

(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
2011年1月27日(27.01.2011)

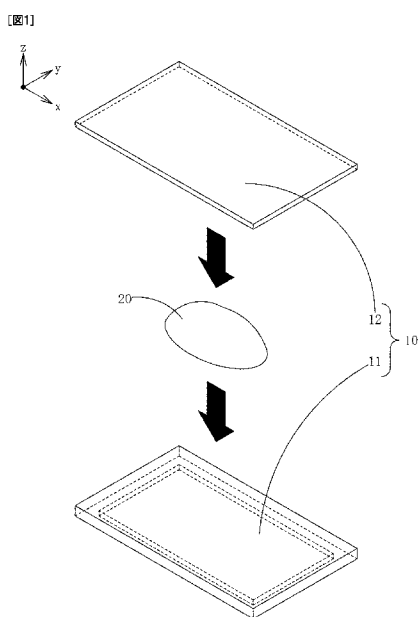
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/010525 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 1/28 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G02B 21/34 (2006.01) G01N 35/04 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060748
 - (22) 国際出願日: 2010年6月24日(24.06.2010)
 - (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 2009-170605 2009年7月21日(21.07.2009) JP
 - (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
 - (72) 発明者; および
 - (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松浦 宏治(MATSUURA, Koji) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中三丁目1番1号 国立大学法人岡山大学異分野融合先端研究コア内 Okayama (JP). 舟橋 弘晃(FUNAHASHI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院自然科学研究科内 Okayama (JP).
 - (74) 代理人: 森 寿夫, 外(MORI, Hisao et al.); 〒7100047 岡山県倉敷市大島505-14 Okayama (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CHAMBER FOR OPTICAL OBSERVATION, METHOD FOR OPTICALLY OBSERVING SAMPLE, AND METHOD FOR MANUFACTURING LOWER TRANSPARENT PLATE

(54) 発明の名称: 光学的観察用チャンバー及び試料の光学的観察方法、並びに下側透明板の製造方法



(57) Abstract: Disclosed is a chamber for optical observation wherein a sample put therein is not only hard to evaporate but also hard to adsorb, and the motility of the sample and the like can be more accurately evaluated. Specifically disclosed is a chamber for optical observation, which is provided with a lower transparent plate for mounting a sample thereon, and an upper transparent plate for covering the upper side of the sample therewith, wherein the lower transparent plate is formed by a material having flexibility, and when the sample is mounted on the central portion of the lower transparent plate and covered with the upper transparent plate, the central portion of the lower transparent plate is dented by the weight thereof and the weight of the sample, and the peripheral edge portion of the lower transparent plate is brought into contact with the upper transparent plate in that state, thereby being able to seal the sample between the upper transparent plate and the lower transparent plate.

(57) 要約: それに入れた試料が蒸発しにくいだけでなく、試料が吸着しにくく、試料の運動性などをより正確に評価することのできる光学的観察用チャンバーを提供する。試料を載せるための下側透明板と、試料の上側に被せるための上側透明板とを備えた光学的観察用チャンバーにおいて、下側透明板を可撓性を有する素材によって形成し、下側透明板の中央部に試料を載せて上側透明板を試料に被せた際に、下側透明板の中央部が自重及び試料の重さによって窪み、その状態で下側透明板の周縁部が上側透明板に接触することにより、上側透明板と下側透明板とで試料を密封できるようにした。



WO 2011/010525 A1

明 細 書

発明の名称：

光学的観察用チャンバー及び試料の光学的観察方法、並びに下側透明板の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、顕微鏡などの光学的観察手段を用いて試料を観察する際に、試料を保持させるのに適した光学的観察用チャンバーと、この光学的観察用チャンバーを用いて行う試料の光学的観察方法と、光学的観察用チャンバーにおける下側透明板を製造するための下側透明板の製造方法とに関する。

背景技術

[0002] 近年、豚や牛を始めとする各種の家畜において、人工授精による品質改良が盛んに行われるようになってきている。人工授精による家畜の品質改良は、優良な家畜の精液を選択的に使用することにより、家畜の改良増進を図るものである。このため、品質改良に供される人工授精用の精液は、市場に流通するよりも前に、その品質検査が行われている。この品質検査における精液の評価基準は様々であるが、重要な評価基準の一つとして、精液に含まれる精子の運動性が挙げられる。精液の運動性を評価するための装置や方法も、各種のものが提案されている。

[0003] 例えば、精液が入れられる精液受容部（チャンバー）内における対向位置に光源と光センサを配した精子活性度評価器が知られている（特許文献1）。この精子活性度評価器は、微弱な光を光源から精液に照射し、その際の散乱光を光センサで検知することにより、精液に含まれる精子の活性度を測定するものとなっている。しかし、この精子活性度評価器では、近似的な精子の数や、多数の精子の全体としての活性度が分かるだけであり、個々の精子の運動性を知ることができない。

[0004] このため、人工授精用の精液の評価においては、顕微鏡によって精液を観察し、それに含まれる個々の精子の運動を評価することが今でも一般的に行

われている。しかし、プレパラートを用いた観察では、スライドガラスとカバーガラスの間隙から精液の水分が蒸発していくため、精液を長時間観察できないという欠点があった。このような問題を解決できるものとして、特許文献2には、カバーガラスの片面における周辺部と、試料保持領域を備えた下部材（スライドガラスなど）の間をシーリング材で接着したプレパラートが提案されている。特許文献2には、前記シーリング材として、細胞などに対する影響の少ないシロキサン結合を主鎖とする高分子溶液（シリコーンアルコール溶液）が好ましい点も記載されている。

[0005] 特許文献2のプレパラートは、試料（細胞など）の蒸発を防ぐことはできるものの、精液を試料として用いた場合には、それに含まれる精子の運動性を正當に評価することができないという欠点があった。というのも、精子は、スライドガラスやカバーガラスに吸着されやすく、この吸着によってその運動が阻害されてしまうからである。

[0006] また、顕微鏡による精液の観察では、専用のチャンバー（米国のダイアグノスティクス社製の「マクラーカウンティングチャンバー」（非特許文献1）が有名）に精液を入れることも行われている。しかし、この種のチャンバーも、ガラスや樹脂といった、精子を吸着しやすい素材で形成されていることには変わらず、精子の運動性を正當に評価できないことに関しては、プレパラートを用いた場合と同様であった。加えて、専用のチャンバーは高価で入手しにくいという欠点もあった。

[0007] このような実状に鑑みてか、これまでには、スライドガラスやカバーガラスの表面に、ウシ血清アルブミンなど、精子が吸着しにくい蛋白質を塗布することも行われている。これにより、スライドガラスやカバーガラスに精子が吸着しないようにすることができるので、精子の運動が前記観察部品に阻害されなくなるという利点がある。しかし、スライドガラスやカバーガラスの表面に蛋白質を均一に塗布することは必ずしも容易ではなく、場所によってむらが生じやすかった。このため、このむらが観察像を不鮮明なものとし、精子の運動性の評価に悪影響を及ぼすおそれがあった。

[0008] ところで、特許文献3には、チャンバーの下面にシリコン膜を配し、そのシリコン膜の上に細胞を載せて観察するようにした顕微鏡用細胞観察装置が記載されている。しかし、特許文献3には、試料として精液を採用することや、試料の蒸発を防ぐための工夫については何ら記載されていない。また仮に、特許文献3の顕微鏡用細胞観察装置のチャンバーに精液を入れて該チャンバーの上面に蓋をし、精液の蒸発を防いだとしても、その蓋で精液を薄く引き伸ばすことができないため、精液の厚さが場所によって不均一になってしまう。したがって、多数の精子が上下に重なったり、顕微鏡の焦点が合わないことなどにより、個々の精子の運動性を正確に評価することができないといった不具合が生じるおそれもある。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特開2007-017417号公報
特許文献2：特開2004-229548号公報
特許文献3：特開2009-025630号公報

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：“MAKLER COUNTING CHAMBER”、[Online]、MidAtlantic DIAGNOSTICS, INC.、[平成21年6月11日検索]、インターネット<<http://www.midatlanticdiagnostics.com/documentation/pdf/makler/MaklerCountingChamber.pdf>>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 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、それに入れた試料が蒸発しにくだけでなく、試料が吸着しにくく、試料の運動性などをより正確に評価することのできる光学的観察用チャンバーを提供するものである。特に、精液に含まれる精子など、ガラスやプラスチックに吸着しやすい物質を含む試料の光学的観察を行う際に好適に使用することのできる光学

的観察用チャンバーを提供することを目的とする。また、簡素な構造で製造が容易であり、低価格で入手でき、取り扱いも容易な光学的観察用チャンバーを提供することも本発明の目的である。さらに、この光学的観察用チャンバーを用いて行う試料の観察方法を提供することも本発明の目的である。さらにまた、この光学的観察用チャンバーにおける下側透明板を容易に製造するための下側透明板の製造方法を提供することも本発明の目的である。

