

<特集「光学顕微鏡法 -その歴史と展望-」>

光学顕微鏡法の歴史的概観

熊本 康昭*, 田中 秀央

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学

Optical Microscopy: a Historical Overview

Yasuaki Kumamoto and Hideo Tanaka

Department of Pathology and Cell Regulation,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Sciences

抄 録

光学顕微鏡は今日、科学、医療、工業などの多くの分野において欠かせないものであり、分野によっては、あたかも空気のような存在であるといっても過言ではない。しかしながら、あるいは、それゆえにというべきか、基本的な使い方以外は光学顕微鏡のことを全く知らない、という方は非常に多い。そこで本稿では、光学顕微鏡法の歴史を概観することにより、紀元前の光学やレンズを源泉とし、人類がどのようにして光学顕微鏡を産み出し、研究・改良を重ね、普及させてきたか、さらには、光学顕微鏡が科学の発展にとって如何に重要であったか、を解説する。20世紀以降の歴史については、特に生命科学にとって重要である位相顕微鏡、蛍光顕微鏡、超解像顕微鏡、非線形光学顕微鏡、ライトシート顕微鏡、およびラマン顕微鏡にフォーカスする。蛍光顕微鏡については、本学病理学教室の貢献を詳述する。歴史から見えてくる進化の流れを踏まえた上で、光学顕微鏡の未来を展望する。

キーワード：光学顕微鏡, Carl Zeiss, 生細胞観察, 分子イメージング, ビッグデータ。

Abstract

Optical microscopy is nowadays an essential means in various fields of science, industry, and medicine. However, many microscope users do not have sufficient knowledge about optical microscopy except the actual operation of the instruments for daily use. Here we overview the history of optical microscopy regarding how the optics and lenses in the early days had developed into current optical microscopy and how microscopy has contributed to advancements in science. We briefly describe several types of optical microscopy that developed from the 20th century to the present, which are particularly important in the life sciences, including bright field microscopy, phase microscopy, fluorescence microscopy, super-resolution microscopy, nonlinear microscopy, light-sheet microscopy, and Raman microscopy. We also look back on the historic accomplishment of the development of laser scanning confocal microscopy that was made in the late 1980s in the Department of Pathology, Kyoto Prefectural University of Medicine. Considering the history of optics and microscopy, we further offer the future prospects of optical instruments for the life sciences.

Key Words: Optical microscopy, Carl Zeiss, Live cell imaging, Molecular imaging, Big data.

平成29年11月14日受付 平成29年11月14日受理

*連絡先 熊本康昭 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地
kumakpum@koto.kpu-m.ac.jp

光学顕微鏡の発明

人々の光への関心は紀元前にはすでに高く、Democritus, Aristotle などの著名な哲学者らも光に関心をもっていたようである¹⁾。紀元前 300 年頃、「幾何学の父」とも呼ばれる Euclid は「光学」という書物を著し、光の直進性や視覚に関する理論をまとめている¹⁾²⁾。レンズは紀元前には存在し、光を集めて熱源を生み出すものとして利用されていたと考えられている¹⁾。

レンズの像拡大作用については、紀元 1 世紀、ローマの哲学者 Lucius Annaeus Seneca が記述している¹⁾³⁾。しかし、レンズの像拡大作用を詳述したのは、Seneca より約 1000 年の後、光学の父として知られるイラクの Ibn Al-Haytham とされる⁴⁾。Al-Haytham は、レンズや鏡を用いた反射や屈折などの光学実験を精巧に行ったとされ、レンズの像拡大の仕組みのほか、レンズの中心と辺縁とを通る光線による焦点の位置ズレ（球面収差）などを「光学の書」にまとめている⁵⁾⁶⁾。「光学の書」はラテン語に訳され、13 世紀イギリスの Roger Bacon もその内容を把握していたとされる¹⁾。その Bacon は「大著作」において、レンズの拡大作用を詳述しているほか、任意の形状・大きさのレンズを任意に配置することにより顕微鏡や望遠鏡を作製できると記している⁷⁾。また、Bacon の活躍と同時期には眼鏡が発明されたらしい¹⁾。この時代は、光学顕微鏡誕生前夜と言えよう。とはいえ、光学顕微鏡の誕生はこの時代の 300 年以上後のことである。

