

(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
2016 年 10 月 13 日(13.10.2016)



(10) 国際公開番号

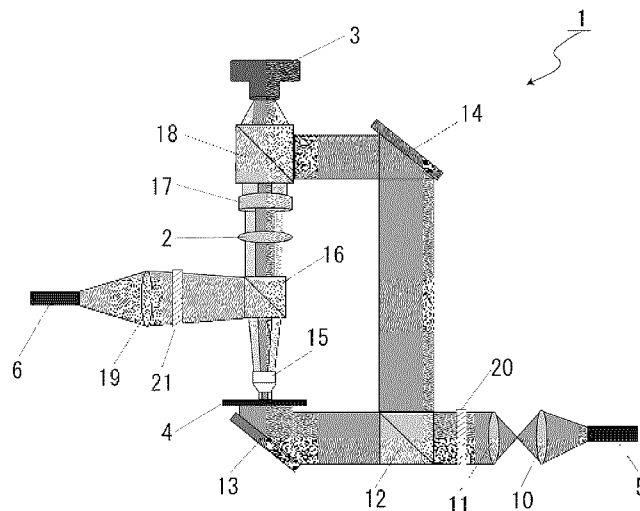
WO 2016/163560 A1

- (51) 国際特許分類:
G03H 1/00 (2006.01) *G02B 21/00* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061704
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 11 日(11.04.2016)
- (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 2015-080420 2015 年 4 月 9 日(09.04.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 番 1 号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 的場 修(MATOBA Osamu); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 番 1 号 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 全 香玉(QUAN Xiangyu); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 番 1 号 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人グローバル知財(THE PATENT CORPORATE BODY GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY); 〒6500024 兵庫県神戸市中央区海岸通 4 番地 新明海ビル 3 F Hyogo (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), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

(54) 発明の名称: デジタルホログラフィック顕微鏡



(57) Abstract: Provided is a digital holographic microscope combining a fluorescence digital holographic microscope and a phase image detection digital holographic microscope and capable of simultaneously three-dimensionally measuring a fluorescence image and a phase image. The digital holographic microscope is provided with: a first holographic optical system which, using first laser light 5, acquires a phase three-dimensional image due to interference light generated by superimposing object light that passes through a sample stage 4 and reference light that does not pass therethrough on each other; a second holographic optical system which, using second laser light 6, acquires a fluorescence three-dimensional image due to fluorescence excitation light; an imaging means 3; and a bifocal Fresnel lens (Sub-wavelength Periodic structured Fresnel Lens (SPFL)) 2 having polarization dependency. The respective optical systems are disposed such that the object light and fluorescence signal light are coaxially superimposed, and the bifocal lens 2 is disposed on superimposed optical axes. The imaging means 3 simultaneously acquires the phase three-dimensional image and the fluorescence three-dimensional image as a hologram. The phase three-dimensional image and the fluorescence three-dimensional image are separated, and the object light and the fluorescence signal light are reconstructed from the interference intensity distributions of the respective three-dimensional images.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/163560 A1



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 添付公開書類:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡と位相像検出デジタルホログラフィック顕微鏡が結合され、蛍光像と位相像を同時に 3 次元計測できるデジタルホログラフィック顕微鏡を提供する。第 1 のレーザ光 5 を用いて試料ステージ 4 を通過する物体光と通過しない参照光とを重ね合わせた干渉光による位相 3 次元像を取得する第 1 のホログラフィック光学系と、第 2 のレーザ光 6 を用いて蛍光励起光による蛍光 3 次元像を取得する第 2 のホログラフィック光学系と、撮像手段 3 と、偏光依存性を有する 2 焦点フルネルレンズ (S P F L) 2 を備える。物体光と蛍光信号光とが同軸に重畳するように各々の光学系が配置され、重畳した光軸上に 2 重焦点レンズ 2 が配置される。撮像手段 3 が位相 3 次元像と蛍光 3 次元像をホログラムとして同時に取得する。位相 3 次元像と蛍光 3 次元像を分離してそれぞれの干渉強度分布から物体光と蛍光信号光を再構成する。

明 細 書

発明の名称： デジタルホログラフィック顕微鏡

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光と位相を同時に３次元計測できるデジタルホログラフィック顕微鏡に関するものである。

背景技術

[0002] 生きた細胞の動的３次元イメージングは、バイオ応用分野において重要な計測技術である。例えば、蛍光顕微鏡を使って細胞核中の特定DNAに蛍光分子を導入し、有糸分裂する細胞の変化を計測する蛍光標識技術が知られている。蛍光分子で染色された細胞内の核やタンパク質の相互作用を可視化することで様々な観測が可能になる。蛍光３次元像を高分解能かつ高コントラストで計測できるものとして、共焦点レーザ走査型顕微鏡が知られている。しかし、共焦点レーザ走査型顕微鏡では計測物体の一点ごとに集光点の走査が必要なため、蛍光３次元像を得るためには時間がかかり、動的物体の変化が速い現象の計測や奥行き位置が異なる複数の細胞の同時計測は不向きであるという本質的な限界がある。

また、蛍光像だけでなく細胞核や細胞壁などの構造を同時に観察する技術も求められている。構造観察の手段として、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡などがある。位相差像は透明物体の形状測定に有効である。

[0003] 蛍光像および位相差像を同時観察することができれば、異なる情報を同時に取得することができるため、バイオ反応においてより詳細な情報を提供することが可能になる。

最近では、蛍光像および位相差像を同時観察可能な光学顕微鏡が市販されているが、フィルタの入れ替えが必要な上、一度の計測範囲は１点もしくは２次元に限られるといった制約がある。

[0004] 一方、瞬時的な３次元計測を可能とするツールとして、デジタルホログラフィック顕微鏡 (Digital Holographic Microscope ; DHM) が知られて

いる。デジタルホログラフィック顕微鏡では、3次元情報をホログラム情報として取得し、計算機内で光波の逆伝搬計算を行うことで奥行き位置に対する物体の光波情報を再構成する。デジタルホログラフィック顕微鏡の特徴としては、特殊な蛍光染色が不要なく生体細胞の3次元観察が可能であること（ラベルフリー）、計算機再構成により焦点位置を任意に変更できるオートフォーカシング機能を有すること、定量的位相計測が可能であることが挙げられる。このため、3次的に細胞が動くような状況においても、再構成計算により自動的にピントの合った再構成画像を得ることができる。

[0005] デジタルホログラフィック顕微鏡を細胞観察に応用する場合、蛍光情報のホログラム取得が必要となるが、蛍光を用いてホログラフィー技術を実現するためには、蛍光が非常に干渉しにくいインコヒーレント光であるという問題がある。近年、インコヒーレント光からホログラムを作る方法が次々に提案されており、蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡（Fluorescence Digital Holographic Microscope ; F D H M）に向けた研究が世界中で活性化しているが、空間光変調素子や光学素子を多く有するものが大半である（例えば、特許文献1を参照）。

[0006] 特許文献1に開示されたホログラム記録装置は、干渉性の低い光（例えば自然光または蛍光等）を観察することができないといった問題を解決するものであり、空間光変調器（波面変調素子）を用いて、互いに偏光方向が異なる第1成分光および第2成分光を含む物体光を、第1成分光の波面形状と第2成分光の波面形状を異なる形状にし、第1成分光に対する第2成分光の位相シフト量に、空間的に周期的に変化する分布を生じさせて、第1成分光と第2成分光とを干渉させてホログラムを形成するものである。これにより、単一の光路を通る干渉性の低い光を用いて、1回の撮像で記録されるホログラムから、被写体の再生像を得ることができるものである。しかしながら、この方法では、干渉性の低い蛍光3次元像の観察に限定されるといった問題がある。

[0007] また、蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡（F D H M）は、ターゲッ

ティング計測には適しているが、蛍光を発生しない物質に対しては無力であるという問題がある。また、蛍光観察を行う場合に、有害な蛍光分子を使うために計測対象が制限される問題も生じる。そのため、デジタルホログラフィック顕微鏡（DHM）の応用拡大といった視点で見ると、位相像や蛍光像さらには偏光などの多様な情報が観測可能なマルチモーダル（multimodal）デジタルホログラフィック顕微鏡の登場が望まれている。

[0008] 本発明者らは、マルチモーダルデジタルホログラフィック顕微鏡の実現を目指し、蛍光2次元像と位相イメージングが可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を既に試作して実験にホログラム画像から再構成している（非特許文献1を参照）。試作した顕微鏡は、蛍光像と位相像を逐次的に取得するものであり、蛍光像と位相像を同時に計測するものではない。

