

(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
2020年7月30日(30.07.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/153463 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/02 (2006.01) **G02B 21/33** (2006.01)
G02B 21/24 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/002433
- (22) 国際出願日: 2020年1月24日(24.01.2020)
- (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 2019-010452 2019年1月24日(24.01.2019) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所
(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広
沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 宮脇 敦史 (MIYAWAKI, Atsushi);
〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立
研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
星田 哲志 (HOSHIDA, Tetsushi); 〒3510198 埼
玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法
人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 H A R A K E N Z
O W O R L D P A T E N T & T
R A D E M A R K (HARAKENZO WORLD
PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府
大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大
和南森町ビル Osaka (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,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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:
一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: MICROSCOPE IMMERSION LIQUID AND METHOD FOR OBSERVING SAMPLE BY EMPLOYING IMMERSION LIQUID

(54) 発明の名称: 顕微鏡の液浸液体、及び該液浸液体を用いた試料の観察方法

(57) Abstract: Provided are: an immersion liquid capable of reducing chromatic aberration in microscopy; and a utilization or the like thereof. The present invention provides a microscope immersion liquid having an Abbe number in the range of 50-60.

(57) 要約: 顕微鏡観察において色収差を低減することができる浸液、及びその利用等を提供する。
本発明である顕微鏡の液浸液体は、アッペ数が50以上60以下の範囲内である。



WO 2020/153463 A1

明 細 書

発明の名称：

顕微鏡の液浸液体、及び該液浸液体を用いた試料の観察方法

技術分野

[0001] 本発明は、顕微鏡の液浸液体、及び該液浸液体を用いた試料の観察方法に関する。

背景技術

[0002] 顕微鏡を用いた高解像度観察において、試料と対物レンズとの間を液体（浸液）で満たす手法がよく用いられている。浸液の例が非特許文献1及び2に開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Staudt, T. et al., Microsc Res Tech. 2007 Jan;70(1):1-9
非特許文献2：Ke, M.T. et al., Cell Rep. 2016 Mar 22; 14(11):2718-32.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 浸液は、試料と対物レンズとの間に存在する屈折率差（主に、試料上のカバーガラスと空気との界面における屈折率差）を調整して当該界面での全反射を抑制し、試料からの光をより多く対物レンズに導く目的で用いられている。

したがって、一般に使用されている浸液の屈折率は、顕微鏡観察で使用されるカバーガラス（硼珪酸ガラスから主に構成されている）の屈折率に合わせるために、 N_D が1.515前後に設定されている。

しかしながら、これらの浸液や対物レンズを含む光学系では、試料深部での顕微鏡観察において色収差をもたらし得る。特に近年、顕微鏡観察に関連する様々な手法が生み出されていることから、顕微鏡観察において色収差の発生が重大な問題となり得る局面が増大する傾向にあると考えられる。例え

ば、色収差の発生は、試料深部における高解像度観察を困難にし得る。

本発明の一態様は、顕微鏡観察において色収差を低減することができる浸液を実現することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 上記の課題を解決するために、本発明は、以下に示す態様を含む。

<1>アッペ数が50以上60以下の範囲内である、顕微鏡の液浸液体。

<2><1>に記載の液浸液体を、透光性の試料配置部材における、試料配置側の面に背向する面と、液浸対物レンズとの間に、配置して、試料を観察する工程を含む、試料の観察方法。

発明の効果

[0006] 本発明の一態様によれば、顕微鏡観察において色収差を低減することができる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]本実施形態の試料の観察方法を示す模式図である。

[図2] (201) 本実施形態の液浸液体中のTDEとPEG600の混合比による、屈折率の変化を示すグラフである。(202) 本実施形態の液浸液体の屈折率とアッペ数の関係を示すグラフである。

[図3]水分の添加による、本実施形態の液浸液体の屈折率とアッペ数の変化を示すグラフである。

[図4]湿度別による、本実施形態の液浸液体の屈折率の変化を示すグラフである。

[図5]温度40℃／湿度35％における、対物レンズ上に配置した本実施形態の液浸液体の屈折率の変化を示すグラフである。

[図6]本実施形態の液浸液体を用いたマウス脳切片のイメージングの結果を示す図である。

[図7]本実施形態の液浸液体を用いたマウス脳切片のイメージングの結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0008] [1. 顕微鏡の液浸液体]

本発明の一実施形態に係る顕微鏡の液浸液体（以下、「液浸液体」と称する場合もある）は、アッペ数が50以上60以下の範囲内である。アッペ数が上記範囲内であると、液浸液体が色収差の発生に与える影響を低減できる。また、観察対象となる試料（特に生物材料）および当該試料の周囲の溶液（液体媒体）のアッペ数が比較的高い場合でも、合わせ込みが容易である。また、アッペ数が上記範囲内であると、観察対象となる試料内における深さ方向の焦点位置が変化しても、全体の光路長は変化しないため、深さ方向に変化する色収差はなくなる。それによって、色収差をなくすように対物レンズを設計することが可能になる。

アッペ数の下限は、例えば、51以上、又は52以上であることが好ましい場合があり、53以上がより好ましい場合がある。アッペ数の上限は、例えば、59以下、又は58以下であることが好ましい場合があり、57以下、又は56以下がより好ましい場合がある。

[0009] (アッペ数)

アッペ数 (ν_D) は、以下の式により求めることができる。

$$\nu_D = (N_D - 1) / (N_F - N_C)$$

式中、 N_C 、 N_D 及び N_F はそれぞれ、フラウンホーファーのC線（波長656 nm）、D線（波長589 nm）及びF線（波長486 nm）に対する屈折率である。

アッペ数は、例えば、公知のアッペ屈折計を用いて測定することができる。

[0010] (屈折率)

本明細書において、屈折率は N_C 、 N_D 及び N_F のいずれかをいう。液浸液体の屈折率は、一般的なカバーガラスの屈折率との差を小さくして、様々な形態の試料の観察が可能になる等の点で、1.32以上1.52以下が好ましく、1.35以上1.51以下がより好ましい。液浸液体の屈折率の下限は

、1.45以上、又は1.46以上であることが好ましい場合があり、1.47以上、1.48以上、又は1.49以上であることがより好ましい場合がある。

[0011] (アッベ数と屈折率との組合せ)

本発明の一実施形態に係る液浸液体は、アッベ数が50以上60以下の範囲内であって、かつ屈折率が1.32以上1.52以下の範囲内であることが好ましい場合がある。この液浸液体では、アッベ数の下限は、例えば、51以上、又は52以上であることが好ましい場合があり、53以上がより好ましい場合がある。アッベ数の上限は、例えば、59以下、又は58以下であることが好ましい場合があり、57以下、又は56以下がより好ましい場合がある。この液浸液体では、屈折率は、1.35以上1.51以下がより好ましい。液浸液体の屈折率の下限は、1.45以上、又は1.46以上であることが好ましい場合があり、1.47以上、1.48以上、又は1.49以上であることがより好ましい場合がある。

[0012] (従来の浸液との比較)

例えば、非特許文献1及び2に記載の浸液について、屈折率が高いが、アッベ数(ν_D)が透光性の試料配置部材の1つであるカバーガラスのアッベ数(55前後)よりも低い。非特許文献1に記載の浸液のアッベ数は約47であり、非特許文献2に記載の浸液のアッベ数は33.2(SeeDB2S(非特許文献2))又は36.5(SeeDB2G(非特許文献2))である。その結果、顕微鏡観察時に色収差が生じる。特に、観察点のカバーガラス表面から離れる程、色収差が大きくなる。よって、例えば、試料深部におけるタンパク質の共局在に関する多色イメージング等の高解像度観察が困難である。

本実施形態の液浸液体は、特定の範囲のアッベ数を有することにより、液浸液体を原因とした色収差の発生は抑制される。したがって、本実施形態の液浸液体は、従来の液浸液体と比較して、高解像度観察、特にこれまで困難であった、試料深部の観察を可能にし得る。

