(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6846054号
(P6846054)

(45)発行日　令和3年3月24日(2021.3.24)　(24)登録日　令和3年3月3日(2021.3.3)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	5/073	(2010.01)	C12N	5/073	
C12N	5/071	(2010.01)	C12N	5/071	
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
A61J	3/00	(2006.01)	A61J	3/00	301
A01N	1/02	(2006.01)	A01N	1/02	

請求項の数 10　(全 26 頁)

(21)出願番号　特願2018-514010(P2018-514010)
(86)(22)出願日　平成28年4月27日(2016.4.27)
(86)国際出願番号　PCT/JP2016/063147
(87)国際公開番号　WO2017/187543
(87)国際公開日　平成29年11月2日(2017.11.2)
審査請求日　平成31年4月10日(2019.4.10)

前置審査

(73)特許権者　520503636
株式会社ナガヨシ
福島県石川郡石川町大字新屋敷字長土路４８番地
(74)代理人　110002697
めぶき国際特許業務法人
(74)代理人　100110973
弁理士　長谷川　洋
(72)発明者　乾　裕昭
福島県郡山市並木３－５－１８　有限会社乾メディカル内
(72)発明者　水野　仁二
福島県郡山市並木３－５－１８　有限会社乾メディカル内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】液中操作型ガラス化凍結保存方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細胞または胚を保持したままガラス化凍結保存するためのガラス化凍結保存容器であって、当該容器に、細胞または胚を保持するための保持部を備え、前記保持部に、細胞または胚を入れるための凹部を備え、前記凹部を構成する壁面に、細胞または胚を通過させずにガラス化液を通過可能な貫通孔を備える液中操作型ガラス化凍結保存容器を、細胞または胚を含む前記ガラス化液中に挿入し、

当該ガラス化液中で前記液中操作型ガラス化凍結保存容器の前記凹部に細胞または胚を入れることを特徴とする、細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。

【請求項２】

前記凹部は、前記保持部の一つの面に開口し、当該一つの面の反対側の面から外方向に突出して形成されている請求項１に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。

【請求項３】

前記凹部は前記底部に十字帯を備え、

前記貫通孔は前記底部と前記十字帯との隙間に形成されている請求項１または請求項２に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。

【請求項４】

前記貫通孔を閉塞した状態の前記凹部の内容積が３０ｎＬ以下である請求項１から請求項３のいずれか１項に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。

【請求項５】
前記保持部の前記凹部よりも先端側に、前記保持部に加わる衝撃を和らげるための衝撃緩和部を備える請求項１から請求項４のいずれか１項に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。
【請求項６】
一端側に把持部を備える請求項１から請求項５のいずれか１項に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。
【請求項７】
前記凹部の開口部を開閉自在な蓋部を、さらに備える請求項１から請求項６のいずれか１項に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。
【請求項８】
更に、細胞または胚を前記凹部に保持した前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を、ガラス化液から取り出し、直接、凍結剤中に投入し、又は一端が凍結剤中に沈められたチューブに投入することを含む、請求項１から請求項７のいずれか１項に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。
【請求項９】
細胞または胚を前記凹部に保持した前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を前記ガラス化液から取り出した後、１～９０秒以内に、直接、凍結剤中に投入し、又は一端が凍結剤中に沈められたチューブに投入する、請求項８に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。
【請求項１０】
一方向を開口したディッシュの内底面に、前記ディッシュの内容積の深さと同一若しくは該深さよりも低い高さを持つウェルを少なくとも３個配置し、
１または２以上の第一ウェルに平衡液を入れ、１または２以上の第二ウェルにガラス化液を入れ、１または２以上の第三ウェルにガラス化液を入れると共に前記液中操作型ガラス化凍結保存容器の前記凹部を前記ガラス化液中に浸漬させておき、
細胞または胚を、前記第一ウェル、前記第二ウェル、前記第三ウェルの順に移動させ、
前記第三ウェルにおいて前記凹部に細胞または胚を収納した状態で前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を前記第三ウェルの前記ガラス化液から引き上げ、
細胞または卵子を前記凹部に収納した状態の前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を凍結剤中に浸漬する請求項１から請求項９のいずれか１項に記載の細胞または胚の液中操作型ガラス化凍結保存方法。
【発明の詳細な説明】
【クロスリファレンス】
【０００１】
本願において引用した特許、特許出願及び文献に記載された内容は、本明細書に援用する。
【技術分野】
【０００２】
本発明は、細胞または胚等の生体材料をガラス化凍結保存するために使用される液中操作型ガラス化凍結保存方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
従来から、細胞または胚（総称するときには、適宜、「細胞等」という）を、その性質が損なわれない状況下に長期間保存することが行われている。例えば、哺乳動物の胚を凍結保存し、当該哺乳動物の発情期に合わせて、凍結していた胚を融解して、哺乳動物に移植する方法が知られている。また、ヒトの不妊治療の一つとして、卵子あるいは各段階の胚（未成熟卵、成熟未受精卵、前核期胚、初期胚、胚盤胞、透明帯脱出胚盤胞など）を凍結保存しておき、妊娠を希望する時期に、凍結していた卵子あるいは胚を融解して用いる方法が知られている。

【０００４】
緩慢凍結法は、哺乳動物の初期胚の凍結保存法として周知の凍結保存法の一つである。緩慢凍結法は、所定濃度のジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）やグリセロールを添加した溶液に胚を漬けて、ゆっくり冷却して凍結する方法である。緩慢凍結法は、ヒトを含む哺乳動物の初期胚の凍結には適しているが、未受精卵および特定の胚の凍結保存に対しては、生存率が低いという課題を有していた。この主な原因には、未受精卵や胚の内外の水分の氷晶化によって未受精卵や胚が損傷することにあると考えられている。その後、このような課題を解決する新しい凍結保存法として、ガラス化保存法という技術が開発された（非特許文献１を参照）。ガラス化保存法は、一般的に、次のような工程を有する。まず、ＤＭＳＯ、エチレングリコール、プロピレングリコールやグリセロールなどに代表される分子量が小さく細胞内に浸透する耐凍結剤とスクロースやトレハロースなどに代表される細胞内に浸透せず細胞外で自由水の脱水により凍結保護作用を示す高分子二糖類を高濃度にて培養液に混合させてガラス化液を作製する。次に、細胞等をガラス化液に浮遊または浸漬して、細胞等の内部及び外部における水分をガラス化液と置換させる。次に、細胞等を凍結保存容器に保持する。最後に、細胞等を保持した凍結保存容器を、液体窒素中に入れて凍結保存する。高濃度の耐凍結剤の使用と液体窒素を用いた急速凍結は、細胞等を傷つける原因となっていた氷晶形成の低減に寄与する。

【０００５】
ガラス化保存法としては、例えば、ＶＳＥＤ法、ＧＬ－Ｔｉｐ法およびクライオトップ法等の手法が知られている。ＶＳＥＤ法は、細胞等の保存容器にストローを用い、ストロー内部にガラス化液を満たし、その中で細胞等を凍結保存しておく方法である（特許文献１を参照）。ＧＬ－Ｔｉｐ法は、細胞等の保存容器にＧＬ－Ｔｉｐを用い、ピペット等によりチップ内にガラス化液と共に細胞等を吸引して、凍結を行う方法である。クライオトップ法は、クライオトップ（登録商標）と称する液体窒素耐性シートの先端に、ガラス化液と共に細胞等を載せて、そのまま液体窒素中に投入して凍結する方法である（特許文献２を参照）。これらの方法の内、クライオトップ法は、現在、実用化のレベルとなっている。

【０００６】
図１４は、クライオトップ法にて、細胞の一例としての卵子を凍結保存する典型的な手法を示す。（１４Ａ）は操作の全体像を、（１４Ｂ）は（１４Ａ）の一部Ｘにおける段階的な操作を、それぞれ示す。（１４Ａ）に示すように、操作に先立ち、シャーレ１００中のガラス化液１０１に複数の卵子１０２が浸漬されている。次に、先端部分の細いガラス製のピペット１１０を使用して、シャーレ１００から、１個の卵子１０２を含むガラス化液１０１を吸引する。次に、（１４Ｂ）に示すように、クライオトップと称する凍結保存容器１２０のシート１２１の先端部に、ピペット１１０内の卵子１０２とガラス化液１０１を吐出する。その後、ガラス化液１０１が多すぎた場合には余分なガラス化液１０１をピペット１１０にて吸引する操作を行う。その後、液体窒素中に、卵子１０２を載せた凍結保存容器１２０を入れて、卵子１０２を急速に凍結させる。余分なガラス化液１０１を吸引するのは、過量のガラス化液１０１が卵子１０２の周囲に存在すると冷却速度が遅くなり、卵子１０２の生存率が低下するからである。しかし、シート１２１上のガラス化液１０１を吸引して適量に調整する操作は、熟練を要し、卵子が乾燥し障害を受けるという問題がある。

【０００７】
かかる問題を解決すべく凍結保存操作を容易にする治具として、例えば、余分なガラス化液を吸収可能な吸収層を備えたガラス化凍結保存用治具が知られている（特許文献３を参照）。このような治具を用いると、治具のシート上に供したガラス化液が多すぎても、ガラス化液をピペットで吸い取る作業を必要としない。加えて、卵子等に傷をつけることもなく、かつ卵子等を保持したガラス化凍結保存用治具を液体窒素中に迅速に投入できる。

【０００８】

また、本発明者が開発した別の治具も知られている（特許文献４を参照）。図１５は、本発明者が先に開発した凍結保存容器を用いた手法を示す。（１５Ａ）はその全体像を、（１５Ｂ）は（１５Ａ）中の一部Ｘの拡大図を、（１５Ｃ）は（１５Ｂ）のＹ－Ｙ線断面図を、それぞれ示す。当該凍結保存容器１３０は、５０ｎＬ以下の容積を持つ複数の貫通孔１４０を備える。この容器１３０を用いると、ピペット１１０から供されたガラス化液１０１の表面張力によって、貫通孔１４０内に卵子１０２を含む一定量のガラス化液１０１を保持できる。このため、貫通孔１４０の大きさを予め決めておくと（直径：Ｚ）、誰が作業を行っても、一定量のガラス化液１０１をシート１３１に保持できる。したがって、凍結前に、ガラス化液１０１の増減調整を行う必要がない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｒａｌｌ，Ｗ．Ｆ．　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ，３１３，５７３－５７５（１９８５）

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】特開平１０－２４８８６０号公報
【特許文献２】特開２００２－３１５５７３号公報
【特許文献３】特開２０１４－２２３０３４号公報
【特許文献４】特開２０１０－２１３６９２号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

しかし、細胞等の生存率をより高めるには、さらなる改良を要する。上記の従来の凍結保存操作は、全て、空気中にて、凍結保存容器の薄いシート上若しくはシートに形成された貫通孔に、細胞等を含むごく微量のガラス化液を供するものである。このため、ガラス化液中に浸漬していた状態から急速凍結に至るまでの過程において、細胞等は、空気に触れる時間が長くなり乾燥してしまい、ｐＨ、温度および／または浸透圧の大きな変化に晒される。このようなｐＨ等の大きな変化は、細胞等に対してダメージを与える大きな要因となる。また、従来の方法では、シート上に細胞等を保持する途中あるいは保持した後に、細胞等がシートから落下する可能性がある。この結果、細胞等が卵子や胚の場合には、採卵対象者に対して、採卵を再び行うことによる身体的及び精神的な負担を強いることになる。このような細胞等の落下は、凍結保存の処理を行う術者のスキルが低い場合には、より高くなる。

【００１２】

また、上記のような細胞等に対するダメージを低減することおよび失敗による再操作を低減することは、不妊治療に限られず、哺乳動物の遺伝資源の保存若しくは交配、あるいは再生医療にとって重要なＥＳ細胞やｉＰＳ細胞等を扱う際にも、極めて重要である。

【００１３】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、細胞または胚に対するダメージを減らし、かつ作業効率を高めることのできる液中操作型ガラス化凍結保存容器、当該容器とそれを収容するためのチューブとを備えるキット、および液中操作型ガラス化凍結保存方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明者は、細胞等へのダメージのさらなる低減とガラス化凍結保存処理の作業効率のさらなる向上を目的として鋭意努力した結果、細胞等を凍結直前まで空気に触れさせないことにより、細胞等の乾燥を可能な限り防ぐことができ、もって細胞等に対してｐＨ、温度および／または浸透圧の大きな変化を与えることを防ぐことができるという知見を得た。本発明者は、具体的には、次のような手段により目的を達成するに至った。

