

(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
2017年9月21日(21.09.2017)



(10) 国際公開番号

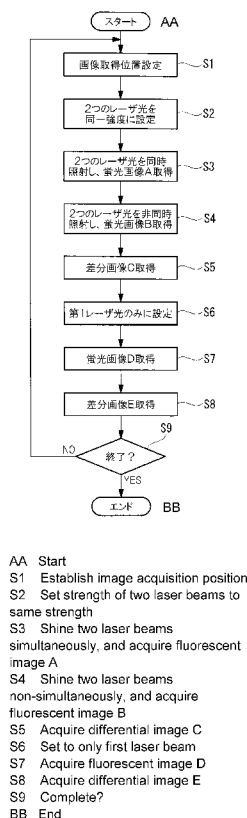
WO 2017/158697 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/058018
- (22) 国際出願日: 2016年3月14日(14.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: オリンパス株式会社(OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 土井 厚志(DOI, Atsushi); 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 上田 邦生, 外(UEDA, Kunio et al.); 〒2208137 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-2-1 横浜ランドマークタワー37F Kanagawa (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, 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, 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, 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

[続葉有]

(54) Title: IMAGE ACQUISITION METHOD AND IMAGE ACQUISITION DEVICE

(54) 発明の名称: 画像取得方法および画像取得装置



(57) Abstract: In order to acquire a clear signal light image by removing unfocused signal light without detriment to S/N ratio, the image acquisition method according to the present invention entails condensing onto a sample and scanning a pulse-form illumination light emitted from a light source, detecting signal light generated by a non-linear optical process at each scanning position, and generating an image of the sample on the basis of the detected signal light, said method comprising: a first step (S2, S7) for acquiring a mixed image containing both focused signal light and unfocused signal light generated at a focal position of illuminating light in a sample, and a second step (S3, S4, S5) for acquiring an image of unfocused signal light on the basis of a plurality of mixed images having different intensities of unfocused signal light, and a third step (S8) for acquiring an image of focused signal light by subtracting the image of unfocused signal light acquired in the second step (S3, S4, S5) from the mixed image acquired in the first step (S2, S7).

(57) 要約: S/N比を低下させることなく焦点外信号光を除外して鮮明な信号光画像を取得することを目的として、本発明に係る画像取得方法は、光源から発せられたパルス状の照明光を試料に集光させて走査し、各走査位置において非線形光学過程により発生した信号光を検出し、検出された信号光に基づいて試料の画像を生成する画像取得方法であって、試料における照明光の焦点位置において発生する焦点信号光と焦点外信号光の両方を含む混合画像を取得する第1のステップ(S2, S7)と、焦点外信号光の強度が異なる複数の混合画像に基づいて焦点外信号光の画像を取得する第2のステップ(S3, S4, S5)と、第1のステップ(S2, S7)において取得された混合画像から第2のステップ(S3, S4, S5)において取得された焦点外信号光の画像を減算して焦点信号光の画像を取得する第3のステップ(S8)とを含む。



ロシア (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))

明 細 書

発明の名称：画像取得方法および画像取得装置

技術分野

[0001] 本発明は、画像取得方法および画像取得装置に関するものである。

背景技術

[0002] 2光子励起顕微鏡のような画像取得装置においては、試料の深部を観察する際に、試料中での散乱等によるレーザ光のパワーの低下を補うために、照射するレーザ光のパワーを増大させることが行われる。この場合には試料の表面領域においても強いパワーのレーザ光によって2光子吸収効果が発生し、結果として発生した焦点外蛍光がノイズとなって検出されてしまう。

[0003] このような場合に、焦点外蛍光信号を除去して焦点からの蛍光信号のみの画像を生成する方法が知られている（例えば、非特許文献1参照。）。

この方法は、デフォーマブルミラーを用いて集光位置におけるレーザ光の空間分布を変調することで集光位置における蛍光の発生効率を下げた画像を取得し、焦点外蛍光信号および焦点からの蛍光信号の両方を含む画像から減算することで焦点からの蛍光信号を取得するものである。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：A. Leray, K. Lillis and J. Mertz, "Enhanced Background Rejection in Thick Tissue with Differential-Absorption Two-Photon Microscopy," Biophysical Journal, Vol. 94, 1449 (2008) .

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、非特許文献1のように焦点位置における蛍光強度を変調し

て焦点外蛍光画像を取得する方法では、変調が十分ではない場合には焦点外蛍光の画像内に焦点からの蛍光信号が含まれてしまい、差分によって焦点からの蛍光信号にロスが発生するという不都合がある。2光子蛍光観察においては蛍光が励起光よりも短波長であって試料内において強い散乱を受けるため、その回収効率が低く、 S/N 比が低い。このため、焦点からの蛍光信号にロスを生ずることは、 S/N 比をさらに低下させることになり好ましくない。

[0006] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、 S/N 比を低下させることなく焦点外信号光を除外して鮮明な信号光画像を取得することができる画像取得方法および画像取得装置を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の一態様は、光源から発せられたパルス状の照明光を試料に集光させて走査し、各走査位置において非線形光学過程により発生した信号光を検出し、検出された該信号光に基づいて前記試料の画像を生成する画像取得方法であって、前記試料における前記照明光の焦点位置において発生する焦点信号光と、焦点位置以外の位置において発生する焦点外信号光の両方を含む混合画像を取得する第1のステップと、前記焦点外信号光の強度が異なる複数の前記混合画像に基づいて前記焦点外信号光の画像を取得する第2のステップと、前記第1のステップにおいて取得された前記混合画像から前記第2のステップにおいて取得された前記焦点外信号光の画像を減算して前記焦点信号光の画像を取得する第3のステップとを含む画像取得方法である。

[0008] 本態様によれば、光源から発せられたパルス状の照明光が、試料に集光されて走査されると、各走査位置において非線形光学過程により、照明光の焦点位置において焦点信号光が発生し、焦点位置以外の位置において焦点外信号光が発生する。第1のステップにおいては焦点信号光と焦点外信号光の両方を含む混合画像が取得される。

[0009] 一方、第2のステップにおいては、焦点外信号光の強度が異なる複数の混合画像が取得され、取得された複数の混合画像に基づいて焦点外信号光の画

像が取得される。

そして、第3のステップにおいて、混合画像から焦点外信号光の画像が減算されることにより、焦点信号光の画像が取得される。

[0010] この場合において、本態様によれば、焦点位置における信号強度を変調することなく焦点外信号光の画像を生成できる。したがって、混合画像から焦点外信号光の画像を減算する際に、焦点位置からの信号にロスが発生することがない。その結果、S/N比を低下させることなく焦点外信号光を除外して鮮明な信号光画像を取得することができる。

[0011] 上記態様においては、前記第2のステップが、2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に同時に集光して前記試料の第1画像を生成する同時照明ステップと、2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に非同時に集光して前記試料の第2画像を生成する非同時照明ステップと、前記同時照明ステップにおいて生成された前記第1画像と前記非同時照明ステップにおいて生成された前記第2画像とに基づいて前記焦点外信号光の画像を取得する演算ステップとを含んでいてもよい。

このようにすることで、2つのパルス状の照明光を試料の異なる位置に同時に集光して生成された第1画像には高強度の焦点外信号光が含まれ、2つのパルス状の照明光を試料の異なる位置に非同時に集光して生成された第2画像には第1画像よりも低強度の焦点外信号光が含まれる。これにより、2つのパルス状の照明光の試料への照射方法を変えて取得された第1画像と第2画像とから焦点外信号光の画像を容易に取得することができる。

[0012] また、上記態様においては、前記演算ステップが、前記同時照明ステップにおいて生成された前記第1画像から前記非同時照明ステップにおいて生成された前記第2画像を減算してもよい。

このようにすることで、第1画像から第2画像を減算するだけで焦点外信号光の画像を容易に取得することができる。

[0013] また、上記態様においては、前記第1のステップが、いずれか一方の前記照明光を遮断した状態で検出された前記信号光に基づいて前記混合画像を生

成してもよい。

このようにすることで、一方の光路の照明光のオンオフにより第1のステップと第2のステップとを簡単に切り替えることができる。

[0014] また、上記態様においては、前記同時照明ステップと前記非同時照明ステップとが、2つの前記照明光の光路長が等しい状態と異なる状態とで時間周期的に切り替えることにより実施されてもよい。

このようにすることで、2つの照明光の光路長を等しくして同時照明ステップを行い、2つの照明光の光路長を異ならせて非同時照明ステップを行うことを時間周期的に簡単に切り替えることができる。

[0015] また、上記態様においては、2つの前記照明光として、繰り返し周波数の異なる照明光を採用してもよい。

このようにすることで、繰り返し周波数の異なる2つの照明光を試料に照射すると、2つの照明光が同時に照射される同時照明ステップと、別々に照射される非同時照明ステップとを、自動的に時間周期的に切り替えることができる。

[0016] また、上記態様においては、前記第2のステップが、検出された前記信号光を時間周期的に復調した復調信号に基づいて前記焦点外信号光画像を生成してもよい。

このようにすることで、時間周期的に切り替えられた同時照明ステップと非同時照明ステップとにより取得された信号光をそれぞれ時間周期的に復調して抽出することができ、焦点外信号光画像を簡易に生成することができる。

