

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	生体機能可視化のための超解像分子イメージング技術の開発
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・大学院工学研究科・准教授
氏名	藤田 克昌

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	123,000,000	123,000,000		123,000,000	123,000,000	0	
間接経費	36,900,000	36,900,000		36,900,000	36,900,000	0	
合計	159,900,000	159,900,000	0	159,900,000	159,900,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	400,000	32,190,083	23,654,431	7,537,180	63,781,694
旅費	0	1,016,347	2,059,736	1,670,376	4,746,459
謝金・人件費等	0	12,368,380	20,255,444	18,653,632	51,277,456
その他	0	582,433	1,278,354	1,333,604	3,194,391
直接経費計	400,000	46,157,243	47,247,965	29,194,792	123,000,000
間接経費計	0	7,504,738	10,235,629	19,159,633	36,900,000
合計	400,000	53,661,981	57,483,594	48,354,425	159,900,000

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
CO2インキュベーター	三洋電機製 MCO-5AC	1	604,800	604,800	2011/6/22	大阪大学
電子冷却型EM-CCD検出器	米国ローパーサイ エンティフィック 社製 ProEM:1024 BeXcelon-5	1	5,722,500	5,722,500	2011/10/27	大阪大学
ガルバノスキャナ	ケンブリッジテクノ ロジー社 VM500PLUS 6mmDS XY	1	1,113,000	1,113,000	2011/10/28	大阪大学
ONICSチャンバー部及びINU-S	東海ヒット製	1	897,750	897,750	2011/11/25	大阪大学
共焦点スキャナユニット	横河電気(株) 製 CSU- X1-A-	1	8,620,500	8,620,500	2012/1/31	大阪大学
CSU-X1-A-PTSP2専用コントロ	横河電機(株) 製CSUX1- CU-PTSP2 セカンドカメラ	1	1,596,000	1,596,000	2013/10/17	大阪大学
倒立型オートフォーカス顕微鏡システム	オリンパス(株)製	1	7,990,500	7,990,500	2012/1/30	大阪大学
超安定ステージ	池田理化製 KS-0	1	926,100	926,100	2012/2/27	大阪大学
8チャンネル電流・電圧増幅装置	(株)エヌエフ回 路設計プロッ ク製AS-905- 1	1	858,900	858,900	2012/3/26	大阪大学

ピエゾステージ	Physik Instrumente 社製P- 611.ZS E-	1	514,500	514,500	2012/6/28	大阪大学
恒温低湿空気発生器	オリオン機械 株製 PAPO3B- SPR	1	1,459,500	1,459,500	2012/7/10	大阪大学
LD励起コンパクトCWLレーザー	米国スペクトラ フィジックス社製 EXLSR-532- 300KH-W	1	1,981,140	1,981,140	2012/8/21	大阪大学
デジタルガルバノスキャナ	キヤノン(株)製 GM-1010	1	770,385	770,385	2012/9/28	大阪大学
顕微鏡デジタルカメラ	オリンパス(株)製 DP73	1	1,039,500	1,039,500	2012/10/29	大阪大学
2-CHDドライバー	IntraAction 社製DFE- 402B3J	1	593,512	593,512	2012/11/28	大阪大学
ファインポリクロメーター	分光計器(株) 製MK-300TD	1	2,766,750	2,766,750	2012/12/19	大阪大学
ラジアル偏光コンバーター	ARC社製 RADPOL4 USB LC Driver	1	784,350	784,350	2012/12/3	大阪大学
光励起半導体レーザー	米国コヒレント 社製 GenesisMX4 88-1000- SLM-S	1	3,045,000	3,045,000	2013/3/8	大阪大学
CSU用ダイクロイックミラー	オリンパス(株)製 DM-IV-125	1	790,965	790,965	2013/3/5	大阪大学
小型固体レーザー	コボルト社製 SambaTM	1	1,470,000	1,470,000	2013/3/29	大阪大学
コンパクトCWLレーザー	スペクトラ・フィ ジックスインコー ポレイテッド社 製EXLSR- 532-	1	1,121,400	1,121,400	2014/1/23	大阪大学

## 5. 研究成果の概要

生きた細胞内部の高解像・高速観察を可能とするイメージング技術の開発を目的とした。研究開発では、要素技術として1)細胞を染色するための蛍光プローブの開発、2)蛍光プローブの光励起法、3)レーザー制御および観察像構築光学系、を新たに開発し、それらを組み合わせることで上記の目的を達成した。具体例としては生きた細胞内の小器官を従来技術に比べ約2倍以上の空間分解能、かつ約33ミリ秒の時間分解能で観察が可能な顕微鏡の開発に成功した。研究の過程において、蛍光プローブの発光特性の詳細な理解、新奇な非線形光学効果の発見、無標識分子分光法の検討も行い、新しい原理の光学顕微鏡の創出につながる科学的知見も得られた。

課題番号	LR024
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
研究成果報告書**

本様式の内容は一般に公表されます
------------------

研究課題名 (下段英語表記)	生体機能可視化のための超解像分子イメージング技術の開発
	Development of super-resolution molecular imaging techniques for visualization of biological functions
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	大阪大学・工学研究科・准教授
	Osaka University, Graduate School of Engineering, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	藤田克昌
	Katsumasa Fujita

**研究成果の概要**

(和文):

本研究では、生体内部を生きのまま高解像度に観察する新しい光学顕微鏡の開発を行った。従来の光学顕微鏡の限界を超えた空間分解能を実現するために、主に、試料からの非線形な信号光を利用した。非線形な信号光として蛍光励起の飽和効果、多光子励起、コヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)を用い、また非線形な蛍光発光を生じる新しい蛍光分子プローブを作製することで、超解像イメージングが可能な顕微鏡装置を開発した。本研究の成果は、超解像イメージングをより多くの種類、形態の試料に利用することを可能とし、生物学、医学における基礎研究に資するものである。

(英文):

In this research, new techniques for optical high-resolution imaging have been developed. To overcome the physical limit of spatial resolution in optical microscopy, use of nonlinear optical signals have been investigated. As nonlinear signals, fluorescence emission with saturated excitation, multiphoton excitation, coherent anti Stokes Raman scattering (CARS) have been utilized. A fluorescent probe, which shows nonlinear response to visible wavelength, was also developed for realizing a simple high-resolution imaging technique. This research result makes it possible to apply super resolution techniques to various types of biological samples and contribute to the fundamental research in biology and medicine.

