

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008年1月24日 (24.01.2008)

PCT

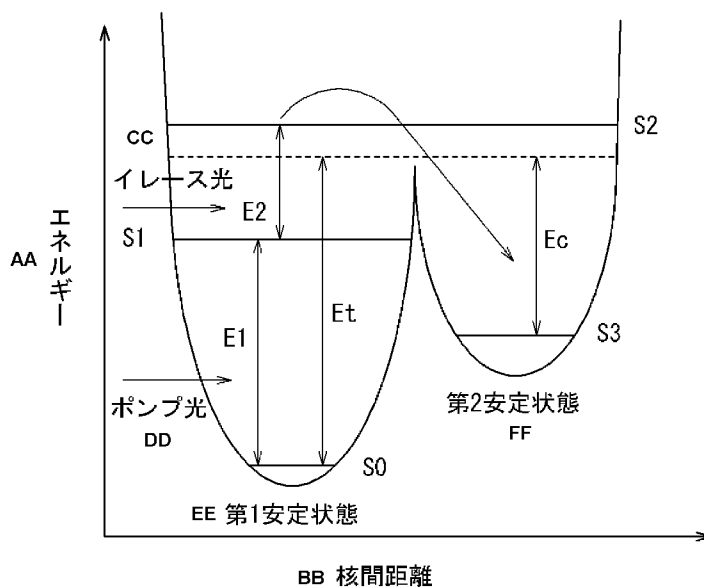
(10) 国際公開番号
WO 2008/010405 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01) G02B 21/12 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/063245
- (22) 国際出願日: 2007年7月2日 (02.07.2007)
- (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2006-196943 2006年7月19日 (19.07.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池滝 慶記 (IKE-TAKI, Yoshinori) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 杉村 憲司, 外 (SUGIMURA, Kenji et al.); 〒1000013 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 4 号 霞山ビルディング 7 F 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR OBSERVING SAMPLE, AND MICROSCOPE

(54) 発明の名称: 試料観察方法および顕微鏡



AA ENERGY
BB INTERNUCLEAR DISTANCE
CC ERASE LIGHT
DD PUMP LIGHT
EE FIRST STABLE STATE
FF SECOND STABLE STATE

(57) Abstract: A sample containing a photochromic molecule having a quantum state of at least a first stable state (S0) and a second stable state (S3) can be observed as follows. First light for exciting the photochromic molecule from the first stable state (S0) to a photoresponsive first excited state (S1) and second light for exciting the photochromic molecule from the first excited state (S1) to a second excited state (S2) of another energy level are used. The first and second lights are partially superimposed on top of each other and are applied to a sample. The photochromic molecule in its area exposed to the superimposed first and second light is transited to the second stable state (S3) through the second excited state (S2), while the photochromic molecule in its area to which only the first light has been applied is transited to the first excited state (S1), and, in this state, the sample is observed.

[続葉有]



KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 少なくとも第1安定状態S0および第2安定状態S3の量子状態を有するフォトクロミック分子を含む試料を観察するにあたり、フォトクロミック分子を第1安定状態S0から光応答可能な第1励起状態S1に励起する第1の光と、フォトクロミック分子を第1励起状態S1から他のエネルギー準位の第2励起状態S2に励起する第2の光とを用い、第1の光および第2の光を一部重ね合わせて試料に照射し、第1の光および第2の光が重ね合わされて照射された領域のフォトクロミック分子を第2励起状態S2を経て第2安定状態S3に遷移させ、第1の光のみが照射された領域のフォトクロミック分子を第1励起状態S1に遷移させて、試料を観察する。

明 細 書

試料観察方法および顕微鏡

関連出願の相互参照

- [0001] 本出願は、2006年7月19日に出願された日本国特許出願2006-196943号の優先権を主張するものであり、この先の出願の開示全体をここに参照のために取り込む。

技術分野

- [0002] 本発明は、試料観察方法および顕微鏡、特にフォトクロミック分子を含む試料を、第1の光および第2の光により照明して、超解像で観察する試料観察方法および顕微鏡に関するものである。

関連技術

- [0003] 光学顕微鏡の技術は古く、種々のタイプの顕微鏡が開発されてきた。また、近年では、レーザ技術および電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩により、さらに高性能の顕微鏡システムが開発されている。
- [0004] このような背景の中、複数波長の光で試料を照明することにより発する二重共鳴吸収過程を用いて、得られる画像のコントラストの制御のみならず化学分析も可能にした高機能な顕微鏡が提案されている(例えば、特開平8-184552号公報参照)。
- [0005] この顕微鏡は、二重共鳴吸収を用いて特定の分子を選択して、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観察するものである。この原理について、図7～図10を参照して説明する。図7は、試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示すもので、先ず、図7に示す基底状態(S0状態)の分子がもつ価電子軌道の電子を波長 λ_1 の光により励起して、図8に示す第1電子励起状態(S1状態)とする。次に、別の波長 λ_2 の光により同様に励起して、図9に示す第2電子励起状態(S2状態)とする。この励起状態により、分子は蛍光あるいは燐光を発光して、図10に示すように基底状態に戻る。
- [0006] 二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、図9の吸収過程や図10の蛍光や燐光の発光を用いて、吸収像や発光像を観察する。この顕微鏡法では、最初にレーザ光

等により共鳴波長 $\lambda 1$ の光で図8のように試料を構成する分子をS1状態に励起させるが、この際、単位体積内でのS1状態の分子数は、照射する光の強度が増加するに従って増加する。

- [0007] ここで、線吸収係数は、分子一個当りの吸収断面積と単位体積当たりの分子数との積で与えられるので、図9のような励起過程においては、続いて照射する共鳴波長 $\lambda 2$ に対する線吸収係数は、最初に照射した波長 $\lambda 1$ の光の強度に依存することになる。すなわち、波長 $\lambda 2$ に対する線吸収係数は、波長 $\lambda 1$ の光の強度で制御できることになる。このことは、波長 $\lambda 1$ および波長 $\lambda 2$ の2波長の光で試料を照射し、波長 $\lambda 2$ による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストは波長 $\lambda 1$ の光で完全に制御できることを示している。
- [0008] また、図9の励起状態での蛍光または燐光による脱励起過程が可能である場合には、その発光強度はS1状態にある分子数に比例する。したがって、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。
- [0009] さらに、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、上記の画像コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。すなわち、図7に示される最外殻価電子軌道は、各々の分子に固有なエネルギー準位を持つので、波長 $\lambda 1$ は分子によって異なることになり、同時に波長 $\lambda 2$ も分子固有のものとなる。
- [0010] ここで、従来の単一波長で照明する場合でも、ある程度特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能であるが、一般にはいくつかの分子における吸収帯の波長領域は重複するので、試料の化学組成の正確な同定までは不可能である。
- [0011] これに対し、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、波長 $\lambda 1$ および波長 $\lambda 2$ の2波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので、従来法よりも正確な試料の化学組成の同定が可能となる。また、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルをもつ光のみが強く吸収されるので、波長 $\lambda 1$ および波長 $\lambda 2$ の偏光方向を決めて吸収または蛍光像を撮影すれば、同じ分子でも配向方向の同定まで可能となる。
- [0012] また、最近では、二重共鳴吸収過程を用いて回折限界を越える高い空間分解能をもつ蛍光顕微鏡も提案されている(例えば、特開2001-100102号公報参照)。

- [0013] 図11は、分子における二重共鳴吸収過程の概念図で、基底状態 S_0 の分子が、波長 λ_1 の光で第1電子励起状態である S_1 に励起され、さらに波長 λ_2 の光で第2電子励起状態である S_2 に励起されている様子を示している。なお、図11はある種の分子の S_2 からの蛍光が極めて弱いことを示している。
- [0014] 図11に示すような光学的性質を持つ分子の場合には、極めて興味深い現象が起きる。図12は、図11と同じく二重共鳴吸収過程の概念図で、横軸のX軸は空間的距離の広がりを表わし、波長 λ_2 の光を照射した空間領域A1と波長 λ_2 の光が照射されない空間領域A0とを示している。
- [0015] 図12において、空間領域A0では波長 λ_1 の光の励起により S_1 状態の分子が多数生成され、その際に空間領域A0からは波長 λ_3 で発光する蛍光が見られる。しかし、空間領域A1では、波長 λ_2 の光を照射したため、 S_1 状態の分子のほとんどが即座に高位の S_2 状態に励起されて、 S_1 状態の分子は存在しなくなる。このような現象は、幾つかの分子により確認されている。これにより、空間領域A1では、波長 λ_3 の蛍光は完全になくなり、しかも S_2 状態からの蛍光はもともとないので、空間領域A1では完全に蛍光自体が抑制され(蛍光抑制効果)、空間領域A0からのみ蛍光が発することになる。
- [0016] このことは、顕微鏡の応用分野から考察すると、極めて重要な意味を持っている。すなわち、従来の走査型レーザ顕微鏡等では、レーザ光を集光レンズによりマイクロビームに集光して観察試料上を走査するが、その際のマイクロビームのサイズは、集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界となり、原理的にそれ以上の空間分解能は期待できない。
- [0017] ところが、図12の場合には、波長 λ_1 と波長 λ_2 との2種類の光を空間的に上手く重ね合わせて、波長 λ_2 の光の照射により蛍光領域を抑制することで、例えば波長 λ_1 の光の照射領域に着目すると、蛍光領域を集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界よりも狭くでき、実質的に空間分解能を向上させることが可能となる。以下、波長 λ_1 の光をポンプ光、波長 λ_2 の光をイレース光とも呼ぶ。したがって、この原理を利用することで、回折限界を越える二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡、例えば超解像蛍光顕微鏡を実現することが可能となる。

