

2.5.2 光学イメージング

(1) 研究開発領域の定義

細胞や動植物の組織の構造、細胞や動植物個体内で働く生体分子、および細胞内・細胞間シグナルの根幹をなす生体分子の相互作用や化学修飾を、時間的・空間的に可視化する基盤技術の開発を目的とした研究開発領域である。対象を生かしたまま計測出来る非侵襲性が特徴であり、代謝物、シグナル伝達物質、膜電位、血流などの計測により生理状態・機能状態の計測も可能となる。生命科学・医学分野の基礎研究では、蛍光プローブを用いた蛍光顕微鏡が最も普及しているが、蛍光顕微鏡をベースに時空間分解能や深達度などを高めた手法や、非蛍光標識および非染色のイメージング手法の開発も盛んに行なわれている。また、新たなアプローチとして、計算科学・情報科学技術を活用したコンピューショナルイメージングも注目を集める。基礎生命科学研究のみならず、創薬や医療などに貢献する技術となることが期待されるが、本領域では主に、生命科学・医学の基礎・前臨床研究を対象とした手法を扱う。

なお、複数の時空間スケールを対象とするイメージング手法の動向については、「トランススケールイメージング」領域も参照のこと。

(2) キーワード

光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、超解像顕微鏡、光シート顕微鏡、ラマン/コヒーレントラマン散乱、赤外吸収、光音響イメージング、コンピューショナルイメージング、蛍光プローブ、発光プローブ、in vivo イメージング、ナノ材料、近赤外蛍光、アルキンタグ、コアファシリティ

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

光学顕微鏡の登場が細胞の発見に繋がったことに代表されるように、光学イメージングは、生物・医学研究の発展にとって重要なツールである。特に、緑色蛍タンパク白質の発見に端を発して、生体を構成する物質および機能・生理状態を蛍光プローブ（蛍光色素および蛍光タンパク質）で染色する手法が急速に発展したことにより、1990年代以降は、特定の分子や構造を特異的かつコントラスト良く可視化できる蛍光顕微鏡法が生物・医学研究の標準的な手法として広く普及している。

「Seeing is believing」の言葉が表すように、従来は生体構造・生命現象を可視化する手法として位置づけられていたが、分子生物学やシステムバイオロジーのアプローチが主流になってきて以降、生命の分子化学的理解のための分析手法としての重要性が増してきている。生命の分子化学的理解は、生命現象に対する我々の知的欲求を満たすとともに、医療・診断技術の開発や疾患の原因解明に直結する課題である。生命科学におけるオミックスを始めとした分析技術の多くは、細胞を破碎して目的生体物質を検出する破壊分析法である。破壊分析法は、網羅的な情報を獲得する利点がある一方、時間的・空間的な情報を得ることが容易ではない。生体分子の真の生理機能を理解するためには、生物個体が生きた状態で非破壊的に、かつ定量的に生体分子を時空間解析する技術が不可欠であることから、侵襲性が低く、生きた状態を高空間分解能かつリアルタイムで観察できる光学イメージングは、生命科学研究において重要な役割を果たしている。

近年、顕微鏡光学系、光源（レーザー）、検出器（CMOSなどの撮像装置）、画像解析技術の進展と、蛍光色素や蛍光タンパク質などの蛍光プローブ技術の発展によって、蛍光顕微鏡をベースに生体の構造、構成物質の空間的・時間的分布、機能状態などを高い時間空間分解能で可視化・計測・定量化する様々な技術が

開発され、新たな生物・医学的発見をもたらしている。また、蛍光以外でも、ラマン散乱や光音響効果などの光・物質間相互作用を活用することで、蛍光では難しかった小分子の観察や、標識なしでの特定の分子・構造の観察を可能とする技術も開発されている。このように多岐にわたる光学イメージング技術は、生命科学分野の基礎研究だけでなく、疾患メカニズムの解明、診断、創薬、治療効果の確認など臨床も含めた医学分野においても広く活用されており、光学イメージングは生命科学や基礎・臨床医学の発展の重要なドライバーであると言える。

なお、光学イメージングは、病理診断、内視鏡、眼底検査、手術用顕微鏡など、医療機器として臨床現場でも利用されているが、本稿では生命科学・医学の基礎・前臨床研究を対象とした、いわゆる光学顕微鏡の技術開発の動向を中心に論ずる。

【研究開発の動向】

下村による緑色蛍光タンパク質 (GFP、ノーベル化学賞 2008 年) の発見以降、Tsien によるカルシウム蛍光指示薬 Fura-2 の開発など生体を構成する物質および機能・生理状態を蛍光プローブ (蛍光色素および蛍光タンパク質) で標識する手法が急速に発展した。Fura-2 が開発された当初は培養細胞を対象とした蛍光イメージングが主流であったが、その後 GFP を活用した蛍光タンパク質が盛んに開発され、1990 年代からは線虫やゼブラフィッシュ、マウスなどのモデル生物を対象に、遺伝子導入によって蛍光タンパク質を発現させ蛍光イメージングが行なわれるようになった。こうした蛍光プローブの開発に合わせて、励起光と比較して非常に暗い蛍光をコントラスト良く観察できる顕微鏡光学系や、従来のフィルム観察に対して動画観察が可能となった撮像装置 (CCD カメラ) などが開発されたことが蛍光顕微鏡普及の要因となった。一方、後述する超解像顕微鏡は顕微鏡法・光学系の開発に端を発しているが、手法に対応した蛍光プローブの開発が普及に寄与している。このように、生命科学・医学分野における光学顕微鏡の開発では、ハードウェアや計測・解析手法のような顕微鏡技術に加えて、蛍光を中心としたプローブ技術が非常に重要であり、これらの技術開発が両輪となって光学顕微鏡は発展してきた。

本節では、顕微鏡技術の開発とプローブ開発、それぞれの動向についてまとめる。

【顕微鏡技術】

これまで様々な顕微鏡技術が開発されており、それぞれ、標識の要否、可視化できる分子種・構造・物理量、時間分解能、空間分解能、S/N・コントラスト、視野・深達度、侵襲性・光毒性 (生体標本活性に対する励起光の影響) といった面で異なる特徴を持つ。これらの指標はトレードオフの関係にあるが、プローブや光学系、光源、検出器、解析手法の開発、さらに近年は計算機技術や AI の活用により、このトレードオフを打破しようとするのが、研究開発の基本的な方向性である。

現在、生物・医学研究においては、蛍光顕微鏡が光学イメージングの標準的な手法である一方で課題も存在し、その解決を目指した研究開発が進められている。様々なアプローチがみられるが、大きくは蛍光ベースの観察手法と非染色・非蛍光の標識による観察手法に分かれる。また、ハードウェアとしての光学系を用いて結像させる従来のアプローチに対し、光学系を計算科学・情報科学技術で代用・補完して像を形成するコンピュータシミュレーションイメージングと呼ばれるアプローチが、蛍光・非蛍光の観察手法共に取られるようになってきている。ハードウェアだけのアプローチでは実現が難しかった、全く新たな手法のトレードオフを破る手法の開発に繋がる可能性がある。

・ 蛍光ベースの観察手法

当初開発された蛍光顕微鏡は3次元観察が難しく、生細胞・生体観察には不向きであったが、1980年代に3次元での蛍光イメージングが可能な共焦点顕微鏡が市販化され、細胞生物学において標準的な手法となった。また、1990年にDenkとWebb（米・コーネル大）によって開発された2光子顕微鏡技術により、生きたままのマウスの脳の機能イメージングなど生体内（in vivo）イメージングが実現し、脳科学研究に大きく寄与した。両者とも、光源であるレーザーの汎用化とカルシウム指示薬を始めとしたプローブの性能向上が、普及の大きな鍵であった。

光の波動性（回折）から解決が難しいと考えられていた空間分解能の制限についても、我が国で開発された蛍光1分子イメージング技術をベースとして、蛍光の特性を利用することで回折限界を超えた分解能が得られる超解像顕微鏡法が開発された（ノーベル化学賞 2014 年）。大きく SMLM（単一分子局在化顕微鏡）、STED（誘導放出抑制顕微鏡）、SIM（構造照明顕微鏡）の3つに分類され、それぞれ Betzig（米・ジャーナリア研究所）、Hell（ドイツ・マックスプランク研究所）、Gustafsson（米・カリフォルニア大学）らにより考案、実証された。顕微鏡メーカーやアカデミアのスピンオフにより使い勝手の良い顕微鏡装置が市販化されたことで、生物・医学研究での利用が広がりつつある。