16 世紀も末になり、ようやく光学顕微鏡が誕生した。1590 年、オランダのメガネ職人 Hans Janssen とその息子の Zacharias Janssen が光学顕微鏡を発明したとされている¹⁾。Janssen 親子の光学顕微鏡は、2 つのレンズを組み合わせた複式顕微鏡であった⁸⁾。

16 世紀末に誕生した光学顕微鏡は、すぐに生物観察に用いられた。Robert Hooke は、自作の複式顕微鏡により昆虫、黴、コルクなどを観察し、1665 年「顕微鏡図譜」にそれらのスケッチを残している⁹⁾。顕微鏡解剖学の創設者、最初

の組織学者とされているイタリアの Marcello Malpighi は光学顕微鏡を用いて、肺、腎臓、肝臓などの微細構造を観察し、1661 年毛細血管を発見した¹⁰⁾。1674 年にはオランダの Antonie van Leeuwenhoek が倍率 100 倍を超える単式顕微鏡（図 1）を自作し、微生物を発見した他、精子、原生動物、昆虫の卵などを観察している¹¹⁾。

17 世紀は、屈折、反射、回折などの基本的な光学現象の理解が進んだ時代でもあった¹⁾。Johannes Kepler, Willebrord Snell, Isaac Newton などの光学への貢献はよく知られるところである¹⁾。Newton は光に関する多数の実験により、媒質による光屈折の角度が光の色に依存すること、レンズにより異なる色の光を集光した場合に結像位置がずれること、屈折の強さが異なるレンズを組み合わせれば異なる色の光の結像位置のずれを抑えられること、レンズの代わりに反射鏡を利用すれば異なる色の光の結像位置のずれをなくせること、などを発見している¹²⁾。これらの発見は後に、屈折率の波長依存性、レンズの色収差、色収差補正レンズ、凹面鏡として知られるものとなり、光学顕微鏡法の基礎的事項につながった。

光学顕微鏡の改良と普及

光学顕微鏡の性能を決める重要な要素として収差がある。収差とは、レンズの形状や屈折率分散（屈折率の波長依存性）により光線が理想通りに結像しない現象である。収差には屈折率

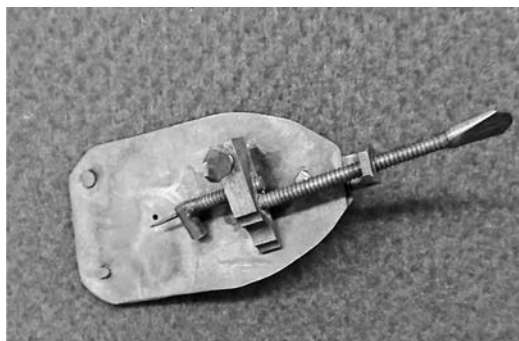


図1 1670 年頃製作されたとされる Leeuwenhoek の顕微鏡のレプリカ。東京都文京区浜野顕微鏡所蔵品。2017 年筆者（田中）撮影。

分散により波長ごとに焦点位置がずれる色収差とレンズ形状により生じる単色収差とがある。これら収差を正しく理解しない限り、高性能な光学顕微鏡を作製することはできない。17世紀当時、収差のうち理解されていたのは球面収差（単色収差の1つ）⁶⁾と色収差¹²⁾のみであった。

19世紀になり、Ludwig von Seidelらによって収差が詳細に理解されるようになる¹³⁾。この頃から、近代的な光学顕微鏡の開発・量産が始まった。1846年ドイツの機械工 Carl Zeiss は顕微鏡製造工房を立ち上げ、その後、ドイツの物理学者 Ernst Abbe とともに光学の原理に基づいた顕微鏡設計を行い、ドイツの材料学者 Otto Schott と協力し光学設計に基づいたレンズ製造を行い、高性能な光学顕微鏡を量産した（図2）¹⁴⁾。また、ドイツの光学技術者であった Carl Kellner は、1849年ケルナー式接眼鏡と呼ばれる色収差補正レンズを発明し、同年創立した光学顕微鏡メーカーによりこれを普及させた。これら2社の誕生は光学顕微鏡の近代化を象徴している。

