

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号
WO2008/044492

発行日 平成22年2月12日 (2010. 2. 12)

(43) 国際公開日 平成20年4月17日 (2008. 4. 17)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 B 1/00 (2006.01)	A 6 1 B 1/00 3 0 0 A	4 C 0 6 1
	A 6 1 B 1/00 3 2 0 E	
	A 6 1 B 1/00 3 2 0 Z	

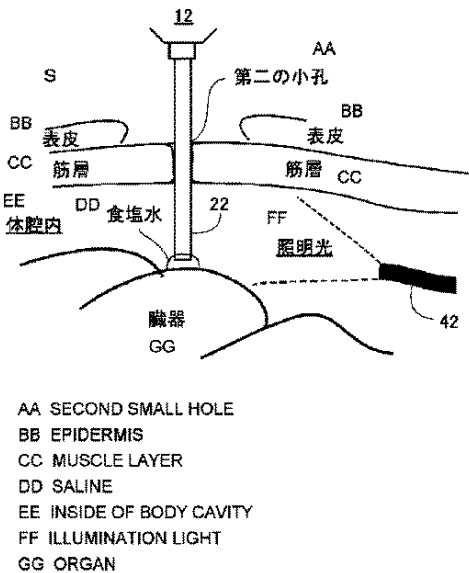
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

出願番号	特願2008-538642 (P2008-538642)	(71) 出願人	000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4 3番2号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/068978	(74) 代理人	100071216 弁理士 明石 昌毅
(22) 国際出願日	平成19年9月28日 (2007. 9. 28)	(74) 代理人	100130395 弁理士 明石憲一郎
(31) 優先権主張番号	特願2006-279849 (P2006-279849)	(72) 発明者	樋口 香織 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4 3番2号 オ リンパス株式会社内
(32) 優先日	平成18年10月13日 (2006. 10. 13)	(72) 発明者	笹岡 ち乃 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4 3番2号 オ リンパス株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	Fターム (参考)	4C061 BB08 DD01 DD04 HH51 LL03 NN09
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 小動物体内の顕微観察方法

(57) 【要約】

光学顕微鏡用のスティック型対物レンズを用いた実験小動物の体内の in vivo 顕微観察方法に於いて、被検動物の負担を大幅に増大することなく、動物の体内の観察部位の特定、対物レンズの視野の位置の確認が可能となる。本発明の小動物体内の組織又は細胞の顕微観察をする方法では、小動物の表皮部位に開けられた第一の小孔を介して内視鏡を挿入し、内視鏡の像を基に、小動物の表皮を貫通する第二の小孔を開け、その孔にスティック型対物レンズの細径レンズユニットを挿入する。細径レンズユニットの先端の位置は、第一の小孔を介して挿入した内視鏡の像にて観察され、細径レンズユニットの視野が観察したい部位に合わせることができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細径レンズユニットを有する対物レンズを用いて小動物体内の組織又は細胞をin vivoにて顕微観察する方法であって、

前記小動物の表皮部位に、前記小動物の体内を密閉することのできる第一の小孔を開ける過程と、

前記第一の小孔を介して前記小動物の体内へ気体を送気し、前記表皮部位の内側に空間を形成する過程と、

前記第一の小孔を介して前記小動物の体内へ内視鏡を挿入する過程と、

前記小動物の表皮部位に前記小動物の体内を密閉することのできる第二の小孔を開ける過程と、 10

前記第二の小孔へ前記対物レンズの細径レンズユニットを挿入する過程と、

前記第一の小孔を介して挿入した前記内視鏡にて前記第二の小孔に挿入した細径レンズユニットの先端の位置を観察し、前記内視鏡の像に基づいて、前記細径レンズユニットの先端の位置決めをする過程と、

前記細径レンズユニットを有する対物レンズにより前記小動物体内の組織又は細胞を観察する過程と

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 の方法であって、前記第二の小孔を開ける過程に於いて、前記内視鏡にて前記小動物の体内の観察部位を決定した後に、前記第二の小孔が、前記細径レンズユニットを該第二の小孔に挿入した際、前記観察部位が観察可能となる位置に開けられること、及び、前記細径レンズユニットの先端の位置決めをする過程に於いて、前記細径レンズユニットの先端が、前記観察部位が観察可能となる位置に位置決めされることを特徴とする方法。 20

【請求項 3】

請求項 1 の方法であって、更に、

前記細径レンズユニットを前記第二の小孔から抜き出し、前記対物レンズとは倍率又は開口数の異なる細径レンズユニットを有する第二の対物レンズを前記第二の小孔に挿入する過程と、 30

前記第一の小孔に挿入した前記内視鏡にて前記第二の小孔に挿入されている前記第二の対物レンズの細径レンズユニットの先端位置と前記抜き取られた対物レンズの観察していた部位とを観察し、前記内視鏡の像に基づいて前記第二の対物レンズユニットの細径レンズユニットの先端を前記抜き取られた対物レンズの観察していた部位が観察可能な位置に配置する過程と、

前記細径レンズユニットを有する第二の対物レンズにより前記観察部位を観察する過程と

を含む方法。

【請求項 4】

細径レンズユニットを有する対物レンズを用いて小動物体内の組織又は細胞をin vivoにて顕微観察する方法であって、 40

前記小動物の表皮部位に、前記小動物の体内を密閉することのできる第一の小孔を開ける過程と、

前記第一の小孔を介して前記小動物の体内へ気体を送気し、前記表皮部位の内側に空間を形成する過程と、

前記第一の小孔を介して前記小動物の体内へ内視鏡を挿入する過程と、

前記内視鏡の像に基づいて、前記小動物の体内の観察部位を特定し、該特定された観察部位の位置が前記小動物の外部からの目視により特定できるよう前記小動物の体内の一部にマーカーを付与する過程と、

前記マーカーにより特定される観察部位に近接する前記小動物の表皮部位に第二の小孔 50

を開ける過程と、

前記第二の小孔へ前記対物レンズの細径レンズユニットを挿入する過程と、

前記対物レンズにより前記観察部位を観察する過程と

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 4 の方法であって、前記マーカが粘性を有する着色された液状物質であり、前記内視鏡が前記マーカを送出するマーカ送出手段を有し、前記マーカ送出手段により、前記マーカが前記観察部位を特定できる前記小動物の体内の一部に付着されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

10

請求項 1 又は 4 の方法であって、前記内視鏡が気体を送出する手段を有し、前記第一の小孔を介して前記小動物の体内へ気体を送気し、前記表皮部位の内側に空間を形成する過程が、前記第一の小孔へ前記内視鏡を挿入した後に行われることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 又は 4 の方法であって、前記内視鏡を前記第一の小孔に挿入するのに先立って、前記第一の小孔にトラカールを挿入する過程を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、小動物、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の実験用小動物の体内を観察する方法に係り、より詳細には、光学顕微鏡を用いて小動物の体内組織又は細胞を *in vivo* 観察する方法に係る。

