

第 39 回先端技術大賞応募論文

生きた組織を透明化する試薬の開発

～蛍光顕微鏡を用いた深部観察への応用～

九州大学大学院 医学研究院

助教 稲垣 成矩

1. 緒 言

ヒトを含む哺乳類において、生命現象は多くの細胞が協調して機能することで成り立っている。例えば脳では、多数の神経細胞が機能的ネットワークを形成することで、単純な神経活動の総和だけでは説明できない認知や記憶といった高次機能が生み出される。従って、哺乳類の生命現象を記述するためには、個々の細胞を別々に計測するだけでは不十分であり、多数の細胞の振る舞いを組織から器官に至るスケールで同時計測することが重要である。

近年、細胞内のさまざまな分子の機能を可視化できる蛍光センサーの開発が進み、生きた細胞内で起こる分子の挙動をリアルタイムで観察できるようになった¹。しかし、生体組織には異なる屈折率を持つ様々な構造が詰め込まれており、その屈折率差によって光が複雑に屈折・散乱する²。そのため、生体組織は一般に不透明であり、深部に位置する細胞を光学的に観察することは困難であった。

蛍光顕微鏡を用いた深部観察は、蛍光を励起する光（励起光）の長波長化や高出力化によって発展してきた^{3,4}。1990年代頃から共焦点顕微鏡が普及し、組織表層から約50 μm の深さまで、単一細胞分解能での計測が可能になった。さらに、2000年代頃から二光子励起顕微鏡が普及したことで、組織表層から約500 μm の深さまで計測できるようになった。近年では、励起光のさらなる長波長化を目指して、多くの研究者が三光子励起顕微鏡の開発を進めている。しかし、この波長域では水分子による光吸収が大きく、熱による組織損傷が生じるため、細胞機能の動態を高い時間分解能で追跡することは難しい⁵。従って、蛍光顕微鏡の改良による深部観察は、すでに技術的な限界に至っており、さらなる組織深部の観察は困難である。

死後にホルマリンなどで固定した組織標本では、近年、組織透明化法を用いることで透明化が可能となり、深部観察が容易になった⁶⁻¹⁵。これらの手法では、高い屈折率の溶液（透明化液）を組織内に浸透させることで、組織内の屈折率を均一化する。その結果、組織における光の屈折や散乱が抑えられ、組織が透明化することで、深部を含む組織全体を見通す蛍光観察が可能となる。しかし、このような従来の透明化液は、極めて高い毒性を生じるため、生きた細胞の正常な機能を保持することはできなかった。

一方で、生きた動物における組織を透明化する試みもこれまでになされてきた¹⁶。例えば、動物の皮膚の透明化では、皮膚表面でバリア機能を担う角層を物理的に破壊したのち、タートラジンなどの溶液を浸透させることで、組織内で生じる光散乱を抑制する¹⁷⁻¹⁹。同様に、頭蓋骨を脱灰して透明化する方法も数多く報告されている²⁰⁻²²。しかし、これらに用いられる試薬も、固定組織に用いられる透明化液と同様に高い毒性を生じる。従って、これらの手法はいずれも、観察対象の組織を正常な機能を維持したまま透明化することはできない。生きた組織を、機能を損なうことなく透明化し、深部の観察を実現することは、生命科学における長年の課題であり、多くの研究者の夢であった。

2. 生きた組織を透明化する手法の開発

生きた組織の透明化を実現するためには、組織中の屈折率を均一化して透明にするだけでなく、細胞に対する毒性を最小限に抑える必要がある。特に、細胞外液の浸透圧やイオン組成などを生体内の環境にできる限り近づけ、細胞機能を正常に保つことが重要である。しかしこれまで、これらの条件を全て満たす「生きた組織の透明化」は実現していなかった。

2-1. 生きた組織を透明化するための条件検討

生きた細胞を透明化するうえで、浸透圧ストレスによる細胞への影響を回避することは極めて重要である。細胞膜は半透膜として働き、水は通しやすい一方で溶質やイオンは通しにくい。そのため、細胞外液の浸透圧が高いと、細胞質中の水分が浸透圧の高い細胞外へ流出してしまう。その結果、細胞は収縮し、細胞内環境が変化することで、本来の機能を維持できなくなる。溶液の屈折率は溶質の質量濃度に、浸透圧はモル濃度に依存して上昇する。従来の高い屈折率を持つ透明化液は一般に飽和溶液に近く、通常の細胞外液の10倍以上に達する高い浸透圧を示すため、細胞機能を障害する。

そこで私はまず、グリセロールなどの細胞膜を透過可能な小分子（膜透過性小分子）を透明化液に用いることを検討した。浸透圧による細胞への負荷は、細胞内外の浸透圧差によって生じる。そのため、膜透過性小分子であれば細胞内外の浸透圧をともに上昇させることで、浸透圧差に起因する細胞への負荷を回避できると考えられた。

