(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
2012 年 9 月 27 日(27.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/127907 A1

(51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/052377

(22) 国際出願日: 2012 年 2 月 2 日(02.02.2012)

(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 2011-061333 2011 年 3 月 18 日(18.03.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 磯部 圭佑(ISOBE, Keisuke) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 緑川 克美(MIDORIKAWA, Katsumi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル６階 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

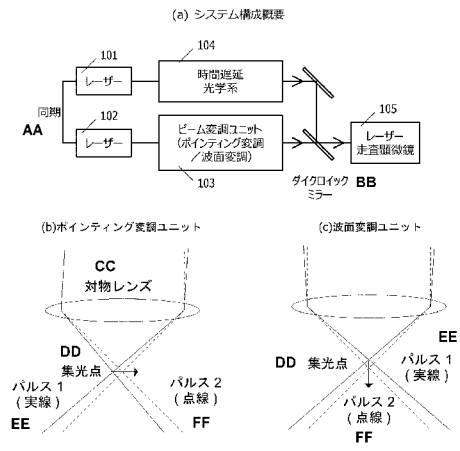
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) **Title**: NONLINEAR OPTICAL MICROSCOPE AND NONLINEAR OPTICAL MICROSCOPY

(54) 発明の名称 : 非線形光学顕微鏡および非線形光学顕微鏡法

[図1]



(a) System configuration overview
AA Synchronization
101, 102 Laser
104 Time delay optical system
103 Beam modulation unit
(pointing modulation / wavefront modulation)
BB Dichroic mirror
105 Laser scanning microscope
(b) Pointing modulation unit
CC Objective lens
DD Light collection point
EE Pulse 1 (solid line)
FF Pulse 2 (dotted line)
(c) Wavefront modulation unit

(57) **Abstract**: A nonlinear optical microscope for measuring signal light generated from a nonlinear optical process due to a plurality of excitation rays of light, wherein the center of gravity of a light collection point of the plurality of excitation rays of light is position-modulated at a predetermined frequency, and a frequency component corresponding to the modulation frequency is extracted from the signal light. The frequency component to be extracted is preferably an even multiple of the modulation frequency. Moreover, as a position modulation method, a method for linearly or spirally moving the center of gravity of the light collection point within a plane perpendicular to a light axis, or linearly moving the center of gravity of the light collection point in a light axis direction is preferable.

(57) 要約: 複数の励起光による非線形光学過程から生じる信号光を測定する非線形光学顕微鏡において、複数の励起光の集光点の重心を所定の周波数で位置変調し、信号光から変調周波数に応じた周波数成分を抽出する。抽出する周波数成分は、変調周波数の偶数倍とすることが好ましい。また、位置変調方法としては、集光点重心を、光軸に垂直な面内で直線状または螺旋状に移動させたり、光軸方向に直線状に移動させたりする方法が好ましい。

WO 2012/127907 A1

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（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 非線形光学顕微鏡および非線形光学顕微鏡法

技術分野

[0001] 本発明は、非線形光学顕微鏡の空間分解能を向上させる手法に関する。

背景技術

[0002] n光子励起蛍光顕微鏡は、１光子励起蛍光顕微鏡の励起波長λ_{ex}の約n倍長い励起波長$\lambda_n \fallingdotseq n \cdot \lambda_{ex}$を用いることにより、蛍光分子を励起する。n光子励起による信号光強度は励起光強度のn乗に比例する。そのため、励起光を対物レンズ（開口数：NA）により集光した場合、励起光強度の高い集光点近傍のみで信号が発生する。その結果、同じ波長で１光子励起を行った場合の空間分解能$0.61\lambda_n/NA$に比べて、空間分解能が$n^{1/2}$倍［$(0.61 \cdot \lambda_n)/(n^{1/2} \cdot NA)$］に向上する。

[0003] また、２波長以上の波長成分によって誘起される非線形光学過程（非縮退２光子励起蛍光、和周波発生過程、４光波混合過程、非縮退２光子吸収、誘導ラマン散乱など）により発生する信号光を検出する非線形光学顕微鏡法も利用されている。これらの手法でも、励起光強度の高い集光点近傍のみで非線形光学過程による信号が発生するため、空間分解能を向上させることができる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２００５／１１３７７２号パンフレット

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Stefan W. Hell and Jan Wichmann, ”Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy Opt. Lett. 19, 780-782 (1994)

非特許文献2：Christian W. Freudiger, et al., “Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microsco

py”, Science 322, 1857 (2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] n光子励起蛍光顕微鏡では、同じ励起波長を用いて１光子励起を行う場合よりも空間分解能は向上している。しかし、異なる励起波長を用いて同じエネルギー状態に励起し、発生した蛍光を検出する場合には、n光子励起の励起波長は１光子励起の波長のn倍($\lambda_n \fallingdotseq n \cdot \lambda_{ex}$)である。したがって、実際には空間分解能が$1/n^{1/2}$倍[$(0.61 \cdot n^{1/2} \cdot \lambda_{ex})/NA$]に低下してしまう。

[0007] また、２波長以上の波長成分によって励起される非線形光学過程の信号光強度は２波長の励起光の空間的な重なり面積に比例する。したがって、２つの励起光のビームポインティングが揺らぐと、空間的な重なり面積が変化し信号光強度が揺らぐため問題となる。これらの非線形光学顕微鏡では、２波長の励起光のビームポインティングを安定させなければ空間分解能を高めることができない。したがって、従来はビームポインティングを安定させるために様々な工夫が施されてきた。しかしながら、ビームポインティングの安定には困難が伴う。

[0008] このような課題を考慮し、本発明の目的は、簡易な構成でありながら高分解能の多光子励起顕微鏡を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明では、２波長以上の波長成分によって励起される非線形光学過程の信号光を測定する非線形光学顕微鏡において、複数の励起光の集光点重心を所定の周波数で位置変調させ、この信号光から変調周波数に応じた周波数成分を抽出する。

[0010] より具体的には、本発明に係る非線形光学顕微鏡は、第１の励起光を試料上に集光する第１の光学系と、第２の励起光を試料上に集光する第２の光学系と、前記第１の励起光と前記第２の励起光の試料上での集光位置を、所定の変調周波数で相対的に位置変調させる集光位置変調手段と、試料から生じる信号光から、前記変調周波数に応じた周波数成分を抽出する信号抽出手段

と、を備える。

[0011] 信号光強度は励起光強度の積に比例するため、集光点位置の変調に伴って信号強度に揺らぎが生じる。この際、信号光のうち変調周波数の偶数倍の成分は、集光位置中心から発生した信号が支配的になる。したがって、信号光から変調周波数の偶数倍の成分を抽出することで、空間分解能を向上させることができる。高調波成分を抽出するほど空間分解能は向上するが、高調波成分ほど信号強度が弱くなるため、変調周波数の２倍の周波数成分を抽出することが好ましい。

[0012] また、励起光の集光位置を変調させる方法としては、複数の励起光の集光位置の重心を、光軸に垂直な面内で直線状に移動させる方法、光軸に垂直な面内で螺旋状に移動させる方法、光軸に垂直な方向に直線状に移動させる方法、およびこれらの組合せが考えられる。

[0013] たとえば、前記集光位置変調手段は、第１の励起光の集光位置を固定し、第２の励起光の集光位置を、光軸に垂直な面内で直線状または螺旋状に移動させたり、光軸方向に直線状に移動させたりする、ことが考えられる。

[0014] また、前記集光位置変調手段は、第１の励起光と第２の励起光の集光位置をともに移動させて、集光点重心が、光軸に垂直な面内で直線状または螺旋状に移動したり、光軸方向に直線状に移動したりするようにしても良い。

[0015] 励起光の集光位置を光軸に垂直な面内で移動させるには、電気光学（ＥＯ）素子・音響光学（ＡＯ）素子・ガルバノスキャナーなどのビームポインティング変調ユニットを用いればよい。また、励起光の集光位置を光軸に垂直な方向に移動させるには、電気光学素子・可変ミラーなどのビームの発散角度を制御可能な波面変調ユニットを用いればよい。

[0016] また、本発明において励起光にパルスレーザ光を用いることが好ましく、複数の励起光の集光位置を時間的に重ねるための時間遅延光学系を備えることが好ましい。

[0017] なお、励起光の数は２つ以上であればいくつであっても良く、観測する非線形光学過程に依存して変化する。励起光を３つ以上用いる場合も励起光の

集光位置重心を変調させれば、空間分解能が向上する。複数の励起光を用いる場合、１つの励起光のみを位置変調しその他の励起光の集光位置を固定としても良く、また２つ以上（あるいは全て）の励起光を位置変調させてもかまわない。

[0018] 本発明は、上記手段の少なくとも一部を有する非線形光学顕微鏡として捉えることができる。また、本発明は、上記処理の少なくとも一部を含む非線形光学顕微鏡法として捉えることもできる。上記手段および処理の各々は可能な限り互いに組み合わせて本発明を構成することができる。

発明の効果

[0019] 本発明に係る非線形光学顕微鏡によれば、空間分解能を向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]（ａ）本実施形態にかかる非線形光学顕微鏡のシステム構成概要図、（ｂ）ポインティング変調ユニットの説明図、（ｃ）波面変調ユニットの説明図。

[図2]非線形光学顕微鏡の具体的構成を示す図。

[図3]（ａ）励起光パルスの位置変調を説明する図と、（ｂ）試料の中央および外側から発生する信号光強度を示す図。

[図4]（ａ）～（ｃ）はそれぞれ従来手法による入射励起光強度・ＴＰＡ（２光子吸収）後の励起光強度・ＳＲＳ（誘導ラマン散乱）後の励起光強度を示す図、（ｄ）～（ｆ）は本手法による入射励起光強度・ＴＰＡ後の励起光強度・ＳＲＳ後の励起光強度を示す図。

[図5]本手法によって励起光の集光位置を１０ｋＨｚで変調させた際のＳＦＧ信号の周波数特性を示す数値計算結果。太線が中心位置のＳＦＧ信号の周波数特性であり、細線が外側位置の周波数特性。

[図6]点像分布を示す数値計算結果であり、上段は光軸に垂直な面内での点像分布を表し、下段は光軸を含む面内での点像分布を表す。

[図7]（ａ）光軸方向の信号光強度プロファイルを示す図、（ｂ）散乱試料の

場合の各深さから発生する信号光強度を示す図。

[図8]本手法による２光子蛍光顕微鏡の光軸方向の応答を示す図であり、（ａ）は強度を線形表示し、（ｂ）は強度を対数表示したもの。

[図9]蛍光ビーズの２光子蛍光像であり、（ａ）は従来手法によるもの、（ｂ）は本手法（Ｘ変調）によるもの、（ｃ）は本手法（ＸＹ変調）によるもの。

[図10]本手法による４光波混合顕微鏡の光軸方向の信号光強度プロファイルを示す図。

[図11]本手法が適用可能な非線形光学過程の例を説明する図。

[図12]本手法が適用可能な非線形光学過程の例を説明する図。

発明を実施するための形態

[0021] ＜原理＞

本発明に係る非線形光学顕微鏡は、２波長以上の励起光によって誘起される非線形光学過程の信号光を検出する。このような非線形光学過程にはいくつかの種類があるが、ここでは和周波発生（SFG: Sum Frequency Generation）顕微鏡を例にして、本発明の原理を説明する。

