

(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8月31日(31.08.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/145381 A1

- (51) 国際特許分類:
G01Q 30/02 (2010.01) *G02B 21/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055889
- (22) 国際出願日: 2016年2月26日(26.02.2016)
- (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: 植草 良嗣(UEKUSA, Yoshitsugu); 〒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). 酒井 信明(SAKAI, Nobuaki); 〒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: 蔵田 昌俊, 外(KURATA, Masatoshi et al.); 〒1050014 東京都港区芝3丁目2番1号

セレスティン芝三井ビルディング11階 鈴榮
特許総合事務所内 Tokyo (JP).

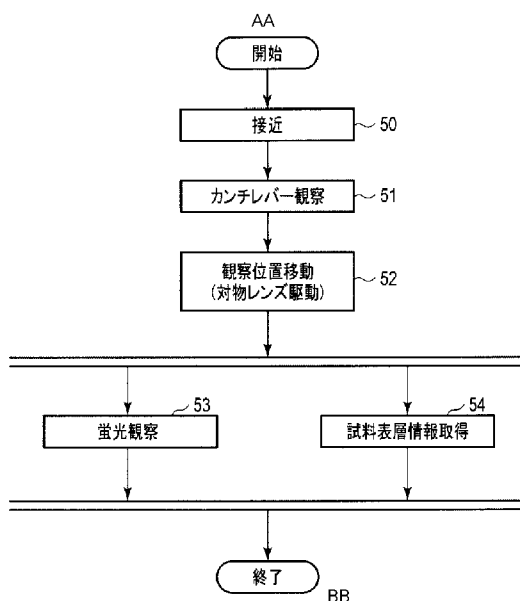
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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), 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),

[続葉有]

(54) Title: OBSERVATION METHOD USING COMPOUND MICROSCOPE HAVING INVERTED OPTICAL MICROSCOPE AND ATOMIC FORCE MICROSCOPE, AND PROGRAM AND COMPOUND MICROSCOPE FOR CARRYING OUT OBSERVATION METHOD

(54) 発明の名称: 倒立型光学顕微鏡と原子間力顕微鏡を有する複合型顕微鏡による観察方法、観察方法を実行するプログラム及び複合型顕微鏡

[図3]



- 50 Approach
51 Cantilever observation
52 Observation position movement (objective lens driving)
53 Fluorescence observation
54 Sample-surface-layer-information acquisition
AA Start
BB End

(57) Abstract: This observation method using a compound microscope having an inverted optical microscope and an atomic force microscope has an approach step (50) in which a cantilever is swept along the Z axis and a probe is made to approach a sample surface layer until sample-surface-layer information can be acquired, a cantilever observation step (51) for observing the cantilever using an inverted optical microscope and acquiring at least shape information for the cantilever, an observation position movement step (52) for moving the observation position of the inverted optical microscope downward along the Z-axis direction at least on the basis of the probe length, a fluorescence observation step (53) for observing fluorescence using the inverted optical microscope, and a sample-surface-layer-information acquisition step (54) for acquiring sample-surface-layer information by sweeping the cantilever at least along the Z-axis. The approach step, cantilever observation step, and observation position movement step are carried out in order. The fluorescence observation step is carried out after the observation position movement step. The sample-surface-layer-information acquisition step is carried out after the approach step (50).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/145381 A1



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))

倒立型光学顕微鏡と原子間力顕微鏡の複合型顕微鏡による観察方法は、カンチレバーをZ軸に沿って走査させて、試料表層情報が取得できるまで探針を試料表層に近づける接近工程(50)と、倒立型光学顕微鏡を通してカンチレバーを観察し、少なくともカンチレバーの形状情報を取得するカンチレバー観察工程(51)と、倒立型光学顕微鏡の観察位置を、少なくとも探針の長さに基づいて、Z軸に沿って下方に向けて移動させる観察位置移動工程(52)と、倒立型光学顕微鏡を通して蛍光観察を行う蛍光観察工程(53)と、カンチレバーを少なくともZ軸に沿って走査させて試料表層情報を取得する試料表層情報取得工程(54)を有する。接近工程とカンチレバー観察工程と観察位置移動工程は順に行う。蛍光観察工程は観察位置移動工程の後に行う。試料表層情報取得工程は、接近工程(50)の後に行う。

明 細 書

発明の名称：

倒立型光学顕微鏡と原子間力顕微鏡を有する複合型顕微鏡による観察方法、観察方法を実行するプログラム及び複合型顕微鏡

技術分野

[0001] 本発明は、倒立型光学顕微鏡と原子間力顕微鏡を有する複合型顕微鏡による観察方法に関する。

背景技術

[0002] 複合型顕微鏡とは、互いに異なる物理情報を取得する少なくとも2種類の顕微鏡を組み合わせた顕微鏡システムである。その代表例として、蛍光観察を行う光学顕微鏡と試料表層の微細な形状を観察する原子間力顕微鏡を組み合わせた複合型顕微鏡がある。この複合型顕微鏡は、同一試料の蛍光情報と試料表層情報の時空間的な相関を得ることができるという利点を有する。

[0003] このような複合顕微鏡の光学顕微鏡には、合焦位置から発せられる蛍光以外の光を低減することでZ軸に沿った分解能（以下、Z分解能）が高められた例えば共焦点顕微鏡やSTEDやSTORMなどの超解像顕微鏡が用いられることがある。共焦点顕微鏡のZ分解能は、500nm～1000nmであり、超解像顕微鏡にいたっては近年では100nm以下まで実現できている。

[0004] このような複合型顕微鏡の従来例は、例えば、Impact of Actin Rearrangement and Degranulation on the Membrane Structure of Primary Mast Cells: A Combined Atomic Force and Laser Scanning Confocal Microscopy Investigation (Biophysical Journal Volume 96 February 2009 1629-1639)に開示されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記従来例においては、蛍光標識された物質が試料内部にのみ存在してい

る試料（細胞）を観察している。しかし、蛍光標識された物質が試料の内部と外部の両方に存在する場合は、光学顕微鏡の観察像すなわち蛍光情報と原子間力顕微鏡の観察像すなわち試料表層情報の位置相関が正しく得られないことがある。

[0006] 図15～図17は、試料42と、蛍光標識された物質44と、試料42の表層に近接した原子間力顕微鏡のカンチレバー22の位置関係を模式的に示している。図15は、Z軸上方から見た図であり、また図16は、図15のX軸プラス方向から見た図である。

[0007] 図15～図17において、試料42は、例えば細胞であり、蛍光標識された物質44は、例えば蛍光標識されたウイルスであり、ウイルスが試料42の内外に点在しているとする。

[0008] 原子間力顕微鏡は、試料42の表層情報を取得する。それに対して、光学顕微鏡は、蛍光観察を行う。蛍光観察では、図17の（a）、（b）、（c）の一点鎖線枠で示すZ軸に沿ったZ分解能の幅（Z観察幅）に含まれている蛍光情報を取得する。光学顕微鏡では、Z分解能の幅（Z観察幅）を、例えば図17の（a）、（b）、（c）に示されるように、Z軸に沿って自由に設定できてしまう。このため、Z分解能の幅（Z観察幅）が試料42の表層にない場合には、原子間力顕微鏡で観察している試料42の表層付近の蛍光情報が正しく得られない、すなわち原子間力顕微鏡の試料表層情報と光学顕微鏡の蛍光情報の正しい位置相関が得られないという問題がある。さらに共焦点顕微鏡や超解像顕微鏡などのZ分解能が高い光学顕微鏡においては、正しい位置相関を得ることがより困難になる。

[0009] 本発明の主な目的は、蛍光情報と試料表層情報の正しい位置相関が得られる複合型顕微鏡による観察方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、ひとつのアスペクトにおいては、試料下方から少なくとも蛍光観察を行う倒立型光学顕微鏡と、試料上方から試料表層情報を取得する原子間力顕微鏡とを有する複合型顕微鏡による観察方法である。複合型顕微鏡は

、上下方向に延びるZ軸を有している。倒立型光学顕微鏡は、試料を保持した透明な基板が載置されるステージと、ステージの下方に配置された対物レンズと、Z軸に沿って対物レンズを駆動する対物レンズ駆動アクチュエータを備えている。原子間力顕微鏡は、ステージの上方に配置される探針を自由端に備えたカンチレバーと、カンチレバーをZ軸に沿って走査させるZ走査アクチュエータを備えている。この複合型顕微鏡による観察方法は、カンチレバーをZ軸に沿って走査させて、試料表層情報が取得できるまで探針を試料表層に近づける接近工程と、倒立型光学顕微鏡を通してカンチレバーを観察し、少なくともカンチレバーの形状情報を取得するカンチレバー観察工程と、倒立型光学顕微鏡の観察位置を、少なくとも探針の長さに基づいて、Z軸に沿って下方に向けて移動させる観察位置移動工程と、倒立型光学顕微鏡を通して蛍光観察を行う蛍光観察工程と、カンチレバーを少なくともZ軸に沿って走査させて試料表層情報を取得する試料表層情報取得工程を有する。接近工程とカンチレバー観察工程と観察位置移動工程は順に行う。蛍光観察工程は観察位置移動工程の後に行う。試料表層情報取得工程は、接近工程の後に行う。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、試料表層情報と蛍光情報の正しい位置相関を得ることが可能になる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、第一の実施形態による複合型顕微鏡を示している。

[図2]図2は、複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示している。

[図3]図3は、第一の実施形態の観察方法の工程フローを示している。

[図4]図4は、図1に示した複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示している。

[図5]図5は、図1に示した複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示しており、Z分解能の幅（Z観察幅）内にカンチレバーが含まれ

ている様子と、Z分解能の幅（Z観察幅）内に探針の先端と試料の表層が含まれている様子を示している。

[図6]図6は、第二の実施形態による複合型顕微鏡を示している。

[図7]図7は、第二の実施形態の観察方法の工程フローを示している。

[図8]図8は、図6に示した複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示しており、観察位置移動工程の直後と時間経過後の状態を示している。

[図9]図9は、第三の実施形態による複合型顕微鏡を示している。

[図10]図10は、第三の実施形態の観察方法の工程フローを示している。

[図11]図11は、試料とその観察領域を示している。

[図12]図12は、蛍光情報と試料表層情報を重ね合わせてモニターに表示する様子を示している。

[図13]図13は、カンチレバーの形状情報を位置基準として蛍光情報と試料表層情報を重ね合わせてモニターに表示する様子を示している。

[図14]図14は、複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示しており、蛍光標識された物質が試料の底部にのみ存在している様子を示している。

[図15]図15は、複合型顕微鏡を通して観察される試料を模式的に示している。

[図16]図16は、複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示している。

[図17]図17は、複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近と、Z分解能の幅（Z観察幅）のいくつかの位置を模式的に示している。