課題を解決するための手段

- [0012] 上記課題は、試料を載せるための下側透明板と、試料の上側に被せるための上側透明板とを備えた光学的観察用チャンバーであって、下側透明板が可撓性を有する素材によって形成され、下側透明板の中央部に試料を載せて上側透明板を試料に被せた際に、下側透明板の中央部が自重及び試料の重さによって窪み、その状態で下側透明板の周縁部が上側透明板に接触することにより、上側透明板と下側透明板とで試料を密封できるようにしたことを特徴とする光学的観察用チャンバーを提供することによって解決される。
- [0013] これにより、上側透明板と下側透明板という2つの単純な部材のみで、試料を密封することが可能になる。したがって、製造が容易で低価格で入手でき、取り扱いが容易でありながらも、試料が蒸発しにくく、精液などの蒸発しやすい試料であっても長時間観察することのできる光学的観察用チャンバーを提供することが可能になる。本発明の光学的観察用チャンバーにおいて、上側透明板は、特に可撓性を要求されないが、この上側透明板も、可撓性を有する素材によって形成すると好ましい。これにより、上側透明板と下側透明板の密封性をさらに高めることが可能になる。
- [0014] また、本発明の光学的観察用チャンバーにおいて、下側透明板の下面における周縁部から下方に突出して脚部を設け、下側透明板に試料を載せた際に、下側透明板の自重及び試料の重量によって下側透明板の中央部が押し下げられるようにすると好ましい。このように、下側透明板の中央部が沈み込むようにすることで、試料に被せる上側透明板の撓み量を大きく確保できない場合であっても、上側透明板と下側透明板とで試料を好適に密封することが

可能になる。

[0015] このとき、下側透明板の平面視形状は、特に限定されない。しかし、下側透明板の平面視形状は、長方形や楕円形など、ある一方向における長さ、該一方向に直交する他の方向の長さとは異なる形状とし、前記脚部を下側透明板の周縁部に沿って設けると好ましい。例えば、下側透明板を平面視略矩形状とし、前記脚部を下側透明板の周縁部に沿って平面視略矩形状に設けた場合などが該当する。これにより、下側透明板における試料を保持させる空間（試料保持領域）に異方性を持たせることが可能になる。したがって、後述するように、試料に含まれる精子の移動する方向などを操作しやすくして、精子の運動性の評価をより容易に行うことも可能になる。

[0016] 本発明の光学的観察用チャンバーにおいて、上側透明板や下側透明板の素材は、透明で可撓性を有するものであれば特に限定されない。しかし、上側透明板や下側透明板を撥水性に乏しい素材で形成してしまうと、上側透明板や下側透明板に試料（運動精子など）が吸着されやすくなり、観察対象の運動性などを正確に観察できなくなるおそれがある。このため、上側透明板及び／又は下側透明板は、水接触角 70° 以上の素材によって形成すると好ましい。上側透明板及び／又は下側透明板の水接触角は、 80° 以上であるとより好ましく、 90° 以上であるとさらに好ましい。

[0017] 上側透明板や下側透明板には、このように撥水性に優れた各種の素材を使用することができる。しかし、精子や細胞などの生体（運動性物質）が試料に含まれる場合には、上側透明板や下側透明板には、撥水性だけでなく、それらの生体に害を与えない素材であることが要求される。このような素材としては、具体的に、シロキサン結合による主骨格を持つシリコーンエラストマーなどが例示される。シリコーンエラストマーは、透明で可撓性を有していることに加えて、撥水性に優れて精子などを吸着せず、さらに精子などに害を及ぼす心配もないので、上側透明板や下側透明板の素材として好適に用いることができる。

[0018] ところで、上記課題は、下側透明板と上側透明板とを備えた光学的観察用

チャンバーに試料を挟んだ状態で該試料を光学的観察手段によって観察する試料の光学的観察方法であって、可撓性を有する素材によって形成した上側透明板を試料に被せて、上側透明板の周縁部を自重によって垂れ下がらせて下側透明板に接触させることにより、上側透明板と下側透明板とで試料を密封した状態で試料を観察することを特徴とする試料の光学的観察方法を提供することによっても解決される。この光学的観察方法は、上述した本発明の光学的観察用チャンバーを用いて好適に行うことができる。

[0019] また、上記課題は、試料を載せるための下側透明板と、試料の上側に被せるための上側透明板とを備えた光学的観察用チャンバーにおける下側透明板の製造方法であって、脚部形成用凹部が設けられた下側透明板成形用型枠に透明な熱硬化性樹脂を未硬化の状態で流し込んだ後、熱硬化性樹脂を下側透明板成形用型枠とともに加熱して硬化させることにより、脚部形成用凹部で下側透明板の下面における周縁部から下方に突出した脚部を形成することを特徴とする下側透明板の製造方法を提供することによっても解決される。これにより、上述した本発明の光学的観察用チャンバーにおける下側透明板を容易かつ低コストで製造することが可能になる。また、下側透明板を大量生産することも容易となる。

[0020] 下側透明板成形用型枠は、それに設けられた脚部形成用凹部によって、下側透明板の下面における周縁部から下方へ突出した脚部を形成できるものであれば特に限定されない。しかし、下側透明板成形用型枠として、その脚部形成用凹部の底部に複数本の微細な溝が形成されたものを用いると好ましい。これにより、硬化後の熱硬化性樹脂（下側透明板）を下側透明板成形用型枠から剥がしやすくすることが可能になる。したがって、下側透明板の製造方法をより大量生産に適したものとすることが可能になる。また、下側透明板を下側透明板成形用型枠から剥がす際に下側透明板が破れにくくなるので、歩留まりを向上することも可能になる。

発明の効果

[0021] 以上のように、本発明によって、それに入れた試料が蒸発しにくいだけで

なく、試料が吸着しにくく、試料の運動性などをより正確に評価することのできる光学的観察用チャンバーを提供することが可能になる。この本発明の光学的観察用チャンバーは、特に、精液に含まれる精子など、ガラスやプラスチックに吸着しやすい物質を含む試料の光学的観察を行う際に好適に使用することができる。また、簡素な構造で製造が容易であり、低価格で入手でき、取り扱いも容易である。さらに、本発明の光学的観察用チャンバーを用いて行う試料の観察方法を提供することも可能になる。さらにまた、この光学的観察用チャンバーにおける下側透明板を容易に製造するための下側透明板の製造方法を提供することも可能になる。

図面の簡単な説明

- [0022] [図1]本発明の光学的観察用チャンバーにおける下側透明板と上側透明板とを分離した状態を示した斜視図である。
- [図2]本発明の光学的観察用チャンバーにおける下側透明板を裏返した状態を示した斜視図である。
- [図3]本発明の光学的観察用チャンバーに試料を密封している途中の状態を示した斜視図である。
- [図4]本発明の光学的観察用チャンバーに試料を密封した状態を中心部で切断した状態を模式的に示した断面図である。
- [図5]比較例のプレパラートを作製してから15分経過後の精子運動解析装置の解析画像を撮影した写真である。
- [図6]実施例のプレパラートを作製してから15分経過後の精子運動解析装置の解析画像を撮影した写真である。
- [図7]運動性物質の移動経路線から精子の直進速度と頭部振幅を求めるアルゴリズムを説明する図である。
- [図8]比較例のプレパラートを作製した直後における試料中の運動性物質の直進速度の分布（折れ線A）と、比較例のプレパラートを作製してから15分経過後における試料中の運動性物質の直進速度の分布（折れ線B）と、実施例のプレパラートを作製してから15分経過後における試料中の運動性物質

の直進速度の分布（折れ線C）と、をそれぞれ示したグラフである。

[図9]比較例のプレパラートを作製した直後における試料中の運動性物質の頭部振幅の分布（折れ線D）と、比較例のプレパラートを作製してから15分経過後における試料中の運動性物質の頭部振幅の分布（折れ線E）と、実施例のプレパラートを作製してから15分経過後における試料中の運動性物質の頭部振幅の分布（折れ線F）と、をそれぞれ示したグラフである。

[図10]本発明の光学的観察用チャンバーを構成する下側透明板を成形する際に用いる下側透明板成形用型枠を示した斜視図である。

[図11]下側透明板成形用型枠の脚部形成用凹部の底部に設けられた微細な溝を該溝に垂直な面で切断した状態を示した断面図である。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明の光学的観察用チャンバーの好適な実施態様について、図面を用いてより詳しく説明する。図1は、本発明の光学的観察用チャンバー10における下側透明板11と上側透明板12とを分離した状態を示した斜視図である。図2は、本発明の光学的観察用チャンバー10における下側透明板11を裏返した状態を示した斜視図である。図3は、本発明の光学的観察用チャンバー10に試料20を密封している途中の状態を示した斜視図である。図4は、本発明の光学的観察用チャンバー10に試料20を密封した状態を中心部で切断した状態を模式的に示した断面図である。

[0024] 本実施態様の光学的観察用チャンバー10は、図1に示すように、試料20を載せるための下側透明板11と、試料20の上側に被せるための上側透明板12とを備えたものとなっている。下側透明板11と上側透明板12はいずれも、可撓性を有する素材によって形成されている。

[0025] 下側透明板11と上側透明板12の素材は、透明性と可撓性を兼ね備えたものであれば特に限定されない。下側透明板11と上側透明板12の素材は、試料20の種類に応じて適宜決定される。本実施態様の光学的観察用チャンバー10は、試料20として精液を想定したものとなっており、下側透明板11と上側透明板12は、シロキサン結合による主骨格を持つシリコーン

エラストマーで形成されたものとなっている。このため、下側透明板 11 と上側透明板 12 は、透明性と可撓性に優れているだけでなく、撥水性にも優れ、精子などの運動性物質（ガラスには吸着するガラス吸着性物質）を吸着しにくいものとなっている。また、精子などの生体にも無害なものとなっている。

[0026] 下側透明板 11 や上側透明板 12 を形成する方法は、特に限定されないが、例えば、以下の方法が挙げられる。

[1] ポリアルキルアルケニルシロキサンと白金化合物からなる混合液（例えば、ジーイー東芝シリコン株式会社製の T S E 3 0 3 2（A 液））とポリアルキルアルケニルシロキサン及びポリアルキル水素シロキサンからなる混合液（例えば、ジーイー東芝シリコン株式会社製 T S E 3 0 3 2（B 液））とを所定の比率（例えば 10 対 1）で混合する。