## 様式21

1. 執行金額 159,900,000 円  
(うち、直接経費 123,000,000 円、間接経費 36,900,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

### 3. 研究目的

本研究では、生体機能の可視化のための超解像イメージング技術を開発することを目的とする。従来の光学顕微鏡は、光の波動性の制限から、光の波長の半分(250 nm 程度)よりも小さな構造を観察することができず、細胞内の微小空間における生体機能を可視化することが出来なかった。近年、研究代表者を含む複数のグループがこの波長限界を超える手法を実証したが、限られた条件でしか、その解像力を発揮できず、生体内部の超解像観察、また動きのある試料の超解像観察は依然困難であった。さらに、これらの手法の利用は蛍光標識された試料にのみ限定されており、生体分子を直接、無標識にイメージングすることは不可能である。超解像イメージング技術における上記の課題を解決するため、本研究プロジェクトでは、1)生体深部での超解像観察技術の構築、2)生体内の分子動態の高速超解像観察技術の開発、3)無標識超解像分子イメージング技術の開発、の3つを目標とした。これらの目標を達成するために、以下の4つのテーマを設定した。

#### (1) 蛍光の飽和励起を利用した超解像顕微鏡の開発

蛍光に高強度の光を照射することにより光励起を飽和させ、その際に見られる非線形な蛍光応答を利用した超解像技術を開発する。飽和による非線形応答の誘起、試料内部での非線形応答の3次元的な局在を確認し、細胞組織内部を観察できる超解像顕微鏡システムを構築する。

#### (2) 可視光多光子励起の利用による高解像度観察技術の開発

可視光波長の光で蛍光性タンパク質を多光子励起し、高解像度、高速に多色観察可能な超解像技術を開発する。複数の蛍光性タンパク質を可視光多光子励起で同時に励起できること、短波長の光による多光子励起により3次元的に高い空間分解能が得られることを確認し、細胞内を高解像度かつ高速に観察できる顕微鏡システムを構築する。

#### (3) 超解像蛍光プローブの開発

可視光の光に対して非線形に蛍光発光を示す蛍光プローブを開発し、高速超解像イメージングに応用する。光誘起電子移動により高速に蛍光性をスイッチングできる蛍光分子を合成し、その分子が非線形な応答を示すこと、また顕微鏡観察時に空間分解能の向上をもたらすことを確認する。開発した蛍光プローブにより生体試料を標識し、超解像観察を行う。

#### (4) 無標識超解像イメージング技術の開発

分子振動を検出することにより無標識に生体イメージングを行えるラマン散乱顕微鏡の超解像化技術を開発する。ラマン散乱の飽和現象や微細パターン光による試料の照明がラマン散乱顕微鏡での超解像観察に利用できることを確認する。

#### 4. 研究計画・方法

##### (1) 蛍光の飽和励起を利用した超解像顕微鏡の開発

本研究テーマでは、蛍光励起が飽和する際に見られる励起光強度と蛍光強度と間の非線形性を利用した超解像レーザー顕微鏡の開発を行った。レーザー走査顕微鏡では試料にレーザー光を集光して蛍光を励起するが、励起光に対して非線形に応答する蛍光は、レーザー集光内の狭い範囲に局在する。このため、レーザー光を走査しながら蛍光強度を測定すれば、試料内の蛍光プローブの分布を高い解像度で得ることができる。蛍光応答の非線形性が高次になると、より狭い範囲に蛍光発光は局在するため、より空間分解能を高めることができる。そこで、本研究では、蛍光励起の飽和に見られる高次の非線形応答の利用を試みた。非線形応答の局在化は、試料内外で発生する背景光の分離を容易にするため、比較的厚い試料でも超解像観察できる可能性がある。

##### (2) 可視光多光子励起の利用による高解像度観察技術の開発

本研究テーマでは、可視光による多光子励起を利用した、空間分解能の向上を試みた。短い波長、例えば紫外線は生体を損傷させてしまうため、生体観察への利用は難しい。そこで、可視域の波長の光を用いて蛍光プローブを多光子励起し、深紫外光を利用した場合と同様の効果を得ることを試みた。様々な蛍光性タンパク質の吸収スペクトル、および励起スペクトルを測定したところ、多くの蛍光性タンパク質が深紫外域で効率良く励起されることが分かった。そこで、これらの蛍光タンパク質の励起-発光特性を調べ、高解像度イメージングに利用できるか確認した。また実際に提案する励起方法を採用したレーザー走査顕微鏡の開発を行い、生体試料を高解像度かつ生きのまま観察することを試みた。

##### (3) 超解像蛍光プローブの開発

本研究テーマでは、可視域の波長の光の照射によって高効率に非線形な蛍光応答を誘起できる新しい蛍光プローブの開発を行い、超解像観察への応用を行った。従来の非線形蛍光の励起法には高強度のパルスレーザー光が必要となるため、高価な顕微鏡システムが必要となる。そこで低強度のレーザーを用いる従来の共焦点顕微鏡においても非線形な蛍光応答が得られる蛍光分子を設計、作製した。非線形な蛍光応答を得るために、蛍光分子が光励起された際に生じる分子内の電荷移動を利用した。実際に作製した試料の蛍光発光の特性を把握し、さらに開発した蛍光プローブにより試料を染色して、超解像顕微鏡観察が可能であることを示した。

