

(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
2018年12月20日(20.12.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/230477 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/022105
- (22) 国際出願日: 2018年6月8日(08.06.2018)
- (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 2017-114822 2017年6月12日(12.06.2017) JP
特願 2018-032654 2018年2月27日(27.02.2018) JP
特願 2018-056780 2018年3月23日(23.03.2018) JP
- (71) 出願人:三菱製紙株式会社(MITSUBISHI PAPER MILLS LIMITED) [JP/JP]; 〒1300026 東京都墨田区両国二丁目10番14号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者:吉田 翔(YOSHIDA, Kakeru); 〒1300026 東京都墨田区両国2丁目10番14号 三菱製紙株式会社内 Tokyo (JP). 松澤 篤史(MATSUZAWA, Atsushi); 〒1300026 東京都墨田区両国2丁目10番14号 三菱製紙株式会社内 Tokyo (JP). 徳永 幸雄(TOKUNAGA, Yukio); 〒1300026 東京都墨田区両国2丁目10番14号 三菱製紙株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所(YASUTOMI & ASSOCIATES); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番36号 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: CRYOPRESERVATION JIG FOR CRYOPRESERVING CELLS OR TISSUES

(54) 発明の名称: 細胞又は組織の凍結保存用治具

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a cryopreservation jig with which cells or tissues can be easily and reliably cryopreserved. The cryopreservation jig for cryopreserving cells or tissues according to the present invention has a placement portion on which cells or tissues are placed together with a preservative liquid, wherein a surface of the placement portion has a projection for holding the cells or tissues and a recess for pooling the preservative liquid.

(57) 要約: 本発明は、細胞又は組織の凍結保存作業を容易かつ確実に行うことが可能な、凍結保存用治具を提供することを目的とする。本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具は、細胞又は組織を保存液とともに載置する載置部を有する凍結保存用治具であって、該載置部表面が、細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有することを特徴とする。



WO 2018/230477 A1

明 細 書

発明の名称：細胞又は組織の凍結保存用治具

技術分野

[0001] 本発明は、細胞又は組織を凍結保存する際に使用する、細胞又は組織の凍結保存用治具に関する。

背景技術

[0002] 細胞又は組織の優れた保存技術は、様々な産業分野で求められている。例えば、牛の胚移植技術においては、胚を凍結保存し、受胚牛の発情周期に合わせて胚を融解し、移植することが行われている。また、ヒトの不妊治療においては、母体から卵子又は卵巣を採取後、移植に適したタイミングに合わせるために凍結保存しておき、移植時に融解して用いることがなされている。

[0003] 一般に、生体内から採取された細胞又は組織は、たとえ培養液の中であっても、次第に活性が失われていくことから、生体外での細胞又は組織の長期間の培養は好ましくない。そのため、生体活性を失わずに長期間保存するための技術が重要である。優れた保存技術によって、採取された細胞又は組織をより正確に分析することが可能になる。また優れた保存技術によって、より高い生体活性を保ったまま細胞又は組織を移植に用いることが可能となり、移植後の生着率が向上することが望める。さらには、生体外で培養した培養皮膚、生体外で構築したいわゆる細胞シートのような移植のための人工の組織を、順次生産して保存しておき、必要なときに使用することも可能となり、医療の面だけではなく、産業面においても大きなメリットが期待できる。

[0004] 細胞又は組織の保存方法として、例えば緩慢凍結法が知られている。この方法では、まず、例えばリン酸緩衝生理食塩水等の生理的溶液に耐凍剤を含有させることで得られた保存液に、細胞又は組織を浸漬する。該耐凍剤としては、グリセロール、エチレングリコール等の化合物が用いられる。該保存

液に、細胞又は組織を浸漬後、比較的遅い冷却速度（例えば0.3～0.5℃/分の速度）で、-30～-35℃まで冷却することにより、細胞内外又は組織内外の溶液が十分に冷却され、粘性が高くなる。このような状態で、該保存液中の細胞又は組織をさらに液体窒素の温度（-196℃）まで冷却すると、細胞内又は組織内とその外の周囲の微量溶液がいずれも非結晶のまま固体となる、ガラス化が起こる。ガラス化により、細胞内外又は組織内外が固化すると、実質的に分子の動きがなくなるので、ガラス化された細胞又は組織を液体窒素中に保存することで、半永久的に保存できると考えられる。

[0005] しかしながら、前記した緩慢凍結法では、比較的遅い冷却速度で冷却する必要があるために、凍結保存のための操作に時間を要する。また、冷却速度を制御するための装置又は治具を必要とする問題がある。加えて緩慢凍結法では、細胞外又は組織外の保存液中に氷晶が形成されるので、細胞又は組織が該氷晶により物理的に損害を受けるおそれがある。

[0006] 緩慢凍結法での問題点を解決するための方法として、ガラス化凍結法が提案されている。ガラス化凍結法とは、グリセロール、エチレングリコール、DMSO（ジメチルスルホキシド）等の耐凍剤を多量に含む保存液の凝固点降下により、氷点下であっても氷晶ができにくくなる原理を用いたものである。この保存液を急速に液体窒素中で冷却させると、氷晶を生じさせないまま固体化させることができる。このように固体化することをガラス化凍結という。また、耐凍剤を多量に含む保存液はガラス化液と呼称される。

[0007] 前記したガラス化凍結法の具体的な操作としては、耐凍剤を多量に含む保存液に細胞又は組織を浸漬し、その後、液体窒素の温度（-196℃）で冷却する。ガラス化凍結法は、このような簡便かつ迅速な工程であるために、凍結保存のための操作に長い時間を必要としない他、温度制御をするための装置又は治具を必要としないという利点がある。

[0008] ガラス化凍結法を用いると、原理的には、細胞又は組織の内外のいずれにも氷晶が生じないために凍結時及び融解時の細胞又は組織への物理的障害（

凍害)を回避することができるが、適切なガラス化凍結を成し得るためには、ガラス化に用いる保存液に含有される耐凍剤の濃度を高いものとしなければならない。一方で、保存液に含まれる高濃度の耐凍剤は細胞又は組織にとって化学的毒性が高いことが知られている。

[0009] 上記した背景から、細胞又は組織の凍結保存においては、細胞又は組織が保存液に暴露される時間(つまりは凍結されるまでの時間)は短時間であることが好ましい。また、凍結速度を速くする観点から、細胞又は組織の凍結保存時には細胞又は組織周囲に存在する保存液が少ない方が好ましい。細胞又は組織周囲に存在する保存液が少ないほど、凍結対象の熱容量が少なくなり、細胞又は組織の凍結速度が速くなり、ガラス化凍結にとっては好ましいといえる。さらに、細胞又は組織周囲に存在する保存液が少ないことは、凍結後の融解時においても、保存液が速やかに融解液中に希釈され、細胞又は組織中への再氷晶形成を抑制する観点で好ましい。また細胞又は組織周囲に存在する保存液が少ないことは、融解時に融解液中に混入する耐凍剤の濃度を低くすることができるために、耐凍剤に由来する毒性を軽減する観点からも好ましい。

[0010] ガラス化凍結法を用いた細胞又は組織の凍結保存については、様々な方法で、様々な種類の細胞又は組織を用いた例が示されている。例えば、特許文献1では、動物又はヒトの生殖細胞又は体細胞へのガラス化凍結法の適用が、凍結保存及び融解後の生存率の点で、極めて有用であることが示されている。

[0011] ガラス化凍結法は、主にヒトの生殖細胞を用いて発展してきた技術であるが、最近では、iPS細胞やES細胞への応用も広く検討されている。また、非特許文献1では、ショウジョウバエの胚の保存にガラス化凍結法が有効であったことが示されている。さらに、特許文献2では、植物培養細胞や組織の保存において、ガラス化凍結法が有効であることが示されている。このように、ガラス化凍結法は広く様々な種の細胞及び組織の保存に有用であることが知られている。

- [0012] 特許文献3及び特許文献4では、ヒトの不妊治療分野で使用されているいわゆるクライオトップ法という方法で、卵付着保持用ストリップとして短冊状の可撓性かつ無色透明なフィルムを使用した卵凍結保存用具を使用して、顕微鏡観察下で該フィルム上に極少量の保存液と共に卵子又は胚を載置し、凍結保存する方法が提案されている。
- [0013] 特許文献5及び特許文献6には、細長い生体細胞付着保持部の長手方向に設けられた細胞収納用凹部を有する凍結保存用治具が記載されている。
- [0014] 特許文献7では、卵子又は胚を、耐凍剤を多量に含む保存液と共に保存液除去材の上に載置し、下部から吸引することで卵子又は胚の周囲に付着した余分な保存液を除き、凍結保存させる方法が提案されている。なお、保存液除去材としては、金網、紙等の天然物や合成樹脂からなるフィルム状物で貫通孔を有したものが記載されている。また余分な保存液を除き、また細胞を載置する際の作業性を向上することが可能な凍結保存用治具として、例えば、特定のヘーズ値を有する保存液吸収体が特許文献8に記載され、更に特許文献9、特許文献10等には、保存液吸収体として多孔質焼結形成体や特定の屈折率を有する素材で形成された多孔質構造体を有するガラス化凍結保存用治具が記載されている。
- [0015] 細胞又は組織を載置する際の作業性を向上することが可能な凍結保存用治具についての記載は上述の通りであるが、細胞又は組織を剥離する際の作業性を向上することが可能な凍結保存用治具として、例えば、細胞又は組織を載置する載置部の最表面に水溶性高分子化合物を含有する層を有する細胞又は組織の凍結保存用治具が、特許文献11に記載されている。また特許文献12には、容器の内面に細胞が接着しないことを目的に、微細突起が形成された内面を有する細胞容器が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0016] 特許文献1：特許第3044323号公報
特許文献2：特開2008-5846号公報

特許文献3：特開2002-315573号公報

特許文献4：特開2006-271395号公報

特許文献5：特許第5781621号公報

特許文献6：特許第5798633号公報

特許文献7：国際公開第2011/070973号

特許文献8：特開2014-183757号公報

特許文献9：特開2015-142523号公報

特許文献10：国際公開第2015/064380号

特許文献11：特開2017-60457号公報

特許文献12：特開2015-226497号公報

非特許文献

- [0017] 非特許文献1：Steponkus et al., Nature 345 : 170-172 (1990)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0018] 特許文献3及び特許文献4では、卵子又は胚を載置するフィルムの幅を制限することにより、少ない量の保存液とともに卵子又は胚を凍結保存し、優れた生存率を得る方法が提案されている。しかしながら、卵子又は胚を凍結後に融解する際、凍結対象の状態等によって、しばしばフィルム上の卵子又は胚がフィルム表面に固着してしまい、これらを回収する際に高い技量が要求されるという問題があった。さらには、作業者がより少量の保存液で卵子又は胚を凍結保存するほど、凍結後に融解する際に卵子又は胚がフィルム表面に、強固に固着してしまうという問題があった。

- [0019] 特許文献5及び特許文献6では、細胞の付着保持部に細胞が収納される凹部を設けることで、凍結作業時の細胞の脱落を改善する方法が提案されているが、依然として、前記した特許文献3や特許文献4と同様、回収する際に高い技量が要求される問題を有している。

- [0020] 特許文献7では、卵子又は胚の周囲に付着した余分な保存液を、保存液除

去材の下部から吸引して除くことにより、これらの生殖細胞を凍結保存させる方法が提案されている。しかしながら、特許文献3及び特許文献4と同様に、凍結後に融解する際、卵子又は胚が保存液除去材上に固着してしまい、これらを回収する際に高い技量が要求されるという問題があった。特許文献8～10では、前述した特許文献7などのように、卵子又は胚の周囲に付着した余分な保存液を作業者が除く必要はなく、良好な作業性が得られるものの、保存液吸収体が保存液を吸収する際に、卵子又は胚が保存液吸収体にとりわけ強固に固着することから、卵子又は胚を回収する際に特に高い技量が要求されるという問題があった。

[0021] 特許文献11では、細胞又は組織を凍結後に融解する際に、細胞又は組織が凍結保存用治具の載置部上に固着することを回避するために、その載置部に水溶性高分子化合物を含有する層を形成する方法が提案されているが、凍結融解時の細胞又は組織の回収性の向上は恒久の課題であり、好ましくは更なる改善が望まれていた。

[0022] 特許文献12では、所謂細胞の保存バイアルのような、細胞を保存液とともに充填する細胞容器において、細胞容器の内面に微細突起形状を形成することにより、細胞容器内面への細胞の付着を抑制する方法が提案されている。しかしながら、上記の技術は、付着を抑制するものであり、保存を目的として付着した細胞を積極的に剥離し、使用する技術ではない。極少数（多くの場合1～3個程度）の細胞又は組織を極少量の保存液とともに載置する所謂クライオトップ法においては、融解時に細胞が強固に固着することなくスムーズに回収されるだけでなく、凍結保存時には細胞又は組織が凍結保存治具上に確実に保持されることも求められる。

[0023] 本発明は、細胞又は組織の凍結保存作業を容易かつ確実に行うことが可能な、細胞又は組織の凍結保存用治具を提供することを主な課題とする。より具体的には、細胞又は組織を保存液に浸漬し、凍結保存用治具の載置部に載置して凍結保存する際に、細胞又は組織が載置部表面に確実に保持されると共に、載置された細胞又は組織の外周の余分な保存液を少なくすることがで

き、さらには、凍結融解時に細胞又は組織を速やかに回収できる凍結保存用治具を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0024] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、以下の構成を有する細胞又は組織の凍結保存用治具（本明細書中、「細胞又は組織の凍結保存用治具」を、単に「凍結保存用治具」ともいう）によって、上記した課題を解決できることを見出した。

[0025] (1) 細胞又は組織を保存液とともに載置する載置部を有する凍結保存用治具であって、該載置部表面が細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有することを特徴とする細胞又は組織の凍結保存用治具。

(2) 上記した細胞又は組織を保持する凸部の高さが、細胞又は組織の平均径の $1/100$ 以上 $1/2$ 未満であることを特徴とする、上記(1)に記載の細胞又は組織の凍結保存用治具。

(3) 上記した細胞又は組織を保存液とともに載置する載置部表面の算術平均粗さ R_a が $1.0\mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする、上記(1)に記載の細胞又は組織の凍結保存用治具。