発明を実施するための形態

[0013] <第一の実施形態>

第一の実施形態について、図1～図5を用いて以下に説明する。図1は、本実施形態による複合型顕微鏡を示している。

[0014] 図1に示す複合型顕微鏡は、試料下方から少なくとも試料42および溶液

4 3 内の蛍光観察を行う倒立型光学顕微鏡 1 0 と、試料上方から試料 4 2 の表層の情報（試料表層情報）を取得する原子間力顕微鏡 2 0 と、複合型顕微鏡を制御するコントローラ 3 1 とを備えている。倒立型光学顕微鏡 1 0 は、共焦点顕微鏡と超解像顕微鏡のいずれかで構成されている。複合型顕微鏡はまた、観察結果の表示等を行うためなどのモニター 3 2 と、指示の入力等を行うための入力部 3 3 を備えている。

[0015] 複合型顕微鏡は X 軸と Y 軸と Z 軸を有している。Z 軸は上下方向すなわち鉛直方向に延びており、X 軸は Z 軸に直交しており、Y 軸は X 軸と Z 軸の両方に直交している。

[0016] 倒立型光学顕微鏡 1 0 は、試料 4 2 を保持した透明な基板 4 1 が載置されるステージ 1 1 と、ステージ 1 1 の下方に配置された対物レンズ 1 2 と、Z 軸に沿って対物レンズ 1 2 を駆動する対物レンズ駆動アクチュエータ 1 3 と、例えば CCD カメラなどの撮像ユニット 1 4 とを備えている。より正確には、ステージ 1 1 は基板 4 1 と接触する載置面 1 1 a を有しており、対物レンズ 1 2 はステージ 1 1 の載置面 1 1 a の下方に配置されている。

[0017] 対物レンズ 1 2 を Z 軸に沿って駆動する対物レンズ駆動アクチュエータ 1 3 はコントローラ 3 1 により制御され、それにより Z 分解能の幅（Z 観察幅）の位置を、例えば図 1 7 の（a）、（b）、（c）のように Z 軸に沿って自由に設定し得る。

[0018] 倒立型光学顕微鏡 1 0 で取得する蛍光情報とは、例えば、細胞の観察においては、低分子有機化合物の蛍光色素や、GFP 等の蛍光タンパク質などの、蛍光物質の情報であり、また、ケージド化合物や自家蛍光の情報を含む、倒立型光学顕微鏡 1 0 で取得可能な情報のことである。

[0019] 倒立型光学顕微鏡 1 0 は、合焦位置から発せられる蛍光以外の光を低減することで Z 軸に沿った分解能（以下、Z 分解能）を高くした、例えば共焦点顕微鏡または STED や STORM などの超解像顕微鏡が用いられる。共焦点顕微鏡の Z 分解能は 500 nm ~ 1000 nm であり、超解像顕微鏡においては最高で 100 nm 以下に達している。

- [0020] 原子間力顕微鏡 20 は、倒立型光学顕微鏡 10 の上に搭載されている。原子間力顕微鏡 20 は、ステージ 11 の上方に配置される自由端に探針 21 を備えたカンチレバー 22 と、カンチレバー 22 を Z 軸に沿って微動走査させる Z 圧電素子 25 と、カンチレバー 22 を Z 軸に沿って粗動走査させる Z 粗動アクチュエータ 26 を備えている。カンチレバー 22 は支持体 23 によって片持ちに支持されており、支持体 23 はホルダ 24 によって Z 圧電素子 25 に取り付けられている。Z 圧電素子 25 と Z 粗動アクチュエータ 26 は、それら両方でカンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させる Z 走査アクチュエータ 27 を構成している。原子間力顕微鏡 20 はまた、カンチレバー 22 を X 軸と Y 軸に沿って走査させる XY 走査アクチュエータ 28 と、カンチレバー 22 の変位を検出する変位センサ 29 を備えている。
- [0021] 探針 21 の先端はその曲率半径が 10 nm 以下であり、これは超解像顕微鏡であっても観察できないほど細い。
- [0022] Z 圧電素子 25 と XY 走査アクチュエータ 28 は、例えば、チューブスキヤナを用いて構成されてもよいし、特開 2014-35252 号公報の走査機構を用いて構成されてもよい。
- [0023] Z 走査アクチュエータ 27 は、コントローラ 31 により制御され、コントローラ 31 から供給される図示しない走査信号に応じてカンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させる。
- [0024] ここでカンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させるとは、カンチレバー 22 を Z 軸に沿って動的にあるいは静的に変位させるだけでなく、カンチレバー 22 を変位した状態に維持することも含んでいる。
- [0025] 従って Z 走査アクチュエータ 27 は、コントローラ 31 から供給される Z 走査信号に応じてカンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させ、それにより探針 21 の先端と試料 42 の表層との間の Z 軸に沿った距離を変えることができる。またその距離を維持することもできる。
- [0026] 変位センサ 29 は、カンチレバー 22 の変位を示す変位信号をコントローラ 31 に出力する。コントローラ 31 は、入力される変位信号に基づいて試

料表層情報を取得する。

[0027] 原子間力顕微鏡 20 で取得する試料表層情報とは、例えば、試料の凹凸形状、粘弾性情報、電気的情報などの、試料と探針間に生じる物理的相互作用の情報である。例えば、試料の凹凸形状の情報は、カンチレバー 22 を X Y 走査および Z 走査させることによって得られる試料表層の画像情報であり、また粘弾性情報は、カンチレバー 22 を X Y 走査させずに、Z 走査のみによって得られる、探針 21 と試料 42 の間に働く力学的な情報である。

[0028] 試料 42 を保持した透明な基板 41 は、倒立型光学顕微鏡 10 のステージ 11 の上に載置される。例えば、ステージ 11 は図示しない X Y ステージを有しており、基板 41 は、この X Y ステージの上に載置される。試料 42 と探針 21 とカンチレバー 22 は、基板 41 に保持された溶液 43 によって包囲される。

[0029] 図 2 は、複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を X 軸プラス方向から見た図を模式的に示している。試料 42 は、例えば、生細胞であり、蛍光標識された物質 44 は、例えば、蛍光標識されたウイルスであり、細胞内外に点在しているものとする。

[0030] 次に、このように構成された本実施形態の複合型顕微鏡の動作の流れ（観察方法の工程）を図 3 ないし図 5 を用いて説明する。図 3 は、本実施形態の観察方法の工程フローを示している。図 4 と図 5 は、複合型顕微鏡を通して観察される試料表層付近を模式的に示している。

[0031] 接近工程 50 では、Z 走査アクチュエータ 27 を伸縮動作させることにより、詳しくは、Z 走査アクチュエータ 27 を構成する Z 圧電素子 25 を伸ばすことにより、あるいは Z 粗動アクチュエータ 26 を縮めることにより、またはその両方により、カンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させて、図 4 に示すように、探針 21 の先端と試料 42 の表層の相互作用が生じるまで、すなわち試料表層情報が取得できるまで、探針 21 の先端を試料 42 の表層に近づける。

[0032] 次のカンチレバー観察工程 51 では、倒立型光学顕微鏡 10 を通してカン

チレバー 22 を観察し、カンチレバー 22 の形状情報を取得する。望ましくは探針 21 の根元部分を観察し、カンチレバー 22 の根元部分の形状情報を取得する。このカンチレバー観察工程 51 では、カンチレバー 22 の自家蛍光の蛍光観察によって、あるいは明視野観察によってカンチレバー 22 を観察する。このカンチレバー観察工程 51 では、対物レンズ駆動アクチュエータ 13 により対物レンズ 12 を Z 軸に沿って駆動し、Z 分解能の幅（Z 観察幅）の Z 軸に沿った位置を図 5 の（a）に示す Z 分解能の幅（Z 観察幅）56 の位置に設定する。Z 分解能の幅（Z 観察幅）56 内にはカンチレバー 22 が含まれている。

[0033] 次の観察位置移動工程 52 では、倒立型光学顕微鏡 10 の観察位置すなわち Z 分解能の幅（Z 観察幅）の位置を、少なくとも探針 21 の長さに基づいて、例えば探針 21 の長さと同じ距離だけ、Z 軸に沿って試料 42 の下方の向きに移動させる。これにより、Z 分解能の幅（Z 観察幅）の位置は、図 5 の（b）に示す Z 分解能の幅（Z 観察幅）57 の位置に設定される。Z 分解能の幅（Z 観察幅）57 内には探針 21 の先端と試料 42 の表層が含まれている。

[0034] この観察位置移動工程 52 においては、Z 分解能の幅（Z 観察幅）57 の位置の移動は、対物レンズ駆動アクチュエータ 13 により対物レンズ 12 を駆動することで行う。その駆動量は、単に探針 21 の長さに基づいて設定されてよいが、好ましくは、探針 21 の長さや、溶液 43 の屈折率や、対物レンズ 12 として油浸対物レンズを使用する場合はイマージョンオイルの屈折率などに基づいて設定される。

[0035] なお、対物レンズ 12 の駆動には、対物レンズ 12 の外装を含めたユニット全体を駆動する方法と、対物レンズ 12 の内部にある少なくともひとつのレンズを駆動する方法がある。油浸対物レンズ、水浸対物レンズ、またはシリコーン浸対物レンズなどの液浸対物レンズを使う場合は、対物レンズ 12 のユニット全体を駆動すると、その動作が液体を介して試料 42 が載置された基板 41 に振動ノイズを生じさせる可能性があるため、対物レンズ 12 の

内部にある少なくともひとつのレンズを駆動する方法が望ましい。この方法においては、対物レンズ 12 の外装が動かないため、基板 41 への振動ノイズの影響が低減される。また、特開 2005-10516 号公報に開示された対物レンズと試料の距離を変えないで焦点移動が可能な顕微鏡の構成を用いても構わない。

[0036] 以上の 3 つの工程により、Z 分解能の幅（Z 観察幅）の位置を、図 5 の（b）に示すように試料 42 の表層に設定することができる。

[0037] その後、蛍光観察工程 53 と試料表層情報取得工程 54 を行う。

[0038] 蛍光観察工程 53 では、倒立型光学顕微鏡 10 を通して、試料 42 および溶液 43 内の蛍光観察を行う。

[0039] 試料表層情報取得工程 54 では、原子間力顕微鏡 20 により、少なくともカンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させて、試料表層情報である試料 42 の表層の情報を取得する。

[0040] 蛍光観察工程 53 と試料表層情報取得工程 54 は、順に行ってもよいが、時間変化を伴う位置相関を得たい場合は同時に行うことが望ましい。

[0041] なお、試料表層情報取得工程 54 の開始は、観察位置移動工程 52 の後に限らない。例えば、試料表層情報取得工程 54 の開始は、カンチレバー観察工程 51 および観察位置移動工程 52 の役割を妨げない場合は、接近工程 50 の直後であってもよい。

[0042] すなわち、接近工程 50 とカンチレバー観察工程 51 と観察位置移動工程 52 は順に行い、蛍光観察工程 53 は、接近工程 50 とカンチレバー観察工程 51 と観察位置移動工程 52 を順に行った後に行うが、試料表層情報取得工程 54 は、接近工程 50 の後に行う。試料表層情報取得工程 54 は、望ましくは観察位置移動工程 52 の後に行う。

