

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年5月11日(11.05.2018)

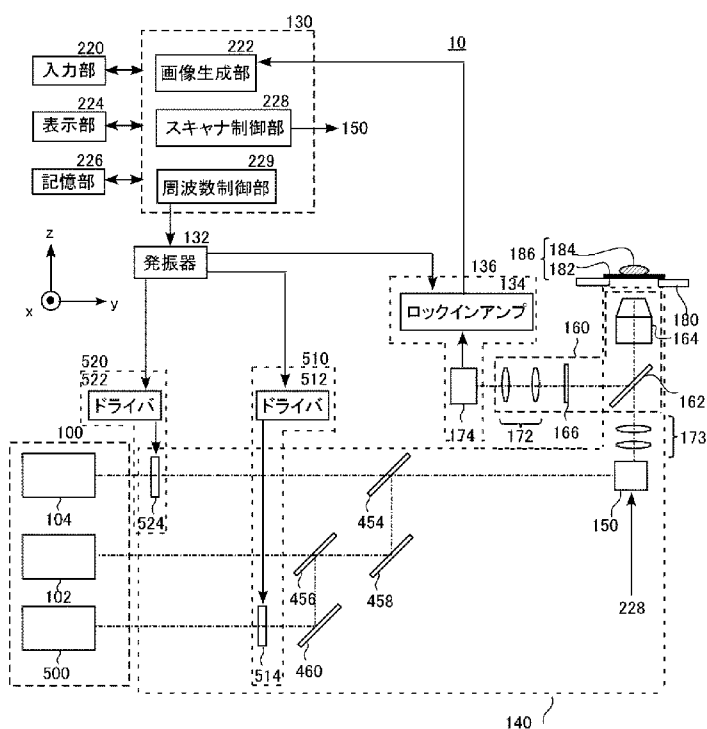


(10) 国際公開番号
WO 2018/084268 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/06 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/039826
- (22) 国際出願日: 2017年11月2日(02.11.2017)
- (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 2016-215693 2016年11月2日(02.11.2016) JP
- (71) 出願人: 株式会社ニコン (NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 嶽 文宏 (DAKE Fumihiro); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 龍華国際特許業務法人(RYUKA IP LAW FIRM); 〒1631522 東京都新宿区西新宿1-6-1 新宿エルタワー22階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

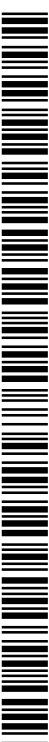
(54) Title: FLUORESCENCE OBSERVATION DEVICE

(54) 発明の名称: 蛍光観察装置



- 132...Oscillator
- 134...Lock-in amplifier
- 220...Input unit
- 222...Image generating unit
- 224...Display unit
- 226...Storage unit
- 228...Scanner control unit
- 229...Frequency control unit
- 512, 522...Driver

(57) Abstract: A fluorescence observation device for observing fluorescence from an observation object including a negative-type switching fluorescent substance transitioned from an inactivated state to an activated state by activation light and excited by pump light in the activated state, the fluorescence observation device being provided with: a first intensity modulation unit for modulating the intensity of the activation light at a frequency f1; a second intensity modulation unit for modulating the intensity of probe light at a frequency f3 different from the frequency f1, the probe light inducing



WO 2018/084268 A1

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

stimulated emission by the observation object; a light receiving unit for receiving the pump light and fluorescence from the observation object irradiated by the intensity-modulated probe light and the activation light; and a detection unit for detecting a frequency $f_1 + f_3$ component in a light reception signal from the light receiving unit.

(57) 要約: 活性化光によって不活性化状態から活性化状態に移行し、活性化状態においてポンプ光によって励起されるネガ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察装置であって、活性化光を周波数 f_1 で強度変調する第1の強度変調部と、観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を周波数 f_1 とは異なる周波数 f_3 で強度変調する第2の強度変調部と、ポンプ光、並びに、強度変調されたプローブ光および活性化光を照射した観察対象物からの蛍光を受光する受光部と、受光部からの受光信号のうち周波数 $f_1 \pm f_3$ の成分を検出する検出部とを備える。

明 細 書

発明の名称： 蛍光観察装置

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光観察装置に関する。

背景技術

[0002] 蛍光物質を2光子で励起し、誘導放出を誘起するレーザビームを照射して、減衰した蛍光を取得して画像を構築する顕微鏡が知られている。（例えば、非特許文献1を参照）。

非特許文献1: Lu Wei et. al., Biomedical Optics Express 1465-1475, vol . 3, No.6, 1 June 2012

発明の概要

[0003] 本発明の第1の態様である蛍光観察装置は、活性化光によって不活性化状態から活性化状態に移行し、活性化状態においてポンプ光によって励起されるネガ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察装置であって、活性化光を周波数 f_1 で強度変調する第1の強度変調部と、観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を周波数 f_1 とは異なる周波数 f_3 で強度変調する第2の強度変調部と、ポンプ光、並びに、強度変調されたプローブ光および活性化光を照射した観察対象物からの蛍光を受光する受光部と、受光部で検出される受光信号のうち周波数 $f_1 \pm f_3$ の成分を検出する検出部とを備える。

[0004] 本発明の第2の態様である蛍光観察装置は、活性化状態においてポンプ光によって励起され、不活性化光によって活性化状態から不活性化状態に移行するポジ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察装置であって、ポンプ光を周波数 f_2 で強度変調する第1の強度変調部と、観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を周波数 f_2 とは異なる周波数 f_3 で強度変調する第2の強度変調部と、強度変調されたポンプ光およびプローブ光、並びに、不活性化光を照射した観察対象物からの蛍光を受

光する受光部と、受光部で検出される受光信号のうち周波数 $2f_2 \pm f_3$ の成分を検出する検出部とを備える。

[0005] 本発明の第3の態様である蛍光観察方法は、活性化光によって不活性化状態から活性化状態に移行し、活性化状態においてポンプ光によって励起されるネガ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察方法であって、活性化光を周波数 f_1 で強度変調し、観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を周波数 f_1 とは異なる周波数 f_3 で強度変調し、ポンプ光、並びに、強度変調されたプローブ光および活性化光を照射した観察対象物からの蛍光を受光部で受光し、受光部で検出される受光信号のうち周波数 $f_1 \pm f_3$ の成分を検出する。

[0006] 本発明の第4の態様である蛍光観察方法は、活性化状態においてポンプ光によって励起され、不活性化光によって活性化状態から不活性化状態に移行するポジ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察方法であって、ポンプ光を周波数 f_2 で強度変調し、観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を周波数 f_2 とは異なる周波数 f_3 で強度変調し、強度変調されたポンプ光およびプローブ光、並びに、不活性化光を照射した観察対象物からの蛍光を受光部で受光し、受光部で検出される受光信号のうち周波数 $2f_2 \pm f_3$ の成分を検出する。

[0007] 上記の発明の概要は、本発明の特徴の全てを列挙したものではない。これらの特徴群のサブコンビネーションも発明となりうる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本実施形態に係る顕微鏡装置10の構成を示す図である。

[図2]状態遷移図である。

[図3]各波長の関係を示す概念図である。

[図4]分解能向上を説明する図である。

[図5]信号発生領域のシミュレーション結果を示す。

[図6]走査部150のスキャン速度と検出の速度を説明する概念図である。

[図7]他の走査部151の例を示す。

[図8]さらに他の走査部156の例を示す。

[図9]他の顕微鏡装置12の構成を示す図である。

[図10]顕微鏡装置12で用いられるGUI画面300の一例である。

[図11]顕微鏡装置12の動作(S10)の一例を示すフローチャートである。

[図12]共焦点観察に基づいて減衰蛍光観察の範囲を選択する動作(S30)のフローチャートである。

[図13]顕微鏡装置12において、共焦点観察をするか減衰蛍光観察をするかを自動選択する動作(S20)のフローチャートである。

[図14]当該動作で用いられるGUI画面350を示す。

[図15]さらに他の顕微鏡装置14の構成を示す図である。

[図16]さらに他の顕微鏡装置18の構成を示す図である。

[図17]状態遷移図である。

[図18]分解能向上を説明する図である。

[図19]さらに他の顕微鏡装置20の構成を示す図である。

[図20]さらに他の顕微鏡装置22の構成を示す図である。

[図21]さらに他の顕微鏡装置24の構成を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、発明の実施の形態を通じて本発明を説明するが、以下の実施形態は請求の範囲にかかる発明を限定するものではない。また、実施形態の中で説明されている特徴の組み合わせの全てが発明の解決手段に必須であるとは限らない。

[0010] 本実施形態で用いられるレーザ光には、ポンプ光、プローブ光およびスイッチング光が含まれる。ポンプ光は蛍光物質を励起して蛍光を発生させる。プローブ光は蛍光物質において誘導放出を誘起することで、蛍光を減衰させる。スイッチング光は蛍光物質を不活性化状態から活性化状態に、あるいは活性化状態から不活性化状態に移行させる。ネガ型スイッチング蛍光物質は、スイッチング光により不活性化状態から活性化状態に移行する。この場合、ス

スイッチング光を特に活性化光ともいう。ポジ型スイッチング蛍光物質は、スイッチング光により活性化状態から不活性化状態に移行する。この場合、スイッチング光を特に不活性化光ともいう。また、スイッチング光、ポンプ光、プローブ光を強度変調する場合の周波数をそれぞれ f_1 、 f_2 、 f_3 という。

[0011] 図1は、本実施形態に係る蛍光観察装置の一例として顕微鏡装置10の構成を示す図である。顕微鏡装置10は、ネガ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物に、ポンプ光、プローブ光および活性化光を観察対象物に照射することで、観察対象物の蛍光物質より生じる誘導放出により減衰した蛍光信号（以下、減衰蛍光、減衰蛍光信号などと記載する）を発生させる。減衰蛍光信号は、プローブ光および活性化光を強度変調させることにより検出することができる。具体的な方法としてはロックイン検出等があげられる。ロックイン検出により得られる減衰蛍光信号は、ポンプ光、プローブ光および活性化光の多重積の結果として得られるために、信号発生領域が制限される。これにより、空間分解能を向上させることができる。なお、以下、減衰蛍光を蛍光と総称して記載する場合もある。また、以下、光スイッチング可能な蛍光物質から生じる減衰蛍光を取得する顕微鏡を減衰蛍光顕微鏡と記載する。図1では説明のために x y z 軸を示す。

[0012] 顕微鏡装置10は、ポンプ光、プローブ光および活性化光を出力する光源100と、ポンプ光、プローブ光および活性化光で観察対象物184を照明する照明光学系140と、観察対象物184から発せられた光を観察する観察光学系160と、観察光学系160を介して光を検出する検出部136を備える。顕微鏡装置10はさらに、標本186を支持するステージ180を備える。顕微鏡装置10はさらに、顕微鏡装置10全体を制御する制御部130と、当該制御部130との間で信号を送受信する入力部220、表示部224および記憶部226を備える。

[0013] 標本186は、観察対象物184と、観察対象物184を載置するスライドガラス182とを有する。観察対象物184は例えば生物細胞である。観

察対象物 184 にはネガ型スイッチング蛍光物質が導入されている。ネガ型スイッチング蛍光物質として、例えば、Dronpa が挙げられる。

[0014] 光源 100 は、ポンプ光用のレーザ光源 102、プローブ光用のレーザ光源 104、および、活性化光用のレーザ光源 500 を有する。レーザ光源 102、104、500 は例えばいずれも連続発振方式であって、かつ、互いに異なる波長のレーザ光を出力する。ポンプ光は蛍光物質を励起して蛍光を発生させる。プローブ光は蛍光物質において誘導放出を誘起することで、蛍光を減衰させる。活性化光は蛍光物質を不活性化状態から活性化状態に移行させる。ポンプ光の波長はプローブ光の波長より短く、例えば、ポンプ光は 488 nm、プローブ光は 600 nm である。活性化光の波長はさらに短く、例えば 405 nm である。これらポンプ光およびプローブ光の波長は蛍光物質の吸収帯(吸収スペクトル)および蛍光帯(蛍光スペクトル)に合わせて適宜設定され、活性化光の波長も蛍光物質の活性化に合わせて適宜設定される。これらポンプ光、プローブ光および活性化光の波長は自動的に設定されてもよいし、入力部 220 でユーザからの入力を受け付けてもよい。

[0015] 照明光学系 140 は、音響光学素子 514、524 (以下、AOM ともいう)、ミラー 460、458、ダイクロイックミラー 454 と、走査部 150、レンズペア 173、ダイクロイックミラー 162 および対物レンズ 164 とを有する。観察光学系 160 は、対物レンズ 164 と、ダイクロイックミラー 162 と、光学フィルタ 166 と、レンズペア 172 とを有する。

[0016] 活性化光が入射する AOM 514 に印加するドライバ 512 の電圧を制御することで、活性化光の 1 次回折光の発生を制御する。常に 1 次回折光を生じさせる状態 (ON 状態、すなわち強度が最大の状態) とすることもできるし、常に生じさせない状態 (OFF 状態、すなわち強度が最小の状態) とすることもできるし、光強度を変調することもできる。例えば、ドライバ 512 から一定の電圧値を付与した場合には、電圧値に応じて光強度は一定値となる。例えば、ドライバ 512 から付与される電圧値が時間的にゼロであれば、光強度もゼロになる。例えばドライバ 512 の電圧波形が正弦波の場合

に光の強度を正弦波に変調する。本実施形態では、発振器 1 3 2 からの発振に基づいて、A O M 5 1 4 により活性化光を、例えば数 M H z の周波数 f_1 で強度変調する。A O M 5 1 4 の利点は、数 M H z という比較的高い周波数で強度変調できることである。なお、これら A O M 5 1 4 とドライバ 5 1 2 とにより第 1 強度変調部 5 1 0 が構成される。なお、この f_1 で決まる時間周期に対して、蛍光物質のスイッチング時間（不活性状態から活性状態への遷移に要する時間）が短いことが望ましい。

[0017] プローブ光が入射する A O M 5 2 4 および当該 A O M 5 2 4 へ電圧を印加するドライバ 5 2 2 の構成も上記 A O M 5 1 4 およびドライバ 5 1 2 と同様の構成である、これにより、発振器 1 3 2 からの発振に基づいて、A O M 5 2 4 によりプローブ光を、例えば数十 M H z の周波数 f_3 で強度変調する。ただし、周波数 f_3 は上記周波数 f_1 とは異ならせる。なお、これら A O M 5 2 4 とドライバ 5 2 2 とにより第 2 強度変調部 5 2 0 が構成される。

[0018] ミラー 4 6 0 は強度変調された活性化光を反射して、ダイクロイックミラー 4 5 6 は活性化光とポンプ光とを合波してミラー 4 5 8 に導く。ミラー 4 5 8 は活性化光およびポンプ光を反射し、ダイクロイックミラー 4 5 4 は強度変調されたプローブ光を、活性化光およびポンプ光と同軸に合波して走査部 1 5 0 に導く。

