



Title	Nonlinear Optical Microscopy with Focal-Spot Engineering
Author(s)	桶谷, 亮介
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61708
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、 〈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

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (桶 谷 亮 介)	
論文題名	Nonlinear Optical Microscopy with Focal-Spot Engineering (非線形光学顕微鏡法における集光スポットエンジニアリング)
論文内容の要旨	
<p>Fluorescence microscopy has been utilized for imaging biological samples. However, the spatial resolution is limited by the light diffraction. Recently, several techniques, such as stimulated emission depletion, two-photon excitation, and saturated excitation (SAX), have been proposed for overcoming this limit, that is called as super-resolution fluorescence microscopy. In this dissertation, I discussed the development of another method to exceed the spatial resolution.</p> <p>In laser-scanning microscopy, a focal spot is used for illumination. The full width at half maximum (FWHM) of the focal spot determines the spatial resolution. The focal spot can be engineered by annular mask for narrowing the FWHM in lateral. In detector plane, signal light from an object is focused. A confocal pinhole can engineer the focal spot for improving resolution in 3 dimensionally. I applied these kinds of engineering methods of focal spots to super-resolution fluorescence microscopy. The super-resolution technique mainly relies on the optical responses of fluorescent probes, while focal-spot engineering relies on the optical instruments. Therefore, the spatial resolution of the super-resolution techniques can be improved from the side of optical instruments by using focal-spot engineering.</p> <p>A pupil mask is used in two-photon excitation microscopy to improve the spatial resolution. The mask shape is ring disk, which is determined by two parameters: outer radius and inner radius, normalized by objective pupil radius. SAX of fluorescence is also used for the resolution improvement. The nonlinear fluorescence signal is extracted through subtraction of images with two different excitation intensities. In the calculation of the PSF, the spatial resolution was improved both in lateral and axial when the outer and inner radii are 6/8 and 3/8. The sidelobe by pupil mask was negligible by the 4th-order nonlinearity from the combination of SAX and two-photon excitation. In observation of fluorescent beads, the resolution improvement of $\times 1.3$ was achieved with the mask and SAX, comparing to the image obtained by conventional two-photon. The proposed technique was applied to the observation of biological samples.</p> <p>The focal spot was segmented into 9×9 pixels in detection by a CCD in two-photon excitation microscopy. Laser scanning on a point object results in 81 images acquired from the pixels. The images have offsets because each pixel has offset from the center of the focal spot. The FWHM only in the offset direction was narrowed. With reassigning the offsets, the cumulative image is obtained to get narrow FWHM in all directions. I calculated the PSF of the method. The resolution improvement by segmented detection was almost same as that by confocal detection. However, the area of the detection is larger than the confocal pinhole. The signal amount obtained by the segmented detection is more than that by confocal detection, that leads the improvement of signal-to-noise ratio (SNR). SNR improvement of $\times 1.3$ was achieved in the imaging of fluorescent beads.</p> <p>The nonlinear scattering from a gold nanoparticle (GNPs) was observed by confocal laser-scanning microscopy. Using a wavelength at the surface plasmon resonance, a single GNP showed strong scattering. Saturation of scattering was observed with the excitation intensity of $10^5 \sim 10^6 \text{ W/cm}^2$. The excitation intensity was temporally modulated in confocal microscopy for super-resolution imaging. Nonlinearity of scattering intensity due to the saturation at the peak of excitation intensity in temporal modulation at the center of focus in space results in the resolution improvement. The FWHM of 1/8 of excitation wavelength was obtained. Reverse saturation of scattering was also observed with the excitation intensity above 10^6 W/cm^2. The 2nd-order nonlinearity of the reverse saturation showed the FWHM of 1/4 of excitation wavelength without using temporal modulation.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (桶 谷 亮 介)			
	(職)	氏	名
論文審査担当者	主 査	教 授	河 田 聡
	副 査	教 授	民 谷 栄一
	副 査	教 授	井 上 康志
	副 査	准主任研究員	田 中 拓男 (理化学研究所)
		兼 連携教授	(兼 埼玉大学大学院理工学研究科)
		兼 特任教授	(兼 東京工業大学物質理工学院)
	副 査	准教授	藤 田 克昌

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、レーザー走査顕微鏡において、試料の非線形応答、および、光学系における集光スポットエンジニアリングを利用し、空間分解能の向上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。

- ・蛍光の飽和によって生じた非線形応答を利用して、2光子励起顕微鏡の空間分解能が向上できることを示している。励起強度の異なる2つの観察像の差分から非線形信号のみを取り出し、空間分解能の向上を数値シミュレーションにより確認している。また、高空間周波数成分をリング形の瞳マスクによって強調し、実効的な空間分解能を3次元的に向上できることを確認している。実際に光学系を構築し、細胞試料および試料深部に埋め込まれた蛍光ビーズを、従来より1.3~1.4倍の空間分解能で観察することに成功している。

- ・2光子励起顕微鏡において、検出器面における信号光のスポットを分割検出することで、信号対雑音比を改善できることを示している。実際にCCDカメラを分割検出に使用したレーザー走査顕微鏡を開発し画像を取得した結果、従来の共焦点検出と同等の空間分解能を維持したまま信号対雑音比を1.3倍に改善している。この結果は、従来の共焦点検出では困難であった、信号量の弱い試料の観察に対して、高空間分解能での観察が可能であることを示している。

- ・散乱光の飽和を利用し、金ナノ粒子の超解像イメージングに成功している。散乱光の飽和が金ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴に起因することを見出し、レーザー走査顕微鏡の空間分解能向上に応用している。実際に顕微鏡を構築し、飽和による非線形成分を取り出すことで、空間分解能の向上を達成している。また、高い励起強度で見られる散乱光の再上昇(逆飽和)が非線形な応答を示すことを利用し空間分解能の向上を達成している。

以上のように、本学位論文は信号光の飽和や2光子励起といった試料の非線形応答、および試料面・検出器面における集光スポットエンジニアリングを用いることで、空間分解能の向上を達成している。これらの成果は応用物理学、特にナノフォトニクス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。