解説

ラマン顕微鏡によるバイオイメージング

熊本康昭, 藤田克昌 大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻ナノフォトニクス領域

Raman microscope is not widely used in life sciences. This fact is attributed to the fundamental weaknesses of Raman imaging, i.e., signal weakness and difficulty in molecular identification upon a cell spectrum. Signal weakness leads to long data acquisition time in Raman imaging. We discuss the recent advances in Raman microscopy for accelerating data acquisition speed. Difficulty in spectrum interpretation is attributable to spectral overlapping of vast kinds of molecules existing in a biological sample. We present Raman tags that have characteristic spectra in the silent region, where little intrinsic cellular signal appears. We also present super-resolution techniques that can aid the spectral complexity.

Raman microscopy / label-free molecular imaging / acquisition speed / signal enhancement / Raman tag / super resolution

1.

はじめに: ラマン顕微鏡による生体イメージング

ヒトのからだは膨大な種類の分子により構成されている。各種分子の数量や構造・機能を理解するには生化学分析や遺伝子解析などが有用である。しかしこれらの方法では詳細な空間情報を得られないため、異なる種類の分子が互いにどのように関係しながら機能するのかを直接捉えることは難しく、複数種の分子が織りなす生命活動の理解は難しい。

分子の詳細な空間情報を得るために生命科学の分野では蛍光顕微鏡がよく利用される。蛍光顕微鏡ではターゲットを蛍光物質により標識し観察する。異なる種類の分子やイオンの同時標識・同時識別も可能であり、複数種の分子の位置関係を明らかにできる。しかし、蛍光物質による標識は試料を改変することがある。また、蛍光標識を観察する場合にはターゲット分子の構造の変化までは追えないことが多い。

蛍光顕微鏡を補うものとしてラマン顕微鏡が研究・開発されている。ラマン顕微鏡は、分子の化学構造を反映するラマン散乱光により試料中のターゲット分子分布を取得できる技術であり、蛍光標識などの前処理を必要としない。ラマン顕微鏡の研究は 2000 年頃から盛んになり、いまでは図 1 のような高解像度・高コントラストのマルチカラー画像がラマン顕微鏡により得られる¹⁾。

前処理をせず図 1 のような画像を得られるならラマン顕微鏡を使いたい、と思う読者は多いだろう。しかしラマン顕微鏡を生命科学研究に活用することは容

易ではない。その理由の 1 つは、ラマン散乱光では励起光強度あたり発生する光子数が蛍光と比べて 12 桁以上少ないためである。もう 1 つの理由は、多くの分子が複数のラマン散乱バンドを示すことから、膨大な種類の分子からなる細胞や生体組織のスペクトルにおいては、それらのバンドが互いに重なって測定されるためである。複数の分子のラマン散乱バンドが重なりあって測定される場合、各種分子を同定し計量することは困難である。

図 1

ラマン顕微鏡により取得される生細胞の分子分布画像とスペクトル。a) 還元型シトクロム c (750 cm⁻¹), b) タンパク質 (1680 cm⁻¹), c) 脂質 (2850 cm⁻¹), d) a (green) + b (blue) + c (magenta), e) 細胞質, 核, 細胞外から取得したスペクトル。横軸は励起レーザーとラマン散乱の波長差を分子振動エネルギーに変換したラマンシフトであり、単位は cm⁻¹。図は参考文献 1 より許可を得て転載。

Raman Microscopy for Bioimaging

Yasuaki KUMAMOTO and Katsumasa FUJITA

Nanophotonics Division, Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka University

分子同定の難しさと信号の微弱さという2つの弱点を克服することにより、ラマン顕微鏡は生命科学研究に役立つようになると筆者らは考えている。そこで本稿ではこれら2つの点による制約を克服するラマン顕微鏡研究の近年の動向を概説する。

2.