(4) 無標識超解像イメージング技術の開発

本研究テーマでは、コヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)の飽和現象を利用し、無標識での超解像イメージング技術の開発を試みた。従来の超解像技術は蛍光プローブの非線形性(飽和およびスイッチング)を用いてきたが、ラマン散乱イメージングのような無標識イメージング技術においても、飽和による高次の非線形応答を誘起できれば、従来技術の限界を超えて空間分解能を向上できる。まず、CARS 光の飽和を確認するため、試料に照射する2波長のレーザー光のうちポンプ光(ストークス光は一定とした)の強度を変化させながら、試料から発せられるCARS光の強度を測定し、CARS光の飽和が得られるかを確認した。また、励起光変調法をCARS顕微鏡システムに組み込み、超解像 CARS 観察を試みた。ラマン散乱を利用したバイオイメージングのアプリケーションはそれほど多く示されていない。そのため、本研究では、ラマン散乱イメージングの生体観察への有用性も探るため、マウス幹細胞の分化状態の観察を通して、その分化状態の可視化も試みた。

5. 研究成果・波及効果

(1) 蛍光の飽和励起を利用した超解像顕微鏡の開発

蛍光色素を2光子励起した際の、励起光強度と蛍光強度との関係を測定した。励起光変調法を利用して、非線形な蛍光応答を分離検出した結果、各色素ともにレーザー光の照射強度が大きくなると、その強度の4乗に比例する高次の非線形応答が現れることが分かった。この結果は分子の励起-発光特性をシミュレートした結果とよく一致しており、これを利用すれば、2光子励起顕微鏡の空間分解能を従来の限界を超えて向上できることを確認した。

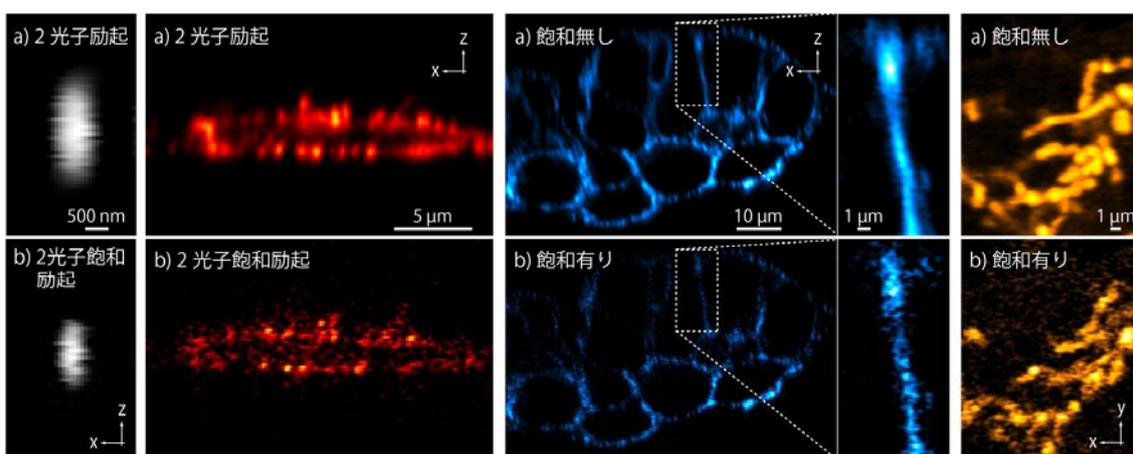


図1 直径200 nmの蛍光ビーズの観察像  
 図2 アクチンを染色した HeLa 細胞の観察像。  
 図3 3次元培養した HeLa 細胞の観察像。アクチンを染色。  
 図4 HeLa細胞のミトコンドリアの観察像。

多光子励起の飽和を利用した顕微鏡システムを構築し、空間分解能の評価および生体試料の観察を行った。図1は、直径 200 nm の蛍光ビーズを従来の2光子励起顕微鏡、および開発した顕微鏡(飽和2光子励起顕微鏡)で観察した結果である。飽和2光子励起を利用することにより、ビ

一ズの像のボケが取り除かれ、3次元的に空間分解能が向上することが確認された。また、図2に、アクチンを染色した HeLa 細胞を観察した結果を示す。この結果から、実際の生体試料の観察においても2光子励起の飽和により空間分解能を向上できることが確認された。

生体深部の超解像観察における飽和励起の利用が有用性を確かめるため、3次元的に培養した HeLa 細胞塊の超解像観察を試みた。従来の共焦点顕微鏡と飽和1光子励起を利用した共焦点顕微鏡とにおいて同じ試料を観察し、比較した(図3)。この結果から、多数の細胞からなる組織深部の観察において飽和励起の利用が試料構造の詳細をコントラスト高く解像できることが確かめられた。また、生体観察を行う上で重要となる蛍光タンパク質(GFP、YFP)の発光特性も確認し、実際に生細胞(HeLa 細胞を YFP により染色)の超解像観察に利用した(図4)。また、蛍光性タンパク質(YFP)を発現させたマウス脳切片の観察においても本手法が有用であることを確認した。

#### (2) 可視光多光子励起の利用による高解像度観察技術の開発

Sirius, mseCFP, mTFP1, EGFP を含む水溶液に波長 525nm のフェムト秒パルス光を照射し、各タンパク質より蛍光発光が得られることを確認した。上記のタンパク質における励起光強度と蛍光強度との関係を調べたところ、各タンパク質は励起光強度の2乗に比例した発光強度を示し、2光子励起による発光であることが確認された。また、2光子励起スペクトルを測定した結果、波長 540 nm 辺りで、各タンパク質の励起-発光効率は同程度になること、また、525 nm 以下の波長を用いた場合は1光子励起と2光子励起とが混在することが分かった。