(4) 上記した載置部が保存液吸収体を有することを特徴とする、上記(1)～(3)のいずれかに記載の細胞又は組織の凍結保存用治具。

発明の効果

[0026] 上記の発明によれば、凍結作業において、細胞又は組織を載置部上に滴下付着する際に、細胞又は組織の周辺の余分な保存液を除く作業が容易であり、細胞又は組織を載置部表面に確実に保持することができ、さらには、融解作業において、細胞又は組織を速やかに回収できる凍結保存用治具を提供することができる。本発明の凍結保存用治具を使用すると、細胞又は組織の凍結保存作業を容易かつ確実にを行うことが可能となる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具の一例を示す全体図である。

[図2]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具の別の一例を示す全体図である

。

[図3]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具の別の一例を示す全体図である

。

[図4]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の一例を示す断面構造概略図である。

[図5]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す断面構造概略図である。

[図6]図4に示す載置部において、細胞及び保存液を滴下付着した際のモデル図である。

[図7]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の一例を示す斜視図である。

[図8]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。

[図9]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。

[図10]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。

[図11]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。

[図12]本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具が、保存液吸収体を有する場合における載置部の一例を示す断面構造図である。

[図13]図12に示す載置部において、細胞及び保存液を滴下付着した際のモデル図である。

[図14]実施例で使用した金型の一例を示す図である。

[図15]実施例で使用した金型の他の一例を示す図である。

[図16]実施例で使用した金型の他の一例を示す図である。

[図17]実施例で使用した金型の他の一例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0028] 本発明の凍結保存用治具は、細胞又は組織を凍結保存する際に用いられるものである。本明細書中で細胞とは、単一の細胞のみならず、複数の細胞からなる生物の細胞集団を含むものである。複数の細胞からなる細胞集団とは単一の種類の細胞から構成される細胞集団でも良いし、複数の種類の細胞から構成される細胞集団でも良い。また、組織とは、単一の種類の細胞から構成される組織でも良いし、複数の種類の細胞から構成される組織でも良く、細胞以外に細胞外マトリックスのような非細胞性の物質を含むものでも良い。

[0029] 本明細書中の凍結保存作業は、細胞又は組織を極低温の冷媒を用いて凍結させる凍結作業、細胞又は組織を極低温の冷媒中で貯蔵する保管作業、細胞又は組織を融解液中で解凍する融解作業の一連の作業を含むものとする。

[0030] 本発明の凍結保存用治具は、凍結保存作業に用いるものであり、好ましくはガラス化凍結保存作業に用いるものである。詳細には、本発明の凍結保存用治具は、細胞又は組織が載置された載置部を有する凍結保存用治具を液体窒素等の冷却溶媒に浸漬し凍結させるためのものである。また、該載置部上に載置された細胞又は組織を融解する際には、細胞又は組織を凍結保存用治具と共に冷却媒体から取り出し、融解液中に浸漬させて融解するためのものである。

[0031] 本発明の凍結保存用治具を用いると、凍結保存する際に、細胞又は組織を載置部表面に確実に保持することができる。また、細胞又は組織と共に滴下した保存液が、載置した細胞又は組織の下部に貯留されるため、細胞又は組織外周の余分な保存液が少なくなり、細胞又は組織を良好な生存率で凍結保存することができる。さらには、凍結保存後に細胞又は組織を融解する際には、載置部上に載置された細胞又は組織と載置部表面との間に貯留された保存液が存在することから、保存液がガラス化状態から融解され、流動性を速やかに取り戻し、融解液に希釈されることに伴い、細胞又は組織を容易に載置部表面から剥離及び回収することができる。つまりは本発明の凍結保存用治具を用いると、細胞又は組織の凍結保存にかかる作業を容易にかつ確実に

行うことができる。本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具は、細胞又は組織の保存用具、細胞又は組織の凍結保存器具、細胞又は組織の保存用器具と言い換えることができる。

[0032] 本発明の凍結保存用治具は、細胞又は組織を載置する載置部表面が、細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有する。凍結操作において、細胞又は組織と保存液を載置部表面に滴下付着させると、該載置部表面の凹凸形状が保存液の広がりを抑制する。このため載置した細胞又は組織の位置が大きく移動することがなく、ピペット等を用いた滴下付着の作業が容易である。また、載置部表面の凸部は細胞又は組織を確実に保持することができる。さらに、載置した細胞又は組織の下部に形成された凹部に、細胞又は組織と共に滴下付着した保存液が貯留されることにより、細胞又は組織外周の余分な保存液を少なくすることができることから、急速なガラス化凍結が可能となる。一方、融解操作においては、細胞又は組織を融解する際には、細胞又は組織と載置部表面との間に貯留された（凍結された）保存液が存在することから、ガラス化状態から融解され、流動性を取り戻した保存液が融解液に希釈されることに伴い、細胞又は組織を容易に載置部表面から剥離及び回収することができる。

[0033] また、本発明の凍結保存用治具が有する載置部が保存液吸収体を有し、その表面に本発明の表面形状である細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有する場合には、上記効果に加えて、該保存液吸収体が余分な保存液を吸収するので、余分な保存液を除くためのその他の操作を特に必要とせず、作業性が格段に向上する。また、そのように操作された細胞又は組織は極少量の保存液に覆われており、凍結作業する場合でも速やかに凍結状態にすることができる。さらに、前記したガラス化凍結法においては、保存液が多量の耐凍剤を含有することによる化学的毒性が問題となるが、載置部が保存液吸収体を有する凍結保存用治具によれば、載置された細胞又は組織周辺の保存液が極少量となることで、細胞又は組織の生存率の向上が期待できる。

- [0034] 以下に、本発明の凍結保存用治具の構成を説明する。
- [0035] 本発明の凍結保存用治具では、細胞又は組織を載置する載置部表面が、細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有する。ここで、細胞又は組織を載置する載置部表面とは、実際に、細胞又は組織が保存液とともに載置される表面部分に相当する。
- [0036] 本発明の凍結保存用治具は、細胞又は組織を載置する載置部の形状は、細胞又は組織を載置可能な形状であればよく、特に限定されない。好ましくは、載置部は略シート状の形状である。略シート状の載置部を有する凍結保存用治具は、本発明の好ましい実施態様の1つである。本発明における略シート状とは、マクロな視点で平面を有する形状であることを意味し、平面シート状、曲率を有するシート状、波型シート状、V字型シート状等の形状が例示される。
- [0037] 本発明において載置部が有する細胞又は組織を保持する凸部は、載置する細胞又は組織と接する構造部分に相当する。該凸部は、載置される細胞又は組織に対して、少なくとも1個以上あればよく、複数あってもよい。載置する1個の細胞又は組織に対して、2個以上の凸部を有することが好ましい。なお、該凸部は載置する細胞又は組織を保持する目的の構造であることから、該凸部表面が細胞又は組織と直接接することなく、例えば細胞の周りの保存液を介して細胞を保持していてもよい。
- [0038] 本発明において載置部が有する保存液を貯留する凹部は、その表面が載置する細胞と接することなく、保存液を貯留することが望ましい。該凹部は、載置する細胞に対して、少なくとも1個以上あればよく、複数あってもよい。また、複数の載置部を有する場合に、各載置部の保存液を貯留する凹部が連結していてもよい。
- [0039] 上記した凸部は、細胞又は組織（以下、載置対象物とも記載）を保存液と共に載置する箇所が存在することが重要である。よって、複数の凸部を有する集合部は1ヶ所に存在していても良いし、複数の凸部を有する集合部が複数個所に存在しても良いが、載置対象物である細胞又は組織を凸部が確実に

保持可能なように、複数の凸部によって載置対象物を保持するような状態、すなわち、凸部間のパターンピッチが、載置対象物の平均径の95%以下であることが好ましい。凸部間のパターンピッチは、上面視したときに、最も近い凸部の中心間の距離である。細胞又は組織が載置されない箇所においては、該凸部が存在していても、存在していなくても良い。

[0040] 本発明において載置部が有する細胞又は組織を保持する凸部の高さ（すなわち凹部の深さ）は、載置する細胞又は組織の大きさにより適宜選択することができるが、100nm以上であることが好ましい。凸部の高さが100nmを下回る場合には、凹部に貯留される保存液の量が不十分であり、奏する効果が得られない場合がある。

[0041] また、本発明において細胞又は組織を保持する凸部の高さは、載置される細胞又は組織の平均径の $1/100$ 以上 $1/2$ 未満であることが好ましい。これにより融解操作の際に細胞又は組織を剥離、回収することがより容易となる。本発明において細胞又は組織の載置部の表面に形成された凸部は、載置部と載置対象物の接触面積を減らすことにより、融解操作時に載置対象物が凍結保存用治具の載置部から剥離することを促進できるが、このような効果は該凸部の高さを、細胞又は組織の平均径の $1/100$ 以上とした場合において、とりわけ顕著に表れる。本発明において、細胞又は組織の平均径は、等体積球換算の直径の平均である。等体積球換算の直径とは、細胞又は組織が球状の場合には、その直径を指す。載置される細胞又は組織が球状でない場合、該細胞又は組織の体積から球相当の直径を求め、この値を等体積球換算の直径として採用するものとする。載置される細胞又は組織が1個の場合は、該細胞又は組織の上記等体積球換算の直径を、平均径とする。

一態様において、本発明の凍結保存用治具は、好ましくは平均径が1~500 μ mの細胞又は組織の凍結保存用治具として好適に使用される。

[0042] 一方、凸部の高さが細胞又は組織の平均径の $1/2$ 以上であった場合、融解操作時において載置対象物が凍結保存用治具から容易に剥離することが困難となる場合がある。この理由は定かではないが、一般に細胞又は組織は、

耐凍剤の化学的毒性を低減するため、培養士の手技によって少量の保存液と共に載置部に載置される。このため凸部の高さが細胞又は組織の平均径の $1/2$ 以上であった場合には、凸部と細胞又は組織との間に適度な液膜が形成した状態で凍結することが難しくなり、良好な融解剥離性が得られにくい場合がある。なお、このような凍結保存用治具を用いた場合、本発明の実施形態は、細胞又は組織を凍結保存用治具に載置し凍結保存する凍結保存方法であって、該凍結保存用治具が細胞又は組織を載置する載置部を有し、該載置部表面は細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有し、該凸部の高さが前記した細胞又は組織の平均径の $1/100$ 以上 $1/2$ 未満である凍結保存方法となる。

[0043] また本発明の別の形態に因れば、前記した載置部表面の算術平均粗さ R_a が $1.0\mu\text{m}$ 以上であることが好ましい。これにより細胞又は組織を融解する際に、細胞又は組織を、より容易に剥離、回収することが可能な凍結保存用治具を提供することができる。該算術平均粗さ R_a は、測定した粗さ曲線の一部を基準長さで抜き出し、その区間の凹凸状態を平均値で表した値である。なお、本発明において算術平均粗さ R_a は、触針式表面粗さ計を使用して測定することができ、その際のカットオフ値は 0.8mm 、基準長は 4.0mm である。なお算術平均粗さ R_a の上限値は、 $10\mu\text{m}$ 以下であることが望ましい。載置部表面の算術平均粗さ R_a は、より好ましくは $1.0\sim 5\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは、 $1.5\sim 3.5\mu\text{m}$ である。載置部表面の算術平均粗さ R_a が上記範囲であると、上述本発明した本発明の効果をより充分に発揮することができる。

[0044] 本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部は規則的かつ均一なパターンを有していても良いし、規則的かつ均一でないすなわちランダムなパターンであってもよい。本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部からなる表面形状のパターンは、ピラー状、ブロック状、ストライプ状、ホール状、錘状などの所望のパターンを利用できる。

[0045] 本発明の凍結保存用治具が有する載置部は、保存液を吸収しない非吸収体からなるものであってもよく、保存液を吸収する保存液吸収体を有するものであってもよい。

まず、本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織を載置する載置部が非吸収体からなる場合について説明する。

本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織を載置する載置部が、非吸収体である場合には、ポリエチレンテレフタレート（PET）やポリエチレンナフタレート（PEN）等のポリエステル樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂、シリコン樹脂、ポリカーボネート樹脂、ジアセテート樹脂、トリアセテート樹脂、ポリアリレート樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリスルホン樹脂、ポリエーテルスルホン樹脂、ポリイミド樹脂、ポリアミド樹脂、ポリオレフィン樹脂、環状ポリオレフィン樹脂、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）等のフッ素樹脂等からなる各種樹脂、アルミニウムやアルミニウム合金、金、金合金、銀、銀合金、鉄、銅、銅合金、ステンレスなどの各種金属、ガラス、ゴム等を用いることができる。

[0046] 次に、本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織の載置部における細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部の形成方法について説明する。

[0047] 本発明の凍結保存用治具が有する載置部表面には、素材に応じた様々な方法で細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部を形成することができる。具体的には、PETのような樹脂を載置部の素材として用いた場合は、切削加工や表面研磨、金型の圧熱転写等の方法により載置部表面に所望の凸部と凹部を形成することが可能である。金属を載置部の素材として用いた場合は、切削加工や表面研磨、ショットピーニング等の方法により、載置部表面に所望の凸部と凹部を形成することが可能である。ガラスを載置部の素材として用いた場合は、エッチングや微細研磨等の方法により、載置部表面に所望の凸部と凹部を形成することができる。

[0048] 次に、本発明の凍結保存用治具が有する載置部が、保存液吸収体を有する

場合について説明する。

[0049] 本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織の載置部が保存液吸収体を有する場合には、余分な保存液を細胞又は組織の周囲から除去することができ、耐凍剤の化学的毒性を軽減する観点から好ましい。細胞又は組織の載置部が保存液吸収体を有する場合には、特にガラス化凍結保存法において必要とされる余分なガラス化液を除去する工程が不要になると共に、細胞又は組織周辺の保存液が極少量となることで、細胞又は組織の生存率の向上が期待できる。