共焦点顕微鏡や2光子顕微鏡では3次元蛍光イメージングが可能だが、レーザーを3軸方向に走査して像を取得するため、時間分解能や光毒性に課題があった。それに対し、広範囲を照射可能なシート状のレーザーをカメラ結像光学系と垂直に当てることで、高速に3次元画像を得る光シート顕微鏡が2000年代に考案され、透明なゼブラフィッシュや光毒性の影響を強く受ける初期胚の観察を中心に利用が広がった。空間分解能が低い、光透過性の高い標本の観察に限られる、といった課題があったが、前者は Betzig らが開発した格子光シート顕微鏡、後者は宮脇（理研）らが開発した生体透明化手法との組み合わせにより克服されつつある。

・ 非染色・非蛍光の標識による観察手法

生体組織は散乱が強くそのままでは透過観察が出来ないことから、従来の顕微観察の対象は薄くスライスした組織切片や平面での培養細胞であった。一方、これらのサンプルは半透明（位相物体）でコントラストが弱く、透過観察時には固定・染色処理によりコントラストをつける必要があり、現在でも病理診断を中心に標準的に用いられる。一方、細胞や微生物などを生きたまま観察する方法として、専用の対物レンズや素子により光を干渉させて標本内の屈折率分布を可視化する手法である位相差顕微鏡（ノーベル物理学賞 1953 年）や微分干渉顕微鏡が用いられているが、レーザーの干渉により専用の光学素子なしで屈折率分布を定量化できる定量位相差顕微鏡法（QPI）が開発された。また、同じく干渉を利用して屈折率の異なる境界面を3次元イメージングする光干渉断層法（OCT）が、眼底検査装置など臨床を中心に利用されている¹⁾。

標識せずに特定の分子・構造を可視化するイメージングとして、蛍光以外の光・物質間相互作用を利用したラマン散乱顕微鏡、光音響顕微鏡や、励起光が不要な発光イメージングといった手法が注目を集めている。また、スペクトルが幅広いため多色化が困難であり、同時に計測を行なうことができる分子種の数に限りがあるという蛍光の欠点を補う標識手法として、これらの観察手法に対応したプローブも開発されている。

ラマン散乱は振動分光測定であるため分子の指紋を取得することができる。細胞内の生体分子でも、シトクロムcといった特徴的なラマン散乱を示す生体分子はラベルフリーで可視化できる²⁾。一方、ラマン散乱光は極めて低強度であり、イメージングへの利用は撮影に長時間を要するという課題があったが、レーザー技術や光学系の工夫によってラマンイメージングが数分オーダーの短時間で行えるようになった²⁾。さらに、（自

発) ラマン散乱と比較して強度が高いコヒーレントラマン散乱を用いた、CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) やSRS (Stimulated Raman Scattering) といった高速ラマンイメージング手法が発展した。広帯域のスペクトルを高速に取得する技術の進展により数秒オーダーでのイメージングが可能になったことから、ラマンイメージングの応用が広がりつつある^{3), 4)}。2019年に国際シンポジウム Biomedical Raman Imaging 2019が大阪で行われるなど、世界でのラマンイメージングの研究者が増えてきている状況である。ルシフェラーゼなどの生物発光を利用するイメージングは1990年代に台頭した。ルシフェラーゼは、化学反応エネルギーを発光に変換するため励起光を必要としないことから、蛍光イメージングと比較して高いS/Nを得ることができる。そのため、組織深部からのシグナルを検出するのに適しており、今や動物でのイメージングにおいて無くてはならない技術となっている。

光音響イメージングは、観察対象にパルス光を照射し、光を吸収した物質が放出する超音波を基に画像を構築するイメージング法である⁵⁾。光によって特定の吸収体を選択的に励起する光イメージングの利点と、生体深部のイメージングが可能な超音波イメージングの両方の利点を併せ持つイメージング手法であり、動物でのイメージングで新たに注目されている。

・コンピューショナルイメージング

光学理論によると、結像光学系を通して得られる像は、結像光学系の特性で決まる伝達関数によって被写体を符号化したもの、と捉えることができる。結像光学系全体もしくは一部を通常のレンズから変更し、検出されるパターンを計算機内で復号化することで被写体像を取得する、というアプローチを総称してコンピューショナルイメージングと呼んでいる。通常の画像処理と異なり、検出後の処理を前提とした結像光学系の変更を伴う点が特徴である。特に、半透明な細胞や強い散乱体である生体組織の非染色イメージングは通常の光学系では難しいことから、生物・医学分野におけるコンピューショナルイメージングの活用が注目されている。

こうしたアプローチを取る手法は、1960年代に発明されたX線CTを始め、複雑な光学系を使った結像が難しいX線や電子線のイメージングを中心に以前から少しずつ報告されていたが、独立した分野として形成されてきたのは2000年代になってからである。2010年代になって発展した、ベイズ推定・圧縮センシング・スパースコーディング、さらには機械学習などに代表される情報科学・計算科学を取り込むことにより、近年コンピューショナルイメージングのアプローチを取る手法が次々と開発されている。レンズを用いることなく像を取得するレンズレスイメージング⁶⁾が典型的な例であるが、コンピューショナルイメージングによって結像光学系が簡略化できるだけでなく、結像光学系を補完することでトレードオフを打破できる可能性がある。

そういった事例として、ライトフィールド顕微鏡および超解像顕微鏡技術のSIMが挙げられる。前者は、従来の顕微鏡がカメラを用いて取得した2次元画像を多数枚重ねることで3次元画像を再構築するのに対し、特殊なマイクロレンズ付きカメラにより光線の位置情報と確度分布を同時に記録することで3次元画像を一回の撮影で取得できるという手法で、線虫全身やマウス脳の複数領域における神経活動の蛍光による同時観察が報告されている^{7), 8)}。後者は、縞状などのパターンをもつ励起光を向きや位置をずらしながら撮影した複数枚の画像の演算により、単独の画像の2倍の分解能を持つ画像を取得する。

コンピューショナルイメージングは蛍光・非蛍光関わらず適用できるアプローチであり、こうしたアプローチにより発展を続ける情報科学・計算科学技術を活用することの重要性は、新たな手法の開発においてさらに増してくると考えられる。

【プローブ】

カルシウム蛍光指示薬 Fura-2 の開発 (1985 年) や緑蛍光タンパク質 GFP のイメージングへの応用 (1994 年) などの事例を皮切りに、蛍光イメージングは目覚ましい進歩をとげた。さらに 2000 年になると、1980 年代に無機材料化学で盛んに研究されていた蛍光性ナノ粒子が、量子ドットを筆頭として蛍光イメージングにも活用され始めることとなった。これら材料の改良や組み合わせにより、生体分子を特異的に認識し可視化するプローブが盛んに開発され現在に至っている。イメージング用プローブは材料の観点から、①有機小分子型プローブ、②タンパク質型プローブ、③無機材料型プローブに大別される⁹⁾。

波長の観点では、黎明期は可視域のプローブが専ら開発されていたが、可視領域の光を用いる励起・蛍光波長は組織透過性が悪く、小動物を用いた実験には制限があった。そこで、2000 年以降 650~900nm の近赤外発光を示す蛍光プローブの開発が盛んに進められており^{10), 11)}、さらに近年では更に高い組織透過性と低い自家蛍光から、1,000nm を超える光を用いた生体イメージングが注目されている¹²⁾。

また測定対象としては、特定分子を標識するだけでなく、カルシウム濃度を始めとしたマイクロ環境の計測用途のプローブも開発されている。温度プローブ¹³⁾ や膜電位プローブ¹⁴⁾ の開発は国内外で進められている他、タンパク質間相互作用や蛋白質の構造変化のモニタリングに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) などが活用されている。さらに、蛍光プローブの開発と平行して、発光、ラマン散乱、光音響イメージングといった観察手法に対応したプローブの開発も進んでいる。