[0017] また、上記態様においては、前記非線形光学過程が多光子吸収過程であり、前記照明光が極短パルスレーザ光であり、前記信号光が蛍光であってもよい。

このようにすることで、多光子励起顕微鏡に適用して、S/N比の高い蛍光画像を取得することができる。

[0018] また、本発明の他の態様は、光源から発せられたパルス状の照明光を走査

する走査部と、該走査部により走査される前記照明光を試料に照射する照明光学系と、該照明光学系による前記照明光の前記試料における照射位置において前記非線形光学過程で発生した信号光を検出する検出光学系と、該検出光学系により検出された前記信号光に基づいて信号光画像を生成する画像生成部とを備え、該画像生成部が、前記試料における前記照明光の焦点位置以外の位置において発生した焦点外信号光の強度が異なる複数の画像から焦点外信号光画像を生成し、前記試料における前記照明光の焦点位置において発生した焦点信号光および前記焦点外信号光の両方を含む混合画像から前記焦点外信号光画像を減算して焦点信号光画像を生成する画像取得装置である。

[0019] 本態様によれば、光源から発せられた照明光が、走査部によって走査され、照明光学系によって試料に照射されると、照明光の各走査位置において非線形光学過程により信号光が発生し、検出光学系によって検出される。検出された信号光には照明光の焦点位置において発生した焦点信号光と、焦点位置以外の位置において発生した焦点外信号光とを含んでいる。画像生成部により、焦点外信号光の強度が異なる複数の画像から焦点外信号光画像が生成され、焦点信号光と焦点外信号光の両方を含む混合画像から焦点外信号光画像を減算することにより焦点信号光画像が生成される。

[0020] すなわち、本態様によれば、焦点位置における信号強度を変調することなく焦点外信号光の画像を生成できる。したがって、混合画像から焦点外信号光の画像を減算する際に、焦点位置からの信号にロスが発生することがない。その結果、 S/N 比を低下させることなく焦点外信号光を除外して鮮明な信号光画像を取得することができる。

[0021] 上記態様においては、前記画像生成部が、2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に同時に集光して前記試料の第1画像を生成し、2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に非同時に集光して前記試料の第2画像を生成し、前記第1画像と前記第2画像とに基づいて前記焦点外信号光画像を取得してもよい。

また、上記態様においては、前記画像生成部が、前記第1画像から前記第

2 画像を減算して前記焦点外信号光画像を取得してもよい。

[0022] また、上記態様においては、2つの前記照明光の一方の光路に、該光路を通過する前記照明光の強度を変調する光強度変調素子を備え、前記画像生成部が、前記光強度変調素子により一方の光路を通過する前記照明光を他方の光路を通過する前記照明光と等しい強度に設定したときに検出された前記信号光に基づいて前記焦点外信号光画像を生成し、前記光強度変調素子により一方の光路を通過する前記照明光を遮断したときに検出された前記信号光に基づいて前記混合画像を生成してもよい。

[0023] このようにすることで、光強度変調素子により一方の光路を通過する照明光の強度が変調され、一方の光路を通過する照明光を他方の光路を通過する照明光と等しい強度に設定したときに検出された信号光に基づいて焦点外信号光画像が生成され、光強度変調素子により一方の光路を通過する照明光を遮断したときに検出された信号光に基づいて混合画像が生成される。

[0024] また、上記態様においては、2つの前記照明光の一方の光路に、前記光路を通過する前記照明光の光路長を時間周期的に変調する光路長変調素子を備え、前記画像生成部が、前記光路長変調素子により2つの前記照明光の光路長が等しくされたときに検出された前記信号光に基づいて前記第1画像を生成し、2つの前記照明光の光路長が異ならされたときに検出された前記信号光に基づいて前記第2画像を生成してもよい。

[0025] このようにすることで、光路長変調素子により、2つの照明光の光路長が等しくされたときに検出された信号光に基づいて第1画像が生成され、2つの照明光の光路長が異ならされたときに検出された信号光に基づいて第2画像が生成される。

[0026] また、上記態様においては、前記画像生成部は、繰り返し周波数が異なる2つのパルス状の前記照明光を前記試料に照射することにより、2つの前記照明光を同時に前記試料に集光する状態と2つの前記照明光を非同時に前記試料に集光する状態とを時間周期的に切り替えてもよい。

[0027] また、上記態様においては、検出された前記信号光を時間周期的に復調す

る復調部を備え、前記画像生成部が、該復調部により復調された復調信号を用いて前記焦点外信号光画像を生成してもよい。

このようにすることで、時間周期的に切り替えられた同時照明ステップと非同時照明ステップとにより取得された信号光を、復調部によってそれぞれ時間周期的に復調して抽出することができ、焦点外信号光画像を簡易に生成することができる。

[0028] また、上記態様においては、前記非線形光学過程が多光子吸収過程であり、前記照明光が極短パルスレーザ光であり、前記信号光が蛍光であってもよい。

発明の効果

[0029] 本発明によれば、S/N比を低下させることなく焦点外信号光を除外して鮮明な信号光画像を取得することができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]本発明の一実施形態に係る画像取得装置を示す模式図である。

[図2]試料内において発生する焦点蛍光と焦点外蛍光とを説明する図である。

[図3]図1の画像取得装置を用いた本発明の一実施形態に係る画像取得方法を説明するフローチャートである。

[図4]図1の画像取得装置の第1の変形例を示す模式図である。

[図5]図4の画像取得装置を用いた画像取得方法を説明するフローチャートである。

[図6]図1の画像取得装置の第2の変形例を示す模式図である。

[図7]図6の画像取得装置を用いた画像取得方法を説明するフローチャートである。

[図8]図1の画像取得装置の第3の変形例を示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0031] 以下、本発明の一実施形態に係る画像取得装置1および画像取得方法について、図面を参照して以下に説明する。

本実施形態に係る画像取得装置1は、多光子励起型の走査型蛍光顕微鏡で

あって、図1に示されるように、近赤外の極短パルスレーザ光（以下、レーザ光という。）を射出するチタンサファイアレーザ等の光源（レーザ光源）2と、該光源2からのレーザ光を試料Xに照射する照明光学系3と、該照明光学系3の途中位置に配置され、レーザ光を2次元的に走査する走査部4と、レーザ光が試料Xに照射されることにより、試料Xにおいて発生した蛍光（信号光）を検出する検出光学系5と、該検出光学系5により検出された蛍光の強度に基づいて画像を生成する処理装置（画像生成部）6とを備えている。

[0032] 照明光学系3は、光源2からのレーザ光のビーム径を調節するビーム径調整光学系7と、レーザ光の偏光方向を 45° 方向に設定する $\lambda/2$ 板8と、レーザ光を2つの光路に分岐する第1偏光ビームスプリッタ9と、一方の光路に設けられた光路調整光学系10と、2つの光路を通過してきたレーザ光（第1レーザ光と第2レーザ光）を合波する第2偏光ビームスプリッタ11と、合波されたレーザ光を通過させる $\lambda/4$ 板12と、リレーレンズ13と、瞳投影レンズ14と、結像レンズ15と、対物レンズ16とを備えている。図中、符号17は光路を形成するためのミラーである。

[0033] 第1偏光ビームスプリッタ9は、 $\lambda/2$ 板8により偏光方向が 45° に設定された後のレーザ光が入射することによって、入射したレーザ光を、強度比が1:1の互いに直交する偏光方向の第1レーザ光（照明光）L1と第2レーザ光（照明光）L2とに分岐するようになっている。

[0034] 第2偏光ビームスプリッタ11は、透過する第1レーザ光L1に対して偏向される第2レーザ光L2の射出角度がわずかに異なるように設定されている。

第1レーザ光L1と第2レーザ光L2の射出角度の差はわずかであるため、図1では第2偏光ビームスプリッタ11以降の2つのレーザ光L1、L2の光路を同一の線で示している。

[0035] 光路調整光学系10は、一对のミラー18を矢印の方向に移動させることにより、第2偏光ビームスプリッタ11による合波後の第1レーザ光L1と

第2レーザ光L2とのパルスのタイミングが同時または非同時となるように、第2レーザ光L2の光路長を調整するようになっている。

$\lambda/4$ 板12は、合波された第1レーザ光L1および第2レーザ光L2をそれぞれ円偏光に変換するようになっている。

[0036] 走査部4は、例えば、2軸のガルバノミラー19であって、リレーレンズ13と瞳投影レンズ14との間に配置されている。走査部4は、リレーレンズ13、瞳投影レンズ14および結像レンズ15によって、第2偏光ビームスプリッタ11および対物レンズ16の瞳位置と光学的に共役な位置に配置されている。

[0037] 検出光学系5は、結像レンズ15と対物レンズ16との間に配置され、対物レンズ16によって集光された蛍光をレーザ光の光路から分岐するダイクロイックミラー20と、該ダイクロイックミラー20によって分岐された蛍光を集光する集光レンズ21と、集光された蛍光を検出する光電子増倍管のような光検出器22とを備えている。