- [0018] さらに、近年では、生物学的に興味深いフォトクロミック分子をプローブとする超解像技術が提案されている。この分子は、特定の波長の光刺激より、蛍光発光特性をもつ第1安定状態から蛍光発光性の無い第2安定状態に変異する(光異性化)。また、他の変異の過程として特定の化学結合が切断または接合したり、電荷移動を起こしたりすることでも光異性化が起きる。基本的には、光異性化が起きると分子構造が全く変化するので、その光学的性質も変化する。
- [0019] 例えば、フォトクロミック部位をもつ蛍光タンパクFP595は、第1安定状態において波長595nm近傍の黄色い光を照射すると、これより長波長領域の赤い蛍光を発光する。ところが、波長458nm以下の短波長の光を照射すると第2安定状態に変異して、もはや黄色い光を照射しても、光学的性質が全く変化して蛍光は発しない。一度、第2安定状態に変異をすると、その状態は安定で、外部からエネルギー刺激を強制的に与えないと短時間内に第1安定状態には戻らない性質がある。
- [0020] フォトクロミック分子をプローブとする超解像技術では、上記のようなフォトクロミック分子の特性を一種の蛍光抑制効果として応用しようとするもので、生物用顕微鏡への応用が期待されている。
- [0021] しかしながら、従来報告されているフォトクロミック分子に関する超解像技術では、分光学的に蛍光抑制効果の発現が弱いために、超解像効果の発現が二重共鳴吸収過程と比較して弱いと言う問題がある。また、光異性化が遅いために、蛍光抑制および第1安定状態への復帰が遅く、計測時間がかかる問題があった。
- [0022] 以下、この点について説明する。図13(a)は、従来の二重共鳴吸収過程を用いた超解像法の場合の分光ダイヤグラム、図13(b)は、フォトクロミック分子の蛍光抑制効果を利用した超解像法の場合の分光ダイヤグラムを示しており、横軸は核間距離を、縦軸は励起エネルギーを示している。
- [0023] 二重共鳴吸収過程を利用する超解像法では、図13(a)に示すように、基底状態(S0)の分子を、光子エネルギーE21のポンプ光照射により蛍光発光可能な第1励起状態(S1)に励起し、さらに蛍光抑制させるために、光子エネルギーE22のイレース光照射により上位の励起状態(S3)に遷移させて、S3からは熱緩和により蛍光を抑制している。この時の光反応過程は、全てナノ秒以下であり非常に高速である。

- [0024] これに対し、フォトクロミック分子は、図13(b)に示すように、第1安定状態(S0)および第2安定状態(S3)に対応する2つの準安定なローカルミニマムのポテンシャルを持っている。このため、フォトクロミック分子の蛍光抑制効果を利用する超解像法では、一般には、第1安定状態である基底状態(S0)にあるフォトクロミック分子を、光子エネルギーE31のポンプ光照射により蛍光発光可能な第1励起状態(S1)に励起し、さらに蛍光抑制させるために、第1安定状態(S0)から第2安定状態(S3)への変異に不可欠な障壁エネルギー E_t を超える光子エネルギーE32のイレース光照射により上位の第2励起状態(S2)に遷移および経由させることで、第2安定状態(S3)に変異させるようにしている。
- [0025] しかし、この場合、第2安定状態(S3)に変異させるイレース光の強度に関しては、あまり強くすると、一度は第1安定状態(S1)から第2安定状態(S3)に変異したものの、再びイレース光によって励起されて第1安定状態(S1)に戻り、再びポンプ光励起により蛍光が発せられて、残留蛍光成分が生じることになる。
- [0026] この現象は、幾らイレース光強度を強くしても、蛍光抑制が確実に誘起できないことを意味しており、超解像法の結像性能に好ましくない影響を与えることになる。この点について、図14に示す2次元点像分布関数を参照して説明する。
- [0027] 超解像法では、ガウシアンタイプのポンプ光に、光軸直交平面における断面形状がドーナツ形状のイレース光を空間的に同軸上に重ね合わせて試料に照射する。この際、二重共鳴吸収過程を用いる場合には、イレース光強度が十分なポンプ光の辺縁部においては蛍光が完全に抑制されるので、得られる蛍光スポットパターンすなわち2次元点像分布関数は、図14に符号Iで示すように、非常に幅の細いローレンツタイプ関数なる。
- [0028] これに対し、フォトクロミック分子の蛍光抑制効果を利用する場合には、幾らイレース光強度を強くしても蛍光抑制が確実に誘起されないため、ポンプ光の辺縁部で蛍光抑制が不完全となる。その結果、得られる2次元点像分布関数は、図14に符号IIで示すように、先尖のみでスポットサイズの収縮が起こり、裾野では蛍光抑制が空間的に十分にできていない関数形となる。なお、図14において、符号IIIは、ポンプ光の2次元点像分布関数を示している。

発明の開示

[0029] したがって、かかる点に鑑みてなされた本発明の目的は、フォトクロミック分子を含む試料を、蛍光抑制効果を確実に誘起して、残留蛍光成分を生じることなく超解像で観察できる試料観察方法および顕微鏡を提供することにある。

[0030] 上記目的を達成する第1の観点に係る試料観察方法の発明は、少なくとも第1安定状態S0および第2安定状態S3の量子状態を有するフォトクロミック分子を含む試料を観察するにあたり、

上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0から光応答可能な第1励起状態S1に励起する第1の光と、上記フォトクロミック分子を上記第1励起状態S1から他のエネルギー準位の第2励起状態S2に励起する第2の光とを用い、

上記第1の光および上記第2の光を一部重ね合わせて上記試料に照射し、上記第1の光および上記第2の光が重ね合わされて照射された領域の上記フォトクロミック分子を上記第2励起状態S2を経て上記第2安定状態S3に遷移させ、上記第1の光のみが照射された領域の上記フォトクロミック分子を上記第1励起状態S1に遷移させて、上記試料を観察することを特徴とするものである。

[0031] さらに、上記目的を達成する第2の観点に係る顕微鏡の発明は、少なくとも第1安定状態S0および第2安定状態S3の量子状態を有するフォトクロミック分子を含む試料を観察する顕微鏡であって、

上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0から光応答可能な第1励起状態S1に励起する第1の光を出射する第1の光源と、

上記フォトクロミック分子を上記励起状態S1から他のエネルギー準位の第2励起状態S2に励起する第2の光を出射する第2の光源と、

上記第1の光および上記第2の光を一部重ね合わせて上記試料に集光して照射する光学系と、

上記光学系により上記第1の光および上記第2の光が重ね合わされて照射される領域の上記フォトクロミック分子を上記第2励起状態S2を経て上記第2安定状態S3に遷移させ、上記第1の光のみが照射される領域の上記フォトクロミック分子を上記第1励起状態S1に遷移させるように、上記光学系を経て照射される光と上記試料と

を相対的に移動させて上記試料を走査する走査部と、

上記第1励起状態S1に励起された上記フォトクロミック分子から発生する光応答を検出する検出部と、を有することを特徴とするものである。

- [0032] 第3の観点に係る発明は、第2の観点に係る顕微鏡において、上記第1の光の光子エネルギーをE1、上記第2の光の光子エネルギーをE2、上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0から上記第2安定状態S3へ変異させる際の障壁エネルギーをEt、上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0へ変異させる際の障壁エネルギーをEcとすると、

$$E2 < E1 < Et < E1 + E2、かつ E1 < Ec$$

を満足することを特徴とするものである。

- [0033] 第4の観点に係る発明は、第2の観点に係る顕微鏡において、上記第1の光の照射により上記第1励起状態S1に励起された上記フォトクロミック分子が緩和しない間に、上記第2の光の照射を開始するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御することを特徴とするものである。

- [0034] 第5の観点に係る発明は、第2の観点に係る顕微鏡において、上記試料の各観察点において、上記第1の光および上記第2の光を照射してから、上記第1の光を単独照射するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御し、

上記第1の光の単独照射により上記フォトクロミック分子から発生する光応答を上記検出部で検出することを特徴とするものである。

- [0035] 第6の観点に係る発明は、第2の観点に係る顕微鏡において、上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0に変異させる際の障壁エネルギーEcよりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態S3にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0に復帰させることを特徴とするものである。

- [0036] 第7の観点に係る発明は、第3の観点に係る顕微鏡において、上記第1の光の照射により上記第1励起状態S1に励起された上記フォトクロミック分子が緩和しない間に、

上記第2の光の照射を開始するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御することを特徴とするものである。

- [0037] 第8の観点に係る発明は、第3の観点に係る顕微鏡において、上記試料の各観察点において、上記第1の光および上記第2の光を照射してから、上記第1の光を単独照射するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御し、

上記第1の光の単独照射により上記フォトクロミック分子から発生する光応答を上記検出部で検出することを特徴とするものである。

- [0038] 第9の観点に係る発明は、第3の観点に係る顕微鏡において、上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0に変異させる際の障壁エネルギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態S3にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0に復帰させることを特徴とするものである。

