

(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
2010 年 9 月 30 日(30.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/110452 A1

- (51) 国際特許分類:
G01Q 60/20 (2010.01) G02B 21/00 (2006.01)
G01Q 80/00 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/055450
- (22) 国際出願日: 2010 年 3 月 26 日(26.03.2010)
- (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 2009-076543 2009 年 3 月 26 日(26.03.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人静岡大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SHIZUOKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮川 厚夫 (MIYAKAWA, Atsuo) [JP/JP]; 〒4328561 静岡県浜松市中区城北 3 丁目 5-1 国立大学法人静岡大学工学部内 Shizuoka (JP). 川田 善正 (KAWATA, Yoshimasa) [JP/JP]; 〒4328561 静岡県浜松市中区城北 3 丁目 5-1 国立大学法人静岡大学工学部内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿 4 丁目 3 番 1 7 号

H K新宿ビル 7 階 太陽国際特許事務所 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, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

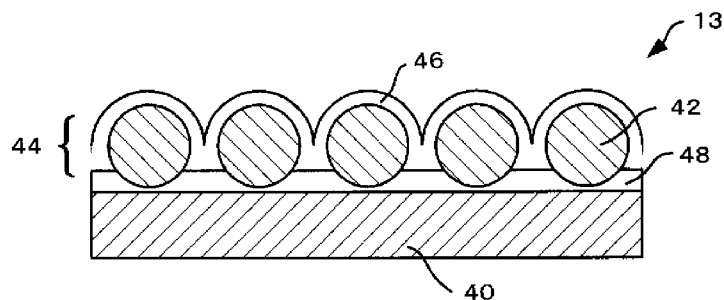
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: FLUORESCENT THIN FILM, METHOD FOR MANUFACTURING FLUORESCENT THIN FILM, FINE LIGHT SOURCE EXCITATION APPARATUS, AND OPTICAL MICROSCOPE

(54) 発明の名称: 蛍光薄膜、蛍光薄膜の製造方法、微小光源励起装置、及び光学顕微鏡

[図1]



(57) Abstract: A fine light source having a size smaller than the wavelength of the visible light is excited by means of irradiation of electronic beams or electromagnetic waves in a fluorescent thin film which includes a substrate and a fluorescent layer, which contains a fluorescent material bonded with the surface of the substrate by means of covalent bonding and has a film thickness less than the wavelength of the visible light.

(57) 要約: 基板と、基板の表面に共有結合により結合された蛍光物質を含み且つ可視光の波長未満の膜厚を有する蛍光層と、を含む蛍光薄膜には、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される。

WO 2010/110452 A1

明 細 書

発明の名称：

蛍光薄膜、蛍光薄膜の製造方法、微小光源励起装置、及び光学顕微鏡 技術分野

[0001] 本発明は、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される蛍光薄膜に関する技術に係り、この蛍光薄膜、蛍光薄膜の製造方法、微小光源励起装置及び光学顕微鏡に関する。

背景技術

[0002] 光学顕微鏡は、生きた生物試料をそのまま観察できるため、生命現象の解明において、非常に有効なツールとして用いられている。様々な機能を有する蛍光プローブが開発され、位相差光学系、共焦点光学系、全反射蛍光観察法など様々な光学系を利用することによって、細胞機能の解明、単一分子の観察などが実現されてきた。光を用いた生体試料の観察については、これまでの長い歴史によって、多くの実績と技術の蓄積がある。

[0003] 生命現象の解明におけるターゲットの一つとして、細胞やたんぱく質など最小構成要素一つの機能解明ではなく、複数の構成要素における相互作用、情報伝達のメカニズム、エネルギー伝達のメカニズム、細胞内の情報分子のダイナミクスなどを明らかにすることが期待されている。生体の器官、臓器などの働きは、生体の最小構成要素である細胞間の相互作用によって決定されるものである。従って、器官・臓器の詳細なメカニズムの解明には、細胞間の相互作用を明らかにすることが必要である。また、実時間観察を行うことによって、複数の生体分子のダイナミクスを理解することが必要である。

[0004] 一方、光学顕微鏡の空間分解能は、光の波としての性質により制限され、たかだかサブミクロン程度の分解能しか実現できない。従って、複数の分子間または微小器官の間における相互作用、情報の伝達機構を解明するには、より高い空間分解能を有する光学顕微鏡を開発することが必要である。

[0005] 光の回折限界を超えた微小領域を光学的に観察する顕微鏡として、近接場

(ニアフィールド)顕微鏡が知られている。図4に近接場顕微鏡の光学的観察の原理を示す。図4に示すように、金属で遮蔽されたプローブの先端部にレーザ光が導入される。プローブの先端部には数nm～数10nmの開口部が形成されている。前記開口部は光の波長に比べて非常に小さいので、プローブ先端部に導入されたレーザ光は前記開口部を通過できない。しかしながら、いわゆる近接場(ニアフィールド)効果によりレーザ光の一部が開口部から外部にしみ出す(エバネッセント波)。近接場顕微鏡では、このプローブ先端からしみ出した近接場光と測定対象物との相互作用が観察される。

[0006] この近接場顕微鏡を用いれば、光の波長未満の微小領域を観察することができる。しかしながら、近接場顕微鏡では、プローブの先端を測定対象物に近接させて観察する必要がある。図5に示すように、プローブを走査して測定対象物を観察するので、2次元の像を観察するのに非常に時間が掛かる。生体のダイナミクスを観察するためには、実時間観察が必要である。しかしながら、従来型の近接場顕微鏡では、上記の理由により実時間観察は不可能である。

[0007] 本発明に関連する先行技術として、以下の技術がある。

特表2003-524779号公報(特許文献1)には、近接場光を用いた近接場顕微鏡において、複数のナノスケールの孔から光を照射して、近接場を生成する技術が記載されている。また、光を電子ビームにより励起することが示唆されている。この近接場顕微鏡では、微小光源はナノスケールの孔により生成されている。

[0008] 特開2006-308475号公報(特許文献2)には、生体試料に光を照射して、発生した近接場光を光電変換膜により電子線に変換し、電子線を検出する近接場顕微鏡が記載されている。特許文献2では、近接場光を検出しているものの、光源自体は平行光である。