イメージングの高速化

ラマン散乱光の微弱さはラマンイメージングの計測時間を長くする。ラマンイメージングによる空間2次元または3次元のスペクトル画像の計測は、1) 励起光を試料に一定時間集光する、2) その集光点から発するラマン散乱光を分光器に導入する、3) アレイ検出器によりラマンスペクトルを記録する、4) 試料または励起光を一定値だけ焦平面内もしくは光軸方向に変位させる、5) 1~4を繰り返す、というプロセスにより行われる。その所要時間はラマン分光画像の1画素すなわち1スペクトルの測定時間と総画素数の積に、走査時間を足したものとなる。このうち1スペクトルの測定時間は、試料をレーザー照射する時間(=信号積算時間)と、受光により検出器において発生した電子を読み出す時間(=信号読み出し時間)の和となる。1座標ずつサンプリングする従来のラマン顕微鏡の場合、細胞の1スペクトルの測定時間は1秒のオーダーであり、例えば 512×256 画素の細胞イメージングには10時間以上も要する。励起光強度を上げれば測定時間は短縮されるが、細胞は光照射によるダメージを受けスペクトルは変質してしまう。

励起光強度を上げることなくイメージングを高速化するには、従来の1スペクトル測定時間で試料の複数領域から同時サンプリングできればよい。このアプローチによる高速化がスリット走査型ラマン顕微鏡により実現されている²⁾。スリット走査型ラマン顕微鏡では図2のように、励起光をライン状に集光し、ライン照明された領域を分光器の入射スリット上に投影することにより、空間1次元のスペクトル画像が分光器の2次元検出器より一括記録される。空間1次元のスペクトル画像の画素数(=スペクトル数)は検出器の素子数(10^2 - 10^3)と同じになることから、従来と同じ励起光強度と信号積算時間で測定を行えば、1スペクトルあたりの実効的な信号積算時間は2-3桁短縮され1-10 msとなる。上述した 512×256 画素の細胞イメージングをスリット走査型ラマン顕微鏡により行った場合、その所要時間は30分程度となる。観察の視野を狭くすることで所要時間はさらに1-2分にまで短縮され、細胞の有糸分裂²⁾やアポトーシス中のシトク

図2

スリット走査型ラマン顕微鏡法の概略図。上は光学系の概略。シリンドルカルレンズ(かまぼこ型のレンズ)によりその焦平面においてライン状ビームを形成する。このビームをレンズ系によりリレーし、試料をライン照明する。ライン照明された領域は分光器の入射スリット上に投影される。スリットを通ったラマン散乱光は分光器によりスリット軸と垂直方向に分光され、分光器付属の2次元アレイ検出器により記録される。これにより、ライン照明された領域はアレイ配列した検出素子群により同時サンプリングされる。ガルバノミラーによりライン状ビームをラインと垂直方向に少しずつシフトしながら記録を繰り返すことにより、空間2次元のラマンハイパースペクトル画像(下)を得る。

ロムc動態³⁾を捉えられる。

計測時間短縮後の実効的な信号積算時間は1スペクトルあたりの信号読み出しにかかる時間と同等である。すなわちスリット走査型ラマン顕微鏡法では信号読み出し時間の短縮によってもラマンイメージングは高速化される。

信号読み出し時間の短縮は使用する検出素子の数を減らすことにより実現される。画素数を減らさず使用する検出素子の数を減らす方法として、波数情報を圧縮し測定する低波数分解能ラマン顕微鏡法と、記録するスペクトルの範囲を減らす狭帯域ラマン顕微鏡法とが開発されている⁴⁾。このうち前者では、時間あたり検出素子1つに入射する散乱光量も増えるため、信号を損なわずその積算時間を短縮できる。狭帯域かつ低波数分解能でのラマン顕微鏡測定を行うことにより、図3に示す180万画素の細胞イメージングがわずか21分で取得されている⁴⁾。このとき1スペクトルの測定時間は0.7 msにまで短縮されている。

狭帯域・低波数分解能測定では 10^2 cm^{-1} のスペクト

図3 狭帯域・低波数分解能ラマン顕微鏡法により得られたヒト乳癌細胞株 MCF-7 のラマン散乱画像。脂質、タンパク質、核酸に帰属される波数域のラマン散乱バンド ($1432\text{--}1458\text{ cm}^{-1}$) の強度分布により構築。画素数 1200×1500 、測定時間 21 分。スケールバー $50\text{ }\mu\text{m}$ 。図は参考文献 4 より許可を得て転載。

