

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-529466

(P2016-529466A)

(43) 公表日 平成28年9月23日 (2016.9.23)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>F 2 5 B 21/00</b> (2006.01)	F 2 5 B 21/00	A 4 H 0 1 1
<b>A O 1 N 1/02</b> (2006.01)	A O 1 N 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2016-531762 (P2016-531762)	(71) 出願人	508032284
(86) (22) 出願日	平成26年7月23日 (2014.7.23)		カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー
(85) 翻訳文提出日	平成28年1月28日 (2016.1.28)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 1 2 5, パサデナ, イースト・カリフォルニア・ブールヴァード 1 2 0 0, エムシー 6-3 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/047884	(74) 代理人	100147485
(87) 国際公開番号	W02015/017221		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開日	平成27年2月5日 (2015.2.5)	(74) 代理人	100161148
(31) 優先権主張番号	61/859, 940		弁理士 福尾 誠
(32) 優先日	平成25年7月30日 (2013.7.30)	(74) 代理人	100198568
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 君塚 絵美
(31) 優先権主張番号	14/328, 602	(72) 発明者	小林 厚子
(32) 優先日	平成26年7月10日 (2014.7.10)		東京都目黒区自由が丘 3 - 8 - 4
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体磁性粒子の安定化及び振動化による電磁冷凍の向上

## (57) 【要約】

新規な電磁冷凍方法及びシステムが開示される。生物組織内の磁性粒子を整列させるための静磁場と同時に振動磁場を印加することができる。このような磁性粒子の鎖は自然に又は人工的に導入されたものとし得る。針状電極を用いてイオンを発生させ、冷凍すべき組織を断熱する空気層を攪乱することができる。

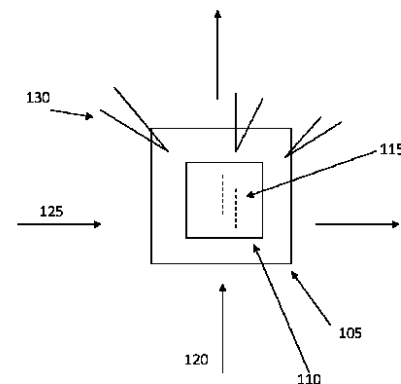


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生物組織を冷凍するシステムであって、  
生物組織を収容するように構成された容器と、  
前記生物組織に静磁場を印加するように構成された静磁場発生器と、  
前記容器内の前記生物組織に振動磁場を印加するように構成された振動磁場発生器と、  
前記容器内の前記生物組織を冷凍するように構成された冷凍素子と、  
を備えるシステム。

**【請求項 2】**

前記振動磁場は前記静磁場に対して直角方向に一次元又は二次元的に印加される、請求項 1 記載のシステム。 10

**【請求項 3】**

前記振動磁場の強度は前記静磁場の強度の 10 % である、請求項 2 記載のシステム。

**【請求項 4】**

前記静磁場の強度は 15 mT より大きい、請求項 1 - 3 のいずれかに記載のシステム。

**【請求項 5】**

前記容器内の前記生物組織に電圧を印加するように構成された少なくとも一つの電極を更に備える、請求項 1 - 4 のいずれかに記載のシステム。

**【請求項 6】**

前記少なくとも一つの電極は針状であり、前記容器内の前記生物組織の表面に隣接する空気境界層でイオンを発生するように構成されている、請求項 5 記載のシステム。 20

**【請求項 7】**

請求項 1 - 6 のいずれかに記載のシステムで生物組織を冷凍する方法であって、該方法は、

前記容器内の前記生物組織に前記静磁場を印加するステップと、  
前記容器内の前記生物組織に前記振動磁場を印加するステップと、  
前記容器内の前記生物組織を冷凍するステップと、  
を備える方法。

**【請求項 8】**

前記振動磁場は前記静磁場に対して直角方向に印加される、請求項 7 記載の方法。 30

**【請求項 9】**

前記静磁場の強度は 15 mT より大きい、請求項 7 又は 8 記載の方法。

**【請求項 10】**

前記振動磁場の強度は前記静磁場の強度の 10 % である、請求項 7 - 9 の何れかに記載の方法。

**【請求項 11】**

請求項 5 に記載のシステムで生物組織を冷凍する方法であって、該方法は、  
前記容器内の前記生物組織に前記静磁場を印加するステップと、  
前記容器内の前記生物組織に前記振動磁場を印加するステップと、  
前記容器内の前記生物組織に電場を印加するステップと、  
前記容器内の前記生物組織を冷凍するステップと、  
を備える方法。 40

**【請求項 12】**

前記振動磁場は前記静磁場に対して直角方向に印加される、請求項 11 記載の方法。

**【請求項 13】**

前記静磁場の強度は 15 mT より大きい、請求項 11 又は 12 記載の方法。

**【請求項 14】**

前記振動磁場の強度は前記静磁場の強度の 10 % である、請求項 11 - 13 の何れかに記載の方法。

**【請求項 15】**

冷凍前に前記生物組織内に磁性粒子を導入するステップを更に備える、請求項 7 記載の方法。

【請求項 16】

前記磁性粒子の導入ステップは、前記生物組織の遺伝子活性化によって前記磁性粒子を生成するように前記生物組織を励起することにより実行される、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

生物組織を冷凍する方法であって、該方法は、  
生物組織を収容し冷凍するように構成された冷凍容器を用意するステップ、  
静磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を整列させるステップと、

10

前記静磁場に直角方向の振動磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を振動させるステップと、

前記静磁場と前記振動磁場が活性である間前記生物組織を冷凍するステップと、  
を備える方法。

【請求項 18】

生物組織を冷凍する方法であって、該方法は、  
生物組織を収容し冷凍するように構成された冷凍容器で、前記生物組織に向けら前記生物組織に実質的に近接するが離された複数の針状電極を有する、冷凍容器を用意するステップと、

静磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を整列させるステップと、

20

前記静磁場に直角であって前記静磁場を中心に回転する成分を有する振動磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を楕円状又は円状に振動させるステップ、

前記針状電極と前記生物組織との間に電圧差を与え、前記生物組織を包囲する空気層内にイオンを生成するステップ、

前記電圧差、前記静磁場及び前記振動磁場が活性である間生物組織を冷凍するステップと、  
を備える方法。

【請求項 19】

30

前記静磁場の強度は 15 mT より大きい、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記振動磁場の強度は前記静磁場の強度の 10 % である、請求項 18 又は 19 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014 年 7 月 10 日に提出された米国特許出願第 14 / 328,602 号及び 2013 年 7 月 30 日に提出された米国仮特許出願第 61 / 859,940 号の優先権を主張するものであり、両出願の全開示内容は参照することにより本明細書に組み込まれる。

40

【背景技術】

【0002】

本発明は、電磁冷凍に関し、特に微小磁性粒子（通常生体マグネタイト）に楕円又は円偏光振動を生じさせる磁界を印加してそれらの表面に氷の結晶が生成しないようにすることによって電磁冷凍を向上させる技術に関する。より具体的には、生体磁性粒子の安定化及び振動化による電磁冷凍の向上に関する。

【発明の概要】

【0003】

50

本発明の第１の態様では、生物組織を冷凍するシステムが提供され、該システムは、生物組織を収容するように構成された容器、前記生物組織に静磁場を印加するように構成された静磁場発生器、前記容器内の前記生物組織に振動磁場を印加するように構成された振動磁場発生器、前記容器内の前記生物組織を冷凍するように構成された冷凍素子を備える。