[0013] また、本実施形態の液浸液体は、実施例に示すとおり、乾燥や吸湿により、当該液浸液体の屈折率は影響を受ける。ただし、実施例に示すとおり、例えば室温付近での観察において、一定時間乾燥条件下又は高湿度条件下にさらしても、当該液浸液体のアッペ数は変化しない。すなわち、当該液浸液体は光分散性に関しては耐湿性及び耐乾燥性を有するといえる。したがって、当該液浸液体を使用することにより、色収差が低減し、長時間の顕微鏡観察が可能である。

[0014] 本実施形態の液浸液体は、対物レンズ（先玉レンズ）上で接触角を大きくできる点から、親水性であることが好ましい。すなわち、液浸液体が親水性であることによって、WD（working distance）が大きな場合でも、先玉上の液浸液体をこぼさずに保持することが容易で、かつ、先玉から液浸液体を除去することも容易（水はけが良い）となる。このことは、試料の深部観察及び多点観察に有利であり、また対物レンズの切替えや対物レンズを清浄に保つ上でも有利である。また、液浸液体の乾燥防止の点で、本実施の液浸液体は、蒸気圧が低い（一例では水よりも蒸気圧が低い）ことがより好ましい。

[0015] （親水性の液体）

本実施形態の液浸液体は、2種以上の親水性の液体を含んでいてもよい。典型的には、2種以上の親水性の液体は互いに混ざり合って均一な液体（溶液）となる。本明細書において、「親水性の液体」とは、水に可溶であって、室温近傍において液体の形態をとる化合物をいう。2種以上の親水性の液体を含むことによって、液浸液体の諸物性が所望の範囲内となるように調製することが容易となる。

[0016] 2種以上の親水性の液体の少なくとも一種は、アッペ数（ ν_D ）が低い液体であることが好ましく、アッペ数が50以下の液体であることがより好ましく、アッペ数が48以下の液体であることがさらに好ましい。当該液体は、屈折率の観点では、1.44以上、1.45以上、1.46以上、1.47以上、1.48以上、1.49以上、1.50以上、1.51以上、又は1

、515以上であることが好ましい場合がある。アッベ数が低い液体の例として、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ホルムアミド、及びチオジエタノール（TDE）等が挙げられる。これらの液体は1種又は複数種を用いることができる。具体的に例示したこれらの液体は何れも、水と比較して十分に小さい蒸気圧を有する。

[0017] また、本実施形態の液浸液体において、2種以上の親水性の液体の少なくとも一種は、アッベ数（ ν_D ）が高い液体であることが好ましく、アッベ数が50超の液体であることがより好ましく、アッベ数が55以上、56以上、57以上、58以上、59以上、又は60を超える液体であることがさらに好ましい。アッベ数が高い液体の例として、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール（PEG）、及びポリプロピレングリコール（PPG）等のグリコール類；グリセロール；ブタンジオール（ブチレングリコール）；ブタントリオール；等が挙げられる。これらの液体は1種又は複数種を用いることができる。具体的に例示したこれらの液体は何れも、水と比較して十分に小さい蒸気圧を有する。液浸液体の乾燥抑制や吸湿によるアッベ数の変動の抑制等の点で、アッベ数が高い液体として、グリコール類が好ましく、ポリエチレングリコールがより好ましく、分子量が200～1000のポリエチレングリコールがさらに好ましい。

[0018] また、2種以上の親水性の液体の少なくとも一種はアッベ数が高い液体であり、別の一種はアッベ数が低い液体であることがより好ましい。

本実施形態の液浸液体が、アッベ数が高い液体とアッベ数が低い液体とを混ぜた溶液である場合、アッベ数が高い液体とアッベ数が低い液体の割合（アッベ数が高い液体の重量：アッベ数が低い液体の重量）は、20～80：80～20が好ましく、30～70：70～30がより好ましく、40～60：60～40がさらに好ましい。

液浸液体における、2種以上の親水性の液体の合計量（重量%）は、85重量%以上、90重量%以上、95重量%以上、96重量%以上、97重量%以上、98重量%以上、99重量%以上、100重量%が好ましい場合が

ある。

[0019] 上記で列挙した親水性の液体の屈折率 (N_D 、 N_F 、および N_C) 及びアッペ数 (ν_D) を、以下の表 1 に示す。表 1 中の温度 ($^{\circ}\text{C}$) は、屈折率およびアッペ数を測定したときの温度である。上記で列挙した親水性の液体同士は互いによく混じり合い溶液を形成する。

[0020] [表1]

	N_D	N_F	N_C	ν_D	温度
TDE	1.5181	1.5260	1.5150	47.1	25.0
DMSO	1.4759	1.4832	1.4726	44.9	25.2
ホルムアミド	1.4406	1.4482	1.4373	40.4	25.1
グリセロール	1.4701	1.4755	1.4679	61.9	25.0
PEG600	1.4670	1.4722	1.4646	61.4	25.2
PEG400	1.4633	1.4687	1.4611	61.0	25.2
PEG200	1.4559	1.4613	1.4537	60.0	25.0
エチレングリコール	1.4184	1.4229	1.4160	60.6	25.1
PPG4000 (トリオール)	1.4504	1.4556	1.4481	60.1	25.0
PPG1200	1.4481	1.4533	1.4459	60.6	25.0
PPG400	1.4447	1.4498	1.4424	60.1	25.0
プロピレングリコール	1.4305	1.4357	1.4286	60.6	25.1
ブチレングリコール	1.4379	1.4431	1.4360	61.7	25.1
ブタントリオール	1.4675	1.4732	1.4655	60.7	25.1

[0021] 表 2 は、観察対象となる生物試料に使用される溶液（試料溶液）の屈折率 (N_D 、 N_F 、および N_C) 及びアッペ数 (ν_D) を示す。表 2 中の温度 ($^{\circ}\text{C}$) は、屈折率およびアッペ数を測定したときの温度である。Scale A2 (Hama, H. et al., Nat. Neurosci., 14:1481-1488 (2011))、Scale S4 D25 (O) (Hama, H. et al., Nat. Neurosci., 18:1518-1529 (2015))、Scale CUBIC-2 (Reagent-2) (Susaki, E.A. et al., Cell, 157:726-739 (2014))、および SCALEVIEW-SMt (富士フィルム和光純薬株式会社製) はいずれも透明化の最終段階で使用され、マウンティング溶液として作用する。

[0022]

[表2]

	N_D	N_F	N_C	ν_D	温度
PBS (-)	1.3343	1.3382	1.3323	56.7	25.1
HBSS (Ca ⁺ /Mg ⁺)	1.3343	1.3382	1.3323	56.7	25.0
HBSS (Ca ⁺ /Mg ⁺) + HEPES:10mM	1.3347	1.3386	1.3327	56.7	25.0
ACSF	1.3346	1.3385	1.3326	56.7	25.0
DMEM	1.3347	1.3386	1.3327	56.7	25.0
DMEM + FBS:1.0%	1.3355	1.3394	1.3337	58.9	25.0
ScaleA2	1.3879	1.3930	1.3857	53.1	24.9
ScaleS4D25(0)	1.4601	1.4662	1.4574	52.3	24.9
SCALEVIEW-SMt	1.4915	1.4977	1.4887	54.6	24.9
ScaleCUBIC-2 (Reagent-2)	1.4886	1.4948	1.4858	54.3	25.0

[0023] 本実施形態の液浸液体は、液浸液体の乾燥防止、及び、液浸液体のアップベ数と屈折率とのバランス等の点から、グリセロールを含むことが好ましい場合がある。また、本実施形態の液浸液体は、グリセロール以外のアップベ数が高い液体と、アップベ数が低い液体と、グリセロールと、を含むことがより好ましい。液体の均一性、相溶性の保持、又は取扱い性等の点で、液浸液体に対して、グリセロールの量は50重量%以下が好ましい場合があり、40重量%以上がより好ましい場合があり、30重量%以下または20重量%以下がさらに好ましい場合がある。グリセロールの量は一例では、10重量%以上50重量%以下の範囲内であり、他の一例では、0.5重量%以上で10重量%以下の範囲内であり、さらに他の一例では、0.5重量%以上で5重量%以下の範囲内である。

