

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6764469号
(P6764469)

(45) 発行日 令和2年9月30日(2020.9.30)

(24) 登録日 令和2年9月15日(2020.9.15)

(51) Int.Cl.	F I
GO2B 21/06 (2006.01)	GO2B 21/06
GO2B 21/36 (2006.01)	GO2B 21/36
GO1N 21/76 (2006.01)	GO1N 21/76
GO1N 21/63 (2006.01)	GO1N 21/63 Z
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34 B
請求項の数 13 (全 14 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2018-507415 (P2018-507415)	(73) 特許権者	503360115
(86) (22) 出願日	平成29年3月23日 (2017. 3. 23)		国立研究開発法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/011837		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02017/164332	(74) 代理人	100076428
(87) 国際公開日	平成29年9月28日 (2017. 9. 28)		弁理士 大塚 康德
審査請求日	平成31年3月22日 (2019. 3. 22)	(74) 代理人	100115071
(31) 優先権主張番号	特願2016-58946 (P2016-58946)		弁理士 大塚 康弘
(32) 優先日	平成28年3月23日 (2016. 3. 23)	(74) 代理人	100112508
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		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) 【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、前記第1パターンの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前記化学発光の第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検出工程と、

を含むことを特徴とする方法。

【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、
 前記照明工程では、前記制御光の照射パターンを、前記第1パターンとして、前記制御光で照射されない第1領域と前記制御光で照射される第2領域とが交互に且つ周期的に前記観察面上に配列されるように画定することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【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、

前記照明工程では、前記制御光の照射パターンを、前記第1パターンとして、前記制御光で照射されない第1領域と前記制御光で照射される第2領域とが交互に且つ周期的に前記観察面上に配列されるように画定することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【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、

前記照明工程では、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、前記第1パターンとして、前記第1制御光で照射される第1領域と前記第2制御光で照射される第2領域とが交互に且つ周期的に前記観察面上に配列されるように画定することを特徴とする請求項1に記載の方法。

10

【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、

前記照明工程では、前記制御光の照射パターンを、前記第1パターンとして、前記制御光で照射されない第1領域と前記制御光で照射される第2領域とが交互に且つ周期的に前記観察面上に配列されるように画定し、

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1に記載の方法。

20

【請求項6】

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1乃至5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記第1パターンは、縞状のパターンを含み、

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1乃至6のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項8】

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7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記発光制御部分は、フォトリポンの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1乃至8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

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1乃至9のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項11】

前記制御光は、1光子吸収の380~480nmの波長または2光子吸収の850~940nmの波長を有することを特徴とする請求項1乃至10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

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、

50

前記検出工程では、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 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて、生体試料を生存状態で観察する顕微鏡。

【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】

10

【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。

【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

20

【先行技術文献】

【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】

30

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。

【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】

40

【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

50

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。

【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】

10

【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。

【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】

20

【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】

[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。

30

【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。

40

【0014】

発光制御部分23は、制御光が照射されていない状態(図4の状態41)では、自発光タンパク質融合体24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23は、制御光が照射されている状態(図4の状態42)では、自発光タンパク質融合体24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23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

50

は、制御光として、1光子吸収の380～480nmの波長を有する青色の光または2光子吸収の850～950nmの波長を有する光を使用する。自発光タンパク質融合体24に制御光の青色光を照射すれば、発光基質25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42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24は、熱緩和によって状態41に復帰される。発光制御部分23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-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)、BLUFタンパク質のYcgFドメイン(1-97)である。

【0015】

[制御光]

化学発光物質20の化学発光、すなわち、自発光タンパク質融合体24と発光基質25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51のように、化学発光の生成を許容する第1領域7aと化学発光の生成を抑制する第2領域7bとに分ける。第1領域7a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7b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7aを取り囲むドーナツ形状の第2領域7bのみに照射されるドーナツ光である。

【0016】

図5の52に示されるように、第1領域7aから化学発光が射出され、第1領域7aを取り囲む第2領域7b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7aおよび第2領域7b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、53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7bのみに制御光を照射する場合には、第1領域7a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、53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7a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。