[0022] SFG顕微鏡では、励起光として周波数ω1、ω2を有する２つのパルスを用いる。SFG顕微鏡における信号光の時間平均光強度分布$I_{SFG}(r)$は、集光点における２つの励起光パルスの光強度分布$I_{\omega 1}(r,t)$, $I_{\omega 2}(r,t)$を用いて、

[数1]

$$\bar{I}_{SFG}(r) \propto \int I_{\omega 1}(r,t) I_{\omega 2}(r,t) dt$$

と表される。２つの励起光パルスの空間的重なり面積が大きいほど和周波光強度が高く発生分布も狭くなる。２つのパルスの集光位置が時間的に揺らぐと、和周波光の時間平均光強度分布は空間的に広がり、信号光強度にも揺らぎが生じる。従来のSFG顕微鏡では、空間的な重なり面積が大きくなるように２つの励起光パルスの集光位置を固定した状態で使用し、かつ、時間的に揺らぎが生じないようにしている。これに対して、本発明では、２つのパル

スの集光位置を時間的に変調し、変調により揺らいだ信号成分を検出する。このように、本発明では、パルスの集光位置を積極的に移動させて、和周波光の揺らぎ成分を測定対象とする。

[0023] 例えば図３（ａ）に示すように、励起光パルス１の位置（実線）をr=+δからr=-δの間を周波数fで周期的に動かし、励起光パルス２の集光位置（破線）はr=0に固定する場合を考える。このときの、SFG強度は、

[数2]

$$I_{SFG}(r) \propto \int I_{\omega 1}(r+\delta\cos 2\pi ft) I_{\omega 2}(r,t)dt$$

と表される。励起光パルス１を１周期（+δ→0→-δ→0→+δ）動かした場合の位置r=0，-δ，+δにおける和周波光強度$I_{SFG}(0,t)$，$I_{SFG}(-\delta,t)$，$I_{SFG}(+\delta,t)$は図３（ｂ）に示すようになる。位置r=0において信号は２周期の変化があり、位置r=-δ，+δにおいて信号は１周期の変化がある。すなわち、励起光パルス１の集光位置を周波数fで変調した場合、位置r=0における信号は2fの周波数成分が支配的となり、位置r=-δ，+δにおける信号はfの周波数成分が支配的となる。このように、周波数特性が集光スポットの中心と外側で異なる。そのため、周波数2fの信号を抽出することにより、集光スポットサイズよりも空間的に狭い領域の信号を抽出することが可能となる。また、集光位置変調によって生じる信号の変化は完全な正弦波ではないので、r=0では高調波である周波数4f,6f,8f,...となる成分も生じる。高調波成分になればなるほど空間的に狭い領域からの信号となるので、高調波成分を抽出すれば分解能をより高めることができる。

[0024] ２光子吸収（TPA: Two-Photon Absorption）や誘導ラマン散乱（SRS: Stimulated Raman Scattering）を測定する場合にも、本発明は適用できる。これらの非線形光学過程を計測する場合は、励起光強度の変化量を測定する。従来の手法では、周波数ω1，ω2の励起光のうち一方（ω1）を周波数fで時間的に強度が変化するような強度変調を与える。他方の励起光（ω2）の入射強度は一定とするが、ω1の強度変化がTPAやSRS過程を通じてω2の励起光強度

に影響を与え、ω2の励起光も周波数fで変化する。このように従来のTPAやSRSでは、強度変調を与えていない方の励起光強度の周波数f成分を測定する。図４（ａ）は入射励起光強度、図４（ｂ）はTPA後の励起光強度、図４（ｃ）はSRS後の励起光強度を表している。

[0025] これに対して、TPAやSRSに本発明を適用した場合は、強度変調をする必要はなく、一方の励起光の位置を周波数fで変調する。この結果、周波数ω1,ω2の両方の励起光強度に周波数2fで変化する成分が生じるため、この成分を測定する。図４（ｄ）～４（ｆ）のそれぞれは、本発明を適用した場合の入射励起光強度、TPA後の励起光強度、SRS後の励起光強度を表している。本発明によれば、周波数ω1とω2の励起光強度変化を同時に測定可能なので、2つの信号の平均化などにより信号対雑音比も向上させることが可能である。SRSではポンプ光である周波数ω1の励起光強度が減少するときにストークス光である周波数ω2の励起光強度が増加するため、これら２つの励起光を差分検出すれば、強度が２倍になると共に外部環境によるノイズを相殺できるため従来手法よりも感度が向上する。もちろん、従来手法のように励起光を時間的に変調し、さらに集光位置も変調することも可能である。

[0026] ここでは、本発明の原理的な説明を、和周波発生（SFG）,2光子吸収（TPA）,誘導ラマン散乱（SRS）などを例に説明したが、2波長（以上）の励起光を用いるその他の非線形光学過程を利用する顕微鏡にも適用できることは当業者であれば理解できるであろう。

[0027] また、上記の位置変調は原理を説明するためのものであり、具体的には種々の位置変調方法が採用可能である。

[0028] 例えば、励起光パルス１と励起光パルス２の集光点の重心が光軸に垂直な面内で直線上を動くように変調する方法（Ｘ変調）がある。この場合、各励起光パルスの光強度は、

[数3]

$$I_{\omega 1}(x,y,z) \to I_{\omega 1}(x+\delta_1 \cos 2\pi ft, y+\delta_2 \cos 2\pi ft, z)$$
$$I_{\omega 2}(x,y,z) \to I_{\omega 2}(x+\delta_3 \cos 2\pi ft, y+\delta_4 \cos 2\pi ft, z)$$

と表される。ここで、$\delta_1 \neq \delta_3$または$\delta_2 \neq \delta_4$とする。また、この条件を満たせば$\delta_n=0$(n=1,2,3,4)であっても良い。このような変調では、励起光パルスの集光点重心は、$[\delta_1-\delta_3,\ \delta_2-\delta_4]^T$方向の直線上を移動する。このような変調方式では、2jf（jは整数)の周波数成分を検出する。こうすることで、集光点重心が移動する直線方向についての空間分解能が向上する。また、光軸方向についても空間分解能が向上する。

[0029] また、励起光パルス１と励起光パルス２の集光点の重心が、光軸に垂直な面内で螺旋上を動くように変調する方法（ＸＹ変調）がある。この場合、各励起光パルスの光強度は、

[数4]

$$I_{\omega 1}(x,y,z) \to I_{\omega 1}(x+\delta_1 \cos 2\pi ft \cos 2\pi f_0 t, y+\delta_2 \cos 2\pi ft \sin 2\pi f_0 t, z)$$
$$I_{\omega 2}(x,y,z) \to I_{\omega 2}(x+\delta_3 \cos 2\pi ft \cos 2\pi f_0 t, y+\delta_4 \cos 2\pi ft \sin 2\pi f_0 t, z)$$

と表される。ここで、$\delta_1 \neq \delta_3$または$\delta_2 \neq \delta_4$、$2f < f_0$とする。また、この条件を満たせば$\delta_n=0$(n=1,2,3,4)であっても良い。このような変調では、励起光パルスの集光点重心は螺旋状に移動する。このような変調方式では、2jf（jは整数)の周波数成分を検出する。こうすることで、光軸に垂直な面内および光軸方向、すなわち全方向について空間分解能が向上する。

[0030] また、励起光パルス１と励起光パルス２の集光点の重心が、光軸方向で直線上を動くように変調する方法（Ｚ変調）がある。この場合、各励起光パルスの光強度は、

[数5]

$$I_{\omega 1}(x,y,z) \to I_{\omega 1}(x,y,z+\delta_1 \cos 2\pi ft)$$
$$I_{\omega 2}(x,y,z) \to I_{\omega 2}(x,y,z+\delta_2 \cos 2\pi ft)$$

と表される。ここで、$\delta_1 \neq \delta_2$とする。また、この条件を満たせば$\delta_n=0$(n=1,2)であっても良い。このような変調では、励起光パルスの集光点重心は光軸方向の直線上を移動する。このような変調方式では、2jf（jは整数)の周波数成分を検出する。こうすることで、光軸方向の空間分解能が向上する。

[0031] また、上記のＸ変調とＺ変調を組み合わせた変調方法や、ＸＹ変調とＺ変

調を組み合わせた変調方法を採用することも考えられる。

[0032] また、ここでは励起光パルスが２つの場合を例に説明しているが、励起光パルスが３つ以上の場合であっても集光点重心を上記と同様に移動させれば良い。

[0033] ＜本手法が適用可能な非線形光学過程の例＞

以下、本手法が適用可能な非線形光学過程の例を説明する。

[0034] （１）非縮退２光子励起蛍光（nondegenerate two-photon excitation fluorescence: TPEF）

図１１（ａ）に示すように、分子は、周波数ω_1, ω_2の２個の光子を同時に吸収し、基底状態から励起状態へ遷移する。その後、励起状態から蛍光を発し，基底状態へ遷移する。このとき発せられる蛍光が非縮退２光子励起蛍光である。２光子励起蛍光強度は励起光強度の２乗に比例するため，励起光をきつく集光することにより光軸方向の分解能が得られる。そのため，共焦点ピンホールなしで３次元イメージングが可能である。光褪色や光損傷も集光点近傍に抑制される。１光子励起蛍光顕微鏡では励起光として紫外光や可視光の励起光を用いるのに対して２光子励起蛍光顕微鏡では近赤外光を用いる。近赤外光は生体試料中における散乱や１光子吸収が小さいため、励起光が試料の深部まで到達でき、深部イメージングが可能である。また、励起光と蛍光の波長が大きく異なることから励起光と蛍光の分離も容易である。

[0035] （２）和周波発生（Sum frequency generation: SFG）と第２高調波発生（Second harmonic generation: SHG）

２光子励起のSFGとは，図１１（ｂ）に示すように周波数ω_1, ω_2の２個の光子が和の周波数$\omega_3=\omega_1+\omega_2$をもつ１個の光子に変換される２次の非線形光学過程であり、反転対称性のない分子・媒質でのみ生じる現象である。そのため、SFG顕微鏡では生体組織中における配向構造や組織構造を可視化することが可能である。