[0019] 走査部 1 5 0 は対物レンズ 1 6 4 の瞳面とほぼ共役な位置に配される。このために、走査部 1 5 0 とダイクロイックミラー 1 6 2 の間にはレンズペア 1 7 3 が設置されていることが望ましい。走査部 1 5 0 の一例はガルバノスキャナであり、互いに直交する方向に回転可能な一対のガルバノミラーを有する。それらガルバノミラーの角度を変化させることで観察対象物 1 8 4 におけるレーザ光のスポット位置を $x y$ 方向でスキャンする。走査部 1 5 0 の他の例はレゾナントスキャナ（共振型スキャナ）である。レゾナントスキャナは、共振により動作する共振ミラー（レゾナントミラー）を有する。レゾナントスキャナは、例えば、主走査用のレゾナントミラーと、副走査用のガルバノミラーを備える。レゾナントスキャナを用いることで、より高速なス

キャンをすることができる。

- [0020] 走査部 150 から出力されたレーザ光はダイクロイックミラー 162 を透過して、対物レンズ 164 に導かれる。対物レンズ 164 はレーザ光を観察対象物 184 に集光する。
- [0021] 観察対象物 184 の蛍光物質から生じた蛍光はダイクロイックミラー 162 で反射し、光学フィルタ 166 によりポンプ光、プローブ光および活性化光が除去される。蛍光はレンズペア 172 により対物レンズ瞳面とほぼ共役な位置に設置された受光部 174 に入射する。なお、ダイクロイックミラー 162 は、レンズペア 173 と走査部 150 の間に設置されても良いし、走査部 150 よりも光源側に設置されても良い。
- [0022] 検出部 136 は、受光部 174 およびロックインアンプ 134 を備える。受光部 174 は対物レンズ 164 の瞳面とほぼ共役な位置に配される。受光部 174 の一例は、光電子増倍管である。受光部 174 は光電変換によって、受光した蛍光の強度に応じた電気信号を出力する。受光部 174 の出力はロックインアンプ 134 に入力されてロックイン検出される。ロックイン検出については後述する。
- [0023] 入力部 220、表示部 224、記憶部 226 および制御部 130 は例えば PC 等であってもよい。入力部 220 は、ユーザから制御部 130 への入力を受け付けるものであって、例えば、キーボード、タッチパネル、マウス等である。表示部 224 は、例えば、GUI、検出結果、観察画像を表示するディスプレイである。記憶部 226 は、顕微鏡装置 10 を制御するプログラム、パラメータ等、および、検出結果、観察画像等が記憶される。
- [0024] 制御部 130 は、周波数制御部 229、スキャナ制御部 228 および画像生成部 222 を有する。周波数制御部 229 はユーザからの入力により、または、蛍光物質に基づいて自動で、発振器 132 に発生させる発振周波数を制御する。スキャナ制御部 228 は、走査部 150 を制御する。画像生成部 222 は検出部 136 の検出結果に基づいて画像を生成し、表示部 224 に表示する。

[0025] 図2から図6を用いて顕微鏡装置10の減衰蛍光による観察の原理を説明する。図2は状態遷移図である。図3は、各波長の関係を示す概念図である。図4は分解能向上を説明する図である。図5に信号発生領域のシミュレーション結果を示す。

[0026] ネガ型スイッチング蛍光物質は図3に示すように状態遷移する。まず、発光できない不活性化状態からは活性化光の励起により発光できる活性化状態に遷移する。活性化状態においてはポンプ光で励起され、プローブ光で誘導放出されて減衰した蛍光が出射される。ここで、信号として、時間的に以下の過程を経て生じる蛍光信号を検出する。

(Step 1) 活性化光によるスイッチング (不活性化状態から活性化状態へ) (1)

(Step 2) ポンプ光による励起(2)

(Step 3) プローブ光による誘導放出(3)

[0027] この過程を経て生じる蛍光信号は、活性化光、ポンプ光、プローブ光の積の結果として得られるため、信号発生領域が制限される。このメカニズムは後述する。発生する蛍光信号をPSN-RF (Photo-Switchable probe (Negative) Reduced Fluorescence) 信号と定義する。

[0028] 図3において破線は特定の蛍光物質の吸収帯を示し、実線は当該蛍光物質の蛍光帯を示す。ポンプ光の波長は吸収帯に含まれるように設定され、プローブ光は蛍光帯の強度のピークよりも長い波長に設定されることが好ましい。これにより、蛍光帯の強度のピークを含む波長領域を蛍光検出領域とすることができる。

[0029] 活性化光強度を周波数 f_1 で、プローブ光強度を周波数 f_3 で強度変調する。活性化光、ポンプ光、プローブ光の時間波形を I_{Act} 、 I_{Pump} 、 I_{Probe} とすると、

[数1]

$$I_{Act}(t) = I_1 [1 + \cos(f_1 t)] \quad (1.1)$$

$$I_{Pump}(t) = I_2 \quad (1.2)$$

$$I_{Probe}(t) = I_3 [1 + \cos(f_3 t)] \quad (1.3)$$

ここで、 I_1 、 I_2 、 I_3 はそれぞれ活性化光、ポンプ光、プローブ光の光強度である。PSN-RF信号は、

[数2]

$$\begin{aligned} I_{PSN-RF}(t) &\propto I_{Act}(t) I_{Pump}(t) I_{Probe}(t) \\ &= I_1 I_2 I_3 [1 + \cos(f_1 t)] [1 + \cos(f_3 t)] \\ &= I_1 I_2 I_3 \left[\frac{3}{2} + \cos f_1 t + \cos f_3 t + \frac{1}{2} \cos[(f_1 - f_3)t] + \frac{1}{2} \cos[(f_1 + f_3)t] \right] \end{aligned} \quad (1.4)$$

従って、受光部174で検出された蛍光信号を $f_1 + f_3$ または $f_1 - f_3$ を復調周波数としてロックインアンプ134で復調することで、分解能の向上したPSN-RF信号を取得することができる。復調周波数は、強度変調した2以上の周波数の和または差のいずれであってもよい。この場合、単に「±」と表記する。より具体的には、発振器132から上記復調周波数がロックインアンプ134に入力される。ロックインアンプ134は復調周波数に同期する信号を抽出する。走査部150で観察対象物184における光スポットを走査しつつ、ロックインアンプ134でピクセルごとにロックイン検出を実施し、当該ピクセルの位置情報に対応付けて記憶部226に記憶する。画像生成部222は、記憶部226から位置情報に対応付けられた検出結果を読み出して、減衰蛍光の観察画像を生成し、表示部224に表示する。

[0030] 図4は分解能向上の原理について示す図である。活性化光、ポンプ光、プローブ光の光スポットの強度分布をそれぞれ S_1 、 S_2 、 S_3 とする。図中の各スポットの縦軸は強度を表し、横軸は空間座標を表す。

(Step 1) 活性化光により光スイッチングが発生する発生分布を A_1 とす

ると、それは活性化光の強度分布に等しいので、

[数3]

$$A_1 = S_1 \quad (1.5)$$

(Step 2)

ポンプ光により励起が発生する発生分布を A_2 とする。この信号発生分布は、Step 1 の発生分布 A_1 と、ポンプ光スポットの強度分布 S_2 の積に等しいので、

[数4]

$$A_2 = A_1 S_2 = S_1 S_2 \quad (1.6)$$

(Step 3)

プローブ光により誘導放出が発生する発生分布を A_3 とする。この信号発生分布は、Step 2 の発生分布 A_2 と、プローブ光スポットの強度分布 S_3 の積に等しいので、

[数5]

$$A_3 = A_2 S_3 = S_1 S_2 S_3 \quad (1.7)$$

この発生分布 A_3 は P S N - R F 信号の発生分布と等価である。このように、3つの光の積で生じる蛍光信号を検出することで、図4に示すように、光スポットの中心からの蛍光発生の影響を大きくかつ周辺からの蛍光発生の影響を小さくすることができるので、観察対象物184からの信号発生領域を回折限界以下に制限でき、結果として分解能を向上させることができる。

[0031] 図5に信号発生領域のシミュレーション結果を示す。比較のために、通常の共焦点顕微鏡 (CM) と、減衰蛍光 (RF) 顕微鏡の信号発生領域も示す。信号が活性化光、ポンプ光、プローブ光の積で生じる効果によって、P S N - R F ではX方向、Z方向ともに、信号発生領域がシャープになること

がわかる。

[0032] 図6は、走査部150のスキャン速度と検出の速度を説明する概念図である。ガルバノスキャナにおいて主走査（図中x方向）のスキャンに要する時間はレゾナントスキャナと比較して長いので、図6の（a）に示すように差周波の復調で検出するのにかかる時間の間にビームの位置はほぼ変わらないと考えるよい。しかしながら、レゾナントスキャナにおいて主走査（図中x方向）のスキャンに要する時間はガルバノスキャナと比較して短いので、差周波の復調で検出するのにかかる時間の間に、図6の（b）に示すようにビームの位置は変わってしまい正確な画像取得が困難になるというおそれがある。しかしながら和周波で復調した場合、復調の周波数が高いので検出にかかる時間も短くなり、レゾナントスキャナを用いても所定位置における信号検出に必要な所定時間の間にビームの位置はほぼ変わらないと考えるよい。したがって、レゾナントスキャナを用いて高速で検出しつつ、正確な画像取得をすることができる。

[0033] 図7は、他の走査部151の例を示す。走査部151は、レゾナントスキャナ152、ガルバノスキャナ153および一对のミラー154、155を有する。一对のミラー154、155はそれぞれ図中矢印の方向に移動可能に設けられており、これらの位置に基づいて、レゾナントスキャナ152、ガルバノスキャナ153のいずれを用いるかが選択される。

[0034] 図7は、レゾナントスキャナ152が選択された状態が示されている。この場合、ダイクロイックミラー454から出射される光の光路上にミラー154が配され、レゾナントスキャナ152から出射される光の光路上にミラー155が配されている。これにより、ミラー154で反射された光はレゾナントスキャナ152に入射する。レゾナントスキャナ152で所定の方向に偏向された光はミラー155で反射されて、ダイクロイックミラー162を透過して、対物レンズ164に入射する。

[0035] 一方、ガルバノスキャナ153が選択される場合には、ダイクロイックミラー454から出射される光の光路上からミラー154が退避するとともに

、ガルバノスキャナ153とダイクロイックミラー162との間からミラー155が退避する。これにより、ガルバノスキャナ153に光が入射し、ガルバノスキャナ153で偏向された光がダイクロイックミラー162を透過して、対物レンズ164に入射する。

[0036] 走査部151によれば、用途に応じてレゾナントスキャナ152とガルバノスキャナ153を使い分けることができる。なお、一对のミラー154、155の位置を移動させる手段は、例えばリニアモーターが挙げられるが、これに限られずそれぞれが対応するターゲット上に配され、当該ターゲットの回転によりミラー154、155が移動してもよい。一对のミラー154、155に代えて、一对のダイクロイックミラーを配することにより、当該一对のダイクロイックミラーを反射する波長の光に対してはレゾナントスキャナ152を用い、当該一对のダイクロイックミラーを透過する波長の光に対してガルバノスキャナ153を用いることができる。なお、レゾナントスキャナ152とガルバノスキャナ153の位置は図7と逆でもよい。

[0037] 図8は、さらに他の走査部156の例を示す。図8において図7と同じ構成については同じ番号を付して説明を省略する。

[0038] 走査部156は、走査部151の一对のミラー154、155に代えて、それらが一体化したミラー157を有する。当該ミラー157は紙面に垂直な方向に移動可能に設けられる。ここで図8の状態は図7の状態に対応しており、ミラー157によって光が反射されることにより、レゾナントスキャナ152が用いられる状態が示されている。一方、図8の状態からミラー157が紙面に垂直な方向に移動して、ダイクロイックミラー454とガルバノスキャナ153との間の光路、および、ガルバノスキャナ153とダイクロイックミラー162との間の光路から同時に退避することで、ガルバノスキャナ153が用いられる状態となる。

[0039] 図9は他の顕微鏡装置12の構成を示す図である。顕微鏡装置12は顕微鏡装置10と同様に減衰蛍光顕微鏡として用いることができるとともに、共焦点顕微鏡としても用いることができる。顕微鏡装置12において顕微鏡装

置 1 0 と同じ構成については同じ参照番号を付して説明を省略する。

- [0040] 顕微鏡装置 1 2 は、ポンプ光を変調する第 3 強度変調部 5 4 0 を有する。第 3 強度変調部 5 4 0 は、ポンプ光の光路上に配された A O M 5 4 4 と、A O M 5 4 4 を発振器 1 3 2 からの発振に基づいて駆動するドライバ 5 4 2 を有する。
- [0041] さらに、顕微鏡装置 1 2 において、蛍光を反射して、ポンプ光およびプローブ光を透過するダイクロイックミラー 4 0 2 はダイクロイックミラー 4 5 4 と走査部 1 5 0 との間の光路上に配される。さらに、ダイクロイックミラー 4 0 2 で反射された光が入射する、光学フィルタ 4 0 4、レンズ 4 0 6、受光部 4 1 0 を有する。光学フィルタ 4 0 4 および受光部 4 1 0 は、顕微鏡装置 1 0 の光学フィルタ 1 6 6 および受光部 1 7 4 と同様の構成であってよい。顕微鏡装置 1 2 はさらにピンホール 4 0 8 を有する。ピンホール 4 0 8 は、観察対象物 1 8 4 と共役の位置に配される。レンズ 4 0 6 はピンホール 4 0 8 に光を集光する。また、受光部 4 1 0 はピンホール 4 0 8 に近接して設置される。あるいは、不図示のレンズにより、ピンホールと略共役位置に設置されても良い。
- [0042] 顕微鏡装置 1 2 はさらに、レーザ光源 1 0 2、1 0 4、5 0 0 の光の波長を制御する波長制御部 2 3 0 を有する。
- [0043] 上記構成により、観察対象物 1 8 4 からの蛍光は走査部 1 5 0 を通り、ダイクロイックミラー 4 0 2 で反射されて、光学フィルタ 4 0 4、レンズ 4 0 6 およびピンホール 4 0 8 を介して受光部 4 1 0 で受光される。これら、これにより、走査部 1 5 0 により観察対象物 1 8 4 の観察位置が変わっても、走査部 1 5 0 でデスクャンされて、ピンホール 4 0 8 でのスポット位置は不変である。ピンホール 4 0 8 は穴の大きさが可変となっており、詳細は後述する。
- [0044] 図 1 0 は顕微鏡装置 1 2 で用いられる G U I 画面 3 0 0 の一例である。G U I 画面 3 0 0 は表示部 2 2 4 に表示され、入力部 2 2 0 を用いてユーザからの入力を受け付ける。

