

Title	Analytical cellular imaging with nonlinear laser spectroscopy
Author(s)	小林, 実
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45855
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	小 林 実 ^{こばやしみのる}
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 19468 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 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	Analytical cellular imaging with nonlinear laser spectroscopy (非線形分光法による細胞の顕微分析イメージング)
論文審査委員	(主査) 教授 河田 聡 (副査) 教授 高井 義造 教授 萩行 正憲 基礎工学研究科助教授 橋本 守

論文内容の要旨

本研究は、細胞を染色することなく、細胞内における特定の分子、タンパク質の分布を直接観察する手法の開発を目的とした。この手法においては分子情報を、ラマン散乱および第二高調波発生 (SHG) によって検出した。コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) は非線形光学効果によるラマン散乱であり、分子振動を直接観察するため、細胞内におけるタンパク質、脂質などを検出できる。比較的高い二次の非線形感受率をもつコラーゲン、ミオシンなどの構造タンパク質は SHG によって検出できる。また、生きた細胞の変化を観察するために、マイクロレンズアレイを用いた高速なレーザー走査系を設計、試作した。CARS および SHG 顕微鏡の SN の向上のためのゲーティング法を提案し、実際に装置を作成した。

第一章では、レーザー走査顕微鏡において非線形分光法を用いることの利点、非線形分光法を用いて得られる像の特徴について述べた。2光子吸収、SHG、および CARS 顕微鏡について、特に生物学分野における応用に重点を置いて説明した。

第二章では、SHG-CARS 顕微鏡の開発、および試作した顕微鏡による、生きた細胞の観察について述べた。二台のモード同期チタンサファイアレーザーを同期して試料に照射すると、試料から SHG、和周波発生、CARS による光が同時に発生する。非染色のラット単離心筋細胞、HeLa 細胞からの SHG および CARS による像を示し、その結像特性について述べた。

第三章では、生きた細胞から得られたラマンスペクトルの解析について述べた。

第四章では、SHG 顕微鏡を用いた心筋細胞の細胞膜電位の測定について述べた。細胞膜電位の測定に必要なミリ秒の時間分解能を実現するために、複数の焦点を用いた試料の走査を提案した。試作した装置によって、心筋細胞の SHG 像を 33 fps のフレームレートで得られることを示した。

第五章では、SHG および CARS 顕微鏡において、背景光となる蛍光による影響を除去するために、信号光を時間分割検出する方法を提案し、実験によってその有効性を示した。実験ではゲート付きイメージンシファイアを用い、複数の焦点からの光を時間分割検出した。

第六章では、レーザー走査顕微鏡において、複数の焦点を同時に走査するためのマイクロレンズアレイスキャナの

設計法について述べた。

総括では、本論分で得られた結果をまとめて考察し、本論文の結論および今後の展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

光学顕微鏡を用いると細胞を大気中、水中で生きたまま観察できる。さらに蛍光色素によって染色すると、細胞における特定のタンパク質の分布が感度よく得られる。このため光学顕微鏡は細胞生物学、病理学などにおいて欠かすことのできないツールとなっている。本研究は非線形分光法を細胞の顕微観察に応用することで、細胞を染色することなく、細胞内における特定の分子、タンパク質の分布を直接観察する手法、および、細胞膜電位の高感度な測定法を実現している。以下に本論文の研究成果をまとめる。

本論文では、分子情報を、コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱 (CARS) および第二高調波発生 (SHG) によって検出することを提案している。2台のピコ秒モード同期チタンサファイアレーザーを光源に用い、CARS および SHG の両方を検出可能なレーザー走査顕微鏡を実現している。非染色のラット単離心筋細胞、HeLa 細胞を観察し、細胞内におけるタンパク質、脂質などは CARS によって検出可能であり、比較的高い二次の非線形感受率をもつコラーゲン、ミオシンなどの構造タンパク質は SHG によって検出可能であることを示している。

心筋細胞の細胞膜電位の変化を観察するために、1ミリ秒で試料を走査可能なレーザー走査顕微鏡を設計、試作している。この顕微鏡においては、ディスク上に形成したマイクロレンズアレイを用いて試料に複数の焦点を形成し、ディスクを回転することで焦点を同時に走査する。複数の焦点を用いることで、一焦点あたりの光強度を低く抑え、試料の損傷を防ぎつつ、高速な試料の観察が可能である。RH237 染色の心筋細胞の観察において 33 fps の実時間観察を実現している。

SHG および CARS 顕微鏡において、背景光となる蛍光による影響を除去するために、信号光を時間分割検出する方法を提案し、実験によってその有効性を示している。実験ではゲート付きイメージンテンシファイアを用い、複数の焦点からの光を時間分割検出している。結果、SHG と蛍光の検出比を 10^3 以上にできることを示し、また、検出器の暗電流が 99% 以上減少することを示している。

以上のように、本論文は非線形分光法を細胞観察に応用することにより、細胞内の分子の分布が直接観察可能であることを実証し、さらに、複数の焦点を用いて試料を走査することにより細胞の実時間観察を実現している。結果は応用物理学、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。