[0050] 本発明の凍結保存用治具が有する細胞又は組織の載置部が保存液吸収体を有する場合には、保存液吸収体として、繊維からなる多孔性構造体、樹脂からなる多孔性構造体、金属からなる多孔性構造体、金属酸化物からなる多孔性構造体を用いることができる。本発明における「多孔性」とは、上記した吸収体が表面に気孔（細孔）を有する構造体であることを意味し、該吸収体表面及び内部に連続的な気孔を有する構造体であることがより好ましい。また保存液吸収体（上記した各種多孔性構造体）の厚みは $10\ \mu\text{m}\sim 5\ \text{mm}$ であることが好ましく、より好ましくは $20\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \text{mm}$ である。保存液吸収体が、薄いシートである場合には、補強部材として前記した非吸収体を支持体として組み合わせることも可能である。

[0051] 本発明において、保存液吸収体として用いる繊維からなる多孔性構造体としては、紙又は不織布が例示され、紙はバインダー等の結着剤成分の紙全体に占める割合が $10\ \text{質量}\%$ 以下である紙が好ましく、より好ましくは $5\ \text{質量}\%$ 以下であり、更に $3\ \text{質量}\%$ 以下である紙が好ましい。これにより優れた保存液の吸収性が得られる。また、該紙に含まれる製紙用薬品の紙全体に占める割合は $1\ \text{質量}\%$ 以下であることが好ましい。通常紙に含まれている製紙用薬品のうち、例えば蛍光増白剤や染料、カチオン系のサイズ剤等には細胞への影響が懸念される場合がある。

[0052] 繊維からなる多孔性構造体が紙である場合、密度が $0.1\sim 0.6\ \text{g}/\text{cm}^3$ であり、坪量が $10\sim 130\ \text{g}/\text{m}^2$ の紙であることが好ましい。特に密

度が $0.12 \sim 0.3 \text{ g/cm}^3$ であり、坪量が $10 \sim 100 \text{ g/m}^2$ である紙は、保存液の吸収性に優れ、さらには、透過型顕微鏡を用いて載置部上に載置した細胞又は組織を観察することができるような、細胞又は組織の視認性に優れた凍結保存用治具を提供することが可能となるため好ましい。

[0053] 繊維からなる多孔性構造体が不織布である場合、該不織布が含有する繊維としては、セルロース繊維、セルロース繊維からなる再生繊維であるレーヨン繊維やキュプラ繊維、さらにはセルロース繊維からの半合成繊維であるアセテート繊維、ポリエステル繊維、ナイロン繊維、アクリル繊維、ポリプロピレン繊維、ポリエチレン繊維、ポリ塩化ビニル繊維、ビニリデン繊維、ポリウレタン繊維、ビニロン繊維、ガラス繊維、絹繊維等が挙げられ、これら繊維を各種混合した不織布も用いることができる。中でもセルロース繊維、セルロース繊維由来の繊維でセルロース再生繊維であるレーヨン繊維やキュプラ繊維、更にはセルロース繊維からの半合成繊維であるアセテート繊維が好ましい。

[0054] 繊維からなる多孔性構造体が不織布である場合、密度が $0.1 \sim 0.4 \text{ g/cm}^3$ であり、坪量が $10 \sim 130 \text{ g/m}^2$ の不織布であることが好ましい。特に密度が $0.12 \sim 0.3 \text{ g/cm}^3$ であり、坪量が $10 \sim 100 \text{ g/m}^2$ である不織布は、保存液の吸収性に優れ、さらには細胞又は組織の視認性に優れた凍結保存用治具を提供することが可能となるため好ましい。

[0055] 保存液吸収体として用いられる不織布においても前記した紙と同様に、バインダー等の結着剤成分の不織布に占める割合が10質量%以下である不織布が好ましく、より好ましくは5質量%以下であり、更に3質量%以下である不織布が好ましい。特に結着剤を含有しない不織布が好ましい。

[0056] 不織布は紙と異なり様々な製造方法があるが、上記した結着剤成分が低減された不織布としては、スパンボンド法、メルトブロー法で製造された不織布、更には湿式法又は乾式法で繊維を並べた後、水流交絡法又はニードルパンチ法で製造された不織布が好適に使用できる。また上記した通り、本発明において不織布が含有する好ましい繊維としては、セルロース繊維、セルロ

ース繊維由来の繊維でセルロース再生繊維であるレーヨン繊維やキュプラ繊維、更にはセルロース繊維からの半合成繊維であるアセテート繊維が挙げられるが、これら繊維を用いて製造する場合は、湿式法、乾式法に関わらず水流交絡法又はニードルパンチ法での製造方法が好適である。

[0057] 本発明において保存液吸収体として用いる樹脂からなる多孔性構造体としては、例えば特公昭42-13560号公報や、特開平08-283447号公報に記載される、少なくとも一軸方向に延伸し、樹脂の融点以上に加熱し焼結することで得た微細繊維状構造により多孔質構造を形成した多孔性構造体、特開2009-235417号公報に記載される、乳化重合又は粉碎等の方法によって得られた熱可塑性樹脂の固体粉末を金型に充填し、加熱、焼結して粉末粒子表面を融着させて冷却することにより、多孔質構造を形成した多孔性構造体等が挙げられる。多孔性構造体を保存液吸収体として用いた場合、保存液の吸収性に優れ、さらには細胞又は組織の視認性に優れた凍結保存用治具を提供することが可能となるため、好ましい。

[0058] 上記した樹脂からなる多孔性構造体（多孔性樹脂シート）を形成する樹脂としては、低密度ポリエチレン、高密度ポリエチレン、超高分子ポリエチレン等の各種ポリエチレンやポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレンやポリビニルジフロライド等のフッ素樹脂、エチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリアミド、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン-アクリロニトリル三元共重合体、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル等が挙げられる。中でもポリテトラフルオロエチレンやポリビニリデンジフロライド等のフッ素樹脂を用いた多孔性樹脂シートは、細胞又は組織を保存液と共に載置部に載置した場合、透過型顕微鏡観察下での細胞又は組織の視認性が飛躍的に高まり、細胞又は組織の視認性にとりわけ優れた凍結保存用治具を提供することが可能となるため好適である。また多孔性樹脂シートとしては、理化学実験用途や研究用途として市販されている、濾過用のメンブレンフィルターも使用できる。

[0059] 本発明において、保存液吸収体として用いる金属からなる多孔性構造体と

しては、銅、銅合金、アルミニウム、アルミニウム合金、金、金合金、銀、銀合金、錫、亜鉛、鉛、チタン、ニッケル、ステンレス等の金属からなる多孔性金属シートが挙げられる。また、金属酸化物からなる多孔性構造体としては、シリカ、アルミナ、ジルコニウム、石英ガラス等の金属酸化物からなる多孔性構造体を好ましく利用することができる。なお、金属からなる多孔性構造体及び金属酸化物からなる多孔性構造体は、上記した金属及び金属酸化物をそれぞれ2種類以上含有する多孔性構造体であっても良い。中でも金属酸化物からなる多孔性構造体は、透過型顕微鏡観察下での細胞又は組織の視認性に優れた凍結保存用治具を提供することが可能となるため、好ましい。

[0060] 本発明において、保存液吸収体として用いる金属からなる多孔性構造体、金属酸化物からなる多孔性構造体の製造方法としては、一般に知られた方法を使用することができる。保存液吸収体が金属からなる多孔性構造体の場合には、粉末冶金法、スパーサー法等の方法を使用することができる。また、樹脂射出成型と粉末冶金法を組み合わせた所謂パウダースペースホルダー法も好ましく使用できる。例えば、国際公開第2006/041118号や特許第4578062号公報に記載された方法等を用いることができる。より具体的には、金属粉末とスパーサーとなる樹脂を混合後、圧力をかけて成型し、高温環境下で焼成することで、金属粉末を焼き固め、スパーサーとなる樹脂を気化させて、多孔性金属シートを得ることができる。パウダースペースホルダー法等を用いる場合には、金属粉末とスパーサーとなる樹脂に加えて、樹脂のバインダーを混合することができる。また、金属粉末を高温で加熱した後に、ガスを注入して空隙を作製する発泡熔融法、ガス膨張法等の金属多孔質体の製造方法も使用することができる。さらには、発泡剤を用いて金属多孔質体を製造するスラリー発泡法のような製造方法も使用することができる。保存液吸収体が金属酸化物からなる多孔性構造体の場合には、例えば、特開2009-29692号公報や特開2002-160930号公報に記載された方法等を用いることができる。

[0061] 保存液吸収体が、上記した樹脂からなる多孔性構造体、金属からなる多孔性構造体及び金属酸化物からなる多孔性構造体の多孔質体である場合には、該多孔質体の細孔径は、 $0.02 \sim 50 \mu\text{m}$ であることが好ましく、より好ましくは $0.05 \sim 25 \mu\text{m}$ である。細孔径が $0.02 \mu\text{m}$ 未満の場合、保存液の滴下時に保存液の吸収性能が充分でない場合がある。また、多孔性構造体の製造が難しいという問題がある。一方、細孔径が $50 \mu\text{m}$ を超える場合、本発明の凍結保存用治具の載置部が有する細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部の構造を形成することが難しい場合がある。また細孔径が $25 \mu\text{m}$ を超える場合、透過型顕微鏡観察下において、細胞又は組織の視認性が低下する場合がある。なお、多孔質体の細孔径は、樹脂からなる多孔性構造体の場合には、バブルポイント試験により測定される最も大きい細孔の直径である。また金属からなる多孔性構造体及び金属酸化物からなる多孔性構造体の場合には、該多孔質体の表面及び断面の画像観察から測定した平均細孔直径である。

[0062] 保存液吸収体の空隙率は20容量%以上であることが好ましく、より好ましくは30容量%以上である。また保存液吸収体が、上記した樹脂からなる多孔性構造体、金属からなる多孔性構造体、及び金属酸化物からなる多孔性構造体等の多孔質体である場合、多孔質体の内部の気孔は、厚み方向のみならず、厚み方向に対して垂直な方向に対しても連続的な構造であることが好ましい。このような構造を有すると、多孔質体内部の気孔を有効に用いることができるために、保存液の高い吸収性能が得られる。保存液吸収体の厚み、多孔質体の空隙率は、用いる細胞又は組織の種類や細胞又は組織と共に滴下される保存液の滴下量等に応じて、適宜選択することができる。

[0063] 上記した空隙率とは、以下の式で定義される。ここで空隙容量 V は水銀ポロシメーター（測定器名称 Autopore II 9220 製造者 micromeritics instrument corporation）を用い測定・処理された、保存液吸収体における細孔半径 3nm から 400nm までの累積細孔容積（ ml/g ）に、保存液吸収体の乾燥固形分

量（g／平方メートル）を乗ずることで、単位面積（平方メートル）当たりの数値として求めることができる。また保存液吸収体の厚みTは保存液吸収体の断面を電子顕微鏡で撮影し測長することで得ることができる。

$$P = (V / T) \times 100 (\%)$$

P：空隙率（％）

V：空隙容量（ml／m²）

T：厚み（μm）

[0064] 本発明の凍結保存用治具の細胞又は組織を載置する載置部が保存液吸収体を有する場合においても、前述したように、素材に応じた様々な方法で細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部を形成することができる。具体的には、保存液吸収体として、繊維からなる多孔性構造体や、ポリテトラフルオロエチレンのような樹脂からなる多孔性構造体を使用した場合には、金型の圧熱転写等の方法により、載置部に用いる保存液吸収体表面に所望の凸部と凹部を形成することが可能である。保存液吸収体として、金属からなる多孔性構造体を用いた場合には、エッチング処理や、ショットピーニング、表面研磨等の方法により該保存液吸収体表面に所望の凸部と凹部を形成することが可能である。なお、保存液吸収体が細孔を有する場合には、該保存液吸収体が有する細孔を閉塞することなく、保存液吸収体表面に所望の凸部と凹部を形成することが好ましい。保存液吸収体を有する載置部は、該保存液吸収体の表面の凸部及び凹部を、載置部の表面の凸部及び凹部として有するものであることが好ましい。

[0065] 上述した方法により、載置部上に形成した凸部の高さは、共焦点顕微鏡による形状測定により求めることができる。載置部に形成した凸部の高さを求める他の方法としては、例えば、（株）キーエンス製のデジタルマイクロスコープVHX-5000の深度合成機能を利用し解析する方法、（株）キーエンス製の形状解析レーザー顕微鏡VK-X1000により解析する方法、電子顕微鏡により載置部の断面を観察する方法などが挙げられる。また、上述した凸部のパターンピッチも同様の方法で求めることが可能である。

[0066] 本発明において、載置部が保存液吸収体に加えて補強部材として前述した非吸収体を有する場合には、保存液吸収体と非吸収体との間に、接着層を設けることができる。接着層としては、湿気硬化性の接着物質に代表されるような瞬間接着組成物、ホットメルト接着組成物、光硬化性接着組成物等を含有することが可能であり、例えば、ポリビニルアルコール、ヒドロキシセルロース、ポリビニルピロリドン、澱粉糊のような水溶性高分子化合物、酢酸ビニル系樹脂、アクリル系樹脂、エポキシ系樹脂、ウレタン系樹脂、エラストマー系樹脂、シアノアクリレート系樹脂、フッ素系樹脂、シリコーン系樹脂、ニトロセルロース系樹脂、ニトリルゴム系樹脂、スチレン-ブタジエン系樹脂、ユリア系樹脂、スチレン系樹脂、フェノール系樹脂、ポリイミド系樹脂、ポリアミド系樹脂、ポリエステル系樹脂、ビスマレイミド系樹脂、オレフィン系樹脂、EVA系樹脂等の非水溶性樹脂を含有する組成物が好ましく利用できる。接着層は、一種類の樹脂を含有してもよいし、複数種類の樹脂を含有してもよい。接着層の固形分量は、 $0.01 \sim 100 \text{ g/m}^2$ の範囲が好ましく、更に $0.1 \sim 50 \text{ g/m}^2$ の範囲がより好ましい。

[0067] 本発明の凍結保存用治具が有する載置部の面積は、細胞又は組織と共に滴下される保存液の滴下量等に応じて適宜設定すればよく、特に限定されないが、例えば、滴下する保存液 $1 \mu\text{L}$ につき 1 mm^2 以上とすることが好ましく、 $2 \sim 400 \text{ mm}^2$ とすることがより好ましい。また、同一の凍結保存用治具において、載置部が、非吸収性支持体上に保存液吸収体を複数有する形態である場合には、連続している1つの保存液吸収体部分が前記した面積であることが好ましい。

