

2.3.5 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はたらく生体分子、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。生命科学・医学基礎研究では、蛍光プローブを用いた蛍光顕微鏡が最も普及しており、時空間分解能や深達度などを高めるための開発が進む。非蛍光のイメージング手法・プローブや計算科学・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生命科学・医学向け手法が開発されている。また、単一細胞スケールから組織・個体スケールまで、多階層にわたる生命現象を同時に可視化するための手法としてメゾスコピーも注目される。

なお光学イメージングは、病理診断や内視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手法を中心に扱う。

(2) キーワード

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、コンピューショナルイメージング、ラマンプローブ、近赤外蛍光、ハイブリッド型プローブ、超多重染色、メゾスコピー、大口径レンズ、超高画素カメラ、二光子顕微鏡、コアファシリティ、標準化

(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、緑色蛍光タンパク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で染色する手法が急速に発展したことにより、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.” のことわざが表すように、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。生命科学におけるオミ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。

近年は、光学系（レンズ）、光源、検出器、光制御デバイスといったハードの進化、プローブ技術の発展（ウェット）に加え、数理・情報科学（ドライ）を組み合わせることで新たな手法が開発されている。蛍光顕微鏡は、時間空間分解能や深達度、網羅性が向上したことで新たな生物・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、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。

生命システムは、nmサイズの様々な生体分子が複雑な相互作用ネットワークを形成し、階層的に自己集合・自己組織化することで、 μm サイズの細胞、cmサイズを超える組織・個体を形成する。分子から細胞のスケール

ルにおいては遺伝情報の複製や発現、物質代謝、エネルギー代謝、シグナル伝達など基盤的な機能が発現し、組織/多細胞や個体のスケールにおいては発生・分化、免疫、脳情報処理などの高度な生命機能が発現する。生命の機能発現の仕組みやその破綻に伴う疾患病態を解明するには、多種多様な生体分子が複雑に絡み合っている高次元のシステムの時間的・空間的ダイナミクスを、分子から細胞、個体に至るあらゆる階層（スケール）において定量的に把握するための、高次元・多階層な計測が必要である。多種多様な生体分子の計測は、オミクス解析を始めとする分析手法の発展によりスナップショットは把握できるようになってきたが、多階層の時間的・空間的ダイナミクスの情報を得るための計測手法についてはまだ開発の余地が大きく、光学イメージングベースの手法の開発が期待されている。

【研究開発の動向】

下村脩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、R. Tsienによるカルシウム蛍光指示薬Fura-2（ノーベル化学賞2008年）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。当初は培養細胞が主な観察対象であったが、その後GFPを活用した蛍光タンパク質が盛んに開発され、遺伝子導入技術と合わせることで、1990年代には線虫やゼブラフィッシュ、マウスなどのモデル生物へと対象が広がった。こうした蛍光プローブの開発に合わせて、非常に暗い蛍光をS/N良く観察できる顕微鏡光学系や撮像デバイス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。このように、生命科学・医学分野における光学イメージングの開発では、ハードウェアや計測・解析手法のような、いわゆるイメージング手法の開発に加えて、蛍光を中心としたプローブの開発が非常に重要であり、これらの研究開発が両輪となって発展してきた。これまで様々なイメージング手法が開発されており、それぞれ、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（標識）・光毒性（生体標本活性に対する照射光の影響）といった面で異なる特徴を持つ。これらはトレードオフの関係にあるが、ハードウェアの改良に加えて新たなコンセプトの手法開発、プローブの改良、さらに数理・情報科学の活用により、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。

分子～細胞～組織・個体における多階層な生命現象に対し、従来の光学イメージングではそれぞれのスケールに対して特化したハードウェア（光学系、撮像装置、結像機構など）が開発されてきた。特に、光学顕微鏡は分子～細胞を対象に発展した一方で、より大きなスケールでのダイナミクスの観察には制約があった。近年になって、単一細胞スケール（ μm ）から組織・個体スケール（ $\text{mm}\sim\text{cm}$ ）の4桁もの階層を同時にカバーできるトランススケールなイメージング手法が報告されるようになってきており、従来の顕微鏡（microscopy）と区別してメゾスコピー（mesoscopy）と称されている。

本節では、大きくイメージング手法、プローブ、メゾスコピーの3つの区分に沿って動向をまとめる。

【イメージング手法】

大きくは蛍光ベースの観察手法、および非標識/非蛍光の標識による観察手法に分かれる。また、新たなアプローチとして、ハードウェアとしての光学系を用いて結像させる従来手法に対し、光学系を計算科学・情報科学技術で代用・補完して像を生成するコンピューショナルイメージングが、蛍光・非蛍光問わず開発において取り入れられるようになってきている。

• 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、生細胞や個体の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、Denk、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、2000年代より脳科学研究を中心に大きく寄与した。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。さらに、柳田らにより開発された蛍光1分子イメージング技術は、シグナル伝達を始めとした細胞動態観察に用いられるだけでなく、後述の超解像顕微鏡や次世代シーケンサーの基盤技術となった。