[0038] 処理装置6においては、光検出器22により検出された蛍光の強度と、各走査位置の座標とに基づいて試料Xの蛍光画像が生成される。本実施形態においては、 $\lambda/2$ 板8を操作して、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2の強度が1:1となるように設定した状態で取得された2枚の蛍光画像と、 $\lambda/2$ 板8を操作して、第1レーザ光L1のみが照射されるように設定した状態で、取得された1枚の蛍光画像の合計3枚の蛍光画像に基づいて、レーザ光の焦点位置からの蛍光に基づく焦点蛍光画像を生成するようになっている。

[0039] 第1レーザ光L1と第2レーザ光L2の強度が1:1となるように設定した状態では、光路調整光学系10によって第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とのパルスのタイミングが同時となる光路長に設定されたときに光検出器22により検出された蛍光の蛍光画像と、光路調整光学系10によって第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とのパルスのタイミングが非同時となる光路長に設定されたときに光検出器22により検出された蛍光の蛍光画像と

が生成されるようになっている。

[0040] ここで、対物レンズ 16 で試料 X 内にレーザ光が集光される様子を図 2 に示す。パルス状の第 1 レーザ光 L 1 および第 2 レーザ光 L 2 は対物レンズ 16 の瞳に異なる角度で入射し、各々が第 1 焦点 P 1 および第 2 焦点 P 2 に集光される。第 1 レーザ光 L 1 と第 2 レーザ光 L 2 の対物レンズ 16 の瞳への入射角度は、第 2 偏光ビームスプリッタ 11 のあおり角を調節することによって、第 1 焦点 P 1 および第 2 焦点 P 2 をその領域に重なりがない程度に離間させることができる角度に設定されている。

[0041] 試料 X に蛍光物質が含まれている場合には、第 1 レーザ光 L 1 および第 2 レーザ光 L 2 によって蛍光物質が励起され、第 1 焦点 P 1 および第 2 焦点 P 2 において多光子吸収効果によって蛍光（焦点蛍光、焦点信号光）が発生する。

ここで、第 1 焦点 P 1 および第 2 焦点 P 2 が試料 X の深部に配置されており、第 1 レーザ光 L 1 および第 2 レーザ光 L 2 のパワーが強い場合には、試料 X の表面付近である領域 S においても蛍光（焦点外蛍光、焦点外信号光）が発生する。

[0042] 2 光子励起顕微鏡のような画像取得装置 1 では、ピンホールのような遮光部材を備えないので、この領域 S からの焦点外蛍光および第 1 焦点 P 1 および第 2 焦点 P 2 からの焦点蛍光とが混合して検出される。

各々の領域で発生した蛍光信号を数式で表現すると以下の通りとなる。

まず、第 1 焦点 P 1 および第 2 焦点 P 2 において発生する焦点蛍光を式（1）および式（2）に示す。

[0043] [数1]

$$I_{fl_1} = \alpha I_{1-F}^2 \quad \cdots (1)$$

[数2]

$$I_{fl_2} = \beta I_{2-F}^2 \quad \cdots (2)$$

[0044] ここで、 I_{f1-1} は第1焦点P1からの焦点蛍光の強度、 I_{f1-2} は第2焦点P2からの焦点蛍光の強度を示している。また、 I_{1-F} は第1焦点P1における第1レーザ光L1の強度、 I_{2-F} は第2焦点P2における第2レーザ光L2の強度である。また、 α および β は第1焦点P1および第2焦点P2における蛍光発生効率を示す係数であり、蛍光物質の種類、濃度および分布に依存する。蛍光強度がレーザ光の強度の2乗に比例しているのは、2光子励起だからである。

[0045] 次に、領域Sにおける蛍光強度 I_{fl-S} を式(3)および式(4)に示す。

[0046] [数3]

$$I_{fl-S} = \gamma (I_{1-S}^2 + I_{2-S}^2 + 2I_{1-S}I_{2-S}) \quad \cdots (3)$$

[数4]

$$I_{fl-S} = \gamma (I_{1-S}^2 + I_{2-S}^2) \quad \cdots (4)$$

[0047] ここで、 I_{1-S} および I_{2-S} は、それぞれ領域Sにおける第1レーザ光L1および第2レーザ光L2の強度であり、 γ は領域Sにおける蛍光発生効率を示す係数である。図2に示されるように、領域Sには第1レーザ光L1および第2レーザ光L2の両方が照射されており、その強度は $(I_{1-S} + I_{2-S})$ となる。2光子励起であるため、蛍光強度はレーザ光の強度の2乗であり、 $(I_{1-S} + I_{2-S})^2 = (I_{1-S}^2 + I_{2-S}^2 + 2I_{1-S} \cdot I_{2-S})$ に比例する。

[0048] また、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とが同時に照射された場合には、領域Sでは第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とが、時間的および空間的に重なるため、 $I_{1-S} \cdot I_{2-S}$ は成分を有し、式(3)のようになる。一方、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とが非同時に照射された場合には、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とは時間的に重ならないため、 $I_{1-S} \cdot I_{2-S}$ はゼロとなり、式(4)のようになる。

[0049] すなわち、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とを同時または非同時に

切り替えて照射することにより、領域Sから発生する焦点外蛍光の強度は、式（３）と式（４）とで切り替わることになる。

[0050] 実際に光検出器２２により検出される蛍光信号は、第１焦点P１、第２焦点P２および領域Sのそれぞれにおいて発生した蛍光が混合されたものとなるため、式（５）で示されるようになる。第１レーザ光L１と第２レーザ光L２との照射タイミングを同時と非同時とで切り替えることにより、式（５）内の焦点外蛍光 I_{fl-S} の項が式（３）と式（４）とに切り替わる。

したがって、第１レーザ光L１と第２レーザ光L２の照射タイミングが同時の場合と非同時の場合とで各々蛍光画像を取得し、その差分を演算すると、実質的には式（３）と式（４）との差分をとることになり、結果として式（６）が得られることになる。

[0051] [数5]

$$I_{fl_total} = I_{fl-1} + I_{fl-2} + I_{fl-S} \quad \cdots (5)$$

[数6]

$$I_{fl_total_sub} = 2\gamma I_{1-S} \cdot I_{2-S} \quad \cdots (6)$$

[0052] 式（６）では、係数 α 、 β の項が消去され、係数 γ の項のみ残っている。このことは、第１焦点P１、第２焦点P２および領域Sからの蛍光が混在する混合画像を用いて、領域Sからの蛍光のみの蛍光画像を抽出できることを意味している。すなわち、２光子励起顕微鏡を用いた試料Xの深部観察において、２つのレーザ光L１、L２を試料X内の近接した位置に同時および非同時に照射して各々蛍光画像を取得し、その画像どうしで差分演算を行うことにより、焦点外蛍光画像を生成することができる。そして、このようにして生成された焦点外蛍光画像を、焦点蛍光および焦点外蛍光が混在する画像から減算することにより、焦点蛍光画像を生成することができることになる。

[0053] このように構成された本実施形態に係る画像取得装置 1 を用いた画像取得方法について以下に説明する。

本実施形態に係る画像取得方法は、図 2 に示されるように、まず、試料 X 内における画像取得位置を設定する（ステップ S 1）。

[0054] このステップ S 1 においては、 $\lambda/2$ 板 8 を回転させて、第 1 偏光ビームスプリッタ 9 でのレーザ光の分岐比率を調整し、第 1 レーザ光 L 1 もしくは第 2 レーザ光 L 2 のどちらか一方のみが照射されるようにしておいてよい。

次に、 $\lambda/2$ 板 8 を回転させて、対物レンズ 16 から射出される第 1 レーザ光 L 1 と第 2 レーザ光 L 2 との強度比が 1 : 1 となるように設定する（第 1 のステップ S 2）。このとき、式（1）から式（6）において、 $I_{1-F} = I_{2-F} = I_F$ 、 $I_{1-S} = I_{2-S} = I_S$ とする。

[0055] この状態で、光路調整光学系 10 によって第 1 レーザ光 L 1 と第 2 レーザ光 L 2 とが試料 X に同時に照射されるように第 2 レーザ光 L 2 の光路長を設定し、走査部 4 を作動させて第 1 レーザ光 L 1 および第 2 レーザ光 L 2 を試料 X において走査させ、蛍光画像（第 1 画像）A を取得する（同時照明ステップ S 3、第 2 のステップ）。このとき、蛍光画像 A の信号強度は式（1）から（3）および式（5）から式（7）のようになる。

[0056] [数 7]

$$I_A = \alpha I_F^2 + \beta I_F^2 + 4\gamma I_S^2 \quad \cdots (7)$$

[0057] また、この状態で、光路調整光学系 10 によって第 1 レーザ光 L 1 と第 2 レーザ光 L 2 とが試料 X に非同時に照射されるように第 2 レーザ光 L 2 の光路長を設定し、走査部 4 を作動させて第 1 レーザ光 L 1 および第 2 レーザ光 L 2 を試料 X において走査させ、蛍光画像（第 2 画像）B を取得する（非同時照明ステップ S 4、第 2 のステップ）。このとき、蛍光画像 B の信号強度は式（1）、（2）、（4）および式（5）から式（8）のようになる。