[0068] 本発明の凍結保存用治具の細胞又は組織を載置する載置部の最表面には、水溶性高分子化合物を含有する可溶性層を有することが好ましい。本発明の凍結保存用治具は前述の通り、凍結操作時に、細胞又は組織を保存液と共に凍結保存用治具の載置部に載置した後に、冷媒（例えば液体窒素）に浸漬、凍結し、融解時には、凍結した細胞又は組織を凍結保存用治具と共に取り出し、融解液中に浸漬して融解するものである。可溶性層が載置部の最表面に

存在する場合、細胞又は組織を融解する際に、該可溶性層の全体又は一部が融解液中に溶解することで、前述した載置部表面に所望の凸部と凹部を形成する効果と相まって細胞又は組織の剥離性が相乗的に向上する。

[0069] 本発明において、可溶性層が含有する水溶性高分子化合物としては、例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体、デンプン及びその誘導体、ゼラチン、カゼイン、アルギン酸及びその塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、スチレン-マレイン酸共重合体塩、スチレン-アクリル酸共重合体塩等が挙げられる。中でも、アルギン酸及びその塩やゼラチンは保存液に対する溶解性と適度な被膜形成作用が得られることから好ましく、ポリビニルアルコールは、非生物由来素材であり、かつ細胞又は組織に対しても低毒性であるため、特に好ましい。これらの水溶性高分子化合物は、単独で用いても良いし、2種類以上を併用しても良い。また可溶性層は、融解液に対する溶解度が10質量%を下回らない範囲で、架橋剤を含有することができる。

[0070] 本発明において、載置部が保存液吸収体を有する場合には、該保存液吸収体が有する細孔を閉塞することなく、載置部に所望の凸部と凹部を形成することが好ましい。保存液吸収体の吸収性が著しく低下しない範囲であれば、保存液吸収体上に、可溶性層を設けることも可能である。

[0071] 本発明において、凍結保存用治具が、保存液吸収体上に可溶性層を有する場合には、可溶性層の固形分量が多くなるほど、保存液吸収体が有する細孔が狭くなるために、保存液の吸収性は低下する傾向にある。一方、融解作業の際の細胞又は組織の剥離性は、可溶性層の固形分量が多くなるほど優位である。このような理由から、可溶性層が含有する水溶性高分子化合物の固形分量は、 $0.01 \sim 100 \text{ g/m}^2$ であることが好ましく、より好ましくは $0.1 \sim 10 \text{ g/m}^2$ である。

[0072] 本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具により、細胞又は組織を長期凍結保存する場合、細胞又は組織を外界と遮断するためにキャップを被せる、又

は該凍結保存用治具を任意の形状の容器に入れて密閉することが可能である。液体窒素が滅菌されておらず、細胞又は組織を直接液体窒素に接触させて凍結させる場合においては、凍結保存用治具が滅菌されていても滅菌状態を保証できない場合がある。よって、凍結前に細胞又は組織を付着させた載置部にキャップをして、又は凍結保存用治具を容器中に密閉して、細胞又は組織を直接液体窒素に接触させないで凍結させることがある。欧州等海外先進国では前記のように液体窒素に直接接触させない凍結方法が主流である。また、細胞又は組織を直接液体窒素に接触させて凍結させる場合においても、貯蔵する液体窒素タンク中での物理的衝撃等から、凍結保存用治具上に載置された細胞又は組織を保護することを目的として、載置部にキャップをすることがある。このような理由からキャップ及び容器は耐液体窒素性のある素材である各種金属、各種樹脂、ガラス、セラミック等で作製することが好ましい。形状としては特に限定されず、例えば、キャップは、鉛筆用のキャップのような半紡錘状又はドーム状等のキャップ、円柱状のストローキャップ等本体部と接触せず、細胞又は組織を外界と遮断できるような形状ならどのような形状でもよい。容器は、載置された細胞又は組織に接触せずに、凍結保存用治具を被包又は収納して密閉できるものであればよく、その形状は特に限定されない。

[0073] 本発明においては、本発明の効果を損なわない限り、凍結保存用治具をこのような載置部上の細胞又は組織を外界と遮断することができるキャップ又は容器と組み合わせて使用することができる。また、このようなキャップ又は容器と組み合わせて使用される凍結保存用治具も、本発明に包含される。

[0074] 本発明の凍結保存用治具は、例えば、クライオトップ法において好適に用いられるものである。また、従来のクライオトップ法は、胚又は卵子の凍結保存に一般的に用いられ、通常、単一の細胞又は10個未満の少数の細胞の保存に用いられるが、本発明の凍結保存用治具は、より多くの細胞の保存（例えば、10～1000000個の細胞の保存）においても好適に用いることができる。さらには、複数の細胞からなるシート状の細胞（所謂細胞シー

ト)の保存にも好適に用いることができる。本発明の凍結保存用治具を用いると、細胞又は組織の凍結保存作業において、細胞又は組織を確実に保持することができるとともに、載置する細胞又は組織外周の保存液を少ない状態で凍結保存することができる。また、細胞又は組織を凍結後に融解する際に、細胞又は組織を容易に剥離、回収することができる。また、載置部が保存液吸収体を有することにより、上記した効果に加えて、細胞又は組織を凍結する際に、細胞又は組織の外周に付着した余分な保存液を吸収することから、細胞又は組織の凍結時及び融解時に細胞外の保存液による損傷を受けにくく、細胞又は組織を優れた生存率で凍結保存することができる。

[0075] 本発明の凍結保存用治具を用いて細胞又は組織を凍結保存する方法は特に限定されず、例えば、まず保存液に浸漬した細胞又は組織を保存液と共に載置部上に滴下し、必要に応じて、該細胞又は該組織の周囲に付着している余分な保存液をピペット等により可能な限り除く。このとき、該凍結保存用治具の載置部が保存液吸収体を有する場合には、上記操作は必要なく、自動的に余分な保存液が除かれる。次いで、前記細胞又は前記組織を載置部に保持させたまま液体窒素等の中に浸漬することにより、細胞又は組織を凍結することができる。この際、前記した載置部上の細胞又は組織を外界と遮断することができるキャップを載置部に装着して、又は凍結保存用治具を前記した容器に密閉して、液体窒素等の中に浸漬することもできる。保存液は、通常卵子、胚等の細胞の凍結のために使用されるものを使用でき、例えば、上述したリン酸緩衝生理食塩水等の生理的溶液に耐凍剤（グリセロール、エチレングリコール等）を含有させることで得られた保存液や、グリセロールやエチレングリコール、DMSO（ジメチルスルホキシド）等の各種耐凍剤を多量に（少なくとも保存液の全質量に対して10質量%以上、より好ましくは20質量%以上）含む保存液を使用できる。融解作業の際は、液体窒素等の冷却溶媒中から、該凍結保存用治具を取り出し、凍結された細胞又は組織を載せた載置部を融解液中に浸漬させ、その後、細胞又は組織を回収する。

[0076] 本発明の凍結保存用治具を用いて凍結保存することができる細胞として、

例えば、哺乳類（例えば、人（ヒト）、牛、豚、馬、ウサギ、ラット、マウス等）の卵子、胚、精子等の生殖細胞；人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）等の多能性幹細胞が挙げられる。また、初代培養細胞、継代培養細胞、及び細胞株細胞等の培養細胞が挙げられる。また、細胞は、一又は複数の実施形態において、線維芽細胞、膵ガン・肝ガン細胞等のガン由来細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、神経細胞、軟骨細胞、組織幹細胞、及び免疫細胞等の接着性細胞が挙げられる。さらに、凍結保存することができる組織として、同種又は異種の細胞からなる組織、例えば、卵巣、皮膚、角膜上皮、歯根膜、心筋等の組織が挙げられる。本発明は、特にシート状構造を有する組織（例えば、細胞シート、皮膚組織等）の凍結保存に好適である。本発明の凍結保存用治具は、直接生体から採取した組織だけでなく、例えば、生体外で培養し増殖させた培養皮膚、生体外で構築したいわゆる細胞シート、特開2012-205516号公報で提案されている三次元構造を有する組織モデルのような人工の組織の凍結保存についても、好適に用いることができる。本発明の凍結保存用治具は、上記のような細胞又は組織の凍結保存用治具として好適に用いられる。

[0077] 以上、本発明の凍結保存用治具の載置部について説明してきた。本発明の凍結保存用治具は、載置部と共に把持部を有していても良い。把持部を有すると、凍結保存作業時及び融解作業時の作業性が良好となるため、好ましい。

[0078] 図1は本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具の一例を示す全体図である。図1において凍結保存用治具9aは、把持部1と平面シート状の支持体2上に形成された平面シート状の載置部3を有する。

[0079] 把持部1は耐液体窒素素材であることが好ましい。このような素材としては、例えばアルミ、鉄、銅、ステンレス合金等の各種金属、ABS樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリエチレン樹脂、フッ素系樹脂や各種エンジニアプラスチック、更にはガラス等を好適に用いることができる。図1中、把持部1は円柱形であるが、その形状は任意である。また、後述するように、細胞又

は組織を直接液体窒素に接触させないこと、又は保護を目的に、載置部 3 にキャップを被せることがあるが、この場合、把持部 1 を、載置部 3 を有さない側から、載置部 3 を有する側に向かって、円柱の径が連続的に小さくなる形状とすることで、キャップを被せる際の作業性を向上させることも可能である。

[0080] 図 1 の把持部 1 と支持体 2 の接続方法について説明する。把持部 1 が樹脂の場合、例えば、成形加工するときインサート成形により支持体 2 を把持部 1 に接続することができる。更に、把持部 1 に図示しない構造体挿入部を作製して接着剤にて支持体 2 を接続することができる。接着剤は様々なものを使用できるが、低温に強いシリコン系やフッ素系の接着剤を好適に用いることができる。

[0081] 図 2 は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具の別の一例を示す全体図である。図 2 において凍結保存用治具 9 b は、把持部 1 と V 字型シート状の支持体 2、さらには支持体 2 上に形成された V 字型シート状の載置部 3 を有する。V 字型シート状の載置部の中心に細胞又は組織及び保存液を滴下付着することで、ピペット等で余分な保存液を除く際の作業性が向上する。

[0082] 図 3 は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具の別の一例を示す全体図である。図 3 において凍結保存用治具 9 c は、把持部 1 と曲率を有するシート状の支持体 2、さらには支持体 2 上に形成された曲率を有するシート状の載置部 3 を有する。図 2 の凍結保存用治具同様に、曲率を有するシート状の載置部 3 の中心に細胞又は組織及び保存液を滴下付着することで、ピペット等で余分な保存液を除く際の作業性が向上する。

[0083] 図 4 は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の一例を示す断面構造概略図である。図 4 中の載置部 3 a は、細胞又は組織を保持する凸部 4 と、保存液を貯留する凹部 5 を有する。

[0084] 図 5 は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す断面構造概略図である。図 5 中の載置部 3 b は、頂点部が平坦形状である細胞又は組織を保持する凸部 4 と、保存液を貯留する凹部 5 を有する

。このような構造においては、載置する細胞又は組織との接触面積が増えるため、より確実に細胞又は組織を保持することができる。

[0085] 図6は、図4に示す載置部において、細胞及び保存液を滴下付着した際のモデル図である。図6中、載置部3aは細胞又は組織を保持する凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。図6中に示す細胞6は、保存液7と共に、載置部3a上に載置される。このとき、細胞6は保存液7をその外周にまわっており、保存液7を介して、凸部4により確実に保持される。また、細胞6の外周に、わずかな保存液7を残したまま、その他の余分なガラス化液は、凹部5に貯留されている。

[0086] 図7は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の一例を示す斜視図である。図7に示す載置部3cは、頂点部が平坦形状である細胞又は組織を保持する凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。載置部全体としては、ラインアンドスペース形状（所謂ストライプ形状）の均一なパターンを有している。

[0087] 図8は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。図8に示す載置部3dは、載置部全体として、円柱形状（所謂ピラー形状）の構造体を均一なパターンとして有する構造である。頂点部が平坦形状である細胞又は組織を保持する凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。なお、載置部全体で、凹部5は連結された構造となっており、より多くの余分な保存液を貯留することができることから、凍結操作の際に、細胞又は組織を載置部上に滴下付着する際に、より多くの保存液を滴下付着する場合にも対応できる。

[0088] 図9は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。図9に示す載置部3eは、載置部の上面（細胞又は組織を載置する側）に向かって、頂部を有する略四角錐形状の構造体を載置部全体に均一なパターンとして有する構造である。略四角錐形状の凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。1個の凸部あたりで、細胞又は組織が接する面積が小さくなることから、凍結後の細胞又は組織を融解する際に、

容易な剥離及び回収が可能になる。

[0089] 図10は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。図10に示す載置部3fは、図9と同様に、載置部の上面（細胞又は組織を載置する側）に向かって、頂部を有する略四角錐形状の構造体を載置部全体に均一なパターンとして有する構造であり、略四角錐形状の凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有するが、図9と比較して、略四角錐形状の構造体の密度が低くなっている。このような構造であると、図9と比較して、凹部5がより多くの保存液を貯留することができるため、凍結操作の際に、細胞又は組織を載置部上に滴下付着する際に、より多くの保存液を滴下付着する場合にも対応できる。

[0090] 図11は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具における載置部の別の一例を示す斜視図である。図11に示す載置部3gは、円柱形状の構造体を有し、円柱形状の凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。円柱形状の構造体は、載置部の領域ごとに不均一なパターン（ランダムなパターン）を有する一例である。

[0091] 図12は、本発明の細胞又は組織の凍結保存用治具が、保存液吸収体を有する場合における載置部の一例を示す断面構造図である。図12において載置部3hは、支持体2上に保存液吸収体8を有する。該保存液吸収体8は、細胞又は組織を保持する凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。載置部3hは、凍結操作の際に、細胞又は組織を保存液とともに滴下付着すると、凸部4により細胞又は組織が確実に保持され、凹部5に保存液が貯留されるとともに、細胞又は組織の外周の余分な保存液が保存液吸収体8により除かれることから、ピペット等での余分な保存液を除去する操作を必要とせず、急速なガラス化凍結を行うことができる。