- [0045] チェックボックス302は共焦点観察の画像を取得するか否かの入力欄である。チェックボックス304は共焦点観察においてポンプ光を変調することを指定する入力欄であり、チェックボックス306は変調しないことを指定する入力欄である。
- [0046] 入力欄308はポンプ光の変調周波数の入力欄であり、MHzを単位とした数字の目盛りとともに、指定された変調周波数が縦の太線で示されている。入力欄310はピンホール大きさを指定する入力欄である。入力欄310の「OPEN」は穴の大きさが最大であることを示す。さらに、「1」をエアリーサイズとしたときの大きさの目盛りとともに、指定された穴の大きさが縦の太線で示されている。ここで、エアリーサイズとは、波長と開口数で決まる回折限界の光スポットの大きさで、ピンホール径を規格化した値である。
- [0047] さらに、チェックボックス312は、共焦点観察のタイムラプス画像を取得するか否かの入力欄である。入力欄314はタイムラプスの時間間隔の入力欄である。
- [0048] チェックボックス316は減衰蛍光観察の画像を取得するか否かの入力欄である。入力欄318は活性化光の変調周波数の入力欄であり、MHzを単位とした数字の目盛りとともに、指定された変調周波数が縦の太線で示されている。入力欄320はプローブ光の変調周波数の入力欄であり、MHzを単位とした数字の目盛りとともに、指定された変調周波数が縦の太線で示されている。
- [0049] 入力欄322は減衰蛍光観察におけるピンホール408の穴の大きさの入力欄であって、入力欄310と同様の構成である。また、チェックボックス324および入力欄326は減衰蛍光観察におけるタイムラプスに関する入力欄であり、チェックボックス312、入力欄314と同様の構成である。
- [0050] GUI画面300には、共焦点の観察画像330と減衰蛍光の観察画像332とが並べて表示される。これに代えて、重ねて表示されてもよい。また、互いにリンク付けされることで、共焦点の観察画像330の対象領域をク

リックする減衰蛍光の観察画像 332 が表示されるようにしてもよい。さらに、共焦点観察のタイムラプスによる画像取得が指定されている場合には、タイムラプス画像 334 が時間順に並べて表示される。同様に、減衰蛍光観察のタイムラプスによる画像取得が指定されている場合には、タイムラプス画像 335 が時間順に並べて表示される。

[0051] 図 11 は顕微鏡装置 12 の動作 (S10) の一例を示すフローチャートである。

[0052] フローチャート S10 において、制御部 130 は、GUI 画面 300 のチェックボックス 316 の入力に基づいて、減衰蛍光観察の画像を取得するかどうかを判断する (S100)。ステップ S100 の判断が Yes の場合に、制御部 130 は入力欄 318、320 の入力に基づいて、減衰蛍光観察の活性化光およびプローブ光の変調周波数を発振器 132 に設定する (S102)。なお、ポンプ光は ON 状態に設定される。さらに、制御部 130 は入力欄 323、326 の入力に基づいて復調周波数を発振器 132 に設定する (S101)。

[0053] 制御部 130 はピンホール 408 の径を設定する (S104)。減衰蛍光観察時においてピンホール 408 はデフォルトで開放、すなわち図 10 の入力欄 322 においてデフォルトで「OPEN」が設定されている。ユーザが入力欄 322 の値をデフォルトから変更した場合には、変更された値に基づいてピンホール 408 の大きさが設定される。減衰蛍光観察時において、ピンホール 408 を開放することで、ピンホール共役面である焦点面から生じたにも関わらず散乱等により結像関係が乱されてしまった蛍光も検出することができるので、より多くの光子を検出することができ、結果として信号対雑音比の向上が可能となる。

[0054] 以上の設定に基づいて、減衰蛍光観察の画像が取得される (S106)。減衰蛍光観察の画像を取得する方法は、顕微鏡装置 10 で説明したものと同一であり、説明を省略する。

[0055] ステップ S106 の後、または、ステップ S100 の判断が No の場合に

、共焦点観察の画像を取得するかどうか、チェックボックス302の入力に基づいて判断される(S108)。共焦点観察の画像を取得すると判断された場合に(S108:Yes)、チェックボックス304、306に基づいて共焦点観察に用いられるポンプ光を変調するか否かが判断され(S112)、変調する場合には(S112:Yes)、入力欄308に入力された変調周波数が設定される(S114)。

[0056] ステップS114の後にまたはステップS112でポンプ光を変調しない場合に(S112:No)、ユーザからの入力欄310への入力に基づいてピンホール408の径が設定される(S116)。

[0057] 上記設定に基づいて共焦点観察の画像が取得される(S118)。より詳しくは、ポンプ光についてAOM544をON状態にするか、または、強度変調し、活性化光およびプローブ光をOFF状態にして、走査部150で観察対象物184を走査しつつ、ピクセルごと検出部136で蛍光を検出する。当該検出結果を位置情報に対応付けて記憶部226に記憶する。

[0058] 画像生成部222は、記憶部226から位置情報に対応付けられた検出結果を読み出して、共焦点の観察画像330および減衰蛍光の観察画像332を生成し、表示部224に表示する(S120)。

[0059] さらに、チェックボックス312で共焦点観察のタイムラプス画像の取得を受け付けた場合に、顕微鏡装置12は入力欄314で設定された時間間隔で共焦点観察を実行してそれぞれの観察画像を生成する。同様に、チェックボックス324で減衰蛍光観察のタイムラプス画像の取得を受け付けた場合に、顕微鏡装置12は入力欄326で設定された時間間隔で減衰蛍光観察を実行してそれぞれの観察画像を生成する。

[0060] 顕微鏡装置12で、さらに光スイッチ過程による蛍光を検出してもよい。この場合に、プローブ光のAOM524をOFF状態に、ポンプ光のAOM544をON状態にそれぞれ設定する。活性化光をAOM514によってf1で強度変調する。これにより発生する蛍光を受光部410で検出し、復調周波数f1でロックインアンプ134にてロックイン検出する。この信号は

活性化光とポンプ光の積で生じるので、本質的にセクショニング能力を有するためにピンホール408を開放することが好ましい。

[0061] なお、観察対象物184の広い視野の画像を共焦点観察で取得し、共焦点観察の画像のうちの一部の領域を指定して減衰蛍光観察の画像を取得する構成としても良い。この場合、共焦点観察で画像を取得して、減衰蛍光観察に適した範囲が自動で選択されてもよい。

[0062] 図12は、共焦点観察に基づいて減衰蛍光観察の範囲を選択する動作(S30)のフローチャートである。まず、共焦点観察により画像が取得される(S300)。この場合に、図11の動作(S10)におけるステップS112からS118が実行される。次に、ユーザからの入力に基づいて減衰蛍光観察の範囲を自動選択するか否かが判断される(S302)。

[0063] 自動選択する場合には(S302:Yes)、共焦点画像を画像処理解析し、減衰蛍光観察に適した範囲を選択する。例えば、画像を微分フィルタ処理し、ピークが多く生じる領域を選択する。

[0064] 一方、自動選択しない場合には(S302:No)、ユーザからの指定に基づいて減衰蛍光観察の領域を設定する(S308)。この場合に、図10の共焦点の観察画像330上で領域指定を受け付けてもよい。

[0065] ステップS304またはS308で設定された領域について、減衰蛍光観察を実行して観察画像を取得する(S306)。この場合に、図11の動作(S10)におけるステップS102からS106が実行される。

[0066] 図13は、顕微鏡装置12において、共焦点観察をするか減衰蛍光観察をするかを自動選択する動作(S20)のフローチャートであり、図14は当該動作で用いられるGUI画面350を示す。

[0067] 記憶部226には、蛍光物質の名称に対応付けて、共焦点観察が好ましいか減衰蛍光観察が好ましいか、および、共焦点観察の場合のポンプ光の波長または減衰蛍光観察の場合のポンプ光およびプローブ光の波長が記憶されている。GUI画面350には、記憶部226に記憶されている蛍光物質353の名称がチェックボックス352とともに表示される。

[0068] ユーザによるチェックボックス352へのチェックにより蛍光物質が選択される(S200)。制御部130は、選択された蛍光物質に応じて、記憶部226を参照して共焦点観察が好ましいか減衰蛍光観察が好ましいかを判断する(S202)。共焦点観察が好ましいと判断した場合には、GUI画面350においてポンプ光のボックス355に色が付き、当該蛍光物質に対応したポンプ光の波長が自動選択されて、表示欄354に表示される(S204)。この場合、活性化光のボックス360およびプローブ光のボックス357は白色であって、波長の表示欄356、361がグレイアウトされる。減衰蛍光観察が好ましいと判断した場合には、GUI画面350においてポンプ光のボックス355に色が付き、当該蛍光物質に対応したポンプ光の波長が自動選択されて表示欄354に表示されるとともに、活性化光のボックス360およびプローブ光のボックス357にも色が付いて、当該蛍光物質に対応した活性化光の波長およびプローブ光の波長が自動選択されて表示欄356、361に表示される(S204)。いずれの場合も、表示欄358に蛍光物質の吸収帯、蛍光帯、光源の波長および検出領域の関係が図示される(S206)。

[0069] 減衰蛍光観察が好ましいと判断された場合には、ユーザの実行の指示に基づき、波長制御部230がレーザ光源102、104、500の光の波長を設定する。さらに、周波数制御部229が発振器132に変調周波数を設定する。この場合に、図10のGUI画面300で変調周波数の入力を受け付けてもよいし、蛍光物質に変調周波数を対応付けて記憶部226に記憶しておき、蛍光物質の選択に伴って当該変調周波数を自動的に設定してもよい。上記設定に基づいて、図11のステップS102からS106と同様に減衰蛍光観察の画像が取得される。

[0070] 一方、共焦点観察が好ましいと判断された場合には、ユーザの実行の指示に基づき、波長制御部230がレーザ光源102の光の波長を設定する。上記設定に基づいて、図11のステップS112からS118と同様に共焦点観察の画像が取得される。

- [0071] 図15はさらに他の顕微鏡装置14の構成を示す図である。顕微鏡装置14において顕微鏡装置10、12と同じ構成については同じ参照番号を付して説明を省略する。
- [0072] 顕微鏡装置10においては、活性化光の強度変調のためにAOM514を設けるとともにプローブ光の強度変調のためにAOM524を設けた。これに対し、顕微鏡装置14では、単体の音響光学チューナブルフィルタ(AOTFともいう)534により活性化光およびプローブ光の両方を変調する。AOTF534およびドライバ532が強度変調部530を構成する。
- [0073] この場合に、発振器132からの発振に基づいてドライバ532がAOTF534により、活性化光を f_1 で、プローブ光を f_3 でそれぞれ強度変調する。AOTF534では波長ごとに異なる周波数で強度変調することができるため、より簡易な装置構成で多色観察を実現することができる。この場合にポンプ光は強度変調せずに、常にON状態とする。
- [0074] なお、プローブ光の波長が短くなって試料の励起スペクトルに近づくと、プローブ光による蛍光励起が無視できない場合がある。この信号は、活性化光とプローブ光の積で生じるので、PSN-RF信号より分解能が悪く、混入した場合は分解能を低下させる恐れがある。この場合は、ポンプ光を周波数 f_2 で強度変調することが望ましい。ポンプ光の変調にはポンプ光用の強度変調部を更に設けてもよいし、顕微鏡装置14におけるAOTF534で、活性化光およびプローブ光に加えてポンプ光も強度変調してもよい。PSN-RF信号を検出するために、復調周波数を $f_1 \pm f_2 \pm f_3$ に設定することが望ましい。
- [0075] 図16は、さらに他の顕微鏡装置18の構成を示す図である。顕微鏡装置18は、ポジ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物184に、不活性光、強度変調させたポンプ光およびプローブ光を観察対象物184に照射することで、観察対象物184の蛍光物質より生じる誘導放出により減衰した蛍光信号をロックイン検出する。なお、顕微鏡装置18において顕微鏡装置10から14と同一の構成について同一の番号を付して説明を省略する。

- [0076] ポジ型スイッチング蛍光物質として Kohinor が挙げられる。
- [0077] 顕微鏡装置 18 においては、顕微鏡装置 14 の活性化光用のレーザ光源 500 に代えて不活性化光用のレーザ光源 502 を配している。例えば、不活性化光: 405 nm, ポンプ光: 488 nm, プローブ光: 600 nm のレーザ光をそれぞれ用いる。AOTF 534 は、ポンプ光とプローブ光を周波数 f_2 、 f_3 で強度変調する。この場合に不活性化光は強度変調せずに、常に ON 状態とする。
- [0078] 図 17 を用いて顕微鏡装置 18 の減衰蛍光による観察の原理を説明する。図 17 は状態遷移図である。
- [0079] ポジ型スイッチング蛍光物質は図 17 に示すように状態遷移する。活性化状態においてはポンプ光で励起され、プローブ光で誘導放出されて減衰した蛍光が出射される。さらに活性化状態からは不活性化光の励起により発光できない不活性化状態に遷移する。ここで、信号として、時間的に以下の過程を経て生じる蛍光信号を検出する。
- (Step 1) ポンプ光によるスイッチング(不活性化状態から活性化状態へ)(1)
- (Step 2) ポンプ光による励起(2)
- (Step 3) プローブ光による誘導放出(3)
- [0080] この過程を経て生じる蛍光信号は、ポンプ光、ポンプ光、プローブ光の積の結果として得られるため、信号発生領域が制限される。発生する蛍光信号を PSP-RF 信号と定義する。この蛍光信号は、観察対象物 184 の蛍光スペクトルのうち、プローブ光と重複しない領域に設定することが望ましい。このために、光学フィルタ 166 によって、不活性化光、ポンプ光、プローブ光を除去することが望ましい。
- [0081] この3つの過程を経て生じる PSP-RF を検出するために、ポンプ光強度を周波数 f_2 で、プローブ光強度を周波数 f_3 で強度変調する。不活性化光、ポンプ光、プローブ光の時間波形を I_{Deact} 、 I_{Pump} 、 I_{Probe} とすると、

[数6]

$$I_{Deact}(t) = I_1 \quad (2.1)$$

$$I_{Pump}(t) = I_2 [1 + \cos(f_2 t)] \quad (2.2)$$

$$I_{Probe}(t) = I_3 [1 + \cos(f_3 t)] \quad (2.3)$$

ここで、 I_1 、 I_2 、 I_3 はそれぞれ不活性化光、ポンプ光、プローブ光の光強度である。PSP-RF信号は、

[数7]

$$\begin{aligned} I_{PSP-RF}(t) &\propto I_{Pump}^2(t) I_{Probe}(t) \\ &= I_2^2 I_3 [1 + \cos(f_2 t)]^2 [1 + \cos(f_3 t)] \\ &= I_2^2 I_3 \left[\frac{3}{2} + 2\cos f_2 t + \frac{3}{2}\cos f_2 t + \frac{1}{2}\cos 2f_2 t + \cos[(f_2 + f_3)t] + \cos[(f_2 - f_3)t] \right. \\ &\quad \left. + \frac{1}{4}\cos[(2f_2 + f_3)t] + \frac{1}{4}\cos[(2f_2 - f_3)t] \right] \end{aligned} \quad (2.4)$$

従って、 $2f_2 \pm f_3$ で生じる蛍光信号を取得することで、分解能の向上したPSP-RF信号を取得することができる。より具体的には、発振器132から上記復調周波数がロックインアンプ134に入力される。ロックインアンプ134は復調周波数に同期する信号を抽出する。走査部150で観察対象物184を走査しつつ、ロックインアンプ134でピクセルごとにロックイン検出を実施し、当該ピクセルの位置情報に対応付けて記憶部226に記憶する。画像生成部222は、記憶部226から位置情報に対応付けられた検出結果を読み出して、減衰蛍光の観察画像を生成し、表示部224に表示する。

- [0082] 図18は分解能向上の原理について示す図である。不活性化光、ポンプ光、プローブ光の光スポットの強度分布をそれぞれ S_1 、 S_2 、 S_3 とする。
(Step 1) ポンプ光により光スイッチング (OFF→ON) が発生する発生分布を A_1 とすると、それはポンプ光の強度分布に等しいので、