以下、材料の観点からプローブ開発の潮流と現在のトレンドについて概説する。

・有機小分子型プローブ

蛍光プローブは Fura-2 をはじめ、イオンや分子の定量評価を目的とした 2 波長測光型のレシオメトリックイメージングが主流であったが、近年は生物個体でのイメージングを目的とした 1 波長型プローブ開発が盛んである。また、超解像イメージング用の蛍光プローブの開発も欧州を中心として盛んに行われており、特にタグタンパク質と有機小分子型プローブとを組み合わせた技術開発が盛んに行われている¹⁵⁾。その他、臨床検体への応用といった医学応用を目指した蛍光プローブの開発が行われ、実際に臨床現場への応用は大きなインパクトを与えている¹⁶⁾。新規蛍光プローブ開発においては、新たな分子骨格の設計と発蛍光原理の探索が重要な課題となっている。凝集有機発光 (Aggregation-induced Emission: AIE) 原理に基づく生体分子のイメージングは一つの研究分野となっており¹⁷⁾、中国では AIE 分子開発と細胞応用が非常に盛んである。平行して、近赤外発光や光安定性の向上¹⁸⁾、標的タンパク質特異的なラベル化¹⁹⁾ などは、現在も精力的に研究が進められている。

発光プローブについては、ルシフェラーゼ発光は酵素—基質反応であり、基質の誘導体をプローブとすることは 2000 年頃から開発が進められている。基質誘導体開発の潮流としては大きく 2 つの流れがあり、一つは基質の色変化であり、特に動物個体イメージングのための近赤外発光基質の開発は重要な課題である²⁰⁾。もう一つは可視化したい酵素に対する基質誘導体を作製し、酵素活性を発光シグナルとして検出するためのプローブ開発である²¹⁾。

ラマンイメージング向けのプローブは、蛍光プローブなどと比べて一般的にプローブの分子構造を小さくすることができる利点があり、標識した生体分子の機能への影響をより抑えられると考えられる。ラベルフリーでの細胞イメージングでは、時空間的に多種多様な分子が混在する細胞から特定の分子指紋を得ることは依然として難しいため、分子指紋領域外にスペクトル観測され、生体内には天然でほとんど存在しないアルキンを始めとしたタグによる標識技術に期待が集まっている。これまで、アルキン基を核酸や脂質などの生体小分

子に付加した分子を用い、アルキンが発する特異的なラマン信号を検出することで標的とした核酸や脂質分子局在の可視化が可能であることが示されている²²⁾。

光音響イメージングは、臨床向けでは赤血球などの内因性物質に基づくイメージング技術が開発されているのに対し、主に動物の観察において外部から導入するプローブも用いられる。コントラストの向上だけでなく、内因性物質に基づくイメージングでは観察できない生体分子を特異的にイメージングすることを可能にするため、標的分子の存在下で初めて光音響シグナルが発生する activatable 型光音響プローブの開発が盛んに行われている。

・タンパク質型プローブ

GFP とその誘導体の研究が進み、さらに外部光によりその発光特性を制御する第二世代の 蛍光タンパク質の開発が、この20年間精力的に研究が進められてきた。特に第二世代の 蛍光タンパク質は、超解像蛍光顕微鏡の開発に貢献しており、今も盛んに活用されている。また、長波長発光型の 蛍光タンパク質の開発が進展している。2009年には微生物由来の新たな 蛍光タンパク質が発見され、それ以来こうした微生物由来の 蛍光タンパク質の改良が著しく進んでいる。特に微生物由来 蛍光タンパク質は深赤色から近赤外領域の 蛍光を発するため、より短波長側に 蛍光を示す海洋生物由来 蛍光タンパク質と併用が可能で、また高い生体透過性が期待できる。近年の改良により、700nm 以上の 蛍光波長を示し、 蛍光強度も発見当初のものより数倍以上改善された 蛍光タンパク質が報告されている²³⁾。

細胞内シグナルを検出するプローブ開発では、特定の分子認識やタンパク質間相互作用や翻訳後修飾などを、光シグナルに変換するトリックが必要である。このトリックとしては、 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)、 発光共鳴エネルギー移動 (BRET)、タンパク質再構成法 (PCAs)、 蛍光相関分光法 (FCS)、 蛍光寿命イメージング (FLIM) などが用いられる。その基本原理は かなり出尽くしており、現在はこのような基本原理を活用して「見える」観察対象から「見たい」観察対象を、必要な時空間分解能でイメージングするためのプローブ開発が行われている。円順列変位型 GFP を用いてドーパミンに極めて迅速に応答するプローブ²⁴⁾ や、光コンバージョン 蛍光タンパク質 mEos の円順列変位型を用いてカルシウムシグナルに不可逆的に応答し神経活動履歴を長期的に記録するプローブ²⁵⁾ など、目的指向型のプローブ開発が行われている。また近年では、 蛍光タンパク質と Scale や CUBIC などの組織透明化法を組み合わせることによって^{26), 27)}、これまでの光学イメージングではみることができなかった全脳規模の生体深部の可視化を可能にしている。

さらに、 発光イメージングにおいて、基質の開発と平行して長波長発光型ルシフェラーゼの開発も行われ高い注目を集めている²⁸⁾。また、新たなルシフェラーゼの開発を目指し、真菌やキノコなど新たな生物種からの単離が盛んに試みられている²⁹⁾。

・無機材料型プローブ

CdSe の量子ドットは 蛍光の褪色がほとんど無く、粒子サイズの設計により 蛍光波長を紫外から近赤外まで選択できるため、イメージングの材料として2000年以降に應用が展開されてきた。粒子の表面はポリマーなどでコートすることにより、粒子そのものに機能を付与することも可能である。また、無機材料プローブは、 蛍光タンパク質や有機 蛍光分子と比較して光安定性が高く、かつ生体内で高い滞留性を示すため、生体内での長期 蛍光観察に適している。細胞を特異的にラベルして、動物個体内の細胞動態を追跡したり、個体内の生体分子単体の動きを捉えたりする技術は、量子ドットの特性を利用した典型例といえる³⁰⁾。

現在の潮流は、新しい機能性無機材料をイメージングに應用する研究にある。例えば、有機小分子型 蛍光

色素では難易度が高い1,000 nm以上の蛍光を発することができるナノ粒子の開発が盛んに行なわれ、より生体深部かつ高いS/Nの近赤外蛍光イメージングを可能にしている³¹⁾。また、従来の量子ドットは材料であるCd等有害金属による毒性が問題であったが、その毒性を克服するため、シリコンやダイヤモンドのナノ粒子をプローブとして用いる研究が進められている³²⁾。

光学イメージング分野、特に顕微鏡開発においては日米欧が長らく主要なプレーヤーであったが、中国が第4のプレーヤーとして急速に成長している。欧米から帰国した研究者を核として複数の研究拠点が戦略的に整備され、中国人研究者が育成され独自の業績が出始めている。すでに本分野の国際学会(SPIE BIOSなど)では、日本以上のプレゼンスを示している。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・超解像顕微鏡

引き続き、高時間・空間分解能化に向けた技術開発が進められているが、それに加え生物研究における利用の拡大を目指した動向が注目される。

顕微鏡法の開発としては、生細胞などの不均一な生物試料で安定的に高解像観察できるように、天体望遠鏡で開発が進んだ補償光学系や深層学習などを活用した手法の最適化が見られる^{33), 34)}。並行して超解像顕微鏡用のプローブ開発が盛んに行われており、蛍光タンパク質型プローブも精力的に開発されているが、有機小分子型プローブの方がより盛んである。独Max Plank研究所のKai Johnssonらは生細胞中のアクチンフィラメントやDNA、微小管を特異的かつ低バックグラウンドで蛍光検出できる、細胞透過性の有機分子型蛍光プローブの開発を行なっている³⁵⁾。

また、顕微鏡メーカーからもシステムが市販化されているが、大学・研究所からのスピノフとしてMax Plank研究所からAbberior社、Oxford大学からONI社などが立ち上がり、普及に寄与している。蛍光プローブでも、Max Plank研究所からSPIROCHROMEという会社が設立された。

