

Title	Styryl Dyes for Nonlinear Optical Bio-imaging
Author(s)	鄭, 美玲
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58401">https://hdl.handle.net/11094/58401</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

【20】

氏 名	鄭 美 玲
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 1 9 1 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 工学研究科精密科学・応用物理学専攻
学 位 論 文 名	Styryl Dyes for Nonlinear Optical Bio-imaging (スチリル色素を用いた非線形光学生体イメージング)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 河 田 聡 (副査) 教 授 民 谷 栄 一 教 授 笠 井 秀 明 准 教 授 藤 田 克 昌 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科教授 河合 壯

## 論文内容の要旨

Nonlinear microscopy, including two-photon excited fluorescence (TPEF) and second harmonic generation (SHG) microscopy, has gained overwhelming popularity in biology. With the development of the nonlinear microscopy, the probes that possess optimized nonlinear optical (NLO) response and high affinity for biological targets are required. The selective staining to biological targets would promote the development of the NLO imaging. In this work, the selective staining dynamics of a series of carbazole-based styryl dyes in living human cervical epithelial carcinoma (HeLa) cells were studied by the time-lapse technique for the first time. The molecules with different structures exhibited high staining selectivity. The dyes with long hydrophobic chains stained the mitochondria while those with short carbon chains stained DNA in the nucleus. These probes showed high affinity and significantly enhanced fluorescence when incorporated in the cellular targets. The large two-photon absorption cross section and low toxicity provided the potential for nonlinear bio-imaging. Based on the understanding of these novel molecular behavior, the *trans*-4-[4-(dimethylamino)-N-methylstilbazolium] *p*-tosylate (DAST) nanocrystals (NCs) were also studied as NLO probes. A stable, size-controlled DAST NCs were synthesized and further investigated by the developed nonlinear microscopy. The NCs showed strong polarization dependence in the SHG emission. Optimized NLO probes open new paths for developing the imaging technique and a better understanding of the relationship between the molecular function and the subcellular targets, which will give us the ability to build functional materials for bio-imaging techniques.

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、非線形光学生体イメージングを目的とした二光子蛍光(TPEF)顕微鏡と第二高調波(SHG)顕微鏡の設計および試作、スチリル蛍光プローブの開発と評価、およびそれらを利用した生体観察応用の一連の研究成果をまとめたもので、その主な成果を要約すると次の通りである。

(1) 本論文では、カルバゾールをベースとする一連のスチリル色素を開発している。この色素は分子構造内に異なる長さの疎水基と陰イオンを含んでおり、細胞構造に対して高い親和性をもち、生体観察用の蛍光プローブとして効果的に利用できることを示した。

(2) TPEFとSHG顕微鏡を含む非線形光学顕微鏡の設計、試作、および評価を行なった。TPEFおよびSHGを同時に取得し、生体の非線形光学観察が行なえることを示した。入射レーザーの偏光と検出する信号光の偏光とを独立的に制御し、試料の偏光特性を検出しながらイメージングできることを示した。

(3) カルバゾールをベースとしたスチリル色素を用いて、生きた細胞内の構造を選択的に染色し、観察できることを示した。蛍光顕微鏡によりスチリル色素で染色した細胞を経時的に観察し、DNAやミトコンドリアが染色される際の、色素の空間分布の経時変化を記録した。この結果から、カルバゾールをベースとしたスチリル色素分子と生体細胞構造が結合すると、分子内の電荷移動の作用により蛍光発光が強くなることが実証された。また、カルバゾールの疎水基部分の鎖の長さが増えると分子内の局在電荷が異なり、色素分子ごとに異なる染色選択性を示すことが結論付けられた。また、開発した色素により染色された細胞をTPEF顕微鏡により観察した結果、細胞核、ミトコンドリア等の細胞内構造を高いコントラストで3次元観察することに成功した。

(4) 高効率な非線形光学材料の開発を目的とし、非線形ナノ結晶の作製を行なった。デンドリマーを用いてDASTナ

ノ結晶の粒径を制御する手法を開発し、DASTナノ結晶の直径を30〜200ナノメートルの範囲内でコントロールできることを実証した。また、DASTナノ結晶は、DAST溶液に比べてより強いアップコンバージョン蛍光と非線形性を示した。これらの結果から、DASTナノ結晶が非線形光学材料として有効に活用できることが示唆された。

(5) DASTナノ結晶の非線形光学特性の測定のため、DASTナノ結晶のTPEFとSHG観察を行った。TPEF観察結果より、DASTナノ結晶の粒径はほぼ同一であることが示された。また、SHG顕微鏡により、レーザー光および検出光の偏光を変化させながらDASTナノ結晶を観測した結果、DASTナノ結晶からのSHG光の偏光特性は四葉型の分極図で示され、DASTナノ結晶は多極性単結晶であることが結論付けられた。

以上のように、本論文は新規な生体プローブの作製とその評価、及び生体試料の非線形光学観察への新しい応用を提案・実証したもので、応用物理学、特にナノフォトニクス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。