以下、本明細書において、特に断らない限り、蛍光像と蛍光3次元像、位相像と位相3次元像は、それぞれ同じ意味で用いている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2015-1726号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：的場修ら，“蛍光と位相イメージングが可能なハイブリッドデジタルホログラフィック顕微鏡の試作”，Optics & Photonics Japan 2014，No.6，P15.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上述の試作のデジタルホログラフィック顕微鏡では、蛍光顕微鏡と位相像検出デジタルホログラフィック顕微鏡の機能を併せ持つが、シャッターを切替えてそれぞれの像を逐次的に取得するものであり、蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡と位相像検出デジタルホログラフィック顕微鏡が結合されたものではなく、蛍光像と位相像を同時に3次元計測できるというも

のではない。

かかる状況に鑑みて、本発明は、蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡と位相像検出デジタルホログラフィック顕微鏡が結合され、蛍光像と位相像を同時に3次元計測できるデジタルホログラフィック顕微鏡を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 上記課題を達成すべく、本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡は、下記1)～4)を備える。

1) 第1のレーザ光を用いて観察対象試料を通過する物体光と通過しない参照光とを重ね合せた干渉光による位相3次元像を取得する第1のホログラフィック光学系

2) 第2のレーザ光を用いて観察対象試料の蛍光励起光による蛍光3次元像を取得する第2のホログラフィック光学系

3) 撮像手段

4) 偏光依存性を有する2重焦点レンズ

[0013] そして、物体光と蛍光信号光とが同軸に重畳するように各々の光学系が配置され、重畳した光軸上に上記4)の2重焦点レンズが配置される。撮像手段が位相3次元像と蛍光3次元像をホログラムとして同時に取得する。撮像手段により取得されたホログラム像から、位相3次元像と蛍光3次元像を分離してそれぞれの干渉強度分布から物体光と蛍光信号光を再構成する。

[0014] 上記構成によれば、観察対象試料から位相3次元像を取得する第1のホログラフィック光学系と、蛍光3次元像を取得する第2のホログラフィック光学系との2つの光学系を共通光路として、物体光と蛍光信号光を同軸に重畳させて、1つの撮像手段で2つのホログラム像を取得できる。

ここで、偏光依存性を有する2重焦点レンズとは、光電場の偏光方向に強い異方性を持ち、かつ、2つの焦点距離を持つレンズである。

[0015] 偏光依存性を有する2重焦点レンズとして、サブ波長周期構造の2焦点フレネルレンズ (Sub-wavelength Periodic structured Fresnel Lens ; S P F

L) が好適に用いられる。S P F L の場合、光の波長よりも短い周期の回折格子構造であるサブ波長周期構造によって、光波の偏光状態によって回折を受けることになる。また、フレネルレンズは、通常のレンズを光の波長で折り返し厚みを減らしたレンズであり、断面は鋸状でありプリズムを並べたような形になる。2 焦点フレネルレンズは、1 つのビーム光を 2 つに分けて回折させ、異なる場所で焦点を合わせる機能を持つ。

[0016] また、偏光依存性を有する 2 重焦点レンズとして、液晶空間光変調素子を用いても良い。液晶空間光素子では、液晶分子の配向により入射光電場の偏光状態に対して異なる働きを生じさせることができる。例えば、ある方向の直線偏光に対して常光線として作用するときに、それに垂直な直線偏光に対して異常光線として作用する。そのため、特定の直線偏光方向に対してのみ作用する偏光依存性のある 2 重焦点レンズを実現できる。

なお、本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡における蛍光信号光は、液晶空間光変調素子で実現される 2 重レンズによって、2 つの回折光が生じることになる。この 2 つの回折光は、共に同じ偏光であり、自己干渉が生じる。この点で、偏光方向が異なる第 1 成分光と第 2 成分光とを干渉させてホログラムを形成する上述の特許文献 1 における空間光変調素子とは機能が異なる（本発明の場合、蛍光ホログラム用の蛍光信号光、位相ホログラム用の物体光が、特許文献 1 の第 1 成分光と第 2 成分光に相当するものである。）。

[0017] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡において、偏光依存性を有する 2 重焦点レンズは、第 2 のホログラフィック光学系にのみ作用し、第 1 のホログラフィック光学系には作用しないように設計される。

位相 3 次元像を取得する第 1 のホログラフィック光学系の物体光の偏光には感度がなく、レンズ作用を起こすことがないように 2 重焦点レンズを設計すると共に、蛍光 3 次元像を取得する第 2 のホログラフィック光学系の蛍光の偏光には強い感度を持たせるように設計する。第 2 のホログラフィック光学系の蛍光の偏光は、2 つの焦点距離をもつ 2 重焦点レンズによって、自己

干渉が生じることになる。

[0018] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡では、蛍光３次元像は同心円状ホログラムであり、位相３次元像は等傾角ホログラムであり、空間周波数面において蛍光３次元像と位相３次元像とを分離する。

蛍光３次元像は、第２のホログラフィック光学系の蛍光の偏光が自己干渉するため、干渉パターンは同心円状となる。一方、位相３次元像は、等傾角干渉を用いることによってキャリア周波数をもつ干渉パターンにすることができる。同心円状干渉パターンと等傾角干渉パターンは、空間周波数面で分離することが可能であり、撮像手段により撮像した像から、蛍光３次元像と位相３次元像を空間周波数面で分離することができる。２つのホログラムパターンをフーリエ変換することで、空間周波数面で、等傾角干渉パターンの成分をバンドパスフィルタによって抽出することができる。予め、等傾角干渉パターンに用いた参照光強度分布を取得しておくことで、同心円状干渉パターンのみを抽出することが可能になる。

[0019] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡において、第２のホログラフィック光学系は、励起用レーザ光源が切替可能であることでもよい。観察対象試料の蛍光特性に応じて、励起用レーザ光源の波長を切り替えるようにする。これにより、蛍光染色試薬の種類に応じて、励起用レーザ光源を切替えて使用することにより、ターゲットとなる細胞を選択して分裂や形状変化などの細胞の状態変化を計測できる。

すなわち、本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、一の励起用レーザ光源を用いて取得した蛍光３次元像と、他の励起用レーザ光源を用いて取得した蛍光３次元像と、同時に取得した位相３次元像とから、細胞の挙動を観察する細胞観察方法を実現できる。

[0020] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡では、第１のホログラフィック光学系が透過型であり、第２のホログラフィック光学系が反射型（落射型）にすることが好ましい。また、第１及び第２のホログラフィック光学系は、共に試料の設置状態により上下を反転させても構わない。

観察対象試料の蛍光励起光による蛍光３次元像を取得する第２のホログラフィック光学系において、蛍光信号は微弱であるので、透過型にした場合に、強い蛍光励起光だけをカットするのは非常に困難になるからである。

第２のホログラフィック光学系を反射型（落射型）でなく透過型にする場合は、蛍光信号を励起する蛍光励起光を十分にカットし、蛍光信号のみを通過させるダイクロイックミラーや蛍光波長の特定の波長および位相計測のためのレーザ波長を通過させるバンドパスフィルタを用いる必要がある。

[0021] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡において、細胞観察の際は、蛍光３次元像により細胞核の時空間情報を、位相３次元像により細胞核や細胞壁の時空間構造を同時に取得することが好ましい。

複数の物理量から得られる多次元情報は、従来のバイオイメーシング分野における計測では得られておらず、本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡によって、従来不可能であった観察を可能にする。本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡は、バイオイメーシング分野における強力な計測ルールとして、蛍光３次元像と位相３次元像を同時かつ高速撮影することを可能にする。

すなわち、本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、蛍光３次元像により細胞核の時空間情報と、位相３次元像により細胞核や細胞壁の時空間構造とを同時に取得する細胞観察方法を実現できる。

発明の効果

[0022] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡によれば、蛍光デジタルホログラフィック顕微鏡と位相像検出デジタルホログラフィック顕微鏡が結合され、蛍光３次元像と位相３次元像を同時に計測できるといった効果がある。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]実施例１のデジタルホログラフィック顕微鏡の光学系の構成図