【００１５】
（１）一実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器は、細胞または胚（細胞等と称する）を保持したままガラス化凍結保存するためのガラス化凍結保存容器であって、当該容器に、細胞または胚を保持するための保持部を備え、前記保持部に、細胞または胚を入れるための凹部を備え、前記凹部を構成する壁面に、細胞または胚を通過させずにガラス化液を通過可能な貫通孔を備える。
（２）別の実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器において、さらに、前記凹部は、前記保持部の一つの面に開口し、当該一つの面の反対側の面から外方向に突出して形成されていても良い。
（３）別の実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器において、さらに、前記凹部は前記底部に十字帯を備え、前記貫通孔は前記底部と前記十字帯との隙間に形成されていても良い。
（４）別の実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器において、さらに、前記貫通孔を閉塞した状態の前記凹部の内容積が３０ｎＬ以下であっても良い。
（５）別の実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器において、さらに、前記保持部の前記凹部よりも先端側に、前記保持部に加わる衝撃を和らげるための衝撃緩和部を備えても良い。
（６）別の実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器において、さらに、一端側に把持部を備えても良い。
（７）別の実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器において、さらに、前記凹部の開口部を開閉自在な蓋部を備えても良い。
（８）一実施形態に係るキットは、上述の少なくともいずれか１つの液中操作型ガラス化凍結保存容器と、前記液中操作型ガラス化凍結保存容器に備えられる部分であって細胞または胚を保持するための保持部を少なくとも収容可能なチューブと、を含む。
（９）別の実施形態に係るキットにおいて、さらに、前記チューブは、使用前において、その密閉状態の内部を滅菌処理された状態にあり、前記保持部に細胞または胚を保持した前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を収容する際に、一方向を開封し、前記保持部の先端から前記チューブに前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を入れて、前記保持部を通過した所定位置にて密閉して使用されるものでも良い。
（１０）別の実施形態に係るキットにおいて、さらに、前記液中操作型ガラス化凍結保存容器は、その一端側に把持部を備え、前記チューブは、その内部に前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を入れて、前記把持部の長さの途中位置を前記所定位置として密閉可能であっても良い。
（１１）別の実施形態に係るキットにおいて、さらに、前記液中操作型ガラス化凍結保存容器は、前記保持部よりも径を拡張した拡径部を備え、前記チューブは、その内部に前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を入れて、前記拡径部を前記所定位置として密閉可能であっても良い。
（１２）別の実施形態に係るキットにおいて、さらに、前記チューブは、使用時に開封する位置を表示してなるものでも良い。
（１３）一実施形態に係る細胞または胚のガラス化保存方法は、ガラス化液中で上述のいずれかの液中操作型ガラス化凍結保存容器の凹部に細胞または胚を入れることを含む。
（１４）別の実施形態に係る細胞または胚のガラス化保存方法において、さらに、細胞または胚を含む前記ガラス化液中に上述のいずれかの液中操作型ガラス化凍結保存容器を挿入し、当該ガラス化液中で前記ガラス化凍結保存容器の凹部に細胞または胚を入れるようにしても良い。
（１５）別の実施形態に係る細胞または胚のガラス化保存方法において、さらに、細胞または胚を前記凹部に保持した前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を、ガラス化液から取り出し、直接、凍結剤中に投入し、又は一端が凍結剤中に沈められたチューブに投入することを含んでも良い。
（１６）別の実施形態に係る細胞または胚のガラス化保存方法において、さらに、細胞ま

たは胚を前記凹部に保持した前記液中操作型ガラス化凍結保存容器を前記ガラス化液から取り出した後、１～９０秒以内に、直接、凍結剤中に投入し、又は一端が凍結剤中に沈められたチューブに投入するようにしても良い。
（１７）別の実施形態に係る細胞または胚のガラス化保存方法において、さらに、一方向を開口したディッシュの内底面に、ディッシュの内容積の深さと同一若しくは該深さよりも低い高さを持つウェルを少なくとも３個配置し、１または２以上の第一ウェルに平衡液を入れ、１または２以上の第二ウェルにガラス化液を入れ、１または２以上の第三ウェルにガラス化液を入れると共に液中操作型ガラス化凍結保存容器の凹部をガラス化液中に浸漬させておき、細胞または胚を、第一ウェル、第二ウェル、第三ウェルの順に移動させ、第三ウェルにおいて凹部に細胞または胚を収納した状態で液中操作型ガラス化凍結保存容器を第三ウェルのガラス化液から引き上げ、細胞または卵子を凹部に収納した状態の液中操作型ガラス化凍結保存容器を凍結剤中に浸漬するようにしても良い。
【００１６】
本願において、「ガラス化凍結保存」、「ガラス化」あるいは「ガラス化凍結」は、細胞または胚の内部（外部も含んでも良い）の水分の氷晶化を低減し、細胞または胚の内部を非晶質状態で凍結させることをいう。
【００１７】
本願において、耐凍結剤（凍結抑制剤ともいう）を含む「ガラス化液」は、好ましくは、以下の手順で作製したものを用いることができる。まず、塩化ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム七水和物、１９種のアミノ酸、炭酸水素ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、ゲンタマイシン硫酸塩、ポリビニルアルコール、アラニル－Ｌ－グルタミン、エネルギー源としてＤ－グルコースＤＬ－乳酸ナトリウム等の乳酸塩、ピルビン酸ナトリウム等のピルビン酸塩を含む（４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）含有培地）を作製する。次に、当該基本培養液にエチレングリコール及びジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を、それぞれ、終濃度が１５％となるように加え、耐凍結剤の濃度が３０％のガラス化液を作製する。同様に、エチレングリコール及びジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を、それぞれ、終濃度が７．５％、６％、４．５％、又は、３％となるように加え、耐凍結剤の濃度が１５％、１２％、９％又は６％のガラス化液を作製しても良い。さらに、上記全てのガラス化液に、ショ糖、ポリビニルアルコール、フィコール及びヒアルロナンをそれぞれ終濃度が０．５Ｍ、０．１％、１％となるように加え、ガラス化液（耐凍結剤の濃度が３０％、１５％、１２％、９％および６％）としても良い。耐凍結剤には、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）あるいはエチレングリコール以外に、グリセロール、プロピレングリコール、ブタンジオール、ポリリジンなどから選択される１種または２種以上でも良い。ポリリジンとしては、例えば、ε－ポリ－Ｌ－リジン、ε－ポリ－Ｄ－リジン、α－ポリ－Ｌ－リジン、α－ポリ－Ｄ－リジンを例示できる。また、ポリリジンのアミノ基に結合する水素原子の少なくとも一部をカルボキシル基にて置換したもの、例えば、カルボキシル化ポリ－Ｌ－リジン（ＣＯＯＨ－ＰＬＬ）を用いることもできる。また、ガラス化液は、上記耐凍結剤に加えて、スクロース、グルコース、トレハロース、デキストラン、パーコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ヒアルロナン、フィブロネクチン、ポリビニルピロリドン、ウシ血清アルブミン、フィコール血清などから選択される１種または２種以上を含んでも良い。耐凍結剤は、それを含むガラス化液全体の質量に対して、好ましくは１～４０質量％、より好ましくは２～２０質量％、さらにより好ましくは３～９質量％の比率にて含まれる。
【００１８】
本願において凍結保存対象となる細胞は、ガラス化凍結保存可能なものであれば特に限定されないが、好ましくは、真核細胞であり、より好ましくは、哺乳類、昆虫等の動物細胞及び植物細胞であり、更に好ましくは、哺乳類細胞である。また、細胞または胚は、例えば、ヒト；　ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ等の家畜；　実験動物（マウス、ラット、ウサギ等）；　野生動物から好適に採取可能である。細胞としては、例えば、精子、卵母細胞

、羊膜間葉細胞、未受精卵細胞、受精卵細胞、胚細胞、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞、がん幹細胞、又は、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）等の未分化細胞；並びに、子宮内膜細胞等の内膜細胞、卵管上皮細胞、羊膜上皮細胞、胆管上皮細胞等の上皮細胞、繊維芽細胞、類洞内皮細胞、血管内皮細胞等の内皮細胞、肝細胞等の分化細胞を挙げることができ、好ましくは、未分化細胞であり、より好ましくは、精子、卵母細胞、羊膜間葉細胞、未受精卵細胞、受精卵細胞、胚細胞、又は、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）等の生殖系未分化細胞である。また、本願において凍結保存対象となる胚としては、前核期胚、初期胚、胚盤胞を例示できる。

【００１９】

本願において用いられる凍結剤（冷凍剤ともいう）は、細胞または胚をガラス化状態にて凍結できるものであれば特に限定されず、好ましくは、安全性の高い材料である。凍結剤としては、例えば、液体窒素、スラッシュ窒素（Ｓｌｕｓｈ　Ｎｉｔｒｏｇｅｎ）、液体ヘリウム、液体プロパン、エタンスラッシュを挙げることができ、好ましくは、液体窒素又はスラッシュ窒素である。スラッシュ窒素は、液体窒素を減圧下で保持することにより液体窒素温度を常圧の－１９６℃より低い－２０５～－２１０℃に下げた窒素を意味する（Ｈｕａｎｇら、Ｈｕｍａｎ　Ｒｅｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，Ｖｏｌ．２０，Ｎｏ．１，ｐｐ．１２２－１２８（２００５））。凍結剤としてスラッシュ窒素を用いる場合には、例えば、Ｖｉｔ－Ｍａｓｔｅｒ^{TM}（ＩＭＴ、Ｎｅｓ　Ｚｉｏｎａ、イスラエル）等の装置により、ガラス化凍結保存を行うことができる。

【発明の効果】

【００２０】

本発明によれば、細胞等に対するダメージを減らし、かつ作業効率を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】図１は、本発明の第一実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器の平面図（１Ａ）、側面図（１Ｂ）および斜視図（１Ｃ）をそれぞれ示す。

【図２】図２は、図１（１Ｃ）の一部Ａの拡大図（２Ａ）および当該一部Ａを裏返した状態Ａ’の拡大図（２Ｂ）をそれぞれ示す。

【図３】図３は、図２（２Ａ）に示す凹部に受精卵を入れた状態（３Ａ）および当該状態（３Ａ）において２つの凹部を含む領域のＣ－Ｃ線断面図（３Ｂ）をそれぞれ示す。

【図４】図４は、図１（１Ｃ）の一部Ｂの拡大図を示す。

【図５】図５は、図１のガラス化凍結保存容器と当該容器の薄板部を収容するチューブとを含むキットの斜視図を示す。

【図６】図６は、この実施形態に係るガラス化凍結保存容器を用いて受精卵をガラス化凍結保存する方法（液中操作型ガラス化凍結保存方法）を説明するための概略工程図を示す。

【図７】図７は、本発明の第二実施形態に係るガラス化凍結保存容器の平面図（７Ａ）、側面図（７Ｂ）、斜視図（７Ｃ）および当該（７Ｃ）中の一部Ｈの拡大図（７Ｄ）をそれぞれ示す。

【図８】図８は、図７のガラス化凍結保存容器と当該容器の薄板部を収容するチューブとを含むキットの斜視図を示す。

【図９】図９は、第三実施形態に係るガラス化凍結保存容器の凹部近傍を当該凹部の底部側から見た拡大斜視図（９Ａ）および当該凹部の図３（３Ｂ）と同様の断面図（９Ｂ）をそれぞれ示す。

【図１０】図１０は、第四実施形態に係るガラス化凍結保存容器の凹部近傍を当該凹部の開口面側から見た拡大斜視図（１０Ａ）、当該凹部の底部側から見た拡大斜視図（１０Ｂ）および当該凹部の図３（３Ｂ）と同様の断面図（１０Ｃ）をそれぞれ示す。