- [0039] 第10の観点に係る発明は、第4の観点に係る顕微鏡において、上記試料の各観察点において、上記第1の光および上記第2の光を照射してから、上記第1の光を単独照射するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御し、

上記第1の光の単独照射により上記フォトクロミック分子から発生する光応答を上記検出部で検出することを特徴とするものである。

- [0040] 第11の観点に係る発明は、第4の観点に係る顕微鏡において、上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0に変異させる際の障壁エネルギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態S3にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0に復帰させることを特徴とするものである。

- [0041] 第12の観点に係る発明は、第5の観点に係る顕微鏡において、上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0に変異させる際の障壁エネルギー

ギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態 S_3 にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態 S_0 に復帰させることを特徴とするものである。

- [0042] 図1は、本発明の原理を説明するフォトクロミック分子の分光ダイヤグラムを示している。本発明では、従来のようにイレース光によりフォトクロミック分子を第1安定状態から第2安定状態へ直接変異させるのではなく、フォトクロミック分子に2色の第1の光および第2の光を照射することにより二重共鳴吸収を誘導させて、フォトクロミック分子を第1安定状態から第2安定状態へ変異させる。
- [0043] このため、先ず、第1安定状態である基底状態(S_0)にあるフォトクロミック分子を、光子エネルギー E_1 の第1の光(ポンプ光)照射により光応答可能な第1励起状態(S_1)に励起遷移させる。この第1励起状態(S_1)に遷移すると、フォトクロミック分子は、通常は、光応答過程により基底状態(S_0)に緩和する。
- [0044] 本発明では、第1励起状態(S_1)が緩和しない間に、光子エネルギー E_2 の第2の光(イレース光)照射により、フォトクロミック分子を第1励起状態(S_1)から、それよりも高い量子レベルの第2励起状態(S_2)に励起遷移させる。この第2励起状態(S_2)に遷移させる際の光子エネルギー E_2 は、第1安定状態(S_0)から第2安定状態(S_3)への変異に不可欠な障壁エネルギー E_t 以上で、かつ、第2安定状態(S_3)において、フォトクロミック分子がポンプ光およびイレース光の照射によって二重共鳴吸収を起こさないことが条件となる。
- [0045] このため、本発明では、フォトクロミック分子が第1安定状態(S_0)から第2安定状態(S_3)へ変異すると、分子構造が変化して光学的性質も変わることに着目し、ポンプ光およびイレース光による励起によって、第2安定状態(S_3)では二重共鳴吸収の共鳴条件から外れるように、それぞれの光の光子エネルギー E_1 および E_2 を設定する。このようにすれば、ポンプ光およびイレース光の照射によっては、第2安定状態(S_3)から第1安定状態(S_0)への変異は起きないので、残留蛍光成分は生じない。もちろん、ポンプ光またはイレース光の単独励起では、第2安定状態(S_3)の分子の励起は不

可能なので、蛍光発光は生じない。

- [0046] さらに、本発明の好適実施の形態では、第2安定状態(S3)から第1安定状態(S0)への変異を確実に阻止するため、選択するフォトクロミック分子がもつ量子状態間のエネルギー間隔を、下記の条件を満たすようにする。
- [0047] 1) 大前提として、第1安定状態(S0)にあるフォトクロミック分子を光応答可能な第1励起状態(S1)に励起するポンプ光の光子エネルギー E_1 は、第1安定状態(S0)から第2安定状態(S3)への変異が起こらないエネルギーとする。すなわち、第1安定状態(S0)から第2安定状態(S3)への変異に要する障壁エネルギー E_t よりも小さくする。
- [0048] 2) フォトクロミック分子を第2励起状態(S2)に励起するポンプ光の光子エネルギー E_1 と、イレース光の光子エネルギー E_2 との和は、少なくとも第1安定状態(S0)から第2安定状態(S3)への変異に要する障壁エネルギー E_t よりも大きくする。
- [0049] 3) 残留蛍光成分が発生しないようにするため、すなわち第2安定状態(S3)に変異したフォトクロミック分子が、第2安定状態(S3)から第1安定状態(S0)へ戻らないようにするため、ポンプ光による光子エネルギー E_1 は、第2安定状態(S3)から第1安定状態(S0)への変異に要する障壁エネルギー E_c よりも小さくする。
- [0050] 以上の条件を整理すると、 $E_2 < E_1 < E_t < E_1 + E_2$ 、かつ $E_1 < E_c$ となる。
- [0051] なお、イレース光は、ポンプ光の照射によりS1状態に励起されたフォトクロミック分子が緩和しない間に、照射を開始することが不可欠である。なぜなら、ポンプ光の照射が止まり、フォトクロミック分子が第1安定状態である基底状態(S0)に緩和してしまうと、イレース光の照射では光子エネルギーが障壁エネルギー E_t より遥か小さくなって、フォトクロミック分子を第1安定状態(S0)から第2安定状態(S3)へ効率的に変異できなくなるからである。
- [0052] 以上の条件を満たすように、ポンプ光とイレース光とを空間的に重ね合わせてフォトクロミック分子を含む試料に照射すれば、ポンプ光とイレース光とが照射された部分では、フォトクロミック分子は第2安定状態(S3)に変性して、ポンプ光で励起されても蛍光を発しない。これに対し、イレース光が照射されていない部分では、障壁エネルギー E_t を乗り越えることができないので、観察に必要な蛍光領域の強度が損なわれる

ことがなくなる。

図面の簡単な説明

[0053] 図1は、本発明の原理を説明するフォトクロミック分子の分光ダイヤグラムである。

[0054] 図2は、本発明の第1実施の形態による超解像顕微鏡の光学系の要部構成図である。

[0055] 図3は、図2の位相板を示す拡大平面図である。

[0056] 図4は、本発明の第2実施の形態による超解像顕微鏡におけるポンプ光およびイレース光の照射タイミングを示すタイミングチャートである。

[0057] 図5は、本発明の第3実施の形態による超解像顕微鏡の光学系の要部構成図である。

[0058] 図6は、第3実施の形態による超解像顕微鏡におけるポンプ光、イレース光および復帰光の照射タイミングを示すタイミングチャートである。

[0059] 図7は、試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示す概念図である。

[0060] 図8は、図16の分子の第1励起状態を示す概念図である。

[0061] 図9は、同じく、第2励起状態を示す概念図である。

[0062] 図10は、同じく、第2励起状態から基底状態に戻る状態を示す概念図である。

[0063] 図11は、分子における二重共鳴吸収過程を説明するための概念図である。

[0064] 図12は、同じく、二重共鳴吸収過程を説明するための概念図である。

[0065] 図13(a)および(b)は、二重共鳴吸収過程を用いた超解像法の場合の分光ダイヤグラムおよびフォトクロミック分子の蛍光抑制効果を利用した超解像法の場合の分光ダイヤグラムである。

[0066] 図14は、二重共鳴吸収過程を用いた超解像法と、フォトクロミック分子の蛍光抑制効果を利用した超解像法とによる2次元点像分布関数を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0067] (第1実施の形態) 本実施の形態では、フォトクロミック分子として蛍光タンパクFP595を含む試料を観察する。蛍光タンパクFP595は、第1安定状態(S0)で波長568nmの光(ポンプ光)を照射すると、波長605nmに蛍光発光ピークをもち、波長458nmの光(イレース光)を照射すると、障壁エネルギーを乗り越えて、第2安定状態(S3)

に変性し、一度、第2安定状態(S3)に変性するとポンプ光を照射しても蛍光を発しないが、イレース光の照射では蛍光を発光する特性を有している。

- [0068] 蛍光タンパクFP595を含む試料の場合、ポンプ光波長を勘案すると、S0状態から光応答としての蛍光発光可能な第1励起状態S1へ励起遷移させるために必要な光子エネルギーE1は、2. 2eVとなる。一方、イレース光単独で第1安定状態(S0)から障壁エネルギーを越えて第2安定状態(S3)へ変異させるのに必要な光子エネルギーE32(図13(b)参照)は、2. 7eVである。したがって、少なくとも2. 7eV以上の光子エネルギーをもつ光がイレース光として利用できる。
- [0069] ここで、ポンプ光とイレース光との光子エネルギーの差は、0. 5eVである。すなわち、第1励起状態S1を基準にすると、そこから0. 5eVの上位のエネルギー準位として第2励起状態S2が存在する。一般に、第2励起状態S2以上の電子状態はエネルギー間隔が密に存在し、しかもそれに帰属する振動・回転準位も広く分散するので、第1励起状態S1の分子に0. 5eV以上の光子エネルギーを有する光を照射すると、障壁エネルギーEtを超えて第2安定状態(S3)に変性させることができる。これは、波長換算すると、2. 4 μ mとなる。
- [0070] したがって、イレース光として、0. 5eV以上で、かつ2. 2eV(ポンプ光の光子エネルギー)以下の光子エネルギーを有する光を用いれば、第1安定状態(S0)の蛍光タンパクFP595を第1励起状態S1に励起して、さらに効率的に第2安定状態(S3)に変性させることができる。言い換えると、波長が568nmより長く2. 4 μ mより短い光源を選べば、イレース光として用いることができる。このような波長帯域で発振できるレーザとしては、例えば、Ti:サファイヤレーザや、手軽な近赤外の各種半導体レーザが知られている。
- [0071] 従来の二重共鳴吸収過程のみを用いた超解像顕微鏡法においては、イレース光源として先頭値の高いレーザ光が必要であった。そのため、ピコ秒、フェムト秒といった極短パルスレーザ光を、取り扱いが難しい各種非線形結晶を用いて波長変換を行っていた。その結果、顕微鏡システムが非常に大掛かりとなって、生物系の一般ユーザには使いにくいものとなっていた。
- [0072] これに対し、本実施の形態の蛍光タンパクFP595を用いた超解像顕微鏡法では、イ