[0009] 特開2004-111333号公報(特許文献3)には、100nm以下の膜厚の蛍光薄膜が記載されている。しかしながら、この蛍光薄膜は、電界放射型ディスプレイ用に開発されたものである。光学顕微鏡のように、試料

を載置することや、電子ビーム又は電磁波で走査されることは想定されていない。また、結晶成長により蛍光層を形成しているため、蛍光物質は結晶化が可能な物質に限定される。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特表2003-524779号公報

特許文献2：特開2006-308475号公報

特許文献3：特開2004-111333号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上述した通り、従来の光学顕微鏡では光の回折限界により分解能に限界があった。一方、光の回折限界を超えて光学的な観察を行う顕微鏡として近接場顕微鏡があるが、プローブを観察対象部に近接させて走査させる必要があり、像を形成するのに時間が掛かる、という問題があった。また、ディスプレイ用の蛍光薄膜はいくつか知られているが、光学顕微鏡のように、試料を載置することや、電子ビーム又は電磁波で走査されることは想定されていない。

[0012] 本発明の目的は、数nmから数10nmの蛍光層を形成することが可能で、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源を励起することができ、蛍光物質が剥がれ落ち難い蛍光薄膜及びその製造方法を提供することにある。

[0013] また、本発明の他の目的は、蛍光薄膜に励起される微小光源により得られる近接場効果を、光の回折限界を超えた分解能の近接場情報を高速で取得可能な光学顕微鏡等、種々の用途に利用することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明の蛍光薄膜は、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される蛍光薄膜であって、基板と、前記基板の

表面に共有結合により結合された蛍光物質を含み且つ可視光の波長未満の膜厚を有する蛍光層と、を含む。

[0015] 本発明の蛍光薄膜の製造方法は、蛍光物質に、第1官能基を導入するステップと、基板に、前記第1官能基と共有結合を形成する第2官能基を導入するステップと、前記蛍光物質に導入された前記第1官能基と前記基板に導入された前記第2官能基との反応により、前記基板の表面に共有結合により蛍光物質を結合するステップと、を含む。

[0016] 本発明の微小光源励起装置は、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される蛍光薄膜と、電子ビーム又は電磁波を発生する電子ビーム又は電磁波発生部と、前記電子ビーム又は電磁波発生部で発生した電子ビーム又は電磁波を制御して前記蛍光薄膜に照射し、前記蛍光薄膜に可視光の波長未満の大きさの微小光源を励起させる電子ビーム又は電磁波制御部と、を含む。

[0017] 本発明の光学顕微鏡は、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される蛍光薄膜と、電子ビーム又は電磁波を発生する電子ビーム又は電磁波発生部と、前記電子ビーム又は電磁波発生部で発生した電子ビーム又は電磁波を制御して前記蛍光薄膜に照射し、前記蛍光薄膜に可視光の波長未満の大きさの微小光源を励起させる電子ビーム又は電磁波制御部と、前記微小光源で発生して前記測定対象物に作用した測定光を検出する光検出部と、を含む。

発明の効果

[0018] 本発明の蛍光薄膜は、基板と蛍光物質とを共有結合で結合することで、単層又は複数層の蛍光物質の層を形成して数nmから数10nmの蛍光層を形成することが可能で、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源を励起することができる。また、基板と蛍光物質とを共有結合で結合することで、蛍光物質が剥がれ落ち難くなる。

[0019] 本発明の蛍光薄膜は、蛍光薄膜に励起される微小光源によれば近接場効果が得られるので、光学顕微鏡等の種々の用途に利用することが可能である。

本発明の光学顕微鏡は、本発明の蛍光薄膜を用いることにより、光の回折限界を超えた分解能の近接場情報を高速で取得することが可能である。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]本発明の実施形態に係る蛍光薄膜の構成の一例を示す模式図である。

[図2]基板と蛍光物質とが共有結合で結合される様子を示す模式図である。

[図3]実施例で形成された蛍光薄膜のAFM像を示す図である。

[図4]近接場顕微鏡の構成と光学的観察の原理を示す概略図である。

[図5]従来の近接場顕微鏡の原理を説明するための概略図である。

[図6]従来の近接場顕微鏡の走査方法を説明するための概略図である。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明の実施の形態の一例を詳細に説明する。

[0022] <実施形態1（蛍光薄膜）>

まず、本発明の実施の形態に係る蛍光薄膜について説明する。図1は本発明の実施形態に係る蛍光薄膜の構成の一例を示す模式図である。図1に示すように、蛍光薄膜13は、基板40、蛍光物質42を含む蛍光層44、及び金属蒸着層46を含んで構成されている。基板40上に複数の蛍光物質42が配置されて、蛍光層44が形成されている。金属蒸着層46は、複数の蛍光物質42を覆うように蛍光層44上に形成されている。基板40には、反応性の官能基48が導入されている。また、後述する通り、蛍光物質42には、官能基48と共有結合を形成する官能基が導入されている。なお、金属蒸着層46は、適宜省略することができる。

[0023] 本実施の形態では、蛍光物質42として「量子ドット」が用いられている。また、基板40として「ガラス基板」が用いられている。基板40には、官能基48として「活性化アミノ基」が導入されている。また、蛍光物質42には、活性化アミノ基と「ペプチド結合」を形成する官能基が導入されている。各々の官能基は、メチレン基 $-(CH_2)_n-$ やポリエチレングリコール（略称PEG、 $H-(CH_2CH_2O)_n-$ ）等、適当なスペーサ基を介して導入することができる。基板（ガラス基板）40上には、これら官能基の共有結合（ペプチド

