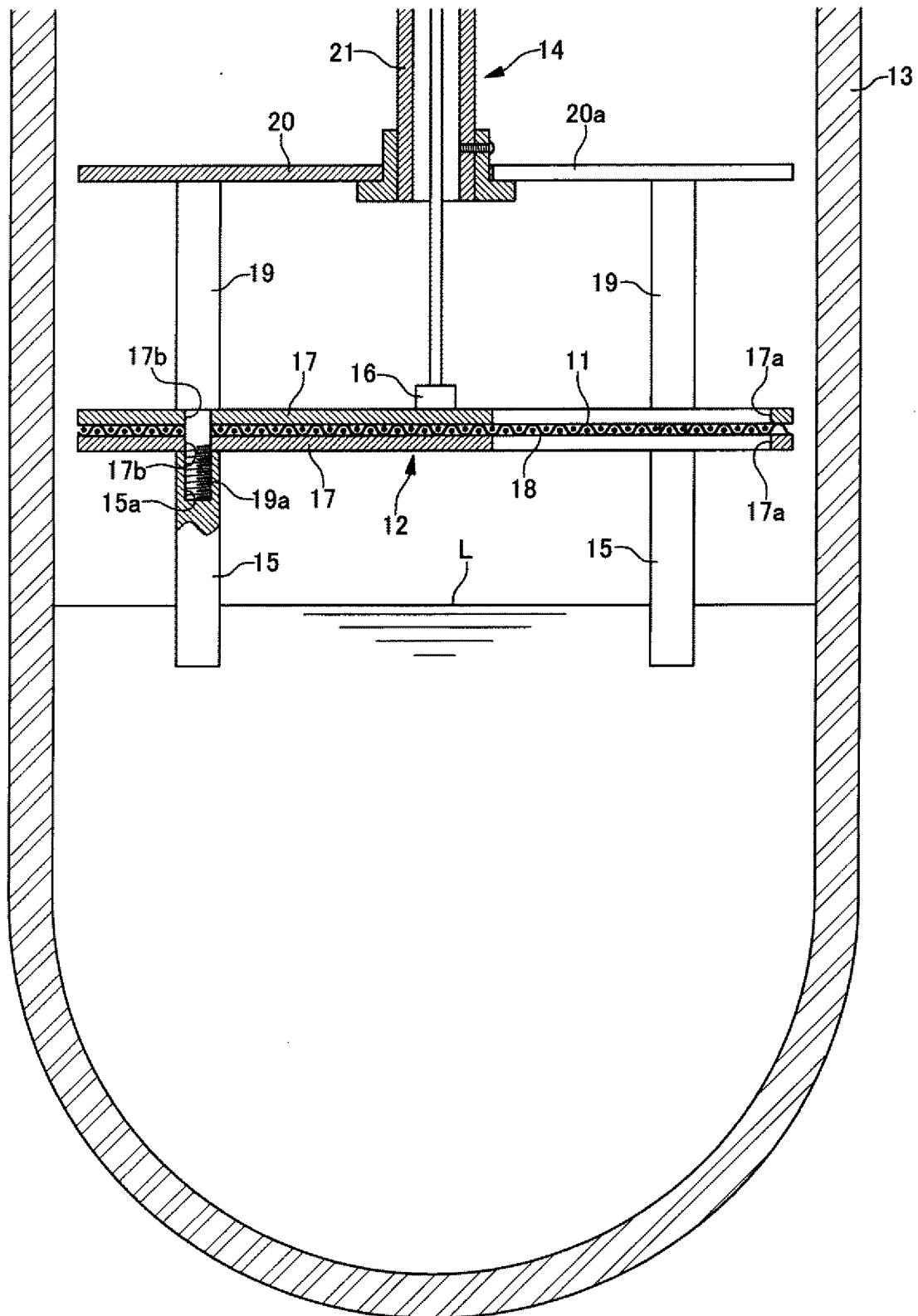
[0023] 11…試料載置部、12…試料載置部材、13…低温液化ガス容器、14…保持部材、15…熱伝導部材、15a…雌ネジ、16…温度センサ、17…円盤状部材、17a…開口部、17b…小通孔、18…網状部材、19…