[2] 上記 [1] で得られた混合液を真空デシケータ内で脱泡する。

[3] 上記 [2] で脱泡された混合液をスピコーター（例えば、ミカサ株式会社製の O p t i c o a t M S - A 1 0 0）を使用して薄膜にする。

[4] 上記 [3] で得られた薄膜に上から型枠を接着させた後、オーブンに入れて、所定温度（例えば 70℃）で所定時間（例えば 1 時間）加熱して硬化させる。

[5] 上記 [4] で硬化した薄膜を所定寸法に切断する。

この方法は、非常に容易に下側透明板 11 と上側透明板 12 を成形できるという利点がある。

[0027] また、上記 [3] 以降の工程を、

[3'] 上記 [2] で脱泡された混合液を、鏡面加工が施された型枠に流し込む。

[4'] 上記 [3'] で混合液が流し込まれた型枠をオーブンに入れて、所定温度（例えば 70℃）で所定時間（例えば 1 時間）加熱して硬化させる。

[5'] 上記 [4'] で硬化して薄膜状となった混合液を型枠から剥がし

取る。

という工程で差し替えても、下側透明板 11 や上側透明板 12 を成形することができる。この方法は、後述するように、下側透明板 11 に脚部 11a があるなど、下側透明板 11 や上側透明板 12 が複雑な形状を有する場合にも好適に使用できる。また、上記 [3'] で使用する型枠として、血球計算盤を使用すれば、下側透明板 11 や上側透明板 12 に血球計算盤の目盛りを転写することができ、後述する精子運動解析装置などを使用しなくても、精子の運動を解析することができるようになるという利点もある。

[0028] 本実施態様の光学的観察用チャンバー 10 において、下側透明板 11 は、上記 [3'] における型枠として、図 10 と図 11 に示す下側透明板成形用型枠 100 を用いて成形している。図 10 は、本発明の光学的観察用チャンバー 10 を構成する下側透明板 11 を成形する際に用いる下側透明板成形用型枠 100 を示した斜視図である。図 11 は、下側透明板成形用型枠 100 の脚部形成用凹部 110 の底部に設けられた微細な溝 111 を溝 111 に垂直な面で切断した状態を示した断面図である。この下側透明板成形用型枠 100 は、図 10 に示すように、盤状のものとなっており、その片面に、下側透明板 11 (図 2 を参照。) における下面の周縁部に脚部 11a を形成するための脚部形成用凹部 110 と、下側透明板 11 における下面の中央部 11b に窪みを形成するための中央部形成用凸部 120 と、下側透明板成形用型枠 100 の外周部を囲う枠部 130 とが設けられたものとなっている。本実施態様の下側透明板成形用型枠 100 において、脚部形成用凹部 110 は格子状に設けられており、格子状の脚部形成用凹部 110 によって区切られた部分が中央部形成用凸部 120 となっている。脚部形成用凹部 110 は、縦方向に平行に 5 本、横方向に平行に 5 本、溝状に設けられており、中央部形成用凸部 120 は、平面視矩形のものが 4 行 4 列に形成されており、一つの下側透明板成形用型枠 100 で一度に 16 個の下側透明板 11 を成形できるようになっているが、この態様に限定されるものでなく、溝状の脚部形成用凹部 110 の本数や、形成される中央部形成用凸部 120 の個数は、適宜変

更することができる。

[0029] 下側透明板成形用型枠 100 は、未硬化の熱硬化性樹脂を成形できるものであれば、特に限定されないが、金属板の片面に切削加工（フライス加工など）を施すことにより、脚部形成用凹部 110 となる溝を形成したものを採用すると好ましい。この場合、切削された溝の底部には、フライス加工機などの切削装置における回転切削刃が切削する際に形成される多数本の微細溝が形成されるが、鏡面加工などを施すことなく、削り出したままの状態としておくことが好ましい。このように、溝の底部に多数の微細溝を残しておくことにより、熱硬化性樹脂と下側透明板成形用型枠 100 の接触面積を減らし、下側透明板 11 の脚部 11a の底面を下側透明板成形用型枠 100 に貼り付きにくくすることができるので、硬化後の下側透明板 11 を下側透明板成形用型枠 100 から剥がしやすくすることができる。本実施態様の下側透明板成形用型枠 100 も、図 10 に示すように、脚部形成用凹部 110 の底部に、回転切削刃が脚部形成用凹部 110 を切削した際に形成された多数の微細溝 111 が残ったままの状態のものを使用している。

[0030] 下側透明板成形用型枠 100 の脚部形成用凹部 110 の底部に形成する微細溝 111 のピッチ P（微細溝 111 の隣り合う山部 111a の間隔。図 11 を参照。）や高さ（深さ）H（微細溝 111 の谷部 111b から山部 111a の高さ。図 11 を参照。）は、特に限定されない。ピッチ P や高さ H は、回転切削刃の形状や送り速度を変えることにより、変更することができる。しかし、微細溝 111 のピッチ P を狭くするのは限界があるため、ピッチ P は、通常、 $0.55\mu\text{m}$ 以上とされる。ピッチ P は、 $1\mu\text{m}$ 以上であると好ましく、 $2\mu\text{m}$ 以上であるとより好ましい。一方、ピッチ P を広くしすぎると、未硬化の熱硬化性樹脂が微細溝 111 の谷部 111b に入りこむようになり、逆に、硬化後の下側透明板 11 を下側透明板成形用型枠 100 から剥がしにくくなるおそれがある。このため、ピッチ P は、通常、 $100\mu\text{m}$ 以下とされる。ピッチ P は、 $50\mu\text{m}$ 以下であると好ましく、 $20\mu\text{m}$ 以下であるとより好ましい。また、微細溝 111 の高さ H を低くしすぎると、未

硬化の熱硬化性樹脂が微細溝 111 の谷部 111 b に入りこむようになり、やはり、硬化後の下側透明板 11 を下側透明板成形用型枠 100 から剥がしにくくなるおそれがある。このため、高さ H は、通常、 $0.5 \mu\text{m}$ 以上とされる。高さ H は、 $1 \mu\text{m}$ 以上であると好ましく、 $2 \mu\text{m}$ 以上であるとより好ましい。一方、高さ H を高くしすぎると、微細溝 111 の山部 111 a が強度的に脆弱になるおそれがある。このため、高さ H は、通常、 $100 \mu\text{m}$ 以下とされる。高さ H は、 $50 \mu\text{m}$ 以下であると好ましく、 $20 \mu\text{m}$ 以下であるとより好ましい。

[0031] 下側透明板 11 や上側透明板 12 の形状は、特に限定されない。本実施態様の光学的観察用チャンバー 10 においては、図 1 に示すように、下側透明板 11 と上側透明板 12 は、いずれも略矩形の板状体となっている。このうち、上側透明板 12 は、その上下面が平坦に形成されているものの、下側透明板 10 は、図 2 に示すように、その下面の周縁部に他の部分よりも突き出した脚部 11 a が設けられている。脚部 11 a は、略矩形状の下側透明板 11 の四辺部の全周に沿って環状に設けられている。これにより、下側透明板 11 と上側透明板 12 とで試料 20 をより密封しやすくすることが可能となっている。すなわち、図 4 に示すように、下側透明板 11 の中央部 11 b に試料 20 を載せた際に、下側透明板 11 の中央部 11 b が、その自重及び試料 20 の重さによって下側に窪みやすくなるため、下側透明板 11 の周縁部と上側透明板 12 の周縁部とが密着しやすくなる。試料 20 の上側に被せられた上側透明板 12 は、試料 20 の上面形状に沿って撓む。

[0032] この際、試料 20 が厚く、試料 20 の最も高い点の下側透明板 11 の周縁部よりも高く突き出した状態となっている場合には、図 4 に示すように、上側透明板 12 は、その周縁部が垂れ下がって下側透明板 11 の周縁部に密着する。逆に、試料 20 が薄く、試料 20 における最も高い点の下側透明板 11 の周縁部よりも低くなっている場合には、上側透明板 12 の中央部が下方へ窪み、上側透明板 12 の周縁部が高くなった状態で下側透明板 11 の周縁部に密着する。いずれの場合も、下側透明板 11 の周縁部と上側透明板 12 の

周縁部は、密着した状態となり、それに密封された試料 20 が蒸発するのを防ぐことができる。

[0033] また、下側透明板 11 と上側透明板 12 を略矩形状としたことによって、試料 20 に含まれる運動性物質（精子など）の移動する方向を操作しやすくして、精子の運動性の評価をより容易に行うことも可能になる。すなわち、図 3 に示すように、試料 20 に対して上側透明板 12 を x 軸負側から x 軸正側へ被せていくと、試料 20 に含まれる精子は x 軸負側から x 軸正側へ移動するものが増えるのであるが、下側透明板 11 を略矩形状とし、その長軸方向が上側透明板 12 を被せる方向と一致するようにすることによって、精子の運動を長時間観察することができるようになる。

