(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 24 日(24.08.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/141447 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 1/28 (2006.01) *H01J 37/20* (2006.01)
G01N 23/04 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
G01N 23/225 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054966

(22) 国際出願日: 2016 年 2 月 19 日(19.02.2016)

(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: 株式会社ニコン(NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1086290 東京都港区港南二丁目１５番３号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 佐瀬　一郎(SASE Ichiro); 〒1086290 東京都港区港南二丁目１５番３号　株式会社ニコン内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 龍華国際特許業務法人(RYUKA IP LAW FIRM); 〒1631522 東京都新宿区西新宿１－６－１　新宿エルタワー２２階 Tokyo (JP).

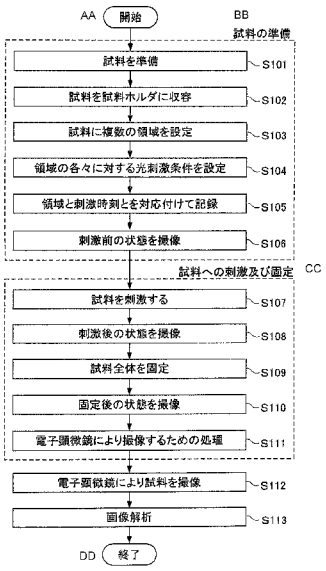
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

[続葉有]

(54) **Title**: SAMPLE PREPARATION METHOD AND SAMPLE PREPARATION DEVICE

(54) 発明の名称 : 試料作製方法および試料作製装置



S101 Prepare a sample
S102 Accommodate the sample in a sample holder
S103 Set a plurality of regions of the sample
S104 Set photostimulation conditions for each region of the sample
S105 Associate and store the regions and photostimulation times
S106 Carry out imaging of the state before stimulation
S107 Stimulate the sample
S108 Carry out imaging of the state after stimulation
S109 Fix the entire sample
S110 Carry out imaging of the state after fixing
S111 Carry out processing for imaging using an electron microscope
S112 Carry out imaging of the sample using an electron microscope
S113 Carry out image analysis
AA Start
BB Sample preparation
CC Stimulation and fixing of the sample
DD End

(57) Abstract: Provided is a sample preparation method provided with a first light irradiation step for irradiating light onto a first region of a sample at time t1, a second light irradiation step for irradiating light onto a second region of the sample different from the first region at time t2 after time t1, and a fixing processing step for carrying out fixing processing on the sample at time t3 after time t2. Also provided is a sample preparation device provided with a light irradiation unit for irradiating light onto a first region of a sample at time t1 and irradiating light onto a second region of the sample different from the first region at time t2 after time t1 and a fixing unit for carrying out fixing processing on the sample at time t3 after time t2.

(57) 要約: 試料作製方法であって、時刻 t1 に、試料の第１領域に光を照射する第１光照射工程と、時刻 t1 の後、時刻 t2 に、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射する第２光照射工程と、時刻 t2 の後、時刻 t3 に、試料に対して固定処理を行う固定処理工程とを備える。試料作製装置であって、時刻 t1 に、試料の第１領域に光を照射し、時刻 t1 の後、時刻 t2 に、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射する光照射部と、時刻 t2 の後、時刻 t3 に、試料に対して固定処理を行う固定部とを備える。

WO 2017/141447 A1

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:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 試料作製方法および試料作製装置

技術分野

[0001] 本発明は、試料作製方法および試料作製装置に関する。

背景技術

[0002] 生物試料に対して光刺激し、凍結保存する装置が知られている。（例えば、特許文献１参照）。

特許文献１　US2013/0227970

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 試料に対する光刺激の条件を変えて、試料を電子顕微鏡で観察する要求が高まっており、そのための試料が必要となっている。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明の第１の態様においては、試料作製方法であって、時刻t1に、試料の第１領域に光を照射する第１光照射工程と、時刻t1の後、時刻t2に、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射する第２光照射工程と、時刻t2の後、時刻t3に、試料に対して固定処理を行う固定処理工程とを備える。

[0005] 本発明の第２の態様においては、試料を作製する方法であって、時刻t1に、試料の第一の領域および第一の領域とは異なる第二の領域に、光を照射する第１照射工程と、時刻t1の後、時刻t2に、第一の領域に光を照射する第２照射工程と、時刻t2の後、時刻t3に、第二の領域に、光を照射する第３照射工程と、時刻t3の後、時刻t4に、試料に対して固定処理を行う固定処理工程とを備える。

[0006] 本発明の第３の態様においては、試料作製方法であって、試料の第１領域および第１領域とは異なる第２領域に対して光の照射を同時開始し、互いに異なる時間の間光を照射する光照射工程と、光照射工程後、試料に対して固定処理を行う固定処理工程とを備える。

[0007] 本発明の第４の態様においては、試料作製装置であって、時刻t1に、試料の第１領域に光を照射し、時刻t1の後、時刻t2に、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射する光照射部と、時刻t2の後、時刻t3に、試料に対して固定処理を行う固定部とを備える。

[0008] 本発明の第５の態様においては、試料を作製する装置であって、時刻t1に、試料の第一の領域および第一の領域とは異なる第二の領域に、光を照射する第１照射工程と、時刻t1の後、時刻t2に、第一の領域に光を照射する第２照射工程と、時刻t2の後、時刻t3に、第二の領域に、光を照射する第３照射工程とを実行する光照射部と、時刻t3の後、時刻t4に、試料に対して固定処理を行う固定部とを備える。

[0009] 本発明の第６の態様においては、試料作製装置であって、試料の第１領域および第１領域とは異なる第２領域に対して光の照射を同時開始し、互いに異なる時間の間光を照射する光照射部と、光照射工程後、試料に対して固定処理を行う固定部とを備える。

[0010] 本発明の第７の態様においては、試料作製装置であって、試料の第１領域に光を照射する第１光照射工程と、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射する第２光照射工程と、試料に対して固定処理を行う固定処理工程とを行う順序を設定可能な設定画面を表示する表示部を有する。

[0011] 本発明の第８の態様においては、試料作製装置であって、試料の第１領域に光を照射する時刻と、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射する時刻と、試料に対して固定処理を行う時刻とを設定可能な設定画面を表示する表示部を有する。

[0012] 本発明の第９の態様においては、試料作製装置であって、時刻t1に、試料の第１領域に光を照射し、時刻t1の後、時刻t2に、第１領域とは異なる第２領域に、光を照射し、時刻t2の後、時刻t3に、試料に対して固定処理を行う場合において、時刻t1、時刻t2および時刻t3を設定可能な設定画面を表示する表示部を有する。

[0013] 上記の発明の概要は、本発明の特徴の全てを列挙したものではない。これ

ら特徴群のサブコンビネーションもまた、発明となり得る。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]試料作製システム１００全体の模式図である。

[図2]試料作製システム１００における光路図である。

[図3]試料の作製手順を示す流れ図である。

[図4]試料３０１の模式図である。

[図5]光刺激条件の設定画面１４５を示す図である。

[図6]試料３０１の領域を説明する模式図である。

[図7]他の設定画面１４５を示す図である。

[図8]刺激された試料３０１の状態を示す模式図である。

[図9]試料ホルダ３００および固定部１６０の模式的断面図である。

[図10]表示画面１７０を示す図である。

[図11]他の表示画面１７１を示す図である。

[図12]さらに他の表示画面１７２を示す図である。

[図13]さらに他の表示画面１７３を示す図である。

[図14]他の設定画面１４５を示す図である。

[図15]他の設定画面１４５を示す図である。

[図16]他の表示画面１７４を示す図である。

[図17]さらに他の表示画面１７５を示す図である。

[図18]さらに他の表示画面１７６を示す図である。

[図19]他の設定画面１４５を示す図である。

[図20]他の表示画面１７７を示す図である。

[図21]さらに他の表示画面１７８を示す図である。

[図22]さらに他の表示画面１７９を示す図である。

[図23]他の設定画面１８１を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、発明の実施の形態を通じて本発明を説明するが、下記の実施形態は請求の範囲に係る発明を限定するものではない。また、実施形態の中で説明

されている特徴の組み合わせの全てが発明の解決手段に必須であるとは限らない。

[0016] 図１は、試料作製システム１００全体の模式図である。試料作製システム１００は、倒立顕微鏡１１０、撮像部１２０、第二照明部１３０、制御部１４０、入力部１４２、表示部１４４、第一照明部１５０、および固定部１６０を備える。

[0017] 倒立顕微鏡１１０は、ステージ１１２および接眼部１１４を有する。ステージ１１２は、観察対象となる試料を支持して位置決めする。図示の例では、試料ホルダ３００に保持された試料がステージ１１２に置かれる。ステージ１１２上に置かれた試料は接眼部１１４から観察される。

[0018] 撮像部１２０は、ＣＣＤ、ＣＭＯＳセンサ等のイメージセンサを有し、倒立顕微鏡１１０により観察される試料の像を記録する。第二照明部１３０は、ステージ１１２上に置かれた試料に向かって照明光を照射する。

[0019] 制御部１４０は、試料作製システム１００の各部の動作を制御すると共に、入力部１４２を通じて、試料作製システム１００の各部に対する設定および指示を受け付ける。また、制御部１４０は、試料作製システム１００の各部に対する設定および指示を受け付けるための設定画面を表示部１４４に表示する。制御部１４０は設定画面において設定された情報に基づいて、少なくとも第一照明部１５０と固定部１６０とを制御する。制御部１４０は、専用のハードウェアにより形成してもよいし、パーソナルコンピュータ等の汎用装置に試料作製システム１００のために記述したプログラムを実装して形成してもよい。

[0020] 第一照明部１５０は、ステージ１１２上の試料に対して、刺激光および励起光を照射する。

[0021] なお、光刺激の一例は、ケージド化合物に光を照射してアンケージさせることにより活性化させ、細胞に特定の反応を起こさせること、また、オプトジェネティクスにおいてチャネルロドプシンに光を照射し、細胞内にイオンを流入させることであってもよいし、これらに限られない。例えば、蛍光色

素に光照射することによりフォトブリーチングさせることであってもよいし、フォトコンバージョンさせることであってもよいし、フォトアクティベーションさせることであってもよい。

[0022] 固定部１６０は、制御部１４０の制御の下に動作して、ステージ１１２上に置かれた試料の状態を固定する。例えば、第一照明部１５０により刺激された試料の状態を、制御部１４０から指示を受けたタイミングで固定できる。以降の説明において、「固定」は、化学反応または生体反応を停止させて試料の組成等が変化しなくなるようにすることを意味する。また、架橋した組成物により細胞の移動、変形等を固定することも「固定」に含む。

[0023] 固定部１６０が試料の状態を固定する方法は、観察の目的に応じて適宜選択される。このため、選択された固定方法に応じて、固定部１６０の動作も異なる。例えば、凍結により試料を固定する場合、固定部１６０は、試料に対して液体窒素等の冷媒を供給する。

また、グルタルアルデヒド等の化学溶液などにより、試料を固定する場合、固定部１６０は、試料溶液をグルタルアルデヒド等の化学溶液などに置換する。光硬化性樹脂を用いて試料を固定してもよく、その場合に樹脂を硬化させる光照射部がさらに設けられてよい。

[0024] 図２は、試料作製システム１００の光路図である。 第一照明部１５０は、光源部２５０と、照明光学系２６０とを含む。

[0025] 光源部２５０は、第一光源２５１、第二光源２５２および第三光源２５３と、シャッタ２５４、２５５、２５６と、ダイクロイックミラー２５７、２５８および反射ミラー２５９とを有する。

[0026] 第一光源２５１、第二光源２５２から射出された光は、試料３０１を蛍光観察するための励起光として用いられる。また、第三光源２５３から射出された光は、試料３０１を刺激するための刺激光として用いられる。励起光の波長は、例えば、５６１ｎｍである。刺激光の波長は、例えば、３４０ｎｍである。

[0027] シャッタ２５４とダイクロイックミラー２５７は、第一光源２５１の射出

側に配される。シャッタ２５４は、制御部１４０の制御の下に開閉して、第一光源２５１から射出された励起光を選択的に通過させる。同様に、シャッタ２５５とダイクロイックミラー２５８は第二光源２５２の射出側に配され、シャッタ２５５は、制御部１４０の制御の下に開閉して、第二光源２５２から射出された励起光を選択的に通過させる。シャッタ２５６と反射ミラー２５９は第三光源２５３の射出側に配され、シャッタ２５６は、制御部１４０の制御の下に開閉して、第三光源２５３から射出された刺激光を選択的に通過させる。

[0028] 反射ミラー２５９は、第三光源２５３から射出された刺激光を反射する特性を有する。ダイクロイックミラー２５８は、反射ミラー２５９により反射された刺激光を透過し、第二光源２５２から射出された励起光を反射する特性を有する。ダイクロイックミラー２５７は、第一光源２５１から射出された励起光を透過し、第二光源２５２から射出された励起光および第三光源２５３から射出された刺激光を反射する特性を有する。

[0029] つまり、第一光源２５１から射出された励起光、第二光源２５２から射出された励起光および第三光源２５３から射出された刺激光の光路は、ダイクロイックミラー２５７、２５８および反射ミラー２５９により合成される。

[0030] ダイクロイックミラー２５７を透過した励起光およびダイクロイックミラー２５７において反射された励起光および刺激光は、集光レンズを含むフォトカプラ２６１により光ファイバ２６２の入射端に集光される。また、励起光および刺激光は、光ファイバ２６２により、照明光学系２６０に導かれる。

[0031] なお、上記では、第一光源２５１、第二光源２５２から射出された光が励起光として用いられ、第三光源２５３から射出された光が刺激光として用いられる場合を例示したがこれに限られず、例えば、第一光源２５１、第二光源２５２から射出された光が刺激光として用いられてもよいし、第三光源２５３から射出された光が励起光として用いられてもよい。

[0032] 照明光学系２６０は、コレクタレンズ２８１、反射ミラー２８３、ＤＭＤ

（Dgital Micromirror Device）２９０、リレー光学系２９９、開口絞り２９４、レンズ２９５、視野絞り２９６、フィールドレンズ２９７、フィルタ２９８、ダイクロイックミラー２２２および対物レンズ２２１を有する。

光ファイバ２６２の射出端から射出された光は、コレクタレンズ２８１により平行光となる。平行光となった光は、反射ミラー２８３で反射され、ＤＭＤ２９０に導かれる。

[0033] ＤＭＤ２９０は、試料３０１の観察面（対物レンズ２２１の前側焦点位置）の共役位置に設けられている。ＤＭＤ２９０は、ＭＥＭＳデバイスであり、制御部１４０から受けた信号により個別に向きを変える複数の反射鏡を有する。反射鏡の背面には電極が設けられ、制御部１４０からの制御信号に応じて電圧が印加され、反射鏡の向きが変化する。電圧が印加されていない状態（ＯＦＦ状態）では、反射鏡で反射した光は、試料３０１に照射されず、電圧が印加された状態（ＯＮ状態）では、反射鏡で反射した光は、試料３０１に照射される。

[0034] リレー光学系２９９は、レンズ２９１、２９２、２９３を含む。開口絞り２９４は、リレー光学系２９９の後側焦点位置およびレンズ２９５の前側焦点位置に設けられている。また、視野絞り２９６は、レンズ２９５の後側焦点位置およびフィールドレンズ２９７の前側焦点位置に設けられる。ＤＭＤ２９０において反射された光は、リレー光学系２９９により、開口絞り２９４の位置において集光され、レンズ２９５により平行光となる。平行光となった光は、視野絞り２９６を通りフィールドレンズ２９７により、対物レンズ２２１の瞳位置（後側焦点位置）に集光される。なお、フィルタ２９８は、刺激光および励起光の波長の光を通過させ、その他の波長の光を遮断する特性を有する。また、ダイクロイックミラー２２２は、刺激光および励起光の波長の光を反射させ、試料３０１からの光を透過する特性を有する。対物レンズ２２１の瞳位置（後側焦点位置）に集光された光は、平行光となり試料３０１に照射される。

