

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】令和7年7月3日(2025.7.3)

【国際公開番号】WO2024/116681

【出願番号】特願2024-561262(P2024-561262)

【国際特許分類】

G 0 1 N 1/28(2006.01)

G 0 1 N 1/30(2006.01)

G 0 1 N 1/42(2006.01)

G 0 1 N 21/64(2006.01)

G 0 2 B 21/28(2006.01)

G 0 2 B 21/30(2006.01)

G 0 2 B 21/34(2006.01)

G 0 2 B 21/00(2006.01)

C 1 2 M 1/00(2006.01)

10

【F I】

G 0 1 N 1/28 J

G 0 1 N 1/30

G 0 1 N 1/42

G 0 1 N 21/64 E

G 0 2 B 21/28

G 0 2 B 21/30

G 0 2 B 21/34

G 0 2 B 21/00

C 1 2 M 1/00 A

20

【手続補正書】

【提出日】令和7年4月21日(2025.4.21)

【手続補正1】

30

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

寒剤接触領域における液体の体積が、前記寒剤接触領域の外側の前記液体の体積と異なる状態で、前記液体を含む試料を保持する試料ホルダと、

寒剤によって、前記寒剤接触領域にある試料を凍結させる試料凍結手段と、を備えた凍結装置。

40

【請求項2】

前記試料ホルダが、前記寒剤接触領域における前記試料の液面の高さが、前記寒剤接触領域の外側よりも低くなる状態で前記試料を保持している請求項1に記載の凍結装置。

【請求項3】

前記液体の液面の高さを調整する調整機構を有する請求項1、又は2に記載の凍結装置。

【請求項4】

前記試料ホルダに貫通口が設けられており、

前記貫通口から前記液体を吸引することで、前記液体の液面の高さを調整する請求項1、又は2に記載の凍結装置。

50

## 【請求項 5】

前記試料ホルダで囲まれた空間に、前記試料を化学固定するための化学固定剤を供給される第 1 供給口と、

前記空間に、前記試料を染色する染色色素、又は前記染色された試料を脱色する脱色剤を供給する第 2 供給口と、を備えている請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 6】

前記試料ホルダには、前記試料を押さえる試料押さえが設けられており、

前記試料押さえは、前記寒剤接触領域に対応する開口部を有している請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 7】

前記試料の上に設けられた押し当て部材を前記試料に押し当てることで、前記液体の液面の高さを調整する請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 8】

前記試料の凍結後に、前記寒剤を低温に維持する低温維持機構をさらに備えた請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 9】

前記液体の液面の高さを測定する測定機構をさらに備える請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 10】

前記試料の凍結後に、前記試料を凍結状態のまま保存する請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 11】

凍結状態で保存された試料を解凍して、培養する請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置。

## 【請求項 12】

請求項 1、又は 2 に記載の凍結装置と、

前記試料からの光を受光する対物レンズと、を備え、

前記寒剤接触領域が前記対物レンズの視野に対応しており、

前記試料凍結手段が前記対物レンズの視野にある試料を凍結する顕微鏡。

## 【請求項 13】

前記試料の真上に設けられた冷却ブロックをさらに備え、

前記冷却ブロックの内部には、前記冷却ブロックを冷却するための液体を循環する冷却管が設けられており、

前記試料を凍結するための寒剤が通過する貫通穴が設けられ、

前記冷却ブロックは、温度センサ、及びヒータの少なくとも一方が設けられている請求項 12 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 14】

試料ホルダが、寒剤接触領域における試料の液体の体積が、前記寒剤接触領域の外側における液体の体積と異なる状態で、前記液体を含む試料を保持するステップと、

前記寒剤接触領域にある前記試料を寒剤によって凍結させるステップと、を備えた、凍結方法。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の凍結方法によって、対物レンズの視野にある前記試料を凍結するステップと、

前記対物レンズを用いて、前記寒剤接触領域にある凍結した前記試料を観察するステップと、を備えた観察方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 1 】