#### 【０００４】

本発明の第２の態様では、生物組織を冷凍する方法が提供され、該方法は、生物組織を収容し冷凍するように構成された冷凍容器を用意するステップ、静磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を整列させるステップ、前記静磁場に直角の振動磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を振動させるステップ、前記静磁場と前記振動磁場が活性であるある間前記生物組織を冷凍するステップを備える。

10

#### 【０００５】

本発明の第３の態様では、生物組織を冷凍する方法が提供され、該方法は、生物組織を収容し冷凍するように構成された冷凍容器で、前記生物組織に向けられ前記生物組織に実質的に近接するが離された複数の針状電極を有する、冷凍容器を用意するステップ、静磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を整列させるステップ、前記静磁場に直角であって前記静磁場を中心に回転する成分を有する振動磁場を前記容器内の前記生物組織に印加することによって前記生物組織内の磁性粒子を楕円状又は円状に振動させるステップ、前記針状電極と前記生物組織との間に電圧差を与え、前記生物組織を包囲する空気層内にイオンを生成するステップ、前記電圧差、前記静磁場及び前記振動磁場が活性である間生物組織を冷凍するステップを備える。

20

#### 【０００６】

本明細書に組み込まれその一部を構成する添付の図面は、本発明の一以上の実施形態を示し、代表的な実施形態の説明とともに、本発明の原理及び実施の形態を説明するのに役に立つものである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【０００７】

【図１】磁場を用いる代表的な冷凍容器を示す。

【図２】代表的な組織冷凍方法を示す。

30

【発明を実施するための形態】

#### 【０００８】

本発明は、微小磁性粒子（通常生体マグネタイト）に楕円又は円偏光振動を生じさせる磁場を印加してそれらの表面に氷の結晶が生成しないようにすることにより電磁冷凍を向上させる技術に関する。

#### 【０００９】

本明細書のいたるところで、本発明の概念の利用及び実装を説明するためにいくつかの実施形態及び変形例が記載される。この説明のための記載は、本明細書に開示される概念の範囲を限定するものでなく、本発明の概念の例示として理解されたい。様々な図面において対応する部分は同じ参照番号で示されている。

40

#### 【００１０】

冷凍は、限定されないが流体工業等の様々な分野における重要な技術的プロセスである。冷凍は生物学的及び化学的過程の時間速度を低減するため、例えば人や動物が食べる食物を腐敗させる微生物活動を低減するために使用することができる。

#### 【００１１】

農場と食卓との間における人間の食物の損失額は（米国のような先進技術国においてさえ）４０％に上り得る（例えば、参考文献５０参照）。この無駄を減らす能力の向上は人類の持続可能な未来に重要な意味を持っている。冷蔵及び冷凍技術は、材料の冷凍時の氷晶の生成のために出荷用の植物性及び動物性組織の貯蔵に困難がある。例えば、果物及び野菜の冷凍は特に問題がある。最近、日本の千葉市所在のＡＢＩ社は、氷晶の成長により

50

破壊される細胞の問題を大幅に低減すると主張する「セルアライブシステム」(CAS)を市販している。CASシステムは通常の冷凍技術と選択振動電場及び磁場との結合並びに音波の印加を利用している。ABI社は最小の氷晶成長による細胞超構造の損傷で大量の動物及び野菜食材を冷凍することができたと主張している。プログラム可能なCAS冷凍庫は、試料に冷気を吹き付けることによって試料の過冷却を0 から - 20 の臨界温度範囲内に制御しながら、試料を低周波数の振動電場及び磁場及び弱い音波に曝している(例えば、参考文献1, 2 及び3 参照)。

#### 【0012】

しかしながら、CASシステムが氷晶の生成をほぼ抑制しながら生物組織を有効に冷凍することができる理由の公的に入手可能な文書は、熱力学及び統計力学の基本原則に反する。例えば、公的に入手可能な文書は、弱い振動磁場が水分子を振動させ、氷晶核生成を抑制すると断言している。しかしながら、このような主張は、水分子は反磁性であり、このような振動磁場の効果は背景熱雑音より何桁も小さいため、信じられない。少なくとも一つの同業者による論評(例えば、参照することにより組み込まれる参考文献9 参照)及び回答(例えば、参照することにより組み込まれる参考文献1 参照)はこの問題に取り組んでいるが、明確な解決は示されていない。いずれにしても、これらの冷凍庫は正常に動作し、現在高価なマグロの風味を保つために船上でも広く使用されている。

#### 【0013】

本発明の代表的な実施形態において記載されるように、カリフォルニア工科大学で古生態学の教授、ハインツ・ローウェンスタムにより50年以上前になされた発見がCASシステムの動作の仕方に関連する。特に、ローウェンスタムは、ヒザラ貝などの軟体動物の原始群の歯は生物学的に沈殿したマグネタイト結晶( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )の層で覆われていることを発見した。ミネラルは、人体が骨や歯内でミネラル燐灰石を形成するのと同様の生物学的沈殿物である。しかしながら、それは強磁性、即ち磁石に強く吸引される動物内の唯一の既知の生体物質である。ローウェンスタムの最初の発見以来、多くの研究が、マグネタイトの生物学的沈殿はむしろ一般的であり、走磁性バクテリア及び多くの属の真核生物、例えば原生生物及び植物、及び魚類、両生類、爬虫類、鳥類及び哺乳類などの種々の動物内で起こることを示している。カリフォルニア工科大学のキルシェビクのグループは、生物学的沈殿マグネタイト結晶( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )は人体の組織内に存在し、一部のガン組織にも、数ppmのレベルで存在することを示している。同等のレベルがほとんどの動物組織並びに種々のバクテリア及び原生生物内に存在する。数ppmは少量であるように思われるが、代表的な組織内にはこれらのクラスタの多くが存在し、例えば人間の脳内には100, 000 / グラム程度存在する。

#### 【0014】

生物組織の冷凍保存分析にとって、生物組織内に存在する磁性結晶のすべてが冷凍保存システム(例えばCAS冷凍庫)で使用されるレベル及び周波数の磁場と極めて強く相互作用する(例えば、場合によっては熱雑音限界の何千倍に上る)という事実が重要である。それに反して、反磁性粒子は熱雑音レベル以下である。

#### 【0015】

強磁性物質の存在は、冷凍中に組織内で起こっていることを物理的に説明し得る唯一のメカニズムであると考えられるが、公的に入手し得る文献のいずれにも可能なメカニズムとして言及されていない。更に、これまでの研究は、CAS技術が生存率の向上を主張する生物学的研究において哺乳類細胞株を成長させるために使用する液体培地の多くには強磁性汚染物質が存在することを証明している。従って、このような強磁性汚染物質が生物組織内に自然に存在する強磁性クラスタと同様に作用している可能性もある。

#### 【0016】

工業的に重要なプロセスに対する基本的な物理的メカニズムが明らかにされると、新たな理解が関連する技法の改良のための可能な洞察力がもたらされることが知られている。このような改良のためのいくつかの新たな機会が本開示に以下で提示され検討される。

#### 【0017】

バクテリアや動物組織内に見られる生物学的磁気結晶のクラスタは細胞死後すぐに凝集して最小エネルギー構造になりやすいことが知られている。磁気結晶を保持する細胞骨格タンパク質は細胞死後急速に退化し、磁気結晶が凝集塊になり得る。この凝集塊は孤立した磁性粒子又は鎖よりも有効に周囲の液体を同相で振動させることができない。凝集塊が有効でない理由は少なくとも2つあり、(1)それらの磁気モーメントが鎖に比較して小さいため(それらが感じる磁気トルクが小さくなる)ため、(2)音響振動を周囲の組織に伝達する凝集塊の表面積がそれらの粒子を長い鎖に延ばしたときの面積よりはるかに小さいためである。