レース光強度が μ Wクラスでも使えるので、光源の選択の幅が広がるのと同時に、生体試料へのダメージも大幅に低減できる。

[0073] 図2は、本実施の形態による超解像顕微鏡の光学系の要部構成図である。この超解像顕微鏡は、通常のレーザ走査型蛍光顕微鏡を前提としたもので、主に3つの独立したユニット、すなわち、光源ユニット10、スキャンユニット30および顕微鏡ユニット50からなっている。

[0074] 光源ユニット10は、例えば波長568nmのポンプ光を出射するアルゴン・クリプトンレーザからなる第1の光源11と、波長1064nmのイレース光を出射するNd:YAGレーザからなる第2の光源12と、イレース光空間変調用の位相板13と、イレース光およびポンプ光を同軸上に重ね合わせるためのビームコンバイナ14とを有している。位相板13は、図3にか拡大平面図を示すように、光軸対称の位置で通過したイレース光の位相が反転するように調整された光学薄膜を蒸着して構成されている。図3では、光軸の周りに独立した4つの領域を有し、イレース光波長に対して4分1ずつ位相が異なっている。この位相板13を通過した光を集光すれば、光軸上で電場が相殺され中空状のイレース光が生成される。

[0075] スキャンユニット30は、光源ユニット10から出射される同じ光学軸を共有するポンプ光とイレース光とを、ハーフミラー31を通過させた後、2枚のガルバノミラー32および33により2次元方向に揺動走査して、後述の顕微鏡ユニット50に出射するようになっているとともに、顕微鏡ユニット50で検出された蛍光を、往路とは逆の経路を辿ってハーフミラー31で分岐し、その分岐された蛍光を投影レンズ34、ピンホール35、ノッチフィルタ36および37を経て光電子増倍管38で受光するようになっている。図2では、図面を簡略化するため、ガルバノミラー32, 33を同一平面内で揺動可能に示している。なお、ノッチフィルタ36および37は、蛍光に混入したポンプ光およびイレース光を除去するものである。また、ピンホール35は、共焦点光学系を成す重要な光学素子で、観察試料内の特定の断層面で発光した蛍光のみを通過させるものである。

[0076] 顕微鏡ユニット50は、いわゆる通常の蛍光顕微鏡で、スキャンユニット30から入射するポンプ光およびイレース光をハーフミラー51で反射させて、対物レンズ52により蛍

光タンパクFP595を含む試料53上に集光させるとともに、試料53で発光した蛍光を、再び対物レンズ52でコリメートしてハーフミラー51で反射させることにより、再び、スキャンユニット30に戻すと同時に、ハーフミラー51を通過する蛍光の一部を接眼レンズ54に導いて、蛍光像として目視観察できるようになっている。

- [0077] 本実施の形態では、ポンプ光およびイレース光を試料53に連続的に照射しながら試料53を走査して、中空状のイレース光の中央部を蛍光観察領域として超解像で観察する。したがって、本実施の形態の場合には、イレース光の照射によって第2安定状態に変性される領域が、熱緩和により第1安定状態に復帰する時間に同期させて、試料53を走査する。
- [0078] (第2実施の形態) 本発明の第2実施の形態では、第1実施の形態の超解像顕微鏡において、第1の光源11からのポンプ光および第2の光源12からのイレース光を、蛍光タンパクFP595が変性したときの寿命の長さに着目して、図4に示すタイミングで試料53にパルス状に照射する。
- [0079] すなわち、試料53の各観察点において、まず、ポンプ光およびイレース光を同時照射して、信号検出に必要な領域にある分子を第2安定状態に変性させ(超解像記録)、続いて、熱緩和によって第2安定状態から第1安定状態に戻る前に、ポンプ光を単独照射し、そのポンプ光の単独照射に同期して回折限界以下の狭い領域にある第1安定状態の蛍光タンパクFP595からの蛍光を読み出す。
- [0080] このように、本実施の形態によれば、ポンプ光単独照射時の蛍光信号を計測するので、イレース光の散乱光が混入せず、良好なS/Nで試料53を超解像で観察することができる。
- [0081] なお、パルス状のポンプ光およびイレース光は、第1の光源11および第2の光源12の駆動を制御して、それらの出力光自体をオン・オフして得るか、あるいは第1の光源11および第2の光源12からはそれぞれCWのポンプ光およびイレース光を出射させ、ビームコンバイナ14と第1の光源11および第2の光源12との間の光路中に、それぞれ電気光学変調素子や音響光変調素子等からなる強度変調手段を配置して、対応する強度変調手段の駆動を制御することにより、パルス状のポンプ光およびイレース光を得る。

- [0082] (第3実施の形態)図5は、本発明の第3実施の形態による超解像顕微鏡の光学系の要部構成図である。本実施の形態は、図2に示す構成において、光源ユニット10に、蛍光タンパクFP595が第2安定状態から第1安定状態に復帰するのを促進する第3の光(復帰光)を出射する第3の光源15と、この第3の光源15からの復帰光を、その光軸をポンプ光やイレース光の光軸と一致させてスキャンユニット30に入射させるビームコンバイナ16とを付加したものである。その他の光学系の構成は、図2と同様である。
- [0083] 本実施の形態では、第1の光源11からのポンプ光、第2の光源12からのイレース光および第3の光源15からの復帰光を、図6に示すタイミングで試料53にパルス状に照射する。すなわち、図4に示した第2実施の形態と同様に、試料53の各観察点において、先ず、ポンプ光およびイレース光を同時照射して、信号検出に必要な領域にある分子を第2安定状態に変性させ(超解像記録)、続いて、熱緩和によって第2安定状態から第1安定状態に戻る前に、ポンプ光を単独照射し、そのポンプ光の単独照射に同期して回折限界以下の狭い領域にある第1安定状態の蛍光タンパクFP595からの蛍光を読み出す。その後、超解像計測が終了した当該観察点に、第3の光源15からの復帰光を照射して、第2安定状態から第1安定状態への復帰を促進させる。
- [0084] ここで、パルス状の復帰光は、パルス状のポンプ光およびイレース光を得る場合と同様に、第3の光源15の駆動を制御して、その出力光自体をオン・オフして得るか、あるいは第3の光源15からはCWの復帰光を出射させ、ビームコンバイナ16と第3の光源15との間の光路中に強度変調手段を配置し、その駆動を制御してパルス状の復帰光を得る。また、第3の光源15から出射させる復帰光は、第2の光源12から出射されるイレース光よりも短い波長で、かつ蛍光タンパクFP595を第2安定状態から第1安定状態へ復帰するための障壁エネルギー E_c (図1参照)より大きい光子エネルギーを持つものとする。
- [0085] このように、本実施の形態によれば、超解像計測が終了した試料53の観察点に、第3の光源15からの復帰光を照射して、蛍光タンパクFP595の第2安定状態から第1安定状態への復帰を促進させるようにしたので、第2実施の形態の効果に加えて、第

1安定状態への復帰を早めることができる。その結果、試料53の走査を早めることができ、大幅な計測時間の短縮が図れる。

- [0086] なお、上記実施の形態では、蛍光タンパクFP595を例にとって説明したが、本発明は蛍光タンパクFP595を含む試料に限らず、他のフォトクロミック分子を含む試料を観測する場合も有効に適用することができ、フォトクロミック分子の光学特性に応じて、第1の光(ポンプ光)および第2の光(イレース光)、さらには第3の光(復帰光)を適宜設定すればよい。

産業上の利用可能性

- [0087] 本発明によれば、フォトクロミック分子を含む試料を、蛍光抑制効果を確実に誘起して、残留蛍光成分を生じることなく観察できるので、従来の二重共鳴吸収過程を利用した超解像顕微鏡法に勝るとも劣らない結像性能を得ることができる。また、二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡法では、非蛍光緩和の過程が熱緩和のパスのみであったのに対して、フォトクロミック分子の場合には、フォトクロミック光反応も非蛍光緩和の過程に加わるので、弱い強度の第2の光(イレース光)で蛍光抑制を実現することができるとともに、生体試料へのダメージも大幅に低減することができる。その結果、商用顕微鏡装置の構成を考える際に、超解像顕微鏡のもつ高いパフォーマンスをもちつつ、しかもシステム構成が簡単な商品コンセプトを提示することができる。

