

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/164332

発行日 平成31年2月28日 (2019. 2. 28)

(43) 国際公開日 平成29年9月28日 (2017. 9. 28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G02B 21/06 (2006.01)	G02B 21/06	2G043
G02B 21/36 (2006.01)	G02B 21/36	2G054
G01N 21/76 (2006.01)	G01N 21/76	2H052
G01N 21/63 (2006.01)	G01N 21/63	Z 4B029
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34	B 4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

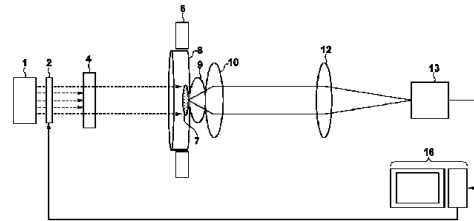
出願番号 特願2018-507415 (P2018-507415)	(71) 出願人 503360115 国立研究開発法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/011837	
(22) 国際出願日 平成29年3月23日 (2017. 3. 23)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-58946 (P2016-58946)	(74) 代理人 100076428 弁理士 大塚 康德
(32) 優先日 平成28年3月23日 (2016. 3. 23)	(74) 代理人 100115071 弁理士 大塚 康弘
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100112508 弁理士 高柳 司郎
	(74) 代理人 100116894 弁理士 木村 秀二
	(74) 代理人 100130409 弁理士 下山 治
	(74) 代理人 100134175 弁理士 永川 行光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体試料を生存状態で観察する顕微鏡および方法

(57) 【要約】

化学発光を生成する化学発光物質を含む生体試料を生存状態で顕微鏡により観察する。前記顕微鏡は、前記化学発光の状態を変化させる制御光を射出する光源と、前記生体試料の観察面に照射される前記制御光の照射パターンを画定する画定部と、前記生体試料から射出された前記化学発光を検出する検出器と、を備える。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生体試料を生存状態で観察するための顕微鏡であって、
前記生体試料は、化学発光を生成する化学発光物質を含み、
前記顕微鏡は、
前記化学発光の状態を変化させる制御光を射出する光源と、
前記生体試料の観察面に照射される前記制御光の照射パターンを画定する画定部と、
前記生体試料から射出された前記化学発光を検出する検出器と、
を備えることを特徴とする顕微鏡。

【請求項 2】

前記制御光は、その照射により前記化学発光の生成を抑制し、
前記画定部は、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記制御光を照射せずに、前記第 1 領域を取り囲む第 2 領域に前記制御光を照射するように、前記制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 3】

前記制御光は、その照射により前記化学発光の生成を促進し、
前記画定部は、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記制御光を照射するように、前記制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 4】

前記制御光は、照射により前記化学発光の生成を促進する第 1 制御光と、照射により前記化学発光の生成を抑制する第 2 制御光とを含み、
前記画定部は、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記第 1 制御光を照射し、前記第 1 領域を取り囲む第 2 領域に前記第 2 制御光を照射するように、前記第 1 制御光および前記第 2 制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 5】

前記制御光は、その照射により前記化学発光の波長を第 1 波長から第 2 波長に変化させ、
前記画定部は、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記制御光を照射するように、前記制御光の照射パターンを画定し、
前記検出器は、前記第 1 波長の光を透過させずに前記第 2 波長の光を透過させるフィルタを介して、前記生体試料から射出された前記化学発光を検出することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 6】

前記画定部は、前記観察面に複数の前記第 1 領域を形成するように前記制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 2 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 7】

前記検出器の検出結果を処理して前記化学発光の画像を生成する処理部を更に備えることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 8】

前記検出器の検出結果を処理する処理部を更に備え、
前記画定部は、前記生体試料の観察面に照射される前記制御光の照射パターンを第 1 パターンに画定し、
前記検出器は、前記生体試料の周波数成分と前記第 1 パターンの周波数成分との相互作用により前記観察面に形成された第 2 パターンを検出し、
前記処理部は、前記第 1 パターンの周波数成分と前記第 2 パターンの周波数成分とに基づいて前記生体試料の周波数成分を求めることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 9】

前記第 1 パターンは、縞状のパターンを含み、

10

20

30

40

50

前記第 2 パターンは、前記生体試料の周波数成分と前記第 1 パターンの周波数成分との相互干渉により得られるモアレを含むことを特徴とする請求項 8 に記載の顕微鏡。

【請求項 10】

前記制御光は、 1 W/cm^2 以下の強度を有することを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 11】

前記生体試料を刺激する刺激光を射出する第 2 の光源をさらに備えることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 12】

前記化学発光物質は、発光基質と、発光酵素および蛍光タンパク質を含み前記発光基質と協働して前記化学発光を生成する自発光タンパク質融合体と、前記発光酵素と結合され、前記制御光の照明の有無に応じて前記化学発光を制御する発光制御部分と、を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

10

【請求項 13】

前記自発光タンパク質融合体は、化学発光反応を発生させる第 1 の立体構造と、前記化学発光反応の発生が抑制される第 2 の立体構造とをとることができ、

前記制御光は、前記自発光タンパク質融合体の立体構造を前記第 1 の立体構造から前記第 2 の立体構造に変化させることを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡。

【請求項 14】

前記発光制御部分は、フォトリピンの Light-oxygen-voltage-sensing ドメイン 2 (LOV2 ドメイン)、前記 LOV2 ドメインの変異体である LOV2 - I427V、BLUF タンパク質の AppA ドメイン (1 - 133)、BLUF タンパク質の PapB ドメイン (1 - 147)、または、BLUF タンパク質の YcgF ドメイン (1 - 97) を含むことを特徴とする請求項 12 又は 13 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

20

【請求項 15】

前記自発光タンパク質融合体は、イエロ - ナノランタン、シアン - ナノランタン、オレンジ - ナノランタン、グリーン - ナノランタン、および、レッド - ナノランタンの少なくとも 1 つを含むことを特徴とする請求項 12 乃至 14 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 16】

前記生体試料に前記発光基質を添加する添加部をさらに含むことを特徴とする請求項 12 乃至 15 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

30

【請求項 17】

前記画定部は、Vortex 位相板、空間光変調器、または、前記制御光を遮断する材料が部分的に塗布された透明板であることを特徴とする請求項 1 乃至 16 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 18】

前記生体試料を保持する保持部と、

前記光源から射出された前記制御光の前記画定部への入射をオンオフするシャッターと、前記保持部と前記検出器との間に配置された対物レンズと、

をさらに備えることを特徴とする請求項 1 乃至 17 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

40

【請求項 19】

前記検出器は、前記生体試料の前記画定部の側とは反対の側の前記観察面から射出された前記化学発光を検出することを特徴とする請求項 18 に記載の顕微鏡。

【請求項 20】

前記光源と前記保持部との間に配置され、前記光源から射出された前記制御光を前記保持部に向けて導き、前記画定部の側の前記観察面から射出された前記化学発光を前記検出器に向けて導くビームスプリッタをさらに備えることを特徴とする請求項 18 に記載の顕微鏡。