#### 【0018】

従って、冷凍前に粒子が凝集しないようにすると電磁冷凍効果を高められる。本発明は、例えば15mTより大きい静磁場を用いて電磁冷凍を向上させる新規な方法を提供する。このような磁場は、磁性粒子が手持ち磁石の近傍の鉄くずのように延ばされた状態に保つことによって磁性粒子が凝集し得ないようにすることができる。本開示に記載する方法に基づいて、冷凍前の凍結防止を向上させるいくつかのタイプの磁気前処理を開発することができる。

10

#### 【0019】

CAS技術のような電磁冷凍技術は血液、精液、人の卵細胞、受精胚及び細胞培養液等の多くの「液体」組織を冷凍保存するために使用できる。本発明の模範的な実施形態によれば、適切に調整した強磁性粒子を添加することで氷晶生成プロセスを抑制するよう作用する磁気振動サイトの密度を増大させ、それに相応して冷凍初期に望ましい核生成サイトの数を増大させることによって、電磁冷凍技術の有効性を向上させることができる。従って、生物組織内に自然に存在する強磁性クラスタに加えて強磁性粒子を添加することによって冷凍保存方法及びシステムを高性能化することができる。

20

#### 【0020】

冷凍保存を促進する十分な磁性物質を所有しない、もしくは十分な量の追加の強磁性粒子を受け入れるのに適さない、一部の生物組織の場合には、遺伝子工学を使って、ほとんどの群の動物及び植物における天然のマグネタイト沈殿細胞の生成を制御する転写因子をターンオンさせることができる。適切な因子をターンオンすることによって、より多くの天然振動磁性クラスタを生成させ、電磁冷凍中の氷晶核生成を抑制することができる。

#### 【0021】

30

電磁冷凍(CAS)に関する特許文献では、冷凍すべき生物組織に印加された弱い音波レベルが通常固体及び液体表面に僅かな熱絶縁をもたらす不活性空気の表面境界層を攪乱すると主張している。それゆえ、音波は絶縁をもたらすこの境界層を除去し、冷凍プロセスを改善すると主張している。

#### 【0022】

しかしながら、後の項で記載する本発明の代表的な実施形態は、このような説明は科学的に正しくないことを明らかにする。はっきり言えば、音波を印加した状態での電磁冷却中の熱輸送は静電「コロナ」風効果の結果である。静電コロナ風効果は針電極のアレイの付加により高めることができる(例えば、参考文献11参照)。針電極のアレイは、高電圧電界を印加して多数のイオンを発生させ静電コロナ効果を最大にして冷凍すべき生物組織を包囲する空気を動かすことができる。それゆえ、針電極は電磁冷凍庫内の熱輸送を増大させるために使用することができる。言い換えれば、当業者に知られているように、針電極は静電効果によりイオンを発生する。このような場合には、先のとがった電極はより高い値の局所的静電界を生成し、そこでイオンを生成しやすい。この場合、静電界内のイオンの移動は冷凍すべき生物組織の周囲の空気層を攪乱することができる。

40

#### 【0023】

冷凍保存中の氷核生成及び結晶化に対する電磁場の可能な抑制作用はいくつかの工業的方法の出発点である。これらの方法はグローバル食品保存技術の大きな進歩をもたらすことができる。例えば、強い電場は冷凍する必要のある物質(例えば、生物組織)の表面の不活性空気の表面境界層を攪乱することができ、よってより高速の蒸発及びより大きな熱

50

輸送をもたらすことができる。

【0024】

更に、上述したように、大部分の生物組織は微量の強磁性物質、例えば生物学的に沈殿したマグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 並びに生物系に偶発的に含まれる環境汚染物質を含む。微量の存在であるが、これらの粒子の数密度は高く、弱い低周波数磁場と非常に強い相互作用を呈し得る。当業者に知られているように、このような弱い低周波数磁場は電磁冷凍保存で使用する事ができる。

【0025】

本発明の代表的な実施形態は、生物組織内の振動強磁性クラスタにより発生される低周波数の音波が、組織が結晶になる前の超臨界状態になることを可能にしながら、どのように氷晶核生成の抑制を生じるかを記載している。結晶化が生物組織を損傷し、冷凍時にそれらの状態を退化させることは当業者に知られているので、このような方法によれば、生物組織は良好に保存され得る。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、強い静磁場での新鮮組織の前処理はマグネトソーム鎖の崩壊の抑制及び逆戻りにより冷凍を高めることができる。その後、振動磁場及び静磁場の同時印加によりマグネトソーム鎖を保存することができる。特に、磁性粒子の鎖を保存し、生物組織の冷凍を向上させるためには、低周波数で回転する磁場を振動磁場より高い強度を有する静磁場に直角に、生物組織に印加するのが有利である。

【0027】

当業者に知られているように、マグネトソームは走磁性微生物内に存在する膜結合構造である。それらは、自発強磁性であるそれらの被包性単ドメインマグネタイト結晶の永久磁気双極子モーメントのために地球磁場の磁力線に沿って整列し得る。個々の細胞は、その種又は組織に依存して、1個から数千個の個別のマグネトソームを含み得る。マグネトソーム内の各磁気結晶は脂質二重層で囲まれ、固有の可用性膜貫通タンパクが膜に分類される。本発明では、「マグネトソーム」は、生物組織内に存在する任意の磁性粒子又は磁性粒子のクラスタを自然に含有されるか人工的に導入されるかを問わずに示す一般的な用語として使用する。

20

【0028】

当業者に知られているように、水は液体から固体状態へ凍結する際に体積を膨張する。水の体積は凍結時に約10%膨張する。氷に変わる際のこの膨張は、成長する氷晶による鋭いエッジの損傷と単純な膨張効果とによって細胞膜を破壊し得る。当業者に知られているように、水の凍結により細胞膜内部に生じる損傷は、水を過冷却し、膨張過程を経ずにガラス状態に冷却する、及び/又は形成される氷晶の大きさを制限することによって回避することができる。電子顕微鏡使用者は、通常数  $\text{mm}^3$  の小さな試料を低音液体中に、時々高い圧力で直接浸すことによって、これを達成することができる。しかしながら、生物組織内への熱伝導速度が遅いためにこの状態に保存し得る組織の大きさが制限される。

30

【0029】

本開示で上述したように、グラムサイズ以上の対象物、例えばねずみの脳、野菜又は無傷の魚の(細胞超構造を維持しながらの)冷凍はやりがいのある問題であった。更に上述したように、CAS技術などの電磁冷凍技術は、繊細な果物及び野菜の輸送に役立ち、歯(例えば、参考技術文献4及び5参照)及び胚肝細胞(例えば、参考技術文献6参照)等の人の移植組織の高度冷凍保存に役立ち得る。電磁冷凍は更にショウジョウバエ等の小動物の生きた固体そのものの冷凍生存を促進することもできる(例えば、参考文献7参照)。

40

【0030】

他方、本開示で上述したように、ABIグループにより公開されたCASシステムに関する論文及び特許文献(例えば、参考文献1, 2, 3及び8参照)は基礎生物物理学と一致しない2つの作用機序を仮定している。特に、参考文献1, 2, 3及び8に提示されている第1の主張は、振動電場及び磁場は水分子を直接小刻みに動かして過冷却状態にて氷