ル範囲を 10^4 個の検出素子により記録する。これに対し、通常のラマン測定 (= 広帯域・高波数分解能測定) では 10^3 cm^{-1} のスペクトル範囲を 10^3 個の検出素子により記録する。すなわち狭帯域・低波数分解能測定では、得られる情報量が従前に比べて 3 桁少ない。しかしそれでも応用次第では十分な情報を得られることがある。狭帯域・低波数分解能測定により得られたスペクトルにより、ヒトの乳癌細胞株と非癌乳腺上皮細胞株とが 90% 以上の正確度で判別されている⁴⁾。

スペクトル情報量を減らすことによる高速化は数学的にも行える。その方法の 1 つでは、1 検出素子だけで複数波長の散乱光を一括記録し、測定する波長の組み合わせを変えつつイメージングする。これにより得られるデータを数学的に解析することにより各座標のスペクトルが復元される⁵⁾。この方法は 1 素子により必要な情報を全て記録するため、画素あたりの信号積算時間も読み出し時間も短縮される。信号積算時間を短くしすぎるとスペクトルは精度よく復元されない。

スペクトル情報という言葉を広義に捉えたと、信号対雑音比もその 1 つと言える。信号対雑音比を犠牲にし信号積算時間を短くすることも、スペクトル情報量を減らすことによる高速化と捉えられる。信号対雑音比が低いデータから信号成分を見出す数学的アプローチは様々開発されており⁶⁾、ラマンスペクトル画像の解析に広く利用されている。

空間情報量を減らすことでも測定時間は短縮される。その方法の 1 つは観察視野を維持したままスペク

トル測定点数を間引くことである。走査による光イメージング計測では通常、光照射面積よりサンプリング間隔の方が小さく設定されているため、測定点数を減らしても得られる情報量は線形には減少しない。その一方で測定に要する時間は、測定点数の減少分だけ線形に短縮される。この差を利用することにより、空間情報をほぼ維持したまま細胞のラマンイメージングが 4 倍高速化されている⁷⁾。

他にもスペクトル測定点数を減らすためのユニークな方法が報告されている⁸⁾。この方法による計測は、1) 計測対象分子のラマン散乱光が得られるまで走査範囲の座標からランダムに測定を繰り返す、2) 計測対象分子のラマン散乱光が得られたらその測定点の周辺の座標を測定する、3) さらにその周辺の座標を計測対象分子のラマン散乱光が得られなくなるまで測定する、4) 未測定の領域において 1～3 を繰り返す、5) 計測対象分子のラマン散乱光が得られなくなった場合に測定を終了する、というプロセスにより行われる。この方法は点照明を用いており、ライン照明を用いる場合と比べて焦点以外からの散乱光が抑えられる。

空間情報を極限にまで減らしラマンイメージングを高速化する方法も開発されている⁹⁾。この方法ではナノ粒子をターゲットとし、その周辺の継時ラマン測定を行う。ターゲットが動かない場合は定点を測定することになるが、ターゲットが動く場合には、ナノ粒子の軌跡を捉える、ある種のラマンイメージングを行える。特にターゲットに金属ナノ粒子を用いる場合には、光の電場と金属ナノ粒子の自由電子の共振効果により、粒子近傍の光の電場が増大し分子のラマン散乱光を増強するため、測定が 50 ms/フレーム にまで高速化される。この方法は、ナノ粒子がエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれたのち輸送される過程をダイナミックに捉える方法として応用されている。

金属ナノ粒子によるラマン散乱光の増強効果を利用すれば通常のライン照明による測定の時間も短縮される¹⁰⁾。この場合の測定の結果はナノ粒子の分布や増強効果のばらつきに影響される。

ラマン散乱光の増強は非線形効果によっても行える。非線形ラマン散乱は、分子振動エネルギーに対応する波長差をもつ 2 つの高強度レーザーの同時照射により複数分子から同時発生するものであり、これまで述べてきたラマン散乱 (= 自発ラマン散乱または線形ラマン散乱) とは異なる。非線形ラマン散乱は複数分子からの同位相のラマン散乱であるため、同数のラマン散乱フォトンが自発ラマン散乱に比べて短時間のうちに発生する。また、非線形ラマン散乱はコヒーレン