【請求項 21】

前記保持部は、前記制御光の光路と直交する方向に前記画定部に対して移動可能である

50

ことを特徴とする請求項 18 乃至 20 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 22】

前記制御光は、1 光子吸収の 380 ~ 480 nm の波長または 2 光子吸収の 850 ~ 940 nm の波長を有することを特徴とする請求項 1 乃至 21 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 23】

前記生体試料は、互いに異なる波長の複数の化学発光をそれぞれ生成する複数種類の化学発光物質を含み、

前記検出器は、前記複数の化学発光を検出することを特徴とする請求項 1 乃至 22 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

10

【請求項 24】

前記複数の化学発光を波長に基づいて分離する波長フィルタをさらに備え、

前記検出器は、前記波長フィルタによって分離された前記複数の化学発光のそれぞれを検出することを特徴とする請求項 23 に記載の顕微鏡。

【請求項 25】

生体試料を生存状態で観察する方法であって、

発光酵素および蛍光タンパク質を含み発光基質と協働して化学発光を生成する自発光タンパク質融合体と、前記発光酵素と結合され、前記化学発光の状態を変化させる制御光の照明の有無に応じて前記化学発光を制御する発光制御部分と、を含む前記生体試料に前記発光基質を添加する添加工程と、

20

前記制御光の照射パターンを画定し、前記照射パターンに画定された前記制御光で前記生体試料を照明する照明工程と、

前記生体試料から射出される前記化学発光を検出する検出工程と、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 26】

前記制御光は、その照射により前記化学発光の生成を抑制し、

前記照明工程では、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記制御光を照射せずに、前記第 1 領域を取り囲む第 2 領域に前記制御光を照射するように、前記制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記制御光は、その照射により前記化学発光の生成を促進し、

前記照明工程では、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記制御光を照射するように、前記制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記制御光は、照射により前記化学発光の生成を促進する第 1 制御光と、照射により前記化学発光の生成を抑制する第 2 制御光とを含み、

前記照明工程では、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記第 1 制御光を照射し、前記第 1 領域を取り囲む第 2 領域に前記第 2 制御光を照射するように、前記第 1 制御光および前記第 2 制御光の照射パターンを画定することを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記制御光は、その照射により前記化学発光の波長を第 1 波長から第 2 波長に変化させ、

前記照明工程では、前記生体試料の観察面のうち前記化学発光を検出すべき第 1 領域に前記制御光を照射するように、前記制御光の照射パターンを画定し、

前記検出工程では、前記第 1 波長の光を透過させずに前記第 2 波長の光を透過させるフィルタを介して、前記生体試料から射出された前記化学発光を検出することを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

50

前記照明工程では、前記生体試料の観察面に照射される前記制御光の照射パターンを第1パターンに画定し、

前記検出工程では、前記生体試料の周波数成分と前記第1パターンの周波数成分との相互作用により前記観察面に形成された第2パターンを検出し、前記第1パターンの周波数成分と前記第2パターンの周波数成分とに基づいて前記生体試料の周波数成分を求めることを特徴とする請求項25に記載の方法。

【請求項31】

前記制御光の光路に直交する方向における前記生体試料の位置を変更する変更工程を含み、

前記変更工程の後、前記照明工程および前記検出工程をその順序で繰り返し行うことを特徴とする請求項25乃至30のいずれか1項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体試料を生存状態で観察する顕微鏡および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、試料中に含まれる物質から生成される発光を、顕微鏡を用いて観察することが行われてきた。例えば、従来の蛍光顕微鏡では、試料に紫外線やX線や可視光線を照射して試料中の物質を励起させ、励起状態の物質が基底状態に戻るときに放出する蛍光を検出することによって試料を観察する。したがって、従来の蛍光顕微鏡では、試料中の物質を励起させるための励起光の光源を必要とする。

20

【0003】

近年では、励起光源を必要としない顕微鏡も出現している。このタイプの顕微鏡は、励起光源からの光照射を受けることなく、試料中に含まれる物質によって生成される化学発光を検出する。特許文献1には、700nm、強度400mWのイレーズ光を試料である鉄道虫の観察領域外に照射して当該観察領域外での化学発光の発生を抑制することによって、鉄道虫の観察領域から生成された化学発光を顕微鏡によって高感度で検出することが開示されている。

【先行技術文献】

30

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2008-57997号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

特許文献1記載の化学発光を観察する顕微鏡は、励起光源を必要としないので、構造が簡素で低コストで入手可能である。しかし、特許文献1記載の顕微鏡は、観察領域外からの化学発光を抑制するために、細胞が瞬時に死んでしまうほど高い強度照度でイレーズ光を照射するので、細胞を生存状態で観察することはできない。例えば、神経細胞の活動を、当該細胞を構成している多数のタンパク質分子のうちどのタンパク質分子がどのように反応するのかを観察したい場合、当然に細胞を生存状態で観察することが求められる。

40

【0006】

そこで、本発明は、生体試料を生存状態で高感度かつ低コストで観察することが可能な顕微鏡、方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第1の側面は、生体試料を生存状態で観察するための顕微鏡であって、前記生体試料は、化学発光を生成する化学発光物質を含み、前記顕微鏡は、前記化学発光の状態を変化させる制御光を射出する光源と、前記生体試料の観察面に照射される前記制御光の

50

照射パターンを画定する画定部と、前記生体試料から射出された前記化学発光を検出する検出器と、を備えることを特徴とする。

【0008】

また、本発明の第2の側面は、生体試料を生存状態で観察する方法であって、発光酵素および蛍光タンパク質を含み発光基質と協働して化学発光を生成する自発光タンパク質融合体と、前記発光酵素と結合され、前記化学発光の状態を変化させる制御光の照明の有無に応じて前記化学発光を制御する発光制御部分と、を含む前記生体試料に前記発光基質を添加する添加工程と、前記制御光の照射パターンを画定し、前記照射パターンに画定された前記制御光で前記生体試料を照明する照明工程と、前記生体試料から射出される前記化学発光を検出する検出工程と、を含むことを特徴とする。

10

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、生体試料を生存状態で高感度かつ低コストで観察することが可能な顕微鏡、方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】実施例1の顕微鏡を示す図。