50

晶の核生成を抑制するはずであり、試料内部の急速恒温冷却を促進するはずであると述べている。更に、参考文献 1, 2, 3、及び 8 に提示されている第 2 の主張は、弱い音波は不活性空気の熱境界層を攪乱して試料内への熱伝導を向上させるはずであると述べている。

【 0 0 3 1 】

第 1 の主張（磁場による「小刻み振動」）に関して、ウォウク（例えば、参考文献 9 参照）は、当業者に知られているように、水分子は反磁性であり、C A S 冷凍庫で使用されている弱い振動磁場（例えば、10 ガウス又は 1 m T 以下）に曝されたとき熱雑音以上の効果を生じないことを指摘している。ウォウク（例えば、参考文献 9 参照）は、電場は使用条件に応じて氷晶の生成を僅かに抑制又は促進することが知られているが、これらの装置に要求されるレベルではないとも言及している。

10

【 0 0 3 2 】

C A S 冷凍庫の磁気アスペクトの直接検査において、鈴木等（例えば、参考文献 10 参照）も、振動磁場単独の印加はダイコン又はサツマイモの検査試料の冷却時間曲線に変化を与えず、検査した組織の細胞微構造に目に見える効果を与えないことを報告している。

【 0 0 3 3 】

当業者に知られているように、結果が再現可能であれば、異なる科学的な説明が正当化されるかもしれない。このような異なる科学的な説明が本開示に記載され、間違った科学的説明に基づいては不可能な改善を可能にすることができる。

【 0 0 3 4 】

第 2 の主張（即ち、音波の印加は空気層を攪乱する）に関して、C A S システムで 사용되는音波レベルの分析（例えば、本開示の表 1 参照）は、1 振動サイクル中に個々の水分子に到達するエネルギーはその最大強度（ $10 \text{ W} / \text{m}^2$ ）でも、熱雑音のエネルギーより何桁も低い。表 1 に示すように、音波レベルも大部分の人間環境内の周囲雑音のレベルより十分に低い。従って、参考文献 1, 2, 3 及び 8 において A B I グループにより提案されている試料表面の熱境界層の音響破壊は正しくないと思われる。更に、当業者に知られているように、音響振動はまた過冷却水を突然結晶化させるトリガの一つであると考えられている。このような現象は C A S システム（例えば、参考文献 2, 3 参照）に記載されている電磁冷凍と矛盾する。

20

【 0 0 3 5 】

30



## 【表 1】

表 1：標準温度及び気圧（STP）におけるCAS冷凍庫の音波成分の大規模なエネルギー分析

3.8E-21	Joule/kT	一次元熱背景雑音エネルギー, kT
9.6E-11	m	水分子の近似的大きさ
9.2E-21	m <sup>2</sup>	水分子の断面積
6.8E-08	m	STPにおける空気中の水分子の平均自由行程
3.0E-26	kg	個々の水分子の質量
614	m/s	STPにおける水分子の速度(rms)=sqrt(3kT/mass)
1.1E-10	seconds	振動間の平均時間
		弱い音波の場合
1.0E-10	W/m <sup>2</sup>	スピーカからの音波の最小エネルギー
9.2E-31	W	1つの水分子への音波からの音響エネルギー束,(面積 x パワー)
1.0E-40	Joule	隣接衝突事象の間で受け取られる総合音響エネルギー、ジュール単位 (エネルギー束 x 相互衝突時間)
2.7E-20	kT	隣接衝突事象の間で受け取られる総合音響エネルギー、k T単位
		強い音波の場合
1.0E+01	W/m <sup>2</sup>	スピーカからの音波の最小エネルギー
92E-20	W	1つの水分子への音波からの音響エネルギー束,(面積 x パワー)
1.0E-29	Joule	隣接衝突事象の間で受け取られる総合音響エネルギー、ジュール単位 (エネルギー束 x 相互衝突時間)
2.7E-09	kT	隣接衝突事象の間で受け取られる総合音響エネルギー、k T単位

10

20

30

## 【0036】

## 熱輸送への静電効果

本開示に記載したように、熱輸送への静電効果及び生物学的に沈殿される強磁性物質は、なぜこの冷凍技術が正常に機能し、電磁冷凍技術の改善をもたらし得るかという生物学的難問に対する可能な解に直接的な関係を有する。

## 【0037】

参考文献11において、濡れた材料の乾燥速度への静電場の効果が研究されている。当業者は、輸送現象の研究から、気体流の相対速度が漸近的に零に低下する大部分の材料の表面に比較的不活性の空気の薄い層が存在することを知っている。参考文献12, 13及び14に記載されているように、これらの表面境界層は材料からの気体の拡散をさまたげ、その内部への対流熱伝導速度を制限する。

40

## 【0038】

鋭い通電点は電極終点から出るイオンの結果として電気風又はコロナ風を生成し、このイオン風は停滞している表面境界層を破壊して表面の熱伝導に顕著な増大を生じさせることは当業者に知られている(例えば、参考文献15, 16, 17, 18, 19及び20参照)。この効果は以前より、溶接中の熱い表面の冷却速度を増大するため、例えば半導体素子を冷却するため、及びCO<sub>2</sub>レーザ内の光学素子を冷却するため(例えば、参考文献18参照)に使用されている。音波破壊のエネルギーに比較して、1つのイオン当たりの

50

この静電効果は、本開示の表 2 で概説されるように、熱雑音の数倍の大きさである。

【 0 0 3 9 】

C A S 冷凍庫で使用される電場に相当する静電場は空気分子の不活性表面境界層を破壊し、乾燥時間を劇的に短縮することができる（参考文献 1 1）。同様の効果によって、C A S 冷凍庫内に印加される高電圧静電場は材料表面の不活性気体の表面境界層を破壊して冷却効率を増大する。大和田他の参考文献 2 で示される冷却増強は、實際上それ以前に報告された参考文献 1 1 のものに類似する。従って、D C 又は A C の電場は過冷却のために必要とされる急速除熱を促進することが期待されるが、A C 電場の生成の方が変成器の使用によって確実に容易である。電極へのスパイク状突起の付加は、すでに観察されているように（参考文献 1 1）、可動イオン生成を促進して C A S 効果の冷却を高めるかもしれない。

10

【 0 0 4 0 】

【表 2】

表 2：標準温度及び気圧（S T P）における C A S 冷凍庫の静電成分の大規模エネルギー分析

1.6E-19	J	1 電子ボルト
0.001	M	相互境界層の近似的厚さ
100	kV/m	C A S 冷凍庫で使用される最小 A C 電界強度
100	ボルト	表面境界層間の電界
1.6E-17	J	境界層を横断移動する単一の荷電イオンにより得られるエネルギー
4243	kT	熱境界層中を引きずられる荷電分子の静電エネルギー

20

30

【 0 0 4 1 】

生物学的に沈殿される強磁性物質

本質的により関心のある質問は、冷凍保存への弱い振動磁場の作用の可能なメカニズムに関係がある。当該技術分野で知られているように、振動磁場と物質との間で相互作用効果を生じ得る可能な物理的結合メカニズムは 4 つしかない。例えば、電気誘導、反磁性、常時性、及び強磁性である。しかしながら、数百  $\mu$  T より弱い低周波数場に対しては、強磁性しか役に立たず、他のメカニズムは熱雑音限界よりはるかに低いピーク相互作用エネルギーを有する（このようなメカニズムの復習のためには、例えば参考文献 2 参照）。