20

【背景技術】

【0002】

医学的、薬学的又は生物学的研究の分野に於いて、種々の研究の目的のために実験用小動物（被検動物）の体内臓器又はその他体内の組織の状態を、*in vivo* にて、しかも、細胞レベル又は分子レベルにて観察（顕微観察）することが望まれることがある。その場合、被検動物の表面から体腔へ、光学顕微鏡の対物レンズ（通常、直径 2－3 cm）が挿入でき且目的の部位を探すのに十分な大きさの孔を開孔する処置が施される。しかしながら、かかる処置は、被検動物に負担がかかるため、長時間観察することを困難にし、また、開孔処理を施すことにより観察されるべき組織・細胞の現象・状態が損なわれてしまう危険性がある。そこで、本願出願人は、実験用小動物の体内など、従前の光学顕微鏡用の対物レンズを容易に近接することのできない領域の顕微観察を可能にするべく、通常の対物レンズの先端に、その対物レンズの径よりも相当に細径（直径約 1 mm－5 mm 程度まで）のレンズユニット（細径レンズユニット）を（光学的に）接続してなる「スティック型対物レンズ」を開発した（例えば、特許文献 1、2 参照。）

30

【0003】

かかるスティック型対物レンズによれば、対物レンズの先端が 5 mm 未満となるので、被検動物の体内又は体腔内へ対物レンズの先端を挿入して体内又は体腔内の組織を *in vivo* にて顕微観察する場合であっても、被検動物の表面の開孔処理に於ける孔径は、数 mm 程度でよく、従前に比べて、動物への負担が大幅に低減され有利である。また、スティック型対物レンズ内部の光学系は、通常の光学顕微鏡又はレーザー走査型光学顕微鏡の光学系及び検出系に適合するよう構成されており、かくして、スティック型対物レンズを既存の光学顕微鏡に取り付けてそのまま使用することも可能となっている。このようなスティック型対物レンズを用いて被検動物の体腔内を観察する際に、スティック型対物レンズの位置と観察対象の位置との関係を固定するための装置（対物レンズ挿入具）も本願出願人による特許文献 1 に提案されている。

40

【特許文献 1】 特開 2005－121947

【特許文献 2】 特開 2006－145771

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記の如き細径レンズユニットを有するスティック型対物レンズに於いて、細径レンズユニットから対物レンズ本体までのレンズ群は、対物レンズに要求される高倍率・高分解能を達成するべく強固に保持される必要があるので、通常の光学顕微鏡用の対物レンズと同様、金属等から成る枠内に収容され、スティック型対物レンズ全体の構造は剛固である。従って、細径レンズユニット、即ち、スティック型対物レンズの先端を実験用小動物の体内又は体腔内へ穿たれた開孔部に一旦挿入すると、その状態で、体内又は体腔内にて、細径レンズユニットをレンズの光軸方向に対して垂直方向に移動することは困難である。例えば、細径レンズユニットを開孔部へ挿入した後に、適当な観察部位を探索する目的で、（剛固な）細径レンズユニットの視野（即ち、位置）を無理に移動すれば、被検動物の開孔部を広げてしまったり、剛固なレンズユニットが被検動物の体内を無用に損傷してしまうこととなる。従って、スティック型対物レンズにて特定の部位の *in vivo* 観察するためには、被検動物の体内に於ける観察部位を予めできるだけ確実に特定してから開孔処置を施す必要がある。しかしながら、観察部位は、被検動物の体内又は体腔内であるので、動物の外部からその部位を特定することは容易ではない。

【0005】

また、或る程度の観察部位を特定した上で、細径レンズユニットを被検動物に挿入した後に於いても、レンズの先端は、動物の内部にあるので、その先端の位置を動物の外部から特定することがやはり困難であり、実際に観察している部位の動物内部に於ける位置を特定することが難しく、また、観察したい部位にレンズの視野が合っているのかの確認も困難である。特に、スティック型対物レンズは、既に述べた如く、細径のレンズにて通常の光学顕微鏡用の対物レンズに匹敵する高倍率・高分解能を達成しているので、その視野が直径数百 μm 程度と、通常の対物レンズより狭いところ、被検動物の体内又は体腔内に於けるレンズの先端位置を移動することも容易にできないことから、細径レンズユニットの現在の視野が被検動物の体内又は体腔内の臓器のどの部分に位置しているかを把握することが困難となっている。

【0006】

かくして、もし、被検動物の負担を大幅に増大することなく、被検動物の体内又は体腔内の観察部位の特定・確認又はスティック型対物レンズの視野の位置の確認を比較的容易に且より確実に行うことができる方法があれば、スティック型対物レンズが小動物内部に比較的容易に挿入することができるという利点を、より有効に生かして実験用小動物の体内又は体腔内の組織・細胞の *in vivo* 顕微観察を行うことができるようになる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明によれば、細径レンズユニットを有する光学顕微鏡用対物レンズと内視鏡とを併用することにより、小動物の負担を大幅に増大することなく、小動物の体内又は体腔内の観察部位の特定又は対物レンズの視野の位置の確認がなされる態様にて小動物の組織・細胞を *in vivo* 顕微観察を可能にする新規な方法が提供される。

【0008】

本発明の一つの態様によれば、細径レンズユニットを有する対物レンズを用いて小動物体内の組織又は細胞を *in vivo* にて顕微観察する方法は、小動物の表皮部位に、小動物の体内を密閉することのできる第一の小孔を開ける過程と、第一の小孔を介して小動物の体内へ気体を送気し、表皮部位の内側に空間を形成する過程と、第一の小孔を介して小動物の体内へ内視鏡を挿入する過程と、小動物の表皮部位に小動物の体内を密閉することのできる第二の小孔を開ける過程と、第二の小孔へ対物レンズの細径レンズユニットを挿入する過程と、第一の小孔を介して挿入した内視鏡にて第二の小孔に挿入した細径レンズユニットの先端の位置を観察し、内視鏡の像に基づいて、細径レンズユニットの先端の位置決めをする過程と、細径レンズユニットを有する対物レンズにより小動物体内の組織又は細胞を観察する過程とを含む。なお、第一及び第二の小孔が被検動物の体内を密閉可能とな

るよう形成するのは、被検動物の体内に於いて、内視鏡又は対物レンズによる観察を容易にするべく気体が被検動物の体内へ送出され空間が形成されるとき、気体が外部に流出して空間が縮小することを避けるためである。また、内視鏡が気体を送出する手段を有する場合には、第一の小孔を介して内視鏡を挿入した後に小動物の体内へ気体を送気し、表皮部位の内側に空間を与えられてよく、そのような場合も本発明の範囲に属することは理解されるべきである。更に、内視鏡を第一の小孔に挿入し易くするために、第一の小孔にトラカールが内視鏡を挿入する前に挿入されてよい。

【0009】

上記の小動物体内の組織又は細胞を *in vivo* にて顕微観察する方法によれば、対物レンズの細径レンズユニットを挿入する開孔処置をするのに先立って、内視鏡を小動物の体内に挿入し、小動物の内部に空間を形成し、内視鏡にて小動物の体内を広範囲にて観察できる状態にした上で、対物レンズの細径レンズユニットが挿入されることとなる。内視鏡は、よく知られているように、光ファイバ等の柔軟な光を伝達する材料からなる可撓性の管の端の一方を観察部位に向け、管の他方に光検出器を備えて、観察部位からの発光又は反射光を可撓性の管を通じて光検出器へ導くことにより観察部位の状態を観察する装置である。従って、光学顕微鏡の対物レンズに匹敵するほどの分解能又は倍率の像を得ることはできないが、観察部位に向けられる可撓性の管の先端近傍は、比較的自在に湾曲可能であり、また、その視野が光学顕微鏡用の対物レンズの視野よりも広い。そこで、本発明では、かかる内視鏡の特徴を利用して、下記の実施形態に於いて示されている如く、内視鏡の視野内の像に於いて被検動物の体内又は体腔内の広範囲の状態を観察して把握し、（一旦動物の体内に挿入されると移動の自由度の少ない）対物レンズの細径レンズユニットの先端の位置の特定又は確認がなされる。かかる構成によれば、細径レンズユニットの先端の挿入後、その位置が、被検動物の外部からは確認できなくても、対物レンズの視野が被検動物の体内のどの部位を観察しているのかが容易に確認できることとなる。

