



Title	Cryo-Raman Microscopy for High-Sensitivity Chemical Imaging of Biological Samples
Author(s)	水島, 健太
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105433
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 (水島健太)	
論文題名	Cryo-Raman Microscopy for High-Sensitivity Chemical Imaging of Biological Samples (生体試料の高感度化学イメージングのためのクライオラマン顕微鏡の開発)
論文内容の要旨 Raman imaging enables label-free visualization of intracellular molecular distributions based on molecular vibrational modes that reflect chemical structures and local chemical environments. Despite these advantages, Raman microscopy suffers from low sensitivity and limited applicability to rapid biological dynamics due to the inherently small Raman scattering cross-section, which limits signal-to-noise ratio (SNR). Although increasing illumination intensity or acquisition time can improve SNR, such approaches often induce photodamage and motion artifacts. In this dissertation, I developed several Raman microscopy techniques to achieve high-SNR imaging of weak Raman signals by controlling the physical properties of samples to enhance signal accumulation and suppress background signals. Cryofixation was introduced to stabilize sample morphology and chemical states, enabling long-duration Raman observation with reduced photodamage. Cryofixation combined with fluorescence imaging provided temporal information on biological dynamics prior to the cryofixation. Background signals were further reduced by exploiting the low-temperature thermo-optic properties of the sample, and signal attenuation in thick samples was addressed by improving optical transparency using absorbing media. First, I developed a cryo-Raman microscopy system that enables rapid freezing and long-duration low-temperature observation, allowing the accumulation of a large number of photons and thereby achieving high SNR Raman measurement. This system preserves intracellular molecular distributions and chemical states, reduces photodamage, and enables large field-of-view, high-resolution Raman imaging. A six-fold improvement in SNR was achieved by extending the acquisition time sixteen-fold without notable photodamage. Cryofixation also immobilized mobile small molecules and preserved cytochrome redox states, enabling high-SNR multiplex Raman tag imaging. Furthermore, the applicability of cryo-Raman microscopy was demonstrated through imaging of rat heart tissue while preserving cytochrome redox state. Second, time-deterministic cryo-Raman imaging was realized by combining cryofixation with fluorescence imaging to identify the cryofixed phase of biochemical dynamics. Using this approach, molecular distributions at a specific phase of cardiac beating were successfully visualized with high SNR and without motion artifacts by cryo-Raman imaging. Third, cryo-Raman microscopy was combined with stimulated Raman photothermal (SRP) microscopy to further enhance sensitivity. Low-temperature SRP imaging reduced background signals originating from the linear light absorption of water and achieved a ten-fold improvement in the SNR in imaging PMMA beads in water by exploiting the increased thermal conductivity of water at low temperature. Finally, an optical transparency technique using a tartrazine solution was applied to Raman spectroscopy to improve detection depth in highly scattering biological tissues. Refractive index matching enhanced Raman signal intensity and extended observable tissue depth from 3 mm to 5 mm, demonstrating applicability of this approach to thick and strongly scattering biological samples.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (水 島 健 太)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	井上 康志
	副 査	教授	小野 寛太
	副 査	教授	加納 英明 (慶應義塾大学理工学部)

論文審査の結果の要旨

本論文は、生体試料の物理的特性を操作することで、試料内分子の検出効率を向上させるラマン顕微鏡法を提案し、低濃度分子のラマン観察の高感度化に関する研究成果をまとめたものである。その成果は以下の通りである。

生体試料を急速凍結固定した後、その状態を保持したまま長時間観察可能なクライオチャンバーを備えたクライオラマン散乱顕微鏡を開発している。開発した顕微鏡を用いることで、低温環境下において試料損傷を抑制しつつ、長時間にわたり安定したラマン観察が可能であることを示し、生体試料のラマン観察における信号対雑音比 (SNR) の向上に成功している。ヒトがん細胞の観察においては、常温観察と比較して約 16 倍の観察時間を試料損傷なく実現するとともに、約 6 倍の SNR 向上を達成している。

急速凍結とクライオラマン観察を組み合わせることにより、細胞内シトクロームの酸化還元状態や小分子の空間分布が、凍結前の状態に近い形で固定されることを確認している。さらに、脂質分子状態の温度依存性を確認し、検出された脂質分子が脂質膜に由来する可能性を示唆している。

低温条件下でのラマン散乱観察において、共鳴ラマン散乱に伴う褪色効果が大きく低減されることを確認している。特に細胞内では、シトクロームおよびカロテノイドに対する光吸収に起因する光損傷が軽減され、シトクローム由来の信号強度が約 3 倍に増加するとともに、常温では検出が困難であったカロテノイドが低温条件下では観察可能となるなど、細胞内分子の検出能が大きく向上することを示している。

蛍光観察下で急速凍結固定を行うことにより、細胞活動の特定の瞬間をラマン観察可能とするクライオラマン顕微鏡法を開発している。本手法では、生体試料の蛍光観察を行いながら急速凍結固定を実施することで、細胞活動の時相を指定して凍結固定し、その状態を保持したままクライオラマン観察を行うことができる。この手法により、従来のラマン顕微鏡法の時間分解能では観察が困難であった高速な細胞活動の瞬間における化学状態のラマン観察に成功している。特に心筋細胞の拍動観察に本手法を適用し、拍動の収縮期を指定した状態で、細胞内ヘムタンパク質の酸化還元状態を保持したまま高感度なラマン観察が可能であることを示している。

試料を低温状態とすることで、生体試料内部および試料周囲の水に起因する光熱背景信号を低減し、高感度なラマン観察を可能とするクライオ誘導ラマンフォトサーマル顕微鏡 (SRP) を開発している。SRP による生体観察において、水の線形光吸収に由来する背景信号の発生を確認するとともに、低温下における熱伝導率などの物理特性を利用してこの背景信号を低減できることを示している。その結果、信号対背景比を約 10 倍向上可能であることを実験的に確認している。

以上のように、本学位論文は、急速凍結固定および低温観察を活用した新たなラマン顕微鏡法を提案し、生体試料に対する高感度な化学イメージングを実現したものである。これらの成果は、応用物理学、特にナノフォトニクス分野の発展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十分な価値を有するものと認める。