40

【 0 0 4 2 】

対照的に、強磁性物質の粒子は背景熱エネルギーの数百倍から数千倍の相互作用エネルギーを有し得る（例えば、参考文献 2 参照）。更に、大和田他（参考文献 2, 3）及びウオウク（参考文献 9）は、広範囲の生物組織内における強磁性物質、主として生物学的に沈殿されるマグネタイト（ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）、の周知の存在（例えば、参考文献 2 3, 2 4, 2 5, 2 6, 2 7, 2 8 及び 3 0 参照）を考察していない。広く複製されているこれらの観測結果（例えば、参考文献 3 1, 3 2, 3 3, 3 4, 3 5, 3 6 参照）は、強磁性物質の一部は動物内の磁気知覚細胞小器官の基であるという仮説を強くサポートしている。更に、人間の脳組織が広範囲にわたって研究されている（例えば、参考文献 3 0, 3 1, 3 2, 3 3, 3 4, 3 5, 3 6, 3 7, 3 8, 3 9, 4 0, 4 1 参照）。しかしながら、参

50

考文献 4 2 及び 4 3 に示されるように、特異性細胞内のマグネタイト沈殿物は広範囲に発見されている。

#### 【 0 0 4 3 】

時々、同様に環境内に偏在し得る無機質由来の一部の強磁性物質（例えば、参考文献 4 4 参照）も生物組織内に入り込み得る（例えば、参考文献 4 5 参照）。典型的な動物組織は  $1 \sim 1000 \text{ ng/g}$  の範囲内の強磁性物質の背景濃度を有し、典型的には約  $4 \text{ ng/g}$  のレベルである。より高レベルの濃度を有する組織は磁気知覚部（magnetoreception）に含まれる宿主細胞と考えられるが、その他は鉄蓄積生成物に関連するかもしれない。あるいはことによると磁気化学的な役割を有することさえある（例えば、参考文献 4 6 参照）。当業者に知られているように、一部の動物の磁場を感知する能力は比較的最近に証明されている。例えば、渡り鳥は磁気知覚器官を有することが証明されている。

10

#### 【 0 0 4 4 】

エデル他による魚の生物マグネタイトを含有する細胞の最近の高分解能研究（例えば、参考文献 4 7 参照）は、個々の細胞が驚くべき磁性を有し、走磁性バクテリアの典型的な細胞の  $100$  倍のマグネタイト濃度を有することを証明している。これらの細胞は地球磁場内で背景熱雑音の  $1500$  倍までの相互作用エネルギーを有する。当業者に知られているように、背景熱雑音エネルギーは  $kT$  程度であり、ここで  $k$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度である。上述した熱雑音の約  $1550$  倍の相互作用エネルギーは  $CAS$  冷凍庫（例えば、参考文献 1 参照）で使用される典型的な磁場（ $0.1 \text{ mT}$ ）内で  $kT$  の約  $4500$  倍である。

20

#### 【 0 0 4 5 】

人間の細胞について実行された研究作業（参考文献 3 9）は大脳皮質及び小脳内に約  $4 \text{ ng/g}$  のマグネタイト（髄膜内の  $10$  倍）の存在を報告している。これらの値は種々の他の動物組織内で超伝導磁気測定により測定される値と同等である（例えば、参考文献 2 7 参照）。上記の参考文献で測定されたレベルの脊椎動物細胞濃度で、典型的な組織の  $1$  グラム当たり約  $100,000$  細胞の最小推定が得られる（本開示の表 3 参照）。

#### 【 0 0 4 6 】

#### 【表 3】

表 3： 組織試料内のマグネトソームクラスタの推定平均間隔

30

4e-09	g	1 グラム当たりの動物組織内の典型的なマグネタイト
4.0	fA/m <sup>2</sup>	最小の鱗マグネタイトサイトの磁気双極子モーメント
4.3E-14	G	1 鱗マグネタイトサイト当たりの単一#ドメインマグネタイトの質量
92000	#/g 又は#/cc	1 グラムの組織当たりのマグネタイトサイトの数
45	#/cm	1 cm に沿うマグネタイトクラスタの数
22	$\mu\text{m}$	マグネタイトクラスタ間の平均間隔

40

#### 【 0 0 4 7 】

更に、このような研究は、マグネタイト含有組織内の細胞の平均距離は強磁性クラスタから  $20 \mu\text{m}$  程度であり得ることを暗に示している。より小さい粒子サイズは対応してより多くの粒子になり且つ最も近いクラスタからより近くなることを暗に示している。

#### 【 0 0 4 8 】

電磁冷凍の改善

50

本開示によれば、C A S 冷凍プロセス中に観測される静電的改善は不活性空気の表面境界効果の簡単な破壊をもたらし、結果としてより効果的な熱輸送プロセスをもたらす。組織からの向上した除熱は観測される超臨界冷却を生成する一つの要因である。続いて、コロナ風の発生を促進する鋭い針先のアレイによる冷凍庫の機能強化が、先行研究（例えば、参考文献 1 1 参照）に見られるように、この効果を増強する。

【 0 0 4 9 】

C A S 仮説の構成要素を試験する試みにおいて、鈴木他（例えば参考文献 1 0 参照）は、磁気処理は熱輸送にかかわるとい主張のみを調査している。このような主張は、試験構成要素の時間 / 温度曲線に何の磁気効果も観測されないために、正しくないことが証明された。組織中に分散された微小強磁性粒子の振動が C A S 冷凍庫の報告された作用に含まれるならば、もしかすると氷晶核生成の抑制のための 2 つの可能なメカニズムが存在するかもしれない。

【 0 0 5 0 】

第 1 のもっとも明白なメカニズムは、これらの粒子は通常は氷晶の形成のための核生成サイトのいくつかとして作用する可能性である。この場合、振動は初期結晶成長にかかわる数百の水分子の凝集を抑制しようとする（例えば、参考文献 4 8 参照）。

【 0 0 5 1 】

第 2 のメカニズム、即ち振動粒子からの低周波数音波は、マグネタイト含有細胞から外へ放射する。物体の外部からの音響波（氷晶の核生成をトリガし得る）と異なり、振動する強磁性粒子に近い音響波は周囲の組織内に空間的に大きな勾配で急速に消散する。これらの勾配は氷晶核生成構造になる水分子の凝集を様々にせん断することにより分裂するように作用し得る（例えば、参考文献 4 8 参照）。

【 0 0 5 2 】

これらの状態のいずれにおいても、強磁性クラスタの周囲の細胞質への機械的結合は、磁気エネルギーを隣接組織へ変換するための重要な機能である。本開示によれば、これらの冷凍庫の磁場印加状態をこの変換のために生物マグネタイトの結合が最大になるように調整することができ、既存の文献はこれが試みられるまで仮説誘導していない。

【 0 0 5 3 】

更に、静磁気バクテリアのこれまでの研究では、マグネトソーム鎖の線形ストリングが細胞の死後急速に複数の塊に崩壊することが知られている（例えば、参考文献 4 9 参照）。強磁性粒子の細長い分布は、それらのより大きな有効表面及び磁気モーメントのために、粒子の球状塊と比較して静磁気エネルギーの音波への変換に有効である。動物組織の岩石磁気特性の詳細な分析は、粒子間磁気相互作用効果を増大させることによって測定されるように、極めて類似の死後効果がそれらの細胞環境内でも働くことも示唆している（例えば、参考文献 2 6 , 2 9 参照）。