[0035] 第二照明部１３０は、照明光源２３１と、照明光学系２３０とを含む。照

明光源２３１から射出された照明光は、照明光学系２３０を通じて、試料ホルダ３００に保持された試料３０１に照射される。照明光学系２３０は、コレクタレンズ２３９、反射ミラー２３４、視野絞り２３５、フィールドレンズ２３６、開口絞り２３７、およびコンデンサレンズ２３８を有する。

[0036] なお、照明光源２３１は、コレクタレンズ２３９の前側焦点位置に配置されるので、照明光源２３１から射出された光は、コレクタレンズ２３９により平行光となる。平行光となった光は、反射ミラー２３４で反射され、視野絞り２３５を通り、フィールドレンズ２３６によりコンデンサレンズ２３８の前側焦点位置に配置された開口絞り２３７おいて集光される。コンデンサレンズ２３８の前側焦点位置で集光された光は、コンデンサレンズ２３８により平行光となり、試料３０１に照射される。なお、視野絞り２３５は、コレクタレンズ２３９の後側焦点位置およびフィールドレンズ２３６の前側焦点位置に配置される。また、開口絞り２３７は、フィールドレンズ２３６の後側焦点位置およびコンデンサレンズ２３８の前側焦点位置に配置される。また、開口絞り２３７は、照明光源２３１と共役な位置に配置される。

[0037] 観察光学系２１０は、ステージ１１２上の試料３０１の像を形成する。観察光学系２１０は、試料３０１の像を撮像部１２０に形成する第１観察光学系２２０と、試料３０１の像を接眼レンズ２１７で観察するための第２観察光学系２１８とを有する。

[0038] 第１観察光学系２２０は、対物レンズ２２１と、ダイクロイックミラー２２２と、フィルタ２２３と、結像レンズ２２４と、光路切替部材２２５とを有する。試料３０１からの蛍光は、対物レンズ２２１およびダイクロイックミラー２２２を通って、フィルタ２２３に入射する。フィルタ２２３は、試料３０１からの光のうち所定の波長帯の光が選択的に通る特性を有する。フィルタ２２３は、例えば、試料３０１で反射した照明光、外光、迷光などを遮断する。これにより、ダイクロイックミラー２２２で除去し切れなかった照明光を除去する。フィルタ２２３を通った光は、結像レンズ２２４により、光路切替部材２２５を介して、撮像部１２０において結像される。光路切

替部材２２５は、例えばプリズムであり、観察光学系２１０光路に挿脱可能に設けられる。光路切替部材２２５は、例えば、制御部１４０により制御される駆動部（図示せず）によって、観察光学系２１０の光路に挿脱される。光路切替部材２２５は、観察光学系２１０光路に挿入された状態において、試料３０１からの蛍光を内面反射によって撮像部１２０へ向かう光路へ導く。

[0039] 第２観察光学系２１８は、対物レンズ２２１と、ダイクロイックミラー２２２と、フィルタ２２３と、結像レンズ２２４と、反射ミラー２１１、２１３、２１６と、リレーレンズ２１２、２１４、２１５、および接眼レンズ２１７を有する。試料３０１からの光は、結像レンズ２２４を通った後に、光路切替部材２２５が観察光学系２１０の光路から退避された状態において、リレーレンズ２１２の手前で中間像を形成する。この中間像は、リレーレンズ２１２、２１４、２１５により、接眼レンズ２１７の手前で二次像を形成する。観察者は、接眼レンズ２１７により、試料の像を観察することができる。なお、反射ミラー２１１は、結像レンズ２２４と、リレーレンズ２１２と間に配置され、反射ミラー２１３は、リレーレンズ２１２と、リレーレンズ２１４との間に配置され、反射ミラー２１６は、リレーレンズ２１５と、接眼レンズ２１７との間に配置される。接眼レンズ２１７が図１の接眼部１１４の光学系を形成する。

なお、上記では、試料からの蛍光を観察する場合について説明したが、第二照明部１３０から試料３０１に照射され、試料３０１を透過した光（透過光）を観察してもよい。

[0040] 図３は、試料３０１から、試料作製システム１００を用いて、電子顕微鏡で撮像するための試料を作製する手順を示す流れ図である。

図３に示される手順は、試料の準備(ステップＳ１０１～ステップＳ１０６)、試料への刺激及び固定（ステップＳ１０７～ステップＳ１１１）、電子顕微鏡での撮像（ステップＳ１１２）、画像解析（ステップＳ１１３）を含む。

以下、試料の準備(ステップＳ１０１～ステップＳ１０６)を説明する。

[0041] まず、観察対象として、図４に示す光応答性物質を含む試料３０１が準備される（ステップＳ１０１）。

図４は、試料作製システム１００において、電子顕微鏡で撮像する試料を作製する素材となる試料３０１の模式的平面図である。試料３０１は、複数の細胞３５０が支持体３４０上に配置されたものであり、支持体３４０には位置指標３５９が配されている。支持体３４０上に複数の細胞３５０を覆うカバーガラスを置いてもよい。

試料３０１は、試料ホルダ３００（図１参照）に収容される（ステップＳ１０２）試料３０１を収容した試料ホルダ３００は、試料作製システム１００のステージ１１２に置かれ、固定部１６０に結合される。

[0042] 次に、制御部１４０は、試料３０１に、複数の領域を設定する（ステップＳ１０３）。この場合に制御部１４０は、入力部１４２を介して入力された情報に基づいて、複数の領域を設定してもよい。

[0043] 図５は、図１に示した表示部１４４に表示される設定画面１４５の一例を示す図である。 設定画面１４５には、領域数のフィールド１４６にユーザが当該領域数を入力するための入力窓１４７が設けられている。図５の例においては領域数として「４」が入力された状態が表されている。設定画面１４５は、試料の領域＃１に光を照射する時刻と、領域＃１とは異なる領域＃２に、光を照射する時刻と、試料に対して固定処理を行う時刻とが設定可能な例が示されている。

[0044] 図６は、図５の設定画面１４５への入力に基づいて制御部１４０が試料３０１に領域を設定した状態を示す模式図である。制御部１４０は、予め決められた試料全体の領域において、ユーザから入力された領域数に基づいて、領域数を設定する。例えば、図６に示す例では、左から右へ同じ大きさの４つの縦長の矩形領域３４１、３４２、３４３、３４４が設定されている。

[0045] 制御部１４０が設定する領域は、互いに重複しないことが好ましいが、一部が重複していてもよい。複数の領域の各々には、ケージド化合物や、チャ

ネルロドプシンなどの光応答性物質が含まれており、領域毎に刺激光が照射される。したがって、所定の領域に刺激光が照射され光刺激が行われたときに、隣接する領域にその光刺激の影響が及ばないように、隣接する領域に間隔が設けられていてもよい。なお、ステップＳ１０３において設定される領域の境界には、機械的な仕切等が設けられるわけではない。

[0046] 次に、制御部１４０は、ユーザにより入力部１４２を介して入力された情報（図５参照）に基づいて、試料３０１に対する光刺激条件を、領域毎に設定する（ステップＳ１０４）。ここで、複数の領域３４１から３４４に対して設定される光刺激条件は、少なくとも、互いに異なる２つの光刺激条件を含む。

[0047] 上記のように設定される光刺激条件の例は、図５に示されるように、試料３０１の各領域に対して刺激光を照射する時刻、刺激後に試料３０１を固定する時刻等である。また、照射する刺激光の光強度、試料３０１の温度、雰囲気等も光刺激条件として設定してもよい。

以下、図５を参照して、上記の光刺激条件についてさらに説明する。

[0048] 図５に示される設定画面１４５には上記光刺激条件を設定するためのフィールド１４６が設けられる。フィールド１４６には、各領域に刺激を開始する時間的間隔としての刺激間隔を入力する入力窓１５４、および、各領域を刺激する刺激時間を入力する入力窓１８０が設けられている。さらに、各領域の番号に対応付けて、各領域を刺激する時刻を入力する入力窓１５５、１５６、１５７、１５８も設けられている。

[0049] 設定画面１４５入力窓１５４に、ユーザにより刺激間隔が入力されると、制御部１４０は刺激間隔に基づいて各領域の刺激時刻を算出して表示する。図示の状態では、２００ミリ秒の刺激間隔に対応して、０、２００、４００、６００の値が、各領域の入力窓１５５から１５８に示されている。

[0050] さらに、ユーザは各領域の刺激時刻を上記計算値から変更できてよい。例えば、ユーザは、フィールド１４６において、各領域を刺激する時刻を直接入力することにより、適宜、刺激時刻を変更することができる。なお、ユー

ザは、刺激間隔を入力することなく、刺激時刻を指定してもよい。また、ユーザは、領域３４１、３４２、３４３、３４４のうちの複数の領域に対して、同時に光刺激を与えるように設定することもできる。この場合、例えば、領域１（＃１）、領域２（＃２）について、同じ刺激時刻を指定すればよい。

[0051] 設定画面１４５の最下段のフィールド１４６には、試料３０１を固定する時刻を入力する入力窓１５９が設けられている。

[0052] 上記のような設定画面により設定した刺激および固定の条件は、設定画面１４５上の保存ボタン１４８を押すことにより確定される。

[0053] 図７は、表示部１４４に表示される他の設定画面１４５を示す図である。図７において以下のようにユーザが領域を自由に指定できる。

この場合に、第一光源２５１から試料３０１に励起光が照射され、当該試料３０１が撮像部１２０により撮像されることにより生成された光学顕微鏡の撮像画像ＯＭが設定画面１４５に表示される。ユーザは、入力部１４２の一例としてのマウスを用いて、撮像画像ＯＭ上の領域をドラッグ等に指定する。図７に示す例では、設定画面１４５において、ユーザにより、マウスを用いて４つの矩形の領域が指定された状態が示されている。さらに、光刺激条件としての刺激時間、固定時間、および、各領域に対応する刺激時刻の入力窓１４７が表されている。なお、設定画面１４５上の撮像画像内に「ＯＭ」を付すことにより、当該撮像画像が光学顕微鏡により取得されたものであることが表されている。

[0054] 図７の設定画面１４５には、撮像部１２０を通じて取得した試料３０１の撮像画像ＯＭと、試料３０１の画像上に、ユーザにより設定された領域３４１、３４２、３４３、３４４を示す点線および領域を特定するラベル１４９が表示されている。さらに、ユーザにより設定された刺激時間および固定時間、並びに、領域３４１、３４２、３４３、３４４の各々に対して設定された刺激時刻が表示されている。

[0055] 次に、制御部１４０は、ステップＳ１０３で試料３０１に設定された上記

のラベル１４９など個々の領域を特定する情報と、領域の位置に関する情報と、各領域に対して設定された光刺激条件、即ち、少なくとも刺激光の照射時刻に関する情報とを対応付けて格納する（ステップＳ１０５）。領域の位置に関する情報は、例えば支持体３４０の位置指標３５９を基準とした支持体３４０上の座標である。これにより、試料作製システム１００で作製された観察試料を電子顕微鏡で撮像した後に、電子顕微鏡により取得された撮像画像を、各領域に対する光刺激条件と対応付けて評価できる。

[0056] 次に、試料作製システム１００の倒立顕微鏡１１０を使用して、刺激前の試料３０１の状態を撮像してもよい（ステップＳ１０６）。この場合に、この場合に、第一光源２５１から試料３０１に励起光が照射され、当該試料３０１が撮像部１２０により撮像されることに光学顕微鏡の撮像画像ＯＭが生成される。なお、試料３０１の刺激後の撮像結果を得ることだけが目的である場合は、ステップＳ１０６は省いてもよい。また、ここまでのステップにおいては、第一照明部１５０および固定部１６０は、倒立顕微鏡１１０に結合されていなくてもよい。

[0057] 以下、試料への刺激及び固定（ステップＳ１０７～ステップＳ１１１）を説明する。

制御部１４０は、ステップＳ１０３で設定された領域の各々に対して、ステップＳ１０４で設定された光刺激条件で、試料３０１の刺激が実行されるよう第三光源２５３等を制御する（ステップＳ１０７）。

制御部１４０は、図５に示された領域毎に設定された光刺激条件に基づいて、領域３４１、３４２、３４３、３４４に対して刺激光が照射されるようＤＭＤ２９０等を制御する。具体的には、制御部１４０は、領域３４１に刺激光が照射された後、２００ミリ秒後に領域３４２に刺激光が照射され、その２００ミリ秒後に領域３４３に刺激光が照射され、さらにその２００ミリ秒後に領域３４４に刺激光が照射されるよう、第三光源２５３、ＤＭＤ２９０等を制御する。上記光刺激条件に基づき、刺激光の照射時間はそれぞれの領域に対して１０ミリ秒である。

[0058] 図８は、ステップＳ１０７において設定された光刺激条件で刺激された後、ステップＳ１０８において、最初の領域３４１への刺激光の照射から８１０ミリ秒後に固定された試料３０１の状態を示す図である。

[0059] 図示の例では、ケージド化合物に光を照射してアンケージさせることにより活性化させ、細胞に特定の反応を起こさせる光刺激の例を模式的に示しており、最も早い時刻に光刺激された領域３４１においては、アンケージされた物質に細胞３５０が反応した結果、細胞３５０から例えばタンパク質などの情報伝達物質が放出されている。また、光刺激を受けるタイミングが最も遅かった領域３４４においては、細胞３５０の情報伝達物質は、未だ細胞３５０内に留まっている。

[0060] 倒立顕微鏡１１０を用いて、刺激後の試料３０１を撮像してもよい（Ｓ１０８）。図１０はステップＳ１０８で撮像された試料３０１の状態を示す表示画面１７０である。

[0061] この場合に、ステップ１０６と同様に、第一光源２５１から試料３０１に励起光が照射され、当該試料３０１が撮像部１２０により撮像されることに光学顕微鏡の撮像画像ＯＭが生成される。表示画面１７０においては、領域３４１、３４２、３４３、３４４を含む撮像画像ＯＭを、当該撮像画像が光学顕微鏡により取得されたことを示す文字「ＯＭ」とともに表示している。また、領域３４１、３４２、３４３、３４４それぞれに、試料３０１の位置を示すラベル１４９を付加する。ユーザは、表示画面１７０において撮像画像を確認後に、保存ボタン１４８を押下することにより、光学顕微鏡による撮像画像ＯＭを保存することができる。また、ユーザは、取消ボタン１５３を押下することにより、撮像画像を破棄してもよい。

[0062] 次に、制御部１４０は、ステップＳ１０３で設定された条件に従って、試料３０１が固定されるよう固定部１６０を制御する（ステップＳ１０９）。この処理により、刺激光が照射された時刻の時間差に対応した状態の細胞が固定される。試料３０１を固定する方法の一例は、凍結固定である。凍結固定は、試料３０１を液体窒素等の冷却媒体に浸漬することにより、短時間の

うちに試料３０１を凍結させて、試料３０１における生体反応、化学反応等を停止させる。

[0063] 図９は、試料作製システム１００において互いに結合された試料ホルダ３００および固定部１６０の模式的な断面図である。試料ホルダ３００は、上記ステップＳ１０２において試料３０１を収容する。また、固定部１６０は、上記ステップＳ１０９において試料３０１を固定する。これら試料ホルダ３００および固定部１６０は、試料作製システム１００のステージ１１２において互いに結合される。

[0064] 試料ホルダ３００は、空洞３１０および一対の透明窓３２１、３２２を有する。これにより、第一照明部１５０から透明窓３２１を通じて試料３０１に励起光を照射し、試料３０１からの光を透明窓３２１を通じて撮像部１２０で光学的に撮像することができる。さらに、第一照明部１５０から透明窓３２１を通じて、試料ホルダ３００内に収容された試料３０１に刺激光を照射できる。