ミトコンドリア、核、ゴルジ体、核小体に同時発現する HeLa 細胞を作製し、波長 525 nm のパルス光で2光子励起観察を行った結果、細胞内小器官内の微細構造がコントラスト高く観察された(図5)。本手法による空間分解能を評価した結果、面内方向で 100 nm 程度、深さ方向 270 nm 程度と高い空間分解能が得られ、この結果は、理論、実験とも一致した。紫外波長域では、細胞内のトリプトファン等生体分子も光を吸収し、蛍光を発する可能性がある。そこで、可視光多光子励起時における自家蛍光の観察像への影響を調べたところ、蛍光タンパク質からの発光は概ね2桁以上、自家蛍光に比べ明るいことが分かった。

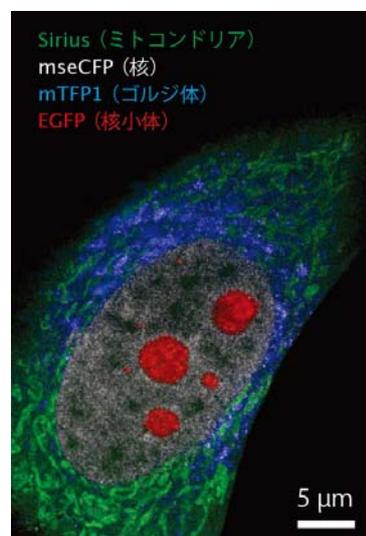


図5 Sirius, mseCFP, mTFP1, EGFP を発現した HeLa 細胞の可視光多光子励起観察像。

蛍光タンパク質を発現した生細胞の可視光多光子励起による超解像ライブイメージングを試みた。試料を複数のレーザー焦点で励起する高速撮像光学系に波長 525nm のパルスレーザー光を導入し、細胞内の蛍光タンパク質の2光子励起を行った結果、生細胞の超解像画像を得ることに成功した。観察時間分解能の評価を EGFP を発現したゴルジ体の動態の観察により行い、約 33 ミリ秒の時間分解能を達成した。

本研究により、可視光による多光子励起を用いることで従来顕微鏡に比べて2倍程度高い空間

分解能を実現でき、さらに多数の蛍光タンパク質を同時に観察できることが示された。また、多くの超解像法にくらべ簡易なシステムで高解像度観察が行え、かつ高速撮像も行えるため、様々なタイプの生体試料に利用することができる。

### (3) 超解像蛍光プローブの開発

図6に設計した蛍光プローブのエネルギー準位モデルを示す。このモデルが示す分子は光誘起電子移動を生じる分子で、2つの電子ドナー部(D)と1つの電子アクセプター部(A)を持つ。この分子の1つのドナーが1つの光子を吸収した場合、そのドナーは電子をアクセプターに移動させ、電荷分離状態(D+A-)を形成する。電荷分離状態からの緩和は無発光なため、このような過程では分子は発光しない。しかし、電荷分離状態が存在するうちに、2つめの光子が入射すると、もう片方の分子がそれを吸収し、励起状態(D\*)になる(図6aの経路1)。この状態では、さらなる電荷分離状態を形成できないため、励起状態にあるドナー分子は蛍光発光を生じて緩和する。この時、2つの励起光子の入射に対して、1つの蛍光光子が放出されることになるため、蛍光発光の強度は、2光子励起と同様、励起光の2乗に比例する。また、2つのドナーが同時に励起された場合も同様に、図6aの経路2の過程により、非線形な蛍光応答を示す。これは、励起されたドナーの片方のみが電荷分離状態を形成し、もう片方は発光による緩和を示すためである。

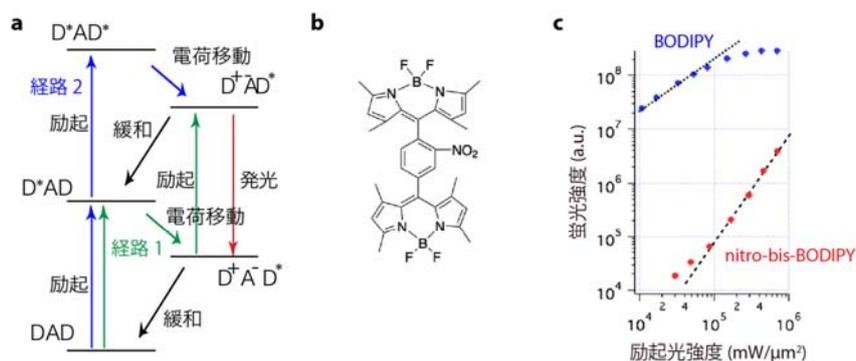


図6 a) 設計した分子のエネルギー準位モデル。b) nitro-bis-BODIPY の構造。c) nitro-bis-BODIPY の蛍光強度と励起高強度との関係。

上記のような応答を示す蛍光分子として、ドナー部に BODIPY をもち、アクセプター部にニトロベンゼンをもつ nitro-bis-BODIPY (図6b) を合成した。この分子に波長 488 nm の励起光を照射し、その励起光の強度を変化させながら蛍光強度を測定したところ、予想通り励起光の 2 乗に比例して蛍光発光が得られた(図6c)。この非線形な蛍光発光が光誘起電子移動によることを確かめるため、1つのドナーのみをもつ nitro-BODIPY、およびアクセプターを持たない bis-BODIPY を合成し、同様の測定を行ったところ、ドナーが一つしか無い場合は蛍光発光が殆ど得られず、また、アクセプターが存在しない分子からは線形な蛍光発光が得られた。この結果から、nitro-bis-BODIPY による非線形な蛍光発光は、電荷分離状態の形成を介した、多段階な2光子吸収によりもたらされていることが示唆された。