【図2】実施例2の顕微鏡を示す図。

【図3】本発明に係る観察方法を説明するフローチャート。

【図4】化学発光物質を説明する図。

20

【図5】制御光の作用を説明する図。

【図6A】ネガティブ型の化学発光物質を説明する図。

【図6B】デカップル型の化学発光物質を説明する図。

【図7】光変換型の化学発光物質を説明する図。

【図8】生体試料の観察面に制御光を照射した例を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0011】

<第1実施形態>

以下、図面を用いて本発明の第1実施形態を説明する。

【0012】

30

[化学発光物質]

細胞等の生体試料の中に含まれ化学発光を生成する化学発光物質について説明する。本実施形態で使用される化学発光物質20は、制御光の照射により化学発光の状態が変化する特性を有しており、図4に示されるように、発光基質(ルシフェリン)25と、発光基質25と協働して化学発光を生成する自発光タンパク質融合体24とを含む。自発光タンパク質融合体24は、蛍光タンパク質21と発光酵素(ルシフェラーゼ)22とを含む。発光酵素22が発光基質25の化学反応(酸化)を触媒することで化学発光が発生する。発光酵素22の発光量子収率よりも蛍光タンパク質21の蛍光量子収率が高ければ、発光酵素22と蛍光タンパク質21との間のフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)により化学発光の光強度が増加する。そこで、発光酵素22と蛍光タンパク質21との自発光タンパク質融合体24は、高い光強度の化学発光を生成するナノスケールの光源という意味を込めて、ナノランタン(Nano-lantern)と呼ばれる。

40

【0013】

本実施形態において、自発光タンパク質融合体(ナノランタン)24として、互いに生成する化学発光の波長(色)が異なる、イエロ-ナノランタン、シアン-ナノランタン、オレンジ-ナノランタン、グリーン-ナノランタン、レッド-ナノランタン、および、それらの改変体の少なくとも1つを使用することができる。互いに色が異なる複数の自発光タンパク質融合体(ナノランタン)24を使用すれば、細胞中の複数の種類のタンパク質の挙動を同時に観察可能である。例えば、万能細胞(ES細胞)の万能性維持に重要な3つの遺伝子の発現の様子を同時に観察することが可能となる。

50

【 0 0 1 4 】

発光制御部分 2 3 は、制御光が照射されていない状態（図 4 の状態 4 1）では、自発光タンパク質融合体 2 4 に化学発光反応を発生させる第 1 の立体構造をとらせる。一方、発光制御部分 2 3 は、制御光が照射されている状態（図 4 の状態 4 2）では、自発光タンパク質融合体 2 4 に化学発光反応の発生が抑制される第 2 の立体構造をとらせる。すなわち、発光制御部分 2 3 は、制御光の照明の有無に応じて化学発光を制御する。本実施形態では、制御光として、1 光子吸収の 3 8 0 ~ 4 8 0 n m の波長を有する青色の光または 2 光子吸収の 8 5 0 ~ 9 5 0 n m の波長を有する光を使用する。自発光タンパク質融合体 2 4 に制御光の青色光を照射すれば、発光基質 2 5 が存在していても化学発光反応の発生が抑制される状態 4 2 となり、青色光の照射が停止されれば、自発光タンパク質融合体 2 4 は、熱緩和によって状態 4 1 に復帰される。発光制御部分 2 3 は、例えば、フォトリポソムの Light-oxygen-voltage-sensing ドメイン 2（LOV2 ドメイン）、LOV2 ドメインの変異体である LOV2 - I 4 2 7 V、BLUF タンパク質の AppA ドメイン（1 - 1 3 3）、BLUF タンパク質の PapB ドメイン（1 - 1 4 7）、BLUF タンパク質の YcgF ドメイン（1 - 9 7）である。

10

【 0 0 1 5 】

〔制御光〕

化学発光物質 2 0 の化学発光、すなわち、自発光タンパク質融合体 2 4 と発光基質 2 5 との協働による化学発光を制御する制御光の作用について説明する。生体試料の観察面を、図 5 の 5 1 のように、化学発光の生成を許容する第 1 領域 7 a と化学発光の生成を抑制する第 2 領域 7 b とに分ける。第 1 領域 7 a には、化学発光の生成を抑制する制御光は照射されない。一方、第 2 領域 7 b には、化学発光の生成を抑制するために制御光が照射される。制御光は、第 1 領域 7 a を取り囲むドーナツ形状の第 2 領域 7 b のみに照射されるドーナツ光である。

20

【 0 0 1 6 】

図 5 の 5 2 に示されるように、第 1 領域 7 a から化学発光が射出され、第 1 領域 7 a を取り囲む第 2 領域 7 b からは化学発光が抑制される。もし、制御光を使用しない場合には、観察面全体すなわち第 1 領域 7 a および第 2 領域 7 b の双方から化学発光が射出されるので、顕微鏡で生体試料 7 の観察面を観察すると化学発光の強度は、5 3 の点線で示されるように、ブロードに分布する。一方、第 2 領域 7 b のみに制御光を照射する場合には、第 1 領域 7 a 内の化学発光のみが主として観察されるので、化学発光の強度は、5 3 の実線で示されるように、シャープに分布する。したがって、制御光を使用することで化学発光のコントラストが増大して検出感度が向上する。化学発光が生成する第 1 領域 7 a の位置を変えて化学発光を検出することを繰り返して大量の画像を撮り、これらを重ね合わせることで観察面全体の画像が得られる。

30

【 0 0 1 7 】

図 5 は、制御光が照射されない第 1 領域 7 a の数が 1 つの例を示している。しかし、制御光が照射されない第 1 領域 7 a の数を複数とすると、複数の第 1 領域 7 a からの複数の化学発光を同時に検出し得るので、効率的である。このように、複数の第 1 領域 7 a からの複数の化学発光を同時に検出する場合でも、隣接し合う 2 つの化学発光を生成する領域同士は十分に離れているので、化学発光を生成する複数の領域それぞれについて、精密に位置を確定することができる。観察面全体における第 1 領域 7 a と第 2 領域 7 b との分布は、制御光の照明形状を画定する後述の画定部 4 によって決定される。第 1 領域 7 a の径は、例えば、顕微鏡の光学系の NA を 1 とするとき、制御光の波長の半分程度とすることができる。本実施形態では、第 1 領域 7 a の径を 5 0 n m 程度、第 2 領域 7 b の径を 2 5 0 n m 程度としている。

40

【 0 0 1 8 】

本実施形態では、化学発光物質として、蛍光タンパク質 2 1 と発光酵素 2 2 との自発光タンパク質融合体 2 4 と、LOV2 ドメイン、LOV2 ドメインの変異体等の発光制御部分 2 3 と、を含むものを使用する。そのため、1 W / c m ² 以下、好ましくは 1 8 m W /