[0024] また、本実施形態の液浸液体が水を含む場合、液浸液体の揮発防止の点で、水の含有量は50重量%以下であることが好ましく、5重量%以下、4重量%以下又は3重量%以下であることがより好ましい場合がある。水の含有量が上記の範囲内にあれば、乾燥によって水が揮発した場合でも液浸液体に及ぼす影響（例えば、液浸液体の体積及び屈折率の変動、並びに、水に溶けきれなくなった成分の析出など）が低減される。液浸液体に水を添加しない

ことが特に好ましい場合がある。

一方で、本実施形態の液浸液体を湿潤な環境下で用いる場合には、少量の水（例えば、5重量%以下の水）を含んでいることによって、環境からの吸湿を防止することができる場合もある。

液浸液体から水が揮発すること、及び、液浸液体が環境から吸湿することは、液浸液体の屈折率には影響を及ぼし得るが、そのアッペ数に及ぼす影響は相対的に非常に小さい（実施例も参照のこと）。

なお、水はアッペ数が50超の、アッペ数が高い液体である。

[0025] （その他の成分）

本実施形態の液浸液体は、必要に応じて、界面活性剤、ナノ粒子、または金属酸化物等を含むことができる。

[0026] （液浸液体の調製）

本実施形態の液浸液体の調製方法は、例えば、2種以上の親水性の液体を混合することによって調製することができる。混合する手順や手段は特に限定されない。

[0027] 本実施形態の液浸液体（液浸液体1）は、例えば、図1に示すように、透光性の試料配置部材3における、試料配置側の面（試料配置側面3a）に背向する面（背向面3b）と、液浸対物レンズ2との間に配して、試料（図示せず）を観察してもよい。

図1において、液浸対物レンズ2はレンズが上向きになるように配置されている。液浸対物レンズ2のレンズ上に液浸液体1が配置されている。液浸液体1の上に試料配置部材3の試料配置側面3aが配置されている。

これによって、液浸対物レンズ2と試料配置部材3とが液浸液体1を介して接触をする。試料の詳細は、後述の〔2. 試料の観察方法〕の欄において説明する。

[0028] 透光性の試料配置部材3はガラス製（硼珪酸ガラスから主に構成されている）であることが好ましい。試料配置部材3の例として、例えば、カバーガラス、ガラスプレート及びガラスシャーレ等が挙げられる。

[0029] 試料配置側面 3 a は、試料が直接接していてもよいし、試料を含む媒体 4（試料溶液 4）が直接接していてもよい（すなわち、試料は、媒体 4 を介して間接的に、試料配置側面 3 a に接していてもよい）。媒体 4 の一例は、液体媒体である。

[0030] なお、アクロマート、アポクロマート、及びスーパーアポクロマート等と称される、色収差の発生を抑制した対物レンズが市販されてはいる。ただし、これらのレンズは WD が短いことが多く、使用できる試料が限定される。また、液浸液体に起因する色収差のために、これら対物レンズの性能が充分に発揮できない場合もある。一般に、液浸液体はその屈折率の調整が最優先課題であるところ、本実施形態に記載のように色収差の発生を抑制するという着想に基づけば、使用できる試料や対物レンズに関しても自由度が増す。

[0031] [2. 試料の観察方法]

本実施形態の一実施形態に係る試料の観察方法（以下、「観察方法」と称する場合もある）は、本実施形態の液浸液体を、透光性の試料配置部材における、試料配置側の面に背向する面と、液浸対物レンズとの間に、配置して、試料を観察する工程を含む（図 1 も参照のこと）。

[0032] （試料）

試料の例として、生物材料等が挙げられる。生物材料の種類は特に限定されないが、植物由来の材料又は動物由来の材料が好ましく、魚類、両生類、爬虫類、鳥類又は哺乳類（哺乳動物）等の動物由来の材料がより好ましく、哺乳動物由来の材料が特に好ましい。また、哺乳動物の種類は特に限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、マーモセット等のヒトを除く霊長類、等の実験動物；イヌ、ネコ、フェレット等の愛玩動物（ペット）；ブタ、ウシ、ウマ等の家畜；ヒト；が挙げられる。

[0033] また、生物材料は、個体そのものであってもよく（生きているヒト個体そのものは除く）、植物若しくは動物の個体から取得した器官、組織、又は細胞であってもよい。また、細胞は培養細胞であってもよい。

[0034] 本実施形態の観察方法では、例えば高解像顕微鏡又は超解像顕微鏡を用い

ると50～200 μm 程度の深度まで超解像イメージングが可能である。この深度は対物レンズの作動距離（WD）によって制約されるため、対物レンズのWDを調整することによってさらに深部での観察も可能になる。

[0035] また、上記の生物材料は、顕微鏡観察用にパラホルムアルデヒド等で固定化（fixed）処理された材料であってもよく、固定化されていない材料であってもよい。固定化処理は、例えば、従来公知の方法で行うことができる。

[0036] 生物材料の厚みは特に限定されないが、例えば、1 μm ～10 mmとすることができ、100 μm ～2 mmであることが好ましい。本実施形態の観察方法によって、色収差の発生を抑制しながらより深部のイメージングが可能となるため、0.1 mm以上の厚みであっても本発明を適用し得る。

[0037] 上記生物材料は、具体的には例えば、蛍光性化学物質を注入した生体組織、蛍光性化学物質で染色を行った生体組織、蛍光タンパク質を発現した細胞を移植した生体組織、又は蛍光タンパク質を発現した遺伝子改変動物の生体組織等であってもよい。

[0038] 本実施形態の観察方法によって、特に、透明化処理された試料の観察を好適に行うことができる。透明化処理とは、例えば、SCALEVIEW（登録商標）による処理等をいう。

[0039] 本実施形態の観察方法は、あらゆる種類の光学顕微鏡を用いて行うことができる。例えば、3次元超分解顕微鏡技術（例えば、STED、3D PALM、FPALM、3D STORM、及びSIM）を適用して、本実施形態の観察方法を行うこともできる。また、多光子励起型（一般的には2光子励起型）の光学顕微鏡技術を適用して、本実施形態の観察方法を行うこともできる。一光子励起型の光学顕微鏡技術でも十分な観察が可能である。

[0040] また、本実施形態の観察方法により、上記顕微鏡を用いた多色イメージングや3次元イメージング、特に試料の透明化技術を組み合わせた3次元多色イメージング等において色収差の発生を抑制することができる。また、本実施形態の観察方法は、これまで困難であった、試料深部の多色イメージングや3次元イメージング、特に試料の透明化技術を組み合わせた試料深部の3

次元多色イメージングに有効である。また、本実施形態の観察方法によって、培地中の培養細胞塊等をそのまま観察することができる。

[0041] 図1では、液浸対物レンズ2が上方を向いている、いわゆる倒立型の顕微鏡の例を図示しているが、図1に示す配置関係を上下逆転した顕微鏡（例えば、ハンギングドロップに保持された試料を上方から観察する顕微鏡）にも、本発明を適用可能である。ただし、本発明は、倒立型の顕微鏡に適用することがより好ましい。

[0042] 倒立型の顕微鏡での透明化処理された試料の観察に液浸液体を使用するときに、液浸液体と透明化試薬のアッペ数を合わせることが好ましい。これにより、深さに応じて生じ得る色収差の変化を低減することができる。特に、多色イメージングや厚みのある試料の測定時に有用である。本実施形態の液浸液体を使用する場合、アッペ数が50以上60以下の範囲内である透明化試薬を使用することが好ましい。

[0043] [3. その他]

本実施形態の液浸液体のアッペ数及び屈折率等に対応させて、液浸対物レンズを設計することができる。透明化処理された試料の観察に液浸液体を使用するときに、液浸液体および透明化試薬の屈折率とアッペ数に対応する対物レンズを使用することによって色収差を低減することができる。