・光シート顕微鏡

光シート顕微鏡は、励起と観察の光学系が垂直に配置されるという空間的制約から、観察対象のサイズによって装置構成が異なり、主に細胞や胚の動態観察を対象とする比較的小さいスケールと、組織・個体を対象とするマクロなスケールに分かれる。観察手法の技術面では成熟しつつあり、アプリケーションの拡大や市販化の動きが目立っている。

前者では、分解能が低いという欠点を克服した格子光シート顕微鏡をベースに、補償光学系を組み合わせることでオルガノイドなどの生体深部での高分解能3次元ライブイメージングが実現した³⁶⁾。また、格子光シート顕微鏡が米3i社の他、Zeissや独EMBLのスピノフであるLuxendo(現Bruker)から市販された。

マクロスケールでは、透明化した組織・個体が主な観察対象であり、生体透明化手法を開発するErtürk(ドイツ・ヘルムホルツ研究所)らが協力して開発したMiltenyi(旧La Vision)社の装置が代表的な市販化装置である。マウス全身での病態と抗体結合を、撮影や解析を半自動化してハイスループットに観察した事例など、創薬の前臨床研究での活用が期待される。また、現在の生検サンプルの一部をスライスして観察するという病理診断は網羅性に課題があるのに対して、光シート顕微鏡が活用できると考えられており³⁷⁾、生検標本観察を意識した構成の装置開発が行われている^{38), 39)}。

・メゾスコープ

焦点距離が長く開口数が大きい大口径のレンズを用いて、生体試料の広い範囲を同時に観察する技術が注目を集めており、Microscope（顕微鏡）に対してMesoscopeと呼ばれている。蛍光顕微鏡をベースとした手法と、3次元における広範囲の観察向けの、二光子顕微鏡をベースとした手法が近年になって報告されている。詳細は、本報告書の別項「トランススケールイメージング」を参照のこと。

・ラマンイメージング

アルキンタグ分子をよりラマン散乱計測に最適化された分子構造に改良する試みが行われており、アルキン構造の共役化によるラマン信号強度増強などが提案されている。これらの改良により現在では核酸（DNA, RNA）、タンパク質、脂質、糖類などの生体分子や外部から添加された薬剤の代謝過程を追跡できることが示されている。また、蛍光プローブに対するラマンプローブの利点の1つは、ラマン信号のスペクトル幅が蛍光スペクトルに比べ1/100程度しかなく、測定が多色化が原理的には容易である点である。多色測定の実現には、ピーク波長が異なるタグ分子群の分子設計が鍵であり、共役アルキン構造の構造変異を系統的に行うことでピーク波長が細かに異なるタグ分子を20種類開発したことが報告され、同時多色観測にも成功した⁴⁰⁾。これらのラマンタグを生体小分子へ修飾する技術が確立されれば、細胞内の種々の分子の時空間的变化を解析する強力な手法になると期待される。

観察手法としては、コヒーレントラマン散乱を用いた手法の開発が進む。非線形ラマンの高次過程を利用した超解像イメージング⁴¹⁾や誘導ラマンと蛍光のハイブリッド観察手法⁴²⁾、量子光源を利用した高感度化といった開発⁴³⁾の他、アプリケーションとして、ラベルフリーでのフローサイトメトリー⁴⁴⁻⁴⁶⁾を実現した例も報告されている。また、臨床検体におけるラベルフリーでのイメージング⁴⁷⁾やSRSによる脳腫瘍の術中検査⁴⁸⁾など、臨床現場への応用も試みられている。さらに、大阪大学の河田らによってラマン顕微鏡を販売するナノフoton株式会社が設立されるなど、新たな産業も誕生している。

・光音響イメージング

3次元断層像でリアルタイムに測定でき市販化されているMSOTなど、光音響イメージング装置の開発が世界中で行われている。米国ワシントン大学のLihong Wangらが世界の最先端を走っており、日本では、京都大学とキャノンの共同研究をベースとして、Luxonus社が臨床向けの装置を開発する⁴⁹⁾。克服すべき課題としては、感度の低さとその低感度に由来する時間分解能の低さが挙げられる。

光音響プローブの開発では、標的とプローブの相互作用により光音響信号強度が変化するactivatable型のプローブ開発が活発であり、光音響イメージコントラストの大幅な向上に成功している。信号強度の変化には、標的分子との相互作用によるプローブの光吸収特性の変化を利用したものが多く、酵素、活性酸素、金属イオンなどの化学種検出のみならず、pH、温度、酸素濃度などの細胞環境を標的としたプローブが報告されている⁵⁰⁾。

・その他の非染色イメージング

ラマン散乱と同じく分子振動を用いた手法として、赤外吸収を用いた細胞イメージングの研究が進んでいる。赤外吸収は、自発ラマン散乱よりも感度が良いものの、波長の長い光を用いることから空間分解能が悪く、細胞イメージングには用いられてこなかったが、可視光イメージング手法と組み合わせることで分解能向上を目指した開発^{51), 52)}や、赤外吸収に適したプローブの開発⁵³⁾が行なわれている。特に、技術開発の進んだ

定量位相顕微鏡との組み合わせの発展が期待される⁵⁴⁻⁵⁶⁾。

定量位相イメージングは、非線形光学効果 (SHG) との組み合わせによるトモグラフィ手法⁵⁷⁾ やダイナミッククレンジ拡大手法⁵⁸⁾ といった技術開発も行われているが、技術的には成熟しつつありアプリケーション拡大に比重が移ってきており⁵⁹⁾、英 Phasefocus 社のような装置開発のスタートアップも出てきている。

また、これまで可視化できなかったパラメータを用いたイメージング手法として、非接触で機械特性 (粘弾性) が計測できるブリルアン散乱を用いたバイオイメージング⁶⁰⁻⁶²⁾ や、生体高分子 (主にタンパク質) の散乱パターンから質量イメージングを行なう干渉散乱顕微鏡 (Interferometric scattering microscopy : iSCAT)^{63), 64)} が注目され、特に前者はメカノバイオロジーでの活用が期待される。

・コンピュータショナルイメージング

コンピュータショナルイメージングは、計算機内での復号化を前提としており、また情報科学分野の進展を素早く取り込む分野でもあることから、散乱体越しのレンズレスイメージングの事例⁶⁵⁾ など、イメージング手法の中では機械学習の適用が早くから進んだ。従来の幾何光学や波動光学の理論をベースとした数値計算による復号化に対し、機械学習は学習データを用意する必要はあるものの、完成した学習モデルによる復号は高速に行なえるメリットがある。生命科学において注目される例としては、蛍光顕微鏡画像と非蛍光顕微鏡画像を機械学習により紐付け、計算機内で非蛍光画像から蛍光画像の変換を行う仮想染色技術が挙げられる^{66), 67)}。また、復号化前のシグナルは人が認識できる画像ではないものの被写体に関する情報は含まれることから、復号化前のシグナルを画像生成プロセスなしに直接機械学習にかけて解析を行なうことで、イメージングと解析を合わせたプロセス全体の負荷の軽減や高速化を図るという考え方が出てきており、こうしたアイデアに基づいた高速イメージングフローサイトメトリーが実証されスタートアップも立ち上がるなど^{68), 69)}、成果も出てきている。

また、生命科学以外の領域も含めてコンピュータショナルイメージングで注目される技術としては、time-of-flight を利用した LiDAR (Light Detection and Ranging) が挙げられる。自動運転などで注目されるこの技術は、コンピュータショナルイメージングにより超低侵襲 (低光毒性) 化を実現した研究⁷⁰⁾ を契機として、コンピュータショナル分野で活発に研究が行なわれ LiDAR の高性能化に貢献している。