[0036] （３）差周波発生（Difference frequency generation: DFG）

DFGとは，図１１（ｃ）に示すように周波数ω_1, ω_2の２個の光子が差の周波

数$\omega_3=\omega_1-\omega_2$をもつ１個の光子に変換される２次の非線形光学過程であり、反転対称性のない分子・媒質でのみ生じる現象である。周波数差をラマン振動数に一致させることにより、試料の化学成分や熱力学的状態に由来する振動コントラストが得られる。

[0037] （４）第３高調波発生（Third harmonic generation: THG）

３光子励起のSFGとは図１１（ｄ）に示すように周波数ω_1, ω_2, ω_3の３個の光子が和の周波数$\omega_4=\omega_1+\omega_2+\omega_3$をもつ１個の光子に変換される３次の非線形光学過程であり、全ての分子・媒質で生じる現象である。ただし、励起光と信号光の波長が大きく異なり屈折率が大きく異なるために、位相整合条件を満たすことが困難である。そのため、一般的に屈折率が一様な分布の媒質中ではTHGは発生せず、屈折率分布が不均一な媒質中（屈折率の異なる媒質の境界）で発生する。入射光である３個の光子の周波数が同じ周波数の場合をTHGと呼ぶ。

[0038] （５）４光波混合（Four-wave mixing: FWM）

周波数ω_1, ω_2, ω_3の3つの入射場と媒質の相互作用により、新しい周波数$\omega_4=\omega_1-\omega_2+\omega_3$の光が発生する３次の非線形光学過程をFWM過程と呼ぶ。相互作用を行う場の順番により、FWM過程には図１１（ｅ）（ｆ）に示す2つの過程がある。非共鳴FWM顕微鏡では、屈折率の分布を測定することが可能である。

[0039] （６）コヒーレント反ストークスラマン散乱（Coherent anti-Stokes Raman scattering: CARS）

図１２（ａ）のようにFWM過程において2つの励起光の周波数差$\omega_1-\omega_2$がラマン振動数W_Rに近づくとFWM過程が増強される。振動共鳴により増強されたFWM過程をCARS過程と呼ぶ。CARS強度は周波数ω_1のポンプ光と周波数ω_2のストークス光の周波数差$\omega_1-\omega_2$がラマン振動数W_Rに近づくほど強くなる。そのため、CARS顕微鏡では、試料の化学成分や熱力学的状態に由来する振動コントラストが得られる。

[0040] （７）誘導パラメトリック発光（Stimulated parametric emission: SPE）

図１２（ｂ）のようにFWM過程において2つの励起光の周波数和$\omega_1+\omega_3$が電

子共鳴振動数W_eに近づくとFWM過程が増強される。2光子電子共鳴により増強されたFWM過程をSPE過程と呼ぶ。SPE強度は周波数和$\omega_1+\omega_3$が電子共鳴振動数W_eに近づくほど強くなる。そのため、SPE顕微鏡では，試料の吸収に基づくコントラストが得られる。

[0041] （８）非縮退２光子吸収（nondegenerate two-photon absorption: TPA）

TPAは超短光パルスの強度自身に誘起された吸収係数の変化に起因する。TPAは、２個の光子が同時に吸収され、基底状態から励起状態へ遷移する。TPA顕微鏡では吸収による励起光強度の微小な変化量を測定するために、図１２（ｃ）に示すように、第１光子と第２光子の周波数が異なる２波長励起を行う。また、一方の周波数（ω_2）の光強度のみを周波数fで強度変調し、他方（ω_1）は変調せずに用いる。TPAが生じると、励起光強度は周波数ω_2の光強度が減少した量だけ周波数ω_1の光強度が減少する。従来は、ω_2の励起光を強度変調して、ω_1の励起光に生じる周波数fの信号を測定するが、上述したように本手法を適用する場合は強度変調を行う必要はない。TPA顕微鏡では吸収コントラストが得られる。

[0042] （９）誘導ラマン散乱（Stimulated Raman scattering: SRS）

ラマン活性媒質に周波数ω_1のポンプ光と周波数ω_2のストークス光を入射したとき、ラマン散乱によりポンプ光がストークス光に変換され、ストークス光が増幅される過程がSRS過程である（図１２（ｄ））。従来のSRS顕微鏡では、SRSによるストークス光強度とポンプ光強度の微小な変化量を測定するために、TPA顕微鏡と同様に一方の励起光に強度変調を行う。ただし、上述したように本手法を適用する場合は強度変調を行う必要はない。SRS顕微鏡では振動コントラストが得られる。

[0043] ＜数値計算による原理の検証＞

図５に数値計算により周波数f=10kHzで励起光１の集光点を100nm（δ=100nm)変調したときの信号のフーリエ変換を示す。図５のグラフの横軸は周波数（kHz）を表し、縦軸は任意単位の信号光強度をログスケールで表している。

[0044] 数値計算は、ビーム半径3mm($1/e^2$)のガウス型空間プロファイルを有する、

中心波長800nm(励起光1)と中心波長1015nm(励起光2)の２つの励起パルスを、焦点距離4.5mmの対物レンズにより集光し、SFGを発生させた場合を仮定した。

[0045] 図５において、太線は中心位置（r=0）でのSFG光の周波数成分を示し、細線は中心から離れた外側位置（r=250nm）のSFG光の周波数成分を示す。なお、周波数2n×10kHz（nは整数）における外側位置の信号の強度は矢印で示してある。図から、中心位置の周波数成分は変調周波数fの偶数倍の周波数成分が大きく、中心から離れた位置では変調周波数fの奇数倍の周波数成分が大きいことが分かる。また、変調周波数の偶数倍成分は主に中心位置から生じるSFG光によるものであることが分かる。例えば、2fの周波数成分は、中心位置から生じるSFG光の方が、中心から離れた位置から生じるSFG光よりも10^1～10^2倍大きいことが分かる。さらに、励起光の空間強度分布が完全な正弦波ではないので、正弦波からの歪成分として高次の周波数成分も現れている。そのため、高次成分においても中心位置と中心から離れた位置において周波数特性が異なっている。以上から、変調周波数の偶数倍の周波数成分を検出することにより、中心位置付近で生じるSFG光を特異的に抽出できることが分かる。

[0046] 図６に数値計算により得られた点像分布関数を示す。図６上側は光軸に垂直なxy面での点像分布を示し、図６下側は光軸に平行なxz面内での点像分布を示している。

[0047] ここで、励起光１の集光位置変調は、光軸に垂直なxy面内における対称性を得るために、集光位置が螺旋状に動くように変調して数値計算を行った。すなわち、SFG光強度は、

[数6]

$$I_{SFG}(x,y,z,r) \propto \int I_{\omega 1}(x+\delta\cos 2\pi f\cos 2\pi f_0 t, y+\delta\cos 2\pi f\sin 2\pi f_0 t, z) I_{\omega 2}(x,y,z)dt$$

により計算した。ここで、f_0は螺旋回転の角周波数、fは螺旋半径の変調周波数であり、f_0>>fとする。こうすることで、xy面内における対称性が確保さ

れる。

[0048] 図６において、従来の手法（ＤＣ成分）に比べて、周波数2fの点像分布関数の広がりが小さくなっている。また、検出する周波数が高くなるほど点像分布の広がりが小さくなっている。すなわち、本発明により空間分解能が向上していることが示されている。なお、点像分布の広がりはxy面内においてもxz面内においても小さくなっており、水平分解能および垂直分解能の両方が向上していること分かる。

[0049] また、本発明によれば垂直方向について、集光点以外での信号を抑制できている。したがって、測定対象の表面近傍から発生する背景光を抑制可能であり、従来手法に比べて観察可能な深さが向上する。図７（ａ）は、光軸（z）方向の信号強度を、本発明の手法と従来の手法について示している。このように、本発明によれば、観察信号が集光点付近に限定されることが分かる。

[0050] 観察対象の試料が散乱の無い試料であれば、図７（ａ）が各深さから発生する信号強度であり、集光点位置で発生する信号強度が最も大きくなり、その他の領域から発生する背景光は十分小さく無視できる。しかしながら、散乱の大きな試料では、励起光強度が深さと共に、以下のように減衰する。

[数7]

$$I(r) \propto \exp[-(z - z_0)/ls]$$

ここで、ls：散乱長、z：光軸方向の位置、z_0：試料表面の位置である。

[0051] したがって、散乱の大きな試料の場合は、図７（ａ）に示す信号強度に、深さに応じた励起光強度を掛け合わせた強さが、各深さから発生する信号強度となる。図７（ｂ）に、散乱有りと無しの場合のそれぞれについて、各深さから発生する信号強度を示した。散乱有りの試料を観測する場合には、ある深さ以上については、試料表面から発生する信号強度の方が集光点付近から発生する信号強度より強くなってしまい、観察が不可能となる。本発明では、集光点以外から発生する信号強度を十分抑制できているため、観察可能な深さを改善することができる。

[0052] ＜非線形光学顕微鏡のシステム概要＞

図１（ａ）に、本実施形態にかかる非線形光学顕微鏡のシステム構成の概念図を示す。

[0053] 本実施形態にかかる非線形光学顕微鏡では、２波長以上の励起光によって誘起する非線形光学過程を用いる。非線形光学過程としては、多光子励起蛍光、和周波発生（第２高調波発生）、差周波発生、第３高調波発生、４光波混合、コヒーレント反ストークス散乱、誘導パラメトリック発光、多光子吸収、誘導ラマン散乱などがある。

[0054] 分子を励起するための励起光として２波長以上のレーザー光を用いるため、２つのレーザー発生装置１０１，１０２を用いる。２波長以上のレーザー光を得ることができれば、１台のレーザー発生装置のみを使用しても良い。例えば、１台のレーザー発生装置で同時に複数の波長を出力可能であれば分割して使用できる。また、レーザー発生装置を１つのみとして、波長変換器を用いて異なる複数の波長を得ても良い。

[0055] ビーム位置変調ユニット１０３は、一方の励起光（励起光１）の集光位置を、他の励起光（励起光２）の集光位置に対して動かすためのものである。図１（ｂ）に示すように集光位置を光軸方向に垂直な平面内で動かすためには、電気光学（ＥＯ）素子・音響光学（ＡＯ）素子・ガルバノスキャナーなどのビームポインティングを制御可能なビームポインティング変調ユニットを用いればよい。また、図１（ｃ）に示すように集光位置を光軸方向に動かすためには、電気光学素子・可変ミラーなどのビームの発散角度を制御可能な波面変調ユニットを用いればよい。また、ビームポインティング変調ユニットと波面変調ユニットの両方を用いて、集光位置を３次元的に移動させてもかまわない。また、各励起光の集光位置を相対的に移動させられれば良いので、複数の励起光の位置をそれぞれ制御してもかまわない。