そして、処理装置 6 において、取得された蛍光画像 A から蛍光画像 B を減算することにより、差分画像 C を生成する（演算ステップ S 5、第 2 のステ

ップ)。差分画像Cの信号強度は、式(9)の通りとなる。

[0058] [数8]

$$I_B = \alpha I_F^2 + \beta I_F^2 + 2\gamma I_S^2 \quad \cdots (8)$$

[数9]

$$I_C = 2\gamma I_S^2 \quad \cdots (9)$$

[0059] 次に、 $\lambda/2$ 板8を回転させて第1偏光ビームスプリッタ9でのレーザ光の分岐比率を調整し、第1レーザ光L1のみが試料Xに照射されるように設定する(ステップS6)。そして、走査部4の作動により、第1レーザ光L1を試料Xにおいて走査させ蛍光画像Dを取得する(第1のステップS7)。

[0060] 蛍光画像Dには、第1焦点P1および領域Sからの蛍光信号が含まれている。また、第1偏光ビームスプリッタ9において2つに分岐されていたレーザ光を第1レーザ光L1のみに統合するため、第1焦点P1および領域Sにおける第1レーザ光L1の強度は、それぞれ $2I_F$ および $2I_S$ となる。その結果、蛍光画像Dの信号強度は式(10)のようになる。

[0061] [数10]

$$I_D = 4\alpha I_F^2 + 4\gamma I_S^2 \quad \cdots (10)$$

[0062] 処理装置6は、蛍光画像Dの信号強度を $1/2$ 倍して、蛍光画像Cを減算することにより差分画像Eを生成する(第3のステップS8)。差分画像Eの信号強度は式(9)および式(10)から式(11)のようになる。式(11)には係数 α の項のみが含まれており、係数 β 、 γ の項は除去されている。これにより、第1焦点P1からの蛍光信号のみを含む蛍光画像が生成されたことになる。

[0063]

[数11]

$$I_E = 2\alpha I_S^2 \quad \dots \quad (11)$$

[0064] このように、本実施形態に係る画像取得装置 1 および画像取得方法によれば、焦点蛍光と焦点外蛍光とが混合された混合画像から、焦点蛍光のみを含む焦点蛍光画像を生成することができる。この時点で、他に観察を行う位置が残っている場合にはステップ S 1 からの処理を繰り返す。

[0065] 本実施形態に係る画像取得装置 1 および画像取得方法によれば、第 1 レーザ光 L 1 と第 2 レーザ光 L 2 の照射タイミングを切り替えることで、焦点外蛍光信号の強度が異なる 2 つの蛍光画像 A, B を取得し、蛍光画像 A, B 間で差分演算を行うことにより焦点外蛍光のみの差分画像 C を生成している。そして、焦点蛍光と焦点外蛍光とを含む蛍光画像 D と差分画像 C との差分演算により焦点蛍光のみの差分画像 E を生成している。

[0066] これらの処理において焦点での集光分布を変調する等の動作を行っていないので、蛍光画像 D と差分画像 C との差分演算時に焦点蛍光信号にロスが発生することがない。したがって、S/N 比を低下させることなく、焦点蛍光画像を取得することができるという利点がある。

[0067] なお、本実施形態に係る画像取得装置 1 においては、第 1 偏光ビームスプリッタ 9 の前段に配置された $\lambda/2$ 板 8 に代えて、 $\lambda/4$ 板を採用してもよい。また、第 2 偏光ビームスプリッタ 11 の後段に配置された $\lambda/4$ 板 12 に代えて、試料 X に偏光依存性がない場合には、 $\lambda/4$ 板 12 を取り除いて、第 1 レーザ光 L 1 および第 2 レーザ光 L 2 が直線偏光となるようにしてもよい。

[0068] また、図 3 のフローチャートにおいて、画像取得順序は限定されるものではなく、蛍光画像 A, B を取得する前に蛍光画像 D を取得してもよい。また、ステップ S 2 において第 1 レーザ光 L 1 と第 2 レーザ光 L 2 との強度比率を 1 : 1 に設定することに代えて、それ以外の比率に設定し、係数 γ の項が除去できるような係数を乗算してから差分演算を行うことにしてもよい。ま

た、蛍光画像Dの取得時に、第1レーザ光L1のみを照射することとしたが、第2レーザ光L2のみを照射することにしてもよい。

[0069] また、図4に示されるように、第1偏光ビームスプリッタ9と第2偏光ビームスプリッタ11との間の第2レーザ光L2の光路に、第2レーザ光L2を強度変調してオンオフする光強度変調素子23を配置してもよい。光強度変調素子23としては、音響光学素子や電気光学素子を採用することができる。

[0070] このような構成の画像取得装置1による画像取得方法を図5に示されるフローチャートに従って説明する。

画像取得位置の設定（ステップS1）および第1レーザ光L1と第2レーザ光L2との強度比率を1：1となるようなλ／2板8の設定（第1のステップS2）は上記と同様である。この状態で、光強度変調素子23を作動させて、第2レーザ光L2をオンオフさせる。

[0071] 次に、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とが同時に試料Xに照射される照射タイミングとなる状態で、蛍光画像を取得する。この際に、第2レーザ光L2は、デューティ比1：1の矩形波形状でオンオフされるように時間周期的に強度が変調されており、画像取得の1ピクセル内に少なくとも強度変調の1周期が含まれるように画像取得速度や強度変調周波数が調節されている。

[0072] そして、第2レーザ光L2がオンの照射タイミングとオフの照射タイミングでそれぞれ蛍光検出を行い、オンの照射タイミングでの蛍光画像Aとオフの照射タイミングでの蛍光画像A'とをそれぞれ取得する（同時照明ステップS3'、第2のステップ）。

[0073] 次に、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とが非同時に試料Xに照射される照射タイミングで、同様に、第2レーザ光L2がオンの照射タイミングでの蛍光画像Bとオフの照射タイミングでの蛍光画像B'とをそれぞれ取得する（非同時照明ステップS4'、第2のステップ）。蛍光画像A、Bの蛍光強度は、式（7）および式（8）となる。一方、蛍光画像A'、B'の取

得時には、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2とは分岐したままの状態であるため、励起強度は I_F 、 I_S となり、蛍光強度は、式(10)を $1/4$ 倍した値となる。

式(10)の場合と比較して励起強度が $1/2$ 倍となるため、蛍光強度はその2乗の $1/4$ 倍となっている。

[0074] そして、上記と同様にして蛍光画像Aから蛍光画像Bを減算することにより、式(9)の蛍光強度を有する焦点外蛍光画像Cが生成される(演算ステップS5、第2のステップ)。そして、蛍光画像A'、B'を加算して焦点外蛍光画像Cを減算することにより、式(11)の蛍光強度を有する焦点蛍光画像Eを取得することができる(第3のステップS8)。

[0075] すなわち、このようにすることで、第1レーザ光L1と第2レーザ光L2の照射タイミングを同時または非同時に切り替えて画像取得する際に、強度変調によって第1レーザ光L1のみの画像も同時に取得することができる。光強度変調素子23として電気光学素子を用いた場合には、強度変調速度が2軸のガルバノミラー19の走査速度よりも圧倒的に早いので、実質的に2枚の画像取得時間で焦点蛍光画像を取得することができるという利点がある。

[0076] また、本実施形態に係る画像取得装置1においては、図6に示されるように、光路調整光学系10に光路長変調素子24を設け、光検出器22からの信号をロックインアンプ(復調部)25を通して処理することにしてもよい。光路長変調素子24としては、例えば、ピエゾシェーカを採用することができる。光路長変調素子24は、光路調整光学系10を移動させて、第2レーザ光L2の光路の光路長を時間周期的に変動させるようになっている。このようにすることで、変復調技術を利用して、画像取得枚数2枚で焦点蛍光画像を取得することができる。

[0077] すなわち、図7のフローチャートで示すように、第2レーザ光L2の光路長を光路長変調素子24の作動によって時間周期的に変調させて、ロックインアンプ25から出力される復調信号に基づいて蛍光画像Aを生成する。ロ

ックインアンプ25は光路長変調素子24からの同期信号をリファレンス信号として作動し、光路長変調素子24の変調周波数に同期して信号の復調を行う。

[0078] ロックインアンプ25から出力される復調信号は、第2レーザ光L2のパルスタイミングが変化したことによる信号の変化分に等しく、すなわち、式(7)および式(8)の差分に他ならない。したがって、取得された蛍光画像Aは式(9)により示される焦点外蛍光画像となっている。

[0079] この後に、 $\lambda/2$ 板8を調整して第1レーザ光L1のみを試料Xに照射させ、ロックインアンプ25による復調を行うことなく、光検出器22により検出された信号を用いて蛍光画像Bを生成する。蛍光画像Bの蛍光強度は式(10)に等しい。蛍光画像Bを1/2倍して蛍光画像Aを減算することにより、式(11)の差分画像C、すなわち焦点蛍光画像を生成することができる。

[0080] このようにすることで、焦点外蛍光画像の生成の際に、光路長変調素子24による光路長の変調とロックインアンプ25による信号の復調によって、直接的に焦点外蛍光画像を取得でき、それによって、画像取得枚数を2枚で済ませることができ、焦点蛍光画像の取得に要する時間を短縮することができるという利点がある。