・超多重染色

蛍光はスペクトルが広く、単純な波長分離による多重染色の蛍光観察は限りがあったが、プローブや分光技術の開発と、大容量データを伝送・解析する技術の進歩に伴い、これまでは難しかった、多数種のプローブを用いた超多重染色による研究事例が相次いで出てきている。蛍光ベースの手法では、固定標本や透明化標本に対して、蛍光染色、観察、脱染色の操作を繰り返すことで超多重染色と同等の効果を得る方法が開発されている⁷¹⁾。また、これまでは特異的な多重標識には抗体が標準的に用いられてきたが、プローブに DNA や RNA を用いることで、配列設計により結合の特異性を保ちつつ識別可能なプローブ種類を増やすことができることから、イメージングによるトランスクリプトームの空間分布解析技術などで注目を集めている^{72), 73)}。また、波長スペクトル幅の狭いラマンプローブや、蛍光波長に加えて蛍光寿命を計測する FLIM の利用も注目される。FLIM は、検出器の開発や後段の伝送系の高速化により、共焦点顕微鏡や専用カメラでのイメージングが汎用化しつつある。解析においては、多重染色観察の結果から、前提知識なしに細胞内構造をマッピングするといった結果も報告されており^{74), 75)}、AI や数理学の活用により新たな知識を見出すツールとなりうる。

・近赤外光線免疫療法 (Near-infrared photoimmunotherapy : NIR-PIT)

近赤外光線免疫療法は光免疫療法 (Photoimmunotherapy : PIT) とも呼ばれ、近赤外蛍光色素である IR700 と結合した抗体を用いた治療法であり、IR700を結合した抗体が標的細胞に結合したのちに近赤外線を照射することで励起した IR700 が細胞膜を傷害し、標的細胞特異的に細胞死を誘導する技術である⁷⁶⁾。本治療法は現在、米国及び日本において臨床試験が行われており、今後、本治療薬の開発が競って行われると予想される。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

研究拠点としては、米国のハーワードヒューズ財団のジェネリア研究所がプローブ開発および顕微鏡開発の拠点として機能している。ハーワードヒューズ財団からの研究支援の一環としてイメージング支援事業にも力を入れており、ユーザーのニーズを開発者にフィードバックする仕組みとしても有効に機能している。技術開発の面では、細胞全体の電子顕微鏡と超解像顕微鏡、光格子シート顕微鏡と透明化技術を活用したエキスパンション顕微鏡など、高度な技術を要するモダリティの組み合わせた事例は、ジェネリア研究所以外では開発が難しいと言えよう^{77), 78)}。脳アトラスや細胞アトラスの作成を進めるアレン研究所や、サンフランシスコ近郊の若手研究者への研究支援やヒト細胞アトラス (HCA) プロジェクト、米国内バイオイメーキング拠点への支援事業を行なうザッカーバーグ財団も注目される。また NIH においても、4Dヌクレオームや BRAIN イニシアチブなど、バイオイメーキングを技術的な核の一つとした大型プロジェクトが進められている。

欧州では、EMBLが中心となってイメージング技術の標準化と普及を目的とした Euro-Bioimaging 事業が進められている。日本でも、科研費で先端バイオイメーキング支援プラットフォーム (ABiS) という支援事業が行われている。いずれも技術開発よりはユーザーのための支援事業の側面が強いが、Euro-Bioimaging においては標準化が強く意識されていることは注意すべきである。

新学術領域「シンギュラリティ生物学」は、生物学的命題を掲げた上で、多くの企業が技術サポートとして参画し新たなイメージング技術を異分野融合で開発することを計画しており、今後の進展が注目される。プローブ開発に特化した政策課題やプロジェクトは、国内外を探してもほとんど無く、多くはバイオイメーキング技術開発の一翼に位置づけられている。コンピュータショナルイメージングにおいては、米国 DARPA の REVEAL (Revolutionary Enhancement of Visibility by Exploiting Active Light-fields) プロジェクト⁷⁹⁾ や、日本の学術変革領域の「散乱・揺らぎ場の包括的理解と透視の科学」領域などが注目される。

(5) 科学技術的課題

顕微鏡技術における第一の課題・開発目標は、分解能であったが、特に生体イメージングへの応用という観点からは、高速・3次元・深部・in toto (全体) の4つが現在の中心的な開発課題である。取得されるデータ量が膨大になることから、イメージング技術だけでなく画像解析技術も合わせて考える必要がある。また、イメージングを分析手法として用いるために、計測の定量性も重要な課題である。蛍光プローブを用いて定量情報を取得する手法として、カルシウム蛍光プローブを用いた二波長測光イメージングによる定量評価法は原理が確立されているが、この原理を他の生体分子に応用した例は必ずしも多くはなく、絶対量を測定することは未だ様々なハードルがある。画像解析技術に加え、顕微鏡システムを含めた試料の標準化を進めることが有効であると考えられる。

プローブ技術という観点からは、脂質や代謝産物の可視化が重要な課題と言える。有機小分子型蛍光プローブやタンパク質型プローブは、様々なイオンや標的タンパク質の可視化を実現してきた一方で、脂質やそ

の代謝物、また神経伝達物質やエネルギー産生に関与するような代謝産物の可視化は、まだまだ発展途上にある。これらの分子を従来の分子プローブ設計で蛍光・発光により可視化を試みることは勿論のこと、ラマンプローブによる可視化も試みられている。

プローブ開発の予算に関して、有機小分子型蛍光プローブや蛍光タンパク質を基盤とした蛍光プローブの何れにおいても依然として可視化したい標的生体分子が多く存在することから、日本では新たなイメージング技術の開発に注力して予算が投資される傾向がある。一方、既存の蛍光イメージング技術は、依然としてその時空間分解能から最も生体イメージングに適した技術であり、依然として従来の蛍光イメージングに準じた技術開発は重要である。例えば、in vivoにおいて従来のカルシウムセンサーよりも正確な活動電位の記録が可能な膜電位センサーの開発が、米国グループによりScience誌に報告されるなど⁸⁰⁾、まだまだ行なうべき課題が多くある。

今後、イメージング技術革新のドライバーとなるのは、機械学習に代表される高度化された情報科学技術を活用したコンピューショナルイメージングのアプローチであろう。既に、超解像顕微鏡やライトフィールド顕微鏡など、情報科学技術を活用することで従来の技術限界を超える性能を達成した例の報告が米国を中心に相次いでいる。それに対し、日本は既存の光学系イメージングに強みがあったこともありこうした動きは限られていたが、近年になって前述の高速イメージングフローサイトメトリーや、周波数分割多重化技術を活用した高速共焦点顕微鏡⁸¹⁾などの成果も生まれてきている。こうした流れを加速するには、日本が従来強みをもつ光学技術やプローブ技術に対して、計算科学・情報科学技術など様々な技術を柔軟に取り入れることが可能なマルチディシプリナリな開発体制が求められる。

(6) その他の課題

日本は、光学イメージング・顕微鏡の技術開発において、世界に伍する地位を占めてきた。しかし、これまで述べてきたように、光学イメージングの開発は近年急速に分野横断的な性質を強め、無機・有機化学、タンパク質科学、光学、オプトエレクトロニクス、計算科学など様々な分野をカバーする学際的アプローチの重要性が高まっており、光学イメージングの技術開発において、従来の光学技術の占める役割は相対的に減少している。本分野の動向に対応した研究開発体制を構築しなければ、日本の相対的地位の低下は免れない。日本でも学際研究や異分野融合が謳われて久しいが、分野間・組織間の壁は高く、未だ有効に機能しているとは言いがたい。このような状況を制度面、ファンディング面などから複合的に打開する方策が必要である。また、研究環境も重要なファクターであり、例えばスタンフォード大学やハーバード大学などの米国トップの大学では、必ずしも研究室毎に部屋分けされるのではなく、共通スペースや研究室スペースが一部融合することで効率良く異分野融合ができる環境にある。

最先端の光学イメージング装置は、高度に複雑化されたシステムとなっている。価格と運用のいずれの面からも、各研究室で個別に所有・維持・利用することは困難かつ非効率になっていることから、共同利用施設(コアファシリティ)に機器や技術者を集めて効率的に運営するという動きが世界各国でますます顕著になってきている⁸²⁾。高度な計測を行なう上では、単純な機器のオペレーションだけでなくハード・ウェット・ドライのさまざまな知識と技術が必要であり、コアファシリティはそういった技術も集まる。また技術開発の面では、特に欧州において、ユーザーである生物・医学研究者と(アカデミアの)技術開発者、機器メーカーをつなぐハブとしての機能も無視できない。日本でも、一部の大学や研究機関では最先端のイメージング機器の導入が進められているが、スキルを持った技術者が不足しており、一般の生物・医学研究者が最先端イメージング技術を駆使して研究を実施することが難しい状況になりつつあるため、日本でも技術者を配したコアファ