[0065] 空洞３１０は、試料ホルダ３００を図中の高さ方向に貫通して形成され、図中の高さ方向中程に試料３０１を収容する。また、空洞３１０において互いに対向する図中の上面および下面は、倒立顕微鏡１１０により試料３０１が観察できるように透明な透明窓３２１、３２２により気密に封止される。このように、ステップＳ１０２において、試料３０１は、試料ホルダ３００に保持される。

[0066] 更に、試料ホルダ３００は、側面に流入口３３１および流出口３３２を有する。流入口３３１は、重力方向について、試料３０１よりも低い位置で空洞３１０を外部に連通させる。流出口は、試料３０１よりも高い位置で空洞３１０を外部に連通させる。これら流入口３３１および流出口３３２を通じて冷却媒体を注入または排出することにより、試料ホルダ３００において、空洞３１０に保持した試料３０１を凍結固定できる。

[0067] 固定部１６０は、冷媒容器１６１および結合部１６２を有する。冷媒容器１６１は、液体窒素等の冷却媒体１６３を収容する。冷媒容器１６１の容量

は試料ホルダ３００における空洞３１０の容量よりも大きく、空洞３１０を充填できる量の冷却媒体１６３が冷媒容器１６１に収容される。

[0068] 結合部１６２は、一対の流路１６４、１６６と、バルブ１６８とを有する。流路１６４、１６６の一端は、試料ホルダ３００の流入口３３１および流出口３３２に連通する。流路１６４、１６６の他端は、冷媒容器１６１の内部に連通する。バルブ１６８は、少なくとも下側の流路１６４において、制御部１４０の指示の下に、流路１６４における冷却媒体１６３の流通を遮断または開放する。

[0069] 上記のように冷媒容器１６１および試料ホルダ３００が結合部１６２により結合された状態で、制御部１４０から受けた指示によりバルブ１６８が開放されると、下側の流路１６４を通じて、冷媒容器１６１から空洞３１０に冷却媒体１６３が流入する。また、当初は空洞３１０を満たしていた空気等は、上側の流路１６６を通じて冷媒容器１６１側に押し出される。

[0070] これにより、空洞３１０に冷却媒体１６３が充填され、短時間のうちに試料３０１全体が凍結固定される。このように、ステップＳ１０９においては、制御部１４０の指示の下に、複数の領域３４１、３４２、３４３、３４４を有する試料３０１全体が一括して固定される。

[0071] また、特定波長の光照射により架橋する組成物を用いて、光照射により試料３０１を固定してもよい。更に、試料３０１の光刺激に対する反応を化学的に停止させる処理を実行してもよい。その場合、反応を停止させる方法として、光刺激により光応答を抑制する光応答物質またはケージド化合物を使用してもよい。

[0072] 倒立顕微鏡１１０を用いて、固定後の試料３０１を撮像してもよい（Ｓ１１０）。この場合に、ステップＳ１０８で説明したように撮像部１２０により撮像され、図１０に示すような固定後の試料３０１の光学顕微鏡の撮像画ＯＭが得られる。

[0073] 次に、固定した試料３０１に対して、電子顕微鏡で撮像するための処理が実行される（ステップＳ１１１）。ここで、電子顕微鏡観察で撮像するため

の処理には、凍結後の細胞を樹脂に包理して、染色することを含む。染色にはＸ線の観察のために重金属が用いられてよい。また、透過型電子顕微鏡により撮像する場合は、試料の薄化も当該処理に含まれてよい。

[0074] 次に、作製された撮像用の試料３０１を、電子顕微鏡（不図示）により撮像する（ステップＳ１１２）。上記の通りひとつの試料３０１に、刺激されてから固定されるまでの時間の長さが異なる複数の領域３４１から３４４が含まれる。よって、ひとつの試料３０１から、刺激後の試料３０１の変化と、時間の経過とを関連付けて撮像できる。この場合に電子顕微鏡により撮像された位置の情報に基づいて、当該撮像位置が、試料３０１において光刺激条件が設定された複数の領域３４１から３４４のうち、いずれの領域に含まれているかが特定される。この場合に、支持体３４０の位置指標３５９を基準として電子顕微鏡の撮像位置が特定される。特定された電子顕微鏡の撮像位置と、制御部１４０に格納されている、位置指標３５９を基準とした各領域３４１から３４４の範囲を特定する座標とを比較することにより、当該撮像位置がいずれの領域に含まれているかが特定される。電子顕微鏡は試料３０１のいずれの領域においても少なくとも一か所以上を撮像することが好ましい。電子顕微鏡により取得された撮像画像が領域３４１等のそれぞれに対応付けて記憶される。

[0075] 更に、電子顕微鏡観察により取得した撮像画像を解析する（ステップＳ１１３）。

[0076] 図１１は、電子顕微鏡の撮像後に表示される表示画面１７１を示す図である。表示画面１７１は、ステップＳ１０５において格納された領域３４１、３４２、３４３、３４４毎の位置情報および光刺激条件情報、並びに、ステップＳ１１０等での撮像部１２０による試料３０１の光学顕微鏡の撮像画像ＯＭから生成される。表示画面１７１においては、撮像部１２０で撮像した領域３４１、３４２、３４３、３４４の光学顕微鏡の撮像画像ＯＭ上に、電子顕微鏡で撮像した領域３６１、３６２、３６３、３６４の位置が矩形で示されている。さらに、電子顕微鏡で撮像した撮像画像を表示するための「次

へ」ボタン１５１が表示されている。ユーザは、表示画面１７１において、保存ボタン１４８を押下することにより、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡で撮像した撮像位置とを関連付けた画像を保存する保存することができる。また、ユーザは、取消ボタン１５３を押下することにより、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡で撮像した撮像位置とを関連付けた画像を破棄してもよい。

[0077] 図１２は、図１１の「次へ」ボタン１５１が押されたときに表示される表示画面１７２を示す図である。表示画面１７２においては、電子顕微鏡で撮像された領域３６１、３６２、３６３、３６４の撮像画像ＥＭの各々に、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭの領域３４１、３４２、３４３、３４４に対応したラベル１４９を付加すると共に、試料作製システム１００において光刺激されてから固定されるまでの時間が短い順に並べ直して表示している。これにより、時間の経過による細胞３５０の変化を容易に把握できる。また、ラベル１４９によって、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡の撮像画像ＥＭとが関連付けられている。なお、撮像画像ＥＭ内に文字「ＥＭ」を付すことにより、電子顕微鏡の撮像画像であることが示されている。ユーザは、表示画面１７２において、保存ボタン１４８を押下することにより、電子顕微鏡の撮像画像ＥＭを保存することができる。また、ユーザは、取消ボタン１５３を押下することにより、電子顕微鏡の撮像画像ＥＭを破棄してもよいまた、ユーザは、「もどる」ボタン１５２が押されることにより図１１の表示画面１７１に戻る。

[0078] 図１２に示す例においては、光刺激によりインスリンが細胞外へ放出される開口分泌の様子が電子顕微鏡により撮像されている。光刺激は、細胞（図中の斜線）内へ導入したケージドカルシウム（例えばＮＰ－ＥＧＴ）に対して行われている。ケージドカルシウムに対して第三光源２５２から射出された光（例えば３４０ｎｍの光）が照射されることにより、光刺激が行われると、同化合物からのカルシウムの放出という現象が起きて、細胞内のカルシウム濃度が上昇する。細胞内のカルシウム濃度が上昇すると、領域３６４お

よび３６３の撮像画像ＥＭに示されるように、細胞内のインスリン分泌顆粒（図中の小さな複数の黒丸を囲む白丸）が細胞膜表面へ移行し、細胞膜と融合する。顆粒の細胞膜への融合により、領域３６２の撮像画像ＥＭに示されるように、顆粒内部に含まれていたインスリン（図中の小さな複数の黒丸）が細胞外へ放出される。さらに、領域３６４に示されるように細胞の膜が復元していく。

[0079] 図１３は、図１２の「次へ」ボタン１５１が押されたときに表示される表示画面１７３を示す図である。表示画面１７３では、領域３４１から３４４の図１１の撮像画像ＯＭと、領域３６１から３６４の図１２の撮像画像ＥＭとが上下に視覚的に関連付けられて表示されている。すなわち、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡の撮像画像ＥＭとが上下に表示されている。これにより、電子顕微鏡の撮像画像ＥＭに基づく細胞３５０の時間変化を容易に解析することができる。なお、表示画面１７１から１７３は、表示部１４４に表示されてもよいし、電子顕微鏡の、または、電子顕微鏡とは別個の表示装置に表示されてもよい。

[0080] 以上、図１から図１３の実施形態によれば、試料３０１の複数の領域に対して異なる時刻に光刺激をした後に固定をしたので、光刺激の時間差以外は同一の条件で作成された試料３０１を電子顕微鏡で撮像することができる。

[0081] 図１４は、他の設定画面１４５を示す図である。図示の設定画面においては、２回の刺激を試料３０１に対して設定する。１回目の刺激の例は、チャンネルロドプシンに特定の波長、例えば青色の光刺激を与えてイオンチャンネルを活性化させることである。２回目の刺激の例はハロロドプシンに他の特定の波長、例えば黄色の光刺激を与えて細胞内にイオンを流入させることである。

[0082] 図１４の設定画面１４５は領域３４１から３４４に対応して、１回目の光刺激を与える第１刺激時刻および２回目の光刺激を与える第２刺激時刻の入力窓１４７がある。それぞれの入力窓１４７に刺激時刻を指定することにより、領域毎に第１刺激時刻および第２刺激時刻が設定される。また、光刺激

を与える刺激時間の入力窓も設けられている。１回目の刺激時間と２回目の刺激時間とで異なる値が入力できるようにしてもよい。また、１回目と２回目の一方または両方で、複数の領域に対して刺激時刻が同一になるように設定できてもよいし、それぞれ異なる刺激時刻が設定できてもよい。さらに、試料３０１を固定する固定時刻の入力窓も設けられている。

[0083] 図１４に示した例では、領域３４１から３４４に、同じ時刻で１回目の光刺激が与えられ、その後、互いに異なる時刻で２回目の光刺激が与えられる。

[0084] 図１４の光刺激条件で刺激された試料３０１の撮像結果も、図１１から図１３と同様に、光刺激されてから固定されるまでの時間が短い順に撮像結果が並べ直されて、その条件とともに表示されることが好ましい。

[0085] 図１５は、他の設定画面１４５を示す図である。図１５の例では、ステップＳ１０６と同様に取得された光学顕微鏡の撮像画像ＯＭ上で、細胞３５０の位置を特定して当該細胞３５０の各々を囲うように領域３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８を設定する。領域が８つ設定されたことに対応して、入力窓１４７に「８」が表示されている。さらに、刺激時間および固定時刻、並びに、当該領域毎に刺激時刻が設定される。

[0086] 細胞３５０の位置の特定すなわち領域３４１等の設定は、ユーザが、設定画面１４５に表示された光学顕微鏡の撮像画像ＯＭ上のドラック等で手動で設定してもよいし、撮像部１２０により撮影された光学顕微鏡の撮像画像ＯＭから画像処理によって制御部１４０が自動で候補を抽出してもよい。

[0087] 図１５の設定画面１４５によれば、細胞３５０の形状に即した光刺激を行うことができるので、他の領域への刺激光の照射を防ぐことができる。ここで、同一の光刺激条件を複数領域に設定することにより、細胞３５０の個体差による撮像結果のばらつきを抑制できる。

[0088] 図１６は、試料３０２の表示画面１７４の一例を示す図である。表示画面１７４は、試料３０１を撮像部１２０で撮像して得られた画像と、試料作製

システム１００の制御部１４０から取得された、領域３４１、３４２、３４３、３４４毎の位置情報および光刺激条件情報に基づいて生成される。

[0089] 表示画面１７４においては、図１１と同様に、撮像部１２０で撮像された領域３４１～３４８の各々に、試料３０１上における配置に対応したラベル１４９が付加されると共に、試料作製システム１００において光刺激されてから固定されるまでの時間が短い順に並べ直している。表示画面１７４には、撮像部１２０で撮像した領域３４１、３４２、３４３、３４４の光学顕微鏡の撮像画像ＯＭ上に、電子顕微鏡で撮像した領域３６１、３６２、３６３、３６４の位置が矩形で示されている。

[0090] 図１７は、図１６の「次へ」ボタン１５１が押されたときに表示される表示画面１７５を示す図である。表示画面１７５においては、電子顕微鏡で撮像された領域３６１、３６２、３６３、３６４の撮像画像ＥＭの各々に、試料３０１上における位置（配置）に対応したラベル１４９を付加すると共に、試料作製システム１００において光刺激されてから固定されるまでの時間が短い順に並べ直して表示している。これにより、時間の経過による細胞３５０の変化を容易に把握できる。また、ラベル１４９によって、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡の撮像画像ＥＭとが関連付けられている。

[0091] 図１８は、図１７の「次へ」ボタン１５１が押されたときに表示される表示画面１７６を示す図である。表示画面１７６では、領域３４１から３４４の図１６の撮像画像ＯＭと、領域３６１から３６４の図１７の撮像画像ＥＭとが上下に関連付けられて表示されている。すなわち、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡の撮像画像ＥＭとが上下に表示されている。これにより、電子顕微鏡による撮像画像ＥＭに基づく細胞３５０の時間変化を容易に解析することができる。

[0092] 図１９は、試料３０３に光刺激条件を設定する設定画面１４５を示す図である。試料３０３には、それぞれが軸索３５２を有する複数の神経細胞である細胞３５０が支持体３４０に配される。細胞３５０の各々において、軸索３５２は、遺伝子導入によって発現されたチャンネルロドプシンおよびハロ

ロドプシンを含む。

[0093] 上記のような試料３０３に対して、設定画面１４５に表示された光学顕微鏡の撮像画ＯＭ上に複数の領域３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８、３４９が指定される。それらのうち、＃１として指定される領域３４１は、１回目の刺激としてチャンネルロドプシンに光刺激を与える領域である。図１９の例において領域３４１は細胞３５０の各々における軸索３５２の付け根部分を含む。＃２～＃５が割り当てられた領域３４２、３４３、３４４、３４５は、２回目の刺激としてハロロドプシンに光刺激を与える領域である。図１９の例において、領域３４２から３４５は領域３４１よりも軸索３５２の先端側に位置する。これら領域３４１から３４５に刺激を与える刺激時刻が設定画面１４５で指定される。これにより、同一の細胞３５０における異なる領域に異なる刺激条件で光刺激を与えることができる。また、光刺激を与える刺激時間の入力窓も設けられている。１回目の刺激時間と２回目の刺激時間とで異なる値が入力できるようにしてもよい。さらに、試料３０１を固定する固定時刻の入力窓も設けられている。

[0094] 指定された時刻に、１回目の刺激として領域３４１に特定の波長の刺激光が照射されることにより、照射された位置のイオンチャンネルが活性化して活動電位が発生し、軸索３５２を伝導する。その後、２回目の刺激として領域３４２から３４５にそれぞれ設定された時刻で他の特定の波長の刺激光が照射されることにより、照射された位置で細胞内にイオンを流入させることで活動電位の伝導を抑制する。

[0095] 更に、設定画面１４５においては、軸索３５２の更に先端側に、電子顕微鏡の撮像のための領域３４６、３４７、３４８、３４９が設定される。これらの領域３４６、３４７、３４８、３４９には、＃６～＃９のラベル１４９が付与される。

[0096] 図２０は、試料３０３の表示画面１７７の一例を示す図である。表示画面１７７は、試料３０３を撮像部１２０で撮像した光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと、試料作製システム１００の制御部１４０から取得された、領域３４１か

