光と物質の相互作用を利用した 超解像蛍光顕微鏡*

Super-Resolution Fluorescence Microscopy Using Light-Matter Interactions

嶽 文宏**
Fumihiko DAKE

Key words

fluorescence microscopy, widefield microscopy, confocal microscopy, diffraction limit, super-resolution

1. はじめに

光学顕微鏡の分解能は光の回折限界によって光波長の約半分に規定される。これは E. Abbe によって導かれた真理であり、現在もさまざまな分野で普遍的に利用されている。光の伝搬・干渉といった純粋光学を取り扱う限りにおいて、この理論の正当性は論を俟たない。これに対し、1990 年代から、光の回折限界を超えた空間分解能を有する超解像蛍光顕微鏡が次々と提案実証されている。これらの手法が回折限界を超える事由は、観察対象である試料に生じる「光と物質の相互作用」を巧みに利用したことにより帰結する。光の回折限界を超えるには光以外の作用が必要であり、これは光学顕微鏡の機序の Optics から Photonics へのパラダイムシフトを示唆している。本稿では、蛍光顕微鏡を照明・検出方式に基づいて広視野型とレーザー走査型とに分類し、それぞれにおける代表的な超解像技術とそれに利用されている光と物質の相互作用を紹介する。

2. 蛍光顕微鏡における超解像の定義

昨今、さまざまな分野で「超解像」という言葉を目にするが、分野によって定義が異なったり定義自体が曖昧であったりすることがしばしば見受けられる。本稿では、超解像の定義として光学伝達関数 (OTF: Optical Transfer Function) のカットオフ周波数を用いる。OTF は光学系が伝達可能な空間周波数帯域を規定しており、カットオフ周波数はその最大値である (開口数 NA と光波長 λ によって規定される)。

蛍光顕微鏡は、試料を励起する励起光学系と、試料から生じる蛍光を検出する結像光学系で構成される。励起・結像光学系における方式の違いから、広視野型とレーザー走査型に大別され、OTF も方式に依存する。広視野型蛍光顕微鏡では、励起光を試料に面照射し、2 次元撮像素子で

蛍光を取得する。画像を一括取得できることによる高速性や、単位面積当たりのレーザー強度を小さくできることによる低侵襲性といった利点がある。OTF は結像光学系だけで規定されるため、カットオフ周波数は $2NA/\lambda$ となる。レーザー走査型蛍光顕微鏡では、対物レンズ焦点面に光スポットを形成し、スポットをスキャナ等で 2 次元走査することで画像を取得する。光検出器には、光電子増倍管などの点検出器が用いられる。結像光学系の試料共役位置にピンホールを設置することで、焦点外れ面から生じる背景光除去が可能となるため、優れた深部観察能を有する。OTF は励起光学系と結像光学系の両方で規定されるため、カットオフ周波数は $2NA/\lambda + 2NA/\lambda = 4NA/\lambda$ となる¹⁾。

本稿では、広視野型とレーザー走査型においてカットオフ周波数がそれぞれ $2NA/\lambda$, $4NA/\lambda$ を超える手法を超解像と定義し、二つの装置構成における代表的な超解像技術を紹介する。

3. 広視野型超解像蛍光顕微鏡

広視野型蛍光顕微鏡における超解像技術としては、PALM (Photo-Activated Localization Microscopy)²⁾ や STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)³⁾ に代表される SMLM (Single-Molecule Localization Microscopy) が広く知られている。PALM と STORM は 2006 年にアメリカの研究グループからそれぞれ独自に提案された非常に類似した手法である (PALM の開発者である E. Betzig は 2014 年にノーベル化学賞を受賞している)。両者の違いは用いられる蛍光物質に帰結する (PALM は蛍光たんぱく質を、STORM は蛍光化学色素を使用する)。

SMLM のコンセプトを説明するにあたって、思考実験として視野内に蛍光分子が一つしかない場合を考えてみよう。この蛍光分子の発光位置を規定する際、光の回折限界の制約が生じるであろうか？ 蛍光分子は結像光学系の点像強度分布関数 (PSF: Point Spread Function) で規定される拡がりをもって撮像素子上に結像する。蛍光分子の位置は、この輝点の重心位置に相当する。重心の位置決め精