[0043] 以上の工程を行うため、この観察方法を実行するプログラムがコントローラ 31 にインストールされている。

[0044] 本実施形態の観察方法を実施することにより、原子間力顕微鏡 20 で表層情報を取得する試料 42 の表層近傍の蛍光情報が正しく得られ、その結果、

試料表層情報と蛍光情報の正しい位置相関を得ることが可能になる。

[0045] 本実施形態においては、探針先端の曲率半径が10nm以下であり、探針先端が超解像顕微鏡であっても観察できないほど細いために、まず接近工程50により探針21の先端を試料42の表層に近づけて、その次にカンチレバー観察工程51によりカンチレバー22を観察し、最後に観察位置移動工程52により倒立型光学顕微鏡10のZ分解能の幅（Z観察幅）の位置を探針21の長さに基づいて移動させることにより、Z分解能の幅（Z観察幅）の位置を試料42の表層に設定している。

[0046] Z分解能の幅（Z観察幅）の位置の基準としては、カンチレバー22、望ましくはカンチレバー22の探針21の根元部分を用いるのが最も精度が高くなる。

[0047] <第二の実施形態>

以下、図6～図8を参照しながら本実施形態について説明する。図6は、本実施形態による複合型顕微鏡を示している。図6において、図1に示した部材と同一の参照符号を付した部材は同様の部材であり、その詳しい説明は省略する。

[0048] 図6に示す複合型顕微鏡は、図1に示す複合型顕微鏡に対して、追従制御コントローラ60が追加されている。

[0049] コントローラ31から出力される微動用の走査信号Aは、Z圧電素子25に供給され、コントローラ31から出力される粗動用の走査信号Bは、Z粗動アクチュエータ26に供給される。言い換えると、コントローラ31から出力される走査信号Aと走査信号Bの両方から成る走査信号が、Z圧電素子25とZ粗動アクチュエータ26で構成されるZ走査アクチュエータ27に供給される。

[0050] Z走査アクチュエータ27は、コントローラ31により制御され、コントローラ31から供給される走査信号に応じてカンチレバー22をZ軸に沿って走査させる。

[0051] ここでカンチレバー22をZ軸に沿って走査させるとは、カンチレバー2

2をZ軸に沿って動的にあるいは静的に変位させるだけでなく、カンチレバー22を変位した状態に維持することも含んでいる。

[0052] 従ってZ走査アクチュエータ27は、コントローラ31から供給される走査信号に応じてカンチレバー22をZ軸に沿って走査させ、それにより探針21の先端と試料42の表層のZ軸に沿った距離を変えることができる。またその距離を維持することもできる。

[0053] Z圧電素子25とZ粗動アクチュエータ26にそれぞれ供給される走査信号Aと走査信号Bは、言い換えるとZ走査アクチュエータ27に供給される走査信号は、追従制御コントローラ60にも供給される。

[0054] 追従制御コントローラ60は、対物レンズ12がカンチレバー22のZ軸に沿った走査に追従して駆動されるよう対物レンズ駆動アクチュエータ13を制御するものである。

[0055] 詳しくは、追従制御コントローラ60は、走査信号Aと走査信号Bから成る走査信号に基づいて対物レンズ駆動アクチュエータ13を制御するものである。

[0056] この追従制御コントローラ60は、走査信号Aと走査信号Bから成る走査信号に基づいて駆動信号Cを生成し、駆動信号Cを対物レンズ駆動アクチュエータ13に供給する。

[0057] 詳しくは、追従制御コントローラ60は、まず、供給される走査信号Aと走査信号BからZ圧電素子25とZ粗動アクチュエータ26の伸縮量をそれぞれ求める。次にZ圧電素子25の伸縮量とZ粗動アクチュエータ26の伸縮量に基づいてカンチレバー22のZ軸に沿った変位量を求める。さらにカンチレバー22のZ軸に沿った変位量から対物レンズ12の駆動量を求める。そして、その変位量に基づき駆動信号Cを生成し、対物レンズ駆動アクチュエータ13に供給する。

[0058] 対物レンズ駆動アクチュエータ13の駆動量は、探針21の長さや、試料42の屈折率や、対物レンズ12として油浸対物レンズを使用する場合はイマージョンオイルの屈折率などに基づいて求められる。

- [0059] なお、追従制御コントローラ 60 が走査信号に基づいて対物レンズ駆動アクチュエータ 13 を制御する以外に、様々な変形が考えられる。例えば、Z 走査アクチュエータ 27 に変位センサを設け、変位センサで得られる Z 走査アクチュエータ 27 の走査量（カンチレバー 22 の変位量と同等）の情報に基づいて対物レンズ駆動アクチュエータ 13 を制御してもよい。
- [0060] また、追従制御コントローラ 60 は、複合型顕微鏡のコントローラ 31 に内蔵されていてもよい。
- [0061] 図 7 は、本実施形態の観察方法の工程フローを示している。本実施形態の観察方法は、第一の実施形態で説明した図 3 に示す観察方法の工程に加えて、観察位置追従工程 71 を有している。
- [0062] 観察位置追従工程 71 は、観察位置追従開始工程 72 と蛍光観察工程 53 と観察位置追従終了工程 74 を有している。すなわち観察位置追従工程 71 は、蛍光観察工程 53 を含んでいる。
- [0063] 観察位置追従工程 71 では、倒立型光学顕微鏡 10 の Z 軸に沿った観察位置をカンチレバー 22 の Z 軸に沿った走査に追従して移動させる。言い換えると、対物レンズ駆動アクチュエータ 13 は、対物レンズ 12 がカンチレバー 22 の Z 軸に沿った走査に追従するように対物レンズ 12 を駆動する。
- [0064] 本実施形態の観察方法は、第一の実施形態で説明した図 3 の観察位置移動工程 52 に続いて以下の工程を行う。図 8 の（a）は、観察位置移動工程 52 の直後の状態を示す。
- [0065] 観察位置移動工程 52 と蛍光観察工程 53 の間に観察位置追従工程 71 を開始する。すなわち観察位置移動工程 52 と蛍光観察工程 53 の間に観察位置追従開始工程 72 を行う。
- [0066] 観察位置追従開始工程 72 が開始された後で、試料表層情報取得工程 54 と蛍光観察工程 53 を開始する。
- [0067] 試料表層情報取得工程 54 では、原子間力顕微鏡 20 により、少なくともカンチレバー 22 を Z 軸に沿って走査させて、試料表層情報である試料 42 の表層の情報を取得する。

[0068] 蛍光観察工程 5 3 では、倒立型光学顕微鏡 1 0 を通して、試料 4 2 および溶液 4 3 内の蛍光観察を行う。

[0069] 試料表層情報取得工程 5 4 と蛍光観察工程 5 3 は、時間変化を伴う位置相関を得たい場合は同時に行うことが望ましい。

[0070] なお、試料表層情報取得工程 5 4 の開始は、観察位置移動工程 5 2 の後に限らない。例えば、試料表層情報取得工程 5 4 の開始は、カンチレバー観察工程 5 1 および観察位置移動工程 5 2 の役割を妨げない場合は、接近工程 5 0 の直後であってもよい。

[0071] 試料表層情報取得工程 5 4 と蛍光観察工程 5 3 が終了した後で、観察位置追従工程 7 1 を終了する。すなわち観察位置追従終了工程 7 4 を行う。

[0072] 以上の工程を行うため、この観察方法を実行するプログラムがコントローラ 3 1 にインストールされている。

[0073] 以上の説明から分かるように、本実施形態では、第一の実施形態と同等の効果が得られる。すなわち、原子間力顕微鏡 2 0 で取得をする試料 4 2 の表層近傍の蛍光情報が正しく得られ、その結果、試料表層情報と蛍光情報の正しい位置相関を得ることが可能になる。

[0074] さらに、本実施形態には次の効果がある。例えば、試料 4 2 が生きた細胞であり、その表層の Z 軸に沿った位置が、時間経過により、図 8 の (a) から (b)、(c) と変化したときに、観察位置追従工程 7 1 を行わない場合には、試料 4 2 の表層近傍の蛍光情報が正しく得られなくなる。これに対して本実施形態では、観察位置追従工程 7 1 を行っているため、試料 4 2 の表層の Z 軸に沿った位置が、Z 分解能の幅 (Z 観察幅) 5 7 を超えて時間的に変化した場合であっても、試料 4 2 の表層近傍の蛍光情報が正しく得られる。

[0075] <第三の実施形態>

第三の実施形態について、図 9 ～図 1 2 を用いて以下に説明する。図 9 は、本実施形態による複合型顕微鏡を示している。図 9 において、図 6 に示した部材と同一の参照符号を付した部材は同様の部材であり、その詳しい説明

は省略する。

[0076] 本実施形態の複合型顕微鏡は、図 6 に示す第二の実施形態の複合型顕微鏡とはコントローラだけが異なっている。図 9 に示す本実施形態の複合型顕微鏡は、第二の実施形態のコントローラ 31 に代えて、コントローラ 34 を備えている。

[0077] コントローラ 34 は、試料表層情報と蛍光情報を重ね合わせる画像処理を行う。モニター 32 は、試料表層情報と蛍光情報が重ね合わせられた画像を表示する。

[0078] 図 10 は、本実施形態の観察方法の工程フローを示している。本実施形態の観察方法は、第二の実施形態で説明した図 7 に示した観察方法の工程に加えて、画像表示工程 81 と観察終了工程 82 を有している。

[0079] 画像表示工程 81 では、試料表層情報取得工程 54 で取得された試料表層情報と、蛍光観察工程 53 で取得された蛍光情報を重ね合わせてモニター 32 に表示する。

[0080] 画像表示工程 81 は、試料表層情報取得工程 54 および蛍光観察工程 53 が終了した後、かつ観察位置追従終了工程 74 の前に行われる。

[0081] 試料表層情報取得工程 54 および蛍光観察工程 53 で取得される情報は、それぞれが、例えばライン単位でも、画像単位でも、動画単位でも、どのような単位でもよいが、本実施形態では、それぞれの情報が画像単位であるとして説明する。

[0082] 画像表示工程 81 では、例えば、図 11 に示すように、試料 90 の領域 91 を観察した場合、モニター 32 には、図 12 に示すように、蛍光情報 92 と試料表層情報 93 が重ね合わされた画像 94 が表示される。

[0083] また画像表示工程 81 では、図 13 に示すように、カンチレバー観察工程 51 で取得されたカンチレバー 22 の形状情報 95 を Z 軸に垂直な X Y 面内の位置基準として蛍光情報 92 と試料表層情報 93 を重ね合わせてモニター 32 に表示してもよい。具体的には、カンチレバー 22 の形状情報 95 と蛍光情報 92 を重ね合わせて蛍光情報 92 の基準位置 97 を決め、カンチレバ