【 0 0 5 4 】

本発明によれば、中程度に強い磁場の印加は冷凍プロセス中のマグネトソーム鎖の崩壊を抑制するように作用し、それによって磁場から音響波へのエネルギー変換の効率を高めることができる。強い外部 D C 磁場を印加することによって既に塊にされた粒子の集合を強制的に線形の鎖に再組立てさせ、静かに結晶を小刻みに振動させてそれらが互いに相対的に運動するようにすることもできる。これは、それらを核生成サイトのプールから除去し、外部磁場とのそれらの磁気相互作用を高める。このような「小刻み振動」は、超音波的に、又は D C （静）磁場に直角に整列した A C （振動）磁場の印加によって実行することができる。いくつかの実施形態では、D C 磁場が一方向にマグネトソーム鎖を整列させるとき、A C 磁場を D C 磁場に対して直角方向にするのが有利であり、A C 磁場は鎖を構成する粒子をその整列方向に直角の方向に振動させることができる。例えば、粒子は密接な接触状態になり得るため、整列方向の振動が妨げられるかもしれない。

【 0 0 5 5 】

先行研究（例えば、参考文献 4 9 参照）において、バクテリア (*M. magnetotacticum*) からマグネトソーム鎖の崩壊を抑制するために少なくとも 1 5 m T の静磁場が必要とされる

ことを計算している。このような結果は、透過型電子顕微鏡（TEM）で実験的に評価され、これより強い磁場を印加し、確かに有効であった。

【0056】

冷却中の磁気振動は、実質的に物理的な運動を確実にするために、静磁場に対して直角方向に適切な振幅（例えば静磁場の10%）を有する低周波数AC磁場を印加することによって達成することができる。原理的には、目標組織内に生成される生物マグネタイトの結晶サイズ及び形状の詳細な研究に基づいて、マグネトソーム鎖の崩落の抑制及び各組織の振動のための最適磁気状態を決定することができる。

【0057】

振動磁場成分及び背景磁場が同一平面にある場合、磁性粒子は各振動サイクル中に背景液体に関して2回一時的に休止する。振動磁気成分を第3次元方向にウォブルさせる（静磁場に垂直な平面内で楕円形又は円形に振動させる）と、これらの過渡的休止が除去され、核生成のチャンスを更に抑制することができる。このような円偏光振動磁場の特定の使用は先行技術文献には存在しない。

10

【0058】

本開示によれば、重要な動物組織細胞、例えば血液、精液、又は小さな胎児の冷凍保存を、液体培地に細菌性マグネトソーム等の安定化強磁性粒子を添加し、この磁気音響変換を生起するより多くの分散サイトを与えることによって向上させることができる。

【0059】

上述したように、強磁性粒子は互いに凝集して大きな凝集体になり、磁気振動の極めて有効な変換器にならなくなりやすい。当業者に知られているように、いくつかの実施形態では、磁性流体の調合に日常的に行われているように、凝集を防止するために合成粒子をなにかで被覆する必要があると得る。CAS技術がどのように正常動作するか（及び正常動作する場合の）その基礎的な物理的原理を理解することは冷凍保存のプロセスを改良するための重要なステップである。

20

【0060】

本発明の代表的な実施形態によれば、図1は生物組織（110）が収容される代表的な容器（105）を示す。生物組織は自然に又は人工的に導入された磁性粒子（115）を含有する。DC磁場（120）が印加され、磁性粒子（115）を整列させる。AC磁場（125）がDC磁場（120）に直角に印加される。いくつかの実施形態では、針状電極（130）が存在し、生物組織と電極との間に電圧を印加してイオンを発生させることができる。例えば、針状電極と生物組織との間に電圧差を印加する方法を提供するために、容器内に生物組織と接触する電極を存在させることができる。代わりに、生物組織は単に容器の電圧レベル（例えば、接地レベル）に維持し、針状電極に電圧を印加することができる。

30

【0061】

本発明の代表的な実施形態によれば、図2は組織を冷凍する代表的な方法を示し、該方法は、静磁場を生物組織に印加することによって容器内の生物組織内の磁性粒子を整列させ（205）、静磁場に直角であり、それを中心に2次元又は3次元的に振動する振動磁場を容器内の生物組織に印加することによって生物組織内の磁性粒子を振動させ（210）、静磁場及び振動磁場を活性にしながら生物組織を凍結する（220）。いくつかの実施形態では、イオン風を生成するために針状電極により電圧を印加することができる（215）。

40

【0062】

図2の代表的な方法は追加のステップを含むこともできる。例えば、冷凍前に磁性粒子を生物組織内に導入し、3次元で振動する合成磁場ベクトルを生成するように調整された正弦状に振動する磁場で直交コイルを駆動することができる。

【0063】

本発明において、冷凍素子は容器内の生物組織を冷凍するように構成された任意の装置であり、例えば冷凍庫と呼ぶことができる。

50

## 【 0 0 6 4 】

本発明において、空気境界層は冷凍すべき試料を包囲する空気の層を指す。

## 【 0 0 6 5 】

本発明において、容器内の生物組織に電界を印加するステップは、例えば生物組織を針電極で取り囲み、それらに電圧を印加するステップを指す。結果として、生物組織と針電極との間に電圧差が生成されるとき、電界が生物組織に印加される。

## 【 0 0 6 6 】

本開示にはいくつかの参考文献が引用され、以上で言及され、以下に記載されている。これらのすべての参考文献の開示内容は参照することによりそっくりそのまま本明細書に組み込まれる。

10

## 【 0 0 6 7 】

本発明の多数の実施形態を開示したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく様々な変更をなし得ることは理解されよう。従って、他の実施形態も後記の請求項の範囲に含まれる。

## 【 0 0 6 8 】

上述した実施形態は、開示の実施形態がどのように構成され使用されるかの完全な開示及び説明として当業者に提供され、発明者（達）が発明とみなす範囲を限定する意図はない。

## 【 0 0 6 9 】

本明細書に開示される方法及びシステムを実施する上述した形態の当業者に自明の変更は後記の請求項の範囲内に含まれることを意図している。本明細書で述べたすべての特許及び公開公報は当業者の技術レベルを示している。本開示で引用した全ての参考文献は参照することにより、あたかも各参考文献が参照することによりそっくりそのまま組み込まれているのと同程度に組み込まれている。

20

## 【 0 0 7 0 】

本発明は特定の方法又はシステムに限定されず、変更可能であること勿論であることを理解されたい。また、本明細書で使用する用語は特定の実施形態を記述するためにのみ使用され、限定することを意図していないことも理解されたい。本明細書及び添付の請求項で使用されている単数表現は、特に明記しないかぎり複数の指示対象を含む。用語「複数の」は特に明記しない限り2つ以上の指示対象を含む。特段の定めのない限り、本明細書使用される技術用語及び科学用語は本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者が一般に理解している意味と同じ意味を有する。

30

## 【 0 0 7 1 】

## 参考文献

[1] M. Kaku, T. Kawata, S. Abedini, H. Koseki, S. Kojima, H. Sumi, H. Shikata, M. Motokawa, T. Fujita, J. Ohtani, N. Ohwada, M. Kurita, and K. Tanne, Electric and magnetic fields in cryopreservation: A response. Cryobiology 64 (2012) 304-305.

[2] N. Owada, and S. Kurita, Super-quick freezing method and apparatus therefor, in: U.S.p. office, (Ed.), US 6,250,087 B1, ABI Limited, Chiba, Japan, United States of America, 2001.

40

[3] N. Owada, and S. Saito, Quick freezing apparatus and quick freezing method, in: U.S.p. office, (Ed.), USP 7,810,340 B2, Owada, N., United States of America, 2010, pp. 15.

[4] S.Y. Lee, G.W. Huang, J.N. Shiung, Y.H. Huang, J.H. Jeng, T.F. Kuo, J.C. Yang, and W.C.V. Yang, Magnetic Cryopreservation for Dental Pulp Stem Cells. Cells Tissues Organs 196 (2012) 23-33.