50

$\text{cm}^2 \sim 1 \text{ W} / \text{cm}^2$ という微弱な制御光を使用して化学発光を制御することができる。したがって、 $\text{KW} / \text{cm}^2 \sim \text{GW} / \text{cm}^2$ レベルという生体試料 7 が瞬時に死んでしまうほど高強度のイレーズ光を使用する特許文献 1 に記載の顕微鏡と比べると、生体試料 7 を損傷する度合いがはるかに小さいので、生体試料 7 を生存状態で観察することが可能である。制御光として、1 光子吸収の $380 \sim 480 \text{ nm}$ の波長を有する青色光または 2 光子吸収の $850 \sim 940 \text{ nm}$ の波長を有する光を使用する。

【0019】

[顕微鏡]

生体試料 7 を生存状態で観察するための顕微鏡について説明する。

【0020】

実施例 1

図 1 は、実施例 1 の顕微鏡を示す。光源 1 は、生体試料 7 に含まれる化学発光物質 20 からの化学発光の生成を抑制する制御光を射出する。制御光の強度は、 $1 \text{ W} / \text{cm}^2$ 以下と微弱なので生体試料 7 を損傷する度合いがわずかであり、観察対象の生体試料 7 を生存状態で観察することが可能である。シャッタ 2 は、生体試料 7 に対する制御光の入射をオンオフする。画定部 4 は、生体試料 7 の観察面のうちで、化学発光の生成を許容して化学発光物質 20 からの化学発光を検出すべき第 1 領域 7 a に制御光を照射せずに、第 1 領域 7 a を取り囲み化学発光の生成を抑制する第 2 領域 7 b に制御光を照射するように、制御光の照明形状（照射パターン）を画定する。制御光は画定部 4 によってドーナツ形状のドーナツ光にされる。画定部 4 として、例えば、V o l t e x 位相板（ラセン型位相板）、空間光変調器、または、制御光を遮断する材料が第 1 領域 7 a に対応する部分に塗布された透明板を使用し得る。

【0021】

生体試料 7 は、ディッシュ 8 の中に格納される。ディッシュ 8 内の生体試料 7 の画定部 4 の側とは反対の側（図 1 の右側）の観察面の第 1 領域 7 a から化学発光が検出器 13 に向けて射出される。生体試料 7 を格納したディッシュ 8 は、ステージ（保持台）6 に保持される。ステージ 6 は、制御光の光路と直交する方向（図 1 の紙面上下方向）に画定部 4 に対して移動可能に設けられている。したがって、ステージ 6 を図 1 の紙面上下方向に少し移動して、制御光の照射と化学発光の検出とを繰り返すことで、生体試料 7 の観察面の全領域を観察することができる。

【0022】

図示されていないが、顕微鏡は、ステージ 6 に保持されているディッシュ 8 内の生体試料 7 に発光基質 25 を添加する添加部を備えている。添加部は、発光基質 25 を生体試料 7 に滴下するか、または、発光基質 25 を生体試料 7 に灌流して導入する。顕微鏡の外部で発光基質 25 をディッシュ 8 内の生体試料 7 に添加し、発光基質 25 が添加された生体試料 7 が格納されたディッシュ 8 をステージ 6 に載置する場合には、発光基質 25 を添加する添加部を省略し得る。

【0023】

ステージ 6 と検出器 13 との間には、第 1 領域 7 a からの化学発光を平行光とする対物レンズ 10 と、平行光とされた化学発光を検出器 13 に集光する結像レンズ 12 と、が配置される。また、ステージ 6 に保持されているディッシュ 8 と対物レンズ 10 との間には、屈折率を調整するための屈折率マッチングオイル 9 が介在される。検出器 13 は、生体試料 7 の画定部 4 の側とは反対の側（図 1 の右側）の観察面の第 1 領域 7 a から射出された化学発光を検出する。画定部 4 が、2 次元的に配置された複数の第 1 領域 7 a を制御光により照明するように構成される場合、検出器 13 は、複数の化学発光を同時に検出するために、例えば、2 次元的に配置されたアレイ型検出器とされる。処理部（コンピュータ）16 は、検出器 13 から送られた検出結果を処理して化学発光の画像を生成する。

【0024】

実施例 2

図 2 は、実施例 2 の顕微鏡を示す。実施例 2 の顕微鏡は、実施例 1 の顕微鏡と基本構成

10

20

30

40

50

において共通するので、相違する以下の3つの構成だけを説明する。

【0025】

実施例1の顕微鏡では、制御光の光源1と化学発光を検出する検出器13とが、ステージ6を挟んで配置されていた。これに対し、実施例2の顕微鏡では、制御光の光源1と化学発光を検出する検出器13とが、図2に示されるように、ステージ6に対して同じ側(図2の紙面の下側)に配置される。したがって、制御光の光源1から生体試料7が格納されステージ6に保持されたディッシュ8に至る制御光の光路と、ディッシュ8内の生体試料7から検出器13に至る化学発光の光路とは、部分的に重なる。そこで、実施例2の顕微鏡は、制御光の光源1とステージ6との間に配置され、光源1から射出された制御光をステージ6に向けて導き、生体試料7の観察面から射出された化学発光を検出器13に向けて導くビームスプリッタ11をさらに備える。

10

【0026】

実施例1の顕微鏡では、生体試料7を刺激する刺激光を射出する光源を有していなかった。これに対し、実施例2の顕微鏡では、生体試料7を刺激する刺激光を射出する第2の光源14と、刺激光の照明形状を例えばパターン形状に画定する第2の画定部15をさらに備えている。例えば、光遺伝学を行う場合には、透過照明により、生体試料7の上面からパターン形状の刺激光を生体試料7に照射する。刺激光の光源14として、例えばLEDを用いることができる。刺激光の照射タイミングは、検出器13のデッドタイムとし、化学発光の検出中に刺激光が漏れないようにする。ここで、刺激光としては、波長および強度の少なくとも一方が制御光と異なる光が用いられうる。例えば、刺激光は、波長が400~600nmの範囲内、強度が0.01~1W/cm²の範囲内であるとよい。

20

【0027】

実施例1の顕微鏡では、1種類の化学発光物質20を含む生体試料7を観察した。これに対し、実施例2の顕微鏡では、互いに異なる波長の複数の化学発光をそれぞれ生成する複数種類の化学発光物質20を含む生体試料7を観察する。例えば、生体試料7は、イエロ-ナノランタン、シアン-ナノランタン、オレンジ-ナノランタン、グリーン-ナノランタン、および、レッド-ナノランタンの少なくとも2つを含む。複数の化学発光に対応するため、実施例2の顕微鏡は、複数の化学発光を波長に基づいて分離する波長フィルタ17をさらに備える。実施例2の顕微鏡では、検出器13は、波長フィルタ17によって分離された化学発光のそれぞれを検出する。生体試料7内の観察対象とする複数の種類のタンパク質のそれぞれに互いに色が異なる複数のナノランタン24を結合させ、かつ、実施例2の顕微鏡を使用すると、観察対象とする複数の種類のタンパク質の挙動を同時に観察可能である。