[0092] 図13は、図12中に示す載置部において、細胞及び保存液を滴下付着した際のモデル図である。図13中、保存液吸収体8は細胞又は組織を保持する凸部4と、保存液を貯留する凹部5を有する。図13中に示す細胞6は、保存液7と共に、保存液吸収体8上に載置される。このとき、細胞6は保存

液7をその外周にまっており、保存液7を介して、凸部4により確実に保持される。また、細胞6の外周に、ガラス化凍結に必須であるごくわずかな保存液7を残したまま、その他の余分な保存液は、凹部5に貯留されるが、保存液吸収体8が余分な保存液7を吸収するために、ピペット等での余分な保存液を除去する操作を必要とせずに、急速なガラス化凍結を行うことができる。さらには、余分な保存液をより確実に除くことができる。

実施例

[0093] 以下に本発明を実施例によりさらに詳細に示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0094] 実施例において、載置部に形成した凸部の高さ及びパターンピッチは、レーザーテック（株）製、共焦点顕微鏡オプテリクス（登録商標）C130を使用して測定した。

[0095] （実施例1）

非吸収体である透明PETフィルムの特定の領域に、エンボスプレス機による圧熱転写加工により、高さ $5\mu\text{m}$ 、パターンピッチが $50\mu\text{m}$ の四角錐形状が均一に配置された構造体を作製し、細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部を有する載置部を得た。作製した載置部の領域を含む透明PETフィルムを $1.5\text{mm}\times 20\text{mm}$ の短冊状に裁断し、ABS製把持部と接合し、実施例1の凍結保存用治具を作製した。

[0096] （実施例2）

非吸収体である透明PETフィルムの特定の領域に、エンボスプレス機による圧熱転写加工により、高さ $1\mu\text{m}$ 、パターンピッチが $10\mu\text{m}$ の六角柱形状が均一に配置された構造体を作製し、細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部を有する載置部を得た。その後、実施例1と同様にして、ABS製把持部と接合し、実施例2の凍結保存用治具を作製した。

[0097] （実施例3）

保存液吸収体として、アドバンテック東洋社製のポリテトラフルオロエチレン多孔体（細孔径 $0.2\mu\text{m}$ 、空隙率71%、厚み $35\mu\text{m}$ ）を用いて、

該保存液吸収体上に、圧熱転写加工により、高さ $5\mu\text{m}$ 、パターンピッチが $50\mu\text{m}$ の四角錐形状が均一に配置された構造体を作製し、細胞又は組織を保持する凸部と保存液を貯留する凹部を有する載置部を得た。また、支持体として透明PETフィルムを用い、該支持体上に、接着層として、ヘンケルジャパン社製のホットメルトウレタン樹脂Purmelit（登録商標）QR170-7141Pを乾燥時の固形分量が $30\text{g}/\text{m}^2$ となるように塗布した。接着層が完全硬化する前に、上記の方法で圧熱転写加工がなされた保存液吸収体を、該保存液吸収体の表面構造体を有さない側の面を、支持体と貼り合わせた。その後、作製した載置部の領域を含む保存液吸収体と支持体の貼合物を $1.5\text{mm}\times 20\text{mm}$ の短冊状に裁断し、ABS製把持部と接合し、実施例3の凍結保存用治具を作製した。

[0098]（実施例4）

前記した実施例3と同様にして、凸部と凹部からなる構造体を載置部上に有する保存液吸収体と支持体の貼合物を得た。その後、該貼合物に対し、水溶性高分子であるエチレンオキサイド基を有するポリビニルアルコールであるゴーセネックス（登録商標）WO-320Rの2質量%水溶液をディップコーティングし、室温乾燥後、さらに 120°C で40時間加熱乾燥を行った。なお、該水溶性高分子の塗布量は $1.6\text{g}/\text{m}^2$ であった。その後は、水溶性高分子を塗布した貼合物を、実施例1と同様にして、 $1.5\text{mm}\times 20\text{mm}$ の短冊状に裁断し、ABS製把持部と接合し、実施例4の凍結保存用治具を作製した。

[0099]（実施例5）

圧熱転写加工により、高さ $1\mu\text{m}$ 、パターンピッチが $50\mu\text{m}$ の四角錐形状が均一に配置された構造体を作製した以外は、実施例4と同様にして、実施例5の凍結保存用治具を作製した。

[0100]（比較例1）

非吸収体である透明PETフィルムに対して表面加工を行わなかった以外は、実施例1と同様にして、比較例1の凍結保存用治具を作製した。

[0101] (比較例2)

ポリテトラフルオロエチレン多孔体に対して表面加工を行わなかった以外は、実施例3と同様にして、比較例2の凍結保存用治具を作製した。

[0102] <スフェアの調製>

細胞又は組織の剥離性の評価に用いるスフェアは以下のように調製した。マウス胚性線維芽細胞を培養シャーレ上で培養後、トリプシン処理により剥離、回収した。その後、住友ベークライト(株)製PrimeSurface(登録商標)96Uプレートに50細胞/ウェルの細胞数で播種し、浮遊培養することでスフェア形成を誘導した。培養3日後に直径約100 μ mのスフェアを得た。

[0103] <スフェアの凍結作業と凍結作業における操作性の評価>

上記方法により調製したスフェアを回収し、平衡化液(7.5容量%ジメチルスルホキシド、7.5容量%エチレングリコール、85容量%199培地(Medium199(GEヘルスケア社)))に浸漬させた。その後、スフェアを平衡化液から回収し、ガラス化保存液(前記199培地を基礎液として、該基礎液の組成に加えて、15容量%ジメチルスルホキシド、15容量%エチレングリコール、14容量%ウシ胎児血清、0.5Mスクロースを含有させた溶液)に移した後に、30秒間浸漬させた。その後、ストリッパーピペッター(オリジオジャパン社)を用いて、微量のガラス化保存液(およそ0.4 μ l)と共にスフェアを回収し、実施例1~5及び比較例1の凍結保存用治具の載置部上にそれぞれ滴下付着させた。保存液吸収体を有さない実施例1、2及び比較例1の凍結保存用治具においては、1個のスフェアを微量のガラス化保存液と共に載置部上に滴下付着させた後に、透過型顕微鏡観察下で、ストリッパーピペッターを用いて、スフェア周辺から余分なガラス化保存液を可能な限り除去し、その後、液体窒素中に浸漬し、載置部上のスフェアをガラス化凍結した。一方、保存液吸収体を有する実施例3~5及び比較例2の凍結保存用治具においては、1個のスフェアを微量のガラス化保存液と共に滴下付着させた後に、透過型顕微鏡で、余分なガラス化保

存液が自発的に吸収される様子を観察しながら、スフェアの周辺から余分なガラス化液が除かれたことを確認し、液体窒素中に浸漬し、載置部上のスフェアをガラス化凍結した。凍結させた凍結保存用治具は、融解するまで、液体窒素保存容器中で保管した。

[0104] 上記凍結作業の際の操作性は以下の通りであった。保存液吸収体を有さない実施例 1 及び 2 の凍結保存用治具においては、比較例 1 と比較して、スフェアを微量のガラス化保存液と共に載置部上に滴下付着する際に、載置部表面に、ガラス化保存液及びスフェアが付着しやすく、スフェアを載置部上に滴下付着する作業が容易であった。また、余分なガラス化保存液を取り除く作業においても、実施例 1 と実施例 2 の凍結保存用治具は、載置部上の凹部にガラス化保存液が貯留され、載置部表面にガラス化保存液が付着しやすいことから、ピペット先端で余分なガラス化液をのばしやすく、余分なガラス化液を除去することが容易であった。一方、保存液吸収体を有する実施例 3 ～ 5 の凍結保存用治具においては、比較例 2 と同様に、滴下付着する際には、保存液吸収体にガラス化保存液が吸収されるために、載置部表面への付着作業は一様に容易であり、さらには、ピペット等を用いての余分な保存液を取り除く作業も必要とせず、凍結作業における操作性は一様に良好であった。

[0105] <スフェアの融解作業と剥離性の評価>

スフェアを載置した実施例 1 ～ 5 及び比較例 1、2 の凍結保存用治具を液体窒素中から取り出し、温度 37℃ の融解液（前記 199 培地を基礎液として、該基礎液の組成に加えて、1 M スクロースを含有させた溶液）に浸漬させた。浸漬後のスフェアの様子を透過型光学顕微鏡で観察し、スフェアの剥離性について以下の基準で評価した。これらの結果を表 1 の「細胞又は組織の剥離性」の項目に示す。

[0106] 細胞又は組織の剥離性は以下の基準で評価した。

◎：凍結保存用治具を融解液に浸漬した後、把持部を穏やかにゆする程度で、30 秒未満で、スフェアを剥離することができた。

○：凍結保存用治具を融解液に浸漬した後、把持部を穏やかにゆする程度で、30秒～60秒で、スフェアを剥離することができた。

△：把持部を穏やかにゆする程度では、60秒以内にスフェアを剥離することができなかつたため、把持部をやや強めにゆすり、スフェアを剥離することができた。

×：把持部を穏やかにゆする程度では、60秒以内にスフェアを剥離することができず、その後、把持部をやや強めにゆする操作においても、スフェアを剥離することができなかつた。

[0107] [表1]

	細胞又は組織の剥離性
実施例1	◎
実施例2	◎
実施例3	○
実施例4	○
実施例5	○
比較例1	△
比較例2	×

[0108] 上記の結果から、本発明の凍結保存用治具は、凍結作業において、細胞又は組織を載置部上に滴下付着する際に、細胞又は組織の周辺の余分な保存液を除く作業が容易であり、細胞又は組織を載置部表面に確実に保持することができ、さらには、融解作業において、細胞又は組織を速やかに回収できることが分かる。

[0109] (実施例6)

ポリエチレンテレフタレートフィルムとして、東レ(株)製のルミラー(

登録商標) T60 (厚み188 μ m、全光線透過率91%)に、図14に示した、一辺の長さが50 μ m、高さ30 μ mの四角錐形状が連続して形成された雌金型(13×12cm、全厚130 μ m)を、サイトウエンジニアーズ(株)製のロール式エンボス加工機、EMBOSTAR(商標登録)を用いてプレス加工することにより、ポリエチレンテレフタレートフィルム的一方の面に凸部を形成した。同機はギャップを調整可能な2本のロール間に加工対象物を通すことにより、凹凸加工を施すエンボス加工機であり、ロール間ギャップや加工温度の調整により対象物への加工深度を調整することが可能である。実施例6では、ロール間ギャップを320 μ mとした。また、加工時の温度(ロール最表面、接触式の温度計により測定)は240℃とした。上記の条件で加工したポリエチレンテレフタレートフィルム上に形成した凸部の高さは、5 μ m、凸部のパターンピッチは50 μ mであった。得られた凹凸加工ポリエチレンテレフタレートフィルムを、短辺1.5mm×長辺25.0mmの長方形に裁断し、ABS樹脂製の把持部と接合させ、図1に示す形態で実施例6の凍結保存用治具を作製した。

[0110] (実施例7)

実施例6において、ロール間ギャップを310 μ mとしてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例7の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例7において、ポリエチレンテレフタレートフィルム上に形成した凸部の高さは14 μ m、凸部のパターンピッチは50 μ mであった。

[0111] (実施例8)

実施例6において、ロール間ギャップを300 μ mとしてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例8の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例8において、ポリエチレンテレフタレートフィルム上に形成した凸部の高さは22 μ m、凸部のパターンピッチは50 μ mであった。

[0112] (実施例9)

実施例6において、ロール間ギャップを290 μ mとしてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例9の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例

9において、ポリエチレンテレフタレートフィルム上に形成した凸部の高さは $27\mu\text{m}$ 、凸部のパターンピッチは $50\mu\text{m}$ であった。

[0113] (実施例10)

図15に示した、一辺の長さが $50\mu\text{m}$ 、高さ $60\mu\text{m}$ の四角錐形状が連続して形成された雌金型 ($13\times 12\text{cm}$ 、全厚 $300\mu\text{m}$) を用いて、ロール間ギャップを $450\mu\text{m}$ としてプレス加工した以外は、実施例6と同様の方法で、実施例10の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例10において、ポリエチレンテレフタレートフィルム上に形成した凸部の高さは $46\mu\text{m}$ 、凸部のパターンピッチは $50\mu\text{m}$ であった。

[0114] (比較例3)

ポリエチレンテレフタレートフィルムとして、東レ(株)製のルミラー(登録商標) T60 (厚み $188\mu\text{m}$) を短辺 1.5mm ×長辺 25.0mm の長方形に裁断し、ABS樹脂製の把持部と接合させ、図1に示す形態で比較例3の凍結保存用治具を作製した。

[0115] <マウス卵子の凍結操作>

直径が $100\mu\text{m}$ のマウス卵子を、液温が 15°C のIrvine Scientific社製Vit Kit平衡液に浸漬させた。次いで、平衡液浸漬後のマウス卵子を、液温が 4°C のIrvine Scientific社製Vit Kitガラス化液に浸漬させた。90秒間ガラス化液に浸漬後、マウス卵子1個を透過型顕微鏡観察下で、凍結保存用治具(実施例6~10、比較例3)の載置部上に、ピペットを用いて載置した。このとき、載置部に存在する余分なガラス化液は、ピペット操作により取り除いた。その後、液体窒素中に上記凍結保存用治具を浸漬し、ガラス化凍結させた。凍結後の凍結保存用治具は、液体窒素保存容器中で保管した。

[0116] <マウス卵子の融解作業と剥離性の評価>

マウス卵子を載置した凍結保存用治具(実施例6~10、比較例3)を、液体窒素中から取り出し、温度 37°C のIrvine Scientific社製Vit Kit融解液に浸漬させた。融解液中で、マウス卵子が凍結

保存用治具の載置部から剥離する様子を、透過型光学顕微鏡で観察し、以下の基準で評価した。これらの評価結果を表2に示す。

[0117] ◎：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部を緩やかにゆすると30秒未満でマウス卵子を剥離することができた。

○：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部を緩やかにゆすると30～60秒の間にマウス卵子を剥離することができた。

△：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部を緩やかにゆすっても剥離ができず、強めにゆするとマウス卵子を剥離することができた。