ト過程であるため、自発ラマン散乱と違い、レーザーのように指向性をもつ。そのため非線形ラマン散乱イメージングでは短い測定時間で十分な信号が得られる。特定の分子を狭い視野で空間分解能よく高速イメージングする用途に適している。しかし、複数の分子のラマン画像を得るには、波長幅の広いレーザー光を用いたり波長を掃引したりする必要があり^{11),12)}、測定時間を要する。

以上の通りラマンイメージングを高速化する技術はこれまでに様々開発されている。これらの技術の一部は見方を変えると、信号対雑音比を向上する技術とも言える。すなわち、信号を犠牲にせずその積算時間を短縮できる技術であるため、従来のラマンイメージングと同じ計測時間を許容する場合、高い信号対雑音比のラマンイメージングを可能にする。つまり、より低濃度の分子の測定も可能にする。

測定されるスペクトルの信号対雑音比の向上は原理的には分子同定能の向上につながる。しかし実際は、膨大な種類の分子からなる細胞や組織のラマンスペクトルでは複数種の分子のバンドが重なり合っているために、ラマン測定の信号対雑音比を向上できても分子同定能の向上は難しい。

3. 分子の同定

ラマンイメージングにより細胞や組織の分子を同定し分析するための方法として共鳴ラマン散乱を利用するものがある。これまで述べてきたラマン散乱には共鳴ラマン散乱と非共鳴ラマン散乱とがあり、このうち共鳴ラマン散乱は、分子の吸収極大波長またはその近くの波長において顕著に励起され、吸収のない波長で励起される非共鳴ラマン散乱に比べて、励起光強度あたりの散乱光量が4-6桁増大される。共鳴下ではこの選択的増強効果のため、非共鳴下において埋もれていた分子のスペクトルが検出できるようになる。例えば、波長532 nm励起では還元型・酸化型のシトクロムやヘモグロビンが同定され^{13),14)}、波長300 nm以下の励起では核酸塩基や芳香族アミノ酸が同定される¹⁵⁾。

共鳴効果を利用するには測定したい分子が光を吸収しなくてはならない。しかし生体のラマンイメージングの励起波長域として一般的な可視・近赤外波長域において光吸収をもつ分子は多くない。

非共鳴下の分子を同定する方法として、サイレント領域と呼ばれている波数域1800-2700 cm⁻¹を使う方法も開発されている。サイレント領域は通常のラマンイ

図4
細胞内核酸代謝のEdUによる経時観察結果。A) EdUなし、B-E) EdU取り込み後3, 9, 12, 14, 21時間経過。Red:EdU (2123 cm⁻¹)、Green:lipid (2849 cm⁻¹)、Blue:cytochrome c (749 cm⁻¹)。細胞株はHeLa。図は参考文献16より許可を得て転載。

メージングでは分析の対象とされない。これは、サイレント領域には細胞や組織に由来する生体分子からの信号がほとんど含まれないためである。しかし生体分子からの信号を含まないという特徴を逆に利用することにより、サイレント領域は生体のラマンイメージングにとって有用となる。すなわち、サイレント領域にラマン散乱バンドを有する化学構造(=ラマンタグ)を使うことにより、そのような化学構造をもつ生体外来分子を膨大な種類の生体分子に邪魔されることなく同定できる。図4はその一例として、EdU(5-エチニル-2'-デオキシウリジン)を細胞に取り込ませ、細胞内の核酸代謝の様子を経時ラマン観察した結果である¹⁶⁾。EdUはC≡C結合由来のラマン散乱バンド(2129 cm⁻¹)により、試料生来の分子の影響を受けず測定される。C≡C結合の他にもC-D結合やC≡N結合もサイレント領域にラマン散乱バンドをもつことから、これらの化学構造をもつ薬剤や、わずかに構造変化させた核酸や脂質、補酵素などの生体分子の類似体もサイレント領域において、膨大な種類の生体分子に邪魔されることなく同定できる¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。薬剤や生体分子の類似体の観察は、薬の作用や細胞の代謝動態などの理解に有用である。

ラマンタグ観察は蛍光観察に似ており、なぜラマンタグ観察なのかと思われるかもしれない。これまでにラマンタグ観察の蛍光観察に対するメリットがいくつか議論されている。その1つは、蛍光より多くの種類の分子・オルガネラを同時観察できる可能性である。様々なラマンタグを使うことにより、10種類以上の