ー 2 2 の形状情報 9 5 と試料表層情報 9 3 を重ね合わせて試料表層情報 9 3 の基準位置 9 6 を決め、基準位置 9 7 と基準位置 9 6 を用いて蛍光情報 9 2 と試料表層情報 9 3 の重ね合わせ画像を生成してモニター 3 2 に表示してもよい。

[0084] 観察終了工程 8 2 では、観察終了かどうかを判断する。観察終了でなければ、蛍光観察工程 5 3 と試料表層情報取得工程 5 4 に戻る。観察終了であれば、観察位置追従終了工程 7 4 に進む。

[0085] 以上の工程を行うため、この観察方法を実行するプログラムがコントローラ 3 4 にインストールされている。

[0086] 以上の説明から分かるように、本実施形態では、蛍光情報 9 2 と試料表層情報 9 3 を重ね合わせて表示するので、試料表層情報と蛍光情報の位置相関をより精度よく得ることが可能になる。

[0087] 本発明においては、その効果は、図 2 に示すように、蛍光標識された物質 4 4 が試料 4 2 の内外の両方に存在する場合に限らない。本発明においては、蛍光標識された物質 4 4 が試料 4 2 の内部にしか存在しない場合でも、同様の効果が得られる。

[0088] 例えば、図 1 4 に示すように、蛍光標識された物質 4 4 が試料 4 2 の表層近傍には存在せず、試料 4 2 の底部にのみ存在している場合は、本発明に従わなければ、倒立型光学顕微鏡 1 0 は、蛍光情報を取得しようとする必然的に、試料 4 2 の底部の蛍光情報を取得してしまう。つまり倒立型光学顕微鏡 1 0 は、原子間力顕微鏡 2 0 が観察する試料 4 2 の表層とは（位置相関を議論してはいけないほどに）大きくズレた Z 軸に沿った位置の蛍光情報を取得することになる。このとき取得すべき蛍光情報とは、「蛍光標識された物質 4 4 は試料表層には無い」ということであり、これが正しい蛍光情報である。しかしながら、従来の複合型顕微鏡では、この正しい蛍光情報を取得することができない。加えて最も重要な問題は、従来の複合型顕微鏡では、「大きくズレた Z 軸に沿った位置の蛍光情報を取得していることが認識できない」ということにある。

[0089] 本発明では、倒立型光学顕微鏡 10 の Z 分解能の幅（Z 観察幅）の位置は、蛍光標識された物質 44 の有無に関係なく、試料 42 の表層に合わせられる。従って、本発明は、このような問題をも解決することができる。

[0090] また本発明においては、その効果は、試料 42 が溶液 43 中に存在する場合に限らない。例えば上述した「蛍光標識された物質 44 が試料 42 の内部にしか存在しない場合」は、試料 42 が大気中に存在する場合でも効果が得られる。

請求の範囲

[請求項1]

試料下方から少なくとも蛍光観察を行う倒立型光学顕微鏡と、試料上方から試料表層情報を取得する原子間力顕微鏡とを有する複合型顕微鏡による観察方法であって、

前記複合型顕微鏡は、上下方向に延びるZ軸を有しており、

前記倒立型光学顕微鏡は、試料を保持した透明な基板が載置されるステージと、前記ステージの下方に配置された対物レンズと、Z軸に沿って前記対物レンズを駆動する対物レンズ駆動アクチュエータを備えており、

前記原子間力顕微鏡は、前記ステージの上方に配置される探針を自由端に備えたカンチレバーと、前記カンチレバーをZ軸に沿って走査させるZ走査アクチュエータを備えており、

前記観察方法は、

前記カンチレバーをZ軸に沿って走査させて、試料表層情報が取得できるまで前記探針を試料表層に近づける接近工程と、

前記倒立型光学顕微鏡を通して前記カンチレバーを観察し、少なくとも前記カンチレバーの形状情報を取得するカンチレバー観察工程と、

前記倒立型光学顕微鏡の観察位置を、少なくとも前記探針の長さに基づいて、Z軸に沿って下方に向けて移動させる観察位置移動工程と、

、

前記倒立型光学顕微鏡を通して蛍光観察を行う蛍光観察工程と、

前記カンチレバーを少なくともZ軸に沿って走査させて試料表層情報を取得する試料表層情報取得工程を有しており、

前記接近工程と前記カンチレバー観察工程と前記観察位置移動工程は順に行い、

前記蛍光観察工程は前記観察位置移動工程の後に行い、

前記試料表層情報取得工程は、前記接近工程の後に行う複合型顕微

鏡による観察方法。

- [請求項2] 前記観察位置移動工程は、前記対物レンズを駆動する対物レンズ駆動工程を含んでいる、請求項1に記載の観察方法。
- [請求項3] 前記試料表層情報取得工程は、前記観察位置移動工程の後に行う、請求項1に記載の観察方法。
- [請求項4] 前記蛍光観察工程を含むとともに、前記倒立型光学顕微鏡のZ軸に沿った観察位置を前記カンチレバーのZ軸に沿った走査に追従して移動させる観察位置追従工程を有し、前記観察位置移動工程と前記蛍光観察工程の間に前記観察位置追従工程を開始する、請求項1に記載の観察方法。
- [請求項5] 前記観察位置移動工程と前記観察位置追従工程の少なくともどちらか一方は、前記対物レンズを駆動する対物レンズ駆動工程を含んでいる、請求項4に記載の観察方法。
- [請求項6] 前記試料表層情報取得工程で取得された試料表層情報と、前記蛍光観察工程で取得された蛍光情報を重ね合わせて画像表示する画像表示工程をさらに有している、請求項1ないし請求項5のいずれかひとつに記載の観察方法。
- [請求項7] 前記画像表示工程は、前記カンチレバー観察工程で取得された前記カンチレバーの形状情報をZ軸に垂直なXY面内の位置基準として蛍光情報と試料表層情報を重ね合わせる、請求項6に記載の観察方法。
- [請求項8] 前記倒立型光学顕微鏡は、共焦点顕微鏡と超解像顕微鏡のいずれかである、請求項1ないし請求項7のいずれかひとつに記載の観察方法。
- [請求項9] 請求項1ないし請求項8のいずれかひとつに記載の観察方法を実行するプログラム。
- [請求項10] 請求項9に記載のプログラムがインストールされた複合型顕微鏡。
- [請求項11] 少なくとも蛍光観察を行う倒立型光学顕微鏡と、試料表層情報を取得する原子間力顕微鏡を有する複合型顕微鏡であって、

上下方向に延びるZ軸を有しており、
試料を保持した透明な基板が載置されるステージと、
前記ステージの下方に配置された対物レンズと、
Z軸に沿って前記対物レンズを駆動する対物レンズ駆動アクチュエータと、
前記ステージの上方に配置される自由端に探針を備えたカンチレバーと、
前記カンチレバーをZ軸に沿って走査させるZ走査アクチュエータと、
前記対物レンズが前記カンチレバーのZ軸に沿った走査に追従して駆動されるよう前記対物レンズ駆動アクチュエータを制御する追従制御コントローラを備えている複合型顕微鏡。

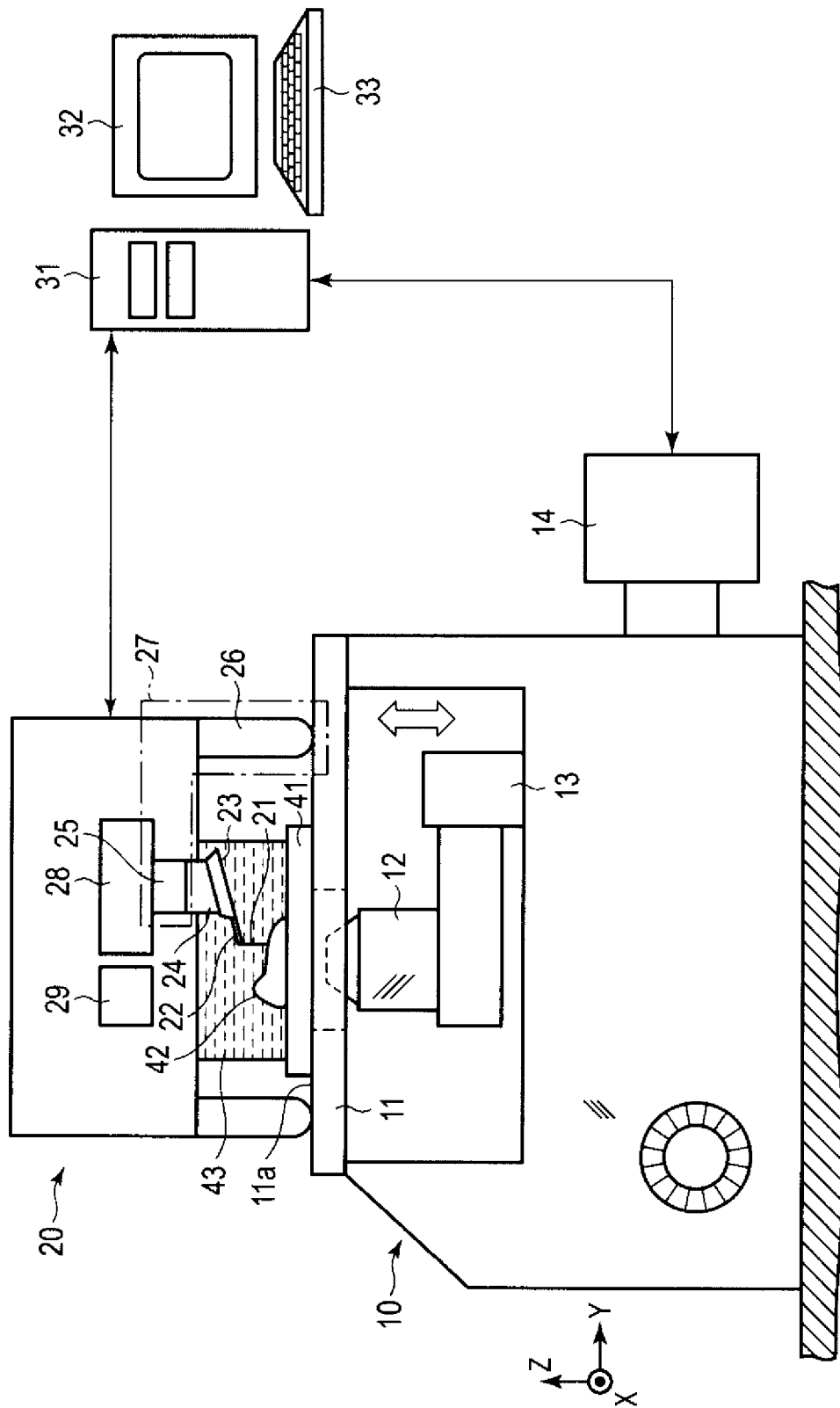
[請求項12] 前記追従制御コントローラは、前記Z走査アクチュエータに供給される走査信号に基づいて前記対物レンズ駆動アクチュエータを制御する、請求項11に記載の複合型顕微鏡。