[0034] 下側透明板 11 と上側透明板 12 の各辺の長さは、試料 20 の種類や、使用する顕微鏡の種類などによっても異なり、特に限定されないが、通常、その一辺が 5 ~ 50 mm、好ましくは 10 ~ 30 mm 程度とされる。また、下側透明板 11 と上側透明板 12 の厚さは、それを形成する素材によっても異なり、その透明性や可撓性を阻害しない程度であれば特に限定されないが、通常、10 μ m ~ 2 mm、好ましくは 50 μ m ~ 1 mm、より好ましくは、100 ~ 500 μ m、さらに好ましくは 150 ~ 300 μ m とされる。本実施態様の光学的観察用チャンバー 10 において、下側透明板 11 と上側透明板 12 はいずれも、縦の長さ（図 1 の y 軸方向の長さ）が 15 mm、横の長さ（図 1 の x 軸方向の長さ）が 10 mm で、その厚さ（下側透明板 11 におけるはその中央部 11 b の厚さ）は約 200 μ m となっている。

[0035] 下側透明板 11 における中央部 11 b の凹み（観察部）の寸法も、特に限定されないが、小さくしすぎると、試料 20 を狭い範囲でしか観察できなくなる。このため、下側透明板 11 における観察部の短辺の長さは、通常、2 mm 以上とされる。観察部の短辺の長さは、5 mm 以上であると好ましく、7 mm 以上であるとより好ましい。同様の理由で、観察部の長辺の長さは、通常、5 mm 以上とされる。観察部の長辺の長さは、6 mm 以上であると好ましく、7 mm 以上であるとより好ましい。一方、観察部の寸法を大きくし

すぎると、使用する熱可塑性樹脂の量が多くなり経済的でないばかりか、下側透明板 11 の当該部分が破れやすくなるなどの不具合が生じるおそれもある。加えて、試料 20 の観察のしやすさに関しても大きなメリットはなくなる。このため、観察部の短辺の長さは、通常、20 mm 以下とされる。観察部の短辺の長さは、15 mm 以下であると好ましく、10 mm 以下であるとより好ましい。同様の理由で、観察部の長辺の長さは、通常、40 mm 以下とされる。観察部の長辺の長さは、30 mm 以下であると好ましく、20 mm 以下であるとより好ましい。

[0036] 下側透明板 11 における中央部 11 b の凹み（観察部）の短辺の長さ（ L_1 とする。）に対する長辺の長さ（ L_2 とする。）の比（ L_2/L_1 ）は、1 よりも大きければ特に限定されない。しかし、上述したように精子の運動を操作するためには、比（ L_2/L_1 ）は、1.2 以上とすると好ましい。比（ L_2/L_1 ）は、1.5 以上であるとより好ましく、1.7 以上であるとさらに好ましい。一方、比（ L_2/L_1 ）を大きくしすぎてもあまり意味がない。このため、比（ L_2/L_1 ）は、通常、10 以下とされる。比（ L_2/L_1 ）は、5 以下であると好ましく、3 以下であるとより好ましい。本実施態様の光学的観察用チャンバー 10 において、下側透明板 11 における観察部の短辺の長さは 5 mm、比（ L_2/L_1 ）は 2 となっている。

[0037] 下側透明板 11 における脚部 11 a の高さは、下側透明板 11 の寸法などによっても異なり、特に限定されない。しかし、脚部 11 a を低くしすぎると、脚部 11 a を設けた意義がなくなってしまう。このため、脚部 11 a の高さは、通常、50 μm 以上とされる。脚部 11 a の高さは、100 μm 以上であると好ましく、150 μm 以上であるとより好ましい。一方、脚部 11 a が高すぎると、下側透明板 11 が歪な形に変形しやすくなるおそれがある。また、下側透明板 11 の設置安定性が悪くなるおそれがある。このため、脚部 11 a の高さは、通常、1 mm 以下とされる。脚部 11 a の高さは、500 μm 以下であると好ましく、300 μm 以下であるとより好ましい。本実施態様の光学的観察用チャンバー 10 において、脚部 11 a の高さは、

約200 μ mとなっている。

[0038] また、下側透明板11と上側透明板12とで挟んだ際の試料20の厚さ（最も厚い部分の厚さ。以下同じ。）も肝要である。というのも、試料20が薄くなりすぎると、試料20が存在しない場所ができて観察を適切に行えなくなるおそれがある。このため、試料20の厚さは、通常、5 μ m以上とされる。試料20の厚さは、50 μ m以上であると好ましく、100 μ m以上であるとより好ましい。一方、試料20が厚くなりすぎると、使用する顕微鏡などの光学的観察手段の被写界深度を超えた場所にも試料20が存在するようになり、観察画像が不鮮明になるおそれがある。このため、試料20の厚さは、通常、1mm以下とされる。試料20の厚さは、700 μ m以下であると好ましく、500 μ m以下であるとより好ましい。

[0039] 続いて、本発明の光学的観察用チャンバーの効果を調べるために、スライドガラスとカバーガラスに試料を挟んで作製したプレパラート（比較例）と、本発明の光学的観察用チャンバーに試料を密封して作製したプレパラート（実施例）とを用いて、前記試料に含まれる各運動性物質の運動性を評価する実験を行った。比較例のプレパラートにおけるスライドガラスとカバーガラスの水接触角は、約30°である。一方、実施例のプレパラートにおける本発明の光学的観察用チャンバーの下側透明板と上側透明板の水接触角は、約100°である。また、比較例と実施例のいずれの場合においても、ポリビニルアルコール（PVA）を含有するHEPES-緩衝タイロドの乳酸（TL-HEPES）培養液で5倍に希釈した豚の精液（2 μ L）を試料として用いた。したがって、ここでいう「運動性物質」とは「豚の精子」のことである。

[0040] 本実験においては、比較例のプレパラートと実施例のプレパラートのそれぞれが精子（運動性物質）の直進速度と頭部振幅にどのような影響を及ぼすかについて調べてみた。精子の直進速度及び頭部振幅は、比較例と実施例のそれぞれのプレパラートを顕微鏡のステージ上のスライドガラス30（図4の符号30）に載せ、該顕微鏡の観察画像を、精子運動解析装置（Sper

m Motility Analysis System: SMAS) で解析することにより求めた。顕微鏡は、正立顕微鏡（例えば、オリンパス株式会社製の生物顕微鏡 C X 4 1）を用いてもよいが、ここでは、倒立顕微鏡（株式会社ニコン製のエクリップス）を用いた。精子運動解析装置は、加賀電子株式会社製のものを用いた。倒立顕微鏡のレンズには、株式会社ニコン製の 10 倍対物レンズ（品名：BM10×A）を使用した。スライドガラスには、松浪硝子工業株式会社製のものを用いた。

[0041] 図 5 は、比較例のプレパラートを作製してから 15 分経過後の精子運動解析装置の解析画像を撮影した写真である。図 6 は、実施例のプレパラートを作製してから 15 分経過後の精子運動解析装置の解析画像を撮影した写真である。図 5 と図 6 においては、当該解析画像が撮影された直前の 1 秒間に亘る各精子の運動軌跡が線で示されてある。以下においては、精子の運動軌跡を表すこの線のことを「移動経路線」と呼ぶ。

[0042] 図 7 は、精子（運動性物質）の移動経路線から精子の直進速度と頭部振幅を求めるアルゴリズムを説明する図である。精子の直進速度は、図 7 に示すように、精子の移動経路線の始点と終点とを結ぶ線分（直進経路）の長さを求め、該直進経路の長さを、精子が前記始点から終点に至るまでに要した時間（本実験においては最大 1 秒間）で序することによって求める。この方法によって、各精子の直進速度を求め、その分布を求めた。また、精子の頭部振幅は、図 7 に示すように、移動経路線の包絡線の間隔を測定することにより求めた。この方法によって、各精子の頭部振幅を求め、その分布を求めた。

[0043] 図 8 は、
比較例のプレパラートを作製した直後における精液（試料）中の精子（運動性物質）の直進速度の分布（折れ線 A）と、
比較例のプレパラートを作製してから 15 分経過後における精液（試料）中の精子（運動性物質）の直進速度の分布（折れ線 B）と、
実施例のプレパラートを作製してから 15 分経過後における精液（試料）

中の精子（運動性物質）の直進速度の分布（折れ線C）と、
をそれぞれ示したグラフである。このうち、折れ線Aの直進速度の分布は、
プレパラートを作製した直後において、上述した方法と同様の方法で精子の
直進速度を求めることにより得たものである。

[0044] 図8の折れ線Aを見ると、直進速度が $5\ \mu\text{m}/\text{s}$ 未満の精子が約2%、直
進速度が $5\sim 10\ \mu\text{m}/\text{s}$ 未満の精子が約4%と、直進速度の遅い精子が非
常に少ないことが分かる。折れ線Aにおいては、直進速度が $10\sim 15\ \mu\text{m}/\text{s}$ 、
 $15\sim 20\ \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $20\sim 25\ \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $25\sim 30\ \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $30\sim 35\ \mu\text{m}/\text{s}$ 、
 $35\sim 40\ \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $40\sim 45\ \mu\text{m}/\text{s}$ の精子は、そ
れぞれ10%前後で推移しており、直進速度が $45\ \mu\text{m}/\text{s}$ 以上の精子は2
5%以上も存在している。比較例のプレパラートを作製した直後における各
精子の直進速度の平均値は、約 $34.3\ \mu\text{m}/\text{s}$ であった。このことから、
比較例のプレパラートであっても、該プレパラートを作製した直後において
は、精液（試料）中の精子（運動性物質）が活発に運動していることが分か
った。