[数8]

$$A_1 = S_2 \quad (2.5)$$

(Step 2) ポンプ光により励起が発生する発生分布を A_2 とする。この信号発生分布は、Step 1 の発生分布 A_1 と、ポンプ光スポットの強度分布 S_2 の積に等しいので、

[数9]

$$A_2 = A_1 S_2 = S_2^2 \quad (2.6)$$

(Step 3) プローブ光により誘導放出が発生する発生分布を A_3 とする。この信号発生分布は、Step 2 の発生分布 A_2 と、プローブ光スポットの強度分布 S_3 の積に等しいので、

[数10]

$$A_3 = A_2 S_3 = S_2^2 S_3 \quad (2.7)$$

この発生分布 A_3 は PSP-RF 信号の発生分布と等価である。このように、3つの光の積で生じる蛍光信号を検出することで、図18に示すように、光スポットの中心からの蛍光発生の影響を大きくかつ周辺からの蛍光発生の影響を小さくすることができるので、観察対象物184からの信号発生領域を回折限界以下に制限でき、結果として分解能を向上させることができる。

[0083] 観察対象物184への集光位置ごとに、時間的に不活性化光を照射後に、ポンプ光とプローブ光を照射する構成としても良い。これにより、プローブ光によりON状態にスイッチする確率が向上するので、信号対雑音比が向上するという利点がある。

[0084] 図19は、さらに他の顕微鏡装置20の構成を示す図である。顕微鏡装置20において顕微鏡装置10から18と同一の構成について同一の番号を付して説明を省略する。

- [0085] 顕微鏡装置 20 は、ポジ型スイッチング蛍光物質およびネガ型スイッチング蛍光物質の両方を含む観察対象物 184 に、ポンプ光およびプローブ光と、活性化光および不活性化とを観察対象物 184 に照射することで、観察対象物 184 のポジ型スイッチング蛍光物質およびネガ型スイッチング蛍光物質より生じる誘導放出により減衰した蛍光信号をロックイン検出する。特に、顕微鏡装置 20 は、ポジ型スイッチング蛍光物質からの減衰蛍光信号と、ネガ型スイッチング蛍光物質からの減衰蛍光信号とを同時に観察することができる顕微鏡装置である。
- [0086] 顕微鏡装置 20 は、顕微鏡装置 14 とは、スイッチング光用のレーザ光源 506 および他のロックインアンプ 135 を設けている点が異なる。また、観察対象物 184 にはポジ型スイッチング蛍光物質およびネガ型スイッチング蛍光物質の両方が導入されている。
- [0087] レーザ光源 506 から出射されるスイッチング光は、ネガ型スイッチング蛍光物質に対して活性化光として機能し、ポジ型スイッチング蛍光物質に対して不活性化光として機能する。言い換えれば、ネガ型スイッチング蛍光物質の活性化光の波長と、ポジ型スイッチング蛍光物質の不活性化光の波長とが同一となるような、ネガ型スイッチング蛍光物質とポジ型スイッチング蛍光物質とが用いられる。このような蛍光物質を用いることで、スイッチング光を共通化できるので、装置構成がシンプルになり、コストも抑えられるという利点がある。
- [0088] なおここで波長が同一とは、それぞれの波長がレーザ光源 506 から出射される光の波長範囲に入っていれば、完全に同一でなくてよい。光波長としては、例えば、スイッチング光：405 nm、ポンプ光：488 nm、プローブ光：600 nm のレーザ光がそれぞれ用いられる。
- [0089] 顕微鏡装置 20 において、AOTF 534 により、スイッチング光を f1 で、ポンプ光を f2 で、プローブ光を f3 でそれぞれ強度変調する。発生する蛍光信号を受光部 174 で受光し、受光部 174 の出力信号を分岐してそれぞれをロックインアンプ 134、135 に入力する。

- [0090] ロックインアンプ134はネガ型スイッチング蛍光物質の信号取得用であり、復調周波数を $f_1 \pm f_2 \pm f_3$ に設定する。一方、ロックインアンプ135はポジ型スイッチング蛍光物質の信号取得用であり、復調周波数を $2f_2 \pm f_3$ に設定する。このように復調周波数に差を設けることにより、同一の装置構成においてネガ型スイッチング蛍光物質とポジ型スイッチング蛍光物質のプロープを同時観察することが可能となる。
- [0091] 図20は、さらに他の顕微鏡装置22の構成を示す図である。顕微鏡装置22において顕微鏡装置10から20と同一の構成について同一の番号を付して説明を省略する。
- [0092] 顕微鏡装置22は、顕微鏡装置20と同様に、ポジ型スイッチング蛍光物質およびネガ型スイッチング蛍光物質の両方を含む観察対象物184に、ポンプ光およびプロープ光と、活性化光および不活性化とを観察対象物184に照射することで、観察対象物184のポジ型スイッチング蛍光物質およびネガ型スイッチング蛍光物質より生じる誘導放出により減衰した蛍光信号をロックイン検出する。ただし、顕微鏡装置22においては、ポジ型スイッチング蛍光物質からの減衰蛍光信号と、ネガ型スイッチング蛍光物質からの減衰蛍光信号とをシーケンシャル、すなわち時分割で観察することができる顕微鏡装置である。
- [0093] 顕微鏡装置22は、顕微鏡装置20とはロックインアンプ135が設けていない点異なる。一方、単一のロックインアンプ134に対し、復調周波数を時分割で変えて検出する。より具体的には、AOTF534で、表1に示すようにスイッチング光を f_1 、ポンプ光を f_2 、プロープ光 f_3 で強度変調して観察対象物184に照射する。受光部174で出力された信号に対して、ある時間帯ではロックインアンプ134において復調周波数 f_p でロックイン検出することで、ポジ型スイッチング蛍光物質による減衰蛍光信号を検出する。他の時間帯ではロックインアンプ134において復調周波数 f_n でロックイン検出することで、ネガ型スイッチング蛍光物質による減衰蛍光信号を検出する。

[0094] [表1]

	ポジ型	ネガ型	
スイッチング光		f_1	f_1
ポンプ光	f_2		f_2
プローブ光	f_3	f_3	f_3
復調周波数	$f_p = 2f_2 \pm f_3$	$f_n = f_1 \pm f_3$	$f_n = f_1 \pm f_2 \pm f_3$

[0095] 図21は、さらに他の顕微鏡装置24の構成を示す図である。顕微鏡装置24において顕微鏡装置10から22と同一の構成について同一の番号を付して説明を省略する。

[0096] 顕微鏡装置24においては、対物レンズ164に対向して対物レンズ190が配され、さらに対物レンズ190からの光路に光学フィルタ192および検出部194が配される。検出部194の一例はフォトダイオードである。また、光学フィルタ192はプローブ光を含む波長帯域を透過させ、他の波長領域を遮断する。

[0097] AOTF534で、表2に示すようにスイッチング光を f_1 、ポンプ光を f_2 、プローブ光 f_3 で強度変調して観察対象物184に照射する。受光部174で出力された信号に対して、ロックインアンプ134において復調周波数 f_m でロックイン検出することで、ポジ型スイッチング蛍光物質による減衰蛍光信号を検出し、受光部194で出力された信号に対してロックイン検出することにより、観察対象物184を通過したプローブ光による信号を検出する。プローブ光による誘導放出光の信号発生領域が活性化光とポンプ光とプローブ光の重複領域となるために、蛍光検出と同様に空間分解能を向上させることができる。なお、光学フィルタ192としてプローブ光波長のみを透過するような狭帯域なフィルタを用いた場合には、誘導放出光のみが検出される。一方、広帯域なフィルタを用いた場合にはプローブ光に加えて

蛍光も検出されるため、光量が増大される。

[表2]

	①蛍光検出		②誘導放出検出
活性化光	f_1	f_1	f_1
ポンプ光		f_2	f_2
プローブ光	f_3	f_3	f_3
復調周波数: f_m	$f_1 \pm f_3$	$f_1 \pm f_2 \pm f_3$	$f_1 \pm f_2 \pm f_3$

[0098] この装置構成において、実施形態1で述べたPSN-RF信号も取得できるので、周波数の変更だけで、どちらの信号を取得するかを容易に切り替えることができる。あるいはロックインアンプを2つ用意してそれぞれの復調周波数を表2に応じて蛍光検出用と誘導放出検出用に設定することで、同時観察も可能となる。なお、ここでは例としてネガ型スイッチング蛍光物質からの誘導放出信号を取得する場合について説明したが、ポジ型スイッチング蛍光物質に対しても同様に適用可能である。

[0099] なお、顕微鏡装置12から24において走査部150に代えて、図7の走査部151または図8の走査部156が用いられてもよい。

[0100] レーザ光源102等として連続発振方式を用いたが、パルスレーザを用いてもよい。また、受光部174等として光電子増倍管を用いたが、アバランシェフォトダイオード(APD)を用いても良い。

[0101] また、上記実施形態において励起には一光子励起を用いたが、二光子励起、三光子励起といった多光子励起を用いても良い。

[0102] 顕微鏡装置14から24において、顕微鏡装置16のデスクャン光学系を用いてもよい。また、減衰蛍光観察時、デスクャンにより蛍光を検出する構成において、ピンホール408等を絞る構成としても良い。その結果、結像系の点像分布関数も光学分解能向上に寄与するため、さらなる分解能向上が可能となる。光量が十分確保される明るい蛍光物質を観察する場合には、ピ

ンホール408等を絞る構成とすることが望ましい。一方で、光量が十分に確保されない暗い蛍光物質を観察する場合には、ピンホール408等を開放することが望ましい。

[0103] また、広視野観察時において倍率色収差によりポンプ光とプローブ光の面内方向のスポットズレが問題となる場合や、深部観察において軸上色収差によりポンプ光とプローブ光の光軸方向のスポットズレが問題となる場合は、ポンプ光のビーム径をプローブ光のビーム径に比べて細くすることが望ましい。これにより、ポンプ光のスポットが面内方向・光軸方向に広がり、ビームのオーバーラップがより容易になる。なお、ポンプ光のビーム径を細くする理由は、ポンプ光はプローブ光に比べて波長が短いことから、同一の対物レンズにおいて同一のビーム径でスポットを生成した際に、ポンプ光の方がプローブ光に比べてスポット径が小さいためである。

[0104] 上記いずれの実施形態においても、AOMに代えて、AOTFを用いてもよい。他の例として、EOM(電気光学素子)と偏光子を用いて、偏光方向を高速に切り替えることで、光強度の変調を実現しても良い。あるいは、チョッパーなどのメカニカルシャッターを用いても良い。

[0105] 顕微鏡装置10から26のいずれかの光の光路に、位相板(ラジアル偏光子)を挿入する構成としても良い。これにより、位相板を透過した光の点像分布関数が面内方向でよりシャープになり、分解能向上効果が増大する。一般的にこのような位相板を用いると、面内方向の分布がシャープになる代わりに、(i)サイドローブが生じる、(ii)光軸方向の分布が太くなるといった課題がある。しかしながら、提案手法では、信号発生領域は3つの光の重複領域となるために、これらの課題が解消され、面内方向分布がシャープになるという恩恵だけを受けることができる。なお、各光それぞれに異なる位相板を挿入しても良いし、3つの光の共通光路に同一の位相板を挿入しても良い。なお、他の形状の位相板でも良い。また、位相板の変わりにマスクを挿入し、光の振幅に分布を持たせることで、点像分布関数の形状を制御しても良い。例えば、輪帯板を挿入してベッセルビームを生成しても同様の

効果が得られる。

[0106] また、顕微鏡装置 10、14、18、20、22、24 においても、顕微鏡装置 12 と同様に、波長制御部 230 を設けてレーザ光源の光の波長を制御してもよい。また、上記実施形態はいずれも顕微鏡装置を用いたが、減衰蛍光が観察できる蛍光観察装置であれば顕微鏡に限られない。

[0107] また、ダイクロイックミラー 162、402 は照明光を透過させて、蛍光を反射するが、これに代えて、照明光を反射して蛍光を透過するようにしてもよい。

[0108] なお、特定の周波数の信号成分を検出する方式としてロックインアンプについて説明したが、他の方法でも良い。例えば、時間信号をフーリエ変換することで特定の周波数の信号成分を検出しても良い。例えば、周波数変換器により、復調周波数を持つ参照信号と信号光を乗算し、直流成分のみを抽出する構成としても良い。なお、ここでいう直流成分とは、正弦波の振動成分を直流に変換した値に相当する。

[0109] 発明を実施の形態を用いて説明したが、本発明の技術的範囲は上記実施の形態に記載の範囲には限定されない。上記実施の形態に、多様な変更または改良を加えることが可能であることが当業者に明らかである。その様な変更または改良を加えた形態も本発明の技術的範囲に含まれ得ることが、請求の範囲の記載から明らかである。

[0110] 請求の範囲、明細書、および図面中において示した装置、システム、プログラム、および方法における動作、手順、ステップ、および段階等の各処理の実行順序は、特段「より前に」、「先立って」等と明示しておらず、また、前の処理の出力を後の処理で用いるのでない限り、任意の順序で実現しうることに留意すべきである。請求の範囲、明細書、および図面中の動作フローに関して、便宜上「まず、」、「次に、」等を用いて説明したとしても、この順で実施することが必須であることを意味するものではない。

[0111] なお、いずれかの顕微鏡装置において、スイッチング光、ポンプ光、プローブ光の偏光は同一であることが望ましい。例えば、同一の直線偏光、円偏

光であることが望ましい。あるいは、ポンプ光とプローブ光の偏光を直交する直線偏光とした場合と、平行な直線偏光とした場合でそれぞれ減衰蛍光による画像を取得し、両者を比較することで、観察対象物の偏光特性を可視化する構成としても良い。これは、誘導放出の効率が偏光に依存するためである。あるいは、スイッチング光とポンプ光の偏光を直交させる構成としても良い。この場合、光スイッチングの偏光特性を可視化できる。

符号の説明

- [0112] 10、12、14、18、20、22、24 顕微鏡装置
- 100 光源
 - 102、104、500、502、506 レーザ光源
 - 130 制御部
 - 132 発振器
 - 134、135 ロックインアンプ
 - 136、194 検出部
 - 140 照明光学系
 - 150、151、156 走査部
 - 152 レゾナントスキャナ
 - 153 ガルバノスキャナ
 - 154、155 ミラー
 - 160 観察光学系
 - 162 ダイクロイックミラー
 - 164 対物レンズ
 - 166、192、404 光学フィルタ
 - 406 レンズ
 - 172、173 レンズペア
 - 174、410 受光部
 - 180 ステージ
 - 182 スライドガラス