[図2]位相３次元像を取得する第１のホログラフィック光学系の構成図

[図3]蛍光３次元像を取得する第２のホログラフィック光学系の構成図

[図4]蛍光ホログラムと位相ホログラムの分離再生原理の説明図

[図5]取得したホログラム像の一例

[図6]ホログラム像から分離した蛍光像と位相像

[図7]2焦点フレネルレンズ（S P F L）の説明図

[図8]実施例2のデジタルホログラフィック顕微鏡の光学系の構成図

[図9]オオカナダモの測定画像例（1）

[図10]オオカナダモの測定画像例（2）

[図11]実施例4のデジタルホログラフィック顕微鏡の光学系の構成図

[図12]2色蛍光ビーズの位相像と蛍光像

発明を実施するための最良の形態

[0024] 以下、本発明の実施形態の一例を、図面を参照しながら詳細に説明していく。なお、本発明の範囲は、以下の実施例や図示例に限定されるものではなく、幾多の変更及び変形が可能である。

実施例 1

[0025] 図1は、デジタルホログラフィック顕微鏡の一実施形態の光学系の構成を示す。図1に示すデジタルホログラフィック顕微鏡は、図2に示す透過型デジタルホログラフィック顕微鏡と、図3で示す反射型蛍光顕微鏡との2つの光学系を共通光路として、物体光と蛍光信号光を同軸に重畳させて、1つの撮像手段で位相3次元像と蛍光3次元像の2つのホログラムを同時に取得できるようにしたものである。

[0026] 先ず、波長355nmから550nmの帯域の励起用レーザ光源6を用いて、試料ステージ4上の観察対象試料の蛍光分子を励起する。励起された蛍光分子は、波長355nmから550nmの帯域の励起用レーザ光源より長波長の蛍光信号を発し、試料ステージ4のガラス基板表面で反射された励起用レーザ光とともに対物レンズ15に入射する。なお、ダイクロイックミラー16を設置し、励起用レーザ光を十分に減衰させ、蛍光信号光を強調して蛍光3次元像を取得する。

蛍光3次元像は、2重焦点レンズである2焦点フレネルレンズ（S P F L

）２によって蛍光の偏光成分が自己干渉するため、干渉パターンは同心円状となる。ＳＰＦＬ２は、図７に示すように、２つの焦点距離（ f_1 、 f_2 ）を持つサブ波長周期構造のフレネルレンズである。光の波長よりも短い周期の回折格子構造（サブ波長周期構造）によって、光波はその偏光状態によって回折を受けることになる。１つのビーム光は、２つの焦点距離をもつフレネルレンズにより、２つの回折波が生成される。そして、２つの回折波は異なる場所で焦点が合うことになる。

[0027] また同時に、波長６３３（nm）のHe-Neレーザ光源５を用いて試料ステージ４上の観察対象試料の計測物体を照明する。He-Neレーザ光はビームスプリッター１２により、それぞれ計測物体を透過する物体光経路と、何もない参照光経路に分けられ、マッハ・ツェンダー干渉計を構成している。計測物体を透過するHe-Neレーザ光の波長が波長３５５nmから５５０nmの帯域の励起用レーザ光の波長より長いため、ダイクロイックミラー１６に影響されずに伝搬され、再びビームスプリッター１８により参照光と干渉することができる。この際、物体光と参照光の間にわずかに角度をつけることによって、オフアクシス（off-axis）ホログラム、すなわち等傾角干渉パターンのホログラムを取得する。取得した等傾角干渉パターンのホログラムから、フーリエ変換法を用いて物体光の振幅分布と位相分布を抽出する。オフアクシス法では元の物体位置まで逆伝搬させることにより、観察対象試料の物体光の波面が再生されることになる。

[0028] そして、撮像手段として用いるイメージセンサ３で、位相３次元像と蛍光３次元像の２つのホログラムを同時に取得する。

上述の如く、蛍光３次元像は、２焦点フレネルレンズ（ＳＰＦＬ）２によって蛍光の偏光成分が自己干渉するため、干渉パターンは同心円状となる。一方、位相３次元像は、等傾角干渉パターンとなる。同心円状干渉パターンと等傾角干渉パターンは、空間周波数面で分離することが可能であり、イメージセンサ３により撮像した像から、位相３次元像の位相ホログラムと蛍光３次元像の蛍光ホログラムとを空間周波数面で分離することができる。

S P F L 2 を設けることにより、位相ホログラム用の光が影響を受けないように、 $1/2$ 波長板 20 を設け、位相ホログラム用の光の偏光を S P F L 2 によって影響しない偏光状態に合わせている。また、 $1/2$ 波長板 21 を設けて、蛍光励起用光源の偏光方向を S P F L 2 が働く偏光方向に合せている。

[0029] ここで、位相ホログラムと蛍光ホログラムが重畳した信号は、下記数式 1 のように示すことができる。

[0030] [数1]

$$I(x, y) = |o_o(x, y) + r_o(x, y)|^2 + |g(o_F(x, y), f_1) + g(o_F(x, y), f_2)|^2$$

[0031] 上記数式 1 において、 o_o は位相ホログラム用の物体光波の複素振幅分布を表し、 r_o は参照光波の複素振幅分布を表す。また、 o_F は 2 重焦点レンズに入射する蛍光ホログラム用物体光波の複素振幅分布である。ここで、 f_1 、 f_2 は 2 重焦点レンズの 2 つの焦点距離を示す。また、 g はレンズの位相関数および撮像面までのフレネル回折伝搬を表す関数である。

r_o が下記数 2 で表される平面波であるとする、位相ホログラムはオフアクシス型ホログラムとなる。そこで、位相ホログラムの抽出は、上記数式 1 をフーリエ変換して、空間周波数面で行うことができる。

[0032] [数2]

$$a \exp\{-i(k \sin \theta x + \cos \theta y)\}$$

[0033] 上記数式 1 をフーリエ変換したものを下記数式 3 に示す。ここで、 A は位相ホログラム用の参照光の振幅である。図 4 (1) は、位相ホログラムと蛍光ホログラムの 2 つのホログラムが重畳した干渉画像であり、下記数式 3 を図示化したものである。下記数式 3 の右辺の第 1, 2, 5, 6, 7, 8 項は自己干渉の同心円状ホログラムによる項であり、空間周波数面で原点付近に現れる信号となる (図 4 (2) を参照)。また、右辺の第 3, 4 項はオフアクシスホログラムによる項であり、空間周波数面で原点からずれた位置に存

在する信号となる（図4（2）を参照）。このため、ウィンドウ関数を掛けることにより、図4（2）に示す空間周波数面で、原点付近に現れる蛍光ホログラムと、原点からずれた位置に存在する位相ホログラムの2つのホログラムを分離する（図4（3）を参照）。したがって、オフアクシスホログラムによる項である右辺の第3，4項を、それぞれ、下記数式4と数式5のように取り出すことができる。

[0034] [数3]

$$\begin{aligned} F(f_x, f_y) = & O_p(f_x, f_y) * O_p^*(f_x, f_y) + A^2 \\ & + AO_p(f_x - k \sin \theta, f_y - k \cos \theta) + AO_p^*(-f_x - k \sin \theta, -f_y - k \cos \theta) \\ & + G_1(f_x, f_y) * G_1^*(f_x, f_y) + G_2(f_x, f_y) * G_2^*(f_x, f_y) \\ & + G_1(f_x, f_y) * G_2^*(f_x, f_y) + G_2(f_x, f_y) * G_1^*(f_x, f_y) \end{aligned}$$

[0035] [数4]

$$F_1(f_x, f_y) = AO_p(f_x - k \sin \theta, f_y - k \cos \theta)$$

[0036] [数5]

$$F_2(f_x, f_y) = AO_p^*(-f_x - k \sin \theta, -f_y - k \cos \theta)$$

[0037] ここで、位相ホログラム用の参照光の振幅Aは、予め測定することが可能であるため、上記数式4と数式5から位相ホログラムの物体光 o_p とその複素共役分布を求めることができる。上記数式3に上記数式4と数式5を代入して、蛍光ホログラムとして下記数式6を得る。

ここで、上記数式3における、 G_1 と G_2 は、それぞれ、 $g(O_F(x, y), f_1)$ と $g(O_F(x, y), f_2)$ のフーリエ変換を表している。

[0038] [数6]

$$F_F(f_x, f_y) = F(f_x, f_y) - O_p(f_x, f_y) * O_p^*(f_x, f_y) - A^2 - F_1(f_x, f_y) - F_2(f_x, f_y)$$

[0039] 上述の如く、位相ホログラムと蛍光ホログラムの2つのパターンをフーリエ変換することにより、空間周波数面で原点からずれた位置に存在する信号

の等傾角干渉パターンの成分を、バンドパスフィルタによって抽出することができる。また、予め等傾角干渉パターンに用いた参照光の強度分布を取得しておくことで、同心円状の干渉パターンのみを抽出することが可能になる。