連結部材、19a…雄ネジ、20…保持板、20a…切欠部、21…筒状吊
持部材

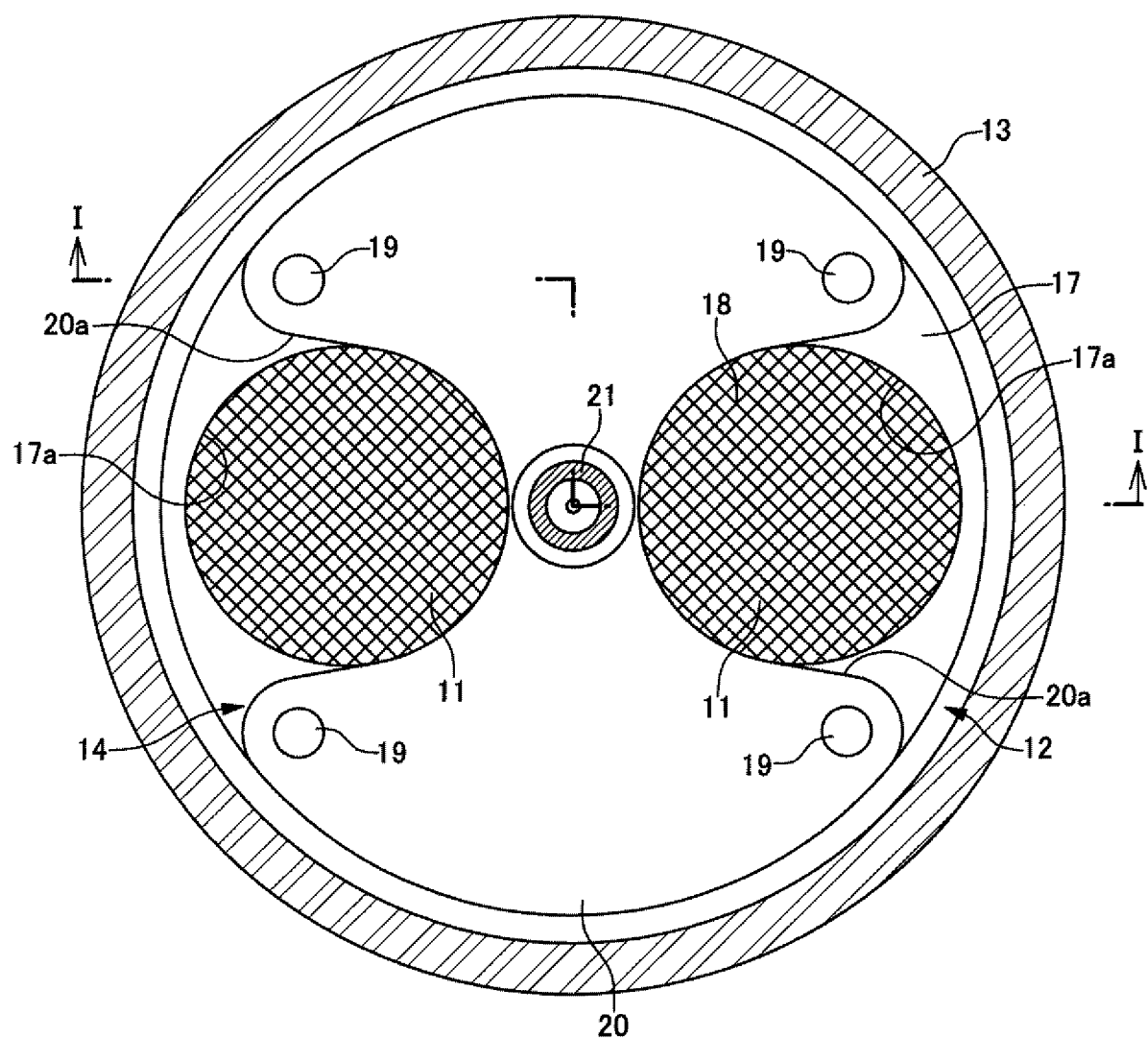
請求の範囲

- [請求項1] 低温液化ガスを収容した低温液化ガス容器内の気相中で、シート状に形成された凍結保存用生体試料を予備凍結させるための予備凍結装置であって、前記シート状に形成された凍結保存用生体試料を載置する試料載置部を備えた試料載置部材と、該試料載置部材を前記低温液化ガス容器内の気相中に保持する保持部材と、前記試料載置部材の下方に突出して前記低温液化ガス容器内の前記低温液化ガス中に挿入される熱伝導部材とを備えている予備凍結装置。
- [請求項2] 前記試料載置部は、通気性を有する部材により形成されている請求項1記載の予備凍結装置。
- [請求項3] 前記試料載置部材の温度あるいは前記試料載置部材の周辺温度を測定する温度センサを備えている請求項1又は2記載の予備凍結装置。
- [請求項4] 前記低温液化ガス容器内に前記試料載置部材を昇降させる電動昇降手段を備えるとともに、前記試料載置部材を前記低温液化ガス容器内に下降させたときに、前記温度センサの測定温度があらかじめ設定された冷却温度範囲より高いときには前記試料載置部材を下降させる方向に前記電動昇降手段を作動させ、測定温度が前記冷却温度範囲より低いときには前記試料載置部材を上昇させる方向に前記電動昇降手段を作動させる制御部を備えている請求項3記載の予備凍結装置。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/050313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, A61J3/00(2006.01)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)

C12M1/00, A61J3/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 09-110601 A (Bio Surface Technology Inc.), 28 April 1997 (28.04.1997), entire text	1-4
A	JP 2008-005846 A (Phyton, Inc.), 17 January 2008 (17.01.2008), paragraph [0066]	1-4
A	JP 2005-143873 A (Taiyo Nippon Sanso Corp.), 09 June 2005 (09.06.2005), paragraph [0028]	1-4

☐ 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
08 April, 2014 (08.04.14)

Date of mailing of the international search report
15 April, 2014 (15.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2014/050313

JP 09-110601 A	1997.04.28	(Family: none)