【0010】

上記の方法に於いて、小動物の体内の或る特定の部位、例えば、或る臓器の特定の部位など、を観察したい場合には、小動物の体内を密閉可能な第二の小孔、即ち、対物レンズの細径レンズユニットを挿入するための孔を開ける過程に於いて、内視鏡にて小動物の体内の観察部位を予め決定し、第二の小孔が、細径レンズユニットを該第二の小孔に挿入した際、観察部位が観察可能となる位置に開けられるようになっていてよい。そして、細径レンズユニットの先端が第二の小孔に挿入される際には、内視鏡の像に基づいて、細径レンズユニットの先端の位置は、上記の予め決定された観察部位が観察可能となる位置に位置決めされる。かかる構成によれば、観察したい部位の被検動物の体内での位置が被検動物の外部から実験者又は観察者の目視により特定又は確認できない場合でも、内視鏡の像によって被検動物の体内の状況を把握することができるので、第二の小孔を開ける前に、観察したい部位が特定又は確認され、被検動物の表皮に於いて誤って観察したい部位を観察できない場所に開孔してしまうといった可能性が低減される。

【0011】

更に、上記の方法によれば、内視鏡で観察部位の位置の確認できることにより、細径レンズユニットを第二の小孔から抜き出し、今まで使用していた対物レンズとは倍率又は開口数の異なる細径レンズユニットを有する第二の対物レンズを第二の小孔に挿入し、しかる後に、第一の小孔に挿入したままの内視鏡にて第二の小孔に挿入されている第二の対物レンズの細径レンズユニットの先端位置と今まで観察していた部位（抜き取られた対物レンズの観察していた部位）とを観察し、内視鏡の像に基づいて第二の対物レンズユニットの細径レンズユニットの先端を、抜き取られた先の対物レンズの観察していた部位が観察可能な位置に配置し、細径レンズユニットを有する第二の対物レンズにより観察部位を観察するといったことが可能となる。かかる手順によれば、種々の異なる倍率又は分解能にて同一の観察部位を観察できることとなり有利である。

【0012】

ところで、内視鏡がスティック型対物レンズにて観察する観察部位を特定するために用

いられる場合、観察部位を内視鏡の像から観察した後、その部位に何等かの目印を付けて、その部位の位置が被検動物の外部から実験者又は観察者により確認できれば、その後は、内視鏡を使用しなくてもよくなる。そこで、本発明のもう一つの態様によれば、細径レンズユニットを有する対物レンズを用いて小動物体内の組織又は細胞を *in vivo* にて顕微観察する方法は、前記の態様と同様に、小動物の外部に対して小動物の体内を密閉するよう小動物の表皮部位に第一の小孔を開ける過程と、第一の小孔を介して小動物の体内へ気体を送気し、表皮部位の内側に空間を与える過程と、第一の小孔を介して内視鏡を挿入する過程の後（内視鏡が気体を送出する手段を有する場合には、第一の小孔に内視鏡を挿入した後に内視鏡を介して小動物の体内へ気体を送気し、表皮部位の内側に空間を形成するようになっていてよい。）、内視鏡の像に基づいて、小動物の体内の観察部位を特定し、
10 該特定された観察部位の位置が小動物の外部からの目視により特定できるよう小動物の体内の一部にマーカーを付与する過程と、マーカーにより特定される観察部位に近接する小動物の表皮部位に第二の小孔を開ける過程と、第二の小孔に細径レンズユニットを挿入する過程とが実行され、かくして、対物レンズにより、マーカーにより特定される観察部位が観察される。なお、前記の実施態様と同様に、内視鏡を第一の小孔に挿入し易くするために、第一の小孔にトラカールが内視鏡を挿入する前に挿入されてよい。

【0013】

かかる態様に於いては、上記の如く、被検動物の体内の観察したい部位又は観察したい部位が特定できる部位にマーカーを付与することにより、被検動物に第二の小孔を開孔する際に被検動物の外部から観察したい部位が確認できるようにして、誤った場所に、即ち
20 、観察したい部位が観察できない場所に、孔を開けてしまうといった可能性が低減されることとなる。なお、上記に於いて、「マーカー」とは、観察部位又はその近傍を着色するなどして、実験者又は観察者の目視により被検動物の外部からその場所が特定できる目印であれば、任意のものであってよい。例えば、マーカーは、粘性を有する着色された液状物質であってよい。その場合、内視鏡がマーカーを送出する手段を有し、内視鏡からマーカー（粘性液状物質）を送出して観察部位に付与又は付着されることとなる。また、被検動物の外部から内視鏡の挿入部先端から放出される照明光が見えるときは、その照明光の位置に基づいて、被検動物の外部から観察部位に近接した表皮に着色又はその他の目印を付与するようになっていてもよい。

【0014】

上記の態様に於いては、第二の小孔を開けるべき場所がマーカーにより特定できることから、マーカーが付与された後は、内視鏡は、第一の小孔より抜き出されてもよいことは理解されるべきである。内視鏡による動物の体内の観察を続けない場合は、動物の体内に形成された空間は必要ないので、第二の小孔は、動物の体内を密閉できる孔でなくてもよい。空間が縮小される場合には、観察部位が表皮に近接し、マーカーの位置が被検動物の外部から確認し易くなるとともに、対物レンズの細径レンズユニットの挿入長さが低減され、実験の観察目的によっては、その方が有利である場合がある。

【0015】

上記の本発明により観察される小動物の体内の部位は、典型的には、動物の体腔内であるが、その他の個所、例えば、動物の頭部、首部、脚部、尾部等であってもよく、そのよ
40 うな場合も本発明の範囲に属することは理解されるべきである。

【発明の効果】

【0016】

本発明は、総じて、スティック型対物レンズを用いた光学顕微鏡と内視鏡を併用することにより、小動物（特に、実験用小動物）の体内又は体腔内の *in vivo* 観察を、細胞・分子レベルにて、即ち、高倍率・高分解能にて、しかも、観察される部位の特定又は確認がより確実に為された状態で、被検動物の負担を大幅に増大することなく行えるようにするものであると言える。従来に於いては、スティック型対物レンズの先端の位置、即ち、視野は、被検動物に挿入された後は、殆ど動かせず（挿入後、観察部位を探すため又は現在の視野の位置を確認するための試料の広範囲のスキャンができない。）、また、被検動物
50

の外からは、被検動物の体内に於ける視野の位置がどこにあるのかの確認が困難であったが、本発明によれば、内視鏡の像を利用することで、スティック型対物レンズの観察部位の位置をより確実に特定することができ、或いは、スティック型対物レンズの視野をより確実に観察したい部位に合わせることができることとなる。従って、スティック型対物レンズを被検動物に挿入後、スティック型対物レンズの位置は、殆ど動かさなくてもよくなり、また、スティック型対物レンズの視野の位置、即ち、観察部位が特定できないことにより、実験が無駄になってしまうといったことを回避することができるようになる。