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、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・ジャネリア研究所）、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。

共焦点顕微鏡や2光子顕微鏡による3次元蛍光イメージングは照明の走査が必要なため、時間分解能や光毒性に課題があったのに対し、広範囲をシート状に照明することでより高速に3次元画像を得る光シート顕微鏡が2000年代に考案された。空間分解能が低い、光透過性の低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、後者は理研の宮脇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。

超解像顕微鏡、光シート顕微鏡とも、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ってきている。

• 非染色・非蛍光の標識による観察手法

細胞・組織の形態観察において、典型的な対象である組織切片や培養細胞は半透明（位相物体）でコントラストが弱いことから、染色・固定によりコントラストをつける処理が一般的に用いられる。そうした処理なしに観察する手法として、専用の対物レンズや光学素子により標本内の屈折率分布を可視化する位相差顕微鏡（ノーベル物理学賞 1953 年）や微分干渉顕微鏡が用いられるが、レーザー干渉を利用して専用の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、韓国の Tomocube 社などにより市販されている。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。

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開発されている。

ラマン散乱は振動分光測定により分子の「指紋」を取得することができる。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ため、ラマン散乱による細胞内の生体分子イメージングが開発された。一方、多種多様な分子が混在する細胞から特定分子の指紋を分離することは難しいから、特徴的なラマンスペクトルを発するプローブも開発されている。（自発）ラマン散乱光は極めて低強度であり、イメージングに長時間を要するという課題があったが、より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）といったより高速な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検出技術の進展と合わせて、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¹⁾。

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。酵素—基質反応のエネルギーを光に変換するため、蛍光と比べて暗いという難点はあるものの、標識部位以外からの自家蛍光の影響を受けないことから、高いコントラスト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。また、生物発光で必要とされる発光タンパクの遺伝子導入やATPを必要としないことから、化学反応によって励起状態となった分子から放出される光を利用した化学発光イメージングの開発も行なわれている。

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²⁾。光によって特定の吸収体を選択的に励起する光の利点と、生体深部のイメージングが可能な超音波の両方の利点を併せ持つイメージング手法である。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日本の Luxonus 社などから市販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。こうしたアプローチは、X線CTを始め高度な結像系の構成が難しいX線や電子線のイメージングを中心に用いられていたが、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、機械学習などの情報・数理科学を取り込むことにより、近年は光学イメージングでの適用事例が増えてきている。レンズを用いることなく像を取得できるレンズレスイメージングが典型的な例であるが、結像光学系を補完することによるトレードオフ打破を目指した開発も行なわれる。生命科学・医学向けの手法としては、特殊なマイクロレンズ付きカメラにより3次元画像を一回の撮影で取得できるライトフィールド顕微鏡^{3, 4)}や、照明パターンを変えながら取得した複数枚画像の演算から超解像効果を得るSIMが挙げられる。

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を通じて情報科学・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。生命科学・医学分野においては特に、強い散乱体である生体組織内部の非標識イメージングへの活用に期待が集まる。

【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きく大別されるが、近年では①と②を組み合わせたハイブリッド型プローブも誕生している。

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、組織透過性の低さから小動物を用いた実験には制限があった。そこで、2000年以降650~900 nm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、近年では更に高い組織透過性と低い自家蛍光から、1,000 nm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。

また測定対象としては、特定分子を標識するだけでなく、カルシウム濃度や温度、膜電位といったマイクロ環境の計測用途のプローブも開発されており、タンパク質間相互作用やタンパク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並行して、ラマン散乱、発光、光音響といった観察手法に対応したプローブの開発も進む。

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

蛍光では、従来はFura-2をはじめイオンや分子のレシオメトリック定量測定を目的とした2波長励起型プローブが主流であったが、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、超解像顕微鏡用の蛍光プローブの開発が欧州を中心として盛んに行われている他、近赤外発光プローブ⁵⁾、標的タンパク質特異的なラベル化¹⁹⁾などは継続的に研究が進められている。また、臨床検体への導入といった医学応用を目指した蛍光プローブの開発も行われ、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。新規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⁶⁾、特に中国においてAIE分子開発と細胞応用が非常に盛んである。

生物発光については、基質誘導体の開発が行われており、その潮流としては大きく2つの流れがある。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。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。また、化学発光プローブについては、従来の化学発光基質の殆どはその発光量子収率が非常に低かったが、Shabat (テルアビブ大学) らによる誘導体展開により、発光量子収率を大幅に改善した基質が開発され、生体イメージングへの適用可能性が高まってきている⁷⁾。

ラマンプローブは、アルキンを始めとした、細胞内の生体分子由来の信号がでないsilent領域で観測できる標識技術に期待が集まっている。また、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ため、小分子へ標識した場合も機能への影響が比較的低いと考えられる。これまで、アルキンを付加した核酸や脂質などの生体小分子を用いることで、標的とした分子の局在の可視化が可能であることが示されている。