30

【0028】

[観察方法]

図3を用いて、図1に示される実施例1の顕微鏡を用いて生体試料7を生存状態で観察する方法を説明する。まず、ステップS1で、発光酵素および蛍光タンパク質を含み発光基質と協働して化学発光を生成する自発光タンパク質融合体と、制御光の照明の有無に応じて化学発光を制御する発光制御部分と、を含む生体試料7に発光基質を添加して生体試料7を準備する。ステップS1は、例えば以下のようなサブステップに区分され得る。

40

- ・サブステップ1：光スイッチング化学発光を発現する細胞、生体組織、個体などの生体試料7を作成する。
- ・サブステップ2：高開口数の対物レンズ観察に適した厚さのガラス製のディッシュ8上で生体試料7を培養する。
- ・サブステップ3：ディッシュ8内の培養が血清培地であれば、観察開始前に血清を取り除いた培地に交換する。

【0029】

次いで、ステップS2では、顕微鏡のステージ6に生体試料7が収容されたディッシュ8を搭載する。ステージ6は、細胞培養用のインキュベーション(培養)機能を備えていることが望ましい。ステップS3では、発光基質25、例えばセレンテラジンを生体試料

50

7に添加する(添加工程)。なお、発光基質25を顕微鏡外で、すなわち、ステップS1中で添加することも可能である。ステップS2またはステップS3の後、顕微鏡による観察の準備、例えば、明視野観察や蛍光観察で顕微鏡のフォーカスを調整したり、化学発光を観察するためのオートフォーカス装置を作動させたりする。本実施形態では、自発光タンパク質融合体(ナノラタン)24が、蛍光タンパク質21を含んでいるので蛍光観察が可能である。

【0030】

ステップS4では、生体試料7の観察面のうちで、化学発光の生成を許容する第1領域7aに制御光を照射せずに、第1領域7aを取り囲み化学発光の生成を抑制する第2領域7bに制御光を照射するようにして、制御光で生体試料7を照明する(照明工程)。制御光は、第1領域7aを取り囲む第2領域7bのみを照明するドーナツ形状の照明形状を有する。制御光は、発光制御部分23であるLOV2ドメインの構造変化を誘導する380~480nmの波長を有するシアン色(青色)の光である。なお、生体試料7に照射される制御光は、1光子吸収の380~480nmの波長を有するシアン色(青色)の光である必要はなく、2光子吸収の850~950nmの波長を有する光でもよい。

10

【0031】

ステップS5では、制御光による生体試料7の照明を停止する(停止工程)。ステップS6では、制御光による生体試料7の照明が遮断され、かつ、LOV2ドメインが回復していない状態で、生体試料7の第1領域7aから射出される化学発光を検出器13により検出する(検出工程)。なお、検出工程において、検出器13に対する制御光の入射が阻止されるのであれば、S5の停止工程を設ける必要はない。ステップS7では、ステージ6を制御光、化学発光の光路に直交する方向に移動して、生体試料7の位置、化学発光が射出される第1領域7aの位置を変更する(変更工程)。ステップS8では、ステップS4の照明工程、ステップS5の停止工程およびステップS6の検出工程をその順序で行い、生体試料7の異なる第1領域7aを観察する。そして、ステップS4の照明工程、ステップS5の停止工程およびステップS6の検出工程を生体試料7の多数の第1領域7aのそれぞれについて繰り返し行って、生体試料7の観察面の全領域に対する観察を行う。

20

【0032】

本実施形態では、制御光の照射により化学発光の生成が抑制される化学発光物質20を含む生体試料7を生存状態で観察する例を示した。このように制御光の照射により化学発光をオン/オフすることができる化学発光物質は光スイッチング型と呼ばれ、中でも、本実施形態で用いた化学発光物質20のように制御光の照射により化学発光の生成が抑制されるものはポジティブ型と呼ばれる。ポジティブ型の化学発光物質は、例えばPadronやKohinoorなどの蛍光タンパク質を含み、制御光を照射すると、化学発光の発生を抑制させて蛍光タンパク質の発光強度を低下させることができる。

30

【0033】

<第2実施形態>

第2実施形態では、光スイッチング型の化学発光物質のうち、制御光の照射により化学発光の生成が促進する、いわゆるネガティブ型の化学発光物質を生体試料が含む例について説明する。ネガティブ型の化学発光物質は、例えばDronpaやrsEGFP、SkyJan、rsTagRFPなどの蛍光タンパク質を含み、制御光を照射すると、化学発光の生成を促進させて蛍光タンパク質の発光強度を増加させることができる。図6Aは、ネガティブ型の化学発光物質20aを示す図であり、該図では発光酵素22と発光制御部分23とを合わせて図示している。制御光を照射する前では(下図)、励起状態にある発光酵素22のエネルギーが蛍光タンパク質21aに共鳴エネルギー移動(FRET)することにより、化学発光の生成が抑制されている。この状態から制御光を照射すると、化学発光の生成が促進され、蛍光タンパク質21aからの発光強度を増加させることができる(上図)。

40

【0034】

次に、ネガティブ型の化学発光物質を含む生体試料を、上記の実施例1および実施例2で示した顕微鏡を用いて観察する例について説明する。ネガティブ型の化学発光物質を含

50

む生体試料7を観察する場合、顕微鏡の画定部4は、生体試料7の観察面のうち化学発光物質からの化学発光を検出すべき領域(第1領域)に制御光を照射するように、制御光の照射パターンを画定する。例えば、制御光は、該領域のみに照射されるように、画定部4によってドット形状のドット光にされる。これにより、制御光を照射した該領域と他の領域とにおける発光強度のコントラストを増大させ、該領域からの化学発光の検出感度を向上させることができる。ここで、化学発光を検出すべき該領域を生体試料7の観察面に複数設ける場合には、画定部4は、複数のドット光が配列するように制御光の照射パターンを画定するとよい。

【0035】

<第3実施形態>

第3実施形態では、光スイッチング型の化学発光物質のうち、互いに異なる2種類の制御光の照射により化学発光の生成が促進されたり抑制されたりする、いわゆるデカップル型の化学発光物質を生体試料が含む例について説明する。デカップル型の化学発光物質は、例えばDreiklangやPSFPなどの蛍光タンパク質を含み、第1制御光を照射すると、化学発光の生成を促進させて蛍光タンパク質の発光強度を増加させることができる。一方、第1制御光とは異なる第2制御光を照射すると、化学発光の生成を抑制して蛍光タンパク質の発光強度を低下させることができる。