2.5

俯瞰区分と研究開発領域
 基礎・計測技術
 基礎・計測技術

シリティの整備を進める必要がある。

このような状況の中で、日本の技術開発の現状を打破する方策として、医学、工学、薬学、分子生物学、物理学、化学、材料、情報科学等の諸関連分野の研究者が、分野を超えて連携し研究開発を行う学際的なイメージング研究開発プラットフォームを構築することが考えられる。その場合、このプラットフォームで開発された最先端イメージング装置を一般の研究者の利用のために開放し、共同利用する体制を予め設計しておくことが極めて重要である。これにより、最先端の技術成果を速やかに個別研究へ展開できるだけでなく、開発現場に利用者からのニーズが速やかにフィードバックされ、生物・医学研究の発展に寄与する実用的な技術開発を効率的に進めることができる。また、産学連携の拠点ともなりうることから、制度やファンディングに加え知財面でのサポートが重要となる。研究開発と利用を統合したプラットフォームとして特筆すべき事例は、米国ハーワードヒューズ財団のジェネリア研究所であり、これを先行成功例として体制構築が望まれる。

また、異分野融合において、人材育成は重要なファクターである。異分野融合や新しい学問の構築を通して本当の意味での科学の進歩に貢献する研究に、若手研究者が取り組んでいくことが必要であると考えられるが、現状は博士進学者が減少しているのに加え、若手研究者の任期無しのポジションが減少して安易に成果が得られる研究に流れる傾向があることは否めない。若手研究者が挑戦できる研究環境づくりが不可欠であるとする。

イメージングデータに基づいたデータ駆動型生命科学を推進するためには、さまざまな研究者が取得したイメージングデータの蓄積、そしてそれらを統合的に解析する上で前提となるデータ形式や計測方法の標準化・規格化が重要となる。欧州Euro-Bioimagingでは、データ蓄積のための共用のストレージ、およびデータ形式の標準化の検討が行なわれており、特にデータ形式についてはこれまで各メーカーの独自形式で保存されてきたことから、産学での議論が行なわれている。基礎研究における光学イメージング手法や解析手法は非常に多岐に渡ることから、計測方法やデータの質に関する標準化の議論は必ずしも進んでいるとは言えないが、Human Cell Atlasのような大規模プロジェクト、またコアファシリティ間のコミュニティを通じて、標準化の議論が進展する可能性はある。産業および国家戦略としての標準・規格の重要性は議論を待たない一方、日本単独での標準の構築は不可能であるため、こういった状況を注視し、日本の産学も積極的に議論に参加していくことが必要だろう。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	↘	これまでの顕微鏡技術をベースにした研究開発に加えて、コンピュータシヨナルイメージングなどで従来技術の枠を超える成果もあがっているが、人材の層が薄く研究発表件数は減少の一途。 有機小分子型プローブ開発は、有機合成化学の伝統的な強みを下支えとして、世界的を先導した研究を展開している。タンパク質プローブは、近赤外ルシフェラーゼの開発など、先駆的な研究が進められている。一方、無機材料を利用するイメージングはやや後発的である。
	応用研究・開発	○	↘	既存メーカーの有する光学部品や検出器といった要素技術は世界トップレベルにあるが、イメージング技術開発における産学連携が活発とは言えず、新技術への対応はスピード感に欠ける。ラマン顕微鏡やイメージングサイトメトリーなど、アカデミア発のベンチャーが出てきつつあり、今後普及に至るかが注目される。 有機小分子型プローブ開発の代表的な応用研究は、浦野等が進めている癌診断のための蛍光プローブや、永井等が開発した高輝度の生物発光タンパク質などが挙げられる。プローブの生命科学研究への応用例も数多くある。
米国	基礎研究	◎	↗	これまでの顕微鏡技術の研究グループだけでなく、フォトンクスから計算・情報科学まで様々な人材が流入し、イノベーションの種となるような新しい成果が継続的に生まれている。 新しい蛍光・発光・ラマンプローブはアメリカ発が多くを占めている。特に有機合成化学、タンパク質化学ともに、戦略的かつ体系的に研究を進めており、世界をリードする研究が進められている。世界的なリーダーとなるイメージング研究者を挙げれば枚挙に暇無い。
	応用研究・開発	○	↗	大手顕微鏡メーカーを国内に持たないこともあり、研究成果の製品化・市販化は日本あるいは欧州メーカーへのライセンスか中小・ベンチャーからのニッチ的製品に留まるものが多かった。近年、後者がM&Aにより欧米の大手研究機器企業から市販されるケースが増えつつある。プローブ開発のシーズと生命科学研究者とのニーズが協働して世界を先導する成果が発信されている。特に蛍光だけでなく、様々なマルチモーダルなイメージングに関して、世界のトレンドを米国が牽引している印象を持っている。
欧州	基礎研究	◎	→	従来の顕微鏡技術における分厚い蓄積をベースに最先端の研究まで手広く展開されているが、コンピュータシヨナルイメージングでは米国に見劣りする。 蛍光・発光プローブに関しては、化学小分子は精力的であるものの、タンパク質プローブ開発は後発的である。
	応用研究・開発	◎	↗	顕微鏡メーカーが継続的に新技術を製品化しているのと同時に、研究者自身がスピンアウトして最先端の研究成果を市販化するなど、大手メーカー、中小・ベンチャーがバランスよく展開している。 独国Max PlankのHell等を中心に、超解像顕微鏡およびその蛍光プローブの開発が盛んであり、スタートアップも起ち上がっている。

2.5

俯瞰区分と研究開発領域
 基礎・計測技術
 基礎・計測技術

中国	基礎研究	○	↗	欧米から帰国した研究者が核となって中国各地に研究拠点が形成されている。そこで育った研究者からの研究発表が始まっている。学会発表件数では日欧を凌駕し米国に迫る勢いである。後追いの研究も少なくないが、超広視野イメージング ⁸³⁾ などオリジナルな研究成果も出始めている。蛍光タンパク質プローブの開発はあまり精力的に行なわれていない一方、有機小分子プローブの開発が近年盛んになってきた。ただし依然として後発的なプローブが多い。Aggregation-induced emission (AIE) の研究は、2000 年以降中国で基礎・応用ともに爆発的に研究が展開されている。
	応用研究・開発	△	↗	光学技術では見劣りするものの、深圳周辺の高い技術力・製造能力を背景に、レーザーやカメラなどの周辺機器では国際的な性能・品質のものが登場している。今後も成長が予想される。プローブを用いた生物応用はあまり進んでいない。全体的に、早期に成果が得られる研究が多い印象。
韓国	基礎研究	△	→	欧米から帰国した研究者も少なくないが、研究拠点としての支援が弱く、第2世代の育成やオリジナルな成果には至っていない。Yong-Keun Park (KAIST) が定量位相顕微鏡の世界的な研究リーダーである。
	応用研究・開発	△	↗	ベンチャー企業によるニッチな製品もみられ、米国企業による M&A で市販化された事例もあるものの、全体として見劣りする。有機小分子型蛍光プローブに関しては、Young-Tae Chang (POSTEC) や Seung Bum Park (ソウル国立大) が中心となり、蛍光プローブを基盤とした研究を展開している。しかし、その他イメージングプローブの開発研究では目立った研究者がいない印象。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

関連する他の研究開発領域

- ・バイオイメージング (ナノテク・材料分野 2.2.4)
- ・ナノ・オペランド計測 (ナノテク・材料分野 2.6.3)

参考・引用文献

- 1) 25 Year Anniversary of Optical Coherence Tomography. https://www.osapublishing.org/boe/virtual_issue.cfm?vid=336 (2021年2月1日アクセス)
- 2) A. F. Palonpon et al., "Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells", *Nat. Protocol* 8, no. 4 (2013) : 677-692. doi : 10.1038/nprot.2013.030
- 3) J. -X. Cheng and X. S. Xie, "Vibrational spectroscopic imaging of living systems : An emerging platform for biology and medicine", *Science* 350, no. 6264 (2015) : aaa8870. doi : 10.1126/science.aaa8870