ら３４９の位置情報および光刺激条件情報に基づいて生成される。

[0097] 表示画面１７７においては、図１１と同様に、撮像部１２０で撮像された領域３４１～３４９の各々に、試料３０３上における配置に対応したラベル１４９が付加される。さらに、試料作製システム１００において光刺激されてから固定されるまでの時間が短い順に並べ直している。さらに、電子顕微鏡の撮像のための領域３４６、３４７、３４８、３４９と、試料作製システム１００において光刺激されてから固定されるまでの経過時間とが点線で対応付けて示されている。さらに、撮像部１２０の領域３４６、３４７、３４８、３４９の撮像画像上に、電子顕微鏡で撮像した領域３６１、３６２、３６３、３６４の位置が矩形で示されている。

[0098] 図２１は、図２０の「次へ」ボタン１５１が押されたときに表示される表示画面１７８を示す図である。表示画面１７５においては、電子顕微鏡で撮像された領域３６１、３６２、３６３、３６４の撮像画像ＥＭの各々に、試料３０３上における位置（配置）に対応したラベル１４９を付加すると共に、試料作製システム１００において光刺激されてから固定されるまでの時間が短い順に並べ直して表示している。これにより、時間の経過による細胞３５０の変化を容易に把握できる。また、ラベル１４９によって、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡の撮像画像ＥＭとが関連付けられている。

[0099] 図２１は、細胞内に導入したチャネルロドプシンに光刺激を与えることで、アセチルコリンなどの神経伝達物質がスパインの外へ放出される様子が示されている。この場合に、細胞内に導入したチャネルロドプシンに対して、例えば４７０ｎｍの光を照射することにより光刺激が与えられると、光刺激が与えられたチャネルから細胞内へナトリウムイオンが流れ込む。細胞内のナトリウム濃度が上昇すると、その信号がトリガーとなり、スパイン内の情報伝達物質を含んだ小胞（図中の小さな白丸で示されている）が、領域３６１および３６２に示すようにスパインの表面側に移動する。さらに、領域３６３に示すようにスパインの表面の膜と融合する。小胞が膜に融合することにより、領域３６４に示すように小胞に含まれていた神経伝達物質がスパイ

ンの外へ放出される。

[0100] 図２２は、図２１の「次へ」ボタン１５１が押されたときに表示される表示画面１７９を示す図である。表示画面１７９では、領域３４６から３４９の図２０の撮像画像と、領域３６１から３６４の図２１の撮像画像とが上下に関連付けられて表示されている。すなわち、光学顕微鏡の撮像画像ＯＭと電子顕微鏡の撮像画像ＥＭとが上下に表示されている。これにより、電子顕微鏡による撮像画像に基づく細胞３５０の時間変化を容易に解析することができる。

[0101] 図２３は、他の設定画面１８１を示す図である。設定画面１８１では、試料３０１の複数の領域に対して光の照射を同時開始し、互いに異なる時間の長さで光を照射して、試料３０１を固定するように設定ができる。設定画面１８１には、領域の数を設定する入力窓１４７が設けられる。さらに、当該領域の数に対応したそれぞれの領域での刺激時間を設定する入力窓１８３が設けられる。さらに、試料３０１を固定する時刻を入力する入力窓１５９が設けられている。

[0102] 観察の対象のさらに他の例として、ＦＲＡＰ法（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｒｅｃｏｖｅｒｙ ａｆｔｅｒ Ｐｈｏｔｏｂｌｅａｃｈｉｎｇ）、ＦＬＩＰ法（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｌｏｓｓ ｉｎ Ｐｈｏｔｏｂｌｅａｃｈｉｎｇ）、ＦＬＡＰ法（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ａｆｔｅｒ ｐｈｏｔｏｂｌｅａｃｈｉｎｇ）、ＣＡＬＩ法（Ｃｈｒｏｍｏｐｈｏｒｅ－ａｓｓｉｓｔｅｄ ｌａｓｅｒ ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）等による細胞の蛍光観察の観察試料が挙げられる。

[0103] また、試料３０１の固定の方法は図９の固定部１６０に限られない。これに代えて、液体冷媒が満たされた浴槽を設けておき、試料３０１をアーム等で試料ホルダ３００から浴槽へ移動して、当該浴槽に浸けることにより、試料３０１を固定してもよい。

[0104] 図５、図７、図１４等の設定画面１４５に代えてまたはこれに加えて、試料の各領域に光を照射する工程および固定処理工程の順序の設定を受け付け

る設定画面が表示されてもよい。

[0105] 以上、本発明を実施の形態を用いて説明したが、本発明の技術的範囲は上記実施の形態に記載の範囲には限定されない。上記実施の形態に、多様な変更または改良を加えることが可能であることが当業者に明らかである。その様な変更または改良を加えた形態も本発明の技術的範囲に含まれ得ることが、請求の範囲の記載から明らかである。

[0106] 請求の範囲、明細書、および図面中において示した装置、システム、プログラム、および方法における動作、手順、ステップ、および段階等の各処理の実行順序は、特段「より前に」、「先立って」等と明示しておらず、また、前の処理の出力を後の処理で用いるのでない限り、任意の順序で実現しうることに留意すべきである。請求の範囲、明細書、および図面中の動作フローに関して、便宜上「まず、」、「次に、」等を用いて説明したとしても、この順で実施することが必須であることを意味するものではない。

符号の説明

[0107] １００ 試料作製システム、１１０ 倒立顕微鏡、１１２ ステージ、１１４ 接眼部、１２０ 撮像部、１３０ 第二照明部、１４０ 制御部、１４２ 入力部、１４４ 表示部、１４５ 設定画面、１４６ フィールド、１４７ 入力窓、１４８ 保存ボタン、１４９ ラベル、１５０ 第一照明部、１５１ ボタン、１５２ ボタン、１５３ 取消ボタン、１５４ 入力窓、１６０ 固定部、１６１ 冷媒容器、１６２ 結合部、１６３ 冷却媒体、１６４、１６６ 流路、１６８ バルブ、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９ 表示画面、１８０ 入力窓、１８１ 設定画面、１８３ 入力窓、２１０ 観察光学系、２１１、２１３、２１６、２３４、２５９、２８３ 反射ミラー、２１２、２１４、２１５ リレーレンズ、２１７ 接眼レンズ、２１８ 第２観察光学系、２２０ 第１観察光学系、２２１ 対物レンズ、２２２、２５７、２５８ ダイクロイックミラー、２２３、２９８ フィルタ、２２４ 結像レンズ、２２５ 光路切替部材、２３０ 照明光学系、２３１ 照明光源、２９

１、２９２、２９３、２９５　レンズ、２３５、２９６　視野絞り、２３６、２９７　フィールドレンズ、２３７、２９４　開口絞り、２３８　コンデンサレンズ、２３９、２８１　コレクタレンズ、２５０　光源部、２５１　第一光源、２５２　第二光源、２５３　第三光源、２５４、２５５、２５６　シャッタ、２６０　照明光学系、２６１　フォトカプラ、２６２　光ファイバ、２９０　ＤＭＤ、２９９　リレー光学系、３００　試料ホルダ、３０１、３０２、３０３　試料、３１０　空洞、３２１、３２２　透明窓、３３１　流入口、３３２　流出口、３４０　支持体、３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８、３４９　領域、３５０　細胞、３５２　軸索、３５９　位置指標

請求の範囲

[請求項1] 時刻t1に、試料の第１領域に光を照射する第１光照射工程と、

時刻t1の後、時刻t2に、前記第１領域とは異なる第２領域に、前記光を照射する第２光照射工程と、

時刻t2の後、時刻t3に、前記試料に対して固定処理を行う固定処理工程と

を備える

試料作製方法。

[請求項2] 前記第１領域および第２領域に照射される光は、前記試料に対して光刺激を行うための刺激光であることを特徴とする

請求項１に記載の試料作製方法。

[請求項3] 前記第１領域および前記第２領域は、前記刺激光が照射された後の経過時間が互いに異なる状態で固定されることを特徴とする

請求項２に記載の試料作製方法。

[請求項4] 前記第１領域および第２領域を設定する領域設定工程をさらに備えることを特徴とする

請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 前記第２光照射工程後に、前記試料の像を光学顕微鏡により撮像する第１撮像工程をさらに備えること特徴とする、

請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 前記固定処理は、凍結による固定処理であることを特徴とする

請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記固定処理は、光照射による固定処理であることを特徴とする

請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 前記固定された試料は、前記光刺激による時間に対する変化を電子顕微鏡で観察するための試料であることを特徴とする、

請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 前記固定処理工程の後、前記試料の像を電子顕微鏡により撮像する

第２撮像工程を備えること特徴とする、

請求項８に記載の方法。

[請求項10] 前記第１撮像工程により撮像された前記試料の画像と、前記第２撮像工程により撮像された前記試料の画像とを関連付けて表示する表示工程をさらに備える、

請求項９に記載の方法。

[請求項11] 前記第１領域および第２領域は、互いに異なる光強度で前記光が照射されることを特徴とする

請求項１～１０に記載のいずれか１項に記載の方法。

[請求項12] 時刻t2の後、時刻t3より前に、前記第１領域および第２領域とは異なる第三の領域に、前記光を照射する第３照射工程を更に備え、

時刻t1と時刻t2との差は、時刻t2とt3との差と同じであることを特徴とする

請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項13] 試料を作製する方法であって、

時刻t1に、試料の第一の領域および前記第一の領域とは異なる第二の領域に、光を照射する第１照射工程と、

時刻t1の後、時刻t2に、前記第一の領域に光を照射する第２照射工程と、

時刻t2の後、時刻t3に、前記第二の領域に、前記光を照射する第３照射工程と、

時刻t3の後、時刻t4に、前記試料に対して固定処理を行う固定処理工程と

を備える

方法。

[請求項14] 試料の第１領域および前記第１領域とは異なる第２領域に対して光の照射を同時開始し、互いに異なる時間の間前記光を照射する光照射工程と、

前記光照射工程後、前記試料に対して固定処理を行う固定処理工程と

を備える

試料作製方法。

[請求項15] 時刻t1に、試料の第１領域に光を照射し、時刻t1の後、時刻t2に、前記第１領域とは異なる第２領域に、前記光を照射する光照射部と、

時刻t2の後、時刻t3に、前記試料に対して固定処理を行う固定部と

を備える

試料作製装置。

[請求項16] 試料を作製する装置であって、

時刻t1に、試料の第一の領域および前記第一の領域とは異なる第二の領域に、光を照射する第１照射工程と、時刻t1の後、時刻t2に、前記第一の領域に光を照射する第２照射工程と、時刻t2の後、時刻t3に、前記第二の領域に、前記光を照射する第３照射工程とを実行する光照射部と、

時刻t3の後、時刻t4に、前記試料に対して固定処理を行う固定部と

を備える

装置。

[請求項17] 試料の第１領域および前記第１領域とは異なる第２領域に対して光の照射を同時開始し、互いに異なる時間の間前記光を照射する光照射部と、

前記光照射工程後、前記試料に対して固定処理を行う固定部と

を備える

試料作製装置。

[請求項18] 試料の第１領域に光を照射する第１光照射工程と、前記第１領域とは異なる第２領域に、前記光を照射する第２光照射工程と、前記試料に対して固定処理を行う固定処理工程と

を行う順序を設定可能な設定画面を表示する表示部

を有する試料作製装置。

[請求項19] 試料の第１領域に光を照射する時刻と、前記第１領域とは異なる第２領域に、前記光を照射する時刻と、前記試料に対して固定処理を行う時刻とを設定可能な設定画面を表示する表示部

を有する試料作製装置。

[請求項20] 時刻t1に、試料の第１領域に光を照射し、時刻t1の後、時刻t2に、前記第１領域とは異なる第２領域に、前記光を照射し、時刻t2の後、時刻t3に、前記試料に対して固定処理を行う場合において、前記時刻t1、前記時刻t2および前記時刻t3を設定可能な設定画面を表示する表示部