光音響は、課題である感度の低さを改良するための開発が行われるほか、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。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⁸⁾。

• 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年に深赤色から近赤外領域の蛍光を発する微生物由来の新たな蛍光タンパク質が発見されて以来、その改良の研究開発が進み、700 nm以上の長波長かつ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⁹⁾。また、蛍光タンパク質の開発においては長年、光安定性と明るさとのトレードオフに悩まされてきたが、宮脇 (理研) らにより、明るく極めて褪色しにくい蛍光タンパク質が開発されている¹⁰⁾。

細胞内シグナルを検出するには、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、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た目的指向型のプローブ開発が行われている^{11, 12)}。

さらに、発光イメージングにおいて、基質の開発と並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¹³⁾。また、新たな発光酵素の開発を目指し、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¹⁴⁾。

• 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、粒子サイズ的设计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年以降に応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¹⁵⁾。

現在の潮流は、新しい機能性無機材料をイメージングに応用する研究にある。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^{16, 17)}。

【メゾスコーピー】

細胞～組織・個体を同時にカバーするメゾスコーピーを実現するためには、少なくとも単一細胞レベルの分解能を維持したまま観察領域を大きく広げる必要がある。

静的な形態・構造の情報を取得する場合は、試料を移動させながら順次撮像して画像処理によるつなぎ合わせ（タイリング）を行うことで、2次元であれば通常の顕微鏡光学系でも広い領域をカバーできる。組織切片試料の全体を広視野・高分解能で迅速に画像化するWSI（Whole Slide Imaging）が代表的な例で、AI病理診断の実現に向けて需要が高まっている。一方、3次元観察では光透過性による深達度の制約の回避が必要で、マウス全脳の構造把握のため、マイクロームによる順次切断とイメージング¹⁸⁾、もしくは組織透明化後に光シート顕微鏡¹⁹⁾やエクспанション超解像顕微鏡²⁰⁾で観察する手法などが開発された。

生きた試料の動的変化を観察する場合、試料を走査することなく観察領域を広げるために、光学系で広い視野を実現する必要がある。高分解能と広視野はトレードオフであり従来の顕微鏡光学系で両立させることは難しかったが、2010年代になって大口径レンズによってこの問題を解決する試みが報告された。その手法は、結像・検出機構によってワイドフィールド型と焦点走査型に分類される。

ワイドフィールド型では試料全域を照明し、試料から発せられる光（蛍光、透過光、散乱光など）を大口径レンズ系により2次元イメージセンサー面に結像することで、画像を一度に取得する。2次元的に分布した試料の観察に適している。光学系とともにイメージング性能に大きく影響するのはイメージセンサーの画素数およびサイズである。パイオニア的な研究として英国ストラスクライド大学で開発されたMesolensがよく知られ²¹⁾、事業化もされている。

焦点走査型は3次元観察に適しており、脳神経科学の分野で脳深部の神経活動の観察に用いられる二光子顕微鏡をベースとした手法が開発された。米国カリフォルニア大学サンタバーバラ校のグループが開発したTrepan2p²²⁾、および米国ジャネリア研究所が開発した2p-RAM²³⁾が技術発展の契機となっており、後者はThorlabs社により市販化されている。マウスの脳をターゲットとしていて、視野を広げることで全脳のうちカバーできる領域の数が顕著に増えるため、視野を広げることの意味が大きい。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

• 超解像顕微鏡

STEDを開発したHellを中心に、独マックスプランク研究所において精力的に開発が行われている。高分解能化では、STEDで特徴的なドーナツ状照明を新しい発想でSMLMに利用したMINFLUX法²⁴⁾、さらにSTEDの原理を組み合わせたMINSTED法²⁵⁾により、分子スケール（1-3 nm）の空間分解能が達成されている。また、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^{26, 27)}。

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。一例として、Hellらにより開発された、ケージ基が不要な新たな光活性化蛍光色素が挙げられる²⁸⁾。

マックスプランク研究所からは、超解像顕微鏡開発の成果をベースにAbberior社（STEDやMINFLUXを市販）、SPIROCHROME社（蛍光プローブを市販）という会社が設立された。

• 光シート顕微鏡

格子光シート顕微鏡は、細胞や胚など比較的小さいスケールでの動態観察が主な対象であるが、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²⁹⁾。

格子光シート顕微鏡は顕微鏡メーカー Zeiss 社やドイツ Bruker 社などから市販されている。

組織・個体を対象とする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ったが、ベッセルビームを用いた2光子ライトシート顕微鏡により、数ミリのサイズのメダカの3次元ライブイメージングを実現している³⁰⁾。また、組織網羅的な病理診断への応用を念頭に、生検標本観察に適した構成の装置開発が行われている^{31, 32)}。Miltenyi社などからマクロスケール向けの装置が市販されているが、スイスのチューリッヒ大学が中心となって運営されている mesoSPIM プロジェクト³³⁾では、開発したライトシート顕微鏡の設計や光学素子、デバイスなどを情報公開しており、世界で少なくとも20近くのグループが同じ装置を構築し、多数の応用研究成果を報告している。