なお、Zeissの工房は1889年に現在のCarl Zeiss社となり、Kellnerの光学顕微鏡メーカーは1869年に Ernst Leitz に引き継がれ現在のLeica社となっている。本学の病理学教室には1922～1924年（大正11～13年）頃に製造されたLeitzの光学顕微鏡が現存している（図3）。

収差論のほかにも19世紀に確立された光学顕微鏡理論は数多存在する。その1つは、Abbeの回折限界理論である。回折限界理論は、レンズにより得られる集光スポットサイズ d が $\lambda/2n\sin\theta$ （ λ :光の波長、 n :レンズ-試料間媒質の屈折率、 θ :レンズの最大集光角）より小さくならないことを示したものであり、光学顕微鏡によりどの程度まで細かい構造を観察できるかという空間分解能の議論を可能にした。回折限界理論を端緒に、Abbeは屈折率が大きい液体を利用する液浸対物レンズを開発し、Carl Zeiss社のAugust Köhlerは波長280 nm以下の深紫外光を利用する光学顕微鏡を開発した¹⁵⁾。Köhlerは、光学顕微鏡観察に不可欠な均一照明法（ケーラー照明



図2 19世紀に製造された Carl Zeiss 社の顕微鏡。(左) 1848年まで製造されていた解剖顕微鏡。(右) 現存する最古の複式顕微鏡の1つ。1862年製造。From the Timo Mappes; photographed by Manfred Stich (ZEISS Archives).



図3 1922～24年製造の Leitz 製単眼式光学顕微鏡。2017年筆者（熊本）撮影。

法)の発明者として有名である¹⁶⁾。

19世紀の光学顕微鏡の発展及び普及は、医学・生物学を著しく発展させた。「近代病理学の父」と称される Rudolf Virchow, 近代細菌学の開祖とされる Louis Pasteur と Robert Koch の成果などは光学顕微鏡なしには成し得ないものであろう。

19世紀ドイツで開発された光学顕微鏡は、当時文明開化を迎えた日本においても急速に普及し、明治後期～大正にかけて国産顕微鏡が工業化され始めた。そして、日本の光学顕微鏡は、千代田光学工業（現在のコニカ・ミノルタ）、高千穂製作所（現在のオリンパス）、日本光学工業（現在のニコン）により発展を遂げた。

生細胞観察へ

19世紀～20世紀前半までの光学顕微鏡は、ほとんどが明視野顕微鏡であった。明視野顕微鏡では、試料透過に伴う光強度の減少をそのまま観察するため、無色透明の細胞をコントラストよく観察できない。この問題を解決したのは、位相顕微鏡である。位相顕微鏡では試料透過に伴う光位相のわずかな遅れを光干渉により検出する。位相の遅れは屈折率を反映し、干渉法はわずかな位相変化をも検出できるため、位相顕微鏡は無色透明な細胞内のわずかな屈折率分布の観察を可能にした。

今日、位相顕微鏡として、位相差顕微鏡と微分干渉顕微鏡が広く利用されている。位相差顕微鏡を発明¹⁷⁾した Fritz Zernike は、その功績により 1953 年ノーベル物理学賞を受賞している。

蛍光顕微鏡の発展

位相顕微鏡の登場により、生きた細胞をコントラストよく観察できるようになった。しかし位相顕微鏡により得られる情報は試料の形態情報であり、生きた細胞の分子情報を顕微鏡により得ることは位相顕微鏡登場後も困難であった。例外として、紫外光顕微鏡により生細胞の核酸分子をそのまま観察できた¹⁸⁾が、観察可能な分子は波長 230～300 nm に吸収帯を有する核酸塩基と芳香族アミノ酸などに限られていた

上、紫外光照射による生体ダメージは無視できるものではなかった¹⁹⁾。

生細胞分子イメージングが今日ほどに容易になったのは、蛍光顕微鏡の普及によるところが大きい。1906年に発明された蛍光顕微鏡²¹⁾が普及したのは、1960年代以降である。この頃、ダイクロイックミラーを利用する可視光励起の落射照明蛍光顕微鏡が商品化されている²⁰⁾²¹⁾。これにより、試料への光毒性を抑えつつ、十分な明るさとコントラストの蛍光顕微鏡画像が得られるようになった。その後、蛍光プローブの開発も盛んになり、生細胞の分子イメージング技術は医学・生物学の分野において欠かせないツールとして発展を遂げてきた。