しかし実際には、膜透過性小分子を培地に添加しても細胞の透明性は大きく向上せず、む

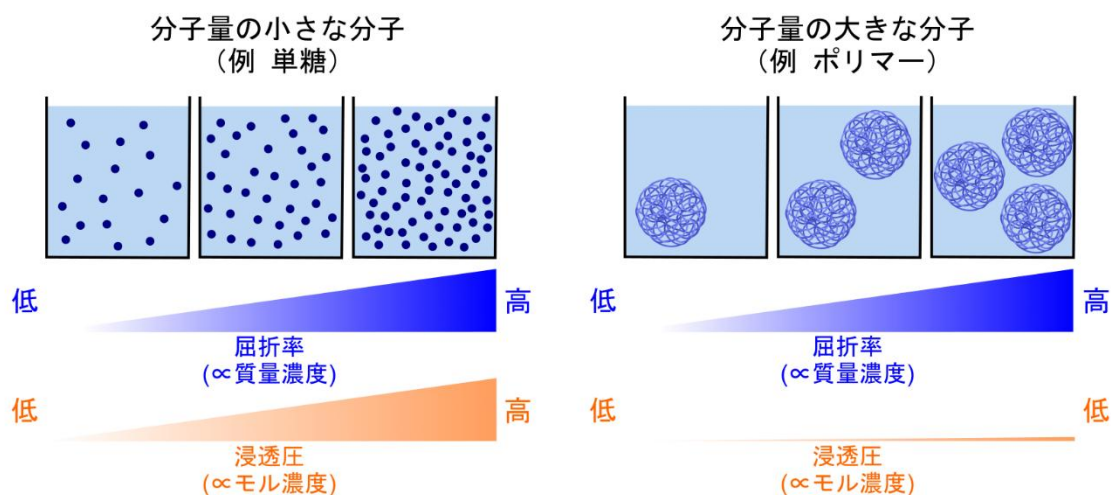


図 1 高分子量分子を用いることで、浸透圧の上昇を最小限に抑えながら屈折率を高めることができる。

溶液の屈折率は溶質の質量濃度に依存し、浸透圧はモル濃度（分子数）に依存する。従来の透明化液では、屈折率を高めるために分子量の小さな分子が用いられてきたが、この場合は多くの分子を溶解させる必要があるため、浸透圧も大きく上昇する（左）。一方、ポリマーのような高分子量分子を用いれば、モル濃度を低く抑えたまま屈折率を高められるため、浸透圧の上昇を抑制できる（右）。

しる細胞増殖は停止し、最終的には細胞死が誘導されることが分かった。これは、細胞膜における透過速度が十分に高くないため、試薬添加直後に培地の浸透圧が急激に上昇し、細胞機能が障害されたためと考えられた。加えて、試薬が細胞内に取り込まれること自体によって、細胞機能が障害された可能性も考えられた。以上のことから、膜透過性小分子は生きた細胞の透明化液としては適さないことが明らかとなった。

そこで次の候補として、分子量の大きな分子（高分子量分子）を透明化液に用いることを検討した。従来の透明化液では、分子量の小さな分子が用いられていたため、モル濃度が高くなり透明化液の浸透圧は極めて高くなっていた。一方、ポリマーなどの高分子量分子を用いれば、モル濃度を低く抑えることができるため、浸透圧の上昇は最小限に抑えられると考えられた（図 1）。例えば、分子量 10 万のポリマーでは、50% (w/v) で溶液に溶解しても、計算上、浸透圧の上昇は +5 mOsm/L にとどまる（分子量の小さなグルコースでは +2778 mOsm/L）。

まず高分子量分子の一つであるイオジキサノールを用いて細胞外液の屈折率を段階的に変化させ、生きた培養細胞における光の透過率を測定した。その結果、細胞外液の屈折率が 1.36–1.37 としたときに、生きた細胞が透明になることを見出した（図 2A,B）。

通常培地の屈折率が 1.33–1.34 であるのに対し、細胞内の屈折率は 1.36–1.37 である。そのため、通常培地中では、光が細胞に入射すると屈折・散乱が生じる。従って、生きた細胞が透明化したのは、細胞外液の屈折率が細胞内の屈折率に一致したことで、光の屈折・散乱