[0045] これに対し、図8の折れ線Bを見ると、直進速度が $20\ \mu\text{m}/\text{s}$ 以上の精
子が略皆無となっていることが分かる。その反面、折れ線Bにおいては、直
進速度が $20\ \mu\text{m}/\text{s}$ 未満の精子が約98%を占めており、直進速度の遅い
精子ばかりであることが分かる。比較例のプレパラートを作製してから15
分経過後における各精子の直進速度の平均値は、約 $7.9\ \mu\text{m}/\text{s}$ であった
。折れ線Aと折れ線Bは、同じプレパラートを用いた結果であるにもかかわらず、
このように、精子の直進速度の分布に大きな差が生じたのは、時間が
経過するにつれて精子が比較例のプレパラートを形成するスライドガラスや
カバーガラスに吸着してしまい、運動できなくなったことが原因であると考
えられる。

[0046] 一方、図8の折れ線Cを見ると、折れ線Cが折れ線Aに略一致しており、
実施例のプレパラートにおいては、直進速度の遅い精子が非常に少ないこと
が分かる。実施例のプレパラートを作製してから15分経過後における各精

子の直進速度の平均値は、約 $33.3 \mu\text{m}/\text{s}$ であり、比較例のプレパラートを作製した直後の数値と比較して有意差（有意水準 0.05 ）は認められなかった。プレパラートを作製してから約 15 分が経過しているにもかかわらず、本発明の光学的観察用チャンバーを用いた実施例のプレパラートにおいて、精子の直進速度に殆ど影響が見られなかったのは、本発明の光学的観察用チャンバーの下側透明板や上側透明板に精子が殆ど吸着せず、各精子の運動が阻害されなかったことが原因であると考えられる。以上の結果から、本発明の光学的観察用チャンバーが、精液に含まれる精子など、ガラスやプラスチックに吸着しやすい物質を含む試料の光学的観察を行う際に好適に使用できるものであることが分かった。

[0047] 図 9 は、

比較例のプレパラートを作製した直後における精液（試料）中の精子（運動性物質）の頭部振幅の分布（折れ線 D）と、

比較例のプレパラートを作製してから 15 分経過後における精液（試料）中の精子（運動性物質）の頭部振幅の分布（折れ線 E）と、

実施例のプレパラートを作製してから 15 分経過後における精液（試料）中の精子（運動性物質）の頭部振幅の分布（折れ線 F）と、

をそれぞれ示したグラフである。このうち、折れ線 D の頭部振幅の分布は、プレパラートを作製した直後において、上述した方法と同様の方法で精子の頭部振幅を求めることにより得たものである。

[0048] 図 9 を見ると、本発明の光学的観察用チャンバーを用いた実施例のプレパラートにおけるプレパラートを作製してから 15 分経過後の頭部振幅の分布（折れ線 F）は、スライドガラスとカバーガラスに試料を挟んで作製した比較例のプレパラートにおけるプレパラートを作製した直後の頭部振幅の分布（折れ線 D）よりは全体的に小さくなる方向にシフトしているものの、該比較例のプレパラートにおけるプレパラートを作製してから 15 分経過後の頭部振幅の分布（折れ線 E）よりは全体的に大きくなっていることが分かる。折れ線 D、E、F における頭部振幅の平均値は、それぞれ、 $5.4 \mu\text{m}$ 、 2

1 μm 、3. 7 μm であった。以上の結果からも、本発明の光学的観察用チャンバーが、精液に含まれる精子など、ガラスやプラスチックに吸着しやすい物質を含む試料の光学的観察を行う際に好適に使用できるものであることが定量的に裏付けられた。

[0049] 本発明の光学的観察用チャンバーは、各種の試料を観察する際に用いることができる。なかでも、精子や細胞などの生体（運動性物質）を観察する際に用いると好適である。また、精子や細胞などは、ガラスに吸着されやすく、ガラス（スライドガラスやカバーガラス）を試料に接触させる従来のプレパレートでは、その運動性を評価しにくいものの、本発明の光学的観察用チャンバーにおいては、下側透明板や上側透明板には、精子などのガラス吸着性物質が吸着しにくくなる。本発明の光学的観察用チャンバーは、精子などのガラス吸着性物質を観察する際に好適に使用することができる。本発明の光学的観察用チャンバーは、豚などの家畜の精子だけでなく、人間の精子を観察する際にも使用することができる。

符号の説明

- [0050]
- 1 0 光学的観察用チャンバー
 - 1 1 下側透明板
 - 1 1 a 脚部
 - 1 1 b 中央部
 - 1 2 上側透明板
 - 2 0 試料
 - 3 0 スライドガラス
 - 1 0 0 下側透明板成形用型枠
 - 1 1 0 脚部形成用凹部
 - 1 1 1 微細溝
 - 1 1 1 a 山部
 - 1 1 1 b 谷部
 - 1 2 0 中央部形成用凸部

- 1 3 0 枠部
- P 溝のピッチ
- H 溝の高さ（深さ）

請求の範囲

- [請求項1] 試料を載せるための下側透明板と、試料の上側に被せるための上側透明板とを備えた光学的観察用チャンバーであって、
- 下側透明板が可撓性を有する素材によって形成され、下側透明板の中央部に試料を載せて上側透明板を試料に被せた際に、下側透明板の中央部が自重及び試料の重さによって窪み、その状態で下側透明板の周縁部が上側透明板に接触することにより、上側透明板と下側透明板とで試料を密封できるようにしたことを特徴とする光学的観察用チャンバー。
- [請求項2] 下側透明板の下面における周縁部から下方に突出して脚部が設けられ、下側透明板に試料を載せた際に、下側透明板の自重及び試料の重量によって下側透明板の中央部が押し下げられるようにした請求項1記載の光学的観察用チャンバー。
- [請求項3] 下側透明板が平面視略矩形状とされ、前記脚部が平面視略矩形状に設けられた請求項2記載の光学的観察用チャンバー。
- [請求項4] 上側透明板が可撓性を有する素材によって形成された請求項1～3いずれか記載の光学的観察用チャンバー。
- [請求項5] 上側透明板及び／又は下側透明板が、水接触角 70° 以上の素材によって形成された請求項1～4いずれか記載の光学的観察用チャンバー。
- [請求項6] 上側透明板及び／又は下側透明板が、シリコーンエラストマーである請求項5記載の光学的観察用チャンバー。
- [請求項7] 下側透明板と上側透明板とを備えた光学的観察用チャンバーに試料を挟んだ状態で該試料を光学的観察手段によって観察する試料の光学的観察方法であって、
- 可撓性を有する素材によって形成した下側透明板の中央部に試料を載せて上側透明板を試料に被せて、下側透明板の中央部を自重及び試料の重さによって窪ませ、その状態で下側透明板の周縁部を上側透明

板に接触させることにより、上側透明板と下側透明板とで試料を密封した状態で試料を観察することを特徴とする試料の光学的観察方法。

[請求項8]

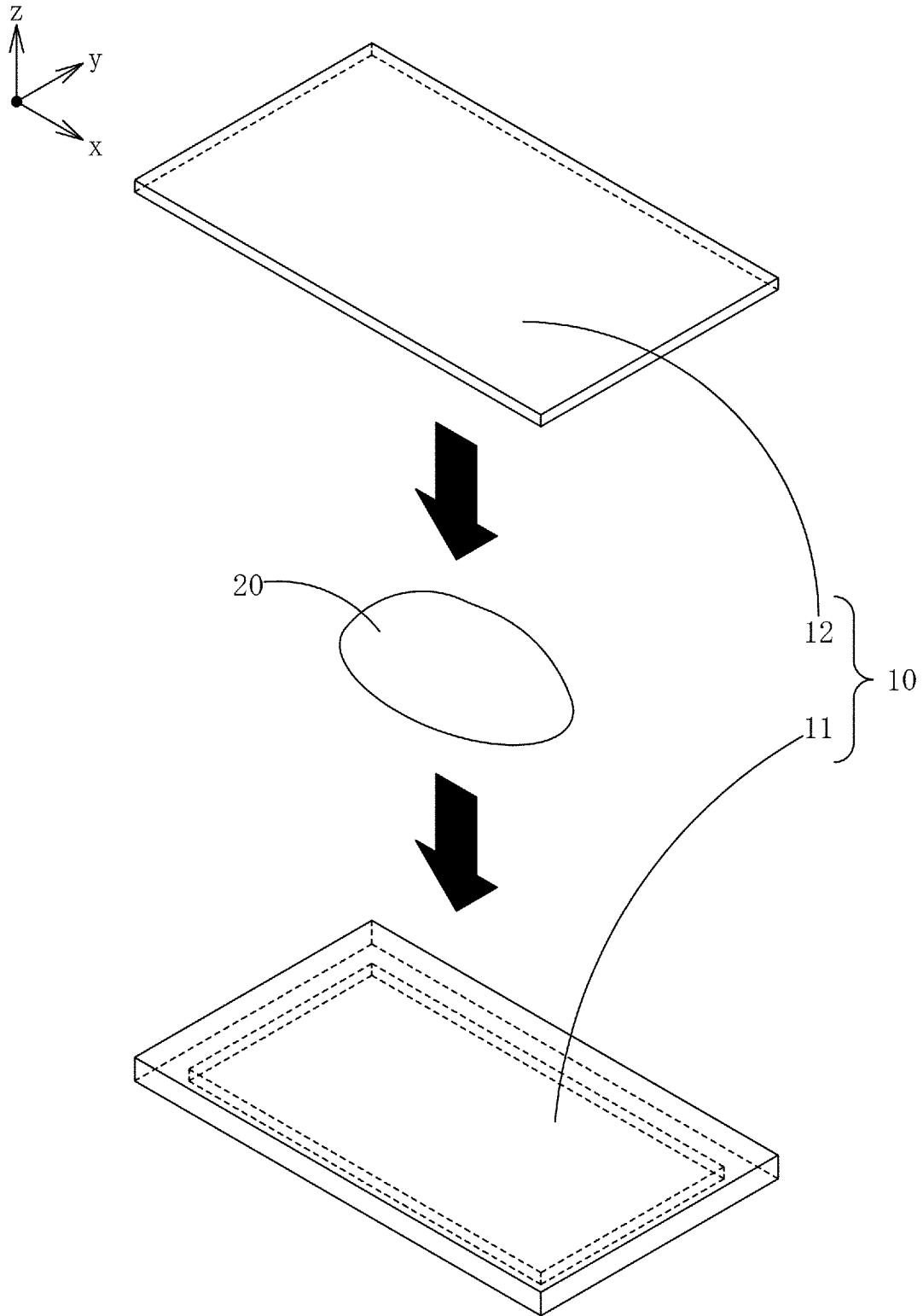
試料を載せるための下側透明板と、試料の上側に被せるための上側透明板とを備えた光学的観察用チャンバーにおける下側透明板の製造方法であって、