- 4) D. Polli et al., "Broadband Coherent Raman Scattering Microscopy", *Laser Photonics Rev.* 12, no. 9 (2018) : e1800020. doi : 10.1002/lpor.201800020
- 5) L. V. Wang and J. Yao, "A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences", *Nat. Methods* 13 (2016) : 627-638. doi : 10.1038/nmeth.3925
- 6) S. O. Isikman et al., "Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip", *Proc Natl Acad Sci USA* 108, no. 18 (2011) : 7296-7301. doi : 10.1073/pnas.1015638108
- 7) R. Prevedel et al., "Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy", *Nat. Methods* 11 (2014) : 727-730. doi : 10.1038/nmeth.2964
- 8) O. Skocek et al., "High-speed volumetric imaging of neuronal activity in freely moving rodents", *Nat. Methods* 15 (2018) : 429-432. doi : 10.1038/s41592-018-0008-0
- 9) Ozawa T, H. Yoshimura and S. B. Kim, "Advances in fluorescence and bioluminescence imaging", *Anal. Chem.* 85, no. 2 (2013) : 590-609. doi : 10.1021/ac3031724
- 10) R. Weissleder and V. Ntziachristos, "Shedding light onto live molecular targets", *Nat. Med.* 9 (2003) : 123-128. doi : 10.1038/nm0103-123
- 11) R. Weissleder, "A clearer vision for in vivo imaging", *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) : 316-317. doi : 10.1038/86684
- 12) A. M. Smith, M. C. Mancini and S. Nie, "Second window for in vivo imaging", *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) : 710-711. doi : 10.1038/nnano.2009.326
- 13) K. Okabe et al., "Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy", *Nat. Commun.* 3 (2012) : 705. doi : 10.1038/ncomms1714
- 14) H. Tsutsui et al., "Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase", *J. Physiol.* 591, no. 18 (2013) : 4427-4437. doi : 10.1113/jphysiol.2013.257048
- 15) L. Wang et al., "Small-molecule fluorescent probes for live-cell super-resolution microscopy", *J. Am. Chem. Soc.* 141, no. 7 (2019) : 2770-2781. doi : 10.1021/jacs.8b11134
- 16) H. Kobayashi et al., "New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging", *Chem. Rev.* 110, no. 5 (2010) : 2620-2640. doi : 10.1021/cr900263j
- 17) Y. Hong, J. W. Y. Lam and . Z. Tang, "Aggregation-induced emission", *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) : 5361-5388. doi : 10.1039/C1CS15113D
- 18) T. Ikeno, T. Nagano and K. Hanaoka, "Silicon-substituted xanthene dyes and their unique photophysical properties for fluorescent probes", *Chem. Asian. J.* 12, no. 13 (2017) : 1435-1446. doi : 10.1002/asia.201700385
- 19) K. Amaike, T. Tamura and I. Hamachi, "Recognition-driven chemical labeling of endogenous proteins in multi-molecular crowding in live cells", *Chem. Commun.* 53, no. 88 (2017) : 11972-11983. doi : 10.1039/c7cc07177a
- 20) T. Kuchimaru et al., "A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging", *Nat. Commun.* 5 (2012) : 11856. doi :

2.5

俯瞰区分と研究開発領域
 基礎・計測技術
 基礎・計測技術

- 10.1038/ncomms11856
- 21) R. Kojima et al., “Development of a sensitive bioluminescence probe for imaging highly reactive oxygen species in living rats”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 127, no. 49 (2015) : 14981-14984. doi : 10.1002/ange.201507530
 - 22) H. Yamakoshi et al., “Alkyne-tag Raman imaging for visualization of mobile small molecules in live cells”, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 51 (2012) : 20681-20689. doi : 10.1021/ja308529n
 - 23) D. M. Shcherbakova et al., “Near-Infrared Fluorescent Proteins : Multiplexing and Optogenetics across Scales”, *Trends Biotechnol.* 36, no. 12 (2018) : 1230-1243. doi : 10.1016/j.tibtech.2018.06.011
 - 24) T. Patriarchi et al., “Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors”, *Science* 360, no. 6396 (2018) : eaat4422. doi : 10.1126/science.aat4422
 - 25) B. F. Fosque et al., “Neural circuits. Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators”, *Science* 347, no. 6223 (2015) : 755-760. doi : 10.1126/science.1260922
 - 26) H. Hama et al., “ScaleS : an optical clearing palette for biological imaging”, *Nat. Neurosci.* 18 (2015) : 1518-1529. doi : 10.1038/nn.4107
 - 27) K. Tainaka et al., “Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32 (2016) : 713-741. doi : 10.1146/annurev-cellbio-111315-125001
 - 28) S. Iwano et al., “Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals”, *Science* 359, no. 6378 (2018) : 935-939. doi : 10.1126/science.aaq1067
 - 29) T. Mitiouchkina et al., “Plants with genetically encoded autoluminescence”, *Nat. Biotechnol.* 38 (2020) : 944-946. doi : 10.1038/s41587-020-0500-9
 - 30) D. Onoshima, H. Yukawa and Y. Baba, “Multifunctional quantum dots-based cancer diagnostics and stem cell therapeutics for regenerative medicine”, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 95 (2015) : 2-14. doi : 10.1016/j.addr.2015.08.004
 - 31) M. Kaimimura et al., “Ratiometric near-infrared fluorescence nanothermometry in the OTN-NIR (NIR II/III) biological window based on rare-earth doped β -NaYF₄ nanoparticles”, *J. Mater. Chem. B.* 5, no. 10 (2017) : 1917-1925. doi : 10.1039/C7TB00070G
 - 32) M. Montalti, A. Cantelli and G. Battistelli, “Nanodiamonds and silicon quantum dots : ultrastable and biocompatible luminescent nanoprobe for long-term bioimaging”, *Chem. Soc. Rev.* 44, no. 14 (2015) : 4853-4921. doi : 10.1039/c4cs00486h
 - 33) F. Xu et al., “Three-dimensional nanoscopy of whole cells and tissues with in situ point spread function retrieval”, *Nat. Methods* 17 (2020) : 531-540. doi : 10.1038/s41592-020-0816-x
 - 34) E. Nehme et al., “DeepSTORM3D : dense 3D localization microscopy and PSF design by deep learning”, *Nat. Methods* 17 (2020) : 734-740. doi : 10.1038/s41592-020-0853-5
 - 35) L. Wang et al., “Small-molecule fluorescent probes for live-cell super-resolution microscopy”,

- J. Am. Chem. Soc.* 141, no. 7 (2019) : 2770-2781. doi : 10.1021/jacs.8b11134
- 36) T. -L. Liu et al., "Observing the cell in its native state : Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms", *Science* 360, no. 6386 (2018) : eaaq1392. doi : 10.1126/science.aaq1392
- 37) S. Nojima et al., "CUBIC pathology : three-dimensional imaging for pathological diagnosis", *Sci. Rep.* 7, no. 1 (2017) : 9269. doi : 10.1038/s41598-017-09117-0
- 38) A. Glaser et al., "Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens", *Nat. Biomed. Eng.* 1 (2017) : 0084. doi : 10.1038/s41551-017-0084
- 39) Lindsey A. Barner et al., "Multi-resolution open-top light-sheet microscopy to enable efficient 3D pathology workflows", *Biomed. Opt. Express* 11, no. 11 (2020) : 6605-6619. doi : 10.1364/BOE.408684
- 40) F. Hu et al., "Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes", *Nat. Methods* 15 (2018) : 194-200. doi : 10.1038/nmeth.4578
- 41) L. Gong et al., "Higher-order coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy realized label-free super-resolution vibrational imaging", *Nat. Photonics* 14 (2020) : 115-122. doi : 10.1038/s41566-019-0535-y
- 42) H. Xiong et al., "Stimulated Raman excited fluorescence spectroscopy and imaging", *Nat. Photonics* 13, no. 6 (2019) : 412-417. doi : 10.1038/s41566-019-0396-4
- 43) R. B. Andrade et al., "Quantum-enhanced continuous-wave stimulated Raman scattering spectroscopy", *Optica* 7, no. 5 (2020) : 470-475. doi : 10.1364/optica.386584
- 44) C. Zhang et al., "Stimulated Raman scattering flow cytometry for label-free single-particle analysis", *Optica* 4, no. 1 (2017) : 103-109. doi : 10.1364/OPTICA.4.000103
- 45) K. Hiramatsu et al., "High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry", *Science Advances* 5, no. 1 (2019) : eaau0241. doi : 10.1126/sciadv.aau0241
- 46) Y. Suzuki et al., "Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering", *Proc Natl Acad Sci USA* 116, no. 32 (2019) : 15842-15848. doi : 10.1073/pnas.1902322116
- 47) M. Shiota et al., "Gold-nanofève surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival", *Nat. Commun.* 9 (2018) : 1561. doi : 10.1038/s41467-018-03899-1
- 48) T. C. Hollon et al., "Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks", *Nat. Med.* 26 (2020) : 52-58. doi : 10.1038/s41591-019-0715-9
- 49) Y. Matsumoto et al., "Visualising peripheral arterioles and venules through high-resolution and large-area photoacoustic imaging", *Sci. Rep.* 8 (2018) : 14930. doi : 10.1038/s41598-018-33255-8
- 50) Q. Miao and K. Pu, "Emerging designs of activatable photoacoustic probes for molecular imaging", *Bioconjugate Chem.* 27, no. 12 (2016) : 2808-2823. doi : 10.1021/acs.bioconjchem.6b00641