[0056] 時間遅延光学系１０４は、励起光１と励起光２を集光点において時間的に重ねるためのものである。

[0057] レーザー走査顕微鏡１０５は、ポインティング変調または波面変調によっ

て生じる信号から、位置変調の変調周波数に応じた周波数成分を抽出する。具体的には、変調周波数の偶数倍の周波数成分を抽出する。

[0058] ＜装置構成＞

図２に、実験で用いた非線形光学顕微鏡の具体的な構成を示す。ここでは、光源として波長775nmのチタンサファイアレーザー発振器１１を用いてレーザーパルスを発振する。薄膜偏光板（ビームスプリッター）１２でこのレーザーパルスを分割し、一方をそのまま励起光パルス２として用い、他方をパラメトリック発振器（波長変換手段）１３により波長1000nmに変換して励起光パルス１として用いる。

[0059] 励起光パルス１についてはガルバノスキャナー（位置変調ユニット）１４を通過させた後に、励起光パルス２については時間遅延光学系１６を通過させた後に、ダイクロイックミラー１５を用いて空間的に重ね合わせる。重ね合わされた励起光パルス１，２は、対物レンズ１８により試料１９の内部に集光される。なお、試料１９が固定されたスライドガラスは３軸ピエゾステージによって移動可能であり、試料１９を３次元的に走査可能である。

[0060] 試料１９から反射された光信号は、ダイクロイックミラー１７等を介して、励起光カットフィルター２０により励起光を除去した後に、光電子増倍管（PMT: Photomultiplier Tube）２０に入射される。また、試料１９を透過した光信号も、励起光カットフィルター２３により励起光を除去した後に、光電子増倍管２４に入射される。ＰＭＴ２０、２４において検出された信号から特定の周波数成分を抽出するためのディジタル信号処理を省略する目的で、本実験例ではロックインアンプを用いて、ガルバノスキャナーによる位置変調の周波数に応じた周波数成分を抽出する。ロックインアンプによって抽出された信号は、例えばコンピュータに送られて表示・記憶等の処理が成される。

[0061] ・実験結果１

本発明の手法によって光軸方向の分解能が向上していることを確認するための実験を行った。本実験例では、ガルバノスキャナーを用いて、励起光パ

ルス１の集光位置が励起光パルス２の集光位置に対して、光軸に垂直な面内で直線上を動くように集光位置を変調させた。この際の変調周波数は1kHzとした。すなわち、励起光パルス１の位置変調方向をx軸としたときに、励起光パルス１の集光位置は次のように表される。なお、このように２つの励起光パルスの集光位置を光軸に垂直な面内で相対的に直線移動させる変調方法を、以下、Ｘ変調と称する。

[数8]

$$I_{\omega 1}(x,y,z) \rightarrow I_{\omega 1}(x+\delta \cos 2\pi ft, y, z)$$

[0062] 厚み７０μｍの検鏡プレートにシアン蛍光タンパクを封入したものを試料として用い、２光子蛍光顕微鏡の光軸方向における応答を測定した。図８にシアン蛍光タンパクとスライドガラスの境界近傍における信号発生分布を示す。図８（ａ）は、光軸方向の応答をリニアスケールで表したものであり、右上は境界付近の拡大図である。図８において、細線が従来手法による結果を示し、太線が本手法による2f(2kHz)成分を示している。境界近傍での応答が本手法の方が急峻であり、光軸方向の分解能が向上していることが分かる。また、図８（ｂ）のように対数表示にすると集光点以外から発生する２光子蛍光強度も抑制できていることが分かる。なお、図８（ｂ）においてデータがつながっていない部分は信号強度がノイズレベルであり、信号が負になっているためである。

[0063] ・実験結果２

次に、本発明の手法によって光軸に垂直な面内での分解能が向上していることを確認するための実験を行った。図９は、直径４０ｎｍの蛍光ビーズの２光子蛍光像である。

[0064] 図９（ａ）は従来手法による観察結果であり、図９（ｂ）は励起光パルス１の集光位置を光軸に対して垂直な面内において、励起光パルス２の集光位置と相対的に直線移動させた。図面では、この移動方向は上下方向（Ｙ方向）に相当する。集光位置をＹ方向に変調させて、変調周波数fの２倍の周波数

成分2f(2kHz)を抽出することで、変調方向（Ｙ方向）の分解能が向上していることが分かる。また、Ｘ方向については位置変調を行っていないので、Ｘ方向についての分解能は向上していない。

[0065] 図９（ｃ）は、Ｘ方向の分解能も向上させるために、励起光パルス１の集光位置を螺旋状に移動させた場合の観測結果である。ここでは、励起光パルス１の集光位置を、以下のように位置変調させている。

[0066] [数9]

$$I_{\omega 1}(x,y,z) \rightarrow I_{\omega 1}(x+\delta_1 \cos 2\pi ft \cos 2\pi f_0 t, y+\delta_2 \cos 2\pi ft \sin 2\pi f_0 t, z)$$

なお、観察信号として抽出する信号は周波数2fの成分である。また、螺旋回転の各周波数f_0はf_0>2fとしている。このように集光位置を螺旋状に移動させることにより、光軸に垂直な面内における分解能が、Ｘ方向およびＹ方向の両方について向上していることが図９（ｃ）から確認できる。

[0067] ・実験結果３

次に、２光子励起蛍光以外の他の多光子励起過程においても分解能が向上することを確認するために、ガラスと空気の境界における４光波混合（FWM: Four-wave Mixing）信号を測定した。FWMは周波数ω1, ω2, ω3の３つの入射場と媒質の相互作用により、ω4=ω1-ω2+ω3の光が発生する３次の非線形光学過程である。本実験では、３つの励起光パルスを試料に照射し、そのうちの１つの励起光パルスを光軸方向に垂直な面内で変調周波数fで直線移動させた。

[0068] 図１０に、光軸に垂直な方向の信号発生分布を示す。細線が従来手法による測定結果であり、太線が本手法による2f成分を示している。２光子蛍光のときと同様に、本手法の方が境界近傍において急峻な変化をしており、光軸方向の分解能が向上していることが分かる。

[0069] ＜本手法による効果＞

以上のように、非線形光学過程による信号光を測定する非線形光学顕微鏡において励起光の集光位置を変調させ、信号光の変調周波数の偶数倍成分を

抽出することで、空間分解能を光軸に垂直な面内方向および光軸方向の両方について向上させることができる。また、集光点以外から発生する信号光を抑制できるので、従来よりも深い部分のイメージングできるようになる。

符号の説明

[0070] １１　レーザー発生装置

１２　ビームスプリッター（薄膜偏光板）

１３　光パラメトリック発振器

１４　ガルバノスキャナー（ポインティング変調ユニット）

１５　ダイクロイックミラー

１６　時間遅延ステージ

１７　ダイクロイックミラー

１８　対物レンズ

１９　試料

２０　励起光カットフィルター

２１　光電子増倍管

２２　対物レンズ

２３　励起光カットフィルター

２４　光電子増倍管

請求の範囲

[請求項1] 第１の励起光を試料上に集光する第１の光学系と、

第２の励起光を試料上に集光する第２の光学系と、

前記第１の励起光と前記第２の励起光の試料上での集光位置を、所定の変調周波数で相対的に位置変調させる集光位置変調手段と、

試料から生じる信号光から、前記変調周波数に応じた周波数成分を抽出する信号抽出手段と、

を備える非線形光学顕微鏡。

[請求項2] 前記信号抽出手段は、前記信号光から前記変調周波数の偶数倍の周波数成分を抽出する、

請求項１に記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項3] 前記集光位置変調手段は、第１の励起光の集光位置と第２の励起光の集光位置との重心を、光軸に垂直な面内で螺旋状に移動させる、

請求項１または２に記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項4] 前記集光位置変調手段は、第１の励起光の集光位置と第２の励起光の集光位置との重心を、光軸に垂直な面内で直線状に移動させる、

請求項１または２に記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項5] 前記集光位置変調手段は、第１の励起光の集光位置と第２の励起光の集光位置との重心を、光軸方向に直線状に移動させる、

請求項１～４のいずれかに記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項6] 前記集光位置変調手段は、第１の励起光または第２の励起光の集光位置を光軸に垂直な面内で移動させるポインティング変調ユニットを含む、

請求項３または４に記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項7] 前記集光位置変調手段は、第１の励起光または第２の励起光の集光位置を光軸方向に移動させる波面変調ユニットを含む、

請求項５記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項8] 第１の励起光および第２の励起光はパルスレーザ光であり、

第１の励起光と第２の励起光の集光位置を時間的に重ねるための時間遅延光学系を更に備える、

請求項１～７のいずれかに記載の非線形光学顕微鏡。

[請求項9] 所定の変調周波数で第１の励起光と第２の励起光の集光位置を相対的に位置変調させつつ、試料上に第１の励起光と第２の励起光を集光する集光工程と、

試料から生じる信号光から、前記変調周波数に応じた周波数成分を抽出する抽出工程と、

を含む、非線形光学顕微鏡法。

[請求項10] 前記抽出工程では、前記信号光から前記変調周波数の偶数倍の周波数成分を抽出する、

請求項９に記載の非線形光学顕微法。

[請求項11] 前記集光工程では、第１の励起光の集光位置と第２の励起光の集光位置との重心を、光軸に垂直な面内で螺旋状に移動させる、

請求項９または１０に記載の非線形光学顕微法。

[請求項12] 前記集光工程では、第１の励起光の集光位置と第２の励起光の集光位置との重心を、光軸に垂直な面内で直線状に移動させる、

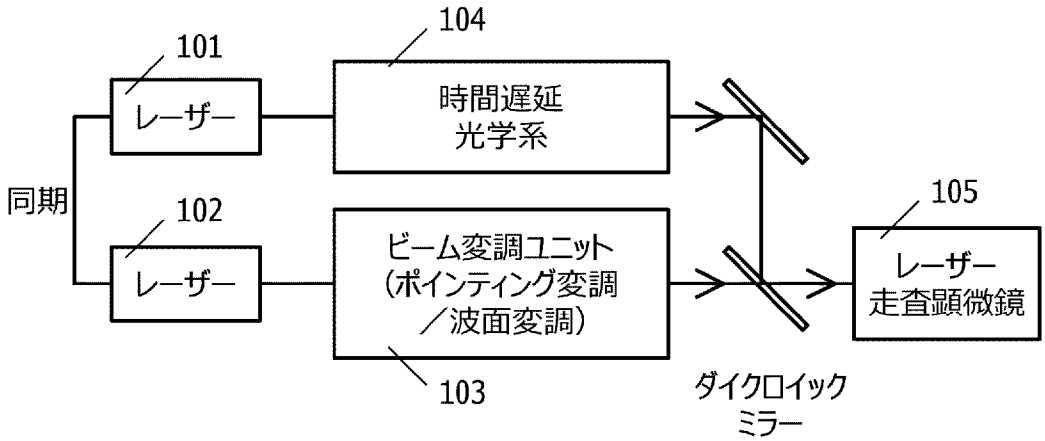
請求項９または１０に記載の非線形光学顕微法。

[請求項13] 前記集光工程では、第１の励起光の集光位置と第２の励起光の集光位置との重心を、光軸方向に直線状に移動させる、

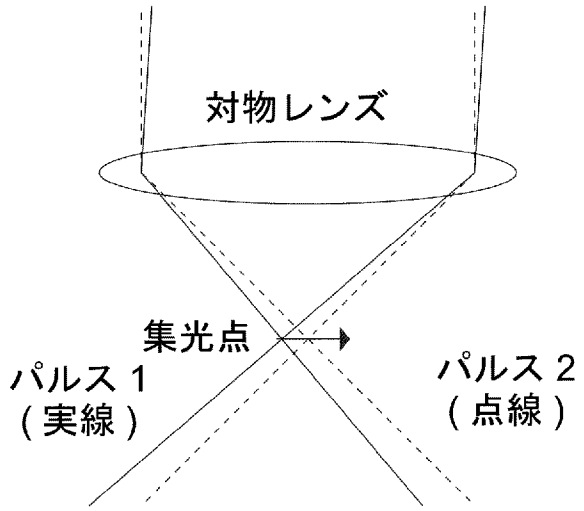
請求項９～１２のいずれかに記載の非線形光学顕微法。

[図1]