[請求項13] 前記Z走査アクチュエータは、前記カンチレバーをZ軸に沿って微動させるZ圧電素子と、前記カンチレバーをZ軸に沿って粗動させるZ粗動アクチュエータを含んでいる、請求項11または請求項12に記載の複合型顕微鏡。

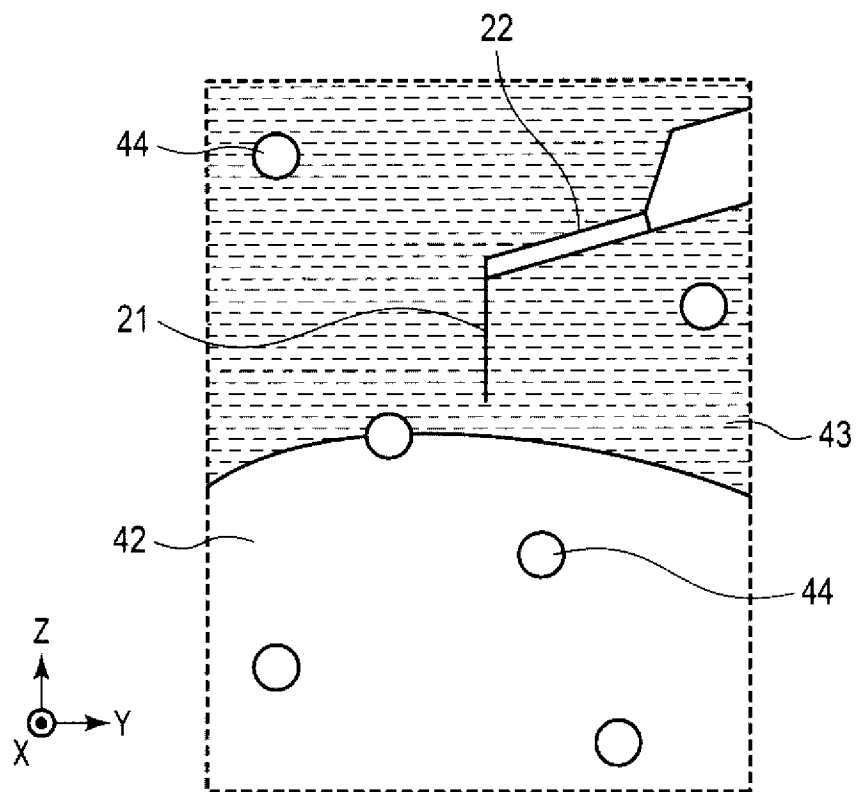
[請求項14] 試料表層情報と蛍光情報を重ね合わせるコントローラと、試料表層情報と蛍光情報が重ね合わせられた画像を表示するモニターを備えている、請求項11ないし請求項13のいずれかひとつに記載の複合型顕微鏡。

[請求項15] 前記倒立型光学顕微鏡は、共焦点顕微鏡と超解像顕微鏡のいずれかである、請求項11ないし請求項14のいずれかひとつに記載の複合型顕微鏡。

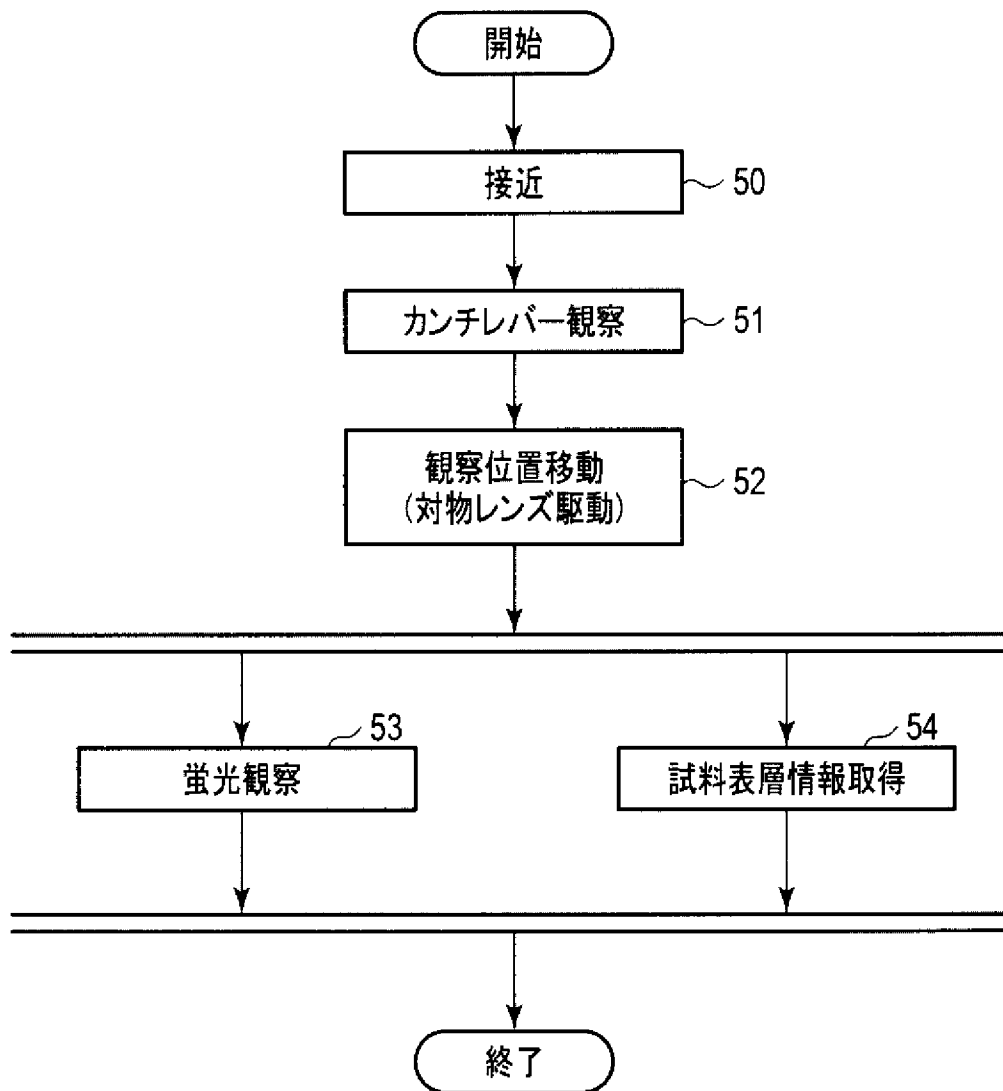
[図1]



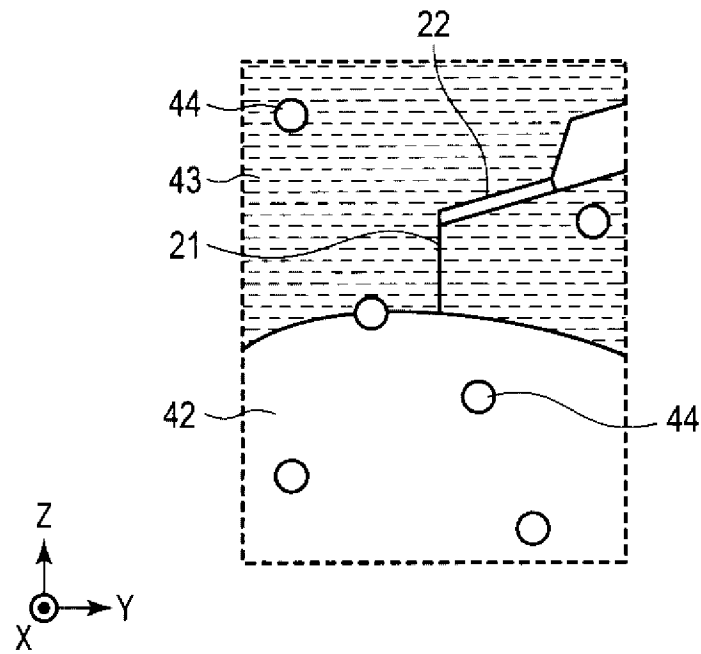
[図2]



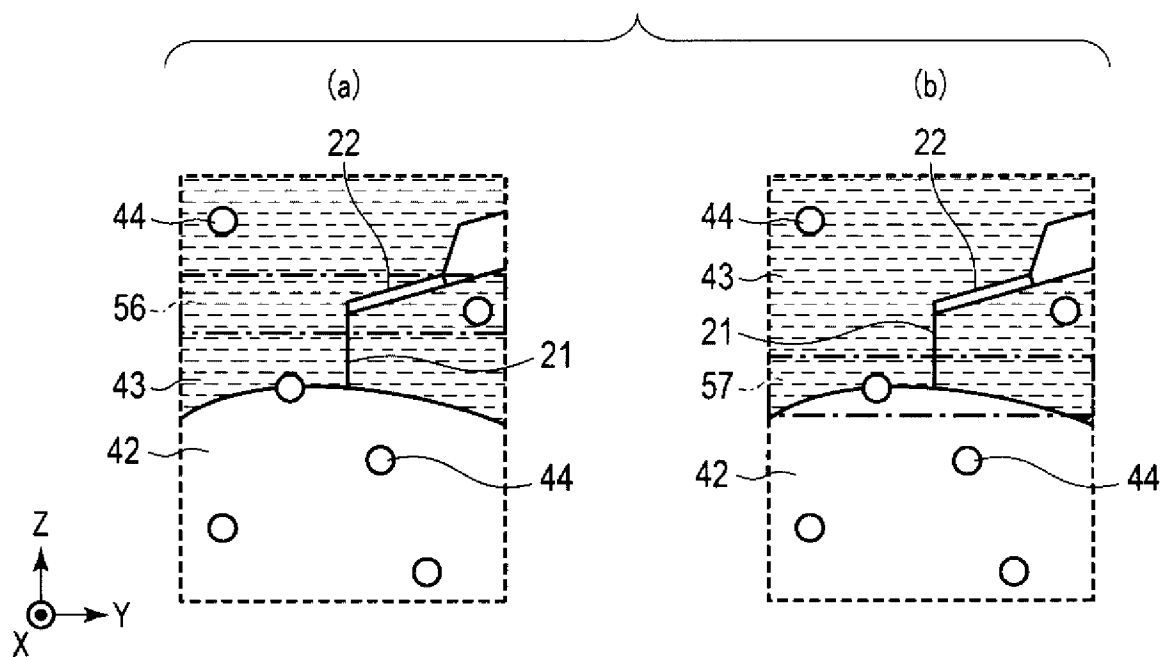
[図3]