[0040] (撮像したホログラムの一例)

ここで、撮像したホログラムの一例を示す。イメージセンサ3は、Photometrics社のCoolSNAPKINO-SPK(4.54 μ m ピッチ、14bit)を使用した。また、対物レンズ15は、オリンパス社製MDPlan40 (NA=0.65)の40倍の対物レンズを使用した。観察対象としては、Invitrogen社のTetraSpeck (登録商標)の直径4 μ mの蛍光ビーズを使用した。

[0041] 蛍光励起中心波長532 (nm)、蛍光の中心波長550 (nm)で、蛍光像と位相ホログラムを個別にイメージセンサで取得したホログラムのイメージの一例を図5に示す。

図5(1)が蛍光ビーズのホログラム画像であり(蛍光ビーズの部分を拡大した図も付記)、それをフーリエ変換して、図5(2)の空間周波数面を得る。空間周波数面の原点からずれた位置に存在するホログラムを抽出し、図5(3)の位相分布を取得する(拡大位相像も付記)。

図5(4)は、再構成された位相分布の3次元表示を示している。図5(4)から、蛍光ビーズの位相変化量が分かる。

[0042] 蛍光ビーズの蛍光像と、図5のプロセスで得られた位相像を、それぞれ図6(1)、(2)に示す。また位相3Dプロットを図6(3)に示す。図6(1)と(2)から蛍光ビーズ像と蛍光ビーズの位相像を確認できる。図6(3)から蛍光ビーズの形状が凸状の球形に近い形状が得られていることがわかる。構築した実験系を用いて、4 μ mサイズの蛍光像や10 μ mサイズの細胞形状の位相像などの計測が可能であることを確認した。

本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡では、リアルタイムで細胞の形状変化と核の動きを計測可能である。奥行き位置方向に結像位置を探索するオートフォーカス機能を更に実装することにより、リアルタイムに蛍光3

次元像と位相 3 次元像の観察が実現できるであろう。

実施例 2

[0043] 上述の実施例 2 のデジタルホログラフィック顕微鏡は、位相ホログラムを取得する第 1 のホログラフィック光学系が透過型であり、蛍光ホログラムを取得する第 2 のホログラフィック光学系が反射型であるが、以下に説明するように、蛍光ホログラムを取得する第 2 のホログラフィック光学系が透過型であっても構わない。

図 8 は、実施例 2 のデジタルホログラフィック顕微鏡の光学系の構成図を示している。

[0044] 実施例 1 のデジタルホログラフィック顕微鏡の光学系と同様に、波長 633 (nm) の He-Ne レーザ光源 5 を用いて試料ステージ 4 上の観察対象試料の計測物体を照明する。He-Ne レーザ光はビームスプリッター 12 により、それぞれ計測物体を透過する物体光経路と、何もない参照光経路に分けられ、マッハ・ツェンダー干渉計を構成する。計測物体を透過する He-Ne レーザ光の波長が後述する波長 532 nm の帯域の励起用レーザ光源より長いため、ダイクロイックミラー 33 に影響されずに伝搬され、再びビームスプリッター 18 により参照光と干渉することができる。この際、物体光と参照光の間にわずかに角度をつけることによって、オフアクシスホログラム（等傾角干渉パターンのホログラム）を取得する。

[0045] また、波長 532 nm の帯域の励起用レーザ光源 6 を用いて、試料ステージ 4 のガラス基板の裏面から試料ステージ 4 の表面に置かれた観察対象試料を透過して蛍光分子を励起する。励起された蛍光分子は、532 (nm) より長波長の蛍光信号を発し、試料ステージ 4 を透過した励起用レーザ光とともに対物レンズ 15 に入射する。観察対象試料の蛍光励起光による蛍光信号は微弱であるので、本実施例のような透過型にした場合に、蛍光励起光を十分にカットし、蛍光信号のみを通過させるダイクロイックミラー 33 を設置し、励起用レーザ光を十分に減衰させ、蛍光信号光を強調して蛍光 3 次元像を取得する。蛍光 3 次元像は、サブ波長周期構造の 2 焦点フレネルレンズ（

S P F L) 2 によって蛍光の偏光成分が自己干渉するため、干渉パターンは同心円状となる。

[0046] そして、イメージセンサ 3 で、位相 3 次元像と蛍光 3 次元像の 2 つのホログラムを同時に取得する。蛍光ホログラムの干渉パターンは同心円状となり、位相ホログラムの干渉パターンは等傾角干渉パターンとなる。実施例 1 と同様に、同心円状干渉パターンと等傾角干渉パターンは、空間周波数面で分離することが可能であり、イメージセンサ 3 により撮像した像から、位相 3 次元像の位相ホログラムと蛍光 3 次元像の蛍光ホログラムとを空間周波数面で分離することができる。また、S P F L 2 を設けることにより、位相ホログラム用の光が影響を受けないように、 $1/2$ 波長板 20 を設け、位相ホログラム用の光の偏光を S P F L 2 によって影響しない偏光状態に合わせている。また、 $1/2$ 波長板 21 を設けて、蛍光励起用光源の偏光方向を S P F L 2 が働く偏光方向に合せている。

実施例 3

[0047] 従来、バイオイメーシング分野の顕微鏡観察では、焦点面近傍での細胞の動きのみしか観察できないという限界がある。一方、デジタルホログラフィーでは、20 倍の対物レンズを用いた場合に、1000 倍の奥行き範囲を観察できることが知られている。実施例 1 又は 2 のデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、3 次元的な細胞の塊や奥行きに異なる細胞における反応を計測し、多数の細胞について 3 次元位置をマルチトラックキングすることが可能である。

[0048] 時間的に異なる再構成像の各々の点において合焦または非合焦の判別を行って、3 次元的にフォーカスの合った再構成像を 30 フレーム毎秒のリアルタイムで再生する。位相分布情報に対して奥行きに合焦となる位置を追跡するオートフォーカスを機能を設ける。時間分解能として 10^{-5} 秒から 10^5 秒の 10 桁の時間スケールに対応可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を構築することも可能である。また、奥行きの異なるがん細胞に対する薬の効果を同時観察することも可能であり、全ての面で焦点のあった再構成像を提

供できる。

[0049] 図9、10は、オオカナダモにおける葉緑体の原形質流動を、実施例1のデジタルホログラフィック顕微鏡で観察した画像のイメージを示している。図9(1)はオオカナダモの撮影画像(2層構造を示す断面図も付記)、図9(2)はホログラム、図9(3)の空間周波数面、図9(4)は再現された位相イメージを示している。

葉緑体は染色することなく自家蛍光を発する(図10(1)を参照)。そのため、蛍光ホログラムと位相ホログラムを同時に取得し、位相測定により細胞壁の構造と葉緑体を同時に計測する(図10(2)を参照)。葉緑体は3次元的に移動しているため、時系列に並ぶホログラム像をリアルタイムで再構成する。

[0050] また、図9(1)に示すように、オオカナダモは表面と裏面の2層構造をしている。実施例1のデジタルホログラフィック顕微鏡によるデジタルホログラフィー計測では、奥行きに構造が存在する場合にコヒーレンス長が長いため、クロストークノイズが大きい。デジタルホログラフィーでは奥行き位置の異なる情報をフィルタにより除去あるいは低減させることが可能であるため、信号処理により奥行き分解能を向上させることが可能である。

実施例 4

[0051] 図11は、デジタルホログラフィック顕微鏡の他の実施形態の光学系の構成を示す。図1に示すデジタルホログラフィック顕微鏡と同様、透過型デジタルホログラフィック顕微鏡と反射型蛍光顕微鏡との2つの光学系を共通光路として、物体光と蛍光信号光を同軸に重畳させて、1つの撮像手段で位相3次元像と蛍光3次元像の2つのホログラムを同時に取得できるようにしたものである。

[0052] 図1に示すデジタルホログラフィック顕微鏡と異なる点は、2つの励起用レーザ光源(41, 42)を備えている点である。具体的には、473nmの波長の青色レーザと、532nmの波長の緑色レーザを備える。青色レーザは、主に500~530nmの蛍光を励起することを目的とする。一方

、緑色レーザは、主に540～600nmの蛍光を励起することを目的とする。観察対象の細胞によって、蛍光マーカーが異なることが想定される。そのため、蛍光マーカーが励起する波長のレーザを観察対象試料に照射できるようにする。