- 1 8 4 観察対象物
- 1 8 6 標本
- 2 2 0 入力部
- 2 2 2 画像生成部
- 2 2 4 表示部
- 2 2 6 記憶部
- 2 2 8 スキャナ制御部
- 2 2 9 周波数制御部
- 2 3 0 波長制御部
- 4 0 8 ピンホール
- 4 0 2、4 5 4、4 5 6 ダイクロイックミラー
- 4 5 8、4 6 0 ミラー
- 5 1 0 第1強度変調部
- 5 1 2、5 2 2、5 3 2、5 4 2 ドライバ
- 5 1 4、5 2 4、5 4 4 音響光学素子
- 5 2 0 第2強度変調部
- 5 3 0 強度変調部
- 5 3 4 音響光学チューナブルフィルタ
- 5 4 0 第3強度変調部
- 3 0 0、3 5 0 GUI画面
- 3 0 2、3 0 4、3 1 2、3 1 6、3 2 4、3 5 2 チェックボックス
- 3 5 4、3 5 6、3 5 8 表示欄
- 3 0 8、3 1 0、3 1 4、3 1 8、3 2 0、3 2 2、3 2 3、3 2 5、3 2 6 入力欄
- 3 3 0、3 3 2 観察画像
- 3 3 4 タイムラプス画像

請求の範囲

- [請求項1] 活性化光によって不活性化状態から活性化状態に移行し、活性化状態においてポンプ光によって励起されるネガ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察装置であって、
前記活性化光を周波数 f_1 で強度変調する第1の強度変調部と、
前記観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を前記周波数 f_1 とは異なる周波数 f_3 で強度変調する第2の強度変調部と、
前記ポンプ光、並びに、強度変調された前記プローブ光および前記活性化光を照射した前記観察対象物からの蛍光を受光する受光部と、
前記受光部で検出される受光信号のうち周波数 $f_1 \pm f_3$ の成分を検出する検出部と
を備える蛍光観察装置。
- [請求項2] 前記ポンプ光、前記プローブ光および前記活性化光で前記観察対象物を二次元的に走査する走査部をさらに備える請求項1に記載の蛍光観察装置。
- [請求項3] 前記走査部は、主走査方向を走査する共振ミラーと副走査方向を走査するガルバノミラーとを有する請求項2に記載の蛍光観察装置。
- [請求項4] 前記受光部は、前記走査部を前記ポンプ光、前記プローブ光および前記活性化光とは逆方向に通過した蛍光を受光する請求項3に記載の蛍光観察装置。
- [請求項5] 前記受光部の直前に配されたピンホールをさらに備え、前記受光部は前記ピンホールを通過した蛍光を受光する請求項4に記載の蛍光観察装置。
- [請求項6] 前記ポンプ光を前記周波数 f_1 、 f_3 のいずれとも異なる周波数 f_2 で強度変調する第3の強度変調部をさらに備え、
前記検出部は、前記受光部で検出される受光信号のうち周波数 $f_1 \pm f_2 \pm f_3$ の成分を検出する請求項1から5のいずれか1項に記載の蛍光観察装置。

- [請求項7] 活性化状態においてポンプ光によって励起され、不活性化光によって活性化状態から不活性化状態に移行するポジ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察装置であって、
前記ポンプ光を周波数 f_2 で強度変調する第1の強度変調部と、
前記観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を前記周波数 f_2 とは異なる周波数 f_3 で強度変調する第2の強度変調部と、
強度変調された前記ポンプ光および前記プローブ光、並びに、前記不活性化光を照射した前記観察対象物からの蛍光を受光する受光部と、
前記受光部で検出される受光信号のうち周波数 $2f_2 \pm f_3$ の成分を検出する検出部とを備える蛍光観察装置。
- [請求項8] 前記ポンプ光、前記プローブ光および前記不活性化光で前記観察対象物を二次元的に走査する走査部をさらに備える請求項7に記載の蛍光観察装置。
- [請求項9] 前記走査部は、主走査方向を走査する共振ミラーと副走査方向を走査するガルバノミラーとを有する請求項8に記載の蛍光観察装置。
- [請求項10] 前記受光部は、前記走査部を前記ポンプ光、前記プローブ光および前記不活性化光とは逆方向に通過した蛍光を受光する請求項9に記載の蛍光観察装置。
- [請求項11] 前記受光部の直前に配されたピンホールをさらに備え、前記受光部は前記ピンホールを通過した蛍光を受光する請求項10に記載の蛍光観察装置。
- [請求項12] 活性化光によって不活性化状態から活性化状態に移行し、活性化状態においてポンプ光によって励起されるネガ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察方法であって、
前記活性化光を周波数 f_1 で強度変調し、
前記観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を前記周波数 f_1 とは異なる周波数 f_3 で強度変調し、

前記ポンプ光、並びに、強度変調された前記プローブ光および前記活性化光を前記観察対象物に照射する工程と、

前記観察対象物からの蛍光を受光部で受光し、前記受光部で検出される受光信号のうち周波数 $f_1 \pm f_3$ の成分を検出する工程と、を含む蛍光観察方法。

[請求項13]

活性化状態においてポンプ光によって励起され、不活性化光によって活性化状態から不活性化状態に移行するポジ型スイッチング蛍光物質を含む観察対象物からの蛍光を観察する蛍光観察方法であって、

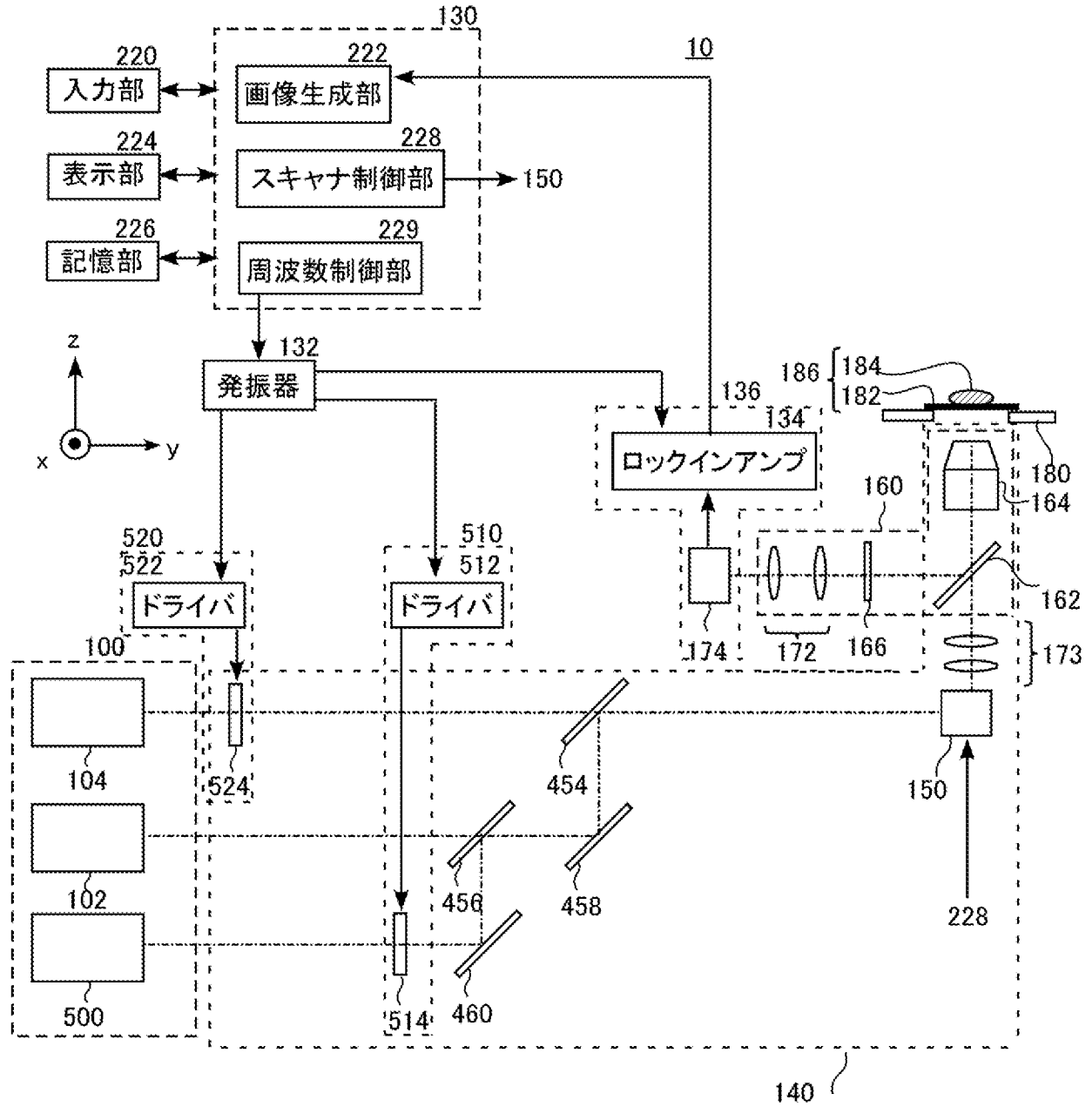
前記ポンプ光を周波数 f_2 で強度変調し、

前記観察対象物の誘導放出を誘起するプローブ光を前記周波数 f_2 とは異なる周波数 f_3 で強度変調し、

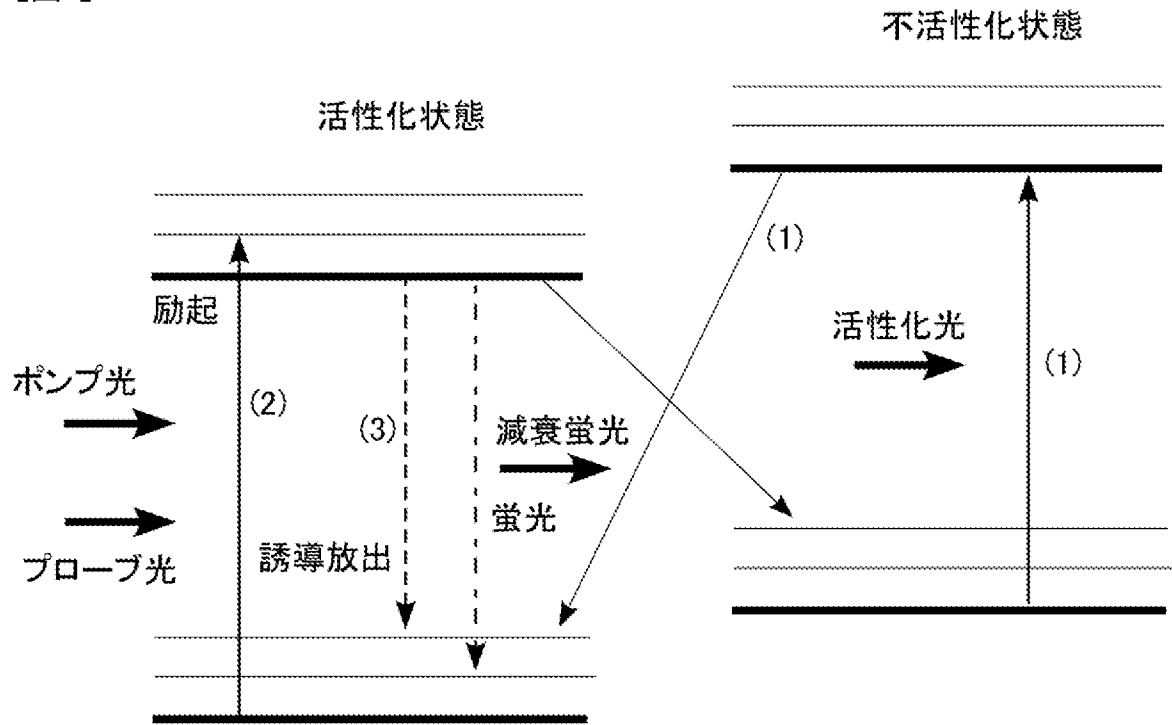
強度変調された前記ポンプ光および前記プローブ光、並びに、前記不活性化光を前記観察対象物に照射する工程と、

前記観察対象物からの蛍光を受光部で受光し、前記受光部で検出される受光信号のうち周波数 $2f_2 \pm f_3$ の成分を検出する工程と、を含む蛍光観察方法。

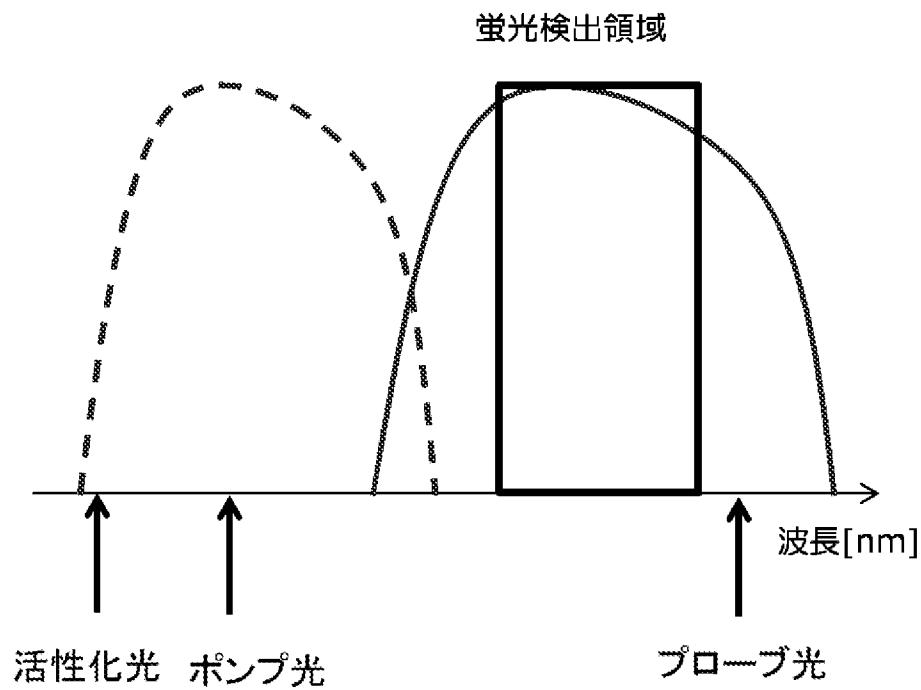
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

活性化光スポットS1 ポンプ光スポットS2 プローブ光スポットS3



(Step1)
ポンプ光による
活性化領域
 $A1 = S1$

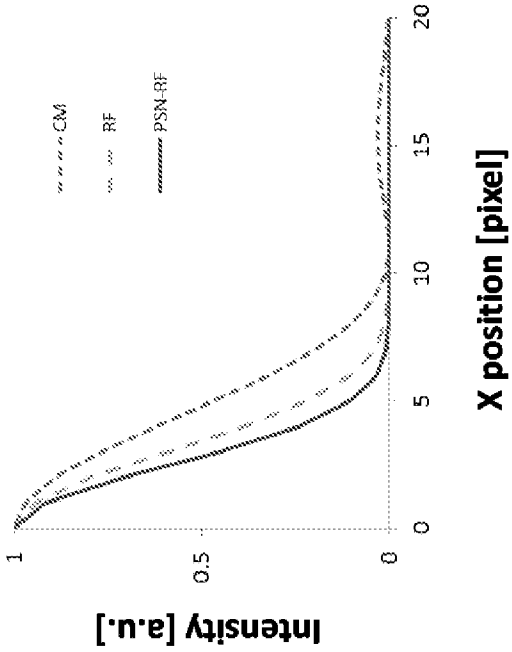
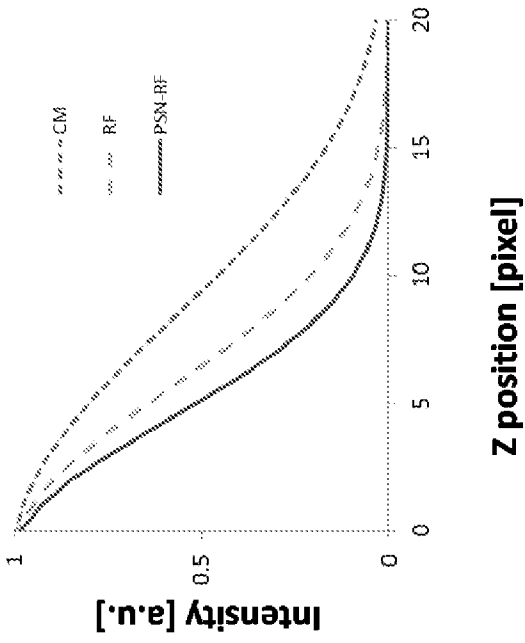