×：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部を緩やかにゆすっても、強めにゆすってもマウス卵子を剥離することができなかった。

[0118] [表2]

	細胞又は組織の剥離性
実施例6	◎
実施例7	◎
実施例8	◎
実施例9	◎
実施例10	○
比較例3	△

[0119] <スフェアの調製>

細胞又は組織の剥離性の評価に用いるスフェアは以下のように調製した。マウス胚性線維芽細胞を培養シャーレ上で培養後、トリプシン処理により剥離、回収した。その後、住友ベークライト（株）製PrimeSurface（登録商標）96Uプレートに50細胞／ウェルの細胞数で播種し、浮遊培養することでスフェア形成を誘導した。培養約40時間後に直径50μmのスフェアを得た。

[0120] <スフェアの凍結作業>

直径が50 μ mのスフェアを、液温が15 $^{\circ}$ CのIrvine Scientific社製Vit Kit平衡液に浸漬させた。次いで、平衡液浸漬後のスフェアを、液温が4 $^{\circ}$ CのIrvine Scientific社製Vit Kit（商標登録）ガラス化液に浸漬させた。90秒間ガラス化液に浸漬後、1個のスフェアを透過型顕微鏡観察下で、凍結保存用治具（実施例6～10、比較例3）の載置部上に、ピペットを用いて載置した。このとき、載置部に存在する余分なガラス化液は、ピペット操作により取り除いた。その後、液体窒素中に上記凍結保存用治具を浸漬し、ガラス化凍結させた。凍結後の凍結保存用治具は、液体窒素保存容器中で保管した。

[0121] <スフェアの融解作業と剥離性の評価>

スフェアを載置した凍結保存用治具（実施例6～10、比較例3）を、液体窒素中から取り出し、温度37 $^{\circ}$ CのIrvine Scientific社製Vit Kit融解液に浸漬させた。融解液中で、スフェアが凍結保存用治具から剥離する様子を、透過型光学顕微鏡で観察し、先に記載した剥離性評価と同様の基準で評価した。これらの評価結果を表3に示す。

[0122] [表3]

	細胞又は組織の剥離性
実施例6	○
実施例7	○
実施例8	○
実施例9	△
実施例10	△
比較例3	×

[0123] (実施例11)

アドバンテック東洋（株）製のポリテトラフルオロエチレン多孔体（細孔径 $0.2\mu\text{m}$ 、空隙率 71% 、厚み $35\mu\text{m}$ ）を $20\text{cm}\times 10\text{cm}$ の短冊状に押切カッターを用いて裁断し、次いで、裁断後の多孔体を、厚み $300\mu\text{m}$ のポリカーボネートフィルム上に載置した。ポリカーボネートフィルム上に載置した多孔体の上に、図14に示した、一辺の長さが $50\mu\text{m}$ 、高さ $30\mu\text{m}$ の四角錐形状が連続して形成された雌金型（ $13\times 12\text{cm}$ 、全厚 $130\mu\text{m}$ ）を載置し、ロール間ギャップ $510\mu\text{m}$ 、加工時の温度 40°C の条件で、多孔体に凹凸加工を施した。他方、支持体として、易接着処理されたポリエチレンテレフタレートフィルムである東レ（株）製のルミラー（登録商標）T60（厚み $188\mu\text{m}$ ）に接着層として、ヘンケルジャパン（株）製のホットメルトウレタン樹脂Purmelit（登録商標）QR170-7141Pを、乾燥時の固形分量が $30\text{g}/\text{m}^2$ となるように塗布した。その後、凹凸加工した多孔体からポリカーボネートフィルム、金型を取り外し、多孔体の非凹凸加工面を、ポリエチレンテレフタレートフィルムの接着層塗布面と、接着層が完全硬化する前に貼り合わせた。得られた貼合体を、短辺 $1.5\text{mm}\times$ 長辺 25.0mm の長方形に裁断し、ABS樹脂製の把持部と接合させ、実施例11の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例11において、多孔体上に形成した凸部の高さは $3\mu\text{m}$ 、凸部のパターンピッチは $50\mu\text{m}$ であった。

[0124]（実施例12）

実施例11において、ロール間ギャップを $490\mu\text{m}$ としてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例12の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例12において、多孔体上に形成した凸部の高さは $5\mu\text{m}$ 、凸部のパターンピッチは $50\mu\text{m}$ であった。

[0125]（実施例13）

実施例11において、ロール間ギャップを $470\mu\text{m}$ としてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例13の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例13において、多孔体上に形成した凸部の高さは $9\mu\text{m}$ 、凸部のパター

ンピッチは50 μ mであった。

[0126] (実施例14)

実施例11において、ロール間ギャップを450 μ mとしてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例14の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例14において、多孔体上に形成した凸部の高さは12 μ m、凸部のパターンピッチは50 μ mであった。

[0127] (実施例15)

実施例11において、ロール間ギャップを430 μ mとしてプレス加工した以外は同様の方法で、実施例15の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例15において、多孔体上に形成した凸部の高さを電子顕微鏡により観察したところ、凸部の高さは16 μ m、凸部のパターンピッチは50 μ mであった。

[0128] (実施例16)

実施例11において、図16に示した直径1.4~2.0 μ mの円柱形状が、パターンピッチ2.7~3.3 μ mで連続して形成された雌金型（外形13×13cm（パターン形成部の面積7×7cm）、全厚190 μ m）を用いて、ロール間ギャップを540 μ mとしてプレス加工した以外は同様の加工を行い、実施例16の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例16において、多孔体上に形成した凸部の高さは1.2 μ m、凸部のパターンピッチは3.0 μ mであった。

[0129] (実施例17)

実施例16において、図16に示した雌金型に代わり、図17に示した、直径1.4~2.0 μ mの円柱形状が、パターンピッチ2.7~3.3 μ mで連続して形成された雄金型（外形13×13cm（パターン形成部の面積7×7cm）、全厚190 μ m）を用いて、プレス加工した以外は同様の加工を行い、実施例17の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例17において、多孔体上に形成した凸部の高さは1.1 μ m、凸部のパターンピッチは3.0 μ mであった。

[0130] (実施例 18)

実施例 11 で得た凍結保存用治具の載置部に、可溶性層を設ける以外は同様の方法で、実施例 18 の凍結保存用治具を作製した。なお、可溶性層は、貼合体を日本合成化学工業（株）製のゴーセネックス（登録商標）WO-320R（ケン化度 88.3 mol%）の 2 質量%水溶液にディップコーティングし、室温乾燥後、120℃で 40 時間加熱処理を行うことにより設けた。なお、実施例 18 において、多孔体上に形成した凸部の高さは 2.9 μm、凸部のパターンピッチは 50 μm であった。

[0131] (実施例 19)

実施例 18 と同様にして、実施例 12 で得た凍結保存用治具の載置部に可溶性層を設け、実施例 19 の凍結保存用治具を作製した。なお、実施例 19 において、多孔体上に形成した凸部の高さは 4.9 μm、凸部のパターンピッチは 50 μm であった。

[0132] (比較例 4)

凸部を形成していないアドバンテック東洋（株）製のポリテトラフルオロエチレン多孔体を載置部として用いる以外は、実施例 11 と同様にして、比較例 4 の凍結保存用治具を作製した。

[0133] 先に記載した、直径が 100 μm のマウス卵子を用いた細胞又は組織の剥離性評価と同様の方法及び基準で、細胞又は組織の剥離性を評価した。この結果を表 4 に示す。

[0134]

[表4]

	細胞又は組織の剥離性
実施例11	○
実施例12	○
実施例13	○
実施例14	○
実施例15	○
実施例16	○
実施例17	○
実施例18	◎
実施例19	◎
比較例4	×

[0135] 表2～4の結果から、本発明によって、融解操作時に細胞又は組織を容易に剥離することが可能な優れた剥離性が得られることがわかる。

[0136] (実施例20)

支持体として易接着処理された透明PETフィルム（全光線透過率91%、ヘーズ値5.5%）を用い、該支持体上に接着層として、ヘンケルジャパン（株）製のホットメルトウレタン樹脂Purmelit（登録商標）QR170-7141Pを乾燥時の固形分量が30g/m²となるように塗布した。接着層が完全硬化する前に、下記の方法で片面を粗面化した保存液吸収体の粗面化していない側の面を、該接着層に貼り合わせた。

[0137] 片面を粗面化した保存液吸収体は、アドバンテック東洋（株）社製のポリ

テトラフルオロエチレン多孔体（細孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ 、空隙率 71% 、厚み $35\ \mu\text{m}$ ）に対して、一辺の長さが、 $50\ \mu\text{m}$ で、高さが $25\ \mu\text{m}$ の四角錐が格子状に配置された表面を有する微細金型を、 $4\ \text{cm}\times 8\ \text{cm}$ の範囲において、面圧 $1.64\ \text{kN}$ 、温度 120°C 、加圧及び加温時間2分間の条件で、エンボスプレス機により圧熱転写加工することにより得た。得られた凸部と凹部とを有する保存液吸収体の表面に、（株）クラレ製のPVA103（ケン化度 $98.5\ \text{mol}\%$ ）の2質量%水溶液をディップコーティングし、室温乾燥後、 120°C で40時間加熱処理を行って可溶性層を形成した。載置部表面のRaを、（株）東京精密製のサーフコム（登録商標）1400Dにより測定したところ、 $1.69\ \mu\text{m}$ であった。また、可溶性層の固形分量は、 $1.6\ \text{g}/\text{m}^2$ であった。なお、支持体上に形成された載置部の大きさは $1.5\ \text{mm}\times 5\ \text{mm}$ であり、その後ABS樹脂製の把持部と支持体と接合させ、図1に示す形態で実施例20の凍結保存用治具を作製した。

[0138]（実施例21）

実施例20の凍結保存用治具の作製において、粗面化したポリテトラフルオロエチレン多孔体上に可溶性層を設けなかった以外は実施例20と同様に、実施例21の凍結保存用治具を作製した。なお、載置部表面のRaを（株）東京精密製のサーフコム（登録商標）1400Dにより測定したところ、 $2.20\ \mu\text{m}$ であった。

[0139]（実施例22）

実施例20の凍結保存用治具の作製において、圧熱転写時の面圧を $2.87\ \text{kN}$ に高めて凍結保存用治具を作製し、実施例22とした。なお、載置部表面のRaを（株）東京精密製のサーフコム（登録商標）1400Dにより測定したところ、 $3.12\ \mu\text{m}$ であった。

[0140] <マウス胚の凍結作業>

直径が約 $100\ \mu\text{m}$ のマウス胚を液温が 4°C の保存液（15容量%DMSO（ジメチルスルホキシド）、15容量%エチレングルコール、14容量%ウシ胎児血清、56容量%修正リン酸緩衝液（ $137\ \text{mM}\ \text{NaCl}$ 、2.

7 mM KCl、0.9 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.5 mM KH_2PO_4 、8 mM Na_2HPO_4 、5.6 mM グルコース、0.3 mM ピルビン酸Na、65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸ジベカシン、1 mg/ml ポリビニルピロリドン、14.8 mM L-proline、200 mM トレハロース、0.5 Mスクロース)に浸漬させた。30秒間の保存液への浸漬後、1個のマウス胚を、作製した凍結保存用治具の載置部上に載置し、透過型顕微鏡観察下で、ピペットを用いてマウス胚周辺の余分な保存液をできるだけ除いた。その後、液体窒素中に浸漬し、ガラス化凍結させた。凍結させた凍結保存用治具は、融解するまで、液体窒素保存容器中で保管した。

[0141] <マウス胚の融解作業と剥離性の評価>

マウス胚を載置した凍結保存用治具を液体窒素中からとりだし、温度37℃の融解液(上記修正リン酸緩衝液に1 Mスクロースを添加した溶液)に浸漬させた。浸漬後のマウス胚の様子を透過型光学顕微鏡で観察し、融解時のマウス胚の剥離性について以下の基準で評価した。これらの結果を表5の「細胞又は組織の剥離性」の項目に示す。

[0142] なお、前記したマウス胚の凍結作業、及び前記したマウス胚の融解作業と剥離性の評価に使用した凍結保存用治具の載置部上に形成された凸部のピッチは、実施例20~22の何れにおいても50 μm であった。

[0143] 細胞又は組織の剥離性は以下の基準で評価した。

◎：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部をゆすりながらマウス胚を剥離することができた(剥離に要した時間は20秒未満)。

○：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部をゆすりながらマウス胚を剥離することができた(剥離に要した時間は20秒以上40秒未満)。

△：凍結保存用治具を融解液に浸漬した際に、把持部をゆすりながらマウス胚を剥離するのに、40秒以上~60秒未満を要した。

×：把持部をゆすることでは、60秒以内にマウス胚を剥離することができなかった。

[0144] [表5]

	細胞又は組織の剥離性
実施例20	◎
実施例21	○
実施例22	◎

[0145] 表5の結果から、本発明の凍結保存用治具は融解時に優れた剥離性を示すことが判る。

産業上の利用可能性

[0146] 本発明は、牛等の家畜や動物の胚移植や人工授精、人への人工授精等の他、i P S細胞、E S細胞、一般に用いられている培養細胞、胚又は卵子を含む生体から採取した検査用又は移植用の細胞又は組織、生体外で培養した細胞又は組織等の凍結保存に用いることができる。

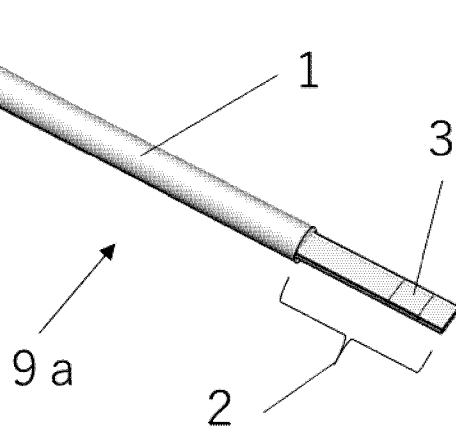
符号の説明

[0147] 1 把持部
 2 支持体
 3、3 a、3 b、3 c、3 d、3 e、3 f、3 g、3 h 載置部
 4 凸部
 5 凹部
 6 細胞
 7 保存液
 8 保存液吸収体
 9、9 a、9 b、9 c 凍結保存用治具