シリンジ 3 0 0 は試料 S の液面の高さを調整するための調整機構となる。シリンジ 3 0 0 にはマイクロメータ 3 0 1 やネジ機構が設けられている。シリンジ 3 0 0 は、配管チューブ 3 1 0 を介して、第 1 プレート 1 1 0 の貫通穴 1 1 4 に接続されている。貫通穴 1 1 4 は、試料ホルダ 4 0 0 内の試料空間 G 2 に繋がっている。シリンジ 3 0 0 は、試料 S の周囲の試料空間 G 2 の圧力を調整することができる。つまり、マイクロメータ 3 0 1 付きのシリンジ 3 0 0 を動作させることで、試料空間 G 2 の気体を吸入すること、又は試料空間 G 2 に気体を供給することができる。これにより、試料 S のある試料空間 G 2 の気圧を調整することができる。よって、試料ホルダ 4 0 0 の内側にある試料空間 G 2 と、試料ホルダ 4 0 0 の外側の空間との気圧差が生じるため、対物レンズ 2 1 0 の視野 1 4 0 において、試料 S の液面の高さを調整することができる。なお、液面の高さを調整する手法は、気体吸引又は気体供給以外の手法を用いることができる。例えば、後述する試料押さえを用いてもよく、あるいは、液体を吸収する吸収材を用いても良い。吸収材を液体に接触されることで、液面が低くなる。

## 【 手 続 補 正 3 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 7 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 0 7 0 】

リング 0 2 よりも内側にあるスペースが試料ホルダ 4 0 0 の收容空間 1 2 9 となる。收容空間 1 2 9 は、X Y 平面視において、円形の空間となっている。試料ホルダ 4 0 0 が收容空間 1 2 9 上に配置された状態で、試料ホルダ 4 0 0 は第 1 プレート 1 1 0 と第 2 プレート 1 2 0 との間に保持される。收容空間 1 2 9 に試料ホルダ 4 0 0 が收容されることで、視野 1 4 0 に試料 S が配置されている。

## 【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 7 9

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 0 7 9 】

押し当て部材 1 8 0 を試料 S に押し当てることで、液面の高さを調整することができる。押し当て部材 1 8 0 をより押し下げることで、液面の高さが低くなる。そして、液面の高さが所望の高さになった状態で、寒剤投入装置 5 0 0 が寒剤 5 0 1 を投入する。つまり、押し当て部材 1 8 0 の上から、寒剤投入装置 5 0 0 が寒剤 5 0 1 を供給しても、寒剤 5 0 1 が押し当て部材 1 8 0 を介して、試料 S を冷却する。試料 S は、基板 4 0 1 に設置されたものに限られるものではない。例えば、押し当て部材 1 8 0 と基板 4 0 1 の間の空間にマイクロ流路を接続し、観察視野内を流れる試料を観察してもよい。押し当て部材 1 8 0 の上側は、寒剤が接触する寒剤接触領域となる。

## 【 手 続 補 正 5 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 0 5

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 1 0 5 】

寒剤投入装置 7 0 0 は、寒剤容器 7 0 5 と、冷却手段 7 0 3 とを備えている。寒剤容器 7 0 5 は液体の寒剤 7 0 1 を貯留する貯留槽 7 0 5 a を有している。寒剤容器 7 0 5 の内側の空間が、寒剤 7 0 1 を貯留する貯留槽 7 0 5 a となっている。寒剤容器 7 0 5 は断熱容器であってもよい。

## 【 手 続 補 正 6 】

10

20

30

40

50

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

冷却手段703は、貯留槽705aの周りを囲むように配置されている。冷却手段703は、寒剤の材料を冷却して、寒剤701を生成する。さらに冷却手段703は、寒剤容器705内の寒剤701を低温で維持する。なお、冷却手段703は液体窒素に限らず、コンプレッサなどを有する冷凍機であってもよい。つまり、冷却手段703は、寒剤又は容器を冷却する冷凍機を有していてもよい。さらには、冷却手段703は、液体窒素と冷凍機の両方を有していてもよい。

10

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0122

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0122】

供給管422からは、染色色素や脱色剤が試料ホルダ400に供給される。試料ホルダ400内の試料空間G2に染色色素が供給されることで、試料Sが染色される。試料ホルダ400に脱色剤が供給されることで、染色された試料Sが脱色される。また、供給管422の上流側では、試料ホルダ400に供給する脱色剤や染色色素を切り替えることができるように、複数系統の配管が設けられていてもよい。試料ホルダ400に供給する染色色素を切り替えることで、異なる蛍光色素を用いて多重染色することができる。このように、供給管422は、染色色素等の薬液を試料に対して供給することができる。