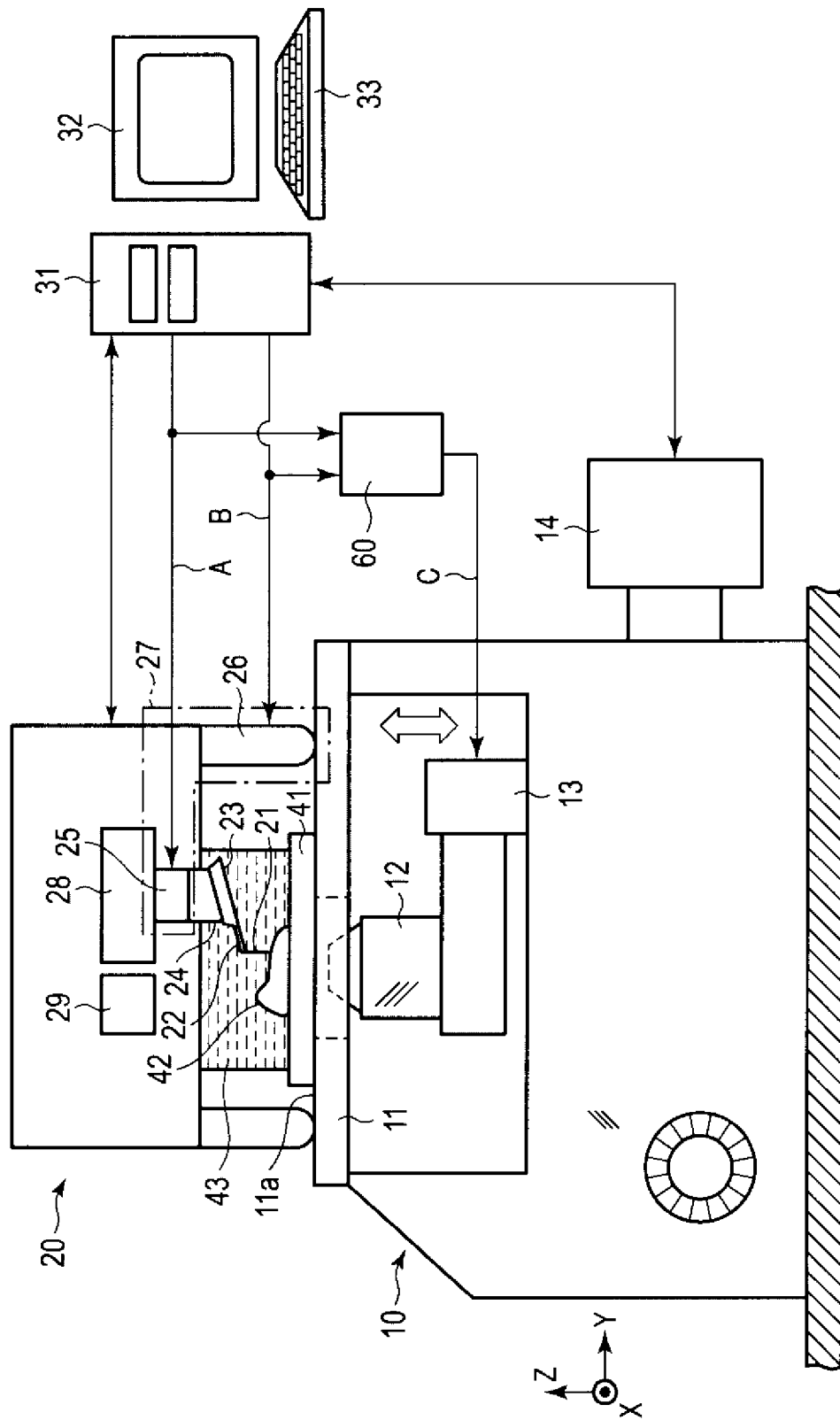
[図4]



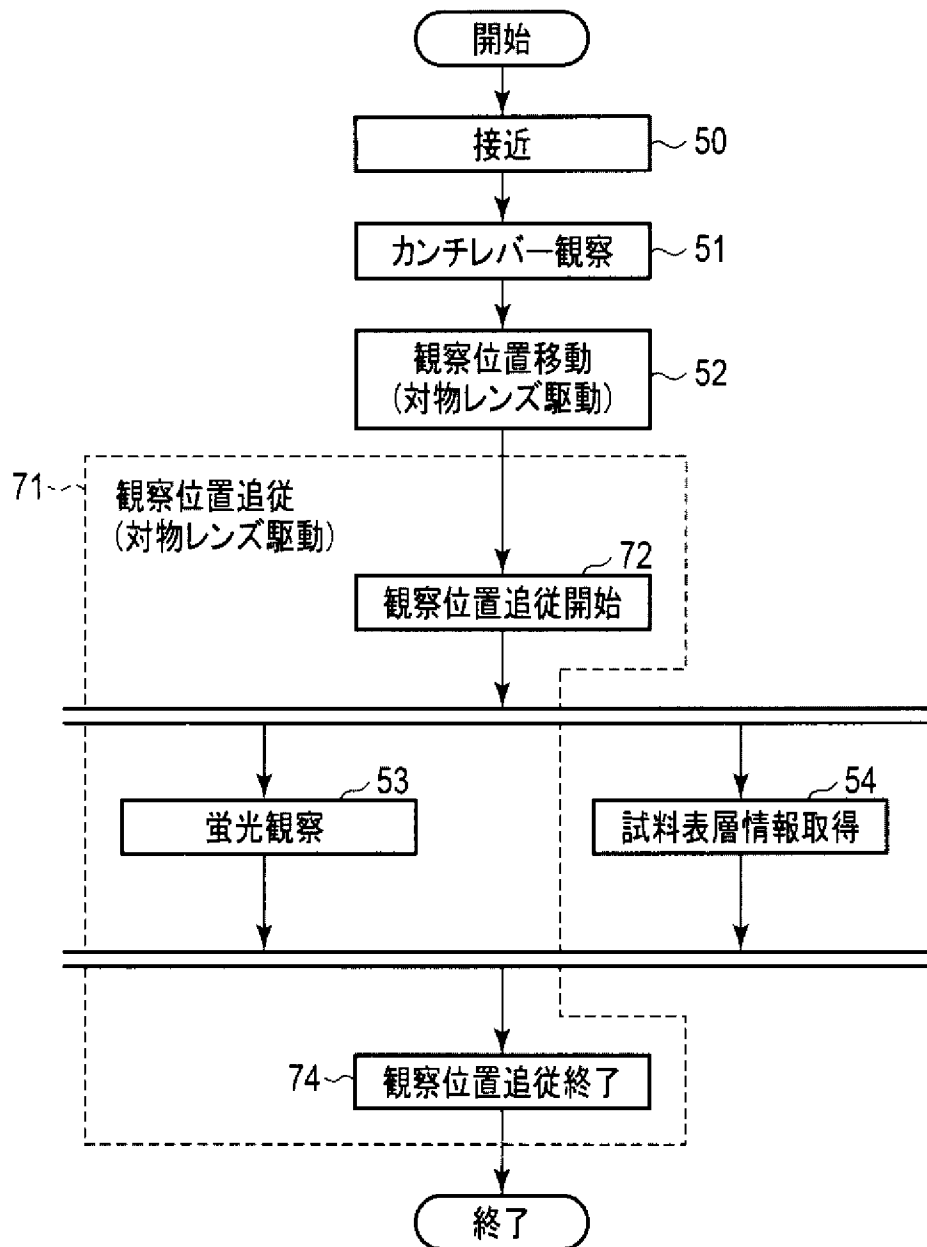
[図5]



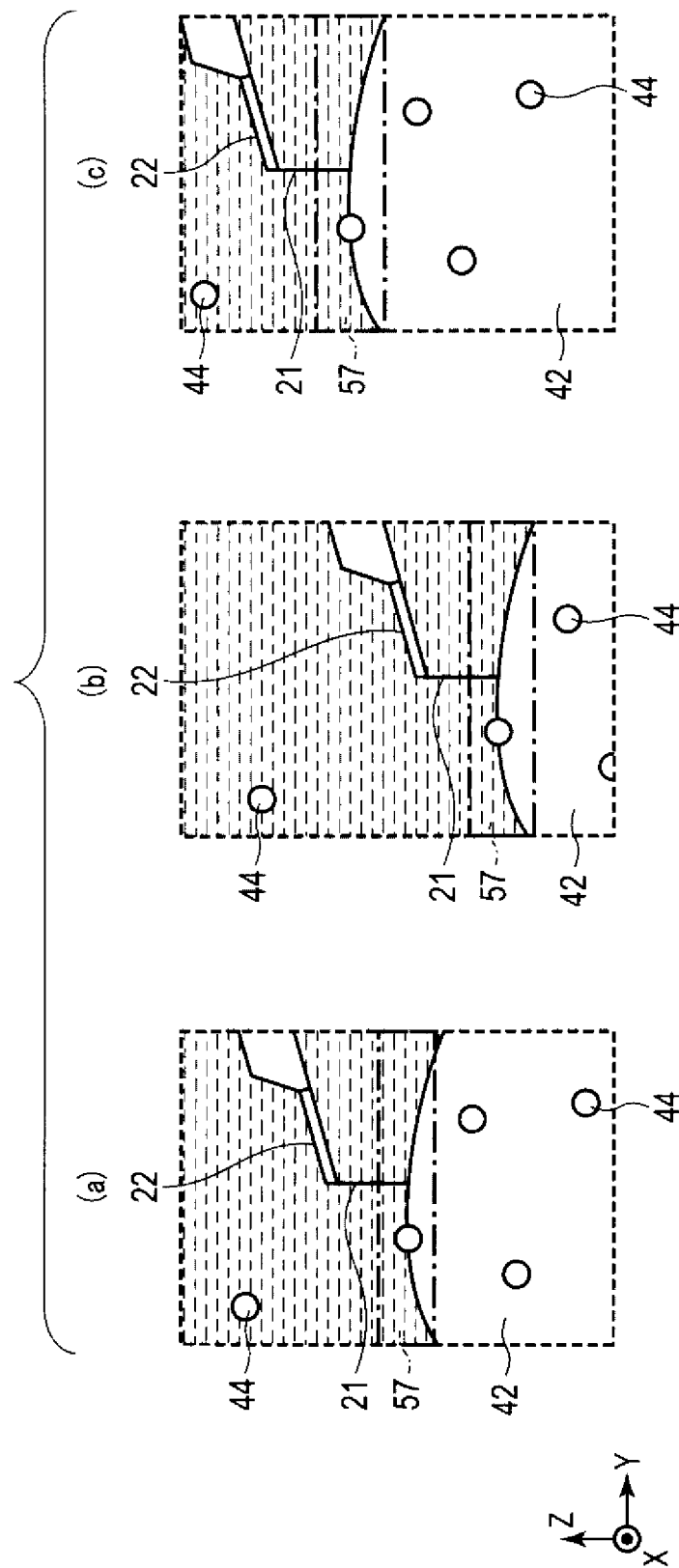
[図6]