[0044] (まとめ)

以上をまとめると、上記の課題を解決するために、本発明は、以下の特徴を含む。

<1>アッペ数が50以上60以下の範囲内である、顕微鏡の液浸液体。

<2>屈折率が1.35以上1.52以下の範囲内である、<1>に記載の液浸液体。

<3>親水性である、<1>又は<2>に記載の液浸液体。

<4>2種以上の親水性の液体を含む、<1>～<3>の何れかに記載の液浸液体。

<5>前記2種以上の親水性の液体の少なくとも1種が、ジメチルスルホキ

シド、ホルムアミド、及びチオジエタノールからなる群より選ばれる少なくとも1つの液体である、＜4＞に記載の液浸液体。

＜6＞前記2種以上の親水性の液体の少なくとも1種が、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ブタンジオール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、及びブタントリオールからなる群より選ばれる少なくとも1つの液体である、＜4＞又は＜5＞に記載の液浸液体。

＜7＞50重量%以下のグリセロールを含む、＜1＞～＜6＞の何れかに記載の液浸液体。

＜8＞50重量%以下の水を含む、＜1＞～＜7＞の何れかに記載の液浸液体。

＜9＞透光性の試料配置部材における、試料配置側の面に背向する面と、液浸対物レンズとの間に配される、＜1＞～＜8＞の何れかに記載の液浸液体。

＜10＞＜1＞～＜8＞の何れかに記載の液浸液体を、透光性の試料配置部材における、試料配置側の面に背向する面と、液浸対物レンズとの間に、配置して、試料を観察する工程を含む、試料の観察方法。

＜11＞前記試料が、動物若しくは植物由来の細胞、組織若しくは器官、又はヒトを除く動物若しくは植物である、＜10＞に記載の観察方法。

[0045] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明の以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

実施例

[0046] ＜実施例1：液浸液体1～5の調製＞

2, 2' -チオジエタノール（以下、TDEと略記する）と、表3に示す液体を混合させ、液浸液体1～5を調製した。調製した液浸液体1～5の屈折率とアッペ数の測定結果を表3に示す。屈折率及びアッペ数は25℃で測定して得られた値である。

[0047] [表3]

	液浸液体の組成 (重量比)			N _D	ν _D
液浸液体1	TDE	DMSO		1.4905	45.0
	30	70			
液浸液体2	TDE	PEG200		1.4907	53.9
	55	45			
液浸液体3	TDE	PEG400		1.4890	53.7
	50	50			
液浸液体4	TDE	PEG600		1.4922	52.4
	50	50			
液浸液体5	TDE	PEG400	グリセロール	1.4921	53.5
	50	40	10		

[0048] <実施例2：TDEとPEG600との混合比による屈折率とアッペ数の変化>

TDEとPEG600との混合比を変化させて、調製した液浸液体の屈折率とアッペ数を25℃で測定した。測定結果を図2に示す。

図2の201は屈折率の測定結果を示す。縦軸は屈折率、横軸は液浸液体の全体を10としたときのPEG600の割合（重量比）を示す。

図2の202は、縦軸をアッペ数（ ν_D ）、横軸を屈折率（ N_D ）としてプロットしたグラフである。

[0049] <実施例3：液浸液体6～8の調製>

TDEとPEG600を以下の表3に示す割合（重量比）で混合させ、液浸液体6～8を調製した。液浸液体6及び7には、調製時に表3に示す量の水を添加した。調製した液浸液体6～8の屈折率とアッペ数の測定結果を図3及び表4に示す。屈折率及びアッペ数は25℃で測定して得られた値である。アッペ数の測定は実施例1と同様に行った。

[0050] [表4]

	TDEとPEG600 の混合比 (TDE:PEG600)	水の添加量	N_D	ν_D
液浸液体6	60:40	3.5%(w/w)	1.4917	51.8
液浸液体7	55:45	2.0%(w/w)	1.4920	51.8
液浸液体8	50:50	—	1.4921	52.9

[0051] 図3に示すように、水の添加によって、液浸液体のアッペ数がほとんど変化しないことが分かった。また、この結果から、湿度の変化によって、液浸液体のアッペ数は影響を受けないことが示唆された。

[0052] <検討例1：環境試験>

液浸液体6～8と、透明化試薬である富士フィルム和光純薬株式会社製のSCALEVIEW-SMt（#191-18571、Lot. PTM0509）について、環境試験を行い、環境変化に伴う屈折率及びアッペ数の変化の有無を観察した。SCALEVIEW-SMtの20℃における N_D は1.4939（メーカー公称値）、25℃における ν_D は52～54（実測値）であった。

[0053] まず、各液体を入れたチューブの蓋を開けた状態で、湿度20%、湿度35%、又は湿度50%の環境下に1日放置した。温度はいずれの湿度環境下において25℃に設定した。また、コントロールとして、外気に触れないようチューブの蓋を閉じ密閉した環境下でも行った。1日経過後、屈折率を測定した。環境試験前後の屈折率の測定結果を図4に示す。

[0054] 図4中、「P6（6：4）W3.5」は液浸液体6、「P6（5.5：4.5）W2」は液浸液体7、「P6（5：5）W0」は液浸液体8、「SMt」はSCALEVIEW-SMtの結果を示す。また、図4の402中の縦軸は、環境試験前の屈折率（ N_D ）に対する環境試験後の屈折率（ N_D ）の割合を示す。

[0055] また、各液体を湿度35%かつ温度40℃の条件下で、透光性の試料配置部材であるカバーガラスと、液浸対物レンズとの間に配し、1日経過後、ア

ッペ数を測定した。測定結果を表5と図5に示す。

[0056] [表5]

	環境試験前の アッペ数	環境試験後の アッペ数
液浸液体6	51.8	51.3
液浸液体7	51.8	51.0
液浸液体8	52.9	52.5

[0057] 図4と5に示すように、湿度環境の変化により液浸液体6～8の屈折率が変化した。乾燥状態（湿度20%）では屈折率が上昇し、吸湿状態（湿度35%、50%）では屈折率が低下する傾向が観察された。一方、アッペ数は、環境試験前後でほとんど変化しなかった。また、図4に示すように、乾燥状態に液浸液体6～8をさらしても、アッペ数はほとんど変化しなかった。屈折率の変動は、補正環により補正（球面収差補正）することができる。アッペ数が湿度環境によって変化しなかったことにより、顕微鏡の液浸液体として、液浸液体6～8の使用することによって、色収差が低減し、長時間の観察が可能であることがわかった。

[0058] <実施例4：対物レンズの影響>

作動距離（WD）の長い新たな対物レンズSPE30Xを設計し、液浸液体と組み合わせて用いた際の色収差に対する影響を調べた。対物レンズSPE30XはSCALEVIEW-SMt（ $N_D=1.492$ 、 $\nu_D=53$ ）を設計対象溶液としてオリンパス株式会社によって作製され、その仕様は以下のとおりである：倍率：30倍、NA：1.05、WD：1mm、屈折率： $N_e=1.49$ 。

[0059] TetraSpeck Beads（ $\phi 1.0\mu\text{m}$ 、ThermoFisher Scientific社製）を、SCALEVIEW-SMt（ $N_D=1.492$ 、 $\nu_D=53$ ）で透明化されたマウス脳切片内に分散させ、カバーガラスとスライドガラスで挟んで包埋した。

[0060] カバーガラス側を底面（レンズ側）にセットし、カバーガラスと対物レンズSPE30Xとの間に液浸液体5（ $N_D=1.492$ 、 $\nu_D=53$ ）を配し

、共焦点レーザー走査型顕微鏡FV3000RS（オリンパス株式会社製）を用いて表面直上付近（0 μm ）から深部（600 μm 付近）までを、405、488、561、640 nmの4種類の波長でイメージングし、得られた画像をXZ面に変換した。結果を図6に示す。この過程で得られた4つの深さ（30 μm 、100 μm 、300 μm 、500 μm ）における画像をそれぞれROI-1～4として示す（図7）。これらの結果から、液浸液体を使用して深部まで色収差のない画像が得られることが示された。