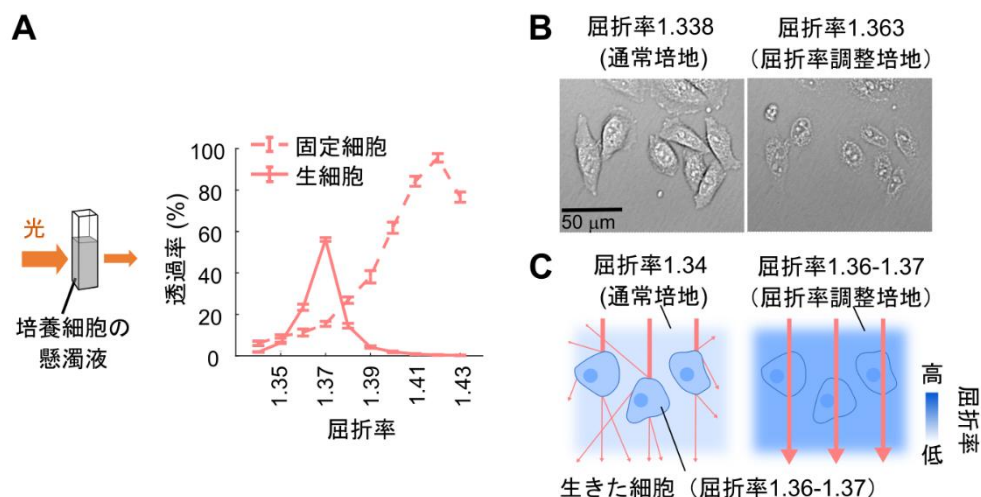


図 2 細胞外液の屈折率を細胞の屈折率に合わせることで、生きた細胞が透明になる

(A) 高分子量分子の一つであるイオジキサノールを用いて、細胞外液 (PBS) の屈折率を変化させた際の光の透過率。生きた HeLa 細胞 (生細胞) と、ホルマリン固定後に界面活性剤で透過処理を施した HeLa 細胞 (固定細胞) について計測を行った。(B) 通常培地 (屈折率 1.338) および屈折率調整培地 (屈折率 1.363) における HeLa 細胞の透過光画像。(C) 通常培地では、細胞外液と細胞の境界で光が屈折・散乱するため、細胞は不透明に見える。一方、細胞外液の屈折率を 1.36-1.37 に調整すると、細胞内外の屈折率が一致し、光の屈折・散乱が抑えられることで、細胞は透明化する。

が抑制されたためであると考えられた (図 2C)。さらに興味深いことに、生きた細胞が透明になる屈折率条件は、従来、固定した死細胞の透明化に用いられてきた屈折率条件 (1.43–1.56) とは大きく異なっていた。

2-2. 浸透圧上昇を抑えながら屈折率を高めることが可能な試薬の探索

そこで、さまざまな高分子量分子の溶液を調製し、屈折率が 1.365 となる条件で浸透圧を測定した。その結果、多くの高分子量分子では、モル濃度から予測される値よりも高い浸透圧を示した。例えば分子量 8000 のポリエチレングリコールでは、予想値が 29 mOsm/kg であったのに対し、実測値は 381 mOsm/kg であった (図 3)。このような予測値と実測値の乖離は、特に直鎖状ポリマーで顕著であり、分子の形態が実際の浸透圧に影響することを示唆していた。

一方、球状ポリマーは、モル濃度に近い浸透圧を示すことが分かった。その中でも、タンパク質の一種であるウシ血清アルブミンの水溶液が、最も低い浸透圧 (3 mOsm/kg) を示すことが明らかとなった (図 3)。一般に、細胞外液の浸透圧は 280–300 mOsm/kg の範囲に調整されているが、アルブミン添加による浸透圧上昇は 3 mOsm/kg にとどまるため、細胞外液に加えても浸透圧はほとんど変化しなかった。

実際、アルブミンを溶解して屈折率を調整した培地中においても、透明化した培養細胞が 3 日間にわたり正常に増殖することを確認した。これらの結果から、アルブミンを添加した培地は、細胞に対する毒性が極めて低いことが示された。

私は、この透明化培地を「SeeDB-Live」と名付けた²³。SeeDB-Live は、アルブミンを添加して細胞外液の屈折率を 1.36–1.37 に調整する。これにより、細胞毒性を抑えつつ、細胞

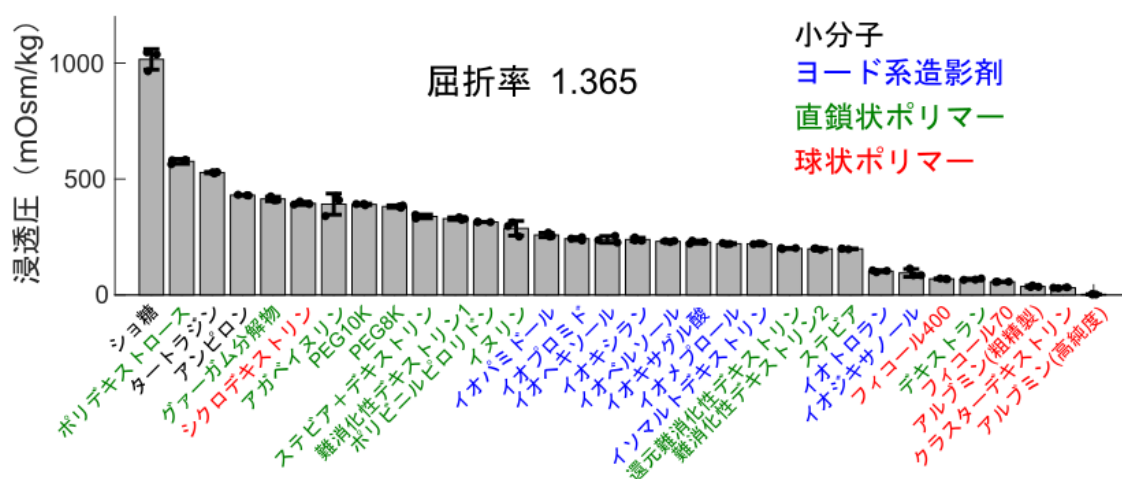


図 3 高分子量分子の中でも、球状ポリマーは低い浸透圧を示した。

高分子量分子として、屈折率を 1.365 に調整した X 線 CT 検査用ヨード系造影剤、直鎖状ポリマー、および球状ポリマー溶液の浸透圧を測定した。ショ糖などの低分子や造影剤、直鎖状ポリマーが高い浸透圧を示したのに対し、球状ポリマーは低い浸透圧を示した。その中でも、タンパク質であるアルブミンは極めて低い浸透圧を示した。