結合/ $-C(=O)NH-$)を介して、蛍光物質(量子ドット)42が配置されている。また、金属蒸着層46として「Au(金)」を蒸着した層が形成されている。

[0024] 図2は基板と蛍光物質とが共有結合で結合される様子を示す模式図である。図2に示すように、ガラス基板(Glass Substrate)上には、メチレン基を介して活性化アミノ基($-NH_2$)が導入されている。また、量子ドット(Quantum Dot/Qドット)には、PEGを介してカルボキシル基($-COOH$)が導入されている。即ち、量子ドットは、表面吸着化合物(Surface & Attachment Chemistry)であるPEGで覆われており、PEGに結合された生体活性分子(Bioactive Molecule)がカルボキシル基($-COOH$)を有している。ガラス基板の活性化アミノ基($-NH_2$)と、量子ドットのカルボキシル基($-COOH$)とが反応して、ペプチド結合($-C(=O)NH-$)により量子ドットがガラス基板に結合される。

[0025] 図1に示す構成の蛍光薄膜13は、基板40と蛍光物質42との結合に共有結合を用いているため、単層または数層の蛍光物質42の層を形成できる。そのため、数nmから数10nmの蛍光層44を形成することができ、例えば細く絞った電子ビーム又は電磁波を用いて励起すれば、可視光の波長に比べて非常に小さな光源を形成することができる。波長よりも小さな光源は近接場効果を起こすので、さまざまな用途に利用することが可能である。また、基板40と蛍光物質42との結合に共有結合を用いているため、水や接触などに対して強く、蛍光層44の上に生体などの測定対象物を載置しても、蛍光物質42が剥がれ落ちることが少ない。

[0026] 基板40としては、これらに限定される訳ではないが、ガラス基板、酸化シリコン基板、窒化シリコン基板などを用いることができる。なお、直接、蛍光物質42とのペプチド結合を形成できる点で、ガラス基板、酸化シリコン基板がより好ましい。窒化シリコン基板を用いる場合には、表面酸化を行う、酸化シリコンや金などを数nm程度に蒸着やスパッタする等してから、蛍光物質42とのペプチド結合を形成する。また、基板40の厚さは、電子

線ビームへの影響が少ないため特に限定されない。例えば、電子線ビームの加速電圧にもよるが、100nm程度の膜厚としてもよい。

[0027] 蛍光層44は、単層または数層の蛍光物質42の層からなることが好ましい。蛍光物質42を、共有結合により単層または数層に形成することにより、数nm～数10nmの蛍光層44を形成することができる。

[0028] 蛍光物質42としては、用途に応じて、電子ビームまたは波長200nm以下の電磁波により励起される物質を用いる。蛍光物質42としては、これらに限定される訳ではないが、量子ドットを利用した蛍光物質が好ましい。量子ドットは微小ながら発光強度が大きいので、蛍光物質として好ましい。また、量子ドットは無機物質からなるので、電子線励起用の蛍光物質として好ましい。更に、蛍光薄膜13の強度を高める点から、量子ドットを共有結合で結合させて蛍光薄膜13を作成することが望ましい。蛍光層44の形成工程からも、蛍光物質42として量子ドットを用いることが好ましい。共有結合せずに残った量子ドットは、超音波洗浄などで除去することが容易である。

[0029] 量子ドットは、CdSe/ZnSやInGaP/ZnSのような無機半導体のため、有機化合物の蛍光物質と比較して、長時間の紫外線照射や電子線照射に耐えられる。この量子ドットを細く絞った紫外線や、走査型電子顕微鏡のような極めて細い電子線で励起して発光させることで、直径が数nm～数10nmの微小光源を得ることができる。このサイズの微小光源を得るには、蛍光発光波長に応じて選択された直径5nmから30nmまでの量子ドットを一層から数層で整列させることが好ましい。

[0030] 金属蒸着層46は適宜省略することができる。電子線励起するときには表面に導電層が必要な場合には、蛍光層44の上に金などの金属蒸着層44を設けることが望ましい。

[0031] また、電子線励起する場合には導電層が必要であるため、基板40の表面に金属蒸着層を形成してもよい。この場合には、蛍光層44は金属蒸着層の上に形成される。つまり、基板40と蛍光層44との間に、金属蒸着層を挟

みこんでも良い。

[0032] 次に、図 1 に示す蛍光薄膜の製造方法について説明する。蛍光薄膜の製造方法は、少なくとも以下の 3 つのステップを含んでいる。

(1) 蛍光物質 4 2 に第 1 官能基を導入するステップ

(2) 基板 4 0 に第 1 官能基と共有結合を形成する第 2 官能基を導入するステップ

(3) 蛍光物質 4 2 に導入された第 1 官能基と基板 4 0 に導入された第 2 官能基との反応により基板 4 0 の表面に共有結合により蛍光物質 4 2 を結合するステップ

[0033] 第 1 官能基及び第 2 官能基としては、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、エポキシ基などがある。基板 4 0 に導入される第 2 官能基は、蛍光物質 4 2 に導入される第 1 官能基と共有結合を形成する官能基である。第 1 官能基、第 2 官能基としては、上記の例示された官能基群の中から、互いに共有結合を形成する組合せを選択すればよい。図 2 に示した例では、蛍光物質 4 2 に導入される第 1 官能基がカルボキシル基であり、基板 4 0 に導入される第 2 官能基がアミノ基である。

[0034] 蛍光層 4 4 の表面に金属蒸着層 4 6 を形成する場合には、金属蒸着層 4 6 を形成するステップを更に含む。

[0035] <実施形態 1 の実施例（蛍光薄膜の作製例）>

次に、蛍光薄膜の作製する具体的な方法について説明する。

(手順 1) まず、ガラス基板上や酸化シリコン基板上に、シラン化試薬を用いてアミノ基を導入する。例えば、シラン化試薬である (3-aminopropyl)-triethoxysilan の濃度が 2 % のアセトン溶液に、上記基板を浸漬する。5 分後に基板を取り出し、アセトンで洗浄した後に、次いで純水で洗浄し、洗浄後の基板を乾燥する。

[0036] (手順 2) 次に、カルボジイミド試薬を用いてカルボキシル基を導入した量子ドットを用意する。そして、基板に導入したアミノ基と量子ドットに導入したカルボキシル基とを反応させて、基板と量子ドットをペプチド結合で結