産業上の利用可能性

[0061] 本発明は、顕微鏡観察、特に、高解像度観察時に色収差の発生を抑制することができ、顕微鏡の液浸液体、及びその利用を提供することができる。

符号の説明

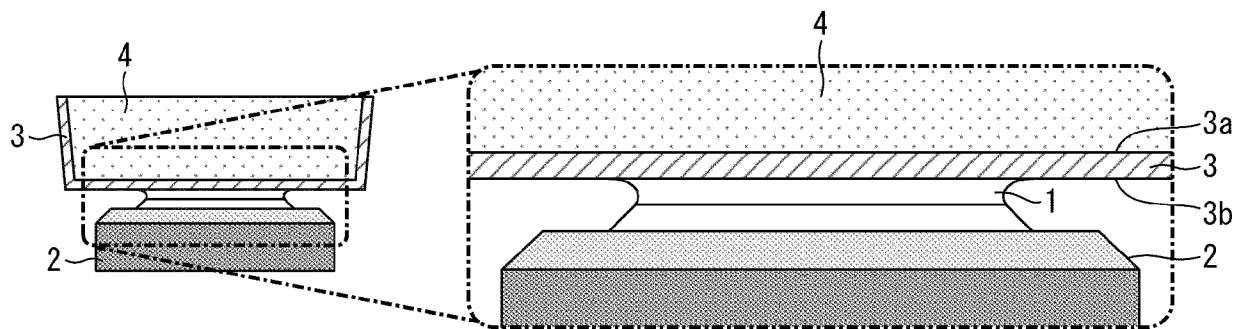
- [0062]
- 1 液浸液体（浸液）
 - 2 液浸対物レンズ
 - 3 試料配置部材
 - 3 a 試料配置側面
 - 3 b 背向面
 - 4 試料および試料溶液

請求の範囲

- [請求項1] アッペ数が50以上60以下の範囲内である、顕微鏡の液浸液体。
- [請求項2] 屈折率が1.35以上1.52以下の範囲内である、請求項1に記載の液浸液体。
- [請求項3] 親水性である、請求項1又は2に記載の液浸液体。
- [請求項4] 2種以上の親水性の液体を含む、請求項1～3の何れか一項に記載の液浸液体。
- [請求項5] 前記2種以上の親水性の液体の少なくとも1種が、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド、及びチオジエタノールからなる群より選ばれる少なくとも1つの液体である、請求項4に記載の液浸液体。
- [請求項6] 前記2種以上の親水性の液体の少なくとも1種が、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ブタンジオール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、及びブタントリオールからなる群より選ばれる少なくとも1つの液体である、請求項4又は5に記載の液浸液体。
- [請求項7] 50重量%以下のグリセロールを含む、請求項1～6の何れか一項に記載の液浸液体。
- [請求項8] 50重量%以下の水を含む、請求項1～7の何れか一項に記載の液浸液体。
- [請求項9] 透光性の試料配置部材における、試料配置側の面に背向する面と、液浸対物レンズとの間に配される、請求項1～8の何れか一項に記載の液浸液体。
- [請求項10] 請求項1～8の何れか一項に記載の液浸液体を、透光性の試料配置部材における、試料配置側の面に背向する面と、液浸対物レンズとの間に、配置して、試料を観察する工程を含む、試料の観察方法。
- [請求項11] 前記試料が、動物若しくは植物由来の細胞、組織若しくは器官、又はヒトを除く動物若しくは植物である、請求項10に記載の観察方法。

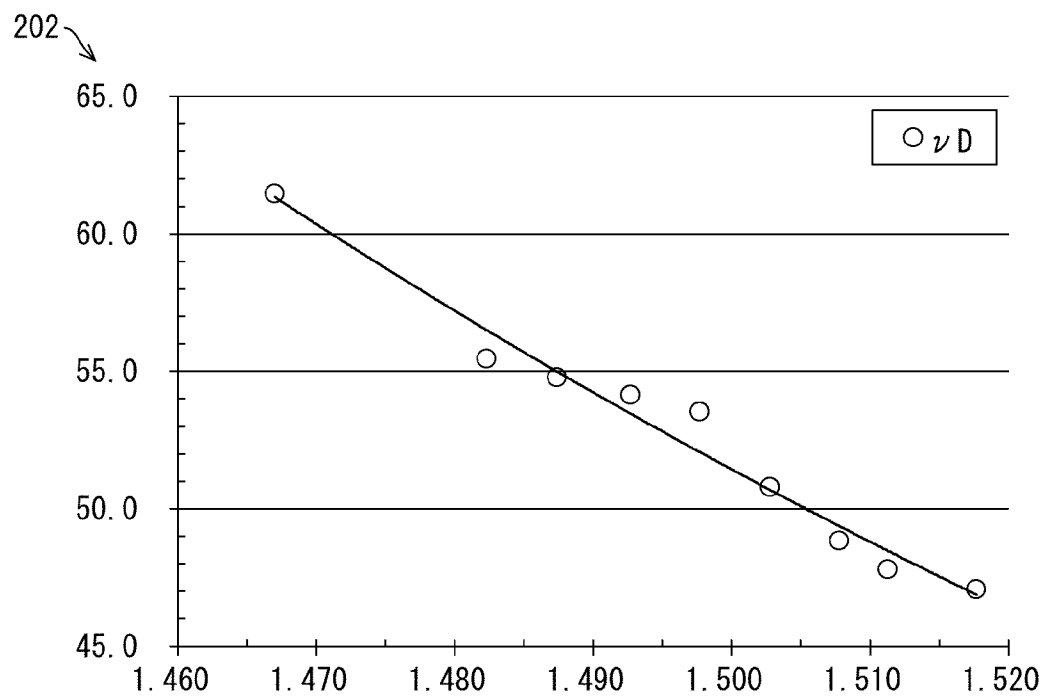
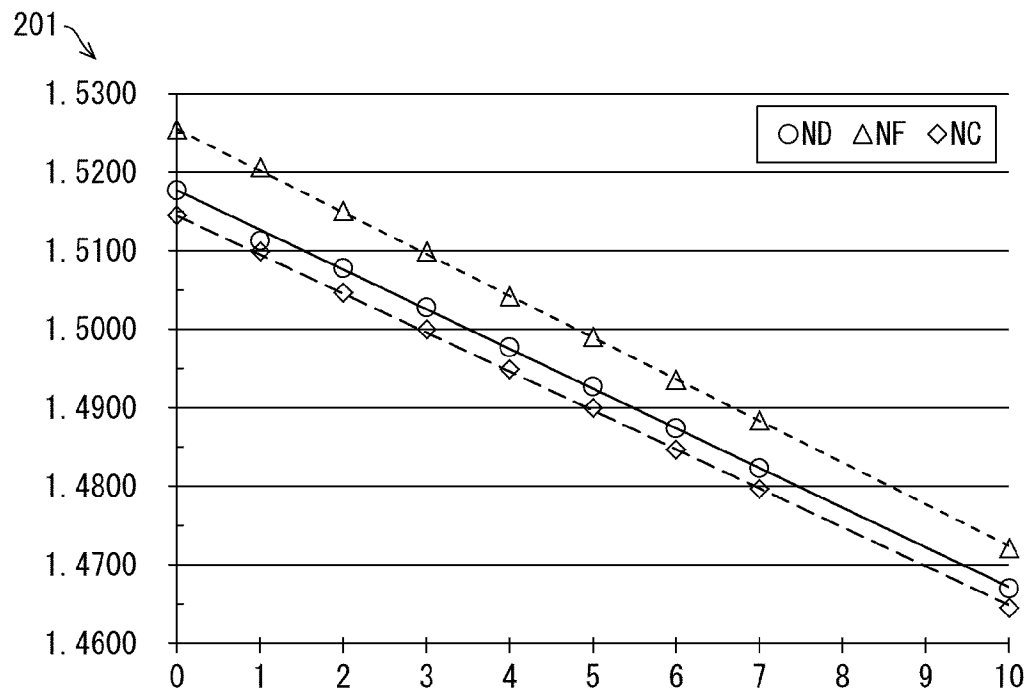
[図1]