を有する試料作製装置。

[請求項21] 前記設定画面において、

前記試料の第１領域に光を照射する時間と、前記試料の第２領域に光を照射する時間とをさらに設定可能であることを特徴とする

請求項１８～２０のいずれか１項に記載の試料作製装置。

[請求項22] 前記設定画面において、

前記第１領域と、前記第２領域とをさらに設定可能であることを特徴とする

請求項１９～２１のいずれか１項に記載の試料製作装置。

[請求項23] 試料の複数の領域に光を照射する光照射部と、

前記試料に対して固定処理を行う固定部と

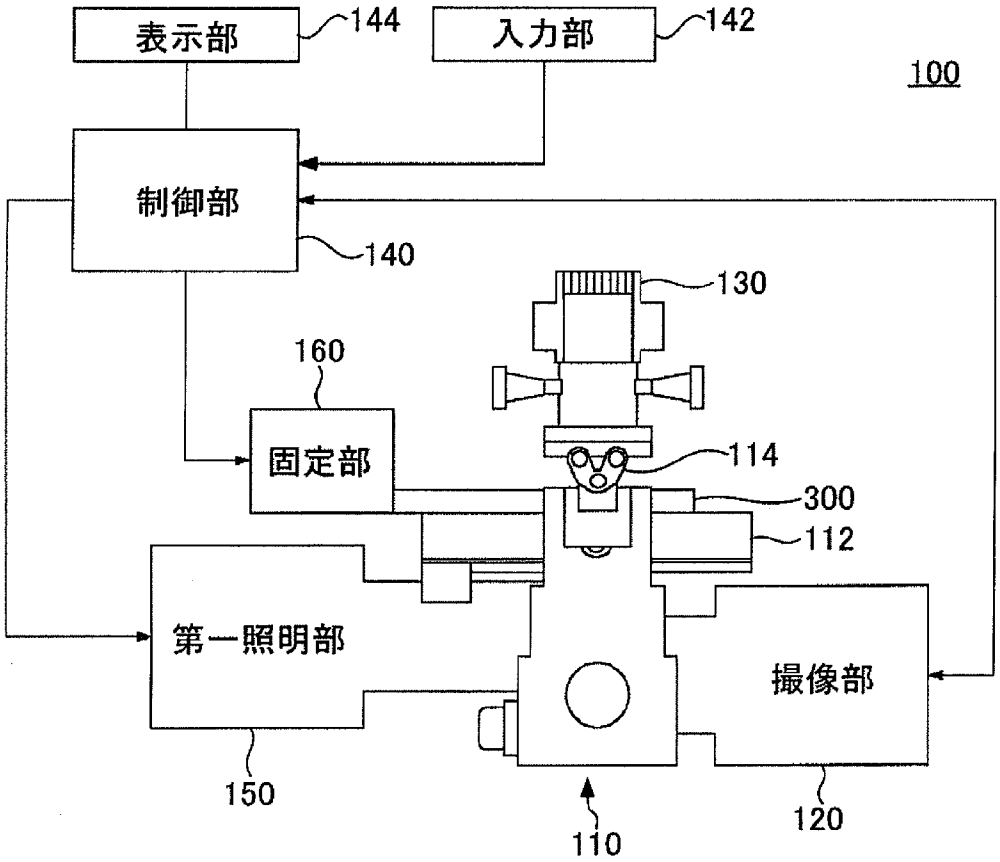
前記光照射部と、前記固定部とを制御する制御部と

をさらに有し、

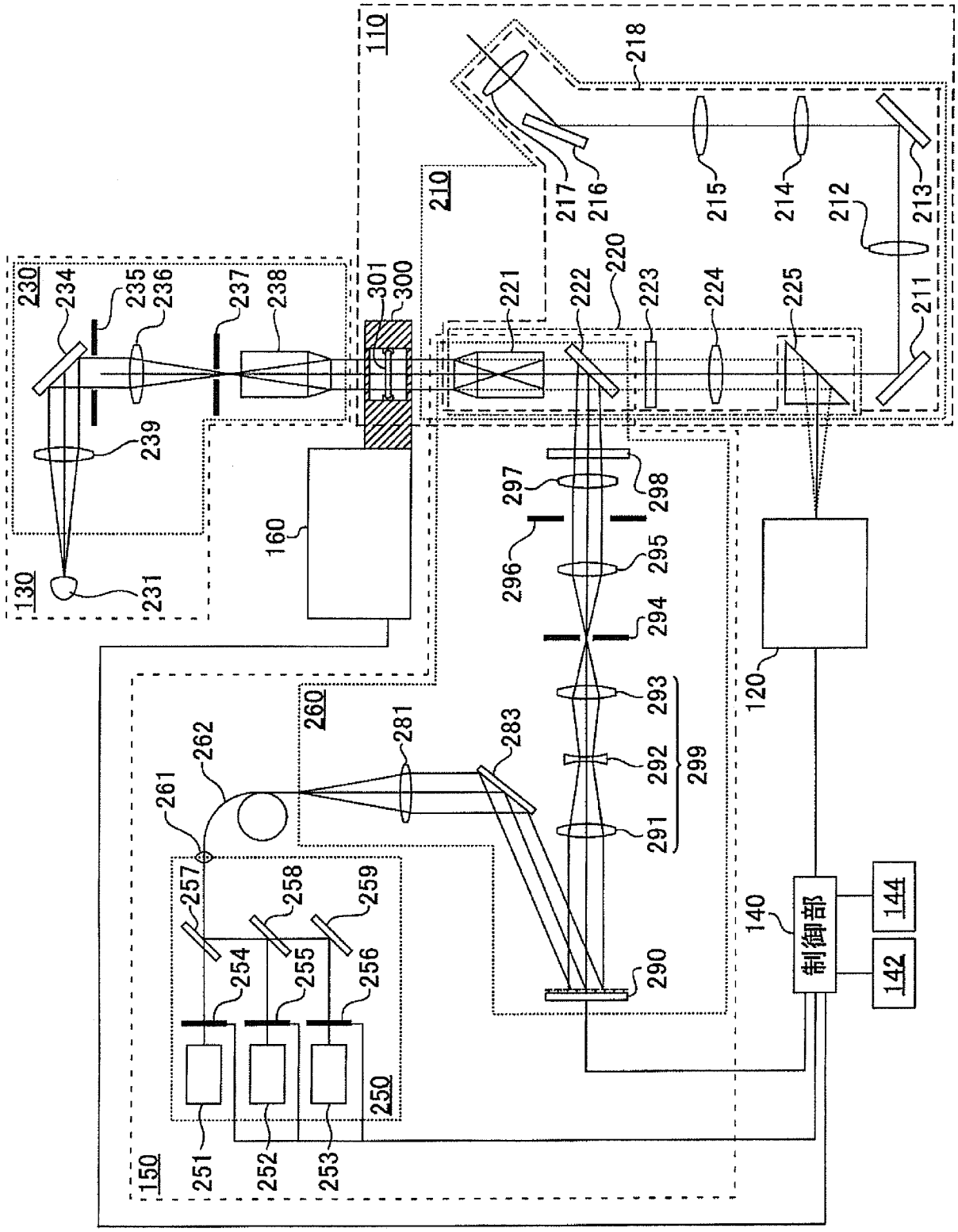
前記制御部は、前記設定画面において設定された情報に基づいて、前記光照射部と、前記固定部とを制御することを特徴とする

請求項１８～２２のいずれか１項に記載の試料作製装置。

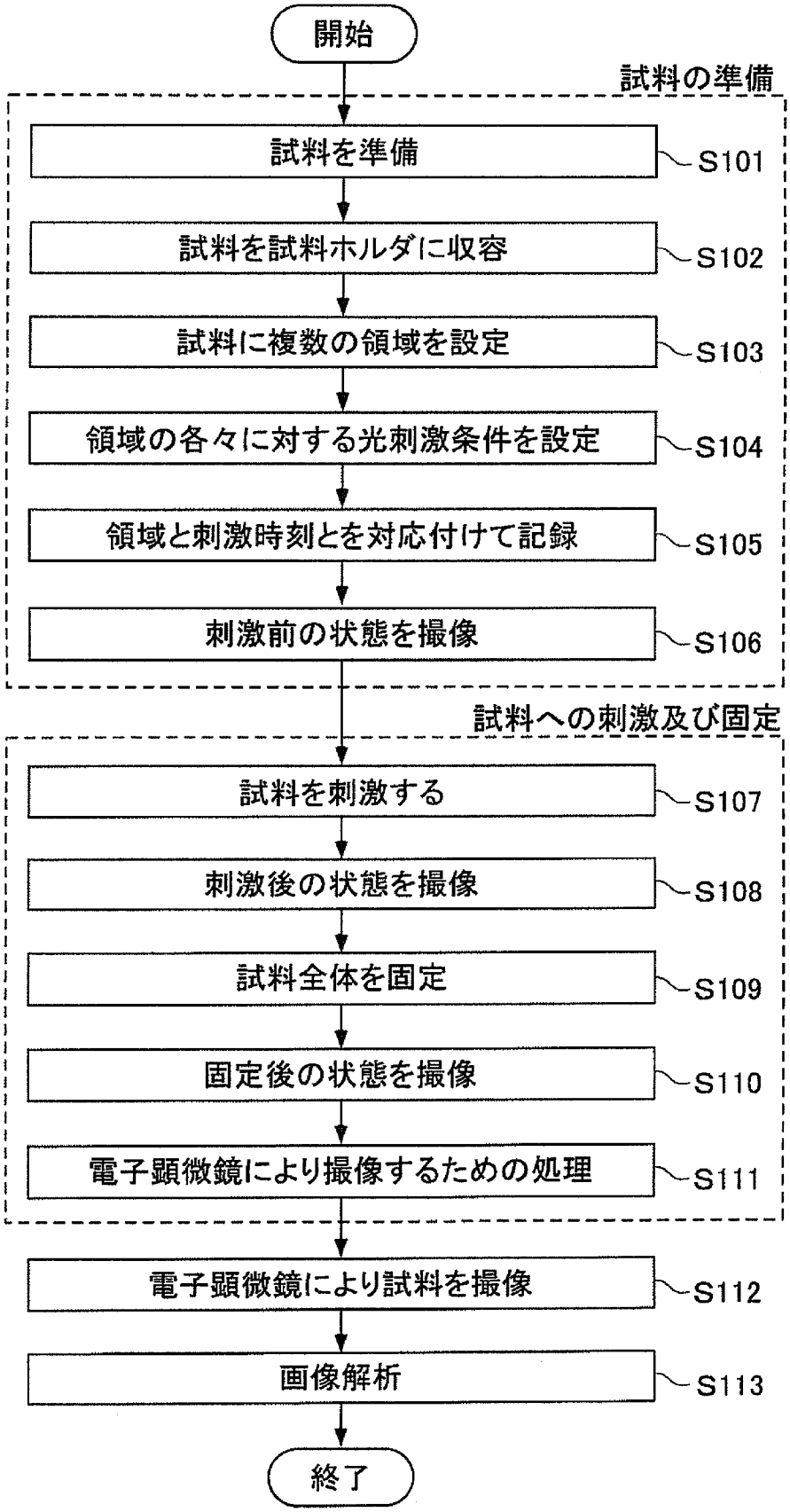
[図1]


表示部
144
入力部
142
100
制御部
140
130
160
固定部
114
300
112
第一照明部
撮像部
150
110
120

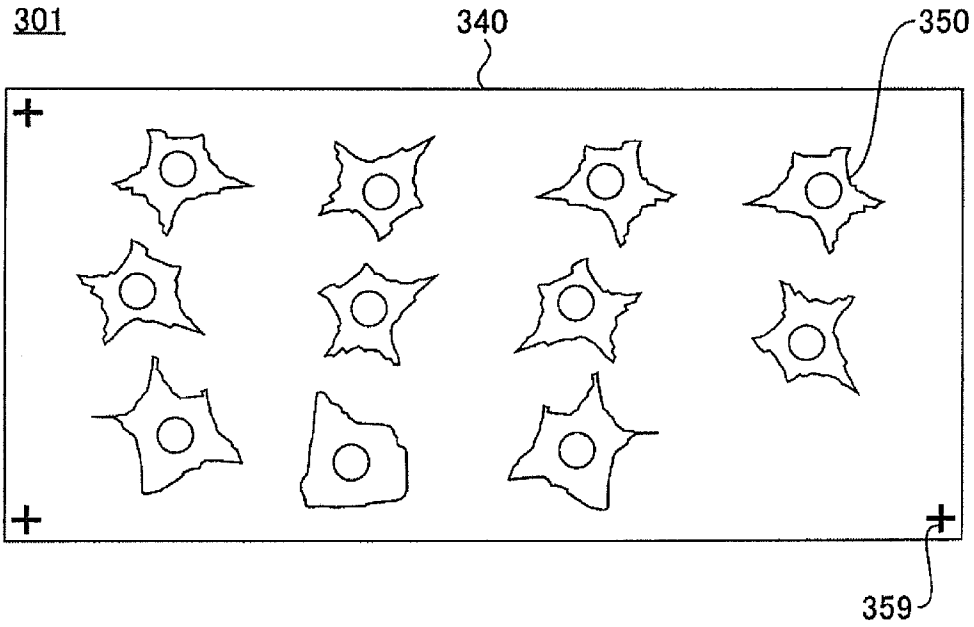
[図2]


110
218
217
216
215
214
212
213
211
210
220
221
222
223
224
225
230
234
235
236
237
238
301
300
239
231
130
160
297
298
296
295
294
293
292
291
299
290
120
260
281
283
262
261
257
258
259
254
255
256
250
251
252
253
150
140
制御部
144
142

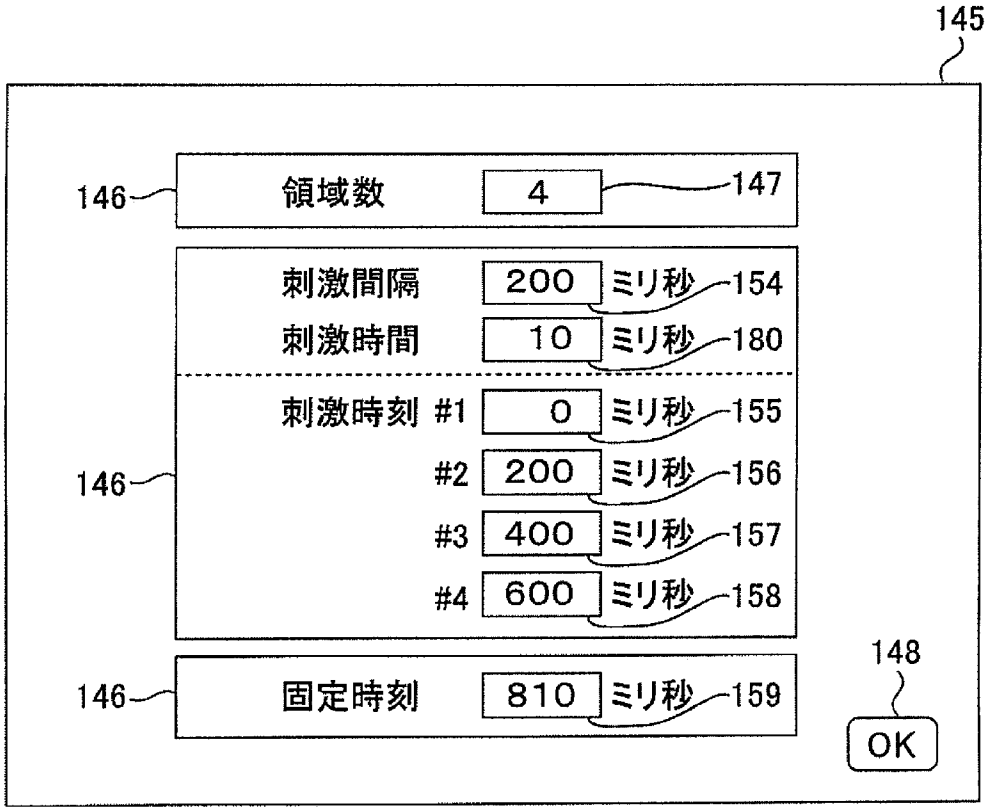
[図3]


開始
試料の準備
試料を準備
S101
試料を試料ホルダに収容
S102
試料に複数の領域を設定
S103
領域の各々に対する光刺激条件を設定
S104
領域と刺激時刻とを対応付けて記録
S105
刺激前の状態を撮像
S106
試料への刺激及び固定
試料を刺激する
S107
刺激後の状態を撮像
S108
試料全体を固定
S109
固定後の状態を撮像
S110
電子顕微鏡により撮像するための処理
S111
電子顕微鏡により試料を撮像
S112
画像解析
S113
終了

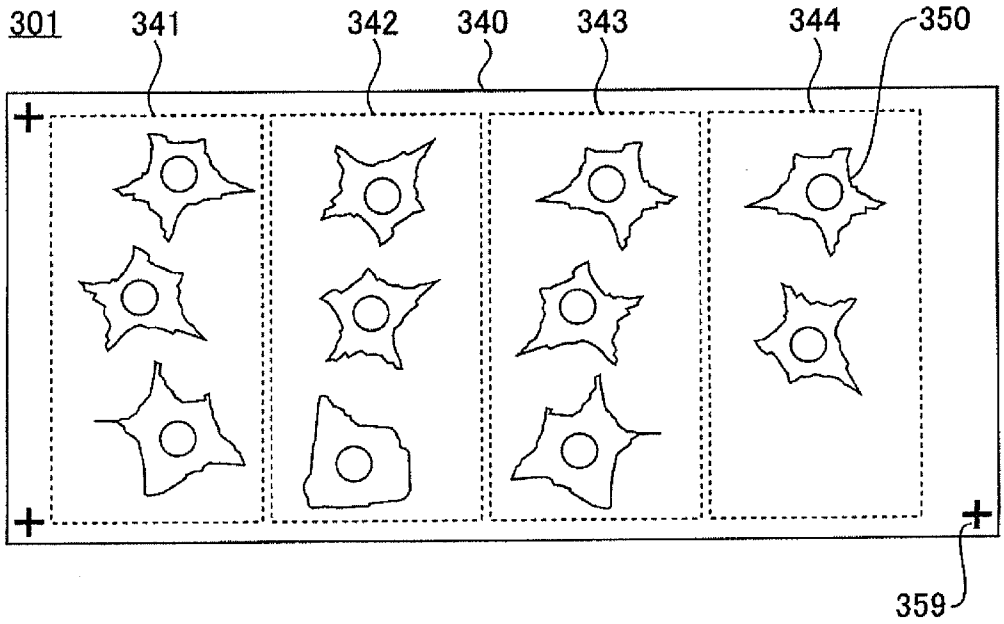
[図4]


301
340
350
359

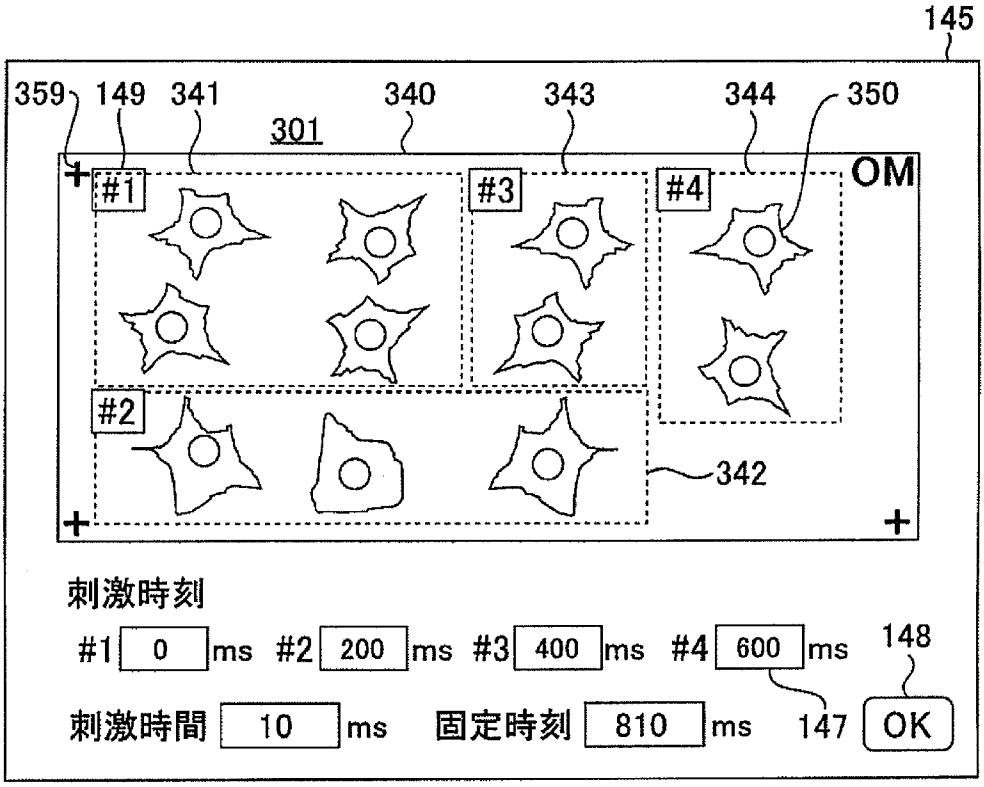
[図5]