脚部形成用凹部が設けられた下側透明板成形用型枠に透明な熱硬化性樹脂を未硬化の状態で流し込んだ後、熱硬化性樹脂を下側透明板成形用型枠とともに加熱して硬化させることにより、脚部形成用凹部で下側透明板の下面における周縁部から下方に突出した脚部を形成することを特徴とする下側透明板の製造方法。

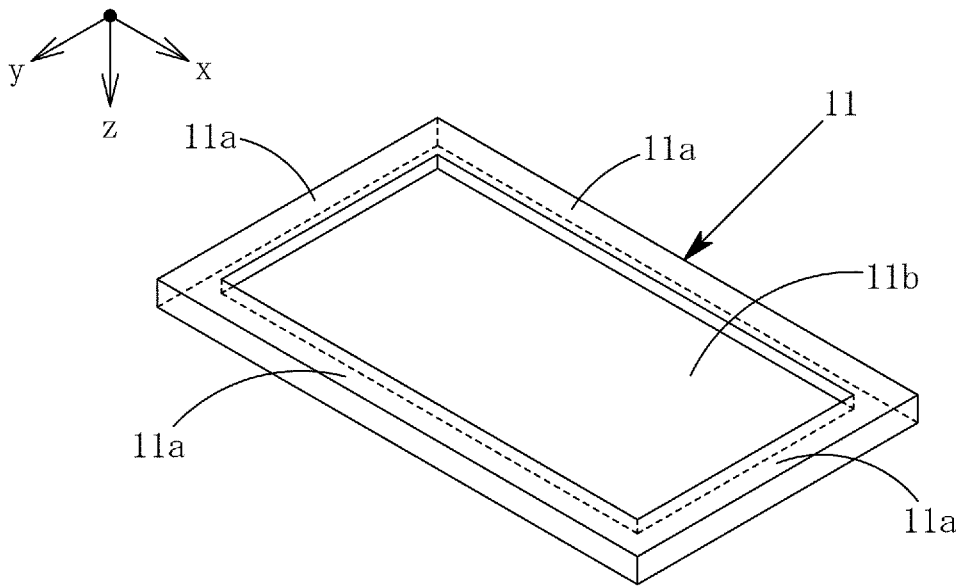
[請求項9]

下側透明板成形用型枠として、その脚部形成用凹部の底部に複数本の微細な溝が形成されたものを用いる請求項8記載の下側透明板の製造方法。

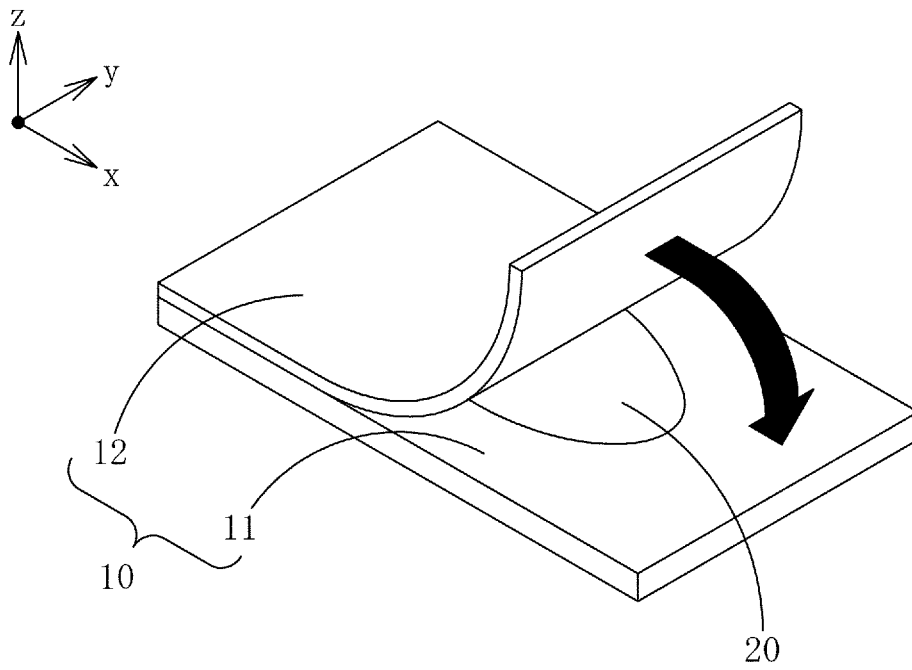
[図1]



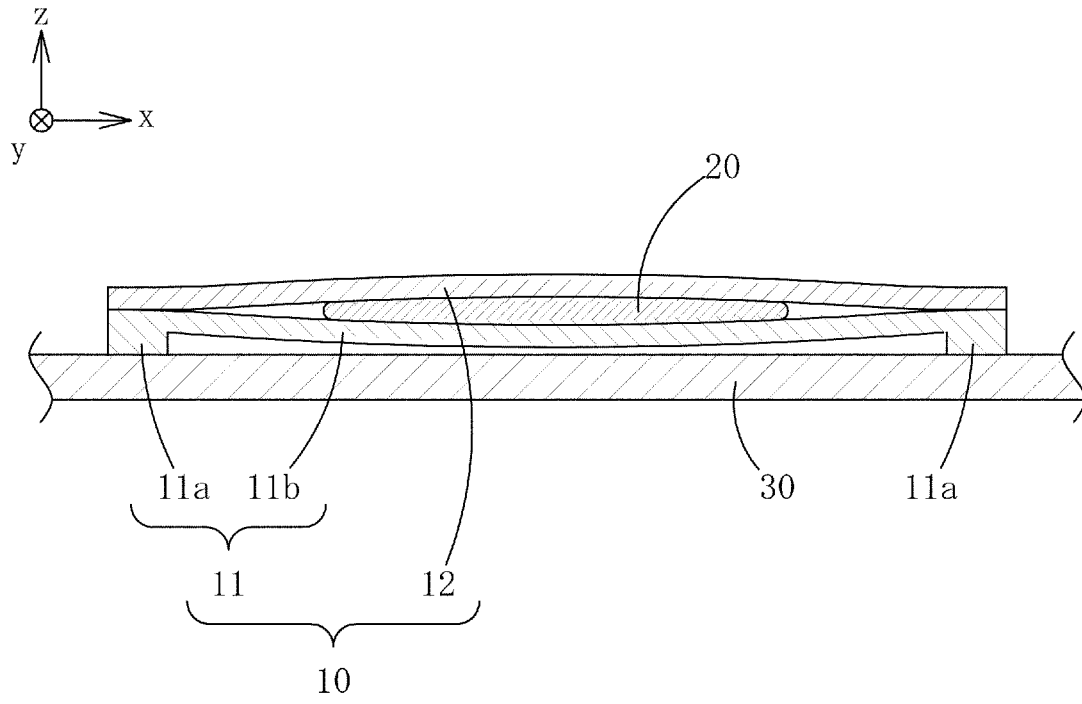
[図2]



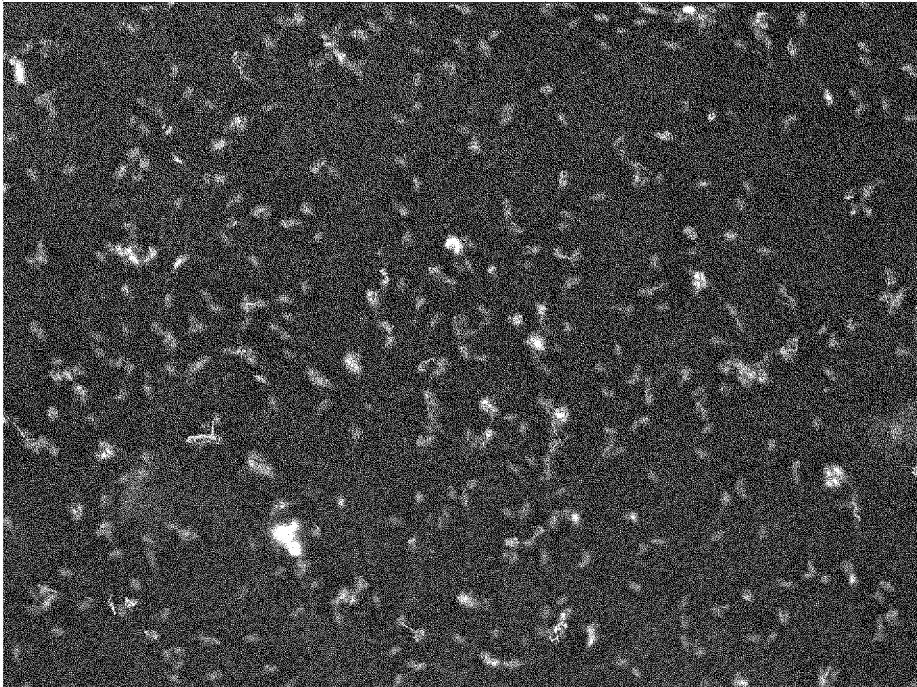
[図3]