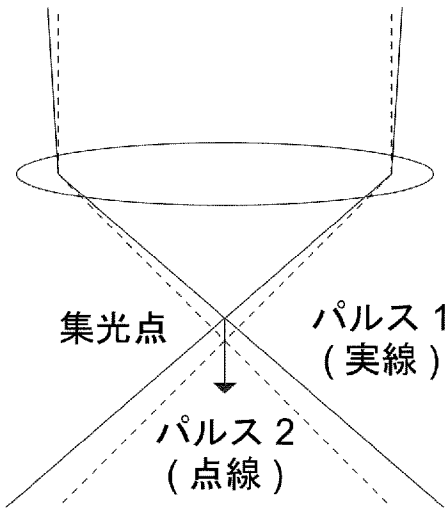
(a) システム構成概要



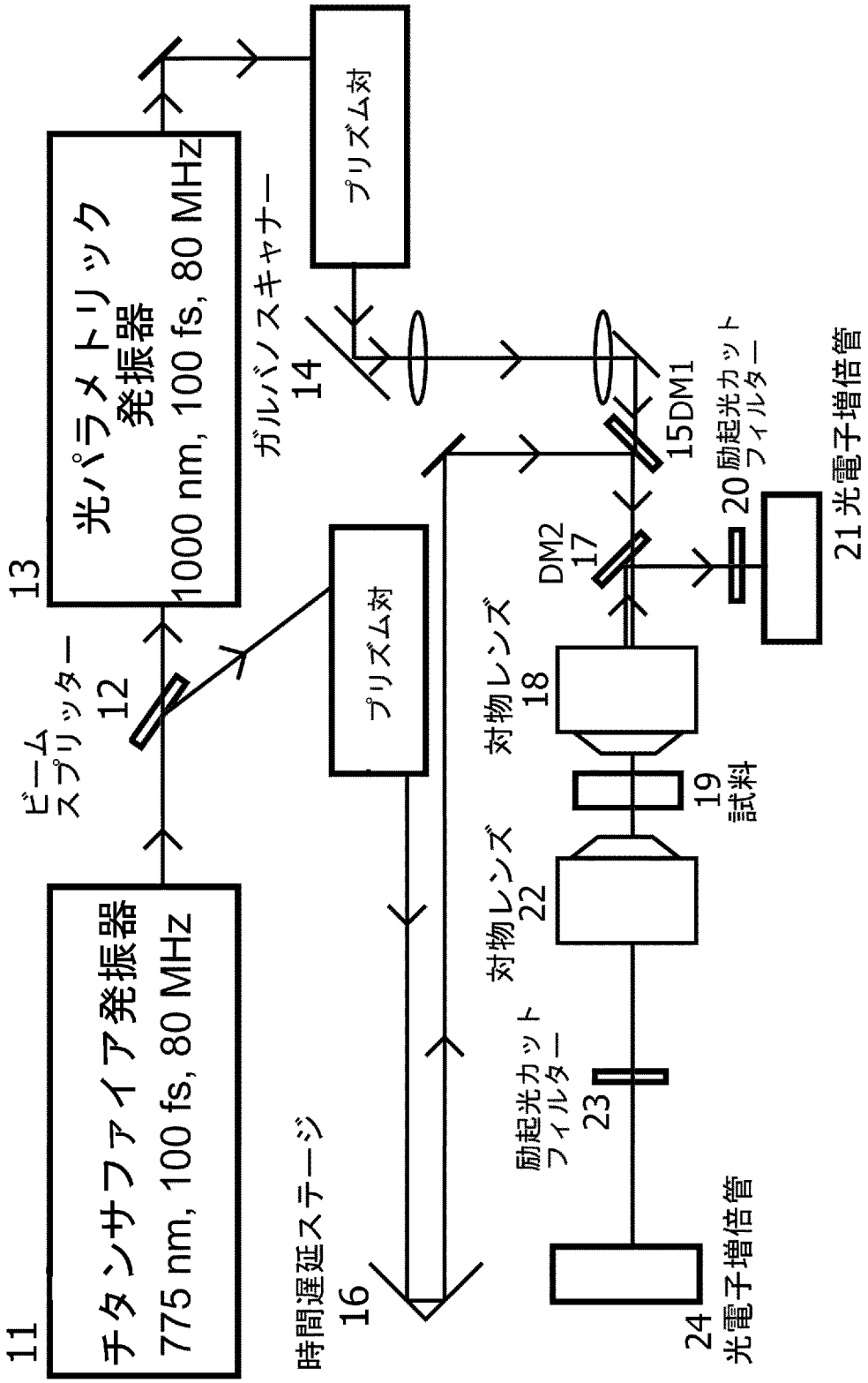
(b)ポインティング変調ユニット



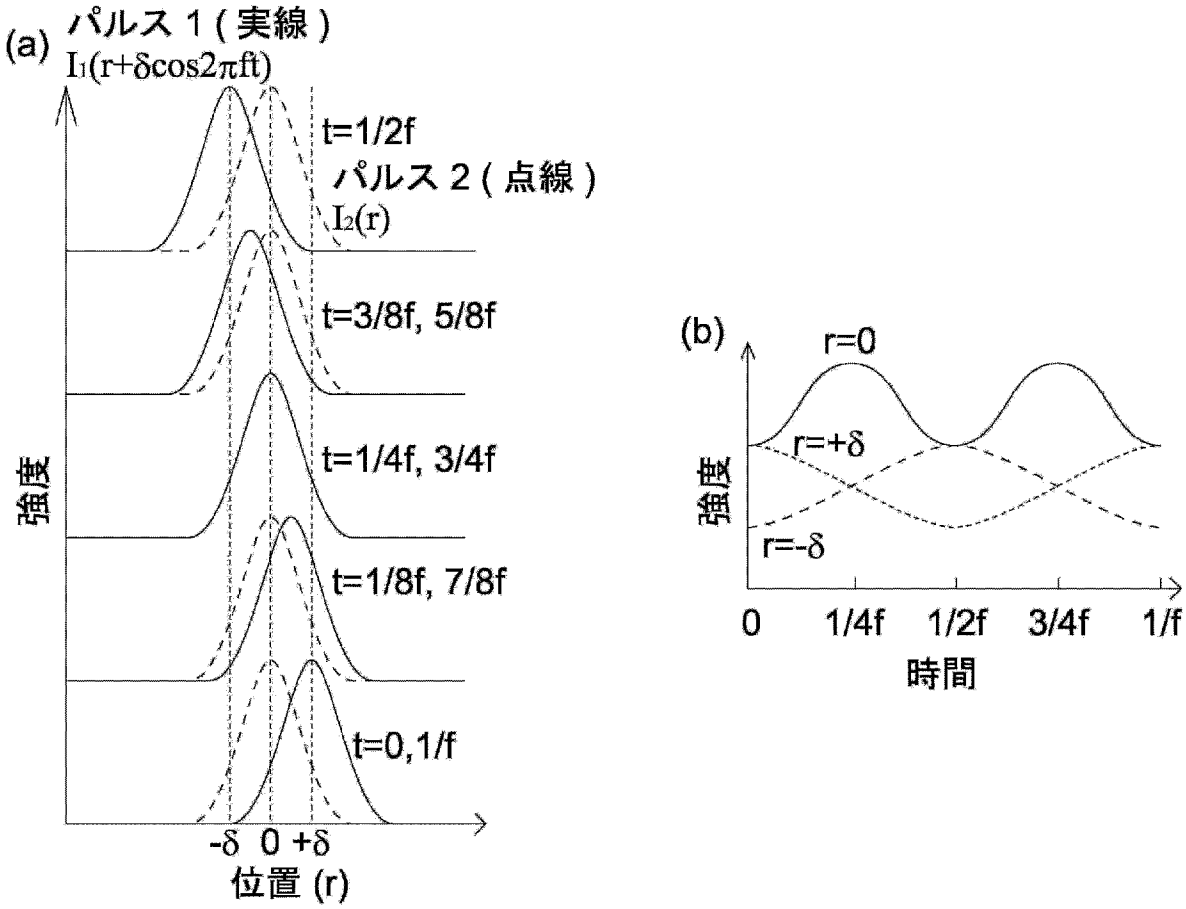
(c)波面変調ユニット



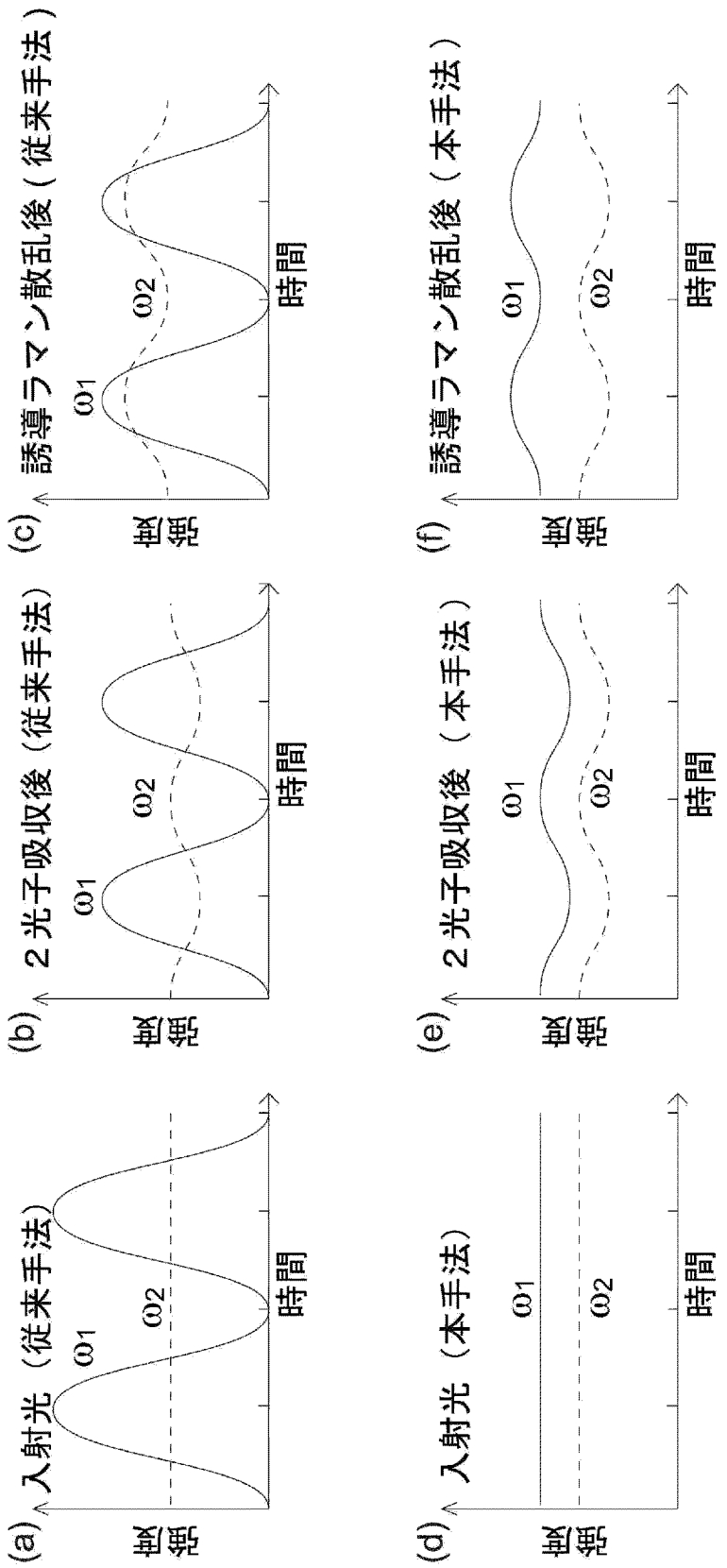
[図2]


11
チタンサファイア発振器
775 nm, 100 fs, 80 MHz
ビームスプリッター
12
13
光パラメトリック発振器
1000 nm, 100 fs, 80 MHz
ガルバノスキャナー
14
プリズム対
プリズム対
時間遅延ステージ
16
DM2
17
15DM1
20 励起光カットフィルター
21 光電子増倍管
対物レンズ
18
19
試料