例えば、図11に示す構成の場合、2つのシャッター（43，44）とビームスプリッター46によって、試料ステージ4上の観察対象試料の蛍光分子を励起する励起用レーザ光源（41，42）が切替えられる。シャッター（43，44）の切り替えは、シャッター制御装置50から出力されるシャッター制御信号（51，52）によって行われる。ビームスプリッター46の先になるND（Neutral Density）フィルタ47は、色彩に影響を与えることなくレーザ光量を低下させるためのものである。

[0053] 2つの励起用レーザ光源（41，42）の内、一方の励起用レーザ光源を用いて、試料ステージ4上の観察対象試料の蛍光分子を励起する。励起された蛍光分子は、励起用レーザ光源より長波長の蛍光信号を発し、試料ステージ4のガラス基板表面で反射された励起用レーザ光とともに対物レンズ15に入射する。また、シャッター制御装置50により、2つのシャッター（43，44）を切り替え、もう一方の励起用レーザ光源を用いて、試料ステージ4上の観察対象試料の蛍光分子を励起する。

2つの励起用レーザ光源（41，42）の各々の蛍光3次元像は、2重焦点レンズである2焦点フレネルレンズ（SPFL）2によって蛍光の偏光成分が自己干渉するため、干渉パターンは同心円状となる。

[0054] 蛍光3次元像の取得と同時に、波長633（nm）のHe-Neレーザ光源5を用いて試料ステージ4上の観察対象試料の計測物体を照明し、オフアクシス（off-axis）ホログラムを作成し、イメージセンサ3で、位相3次元像と蛍光3次元像の2つのホログラムを同時に取得する。

[0055] 観察対象試料として、径が2.5～4.5μmで、黄色とナイルレッドの2色蛍光ビーズを混ぜたものを用いた。図11の光学系の構成のデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、2色蛍光ビーズの位相像と蛍光像を取得

した結果を図12に示す。ただし、本実施例では、蛍光は2次元像の撮影となっている。図12(1)は、2色蛍光ビーズの位相像を示している。図12(2)(3)は、それぞれ黄色の蛍光ビーズの蛍光像、ナイルレッドの蛍光ビーズの蛍光像を示している。図12(2)の黄色の蛍光ビーズの蛍光像は、青色レーザ光源を用いて、試料ステージ4上の観察対象試料の蛍光分子を励起した場合の蛍光像である。また図12(3)のナイルレッドの蛍光ビーズの蛍光像は、緑色レーザ光源を用いて、試料ステージ4上の観察対象試料の蛍光分子を励起した場合の蛍光像である。図12(1)の位相像から6つの蛍光ビーズが確認できる。また、図12(2)の蛍光像では4つの蛍光ビーズが確認でき、図12(3)の蛍光像では2つの蛍光ビーズが確認できる。これらのことから、構築した実験系を用いて、 μ オーダーサイズの蛍光粒子を、その色毎に識別して確認できることがわかった。

また、図12(4)は、これらの蛍光ビーズの1つの位相プロファイルを示している。この図から蛍光ビーズの大きさ(約 $5\mu\text{m}$)と位相差(2.6rad 程度)を知ることができる。

[0056] 本発明のデジタルホログラフィック顕微鏡では、リアルタイムで細胞の形状変化と細胞核の動きを計測可能であり、蛍光染色試薬の種類に応じて、励起用レーザ光源を切替えて使用することにより、ターゲットとなる細胞を選択して形状変化と動きを計測できる。

なお、本実施例では、2つの励起用レーザ光源を用いているが、3つ以上であってもよい。また、シャッター制御装置から出力されるシャッター制御信号を高速に切り替えて、蛍光像を取得してもよい。

産業上の利用可能性

[0057] 本発明は、バイオイメージング分野の顕微鏡に有用である。

符号の説明

- [0058]
- 1, 30 デジタルホログラフィック顕微鏡
 - 2 2焦点フレネルレンズ(SPFL)
 - 3 イメージセンサ

- 4 試料ステージ
- 5 He-Ne レーザ光源
- 6, 41, 42 励起用レーザ光源
- 10, 11, 19, 32, 34, 35, 36 レンズ
- 12, 18, 46 ビームスプリッター
- 13, 14, 31, 45 反射鏡
- 15 対物レンズ
- 16, 33 ダイクロイックミラー
- 17 チューブレンズ
- 20, 21 1/2 波長板
- 43, 44 シャッター
- 47 ND フィルタ
- 50 シャッター制御装置
- 51, 52 シャッター制御信号

請求の範囲

- [請求項1] 第1のレーザ光を用いて観察対象試料を通過する物体光と通過しない参照光とを重ね合せた干渉光による位相3次元像を取得する第1のホログラフィック光学系と、
- 第2のレーザ光を用いて前記観察対象試料の蛍光励起光による蛍光3次元像を取得する第2のホログラフィック光学系と、
- 撮像手段と、
- 偏光依存性を有する2つの焦点距離を持つ2重焦点レンズと、
- を備え、
- 前記物体光と前記蛍光信号光とが同軸に重畳するように各々の光学系が配置され、重畳した光軸上に前記2重焦点レンズが配置され、
- 前記撮像手段が前記位相3次元像と前記蛍光3次元像をホログラムとして同時に取得し、前記位相3次元像と前記蛍光3次元像を分離してそれぞれの干渉強度分布から前記物体光と前記蛍光信号光を再構成することを特徴とするデジタルホログラフィック顕微鏡。
- [請求項2] 前記2重焦点レンズは、サブ波長周期構造の2焦点フレネルレンズであることを特徴とする請求項1に記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。
- [請求項3] 前記2重焦点レンズは、液晶空間光変調素子から成ることを特徴とする請求項1に記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。
- [請求項4] 前記2重焦点レンズは、第2のホログラフィック光学系にのみ作用し、第1のホログラフィック光学系には作用しないものであることを特徴とする請求項1～3の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。
- [請求項5] 第2のホログラフィック光学系は、前記2重焦点レンズによって自己干渉することを特徴とする請求項1～4の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。
- [請求項6] 前記蛍光3次元像は同心円状ホログラムであり、前記位相3次元像

は等傾角ホログラムであり、空間周波数面において前記蛍光 3 次元像と前記位相 3 次元像とを分離することを特徴とする請求項 1 ～ 5 の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。

[請求項7] 第 2 のホログラフィック光学系は、励起用レーザ光源が切替可能であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。

[請求項8] 第 1 のホログラフィック光学系が透過型であり、第 2 のホログラフィック光学系が反射型であることを特徴とする請求項 1 ～ 7 の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。

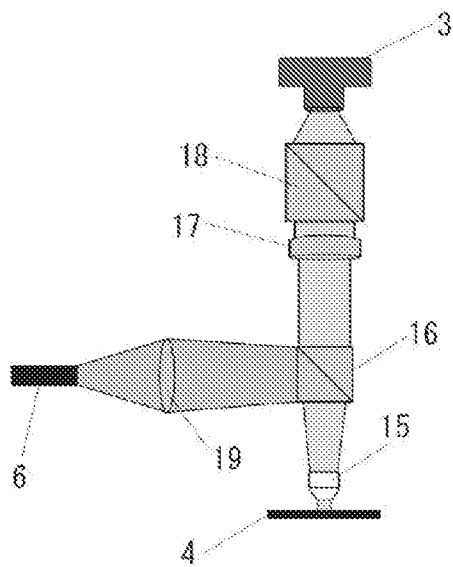
[請求項9] 前記蛍光 3 次元像により細胞核の時空間情報を、前記位相 3 次元像により細胞核および細胞壁の時空間構造を同時に取得することを特徴とする請求項 1 ～ 8 の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡。

[請求項10] 請求項 1 ～ 8 の何れかに記載のデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、

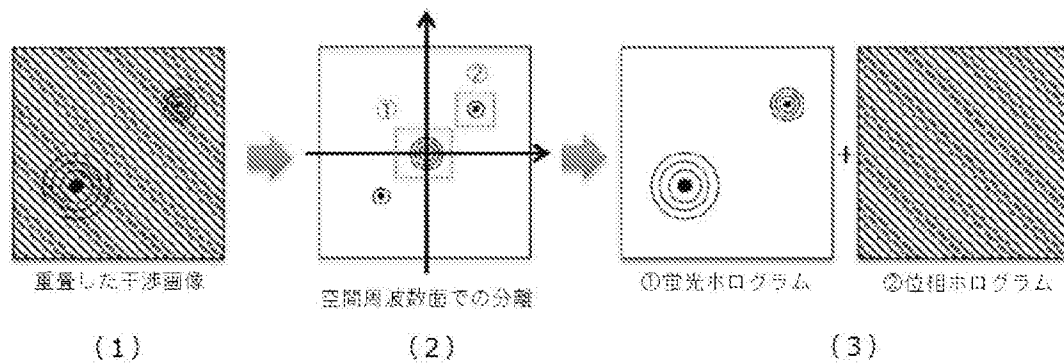
蛍光 3 次元像により細胞核の時空間情報と、位相 3 次元像により細胞核および細胞壁の時空間構造とを同時に取得する細胞観察方法。