開発した nitro-bis-BODIPY、および BODIPY を、HeLa 細胞に導入し、共焦点顕微鏡により観察

を行ったところ、nitro-bis-BODIPY を含む試料では、細胞内の微細構造がより詳細に観察されていることが分かった。観察に用いた顕微鏡は、通常の共焦点顕微鏡であり、光学系での高空間分解能向上の工夫は特に行っていない。この観察結果から、開発した蛍光分子を用いれば、通常の共焦点顕微鏡を用いても超解像観察できることを確認できた。また、開発した蛍光プローブをパルス光により励起することで、より高次の非線形応答を誘起できることを新たに発見した。この発光のメカニズムは現時点では明らかでは無いが、この発見により、提案する手法の空間分解能をさらに向上させる可能性が見いだされた。

開発した蛍光プローブを用いて試料を染色し、従来から用いられてきた機器で観察すれば、容易に超解像イメージングを行うことができる。複雑な機器や画像処理を必要としないため、提案するメカニズムで機能する蛍光プローブの開発が進めば、生体の深部観察や高速観察にも適用でき、より多くの試料で超解像イメージングが可能となる。

#### (4) 無標識超解像イメージング技術の開発

ダイヤモンド粒子を試料とし、CARS に飽和が生じるかを確認した。ダイヤモンド粒子の  $1332\text{ cm}^{-1}$  の振動モードを、強度の異なるレーザー光で誘起したところ、入射するレーザー光の強度が高い場合、CARS 光が飽和することを確認できた。また、振動励起状態の飽和が CARS 光の飽和をもたらすという仮説に基づき CARS 光の強度を理論的に見積もった結果、実験での飽和応答と同様の結果が得られた。

励起光変調法を CARS 顕微鏡システムに組み込み、超解像 CARS 観察を試みた。試料にはダイヤモンド粒子を用い、基板上の粒子に対しレーザー光を走査しながら、 $1332\text{ cm}^{-1}$  の振動モードの励起を示す CARS 光の強度を測定した結果、飽和励起を利用すると、ダイヤモンド粒子内部の微細構造がより鮮明に観察できた。

CARS 光の飽和が振動励起状態の飽和によってもたらされるとすると、CARS 分光におけるスペクトル分解能も、CARS 光の飽和によって向上できると考えられる。そこで、ポンプ光の波長を変化させながら、飽和の有無における CARS スペクトルの測定を行ったところ、検出されたラマン散乱ピークの太さが、飽和励起時に、明らかに減少した。この結果は、提案する手法は、スペクトルの波数分解能においても超解像の効果を発揮できることを示している。

従来から開発してきたラマン散乱顕微鏡の照明光学系に改良を加えることで、空間分解能を向上させることを試みた。試料の照明に周期的なパターンを持つレーザー光を利用し、その周期的なパターンによるモアレ効果により微細構造の情報を効率的に結像する手法を考案した。その結果、従来の手法に比べ約 2 倍の空間分解能の向上できることが理論的に確認できた。

細胞観察のためのスペクトル情報を、マウス脳組織細胞、マウス幹細胞、マウス筋肉細胞のラマン観察を通して取得した。特にマウス幹細胞においては細胞の分化が進むにつれスペクトル特性が変化しており、細胞状態の無標識検出という、ラマン分光イメージングの新しい応用展開を示唆する結果が得られた。

## 6. 研究発表等

雑誌論文 計 27 件	<p>(掲載済み一査読有り) 計 17 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. L.-d. Chiu, A. F. Palonpon, N. I. Smith, S. Kawata, M. Sodeoka, and K. Fujita, "Dual-polarization Raman spectral imaging to extract overlapping molecular fingerprints of living cells," <i>J. Biophotonics</i> (online, <a href="http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201300204">http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201300204</a>).</li> <li>2. M. Yamanaka, N. I. Smith, K. Fujita, "Introduction to super resolution microscopy," <i>Microscopy</i>, Vol.63, No.3, pp.177-192 (2014).</li> <li>3. Y. Yonemaru, M. Yamanaka, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, "Saturated excitation microscopy with optimized excitation modulation," <i>ChemPhysChem</i>, Vol.15, No.4, pp.743-749(2014).</li> <li>4. S.-W. Chu, H.-Y. Wu, Y.-T. Huang, T.-Y. Su, H. Lee, Y. Yonemaru, M. Yamanaka, R. Oketani, S. Kawata, S. Shoji, and K. Fujita, "Saturation and reverse saturation of scattering in a single plasmonic nanoparticle," <i>ACS Photonics</i>, Vol.1, No.1, pp.32-37 (2014).</li> <li>5. S.-W. Chu, T.-Y. Su, R. Oketani, Y. Yonemaru, M. Yamanaka, Y.-T. Huang, H.-Y. Wu, H. Lee, G.-Y. Zhuo, M.-Y. Lee, S. Kawata, and K. Fujita, "Measurement of a saturated emission of optical radiation from gold nanoparticles: Application to an ultrahigh resolution microscope," <i>Phys. Rev. Lett.</i>, Vol.112, No.1, p.017402 (2014).</li> <li>6. T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, S. Kawata, T. M. Watanabe, T. Yanagida, H. Fujita, "Visualizing cell state transition using Raman spectroscopy," <i>PLOS ONE</i>, Vol.9, No.1, e84478 (2014).</li> <li>7. N. Pavillon, K. Fujita, N. I. Smith, "Multimodal label-free microscopy," <i>J. Innov. Opt. Health. Sci.</i>, Vol.7, No.5 pp.1330009-1~22 (2014).</li> <li>8. 藤田克昌, "ミクロな世界を立体的に映し出す - レーザー走査型顕微鏡 -," <i>応用物理</i>, Vol.83 No.1, pp.63-67 (2014).</li> <li>9. M. Yamanaka, Y. Yonemaru, S. Kawano, K. Uegaki, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, "Saturated excitation microscopy for sub-diffraction-limited imaging of cell clusters," <i>J. Biomed. Opt.</i>, Vol.18, No.12, p.126002 (2013).</li> <li>10. T. Shimosawa, K. Yamagata, T. Kondo, S. Hayashi, A. Shitamukai, D. Konno, F. Matsuzaki, J. Takayama, S. Onami, H. Nakayama, Y. Kosugi, T. M. Watanabe, K. Fujita, Y. Mimori-Kiyosue, "Improving spinning disc confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging," <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA.</i>, Vol.110, No.9, pp.3399-404 (2013).</li> <li>11. H. Lee, T.-Y. Su, Y. Yonemaru, M.-Y. Lee, M. Yamanaka, K.-F. Huang, S. Kawata, K. Fujita, S.-W. Chu, "Plasmon saturation induced super-resolution imaging," <i>Proc. SPIE Vol.8597, Plasmonics in Biology and Medicine X</i>, 85970P (2013).</li> <li>12. T.-Y. Su, Y. Yonemaru, M. Yamanaka, M.-Y. Lee, H. Lee, S. Kawata, K. Fujita, S.-W. Chu, "Saturable scattering of localized surface plasmon resonance in a single gold nanoparticle," <i>Proc. SPIE 8457, Plasmonics: Metallic Nanostructures and Their Optical Properties X</i>, 845713 (2012).</li> <li>13. M. Yamanaka, K. Saito, N. I. Smith, S. Kawata, T. Nagai, K. Fujita, "Saturated excitation (SAX) of fluorescent proteins for sub-diffraction-limited imaging of living cells in three dimensions," <i>Interface FOCUS</i>, Vol.3, No.5, 20130007 (2013).</li> <li>14. M. Yamanaka, Y.-K. Tzeng, S. Kawano, N. I. Smith, S. Kawata, H.-C. Chang, and K. Fujita, "SAX microscopy with fluorescent nanodiamond probes for high-resolution fluorescence imaging," <i>Biomed. Opt. Express</i>, Vol.2, Issue 7, pp. 1946-1954 (2011).</li> <li>15. M. Honda, Y. Saito, N. I. Smith, K. Fujita, and S. Kawata, "Nanoscale heating of laser irradiated single gold nanoparticles in liquid," <i>Opt. Express</i>, Vol.19, Issue 13, pp. 12375-12383 (2011).</li> <li>16. M.-L. Zheng, K. Fujita, W.-Q. Chen, X.-M. Duan, S. Kawata, "Two-Photon Excited Fluorescence and Second-Harmonic Generation of the DAST Organic Nanocrystals," <i>J. Phys. Chem. C</i>, Vol.115, No.18, pp. 8988-8993 (2011).</li> <li>17. S. Kawano, N. I. Smith, M. Yamanaka, S. Kawata and K. Fujita, "Determination of the expanded optical transfer function in saturated excitation imaging and high harmonic demodulation," <i>Appl. Phys. Express</i>, Vol.4, 042401 (2011).</li> </ol>
----------------	---