蛍光顕微鏡の発展には、本学の病理学教室が大きく貢献している²¹⁾ことにも触れておきたい。可視光励起の蛍光顕微鏡がまだそれほど利用されていなかった 1970 年頃、藤田哲也教授（現ルイ・パストゥール医学研究センター所長）は、フォイルゲン染色した組織の蛍光を可視光により励起できることを発見し、落射蛍光顕微測光装置により DNA 定量の研究に取り組んでいた。藤田教授は、蛍光顕微測光による DNA 定量の精度を向上させるために、1983 年、今日最もよく普及しているガルバノメーター駆動によるビーム走査方式の共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の開発に着手し、3年後これを完成させた（図 4）。血管の 3 次元イメージングや心臓の高速カルシウムイメージングに代表される共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を利用した先駆的な医学・生物学研究は、藤田教授とその後を引き継いだ高松哲郎教授（現本学医学フォトンクス特任講座教授）により世界に先駆けて行われた²²⁾。

なお、共焦点走査観察法自体は、今日「人工知能の父」として知られている Marvin Minsky により 1957 年に発明²³⁾されている。当時はまだレーザー発明以前であり、さらには共焦点という言葉も使われていなかったが、Minsky の発明は共焦点レーザー走査顕微鏡の原型である。Minsky の発明以降、共焦点観察およびレーザー顕微鏡の理論的研究を経て、1980 年代から本格的に共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の時代

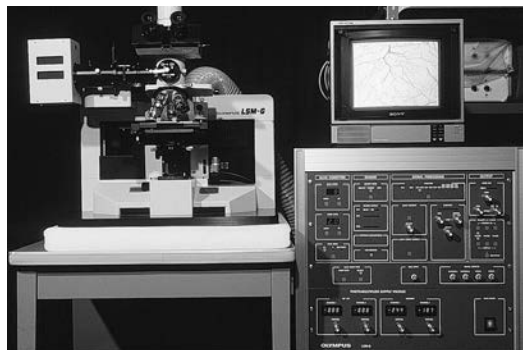


図4 病理学教室の藤田教授と高松助手（当時）らがオリンパス株式会社と共同開発した共焦点レーザー走査顕微鏡。1987年高松助手撮影。

が幕を開けた²⁶⁾。

限界を超える光学顕微鏡

共焦点レーザー走査顕微鏡の登場により、従来の光学顕微鏡より高い空間分解能が得られるようになった²⁴⁾。また、3次元観察も可能になった²⁴⁾。さらに、緑色蛍光タンパク質²⁵⁾に代表される生細胞の蛍光ラベリング技術の発展もあり、任意の分子だけが選択的に検出されるようになった。

しかし、共焦点レーザー走査顕微鏡は空間分解能、3次元観察、分子イメージングにおいてそれぞれ限界に直面した。

光学顕微鏡の空間分解能は、アッペの回折限界理論（図5）の通り、光の波長と対物レンズの開口数により制限される。対物レンズの開口数はせいぜい1.4~1.5程度であるため、光学顕微鏡ではおおよそ200 nmより近接した2物体を見分けることはできない。これは、1980年代にはすでに広く普及していた電子顕微鏡の空間分解能より1桁以上劣るものであった。

光学顕微鏡の空間分解能の限界を打ち破る方法として超解像光学顕微鏡が誕生した。1984年 Dieter Pohlらは、直径20 nm以下の微小開口から染み出した近接場光により試料を走査する超解像光学顕微鏡を実現した²⁶⁾。この方法は微小開口の代わりに微小金属構造を利用する井上、河田の手法²⁷⁾とともに、近接場光学顕微鏡

として知られる。近接場光学顕微鏡ののち、蛍光観察に適したSTED²⁸⁾、PALM²⁹⁾が発明され、超解像蛍光顕微鏡時代の幕が開ける。超解像蛍光顕微鏡を発明したWilliam Moerner, Eric Betzig, Stefan Hellに2014年のノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい。

3次元観察の限界も光学顕微鏡の本質的な限界である。光は、超音波やX線と比べて物質と相互作用しやすく、散乱、反射、吸収されやすいため、試料の深部まで到達しにくい。特に、屈折率が不均一でありしかも吸収が大きい生体組織では、表面から30 μmくらいまでしか鮮明な観察は行えない³⁰⁾。