• ラマンイメージング

アルキント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。また、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程度しかないという利点を生かし、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³⁴⁾。近年では、これらのラマンタグを機能化したラマンプローブの開発も精力的になされており³⁵⁻³⁷⁾、細胞内の多数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。

イメージング手法としては、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³⁸⁾や誘導ラマンと蛍光のハイブリッド観察手法³⁹⁾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^{40, 41)}を実現した例も報告されている。また、臨床検体のラベルフリーイメージングやSRSによる脳腫瘍の術中検査⁴²⁾など、臨床現場への応用も試みられている。

• 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、自発ラマン散乱よりも感度が良い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。空間分解能が低いという欠点があったのに対して分解能向上を目指した開発^{43, 44)}が行われるほか、赤外吸収に適したプローブの開発⁴⁵⁾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⁴⁶⁻⁴⁸⁾。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⁴⁹⁻⁵¹⁾が注目され、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

イメージング手法の中では機械学習との相性が良く、レンズレスイメージングへの適用⁵²⁾など事例がいくつも報告されている。数値計算による復号化に対し、学習の労力がかかるものの、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、機械学習により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^{53, 54)}。また、前述のライトフィールド顕微鏡について、マイクロレンズアレイを最適化することにより、動き回るマウスの頭部に装着できるほど小型化しながら高解像を実現した事例などが報告されている⁵⁵⁾。同様の手法により、メゾスコープで不可欠な大口径レンズの簡略化の可能性なども示唆されており⁵⁶⁾、今後の応用が注目される。

• ハイブリッド型プローブ

光退色耐性と輝度に優れた有機小分子型プローブと空間局在性に優れたタンパク質型プローブを組み合わせたハイブリッド型プローブも精力的に開発されており、例えば、有機小分子型蛍光プローブに自己標識タンパク質(SNAP-tag, Halo-tagなど)のリガンド部位を導入し、自己標識タンパク質を目的のオルガネラに発現させた細胞に適用することで、有機小分子型蛍光プローブを特定のオルガネラのみにも局在させ、その部位のみでの標的分子の可視化が可能となる。近年ではさらに、蛍光タンパク質、自己標識タンパク質、有機小分子蛍光色素、小分子リガンドを自在に巧みに組み合わせた新たなハイブリッド型プローブ(semisynthetic biosensors, Chemigenetic indicatorsとも呼ばれる)も開発されており⁵⁷⁻⁵⁹⁾、従来は観察が難しかった生体分子の可視化を可能とする手法として注目を集めている。

• 近赤外イメージング

従来プローブが積極的に開発されてきた第一近赤外光 (NIR-I, 700–900 nm) よりもさらに長波長で光散乱や光吸収の影響を受けづらい第二近赤外光 (NIR-II, 1,000–1,700 nm; OTN, SWIRと呼ばれることもある) を用いたイメージングが、組織深部におけるイメージングを達成し得る手法として注目を集めている。プローブ開発では、有機小分子や蛍光タンパク質では難易度が高いことから、ナノ粒子を中心に開発が行なわれていたが⁶⁰⁾、近年では有機小分子をベースとした開発も盛んになってきている^{61–63)}。可視域から NIR-II まで広い波長域を観察できる撮像装置が近年になり市販化されたことから、プローブ開発の進展と合わせ、生命科学・医学分野での NIR-II イメージングが広がると期待される。

• 超多重標識イメージング

単純な波長分離による蛍光多重標識の観察は4–6色が限界であったが、プローブの工夫により、これまででは難しかった超多重標識によるイメージング技術が相次いで出てきている。まず、特異的標識に一般的に用いられる抗体をベースに、固定標本や透明化標本に対して、抗体染色、観察、脱染色の操作を繰り返すことで超多重標識イメージングする方法が開発された⁶⁴⁾。一方、蛍光色素を付加したDNAオリゴ鎖をプローブに用いて、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簡便に増やすことができる、DNAバーコード技術の活用が広がっており⁶⁵⁾、イメージングによる空間トランスクリプトームや空間プロテオーム解析などで注目を集めている。10x Genomics社やNanoString社、Akoya Biosciences社などから専用装置やキットが市販化されている。また、その他の手法として、波長スペクトル幅の狭いラマンプローブ^{66, 67)} 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^{68, 69)}。

• メゾスコープ

2022年現在において、主要な顕微鏡メーカーからはメゾスコープを販売するに至っておらず、大学や国立研究所などのアカデミアを中心に広視野・高分解能イメージング技術開発が進められている。