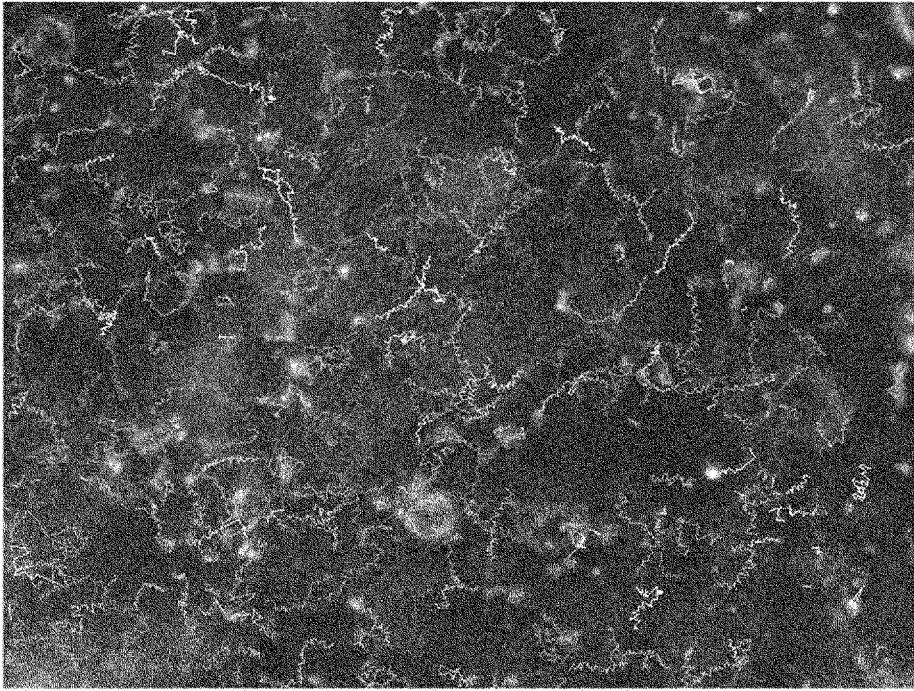
[図4]



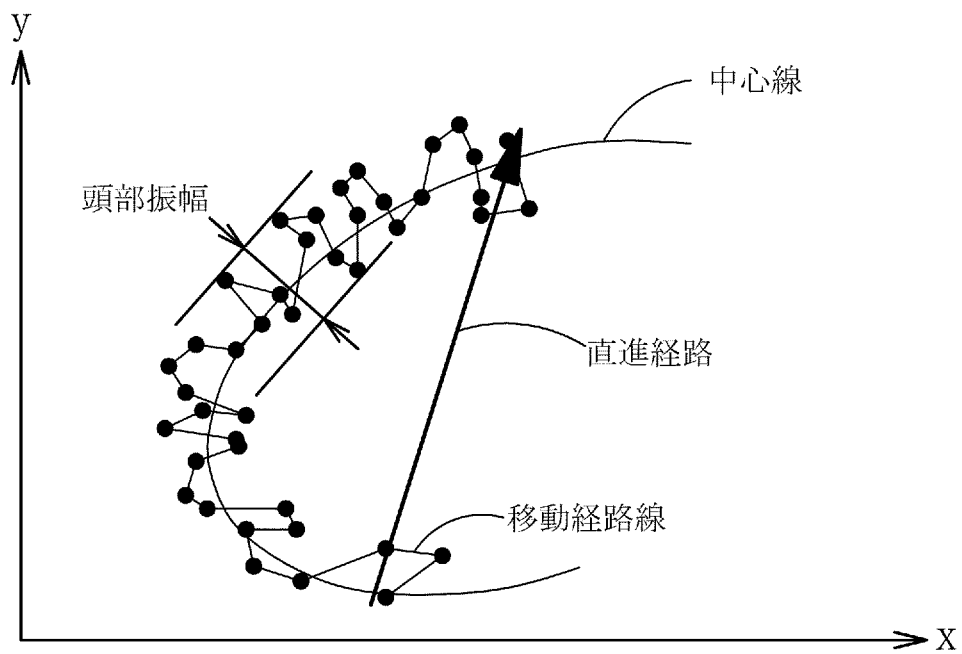
[図5]



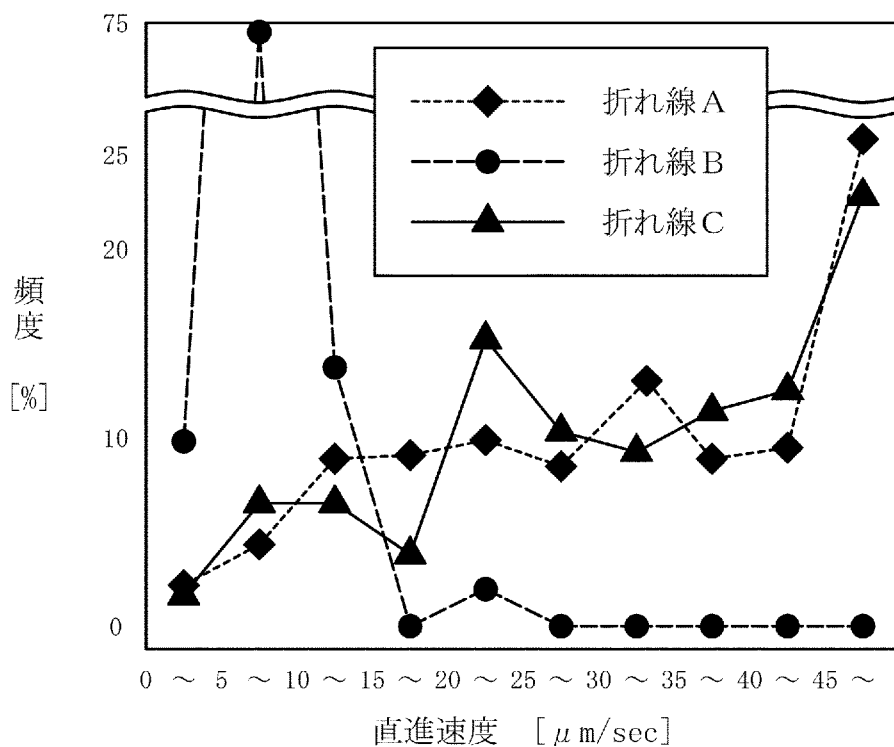
[図6]



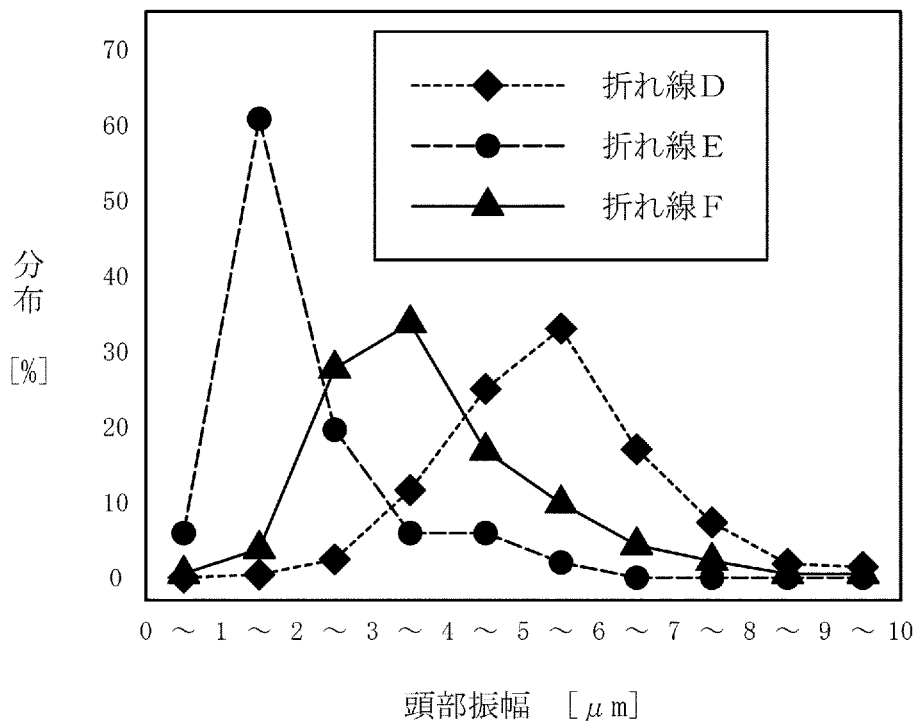
[図7]