形態観察だけを行う目的では、散乱されにくい近赤外光を利用する光断層撮像法³¹⁾により深部観察できるようになっていた。しかし、近赤外光により励起できる蛍光分子は少ないため、深部蛍光観察は困難であった。

深部蛍光観察は非線形光学顕微鏡の登場により1990年に可能となった³²⁾。散乱や吸収などの光学応答は通常、入射光と線形の関係にあ



図5 光学顕微鏡の限界として知られる回折限界理論の表式が刻印されている Ernst Abbe の記念碑。ドイツ Jena の Fürstengraben にて 2014 年筆者（熊本）撮影。

る。すなわち、入射される光子（光子）の数と吸収または散乱される光子の数は正比例の関係がある。ところが、光強度が非常に大きい場合、この関係は非線形となる。この非線形性を利用すれば、光強度が高いところ、すなわちビーム集光点でのみ選択的に強い光学応答を誘起できる。これにより今日では、表面から1 mm以上の深部に鮮明に観察できる³⁰⁾。

3次元観察においては深部観察以外の課題もある。共焦点レーザー走査顕微鏡による3次元観察では、広い領域を観察する場合、測定点数が多くなるため画像取得に時間を要する。また、観察面以外にも常に励起光を照射するため、3次元観察しているうちに試料の褪色やダメージが蓄積してしまう。3次元観察におけるこのような問題点を解消する光学顕微鏡の1つとして、ライトシート顕微鏡がある³³⁻³⁵⁾。その原理の発明自体は古く、Richard Zsigmondyにより20世紀初頭に暗視野観察法として発明されている³⁶⁾。観察光学系と照明光学系とを分け、それらの光軸を直交させ、照明光学系によるシート状の光により照射される面を観察光学系により観察するというシンプルなアイデアである。Zsigmondyはライトシート顕微鏡によりコロイド溶液の不均一性を明らかにし、1925年のノーベル化学賞を受賞している。

共焦点顕微鏡と比べても見劣りしないライトシート顕微鏡がレーザー光により質の良いライトシートを形成できるようになったのは2000年代以降である³³⁾。ライトシート顕微鏡は、ミリメートルを超える試料のうち比較的透明性が高いものの3次元観察に有用であり、胚発生の研究をはじめとした発生生物学³⁴⁾や脳科学³⁵⁾の研究に役立っている。製品としては唯一、Carl Zeiss社より製造・販売されており、その研究開発には筆者の1人である熊本が2008年に関わった。

ラマン顕微鏡

蛍光ラベリング技術により可能となった分子イメージング技術の本質的な限界は、対象分子を標識した分子しか観察できないことである。

前処理できない試料、標識が難しい分子、標識により機能が阻害されてしまう分子などを観察するニーズは大きい。

1990年に実現されたラマン顕微鏡³⁷⁾は分子の無標識イメージングを可能にした。ラマン顕微鏡では試料分子自体から発せられるラマン散乱光を観察する。ラマン散乱光は、物質からの散乱光のうち、散乱体の種類や状態を反映したスペクトルを有する非弾性成分であり、1928年Chandrasekhara Venkata Ramanにより発見された(Ramanはこの業績によりアジア人として初めて科学系ノーベル賞(物理学賞)を受賞)³⁸⁾。ラマン散乱光は、弾性散乱成分であるレイリー散乱に比べて6~8桁、蛍光に比べて12~14桁微弱であるため検出は容易ではなく、発見後40年ほどはほとんど利用されなかったが、レーザーの発明を契機に分子分析に利用されるようになり、やがてデバイスの改良により顕微鏡観察できるまでに進化した。

ラマン顕微鏡発明の当初は、微弱なラマン散乱光による画像をできる限り短時間で取得するために、蛍光顕微鏡と同様にフィルターを用いて広視野観察したり³⁹⁾、共焦点観察の場合は測定点数を減らしたり⁴⁰⁾していた。今日では、検出器、フィルター、光源などのデバイスの改良とスペクトルイメージング法の発展により、回折限界空間分解能での生細胞ラマンイメージングが10分以内に行える⁴¹⁾。さらに、非線形光学顕微鏡をラマン分光法と融合した非線形ラマン顕微鏡法は、ビデオレートでのラマンイメージングを可能にしている⁴²⁾。