20

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0143】

そして、試料Sに寒剤を供給して、試料Sを凍結する。例えば、試料基板800の上方には、寒剤投入装置500が設けられている。寒剤投入装置500は寒剤を試料基板800に向けて放出する。これにより、溝801には、細胞S6及び流体S5が凍結した凍結試料S7が形成される。ここでは、実施の形態1～3と同様に、上方から寒剤を供給する。寒剤は、液体でもよく、固体であってもよい。寒剤を試料Sに接触させることで、細胞S6を凍結することができる。そして、凍結試料S7を保存、評価する。

30

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

また、試料基板800を顕微鏡10のステージ上に設置してもよい。ステージに設置された試料基板800に対して寒剤を供給する。これにより、顕微鏡10の視野において、細胞S6を凍結させることができるため、凍結時に試料Sの様子を観察することができる。つまり、ユーザは、細胞S6が凍結する様子を観察することができる。

40

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0185

【補正方法】変更

50

## 【補正の内容】

## 【0185】

## (付記1)

寒剤接触領域における液体の体積が、前記寒剤接触領域の外側の前記液体の体積と異なる状態で、前記液体を含む試料を保持する試料ホルダと、

寒剤によって、前記寒剤接触領域にある試料を凍結させる試料凍結手段と、を備えた凍結装置。

## (付記2)

前記試料ホルダが、前記寒剤接触領域における前記試料の液面の高さが、前記寒剤接触領域の外側よりも低くなる状態で前記試料を保持している付記1に記載の凍結装置。

10

## (付記3)

前記液体の液面の高さを調整する調整機構を有する付記1、又は2に記載の凍結装置。

## (付記4)

前記試料ホルダに貫通口が設けられており、

前記貫通口から前記液体を吸引することで、前記液体の液面の高さを調整する付記1～3のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記5)

前記試料ホルダで囲まれた空間に、前記試料を化学固定するための化学固定剤を供給される第1供給口と、

前記空間に、前記試料を染色する染色色素、又は前記染色された試料を脱色する脱色剤を供給する第2供給口と、を備えている付記1～4のいずれか1項に記載の凍結装置。

20

## (付記6)

前記試料ホルダには、前記試料を押さえる試料押さえが設けられており、

前記試料押さえは、前記寒剤接触領域に対応する開口部を有している付記1～5のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記7)

前記試料の上に設けられた押し当て部材を前記試料に押し当てることで、前記液体の液面の高さを調整する付記1～6のいずれかに1項に記載の凍結装置。

## (付記8)

前記試料の凍結後に、前記寒剤を低温に維持する低温維持機構をさらに備えた付記1～6のいずれか1項に記載の凍結装置。

30

## (付記9)

前記液体の液面の高さを測定する測定機構をさらに備える付記1～8のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記10)

前記試料の凍結後に、前記試料を凍結状態のまま保存する付記1～9のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記11)

凍結状態で保存された試料を解凍して、培養する付記1～10のいずれか1項に記載の凍結装置。

40

## (付記12)

試料の上方に配置され、前記試料に向けて寒剤を放出する放出口を有する寒剤容器と、

前記寒剤容器に対して、寒剤又はその材料を導入するために設けられた導入路と、

前記寒剤容器に設けられ、前記寒剤又はその材料を冷却する冷却手段と、を備えた、付記1～11のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記13)

前記冷却手段が、冷凍機、又は、液体窒素を有している付記12に記載の凍結装置。

## (付記14)

前記放出口の周囲に、前記試料を照明するリング照明光源が設けられている付記12、又は13に記載の凍結装置。

50

(付記 15)

寒剤容器には、前記寒剤の材料が供給され、前記寒剤容器内において、前記寒剤が製造される付記 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の凍結装置。

(付記 16)

寒剤容器には、寒剤を生成するために前記寒剤の材料を攪拌する攪拌機が取り付けられている付記 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の凍結装置。

(付記 17)

寒剤放出口には開閉弁が設けられている付記 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の凍結装置。

(付記 18)

前記開閉弁が、前記試料からの信号又は前記試料を刺激するための信号により開閉制御される付記 17 に記載の凍結装置。

(付記 19)