【0017】

また、内視鏡の像により、観察したい部位を予め特定する場合には、スティック型対物レンズを挿入すべき場所が、より精度よく決定することができるので、被検動物に於いて観察したい部位を観察するために最も適切な表皮部位に開孔処置を施すことが可能となり、しかも、スティック型対物レンズを開孔部に挿入した後、その先端位置を（レンズの光軸方向以外に）殆ど動かす必要がなくなることが期待される。従って、スティック型対物レンズのための開孔の孔径は、実質的に、スティック型対物レンズの細径レンズユニットの直径程度でよくなり、かくして、被検動物に大きな孔を開ける必要がないので、被検動物の負担を大幅に低減することが可能となる（内視鏡を挿入する孔の孔径も、内視鏡の可撓性の管から成る挿入部が挿入可能な程度であってよく、被検動物の負担を大きく増大することはない。）。また、内視鏡により、スティック型対物レンズを挿入する孔の位置をより正確に決定することにより、被検動物の表皮の開孔に於ける試行錯誤（孔を別の場所に開けなおしたり、孔を拡大するといった操作）が低減され、これにより、更に、被検動物の負担が大幅に低減される。

【0018】

本発明のその他の目的及び利点は、以下の本発明の好ましい実施形態の説明により明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1（A）は、本発明の実施形態を実施する際に使用される顕微観察システムの模式図である。なお、簡単のため、付属部品等は、省略されている。図1（B）は、スティック型対物レンズの模式図である。

【図2】図2（A）は、本発明の実施形態を実施する際に使用される内視鏡のシステムの模式図である。なお、簡単のため、付属部品等は、省略されている。図2（B）は、内視鏡の挿入管部の先端の模式的な正面図である。

【図3】図3は、本発明の実施形態に於ける様子を説明する模式図である。（A）は、被検動物を固定した状態、（B）は、被検動物にカテーテルを挿入した状態、（C）は、内視鏡を挿入するためのゴムキャップをカテーテルに装着した状態、（D）は、内視鏡を被検動物の内部に挿入した状態である。なお、（B）－（D）は、操作に於いて変化のある部分のみを示している。

【図4】図4（A）及び（B）は、被検動物にカテーテルを装着するためのサーフロー留置針の模式図である。（A）は、カテーテルをサーフロー留置針から外した状態であり、（B）は、カテーテルをサーフロー留置針に嵌めた状態である。カテーテルは、（B）の状態では、被検動物に挿入され、その後、サーフロー留置針のみ引き抜かれる。なお、カテーテルの先端は、挿入し易くするために、斜めにカットされてよい。

【図5】図5は、被検動物の表皮から体腔へ貫通する第二の小孔を形成する過程を説明する模式図である。第二の小孔は、針等により筋層から穿つことにより形成される。なお、図では、説明の目的で小孔の大きさが誇張されて示されている。

【図6】図6は、第二の小孔に細径レンズユニットを被検動物の体腔内に挿入した状態の体腔内の状態を説明する模式図である。

【図7】図7（A）は、スティック型対物レンズとともに用いられるガイド管の模式図であり、図7（B）は、ガイド管先端部分の拡大された模式的な断面図である。図中、ガイド保持部は、顕微観察システムの支持台14に固定される。

【図 8】図 8 は、マウスの体腔内に挿入された内視鏡の明視野像と蛍光像（とその模式的な説明図）である。実験に於いては、静脈血管が、AngioSenseの蛍光により明るくなっている（蛍光像）。細径レンズユニットの先端は、胃外壁の静脈血管の近傍に位置決めされた状態である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下に添付の図を参照しつつ、本発明を幾つかの好ましい実施形態について詳細に説明する。図中、同一の符号は、同一の部位を示す。

【0021】

in vivo顕微観察システムの概要

10

本発明の小動物の体内組織・細胞をin vivoにて顕微観察する方法の好ましい実施形態は、図 1 に示されている如き、in vivo顕微観察システム（オリンパス社 I V 1 0 0）を用いて好適に実施される。同図を参照して、顕微観察システム 1 0 は、概して述べれば、スティック型対物レンズ 1 2 と、これを支持する支持台 1 4 と、被検動物となる小動物 S を載置する基台 1 6 とから構成される。スティック型対物レンズ 1 2 は、図 1（B）に、より拡大して示されている如く、通常の対物レンズと略同型の外観を有する本体部 2 0 と、本体部の先端に接続された細径レンズユニット 2 2 とからなる。細径レンズユニット 2 2 の先端から本体部 2 0 までの内部には、通常の光学顕微鏡用の対物レンズと同等の倍率と開口数が達成されるよう複数のレンズが調整されて配列され（図示せず）、従って、細径レンズユニット 2 2 とその接続部 2 2 A を含め、スティック型対物レンズ 1 2 の該枠は、通常の光学顕微鏡用対物レンズと同様にステンレス等の金属部材により剛固に形成されている。また、スティック型対物レンズ 1 2 は、通常の正立型光学顕微鏡に取り付けられてもよいが、本実施形態に於いては、支持台 1 4 に備えられたスキャンユニット 2 6 に取り外し可能に取り付けられるよう構成されている。スキャンユニット 2 6 の内部には、レーザー走査型の蛍光顕微鏡の光学系が構成されており、図示していないレーザー等の光源からの光を受容して細径レンズユニット 2 2 の先端へ導き、細径レンズユニット 2 2 の視野内を照明光にて走査するためのガルバノミラーと、試料からの蛍光を光検出器へ導くダイクロイックミラー及びフィルタ等が備えられている（図示せず。）。スティック型対物レンズ 1 2 とスキャンユニット 2 6 とは、一体的に、支持台 1 4 にて上下動可能であり、かくして、細径レンズユニット 2 2 を所望の深さにて被検動物 S の内部へ差し込むことが可能となっている。スティック型対物レンズは、好適には、種々の倍率・開口数のものが準備され、観察目的に応じて、スキャンユニット 2 6 に適宜付け替えて使用できるようになっている。

20

30

【0022】

更に、本発明に於いては、上記の顕微観察システムとともに、図 2（A）に模式的に例示されている如き内視鏡 4 0 が被検動物の体内のより広い範囲を観察し、被検動物の体内に挿入された細径レンズユニット 2 2 の先端の位置を確認するために用いられる。内視鏡 4 0 は、直径 1 mm 弱（例えば、0.8 mm）の可撓性の挿入管部 4 2（P f 8 P 膈・胆管用）と、その一方の端に照明光を挿入管部 4 2 内へ伝達するためのカップリング及び挿入管部 4 2 の他方の端（先端 4 2 A）からの光を光検出器（CCD カメラ等）4 4 へ伝達するためのダイクロイックミラーを内包する基部 4 6 とを有する。挿入管部 4 2 には、図 2（B）に例示されている如く、その両端間に於いて光を伝達する光通路（光ファイバ）4 8 A と気体又は液体を基部 4 6 の側から先端 4 2 A まで送出する流体通路 4 8 B とが設けられていてよい。先端 4 2 A から照明光を出射する際には、通常の状態にて、レーザー又はランプの光が図示していないカップリングへ集光される。先端 4 2 A には、出射される光を或る程度集光するため及び動物の体内の像を得るために任意にレンズ（内視鏡の対物レンズ）が取り付けられていてよい。また、流体通路 4 8 B に流体を流し込む際には、内部に送出されるべき流体が充填されたシリンジ等 5 0 が接続され、シリンジ 5 0 のピストンを押すことにより、流体が基部 4 6 内の通路と挿入部 4 2 内の流体通路 4 8 B を經由して、先端 4 2 A の流体通路 4 8 B の出口から排出される。なお、内視鏡による動物の