	<p>(掲載済み一査読無し) 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 藤田克昌, “超解像蛍光イメージング,” OplusE, Vol.36, No.2, pp.141-146 (2014).</li> <li>2. 藤田克昌, “超解像顕微鏡,” 生体の科学, Vol.64, No.6, pp.526-532 (2013).</li> <li>3. 藤田克昌, “飽和励起顕微鏡,” 光技術コンタクト, Vol.51, No.4, pp.13-19 (2013).</li> <li>4. 藤田克昌, “飽和励起顕微鏡 - シンプルな超解像技術 -,” 現代化学, Vol.505, No.4, pp.54-56 (2013).</li> <li>5. 山中真仁, 藤田克昌, “飽和励起を用いた高空間分解蛍光イメージング,” レーザー研究, Vol.41, No.2, pp.113-118 (2013).</li> <li>6. 藤田克昌, “光学顕微鏡の限界を超えた超解像イメージング,” 実験医学, Vol. 31, No.3, pp.451-457 (2013).</li> <li>7. 藤田克昌, 齋藤結花, “超解像イメージング,” ぶんせき, No.3, pp.142-149 (2012).</li> <li>8. 藤田克昌, “化学とバイオイメージング,” 化学と生物, Vol.49, pp.852-856 (2011).</li> <li>9. 藤田克昌, “ラマン顕微鏡”の開発,” 分光研究 Vol.60, No.5, pp.185-186 (2011).</li> <li>10. 山中真仁, 藤田克昌, “飽和励起を利用した高空間分解蛍光イメージング(SAX 顕微鏡),” OPTORONICS, Vol. 30, No.335 (2011).</li> </ol> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 35 件</p>	<p>専門家向け 計 32 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. K. Fujita, “Saturated excitation microscopy for super-resolution imaging in 3D,” Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (Taipei, 26 Feb 2014).</li> <li>2. 藤田克昌, “非線形蛍光応答の誘起と超解像イメージングへの利用,” 応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会「バイオ・メディカルフォトンクス:基礎と応用の最前線」(長野 2013 年 12 月 21 日).</li> <li>3. K. Fujita and S. Kawata, “Super-resolution confocal microscopy using saturated excitation (SAX microscopy),” International Symposium on Super-Resolution Imaging 2013 (Super Imaging 2013) (Hamamatsu, 2 Dec 2013).</li> <li>4. 藤田克昌, “超解像顕微鏡の進展,” バイオ単分子研究会 (盛岡, 2013 年 11 月 10 日).</li> <li>5. 藤田克昌, “光学顕微鏡の最前線と関連技法の現状,” 日本顕微鏡学会 様々な極微イメージング技術研究部会 第 1 回研究会 (福岡, 2013 年 10 月 19 日).</li> <li>6. 藤田克昌, “光学応答の飽和を利用した超解像顕微鏡,” 日本顕微鏡学会 第 69 回学術講演会 (ホテル阪急エキスポパーク, 2013 年 5 月 20 日).</li> <li>7. 上垣 久美子, 米丸 泰央, 山中 真仁, N. I. Smith, 河田 聡, 藤田 克昌, “SAX 顕微鏡を用いた三次元培養細胞の超解像イメージング,” 第 61 回応用物理学会春期学術講演会 (神奈川, 2014 年 3 月 17 日).</li> <li>8. K. Fujita, M. Yamanaka, K. Saito, N.I. Smith, S. Kawata, T. Nagai, “Nonlinear deep-UV excitation microscopy for multicolor fluorescent protein imaging with high spatial resolution,” SPIE Photonics West (San Francisco, 4 Feb 2014).</li> <li>9. M. Yamanaka, K. Saito, N. I. Smith, S. Kawata, T. Nagai, K. Fujita, “Sub-diffraction-limited imaging of fluorescent protein expressed in living cells by saturated excitation (SAX) microscopy,” SPIE Photonics West (San Francisco, 2 Feb 2014).</li> <li>10. 米丸 泰央, 山中 真仁, スミス ニコラス, 下村 竜司, 河田 聡, 藤田 克昌, “蛍光の飽和応答の変調光周波数依存と飽和励起 (SAX)顕微鏡への応用,” Optics and Photonics Japan (奈良, 2013 年 11 月 14 日).</li> <li>11. M. Yamanaka, K. Uegaki, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, “High-resolution fluorescence imaging of a multi-layer cell cluster by saturated excitation (SAX) microscopy,” SPIE Optics and Photonics (San Diego 27 August 2013).</li> <li>12. 山中真仁, 上垣久美子, SMITH Nicholas, 河田聡, 藤田克昌, “飽和励起(SAX)顕微鏡を用いた多層化細胞群の高解像蛍光イメージング,” 応用物理学会春季学術講演会 (厚木, 2013 年, 3 月 27 日~30 日).</li> <li>13. 桶谷亮介, SU Tung-Yu, 米丸泰央, LEE Hsuan, 山中真仁, LEE Ming-Yin, 河田 聡, CHU</li> </ol>