合する。例えば、pH 7.4 のphosphate buffered saline 1.0 ml（ミリリットル）に、カルボジイミド試薬であるN-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride（EDC）10 mg とN-hydroxysuccinimide 0.75 mg とを溶解し、得られた溶液と量子ドット分散液である5 μ l（マイクロリットル）の8 μ M（マイクロモル）のQ dot 655 ITK carboxyl quantum dotsとを混合する。EDCとN-hydroxysuccinimideのモル比は、1 : 0.125である。

[0037] 得られた分散液にアミノ基を導入した基板を浸漬し、10分静置して、量子ドットを結合する。反応後に基板を分散液から取り出し、pH 7.4 のphosphate buffered saline で洗浄した後に、次いで純水で洗浄する。その後、基板を更に純水中で超音波洗浄し、未結合の量子ドットを除去する。純水で洗浄後、量子ドットが結合された基板を完全に乾燥させる。

[0038] 図3に本実施例で形成した蛍光薄膜のAFM像を示す。図3から、基板上に1層の量子ドット層が形成されていることがわかる。

[0039] <実施形態2（光学顕微鏡）>

以下、実施形態1で形成した蛍光薄膜を微小光源の励起に用い、近接場光学顕微鏡に適用した例を示す。本発明の実施形態2に係る光学顕微鏡は、実施形態1で形成した蛍光薄膜を用い、電子ビーム又は電磁波を走査できるようにした以外は、一般的な近接場光学顕微鏡と同じ構成であるために、図4を用いてその構成を説明する。

[0040] 図4に示すように、光学顕微鏡は、電子顕微鏡結像系10と光学顕微鏡部20とを備えている。電子顕微鏡結像系10は、電子ビーム又は電磁波を射出する電子源11と、電子源11から射出された電子ビーム又は電磁波を所定位置にフォーカスさせる電子レンズ12と、電子ビーム又は電磁波が照射される蛍光薄膜13と、内部が真空状態になっている真空容器14と、を備えている。電子源11及び電子レンズ12は、真空容器14内に設けられている。蛍光薄膜13は、真空容器14の隔壁に形成された貫通孔を塞ぐように、当該隔壁に貼り付けられ、隔壁の一部を成している。そして、試料30

は、貫通孔の上で且つ蛍光薄膜 13 の上に配置されている。

[0041] また、図 4 に示すように、光学顕微鏡部 20 は、試料 30 からの光を集光する対物レンズ 21 と、対物レンズ 21 からの光を検出する光検出器 22 と、光検出器 22 で検出された信号を記録する信号記録部 23 と、を備えている。なお、図 4 では、蛍光薄膜 13 が、真空容器 14 の上面全面に形成されているように見えるが、実際には大気圧に耐えられるように上面の隔壁に形成された微小の貫通孔を塞ぐような構成とされている。

[0042] 電子源 11 で発生された電子ビーム又は電磁波は、電子レンズ 12 により蛍光薄膜 13 内に（例えば、数 10 nm オーダで）フォーカスされる。フォーカスされた電子ビーム又は電磁波により蛍光薄膜 13 内で光が励起され、微小光源が（～数 10 nm）が生成される。蛍光薄膜 13 の蛍光層 44 の膜厚は、可視光の波長よりも薄い。このため電子ビーム又は電磁波を数 nm ～数 10 nm に絞って蛍光薄膜 13 に照射することで、可視光波長未満の大きさの微小光源を励起することができる。

[0043] なお、電子ビーム又は電磁波は電場や磁場などにより制御可能であるので、電子ビーム又は電磁波を制御することにより蛍光部材内の任意の場所に微小光源を励起させることができ、2次元走査などが可能になる。なお、上記の光の回折限界を超えた分解能の近接場（ニアフィールド）情報を高速で取得可能な走査型の光学顕微鏡は、本発明者等が開発したものである（特願2008-146335）。実施形態 2 に係る光学顕微鏡では、その走査型の光学顕微鏡の蛍光薄膜 13 が改良されている。

[0044] 微小光源の大きさは、微小光源の形状が球状（略球状を含む）であれば、直径が可視光波長未満であり、微小光源の形状が球形以外であれば、最短軸の長さが可視光波長未満である。微小光源と試料 30 との相互作用により生成された光は、対物レンズ 21 を通して光検出器 22 で検出される。即ち、可視光波長未満の大きさの微小光源により、光源周辺の試料 30（測定対象物）の近接場効果が測定され、測定対象物により近接場効果の影響を受けた光は光検出器 22 により検出される。これにより測定対象物の可視光波長未

満の近接場効果が観察される。対物レンズ 2 1 からの光により光検出器 2 2 で生成された信号は、信号記録部 2 3 で記録される。

[0045] 以上説明した通り、電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される蛍光薄膜により、光の回折限界を超えた分解能の近接場情報を高速で取得可能な光学顕微鏡の実現が可能である。本実施の形態に係る光学顕微鏡は、光の回折限界を超えた分解能の近接場情報を高速で取得可能である。このため、近接場光を用いて生きた生物試料を実時間で観察でき、ナノメートルオーダーの空間分解能を有する実時間・ナノイメージング手法を実現することができる。実時間で観察可能な高分解能を実現することによって、分子・たんぱく質レベルでの機能解析から細胞・臓器レベルでの機能解析まで、統一的な観察を行うことが可能となる。

[0046] 本実施の形態に係る光学顕微鏡は、小さな領域に照射可能な電子ビーム又は電磁波を用いて、蛍光薄膜内に微小光源を励起できるため、可視光波長未満の大きさの微小光源を生成できる。また、可視光波長未満の大きさの微小光源を用いているため、ナノメートルオーダーの近接場情報が収集可能である。微小光源の励起に電子ビーム又は電磁波を用いているため制御が容易であり、高速スキャンが可能であるので、高速に近接場（ニアフィールド）の画像を得ることができる。

[0047] 走査型電子顕微鏡は、既に確立された技術であり、10 nm以下の領域に電子を集光することと、高速に走査することが可能である。したがって、電子顕微鏡の技術を光励起に応用することによって、10 nm以下のスポット持ち且つ高速に走査可能な微小光源を実現することが可能となる。また、蛍光薄膜に含まれる蛍光物質として、様々な発光波長、偏光特性などを有する材料を選択することによって、分光計測、偏光計測など高機能化を実現できる。