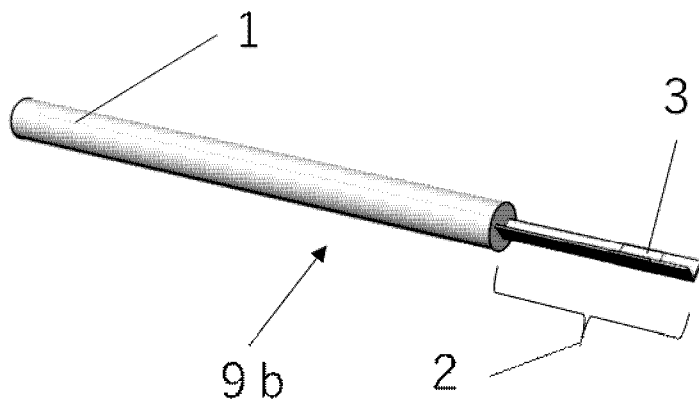
請求の範囲

- [請求項1] 細胞又は組織を保存液とともに載置する載置部を有する凍結保存用治具であって、該載置部表面が細胞又は組織を保持する凸部と、保存液を貯留する凹部を有することを特徴とする細胞又は組織の凍結保存用治具。
- [請求項2] 前記した細胞又は組織を保持する凸部の高さが、細胞又は組織の平均径の $1/100$ 以上 $1/2$ 未満であることを特徴とする、請求項1に記載の細胞又は組織の凍結保存用治具。
- [請求項3] 前記した細胞又は組織を保存液とともに載置する載置部表面の算術平均粗さ R_a が $1.0\ \mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする、請求項1に記載の細胞又は組織の凍結保存用治具。
- [請求項4] 前記した載置部が保存液吸収体を有することを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の細胞又は組織の凍結保存用治具。

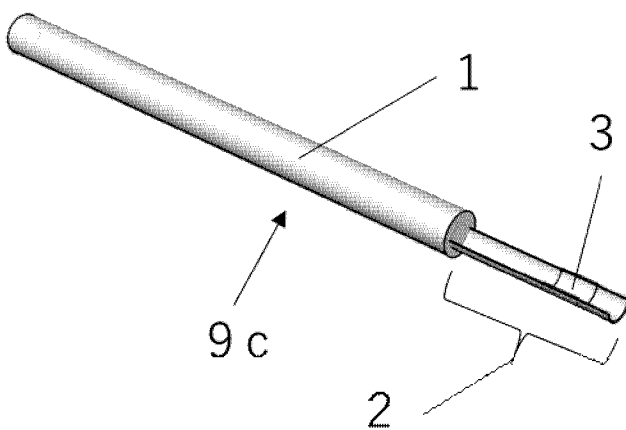
[図1]



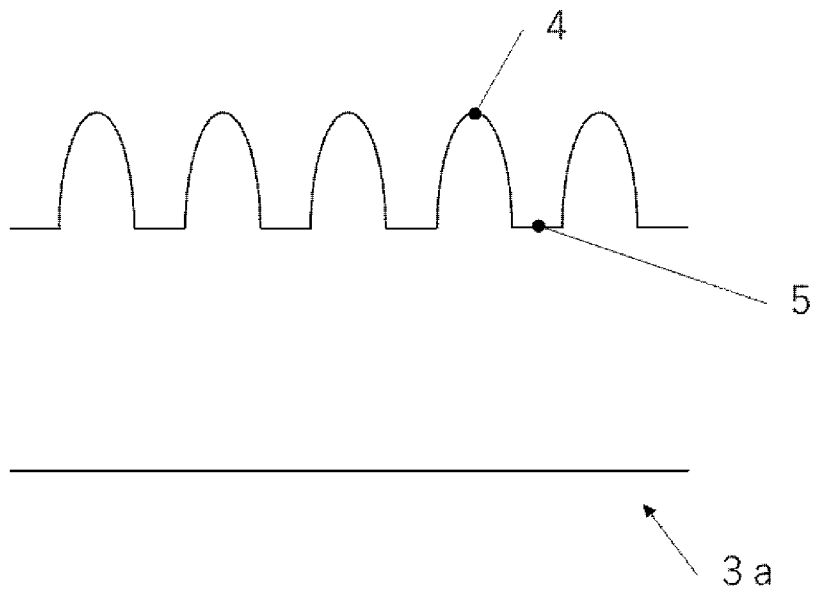
[図2]



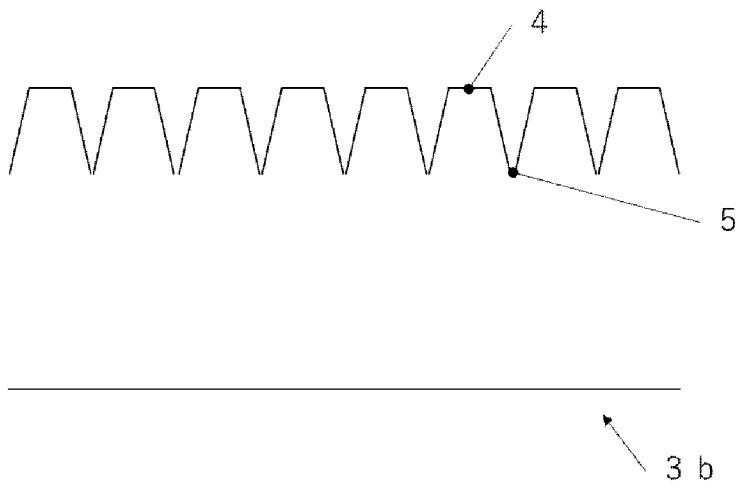
[図3]



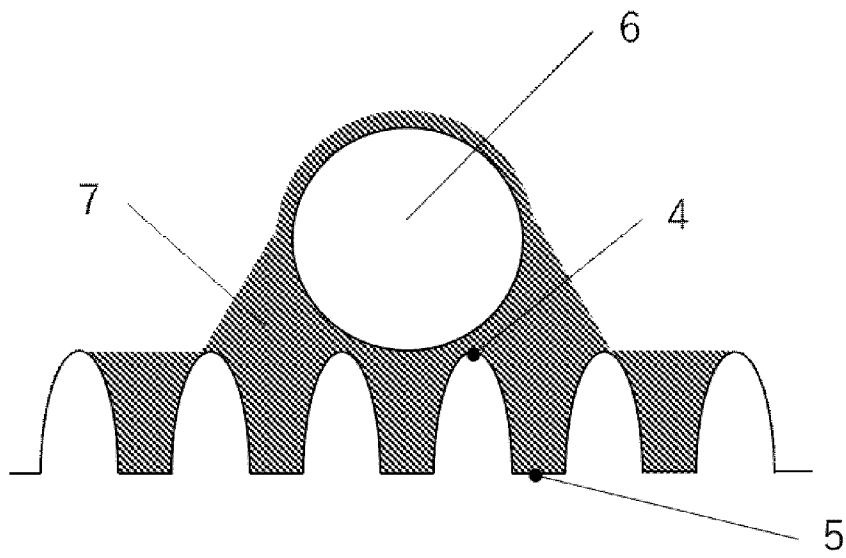
[図4]



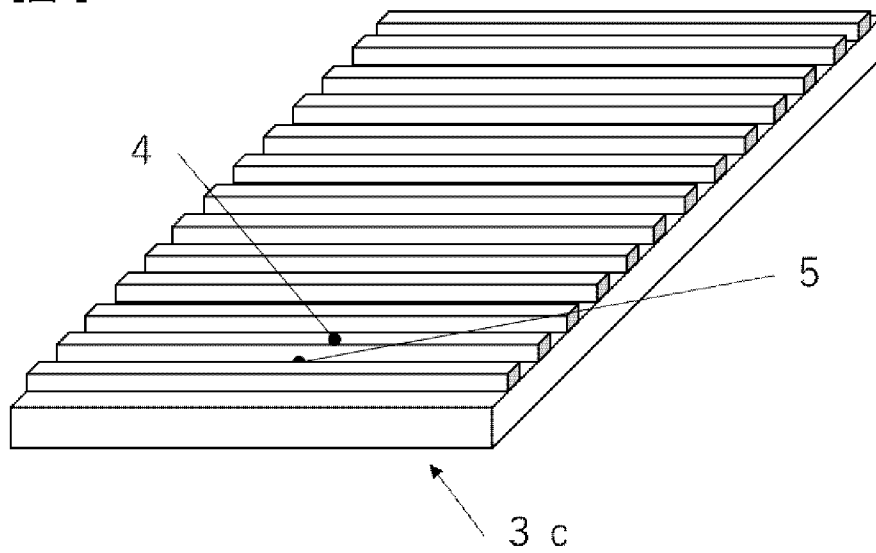
[図5]



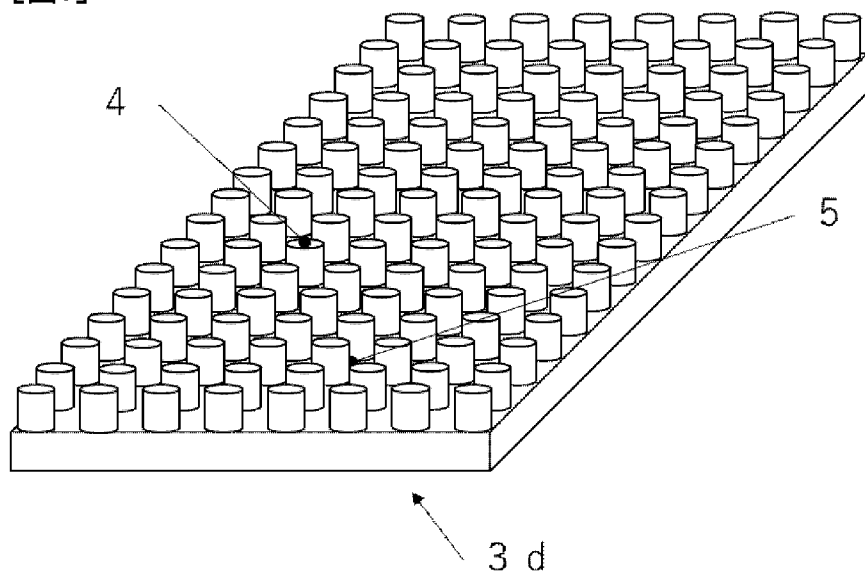
[図6]



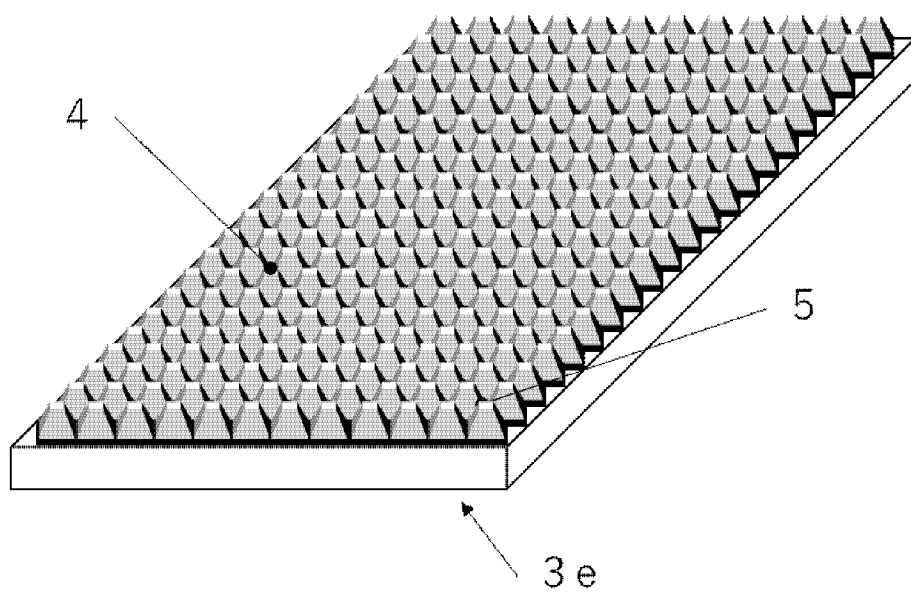
[図7]



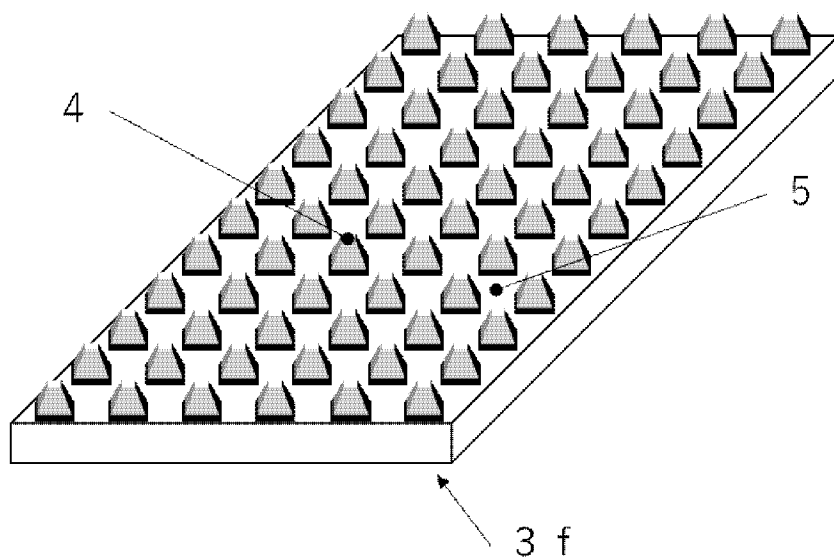
[図8]