ワイドフィールド型メゾスコープとしては、前述のMesolens (倍率4倍、開口数0.47、視野 ϕ 6 mm) を開発した英国ストラスクライド大学が周辺技術開発を継続しており、光シート照明などを組み合わせた3次元メゾスコープを実現している^{70, 71)}。また、大阪大学を中心に、倍率2倍レンズと開口数0.12のマシンビジョンレンズおよび1.2億画素カメラを搭載したAMATERASを開発し、視野1.5 cm x 1.0 cmにて同時に100万以上の細胞の蛍光観察を実現した⁷²⁾。多数の細胞集団内の稀少かつ重要な細胞がトリガーする集団全体の相転移現象を研究対象としている⁷³⁾。第二世代機は特別設計の大口径レンズ (開口数0.25) を使用している。

焦点走査型の二光子励起メゾスコープは米国と日本で開発が進む。前述のTrepan2pを開発した米国UCサンタバーバラ校により、視野5 mm x 5 mm ($\sim\phi$ 7 mm) かつ複数平面観察の機能を有するDiesel2p⁷⁴⁾が開発された。日本の理化学研究所で開発されたFASHIO-2PMシステムは、一細胞レベルの空間分解能で3 mm x 3 mmの広視野を7.5 Hzで観察できることを示し応用研究を精力的に進めている⁷⁵⁾。2次元センサーを用いるワイドフィールド型と比較して、焦点走査型では単位時間当たりのサンプリング点数の制約が大きいが、米国ロックフェラー大学により、励起パルス光を多重化し時間と集光深さをずらして重ね合わせることで、サンプリング点数を30倍以上に増やした光ビーズ顕微鏡が開発された⁷⁶⁾。同時に100万個もの神経細胞のカルシウム動態を2 Hzで観察することに成功した。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

研究拠点としては、米国のハワードヒューズのジャ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。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ジング拠点への支援事業を行うザッカーバーグ財団も注目される。

欧州では、EMBLが中心となってEuro- Bioimaging事業、日本でも科研費で先端バイオイメージ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。

プローブの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ジ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では、米国DARPAのREVEAL (Revolutionary Enhancement of Visibility by Exploiting Active Light-fields) プロジェクトや、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。メゾスコピーでは、新学術領域「シンギュラリティ生物学」において、異分野融合で前述のAMATERASを開発しており、技術サポートとして多くの企業も参画している。

また、開発した技術の活用という点において、オープンサイエンスの流れも注目される。1つは開発した装置の光学系に関する情報の公開で、光学知識やスキルを要するものの、最先端装置を低コストで導入できる。メゾスコピーのDiesel2p (UCサンタバーバラ) やAMATERAS (大阪大学)、光シート顕微鏡のmesoSPIM (チューリッヒ大学) などが積極的に情報公開している。もう1つの流れは、最先端装置で取得したデータのオープンアクセス化で、理研が運営するSSDBや欧州Euro-Bioimagingなどでデータリポジトリが構築されている。

(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。イメージングを分析手法として用いるためには、限界性能の向上だけでなく、計測の定量性・再現性も重要な課題である。定量性・再現性を高めるため、顕微鏡システムのメンテナンス方法や指標の標準化を目指してQUAREP-LiMiなどのコンソーシアムで議論が行われており⁷⁷⁾、今後の動向が注目される。

プローブ技術という観点からは、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、脂質や代謝産物の可視化が重要な課題と言える。従来の分子プローブ設計で蛍光・発光・ラマンにより可視化を試みることは勿論のこと、浜地らによるオルガネラ脂質の選択的な蛍光標識法などの画期的な手法も開発されつつある⁷⁸⁾。プローブ開発の予算に関して、日本では新たなターゲットの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、生命科学・医学研究での幅広い活用という点では、既存の蛍光イメージング技術の改良も重要である。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⁷⁹⁾、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、高度化された情報科学技術を活用したコンピュータショナルイメージングのアプローチであろう。米国を中心に画期的な事例の報告されているのに対し、日本は既存の光学系をベースとした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。しかし近年になって、復号化前のシグナルを画像生成プロセスなしに機械学習することで解析を高速したイメージングフローサイトメトリー⁸⁰⁾ 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⁾ などが実証され、スタートアップも立ち上がるなど成果も生まれてきている。

メゾスコピーにおいては、大口径レンズの開発と並行して、取得できるデータ量を増やすための検出技術が課題となっている。ワイドフィールド型ではイメージセンサーの画素数を増やす必要があり、AMATERASではマシンビジョン用1.2億画素センサーが使われている。キヤノン社の2.5億画素イメージセンサーなど、1億画素超のセンサーも増えてきているものの、半導体プロセスや通信インターフェースの技術的問題により、単一センサーチップの画素数は限界になりつつある。それを打破する方向性として、ピクセルシフト技術の活用、もしくは中国・清華大学が開発したRUSHシステムのようにイメージセンサーを並べてアレイ化するという方向が考えられる⁸²⁾。焦点走査型では、前述のパルス多重化のほか、高空間分解能で取得した形態情報に