【図１１】図１１は、第五実施形態に係るガラス化凍結保存容器の凹部近傍を当該凹部の開口面側から見た拡大斜視図（１１Ａ）および当該凹部の図３（３Ｂ）と同様の断面図（

１１Ｂ）をそれぞれ示す。
【図１２】図１２は、ガラス化凍結保存処理を安定かつ迅速に行うために有益な専用ディッシュにガラス化凍結保存容器を保持した状態の斜視図（１２Ａ）および専用ディッシュの平面図（１２Ｂ）をそれぞれ示す。
【図１３】図１３は、ガラス化凍結保存処理を安定かつ迅速に行うために有益な専用ディッシュであって、図１２に示す専用ディッシュの変形例にガラス化凍結保存容器を保持した状態の斜視図（１３Ａ）および当該変形例に係る専用ディッシュの平面図（１３Ｂ）をそれぞれ示す。
【図１４】図１４は、クライオトップ法にて、細胞の一例としての卵子を凍結保存する典型的な手法を示す。（１４Ａ）は操作の全体像を、（１４Ｂ）は（１４Ａ）の一部Ｘにおける段階的な操作を、それぞれ示す。
【図１５】図１５は、本発明者が先に開発した凍結保存容器を用いた手法を示す。（１５Ａ）はその全体像を、（１５Ｂ）は（１５Ａ）中の一部Ｘの拡大図を、（１５Ｃ）は（１５Ｂ）のＹ－Ｙ線断面図を、それぞれ示す。
【符号の説明】
【００２２】
１，１ａ，１ｂ，１ｃ，１ｄ　　ガラス化凍結保存容器（液中操作型ガラス化凍結保存容器）
１２　　薄板部（保持部）
１３　　先端部（衝撃緩和部）
１５，１５ｂ，１５ｃ　　凹部
１７，６２　　把持部
２０　　十字帯
２１，７１　　貫通孔
２５　　受精卵（細胞または胚の一例）
２６，７２　　底部
３０，３０ａ　　チューブ
４０，４０ａ　　キット
４６　　ガラス化液
５１　　凍結剤（一例として液体窒素）
６０　　拡径部
８０　　蓋部
９０ａ，９０ｂ　　専用ディッシュ（ディッシュ）
９１　　第一ウェル（ウェルの１つ）
９２，９３　　第二ウェル（ウェルの一つ）
９４ａ，９４ｂ　　第三ウェル（ウェルの一つ）
【発明を実施するための形態】
【００２３】
次に、本発明の液中操作型ガラス化凍結保存容器、当該容器とそれを収容するためのチューブとを備えるキット、および液中操作型ガラス化凍結保存方法の各実施形態について、図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する各実施形態は、請求の範囲に係る発明を限定するものではなく、また、各実施形態の中で説明されている諸要素及びその組み合わせの全てが本発明の解決手段に必須であるとは限らない。
【００２４】
＜第一実施形態＞
図１は、本発明の第一実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器の平面図（１Ａ）、側面図（１Ｂ）および斜視図（１Ｃ）をそれぞれ示す。
【００２５】
第一実施形態に係る液中操作型ガラス化凍結保存容器（以後、実施の形態の説明において、単に、「ガラス化凍結保存容器」という）１は、一方向に長い形状を有する容器であ

る。ガラス化凍結保存容器１は、その長さ方向の一端に近い部位に、受精卵（細胞または胚の一例）を保持可能な構造を有する。なお、ガラス化凍結保存容器１は、受精卵以外の細胞または胚（細胞または胚を、以後、適宜、「細胞等」という）を保持しても良い。以下の実施形態では、主として、細胞等を代表して受精卵をガラス化凍結保存する例にて説明する。ガラス化凍結保存容器１は、受精卵を保持したままガラス化凍結保存するための器具である。図１（１Ａ）に示すように、ガラス化凍結保存容器１は、受精卵を保持する部位に近い側から、ガラス化凍結保存容器１を把持する側に向かって順に、先端部１３、薄板部１２、接続部１１、グリップ本体１０、把持部１７を連接して構成されている。

【００２６】

グリップ本体１０は、好ましくは、ガラス化凍結保存容器１の内で最も大径に構成される部位であり、術者がガラス化凍結保存容器１を支持するための主要支持部である。グリップ本体１０は、この実施形態では、六角形の断面を有するので、滑りにくい構成となっている。なお、グリップ本体１０の断面形状は、六角形に限定されず、三角形、四角形、五角形あるいは七角以上の多角形の他、円形でも良い。グリップ本体１０の長さ（Ｌ１）は、特に制約されるものではないが、好ましくは１０～２００ｍｍ、より好ましくは４０～１２０ｍｍ、さらにより好ましくは６０～１００ｍｍの範囲内である。また、グリップ本体１０の幅（または高さ）は、術者が支持しやすい大きさであれば特に制約されず、好ましくは１～５ｍｍ、より好ましくは１．５～２．５ｍｍの範囲内である。

【００２７】

接続部１１は、薄板部１２からグリップ本体１０に向かって徐々に径を大きくする略円錐台形状の部位である。接続部１１は、薄板部１２とグリップ本体１０とを接続する役割を有する。接続部１１の長さ（Ｌ２）は、特に制約されるものではないが、好ましくは０．５～５ｍｍ、より好ましくは１～３ｍｍ、さらにより好ましくは１．５～２．５ｍｍの範囲内である。また、接続部１１のグリップ本体１０側の直径は、グリップ本体１０の幅（または高さ）より小さく、かつ好ましくは０．８～４ｍｍ、より好ましくは１．２～２ｍｍの範囲内である。また、接続部１１の薄板部１２側の直径は、グリップ本体１０側の直径より小さく、好ましくは０．４～２ｍｍ、より好ましくは０．８～１．４ｍｍの範囲内である。

【００２８】

薄板部１２は、ガラス化凍結保存容器１の長さ方向の好ましくは一端側近傍にあって、受精卵を保持するための保持部に相当する部位である。薄板部１２は、好ましくは、接続部１１の最小直径より小さな厚さを持つ扁平体である。薄板部１２の先端部１３に近い部位には、薄板部１２の長さ方向に沿って、受精卵を入れるための２つの凹部１５を備える。ただし、凹部１５は、１つのみ、あるいは３つ以上でも良い。また、凹部１５を薄板部１２の幅方向に並んで形成しても良い。凹部１５は、好ましくは、薄板部１２の一方の板面に開口し、その開口から板厚を超える深さを持つ。すなわち、凹部１５は、薄板部１２の一つの面に開口し、当該一つの面の反対側の面から外方向に突出して形成されている。

【００２９】

薄板部１２の長さ（Ｌ３）は、特に制約されるものではないが、好ましくは３～５０ｍｍ、より好ましくは１０～３０ｍｍ、さらにより好ましくは１５～２５ｍｍの範囲内である。また、薄板部１２の幅は、好ましくは０．１～２ｍｍ、より好ましくは０．３～１．５ｍｍ、さらにより好ましくは０．５～１ｍｍの範囲内である。薄板部１２の厚さ（Ｔ１）は、好ましくは０．０２～１ｍｍ、より好ましくは０．０５～０．３ｍｍ、さらにより好ましくは０．０７～０．１２ｍｍの範囲内である。薄板部１２の長さ（Ｌ３）と厚さ（Ｔ１）とは、薄板部１２の構成材料をも考慮して、十分に撓みやすい組み合わせとするのが好ましい。可撓性に富む大きさに設計するのは、受精卵を含むガラス化液を入れたシャーレ等の浅い容器に、ガラス化凍結保存容器１の凹部１５を漬けたときに、薄板部１２を撓ませて水平に近い状態にした方が、凹部１５に受精卵を入れやすいからである。凹部１５の深さは、好ましくは０．０６～３ｍｍ、より好ましくは０．１～０．８ｍｍ、さらにより好ましくは０．１５～０．５ｍｍの範囲内である。凹部１５の深さは、保持対象であ

る受精卵等の大きさを考慮して、受精卵等を保持しやすく、解凍後に取り出しやすい大きさとするのが好ましい。

【００３０】

２つの凹部１５の距離（開口部の中心間距離： Ｌ６）は、薄板部１２の長さに２つの凹部１５が収まる限り、特に制約されないが、好ましくは０．４～２ｍｍ、より好ましくは０．８～１．４ｍｍの範囲内である。距離Ｌ６は、好ましくは、薄板部１２をシャーレ等に入れて撓ませた際に、ガラス化液中に２つの凹部１５が潰かった状態にできるのに十分小さい距離であって、かつ製造若しくは使用において凹部１５同士が連通せずに独立した形態を維持可能な距離である。凹部１５の外径（Ｌ７）は、１個の受精卵を収納可能な大きさであって、隣り合う凹部１５と重ならない大きさであれば良く、好ましくは０．３～２ｍｍ、より好ましくは０．４～１．５ｍｍ、さらにより好ましくは０．５～１ｍｍの範囲内である。

【００３１】

先端部１３は、薄板部１２における凹部１５よりも先端側にあって、その先端側から薄板部１２に加わる衝撃を和らげるための衝撃緩和部に相当する部位である。先端部１３は、その厚さ方向に貫通する貫通孔１４を備えた略環状の板である。この実施形態では、貫通孔１４の形状は、ハート形状であるが、ハート以外の形状でも良い。また、貫通孔１４に代えて、２本の弧状の板状体から構成される開口部位を採用しても良い。また、先端部１３は、ハニカム構造の部位でも良い。

【００３２】

先端部１３の長さ（Ｌ４）は、凹部１５への受精卵の収納時に邪魔にならず、かつ凍結保存時に凹部１５内の受精卵に与える衝撃を和らげるのに十分な長さであれば特に制約されるものではないが、好ましくは０．５～５ｍｍ、より好ましくは０．７～３ｍｍ、さらにより好ましくは１～２ｍｍの範囲内である。先端部１３の幅は、好ましくは０．５～５ｍｍ、より好ましくは０．７～３ｍｍ、さらにより好ましくは１～２ｍｍの範囲内である。この実施形態では、先端部１３の幅は、薄板部１２の幅よりも大きい。先端部１３の厚さは、好ましくは０．０２～１ｍｍ、より好ましくは０．０５～０．３ｍｍ、さらにより好ましくは０．０７～０．１２ｍｍの範囲内である。この実施形態では、先端部１３の厚さは、薄板部１２の厚さと略同一である。

【００３３】

把持部１７は、ガラス化凍結保存容器１の操作時に常に把持する部分ではなく、液体窒素中等の凍結剤中に入れた後述のチューブ内に、ガラス化凍結保存容器１を挿入する際に把持する部位である。把持部１７は、ガラス化凍結保存容器１の一端側にある先端部１３と反対側に位置する端部に形成されている。把持部１７は、グリップ本体１０より小さな厚さを持つ扁平体である。把持部１７は、好ましくは、グリップ体１０側に底面を向けた円錐部１６を介して、グリップ体１０に固定されている。円錐部１６は、グリップ体１０から把持部１７への急激な厚みの変化を緩和することにより、製造を容易にし、かつ使用時に把持部１７がその根元から折れるのを防止するのに寄与する。

【００３４】

把持部１７の長さ（Ｌ５）は、特に制約されるものではないが、好ましくは５～９０ｍｍ、より好ましくは１０～６０ｍｍ、さらにより好ましくは２０～４０ｍｍの範囲内である。また、把持部１７の幅は、好ましくは０．５～５ｍｍ、より好ましくは０．７～３ｍｍ、さらにより好ましくは１～２ｍｍの範囲内である。把持部１７の厚さ（Ｔ３）は、好ましくは０．０２～１ｍｍ、より好ましくは０．０５～０．３ｍｍ、さらにより好ましくは０．０７～０．１２ｍｍの範囲内である。この実施形態では、把持部１７は、薄板部１２と同一の厚さを有する。

【００３５】

図２は、図１（１Ｃ）の一部Ａの拡大図（２Ａ）および当該一部Ａを裏返した状態Ａ’の拡大図（２Ｂ）をそれぞれ示す。図３は、図２（２Ａ）に示す凹部に受精卵を入れた状態（３Ａ）および当該状態（３Ａ）において２つの凹部を含む領域のＣ－Ｃ線断面図（３

Ｂ）をそれぞれ示す。

【００３６】

凹部１５は、薄板部１２における開口部側から見ると、直径Ｄ１の円筒状の穴である。直径Ｄ１は、受精卵２５を容易に収納可能であって、より好ましくは径方向に並んでたくさんの受精卵２５が入らない程度の大きさであるのが好ましい。受精卵２５は、おおよそ０．１ｍｍであることを考慮すると、凹部１５の直径Ｄ１は、好ましくは０．１５～０．６ｍｍ、より好ましくは０．２～０．４ｍｍの範囲である。ただし、直径Ｄ１は、凹部１５に入れる対象となる細胞等の大きさによって適宜変更可能である。直径Ｄ１は、先に説明した外径Ｌ７よりも小さい。すなわち、凹部１５は、直径Ｄ１の方向に十分に厚い側壁２２を有する。側壁２２の最も好適なサイズは、凹部１５の直径Ｄ１を０．２５ｍｍ、外径Ｌ７を０．７ｍｍとしたときに、０．２２５ｍｍとなる。側壁２２を厚くすると、金型にてガラス化凍結保存容器１を成形する際に、凹部１５の形状を設計通りに保持しやすい。すなわち、凹部１５が潰れあるいは変形する確率を低減できる。