[0081] また、上記各実施形態においては、第2レーザ光L2の光路長の切替によって、同時照射と非同時照射とを切り替えることとしたが、これに代えて、図8に示されるように、別々のレーザ光源26、27から射出される第1レーザ光L1と第2レーザ光L2の繰り返し周波数をわずかに異ならせておくことにしてもよい。この場合には、各レーザ光源26、27の同期信号をミキサ28に入力して繰り返し周波数の差の周波数の同期信号をロックインアンプ25に出力してリファレンス信号として利用すればよい。

[0082] 第1レーザ光L1と第2レーザ光L2の繰り返し周波数がわずかに異なるため、その照射タイミングが周期的にずれ、繰り返し周波数の差分の周期で同時照射と非同時照射とを繰り返すようになる。すなわち、ピエゾシェーカ

24で第2レーザ光L2の光路長を変調した場合と同様の効果を得ることができる。したがって、図8の画像取得装置1によっても画像取得枚数を2枚として、焦点蛍光画像を取得することができる。なお、非線形光学過程で蛍光を発生させることができれば、第1レーザ光L1の波長と第2レーザ光L2の波長とは異なってもよい。

[0083] 以上、本発明のいくつかの実施形態について説明したが、本発明はこれらの実施形態に限定されるものではない。

例えば、走査部4として2軸のガルバノミラー19を用いたものを例示したが、ステージ走査によって画像を取得する方式を採用してもよい。

[0084] また、上記実施形態においては、2光子励起顕微鏡について説明したが、非線形光学過程を利用した走査型顕微鏡であれば、例えば、SHG顕微鏡のような他の方式の顕微鏡についても本発明を適用することができる。

符号の説明

- [0085]
- 1 画像取得装置
 - 2, 26, 27 光源（レーザ光源）
 - 3 照明光学系
 - 4 走査部
 - 5 検出光学系
 - 6 処理装置（画像生成部）
 - 23 光強度変調素子
 - 24 光路長変調素子
 - 25 ロックインアンプ（復調部）
 - S2, S7 第1のステップ
 - S3, S3', S4, S4', S5 第2のステップ
 - S8 第3のステップ
 - S3, S3' 同時照明ステップ
 - S4, S4' 非同時照明ステップ
 - S5 演算ステップ

A 蛍光画像（第 1 画像）

B 蛍光画像（第 2 画像）

L 1, L 2 レーザ光（照明光）

X 試料

請求の範囲

- [請求項1] 光源から発せられたパルス状の照明光を試料に集光させて走査し、各走査位置において非線形光学過程により発生した信号光を検出し、検出された該信号光に基づいて前記試料の画像を生成する画像取得方法であって、
- 前記試料における前記照明光の焦点位置において発生する焦点信号光と、焦点位置以外の位置において発生する焦点外信号光の両方を含む混合画像を取得する第1のステップと、
- 前記焦点外信号光の強度が異なる複数の前記混合画像に基づいて前記焦点外信号光の画像を取得する第2のステップと、
- 前記第1のステップにおいて取得された前記混合画像から前記第2のステップにおいて取得された前記焦点外信号光の画像を減算して前記焦点信号光の画像を取得する第3のステップとを含む画像取得方法。
- [請求項2] 前記第2のステップが、
- 2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に同時に集光して前記試料の第1画像を生成する同時照明ステップと、
- 2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に非同時に集光して前記試料の第2画像を生成する非同時照明ステップと、
- 前記同時照明ステップにおいて生成された前記第1画像と前記非同時照明ステップにおいて生成された前記第2画像とに基づいて前記焦点外信号光の画像を取得する演算ステップとを含む請求項1に記載の画像取得方法。
- [請求項3] 前記演算ステップが、前記同時照明ステップにおいて生成された前記第1画像から前記非同時照明ステップにおいて生成された前記第2画像を減算する請求項2に記載の画像取得方法。
- [請求項4] 前記第1のステップが、いずれか一方の前記照明光を遮断した状態で検出された前記信号光に基づいて前記混合画像を生成する請求項2

または請求項3に記載の画像取得方法。

[請求項5] 前記同時照明ステップと前記非同時照明ステップとが、2つの前記照明光の光路長が等しい状態と異なる状態とで時間周期的に切り替えることにより実施される請求項2から請求項4のいずれかに記載の画像取得方法。

[請求項6] 2つの前記照明光として、繰り返し周波数の異なる照明光を採用する請求項2から請求項4のいずれかに記載の画像取得方法。

[請求項7] 前記第2のステップが、検出された前記信号光を時間周期的に復調した復調信号に基づいて前記焦点外信号光画像を生成する請求項5または請求項6に記載の画像取得方法。

[請求項8] 前記非線形光学過程が多光子吸収過程であり、
前記照明光が極短パルスレーザ光であり、
前記信号光が蛍光である請求項1から請求項7のいずれかに記載の画像取得方法。

[請求項9] 光源から発せられたパルス状の照明光を走査する走査部と、
該走査部により走査される前記照明光を試料に照射する照明光学系と、

該照明光学系による前記照明光の前記試料における照射位置において前記非線形光学過程で発生した信号光を検出する検出光学系と、

該検出光学系により検出された前記信号光に基づいて信号光画像を生成する画像生成部とを備え、

該画像生成部が、前記試料における前記照明光の焦点位置以外の位置において発生した焦点外信号光の強度が異なる複数の画像から焦点外信号光画像を生成し、前記試料における前記照明光の焦点位置において発生した焦点信号光および前記焦点外信号光の両方を含む混合画像から前記焦点外信号光画像を減算して焦点信号光画像を生成する画像取得装置。

[請求項10] 前記画像生成部が、2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異な

る位置に同時に集光して前記試料の第1画像を生成し、2つのパルス状の前記照明光を前記試料の異なる位置に非同時に集光して前記試料の第2画像を生成し、前記第1画像と前記第2画像とに基づいて前記焦点外信号光画像を取得する請求項9に記載の画像取得装置。

[請求項11] 前記画像生成部が、前記第1画像から前記第2画像を減算して前記焦点外信号光画像を取得する請求項10に記載の画像取得装置。

[請求項12] 2つの前記照明光の一方の光路に、該光路を通過する前記照明光の強度を変調する光強度変調素子を備え、

前記画像生成部が、前記光強度変調素子により一方の光路を通過する前記照明光を他方の光路を通過する前記照明光と等しい強度に設定したときに検出された前記信号光に基づいて前記焦点外信号光画像を生成し、前記光強度変調素子により一方の光路を通過する前記照明光を遮断したときに検出された前記信号光に基づいて前記混合画像を生成する請求項10または請求項11に記載の画像取得装置。

[請求項13] 2つの前記照明光の一方の光路に、前記光路を通過する前記照明光の光路長を時間周期的に変調する光路長変調素子を備え、

前記画像生成部が、前記光路長変調素子により2つの前記照明光の光路長が等しくされたときに検出された前記信号光に基づいて前記第1画像を生成し、2つの前記照明光の光路長が異ならされたときに検出された前記信号光に基づいて前記第2画像を生成する請求項10から請求項12のいずれかに記載の画像取得装置。