[請求項11] 請求項 7 に記載のデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、
一の励起用レーザ光源を用いて取得した蛍光 3 次元像と、他の励起用レーザ光源を用いて取得した蛍光 3 次元像と、同時に取得した位相 3 次元像とから、細胞の挙動を観察する細胞観察方法。

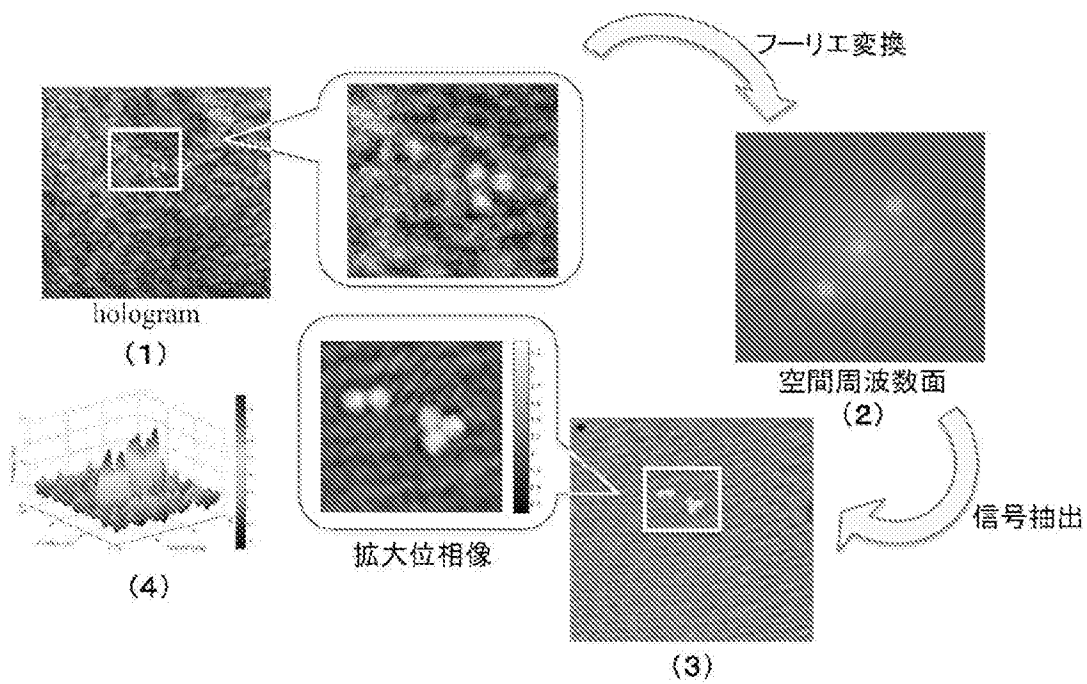
[図3]



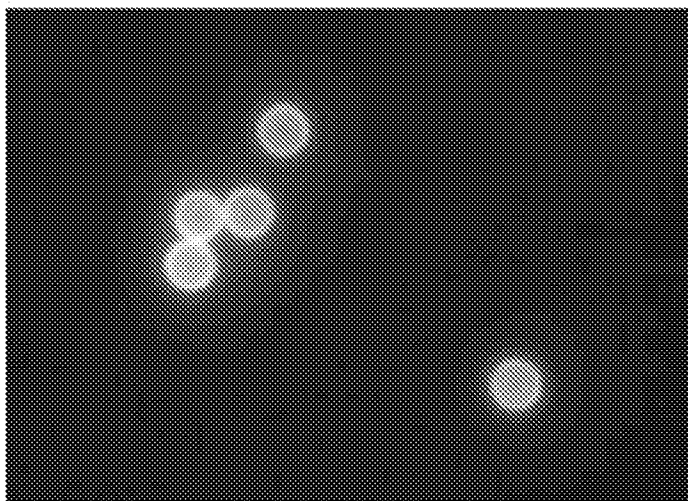
[図4]



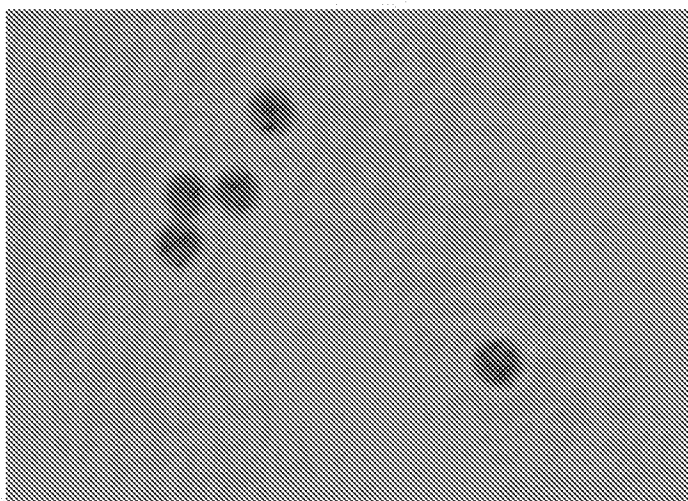
[図5]



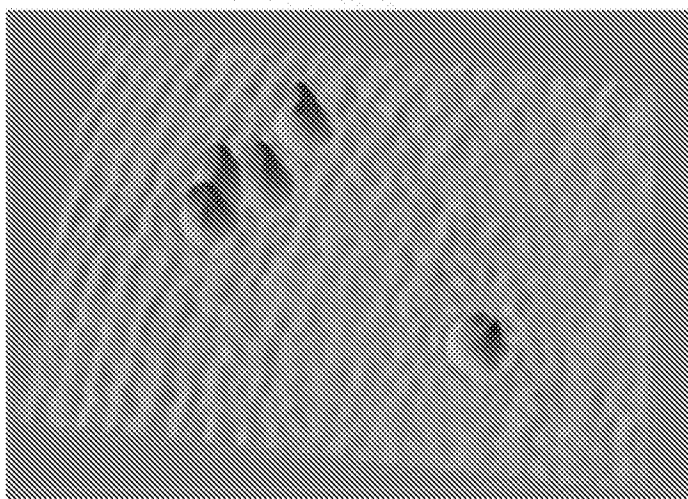
[図6]