請求の範囲

- [1] 少なくとも第1安定状態S0および第2安定状態S3の量子状態を有するフォトクロミック分子を含む試料を観察するにあたり、
- 上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0から光応答可能な第1励起状態S1に励起する第1の光と、上記フォトクロミック分子を上記第1励起状態S1から他のエネルギー準位の第2励起状態S2に励起する第2の光とを用い、
- 上記第1の光および上記第2の光を一部重ね合わせて上記試料に照射し、上記第1の光および上記第2の光が重ね合わされて照射された領域の上記フォトクロミック分子を上記第2励起状態S2を経て上記第2安定状態S3に遷移させ、上記第1の光のみが照射された領域の上記フォトクロミック分子を上記第1励起状態S1に遷移させて、上記試料を観察することを特徴とする試料観察方法。
- [2] 少なくとも第1安定状態S0および第2安定状態S3の量子状態を有するフォトクロミック分子を含む試料を観察する顕微鏡であって、
- 上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0から光応答可能な第1励起状態S1に励起する第1の光を出射する第1の光源と、
- 上記フォトクロミック分子を上記励起状態S1から他のエネルギー準位の第2励起状態S2に励起する第2の光を出射する第2の光源と、
- 上記第1の光および上記第2の光を一部重ね合わせて上記試料に集光して照射する光学系と、
- 上記光学系により上記第1の光および上記第2の光が重ね合わされて照射される領域の上記フォトクロミック分子を上記第2励起状態S2を経て上記第2安定状態S3に遷移させ、上記第1の光のみが照射される領域の上記フォトクロミック分子を上記第1励起状態S1に遷移させるように、上記光学系を経て照射される光と上記試料とを相対的に移動させて上記試料を走査する走査部と、
- 上記第1励起状態S1に励起された上記フォトクロミック分子から発生する光応答を検出する検出部と、を有することを特徴とする顕微鏡。
- [3] 上記第1の光の光子エネルギーをE1、上記第2の光の光子エネルギーをE2、上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0から上記第2安定状態S3へ変異させる際

の障壁エネルギーを E_t 、上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態 S_3 から上記第1安定状態 S_0 へ変異させる際の障壁エネルギーを E_c とすると、

$$E_2 < E_1 < E_t < E_1 + E_2, \text{ かつ } E_1 < E_c$$

を満足することを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。

- [4] 上記第1の光の照射により上記第1励起状態 S_1 に励起された上記フォトクロミック分子が緩和しない間に、上記第2の光の照射を開始するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御することを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。
- [5] 上記試料の各観察点において、上記第1の光および上記第2の光を照射してから、上記第1の光を単独照射するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御し、
- 上記第1の光の単独照射により上記フォトクロミック分子から発生する光応答を上記検出部で検出することを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。
- [6] 上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態 S_3 から上記第1安定状態 S_0 に変異させる際の障壁エネルギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態 S_3 にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態 S_0 に復帰させることを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。
- [7] 上記第1の光の照射により上記第1励起状態 S_1 に励起された上記フォトクロミック分子が緩和しない間に、上記第2の光の照射を開始するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御することを特徴とする請求項3に記載の顕微鏡。
- [8] 上記試料の各観察点において、上記第1の光および上記第2の光を照射してから、上記第1の光を単独照射するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御し、
- 上記第1の光の単独照射により上記フォトクロミック分子から発生する光応答を上記検出部で検出することを特徴とする請求項3に記載の顕微鏡。
- [9] 上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態 S_3 から上記第1安定状態 S_0 に変異させる際の障壁エネルギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する

第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態S3にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0に復帰させることを特徴とする請求項3に記載の顕微鏡。

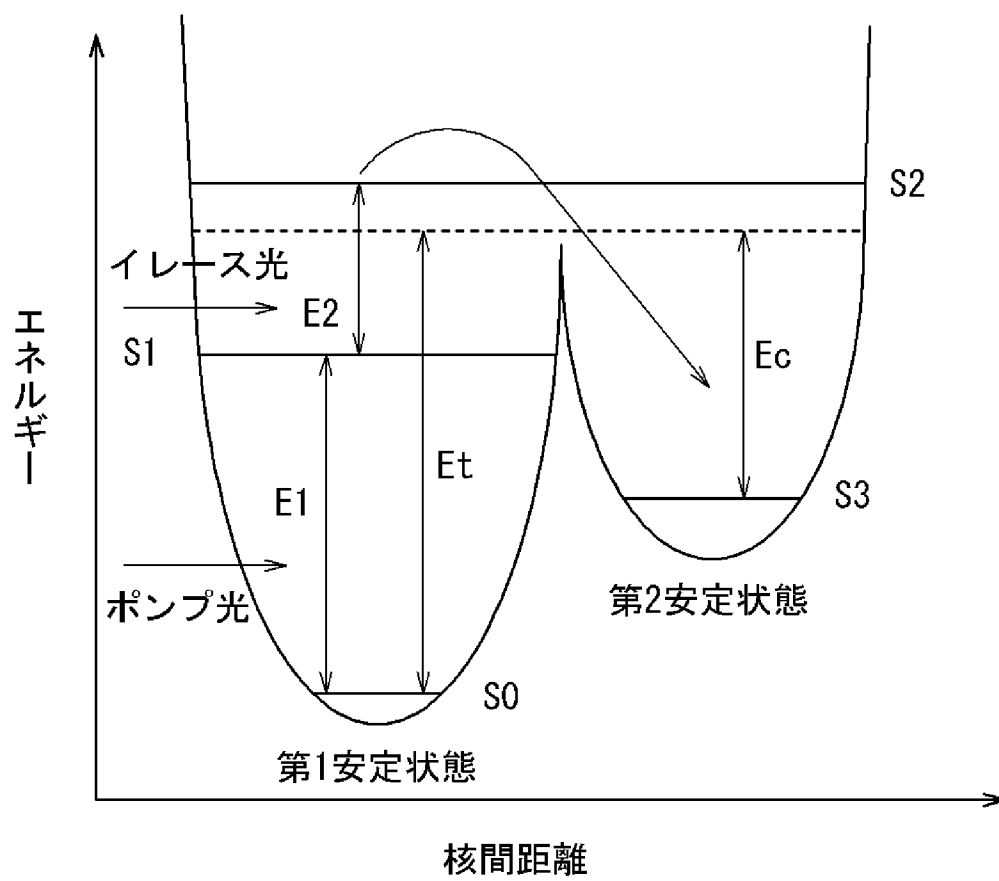
- [10] 上記試料の各観察点において、上記第1の光および上記第2の光を照射してから、上記第1の光を単独照射するように、上記第1の光および上記第2の光の照射タイミングを制御し、

上記第1の光の単独照射により上記フォトクロミック分子から発生する光応答を上記検出部で検出することを特徴とする請求項4に記載の顕微鏡。

- [11] 上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0に変異させる際の障壁エネルギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態S3にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0に復帰させることを特徴とする請求項4に記載の顕微鏡。

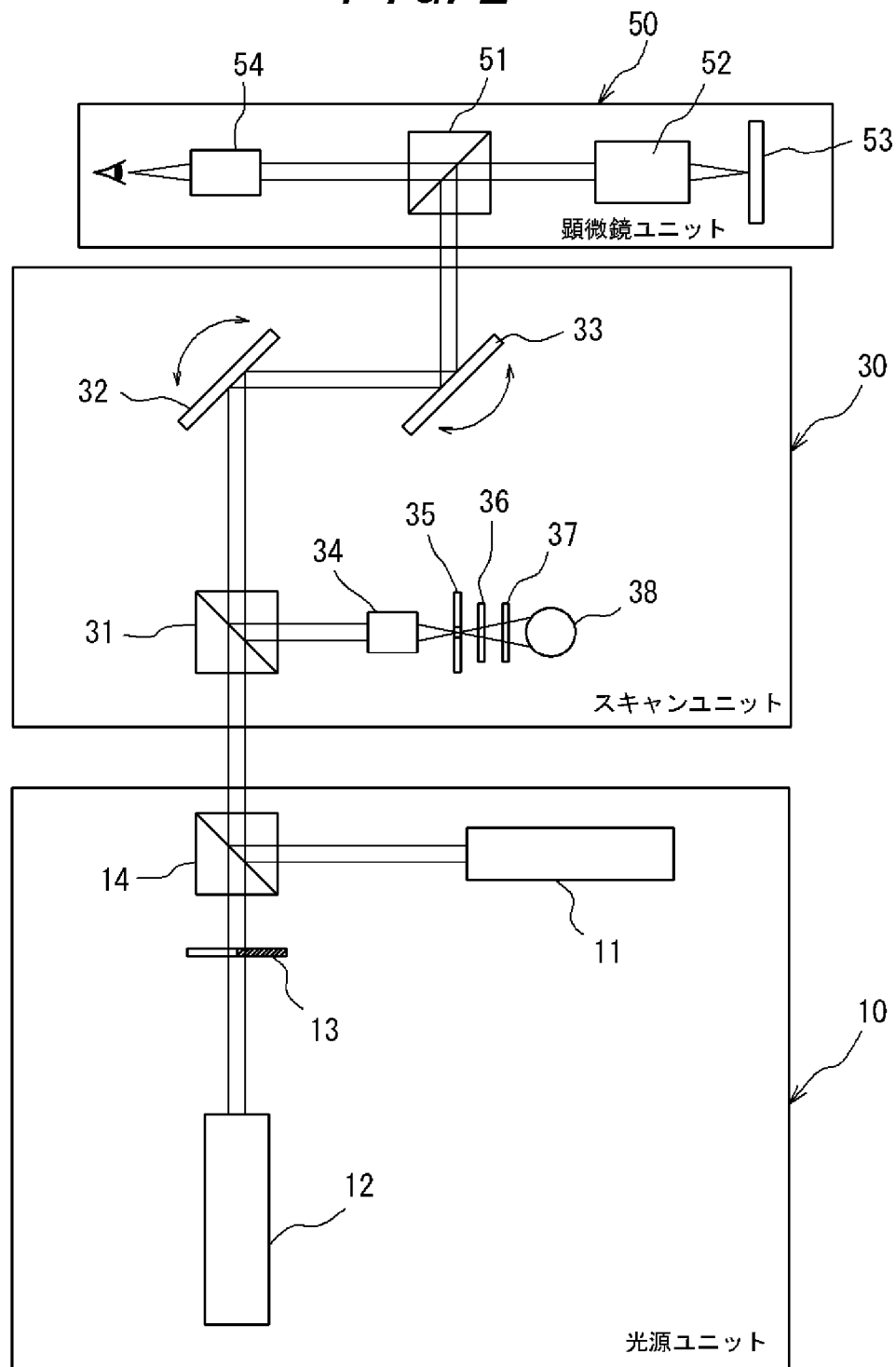
- [12] 上記フォトクロミック分子を上記第2安定状態S3から上記第1安定状態S0に変異させる際の障壁エネルギー E_c よりも大きい光子エネルギーをもつ第3の光を出射する第3の光源を有し、上記試料の各観察点において、上記フォトクロミック分子から発生する光応答の検出後に、当該観察点に上記光学系を経て上記第3の光を照射して、上記第2安定状態S3にある上記フォトクロミック分子を上記第1安定状態S0に復帰させることを特徴とする請求項5に記載の顕微鏡。