対物レンズ
22
励起光カットフィルター
23
24
光電子増倍管

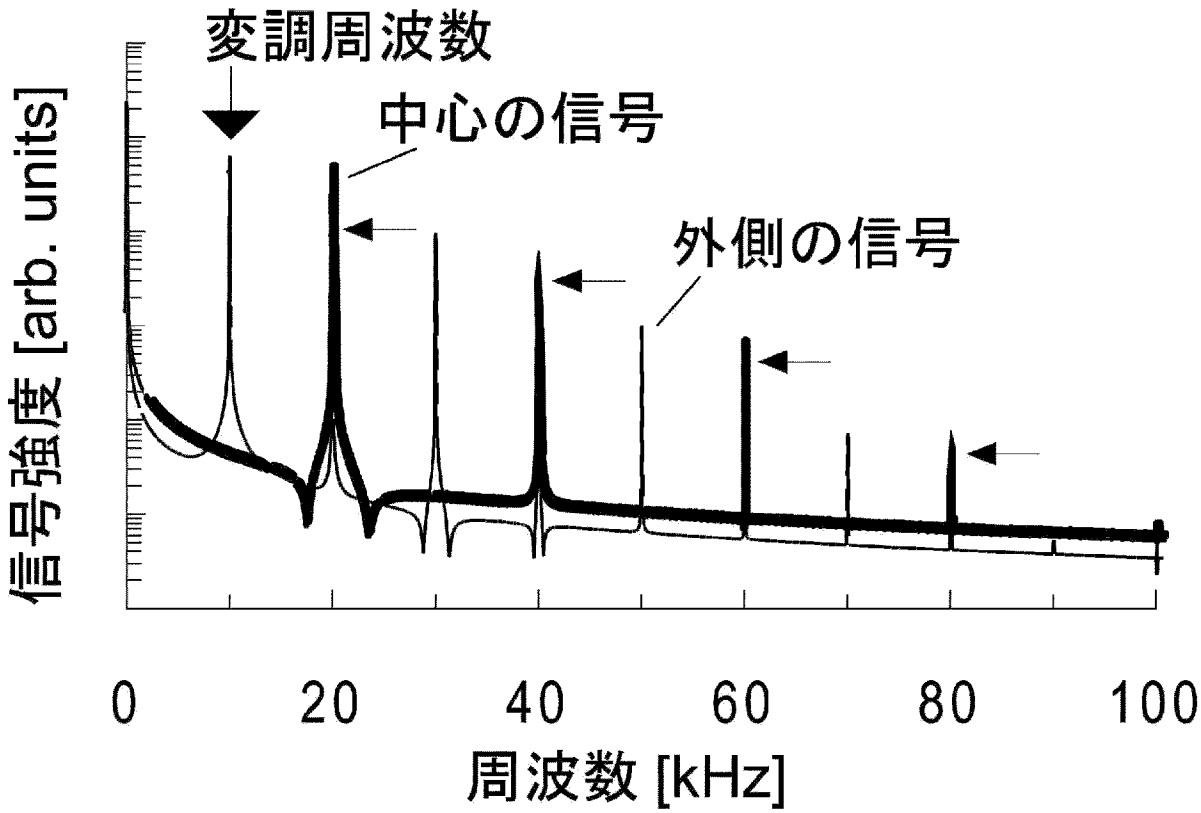
[図3]


(a)
パルス 1 (実線)
I1(r+δcos2πft)
t=1/2f
パルス 2 (点線)
I2(r)
t=3/8f, 5/8f
t=1/4f, 3/4f
t=1/8f, 7/8f
t=0,1/f
強度
-δ 0 +δ
位置 (r)
(b)
r=0
r=+δ
r=-δ
強度
0 1/4f 1/2f 3/4f 1/f
時間

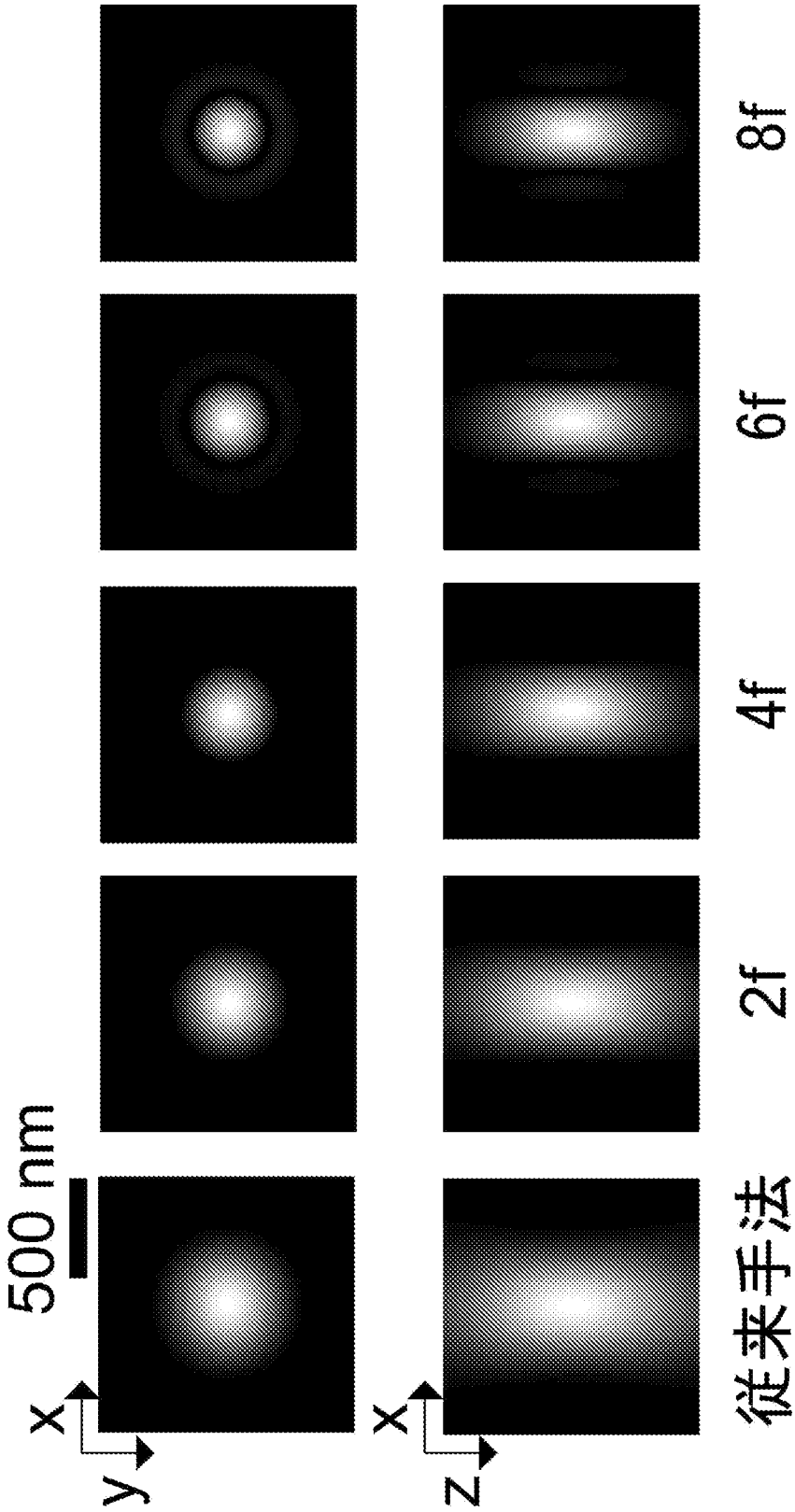
[図4]


(a) 入射光（従来手法）
(b) 2光子吸収後（従来手法）
(c) 誘導ラマン散乱後（従来手法）
(d) 入射光（本手法）
(e) 2光子吸収後（本手法）
(f) 誘導ラマン散乱後（本手法）
強度
時間
ω1
ω2