外液の浸透圧やイオン組成を正常条件にできる限り近づけた状態で、生きた細胞および組織を透明化できる。SeeDB-Live は、観察する細胞の通常培地を基に作製する必要がある。

3. SeeDB-Live を用いた実証実験

3-1. 三次元培養組織の透明化

三次元培養組織における SeeDB-Live の効果を検証するため、まず培養細胞を三次元的に培養して作製したスフェロイドにおいて実験を行った。スフェロイドを SeeDB-Live に浸すと、15 分ほどで透明になることが確認された (図 4A)。透明化後には、蛍光タンパク質を発現する細胞を、透明化前と比べて 3 倍ほどの深さまで観察することができた (図 4B)。さらに、透明化したスフェロイド内の細胞が正常に増殖することも確認した。

次に、オルガノイドにおける透明化効果を検証した。オルガノイドは、ミニ臓器とも呼ばれ、臓器の構造や機能を部分的に再現した三次元組織である。マウスの腸組織を取り出し、培養皿で三次元的に培養することで作製した腸オルガノイドについても、透明化後には蛍光タンパク質を発現する細胞を通常よりも深部まで観察することが可能であった (図 4C, D)。また、透明化後のオルガノイドが正常に増殖することも確認した。

以上のことから、SeeDB-Live は、三次元培養組織であるスフェロイドおよびオルガノイドを生きたまま透明化し、深部観察を可能にすることが示された。さらに、透明化処理を繰り返し行ってもスフェロイドやオルガノイドが正常に増殖したことから、長期的な経過観察にも適用可能であることが示された。

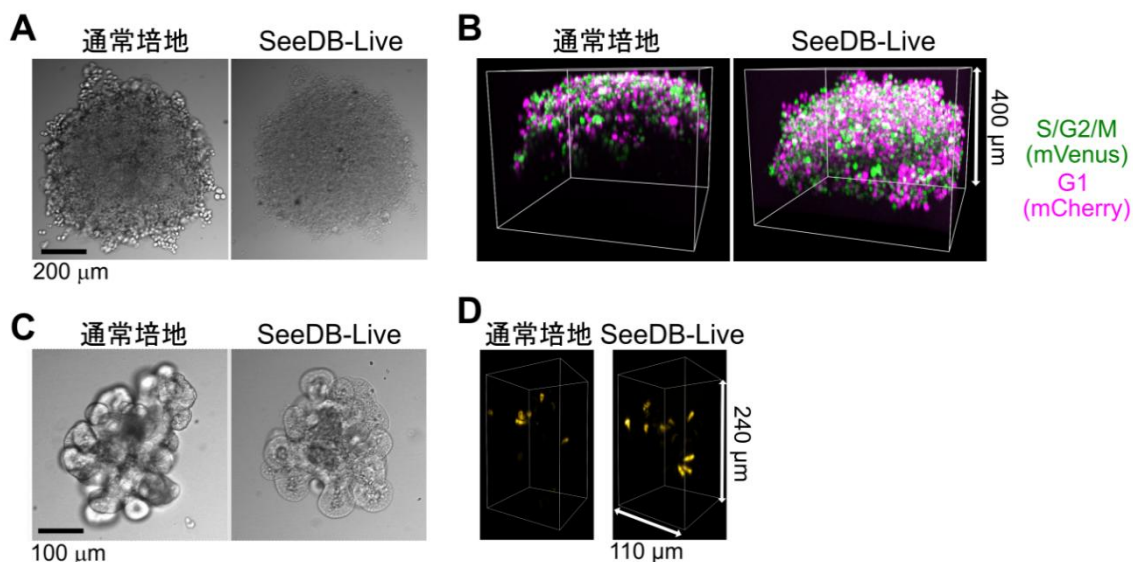


図 4 生きたスフェロイドおよび腸オルガノイドの透明化

(A) HeLa 細胞を三次元的に培養して作製したスフェロイドの透過光画像。(B) 細胞周期センサーFucci2 を発現する HeLa 細胞スフェロイドの共焦点蛍光画像。mVenus および mCherry の蛍光を示す細胞は、それぞれ S/G2/M 期および G1 期にあることを示す。(C) マトリゲルで培養した腸オルガノイドの透過光画像。(D) 腸内分泌細胞に蛍光カルシウムセンサーGCaMP を発現させた腸オルガノイドの共焦点蛍光画像。

3-2. 生体から摘出した三次元組織の透明化

生体から摘出した三次元組織における SeeDB-Live の効果を検証するため、生きた脳組織のスライスである急性脳切片を用いて検討を行った。動物個体から取り出した直後の脳切片は、培地（人工脳脊髄液）を灌流し続けることで、細胞を生かしたまま維持することができる。