145
146
領域数
4
147
刺激間隔
200
ミリ秒
154
刺激時間
10
ミリ秒
180
刺激時刻 #1
0
ミリ秒
155
#2
200
ミリ秒
156
#3
400
ミリ秒
157
#4
600
ミリ秒
158
146
固定時刻
810
ミリ秒
159
148
OK

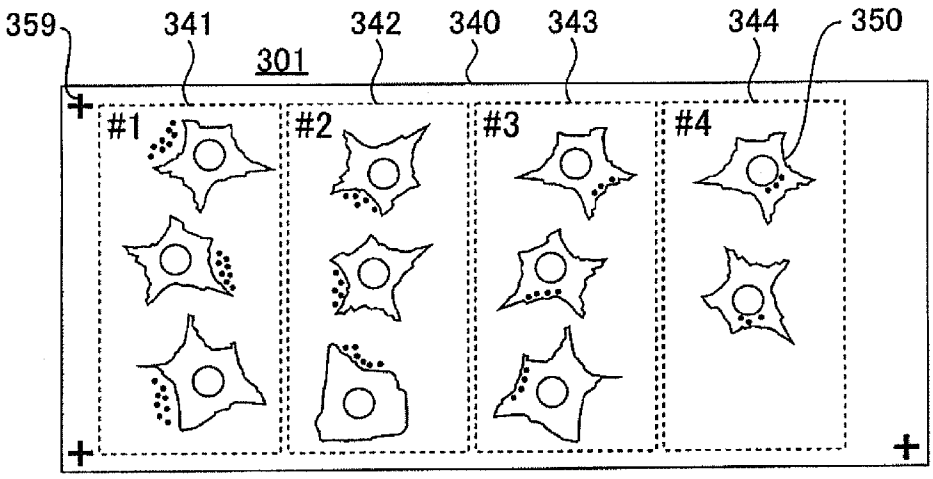
[図6]


301
341
342
340
343
344
350
359

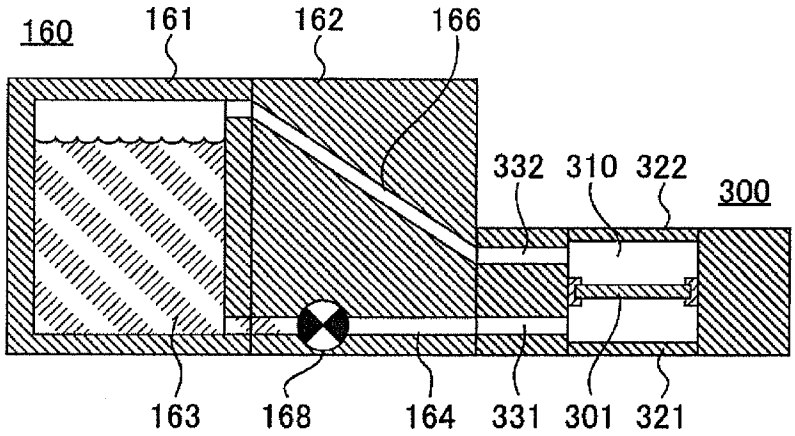
[図7]


145
359
149
341
301
340
343
344
350
OM
#1
#2
#3
#4
342
刺激時刻
#1 0 ms #2 200 ms #3 400 ms #4 600 ms
148
刺激時間 10 ms 固定時刻 810 ms
147
OK

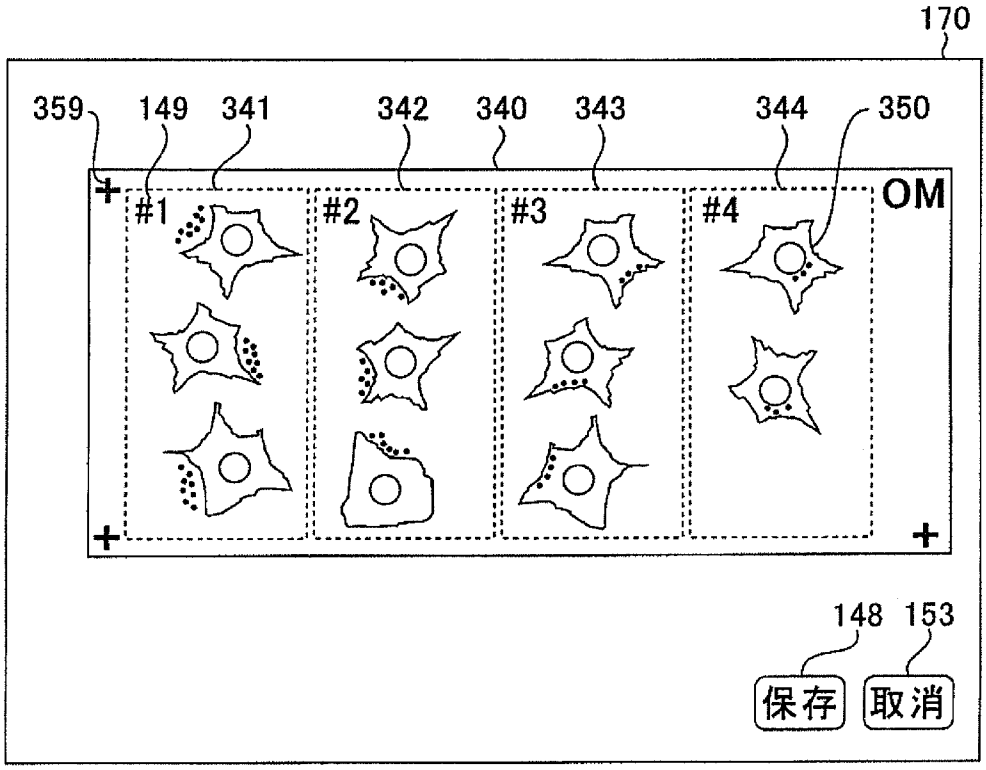
[図8]


359
341
342
340
343
344
350
301
#1
#2
#3
#4
+
+
+

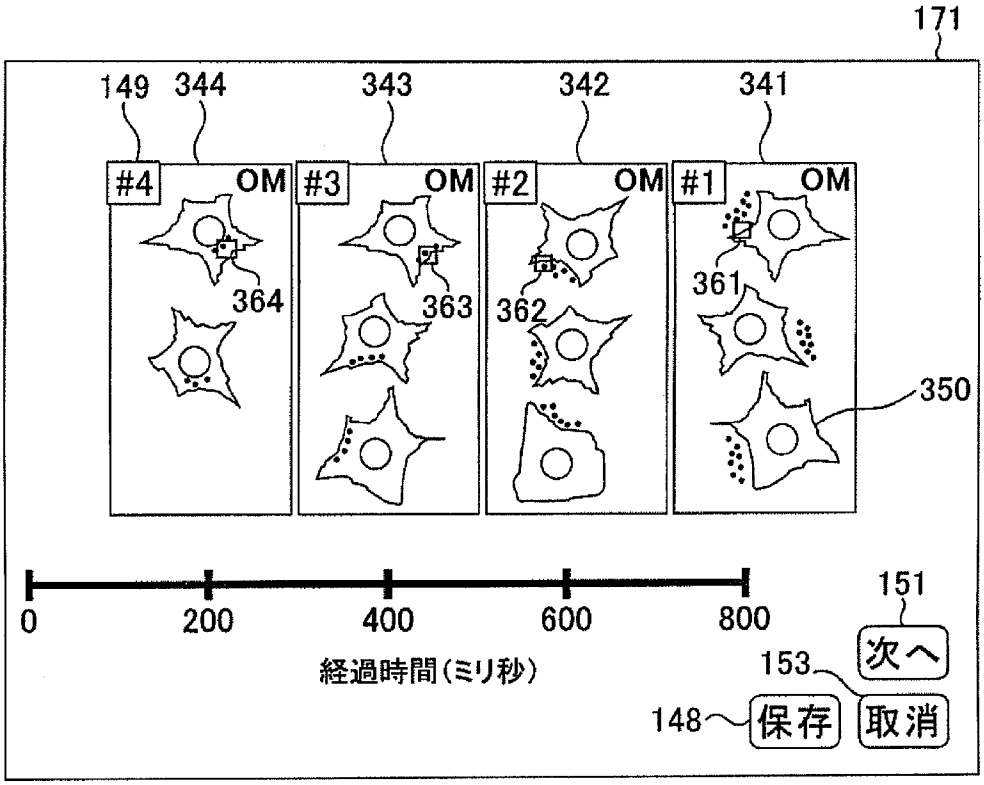
[図9]


160
161
162
166
332
310
322
300
163
168
164
331
301
321

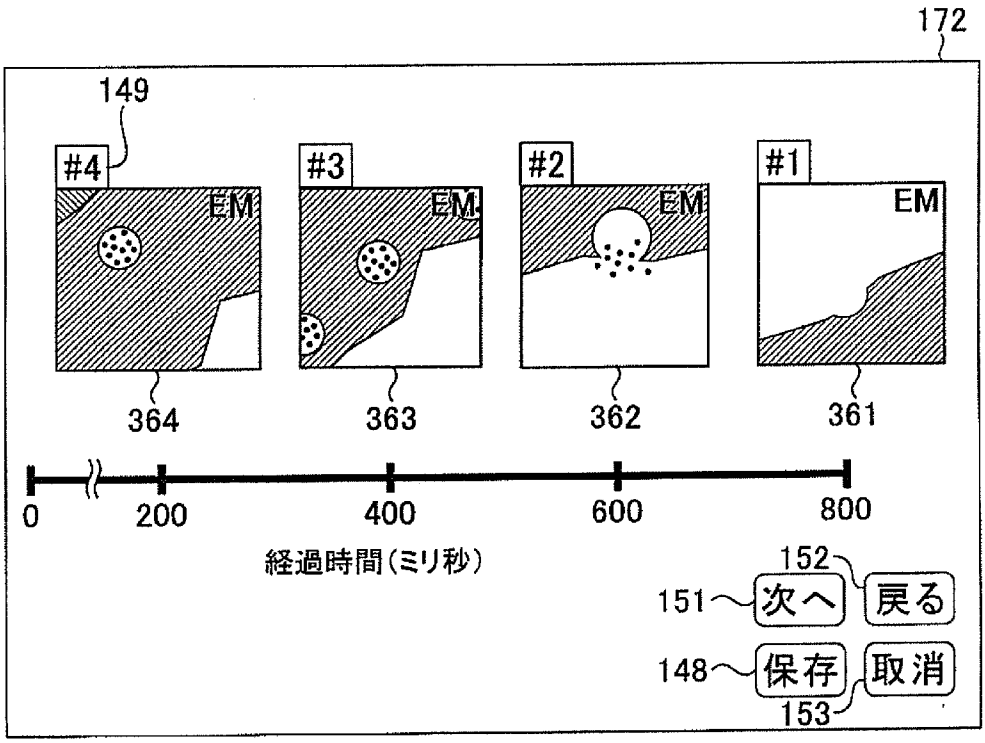
[図10]


170
359
149
341
342
340
343
344
350
#1
#2
#3
#4
OM
148
153
保存
取消

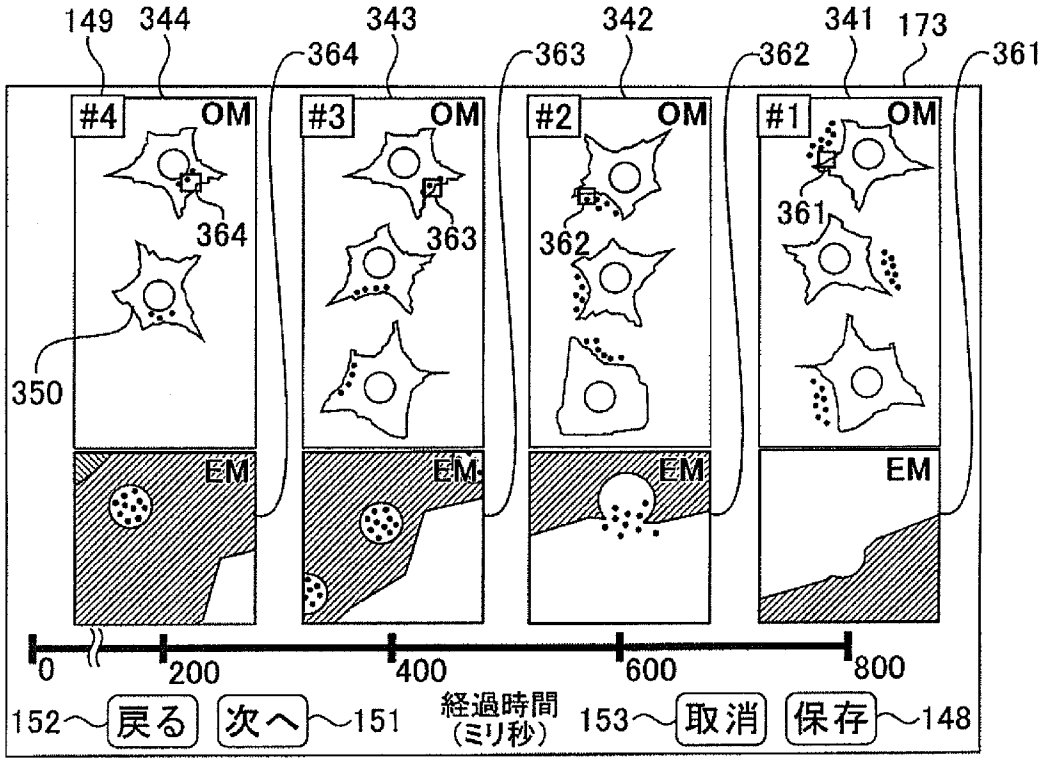
[図11]


171
149
344
343
342
341
#4
OM
#3
OM
#2
OM
#1
OM
364
363
362
361
350
0
200
400
600
800
経過時間(ミリ秒)
151
次へ
153
148
保存
取消

