



Title	Time-Deterministic Cryo-Optical Microscopy: Microscopic Cryofixation for High-Precision Imaging of Dynamic Cellular States
Author(s)	辻, 康介
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105431
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (辻 康介)	
論文題名	Time-Deterministic Cryo-Optical Microscopy: Microscopic Cryofixation for High-Precision Imaging of Dynamic Cellular States (時間決定型クライオ光学顕微鏡法：顕微凍結固定による動的細胞状態の高精度イメージング)
論文内容の要旨 Fluorescence microscopy is a powerful tool for analyzing biological phenomena because it enables specific visualization of biomolecular dynamics as well as quantitative measurements of intracellular environments, such as ion concentrations, in living cells. Recent advances in super-resolution microscopy have overcome the diffraction limit and achieved nanometer-scale spatial resolution. In addition, correlative approaches that combine fluorescence microscopy with electron microscopy add molecular specificity to ultrastructural information. However, imaging dynamic biological processes involves trade-offs among measurement parameters, including spatial resolution, quantitative precision, and multimodal capability, because live imaging requires short exposure times that limit signal levels. To address this limitation, this dissertation presents a cryogenic optical microscopy technique that enables rapid freezing of cellular dynamics at arbitrary time points during live imaging. Cryogenic imaging permits longer exposure times, allowing signal accumulation for detailed analyses, including super-resolution microscopy. Because cellular processes can be observed up to the moment of freezing, this approach preserves spatiotemporal information about the cellular state up to fixation. It therefore enables high-precision optical imaging while retaining temporal information on cellular dynamics. To achieve rapid freezing during live imaging, a custom cryo-chamber was developed. This chamber permits liquid cryogen at -185°C (a mixture of isopentane and propane) to be poured directly onto the sample for rapid freezing. The cryogen remains in the chamber to maintain low temperatures, enabling subsequent optical imaging under cryogenic conditions. Using this system, rapid calcium dynamics in rat cardiomyocytes loaded with the calcium indicator Fluo-4 were frozen during live imaging at 100 frames/s, demonstrating millisecond-scale arrest of dynamic events. Freezing timing can be controlled using a custom-built cryogen injector triggered by external signals. In a demonstration, light-induced calcium dynamics were frozen 120 ms after stimulation with a timing precision of ± 10 ms. Importantly, the dissociation constant of Fluo-4 remained unchanged before and after freezing, indicating that the binding state between calcium ions and the probe was preserved by rapid freezing prior to thermal equilibration. Frozen cells were then imaged with extended exposure times, allowing super-resolution fluorescence imaging, quantitative analysis, and multimodal imaging. While super-resolution microscopy typically requires acquisition times of several seconds or longer, rapid freezing preserves cellular states within milliseconds, allowing super-resolution imaging of a millisecond snapshot of calcium dynamics. Longer exposures improved signal-to-noise ratio and enabled more precise calcium quantification using a ratiometric probe (Yellow Cameleon 3.60) or fluorescence lifetime imaging microscopy. In addition, rapid freezing preserved molecular distributions on millisecond timescales, allowing Raman and super-resolution fluorescence images to be acquired without temporal mismatch despite different acquisition times and the need to switch imaging modalities. Finally, time-deterministic cryo-optical microscopy was extended toward integration with electron microscopy to combine temporal information from live imaging with nanoscale structural information. For this purpose, the cryo-chamber was redesigned to maintain the sample temperature below -150°C during transfer to liquid nitrogen, thereby preventing crystalline ice formation. Scanning electron microscopy confirmed that cellular structures frozen on glass coverslips were well preserved, demonstrating the feasibility of integrating live-cell optical microscopy with electron microscopy.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (辻 康 介)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	吉川 洋史
	副 査	教授	関谷 毅
	副 査	教授	橋本 守 (北海道大学 大学院情報科学研究院)

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、光学顕微鏡観察下で生細胞を任意のタイミングで急速凍結し、細胞構造や分子の空間分布を固定する技術を提案するものである。さらに、低温環境において凍結試料の高精度な光学イメージングを実証している。その成果は以下のとおりである。

生細胞を観察しながら液体寒剤（イソペンタン・プロパン）を試料に直接接触させ、急速凍結を可能とする試料チャンバーを開発している。心筋細胞内を伝播するカルシウムダイナミクスを蛍光顕微鏡観察下で急速凍結し、その空間分布をミリ秒スケールで固定することを実現している。細胞への光刺激によるカルシウムダイナミクスの誘導と急速凍結のタイミングを制御する装置を開発し、 ± 10 ms の時間精度で凍結のタイミングを決定することを実現している。カルシウム指示薬の解離定数が凍結前後でほとんど変化しないことを確認し、凍結によって指示薬とイオンの結合状態が保持されることを見出している。さらに、凍結細胞をクライオ電子顕微鏡で観察し、氷結晶形成による細胞構造の損傷がほとんどないことを確認している。

顕微観察下で凍結固定した細胞を構造化照明顕微鏡（SIM）で観察し、従来法では撮像が困難であるカルシウムダイナミクスのスナップショットの三次元超解像観察に成功している。FRET プローブを用いた細胞内カルシウムイオン濃度の定量計測においては、凍結環境下で露光時間を長くして信号対雑音比を高めることで、定量精度を向上させることに成功している。蛍光寿命イメージング顕微鏡（FLIM）を用いたカルシウムイオン濃度の定量計測では、検出体積内のカルシウムイオンおよびプローブ分子数のゆらぎ、ならびにフォトンショットノイズを考慮したモデルを構築し、濃度定量における検出限界を計算している。実際に、凍結環境下で FLIM を用いたカルシウム濃度定量を実施し、検出限界に近い定量精度を実現している。さらに、凍結細胞をラマン顕微鏡と SIM で観察し、モダリティの切り替えや試料の動きに起因する時間的不一致なしに、マルチモーダル観察を実施することに成功している。

光学顕微鏡下で凍結した細胞を電子顕微鏡で観察するためのワークフローを開発している。ガラス基板上で凍結した細胞に対して凍結置換、樹脂包埋、薄切のプロセスを実施したのち、走査型電子顕微鏡で観察し、細胞構造が良好に保存されることを確認している。加えて、試料チャンバー内での細胞凍結後に試料を取り出せる機構を作製している。細胞凍結後に、試料温度を氷晶形成の閾値である -150 °C 以下に 8 分間保持でき、試料を取り出すのに十分な時間、低温が保持されることを確認している。

以上のように、本学位論文は、光学顕微鏡下で生細胞を急速凍結することによって、細胞内ダイナミクスを固定する時間を決定し、そのスナップショットを高精度に観察することに成功している。これらの成果は応用物理学、特にナノフォトニクスに寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものとして認める。