【0036】

図6Bは、デカップル型の化学発光物質20bを示す図であり、該図では発光酵素22と発光制御部分23とを合わせて図示している。第1制御光(例えば355nm)を照射すると、励起状態にある発光酵素22のエネルギーが蛍光タンパク質21bに共鳴エネルギー移動(FRET)することにより、化学発光の生成が促進され、蛍光タンパク質21bからの発光強度を増加させることができる(上図)。一方、第2制御光(例えば405nm)を照射すると、化学発光の生成が抑制され、蛍光タンパク質21bからの発光強度を低下させることができる(下図)。

【0037】

次に、デカップル型の化学発光物質を含む生体試料を、上記の実施例1および実施例2で示した顕微鏡を用いて観察する例について説明する。デカップル型の化学発光物質を含む生体試料を観察する場合、顕微鏡の画定部4は、生体試料7の観察面のうち化学発光物質からの化学発光を検出すべき第1領域に第1制御光を照射し、該第1領域を取り囲む第2領域に第2制御光を照射するように、第1制御光および第2制御光の照射パターンを画定する。例えば、第1制御光は、第1領域のみに照射されるように画定部4によってドット形状のドット光にされ、第2制御光は、第1領域を取り囲む第2領域のみに照射されるように画定部4によってドーナツ形状のドーナツ光にされる。これにより、第1領域と第2領域とにおける発光強度のコントラストを増大させ、第1領域からの化学発光の検出感度を向上させることができる。

【0038】

<第4実施形態>

第4実施形態では、制御光の照射により化学発光の波長(発光色)が変化する、いわゆる光変換型の化学発光物質を生体試料が含む例について説明する。光変換型の化学発光物質は、例えばKaedeやKikGR、PS-CFP1、mEOS2、mEOS3.2、PSmOrangeなどの蛍光タンパク質を含み、制御光を照射すると、化学発光の波長を第1波長から第2波長に変化する。図7は、光変換型の化学発光物質20cを示す図であり、該図では発光酵素22と発光制御部分23とを合わせて図示している。制御光を照射する前では(下図)、化学発光の波長が第1波長(例えば緑色光)であるのに対し、制御光を照射すると、化学発光の波長を第1波長から第2波長(例えば赤色光)に変化させることができる。

【0039】

次に、光変換型の化学発光物質を含む生体試料を、上記の実施例1および実施例2で示した顕微鏡を用いて観察する例について説明する。光変換型の化学発光物質を含む生体試料7を観察する場合、顕微鏡の画定部4は、生体試料7の観察面のうち化学発光を検出す

10

20

30

40

50

べき領域（第1領域）に制御光を照射するように、制御光の照射パターンを画定する。例えば、制御光は、該領域のみに照射されるように、画定部4によってドット形状のドット光にされる。そして、検出器13は、第1波長の光を透過させずに第2波長の光を透過させるフィルタを介して、生体試料7からの化学発光（第2波長）を検出する。これにより、第2波長で化学発光する該領域と第1波長で化学発光する他の領域とにおける発光強度のコントラストを増大させ、該領域からの化学発光の検出感度を向上させることができる。

【0040】

また、上記の例では第2波長の化学発光を検出したが、第1波長の化学発光を検出してもよい。この場合、画定部4は、生体試料7の観察面のうち化学発光を検出すべき第1領域に制御光を照射せず、該第1領域を取り囲む第2領域に制御光を照射するように、制御光の照射パターンを画定する。そして、検出器13は、第2波長の光を透過させずに第1波長の光を透過させるフィルタを介して、生体試料7からの化学発光（第1波長）を検出する。これにより、第1波長で化学発光する第1領域と第2波長で化学発光する第2領域とにおいて発光強度のコントラストを増大させ、第1領域からの化学発光の検出感度を向上させることができる。

10

【0041】

<第5実施形態>

第5実施形態では、上記の実施例1および実施例2に示した顕微鏡を用いて生体試料を観察する他の方法について説明する。生体試料は、低周波情報（粗い構造情報）から高周波情報（細かい構造情報）までの様々な情報を含んでおり、従来の顕微鏡では、解像限界（回折限界）により高周波情報を得ることが困難であった。そこで、本実施形態では、制御光を既知の照射パターン（第1パターン）で生体試料の観察面に照射し、生体試料の周波数成分と制御光の照射パターンの周波数成分との相互干渉（相互作用）によって該観察面に形成された干渉パターン（第2パターン（例えばモアレパターン））を検出器13で検出する。そして、制御光の照射パターンの周波数成分と検出器13で検出された干渉パターンの周波数成分とに基づいて、生体試料の周波数成分を処理部16で求める。つまり、既知の照射パターンで制御光を生体試料に照射すると、生体試料の周波数成分を干渉パターン（モアレパターン）として低周波側にずらして検出することが可能となるため、従来の顕微鏡では観察することのできなかつた生体試料の高周波情報までも観察することができる。

20

30

【0042】

図8は、生体試料7の観察面に、既知の縞状の照射パターン81で制御光を照射した例を示す図である。制御光の照射パターン81は、画定部4に設けられたLCOS（Liquid Crystals on Silicon）やDMD（Digital Mirror Device）などの空間変調器により画定される。該空間変調器は、顕微鏡（画定部4）に着脱可能に設けられていることが好ましい。

【0043】

生体試料7の観察面に、既知の縞状の照射パターン81で制御光を照射すると、生体試料がポジティブ型の化学発光物質を含む場合、制御光が照射された部分では化学発光が抑制され、制御光が照射されなかった部分では化学発光が許容されたままとなる。その結果、該観察面には、生体試料7の周波数成分と制御光の照射パターン81の周波数成分との相互干渉によりモアレパターン82（干渉パターン）が形成される。このモアレパターン82は検出器13によって検出され、処理部16は、検出器13で検出されたモアレパターン82の周波数成分から制御光の照射パターン82の周波数成分を除去する処理を行う。これにより、生体試料7の周波数成分を、従来の顕微鏡では観察することが困難であった高周波成分（高周波情報）までも得ることができる。つまり、従来の顕微鏡では観察することのできない生体試料7の高周波情報についての超解像化学発光観察を行うことができる。

40

【0044】

50

ここで、図 8 に示す例では、制御光の照射パターン 8 1 として、ライン状の照射領域と非照射領域とが交互に且つ周期的に配列したラインアンドスペースパターンが用いられているが、それに限られるものではなく、生体試料 7 の周波数成分と相互作用を生じさせる周波数成分を有するパターンであればよい。また、生体試料 7 の 2 次元の画像を得るためには、該生体試料 7 に対して 3 方向 × 3 位相のパターン光を照射した合計 9 枚の画像を取得し、各方向・各位相について得られた生体試料 7 の周波数成分を合成（加算）するとよい。