(Step2)
ポンプ光による
励起発生領域
 $A2 = S1 \times S2$



(Step3)
プローブ光による
誘導放出領域
 $A3 = S1 \times S2 \times S3$

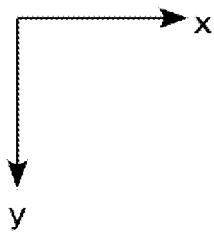
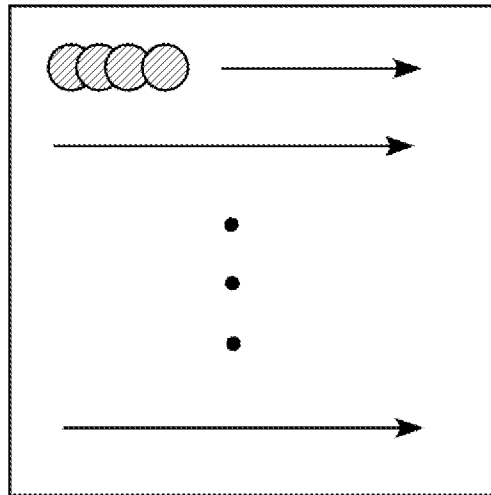
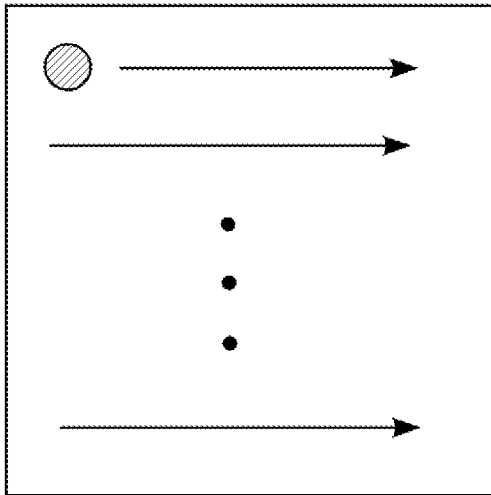
[5]



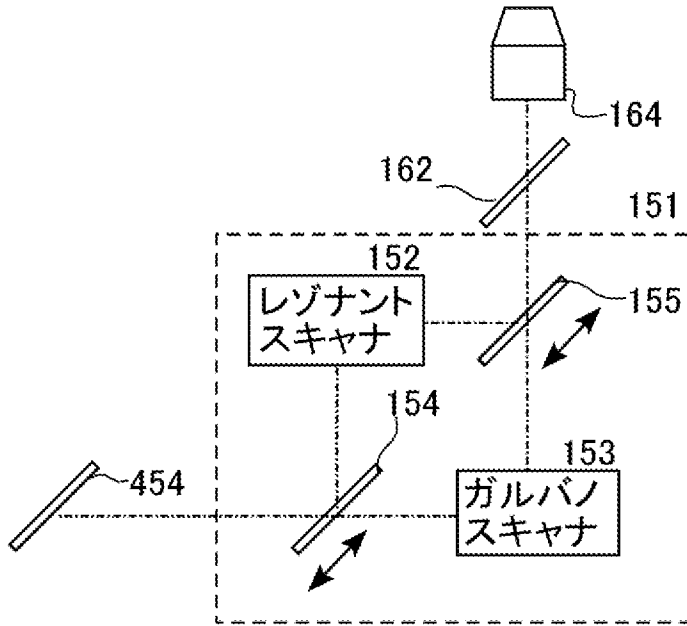
[図6]

(a) ガルバノスキャナ

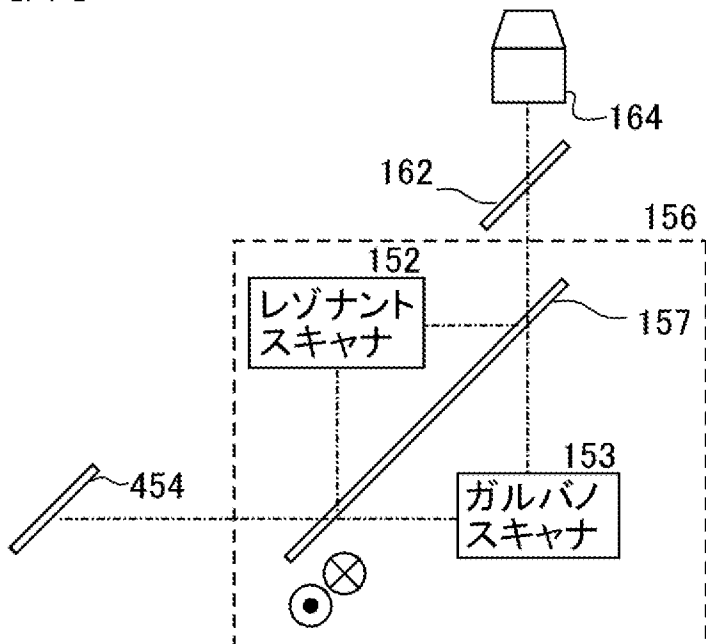
(b) レゾナントスキャナ



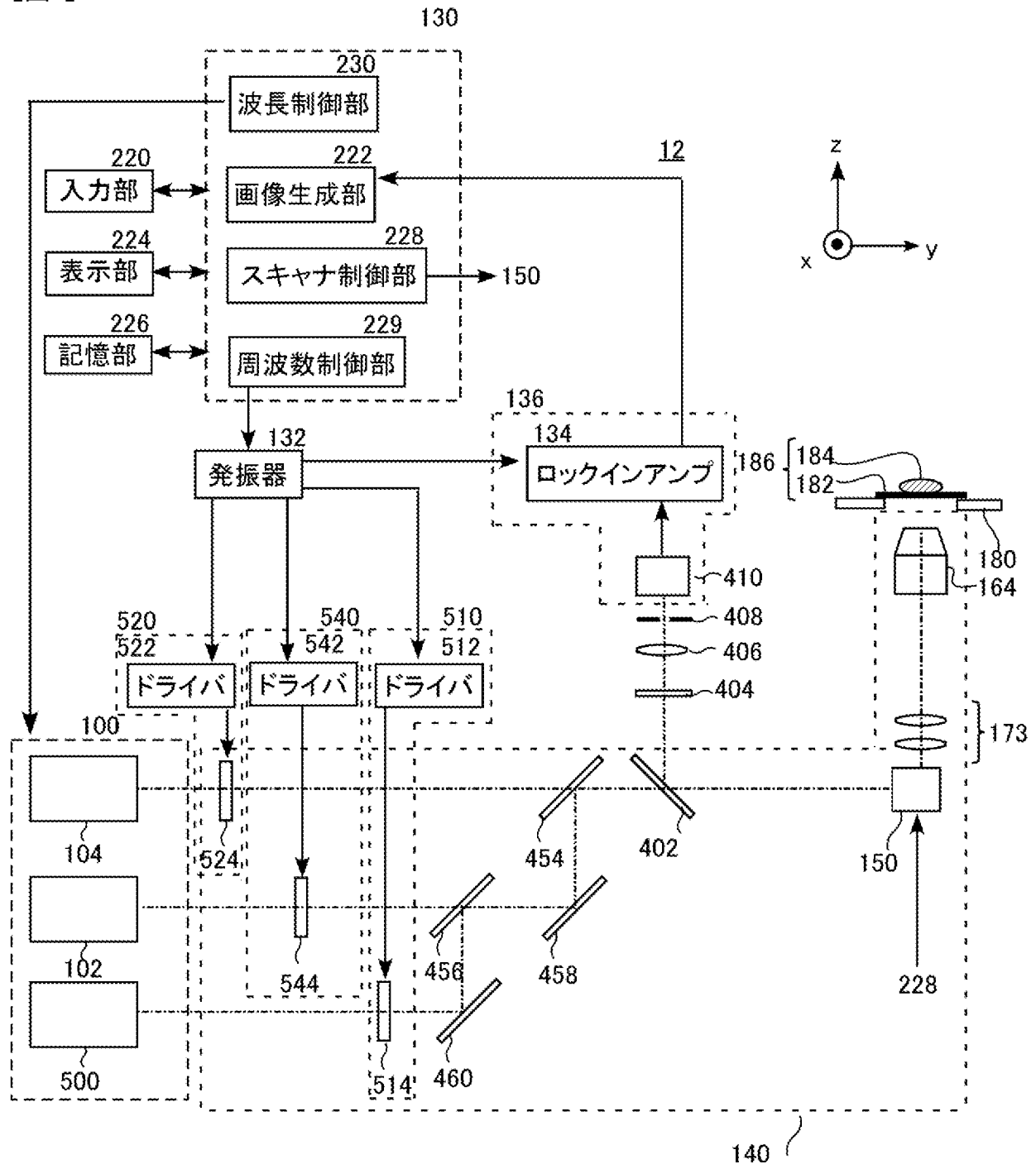
[図7]



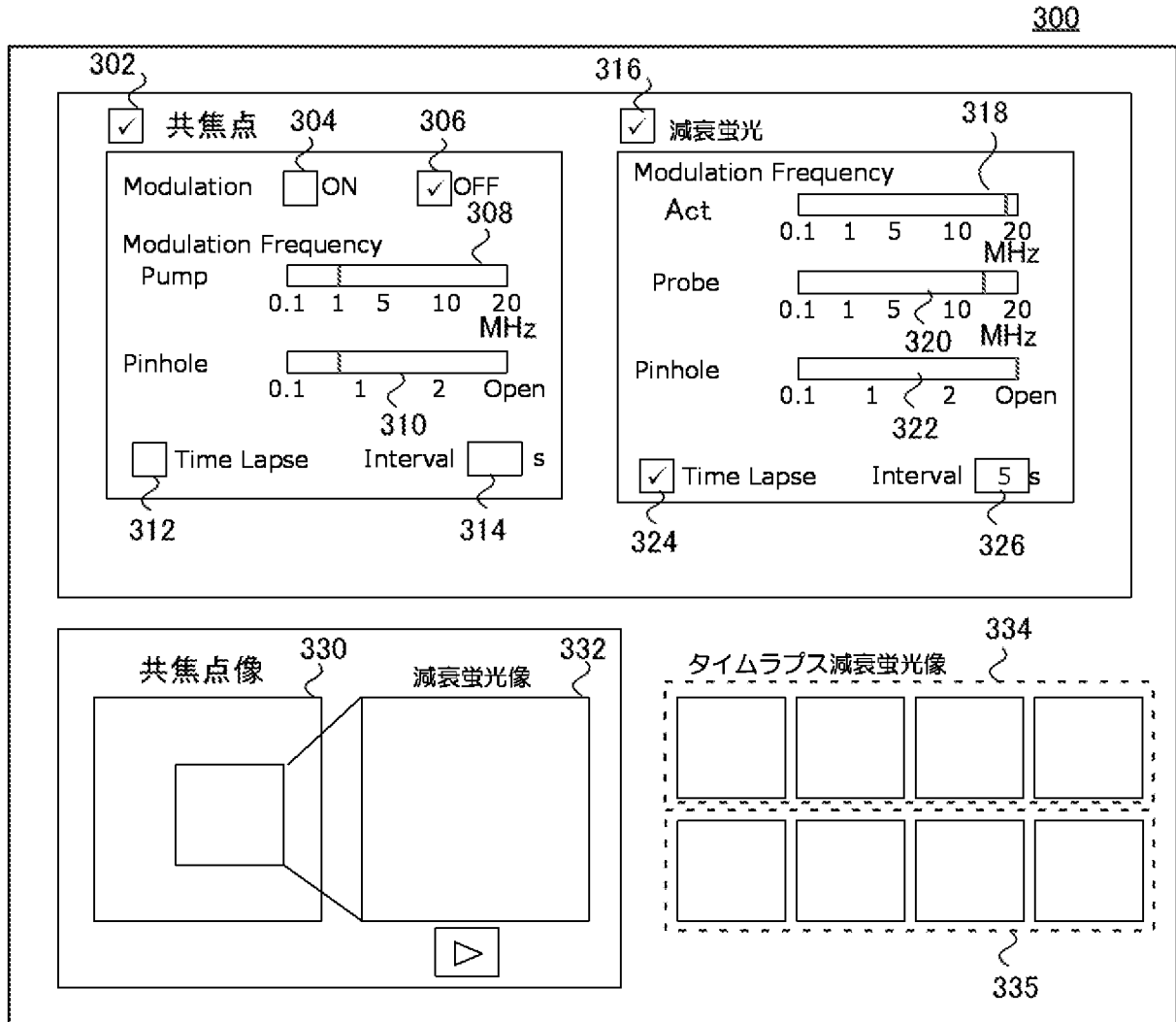
[図8]



[図9]

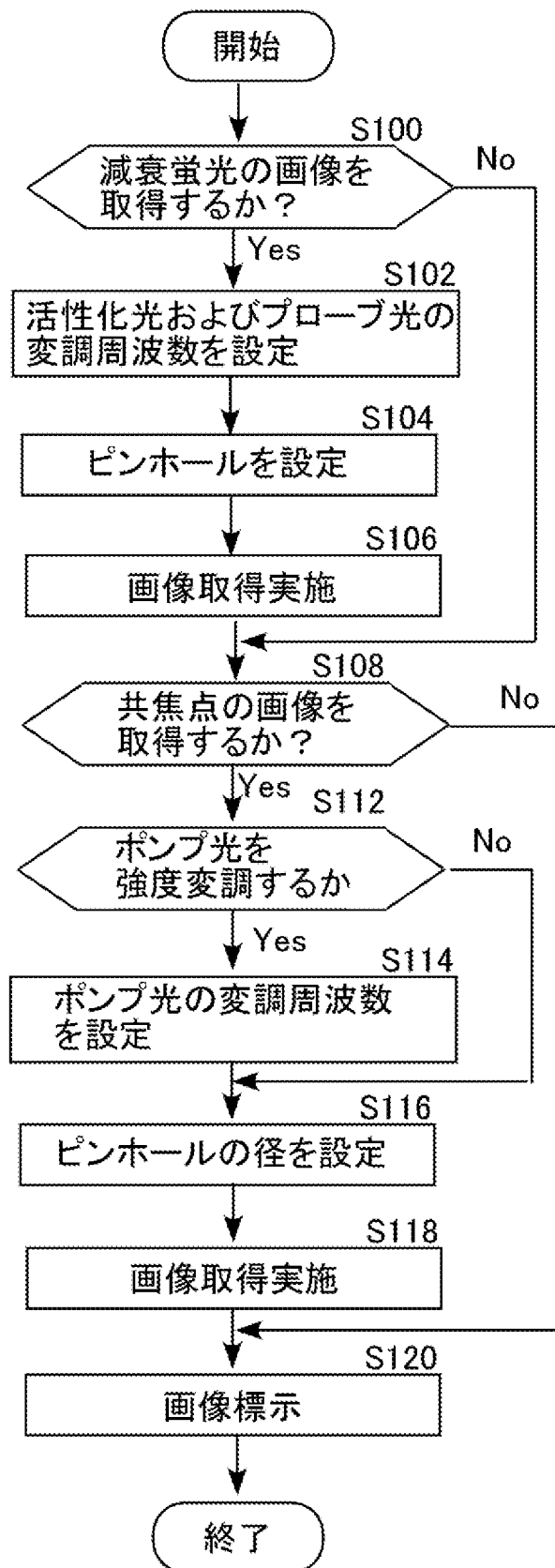


[図10]