[0048] 蛍光薄膜上に生じた微小光源は、近接場光学顕微鏡において、微小開口によって生じたエバネッセント波を利用して試料を照明することと原理的に全く同等である。試料と蛍光薄膜の距離が十分小さい場合、電子線励起によっ

て生じた微小蛍光光源のエバネッセント波で試料を観察することができ、回折限界を超えた分解能を実現することが可能となる。電子線によって微小光源を実現するため、観察系は走査による光の変化を検出するシステムとなる。したがって、既にこれまでに開発されてきた光学顕微鏡の光学系を検出システムに応用することによって、高い空間分解能と多くの機能を持つ検出システムを構築することが可能である。

[0049] さらに、実施形態 1 に係る蛍光薄膜は、共有結合により基板と蛍光物質とが結合されているため、蛍光薄膜上に生物試料を載せたり水で洗い流しても、蛍光物質が溶け出したり遊離したりしない。生きた状態の生物試料は大気中や水中という条件下で観察しなければならないので、生きた試料の観測の際には有効である。また、実施形態 1 に係る蛍光薄膜は、基板の真空側（電子ビーム又は電磁波発生器側）に形成しても試料側に形成しても良いが、試料側に形成すれば微小光源と試料との距離をより近づけられ、ニアフィールド効果が観測しやすい。

[0050] また、実施形態 1 に係る蛍光薄膜では、薄膜状になった量子ドットの上に細胞を培養して、観察試料としてもよい。量子ドットを有する蛍光薄膜と細胞間の距離が短くできるので、分解能の低下が生じ難い。特に、量子ドットを有する蛍光薄膜に接着している細胞の細胞膜部分は、薄膜間距離が数十 nm 以下になるので、更に高い分解能を得ることができる。また、細胞培養や観察に用いる培養液は電気伝導性であるため、金属蒸着膜は不要になり、蛍光薄膜と試料との距離を更に近づけることが可能となる。

[0051] なお、量子ドットの材質や細胞の種類によっては、量子ドットを有する蛍光薄膜上に細胞が生育しない場合も予想される。このような場合であっても、蛍光薄膜上にポリスチロール樹脂（細胞培養フラスコなどに使用されるプラスチック）やコラーゲン、ポリリジン、フィブロネクチンなどを、スピンコーティングなどにより数十 nm 程度の厚さにコートすればよい。これらは、いずれも難接着性や難培養性の細胞を培養する場合に、培養フラスコにコーティングされる材料である。

[0052] 以上、本発明の実施形態の一例を説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、特許請求の範囲に記載された技術的思想の範疇において各種の変更が可能であることは言うまでもない。

請求の範囲

- [請求項1] 電子ビーム又は電磁波の照射により可視光の波長未満の大きさの微小光源が励起される蛍光薄膜であって、
- 基板と、
- 前記基板の表面に共有結合により結合された蛍光物質を含み且つ可視光の波長未満の膜厚を有する蛍光層と、
- を含む蛍光薄膜。
- [請求項2] 基板と、前記基板の表面に共有結合により結合された蛍光物質を含み且つ可視光の波長未満の膜厚を有する蛍光層と、を含む蛍光薄膜と、
- 、
- 電子ビーム又は電磁波を発生する電子ビーム又は電磁波発生部と、
- 前記電子ビーム又は電磁波発生部で発生した電子ビーム又は電磁波を制御して前記蛍光薄膜に照射し、前記蛍光薄膜に可視光の波長未満の大きさの微小光源を励起させる電子ビーム又は電磁波制御部と、
- を含む微小光源励起装置。
- [請求項3] 基板と、前記基板の表面に共有結合により結合された蛍光物質を含み且つ可視光の波長未満の膜厚を有する蛍光層と、を含む蛍光薄膜と、
- 、
- 電子ビーム又は電磁波を発生する電子ビーム又は電磁波発生部と、
- 前記電子ビーム又は電磁波発生部で発生した電子ビーム又は電磁波を制御して前記蛍光薄膜に照射し、前記蛍光薄膜に可視光の波長未満の大きさの微小光源を励起させる電子ビーム又は電磁波制御部と、
- 前記微小光源で発生して前記測定対象物に作用した測定光を検出する光検出部と、
- を含む光学顕微鏡。
- [請求項4] 前記蛍光物質は、量子ドットである、
- 請求項 1 に記載の蛍光薄膜。
- [請求項5] 前記蛍光層は、単層又は数層の前記蛍光物質の層からなる、

請求項 1 又は請求項 4 に記載の蛍光薄膜。

[請求項6] 前記蛍光層の上に、更に第 1 の金属蒸着層を有する、
請求項 1、4、及び 5 のいずれか 1 項に記載の蛍光薄膜。

[請求項7] 前記基板は、ガラス基板、酸化シリコン基板又は窒化シリコン基板
である、

請求項 1 及び請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の蛍光薄膜。

[請求項8] 前記基板の表面に、更に第 2 の金属蒸着層を有し、
前記第 2 の金属蒸着層の上に、前記蛍光層を有する、
請求項 1 及び請求項 4～7 のいずれか 1 項に記載の蛍光薄膜。

[請求項9] 前記蛍光物質は、電子ビーム又は波長 200 nm 以下の電磁波によ
り励起可能である、

請求項 1 及び請求項 4～8 のいずれか 1 項に記載の蛍光薄膜。

[請求項10] 請求項 1 及び請求項 4～9 のいずれか 1 項に記載の蛍光薄膜を製造
する蛍光薄膜の製造方法であって、

蛍光物質に、第 1 官能基を導入するステップと、

基板に、前記第 1 官能基と共有結合を形成する第 2 官能基を導入す
るステップと、

前記蛍光物質に導入された前記第 1 官能基と前記基板に導入された
前記第 2 官能基との反応により、前記基板の表面に共有結合により蛍
光物質を結合するステップと、