[図1]

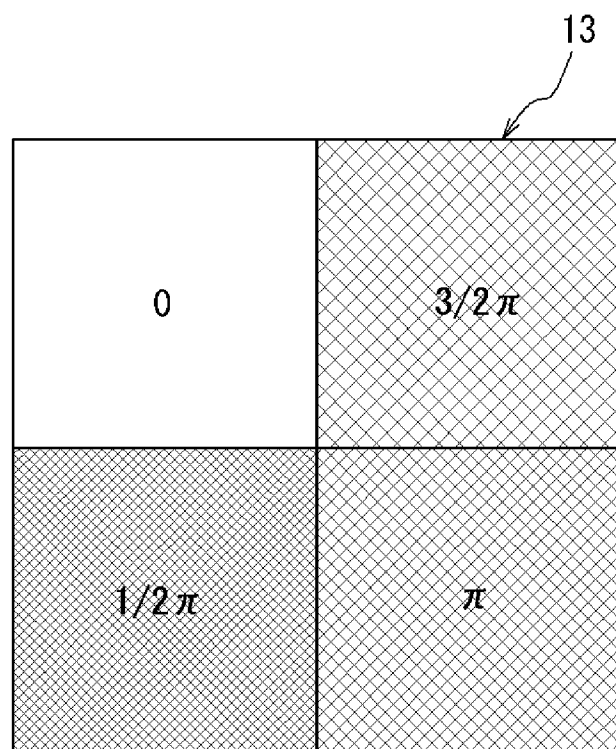
FIG. 1

[図2]

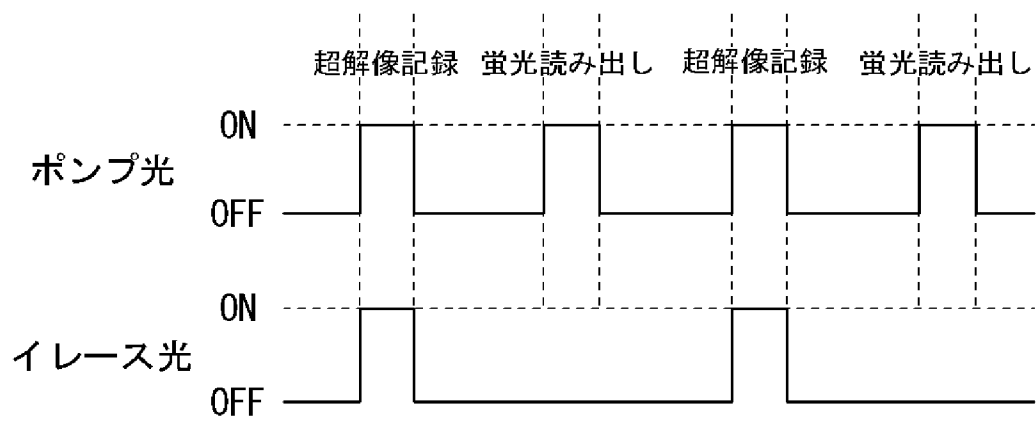
FIG. 2



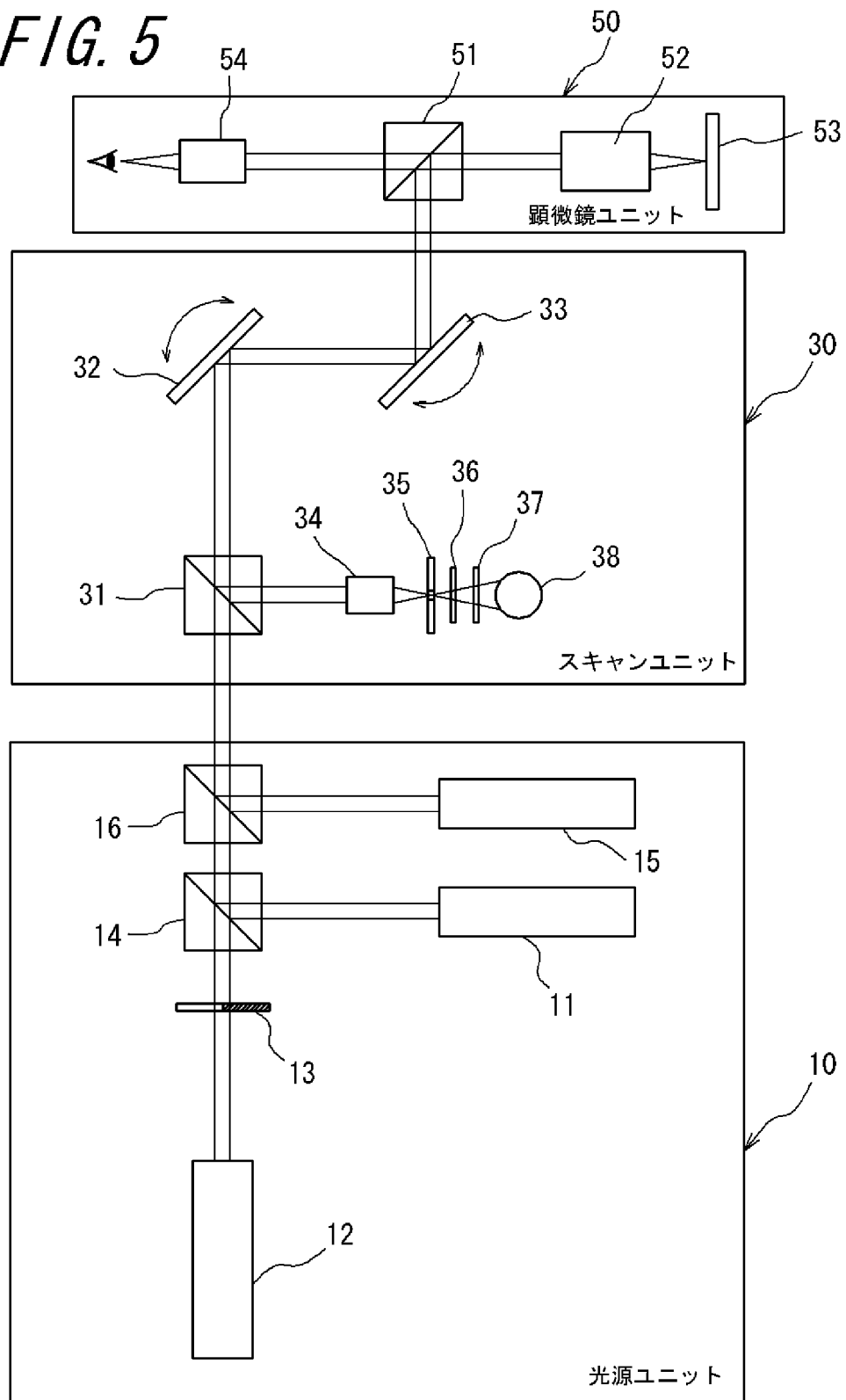
[図3]