【００３７】

凹部１５は、この実施形態では、略カップ形状を有し、その底部２６に、細胞または胚を通過させずにガラス化液を通過可能な開口面積を有する４つの貫通孔２１を備える。より具体的には、凹部１５は、その底部２６に十字帯２０を備える。貫通孔２１は、底部２６と十字帯２０との隙間に形成されている。貫通孔２１は、受精卵２５を通さずに、ガラス化液を通すことのできる大きさであれば、特に制約されない。この実施形態では、扇形の貫通孔２１の直線部分の長さは、好ましくは０．０１～０．１ｍｍ、より好ましくは０．０２～０．０７ｍｍである。凹部１５の底部２６に形成される十字帯２０は、受精卵２５を落下させずに凹部１５内に保持し、余分なガラス化液を凹部１５の底部２６から外に排出する機能を有する。十字帯２０の帯幅は、例えば０．１ｍｍである。凹部１５は、好ましくは、貫通孔２１を閉塞した状態にて３０ｎＬ以下の内容積を有する。一例を挙げると、この実施形態において、凹部１５の内径（上記の直径Ｄ１）を０．２５ｍｍ、凹部１５の深さを０．２ｍｍとすると、凹部１５の内容積は約１０ｎＬとなる。なお、凹部１５の内容積は、貫通孔２１等を仮想的に閉塞した状態の内容積を意味する。他の実施形態でも同様である。

【００３８】

図４は、図１（１Ｃ）の一部Ｂの拡大図を示す。

【００３９】

把持部１７は、その一部を円錐部１６の先端側に埋設した形態で、円錐部１６に固定されている。把持部１７は、円錐部１６と別体で、円錐部１６に接着若しくは嵌め込まれていても良いが、好ましくは円錐部１６と一体で形成される。前述のように、液体窒素中等の凍結剤中に入れたチューブ内にガラス化凍結保存容器１を挿入する際に、把持部１７は、術者が把持する部位となる。これに加えて、この実施形態では、把持部１７は、その長さ方向の途中までガラス化凍結保存容器１をチューブに挿入した状態でチューブを閉鎖する部位となる。この詳細については、後述する。

【００４０】

ガラス化凍結保存容器１は、ポリアミド；　ポリイミド；　環状オレフィンコポリマー；　ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン－プロピレン共重合体、エチレン－酢酸ビニル共重合体等のポリオレフィン；　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、ポリエチレンナフタレート、ポリブチレンナフタレート等のポリエステル；　ポリスチレン、メタクリレート－スチレン共重合体等のポリスチレンに代表される合成樹脂にて好適に形成される。ガラス化凍結保存容器１の材料としては、特に、極めて低い温度環境下で使用可能な環状オレフィンコポリマーあるいはポリアミドを挙げることができる。また、ガラス化凍結保存容器１は、上記樹脂以外に、例えば、アルミニウム、アルミニウム合金、ステンレススチール等の金属；　酸化アルミニウム、窒化珪素等のセラミックス；　あるいはガラスにて製造しても良い。ガラス化凍結保存容器１は、金型内に樹脂等を射出して成形する射出成形にて好適に製造できる。また、射出成型の際に、金型の内

部から外部に通じる通気口を通じて減圧しながら溶融樹脂を金型内に供給するようにしても良い。射出成形とは別の製造方法として、軟化した樹脂を金型に入れて成形する真空成形あるいは圧空成形にてガラス化凍結保存容器１を製造しても良い。また、ガラス化凍結保存容器１は、３Ｄプリンタを用いて製造しても良い。

【００４１】

図５は、図１のガラス化凍結保存容器と当該容器の薄板部を収容するチューブとを含むキットの斜視図を示す。

【００４２】

この実施形態に係るキット４０は、先に説明したガラス化凍結保存容器１と、それを収容するためのチューブ３０と、を備える。チューブ３０は、使用時に、ガラス化凍結保存容器１において細胞等を保持するための薄板部１２を少なくとも収容可能である。チューブ３０は、キット４０において、その少なくとも内部３３を滅菌処理して、チューブ３０の長さ方向端部３１，３２をシールした状態の袋体である。チューブ３０を使用する際には、チューブ３０は、その一方の端部３２の所定位置Ｄにあるライン３４から端部を切り取られ、端部３２側が開口される。すなわち、チューブ３０は、使用時に開封する位置（ライン３４）を表示してなる。開口されたチューブ３０は、開口側を外に出した状態で、液体窒素等に代表される凍結剤中に入れられる。

【００４３】

一方、術者は、受精卵２５を含むガラス化液を入れたシャーレにガラス化凍結保存容器１の凹部１５を漬けて保持し、ピペット等を用いて受精卵２５を含むガラス化液を吸引し、ガラス化液内の凹部１５に向けてピペット等から受精卵２５を吐出する。ガラス化凍結保存容器１をシャーレ内のガラス化液から引き上げる際、余分のガラス化液は、凹部１５の底部２６にある貫通孔２１から落ち、受精卵２５とわずかなガラス化液だけが凹部１５内に残る。その後、術者は、ガラス化凍結保存容器１を、先端部１３側から、凍結剤中のチューブ３０にすばやく入れる。その後、チューブ３０の開口部を、把持部１７の長さ方向所定位置に固定する。当該開口部を把持部１７に固定する方法は、公知の如何なる固定方法でも良い。固定方法としては、熱融着を利用した固定、接着剤による固定などを例示できる。チューブ３０を開けてガラス化凍結保存容器１を取り出す際には、チューブ３０の所定位置Ｅのライン３５の位置でチューブ３０を開封する。なお、ライン３５は、把持部１７とチューブ３０の開口部との固定位置よりも端部３１方向にある。ここで、ライン３４，３５は、いずれも視認可能にチューブ３０の表面に印刷されているのが好ましいが、必ずしも視認可能であることを要しない。また、印刷以外の方法、例えば、エンボス加工等にてライン３４，３５を形成しても良い。さらには、所定位置Ｄ，Ｅは、ライン３４，３５以外の方法、例えば、矢印などで示されていても良い。

【００４４】

チューブ３０は、ポリアミド；　ポリイミド；　環状オレフィンコポリマー；　ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン－プロピレン共重合体、エチレン－酢酸ビニル共重合体等のポリオレフィン；　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、ポリエチレンナフタレート、ポリブチレンナフタレート等のポリエステル；　ポリスチレン、メタクリレート－スチレン共重合体等のポリスチレンに代表される合成樹脂にて好適に形成される。チューブ３０の材料としては、特に、極めて低い温度環境下で使用可能な環状オレフィンコポリマーあるいはポリアミドを挙げることができる。また、チューブ３０は、上記樹脂以外に、例えば、シリコーンゴム等のゴム状弾性体；　アルミニウム、アルミニウム合金、ステンレススチール等の金属；　酸化アルミニウム、窒化珪素等のセラミックス；　あるいはガラスにて製造されても良い。

【００４５】

以上のように、チューブ３０は、使用前において、その密閉状態の内部を滅菌処理された状態にあり、薄板部１２に受精卵２５を保持したガラス化凍結保存容器１を被覆する際に、一方向にある端部３２を開封し、薄板部１２の先端（この実施形態では、先端部１３）からチューブ３０にガラス化凍結保存容器１を入れて、薄板部１２を通過した所定位置

にて密閉して使用される。この実施形態において、チューブ３０は、その内部にガラス化凍結保存容器１を入れて、把持部１７の長さの途中位置を前記所定位置として密閉可能である。

【００４６】

図６は、この実施形態に係るガラス化凍結保存容器を用いて受精卵をガラス化凍結保存する方法（液中操作型ガラス化凍結保存方法）を説明するための概略工程図を示す。なお、以後、実施の形態において、液中操作型ガラス化凍結保存方法を、単に、「ガラス化凍結保存方法」という。

【００４７】

（１）凍結保護物質の平衡

まず、平衡液に受精卵を入れる。平衡液としては、例えば、耐凍結剤を含む液（耐凍結剤の濃度：　５～１５％ｖ／ｖ）を用いることができる。平衡液としては、先に例示したガラス化液よりも耐凍結剤の濃度が低い液を使用するのが好ましい。そのような平衡液の一例としては、塩化ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム七水和物、１９種のアミノ酸、炭酸水素ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、ゲンタマイシン硫酸塩、ポリビニルアルコール、アラニル－Ｌ－グルタミン、エネルギー源としてＤ－グルコースＤＬ－乳酸ナトリウム等の乳酸塩、ピルビン酸ナトリウム等のピルビン酸塩を含むＨＥＰＥＳ含有培地に、低分子で細胞内に浸透し凍結保護作用を示すエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール及びジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を、それぞれ、終濃度がガラス化液の５０％ｖ／ｖに調製した液を挙げることができる。この結果、受精卵２５に悪影響のない濃度の耐凍結剤が受精卵２５の内部に浸透する。なお、耐凍結剤としては、細胞等に対して毒性等が懸念されるＤＭＳＯを含まないもの、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール等を単独あるいは混合して用いても良い。

【００４８】

（２）受精卵へのガラス化液の浸透

次に、ガラス化液４６を用意し、前工程の受精卵２５を、シャーレ４５内のガラス化液４６に移す。ガラス化液４６は、上記平衡液に比べて、耐凍結剤の濃度が高い液（例えば、濃度：　１５～３０％ｖ／ｖ）である。この結果、受精卵２５の内外の平衡液とガラス化液４６との浸透圧差が生じ、受精卵２５内部の自由水あるいは結合水（以後、「自由水等」という）の脱水が生じる。こうして、受精卵２５内において自由水等と耐凍結剤との置換が行われ、受精卵２５内部に高濃度の耐凍結剤が存在するようになる。なお、受精卵２５の内部の自由水等をガラス化液４６に置換させるステップは、耐凍結剤の濃度を徐々に変化させるように、２段階以上（例えば、３段階）としても良い。なお、ガラス化液４６中の耐凍結剤の濃度は、上記濃度の範囲に限定されるものではなく、急速冷却に際してガラス化液４６をアモルファス状に固化できる濃度であり、かつ受精卵２５に著しく悪影響を与えないような濃度であれば良い。なお、ガラス化に必須の耐凍結剤の総添加濃度は、冷却速度に依存し、冷却速度はガラス化時の体積により決まる。このため、可能な限り少ないガラス化液と共に保存できる凍結保存容器を用いるのが好ましい。

【００４９】

（３）ガラス化凍結保存容器への受精卵の収納

次に、図６に示すように、シャーレ４５のガラス化液４６内に、ガラス化凍結保存容器１の先端部１３から薄板部１２の途中まで浸す。この結果、２つの凹部１５は、完全に、ガラス化液４６の液面より下方に位置する。一方、もう一方の手を使って、ピペット４７内に受精卵２５を含むガラス化液４６を吸引し、ピペット４７の先端を凹部１５に近づけ、凹部１５内に受精卵２５を吐出する（図６中の一部Ｆの拡大図を参照）。この操作は、凹部１５の数だけ繰り返される。薄板部１２は、可撓性に富む材料あるいは形態である。このため、凹部１５をガラス化液４６の液面に略平行となるようにして、受精卵２５を凹部１５に入れやすくできる。

【００５０】

この実施形態のガラス化凍結保存容器１の長所の一つは、受精卵２５を、空気に触れさせずに、ガラス化液４６の中でガラス化凍結保存容器１に保持可能なことである。当該長所は、薄板部１２に、板厚方向に貫通する貫通孔を形成してガラス化液４６の表面張力を利用して受精卵２５を保持する技術、および薄板部１２に相当するシートにガラス化液４６を吸収させる層を形成してその層の表面にて受精卵２５を保持する技術では得られない。このように、ガラス化凍結保存の処理において、ガラス化液４６中の受精卵２５が空気に触れる時間をできるだけ短くできることは、受精卵２５の乾燥を防ぎ、もって、受精卵２５に対するｐＨ、温度あるいは浸透圧の各変化を低く抑えることにつながる。この結果、受精卵２５の生存率を向上させることができる。

【００５１】

（４）超急速冷却

凍結剤５１の一例である液体窒素を入れた容器５０を用意し、凍結剤５１中に、チューブ３０を漬ける。このとき、チューブ３０は、開口部を凍結剤５１よりも上方に位置するように維持される。次に、受精卵２５を入れたガラス化凍結保存容器１を、ガラス化液４６から取り出し、一端側を凍結剤５１中に沈められたチューブ３０に投入する。このとき、ガラス化凍結保存容器１は、ガラス化液４６から取り出した後、１～９０秒以内、より好ましくは１～６０秒以内、さらにより好ましくは１～３０秒以内に、直接、凍結剤５１中のチューブ３０に投入されるのが好ましい。液体窒素を凍結剤５１に用いた場合には、凹部１５内の受精卵２５は、約－１９６℃の極低温にて急速に凍結する。