40

50

体内の観察は、明視野観察又は蛍光観察により為されてよく、基部46内には、明視野観察及び蛍光観察のための光学系（図示せず）がそれぞれ構成され、適宜、切り換えて使用できるようになっている。

【0023】

かくして、上記の構成に於いては、顕微観察システム10の基台16に載置された被検動物Sの体内へ内視鏡40の挿入管部42と、スティック型対物レンズ12の細径レンズユニット22とが差し込まれ、内視鏡40にて被検動物Sの体内のより広い範囲と細径レンズユニット22の先端の位置を確認しつつ、スティック型対物レンズ12により、細胞レベル又は分子レベルにて観察部位の詳細な観察が行われる。

【0024】

10

観察方法

上記の如く、スティック型対物レンズ12による観察、即ち、光学顕微鏡による観察は、蛍光観察により行われ、内視鏡40による観察は、蛍光観察又は明視野観察により行われる。従って、スティック型対物レンズによる観察と内視鏡による観察の方法は、下記のいずれかにより行われてよい。

(1) 被検動物の観察部位を蛍光試薬により標識し、光学顕微鏡による観察と内視鏡による観察をかける蛍光試薬による蛍光観察にて行う。なお、蛍光試薬は、一種類でなくてもよい。また、内視鏡により蛍光観察する場合、蛍光像の解像度又は強度が光学顕微鏡による観察よりも低くなる場合には、内視鏡による観察の感度を増大すべく、光学顕微鏡による観察と内視鏡による観察とで用いる蛍光試薬は別々のものであってもよい。（内視鏡による観察に用いられる試薬の標識量を増大してもよい。） 20

(2) 被検動物として、蛍光タンパク質（GFP等）を遺伝子発現させた実験用小動物又は化学発光（ルシフェリンールシフェラーゼ等）をするよう遺伝子発現させた実験用小動物を用い、動物の組織に於ける蛍光又は発光により光学顕微鏡による観察と内視鏡による観察を行う。なお、光学顕微鏡による観察と内視鏡による観察のいずれか一方を遺伝子発現により得られる蛍光又は発光により行い、他方を蛍光試薬の標識による蛍光によって行うようになってよい。

(3) 光学顕微鏡による観察を上記(1)又は(2)の方法で行い、内視鏡の観察を明視野観察により行う。

【0025】

30

被検動物の準備

本発明の方法により観察される小動物は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の実験用の小型の哺乳動物であってよいが、ニワトリ等の鳥類、爬虫類、カエル、イモリ等の両生類又は魚類であってよい。観察部位は、典型的には、被検動物の体腔内の各種臓器であってよいが、内視鏡を挿入することができれば、動物の頭部、脚部、尾部等その他の部位であってよい。光学顕微鏡による観察又は内視鏡による観察を蛍光試薬による蛍光観察で行う場合には、被検動物は、観察に先立って、任意の蛍光試薬により、少なくとも観察したい範囲又は部位が蛍光試薬にて蛍光標識される。また、光学顕微鏡による観察又は内視鏡による観察を特に蛍光タンパク質や化学発光タンパク質の蛍光又は発光により行う場合には、そのような蛍光タンパク質又は化学発光タンパク質を任意の方法で遺伝子発現させた動物が被検動物として選択される。 40

【0026】

上記の如く、光学顕微鏡による観察は、蛍光観察により行われるので、好ましくは、被検動物の餌は、餌による自家蛍光を低減すべく、例えば、二日前に、通常の餌から蛍光除去餌へ切り換えられる（蛍光タンパク質又は化学発光タンパク質を遺伝子発現させた被検動物の場合も同様である。）。その上で、蛍光試薬の蛍光によって観察する場合には、蛍光試薬によって観察されるべき部位が蛍光標識されるよう蛍光試薬が被検動物へ経口又は静脈投与される。蛍光試薬としては、例えば、Prosense又はOsteroSense等の蛍光抗体試薬、AngioSenseなどの血管増影剤等であってよい。投与する時期は、使用する蛍光試薬の被検動物体内での反応時間と代謝・分解時間等を考慮して適宜決定されてよい。

50

【0027】

観察の手順

本発明による *in vivo* 顕微観察方法のいくつかの好ましい実施形態の観察の手順は、以下の如くである。

【0028】

第一の実施形態

本実施形態に於いては、概して述べれば、まず、被検動物の体腔内へ、スティック型対物レンズを挿入するのに先立って、内視鏡を差し込み、スティック型対物レンズにて観察すべき部位が特定される。その後、内視鏡を差し込んだ状態で、被検動物にスティック型対物レンズを挿入するための孔を開孔し、しかる後に、スティック型対物レンズの先端を前記の孔に差し込み、内視鏡で特定された部位が観察できるようスティック型対物レンズの先端の位置の調節及び確認を行う。具体的な手順は、以下の通りである。

【0029】

(a) 被検動物の観察直前の準備—前記の如く蛍光観察するべく準備された被検動物は、通常の *in vivo* 観察をする場合と同様に、麻酔処置が施される。被検動物の麻酔は、被検動物をイソフルラン気化暴露することにより或いは麻酔薬（ペントバルビタール、セボフルラン等）を規定量腹腔内注射することによりなされてよい。次いで、被検動物 S は、観察する臓器を上にした状態で顕微観察システム 10 の基台 16 上にテープ T 等により固定される（図 3（A））。なお、観察中に被検動物が覚醒しないように、イソフルラン気化ガスが被検動物の口及び鼻部に供給されるようになっていてよい。また、AngioSense等の代謝・分解時間の短い蛍光試薬を使用する場合には、被検動物の固定時に適宜静脈投与されてよい。更に、必要であれば、観察部位に毛が入り込むのを防ぐべく、観察部位近傍の表皮は、剃毛されてよい。

【0030】

(b) 内視鏡の挿入—基台 16 上に被検動物 S を固定した後、被検動物の観察したい臓器があると想定される部位からやや離れた部位の表皮を貫通するよう第一の小孔を開孔する。第一の小孔の開孔処置は、図 4 に例示されている如き、サーフロー留置針 60（例えば、テルモ社製、針ゲージ 14 G、長さは 1～2 インチ前後）を被検動物の表皮を貫通させることによりなされてよい。サーフロー留置針 60 は、図示されている如く、剛性を有する先端が鋭利な内針 62 に長さ 2～3 cm 程度の可撓性のカテーテル 64 を被せた状態のもの（図 4（B））である。なお、カテーテル 64 は、当初長いものを 2～3 cm 程度になるよう切断したものでもよい。サーフロー留置針を被検動物の表皮から体腔内へ貫通するよう差し込んだ後、内針 62 を引き抜くと、カテーテル 64 が表皮を貫通した状態で、カテーテルハブ 64 a とともに、被検動物 S に残され、かくして、カテーテル 64 が、内視鏡を挿入するための第一の小孔を形成することとなる（図 3（B））。なお、カテーテル 64 は、被検動物の表皮及び筋層に密着した状態にて貫通するので、カテーテル 64 により形成される第一の小孔は、被検動物の体腔内を外部から密閉可能な状態となっている。また、カテーテルハブ 64 a には、任意に内視鏡の挿入部を安定的に支持するべく、例えば、18 G の針等を用いて孔が形成されたゴムキャップ 66（PRNAdopter；BD 社製）が装着され、カテーテル 64 は、第一の小孔に於いて、内視鏡を導入するためのトラカール（外套管）として機能する（図 3（C））。