FIG. 3

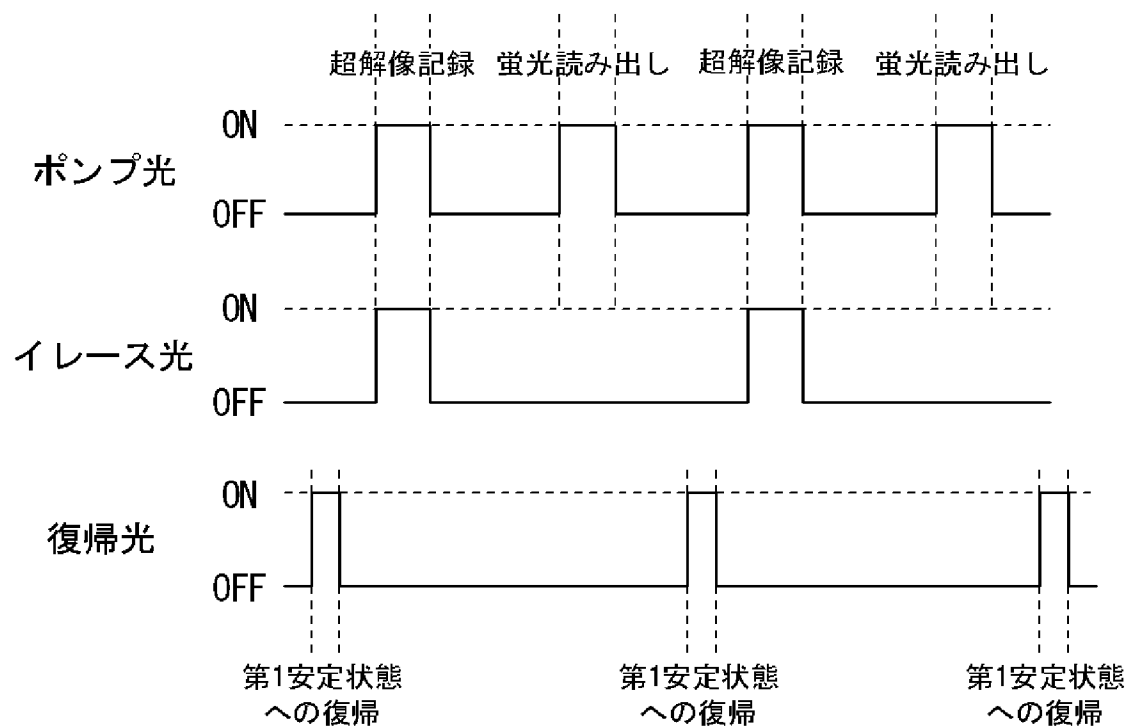
[図4]

FIG. 4

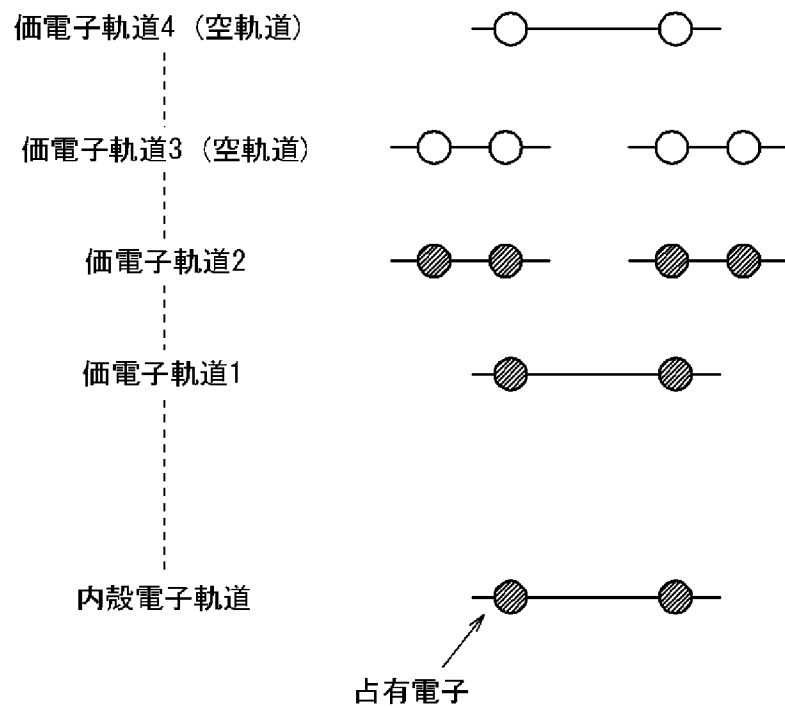
[図5]

FIG. 5

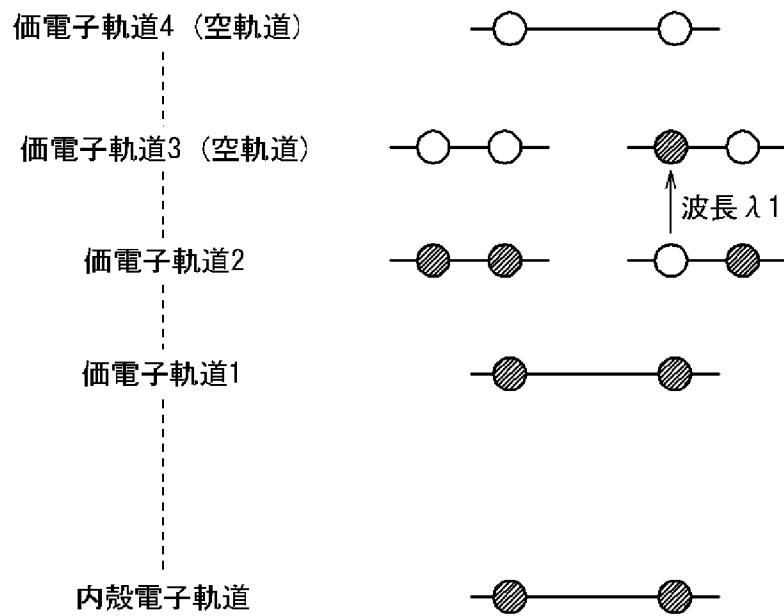
[図6]

FIG. 6

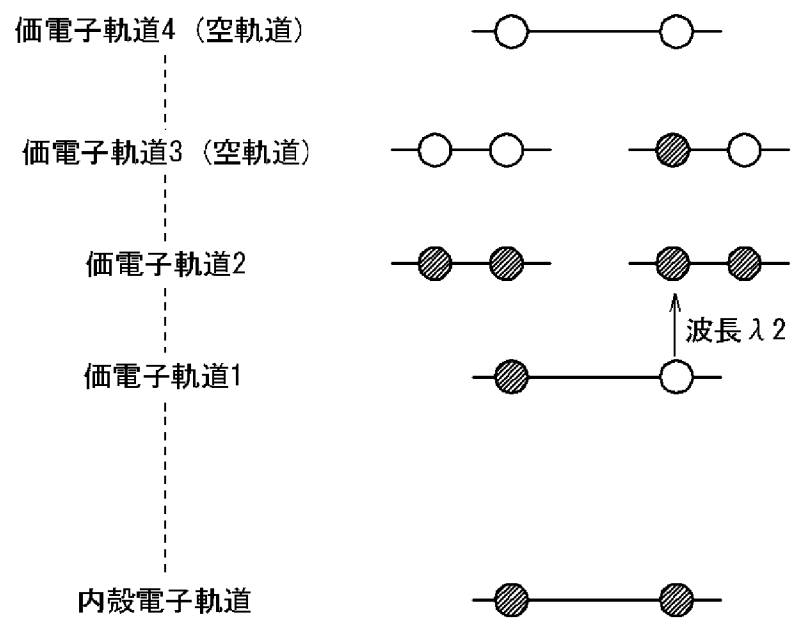
[図7]

FIG. 7

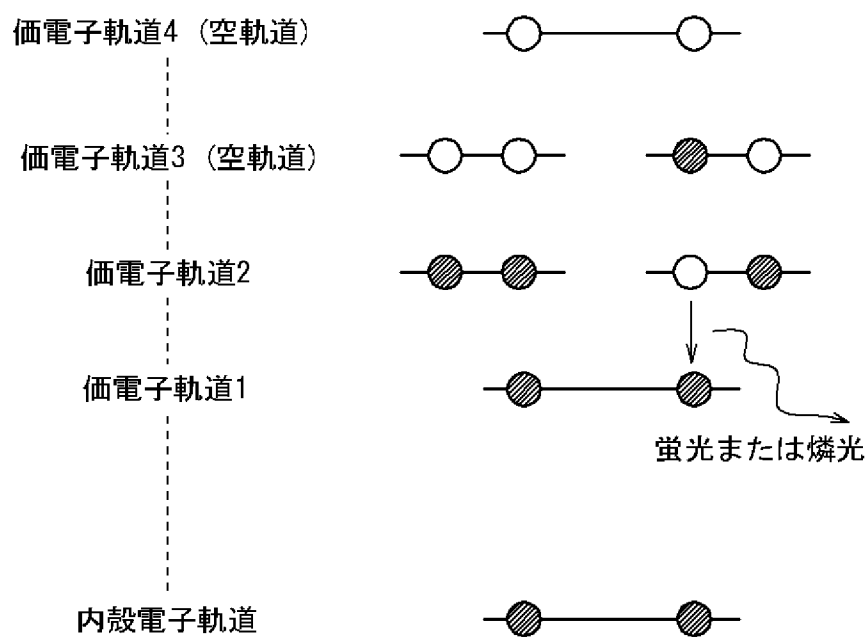
[図8]

FIG. 8

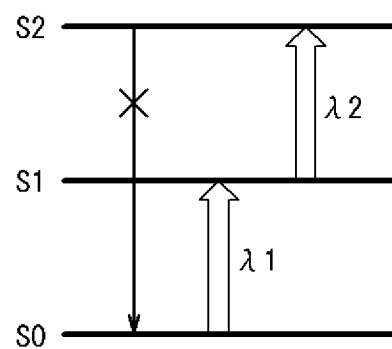
[図9]