分子・オルガネラの同時識別が報告されている²⁰⁾。ラマン散乱では蛍光に比べて各々のバンドの波長幅が小さいため、異なる分子のスペクトルが少ないクロストークで検出される。このことは、高い分子識別能につながっている。もう1つのメリットは、ラマンタグの小ささである。ラマンタグの多くは原子数個により構成されているため、計測対象の分子よりも小さい。ラマンタグは蛍光標識できないほど小さい分子のマーカースとして特に有用である¹⁷⁾。

共鳴効果やラマンタグはラマンイメージングの分子同定能を劇的に向上するが汎用的とはいえない。汎用的な方法は、分光器の波長分解能を向上させることである。分光器の波長分解能とは検出器上において見分けられる2つの線スペクトルの最小波長差として定義されるものであり、分光器の構成を最適化することにより向上できる。しかし分光器の構成は信号対雑音比にも影響を与えるため、高い波長分解能を得るために信号対雑音比が犠牲になることもある。

ラマンスペクトルが分子に固有であることを利用すれば、データの数学的処理によって、重なりあうスペクトルの分離を行える⁶⁾。ラマンイメージングにより得られる各座標のスペクトルは試料に含まれる分子のスペクトルの線形結合となっているため、試料に含まれる分子の種類が測定されるスペクトルの数と同じかそれ以下である場合は理論上、各分子のスペクトルとその分布が一意に求まる。このような数学的処理を応用すれば、細胞の遺伝子発現パターンをラマンスペクトルから同定することもできる^{21), 22)}。

4.

超解像化技術

ラマンイメージングで得られる各座標のスペクトルは、ある体積を有する領域から測定されたものである。座標ごとのスペクトルの信号検出領域を小さくできれば、スペクトルに寄与する分子の種類を減らすことができ、スペクトルから分子の同定を行いやすくなる。

信号検出領域を小さくするということはイメージングの空間分解能を向上させることにほかならない。イメージングの空間分解能は、試料中のぎりぎり識別できる無限小物体の距離として定義され、光の波長 λ と対物レンズの開口数NAとにより、レンズ焦点面内では $0.61 \lambda/NA$ 、レンズ光軸方向では λ/NA^2 と表される。すなわち空間分解能の向上は、短波長の光と開口数が大きい対物レンズにより達成される。ただし対物レンズの開口数はせいぜい1.5程度であるため、空間分解

能は光波長の半分程度に制限される。また短波長の光により高空間分解能を実現できるが、短波長の光を用いたラマン測定では共鳴効果のためスペクトル情報が変わってしまう上に、試料はダメージを受けやすくなる。

励起波長を変えることなく高い空間分解能を得るには、NAと波長による空間分解能の制約を受けないイメージング技術が必要である。そのようなイメージング技術は超解像技術として知られている。

ラマン顕微鏡の超解像技術の1つとしてチップ増強ラマン散乱(TERS)顕微鏡が開発されている²³⁾。TERS顕微鏡では、走査型プローブ顕微鏡と金属ナノ構造を先端に有する探針を用いる。探針先端に励起レーザーを照射しながら試料を走査することにより、金属ナノ構造近傍に生じる増強ラマン散乱により試料をイメージングする。おおよそ30 nm程度またはそれ以下の高い空間分解能のラマン散乱画像を得られる。高い空間分解能が得られる一方で、走査型プローブ顕微鏡を用いるため分析対象は試料表面10 nm程度に限られる。

細胞内部を観察するには、伝播光を利用する超解像技術が必要である。その1つとして構造化照明を利用する超解像ラマン顕微鏡が開発されている²⁴⁾。構造化照明は実空間周期的な繰り返し縞状のパターン照明であり、構造化照明された試料の観察像には干渉縞が観察される。この干渉縞には従来の光学顕微鏡では得られない高周波数成分の試料空間情報が含まれている。干渉縞の位相と配向を変えて画像を取得しそれら画像データを処理することにより、従来の光学顕微鏡の1.4倍の空間分解能をもつ超解像顕微鏡画像が得られる²⁵⁾。構造化照明をスリット走査型ラマン顕微鏡法に応用し2種類のポリマービーズ塗布基板を観察した結果を図5に示す。構造化ライン照明では通常のライン照明に比べて空間分解能が向上している。空間分解能の向上によりスペクトルの分離能も向上している。