まず、急性脳切片において、透明化後にも正常な神経活動が維持されているかを調べた。

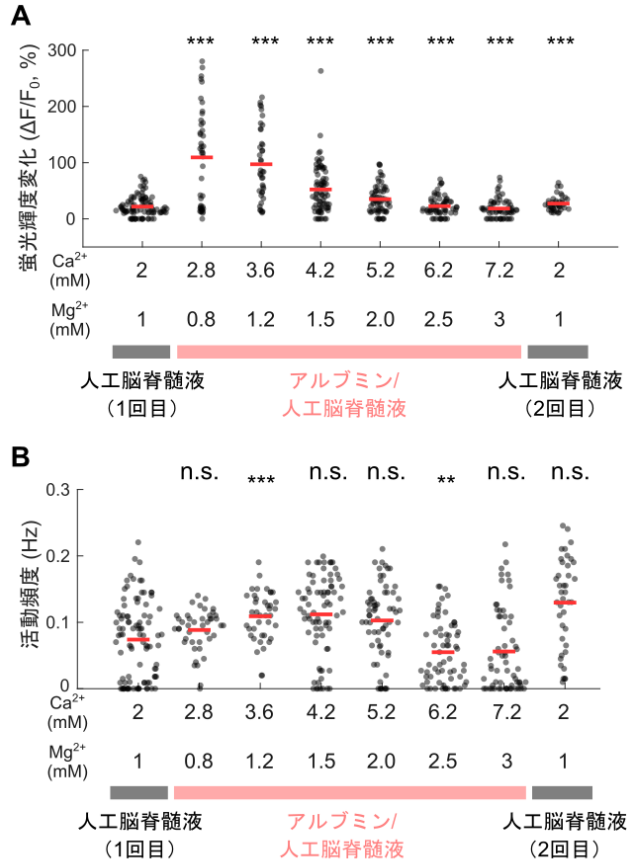


図 5 急性脳切片を対象とした SeeDB-Live におけるイオン組成の最適化。

(A,B) 急性脳切片（生後 11-14 日目のマウス嗅球）において GCaMP 発現神経細胞のカルシウムイメージングを行い、アルブミン/人工脳脊髄液中の総 Ca²⁺/Mg²⁺濃度に依存した蛍光強度変化(A)および活動頻度(B)を比較した。(C) 最終的に決定した、人工脳脊髄液を基にした SeeDB-Live の組成および物性。

神経細胞では、活動に伴って細胞内カルシウム濃度が上昇することが知られている。そのため、蛍光カルシウムセンサーGCaMPを用いることで、蛍光輝度の変化として神経活動を捉えることができる。そこで、GCaMPを用いて神経細胞のカルシウムシグナルを計測したところ、予想に反して、アルブミンを添加した人工脳脊髄液（アルブミン/人工脳脊髄液）では、神経細胞が異常に大きな活動を示すことが分かった（図 5A, B）。

その原因を検討した結果、アルブミンが溶液中の $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ と結合することで、神経細胞が実際に利用できる遊離 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度が低下していることが判明した。そこで、神経細胞のカルシウムシグナルの変化量と活動頻度を指標として、アルブミン/人工脳脊髄液に $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を追加で添加し、遊離 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度が正常範囲となる条件を決定した（図 5A, B）。その結果、アルブミン/人工脳脊髄液中の総 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度を人工脳脊髄液の 2-3 倍にすると、神経活動が正常範囲に収まることが明らかとなった。さらに、神経活動をより正常な状態に近づけるため、 Na^+ , Cl^- , グルコース濃度等についても同様に詳細な検討を行い、最終的に人工脳脊髄液を基にした SeeDB-Live を完成させた（図 5C）。

急性脳切片にこの SeeDB-Live を 1 時間ほど灌流すると、組織が透明になることが確認された（図 6A,B）。さらに、GCaMPを用いて神経細胞のカルシウムシグナルを計測したところ、透明化後も正常な神経活動が維持されていることが確認された（図 6C）。また、透明化された急性脳切片が正常な神経活動を維持しているか調べるため、神経細胞の電氣的活動