JP 2008-005846 A	2008.01.17	JP 11-507380 A US 5965438 A US 6127181 A US 2003/0031998 A1 US 6753182 B1 US 2005/0158699 A1 GB 2316854 A GB 2321840 A EP 0830059 A2 WO 1996/039812 A2 DE 69624701 D DE 69624701 T NZ 312329 A AU 701381 B AU 6383696 A CA 2223959 A AT 227071 T DK 830059 T PT 830059 E ES 2187664 T
JP 2005-143873 A	2005.06.09	(Family: none)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, A61J3/00(2006.01)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（I P C））

Int.Cl. C12M1/00, A61J3/00

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	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014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）

CAplus/MEDLINE/ BIOSIS/WPIDS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

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
A	JP 09-110601 A（バイオサーフェイス テクノロジー インコーポレイテッド）1997.04.28, 全文	1-4
A	JP 2008-005846 A（ファイトン・インコーポレイテッド）2008.01.17, 段落【0066】	1-4
A	JP 2005-143873 A（太陽日酸株式会社）2005.06.09, 段落【0028】	1-4

☐ 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

08.04.2014

国際調査報告の発送日

15.04.2014

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/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）

長谷川 茜

4 N

3 2 2 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

JP 09-110601 A	1997. 04. 28	ファミリーなし
JP 2008-005846 A	2008. 01. 17	JP 11-507380 A US 5965438 A US 6127181 A US 2003/0031998 A1 US 6753182 B1 US 2005/0158699 A1 GB 2316854 A GB 2321840 A EP 0830059 A2 WO 1996/039812 A2 DE 69624701 D DE 69624701 T NZ 312329 A AU 701381 B AU 6383696 A CA 2223959 A AT 227071 T DK 830059 T PT 830059 E ES 2187664 T
JP 2005-143873 A	2005. 06. 09	ファミリーなし