*原稿受付 令和 2 年 4 月 20 日

** (株) ニコン研究開発本部光技術研究所 (神奈川県横浜市栄区長尾台町 471)

図1 SMLMの撮像シーケンス⁶⁾ (a) マイクロチューブ (b) ~ (e) 各シーケンスで取得される輝点画像 (f) 超解像画像

度は主に光子数で規定されることに鑑みると、光の回折限界による制限が及ばなくなる。これがSMLMの基本コンセプトである。このコンセプトを実現するためには、蛍光分子の分布がスパースであり、それぞれの輝点像が互いに重複しないことが大前提となる。しかしながら、実際の観察対象は多数の蛍光分子で構成され、それぞれの像が回折限界程度の広がりをもって重なり合っている。SMLMのキーポイントは、発光状態を光で確率的に制御可能な特殊な蛍光分子を利用することで、蛍光分子の発光がスパースになるような状況を意図的に作り上げることによって成功した点にある（この特殊な蛍光分子の発見者である W. E. Moerner も 2014 年にノーベル化学賞を受賞している⁴⁾）。この光スイッチングの詳細機構は蛍光分子に依存するが⁵⁾、一般的に、試料を一律に非発光状態にするための光と、試料を確率的に発光状態にする光を用いることで、SMLM にとって理想的な状況が実現されている。

図1にSMLMの撮像シーケンスを示す⁶⁾。観察対象である線状のマイクロチューブ（図1(a)）を時間的空間的に離散化して発光させ、発光点の重心を分子位置と規定する。蛍光分子の発光は確率に従うので、全分子からの蛍光を観測するために複数の画像（～数千枚）を取得し（図1(b)~(e)）、各画像で得られた分子位置を点描画の要領でプロットすることで、視野内の分子位置が高精度で規定された超解像画像が得られる（図1(f)）。面内方向の重心位置精度 Δr は以下の式で表される⁷⁾。

$$\Delta r = \sqrt{\frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}} \approx \frac{s}{\sqrt{N}}. \quad (1)$$

ここで、 s は PSF の広がり幅、 a はピクセルサイズ、 b はバックグラウンドレベル、 N は光子数である。一般的に、 ~ 10 nm の精度が得られている。蛍光1分子からの微弱光を用いて高精度で位置決めを行うために、背景光を抑制し、信号対雑音比の高い画像を得ることが非常に重要となる。背景光抑制のために、全反射照明法⁸⁾が用いられている。全反射照明法では、開口数の大きい (> 1.4) 対物レンズを用いて臨界角を超える角度で励起光を斜入射させる

図2 マルチカラー SMLM 画像⁶⁾ (a) (b) 落射蛍光像 (c) SMLM 像 試料：サル腎細胞 マゼンタ：ミトコンドリア (Alexa405, Cy5 で染色) グリーン：マイクロチューブ (Alexa488, Cy5 で染色)

図3 3次元 SMLM⁶⁾ (a) (b) 3次元 SMLM 画像 試料：BSC-1 細胞のチューブリン (c) 3次元 SMLM の原理

ことで、カバーガラス底面の極近傍領域 (~ 100 nm) にのみ近接場光を発生させる。近接場光の範囲内に存在する分子のみが励起されるため、背景光の発生を抑制することができる。近接場領域よりも深部を観察したい場合には、臨界角をわずかに下回る角度で励起光を入射させる薄層斜照明法が利用される。また、光スイッチングに2光子吸収を利用することで、観察領域を特定の深度のみに制限する手法も提案されている⁹⁾。

図2にマルチカラー SMLM 画像を示す⁶⁾。通常の蛍光に比べて、SMLM では圧倒的に鮮明な画像が得られており、ミトコンドリアとチューブリンの空間配置が詳細に可視化されている。図3に3次元 SMLM について示す。光軸方向の分子位置も回折限界以下の精度で求めることが可能となる（図3(a, b)）。手法としていくつかあるが⁵⁾、ここでは非点収差法¹⁰⁾について述べる。対物レンズと撮像素子の間にシリンダリカルレンズを設置することで、試料の Z 位置（深さ）に応じて輝点の形状が変化するため、楕円率から深さ情報を算出することが可能となる（図3(c)）。 ~ 60 nm の位置精度（光軸方向）が得られている¹⁰⁾。

SMLM で可視化されるのは1分子蛍光の輝点の位置であり、これは純粋な光学分解能とは異なる。試料がスパースであるという先験情報を導入し、その状況を特殊な蛍光分子を利用して巧妙に実現することで、光の回折限界を正

