

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Analysis of light propagation through a scattering medium for two-photon fluorescence microscopy  |
| Author(s)    | Daria, Vincent Ricardo  |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/42884">https://hdl.handle.net/11094/42884</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | だりあ、うゐんせんとりかると<br>Daria, Vincent Ricardo   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(工学)   |
| 学位記番号      | 第 15673 号  |
| 学位授与年月日    | 平成12年7月31日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学位論文名      | Analysis of light propagation through a scattering medium for two-photon fluorescence microscopy<br>(2光子蛍光顕微鏡における散乱媒体中の光伝搬の解析) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 河田 聡  |
|            | (副査)<br>教授 増原 宏    教授 伊東 一良    教授 笠井 秀明<br>教授 高井 義造  |

### 論文内容の要旨

本論文は、生体内部を3次元的に観察する2光子蛍光顕微法において、励起光の散乱による画像劣化についてモンテカルロ法を基にした数値解析及び検証実験を行った研究成果についてまとめたものであり、本論5章から構成されている。

第1章では、本研究の背景、目的、意義、論文の概略、および現在までに提案されている生体内部の観察法についての総論を述べている。

第2章では、光の位相を考慮した新しいモンテカルロ法を提案し、2光子蛍光顕微鏡の画像特性の解析を行っている。新しいモンテカルロ法では、生体内部において収束されたパルスレーザー光が作る光強度分布を時間コヒーレンスの効果を含めて解析することが可能である。解析の結果、焦点中心の光強度が、観察深度の増加に伴い指数関数的に減衰することを求め、それに応じて変化する蛍光励起効率および蛍光検出効率を求めている。

第3章では、2光子蛍光顕微鏡を試作することにより、生体内部における観察限界深度を求めている。試料として水中に分散したポリスチレン・ラテックス球(0.164 $\mu\text{m}$ 径)を用いて蛍光信号の減衰を測定した結果、第2章の解析結果と一致した実験結果を得ている。用いた試料の光学特性はマウスの胎児に相当する。解析結果に基づいて入射光強度を補正することで、約1000 $\mu\text{m}$ の深さまで蛍光観察が可能であることを示している。蛍光色素であるDAPIで染色したマウスの胎児を用い、約300 $\mu\text{m}$ 深さの観察に成功している。

第4章では、2光子吸収による蛍光の励起効率の評価を理論的・実験的に行っている。多重散乱によって蛍光信号が微弱になることから、ゼロ・クロッシング法と統計共鳴法を用いた微弱光検出法が有効であることを示している。また、第2章で提案したモンテカルロ法の、 $4\pi$ 光学系、レーザートラッピング光学系への応用について考察することにより、本研究の今後の展望について議論している。

第5章では、本論文で得られた結果をまとめ、本論文の結論としている。

### 論文審査の結果の要旨

生体組織深部を無侵襲に計測する技術は、近年、医学、特にマウスの胎児など未分化組織の組織形成過程を研究す

る発生物学において重要性が増している。従来の外科的切断など侵襲的に生体試料内部の3次元断層像を観察する手法では、試料の状態変化などに起因する情報の損失が非常に大きい。2光子励起蛍光顕微鏡は本質的に3次元結像特性を持つため、散乱体内部の可視化が可能である。しかしながら、散乱体内部では2光子励起による蛍光は試料深さに依存して減衰するので、観察される3次元断層像の特性について研究する必要がある。本論文は2光子蛍光顕微鏡を利用した3次元計測の特性を評価するために、散乱体中での光の伝搬を解析する新しい手法を提案し、検討を行ったものである。主な成果を要約すると次の通りである。

- (1) 強散乱体中において収束されたパルス光の伝搬を解析するために、モンテカルロ法に光の位相を考慮した新しい光子伝搬モデルを提案している。本モデルは集光点での光強度分布および時間コヒーレンスに関して正確な結果を与えている。
- (2) 提案した数値解析の結果から、蛍光励起効率および蛍光検出効率が励起光強度に依存することを示している。さらに散乱体内では、焦点における励起光強度の減衰は集光レンズの開口数 (NA) に依存しており、低 NA レンズによる減衰は高 NA レンズに比較して緩やかであることを見いだしている。また、高 NA レンズを用いた場合、試料表面近傍に収束光の焦点が存在するときには強い蛍光強度を発生するが、焦点が試料深部に移動するにつれてその強度は急激に減衰するという知見を得ている。
- (3) 散乱体内部を観察した画像の特性を評価するために2光子蛍光顕微鏡を試作し、数値解析による結果と比較している。水中に分散させたポリスチレン・ラテックス球を散乱体試料として作製し、実験によって得られた蛍光信号の減衰とモンテカルロ法で数値解析した結果が一致することを示している。
- (4) 散乱体試料へ入射する光強度を補正することで、散乱体深部に位置する試料の蛍光観察が可能であることを数値解析で明らかにし、深さ100  $\mu\text{m}$  の蛍光試料の観察に実験的に成功している。
- (5) 超短パルスレーザー光は強散乱体中では多重散乱を受けてパルス幅が広がるため、試料深部で2光子励起された蛍光強度は微弱になることを示し、この微弱光を検出するためにゼロ・クロッシング法および統計共鳴法が有効であることを示している。

以上のように、本論文では、2光子蛍光顕微鏡による生体組織内深部の3次元観察のために、散乱体中で収束されたパルス光の伝搬を解析する有効な手法について提案し、理論的・実験的に検証している。本研究で得られた成果は、生体組織の無侵襲3次元計測における画像形成・評価に対して有効性を示しており、応用物理学、特に生体医用光学と計測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。