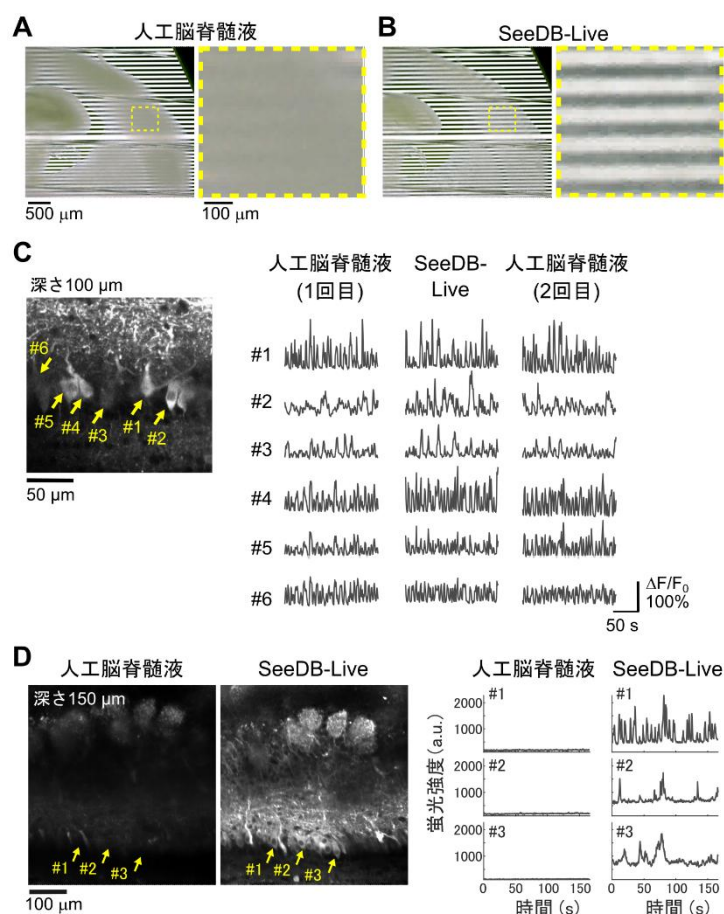


図 6 急性脳切片の透明化

(A, B) 急性脳切片（生後 5 日目のマウス大脳皮質）の透明化。通常培地（人工脳脊髄液）(A) および SeeDB-Live (B) に、それぞれ 1 時間ほど浸した後の脳切片の透過光画像。透明化した脳切片では、標本の下にある縞模様が明瞭に観察できた。(C) 急性脳切片（生後 11 日目のマウス嗅球）の比較的浅い位置（深さ 100 μm ）において、透明化前後で神経細胞のカルシウムシグナルを比較した。(D) 急性脳切片（生後 9 日目のマウス嗅球）の深い位置（深さ 150 μm ）において、透明化前後で神経細胞の経時的な蛍光輝度を比較した。透明化後には、カルシウムシグナルを明瞭に観察できるようになった。

を直接記録する電気生理学的計測を行った。その結果、透明化後も神経細胞の膜電位の特性や活動動態はほとんど損なわれないことが分かった。

そこで次に、深部での蛍光イメージングが可能になるか検証した。神経細胞に蛍光タンパク質を発現させた急性脳切片で評価を行ったところ、SeeDB-Liveで透明化した脳切片では、通常の約2倍深い領域においても、細胞からの蛍光を観察することが可能であった。さらに、通常では計測が困難なより深部の領域において、透明化前後でカルシウムシグナルを計比較したところ、透明化後には蛍光輝度が上昇し、神経活動を明瞭に観察できることが確認された（図6D）。

以上のことから、人工脳脊髄液を基にしたSeeDB-Liveは、イオン組成を緻密に調整することで、生体から摘出した三次元組織である急性脳切片を生きたまま透明化できることが示された。さらに、神経細胞の正常な機能を維持したまま、より深部における活動計測を可能にすることが示された。

3-3. 生きたマウスにおける脳の透明化

続いて、生きたマウスの脳（大脳皮質領域）を対象として、SeeDB-Liveによる透明化を試みた。麻酔下マウスの頭蓋骨と硬膜を除去したのち、蛍光標識アルブミンを含むSeeDB-