(1) 蛍光像

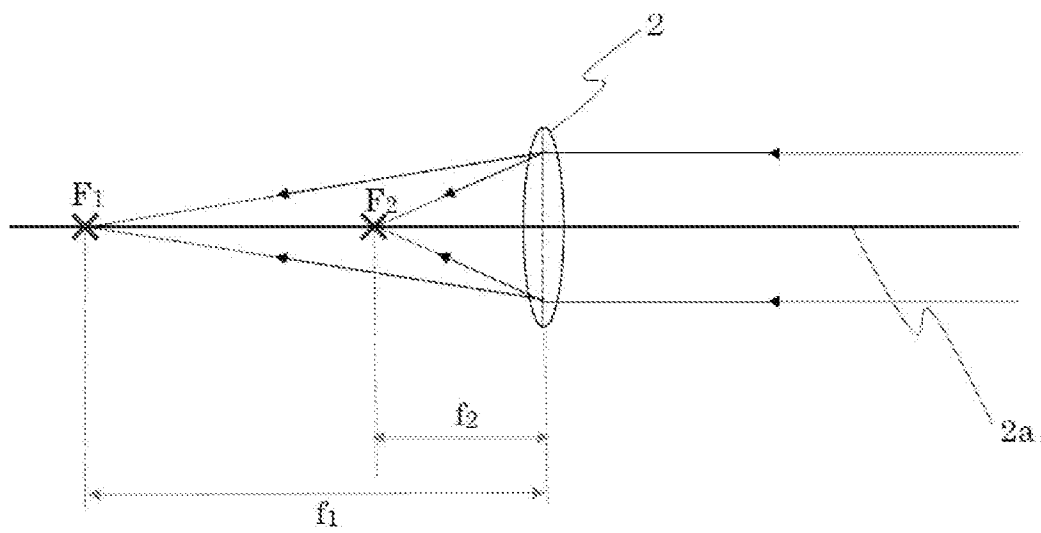


(2) 位相像

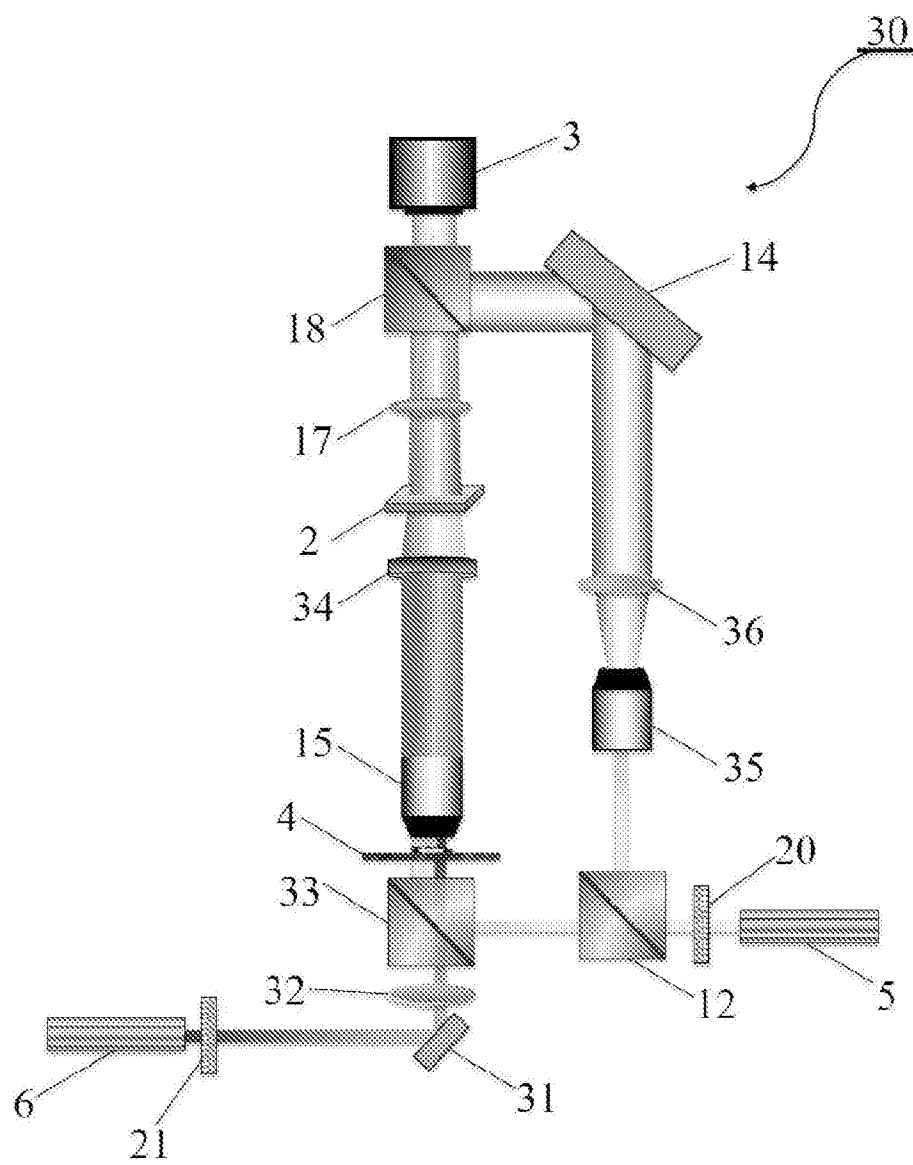


(3) 位相3Dプロット

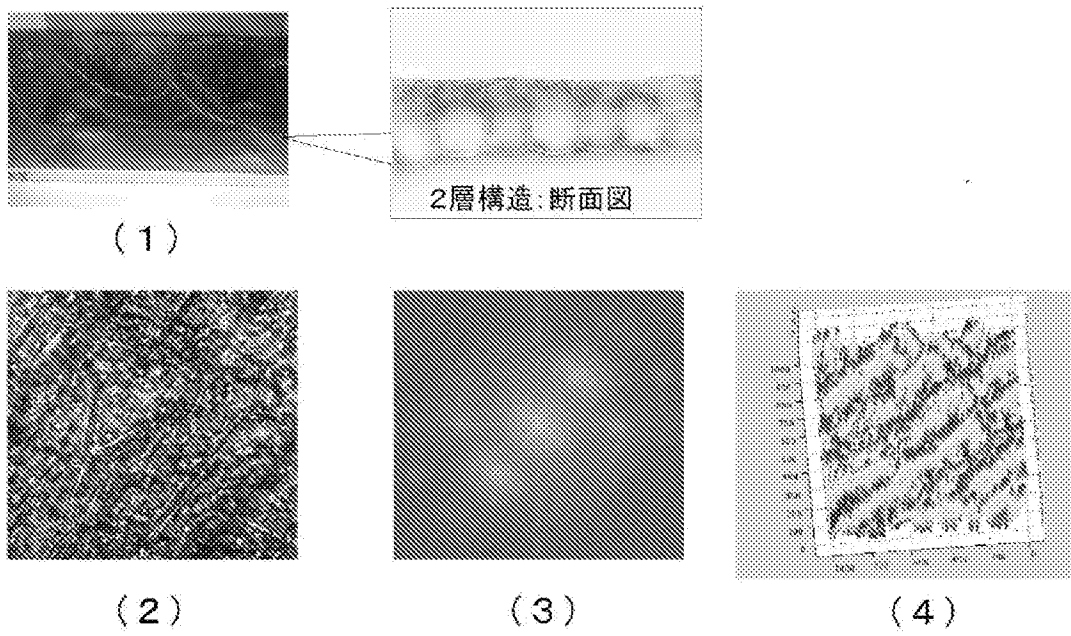
[図7]



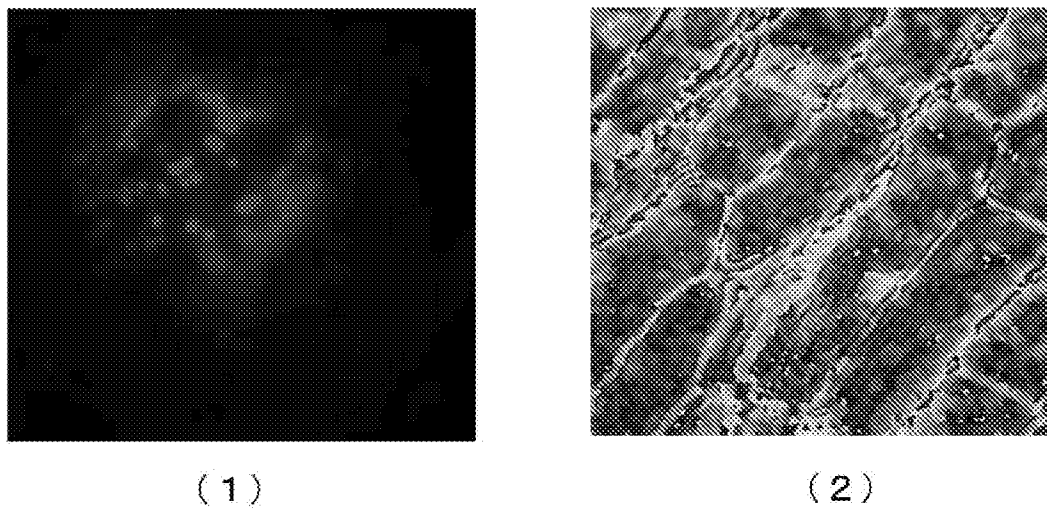
[図8]