対し高速で取得した動態（カルシウム濃度など）を重ね合わせる⁸³⁾、といった手法が検討されている。

メゾスコープをはじめ、取得されるデータ量が膨大になってきており、計測装置に加え、画像処理やデータ共有のための大容量コンピュータや大容量通信インフラ、数理科学・AIを活用した解析ツールの整備が不可欠である。一方、日本では、情報学やデータサイエンスにおける若手研究人材が慢性的に不足していることもあり、拠点の集約化やクラウド・コンピューティングの活用が必要であろう。

(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、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、研究環境の整備などから複合的に打開する方策が必要である。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り、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考えられる。

最先端の光学イメージング装置は、メゾスコープに代表されるように、高度に複雑化されたシステムとなっている。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⁸⁴⁾。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技術開発と普及を加速するには、学際的な研究開発と共同利用を統合したプラットフォームが有効であると考えられる。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。こうしたプラットフォームの代表的な例は米国ハワードヒューズ財団のジャネリア研究所であり、細胞全体での電子顕微鏡と超解像顕微鏡の重ね合わせなど、高度な技術を組み合わせた事例は、ジャネリア研究所以外では開発が難しいと言えよう⁸⁵⁾。日本においては、ABiSなどの先端バイオイメージングプラットフォームが運営されており、技術開発のドライバーとなることが期待される。

共同利用拠点化やデータのオープンアクセス化、クラウド・コンピューティングの活用といった流れを背景に、イメージングデータ形式やメタデータの標準化の必要性が高まってきている。欧州Euro-Bioimagingを核としたコンソーシアムGlobal Bioimagingを中心に議論が始まっており⁸⁶⁾、日本からもABiSが参加している。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が、日本のSSBDでも使われているデータ管理用オープンソースプラットフォームのOME（Open Microscopy Environment）が普及しつつあることから、産業競争力を維持するためにはアカデミアだけでなくメーカーも標準化の議論への参画や仕様公開が必要となるであろう。

(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、メゾスコピー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。蛋白質プローブは、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、イメージング手法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。 プローブ開発の代表的な応用研究は、宮脇等が開発した光退色耐性が高い蛍光蛋白質 ¹⁰⁾ 、Campbellが開発したハイブリッド型プローブ ⁵⁹⁾ 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、フォトニクスから計算・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。ジャーナリヤ研究所など技術開発拠点も充実している。 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、蛋白質化学ともに、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の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、ハイブリッド型プローブの開発をけん引している。化学小分子も精力的であるものの、蛋白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、研究者自身がスピリ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。 ドイツ・マックスプランク研究所の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。
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、清華大学のメゾスコピーやライトフィールド顕微鏡などオリジナルな研究成果も出始めている。 蛍光蛋白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。凝集有機発光(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。

2.3 俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

中国	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	△	↗	前述のParkが開発した技術を基にしたTomocube社など、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

・ ナノ・オペランド計測 (ナノテク・材料分野 2.6.2)

参考・引用文献

- 1) D. Polli et al., "Broadband Coherent Raman Scattering Microscopy", *Laser Photonics Rev.* 12, no. 9 (2018) : e1800020. doi: 10.1002/lpor.201800020
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Y. Hong, J. W. Y. Lam and . Z. Tang, "Aggregation-induced emission", *Che. Soc. Rev.* 40 (2011): 5361-5388. doi: 10.1039/C1CS15113D
- 7) N. Hananya and D. Shabat, "Recent Advances and Challenges in Luminescent Imaging: Bright Outlook for Chemiluminescence of Dioxetanes in Water", *ACS Cent. Sci.* 5, 6 (2019) : 949-959. doi: 10.1021/acscentsci.9b00372
- 8) 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

- 9) 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
- 10) M. Hirano et al., "A highly photostable and bright green fluorescent protein", *Nat. Biotechnol.* 40 (2022) : 1132-1142. doi: 10.1038/s41587-022-01278-2
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) T. Mitiouchkina et al., "Plants with genetically encoded autoluminescence", *Nat. Biotechnol.* 38 (2020) : 944-946. doi: 10.1038/s41587-020-0500-9
- 15) 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
- 16) 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
- 17) D. Terada et al. "Monodisperse Five-Nanometer-Sized Detonation Nanodiamonds Enriched in Nitrogen-Vacancy Centers", *ACS Nano* 13, 6 (2019) : 6461-6468. doi: 10.1021/acsnano.8b09383
- 18) K. Seiriki et al, "Whole-brain block-face serial microscopy tomography at subcellular resolution using FAST", *Nat. Protoc.* 14 (2019) : 1509-1529. doi: 10.1038/s41596-019-0148-4
- 19) E. A. Susaki et al., "Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis" *Cell* 157, 3 (2014) : 726-739. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.042.
- 20) E. A. Susaki et al., "Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues", *Nat. Commun.* 11 (2020) : 1982. doi: 10.1038/s41467-020-15906-5
- 21) G. McConnell et al. "A novel optical microscope for imaging large embryos and tissue volumes with sub-cellular resolution throughout", *eLife* 5 (2016) : e18659. doi: 10.7554/eLife.18659
- 22) J. N. Stirman, et al., "Wide field-of-view, multi-region, two-photon imaging of neuronal activity in the mammalian brain", *Nat. Biotechnol.* 34, 8 (2016) : 857-862. doi: 10.1038/nbt.3594
- 23) N. J. Sofroniew et al., "A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for in vivo imaging", *elife* 5 (2016) : e14472. doi: 10.7554/elife.14472
- 24) F. Balzarotti et al, "Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes", *Science* 355, 6325 (2016) : 606-612. doi: 10.1126/science.aak9913
- 25) M. Weber et al., "MINSTED fluorescence localization and nanoscopy", *Nat. Photonics* 15 (2021) : 361-366. doi: 10.1038/s41566-021-00774-2