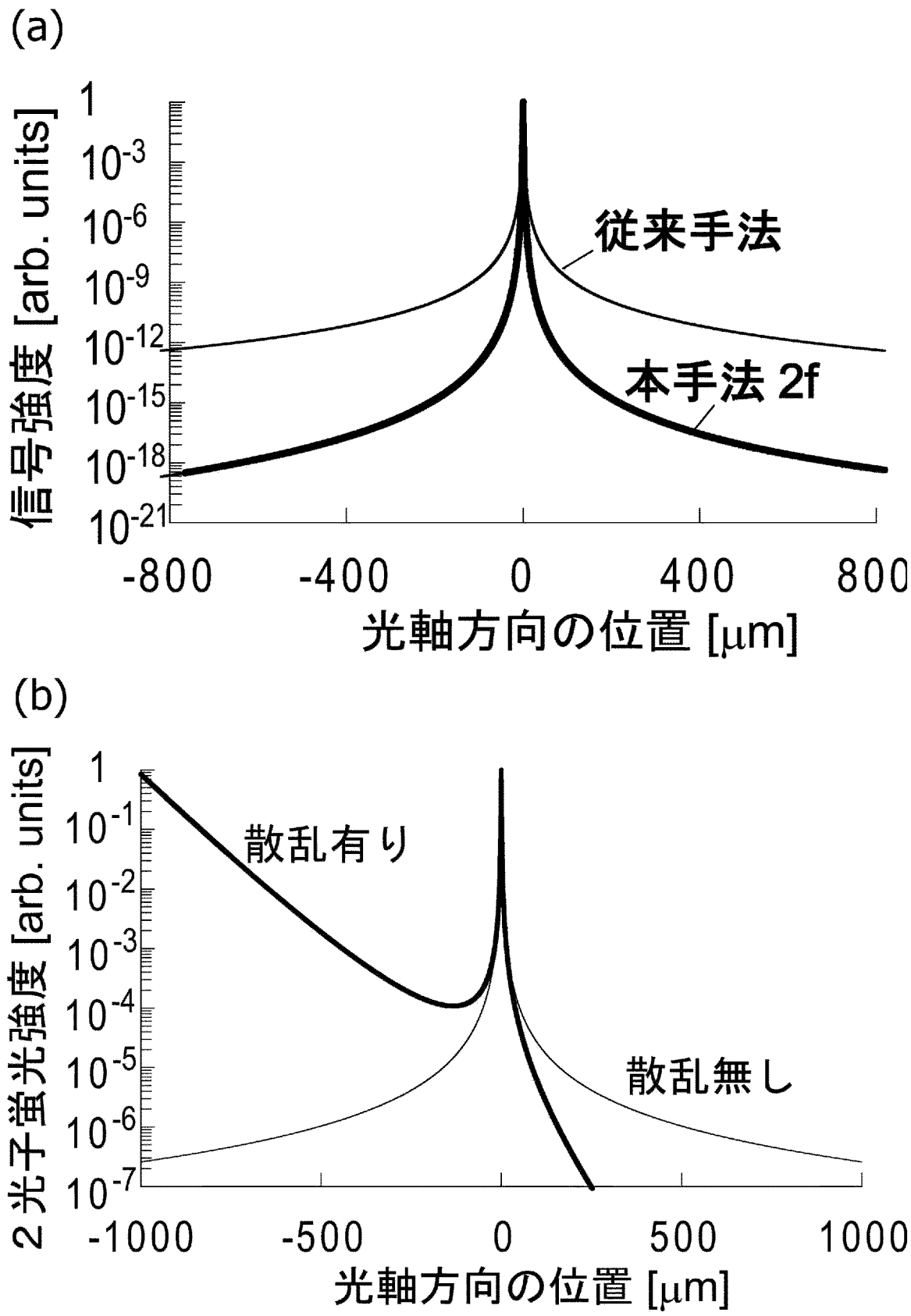
[図5]



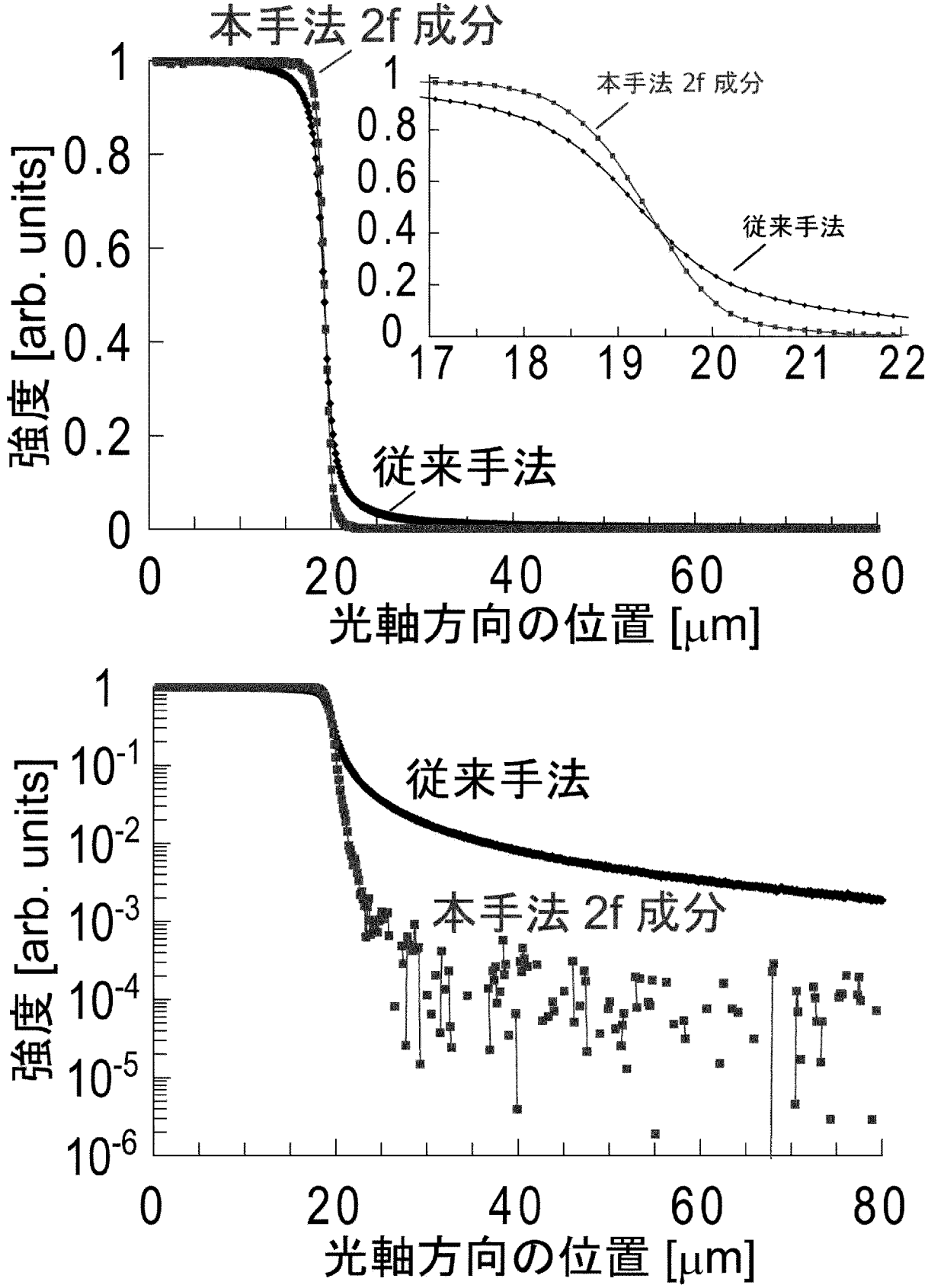
[図6]



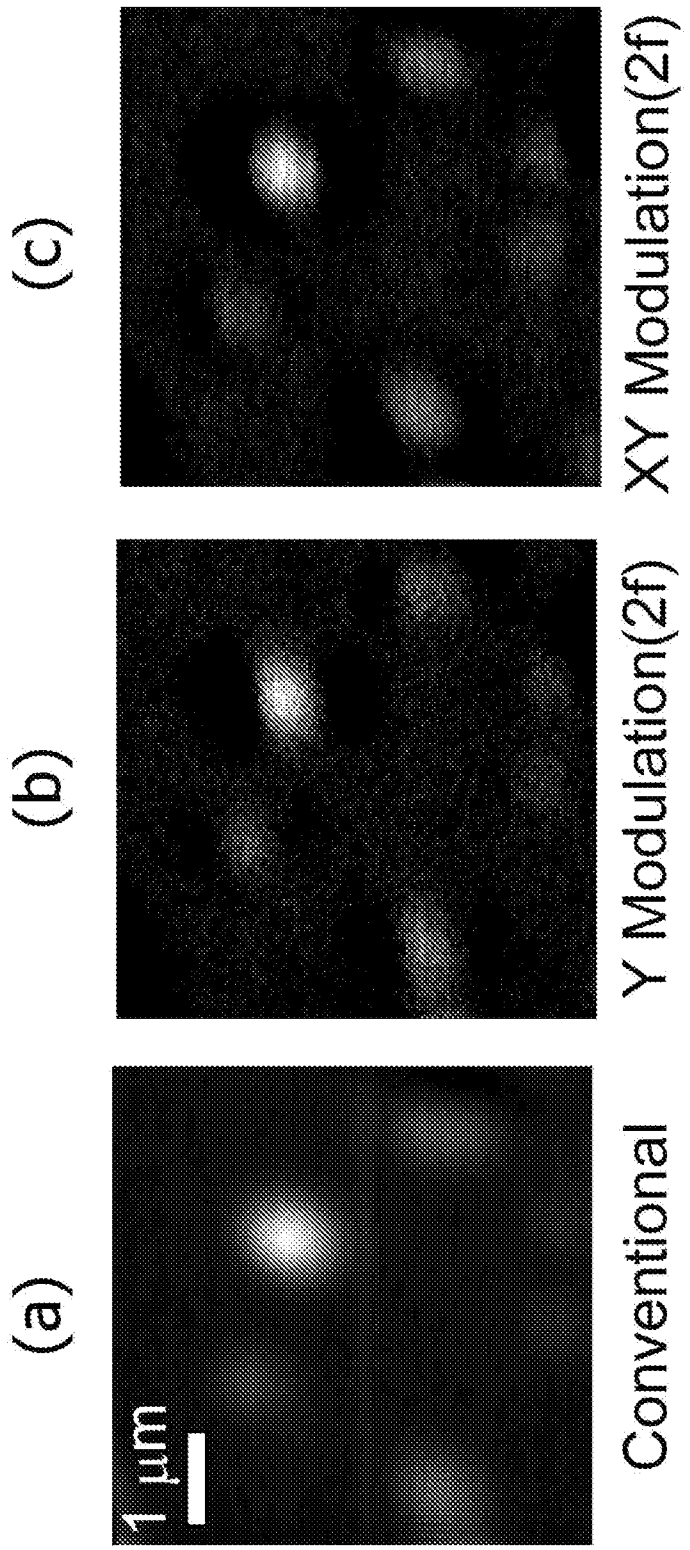
[図7]