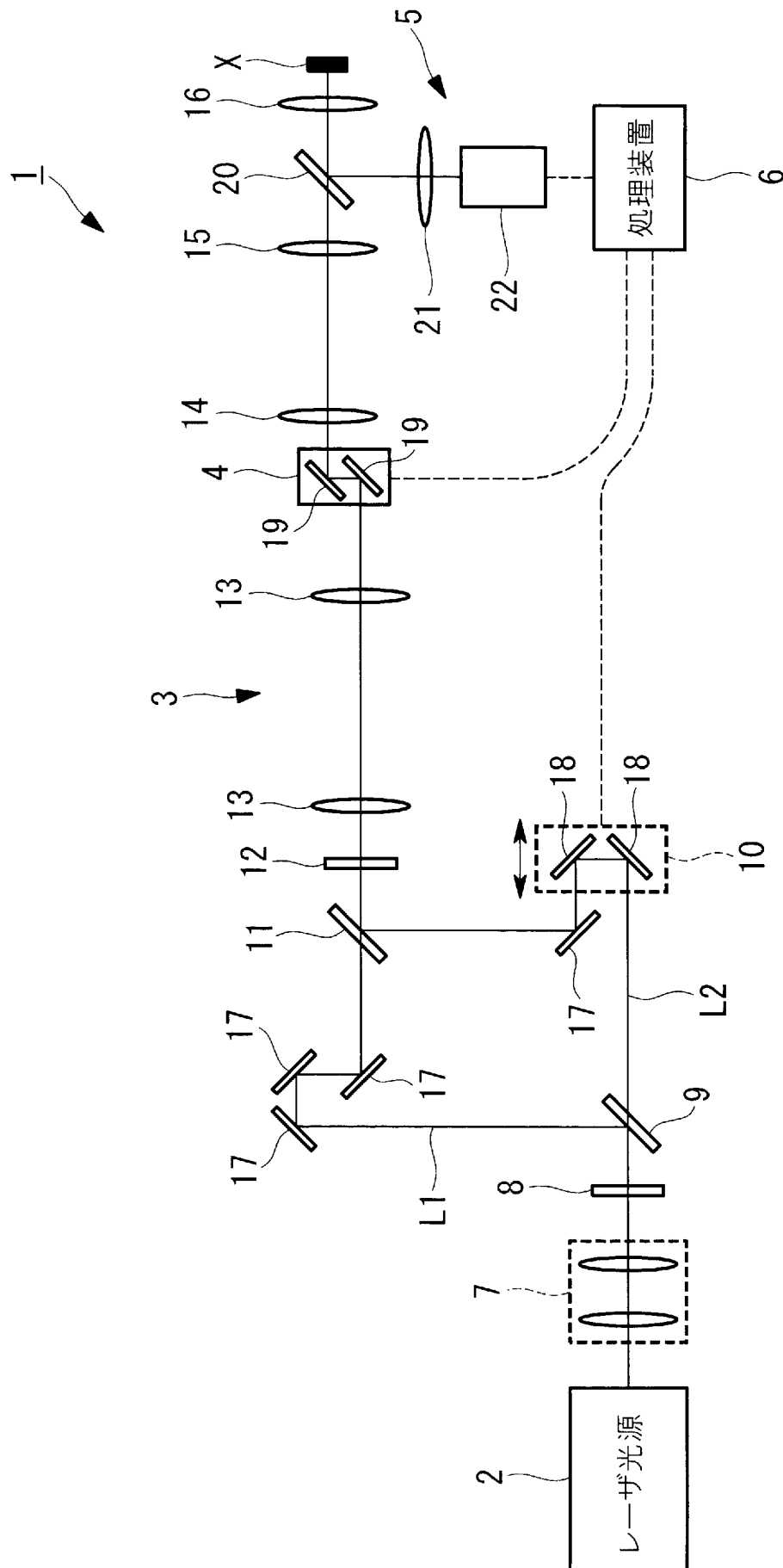
[請求項14] 前記画像生成部は、繰り返し周波数が異なる2つのパルス状の前記照明光を前記試料に照射することにより、2つの前記照明光を同時に前記試料に集光する状態と2つの前記照明光を非同時に前記試料に集光する状態とを時間周期的に切り替える請求項10または請求項11に記載の画像取得装置。

[請求項15] 検出された前記信号光を時間周期的に復調する復調部を備え、
前記画像生成部が、該復調部により復調された復調信号を用いて前

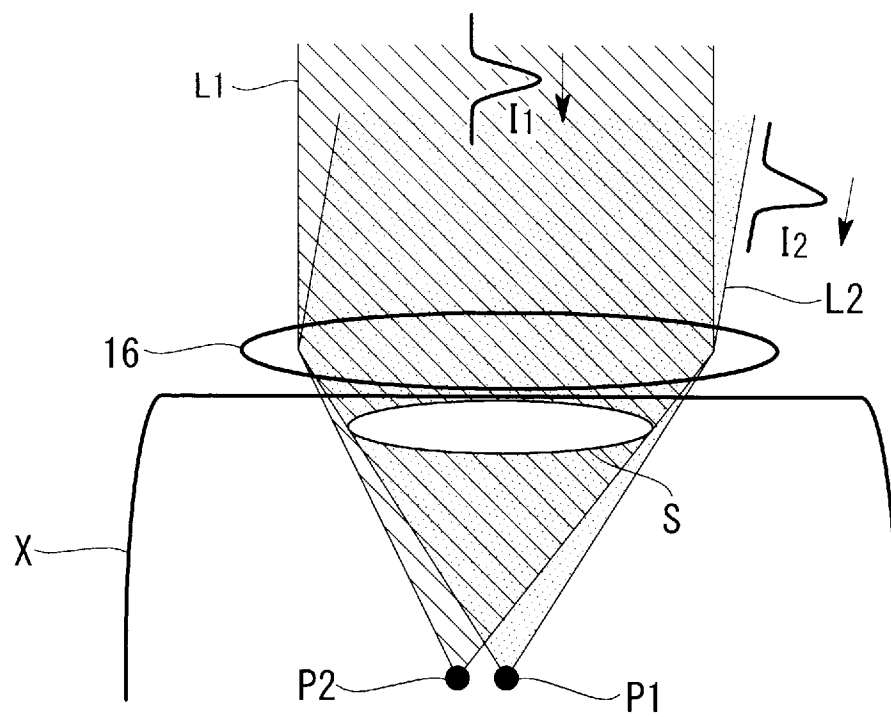
記焦点外信号光画像を生成する請求項 1 3 または請求項 1 4 に記載の画像取得装置。

- [請求項16] 前記非線形光学過程が多光子吸収過程であり、
 前記照明光が極短パルスレーザ光であり、
 前記信号光が蛍光である請求項 9 から請求項 1 5 のいずれかに記載の画像取得装置。

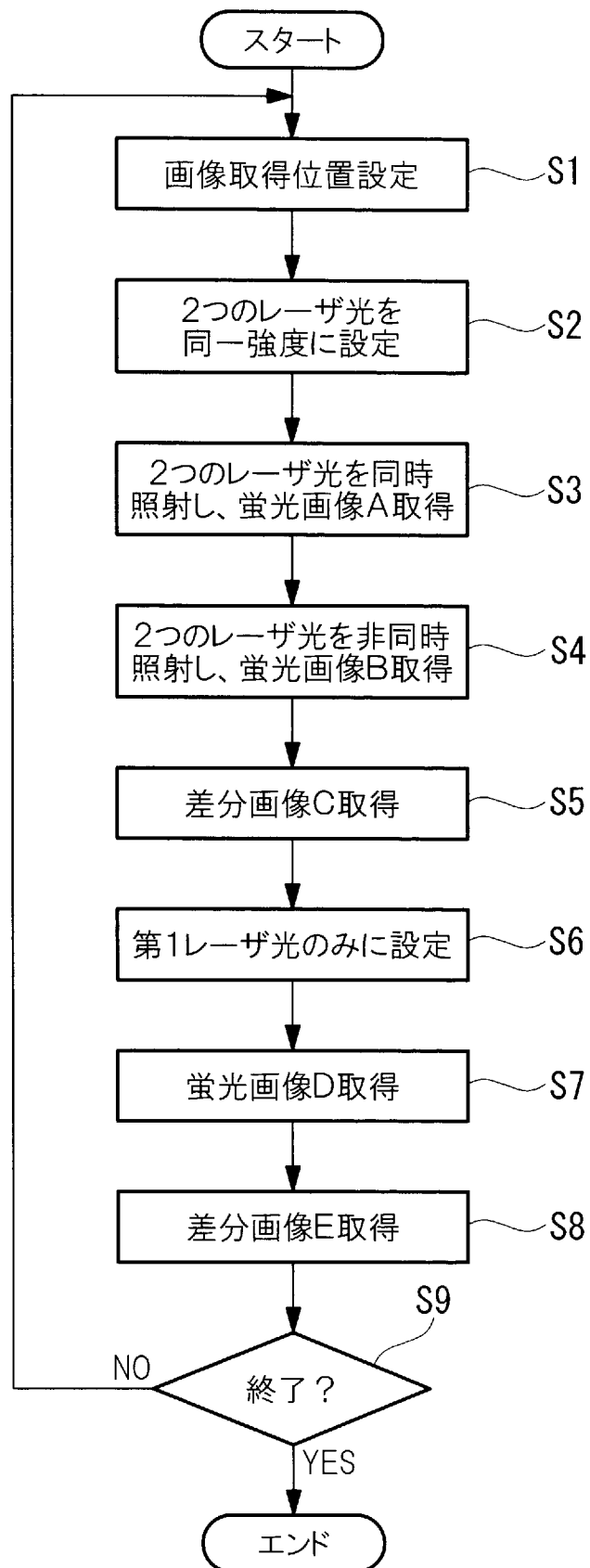
[図1]