【００５２】

ガラス化凍結保存容器１の別の長所は、ガラス化凍結保存容器１に受精卵２５を容易に保持でき、その技術に熟練を要しないことである。空気中で受精卵２５を従来型のガラス化凍結保存容器に保持する場合、受精卵２５を正常に保持できずに、あるいは正常に保持した後に落下して、何度も保持操作のやり直しが生じていた。しかし、この実施形態に係るガラス化凍結保存容器１を用いて受精卵２５を保持する場合、凹部１５に受精卵２５を収納するだけで良く、保持操作のやり直しがほとんど生じない。また、このような簡易な操作は、熟練者養成の軽減につながることから、ガラス化凍結保存の低コスト化につながる。

【００５３】

また、この実施形態に係るガラス化凍結保存容器１は、直接、凍結剤５１中に投入可能であるが、より好ましくは凍結剤５１中に斜めに立てておいたチューブ３０に入れられる。ガラス化凍結保存容器１と凍結剤５１とを接触させないことにより、凹部１５から受精卵２５が脱落するリスクを減らすことができる。受精卵２５を保持したガラス化凍結保存容器１をチューブ３０に入れて、その後、凍結剤５１中に投入することも可能である。しかし、その場合には、受精卵２５の凍結速度が低下しやすい。この実施形態では、予め、凍結剤５１中に例えばアルミニウム製のコンテナを入れ、当該コンテナにチューブ３０を配置し、極低温に維持させておく。これにより、チューブ３０内の空気の温度が凍結剤５１とほぼ同じ温度となる。その後、受精卵２５を保持したガラス化凍結保存容器１をチューブ３０内に入れるだけの操作で凍結保存を完了できる。このような操作によって受精卵２５を急速に凍結させることができる。さらに、チューブ３０を、その使用前に、滅菌処理を行い密封状態としている。このため、無菌環境下で受精卵２５を凍結保存できる。また、術者は、把持部１７を持ちながら、ガラス化凍結保存容器１の先端部１３がチューブ３０の開口部と反対側の端部３１に到達するまで、ガラス化凍結保存容器１をチューブ３０内にゆっくり挿入できる。このため、受精卵２５の脱落リスクをより低減できる。

【００５４】

（５）チューブの封鎖

次に、チューブ３０の開口部若しくはその近傍の所定位置Ｄを、把持部１７の長さの任意の位置にて封鎖する（図６中の一部Ｇの拡大図を参照）。ガラス化凍結保存容器１は、仮に、チューブ３０内に勢いよく投入されたとしても、先端部１３が衝撃緩和部として機能するため、受精卵２５が凹部１５から落下し、あるいは受精卵２５に悪影響が生じる危

険性が低い。なお、先端部１３をチューブ３０の開口部と反対側の端部３１に接触させないように、チューブ３０の所定位置Ｄと把持部１７とを固定しても良い。これにより、受精卵２５の脱落リスクや、受精卵２５に悪影響を与えるリスクを、さらに低減できる。

【００５５】

（６）その後の処理

ガラス化凍結保存容器１に、微小ＩＣタグ（例えば、ＳＫエレクトロニクス社製）をプリントラベルシール（例えば、Ｂｒａｄｙ社）と共に貼り付けるのが好ましい。微小ＩＣタグとプリントラベルシールの貼り付けによって、ガラス化凍結保存容器１の管理が正確かつ容易となる。また、凍結状態にあるガラス化凍結保存容器１をチューブ３０から取り外す際には、ストローカッター等を用いてチューブ３０の所定位置Ｅ（図６中の拡大図Ｇを参照）をカットし、把持部１７を持ってガラス化凍結保存容器１をチューブ３０から引き上げる。この操作によって、ガラス化凍結保存容器１をチューブ３０から安全に取り出すことができる。

【００５６】

＜第二実施形態＞

次に、本発明の第二実施形態について説明する。第二実施形態において、第一実施形態と共通する部分については、構造物に関しては同じ符号および／または名称を付し、重複した説明を省略する。第二実施形態において説明していない部分については、第一実施形態に記載された内容を代用する。

【００５７】

図７は、本発明の第二実施形態に係るガラス化凍結保存容器の平面図（７Ａ）、側面図（７Ｂ）、斜視図（７Ｃ）および当該（７Ｃ）中の一部Ｈの拡大図（７Ｄ）をそれぞれ示す。

【００５８】

第二実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ａは、一方向に長い形状を有する容器である。ガラス化凍結保存容器１ａは、好ましくは、その長さ方向の一端に近い部位に、受精卵（細胞または胚の一例）を保持可能な構造を有する。図７（７Ａ）に示すように、ガラス化凍結保存容器１ａは、受精卵２５を保持する部位に近い一端側から、ガラス化凍結保存容器１ａを把持する他端側に向かって順に、先端部１３、薄板部１２、接続部１１、グリップ本体１０、拡径部６０、鍔部６１、把持部６２を連接して構成されている。先端部１３、薄板部１２および接続部１１は、第一実施形態と共通するので、それらの説明を省略する。

【００５９】

グリップ本体１０は、術者がガラス化凍結保存容器１ａを支持するための主要支持部である。グリップ本体１０は、この実施形態では、四角形の断面を有するので、滑りにくい構成となっている。なお、グリップ本体１０の断面形状は、四角形に限定されず、三角形あるいは五角以上の多角形の他、円形でも良い。グリップ本体１０の長さ（Ｌ８）は、特に制約されるものではないが、好ましくは１０～２００ｍｍ、より好ましくは２０～１００ｍｍ、さらにより好ましくは３５～６０ｍｍの範囲内である。また、グリップ本体１０の幅（または高さ）は、術者が支持しやすい大きさであれば特に制約されず、好ましくは１～５ｍｍ、より好ましくは１．５～２．５ｍｍの範囲内である。

【００６０】

拡径部６０は、把持部６２に近い側にあって、薄板部１２よりも太い。拡径部６０は、好ましくは、グリップ本体１０から鍔部６１に向かって徐々に径を大きくする略円錐台形状の部位である。拡径部６０は、グリップ本体１０と鍔部６１とを接続する役割を有すると共に、後述するチューブを固定する役割をも有する。拡径部６０の長さ（Ｌ９）は、特に制約されるものではないが、好ましくは１～３０ｍｍ、より好ましくは２～１５ｍｍ、さらにより好ましくは４～１０ｍｍの範囲内である。また、拡径部６０のグリップ本体１０側の直径は、グリップ本体１０の幅（または高さ）より小さいか若しくは同一であるのが好ましく、より具体的には、好ましくは０．７～５ｍｍ、より好ましくは１～２．５ｍ

mの範囲内である。また、拡径部６０の鍔部６１側の直径（Ｌ１２）は、鍔部６１の幅（または高さ）より小さいか若しくは同一であるのが好ましく、より具体的には、好ましくは１～６mm、より好ましくは２～４mmの範囲内である。

【００６１】

鍔部６１は、拡径部６０の鍔部６１側の直径（Ｌ１２）より大きな幅（または高さ：Ｌ１３）を有する。鍔部６１は、後述するチューブを把持部６２側に進むのを防止するストッパーとして機能する部位である。したがって、鍔部６１は、好ましくは、チューブの開口部より大きい。鍔部６１の幅（または高さ： Ｌ１３）は、好ましくは、好ましくは１．５～１０mm、より好ましくは２～６mmの範囲内である。鍔部６１の厚さ（Ｌ１０）は、好ましくは、０．７～５mm、より好ましくは１～３mmの範囲内である。

【００６２】

把持部６２は、ガラス化凍結保存容器１ａの操作時に常に把持しても良いが、通常、液体窒素等の凍結剤５１中に予め入れてある後述のチューブ内に、ガラス化凍結保存容器１ａを挿入する際に把持する部位である。把持部６２は、ガラス化凍結保存容器１ａの先端部１３と反対側に位置する。把持部６２の長さ（Ｌ１１）は、特に制約されるものではないが、好ましくは５～９０mm、より好ましくは１０～６０mm、さらにより好ましくは２０～４０mmの範囲内である。また、把持部６２の幅は、特に制約されないが、好ましくは、グリップ本体１０の幅とほぼ同じ大きさである。把持部６２の幅は、好ましくは０．５～５mm、より好ましくは０．７～４mm、さらにより好ましくは１～３mmの範囲内である。

【００６３】

ガラス化凍結保存容器１ａは、第一実施形態に係るガラス化凍結保存容器１と同様の合成樹脂、金属、セラミックスあるいはガラスにて好適に構成される。また、ガラス化凍結保存容器１ａは、第一実施形態に係るガラス化凍結保存容器１と同様、射出成形、真空成形、圧空成形あるいは３Ｄプリンタを用いた製造法によって好適に製造できる。

【００６４】

図８は、図７のガラス化凍結保存容器と当該容器の薄板部を収容するチューブとを含むキットの斜視図を示す。

【００６５】

この実施形態に係るキット４０ａは、先に説明したガラス化凍結保存容器１ａと、それを収容するためのチューブ３０ａとを備える。チューブ３０ａは、使用時に、ガラス化凍結保存容器１ａの薄板部１２を少なくとも収容可能である。チューブ３０ａは、キット４０ａにおいて、その少なくとも内部３３ａを滅菌処理して、チューブ３０ａの長さ方向端部３１ａ，３２ａをシールした状態の袋体である。チューブ３０ａを使用する際には、チューブ３０ａは、その一方の端部３２ａに近い所定位置Ｉにあるライン３４ａから端部を切り取られ、端部３２ａ側が開口される。チューブ３０ａは、この実施形態では、使用時に開封する位置（ライン３４ａ）を表示してなる。開口されたチューブ３０ａは、開口側を外に出した状態で、液体窒素等の凍結剤５１中に入れられる。

【００６６】

術者は、受精卵２５を凹部１５に保持した状態のガラス化凍結保存容器１を、先端部１３側から、凍結剤５１中に立てられたチューブ３０ａにすばやく入れる。その後、術者は、チューブ３０ａの開口部を拡径部６０の長さ方向の所定位置に固定する。この結果、鍔部６１より先端部１３側は、チューブ３０ａ内に密封される。チューブ３０ａからガラス化凍結保存容器１を取り出す際には、術者は、把持部６２を持って、チューブ３０ａからガラス化凍結保存容器１を引き抜けば良い。ライン３４ａは、視認可能にチューブ３０ａの表面に印刷されているのが好ましいが、必ずしも視認可能であることを要しない。また、印刷以外の方法、例えば、エンボス加工等にてライン３４ａを形成しても良い。さらに、所定位置Ｉは、ライン３４ａ以外の方法、例えば、矢印などで示されても良い。チューブ３０ａは、第一実施形態と同様の合成樹脂、ゴム状弾性体、金属、セラミックスあるいはガラスなどから製造可能である。