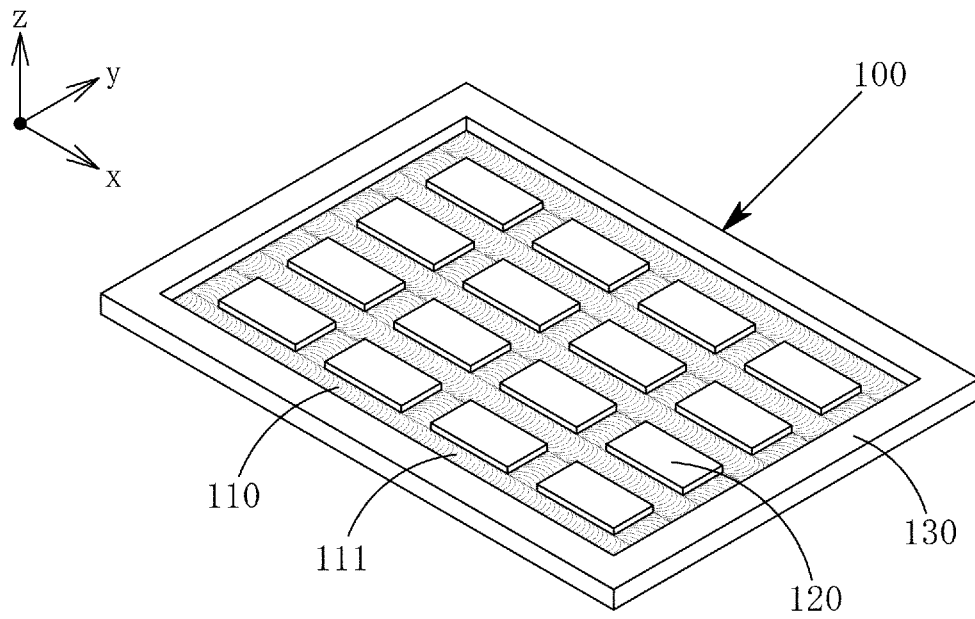
[図8]



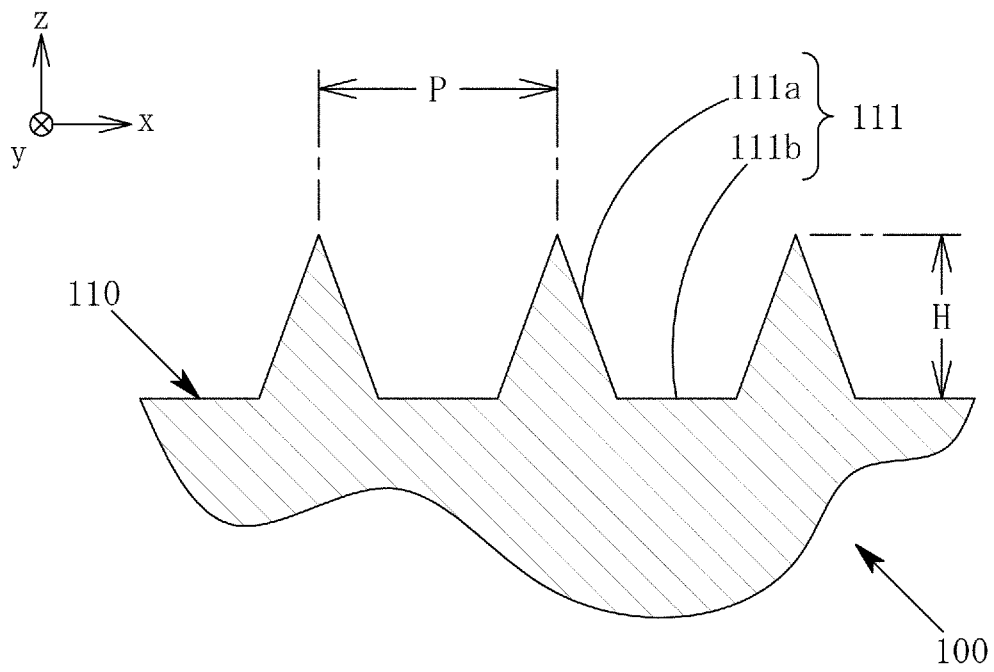
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060748

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N1/28(2006.01) i, G02B21/34(2006.01) i, G01N33/50(2006.01) n, G01N35/04(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)

G01N1/28, G02B21/34, G01N33/50, G01N35/04

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2001-515211 A (Andrew E. Lorincz), 18 September 2001 (18.09.2001), paragraphs [0012] to [0019]; fig. 1, 2, 5 & US 5812312 A & US 6239906 B1 & US 2001/0050810 A1 & US 5812312 A & EP 1015914 A & WO 1999/012057 A2 & AU 9376298 A & CA 2300862 A	8, 9 1-7
Y	JP 10-129200 A (Yugen Kaisha Chusan), 19 May 1998 (19.05.1998), claim 4; paragraphs [0013] to [0015] (Family: none)	8, 9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 August, 2010 (27.08.10)

Date of mailing of the international search report
07 September, 2010 (07.09.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060748

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 06-245771 A (The Perkin-Elmer Corp.), 06 September 1994 (06.09.1994), paragraphs [0035] to [0050]; fig. 1 to 5 & US 5364790 A & US 5527510 A & US 5675700 A & US 5681741 A & EP 611598 A3 & EP 884394 A2 & DE 69323720 C & DE 69333785 D & DE 69333785 T & DE 69323720 D & NZ 248835 A & AU 5505494 A & AU 6219496 A & IL 107131 A & IL 120847 A & AT 177024 T & CA 2106360 A	1-9
A	JP 2002-504666 A (Introtech), 12 February 2002 (12.02.2002), claim 1; paragraph [0030]; fig. 7 & US 6426213 B1 & EP 1054948 A & EP 2204440 A & WO 1999/042557 A1 & AU 3304299 A & BR 9908108 A & CA 2321474 A & AU 745181 B & HK 1033954 A & CN 1291227 A	1-9
A	JP 2000-2839 A (Becton, Dickinson and Co.), 07 January 2000 (07.01.2000), claim 1; fig. 3 & US 6180314 B1 & EP 961109 A2	1-9
A	US 6485918 B1 (Packard BioScience Corp.), 26 November 2002 (26.11.2002), column 9, 42-61; fig. 4, 5 & US 2003/0044837 A1 & WO 2003/004161 A1	1-9
A	JP 2002-340911 A (Hitachi, Ltd.), 27 November 2002 (27.11.2002), fig. 3 (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060748

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.:
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:

- 3. Claims Nos.:
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:

The invention in claim 1 and the invention in claim 8 have such a common technical feature as "an optical chamber for observation which comprises a lower transparent plate on which a sample is placed, and an upper transparent plate for covering the upper side of the sample, said lower transparent plate being formed from a resin".

(continued to extra sheet)

- 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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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

International application No.

PCT/JP2010/060748

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 (JP 2001-515211 A (Andrew E. Lorincz), 18 September 2001 (18.09.2001)), paragraph [0013]. Furthermore, there is no other same or corresponding special technical feature among those different inventions.

The following two inventions (invention groups) are involved in claims.

(Invention 1) the invention in claims 1 - 7

An optical chamber for observation wherein a lower transparent plate is formed from a material having flexibility.

(Invention 2) the invention in claims 8, 9

Method for manufacturing a lower transparent plate provided with a recess for forming a leg part.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N1/28(2006.01)i, G02B21/34(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)n, G01N35/04(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. G01N1/28, G02B21/34, G01N33/50, G01N35/04

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 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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)

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
Y A	JP 2001-515211 A (アンドリュウ・イー・ロリンツ) 2001.09.18, 【0012】 - 【0019】、【図1】、【図2】、【図5】 & US 5812312 A & US 6239906 B1 & US 2001/0050810 A1 & US 5812312 A & EP 1015914 A & WO 1999/012057 A2 & AU 9376298 A & CA 2300862 A	8, 9 1-7

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。

<p>* 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</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 27.08.2010	国際調査報告の発送日 07.09.2010
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) 土岐 和雅 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J | 4 4 5 9

C (続き) . 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
Y	JP 10-129200 A (有限会社中讃) 1998.05.19, 【請求項4】、【0013】 - 【0015】 (ファミリーなし)	8, 9
A	JP 06-245771 A (ザ パーキン-エルマー コーポレイション) 1994.09.06, 【0035】 - 【0050】、【図1】 - 【図5】 & US 5364790 A & US 5527510 A & US 5675700 A & US 5681741 A & EP 611598 A3 & EP 884394 A2 & DE 69323720 C & DE 69333785 D & DE 69333785 T & DE 69323720 D & NZ 248835 A & AU 5505494 A & AU 6219496 A & IL 107131 A & IL 120847 A & AT 177024 T & CA 2106360 A	1 - 9
A	JP 2002-504666 A (イントロテック) 2002.02.12, 【請求項1】、【0030】、【図7】 & US 6426213 B1 & EP 1054948 A & EP 2204440 A & WO 1999/042557 A1 & AU 3304299 A & BR 9908108 A & CA 2321474 A & AU 745181 B & HK 1033954 A & CN 1291227 A	1 - 9
A	JP 2000-2839 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 2000.01.07, 【請求項1】、【図3】 & US 6180314 B1 & EP 961109 A2	1 - 9
A	US 6485918 B1 (Packard BioScience Corporation) 2002.11.26, 9 欄42-61、Fig. 4, 5 & US 2003/0044837 A1 & WO 2003/004161 A1	1 - 9
A	JP 2002-340911 A (株式会社日立製作所) 2002.11.27, 【図3】 (フ ァミリーなし)	1 - 9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1に係る発明と、請求項8に係る発明とは、試料を載せるための下側透明板と、試料の上側に被せるための上側透明板とを備えた光学的観察用チャンパーであって、下側透明板が樹脂によって形成された光学的観察用チャンパー」という共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は文献1（JP 2001-515211 A（アンドリュウ・イー・ロリンツ）2001.09.18）の【0013】段落の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴ではいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そして、請求の範囲には、以下に示す2つの発明（群）が含まれる。

（発明1）請求項1-7に係る発明

下側透明板が可撓性を有する素材によって形成された光学的観察用チャンパー

（発明2）請求項8、9に係る発明

脚部形成用凹部が設けられた下側透明板の製造方法

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。