図 1



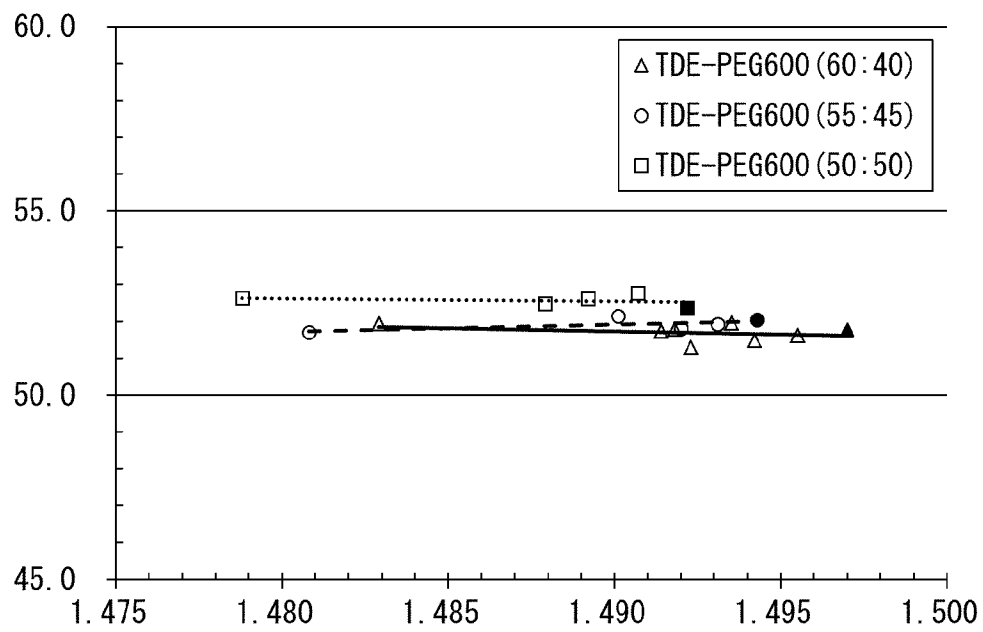
[図2]

図 2



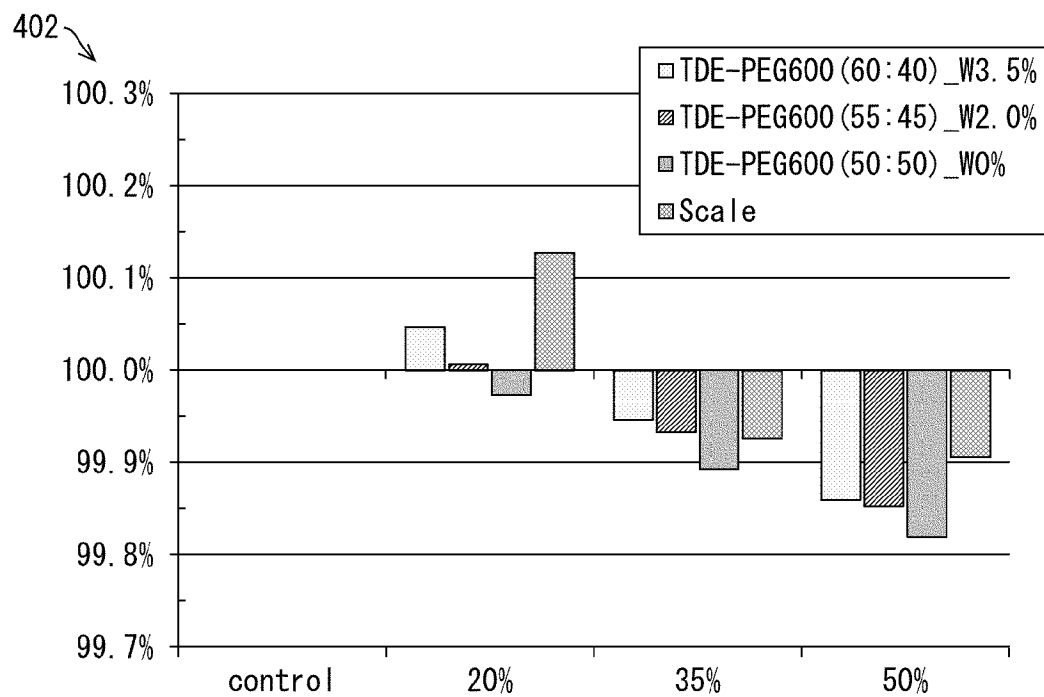
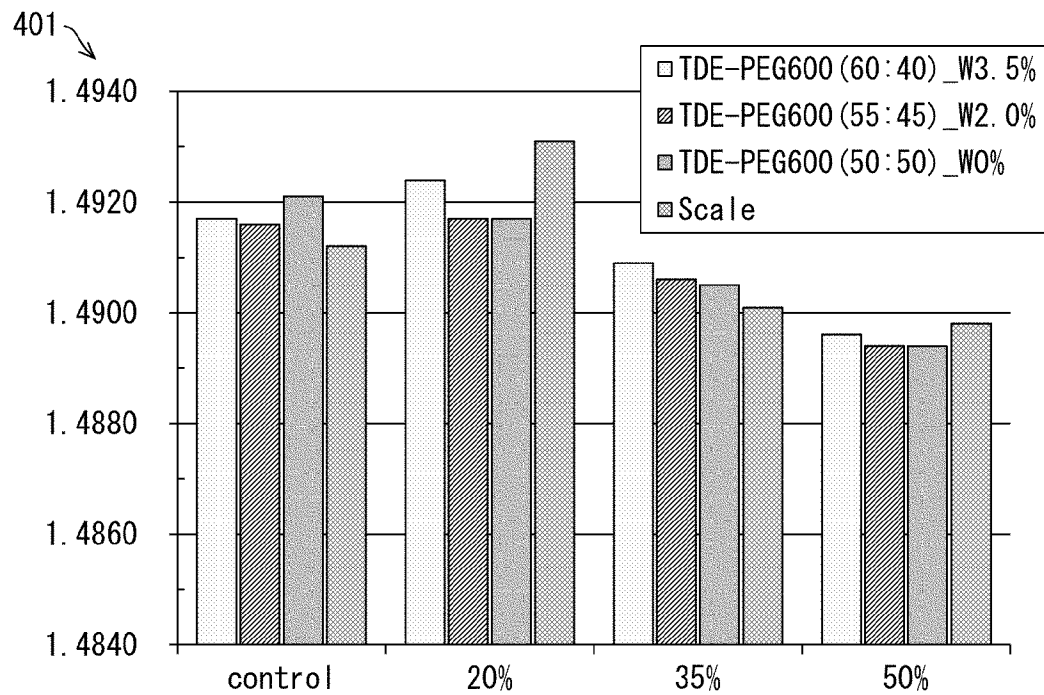
[図3]