凹凸が表面に形成された試料凍結用基板に前記試料が保持されている付記 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の凍結装置。

(付記 20)

前記凹凸の凹部の深さが  $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$  である付記 19 に記載の凍結装置。

(付記 21)

前記凹凸の凹部の幅が  $100 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$  である付記 19、又は 20 に記載の凍結装置。

(付記 22)

前記試料凍結用基板に流体を貯留するためのリザーバが形成されている付記 19 ~ 21 のいずれ 1 項に記載の凍結装置。

(付記 23)

上面視において、前記リザーバが、試料凍結用基板の第 1 の方向における端部に形成されており、

試料ホルダの前記第 1 の方向と直交する第 2 の方向に端部に、前記液体を吸引する吸引口が形成されている付記 22 に記載の凍結装置。

(付記 24)

付記 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の凍結装置と、

前記試料からの光を受光する対物レンズと、を備え、

前記寒剤接触領域が前記対物レンズの視野に対応しており、

前記試料凍結手段が前記対物レンズの視野にある試料を凍結する顕微鏡。

(付記 25)

前記試料の真上に設けられた冷却ブロックをさらに備え、

前記冷却ブロックの内部には、前記冷却ブロックを冷却するための液体を循環する冷却管が設けられており、

前記試料を凍結するための寒剤が通過する貫通穴が設けられている付記 24 に記載の顕微鏡。

(付記 26)

前記冷却ブロックは、温度センサ、及びヒータの少なくとも一方が設けられている付記 25 に記載の顕微鏡。

(付記 27)

試料ホルダが、寒剤接触領域における試料の液体の体積が、前記寒剤接触領域の外側における液体の体積と異なる状態で、前記液体を含む試料を保持するステップと、

前記寒剤接触領域にある前記試料を寒剤によって凍結させるステップと、を備えた、凍結方法。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0186

10

20

30

40

50

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0186】

## (付記28)

試料の上方に配置され、前記試料に向けて寒剤を放出する放出口を有する寒剤容器と、前記寒剤容器に対して、寒剤又はその材料を導入するために設けられた導入路と、前記寒剤容器に設けられ、前記寒剤又はその材料を冷却する冷却手段と、を備えた、凍結装置。

## (付記29)

前記冷却手段が、冷凍機、又は、液体窒素を有している付記28に記載の凍結装置。

10

## (付記30)

前記放出口の周囲に、前記試料を照明するリング照明光源が設けられている付記28、又は29に記載の凍結装置。

## (付記31)

前記寒剤容器には、前記寒剤の材料が供給され、前記寒剤容器内において、前記寒剤が製造される付記28～30のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記32)

前記寒剤容器には、寒剤を生成するために前記寒剤の材料を攪拌する攪拌機が取り付けられている付記28～31のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記33)

前記放出口には開閉弁が設けられている付記28～32のいずれか1項に記載の凍結装置。

20

## (付記34)

前記開閉弁が、前記試料からの信号又は前記試料を刺激するための信号により開閉制御される付記33に記載の凍結装置。

## (付記35)

凹凸が表面に形成された試料凍結用基板に前記試料が保持されている付記28～34のいずれか1項に記載の凍結装置。

## (付記36)

前記凹凸の凹部の深さが $50\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ である付記35に記載の凍結装置。

30

## (付記37)

前記凹凸の凹部の幅が $100\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ である付記35、又は36に記載の凍結装置。

## (付記38)

前記試料凍結用基板に液体を貯留するためのリザーバが形成されている付記35～37のいずれ1項に記載の凍結装置。

## (付記39)

上面視において、前記リザーバが、試料凍結用基板の第1の方向における端部に形成されており、

試料ホルダの前記第1の方向と直交する第2の方向に端部に、前記液体を吸引する吸引口が形成されている付記38に記載の凍結装置。

40

## (付記40)

付記28～39のいずれか1項に記載の凍結装置と、

試料を囲むように設けられ、前記放出口から放出された前記寒剤が供給される開口部を有する試料ホルダと、

前記試料ホルダが設置されたステージと、

前記寒剤で凍結された前記試料を観察するために、前記ステージの下側に配置された対物レンズと、を備えた顕微鏡。

## (付記41)

前記試料の温度を調節する温度調節機構をさらに備えた付記40に記載の顕微鏡。

50

(付記 4 2)