【0031】

かくして、内視鏡の挿入のためのトラカールが形成されると、内視鏡を挿入するのに先立って、トラカールのゴムキャップにシリンジ（例えば、容量 5 ml～10 ml）が接続され、体腔内へ気体を送出され、腹膜を膨張させて体腔内に空間が形成される。なお、このとき、気体により、腹膜が膨張することで、トラカールが体腔内まで貫通していることが確認できる（カテーテル 64 は、可撓性のため、表皮と筋層により容易に密閉されるので、体腔内の気体は保持される。）。その後、トラカールに内視鏡 40 の挿入管部 42 が挿通される（図 3（C）—（D））。なお、内視鏡の挿入管部に、上記の如く、流体を送出する手段が設けられている場合には、内視鏡をトラカールに挿入した後、気体を内視鏡

の流体通路を通じて体腔内へ送出するようになっていてよい。

【0032】

(c) 内視鏡による観察—上記の如く、内視鏡がトラカールに挿入されると、内視鏡により、体腔内の状態が観察される（内視鏡の像は、通常の態様にて、カメラ等の光検出器よりテレビモニター等に映像として映し出される。（図3（D）））。内視鏡による観察に於いては、内視鏡を手にて保持しながら、トラカールを挿入した第一の小孔を支点とし体腔内の広範囲を観察することができる。また、内視鏡では、明視野観察及び蛍光観察が可能なので、内視鏡の光学系を、明視野観察又は蛍光観察ができるように適宜切り替え（明視野の波長を適宜に選択することにより、明視野像と蛍光像とを同時に観察することも可能である。）、かくして、観察すべき臓器及び観察すべき部位が探索され特定される。この点に関し、内視鏡が被検動物の体腔内に挿入され、照明光が当てられると、照明されている領域は、実験者は、被検動物の外部からにより確認することができる（図3（D））。従って、かかる照明光の分布と内視鏡の像とから、被検動物の外部から或る臓器又は或る領域がどこに位置しているかを特定するが可能である。なお、内視鏡の先端部分が汚れて観察できなくなった場合は、その都度内視鏡を引き出し、挿入部の先端を洗浄し汚れが除去されてよい。

10

【0033】

(d) スティック型対物レンズの挿入—観察されるべき臓器又は観察部位が特定された後、その部位に近接する表皮から体腔内へ貫通する孔を開孔することにより、スティック型対物レンズの細径レンズユニットを挿入するための第二の小孔が形成される。かかる第二の小孔は、例えば、目的の臓器又は部位の上の皮膚（表皮）を1cm程度メス又ははさみで切開し、筋層を露呈した後、針などで筋層から腹膜を貫通することにより形成することができる（図5）。なお、第二の孔も筋層の収縮により体腔内が外部に対して密閉され、体腔内の気体は、容易に放出されない。かくして、体腔内まで貫通する孔が形成されると、対物レンズの支持台14上の対物レンズ12が降下され（図1（A））、細径レンズユニット22が第二の孔へ挿通される（図6）。

20

【0034】

なお、細径レンズユニット22を第二の孔に通す際、好ましくは、表皮の切開部位には、50 μ m程度の生理食塩水が載置される。その理由は、一つには、細径レンズユニット22は、水浸用に設計されており、従って、観察部位とレンズの先端とが水で満たされている際に、レンズの本来の設計性能が発揮され、良好な顕微鏡像が得られるからであり、もう一つには、観察部位の乾燥の防止及び細胞の壊死の防止のためである（純水を用いると細胞が壊死し易くなる。）。なお、細径レンズユニット22は、図7（A）に示されている如き、ガイド管70により覆われた状態で第二の孔に挿入されてもよい。ガイド管70は、先端が透明な部材により閉鎖されており、内部に液体を保持することができるように構成されている（図7（B））。従って、ガイド管70の内部に適量の水で満たして細径レンズユニット22をガイド管内に挿入し、細径レンズユニット22とガイド管の底面70Aとの距離を細径レンズユニット22の焦点距離に保持することにより、細径レンズユニット22の焦点が適正にガイド管の底面70Aに一致し、かくして、ガイド管の底面70Aを観察部位に当てることにより、観察部位の良好な顕微鏡像を得ることができることとなる。

30

40

【0035】

(e) 光学顕微鏡による観察—細径レンズユニット22を第二の小孔に挿入すると、図8の内視鏡像により例示されている如く、内視鏡の像により、細径レンズユニット22が被検動物の体腔内のどの位置にあるかが確認できることとなる。かくして、細径レンズユニット22の先端が目的の観察部位に向けられているかどうか（ガイド管70を用いる場合には、ガイド管の底面が観察部位に当てられているかどうか）を確認しながら、細径レンズユニット22の像の焦点を調節し、細径レンズユニット22による観察部位のin vivo蛍光観察が達成される。なお、既に述べた如く、本実施形態に於いては、顕微観察システムは、レーザー走査蛍光顕微鏡を実現するシステムであるので、良好な蛍光像を得るべく

50

、観察部位の特性に合わせたレーザー波長及びミラー等の光学系は適宜選択される。通常の蛍光観察と同様に、レーザーの波長、ダイクロイックミラー及びフィルターの波長特性は、使用する蛍光色素（又はタンパク質）の吸収・発光波長特性を考慮して決定される。化学発光を検出する場合は、励起光照明は行われなくてよい。

【0036】

もし目的の観察部位に細径レンズユニット22の先端が向けられない場合は、細径レンズユニット22の位置は、被検動物の体腔内の臓器又は組織を損傷せず、また、第二の孔を拡大しない程度に於いて移動されてよい。図示していないが、顕微観察システム10に於いて、スティック型対物レンズの向きを鉛直方向から傾斜できる機構が備わっている場合は、第二の小孔を支点として、スティック型対物レンズは傾けられてよい。なお、スティック型対物レンズの位置を移動する際にも、内視鏡により、細径レンズユニット22の位置が確認できるので、被検動物の体腔内が損傷されないよう細径レンズユニット22の移動することが従前に比して容易に実行できることは理解されるべきである。

10

【0037】

また、もし現在の第二の小孔からでは、目的の観察部位を観察することができない場合は、上記の(c)、(d)の過程が繰り返され、新たな小孔が開孔されてよい。この点に関し、第二の小孔の径は、細径レンズユニット22が貫通する程度の孔径でよいので、仮に、新たな孔を開ける必要があっても、従前の如く、数cmに及ぶ大きな孔を開ける必要がないので、被検動物の負担は、大幅に低減されることとなる。

【0038】

(f) スティック型対物レンズの交換一種々の倍率又は開口数（分解能）のスティック型対物レンズが準備されている場合には、観察の目的に応じて、第二の小孔から細径レンズユニット22を抜き出した後、別のスティック型対物レンズを支持台14（スキャンユニット26）に装着し、上記の(d)及び(e)の手順により観察が実行されてよい。既に第二の小孔は形成されているので、別のスティック型対物レンズの細径レンズユニットは、形成された第二の小孔へ挿通される。また、内視鏡で今まで観察された部位が容易に確認できるので、新たに挿入された細径レンズユニットの先端の位置を以前に観察されていた場所に一致させることも容易である。