構造化照明技術とともに光学顕微鏡の超解像技術としてよく知られているものとして局在化顕微鏡法²⁶⁾と誘導放出抑制顕微鏡法²⁷⁾とがある。これらは蛍光顕微鏡の超解像技術として知られているが、同様の原理によるラマン顕微鏡の超解像技術も開発されている。局在化顕微鏡と類似の方法では金属ナノ構造による増強ラマン散乱を利用する²⁸⁾。この方法では試料表面に金属を薄く蒸着したのちレーザー光を一様照射し、金属近傍から発する増強ラマン散乱によりイメージング観察を行う。照射するレーザー光のパワーを低く抑え信号積算時間を短くした場合、1分子の増強ラ

図5 構造化ライン照明 (SLI) と通常ライン照明 (LI) により直径 500 nm PS ビーズ (3055 cm^{-1} ; 緑)・直径 800 nm PMMA ビーズ (2957 cm^{-1} ; 赤) 混合試料を観察した結果. ii と v はそれぞれ 2 種類のビーズの境界領域から LI と SLI により得たスペクトル. v では ii と比べて PS と PMMA のスペクトルの混合が少ない. 図は参考文献 24 より許可を得て転載.

マン散乱が計測されるようになり、確率的に生じる散乱過程を捉えられるようになるため、信号が明滅する。明滅する発光点の中心位置を決定することにより 1 分子の位置が決定される。この測定を繰り返し行うことにより 20-30 nm の空間分解能のラマン画像が取得される。

誘導放出抑制顕微鏡法と類似の方法の 1 つでは非線形ラマン散乱の抑制を利用する²⁹⁾。非線形ラマン散乱光を抑制するために、非線形ラマン散乱を励起する 2 つのレーザービームのほかに decoherence ビームと呼ばれるレーザー光を試料に照射する。これによりラマン散乱過程がコヒーレントではなくなり、非線形ラマン散乱が生じなくなる。decoherence ビームをドーナツ状に整形し他の 2 つのビームとともに試料を照射すれば、非線形ラマン散乱はドーナツビーム照射領域では抑制され、非線形ラマン散乱によりイメージングの空間分解能は向上する。

超解像ラマン顕微鏡は他にも様々開発されている。その詳細は文献 30 に詳しく記述されている。

5.

おわりに

紹介した高速化法、分子同定法、および超解像法により、生命科学におけるラマンイメージング活用の敷居は確実に下がってきている。この記事を読み、ラマンイメージングの活用を検討される読者が 1 人でも多くいれば幸いである。