- 26) 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
- 27) 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
- 28) R. Lincoln et al., "A general design of caging-group-free photoactivatable fluorophores for live-cell nanoscopy" *Nat. Chem.* 14 (2022) : 1013-1020. doi: 10.1038/s41557-022-00995-0
- 29) 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
- 30) S. Takanezawa, T. Saitou and T. Imamura, "Wide field light-sheet microscopy with lens-axicon controlled two-photon Bessel beam illumination", *Nat. Commun.* 12 (2021) : 2979. doi: 10.1038/s41467-021-23249-y
- 31) 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
- 32) 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
- 33) F. F. Voigt et al., "The mesoSPIM initiative: open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue" *Nat. Methods* 16 (2019) : 1105-1108. doi: 10.1038/s41592-019-0554-0
- 34) F. Hu et al., "Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes", *Nat. Methods* 15 (2018) : 194-200. doi: 10.1038/nmeth.4578
- 35) H. Fujioka et al., "Multicolor Activatable Raman Probes for Simultaneous Detection of Plural Enzyme Activities", *J. Am. Chem. Soc.* 142, 49 2020: 20701-20707. doi: 10.1021/jacs.0c09200
- 36) J. Ao et al., "Switchable stimulated Raman scattering microscopy with photochromic vibrational probes", *Nat. Commun.* 12 (2021) : 3089. doi: 10.1038/s41467-021-23407-2
- 37) J. Du and L. Wei, "Multicolor Photoactivatable Raman Probes for Subcellular Imaging and Tracking by Cyclopropenone Caging", *J. Am. Chem. Soc.* 144, 2 (2022) : 777-786. doi: 10.1021/jacs.1c09689
- 38) 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
- 39) 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
- 40) K. Hiramatsu et al., "High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry", *Science Advances* 5, no. 1 (2019) : eaau0241. doi: 10.1126/sciadv.aau0241
- 41) Y. Suzuki et al., "Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering", *PNAS* 116, no. 32 (2019) : 15842-15848. doi: 10.1073/pnas.1902322116
- 42) 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
- 43) D. Zhang et al., "Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and

- organisms with submicrometer spatial resolution”, *Science advances* 2, no. 9 (2016) : e1600521. doi: 10.1126/sciadv.1600521
- 44) 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
- 45) 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
- 46) K. Toda et al., “Molecular contrast on phase-contrast microscope”, *Scientific Reports* 9, no. 1 (2019) : 9957. doi: 10.1038/s41598-019-46383-6
- 47) 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
- 48) 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
- 49) 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
- 50) G. Antonacci et al., “Recent progress and current opinions in Brillouin microscopy for life science applications”, *Biophysical Reviews* 12 (2020) : 615-624. doi: 10.1007/s12551-020-00701-9
- 51) I. Remer et al., “High-sensitivity and high-specificity biomechanical imaging by stimulated Brillouin scattering microscopy”, *Nature Methods* 17, no. 8 (2020) : 913-916. doi: 10.1038/s41592-020-0882-0
- 52) 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
- 53) 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
- 54) C. Oukomol et al., “Label-free prediction of three-dimensional fluorescence images from transmitted-light microscopy”, *Nature Methods* 15 (2018) : 917-920. doi: 10.1038/s41592-018-0111-2
- 55) K. Yanny et al., “Miniscope3D: optimized single-shot miniature 3D fluorescence microscopy”, *Light Sci. Appl.* 9 (2020) : 171. doi: 10.1038/s41377-020-00403-7
- 56) J. Wu et al., “An integrated imaging sensor for aberration-corrected 3D photography”, *Nature* 612 (2022) : 62-71. doi: 10.1038/s41586-022-05306-8
- 57) Q. Yu et al., “A biosensor for measuring NAD⁺ levels at the point of care”, *Nat. Metab.* 1 (2019) : 1219-1225. doi: 10.1038/s42255-019-0151-7
- 58) C. Deo et al., “The HaloTag as a general scaffold for far-red tunable chemigenetic indicators”, *Nat. Chem. Biol.* 17 (2021) : 718-723. doi: 10.1038/s41589-021-00775-w
- 59) W. Zhu et al., “Chemigenetic indicators based on synthetic chelators and green fluorescent protein”, *Nat. Chem. Biol.* 19 (2023) : 38-44. doi: 10.1038/s41589-022-01134-z
- 60) 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.
- 61) E. D. Cosco et al., “Shortwave infrared polymethine fluorophores matched to excitation