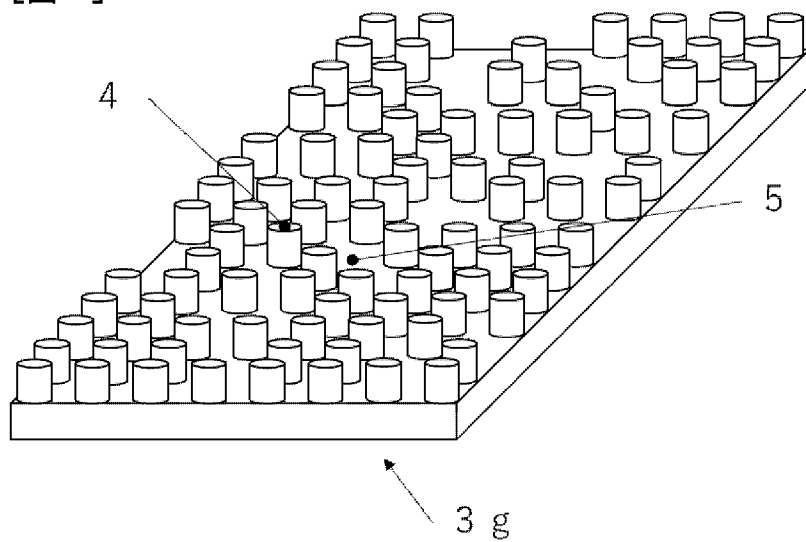
[図9]



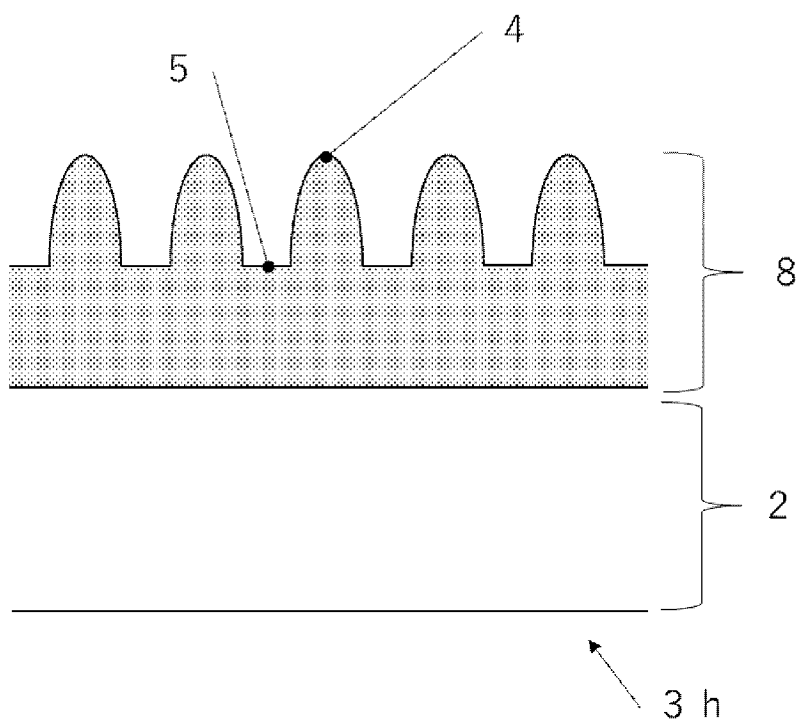
[図10]



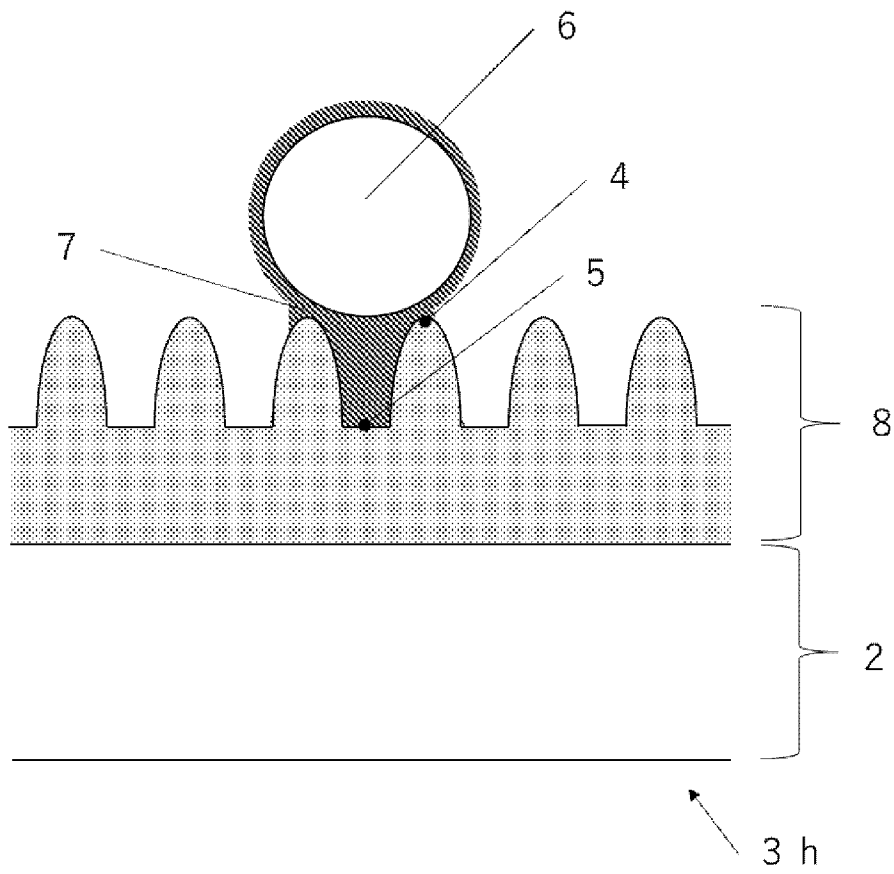
[図11]



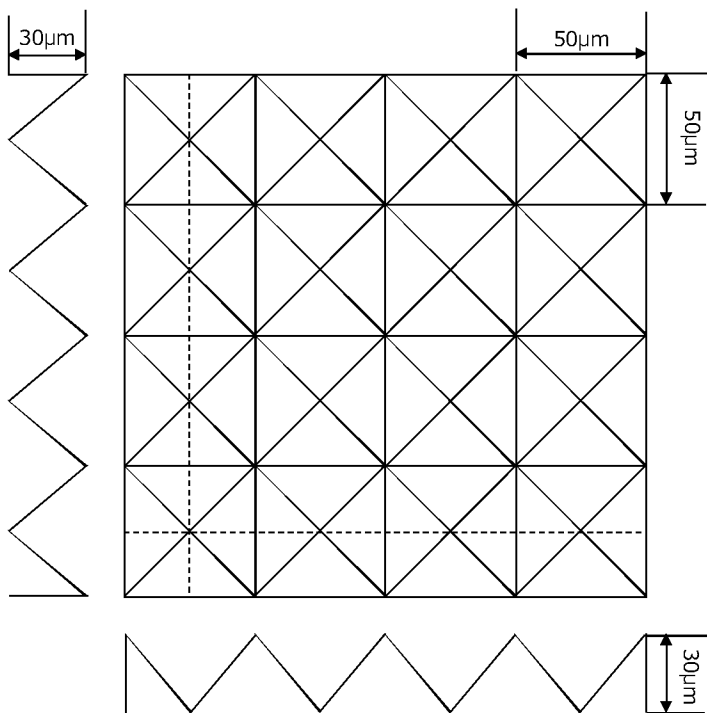
[図12]



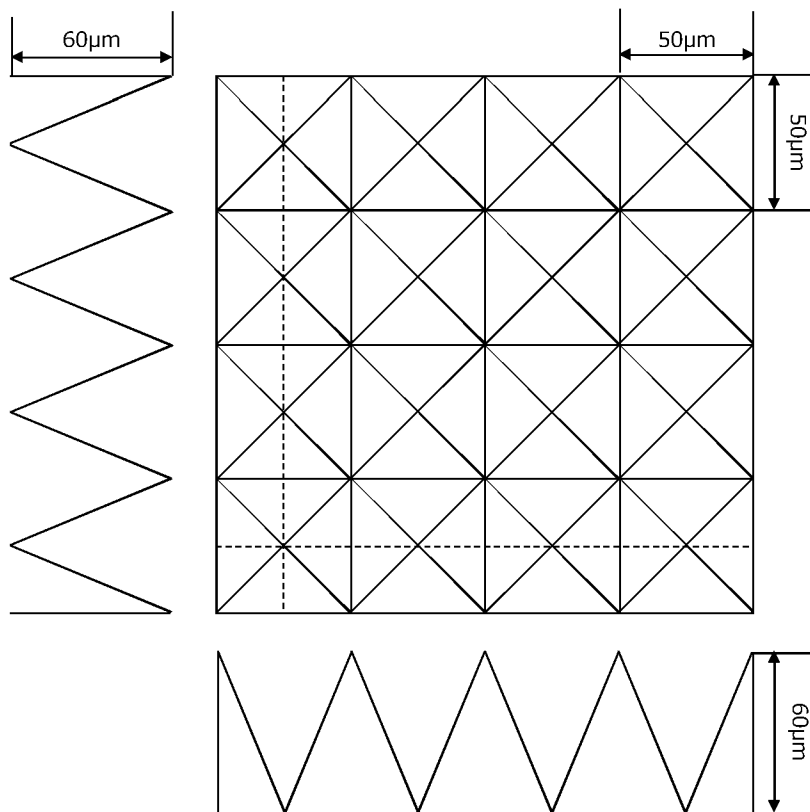
[図13]



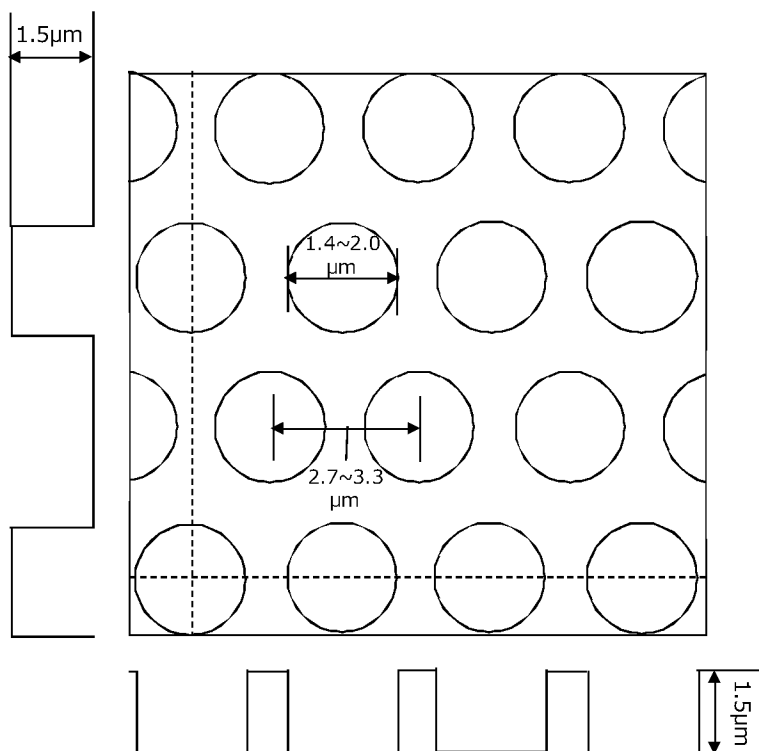
[図14]



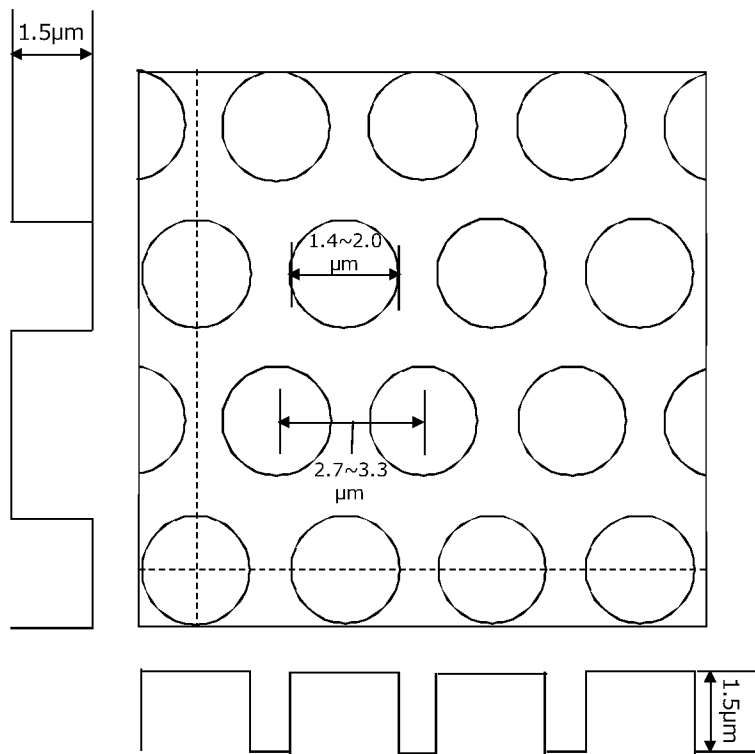
[図15]



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/022105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C12M3/00 (2006.01) i, A01N1/02 (2006.01) i, C12N5/02 (2006.01) n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12M3/00, A01N1/02, C12N5/02		
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	1971-2018	
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018	
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018	
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 (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-142523 A (MITSUBISHI PAPER MILLS LIMITED) 06 August 2015, claims, examples & WO 2015/115313 A	1-4
A	JP 2017-60457 A (MITSUBISHI PAPER MILLS LIMITED) 30 March 2017, paragraphs [0018]-[0021], examples & US 2017/0311587 A, paragraph [0024], examples & WO 2016/063806 A & EP 3211066 A	1-4
A	JP 2015-226497 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 17 December 2015, fig. 10, paragraphs [0035]-[0039] (Family: none)	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "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 27 August 2018 (27.08.2018)		Date of mailing of the international search report 04 September 2018 (04.09.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, A01N1/02(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)n		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M3/00, A01N1/02, C12N5/02		
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 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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 (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
A	JP 2015-142523 A (三菱製紙株式会社) 2015.08.06, 特許請求の範囲, 実施例 & WO 2015/115313 A	1-4
A	JP 2017-60457 A (三菱製紙株式会社) 2017.03.30, [0018]-[0021], 実施例 & US 2017/0311587 A, [0024], examples & WO 2016/063806 A & EP 3211066 A	1-4
A	JP 2015-226497 A (大日本印刷株式会社) 2015.12.17, 図10、[0035]-[0039] (ファミリーなし)	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 27.08.2018	国際調査報告の発送日 04.09.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 松原 寛子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 4154