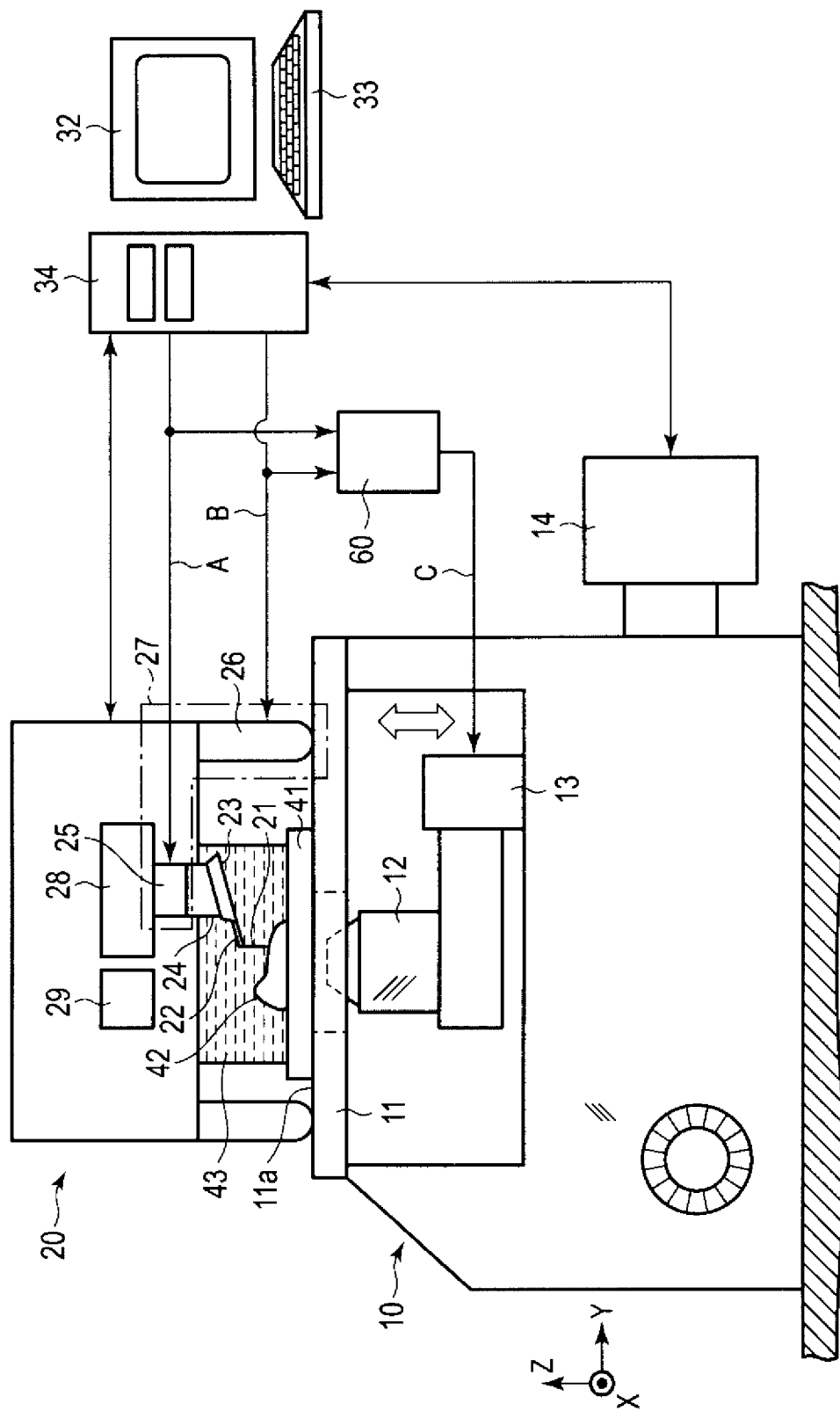
[図7]



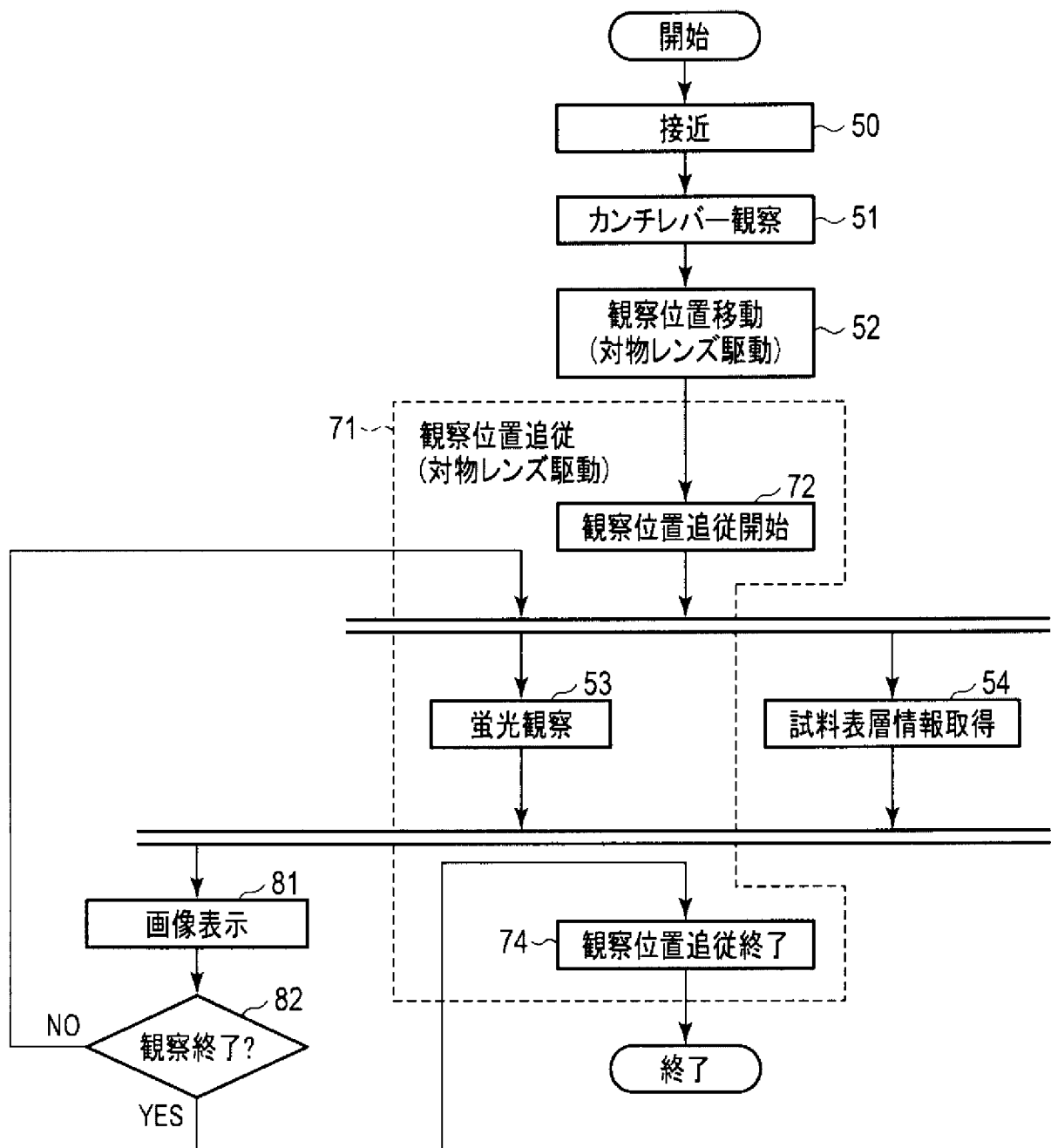
[図8]



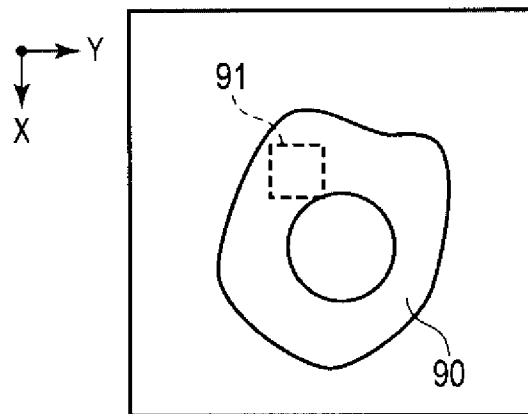
[図9]



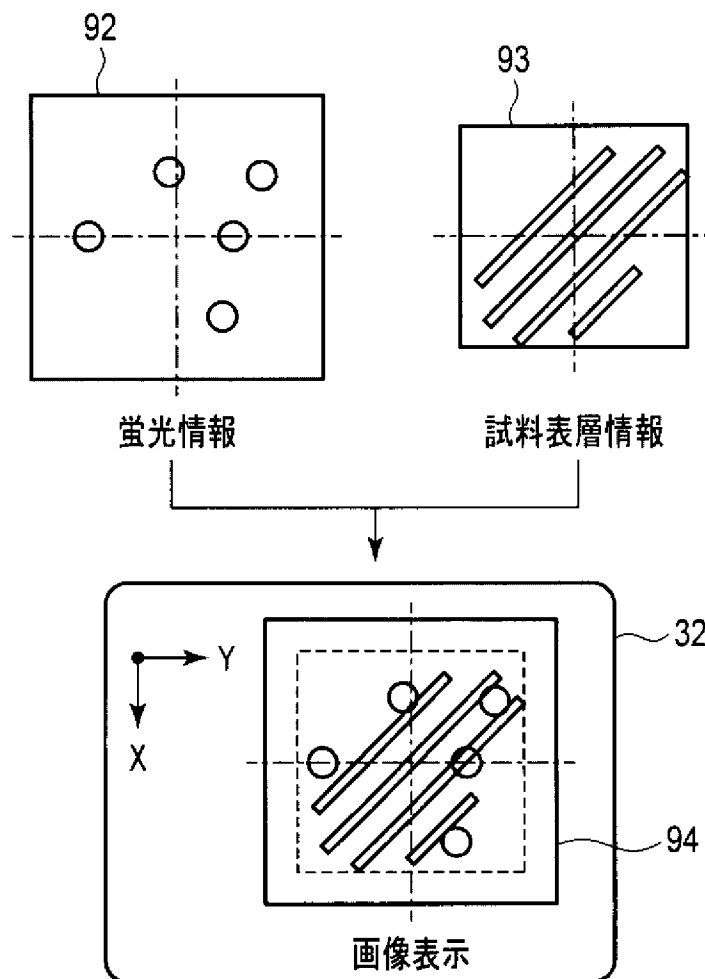
[図10]