面突破することなく超解像を実現した殊勲の手法であるといえる。SMLM の課題として、蛍光を時分割して多数の画像を取得することに起因する時間分解能の制約がある。これに対して、高輝度・高速スイッチング可能な蛍光プローブの適用によるライブセルイメージングも実現されており¹¹⁾、実用性向上に関する技術開発も着実に進行している。

広視野型の超解像顕微鏡として、構造化照明顕微鏡 (SIM: Structured Illumination Microscopy)^{12)~14)}にも簡単に触れておきたい (詳細は参考文献 12) をご参照願いたい)。試料を構造化照明で励起することによって生じるモアレ効果を利用して、通常の広視野型蛍光顕微鏡の 2 倍の空間分解能が達成されている¹³⁾¹⁴⁾。さらに、SIM に飽和励起・誘導放出・光スイッチングといった光と物質の非線形相互作用を導入することで、超解像効果をさらに高める非線形 SIM も提案されている^{15)~17)}。また、構造化照明をライトシート顕微鏡に適用した手法 (格子ライトシート) も提案されており、空間分解能 90 nm で毎秒数十フレームの画像取得が実現されている¹⁸⁾。さらに、格子ライトシートと膨張顕微鏡 (Expansion Microscopy)¹⁹⁾を組み合わせた手法により、空間分解能 8 nm でのショウジョウバエ全脳イメージングも実現されている²⁰⁾。

4. レーザー走査型超解像蛍光顕微鏡

レーザー走査型蛍光顕微鏡における超解像技術としては、STED (Stimulated Emission Depletion) 顕微鏡^{21)~23)}が広く知られている (開発者である S.W. Hell は 2014 年にノーベル化学賞を受賞している)。STED 顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡で使用される励起光に加えて、誘導放出を誘起するための STED 光を光源として用いる。STED 光の波長は試料の蛍光スペクトルの一部と重複しており、対物レンズ焦点面においてドーナツ状の PSF を形成するようあらかじめ波面整形されている。誘導放出が生じると、自然放出光 (蛍光) の一部が誘導放出光に変換される。誘導放出光は STED 光と同波長で生じるので、STED 光波長と非重複領域の蛍光を検出することで、誘導放出によって蛍光強度が低下することになる。蛍光効率 η は、光源がパルスレーザーの場合は $\exp[-\ln 2 I_{\text{STED}}/I_s]$ 、CW レーザーの場合は $1/(1 + I_{\text{STED}}/I_s)$ で表現される²¹⁾。 I_{STED} は STED 光強度、 I_s は飽和強度 (蛍光効率が 1/2 になるときの STED 光強度) である。このように I_{STED} を強くするほど蛍光を抑制できる。STED 光はドーナツ状の PSF をしており、この「穴」の領域も光の回折限界による制限を受けるが、 I_{STED} を強くすることによって生じる誘導放出の飽和を巧みに利用することで、蛍光発光領域 (ドーナツの穴) を光の回折限界以下に制限することに成功している。STED 顕微鏡の面内分解能は²²⁾、

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + I_{\text{STED}}/I_s}} \quad (2)$$

図 4 にイメージング結果を示す²³⁾。通常の蛍光

図 4 Confocal・STED 画像 試料: PtK2 細胞のマイクロチューブ スケールバー: 2 μm (文献 23) より転載, Copyright (2008) National Academy of Sciences)

(Confocal) 画像と比較して、マイクロチューブの微細構造が鮮明に可視化されている。高耐光性のダイヤモンド格子欠陥を観察した場合には、面内分解能 5 nm が達成されている²⁴⁾。さらに、光軸方向に光強度ゼロの点をもつ STED 光を追加導入することによる 3 次元超解像イメージングも実現されている²³⁾。応用に関しても、面内分解能 60 nm でのシナプス小胞体のビデオレートイメージング²⁵⁾、マルチカラーイメージング²⁶⁾や蛍光寿命測定²⁷⁾などが実現されている。また、ドーナツ状の光を用いて、STED とは異なるコンセプトで <10 nm の面内分解能を達成する MINIFLUX²⁸⁾という手法も近年報告されている。