50

- [5] S. Abedini, M. Kaku, T. Kawata, H. Koseki, S. Kojima, H. Sumi, M. Motokawa, T. Fujita, J. Ohtani, N. Ohwada, and K. Tanne, Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. *Cryobiology* 62 (2011) 181-187.
- [6] P.Y. Lin, Y.C. Yang, S.H. Hung, S.Y. Lee, M.S. Lee, M. Chu, and S.M. Hwang, Cryopreservation of human embryonic stem cells by a programmed freezer with an oscillating magnetic field. *Cryobiology* 66 (2013) 256-260. 10
- [7] M. Naito, S. Hirai, M. Mihara, H. Terayama, N. Hatayama, S. Hayashi, M. Matsushita, and M. Itoh, Effect of a Magnetic Field on *Drosophila* under Supercooled Conditions. *Plos One* 7 (2012).
- [8] M. Kaku, H. Kamada, T. Kawata, H. Koseki, S. Abedini, S. Kojima, M. Motokawa, T. Fujita, J. Ohtani, N. Tsuka, Y. Matsuda, H. Sunagawa, R.A.M. Hernandez, N. Ohwada, and K. Tanne, Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. *Cryobiology* 61 (2010) 73-78.
- [9] B. Wowk, Electric and magnetic fields in cryopreservation. *Cryobiology* 64 (2012) 301-303. 20
- [10] T. Suzuki, Y. Takeuchi, K. Masuda, M. Watanabe, R. Shirakashi, Y. Fukuda, T. Tsuruta, K. Yamamoto, N. Koga, N. Hiruma, J. Ichioka, and K. Takai, Experimental Investigation of Effectiveness of Magnetic Field on Food Freezing Process. *Transactions of the Japan Society of Refrigerating and Air Conditioning Engineers* 26 (2009) 371-386.
- [11] A.K. Kobayashi-Kirschvink, and J.L. Kirschvink, Electrostatic enhancement of industrial drying processes. *Ind. Engin. Chem. Proc. Design & Develop.* 25 (1986) 1027-1030. 30
- [12] S.P. Burke, Heat Transfer, in: U.P. Office, (Ed.), Combustion Utilities Corporation, New York, N.Y., United States of America, 1931, pp. 6.
- [13] R.B. Bird, W.E. Stewart, and E.N. Lightfoot, Transport Phenomena, John Wiley & Sons, New York, 1960.
- [14] H.Y. Choi, Electrohydrodynamic condensation heat transfer. *Journal of Heat Transfer* 90 (1968) 98-102. 40
- [15] P.H.G. Allen, Electric stress and heat transfer. *British Journal of Applied Physics* 10 (1959) 347-351.
- [16] P.S. Lykoudis, and C.P. Yu, The influence of electrostrictive forces in natural thermal convection. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 6 (1963) 853-862.
- [17] R. Kronig, and N. Schwarz, On the theory of heat transfer from a wire in an electric field. *Applied Scientific Research Section a-Mechanics Heat Chemical E* 50

ngineering Mathematical Methods 1 (1947) 35-46.

[18] J.D. Cobine, Other Electrostatic Effects and Applications, in: A.D. Moore, (Ed.), Electrostatics and Its Applications, Wiley, New York, 1973, pp. 441-455.

[19] M. Robinson, Convective heat transfer at the surface of a corona electrode. International Journal of Heat and Mass Transfer 13 (1970) 263-274.

[20] E. Bonjour, J. Verdier, and L. Weil, Electroconvection effects on heat transfer. Chem. Eng.Prog. 58 (1962) 63-66. 10

[21] R.K. Adair, Constraints on biological effects of weak extremely-low frequency electromagnetic fields. Phys. Rev. A. 43 (1991) 1039-1048.

[22] J.L. Kirschvink, Constraints on biological effects of weak extremely low-frequency electromagnetic fields comment. Phys. Rev. A. 46 (1992) 2178-2184.

[23] J.L. Gould, J.L. Kirschvink, and K.S. Deffeyes, Bees have magnetic remanence. Science 201 (1978) 1026-1028. 20

[24] H.A. Lowenstam, Magnetite in denticle capping in recent chitons (polyplacophora). Geol. Soc. Am. Bull. 73 (1962) 435-438.

[25] C. Walcott, J.L. Gould, and J.L. Kirschvink, Pigeons have magnets. Science 205 (1979) 1027-1029. [26] M.M. Walker, T.P. Quinn, J.L. Kirschvink, and T. Groot, Production of single-domain magnetite throughout life by sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. J. Exptl. Biol. 140 (1988) 51-63.

[27] J.L. Kirschvink, D.S. Jones, and B.J. McFadden, Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism, Plenum Press, New York, N.Y., 1985. 30

[28] M.M. Walker, J.L. Kirschvink, S.-B.R. Chang, and A.E. Dizon, A candidate magnetic sense organ in the Yellowfin Tuna *Thunnus albacares*. Science 224 (1984) 751-753.

[29] M.M. Walker, J.L. Kirschvink, and A.E. Dizon, Magnetoreception and Magnetite Biomineralization in Fish, in: J.L. Kirschvink, D.S. Jones, and B. McFadden, (Eds.), Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism, Plenum Press, New York, N.Y., 1985, pp. 417-437. 40

[30] F. Brem, A.M. Hirt, M. Winklhofer, K. Frei, Y. Yonekawa, H.G. Wieser, and J. Dobson, Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue. Journal of the Royal Society Interface 3 (2006) 833-841.

[31] J.F. Collingwood, R.K.K. Chong, T. Kasama, L. Cervera-Gontard, R.E. Dunin-Borkowski, G. Perry, M. Posfai, S.L. Siedlak, E.T. Simpson, M.A. Smith, and J. Dobson, Three-dimensional tomographic Imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. Journal of Alzheimers Disease 14 (20 50



08) 235-245.

[32] J.R. Dunn, M. Fuller, J. Zoeger, J. Dobson, F. Heller, J. Hammann, E. Caine, and B.M. Moskowitz, Magnetic material in the Human hippocampus. Brain Research Bulletin 36 (1995) 149-153.

[33] P.P. GrassiSchultheiss, F. Heller, and J. Dobson, Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. Biometals 10 (1997) 351-355.

[34] D. Hautot, Q.A. Pankhurst, and J. Dobson, Superconducting quantum interference device measurements of dilute magnetic materials in biological samples. Review of Scientific Instruments 76 (2005). 10

[35] D. Hautot, Q.A. Pankhurst, CM. Morris, A. Curtis, J. Burn, and J. Dobson, Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease 1772 (2007) 21-25.

[36] Q. Pankhurst, D. Hautot, N. Khan, and J. Dobson, Increased levels of magnetic iron compounds in Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimers Disease 13 (2008) 49-52. 20

[37] J.L. Kirschvink, and J.L. Gould, Biogenic magnetite as a basis for magnetic field sensitivity in animals. Bio Systems 13 (1981) 181-201.

[38] J.L. Kirschvink, M.M. Walker, and C. Deibel, Magnetite-based Magnetoreception. Current Opinion in Neurobiology 11 (2001) 462-467.

[39] J.L. Kirschvink, A. Kobayashi, and B.J. Woodford, Magnetite biomineralization in the human brain. Proceedings of the National Academy of Sciences 89 (1992) 7683-7687. 30

[40] J. Dobson, and P. Grass, Magnetic properties of human hippocampal tissue - evaluation of artefact and contamination sources. Brain Research Bulletin 39 (1996) 255-259.

