OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Scanning structured-illumination microscopy with spectral and non-linear imaging techniques
Author(s)	渡辺, 梢
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/55935
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　渡辺　梢　）	
論文題名	Scanning structured-illumination microscopy with spectral and non-linear imaging techniques （走査型構造化照明を用いた分光および非線形イメージング法）

論文内容の要旨

Recent developments in fluorescence microscopy have enabled us to improve the spatial resolution in optical imaging beyond the diffraction barrier given by the wave nature of light. Controlling the emission capability of fluorescent probes labeling a sample by stimulated emission or photoactivation is the key to achieve a spatial resolution of a few tens of nanometers. Although this approach has a high potential to revolutionize biological imaging, it is not applicable to all types of optical microscopy. Label-free imaging techniques, such as Raman microscopy or harmonic generation microscopy, do not rely on fluorescence labeling to make the image contrast; hence, the above approach cannot be utilized for such microscopies. Even in fluorescence imaging, there are situations, such as in deep-tissue imaging, where precise control of the fluorescence emission capability is quite difficult. Therefore, the spatial resolution of such imaging techniques has been still limited to that of classical light microscopy. The realization of high-resolution chemical imaging and deep-tissue imaging is highly desired because of its expectedly strong scientific, medical, and industrial importance.

In this thesis, I present the development of new microscopy techniques that combine laser scanning microscopy with structured illumination microscopy (SIM) in order to realize high-resolution label-free imaging and deep-tissue imaging. SIM improves the spatial resolution by using spatially patterned illumination light to effectively increase the resolving power of the microscope without relying on the optical responses of fluorescent probes. By introducing structured illumination in laser scanning microscopy, it is possible to implement high-resolution spectroscopical and non-linear excitation techniques to expand the availability of high-resolution microscopy. I applied this concept to Raman microscopy in order to improve the spatial resolution in label-free imaging. I also implemented structured illumination in two-photon excitation microscopy for high-resolution deep-tissue imaging.

For the realization of label-free high-resolution imaging, I developed structured line illumination Raman microscopy. Sample is illuminated with a structured line pattern, and the Raman scattering from each point is observed using a slit-spectrometer. The obtained spatial pattern is mathematically processed in Fourier space to extract the high spatial resolution information at every wavenumber in parallel. I applied the technique to the observation of different kinds of specimens: polymer nanoparticles, graphene, graphite, and mouse brain tissue. The experimental result showed that spatial resolution in the slit direction is twice higher than that of conventional slit-scanning Raman microscopy.

Two-photon excitation by NIR laser pulses was incorporated with the developed structured illumination microscope toward high-resolution deep-tissue imaging. The sample is illuminated with a structured spot rather than wide-field illumination. The spot diameter was 5-10 μm, which produces intense excitation light for two-photon excitation. An imaging theory treating the imaging characteristics of the structured spot illumination is presented. The improvement of spatial resolution in structured spot illumination is experimentally confirmed by the observation of fluorescence nanoparticles. This result indicates the possibility of high-resolution two-photon imaging of deep tissues of biological samples.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　渡辺　梢　）	
論文審査担当者	（職）　氏　名 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　招聘教授　岡田　康志　（生命機能研究科）

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、走査型構造化照明顕微鏡を用いた、高空間分解能の分光および非線形顕微イメージング法の開発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。

・構造化照明を走査して撮像するという顕微鏡法を開発し、試料の分光情報や、厚い試料の蛍光応答を、高分解能で観察する手法を提案している。構造化したライン照明およびスポット照明を用いた走査型顕微鏡の結像特性を、数値シミュレーションによって評価し、実際に顕微鏡システムを構築している。

・構造化したライン照明を用いることで、試料のラマン散乱スペクトルの分布を高い空間分解能で取得できること示している。実際に構造化ライン照明を用いたラマン顕微鏡を開発し、グラフェン、カーボンナノチューブ等のカーボン材料、生体組織、細胞等の生体試料の観察を行っている。これにより、提案する手法が多様な試料の微細構造の非染色・分析観察に応用できることを示している。

・構造化したスポット照明による非線形な蛍光応答を誘起する蛍光顕微鏡が提案されている。実際に２光子顕微鏡へ導入し、分厚い試料の観察に有利な顕微鏡を構築している。構築した顕微鏡を用いて蛍光試料を高空間分解能に観察することに成功している。この結果は、従来法で困難であった厚い蛍光試料の高分解能観察が提案する手法により可能であることを示唆している。

以上のように、本学位論文では、照明光の構造化と走査との組み合わせが超解像顕微法を発展させ、従来法では観察が困難であった試料の高分解能観察に利用できることを示している。提案する手法を実現する装置を実際に開発し、分光顕微鏡および非線形光学顕微鏡の高空間分解能化を行い、実際に様々な物質で構成される試料の観察に応用している。これらの結果は、応用物理学、特にナノフォトニクス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価値あるものと認める。