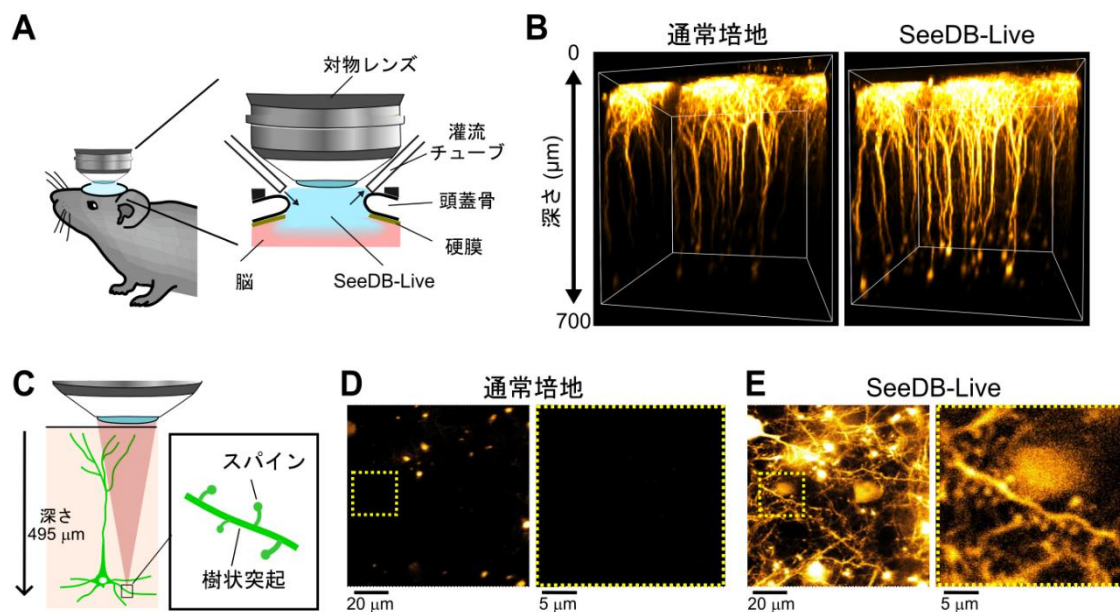


図7 生きたマウスにおける大脳皮質の透明化

(A) 麻酔したマウスにおいて、脳表面に SeeDB-Live を1時間流し続けて浸透させ、透明化を行った。(B) 大脳皮質第五層錐体細胞の三次元蛍光画像。蛍光タンパク質を神経細胞に発現する (Thy1-EYFP-H) マウスを二光子励起顕微鏡により撮像した。(C-E) 大脳皮質第五層錐体細胞の樹状突起およびスパイン (C)。透明化前 (D) と比べ、透明化後 (E) には蛍光輝度が向上し、樹状突起や樹状突起スパインの蛍光画像がより明瞭に観察できるようになった。

Live で脳表面を約 1 時間灌流したところ、SeeDB-Live が大脳皮質内へ浸透することを確認した (図 7A)。その結果、大脳皮質深部に位置する神経細胞の蛍光を、透明化前と比べて 3 倍以上明るく観察できた (図 7B)。さらに、通常は観察が困難であった大脳皮質第五層錐体細胞の基底樹状突起やスパインといった微細構造も明瞭に観察することができた (図 7C-E)。また、GCaMP を用いることで、大脳皮質第五層錐体細胞のカルシウムシグナルも、高い精度で計測することができた (図 8)。

SeeDB-Live による生きた組織の透明化では、細胞外液が一時的に SeeDB-Live へ置換される。そのため、生きた動物の脳では、透明化処理の数時間後に SeeDB-Live が洗い流され、透明度は元の状態に戻る。従って、同一個体を長期間にわたって蛍光観察するには、その都度、SeeDB-Live を脳内に浸透させて透明化する必要がある。私は、生きたマウスにおける脳の透明化を 4 ヶ月以上にわたって繰り返し行い、神経細胞のカルシウムシグナルに異常を生じさせることなく継続的に計測できることを示した。その際、脳内に炎症が生じず、行動異常も生じていないことを確認した。

これらの実験から、SeeDB-Live は、生きたマウスの脳を透明化できることが示された。さらに、正常な神経活動を維持したまま、炎症や行動異常を生じることなく、大脳皮質のより深部における計測を可能にすることが示された。

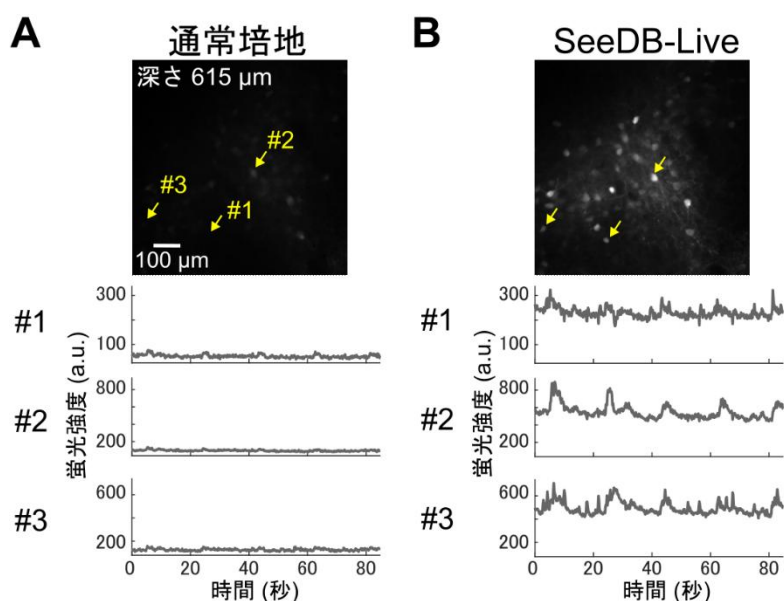


図 8 覚醒下マウスにおける大脳皮質第五層錐体細胞の二光子カルシウムイメージング。

(A,B) 透明化前(A)と透明化後(B)における jGCaMP8m 発現細胞の蛍光画像(上)と蛍光強度の時系列データ(下)。

4. 結論と展望

従来の組織透明化法では、主に分子量の小さな分子が用いられており、極めて高い浸透圧により生じる毒性のため、生きた組織に適用することはできなかった。今回私は、①高分子量分子であるアルブミンを用い、②浸透圧上昇を最小限に抑えつつ細胞内外の屈折率を一致させることで、正常な機能を維持したまま生きた組織を透明化することに、“世界で初めて”成功した。アルブミンは、直径約 7 nm の球状タンパク質であり、血液中に豊富に存在する。比較的安価に入手できるうえ、溶解度が非常に高く、粘性も低いため、透明化液に用いるには最適であった。このアルブミンを用いた生きた組織の透明化試薬「SeeDB-Live」は、対象とするサンプルの培地を基に作製される。これにより、生きた培養細胞、スフェロイド、オルガノイド、急性脳切片、さらにはマウス的大脑皮質の透明化に成功した。

