



Title	Multi-focus CARS microscopy for real-time molecular imaging and its applications to cell dynamics measurement
Author(s)	南川, 丈夫
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58262
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	南 川 文 夫
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 24208 号
学位授与年月日	平成 22 年 9 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科機能創成専攻
学位論文名	Multi-focus CARS microscopy for real-time molecular imaging and its applications to cell dynamics measurement (多焦点CARS顕微鏡によるリアルタイム分子イメージングと細胞ダイナミクス計測への応用)
論文審査委員	(主査) 教授 荒木 勉 (副査) 教授 三宅 淳 教授 宮坂 博

論文内容の要旨

本博士論文では、生きた細胞をリアルタイムイメージングできるCARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) 顕微鏡システムの開発を行った。リアルタイムCARSイメージングを行うために、まずその要素技術としてジッター抑制システムおよび多焦点励起CARS顕微鏡の開発を行った。ジッター (2パルス間の時間ゆらぎ) はCARS顕微鏡において主要なノイズ源となるため、ジッター抑制はリアルタイムCARSイメージングを実現するうえで重要な技術となる。ジッター抑制システムは、2光子検出器を用いたバランス相互相関器を用いて構築した。開発したシステムによって、市販のシステムでは約1 ps あったジッターを約8 fsにまで低減することに成功した。また、リアルタイムCARSイメージングには、高速なレーザービーム走査法が求められる。そこで、マイクロレンズアレイを用いた多焦点CARS顕微鏡システムを開発した。マイクロレンズアレイによって複数の焦点を試料上に形成し、それぞれの焦点から発生したCARS光をイメージセンサーによって並列計測することで、高速CARSイメージングが実現可能である。開発したCARS顕微鏡システムによって、ポリスチレンビーズを33 ms/image、リポソームおよびHeLa細胞を100 ms/imageでイメージングすることに成功した。さらに、開発したCARS顕微鏡システムを用いて、レーザーによるHeLa細胞の細胞膜破壊およびその修復過程のリアルタイム脂質分布イメージング (測定ラマンシフト2840 cm^{-1}) を行った。レーザーにより細胞膜を破壊することで、破壊部近傍の信号光強度が減少したが、このCARS信号減少部はただちに回復し、破壊前よりも強いCARS光強度を呈した。この強いCARS信号光強度は、細胞質中の小胞による細胞膜修復によって脂質分子が膜破壊部に集まったためと考えられる。細胞膜破壊前後の3次元脂質分子分布を確認するために、3次元CARSイメージを取得した。また、細胞膜破壊部におけるCARS光強度の時間的发展を計測することで、膜修復における小胞の融合ダイナミクスの計測を行った。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生きた細胞をリアルタイム分子イメージング可能な多焦点coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)顕微鏡システムの開発に関する研究、ならびに開発した多焦点CARS顕微鏡によって計測した細胞膜修復過程における脂質ダイナミクスに関する研究をまとめたものである。

主な研究成果は以下のとおりである。

- (1) 2光子検出器を用いたバランス相互相関器を開発し、市販のシステムでは約1 psあった2パルス間の時間ゆらぎ（ジッター）を、約8 fsまで低減することに成功している。このジッターは、CARS顕微鏡における主要ノイズ源であるため、その抑制によって高SN比CARSイメージングが実現可能であることを示している。
- (2) 多焦点光学系を用いたCARS顕微鏡の開発を行い、ポリスチレンビーズを33 ms/image、リボソームおよび生きたHeLa細胞を100 ms/imageで分子選択的なイメージングに成功している。また、2光子検出器を用いたパルス幅制御システムを開発し、波長走査、パルス幅最適化、ジッター制御の一連を300 ms以内に完了することを示している。
- (3) 開発したCARS顕微鏡およびレーザーアブレーション技術を組み合わせることで、細胞膜の破壊および修復過程における脂質のダイナミクスの計測を行っている。その時のCARS光強度から、細胞膜破壊時に細胞質内の小胞が膜破壊部に集まり、膜を修復していることを示唆する結果を得ている。また、膜破壊部のCARS光強度の時間挙動から、各小胞の融合過程に関する知見が得られることを示している。

このように、独自に開発したCARS顕微鏡によって、従来法では実現不可能であった生きた細胞の無染色高速イメージングを可能としている。本法は細胞生理を損なうことなく細胞・組織のあるがままの挙動を捉えることができる非侵襲計測法であり、生物学および医学へ大きく貢献するものと期待される。

以上、本研究で得られた成果の工学的意義は大きく、また学術的にも高いレベルの内容を有しているため、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。