【 0 0 4 5 】

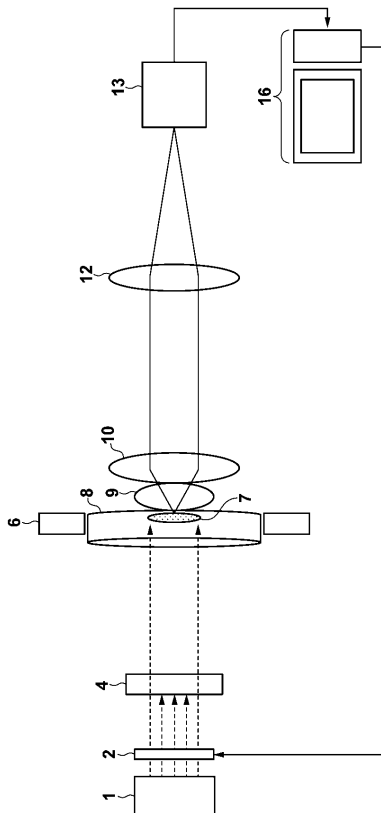
本発明は上記実施の形態に制限されるものではなく、本発明の精神及び範囲から離脱することなく、様々な変更及び変形が可能である。従って、本発明の範囲を公にするために、以下の請求項を添付する。

10

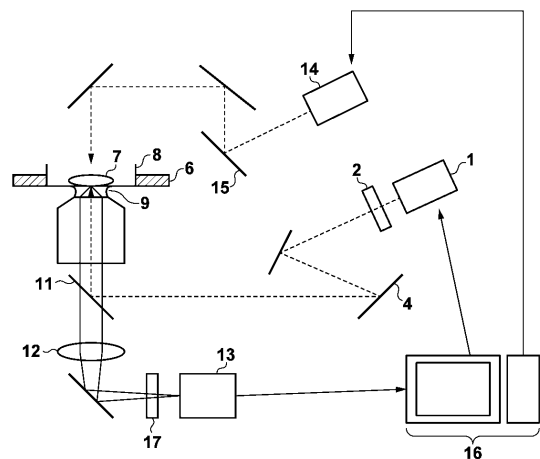
【 0 0 4 6 】

本願は、2016年3月23日提出の日本国特許出願特願2016-058946を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てを、ここに援用する。