図 3



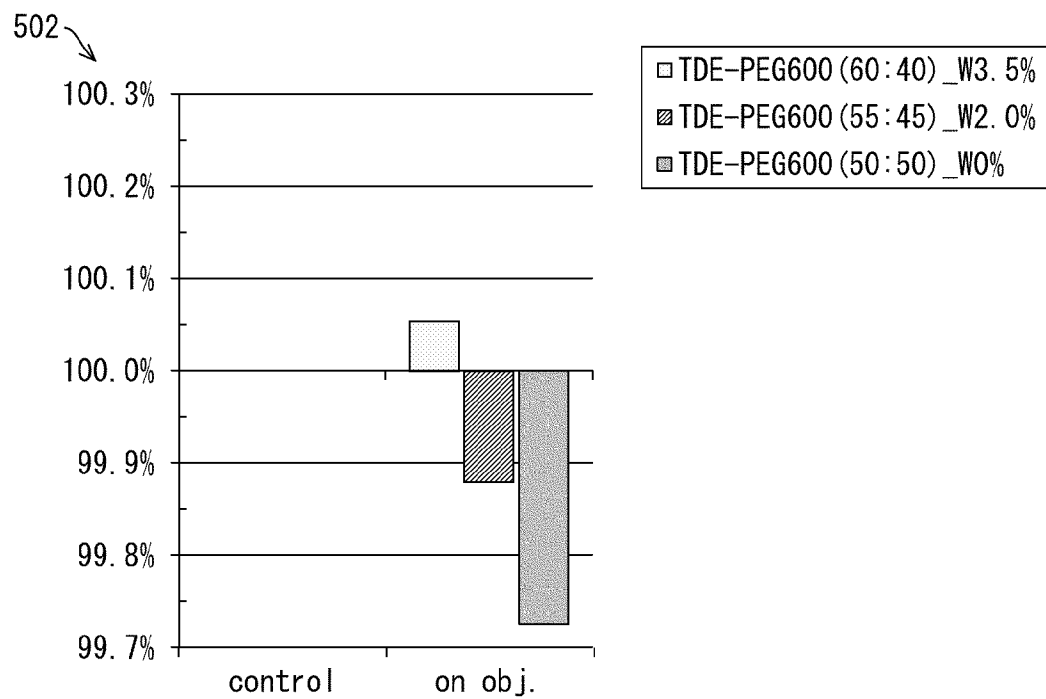
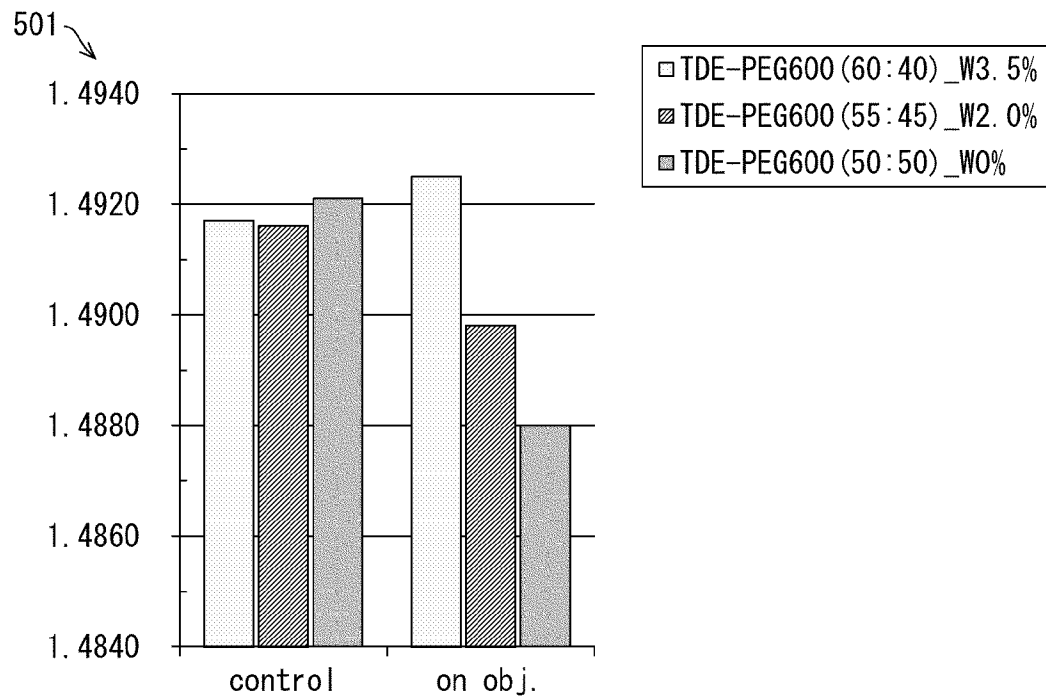
[図4]

図 4



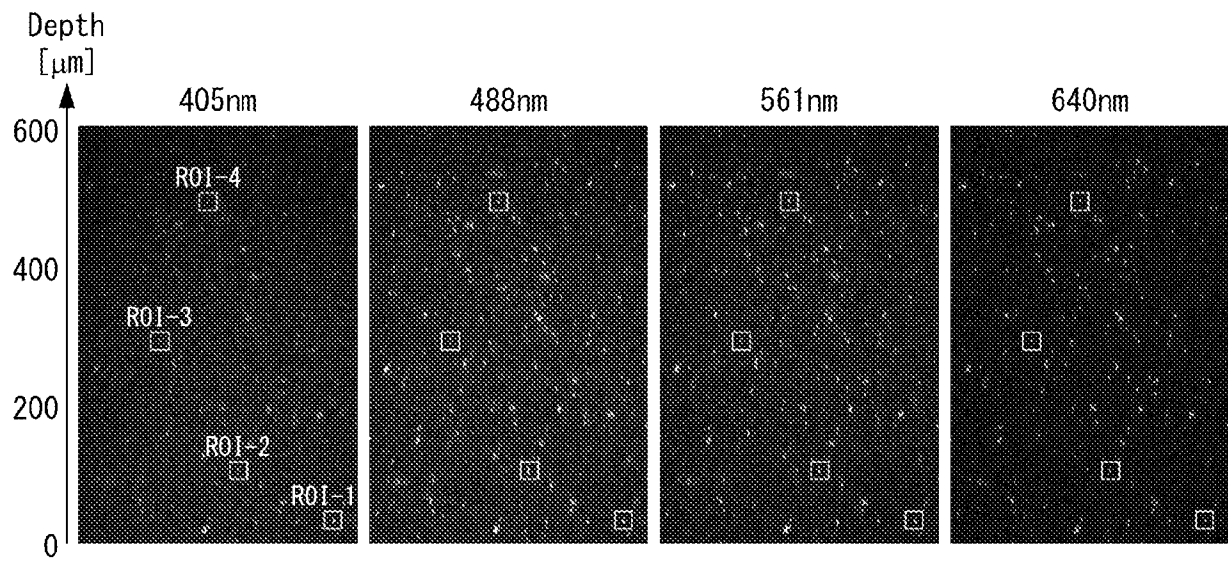
[図5]

図 5



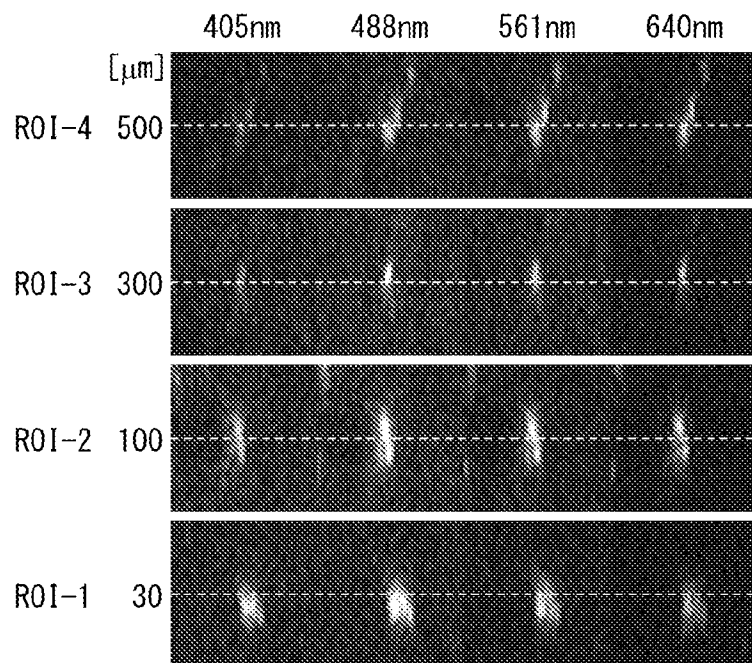
[図6]

図 6



[図7]

図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/002433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G02B21/02 (2006.01) i, G02B21/24 (2006.01) i, G02B21/33 (2006.01) i
FI: G02B21/33, G02B21/24, G02B21/02A