実用上、画質を担保するために二つの機序が重要となる。一つは光褪色の抑制である。理論的には STED 光強度 I_{STED} を強くするほど分解能が向上するが、そのような高強度においては試料の褪色が課題となる。このため褪色にくい蛍光分子を利用することが肝要である。また、試料の空間分布に応じて STED 光強度を制御することで、褪色を抑制する手法も提案されている²⁹⁾。もう一つは理想的な PSF エンジニアリングの実現である。生体試料中の屈折率分布の影響で生じる波面収差が大きくなると、ドーナツ状の PSF が乱され、本来蛍光を検出したい「穴」がふさがれてしまう場合がある。この課題に対しては、補償光学の適用が提案されており、一定の効果が得られている³⁰⁾。

ほかにも、STED とは異なる形態で誘導放出を利用した手法や³¹⁾³²⁾、飽和励起³³⁾、光スイッチング³⁴⁾といった他の光と物質の相互作用を用いて超解像を実現している手法も報告されている。いずれの手法においても、信号発生領域が入射光 PSF の多重積となることを利用している。ここでは、近年、著者が開発に取り組んでいる誘導遷移の繰り返し (REST: Repetitive Stimulated Transition) を利用した非線形蛍光顕微鏡を紹介する³²⁾³⁵⁾。

図 5 にコンセプトを示す。光源として誘導吸収 (励起) を誘起する Pump 光と、誘導放出を誘起する Probe 光を用いる。図 5 (a) は Pump 光による励起により蛍光が発生する様子を示している。図 5 (b) は低次の非線形蛍光 (LNF: the Lowest Nonlinear Fluorescence) の模式図であ

図5 蛍光と非線形蛍光の現象論的モデル (a) 線形蛍光 (b) ~ (d) 非線形蛍光

図6 (a) 蛍光 (Confocal) 画像 (b) REST 画像 (c) ラインプロファイル 試料: スフェロイド (HT-29 細胞のアクチン)

る。Pump 光による励起、Probe 光による誘導放出の結果、二つの入射光の積に比例する非線形蛍光が発生する。LNF は、PSF の積の効果によって通常の蛍光よりも優れた面内・光軸分解能を有する³¹⁾。提案する REST 過程では、Pump 光による励起、Probe 光による誘導放出を経た蛍光分子の一部は、さらに Pump 光あるいは Probe 光により励起されると考える (図5 (c, d))。REST 信号の発生領域が入射光 PSF の3重積で規定されるため、通常の蛍光や LNF と比較して3次元分解能の向上が期待される。REST 過程は LNF 過程より高次の非線形効果と見なすことができる。従来の蛍光に対する非線形蛍光の3次元分解能向上効果は、 $\sqrt{m}$ で表現される³⁵⁾。ここで、 m は関与する誘導遷移の回数であり、REST では $m=3$ となる。

REST イメージングについて述べる。二つの REST 過程は分解能や光退色性に関して相補的な特徴を有しているが、本稿では図5 (d) で表現される REST 過程について述べる。REST 信号のみを抽出するために、ロックイン検出を用いる。Pump 光と Probe 光の強度をそれぞれ f_1, f_2 で強度変調し、二つの光を対物レンズで試料に集光する。試料から生じた蛍光を光電子増倍管で受光し、周波数 $f_1 - 2f_2$ で復調することで REST 信号を検出する。イメージング結果を図6 に示す。(a) は通常の蛍光 (Confocal) 画像、(b) は REST 画像である。図6 (c) に (a) (b) の点線部のラインプロファイルを示す。REST 顕微鏡の分解能向上効果が明瞭に示されている。

REST のような非線形蛍光は、特殊な PSF エンジニアリングが不要であるため、簡易な光学構成で3次元分解能を向上させることができる点に優位性がある。誘導放出が蛍光寿命を反映することを利用して、蛍光寿命測定も実現されている³⁶⁾。理論的には、繰り返しの回数を増やすことで分解能を無限に向上させることができるが、そうした高

次の非線形信号ほど発生効率が低下するため、信号対雑音比が実効的な分解能を規定することになる。

5. ま と め

超解像蛍光顕微鏡は、Abbe の結像理論では考慮されていなかった光と物質の相互作用を巧みに利用することで光の回折限界を打破している。先人が築き、そして紡いできた理論に畏敬の念を払いつつ、あらゆる固定観念と既存概念を取り払ってその前提条件を考査し、真理を探究することで成し遂げられたブレイクスルーである。最新の研究では、深層学習を利用して通常の蛍光画像から超解像画像を得る手法³⁷⁾も報告されており、超解像技術は日進月歩で進化を遂げている。光の回折限界とともに、先人の想像とユーザーの期待を超える新奇手法の開発も待望される。