展 望

光学顕微鏡法の歴史を振り返ると、その技術は50年ほどの間に飛躍的に進化し、新たな時代に突入した感がある。共焦点レーザー走査顕微鏡をはじめとする、長い歴史軸から見て新しく登場した光学顕微鏡は、今日の科学、医療、工業の進歩にはすでに不可欠である。しかもその利用は観察目的にとどまらず、光による生体活動を制御する光マニピュレーション研究⁴³⁾のプラットフォームとしても広く利用されている。

光学顕微鏡は今後どのように発展していくのであろうか。現在の光学顕微鏡は、光源、検出器、光学フィルターなどのデバイスの発展に余地があり、今後もしばらく性能向上が見られるであろう。ビームの位相や方向を時空間制御できる空間光変調器やデジタルミラーデバイス、低解像画像から高解像画像を構築できる圧縮センシング法、LEDや光コム光源などの比較的新しいデバイスやアルゴリズムは、光学顕微鏡の今後を占う鍵となるであろう。別の視点では、超解像顕微鏡、広視野イメージング、3次元イメージング、スペクトルイメージング、さらには医学分野において広まっているバーチャルス

ライドなどの実現により、光学顕微鏡画像が30年以上前とは比べ物にならないほどにビッグデータとなっている点に、注目すべきであろう。1画像のデータサイズが1GBを超えることはもはや珍しくない。近年注目されている情報科学や画像解析技術もこれからの光学顕微鏡法には必要不可欠なものとなろう。

謝 辞

本稿を御校閲くださいました高松哲郎京都府立医科大学名誉教授に心より感謝申し上げます。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) ヘクト. 光学I—基礎と幾何光学—第3刷. 尾崎義治, 朝倉利光訳. 丸善 2004.
- 2) Euclid. Optics. A translation by Burton HE. J Opt Soc Am 1943; 35: 357-372.
- 3) Guenther AH. International Trends in Applied Optics. SPIE Press Book 2002.
- 4) Tbakhi A, Amr SS. Ibn Al-Haytham: Father of modern optics. Ann Saudi Med 2007; 27: 464-467.
- 5) Al-Khalili J. In retrospect: Book of Optics. Nature 2015; 518: 164-165.
- 6) Rashed R. Ibn Al-Haytham's scientific research programme. Al-Amri MD, El-Gomati MM, Zubairy MS. Optics in Our Time. Springer International Publishing 2016; 25-39.
- 7) Roger Bacon. Optical Science. The Opus Majus, Volume II. A translation by Burke RB. Russell & Russell; New York 1962; 419-582.
- 8) www.aps.org/publications/apsnews/200403/history.cfm. The website of American Physical Society.
- 9) Hooke R. Micrographia: or some physilogical descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon. The Royal Society; London 1665.
- 10) Lutz PL. The rise of experimental biology: An illustrated history. Springer Science & Business Media 2002.
- 11) van Zuylen J. The microscope of Antoni van Leeuwenhoek. J Microsc 1981; 121: 309-328.
- 12) ニュートン. 光学 第3刷. 島尾永康訳. 岩波書店

- 1999.
- 13) 光学の原理 第7版 I. 草川 徹訳. 東海大学出版会 2005.
- 14) www.zeiss.com/corporate/int/history.html. The website of Carl Zeiss AG.
- 15) Koehler A. Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem licht. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und Mikroskopische Technik 1904; 21: 129-165, 273-304.
- 16) Koehler A. Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und Mikroskopische Technik 1893; 10: 433-440.
- 17) a) Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. Physica 1942; 9: 686-698. b) Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. Physica 1942; 9: 974-980.
- 18) a) Caspersson A, Schultz J. Nucleic acid metabolism of the chromosomes in relation to gene reproduction. Nature 1938; 142: 294-295. b) Caspersson A. II. Methods for the determination of the absorption spectra of cell structures. J R Microsc Soc 1939; 60: 8-25.
- 19) Loofbourow JR, Joyce L. Increased ultra-violet absorption of cells following irradiation with ultra-violet light. Nature 1941; 148: 166.
- 20) Rost FWD. The history of fluorescence microscopy. Fluorescence Microscopy, Vol. 2. Cambridge Univer-