FIG. 9

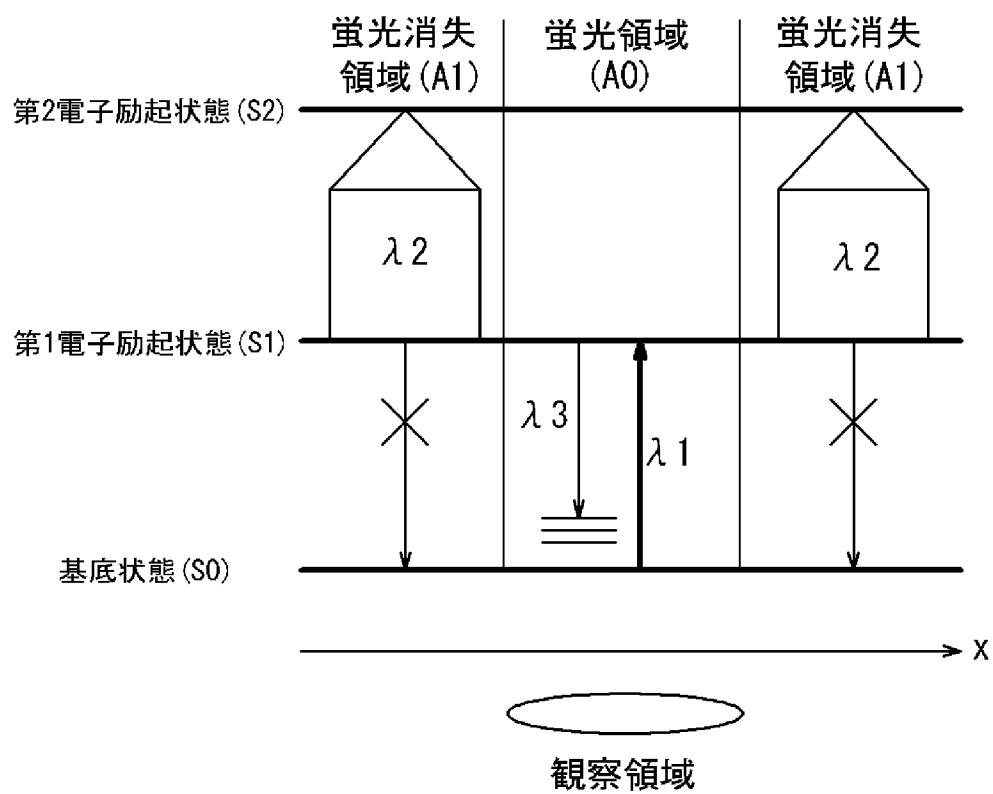
[図10]

FIG. 10

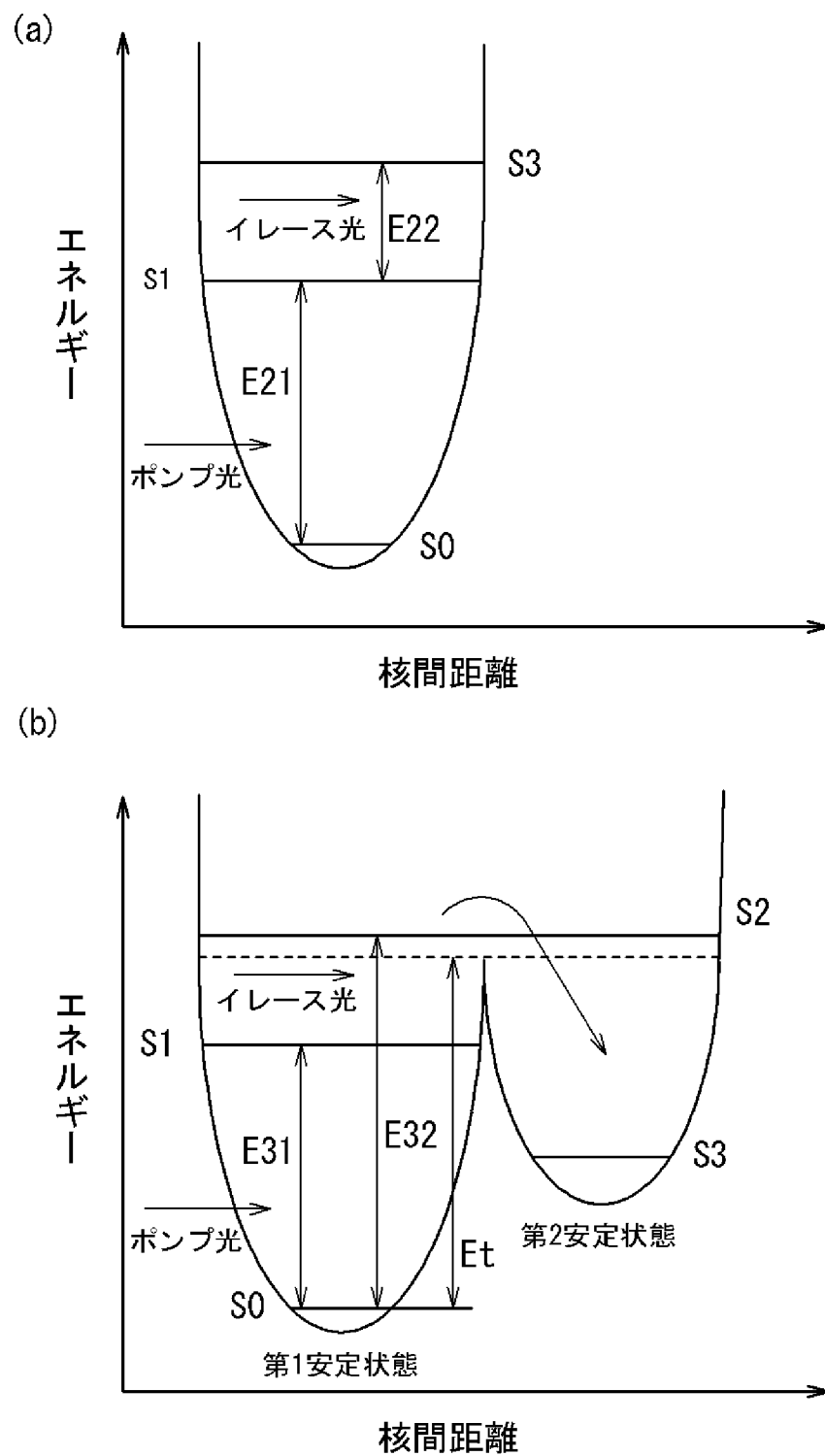
[図11]

FIG. 11

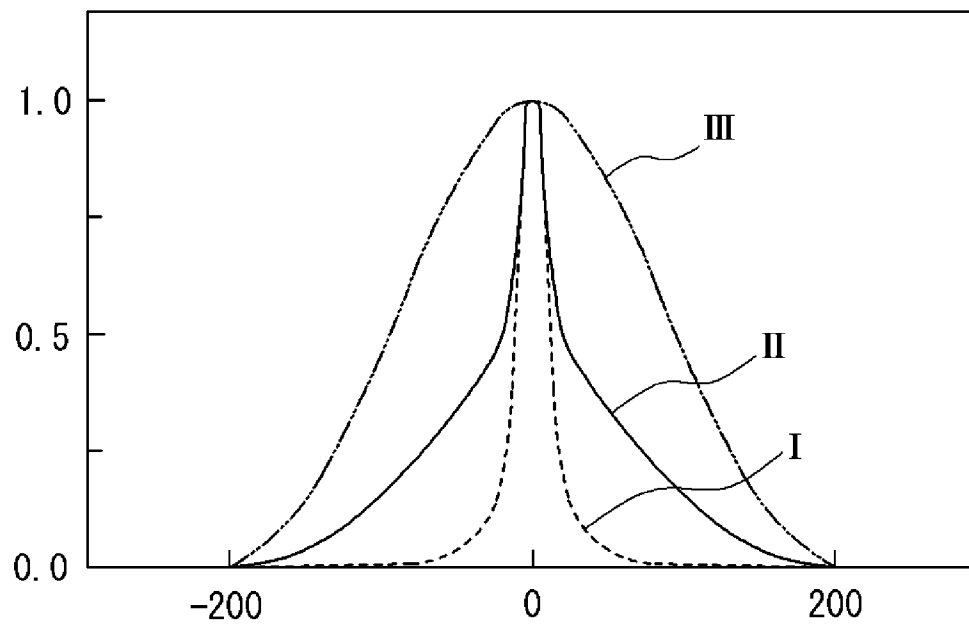
[図12]

FIG. 12

[図13]

FIG. 13

[図14]

FIG. 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B21/00(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i, G02B21/12(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, G02B21/12

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-100102 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 13 April, 2001 (13.04.01), Full text; all drawings & US 6667830 B1 & WO 1999/053356 A1 & DE 19980759 T	1-12

☐ 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
21 September, 2007 (21.09.07)

Date of mailing of the international search report
02 October, 2007 (02.10.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

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, G02B21/12(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, G02B21/12

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 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(JDream2)

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 請求の範囲の番号
A	JP 2001-100102 A（オリンパス光学工業株式会社）2001.04.13, 全文, 全図 & US 6667830 B1 & WO 1999/053356 A1 & DE 19980759 T	1-12

☐ 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

2 1 . 0 9 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

0 2 . 1 0 . 2 0 0 7

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 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

瀬川 勝久

2 V

9 1 2 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 7 1