蛍光顕微鏡の空間分解能がさらに向上したとしても、電子顕微鏡のそれには到底到達しないであろう。すなわち、微細構造の形態学的評価のみであれば、従来の電子顕微鏡で事足りることになる。電子顕微鏡に対する蛍光顕微鏡の強みは、蛍光標識技術による観察対象の選択的可視化とライブセルイメージング能にある。この観点から、光の回折限界を超えた代償として、従来の蛍光顕微鏡が備えていた広い蛍光色素選択性や低侵襲性、さらには高速性・高感度性・深部観察能を損なうことは看過されるべきでない。超解像顕微技術には解決すべきチャレンジングな至上命題がまだまだ残されており、ますます探求の価値がある領域・分野であるといえる。

参 考 文 献

- 河田聡: 超解像の光学, 学会出版センター, (1999).
- E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacio, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H.F. Hess: Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science*, **313**, 5793 (2006) 1642.
- M.J. Rust, M. Bates and X. Zhuang: Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution, *Nat. Methods*, **3**, 10 (2006) 793.
- R.M. Dickson, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien and W.E. Moerner: On/Off blinking and switching behavior of single molecules of green fluorescent protein, *Nature*, **388** (1997) 355.
- 今井健太: 超解像顕微鏡 ローカリゼーション法, 応用物理, **87**, 8 (2019) 614.
- <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/single-molecule-super-resolution-imaging>.
- R.E. Thompson, D.R. Larson and W.W. Webb: Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes, *Biophys. J.*, **82**, 5 (2002) 2775.
- D. Axelrod: Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology, *Traffic*, **2**, 11 (2001) 764.
- J. Fölling, V. Belvo, D. Riedel, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, M. Bossi and S.W. Hell: Fluorescence nanoscopy with optical sectioning by two-photon induced molecular switching using continuous-wave lasers, *Chem. Phys. Chem.*, **9**, 2 (2008) 321.
- B. Huang, W. Wang, M. Bates and X. Zhuang: Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy, *Science*, **319**, 5864 (2008) 810.
- S.A. Jones, S.-H. Shim, J. He and X. Zhuang: Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells, *Nat. Methods*,