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. G02B21/00-21/36

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

CAplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-269317 A (NIKON CORPORATION) 05.10.1999	1-2, 9
Y	(1999-10-05), example 3 paragraph [0027]	1-11
X	JP 9-241214 A (CARL ZEISS STIFTUNG) 16.09.1997	1-2, 4, 6, 9
Y	(1997-09-16), examples 3, 4, paragraph [0009]	9-11
A		3, 5, 7-8
X	JP 63-174009 A (IDEMITSU PETROCHEMICAL CO., LTD.)	1-2, 4, 6, 9
Y	18.07.1988 (1988-07-18), example 5, page 4, upper right	9-11
A	column, line 10 to lower left column, line 15	3, 5, 7-8



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

13.03.2020

Date of mailing of the international search report

31.03.2020

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/JP2020/002433

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2010-539543 A (APPLIED PRECISION, INC.) 16.12.2010 (2010-12-16), paragraphs [0011], [0018], [0025], [0031], [0032]	1-4, 6-9 9-11 5
X Y	US 2016/0124202 A1 (NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY) 05.05.2016 (2016-05-05), paragraphs [0014]-[0040], fig. 1-7, paragraphs [0027]-[0038], fig. 2, 3, 7	1-4, 6-11 9-11
X Y A	GB 2419425 A (DAVIDSON, R. S.) 26.04.2006 (2006-04-26), page 1, line 1 to page 3, line 29, table 1, examples 1-23	1-4, 6-9 9-11 5
X Y A	JP 2017-3827 A (OLYMPUS CORPORATION) 05.01.2017 (2017-01-05), paragraphs [0019]-[0070], fig. 1-12	1-4, 6-11 9-11 5
Y	JP 57-182712 A (F HOFFMANN LA ROCH & CO. AG) 10.11.1982 (1982-11-10), page 2, lower left column, line 13 to page 6, upper left column, line 5	1-11
P, X P, Y P, A	JP 2019-132936 A (NIKON CORPORATION) 08.08.2019 (2019-08-08), second embodiment	1-2, 4-5, 9 9-11 3, 6-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/002433

JP 11-269317 A	05.10.1999	US 6221281 B1 example 3, column 6, lines 3-10
JP 9-241214 A	16.09.1997	US 5817256 A examples 3, 4, column 2, lines 17-28 DE 29724199 U1 DE 19705978 A1 JP 4079475 B2 DE 29724199 B4
JP 63-174009 A	18.07.1988	US 4832855 A example 5, column 3, line 61 to column 4, line 14 EP 274731 A2 DE 3789439 T2 EP 274731 B1 EP 274731 B2
JP 2010-539543 A	16.12.2010	US 2009/0109416 A1 paragraphs [0015], [0022], [0029], [0035], [0036] US 2013/0016328 A1 US 2016/0282597 A1 WO 2009/036192 A1 EP 2188660 A1 CA 2699803 A1 TW 200933190 A JP 2015-7801 A US 9366851 B2 US 10067330 B2 EP 2188660 B1 CA 2699803 C TW 14727796 B
US 2016/0124202 A1	05.05.2016	US 2017/0371137 A1 US 2019/0137745 A1 EP 3054337 A1 TW 201617581 A CA 2882784 A1 AU 2015200908 A1 CN 105852800 A US 9726872 B2 US 10209500 B2 TW 1553294 B
GB 2419425 A	26.04.2006	GB 2419427 B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/002433

JP 2017-3827 A	05.01.2017	JP 6545008 B2
JP 57-182712 A	10.11.1982	US 4493533 A column 2, line 5 to column 4, line 50 GB 2097395 A EP 63684 A1
JP 2019-132936 A	08.08.2019	(Family: none)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G02B 21/02(2006.01)i; G02B 21/24(2006.01)i; G02B 21/33(2006.01)i FI: G02B21/33; G02B21/24; G02B21/02 A		
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）） G02B21/00-21/36		
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 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 1922 - 1996年 1971 - 2020年 1996 - 2020年 1994 - 2020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） CAplus (STN)		
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
X	JP 11-269317 A（株式会社ニコン）05.10.1999（1999 - 10 - 05） 実施例3	1-2, 9
Y	段落[0027]	1-11
X	JP 9-241214 A（カール・ツァイス・ステッフツング）16.09.1997（1997 - 09 - 16） 実施例3-4, 段落[0009]	1-2, 4, 6, 9
Y		9-11
A		3, 5, 7-8
X	JP 63-174009 A（出光石油化学株式会社）18.07.1988（1988 - 07 - 18） 実施例5, 第4ページ右上欄第10行-左下欄第15行	1-2, 4, 6, 9
Y		9-11
A		3, 5, 7-8
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 13.03.2020		国際調査報告の発送日 31.03.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 森内 正明 2V 9222 電話番号 03-3581-1101 内線 3271

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
X	JP 2010-539543 A (アブライド プレシジョン インコーポレイテッド) 16.12.2010 (2010 - 12 - 16) 段落[0011], [0018], [0025], [0031]-[0032]	1-4, 6-9
Y		9-11
A		5
X	US 2016/0124202 A1 (NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY) 05.05.2016 (2016 - 05 - 05) 段落[0014]-[0040], 図1-7	1-4, 6-11
Y		9-11
X	GB 2419425 A (DAVIDSON, Robert Stephen) 26.04.2006 (2006 - 04 - 26) 第1ページ第1行-第3ページ第29行, 表1, 実施例1-23	1-4, 6-9
Y		9-11
A		5
X	JP 2017-3827 A (オリンパス株式会社) 05.01.2017 (2017 - 01 - 05) 段落[0019]-[0070], 図1-12	1-4, 6-11
Y		9-11
A		5
Y	JP 57-182712 A (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・コンパニー・アクチエンゲ ゼルシャフト) 10.11.1982 (1982 - 11 - 10) 第2ページ左下欄第13行-第6ページ左上欄第5行	1-11
P, X	JP 2019-132936 A (株式会社ニコン) 08.08.2019 (2019 - 08 - 08) 第2実施形態	1-2, 4-5, 9
P, Y		9-11
P, A		3, 6-8

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/002433

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	11-269317	A	05.10.1999	US	6221281	B1	
				実施例3, 第6欄第3行-第10行			
JP	9-241214	A	16.09.1997	US	5817256	A	
				実施例3-4, 第2欄第17行-第28行			
				DE	29724199	U1	
				DE	19705978	A1	
				JP	4079475	B2	
				DE	29724199	B4	
JP	63-174009	A	18.07.1988	US	4832855	A	
				実施例5, 第3欄第61行-第4欄第14行			
				EP	274731	A2	
				DE	3789439	T2	
				EP	274731	B1	
				EP	274731	B2	
JP	2010-539543	A	16.12.2010	US	2009/0109416	A1	
				段落[0015], [0022], [0029], [0035]-[0036]			
				US	2013/0016328	A1	
				US	2016/0282597	A1	
				WO	2009/036192	A1	
				EP	2188660	A1	
				CA	2699803	A1	
				TW	200933190	A	
				JP	2015-7801	A	
				US	9366851	B2	
				US	10067330	B2	
				EP	2188660	B1	
				CA	2699803	C	
				TW	14727796	B	
US	2016/0124202	A1	05.05.2016	US	2017/0371137	A1	
				US	2019/0137745	A1	
				EP	3054337	A1	
				TW	201617581	A	
				CA	2882784	A1	
				AU	2015200908	A1	
				CN	105852800	A	
				US	9726872	B2	
				US	10209500	B2	
				TW	1553294	B	
GB	2419425	A	26.04.2006	GB	2419427	B	
JP	2017-3827	A	05.01.2017	JP	6545008	B2	
JP	57-182712	A	10.11.1982	US	4493533	A	
				第2欄第5行-第4欄第50行			
				GB	2097395	A	
				EP	63684	A1	
JP	2019-132936	A	08.08.2019	(ファミリーなし)			