



Title	Two-photon multifocus microscopy for real-time cell imaging
Author(s)	藤田, 克昌
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169386">https://doi.org/10.11501/3169386</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	藤田克昌
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 15423 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用物理学専攻
学位論文名	Two-photon multifocus microscopy for real-time cell imaging (多焦点励起2光子顕微鏡の試作とその実時間細胞動態観察への応用に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 河田 聡
	(副査) 教授 増原 宏    教授 笠井 秀明    教授 岩崎 裕 助教授 中村 収    助教授 木村 吉秀

#### 論文内容の要旨

本論文は、多焦点励起2光子顕微鏡の提案、設計、試作、およびその生体細胞内動態の実時間観察とくに心筋細胞内カルシウムイオン濃度の波動現象の観察への応用に関してまとめたものであり、序論、本論4章、および総括から構成されている。

序論では、本研究の背景、目的、意義、および論文の概略について述べている。

第1章では、多焦点で同時に2光子励起を行う高速走査法を提案し、その原理と光学特性について述べている。また、共焦点化による空間分解能および像コントラストについて考察している。

第2章では、マイクロレンズアレイを用いることによって多焦点を同時に試料内に形成することのできる2光子顕微鏡の試作、およびその実験的な特性評価について述べている。毎秒360枚の蛍光画像を実時間で取得できることを示している。また、光学系の共焦点化にピンホールアレイを用いることにより、空間分解能および像コントラストの向上を実現している。

第3章では、ラット培養心筋細胞および摘出心臓内における心筋細胞内のカルシウムイオン濃度の波動現象を、試作した顕微鏡を用いて実時間観察した結果を示している。実際の観察結果により、多焦点励起2光子顕微鏡の生物学的分野への実用性を示している。

第4章では、位相共役鏡を用いた4 $\pi$ 共焦点光学系を提案し、光学系の特性を示している。実際に装置を試作し、基礎的な実験を行い、116nmの奥行き空間分解能を実現できることを示している。また、同光学系における位相共役波を用いた収差補正に関して、理論的、実験的に検証を行っている。

総括では、本論文で得られた結果をまとめ、本論文の結論および今後の展望について述べている。

#### 論文審査の結果の要旨

近年の新しい分子設計技術、遺伝子操作技術の発展に伴い、生体機構を細胞レベルから解明するための顕微技術が重要となりつつある。本論文では、高い時間分解能と高い空間分解能を同時に備えた2光子蛍光顕微鏡の開発とその生体動態の観察への応用に関する研究を行っている。以下に主要な成果をまとめる。

- (1) 近赤外フェムト秒レーザーによる2光子励起を用いることにより、強散乱物体である生体組織の深部の観察が可能な蛍光顕微鏡の提案を行っている。高い時間分解能の蛍光観察を実現するために、蛍光の励起を複数の焦点で同時におこなう多焦点励起法を提案し、装置開発を行っている。また、フェムト秒レーザーを用いた場合の蛍光励起効率および蛍光強度の飽和現象を理論的・実験的に明らかにし、その実用性を検証している。
- (2) 多焦点で励起された2光子蛍光像をピンホールアレイを通して共焦点観察する手法を初めて提案・開発し、2光子蛍光顕微鏡と比べさらに2倍の空間分解能を得られることを示している。生体試料の観察結果において、蛍光像のコントラストの効果的な改善が見られている。この結果は、理論的には予測し難く、本論文により初めて実験的に明らかにされている。
- (3) 培養心筋細胞内におけるカルシウムイオン濃度の波動現象を、多焦点励起型2光子共焦点顕微鏡を用いることにより実時間観察している。また、摘出心内の心筋細胞においても、カルシウムイオン濃度の波動現象を2光子励起法により観察している。本実験により、多焦点2光子蛍光顕微鏡の医学・生物学分野における重要性を示している。
- (4)  $4\pi$ 共焦点光学系を多焦点2光子顕微鏡に導入することにより、回折限界を越えた100nmオーダーの空間分解能を得ている。また、位相共役波を用いた $4\pi$ 共焦点光学系における収差補正法を初めて提案し、実験的・理論的な検証によりその効果を示している。

以上のように、本論文では、2光子励起を使用した蛍光顕微鏡において高い時間分解能および高い空間分解能を実現するための理論の構築と新しい光学系の提案が行われており、また、実際に提案する顕微鏡を開発することで、その有用性が示されており、応用物理学、特に光学および計測工学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認める。