を含む蛍光薄膜の製造方法。

[請求項11] 前記第 1 官能基は、カルボキシ基、アミノ基、チオール基又はエ
ポキシ基であり、

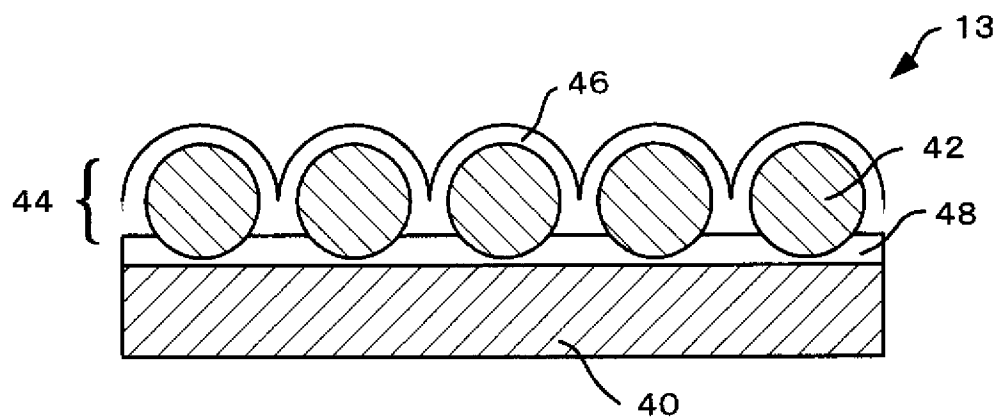
前記第 2 官能基は、前記第 1 官能基と共有結合を形成する官能基で
ある、

請求項 10 に記載の蛍光薄膜の製造方法。

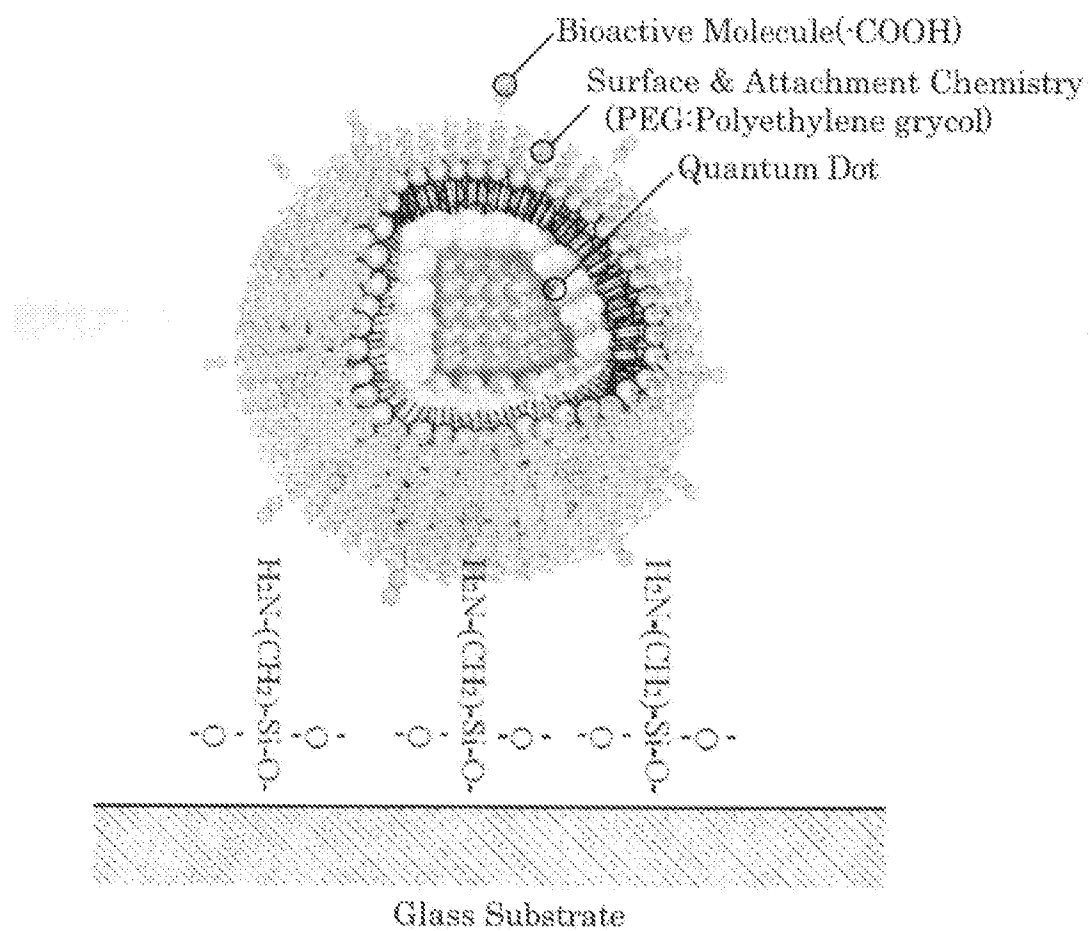
[請求項12] 前記蛍光層の表面に前記第 1 の金属蒸着層を形成するステップを更
に含む、