	<p>Shi-Wei, 藤田克昌, “超解像イメージング:飽和したプラズモン光散乱の利用,” 応用物理学会春季学術講演会(厚木, 2013年, 3月27日~30日).</p> <p>14. H.-Y. Wu, Y. Yonemaru, Y.-Yu Su, M. Yamanaka, Y.-T Huang, S. Kawata, K. Fujita, and S.-W. Chu, “Saturable and reverse saturable scattering of a single gold nanoparticle,” Focus on Microscopy 2013 (Maastricht, 2013年, 3月24日~27日).</p> <p>15. M. Yamanaka, K. Uegaki, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, “High-resolution fluorescence imaging of cells in 3D culture by saturated excitation (SAX) microscopy,” Focus on Microscopy 2013 (Maastricht, 2013年, 3月24日~27日).</p> <p>16. 藤田克昌, “光を用いた細胞内部の超解像イメージング,” 応用物理学会東海支部 第20回基礎セミナー「バイオメディカルフォトニクス」(名古屋, 2013年1月18日).</p> <p>17. 藤田克昌, “光学技術の限界を超える超解像分子イメージング,” 日本学術振興会 光エレクトロニクス第130委員会 第284回研究会 (東京, 2012年10月3日).</p> <p>18. M. Yamanaka, N. I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, “Saturated excitation (SAX) microscopy; high depth-resolution fluorescence imaging,” 2012年秋季第73回応用物理学会学術講演会, (愛媛, 2012年, 9月11~17日)</p> <p>19. 藤田克昌, “超解像イメージング:伝播光を使ったユニークな手法,” 日本分光学会第48回夏期セミナー (幕張, 2012年9月7日).</p> <p>20. 藤田克昌, “光学顕微鏡の解像力の限界を超える” 第48回日本小児循環器学会総会・学術集会 (国立京都国際会館, 2012年7月5日).</p> <p>21. K. Fujita, “High-resolution confocal microscopy using saturated and nonlinear excitation,” Joint meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists &amp; the 64th annual meeting of the Japan Society of Cell Biology (神戸国際会議場, 2012年5月31日).</p> <p>22. K. Fujita, “Super resolution microscopy using optical saturation,” 日本顕微鏡学会 学術講演会 (つくば, 2012年5月15日).(企画も担当)</p> <p>23. T.-Y. Su, Y. Yonemaru, M.-Y. Lee, M. Yamanaka, H. Lee, S. Kawata, K. Fujita, S.-W. Chu, “Study of saturable scattering of single gold nanoparticle for super-resolution imaging,” Focus on Microscopy 2012 (Singapore, 2012年, 4月2日~5日).</p> <p>24. K. Fujita, “Resolution improvement in laser scanning microscopy by using saturated and nonlinear excitation,” 第59回応用物理学関係連合講演会 シンポジウム:最先端バイオイメージング(早稲田大学, 2012年3月15日).</p> <p>25. 藤田克昌, “回折限界を超えた光学顕微鏡:原理と将来展望,” 電顕技術開発若手研究部会 第3回ワークショップ「様々なイメージング技術の現況と展望」(名古屋, 2012年1月5~6日).</p> <p>26. K. Fujita, “High resolution confocal microscopy by using saturated excitation of fluorescence,” Japan-Korea Biomedical Optics Symposium, Optics &amp; Photonics Japan 2011 (OPJ2011) (大阪, 29 Nov 2011)</p> <p>27. Mei-Ling Zheng, Katsumasa Fujita, Wei-Qiang Chen, Xuan-Ming Duan, Satoshi Kawata, “Two-Photon Excited Fluorescence and Second-Harmonic Generation of the DAST Organic Nanocrystals,” International Conference on Nanoscience &amp; Technology(ChinaNANO2011), (Beijin, 7-9 September 2011).</p> <p>28. K. Fujita, “High-resolution confocal microscopy using optical saturation and nonlinear excitation,” 第20回バイオイメージング学会 国際シンポジウム (千歳, 2011年9月1~2日).</p> <p>29. 山中真仁, 藤田克昌, “光学応答の飽和を用いた超解像,” 第37回レーザー顕微鏡研究会シンポジウム「光の回折限界を超えた顕微鏡とその応用」(和光市, 2011年7月6日).</p> <p>30. K. Fujita, “Raman microscopy for visualization of cellular functions,” RIKEN CDB-QBiC Joint Symposium (Kobe, 30 June - 1 July 2011).</p> <p>31. M. Yamanaka, S. Kawano, N.I. Smith, S. Kawata, K. Fujita, “Saturated excitation (SAX) microscopy; depth resolution,” Focus on Microscopy 2011 (Konstantz, 18 April 2011).</p> <p>32. M.-L. Zheng, K. Fujita, W.-Q. Chen, X.-M. Duan, S. Kawata, “Selective staining for subcellular structures by carbazole-Based cyanine probes in nonlinear optical microscopy,” Focus on Microscopy 2011 (Konstantz, 19 April 2011).</p>
--	---