- 8, 6 (2011) 499.
- 12) 照井勇輝：回折限界を破る超解像蛍光顕微鏡, *O Plus E*, **37**, 10 (2015) 1.
- 13) M.G.L. Gustafsson: Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy, *J. Microsc.*, **198**, 2 (2000) 82.
- 14) M.G.L. Gustafsson, L. Shao, P.M. Carlton, C.J.R. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, D.A. Agard and J.W. Sedat: Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination, *Biophys. J.*, **94**, 12 (2008) 4957.
- 15) M.G.L. Gustafsson: Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 37 (2005) 13081.
- 16) E.H. Rego, L. Shao, J.J. Macklin, L. Winoto, G.A. Johansson, N.K. Hughes, M.W. Davidson and M.G.L. Gustafsson: Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 3 (2012) E135.
- 17) F. Dake, S. Nakayama and Y. Taki: Theoretical assessment of two-dimensional nonlinear structured illumination microscopy based on structured excitation and structured stimulated emission depletion, *Opt. Rev.*, **22** (2015) 598.
- 18) B.C. Chen, W.R. Legant, K. Wang, L. Shao, D.E. Milkie, M.W. Davidson, C. Janetopoulos, X.S. Wu, J.A. Hammer III, Z. Liu, B.P. English, Y.M. Kiyosue, D.P. Romero, A.T. Ritter, J.L. Schwartz, L.F. Laylin, R.D. Mullins, D.M. Mitchell, J.N. Bembenek, A. -C. Reymann, R. Böhme, S.W. Grill, J.T. Wang, G. Seydoux, U.S. Tulu, D.P. Kiehart and E. Betzig: Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution, *Science*, **346**, 6208 (2014) 1257998.
- 19) F. Chen, P.W. Tillberg and E.S. Boyden: Expansion microscopy, *Science*, **347**, 6221 (2015) 543.
- 20) R. Gao, S.M. Asano, S. Upadhyayula, I. Pisarev, D.E. Milkie, T.-L. Liu, V. Singh, A. Graves, G.H. Huynh, Y. Zhao, J. Bogovic, J. Colonell, C.M. Ott, C. Zugates, S. Tappan, A. Rodriguez, K.R. Mosaliganti, S.-H. Sheu, H.A. Pasolli, S. Pang, C.S. Xu, S.G. Megason, H. Hess, J. Lippincott-Schwartz, A. Hantman, G.M. Rubin, T. Kirchhausen, S. Saalfeld, Y. Aso, E.S. Boyden and E. Betzig: Cortical column and whole-brain imaging with molecular contrast and nanoscale resolution, *Science*, **363**, 6424 (2019) eaau8302.
- 21) M. Leutenegger, C. Eggeling and S.W. Hell: Analytical description of STED microscopy performance, *Opt. Express*, **18**, 25 (2010) 26417.
- 22) V. Westphal and S.W. Hell: Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope, *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 14 (2005) 143903.
- 23) B. Hein, K.I. Willig and S.W. Hell: Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 38 (2008) 14271.
- 24) E. Rittweger, K.Y. Han, S.E. Irvine, C. Eggeling and S.W. Hell: STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution, *Nat. Photon.*, **3** (2009) 144.
- 25) V. Westphal, S.O. Rizzoli, M.A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn and S.W. Hell: Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement, *Science*, **320**, 5873 (2008) 246.
- 26) J. Bückers, D. Wildanger, G. Vicidomini, L. Kastrup and S.W. Hell: Simultaneous multi-lifetime multi-color imaging for colocalization analyses, *Opt. Express*, **19**, 4 (2011) 3130.
- 27) E. Aukorius, B.R. Boruah, C. Dunsby, P.M.P. Lanigan, G. Kennedy, M.A.A. Neil and P.M.W. French: Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging, *Opt. Lett.*, **33**, 2 (2008) 113.
- 28) F. Balzarotti, Y. Eilers, K.C. Gwosch, A.H. Gynna, V. Westphal, F.D. Stefani, J. Elf and S.W. Hell: Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes, *Science*, **355**, 6325 (2017) 606.
- 29) J. Heine, M. Reuss, B. Harke, E. D' Este, S.J. Sahl, and S.W. Hell: Adaptive-illumination STED nanoscopy, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, 37 (2017) 9797.
- 30) P. Zdankowski, D.M. Gloin and J.R. Swedlow: Full volume super-resolution imaging of thick mitotic spindle using 3D AO STED microscope, *Biomed. Opt. Express*, **10**, 4 (2019) 1999.
- 31) C.Y. Dong, P.T.C. So, T. French and E. Gratton: Fluorescence lifetime imaging by asynchronous pump-probe microscopy, *Biophys. J.*, **69**, 6 (1995) 2234.
- 32) F. Dake and S. Hayashi: High-resolution nonlinear fluorescence microscopy using repetitive stimulated transition based on the saturation of stimulated emission implemented with two-color continuous-wave lasers, *Opt. Lett.*, **44**, 13 (2019) 3402.
- 33) K. Fujita, M. Kobayashi, S. Kawano, M. Yamanaka and S. Kawata: High-resolution confocal microscopy by saturated excitation of fluorescence, *Phys. Rev. Lett.*, **99**, 22 (2007) 228105.
- 34) K. Isobe, A. Suda, H. Hashimoto, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki and K. Midorikawa: High-resolution fluorescence microscopy based on a cyclic sequential multiphoton process, *Biomed. Opt. Express*, **1**, 3 (2010) 791.
- 35) F. Dake, N. Fukutake, S. Hayashi and Y. Taki: Super-resolving nonlinear fluorescence microscopy with pump-probe setup using repetitive stimulated transition, *Appl. Phys. Express*, **11**, 1 (2018) 012401.
- 36) F. Dake and S. Hayashi: Time-domain fluorescence lifetime imaging by nonlinear fluorescence microscopy constructed of a pump-probe setup with two-wavelength laser pulses, *Appl. Opt.*, **57**, 4 (2018) 757.
- 37) H. Wang, Y. Rivenson, Y. Jin, Z. Wei, R. Gao, H. Günaydin, L.A. Bentolila, C. Kural and A. Ozcan: Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy, *Nat. Methods*, **16** (2019) 103.

澤 文宏

2009 年大阪大学大学院工学研究科修士課程修了。同年(株)ニコン入社。光学顕微鏡の光学設計・研究開発に従事。