スフェロイド等の三次元培養組織では、通常培地にアルブミンを添加するだけで細胞機能が正常に保たれていた。一方、急性脳切片では、SeeDB-Live のイオン組成を緻密に検討する必要があった。これは恐らく、急性脳切片が生体から摘出した直後のきわめて脆弱な組織であるうえ、興奮性の高い細胞を多数含むため、細胞外環境のわずかな変化にも機能が大きく影響されやすいためと考えられる。しかし、イオン組成を綿密に検討することで、急性脳切片の透明化に適した SeeDB-Live を確立することができた。さらに、急性脳切片において時間をかけて条件を最適化したことが、生きたマウス脳における透明化の成功にもつながった。

SeeDB-Live を用いた研究の展望として、主に二つの方向性が考えられる。その一つは、オルガノイドを用いた薬剤探索への応用である。これまで、ヒト iPS 細胞から作製した細胞を用いて、疾患治療を目的とした薬剤探索が行われてきた。本来、薬剤探索は、生体により近い環境を再現したオルガノイドを用いて行うことが望ましい。しかし現状では、オルガノイド深部の細胞を十分に観察することが難しいため、一般には分散培養した細胞を用いて薬剤効果を評価することが多い。そこで将来的には、SeeDB-Live をオルガノイドに最適化し、その大規模観察を可能にすることで、生体内で有効に機能する薬剤をより効率的に開発できるようになると考えられる。

二つ目の展望として、SeeDB-Live は脳機能の理解を大きく前進させると考えられる。これまでマウスの脳における光学的計測は、脳の表面に限られていた。そのため、表層で生じる脳機能についての理解は進んできた一方で、深部を含む脳全体の機能については、いまだ十分には分かっていない。今後、SeeDB-Live を効率良く脳に導入できる手法を開発することで、さらに脳深部の計測を可能にしたいと考えている。これにより、マウスの皮質下領域だけでなく、より観察が難しい霊長類の脳機能計測にも応用できる可能性がある。将来的には、脳をまるごと観察できる技術へと繋げることで、全脳レベルでの機能理解を目指したい。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、SeeDB-Live の開発に関してご助力いただいた九州大学大学院医学研究院疾患情報研究分野の今井教授をはじめとする研究室メンバーに深く感謝申し上げます。また、電気生理学的計測においては、鹿児島大学大学院神経病学講座神経筋生理学分野の玉川助教および田川教授に多大な貢献を賜った。さらにマウス脳活動の長期計測実験においては、山梨大学大学院生理学講座神経生理学分野の真仁田助教および喜多村教授に多大な貢献を賜った。この場をお借りして、心より感謝の意を表する。

また、本論文の一部は、原著論文としてすでに報告済みである²³。

6. 参考文献

- [1] Day-Cooney, J., Dalangin, R., Zhong, H. & Mao, T. J. *Neurochem.* 164, 284-308 (2023).
- [2] Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. *Cell* 162, 246-257 (2015).
- [3] Chen, Y., Wang, D. & Liu, J. T. C. *Opt. Lett.* 37, 4495-4497 (2012).
- [4] Xu, C. et al. *Cell* 187, 4458-4487 (2024).
- [5] Wang, T. et al. *eLife* 9, e53205 (2020).
- [6] Chung, K. et al. *Nature* 497, 332-337 (2013).
- [7] Dodt, H. U. et al. *Nat. Methods* 4, 331-336 (2007).
- [8] Erturk, A. et al. *Nat. Protoc.* 7, 1983-1995 (2012).
- [9] Hama, H. et al. *Nat. Neurosci.* 18, 1518-1529 (2015).
- [10] Hama, H. et al. *Nat. Neurosci.* 14, 1481-1488 (2011).
- [11] Ke, M. T., Fujimoto, S. & Imai, T. *Nat. Neurosci.* 16, 1154-1161 (2013).
- [12] Ke, M. T. et al. *Cell Rep.* 14, 2718-2732 (2016).
- [13] Susaki, E. A. et al. *Cell* 157, 726-739 (2014).
- [14] Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. *Cell* 171, 496 (2017).
- [15] Ueda, H. R. et al. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 61-79 (2020).
- [16] Zhu, D., Larin, K. V., Luo, Q. M. & Tuchin, V. V. *Laser Photon. Rev.* 7, 732-757 (2013).
- [17] Wen, X. et al. *J. Biophotonics* 3, 44-52 (2010).
- [18] Cicchi, R., Pavone, F. S., Massi, D. & Sampson, D. D. *Opt. Express* 13, 2337-2344 (2005).
- [19] Ou, Z. et al. *Science* 385, eadm6869 (2024).
- [20] Wang, J. et al. *Laser Phys. Lett.* 9, 469-473 (2012).
- [21] Feng, W. et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 43, 2105-2119 (2023).
- [22] Liu, X. et al. *Nat. Commun.* 16, 7864 (2025).
- [23] Inagaki, S. et al. *Nat. Methods* (2026). doi:10.1038/s41592-026-03023-y.