	<p>一般向け 計3件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 藤田克昌, “顕微光学,” 大阪大学ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究推進機構 社会人再教育プログラム(2013年6月19日, 阪大中之島センター)</li> <li>2. 藤田克昌, “顕微光学,” 大阪大学ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究推進機構 社会人再教育プログラム(2012年6月20日, 阪大中之島センター)</li> <li>3. 藤田克昌, “顕微光学,” 大阪大学ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究推進機構 社会人再教育プログラム(2011年6月22日, 阪大中之島センター)</li> </ol>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得 状況</p> <p>計5件</p>	<p>(取得済み) 計2件</p> <p>国内 名称:顕微鏡及び観察方法 発明者:藤田克昌、河野省吾、山中真仁、河田聡 出願人:国立大学法人 大阪大学 登録番号:特許 5311595、登録日:2013年7月12日</p> <p>外国 名称:Fluorescence microscopy and fluorescence microscopy method(欧州) 発明者:藤田克昌、小林実、河田聡、中村直子 出願人:国立大学法人 大阪大学 登録番号:EP1835323、登録日:2012年8月1日</p> <p>(出願中) 計3件</p> <p>国内 名称:撮像装置 発明者:藤田克昌 出願人:藤田克昌 出願番号:特願 2013-161165、出願日:2013年8月2日</p> <p>外国 名称:Nonlinear luminescent molecule, fluorescent stain, and observation method(米国) 発明者:藤田克昌、水上進、菊地和也、河田聡、河野省悟 出願人:国立大学法人 大阪大学 出願番号 13/380,749、移行日:2012年1月19日</p> <p>外国 名称:Nonlinear luminescent molecule, fluorescent stain, and observation method(欧州) 発明者:藤田克昌、水上進、菊地和也、河田聡、河野省悟 出願人:国立大学法人 大阪大学 出願番号: 10791832.8、移行日:2011年12月23日</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>大阪大 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 藤田克昌 <a href="http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1kat/index_j.html">http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1kat/index_j.html</a> 大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム <a href="http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next">http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</a> 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム <a href="http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html">http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</a></p>

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>阪大学フotonicsセンターと共同で、地域の小学生を対象とした光科学体験セミナー「スーパー光塾」を開催した(計3回)。ペットボトルとガラス玉を用いた簡単な顕微鏡と植物試料の作製および観察、また、作製した顕微鏡による身近な微小物体の観察を体験していただいた。(参加者数 小学生50名、保護者50名)(2013年12月8日、2012年10月23日、2011年10月23日)</p> <p>高校生を対象とした研究体験会を開催した。1)細胞の培養、2)細胞の染色、3)レーザー走査顕微鏡を利用した3次元顕微観察、3つの内容についてレクチャーし、各内容について実験をしていただいた。(2011年8月10日)</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計8件</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. “金ナノ粒子に強い光 光散乱効果の飽和を発見” 日刊工業新聞 2014年1月14日(火)朝刊11面</li> <li>2. “組織・細胞内部を詳細観察” 日経産業新聞 2013年2月13日(水)朝刊7面</li> <li>3. “30倍鮮明に観察” 日刊工業新聞 2013年2月13日(水)朝刊21面</li> <li>4. “生きたまま深部を鮮明に 神戸新聞 2013年2月16日(土)朝刊12面</li> <li>5. “細胞内 精密に高速連続撮影” 読売新聞(大阪)2013年2月18日(月)朝刊22面</li> <li>6. “新イメージング装置 —生物内部を高速・高精細描写—” 化学工業日報 2013年2月21日(木)</li> <li>7. “理研など、厚みのある資料の高速・高精細に蛍光イメージング装置を開発” マイナビニュース (netnews) 2013年2月12日(火) <a href="http://news.mynavi.jp/news/2013/02/12/192/">http://news.mynavi.jp/news/2013/02/12/192/</a></li> <li>8. “理化学研究所と阪大、生物内部を高速・高精細にイメージング可能にする装置を開発” 日経新聞 電子版 (netnews) 2013年2月13日(水) <a href="http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=330086&amp;lindID=5">http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=330086&amp;lindID=5</a></li> </ol>
<p>その他</p>	<p>2013年9月16～19日に同志社大学において開催された応用物理学会第74回応用物理学会学術講演会において、2nd JSAP-OSA Joint Symposium “Biophotonics” を企画し、バイオイメージング関連の研究者の国際交流を行った。</p> <p>2012年9月11～14日に愛媛大学において開催された応用物理学会第73回応用物理学会学術講演会において、1st JSAP-OSA Joint Symposium “Biophotonics” を企画し、バイオイメージング関連の研究者の国際交流を行った。</p> <p>2011年8月29～9月1日に山形大学において開催された応用物理学会第72回応用物理学会学術講演会展示会において、特別展示「ラマン分光イメージング:革新と波及」を企画、実施し、新しい光学顕微鏡技術の一般への紹介を行った。</p>

7. その他特記事項

2011年12月1日 日本分光学会賞(奨励賞)を受賞。