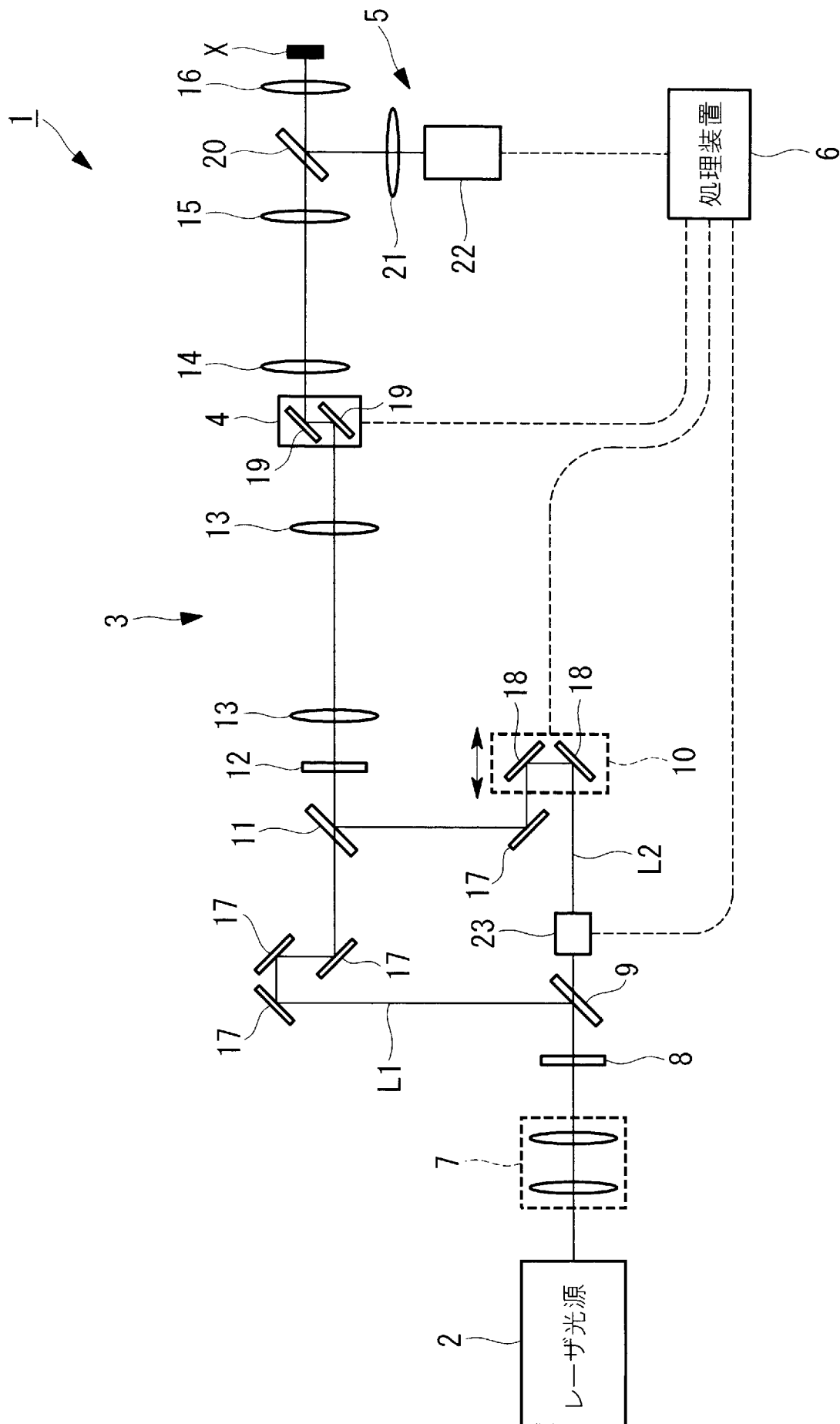
[図2]



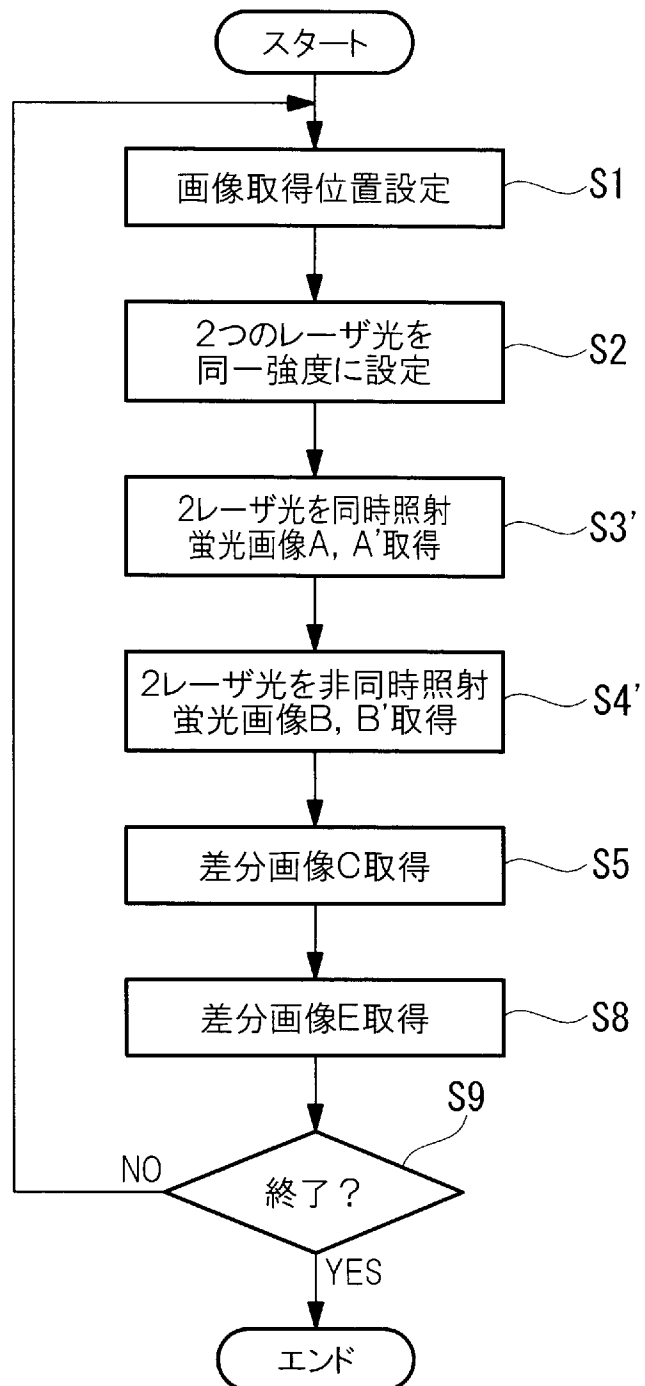
[図3]



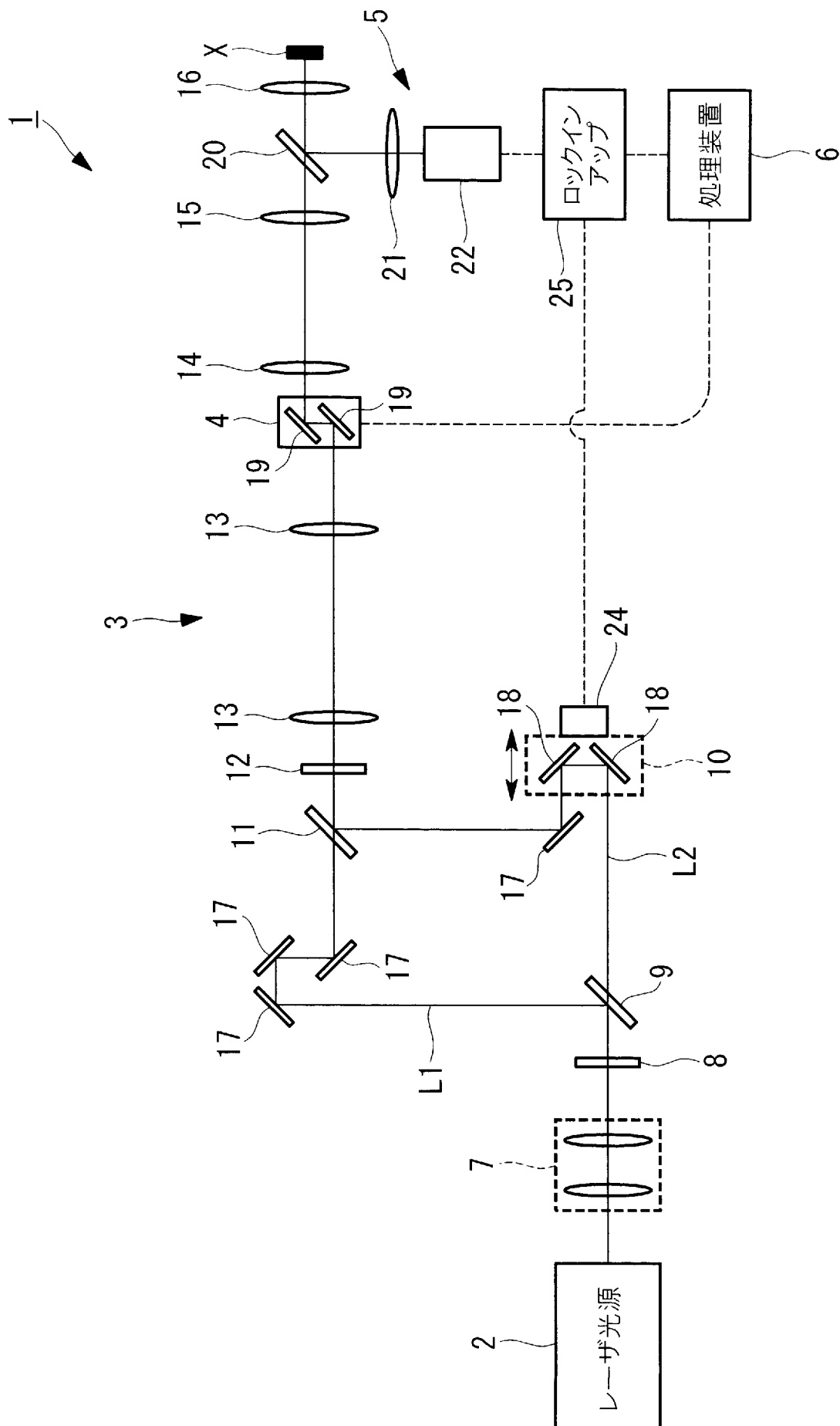
[図4]