- sity Press; Cambridge 1995; 183-195.
- 21) 藤田哲也. 脳の履歴書—幹細胞と私—. 岩波書店 2002.
 - 22) a) Takamatsu T, Fujita S. Microscopic tomography by laser scanning microscopy and its three-dimensional reconstruction. *J Microsc* 1988; 149: 167-174. b) Takamatsu T, Minamikawa T, Kawachi H, Fujita S. Imaging of calcium wave propagation in guinea-pig ventricular cell pairs by confocal laser scanning microscopy. *Cell Struct Func* 1991; 16: 341-346. c) Hama T, Takahashi A, Ishihara A, Takamatsu T. Real-time in situ confocal imaging of calcium wave in the perfused whole heart of rats. *Cell Signal* 1998; 10: 331-337. d) Kaneko T, Tanaka H, Oyamada M, Kawata S, Takamatsu T. Three distinct types of Ca^{2+} waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *Circ Res* 2000; 86: 1093-1099.
 - 23) Minsky M. (1961) US patent 3013467.
 - 24) a) 河田 聡. 新しい光学顕微鏡 第一巻 レーザ顕微鏡の理論と実際. 学際企画. 1995. b) 石川春律, 高松哲郎. 新しい光学顕微鏡 第二巻 共焦点レーザ顕微鏡の医学・生物学への応用. 学際企画. 1995.
 - 25) a) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-805. b) Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-544.
 - 26) Pohl DW, Denk W, Lanz M. Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Appl Phys Lett* 1984; 44: 651-653.
 - 27) Inouye Y, Kawata S. Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip. *Opt Lett* 1994; 19: 159-161.
 - 28) Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994; 19: 780-782.
 - 29) Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt Lett* 1995; 20: 237-239.
 - 30) Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, Hayashi S, Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F, Takayama J, Onami S, Nakayama S, Nakayama H, Kosugi Y, Watanabe TM, Fujita K, Mimori-Kiyosue Y. Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 3399-3404.
 - 31) Kawata S, Minami S. The principle and applications of optical microscope tomography. *Acta Histochem Cytochem* 1986; 19: 73-81.
 - 32) Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990; 248: 73-76.
 - 33) Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EHK. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 2004; 305: 1007-1009.
 - 34) Keller PJ, Ahrens MB, Freeman J. Light-sheet imaging for systems neuroscience. *Nat Methods* 2015; 12: 27-29.
 - 35) Tomer R, Khairy K, Amat F, Keller PJ. Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy. *Nat Methods* 2012; 9: 755-763.
 - 36) Santi PA. Light sheet fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 129-138.
 - 37) Puppels GJ, de Mui FFM, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature* 1990; 347: 301-303.
 - 38) Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature* 1928; 121: 501-502.
 - 39) Puppels GJ, Grond M, Greve J. Direct imaging Raman microscope based on tunable wavelength excitation and narrow-band emission detection. *Appl Spectrosc* 1993; 47: 1256-1267.
 - 40) Feofanov AV, Grichine AI, Shitova LA, Karmakova TA, Yakubovskaya RI, Egret-Charlier M, Vigny P. Confocal Raman microspectroscopy and imaging study of theraphthal in living cancer cells. *Biophys J* 2000; 78: 499-512.
 - 41) a) Hamada K, Fujita K, Smith NI, Kobayashi M, Inouye Y, Kawata S. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells. *J Biomed Opt* 2008; 13: 044027. b) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 370-374. c) Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Ogawa M, Tanaka H, Nosaka K, Akaji K, Takamatsu T. Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 39-46.
 - 42) a) Evans CL, Potma EO, Puoris'haag, Cote D, Lin CP, Xie XS. Chemical imaging of tissue in vivo with

- video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 16807-16812.
- b) Saar BG, Freudiger CW, Reichman J, Stanley CM, Holtom GR, Xie XS. Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering. *Science* 2010; 330: 1368-1370.
- 43) a) Tanabe T, Oyamada M, Fujita K, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein. *Nat Methods* 2005; 2: 503-505.
- b) Smith NI, Fujita K, Kaneko T, Katoh K, Nakamura O, Kawata S, Takamatsu T. Generation of calcium waves in living cells by pulsed-laser-induced photodisruption. *Appl Phys Lett* 2001; 79: 1208-1210.
- c) Smith NI, Kumamoto Y, Iwanaga S, Ando J, Fujita K, Kawata S. A femtosecond laser pacemaker for heart muscle cells. *Opt Express* 2008; 16: 8604-8616.