- 51) D. Zhang et al, "Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organisms with submicrometer spatial resolution", *Science adv* 2, no. 9 (2016) : e1600521. doi : 10.1126/sciadv.1600521
- 52) J. Shi et al, "High-resolution, high-contrast mid-infrared imaging of fresh biological samples with ultraviolet-localized photoacoustic microscopy", *Nat. Photonics* 13 (2019) : 609-615. doi : 10.1038/s41566-019-0441-3
- 53) L. Shi et al, "Mid-infrared metabolic imaging with vibrational probes", *Nat. Methods* 17, no. 8 (2020) : 844-851. doi : 10.1038/s41592-020-0883-z
- 54) K. Toda et al., "Molecular contrast on phase-contrast microscope", *Sci Rep* 9, no. 1 (2019) : 9957. doi : 10.1038/s41598-019-46383-6
- 55) D. Zhang et al, "Bond-selective transient phase imaging via sensing of the infrared photothermal effect", *Light: Science & Application* 8, no. 1 (2019) : 1-12. doi : 10.1038/s41377-019-0224-0
- 56) M. Tamamitsu et al, "Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect", *Optica* 7, no. 4 (2020) : 359-366. doi : 10.1364/OPTICA.390186
- 57) C. Hu et al, "Harmonic optical tomography of nonlinear structures" *Nat. Photonics* 14, no. 9 (2020) : 1-6. doi : 10.1038/s41566-020-0638-5
- 58) K. Toda, M. Tamamitsu and T. Ideguchi, "Adaptive dynamic range shift (ADRIFT) quantitative phase imaging", *Light: Science & Applications* 10 (2021) : 1. doi : 10.1038/s41377-020-00435-z
- 59) Y. Park, C. Depeursinge and G. Popescu, "Quantitative phase imaging in biomedicine", *Nature Photon.* 12 (2018) : 578-589. doi : 10.1038/s41566-018-0253-x
- 60) R. Prevedel et al., "Brillouin microscopy : an emerging tool for mechanobiology", *Nature Methods* 16, no. 10 (2019) : 969-977. doi : 10.1038/s41592-019-0543-3
- 61) G. Antonacci et al., "Recent progress and current opinions in Brillouin microscopy for life science applications", *Biophys Revi* 12 (2020) : 615-624. doi : 10.1007/s12551-020-00701-9
- 62) I. Remer et al., "High-sensitivity and high-specificity biomechanical imaging by stimulated Brillouin scattering microscopy", *Nat Methods* 17, no. 8 (2020) : 913-916. doi : 10.1038/s41592-020-0882-0
- 63) G. Young et al, "Quantitative mass imaging of single biological macromolecules", *Science* 360, no. 6387 (2018) : 423-427. doi : 10.1126/science.aar5839
- 64) R. W. Taylor et al, "Interferometric scattering microscopy reveals microsecond nanoscopic protein motion on a live cell membrane", *Nat. Photonics* 13, no. 7 (2019) : 480-487. doi : 10.1038/s41566-019-0414-6
- 65) R. Horisaki, R. Takagi and J. Tanida, "Learning-based imaging through scattering media", *Optics Express* 24, no. 13 (2016) : 13738-13743. doi : 10.1364/OE.24.013738
- 66) E. M. Christiansen et al., "In Silico Labeling : Predicting Fluorescent Labels in Unlabeled Images", *Cell* 173, no. 3 (2018) : 792-803.e19. doi : 10.1016/j.cell.2018.03.040
- 67) C. Oukomol et al., "Label-free prediction of three-dimensional fluorescence images from

- transmitted-light microscopy”, *Nat Methods* 15 (2018) : 917-920. doi : 10.1038/s41592-018-0111-2
- 68) S. Ota et al., “Ghost cytometry”, *Science* 360, no. 6394 (2018) : 1246-1251. doi : 10.1126/science.aan0096
- 69) http://thinkcyte.com/tc_wp/wp-content/uploads/2020/07/PR_Collaborative-Development-with-Hitachi_07012020.pdf (2021年2月1日アクセス)
- 70) A. Kirmani et al., “First-Photon Imaging”, *Science* 343, no. 6166 (2014) : 58-61. doi : 10.1126/science.1246775
- 71) E. Murray et al., “Simple, scalable proteomic imaging for high-dimensional profiling of intact systems”, *Cell* 163, no. 6 (2015) : 1500-1514. doi : 10.1016/j.cell.2015.11.025
- 72) J. R. Moffitt et al., “High-throughput single-cell gene-expression profiling with multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, no. 39 (2016) : 11046-11051. doi : 10.1073/pnas.1612826113
- 73) X. Zhuang, “Spatially resolved single-cell genomics and transcriptomics by imaging”, *Nat. Methods* 18 (2021) : 18-22. doi : 10.1038/s41592-020-01037-8
- 74) M. A. Bray et al., “Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes”, *Nat Protocols* 11, no. 9 (2016) : 1757-1774. doi : 10.1038/nprot.2016.105
- 75) G. Gut, M. D. Herrmann and L. Pelkmans, “Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states”, *Science* 361, no. 6401 (2018) : eaar7042. doi : 10.1126/science.aar7042
- 76) M. Mitsunaga et al., “Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules”, *Nat. Med.* 17 (2011) : 1685-1691. doi : 10.1038/nm.2554
- 77) D. P. Hoffman et al., “Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells”, *Science* 367, no. 6475 (2020) : eaaz5357. doi : 10.1126/science.aaz5357
- 78) R. Gao et al., “Cortical column and whole-brain imaging with molecular contrast and nanoscale resolution”, *Science* 363, no. 6424 (2019) : eaau8302. doi : 10.1126/science.aau8302
- 79) <https://www.darpa.mil/program/revolutionary-enhancement-of-visibility-by-exploiting-active-light-fields> (2021年2月1日アクセス)
- 80) A. S. Abdelfattah et al., “Bright and photostable chemigenetic indicators for extended in vivo voltage imaging”, *Science* 364, no. 6454 (2019) : 699-704. doi : 10.1126/science.aav6416
- 81) H. Mikami et al., “Ultrafast confocal fluorescence microscopy beyond the fluorescence lifetime limit”, *Optica* 5, no. 2 (2018) : 117-126. doi : 10.1364/OPTICA.5.000117
- 82) S. Ravindran, “Core curriculum : learning to manage a shared microscopy facility”, *Nature* 588, no. 7837 (2020) : 358-360. doi : 10.1038/d41586-020-03466-z
- 83) J. Fan et al., “Video-rate imaging of biological dynamics at centimetre scale and micrometre resolution”, *Nat Photonics* 13, no. 11 (2019) : 809-816. doi : 10.1038/s41566-019-0474-7