20

【0039】

第二の実施形態

本実施形態に於いては、概ね述べれば、第一の実施形態と同様に、被検動物の体腔内へまず内視鏡を差し込み、スティック型対物レンズにて観察すべき部位を特定した後、内視鏡の流体通路から色素等を含む着色された液状物質を吐出して被検動物の外部から実験者により目視することのできるマーカー（目印）が動物の体内に付着される。マーカーは、観察部位そのものに適用されても良いが、実験者がそのマーカーを被検動物の外部から目視することにより観察部位の位置を特定できる部位に適用してもよい。そして、そのマーカーによって特定される被検動物の表皮に於いてスティック型対物レンズを挿入する孔が開孔され、スティック型対物レンズが挿入される。手順としては、(a)被検動物の準備から(c)内視鏡による観察までは、第一の実施形態と同様に行われてよい。これに続く操作は以下の如く実行される。

30

40

【0040】

(g) 観察部位のマーキング内視鏡により観察部位が特定された後、観察部位又はその周囲に内視鏡の挿入部の先端を移動し、挿入部の流体通路（図2B）を通じて着色された粘性のある液状物質を吐出して観察部位又はその周囲に付着させ、かかる粘性液状物質を観察部位のマーカーとする。着色された粘性のある液状物質は、例えば、インク等の染料を含有したローメルトアガー又はその他のゲル状物質であってよい。粘性液状物質は、内視鏡の基部46に於ける流体通路の端（図示せず）よりシリンジ等50を用いて押出される（図2A）。理解されるべきことは、マーカーの役割は、観察部位が被検動物の外部から目視により確認できることであるので、マーカーは、観察部位上に付着されるのではなく、観察部位の周囲又は近傍に付着されるようになっていてよい。なお、別の態様として

50

、内視鏡にて観察中に内視鏡の先端から出射する照明光が被検動物の外部より目視することができるときには、被検動物の外部から観察される照明光の分布から光学顕微鏡にて観察すべき部位の近接する表皮上にインク等でマーカを付与するようにしてもよい。かくして、マーカが付与されると、内視鏡は、被検動物から抜き出される。

【0041】

(h) スティック型対物レンズの挿入—観察部位又はその近傍にマーカが付与され、内視鏡が引き抜かれた後、好ましくは、被検動物の体腔内の気体が除去され、先に形成した空間が収縮される。これにより、表皮と観察部位とが近接し、観察部位又はその周囲・近傍に付与されたマーカの位置が被検動物の外部から確認しやすくなる。かくして、マーカの位置から特定される観察部位の上に近接する表皮から体腔内へ貫通する孔を開孔することにより、スティック型対物レンズの細径レンズユニットを挿入するための第二の小孔が形成される。かかる第二の小孔は、前記の第一の実施形態の場合と同様に、例えば、目的の臓器又は部位の上の皮膚（表皮）を1 cm程度メス又ははさみで切開し、筋層を露呈した後、針などで筋層から腹膜を貫通することにより形成することができる（図5）。かくして、体腔内まで貫通する孔が形成されると、対物レンズの支持台14が上下動され、細径レンズユニット22が第二の孔へ挿通される。また、細径レンズユニット22を第二の小孔に通す際、好ましくは、表皮の切開部位には、50 μ m程度の生理食塩水が載置される。

10

【0042】

(i) 光学顕微鏡による観察—かくして、細径レンズユニット22を第二の小孔に挿入し、細径レンズユニット22の像の焦点を調節することにより、光学顕微鏡による観察が達成される。既に述べた如く、顕微観察システム10は、レーザー走査型蛍光顕微鏡を実現するシステムであるので、観察部位の蛍光標識の特性に合わせたレーザー波長及びミラー等の光学系は適宜選択される。第一の実施形態の場合と同様に、観察の目的に応じて、スティック型対物レンズは、別の倍率又は開口数を有するものに交換されてよい。観察部位は、表皮の直下に存在するので、新たに取り付けられた対物レンズの視野は、内視鏡による位置の確認をしなくても、比較的容易に先に観察した部位に合わせることが可能である。

20

【0043】

以上の説明は、本発明の実施の形態に関連してなされているが、当業者にとって多くの修正及び変更が容易に可能であり、本発明は、上記に例示された実施形態のみに限定されるものではなく、本発明の概念から逸脱することなく種々の装置に適用されることは明らかであろう。

30

【0044】

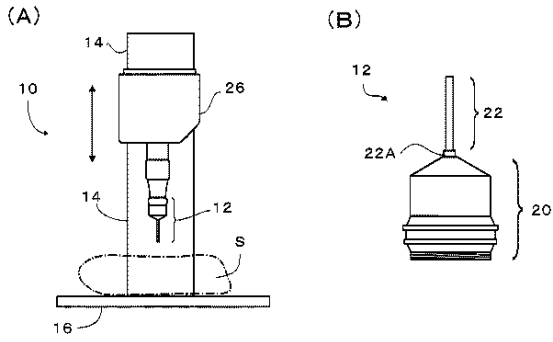
例えば、上記の実施形態に於いては、観察部位を内視鏡により予め特定してから第二の小孔を開孔する観察方法について説明したが、動物にスティック型対物レンズを挿入した後、その視野の位置を確認するために内視鏡が用いられてよいことは理解されるべきである。また、光学顕微鏡の観察として、蛍光観察する場合について説明したが、光学顕微鏡の観察に於いても内視鏡の照明光又は反射光等を用いて明視野観察が行われてもよい。

【0045】

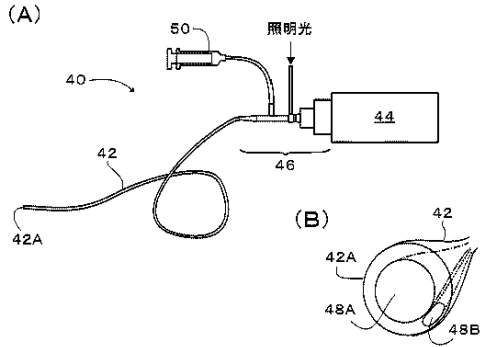
本発明の方法の重要な利点の一つは、被検動物の負担を低減することができるので、従前より長時間の観察が可能であることである。この点に関し、長時間観察が実施される場合には、投与した蛍光色素等が代謝・分解し、蛍光強度が低下することが有り得る。そのような場合、蛍光色素等の試薬は、適宜、観察中に投与されてもよい。また、蛍光色素による標識は、内視鏡の流体通路を介して、観察部位へ適用されてもよい。