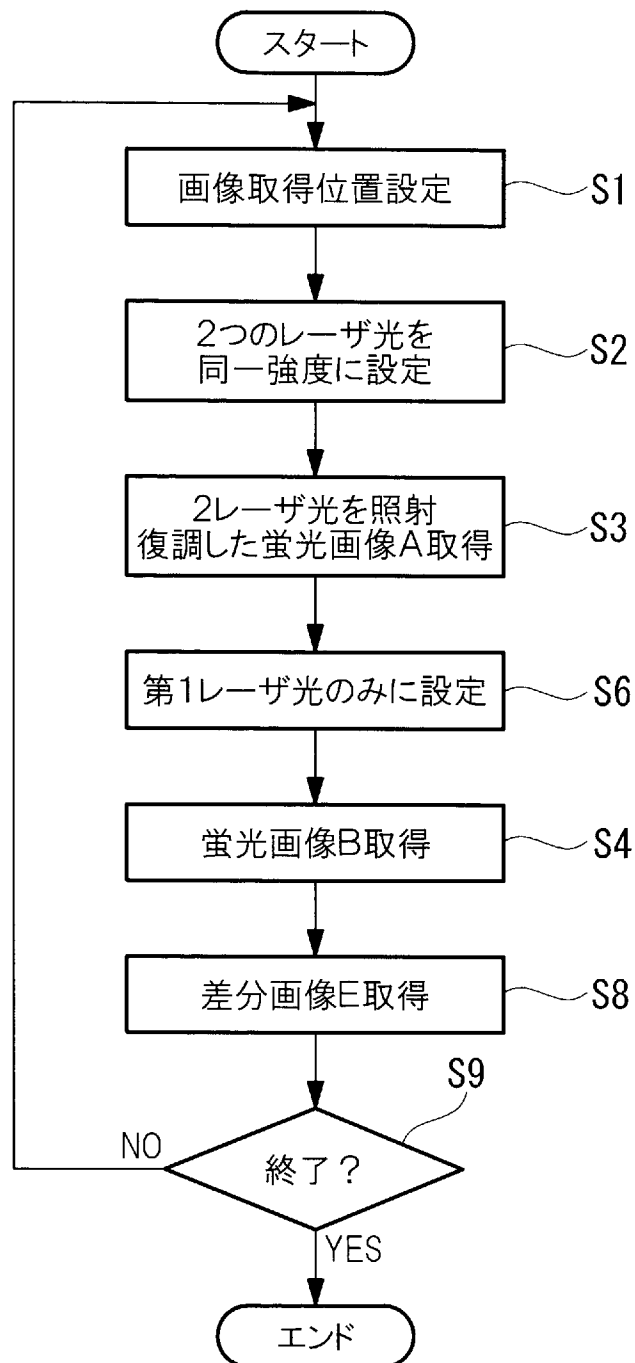
[図5]



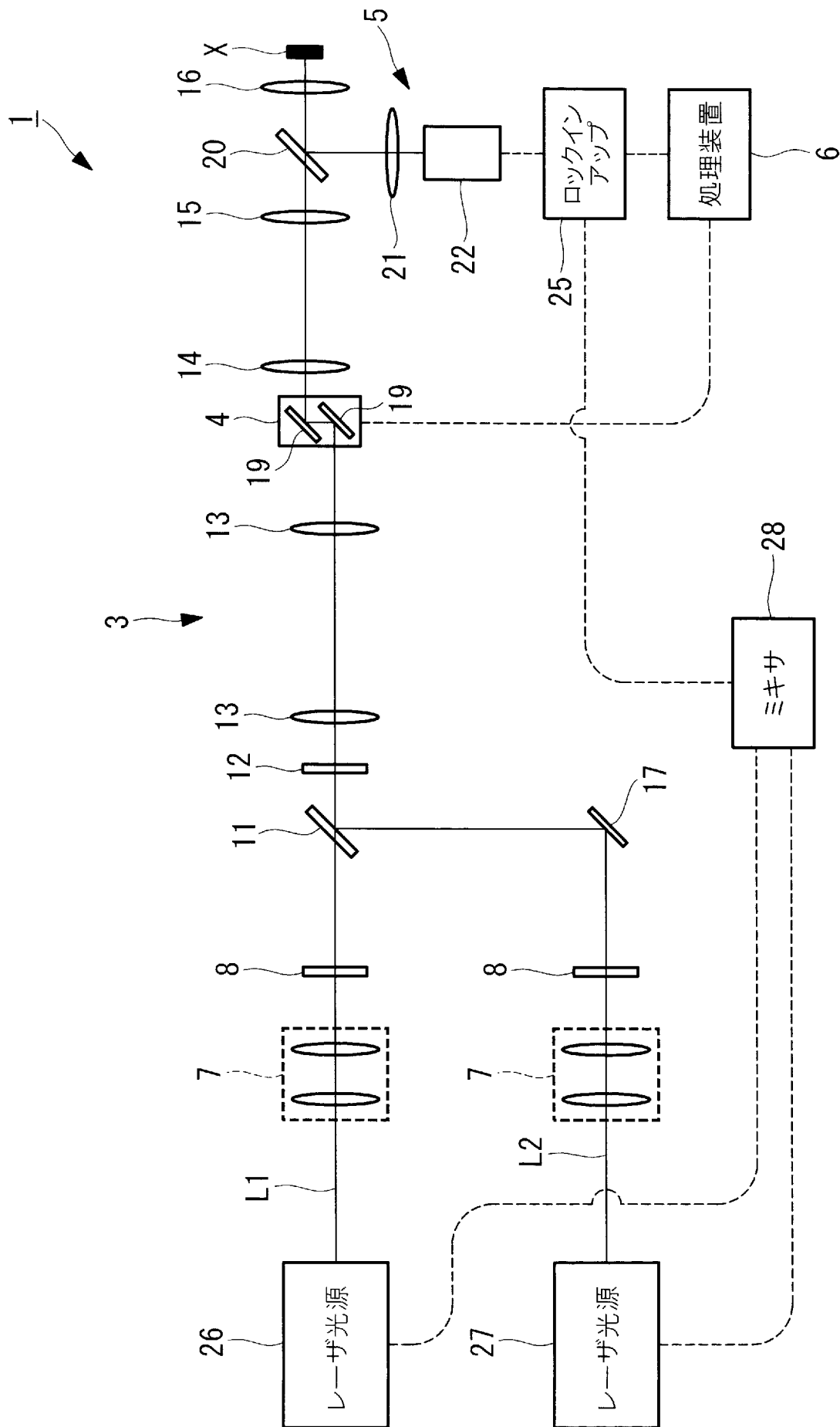
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/058018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B21/00(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)

G02B21/00, G01N21/64

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 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

Scopus, 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	K.Isobe, H.Kawano, T.Takeda, A.Suda, A.Kumagai, H.Mizuno, A.Miyawaki, and K.Midorikawa, "Background-free deep imaging by spatial overlap modulation nonlinear optical microscopy", BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, 2012.07.01, Vol.3, No.7 P.1594-1608	1-16
A	WO 2012/127907 A1 (Riken, Japan), 27 September 2012 (27.09.2012), entire text; all drawings & DE 112012001802 T	1-16
A	US 2009/0084980 A1 (Trustees of Boston University), 02 April 2009 (02.04.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-16



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 May 2016 (27.05.16)

Date of mailing of the international search report

07 June 2016 (07.06.16)

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/JP2016/058018

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 9-229861 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 05 September 1997 (05.09.1997), entire text; all drawings (Family: none)	1-16
A	WO 2015/163261 A1 (Olympus Corp.), 29 October 2015 (29.10.2015), entire text; all drawings (Family: none)	1-16
A	JP 2013-130853 A (Yokogawa Electric Corp.), 04 July 2013 (04.07.2013), entire text; all drawings & US 2013/0128346 A1 entire text; all drawings	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G02B21/00(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（I P C））

Int.Cl. G02B21/00, 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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で利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）

Scopus, 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	K. Isobe, H. Kawano, T. Takeda, A. Suda, A. Kumagai, H. Mizuno, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Background-free deep imaging by spatial overlap modulation nonlinear optical microscopy", BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, 2012.07.01, Vol. 3, No. 7 P. 1594-1608	1-16
A	WO 2012/127907 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2012.09.27, 全文、全図 & DE 112012001802 T	1-16

☒ 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

27.05.2016

国際調査報告の発送日

07.06.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/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）

殿岡 雅仁

電話番号 03-3581-1101 内線 3271

2 V

4 7 4 8

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	US 2009/0084980 A1 (Trustees of Boston University) 2009.04.02, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-16
A	JP 9-229861 A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 1997.09.05, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-16
A	WO 2015/163261 A1 (オリンパス株式会社) 2015.10.29, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-16
A	JP 2013-130853 A (横河電機株式会社) 2013.07.04, 全文、全図 & US 2013/0128346 A1, 全文、全図	1-16