著者プロフィール



熊本 康昭 Yasuaki Kumamoto

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学・助教

略歴：2006年3月 大阪大学工学部応用自然科学科 卒業
 2008年3月 大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻博士前期課程 修了
 2008年4～8月 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany (研修生)
 2011年3月 大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻博士後期課程 修了, 博士号(工学)取得
 2011年4月 理化学研究所基幹研究所 近接場ナノフォトニクス研究室研究員
 2012年4月 理化学研究所光量子工学研究領域 近接場ナノフォトニクス研究チーム研究員
 2015年4月 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研究員
 2015年7月 現職
 2017年6月 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招聘研究員, 有限会社セレンディップ研究所特任研究員

専門分野：光学, 生体医工学

- 主な業績：1. Smith NI, Kumamoto Y, Iwanaga S, Ando J, Fujita K, Kawata S. A femtosecond laser pacemaker for heart muscle cells. *Opt Express* 2008; 16: 8604-8612.
 2. Kumamoto Y, Taguchi A, Smith NI, Kawata S. Deep UV resonant Raman spectroscopy for photodamage characterization in cells. *Biomed Opt Express* 2011; 2: 927-936.
 3. Kumamoto Y, Taguchi A, Smith NI, Kawata S. Deep ultraviolet resonant Raman imaging of a cell. *J Biomed Opt* 2012; 17: 076001.
 4. Kumamoto Y, Taguchi A, Honda M, Watanabe K, Saito Y, Kawata S. Indium for deep-ultraviolet surface-enhanced resonance Raman scattering. *ACS Photonics* 2014; 1: 598-603.
 5. Honda M, Kumamoto Y, Taguchi A, Saito Y, Kawata S. Plasmon-enhanced UV photocatalysis. *Appl Phys Lett* 2014; 104: 061108.
 6. Kumamoto Y, Fujita K, Smith NI, Kawata S. Deep-UV biological imaging by lanthanide ions molecular protection. *Biomed Opt Express* 2016; 7: 158-170.
 7. Kumamoto Y, Harada Y, Tanaka H, Takamatsu T. Rapid and accurate peripheral nerve imaging by multipoint Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2017; 7: 845.
 8. Kawata S, Ichimura T, Taguchi A, Kumamoto Y. Nano-Raman scattering microscopy: resolution and enhancement. *Chem Rev* 2017; 117: 4983-5001.

著者プロフィール

田中 秀央 Hideo Tanaka

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科・細胞分子機能病理学・教授

略歴：1984年3月 京都府立医科大学医学部卒業
 1984年5月 京都府立医科大学附属病院 研修医 (第三内科)
 1986年4月 公立湖北総合病院医員 (内科)
 1987年4月 藤田保健衛生大学総合医学研究所研究員 (心血管部門)
 1990年4月 京都府立医科大学附属病院修練医 (臨床検査医学), 1992年9月～1995年9月同助手 (臨床検査医学), 1995年10月～2002年5月同学内講師
 1993年8月～1995年7月 University of Calgary, Research Fellow (Physiology and Biophysics)
 2002年6月 京都府立医科大学学内講師 (第二病理学)
 2005年8月 京都府立医科大学大学院医学研究科講師 (細胞分子機能病理学), 2010年11月同准教授を歴任し, 2015年4月より現職

- 主な業績：1. Tanaka H et al., Towards an integrated understanding of cardiac arrhythmogenesis-Growing roles of experimental pathology. *Pathol Int* 2017; 67: 8-16.
 2. Matsuyama T et al. Spatiotemporally non-uniform Ca^{2+} dynamics of cardiac Purkinje fibers in mouse myocardial infarct. *J Histochem Cytochem* 2017; 65: 655-667.
 3. Ohira S et al., Label-free detection of myocardial ischaemia in the perfused rat heart by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2017; 10: 42401.
 4. 田中秀央 光学顕微鏡を使いこなす 組織細胞化学 2015. p.1～10. 日本組織細胞化学会編

教室URL：<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>