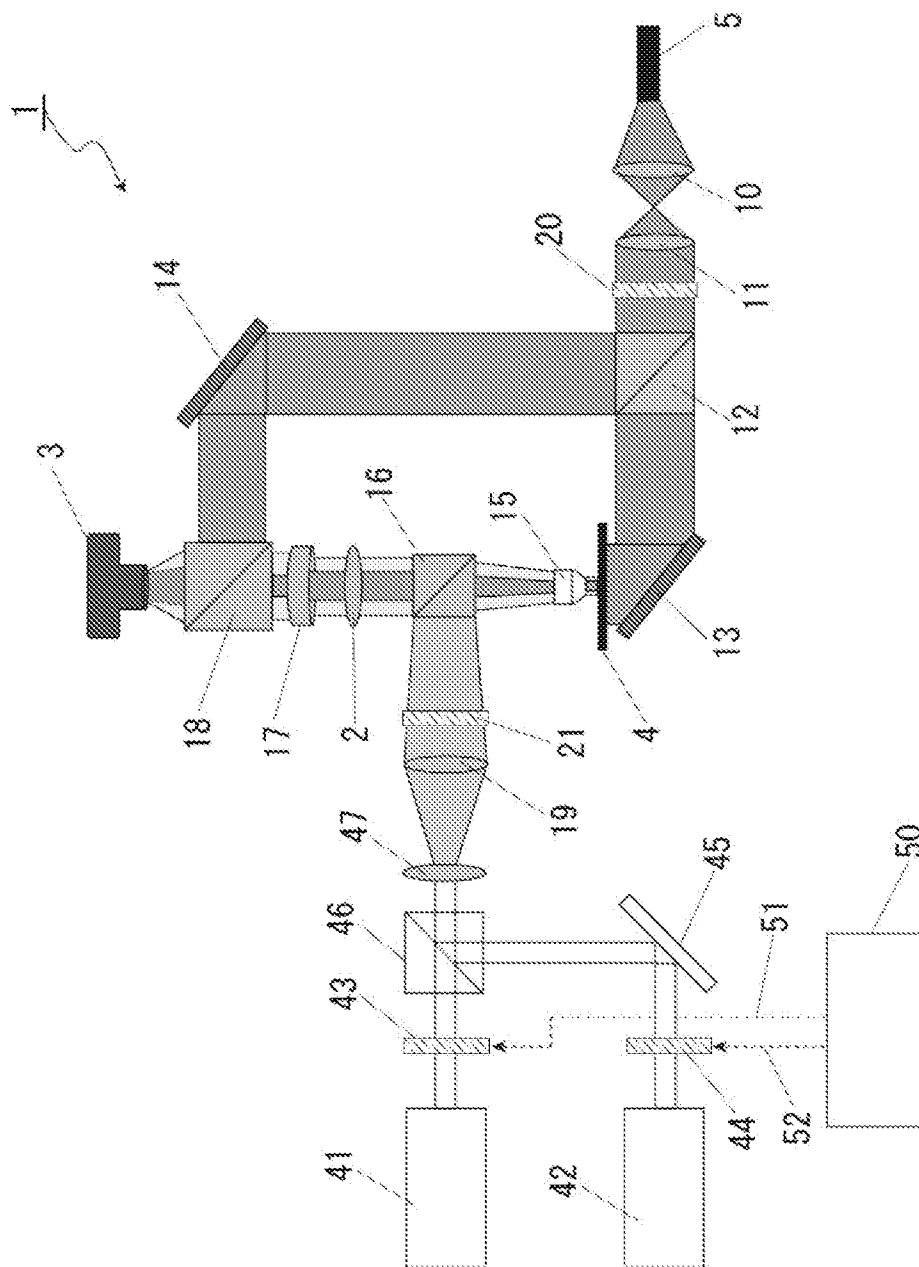
[図9]



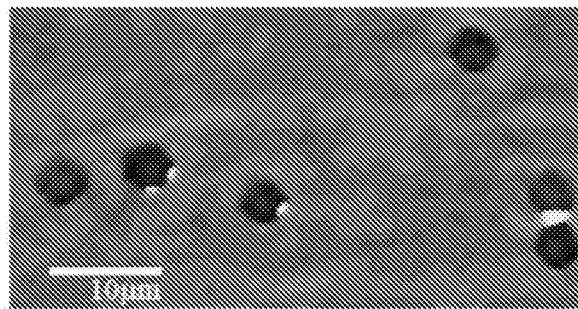
[図10]



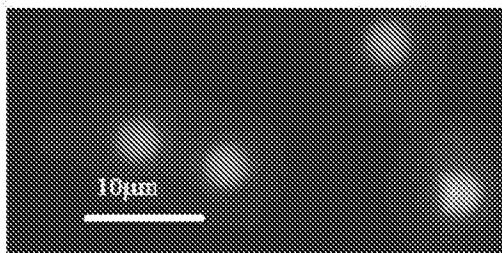
[図11]



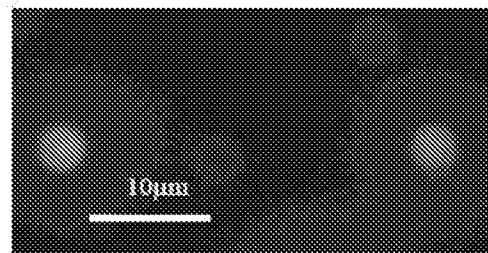
[図12]



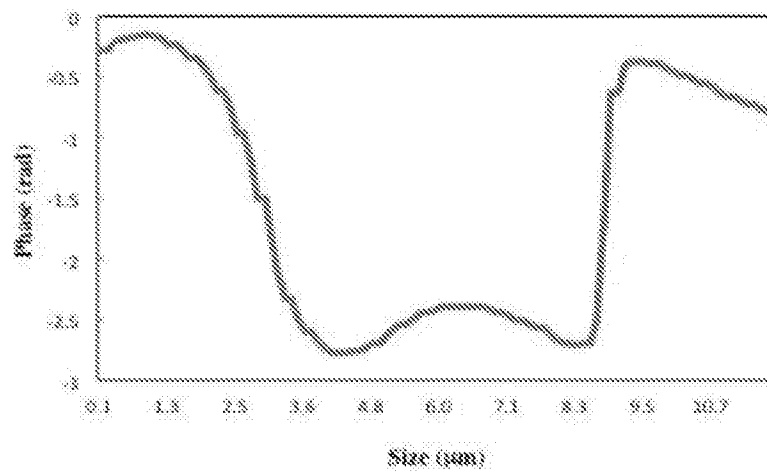
(1)位相像



(2)第1蛍光像



(3)第2蛍光像



(4)位相プロファイル

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G03H1/00(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G02B21/00(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)

G03H1/00, G01N21/64, G02B21/00

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kogyoku ZEN, Koichi NITTA, Osamu MATOBA, Yasuhiro AWATSUJI, "Keiko to Iso Imaging ga Kano na Hybrid Digital Holographic Kenbikyo no Shisaku", Optics & Photonics Japan 2014, no.6, Koeki Shadan Hojin Oyo Butsuri Gakkai Bunkakai Nippon Kogakkai, 05 November 2014 (05.11.2014), P15	1-11

☒ 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
05 July 2016 (05.07.16)

Date of mailing of the international search report
12 July 2016 (12.07.16)

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/JP2016/061704

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 2004-538451 A (Universite Libre de Bruxelles), 24 December 2004 (24.12.2004), paragraphs [0041] to [0084]; fig. 1 & US 2004/0156098 A1 paragraphs [0041] to [0107]; fig. 5 & US 2006/0132799 A1 & WO 2003/002972 A2 & EP 1321760 A1 & EP 1399730 B1 & EP 2420822 A2 & CA 2451166 A1 & AU 2002344849 A1 & CA 2724743 A1	1-11
A	JP 2015-1726 A (Kansai University), 05 January 2015 (05.01.2015), claims; each carrying-out mode (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. G03H1/00(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G02B21/00(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. G03H1/00, G01N21/64, G02B21/00

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
A	全香玉, 仁田功一, 的場修, 栗辻安浩, 蛍光と位相イメージングが可能なハイブリッドデジタルホログラフィック顕微鏡の試作, Optics & Photonics Japan 2014, No. 6, 公益社団法人応用物理学会分科会 日本光学会, 2014. 11. 05, P15	1-11

☒ 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

05. 07. 2016

国際調査報告の発送日

12. 07. 2016

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）

堀井 康司

20

3713

電話番号 03-3581-1101 内線 3271

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 2004-538451 A (ユニベルスイテ リーブル ドゥ ブリュッセル) 2004.12.24, [0041]-[0084], 図 1 & US 2004/0156098 A1, [0041]-[0107], FIG. 5 & US 2006/0132799 A1 & WO 2003/002972 A2 & EP 1321760 A1 & EP 1399730 B1 & EP 2420822 A2 & CA 2451166 A1 & AU 2002344849 A1 & CA 2724743 A1	1-11
A	JP 2015-1726 A (学校法人 関西大学) 2015.01.05, 特許請求の範囲, 各実施形態 (ファミリーなし)	1-11