【0017】

図5は、制御光が照射されない第1領域7a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7aの数を複数とすると、複数の第1領域7a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7a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7aと第2領域7b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7aの径は、例えば、顕微鏡の光学系のNAを1とすると、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7aの径を50nm程度、第2領域7bの径を250nm程度としている。

【0018】

本実施形態では、化学発光物質として、蛍光タンパク質21と発光酵素22との自発光タンパク質融合体24と、LOV2ドメイン、LOV2ドメインの変異体等の発光制御部分23と、を含むものを使用する。そのため、 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 以下、好ましくは $18\text{mW}/\text{cm}^2 \sim 1\text{W}/\text{cm}^2$ 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を生体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380～480nmの波長を有する青色光または2光子吸収の850～940nmの波長を有する光を使用する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

〔 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。

【 0 0 2 0 】

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 2 0 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 2 0 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。

10

【 0 0 2 1 】

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 1 3 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。

20

【 0 0 2 2 】

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 2 5 を添加する添加部を備えている。添加部は、発光基質 2 5 を生体試料 7 に滴下するか、または、発光基質 2 5 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 2 5 をディッシュ 8 内の生体試料 7 に添加し、発光基質 2 5 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 2 5 を添加する添加部を省略し得る。

30

【 0 0 2 3 】

ステージ 6 と検出器 1 3 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 1 0 と、平行光とされた化学発光を検出器 1 3 に集光する結像レンズ 1 2 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 1 0 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 1 3 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 1 3 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）1 6 は、検出器 1 3 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。

40

【 0 0 2 4 】

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。

【 0 0 2 5 】

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 1 3 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 1 3 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

50

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。

【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。

【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。

【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。

- ・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(ナノランタン)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。

10

20

30

40

50

【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。

【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。

【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。

【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7を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)。

【0034】

次に、ネガティブ型の化学発光物質を含む生体試料7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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 3 5 】

< 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。

10

【 0 0 3 6 】

図 6 B は、デカップル型の化学発光物質 2 0 b を示す図であり、該図では発光酵素 2 2 と発光制御部分 2 3 とを合わせて図示している。第 1 制御光（例えば 3 5 5 n m）を照射すると、励起状態にある発光酵素 2 2 のエネルギーが蛍光タンパク質 2 1 b に共鳴エネルギー移動（F R E E T）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 2 1 b 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 4 0 5 n m）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 2 1 b からの発光強度を低下させることができる（下図）。

【 0 0 3 7 】

20

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。

30

【 0 0 3 8 】

< 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 2 0 c を示す図であり、該図では発光酵素 2 2 と発光制御部分 2 3 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。

40

【 0 0 3 9 】

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 1 3 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