【００６７】
このように、チューブ３０ａは、その内部にガラス化凍結保存容器１ａを収容して、薄板部１２を通過した所定位置となる拡径部６０にて固定可能である。この実施形態では、チューブ３０ａは、使用時に開封する位置（所定位置Ｉ）を表示して成る。このため、開封位置を、チューブ３０ａが拡径部６０にて固定される位置になるように設計することにより、ガラス化凍結保存容器１ａの拡径部６０から先端部１３の部位を、チューブ３０ａ内に確実に収容できる。
【００６８】
この実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ａを用いて受精卵２５をガラス化凍結保存する方法の大部分は、第一実施形態における同方法と共通するので、異なる部分のみを以下に説明する。
【００６９】
第一実施形態におけるガラス化凍結保存方法の（１）凍結保護物質の平衡、（２）受精卵へのガラス化液の浸透、（３）ガラス化凍結保存容器への受精卵の収納および（４）超急速冷却の各ステップは、第二実施形態でも共通する。
【００７０】
（５）チューブの封鎖
チューブ３０ａの開口部（所定位置Ｉ）を、拡径部６０の長さの途中位置若しくは鍔部６１に接触する位置まで引き上げる。この結果、凍結剤中に配置されたチューブ３０ａへのガラス化凍結保存容器１ａの装着が完了する。
【００７１】
（６）その後の処理
ガラス化凍結保存容器１ａは、第一実施形態に係るガラス化凍結保存容器１と同様、微小ＩＣタグおよびプリントラベルシールを貼り付けて保存するのが好ましい。凍結状態にあるガラス化凍結保存容器１ａをチューブ３０ａから取り外す際には、ストローカッター等を用いることなく、チューブ３０ａを拡径部６０から先端部１３の方向に引き抜くだけで良い。
【００７２】
＜第三～第五実施形態＞
次に、本発明の第三～第五実施形態について説明する。第三～第五実施形態において、先に説明した各実施形態と共通する部分については、構造物に関しては同じ符号および／または名称を付し、重複した説明を省略する。第三～第五実施形態において説明していない部分については、先に説明した各実施形態に記載された内容を代用する。
【００７３】
図９は、第三実施形態に係るガラス化凍結保存容器の凹部近傍を当該凹部の底部側から見た拡大斜視図（９Ａ）および当該凹部の図３（３Ｂ）と同様の断面図（９Ｂ）をそれぞれ示す。
【００７４】
第三実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ｂは、第一実施形態に係るガラス化凍結保存容器１と異なる形態の凹部１５ｂを備え、かつ先端部１３に相当する衝撃緩和部を備えていない。これら２点以外の構成は、ガラス化凍結保存容器１と共通する。
【００７５】
凹部１５ｂの形状は、薄板部１２の厚さ方向片側に突出する略カップ形状である。凹部１５ｂは、その底部に、複数個（この実施形態では７個）の貫通孔７１を備える。貫通孔７１は、好ましくは円形であるが、多角形でも良い。貫通孔７１は、受精卵２５を通さずに、ガラス化液４６を通すことのできる大きさであれば、特に制約されない。この実施形態では、貫通孔７１の径は、好ましくは０．０１～０．０８ｍｍ、より好ましくは０．０３～０．０６ｍｍである。また、凹部１５ｂの側壁２２は、第一実施形態のそれに比べて過度に厚くはない。凹部１５ｂは、図９に示す形態であっても、先に説明した凹部１５と同様、ガラス化液４６中で受精卵２５を収納でき、かつガラス化液４６からガラス化凍結

保存容器１ｂを離した際に余分のガラス化液４６を貫通孔７１から外に排出可能である。
【００７６】
図１０は、第四実施形態に係るガラス化凍結保存容器の凹部近傍を当該凹部の開口面側から見た拡大斜視図（１０Ａ）、当該凹部の底部側から見た拡大斜視図（１０Ｂ）および当該凹部の図３（３Ｂ）と同様の断面図（１０Ｃ）をそれぞれ示す。
【００７７】
第四実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ｃは、第一実施形態に係るガラス化凍結保存容器１と異なる形態の凹部１５ｃを備え、かつ先端部１３に相当する衝撃緩和部を備えていない。これら２点以外の構成は、ガラス化凍結保存容器１と共通する。
【００７８】
凹部１５ｃの形状は、薄板部１２の厚さ方向のいずれの側にも突出せずに、薄板部１２の厚さの範囲内でへこむ形状である。薄板部１２は、凹部１５ｃの深さ以上の厚さとする必要から、好ましくは、前述の各実施形態の薄板部１２に比べて厚い。凹部１５ｃは、薄板部１２と略面一の底部７２に、複数個（この実施形態では７個）の貫通孔７１を備える。貫通孔７１の好ましい形状および大きさは、第三実施形態と同様である。また、凹部１５ｃの側壁は、薄板部１２と共有の構成となっている。このように、凹部１５ｃを薄板部１２の一方に突出させずに薄板部１２の厚さ内におさまるように形成しても、先に説明した凹部１５と同様、ガラス化液４６中で受精卵２５を収納でき、かつガラス化液４６からガラス化凍結保存容器１ｂを離した際に余分のガラス化液４６を貫通孔７１から外に排出可能である。
【００７９】
図１１は、第五実施形態に係るガラス化凍結保存容器の凹部近傍を当該凹部の開口面側から見た拡大斜視図（１１Ａ）および当該凹部の図３（３Ｂ）と同様の断面図（１１Ｂ）をそれぞれ示す。
【００８０】
第五実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ｄは、第四実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ｃと異なり、凹部１５ｃの開口部を開閉自在な蓋部８０を備える。この点以外の構成は、ガラス化凍結保存容器１ｃと共通する。蓋部８０は、その縁に近い部分を薄板部１２の一部に重ね、蓋部８０の厚さ方向をピン８１により貫通されている。ピン８１は、ピン８１を中心に蓋部８０を回転できるように、薄板部１２に固定されている。図１１（１１Ａ）に示すように、両矢印Ｊで示す両方向に蓋部８０を回転することによって、凹部１５ｃの開口面は開閉自在となる。凹部１５ｃの開口部を蓋部８０によって開閉自在とすることにより、受精卵２５を凹部１５ｃに入れた直後に蓋部８０にて開口部を閉鎖すれば、受精卵２５を凍結剤５１まで運ぶ間、受精卵２５と空気との接触をより確実に防止でき、かつ受精卵２５が凹部１５ｃの開口部からこぼれ落ちる危険性もない。
【００８１】
この実施形態では、薄板部１２は、薄板部１２の長さ方向に２つの凹部１５ｃを隣接配置する。このため、２つの蓋部８０は、開閉時に互いに衝突する可能性がある。これを可能な限り回避するように、２つのピン８１をできるだけ離している。これによって、２つの蓋部８０が各ピン８１を中心に回転しても、蓋部８０同士が衝突するのを防止できる。なお、凹部１５ｃ同士の間隔が十分に長い場合には、ピン８１の位置を必ずしも図１１の位置としなくとも良い。
【００８２】
＜ガラス化凍結保存容器の好適な使用方法＞
図１２は、ガラス化凍結保存処理を安定かつ迅速に行うために有益な専用ディッシュにガラス化凍結保存容器を保持した状態の斜視図（１２Ａ）および専用ディッシュの平面図（１２Ｂ）をそれぞれ示す。専用ディッシュはガラス化保存容器を手で保持することなく、先端の収納室をガラス化保存液中に安定設置でき、かつ顕微鏡下での焦点を変えることなく全ての操作と観察を安全迅速に行える構造（形状、サイズ、高さ等）とする。
【００８３】

図１２に示すディッシュ（ここでは、「専用ディッシュ」という）９０ａは、好ましくは透明性の高い樹脂あるいはガラスから構成され、一方向（図１２（Ｂ）では紙面表方向）に開口する部材である。専用ディッシュ９０ａは、略半球殻形状のウェル９１，９２，９３を各２組と、開口側をハート形状とする略半球殻形状のウェル９４ａを２組との合計８個のウェルを配置可能である。ウェル９１を、以後、第一ウェル９１と称する。ウェル９２およびウェル９３を、それぞれ、以後、第二ウェル９２および第二ウェル９３と称する。ウェル９４ａを、以後、第三ウェル９４ａと称する。専用ディッシュ９０ａの好適な大きさは、横（Ｗ）８５ｍｍ×縦（Ｄ）６５ｍｍ×高さ（Ｈ）１０ｍｍである。第一ウェル９１、第二ウェル９２，９３および第三ウェル９４ａは、専用ディッシュ９０ａと同様、好ましくは透明性の高い樹脂あるいはガラスから構成される。半球殻形状の第一ウェル９１および第二ウェル９２，９３は、好ましくは、同じ大きさであって、直径１５ｍｍである。半球殻形状の第一ウェル９１および第二ウェル９２，９３の高さは、専用ディッシュ９０ａの深さと同一若しくは該深さより低い方が好ましく、この実施形態では５～９ｍｍの範囲にある。この実施形態では、開口側をハート形状とする略半球殻形状の第三ウェル９４ａは、そのハート形状の開口面を内接させる円の直径を１５ｍｍとする。ただし、当該円の直径は、１５ｍｍより大きくても良く、例えば、１６～１８ｍｍの範囲としても良い。また、当該円の直径は、１５ｍｍより小さくても良く、例えば、１２～１４ｍｍの範囲としても良い。開口側をハート形状とする半球殻形状の第三ウェル９４ａの高さは、専用ディッシュ９０ａの深さと同一若しくは該深さより低い方が好ましく、この実施形態では５～９ｍｍの範囲にある。

【００８４】

図１２（１２Ｂ）に示すように、専用ディッシュ９０ａには、その縦（Ｄ）方向の長さの半分ずつの領域に、第一ウェル９１、第二ウェル９２，９３および第三ウェル９４ａを１組とするウェル集合体をそれぞれ配置可能である。すなわち、専用ディッシュ９０ａは、図１２（１２Ｂ）の紙面上下に分かれて２つの操作ラインを持つ。このため、同時に２個の卵子（未受精卵、受精卵のいずれでも良い）の凍結保存操作ができる。第一ウェル９１は、この実施形態では、平衡液を入れるためのものである。第二ウェル９２，９３および第三ウェル９４ａは、この実施形態では、ガラス化液を入れるためのものである。第三ウェル９４ａの開口面はハート形状であり、ガラス化凍結保存容器１ａの先端部の形状と共通の形状とするのが好ましい。この結果、第三ウェル９４ａが最終浸漬部位であることが明確になると共に、ガラス化凍結保存処理を行う術者の多くが女性であることにも配慮可能である。

【００８５】

専用ディッシュ９０ａを用いた卵子のガラス化凍結保存処理の手順は、一例を挙げると、以下のとおりである。

【００８６】

２個の第一ウェル９１に平衡液を、４個の第二ウェル９２，９３および２個の第三ウェル９４ａに約３００μｌのガラス化液を分注する。第三ウェル９４ａへのガラス化液の分注は、ガラス化凍結保存容器１ａの収納室（凹部１５）に空気が入るのを防ぐべく第三ウェル９４ａから空気を押し出すため、ガラス化液を吸い込んだピペッターチップを空の第三ウェル９４ａの内底面に設置した収納室（凹部１５）にめがけて吐き出すように行われるのが好ましい。そのような分注の後、第三ウェル９４ａ内にガラス化液を満たしておくのが好ましい。

【００８７】

卵子を微量の培養液とともに移動用のピペットで移動し、第一ウェル９１内の平衡液表面に吐き出すと、吐き出された卵子は、平衡液添加の保護剤の浸透圧と粘性の差により収縮し、徐々になじみながら、第一ウェル９１の内底面に沈む。その後、卵子が平衡液に入れる前の大きさに戻ったことを確認し、基本的な処理時間を１０～１５分として、第二ウェル９２のガラス化液に移す。第二ウェル９２内のガラス化液は比較的高濃度であり、卵子に悪影響を及ぼす可能性があることから、これ以降、凍結操作までの処理時間を９０秒

以内とするのが好ましい。卵子を第二ウェル９２内のガラス化液に入れただけでは、凍結保護剤が細胞になじまず、細胞内に浸透しにくいため、ピペットにて強制的に卵子を吸引および排出を繰り返し、第二ウェル９２内底面で６箇所以上の場所に素早く卵子を移動させる。加えて、卵子を第二ウェル９３内のガラス化液に移し、ピペットにて強制的に卵子を吸引および排出を繰り返し、第二ウェル９３の内底面で６箇所以上の場所に素早く卵子を移動させるのが好ましい。この結果、卵子はほぼ完全にガラス化液になじむ。完全にガラス化液の平衡を終えた卵子を移動用ピペットで吸引して、予めガラス化凍結保存容器１ａの収納室（凹部１５）をガラス化液で満たしている第三ウェル９４ａまで移動する。続いて、収納室内にピペットの先端を近づけて、ガラス化液中で卵子を排出する。

【００８８】

次に、卵子が収納室から出ないように、第三ウェル９４ａからガラス化凍結保存容器１ａを静かに引き上げ、液体窒素内にて予め冷やしてあるチューブ３０ａに、ガラス化凍結保存容器１ａの先端に衝撃が加わらないように静かに挿入する。ガラス化凍結保存容器１を用いて同様の操作を行った場合、ガラス化凍結保存容器１を、液体窒素内にて予め冷やしてあるチューブ３０に挿入する。また、チューブ３０，３０ａを使用しない場合には、ガラス化凍結保存容器１ａ，１をそのまま液体窒素中に静かに浸漬するのが好ましい。

【００８９】

図１３は、ガラス化凍結保存処理を安定かつ迅速に行うために有益な専用ディッシュであって、図１２に示す専用ディッシュの変形例にガラス化凍結保存容器を保持した状態の斜視図（１３Ａ）および当該変形例に係る専用ディッシュの平面図（１３Ｂ）をそれぞれ示す。

【００９０】

図１３（１３Ａ）は、専用ディッシュ９０ａとほぼ同形状のディッシュ（「専用ディッシュ」という）９０ｂにおいて、図１２の第三ウェル９４ａに代えて、第一ウェル９１および第二ウェル９２，９３とほぼ同形状の第三ウェル９４ｂを配置した例を示す。開口面をハート形状とした第三ウェル９４ａに代えて、開口面を略円形とする第三ウェル９４ｂを用いた場合でも、上記と同様の操作が可能である。