請求項 1 0 又は請求項 1 1 記載の蛍光薄膜の製造方法。

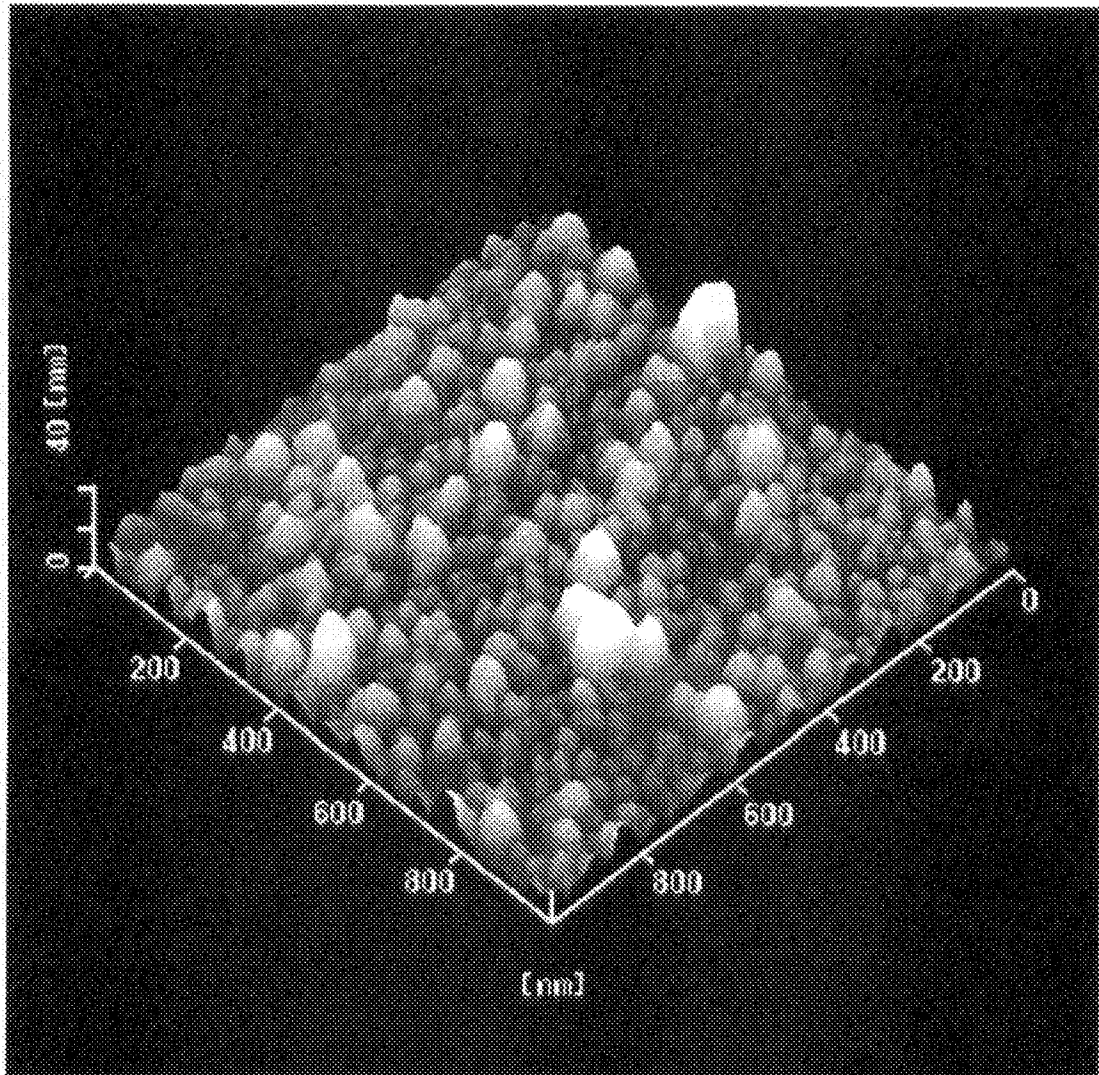
[図1]



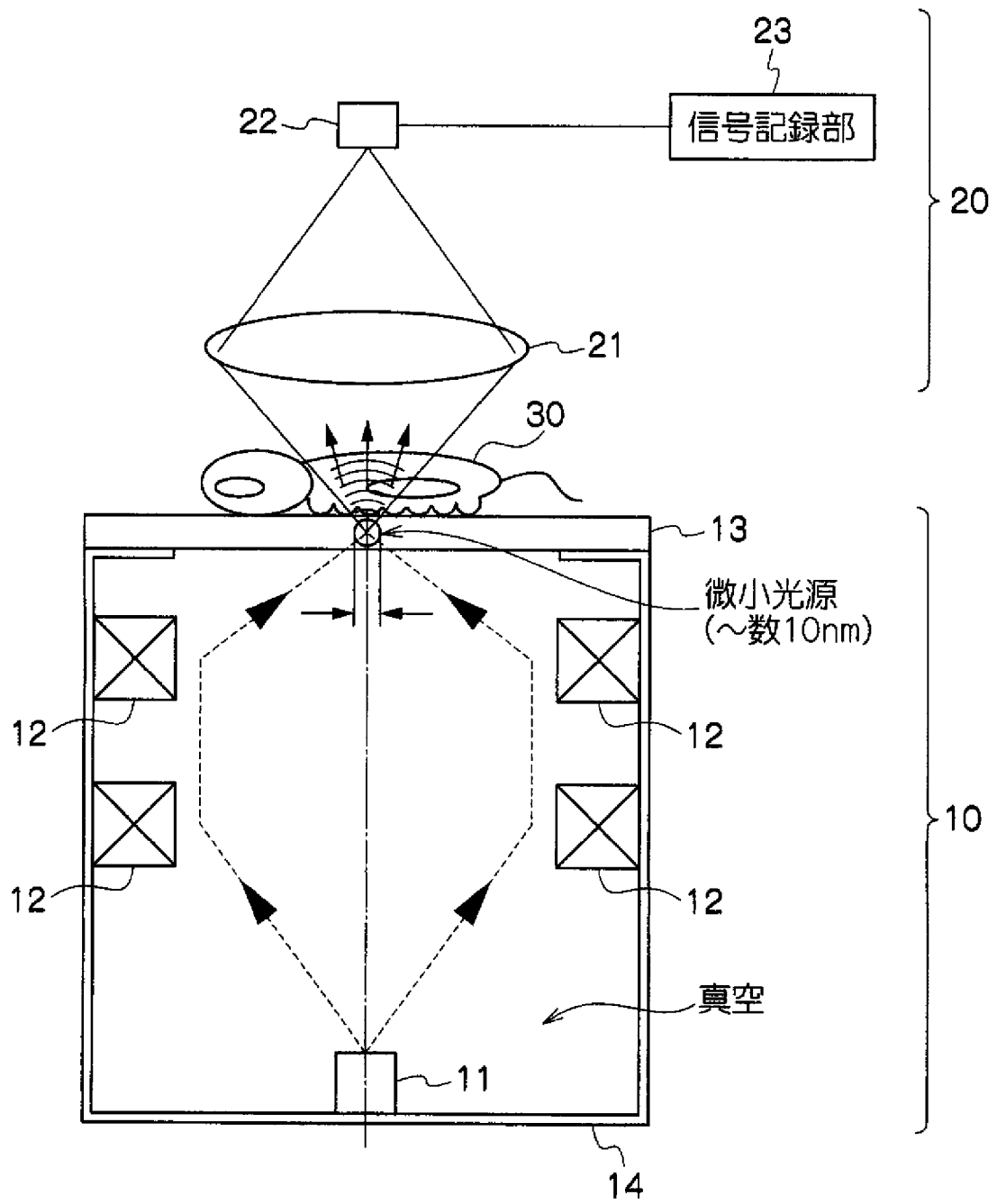
[図2]