(a)
信号強度 [arb. units]
1
10-3
10-6
10-9
10-12
10-15
10-18
10-21
従来手法
本手法 2f
-800
-400
0
400
800
光軸方向の位置 [μm]
(b)
2光子蛍光強度 [arb. units]
1
10-1
10-2
10-3
10-4
10-5
10-6
10-7
散乱有り
散乱無し
-1000
-500
0
500
1000
光軸方向の位置 [μm]

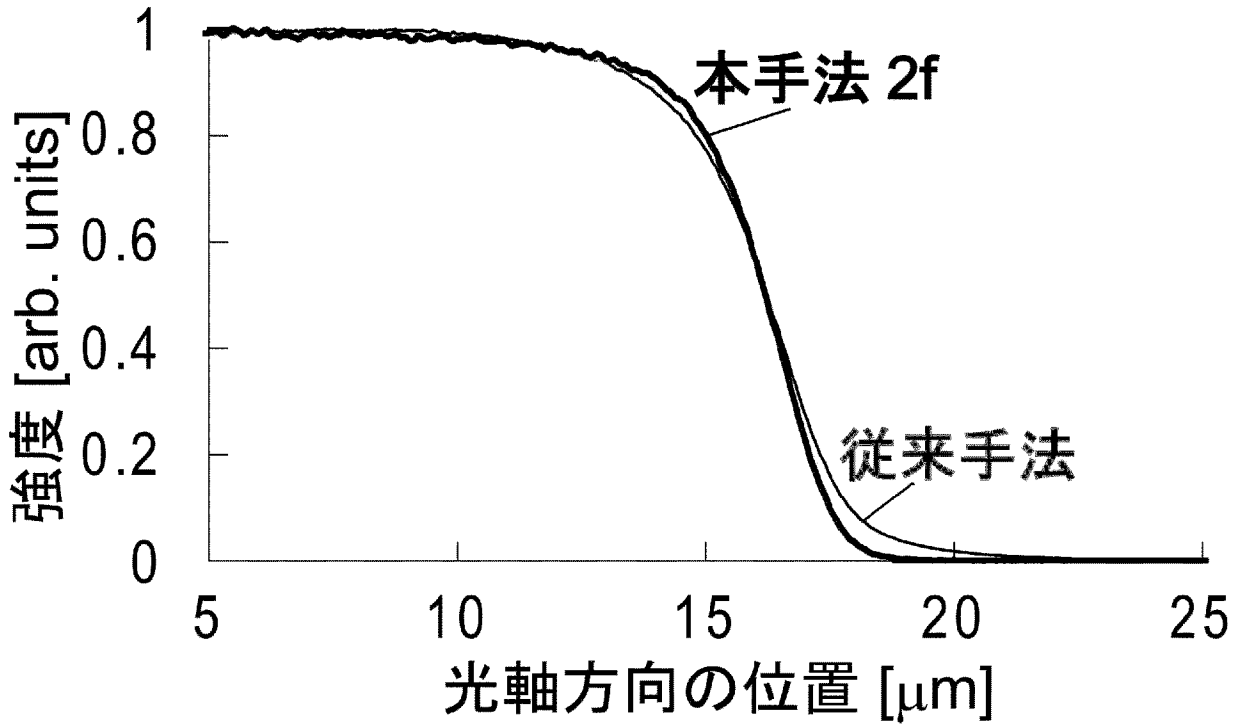
[図8]


本手法 2f 成分
従来手法
強度 [arb. units]
光軸方向の位置 [μm]
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
17
18
19
20
21
22
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}

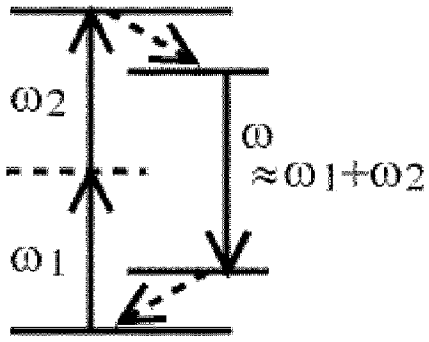
[図9]



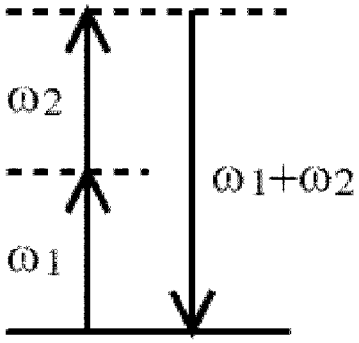
[図10]



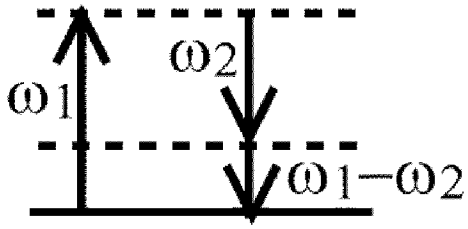
[図11]



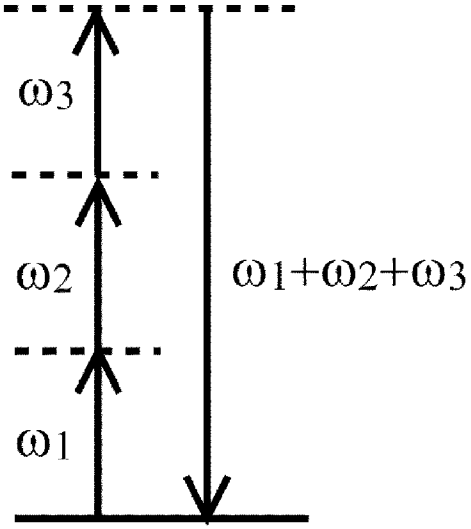
(a)TPEF過程



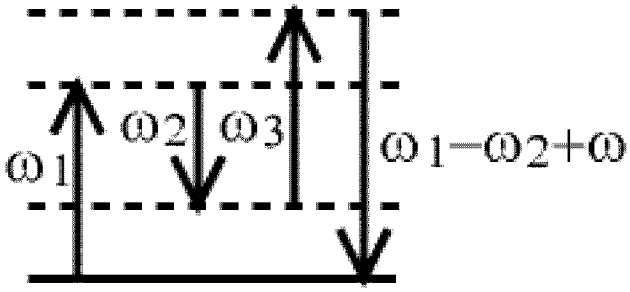
(b)SFG(SHG)過程



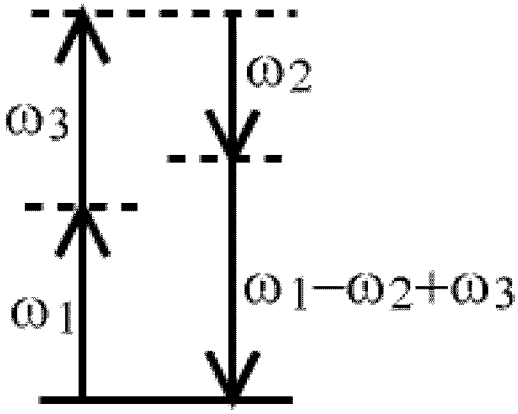
(c)DFG過程



(d)THG過程

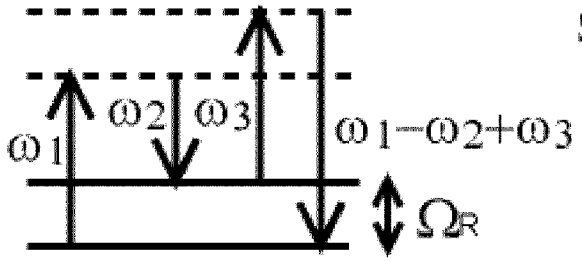


(e)FWM過程

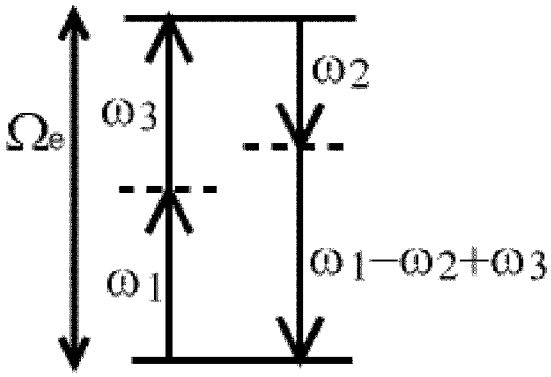


(f)FWM過程

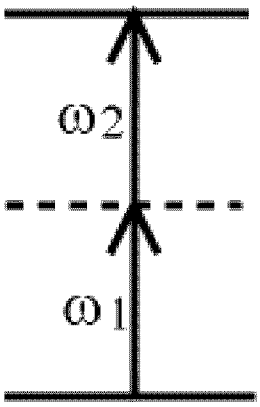
[図12]



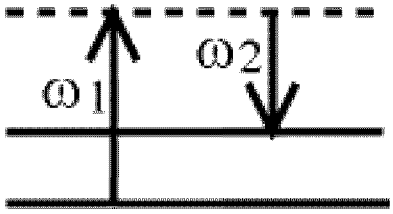
(a)CARS過程



(b)SPE過程



(c)TPA過程



(d)SRS過程

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/052377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G02B21/00(2006.01)i, *G01N21/64*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B21/00, G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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	JP 2005-91895 A (Riken, Japan), 07 April 2005 (07.04.2005), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2010-286799 A (Nikon Corp.), 24 December 2010 (24.12.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2012-532878 A (National University of Singapore), 14 October 2010 (14.10.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-13

☐ 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	Date of mailing of the international search report
27 April, 2012 (27.04.12)	15 May, 2012 (15.05.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５２３７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

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

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G02B21/00, G01N21/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２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	JP 2005-91895 A (独立行政法人理化学研究所) 2005.04.07, 全文全図 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2010-286799 A (株式会社ニコン) 2010.12.24, 全文全図 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2012-532878 A (ナショナル　ユニヴァーシティー　オブ　シンガポール) 2010.10.14, 全文全図 (ファミリーなし)	1-13

☐　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	国際調査報告の発送日
２７．０４．２０１２	１５．０５．２０１２

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　２Ｖ　３７１３
堀井　康司
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２７１