前記試料ホルダは、

前記試料ホルダで囲まれた空間に、前記試料を化学固定するための化学固定剤を供給される第 1 供給口と、

前記空間に、前記試料を染色する染色色素、又は前記染色された試料を脱色する脱色剤を供給する第 2 供給口と、を備えている付記 4 0、又は 4 1 に記載の顕微鏡。

(付記 4 3)

前記試料の上に配置された冷却ブロックをさらに備え、

前記冷却ブロックには、前記試料を冷却するための冷却液体が循環する冷却管が設けられており、

前記冷却ブロックには、前記凍結装置からの寒剤が通過する貫通穴が設けられている付記 4 0 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

(付記 4 4)

前記冷却ブロックには、温度センサが設けられている付記 4 3 に記載の顕微鏡。

(付記 4 5)

前記冷却ブロックには、試料を加熱するヒータが設けられている付記 4 4 に記載の顕微鏡。

(付記 4 6)

(1) 顕微鏡の視野にある試料に寒剤を供給して、試料を凍結するステップと、

(2) 凍結された前記試料に化学固定剤を供給して、前記試料を化学固定するステップと、

(3) 化学固定された前記試料に染色色素を供給して、染色するステップと、

(4) 染色された前記試料を、前記顕微鏡で観察するステップと、を備えた観察方法。

(付記 4 7)

(5) 観察後に、前記視野にある前記試料に脱色剤を供給するステップと、

(6) 脱色された試料を、別の染色色素を供給して、前記試料を染色するステップと、を備えた付記 4 6 に記載の観察方法。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 8 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 8 8】

(付記 6 2)

液体を含む試料を保持する試料基板と、

前記液体を吸引するために、試料基板上の空間に接続された吸引口と、

前記吸引口から液体を吸引した後に前記試料に対して寒剤を供給する寒剤供給手段と、を備えた凍結装置。

(付記 6 3)

液体を含む試料を保持する試料ホルダと、

寒剤によって、前記試料を凍結させる試料凍結手段と、を備え、

前記試料ホルダに設けられた貫通口から、前記液体を吸引することで前記液体の高さを調整する凍結装置。

(付記 6 4)

前記試料ホルダが、試料に対して流体を供給する供給口を備えている付記 6 3 に記載の凍結装置。

(付記 6 5)

前記試料凍結手段が、前記試料の上方に配置され、前記試料に向けて寒剤を放出する放出口を有する寒剤容器を備えている付記 6 3、又は 6 4 に記載の凍結装置。

(付記 6 6)

10

20

30

40

50

前記試料凍結手段が、  
前記寒剤容器に対して、寒剤又はその材料を導入するために設けられた導入路と、  
前記寒剤容器に設けられ、前記寒剤又はその材料を冷却する冷却手段と、を備えた、付記 6 5 に記載の凍結装置。

(付記 6 7)

前記試料ホルダは、細胞を含む流体の試料を保持するための凹凸が表面に形成された試料凍結用基板を保持する付記 6 3 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の凍結装置。

(付記 6 8)

前記凹凸の凹部の深さが  $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$  である付記 6 7 に記載の凍結装置。

(付記 6 9)

前記凹凸の凹部の幅が  $100 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$  である付記 6 7、又は 6 8 に記載の凍結装置。

(付記 7 0)

前記試料ホルダが、前記寒剤接触領域における前記試料の液面の高さが、前記寒剤接触領域の外側よりも低くなる状態で前記試料を保持している付記 6 3 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の凍結装置。

(付記 7 1)

前記試料の真上に設けられた冷却ブロックをさらに備え、

前記冷却ブロックの内部には、前記冷却ブロックを冷却するための液体を循環する冷却管が設けられており、

前記試料を凍結するための寒剤が通過する貫通穴が設けられている付記 7 0 に記載の凍結装置。

(付記 7 2)

前記冷却ブロックには、温度センサが設けられている付記 7 1 に記載の凍結装置。

(付記 7 3)

前記冷却ブロックには、試料を加熱するヒータが設けられている付記 7 2 に記載の凍結装置。

(付記 7 4)

付記 6 2 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の凍結装置と、

前記試料からの光を受光する対物レンズを備えた、顕微鏡。

10

20

30

40

50