【００９１】

以上のように、この実施形態に係る細胞または胚のガラス化保存方法では、まず、一方向を開口した専用ディッシュ９０ａ，９０ｂの内底面に、専用ディッシュ９０ａ，９０ｂの内容積の深さと同一若しくは該深さよりも低い高さを持つ第一ウェル９１、第二ウェル９２，９３および第三ウェル９４ａ（若しくは９４ｂ）を少なくとも３個配置する。１または２以上の第一ウェル９１には平衡液が入れられている。また、１または２以上の第二ウェル９２，９３にはガラス化液が入れられている。さらに、１または２以上の第三ウェル９４ａ（若しくは９４ｂ）には、ガラス化液が入れられると共に、ガラス化凍結保存容器１ａ，１の凹部１５がガラス化液中に浸漬させられる。次に、細胞または胚を、第一ウェル９１、第二ウェル９２，９３、第三ウェル９４ａ（若しくは９４ｂ）の順に移動させる。次に、第三ウェル９４ａ（若しくは９４ｂ）において凹部１５に細胞または胚を収納した状態でガラス化凍結保存容器１ａ，１を第三ウェル９４ａ（若しくは９４ｂ）のガラス化液から引き上げる。最後に、細胞または卵子を凹部１５に収納した状態のガラス化凍結保存容器１ａ，１を凍結剤中に浸漬する。このように、専用ディッシュ９０ａ，９０ｂを用いると、手でガラス化凍結保存容器１ａ，１を継続して保持する必要が無く、正確かつ迅速に細胞または胚を凹部１５に収納する操作が可能となる。なお、専用ディッシュ９０ａ，９０ｂを用いたガラス化凍結保存の操作において、上述の例は、ガラス化凍結保存容器１ａ，１を用いた例であるが、ガラス化凍結保存容器１ｂ，１ｃ，１ｄを用いる場合でも同様の操作を行うことができる。

【００９２】

＜その他の実施形態＞

上述の各実施形態は、本発明の好適な実施形態に過ぎず、本発明は、本発明の目的を逸脱しない限り、種々の変形を施して実施可能である。

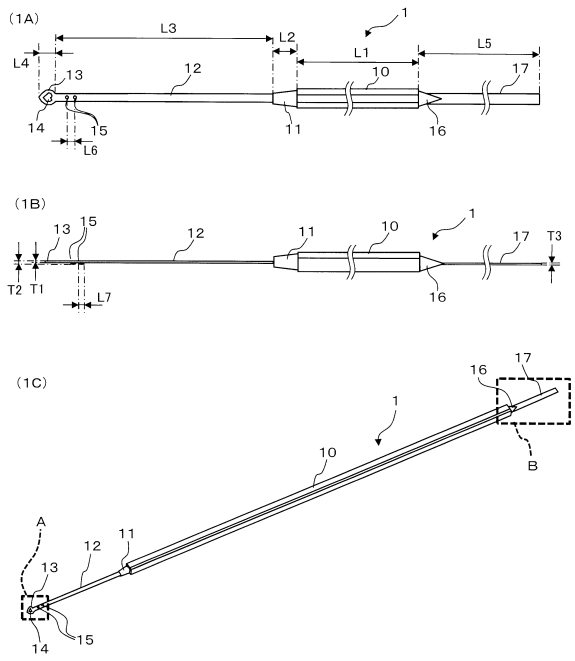
【００９３】
例えば、ガラス化凍結保存容器１，１ａ，１ｂ，１ｃ，１ｄ（以後、「ガラス化凍結保存容器１等」という）は、受精卵２５以外の細胞（例えば、未受精卵）、あるいは胚を保存するものでも良い。また、凹部１５，１５ｂの底部２６，７２に加えて若しくは底部２６，７２に代えて、側壁２２に貫通孔２１，７１を形成しても良い。すなわち、貫通孔２１，７１は、凹部１５，１５ｂを構成する壁面であれば、その形成位置を制約されない。十字帯２０は、凹部１５に備えるのみならず、凹部１５ｂ，１５ｃにも備えることができる。貫通孔２１，７１を閉塞した状態の凹部１５，１５ｂ，１５ｃの内容積は、好ましくは３０ｎＬ以下であるが、３０ｎＬより大きく、かつ５０ｎＬより小さくても良い。さらには、凹部１５，１５ｂ，１５ｃの内容積を５０ｎＬ以上としても良い。細胞等を保持する保持部は、薄板部１２の形態以外の構成部でも良い。例えば、保持部の形状を、棒形状あるいはブロック形状といった非扁平形状とすることもできる。

【００９４】
上述の各実施形態では、凹部１５，１５ｂ，１５ｃにガラス化液４６と受精卵２５とを吐出する場合、ガラス化凍結保存容器１等は、当該吐出されるガラス化液４６と同じ液中に薄板部１２の一部若しくは全部が沈められている。しかし、吐出されるガラス化液は、ガラス化凍結保存容器１等の薄板部１２を沈めているガラス化液４６と必ずしも同一であることを要しない。例えば、シャーレを２つ用意し、一方のシャーレのガラス化液４６内にガラス化凍結保存容器１等の薄板部１２を沈め、他方のシャーレ内のガラス化液と受精卵２５とをピペット４７等で吸引し、薄板部１２の凹部１５，１５ｂ，１５ｃに向けて受精卵２５とガラス化液とを吐出し、受精卵２５を凹部１５，１５ｂ，１５ｃ内に収納しても良い。

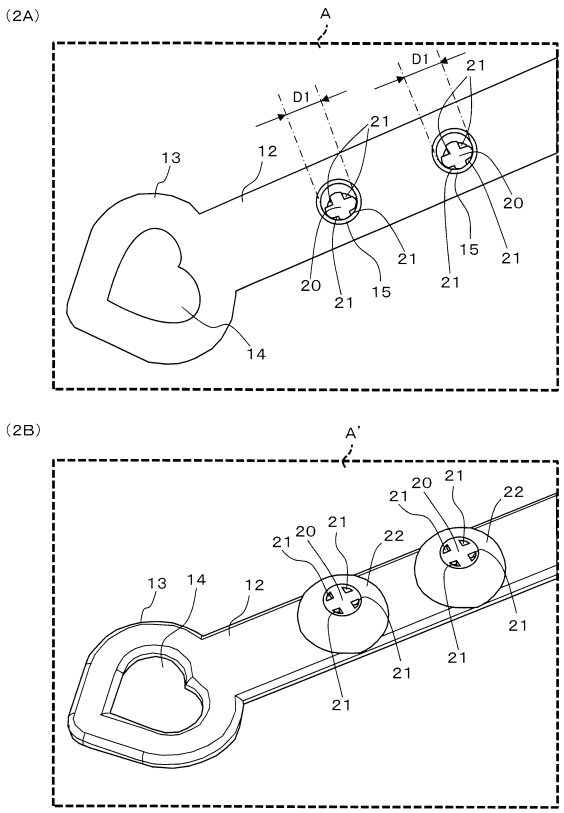
【００９５】
また、本発明は、上述のガラス化凍結保存容器１等、キット４０，４０ａおよびガラス化凍結保存方法を構成する複数の構成要素を、互いに組み合わせても良い。一例ではあるが、第一実施形態若しくは第二実施形態と第五実施形態とを組み合わせて、蓋部８０を凹部１５の開口面側に備えても良い。また、第二実施形態と第三実施形態とを組み合わせて、凹部１５ｂを第二実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ａに備えても良い。また、第二実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ａの拡径部６０を、第三～第五実施形態のガラス化凍結保存容器１ｂ，１ｃ，１ｄに設けても良い。さらに、キット４０またはキット４０ａは、第三～第五実施形態に係るガラス化凍結保存容器１ｂ，１ｃ，１ｄを含むものでも良い。なお、上記ガラス化凍結保存容器１，１ａ，１ｂ，１ｃ，１ｄは、凍結保存液中のみならず、空気中にて使用することもできる。

【産業上の利用分野】
【００９６】
本発明は、細胞または胚のガラス化凍結保存に利用できる。

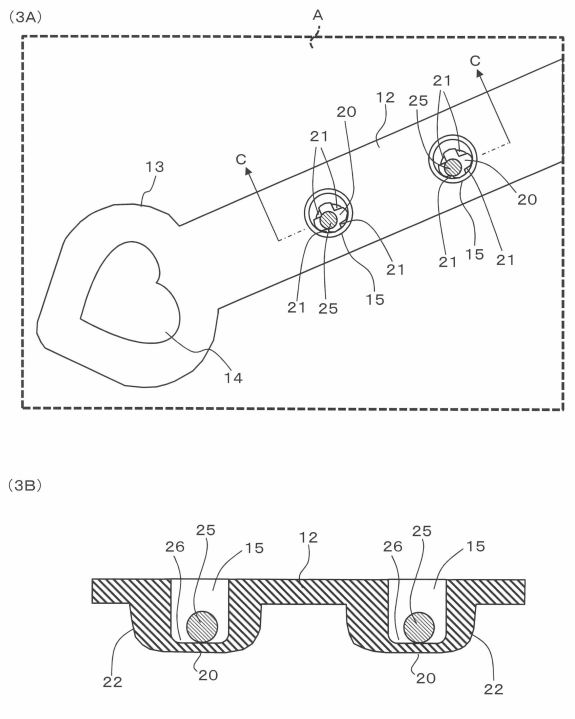
【図１】


(1A)
L3
L2
L1
L5
L4
1
13
12
10
17
14
15
11
16
L6
(1B)
13
15
12
11
10
1
17
T3
T2
T1
L7
16
(1C)
16
17
1
10
B
A
12
11
13
15
14