[41] A. Kobayashi, and J.L. Kirschvink, Magnetoreception and EMF Effects: Sensory Perception of the geomagnetic field in Animals & Humans, in: M. Blank, (Ed.), Electromagnetic Fields: Biological Interactions and Mechanisms, American Chemical Society Books, Washington, DC, 1995, pp. 367-394. 40

[42] A.K. Kobayashi, N. Yamamoto, and J.L. Kirschvink, Studies of inorganic crystals in biological tissue - magnetite in the Human Body. J. Japanese Society of Powder and Powder metallurgy 43 (1996) 1354-1360.

[43] A.K. Kobayashi, N. Yamamoto, and J.L. Kirschvink, Studies of inorganic crystals in biological tissue - magnetite in human tumor. J. Japanese Society of Powder and Powder metallurgy 44 (1997) 294-300.

[44] A.K. Kobayashi, J.L. Kirschvink, and M.H. Nesson, Ferromagnets and EMFs. Na 50

ture 374 (1995) 123-123.

[45] M.M. Walker, J.L. Kirschvink, A.S. Perry, and A.E. Dizon, Methods and Techniques for the Detection, Extraction, and Characterization of Biogenic Magnetite, in: J.L. Kirschvink, D.S. Jones, and B.J. McFadden, (Eds.), Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism, Plenum Press, New York, 1985, pp. 154-166.

[46] J.L. Kirschvink, Rock Magnetism linked to Human Brain Magnetite. EOS, Trans. Am. Geophysical Union 75 (1994) 178-179.

10

[47] S.H.K. Eder, H. Cadiou, A. Muhamad, P.A. McNaughton, J.L. Kirschvink, and M. Winklhofer, Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (2012) 12022-12027.

[48] E.B. Moore, and V. Molinero, Structural transformation in supercooled water controls the crystallization rate of ice. Nature 479 (2011) 506-509.

20

[49] A. Kobayashi, J.L. Kirschvink, C.Z. Nash, R.E. Kopp, D.A. Sauer, L.E. Bertani, W.F. Voorhout, and T. Taguchi, Experimental observation of magnetosome chain collapse in magnetotactic bacteria: Sedimentological, paleomagnetic, and evolutionary implications. Earth and Planetary Science Letters 245 (2006) 538-550.

[50] D. Gunders, Wasted: How America is Losing Up to 40 Percent of Its Food from Farm to Fork to Landfill, NRDC Issue Paper Natural Resources Defense Council, 2012.

【図 1】

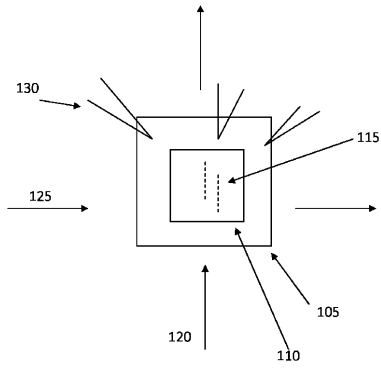
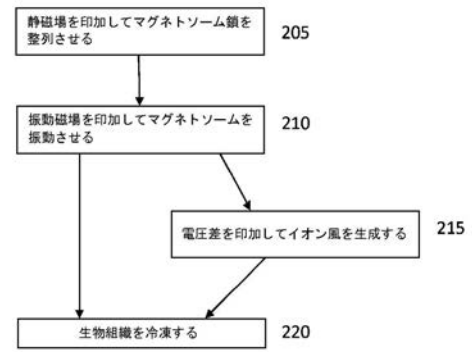




FIG. 1

【図 2】



## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2014/047884</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>A23L 3/36(2006.01)i, A23B 4/06(2006.01)i, A23B 9/10(2006.01)i, A01N 1/02(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23L 3/36; F24F 3/16; F25B 21/00; F25C 1/00; F25D 17/06; F25D 23/00; A23B 4/06; A23B 9/10; A01N 1/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: freezer, biological tissue, static magnetic field, oscillating magnetic field, needle-shaped electrode, voltage		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 7237400 B2 (OWADA, N.) 3 July 2007	1-4
A	See abstract; column 9, lines 25- 65; claims 1-7 and 15-35; figures 1-8.	17-20
Y	LIN, P. Y. et al., 'Cryopreservation of human embryonic stem cells by a programmed freezer with an oscillating magnetic field', Cryobiology, 4 March 2013, Vol. 66, No. 3, pp. 256-260. See abstract; page 256, right column and page 257, left column.	1-4
Y	US 6250087 B1 (OWADA, N. et al.) 26 June 2001	1-4
A	See column 7; claims 1-11; figure 1B.	17-20
Y	US 2009-0199577 A1 (OWADA, N. et al.) 13 August 2009	1-4
A	See abstract; paragraphs [0100]-[0106]; claims 1 and 18-24; figures 1-2. WOWK, B., 'Electric and magnetic fields in cryopreservation', Cryobiology, 10 February 2012, Vol. 64, No. 3, pp. 301-303. See abstract; pages 301-302.	1-4, 17-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 10 November 2014 (10.11.2014)		Date of mailing of the international search report <b>11 November 2014 (11.11.2014)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Jong Kyung Telephone No. +82-42-481-3360 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2014/047884

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 6,8,11-12,15-16  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 6, 8, 11-12 and 15-16 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 5,7,9-10,13-14  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2014/047884**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7237400 B2	03/07/2007	AT 529711 T	15/11/2011
		EP 1447632 A1	18/08/2004
		EP 1447632 A4	28/12/2005
		EP 1447632 B1	19/10/2011
		ES 2371156 T3	28/12/2011
		JP 2003-139460 A	14/05/2003
		US 2005-0005611 A1	13/01/2005
		WO 03-038355 A1	08/05/2003
US 6250087 B1	26/06/2001	AT 362332 T	15/06/2007
		AU 2000-74501 A1	10/05/2001
		AU 779275 B2	13/01/2005
		CA 2353471 A1	12/04/2001
		CA 2353471 C	13/11/2007
		DE 60034868 D1	28/06/2007
		DE 60034868 T2	20/09/2007
		EP 1135999 A1	26/09/2001
		EP 1135999 A4	07/08/2002
		EP 1135999 B1	16/05/2007
		ES 2287031 T3	16/12/2007
		HK 1037305 A1	10/08/2007
		JP 04041673 B2	30/01/2008
		NO 20012685 A	19/07/2001
		NO 20012685 D0	31/05/2001
		NO 317387 B1	18/10/2004
		NZ 512043 A	26/09/2003
		PT 1135999 E	24/08/2007
		RU 2270407 C2	20/02/2006
		WO 01-24647 A1	12/04/2001
US 2009-0199577 A1	13/08/2009	CN 100541079 C	16/09/2009
		CN 101156036 A	02/04/2008
		EG 25055A	20/07/2011
		EP 1867938 A1	19/12/2007
		EP 1867938 A4	02/03/2011
		IL 186160 A	31/08/2011
		IL 186160 D0	20/01/2008
		JP 04385075 B2	16/12/2009
		KR 10-1172104 B1	13/08/2012
		KR 10-2008-0005244 A	10/01/2008
		MX 2007011945 A	16/04/2008
		US 7810340 B2	12/10/2010
		WO 2006-114813 A1	02/11/2006

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, JP, 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

(72)発明者 ジョセフ エル カーシュヴィンク  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91030 サウス パサデナ オーククレスト アヴェニ  
ュー 1415  
Fターム(参考) 4H011 CA01 CB06 CB08 CD06