文 献

- 1) Palonpon, A. F. *et al.* (2013) Nat. Protoc. **8**, 677-692. DOI: 10.1038/nprot.2013.030.
- 2) Hamada, K. *et al.* (2008) J. Biomed. Opt. **13**, 044027. DOI: 10.1117/1.2952192.
- 3) Okada, M. *et al.* (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 28-32. DOI: 10.1073/pnas.1107524108.
- 4) Kumamoto, Y. *et al.* (2019) J. Phys. Chem. B **123**, 2654-2661. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b11295.
- 5) Soldevila, F. *et al.* (2019) Optica **6**, 341-346. DOI: 10.1364/OPTICA.6.000341.
- 6) 河田 聡, 南 茂夫 (2002) 科学計測のためのデータ処理入門, CQ 出版社, 東京.
- 7) Pavillon, N., Smith, N. I. (2016) Opt. Express **24**, 30038-30052. DOI: 10.1364/OE.24.030038.
- 8) Kawata, S., Kawano, S. (2019) Proceedings of Focus on Microscopy. http://www.focusonmicroscopy.org/2019/PDF/1233_Kawata.pdf
- 9) Ando, J. *et al.* (2011) Nano Lett. **11**, 5344-5348. DOI: 10.1021/nl202877r.
- 10) Zhang, Z. *et al.* (2019) Anal. Chem. **91**, 3254-3262. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03276.
- 11) Ozeki, Y. *et al.* (2012) Nat. Photon. **6**, 845-851. DOI: 10.1038/nphoton.2012.263.
- 12) Kinogawa, R. *et al.* (2019) J. Raman Spectrosc. **50**, 1141-1146. DOI: 10.1002/jrs.5630.
- 13) Ogawa, M. *et al.* (2009) Biochem. Biophys. Res. Commun. **382**, 370-374. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.03.028.
- 14) Morimoto, T. *et al.* (2019) Analyst **144**, 2531-2540. DOI: 10.1039/c8an02213e.
- 15) Kumamoto, Y. *et al.* (2019) Adv. Opt. Mater. **7**, 1801099. DOI: 10.1002/adom.201801099.
- 16) Yamakoshi, H. *et al.* (2011) J. Am. Chem. Soc. **133**, 6102-6105. DOI: 10.1021/ja108404p.
- 17) Yamakoshi, H. *et al.* (2012) J. Am. Chem. Soc. **134**, 20681-20689. DOI: 10.1021/ja308529n.
- 18) Shi, L. *et al.* (2018) Nat. Commun. **9**, 2995. DOI: 10.1038/s41467-018-05401-3.
- 19) Yamakoshi, H. *et al.* (2014) Chem. Commun. **50**, 1341-1343. DOI: 10.1039/c3cc48587k.
- 20) Wei, L. *et al.* (2017) Nature **544**, 465-470. DOI: 10.1038/nature22051.
- 21) Germond, A. *et al.* (2018) Commun. Biol. **1**, 85. DOI: 10.1038/s42003-018-0093-8.

- 22) Kobayashi-Kirschvink, K. J. *et al.* (2018) *Cell Syst.* **7**, 104-117.e4. DOI: 10.1016/j.cels.2018.05.015.
- 23) Hayazawa, N. *et al.* (2000) *Opt. Commun.* **183**, 333-336. DOI: 10.1016/S0030-4018(00)00894-4.
- 24) Watanabe, K. *et al.* (2015) *Nat. Commun.* **6**, 10095. DOI: 10.1038/ncomms10095.
- 25) Gustafsson, M. G. L. (2000) *J. Microsc.* **198**, 82-87. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
- 26) Bezig, E. (1995) *Opt. Lett.* **20**, 237-239. DOI: 10.1364/ol.20.000237.
- 27) Hell, S. W., Wichmann, J. (1994) *Opt. Lett.* **19**, 780-782. DOI: 10.1364/OL.19.000780.
- 28) Ayas, S. *et al.* (2013) *Sci. Rep.* **3**, 2624. DOI: 10.1038/srep02624.
- 29) Ruchira Silva, W. *et al.* (2016) *ACS Photonics* **3**, 79-86. DOI: 10.1021/acsp Photonics.5b00467.
- 30) Fujita, K. (2019) *Label-Free Super-Resolution Microscopy* (Astratov, V., ed.) **8**, pp. 195-212, Springer Nature Switzerland. AG. DOI: 10.1007/978-3-030-21722-8_8.

熊本康昭

熊本康昭 (くまもと やすあき)

大阪大学応用物理学ナノフォトニクス助教
2011 年大阪大学博士号 (工学) 取得, 2011 年理化学研究所特別研究員, 2015 年大阪大学特任研究員, 2015 年京都府立医科大学細胞分子機能病理学助教を経て 2019 年より現職。
研究内容: 深紫外顕微鏡, ラマン散乱顕微鏡などの生体イメージング顕微鏡の開発とその医学応用
連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
E-mail: kumamoto@ap.eng.osaka-u.ac.jp
URL: https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home_j.html

藤田克昌

藤田克昌 (ふじた かづまさ)

大阪大学応用物理学ナノフォトニクス教授
2000 年大阪大学博士号 (工学) 取得, 2000 年日本学術振興会特別研究員 (於京都府立医科大学), 2002 年大阪大学応用物理学助手, 2007 年大阪大学応用物理学准教授を経て 2018 年より現職。
研究内容: 超解像光学顕微鏡, ラマン散乱顕微鏡, ラマンタグイメージングなどの新しい光学顕微鏡技術の開発とその応用
連絡先: 同上
E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp
URL: 同上