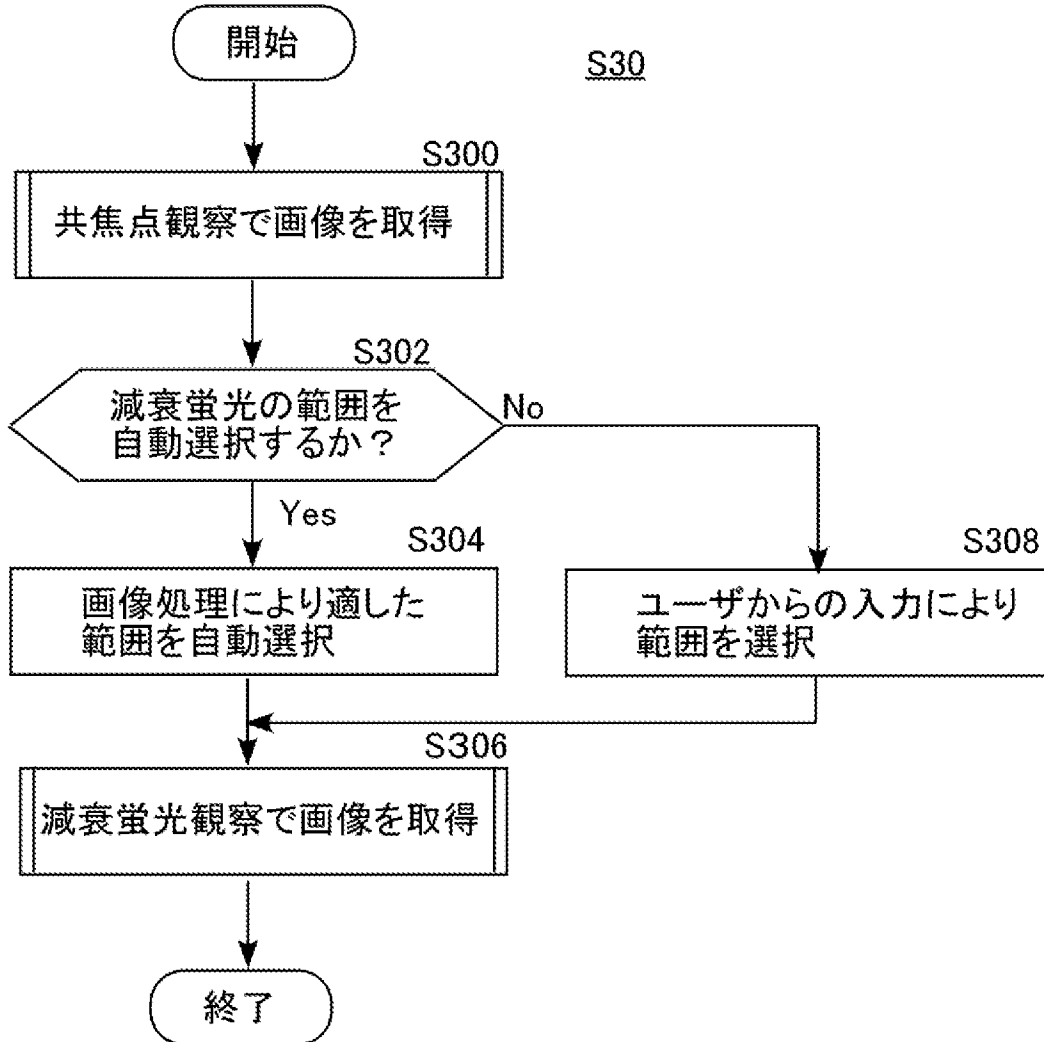


[図11]

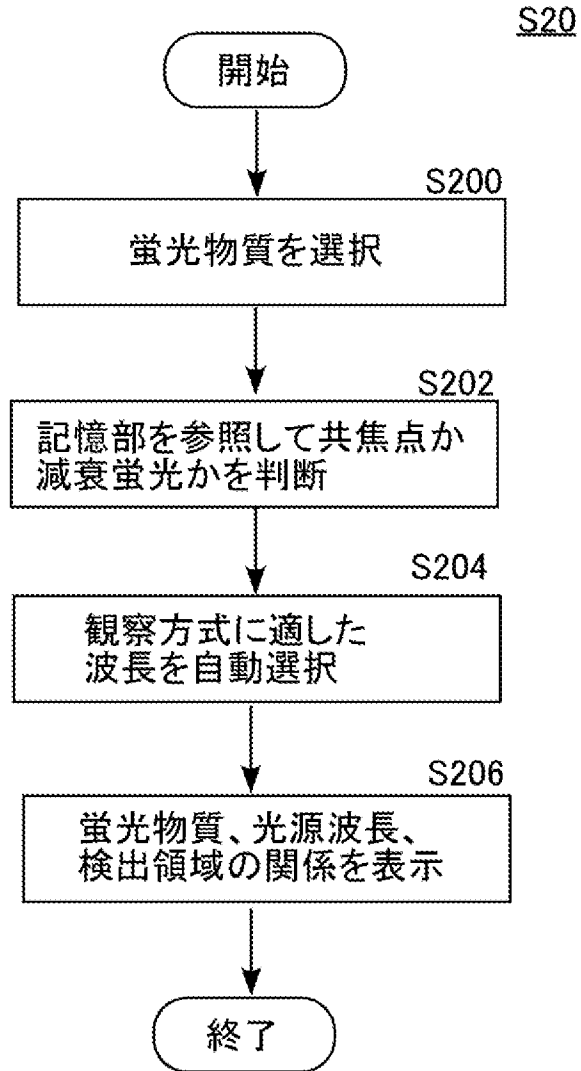
S10



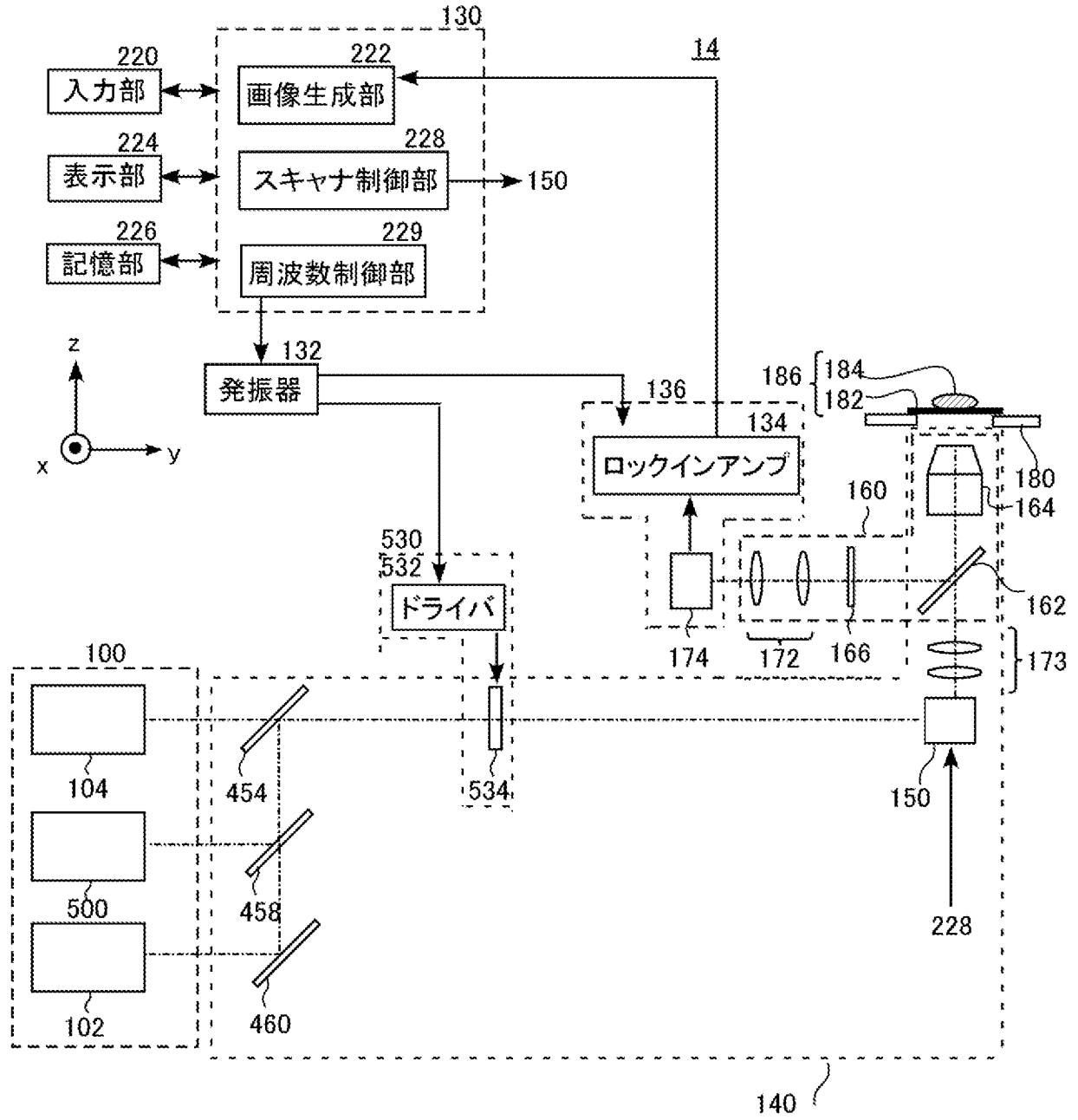
[図12]



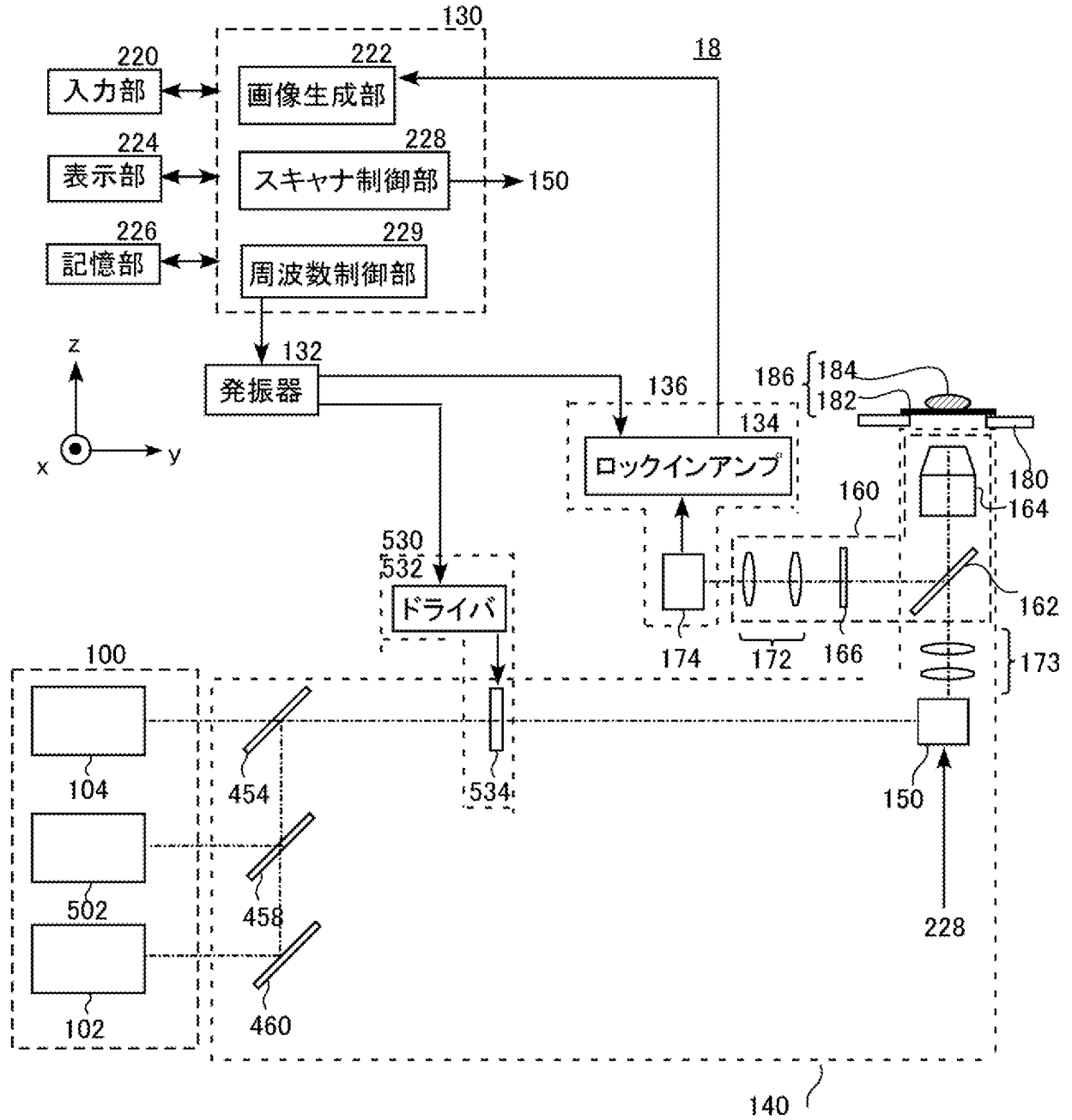
[図13]