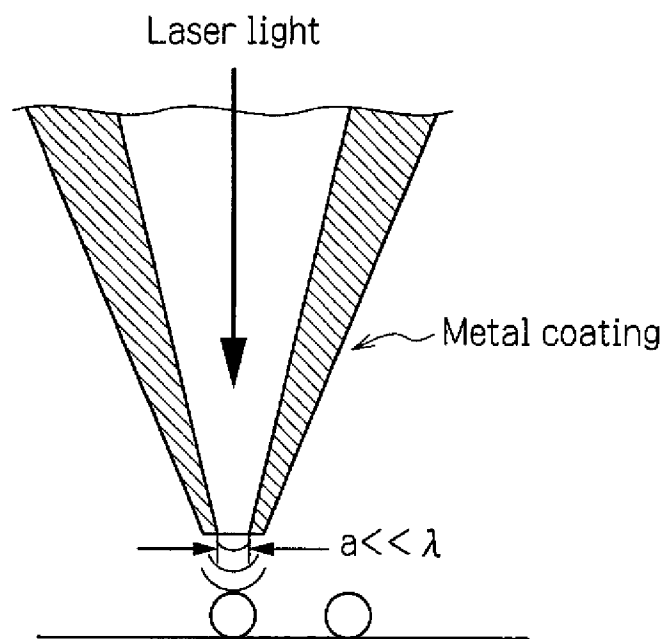
[図3]



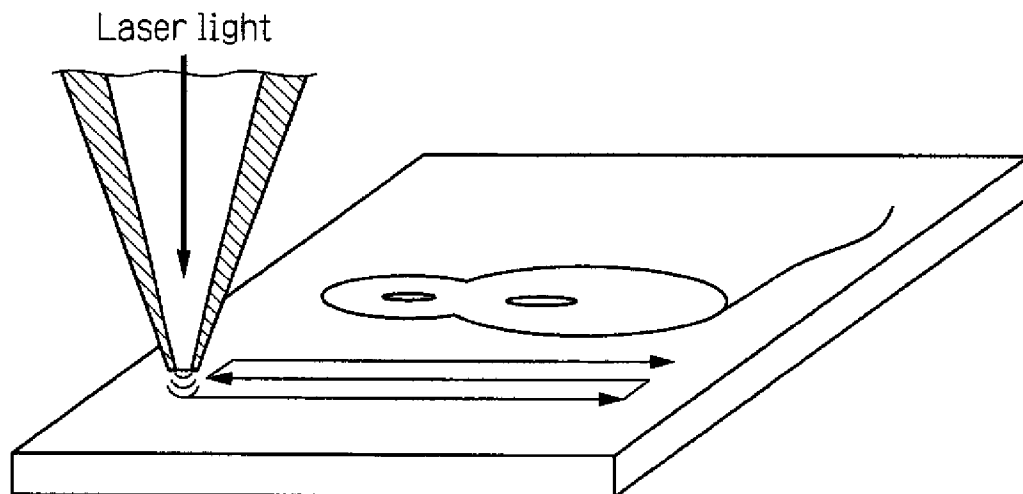
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/055450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01Q60/20(2010.01)i, G01Q80/00(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, G02B21/00

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 1996-2010

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

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.
Y	Yoshimasa KAWADA, "Shizuoka Daigaku tonon Renkei ni yoru Shin Gijutsu Setsumeikai 1. Nanoscale no Bunkaino o Motsu Kogaku Kenbikyō", [online], 06 June 2008 (06.06.2008), [retrieval date 11 June 2008 (11.06.2008)], Internet<URL:http://jstshingi.jp/abst/p/08/805/shizuoka1.pdf>	1-12
Y	JP 2006-282977 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 19 October 2006 (19.10.2006), paragraphs [0044], [0079] to [0085] & US 2008/0213558 A1 & WO 2006/095633 A1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 June, 2010 (11.06.10)Date of mailing of the international search report
22 June, 2010 (22.06.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/055450

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 10-160447 A (Samsung Display Devices Co., Ltd.), 19 June 1998 (19.06.1998), paragraph [0002] & US 5811701 A & GB 2319613 A & GB 9705886 A0 & DE 19712821 A & CN 1182203 A & MX 9702140 A	6, 8, 12
Y	JP 3-234789 A (Nichia Chemical Industries, Ltd.), 18 October 1991 (18.10.1991), page 2, lower left column, line 17 to page 3, upper right column, line 14 (Family: none)	6, 8, 12

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01Q60/20(2010.01)i, G01Q80/00(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（I P C））

Int.Cl. G01Q10/00-90/00
G02B21/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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
Y	川田善正, 静岡大学との連携による新技術説明会 1. ナノスケールの分解能をもつ光学顕微鏡, [online], 2008.06.06, [検索日 2010.06.11], インターネット <URL:http://jstshingi.jp/abst/p/08/805/shizuoka1.pdf>	1-12
Y	JP 2006-282977 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2006.10.19, 【0044】、【0079】 - 【0085】 & US 2008/0213558 A1 & WO 2006/095633 A1	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 6 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 6 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

福田 裕司

2 J

4 6 3 5

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

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
Y	JP 10-160447 A (三星電管株式會社) 1998.06.19, 【0002】 & US 5811701 A & GB 2319613 A & GB 9705886 A0 & DE 19712821 A & CN 1182203 A & MX 9702140 A	6, 8, 12
Y	JP 3-234789 A (日亜化学工業株式会社) 1991.10.18, 第2頁左下欄第17行ー第3頁右上欄第14行 (ファミリーなし)	6, 8, 12