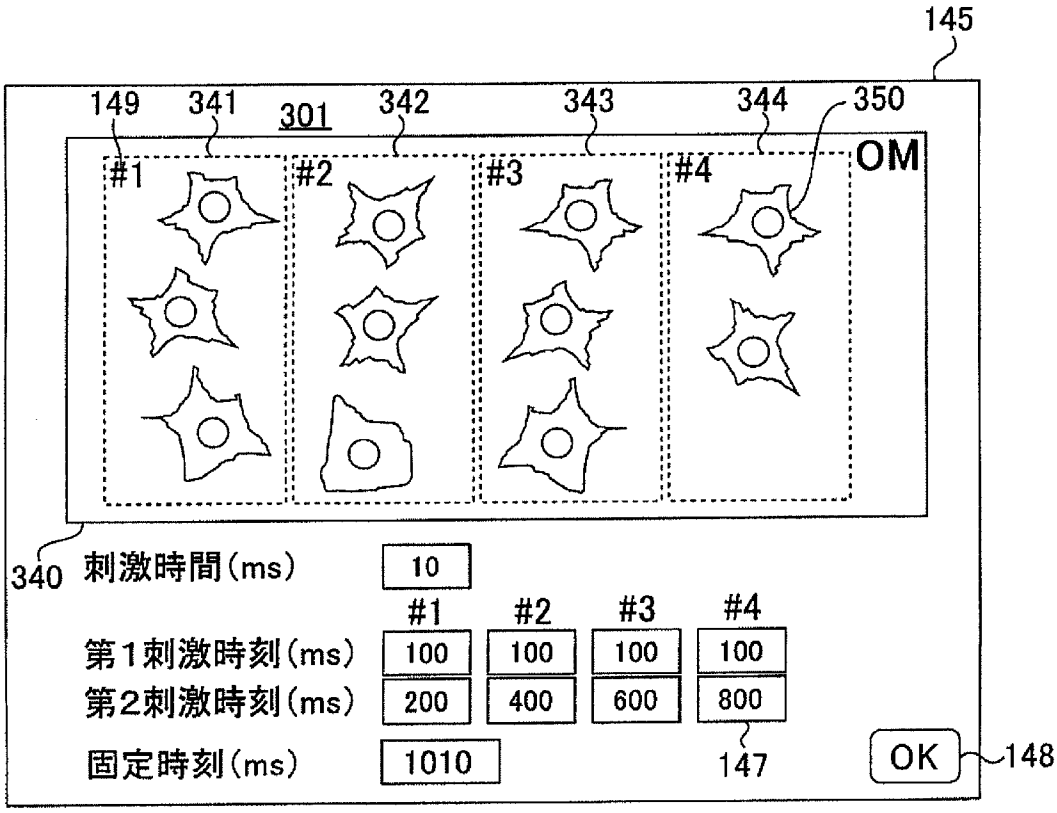
[図12]


172
149
#4
#3
#2
#1
EM
364
363
362
361
0
200
400
600
800
経過時間(ミリ秒)
152
151
次へ
戻る
148
保存
取消
153

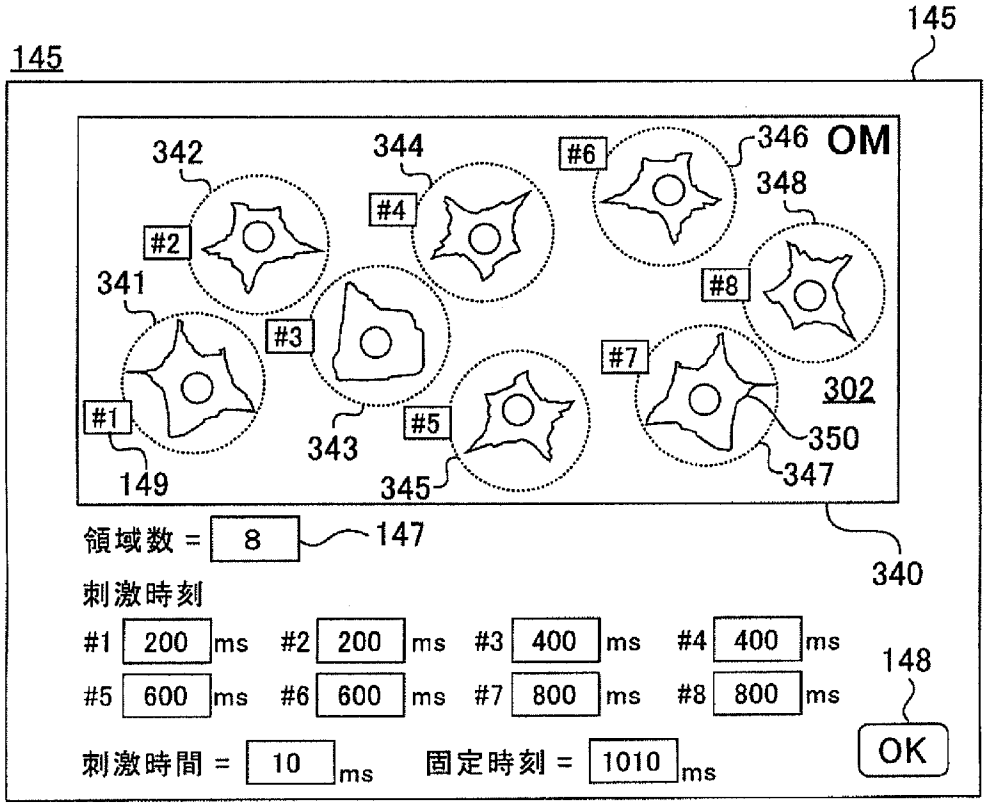
[図13]


149
344
343
342
341
173
364
363
362
361
#4
#3
#2
#1
OM
EM
350
0
200
400
600
800
152
戻る
次へ
151
経過時間
(ミリ秒)
153
取消
保存
148

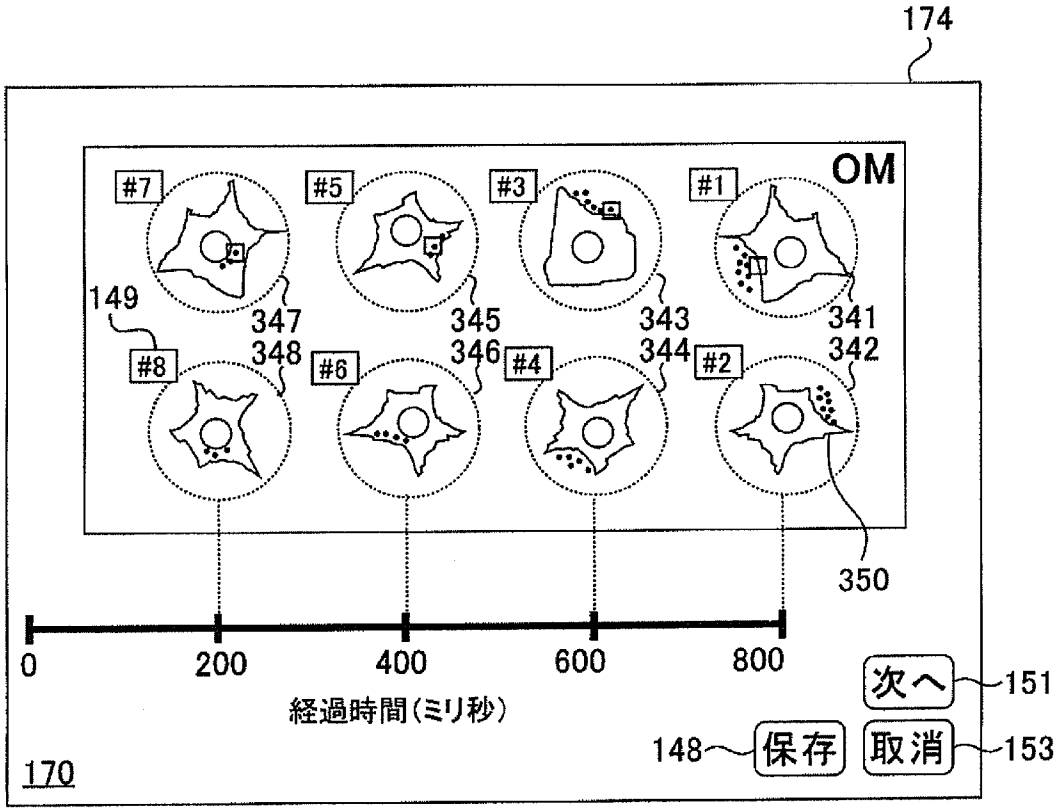
[図14]


145
149
341
301
342
343
344
350
OM
#1
#2
#3
#4
340
刺激時間(ms)
10
#1
#2
#3
#4
第1刺激時刻(ms)
100
100
100
100
第2刺激時刻(ms)
200
400
600
800
固定時刻(ms)
1010
147
OK
148

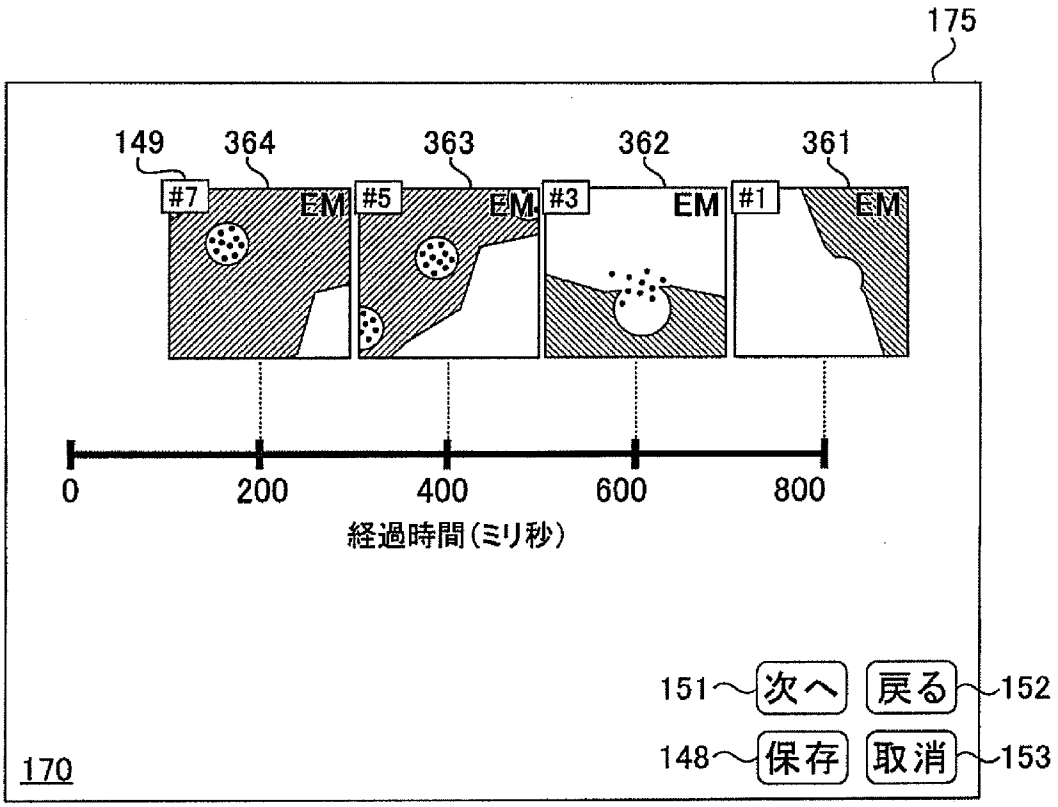
[図15]


145
145
342
344
#6
346
OM
348
#4
#2
#8
341
#3
#7
302
#1
#5
350
343
345
347
149
340
領域数 =
8
147
刺激時刻
#1
200
ms
#2
200
ms
#3
400
ms
#4
400
ms
#5
600
ms
#6
600
ms
#7
800
ms
#8
800
ms
148
刺激時間 =
10
ms
固定時刻 =
1010
ms
OK

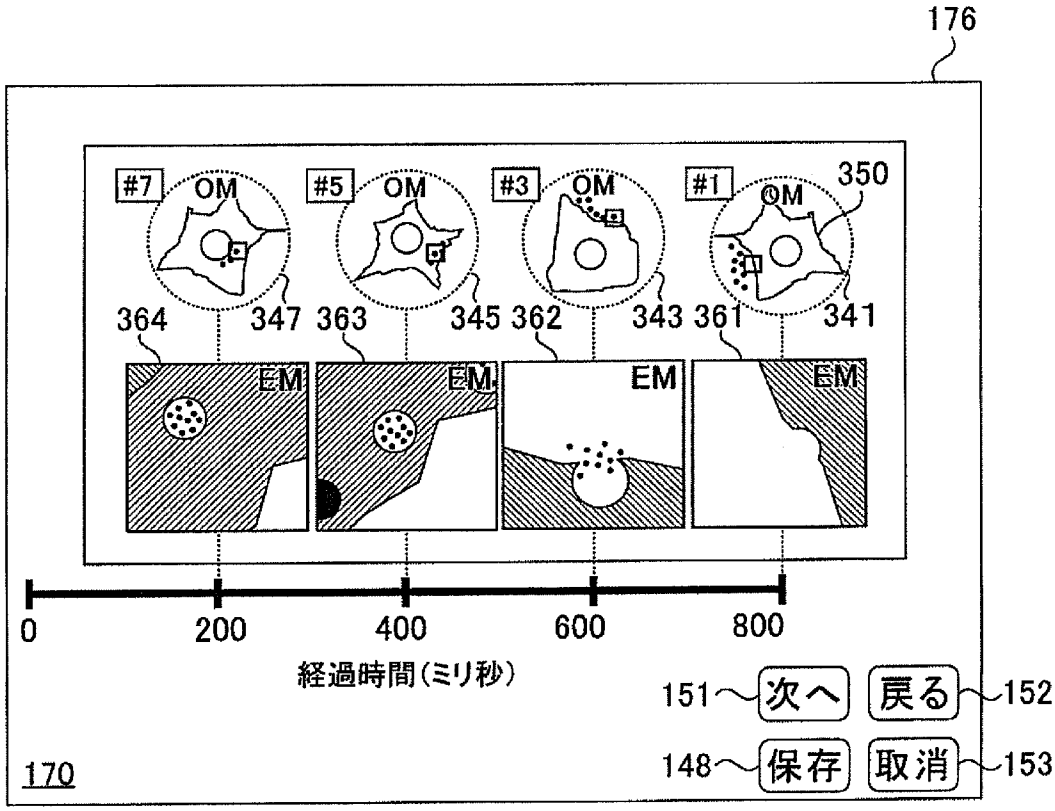
[図16]


174
OM
#7
#5
#3
#1
149
347
348
345
346
343
344
341
342
#8
#6
#4
#2
350
0
200
400
600
800
経過時間(ミリ秒)
次へ
151
148
保存
取消
153
170

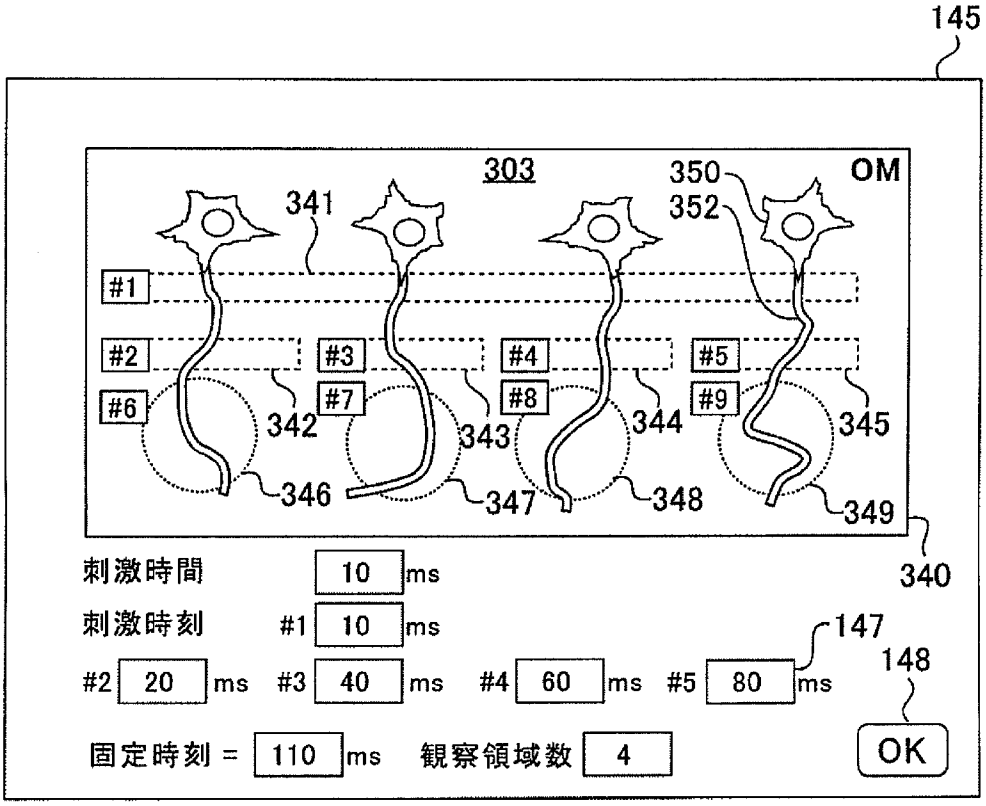
[図17]