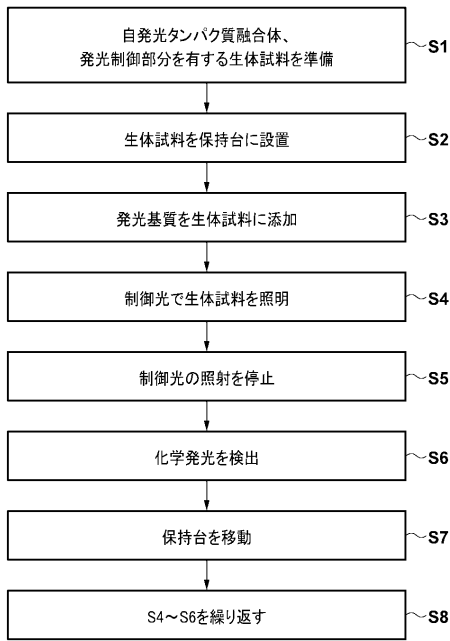
【 図 1 】



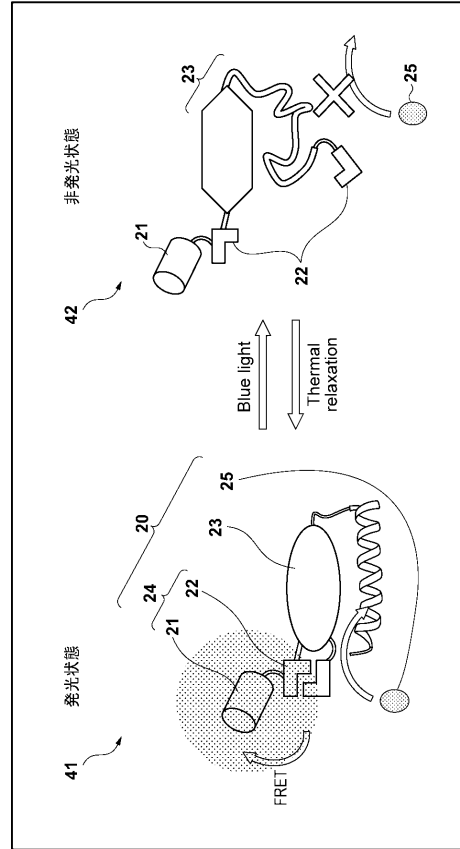
【 図 2 】



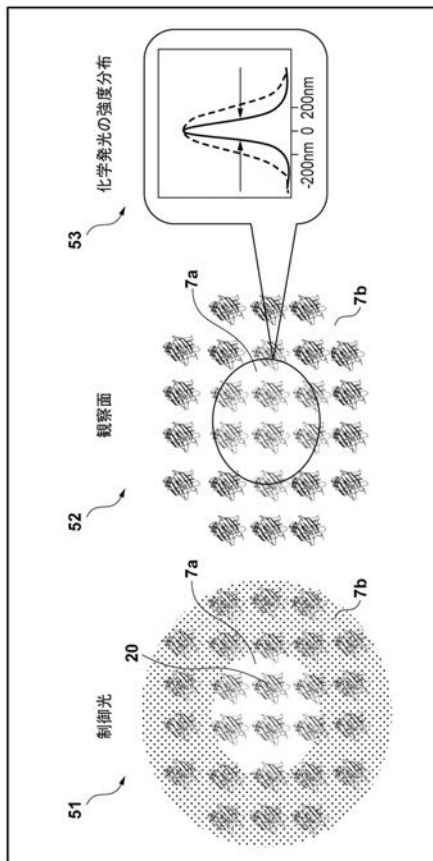
【 図 3 】



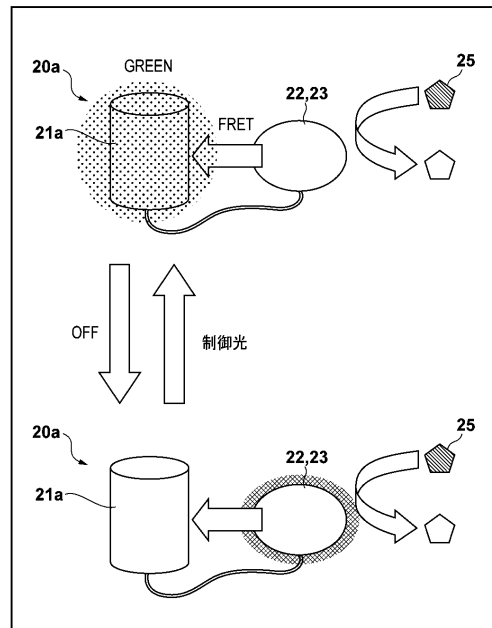
【 図 4 】



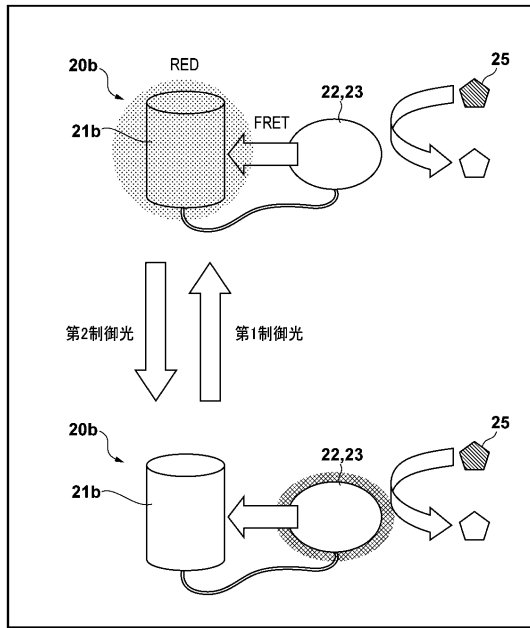
【 図 5 】



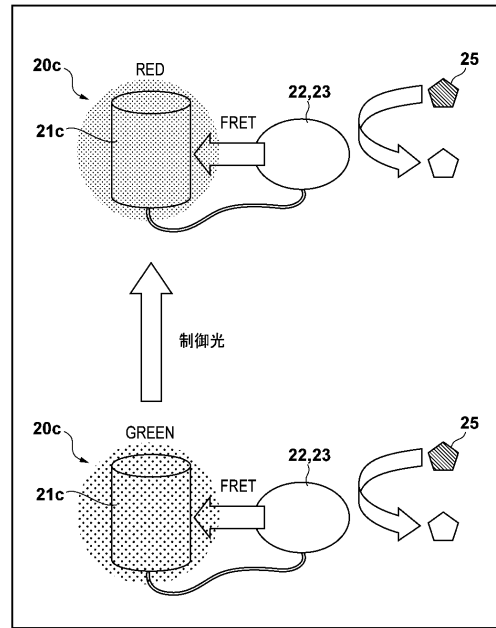
【 図 6 A 】



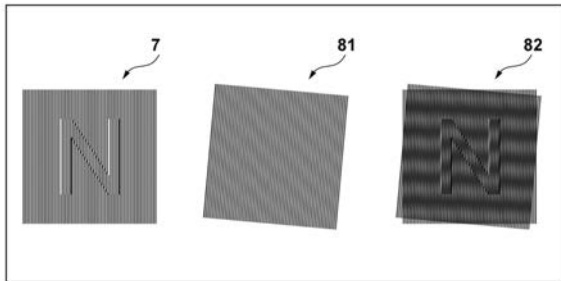
【 図 6 B 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/011837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G02B21/06(2006.01)i, G01N21/76(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G02B21/36 (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) G02B21/06, G01N21/76, G01N21/78, G02B21/36		
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 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017		
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.
X	JP 2008-057997 A (Olympus Corp.), 13 March 2008 (13.03.2008), claims; paragraphs [0022] to [0059]; fig. 1 to 14 (Family: none)	1-2, 7, 12-13, 18-20, 25-26 3-6, 8-11, 14-17, 21-24, 27-31
Y	Akira Takai et al., Expanded palette of Nano- lanterns for real-time multicolor luminescence imaging, Proceedings of the National Academy of Science, 2015.04.07, vol.112 no.14, pp.4352- 4356	3-6, 8-11, 14-17, 21-24, 27-31
Y	JP 2009-69076 A (Olympus Corp.), 02 April 2009 (02.04.2009), claims; paragraphs [0012] to [0013] (Family: none)	3-6, 8-11, 14-17, 21-24, 27-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 a nother 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 15 June 2017 (15.06.17)		Date of mailing of the international search report 27 June 2017 (27.06.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 1 8 3 7													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G02B21/06(2006,01)i, G01N21/76(2006,01)i, G01N21/78(2006,01)i, G02B21/36(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. G02B21/06, G01N21/76, G01N21/78, G02B21/36															
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017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													
X	JP 2008-057997 A (オリンパス株式会社) 2008.03.13, 特許請求の 範囲、段落【0022】 - 【0059】、第1図-第14図 (ファミリーなし)	1-2, 7, 12-13, 18-20, 25-26													
Y		3-6, 8-11, 14- 17, 21-24, 27- 31													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 15.06.2017		国際調査報告の発送日 27.06.2017													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 越河 勉	2V 9313												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3271													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/011837
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	Akira Takai et al., Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging, Proceedings of the National Academy of Science, 2015.04.07, vol.112 no.14, pp. 4352-4356	3-6, 8-11, 14-17, 21-24, 27-31
Y	JP 2009-69076 A (オリンパス株式会社) 2009.04.02, 特許請求の範囲、段落【0012】 - 【0013】 (ファミリーなし)	3-6, 8-11, 14-17, 21-24, 27-31

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 Q 1/25 (2006.01) C 1 2 Q 1/25

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72) 発明者 永井 健治
 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号国立大学法人大阪大学内

(72) 発明者 新井 由之
 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号国立大学法人大阪大学内

(72) 発明者 鈴木 和志
 東京都目黒区駒場 3 - 8 - 1 東京大学内

F ターム (参考) 2G043 AA03 BA16 CA04 CA05 CA09 DA01 DA02 DA06 DA08 EA01
 EA06 FA01 FA02 FA06 GA04 GA06 GA14 GB18 GB21 HA01
 HA02 HA06 HA09 HA11 JA02 JA03 KA01 KA02 LA03
 2G054 AA06 AB01 BB13 CA21 CA23 CB10 CE01 CE02 EA02 EB02
 FA17 FA19 FA20 FA22 FA32 FA33 FA36 FB02 GA01 GA03
 GB10
 2H052 AA09 AB02 AC04 AC05 AC12 AC13 AC14 AC34 AD03 AD06
 AD16 AF04 AF14 AF21
 4B029 AA07 BB01 BB11 CC02 CC03 CC08 FA01 FA09 FA11 GB06
 4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ02 QQ03 QQ08 QQ15 QR01 QR48 QR72
 QR73 QR77 QS02 QS32 QS36 QS39 QX01

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。