- lasers enable non-invasive, multicolour in vivo imaging in real time", *Nat. Chem.* 12 (2020) : 1123-1130. doi: 10.1038/s41557-020-00554-5
- 62) M. Y. Lucero et al., "Development of NIR-II Photoacoustic Probes Tailored for Deep-Tissue Sensing of Nitric Oxide", *J. Am. Chem. Soc.* 143, 18 (2021) : 7196-7202. doi: 10.1021/jacs.1c03004
- 63) D. Liu et al., "Xanthene-Based NIR-II Dyes for In Vivo Dynamic Imaging of Blood Circulation", *J. Am. Chem. Soc.* 143, 41 (2021) : 17136-17143. doi: 10.1021/jacs.1c07711
- 64) 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
- 65) X. Zhuang, "Spatially resolved single-cell genomics and transcriptomics by imaging", *Nat. Methods* 18 (2021) : 18-22. doi: 10.1038/s41592-020-01037-8
- 66) L. Wei et al., "Super-multiplex vibrational imaging", *Nature* 544 (2017) : 465-470. doi: 10.1038/nature22051
- 67) F. Hu et al., "Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes", *Nat. Methods* 15 (2018) : 194-200. doi: 10.1038/nmeth.4578
- 68) M. S. Frei et al., "Engineered HaloTag variants for fluorescence lifetime multiplexing", *Nat. Methods* 19 (2022), 65-70. doi: 10.1038/s41592-021-01341-x
- 69) M. S. Frei et al., "Live-Cell Fluorescence Lifetime Multiplexing Using Synthetic Fluorescent Probes", *ACS Chem. Biol.* 17, 6 (2022) : 1321-1327. doi: 10.1021/acscchembio.2c00041
- 70) J. Schniete et al., "Fast Optical Sectioning for Widefield Fluorescence Mesoscopy with the Mesolens based on HiLo Microscopy", *Sci. Rep.* 8 (2018) : 16259. doi: 10.1038/s41598-018-34516-2
- 71) E. Battistella et al., "Light-sheet mesoscopy with the Mesolens provides fast sub-cellular resolution imaging throughout large tissue volumes", *iScience* 25, 9 (2022) : 104797. doi: 10.1016/j.isci.2022.104797
- 72) T. Ichimura et al., "Exploring rare cellular activity in more than one million cells by a transscale scope", *Sci. Rep.* 11 (2021) : 16539. doi: 10.1038/s41598-021-95930-7
- 73) T. Kakizuka et al., bioRxiv. doi: 10.1101/2020.06.29.176891
- 74) CH. Yu et al., "Diesel2p mesoscope with dual independent scan engines for flexible capture of dynamics in distributed neural circuitry", *Nat. Commun.* 12 (2021) : 6639. doi: 10.1038/s41467-021-26736-4
- 75) K. Ota et al., "Fast, cell-resolution, contiguous-wide two-photon imaging to reveal functional network architectures across multi-modal cortical areas", *Neuron* 109, 11 (2021) : 1810-1824. doi: 10.1016/j.neuron.2021.03.032
- 76) J. Demas et al., "High-speed, cortex-wide volumetric recording of neuroactivity at cellular resolution using light beads microscopy", *Nat. Methods* 18 (2021) : 1103-1111. doi: 10.1038/s41592-021-01239-8
- 77) O. Faklaris, et al., "Quality assessment in light microscopy for routine use through simple tools and robust metrics", *J. Cell Biol.* 221, 11 (2022) : e202107093. doi: 10.1083/jcb.202107093
- 78) T. Tamura et al., "Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells", *Nat. Chem. Biol.* 16 (2020) : 1361-1367. doi: 10.1038/s41589-020-00651-z
- 79) 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

- 80) S. Ota et al., “Ghost cytometry”, *Science* 360, no. 6394 (2018) : 1246-1251. doi: 10.1126/science.aan0096
- 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) J. Fan et al., “Video-rate imaging of biological dynamics at centimetre scale and micrometre resolution”, *Nature Photonics* 13, no. 11 (2019) : 809-816. doi: 10.1038/s41566-019-0474-7
- 83) R. Lu et al., “Rapid mesoscale volumetric imaging of neural activity with synaptic resolution”, *Nat Methods* 17 (2020): 291–294. doi: 10.1038/s41592-020-0760-9
- 84) 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
- 85) 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
- 86) J. R. Swedlow et al., “A global view of standards for open image data formats and repositories”, *Nat. Methods* 18 (2021) : 1440-1446. doi: 10.1038/s41592-021-01113-7