40

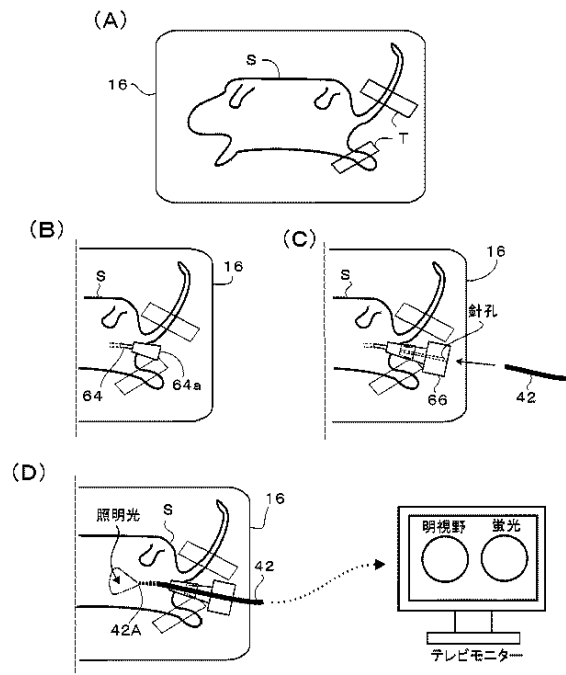
【図 1】



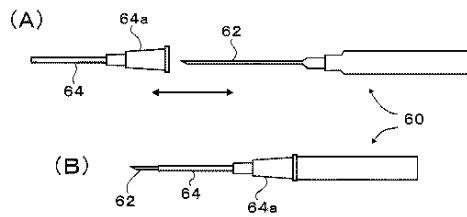
【図 2】



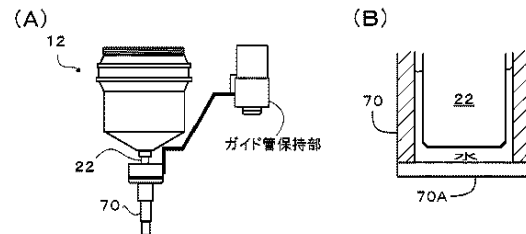
【図 3】



【図 4】



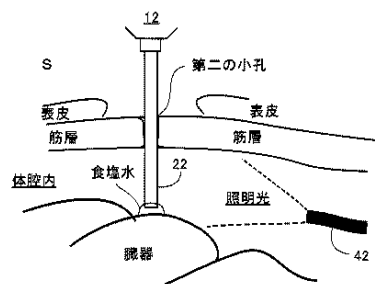
【図 7】



【図 5】

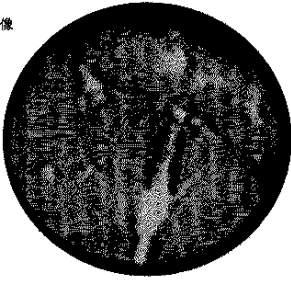


【図 6】

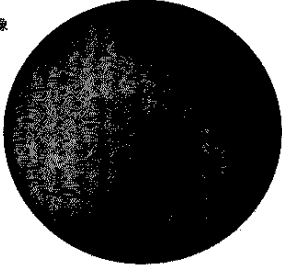


【図 8】

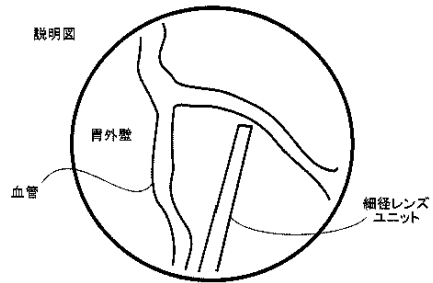
明視野像



蛍光像



説明図



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/068978
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61B1/00(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) A61B1/00		
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 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007		
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 A	JP 2005-121947 A (Olympus Corp.), 12 May, 2005 (12.05.05), & US 2005/094260 A1 & EP 1524542 A1	1-3, 6, 7 4, 5
Y	JP 11-332825 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 07 December, 1999 (07.12.99), (Family: none)	1-3, 6, 7
Y	JP 2000-245689 A (Fuji Photo Optical Co., Ltd.), 12 September, 2000 (12.09.00), (Family: none)	1-3, 6, 7
Y	JP 10-262908 A (Fuji Photo Optical Co., Ltd.), 06 October, 1998 (06.10.98), (Family: none)	6, 7
☒ 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		"I" 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 07 November, 2007 (07.11.07)		Date of mailing of the international search report 20 November, 2007 (20.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/068978

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 5-269079 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 19 October, 1993 (19.10.93), (Family: none)	6, 7
Y	JP 5-199979 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 10 August, 1993 (10.08.93), (Family: none)	6, 7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 8 9 7 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61B1/00(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 (IPC)) Int.Cl. A61B1/00			
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で利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 請求の範囲の番号	
Y A	JP 2005-121947 A (オリンパス株式会社) 2005.05.12, & US 2005/094260 A1 & EP 1524542 A1	1-3, 6, 7 4, 5	
Y	JP 11-332825 A (オリンパス光学工業株式会社) 1999.12.07, (ファミリーなし)	1-3, 6, 7	
Y	JP 2000-245689 A (富士写真光機株式会社) 2000.09.12, (ファミリーなし)	1-3, 6, 7	
☒ 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 07.11.2007		国際調査報告の発送日 20.11.2007	
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) 小田倉 直人 電話番号 03-3581-1101 内線 3292	2Q 9163

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 8 9 7 8
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 請求の範囲の番号
Y	JP 10-262908 A (富士写真光機株式会社) 1998.10.06, (ファミリーなし)	6, 7
Y	JP 5-269079 A (オリンパス光学工業株式会社) 1993.10.19, (ファミリーなし)	6, 7
Y	JP 5-199979 A (オリンパス光学工業株式会社) 1993.08.10, (ファミリーなし)	6, 7

フロントページの続き

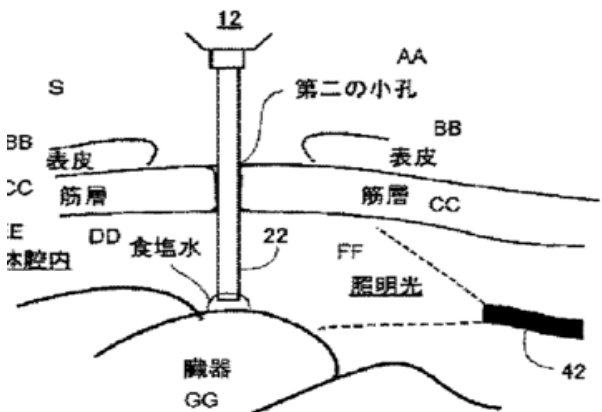
(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(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184条の10第1項(実用新案法第48条の13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。

专利名称(译)	小动物的显微观察方法		
公开(公告)号	JPWO2008044492A1	公开(公告)日	2010-02-12
申请号	JP2008538642	申请日	2007-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	奥林巴斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	奥林巴斯公司		
[标]发明人	樋口香織 笹岡ち乃		
发明人	樋口 香織 笹岡 ち乃		
IPC分类号	A61B1/00		
CPC分类号	A61B5/0071 A61B1/00172 A61B1/043 A61B5/0062 A61B5/0084 A61B2503/40		
FI分类号	A61B1/00.300.A A61B1/00.320.E A61B1/00.320.Z		
F-TERM分类号	4C061/BB08 4C061/DD01 4C061/DD04 4C061/HH51 4C061/LL03 4C061/NN09		
代理人(译)	明石AkiraAtsushi		
优先权	2006279849 2006-10-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在使用用于光学显微镜的棒型物镜的用于实验性小动物的体内显微镜观察方法中，可以识别动物体内的观察部位并且可以使用物镜而不会显著增加测试动物的负担。可以确认视野的位置。在本发明的用于在小动物体内显微观察组织或细胞的方法中，将内窥镜通过在小动物的表皮部分中开口的第一小孔插入，并且基于内窥镜的图像，该小动物 打开穿透外皮的第二小孔，并将棒型物镜的小直径透镜单元插入该孔中。在通过第一小孔插入的内窥镜的图像中观察小直径透镜单元的尖端的位置，并且小直径透镜单元的视野可以与要观察的部分对准。



AA. SECOND SMALL HOLE