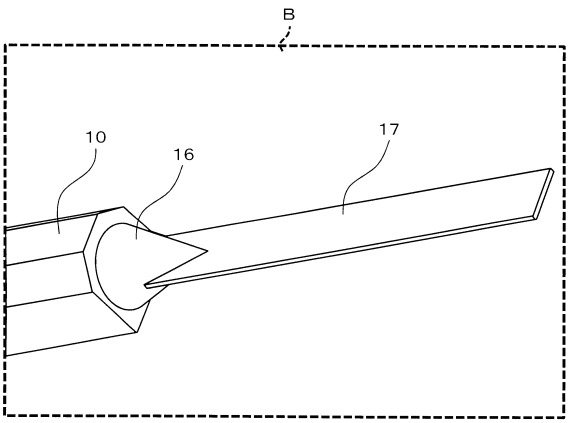
【図２】


(2A)
A
D1
21
13
12
20
15
14
(2B)
A'
22
14

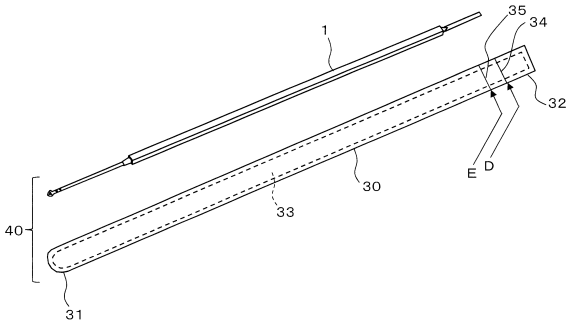
【図３】


(3A)
A
C
12
25
20
13
14
15
(3B)
26
22

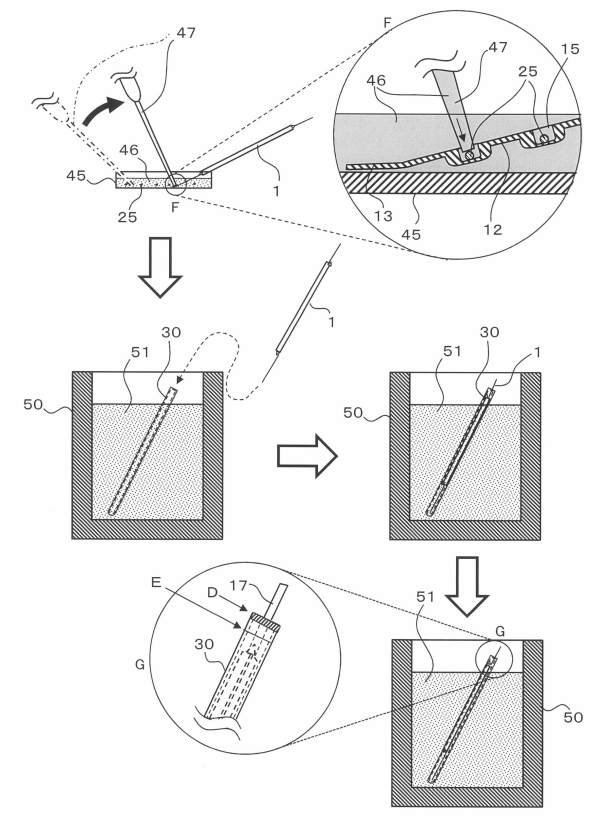
【図４】


B
10
16
17

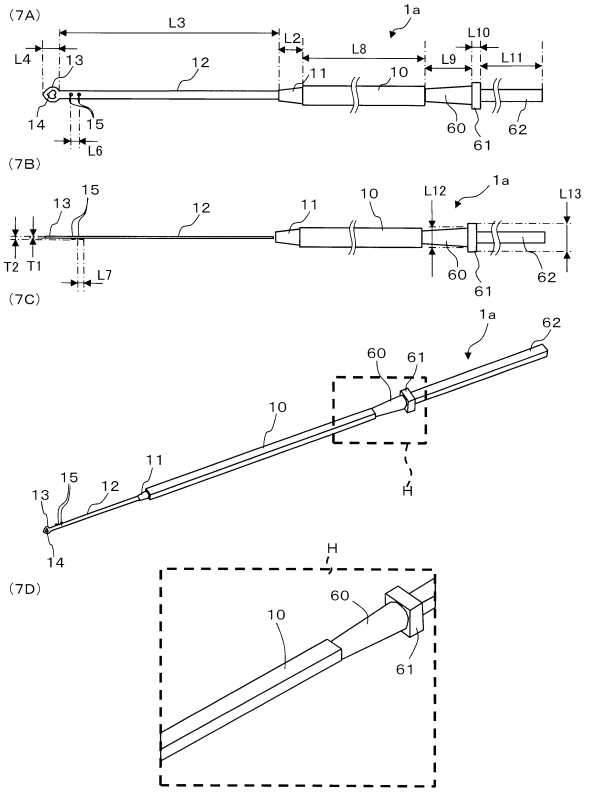
【図５】


1
35
34
32
E
D
30
33
40
31

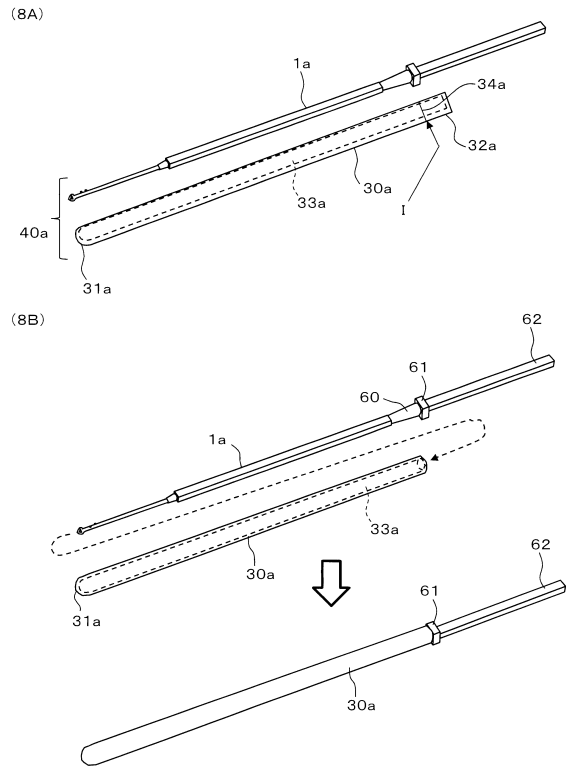
【図６】


47
F
46
45
25
1
15
13
12
30
51
50
E
D
17
G

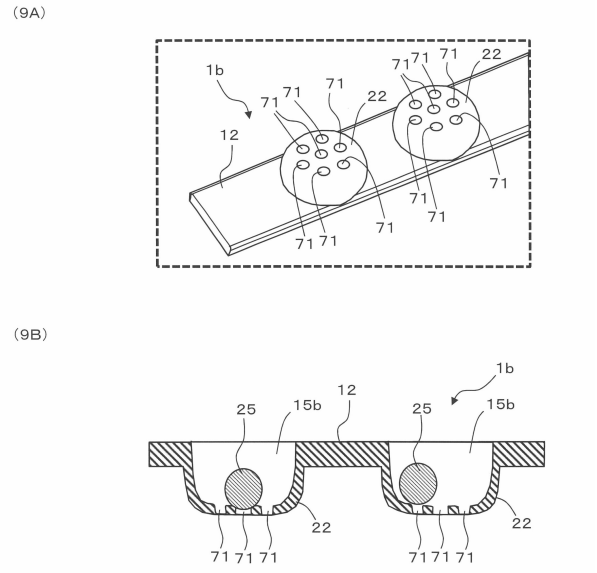
【図７】


(7A)
L3
L2
L8
L10
L4
L9
L11
1a
13
12
11
10
14
15
L6
60
61
62
(7B)
T2
T1
L7
L12
L13
(7C)
H
(7D)

【図８】

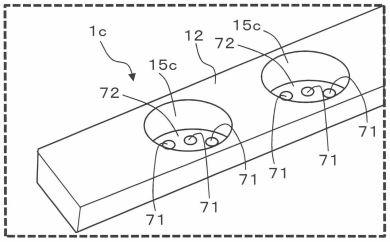

(8A)
1a
34a
32a
30a
33a
I
40a
31a
(8B)
62
61
60
1a
33a
30a
31a

【図９】

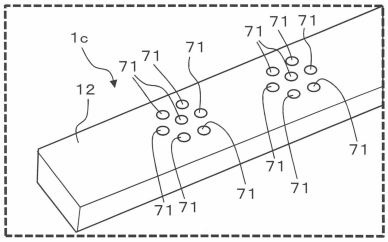

(9A)
1b
71
22
12
(9B)
25
15b
12
22

【図１０】

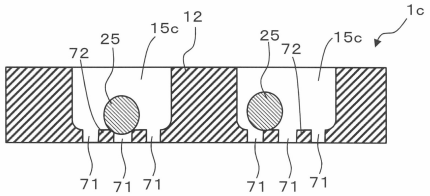
(10A)



(10B)

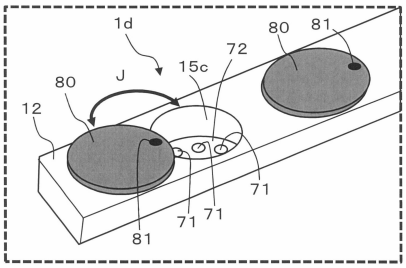


(10C)

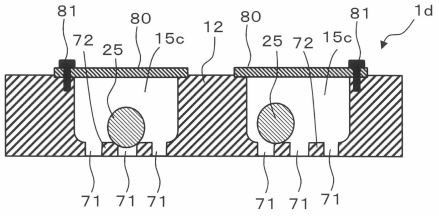


【図１１】

(11A)

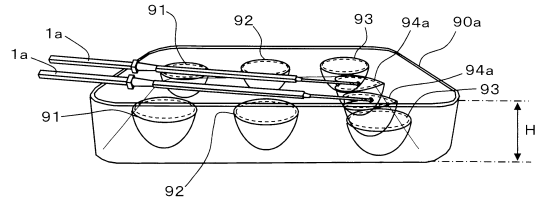


(11B)

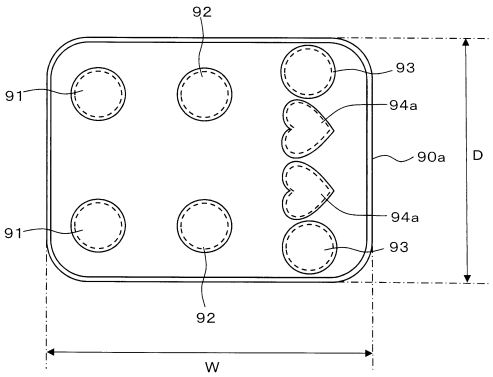


【図１２】

(12A)

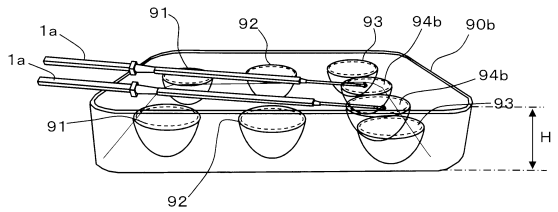


(12B)

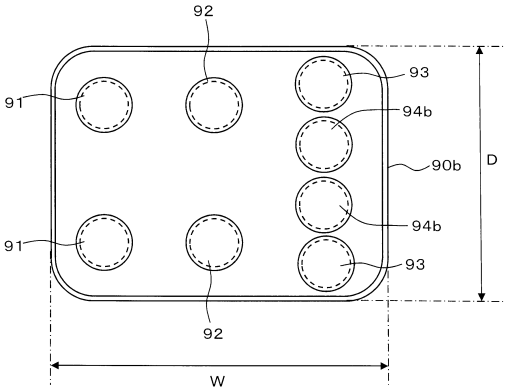


【図１３】

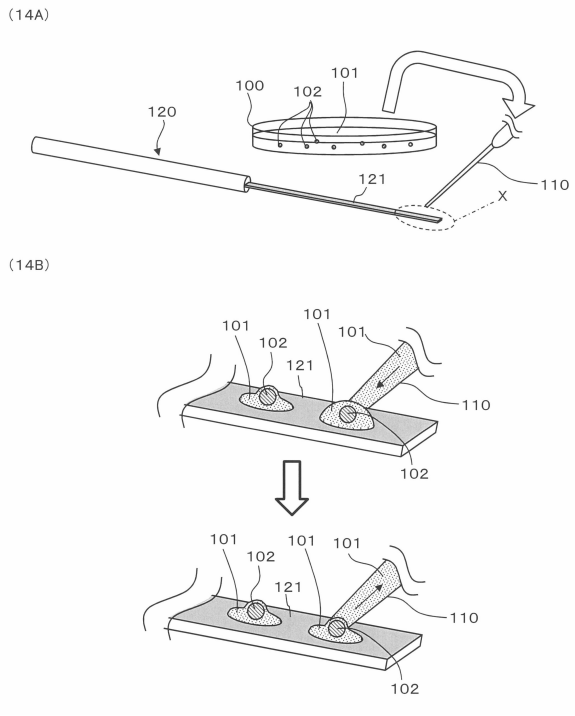
(13A)



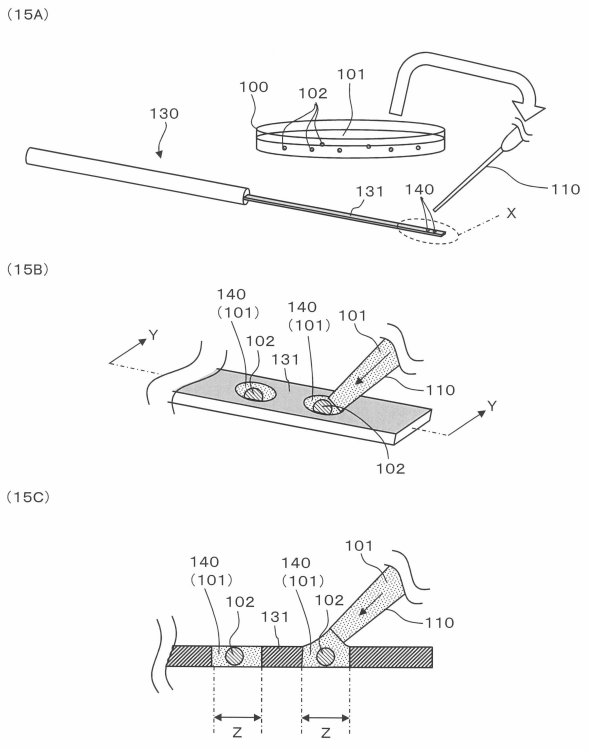
(13B)



【図１４】


(14A)
100
101
102
120
121
110
X
(14B)
101
101
101
102
121
110
102
101
101
101
102
121
110
102

【図１５】


(15A)
100
101
102
130
131
140
110
X
(15B)
140
(101)
140
(101)
101
102
131
110
Y
Y
102
(15C)
140
(101)
140
(101)
101
102
131
102
110
Z
Z

フロントページの続き

審査官　小金井　悟

(56)参考文献　国際公開第２０１１／０７０９７３（WO，Ａ1）
国際公開第２０１０／０４６９４９（WO，Ａ1）
特開２０１０－２１３６９２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１０／１４２９５４（WO，Ａ1）
特開２００７－２６１９７３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／０３１９１６（WO，Ａ1）

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