OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Saturable Fluorescence and Scattering for Super-Resolution Imaging
Author(s)	米丸, 泰央
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52211
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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　米　丸　泰　央　）	
論文題名	Saturable Fluorescence and Scattering for Super-Resolution Imaging (蛍光・光散乱の飽和を利用した超解像イメージング)

論文内容の要旨

Recent developments in fluorescence microscopy have overcome the limit of spatial resolution, which originates from the wave nature of light. These super resolution microscopy techniques are expected as a promising tool for analysis of molecular functions in biological systems. However, the current super-resolution techniques are available for observing only thin biological samples, such as cultured cells on a substrate, since aberration and background signals induced in a sample prevent using these schemes for realizing the resolution improvement. In addition, the target of these techniques is limited to fluorescent samples. Super resolution techniques that do not require fluorescence labeling are also desired in order to observe samples without interference by fluorescent probes.

In this research, I develop a super-resolution technique that improves the spatial resolution of confocal microscopy for the observation of thick biological samples. Saturated excitation (SAX) is utilized to induce a nonlinear relation between excitation and emission of fluorescent probes. Since the nonlinear response is confined in a region smaller than the illumination laser spot, extraction of the nonlinear fluorescence signals realizes the improvement of the spatial resolution and image contrast. To observe a whole 3D structure in a cell cluster, I have investigated the excitation condition for SAX microscopy to improve the signal-to-noise ratio (SNR) and suppress photobleaching effects. The optimal excitation conditions were derived for the observation of a fixed cell cluster stained with rhodamine 6G, and the distributions of actin-filaments in the cells were successfully visualized with sub-diffraction-limited resolution.

For further improvement of the spatial resolution in SAX microscopy, an image processing technique for extracting higher-order nonlinear fluorescence signals was developed. The technique extracts the nonlinear fluorescence signals from two or three fluorescence images obtained with different excitation intensities and allows the increase of SNR in detecting nonlinear signals by a factor of 32 compared to the original SAX microscopy technique. Using the developed technique, a spatial resolution of 130 nm, which is one fourth of the excitation wavelength, was confirmed in the observation of fluorescent beads and biological cells. The use of higher-order radially polarized (HRP) beam was also investigated to sharpen the excitation point-spread-function. The HRP beam consists of 6 concentric rings shaped intensity distributions produced by radial polarization with a phase shift of π in each concentric ring. This approach also achieved a two-fold improvement in the spatial resolution of SAX microscopy in the observations of fluorescent beads and biological cells.

Non-labeling super-resolution microscopy utilizing the nonlinear relation between excitations and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) was also developed. The calculation of CARS signals using the harmonic oscillator model confirmed the improvement of the spatial and spectral resolution simultaneously by extracting the nonlinear relations. By observing diamond structures with the developed technique, the improvement of spatial- and spectral-resolution was achieved by saturating CARS.

Super-resolution imaging with non-fluorescent probes was also performed by using saturable scattering from gold nanoparticles. I found that scattering from single gold nanoparticles with a diameter of 50-100 nm is saturable when strong laser light is irradiated. From the measurement with different excitation wavelengths, the excitation at 532 nm, which corresponds to the plasmon resonance of the particle, effectively induced the saturation of scattering from gold nanoparticles. By exploiting the nonlinear relation between excitation and scattering signal induced by the saturation, super-resolution imaging of single gold nanoparticles was demonstrated.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　米丸　泰央　）

	（職）	氏　名
論文審査担当者		
主 査	教授	河田　聡
副 査	教授	井上　康志
副 査	教授	民谷　栄一
副 査	教授	永井　健治（大阪大学産業科学研究所）

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、蛍光・光散乱の飽和を利用して、超解像イメージングを試みた研究をまとめたものである。その成果は以下の通りである。

- 飽和励起顕微鏡の三次元分解能を評価している。三次元構造を有する生体試料を作成し、40 μm の深さまで、試料内のアクチンを蛍光観察している。空間分解能を評価した結果、光の回折限界を超えた分解能で生体試料深部を観察できたことを確認している。
- 飽和励起顕微鏡の励起条件を、最も高い信号対雑音比を取得できる条件を理論的、及び実験的に決定している。蛍光応答を五準位系のエネルギーダイアグラムを用いて計算し、最適な励起条件を決定している。この最適な励起条件を用いた飽和励起顕微鏡によって、三次元構造を有する生体試料を、三次元超解像で観察している。
- 高次ラジアル偏光を用いて、飽和励起顕微鏡の空間分解能を向上することを確認している。高次ラジアル偏光と飽和励起を組み合わせた結果、従来の飽和励起顕微鏡よりも 1.3 倍の空間分解能の向上を理論的に確認している。また、本手法を用いて生体試料を蛍光観察した結果、理論計算と同程度の空間分解能を達成している。
- 飽和励起によって生じた非線形な応答を差分計測によって抽出し、従来の手法よりも 8 倍高い蛍光強度が得られることを確認している。差分計測を、異なる励起光強度で取得した二枚の蛍光画像から抽出し、空間分解能が向上することを理論的、及び実験的に確認している。差分計測を用いた飽和励起顕微鏡を用いて、生体試料の高い信号対雑音比で超解像観察することに成功している。
- 光散乱の飽和を用いて、非染色での超解像観察に成功している。コヒーレントアンチストークスラマン散乱（CARS）の飽和励起を用いて、超解像かつ非染色での試料観察に成功している。CARS の飽和励起を調和振動子モデルから理論的に計算し、空間分解能、及び波数分解能が向上することを見出している。本手法を用いてダイヤモンド粒子を観察し、空間分解能、及び波数分解能の向上を実験的に示している。また、金ナノ粒子を用いた散乱の飽和を見出し、空間分解能を向上させている。

以上のように、本論文は蛍光・光散乱の飽和を利用して、超解像イメージングを行っている。従来の光学顕微鏡と比較して、1.3-1.5 倍高い空間分解能で生体試料の観察に成功した。そのため、本学位論文は、応用物理学、特に生体医用工学において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。