175
149
364
363
362
361
#7
EM
#5
EM
#3
EM
#1
EM
0
200
400
600
800
経過時間(ミリ秒)
151
次へ
戻る
152
148
保存
取消
153
170

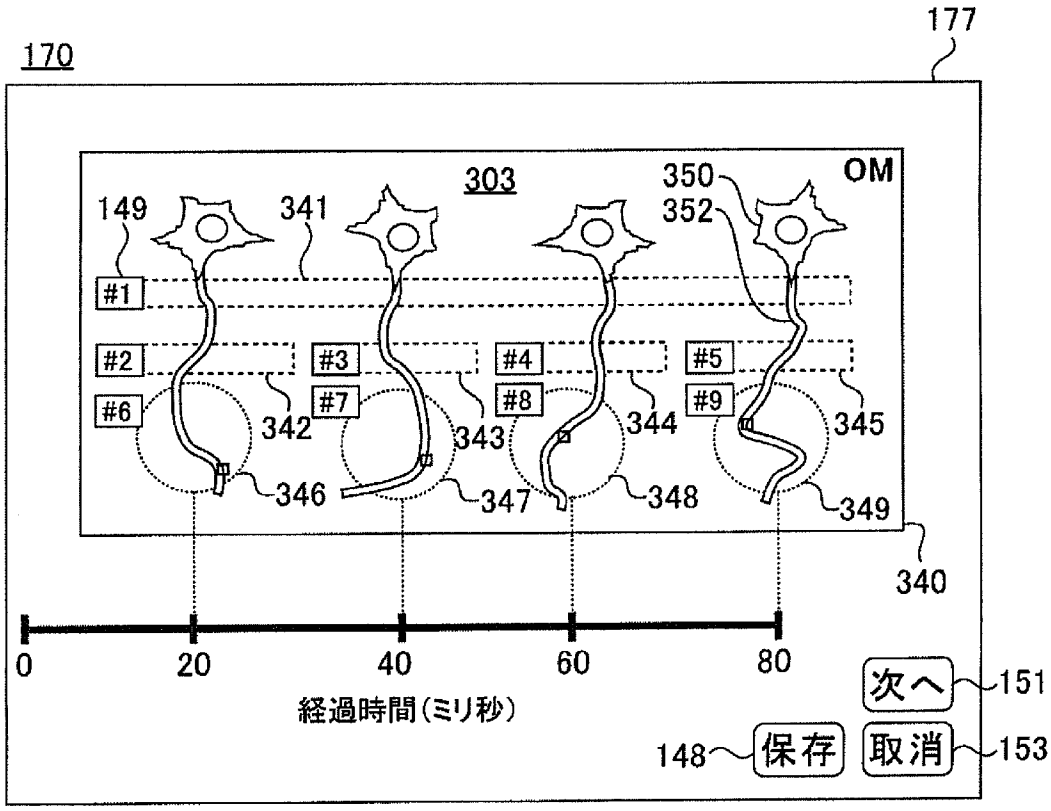
[図18]


176
#7
OM
#5
OM
#3
OM
#1
OM
350
364
347
363
345
362
343
361
341
EM
EM
EM
EM
0
200
400
600
800
経過時間(ミリ秒)
151
次へ
戻る
152
148
保存
取消
153
170

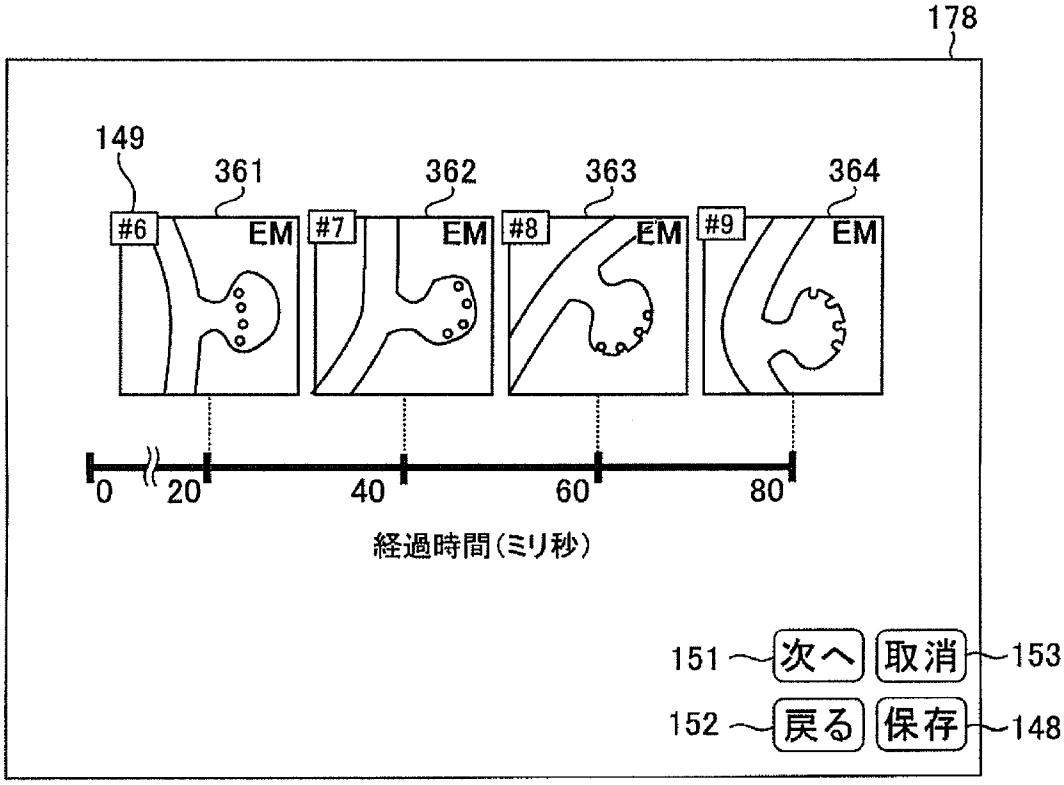
[図19]


145
303
350
352
OM
341
#1
#2
#3
#4
#5
#6
#7
#8
#9
342
343
344
345
346
347
348
349
340
刺激時間
10
ms
刺激時刻
#1
10
ms
147
#2
20
ms
#3
40
ms
#4
60
ms
#5
80
ms
148
固定時刻 =
110
ms
観察領域数
4
OK

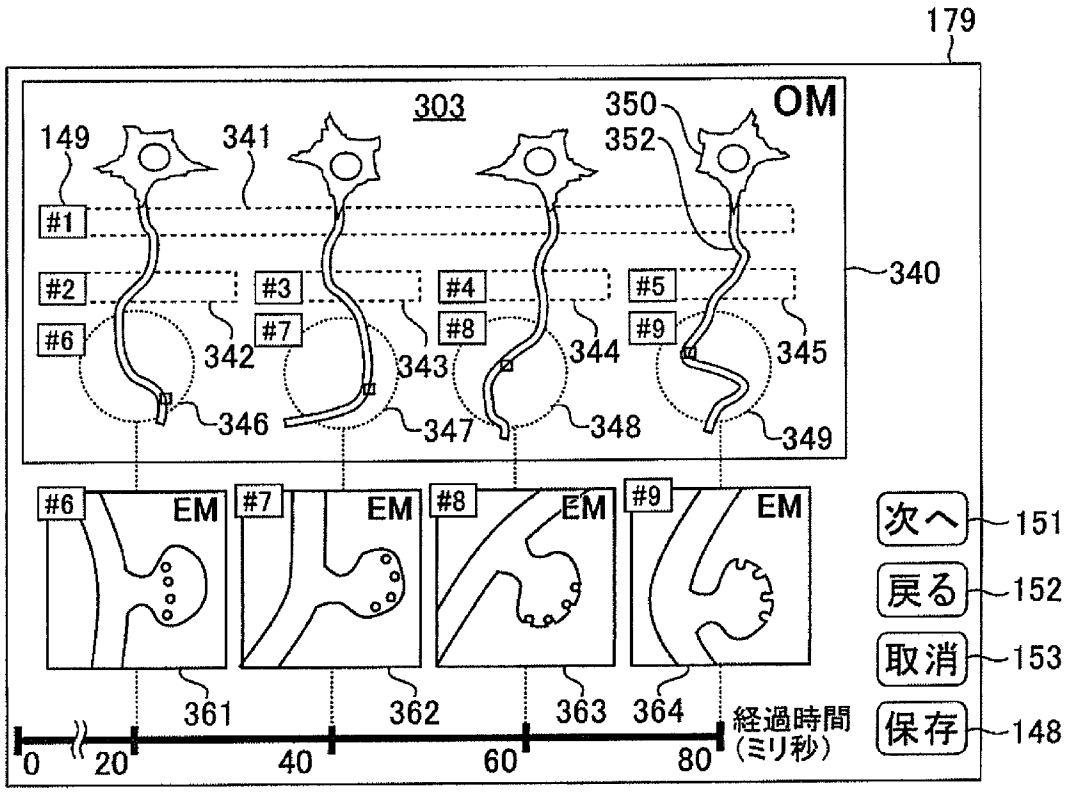
[図20]


177
170
303
350
OM
352
149
341
#1
#2
#3
#4
#5
#6
#7
#8
#9
342
343
344
345
346
347
348
349
340
0
20
40
60
80
経過時間(ミリ秒)
次へ
151
148
保存
取消
153

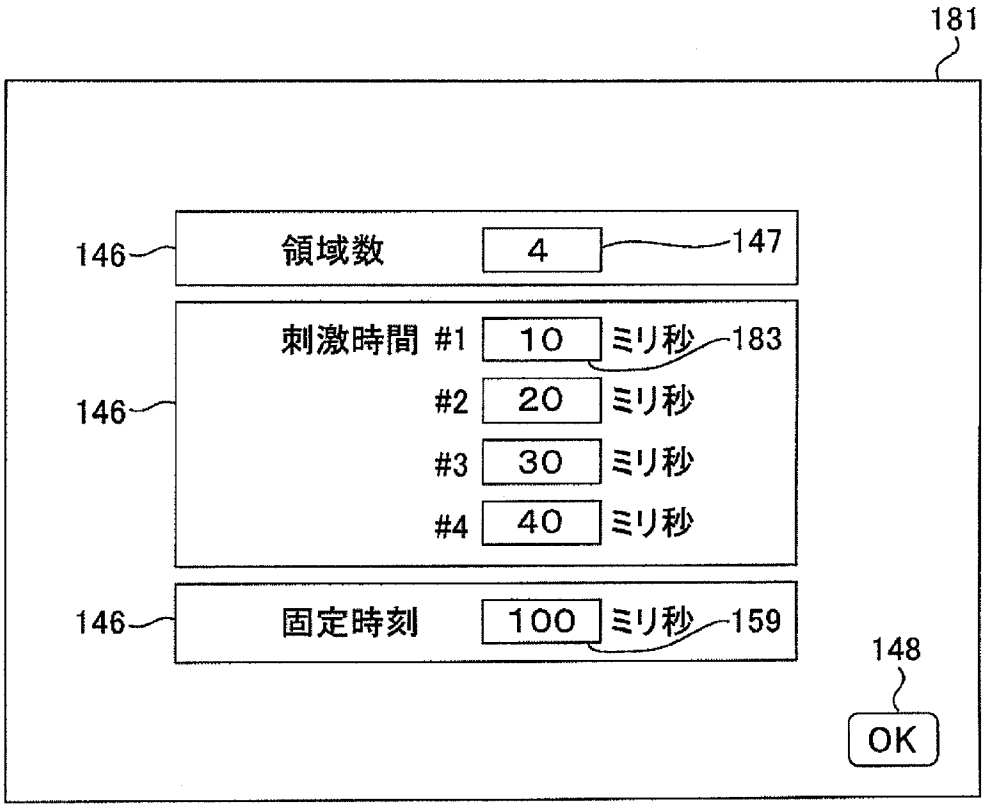
[図21]


178
149
361
362
363
364
#6
EM
#7
EM
#8
EM
#9
EM
0
20
40
60
80
経過時間(ミリ秒)
151
次へ
取消
153
152
戻る
保存
148

[図22]


179
303
OM
350
352
149
341
#1
#2
#3
#4
#5
#6
#7
#8
#9
340
342
343
344
345
346
347
348
349
EM
EM
EM
EM
次へ
151
戻る
152
取消
153
保存
148
361
362
363
364
経過時間
(ミリ秒)
0
20
40
60
80

[図23]


181
146
領域数
4
147
146
刺激時間 #1
10
ミリ秒
183
#2
20
ミリ秒
#3
30
ミリ秒
#4
40
ミリ秒
146
固定時刻
100
ミリ秒
159
148
OK

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/054966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N1/28(2006.01)i, *G01N23/04*(2006.01)i, *G01N23/225*(2006.01)i, *G02B21/00*(2006.01)i, *H01J37/20*(2006.01)i, *C12M1/00*(2006.01)n, *G01N33/48*(2006.01)n

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)
G01N1/28, G01N23/04, G01N23/225, G02B21/00, H01J37/20, C12M1/00, G01N33/48

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), JST7580(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 2013-181987 A (Leica Mikrosysteme GmbH), 12 September 2013 (12.09.2013), entire text; all drawings & US 2013/0227970 A1 & DE 102013003164 A1	1-23
A	JP 2011-107257 A (Olympus Corp.), 02 June 2011 (02.06.2011), entire text; all drawings & US 2011/0116165 A1 & US 2015/0323775 A1 & EP 2322969 A1	1-23
A	JP 2012-155299 A (Olympus Corp.), 16 August 2012 (16.08.2012), entire text; all drawings (Family: none)	1-23

☒ 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
06 May 2016 (06.05.16)	17 May 2016 (17.05.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/054966

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-508185 A (Max-Planck-Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften e.V.), 10 March 2011 (10.03.2011), entire text; all drawings & US 2009/0126373 A1 & WO 2009/065585 A2	1-23

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０５４９６６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N1/28(2006.01)i, G01N23/04(2006.01)i, G01N23/225(2006.01)i, G02B21/00(2006.01)i, H01J37/20(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)n, G01N33/48(2006.01)n

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.　G01N1/28, G01N23/04, G01N23/225, G02B21/00, H01J37/20, C12M1/00, G01N33/48

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), JST7580 (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 2013-181987 A (ライカ　ミクロジャステーメ　ゲーエムベーハー) 2013.09.12 全文、全図 & US 2013/0227970 A1 & DE 102013003164 A1	１－２３

☑　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
０６．０５．２０１６	１７．０５．２０１６

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）　２Ｊ　９８０６
山口　剛
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2011-107257 A (オリンパス株式会社) 2011.06.02 全文、全図 & US 2011/0116165 A1 & US 2015/0323775 A1 & EP 2322969 A1	１－２３
A	JP 2012-155299 A (オリンパス株式会社) 2012.08.16 全文、全図 (ファミリーなし)	１－２３
A	JP 2011-508185 A (マックス　ブランク　ゲゼルシャフト　ツゥアー　フェデルゥン　デル　ヴィッセン　シャフテン　エー　フォー) 2011.03.10 全文、全図 & US 2009/0126373 A1 & WO 2009/065585 A2	１－２３