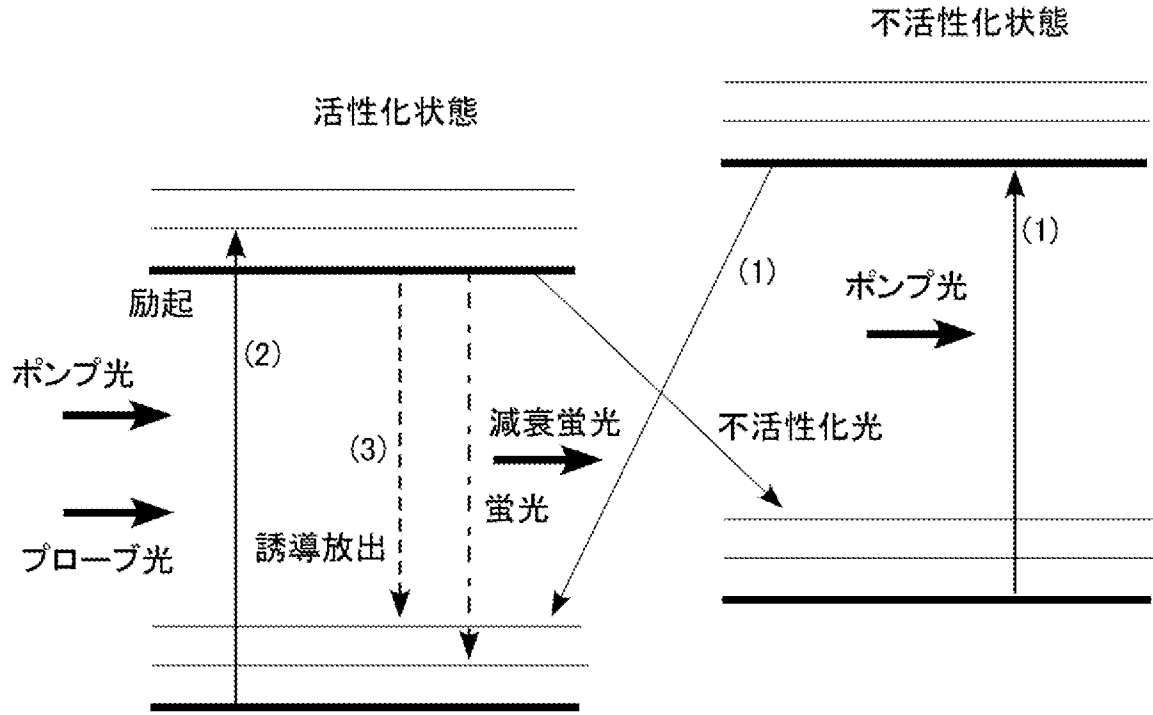
[図15]



[図16]



[図17]



[図18]

ポンプ光スポットS2 ポンプ光スポットS2 プローブ光スポットS3



(Step1)
ポンプ光による
活性化領域
 $A1 = S2$

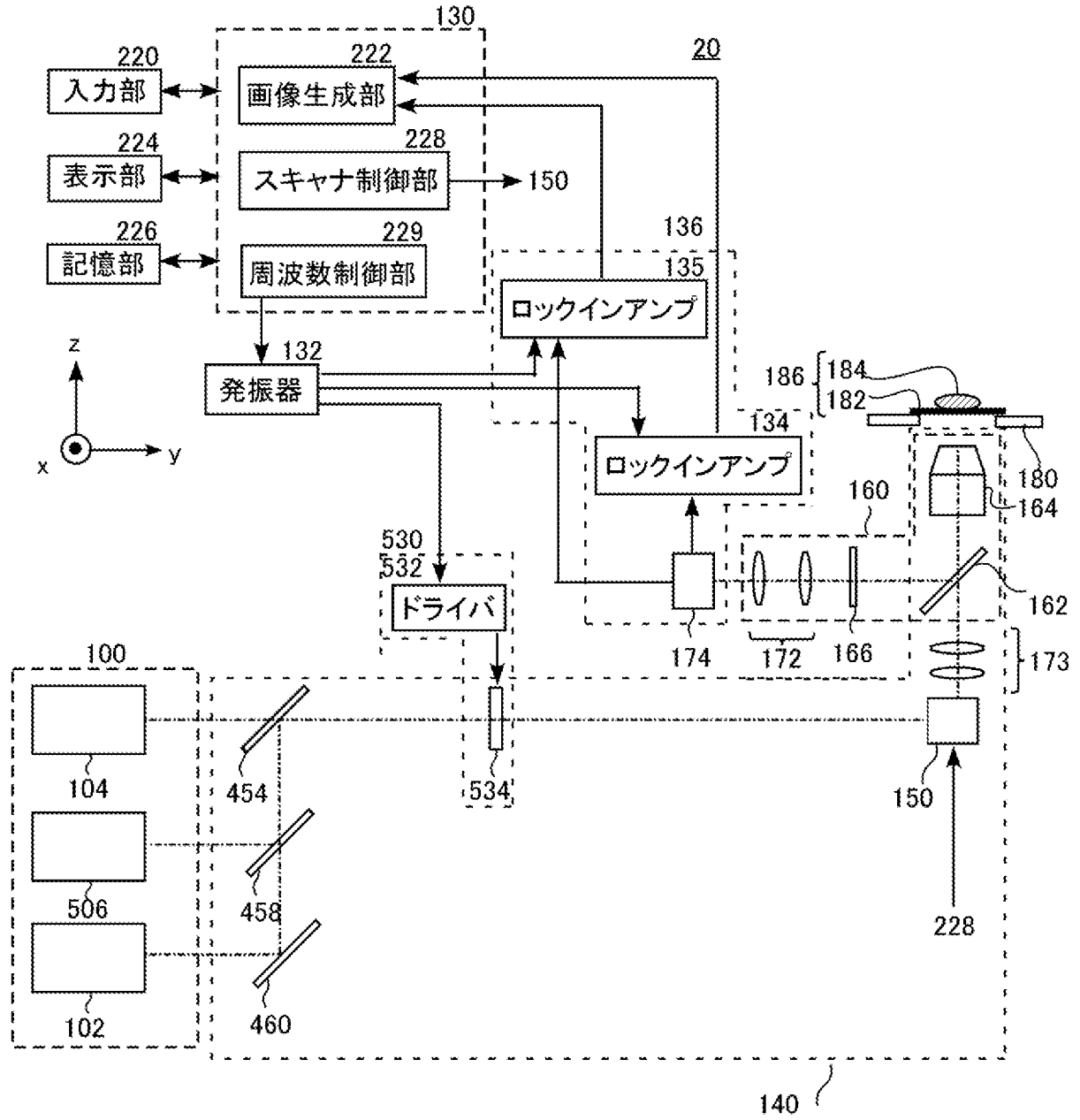


(Step2)
ポンプ光による
励起発生領域
 $A2 = S2 \times S2$

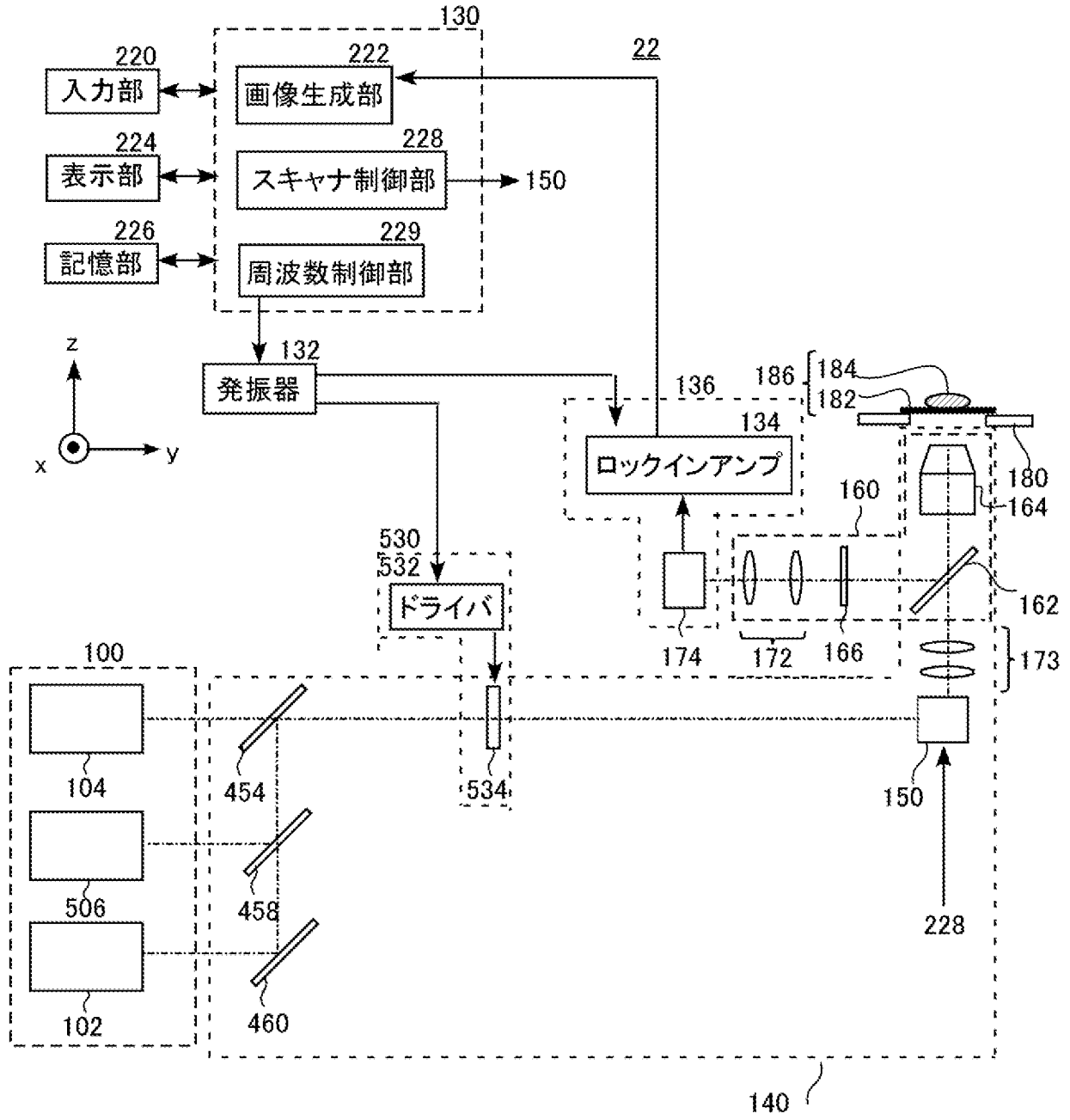


(Step3)
プローブ光による
誘導放出領域
 $A3 = S2 \times S2 \times S3$

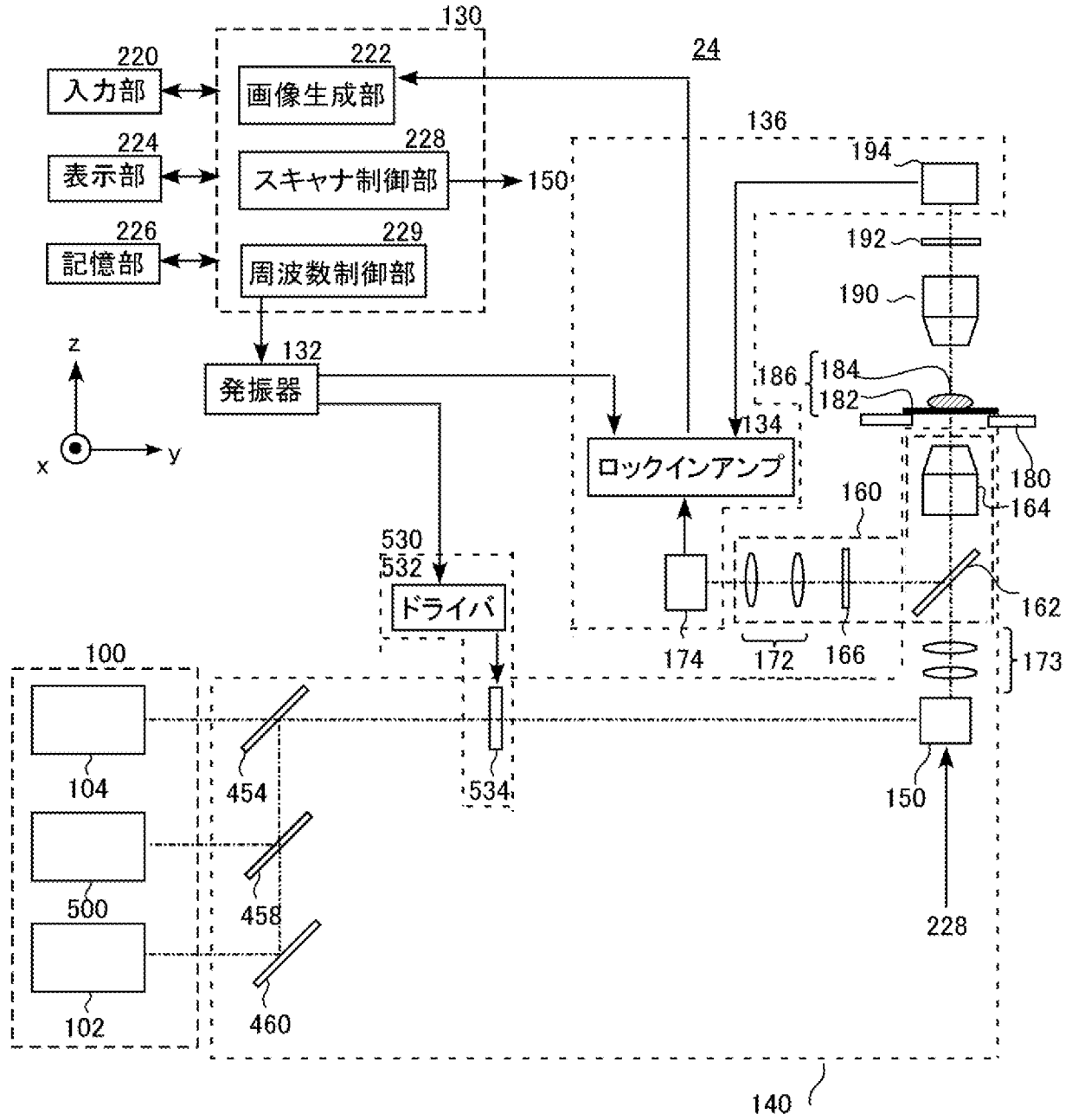
[図19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2017/039826
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl. G02B21/06 (2006.01) i, G01N21/64 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl. G02B21/06, G01N21/64

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/099269 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 18 August 2011 & US 2012/0307238 A1	1-13
A	JP 2014-97191 A (CANON INC.) 29 May 2014 (Family: none)	1-13
A	JP 2014-157372 A (INFINERA CORPORATION) 28 August 2014 & US 2008/0019637 A1 & WO 2009/015241 A1	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 24 January 2018 (24.01.2018)	Date of mailing of the international search report 06 February 2018 (06.02.2018)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/039826

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 2010-60656 A (FUJITSU LTD.) 18 March 2010 & US 2010/0054753 A1 & EP 2159622 A1	1-13
A	JP 2011-145487 A (RIKEN, JAPAN) 28 July 2011 (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G02B21/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i			
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. G02B21/06, G01N21/64			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	WO 2011/099269 A1 (国立大学法人大阪大学) 2011.08.18, & US 2012/0307238 A1	1-13	
A	JP 2014-97191 A (キヤノン株式会社) 2014.05.29, (ファミリーなし)	1-13	
A	JP 2014-157372 A (インフィネラ コーポレーション) 2014.08.28, & US 2008/0019637 A1 & WO 2009/015241 A1	1-13	
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		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	
国際調査を完了した日 24.01.2018		国際調査報告の発送日 06.02.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 将志	2W 4636
		電話番号 03-3581-1101 内線 3258	

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
A	JP 2010-60656 A (富士通株式会社) 2010.03.18, & US 2010/0054753 A1 & EP 2159622 A1	1-13
A	JP 2011-145487 A (独立行政法人理化学研究所) 2011.07.28, (ファミリーなし)	1-13