50

【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

【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。

30

【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】

ここで、図8に示す例では、制御光の照射パターン81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

50

い。

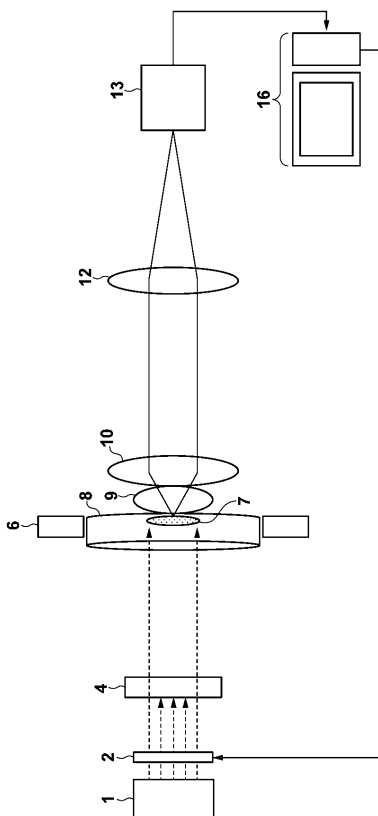
【 0 0 4 5 】

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。

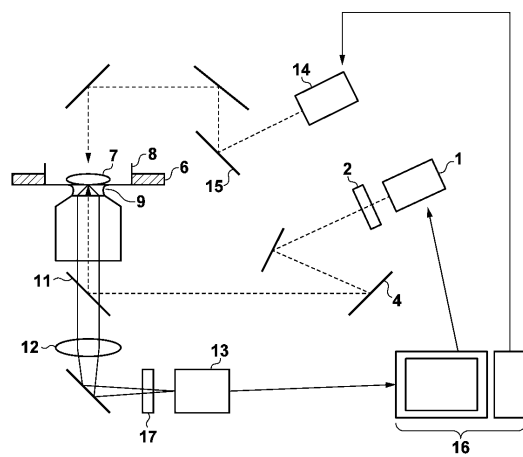
【 0 0 4 6 】

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。

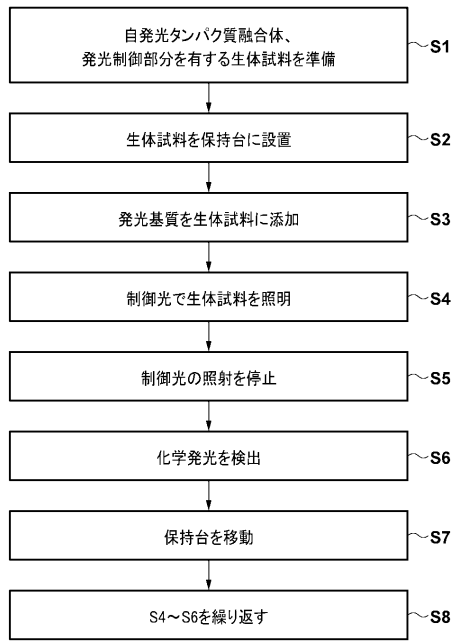
【 図 1 】



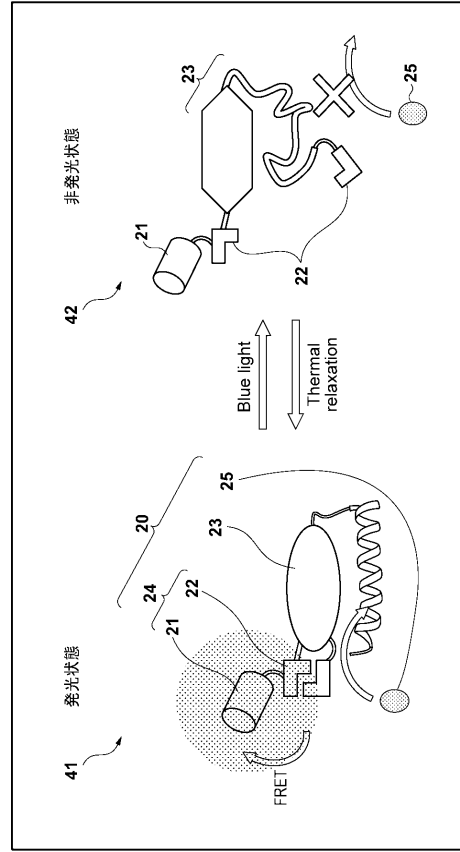
【 図 2 】



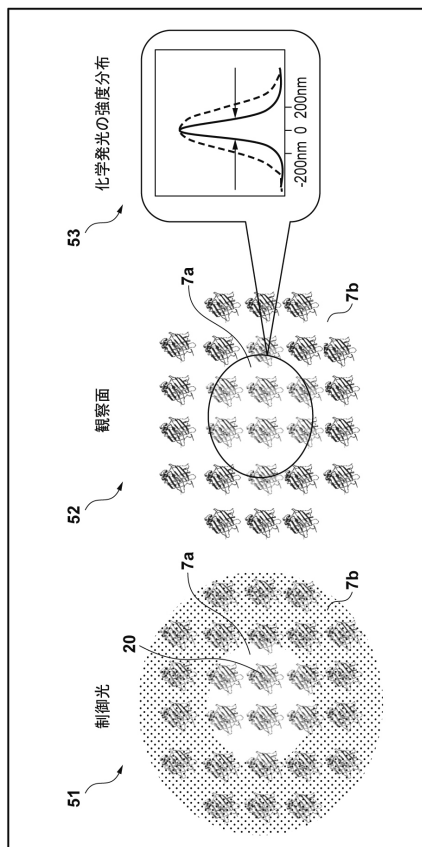
【 図 3 】



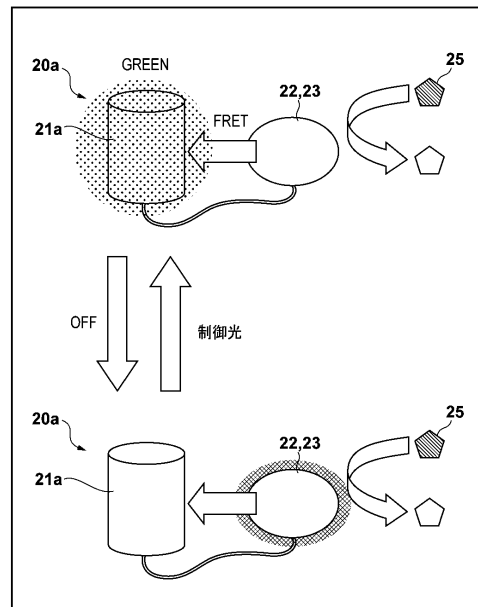
【 図 4 】



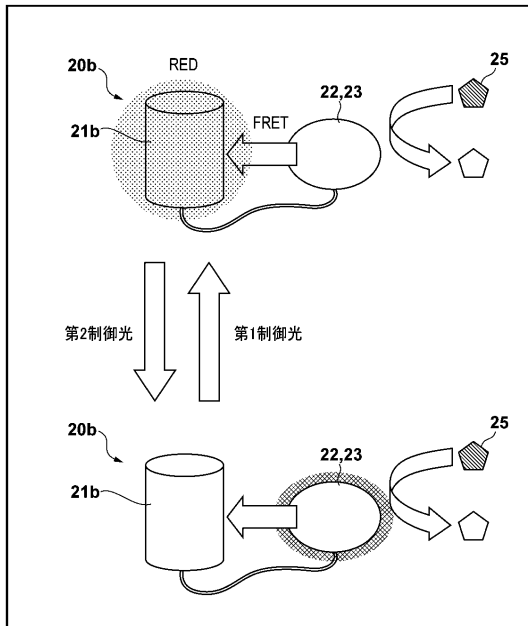
【 図 5 】



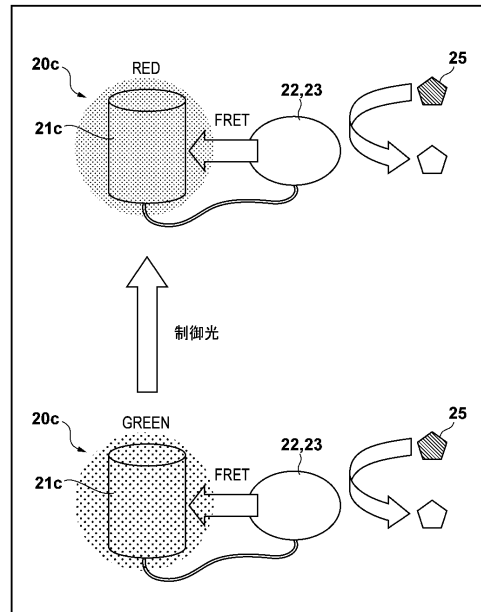
【 図 6 A 】



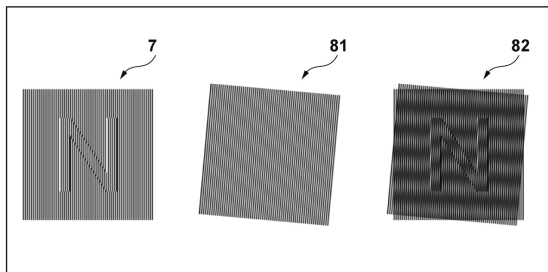
【 図 6 B 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/25 (2006.01) C 1 2 Q 1/25

(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

審査官 越河 勉

(56)参考文献 Mitsuru Hattori ET AL, Sustained accurate recording of intracellular acidification in living tissues with a photo-controllable bioluminescent protein, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, National Academy of Sciences of the United States of America, 2013年 5月20日, vol.110 no.23, pp.9332-9337

Akira Takai ET AL, Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, National Academy of Sciences of the United States of America, 2015年 4月 7日, vol.112 no.14, pp.4352-4356

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 2 B 2 1 / 0 0

G 0 2 B 2 1 / 0 6 - 2 1 / 3 6