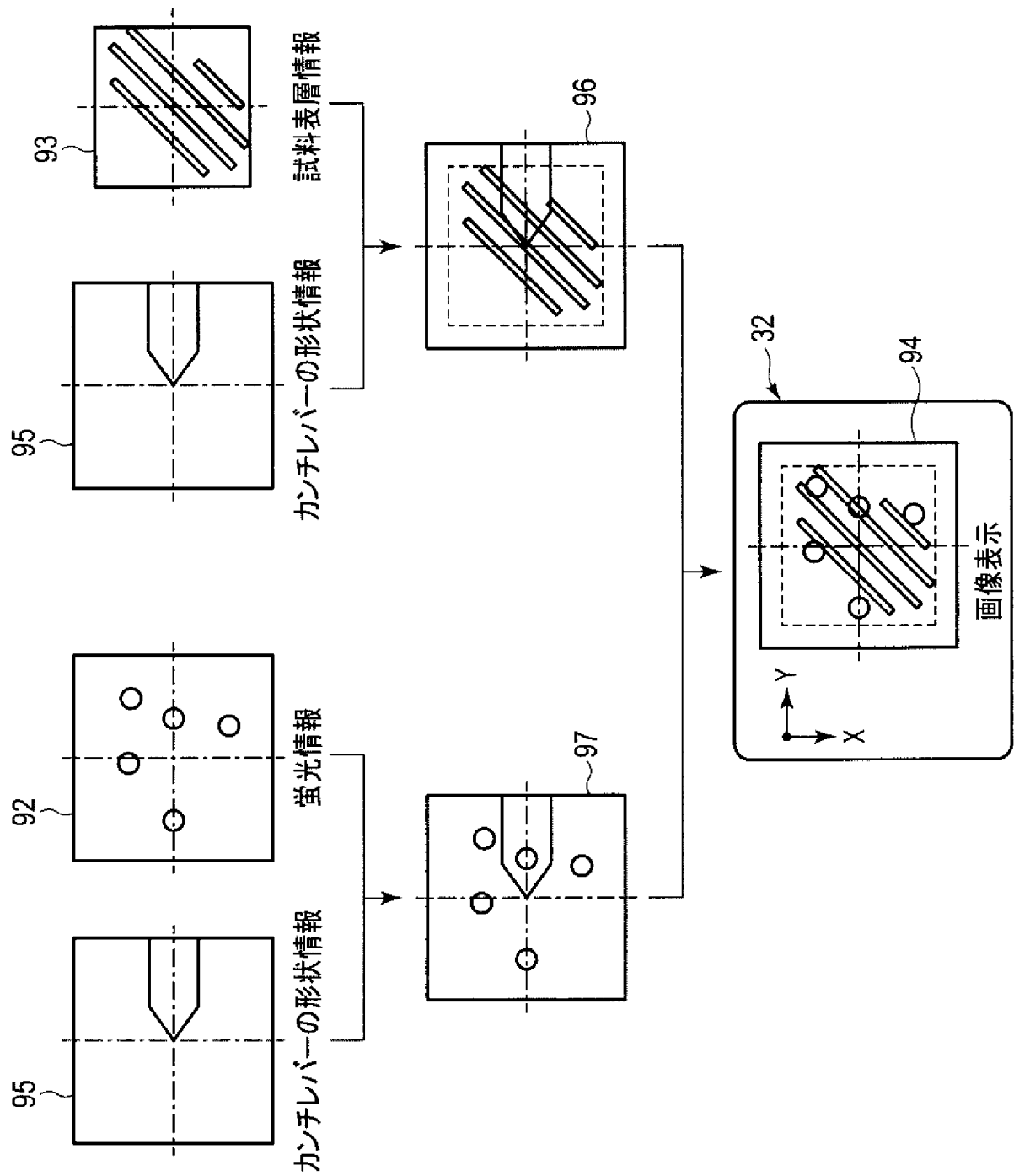
[図11]



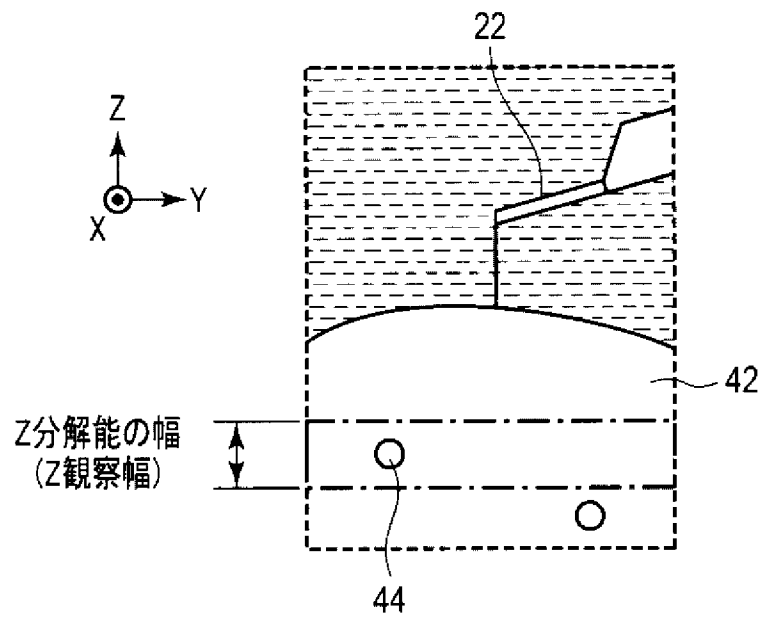
[図12]



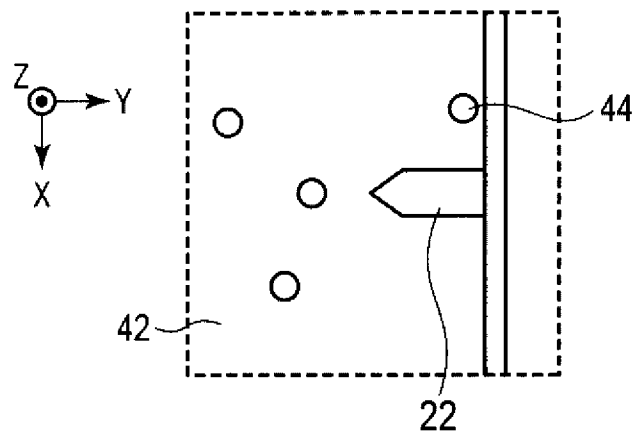
[図13]



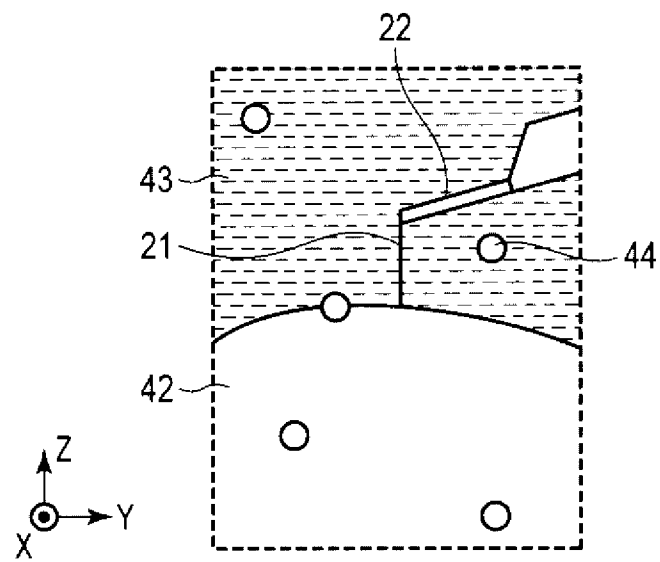
[図14]



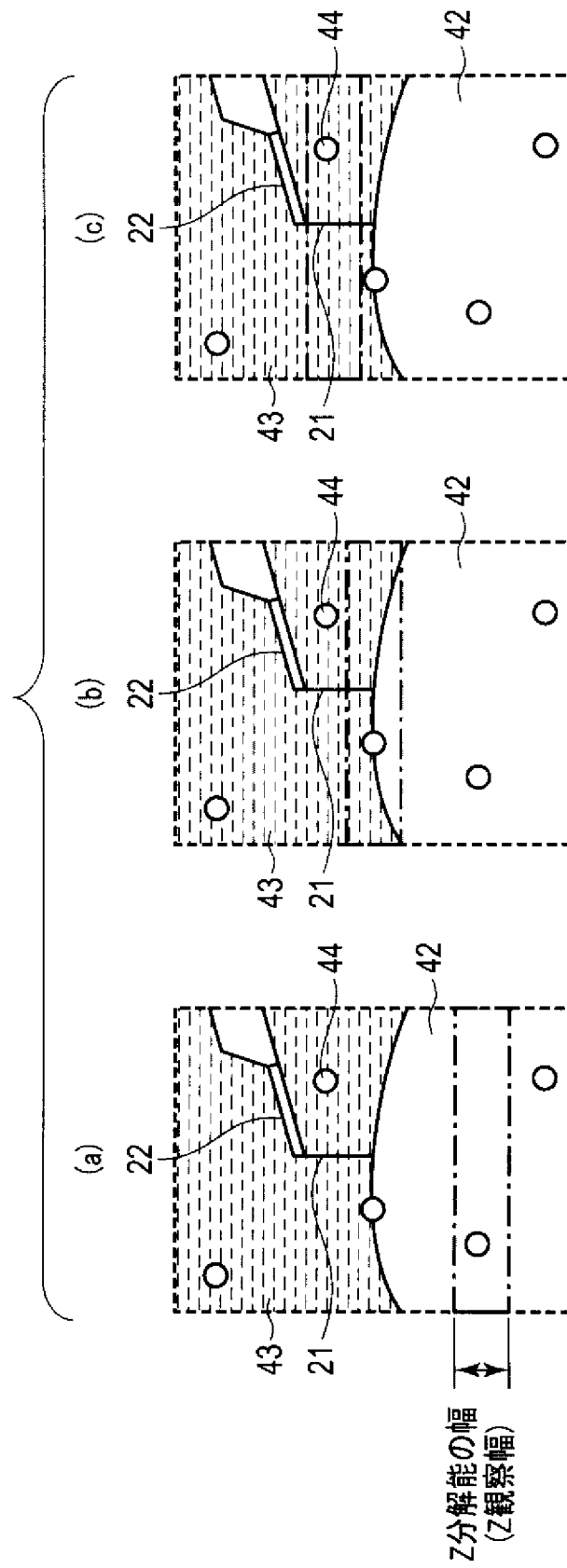
[図15]



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01Q30/02(2010.01) 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)

G01Q10/00-90/00

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)

JSTPlus (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-304420 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 22 November 1996 (22.11.1996), (Family: none)	1-15
A	JP 2004-69428 A (Olympus Corp.), 04 March 2004 (04.03.2004), (Family: none)	1-15
A	US 2011/0070604 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 24 March 2011 (24.03.2011), & WO 2009/142661 A1 & RU 2010151919 A	1-15

☐ 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
10 May 2016 (10.05.16)

Date of mailing of the international search report
24 May 2016 (24.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. G01Q30/02(2010.01)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. G01Q10/00-90/00

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）

JSTPlus (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	JP 8-304420 A（オリンパス光学工業株式会社）1996.11.22, （ファミリーなし）	1-15
A	JP 2004-69428 A（オリンパス株式会社）2004.03.04, （ファミリーなし）	1-15
A	US 2011/0070604 A1（THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA） 2011.03.24, & WO 2009/142661 A1 & RU 2010151919 A	1-15

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

10.05.2016

国際調査報告の発送日

24.05.2016

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）

後藤 大思

2 J

5261

電話番号 03-3581-1101 内線 3252