

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 戸田 圭亮 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（工学） |
| 学位記号番号 | 博理工甲第1090号 |
| 学位授与年月日 | 平成30年3月23日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題目 | 生体深部を観察可能な超解像リアルタイムイメージング技術に関する研究 |
| 論文審査委員 | 委員長 連携教授 緑川 克美 委員 教授 矢口 裕之 委員 連携教授 平山 秀樹 委員 連携教授 田原 太平 |

論文の内容の要旨

顕微鏡は、肉眼では見ることのできない細かな構造を可視化することにより、自然科学や工学の分野において様々な知見をもたらしてきた。特に、生体試料を対象とした観察において、顕微鏡の果たしてきた役割はあまりにも大きい。その中でも、蛍光顕微鏡は、試料の構造を単に拡大するのではなく、生体機能をも可視化することのできる顕微鏡として、現在の生体研究において非常に強力なツールとなっている。蛍光顕微鏡は、励起光の照射により試料中の蛍光分子を励起し、発生した蛍光を観察する顕微鏡であるが、生体内の特定機能を担う分子に対して蛍光タンパク質のような蛍光分子を紐付けすると、蛍光の観察からその特定の分子の局在や動態を知ることができるという特徴を持つ。また、回折限界を超えるような分解能を達成する超解像顕微鏡や、生体深部観察が可能な二光子蛍光顕微鏡といった新たな蛍光顕微鏡の開発も成され、生体研究はますます発展することとなった。

しかし、これらの顕微鏡には弱点もあった。例えば、超解像顕微鏡は観察可能な深さが浅く、一方で二光子励起蛍光顕微鏡は、空間分解能が高くない。また、レーザー走査型の顕微鏡は、走査速度の制限があるために視野を広げると時間分解能が低減してしまう。このようなトレードオフの関係が、空間分解能と観察可能な深さ、視野の広さ、時間分解能の間にあり、このために脳のような分厚い生体組織の活動をリアルタイムで観察することは困難であった。本研究では、このトレードオフの関係を打破するために、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡と、多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡とを組み合わせ、さらに三光子励起蛍光を用いることで空間分解能を向上させた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。

本研究の出発点となる顕微鏡である時空間集光顕微鏡は、他の多光子励起蛍光顕微鏡とは異なり、走査をせず広視野による照明を行う。走査を伴わないため、視野を広げても時間分解能を下げずにすむという利点を持つ顕微鏡である。しかし、発生した蛍光が試料中で散乱されて背景光となることや、走査型の多光子励起蛍光顕微鏡と比べて深さ方向の分解能が低い、つまり焦点面外において発生する蛍光が多いという欠点がある。本研究においては、二光子励起蛍光ではなく三光子励起蛍光を用いることによって深さ方向の分解能を向上させ、また、構造化照明の技術と組み合わせることによって発生した背景光を除去しながら空間分解能の向上も行なった。

三光子励起蛍光を発生させるためには、ピーク強度の高い励起光源が必要であった。そこでまず、Ybフ

ファイバーを利得媒質としたチャープパルス増幅器を作製し、中心波長 1060 nm、パルス幅 92 fs、パルスエネルギー 9 μ J、繰り返し周波数 200 kHz の出力を得た。次に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発を行なった。深さ方向の分解能は、二光子励起蛍光を用いた場合は 2.1 μ m であったのに対し、三光子励起蛍光を用いた場合は 1.6 μ m であり、二光子励起蛍光を用いた場合と比べて 1.3 倍向上した。また、焦点面外において発生する蛍光を 5.9 倍抑制することに成功した。また、二光子励起蛍光を用いることの可能な状況であれば、二光子励起と三光子励起により異なる蛍光色素を同時に励起した二色イメージングを行うことが可能であることが示された。最後に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡を構造化照明顕微鏡と組み合わせた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。構造化照明の効果により、発生した背景光は除去され、深さ方向の分解能は 860 nm、面内方向の分解能は深さ約 100 μ m において 106 nm に達した。つまり、深さ方向の分解能は励起光の波長 1060 nm を下回っており面内方向に至っては、1/10 の大きさに相当する分解能を達成したことになる。また、時空間集光顕微鏡、干渉時空間集光顕微鏡のどちらにおいても、生体試料を用いたイメージングに成功しており、この顕微鏡が生体観察に極めて有効であることを示すことができた。

本研究において開発した、三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡は、将来、脳組織の活動のような生体現象を観察する強力なツールとなりうる。例えば神経科学の分野において、この顕微鏡はシナプスの可塑性や樹状突起スパインの減少といった現象の観察に応用が可能であると考えられる。ニューロン同士のコミュニケーションを観察するためには視野を広げる必要があるが、視野面積の増加分だけ励起光の入射強度を増加させるだけで、時間分解能を下げることなく対応が可能である。試料に照射される全体としての平均強度が高くなることから熱による試料の損傷を招く可能性も考えられるが、励起光の繰り返し周波数を下げることによってこの問題は回避できる。

論文の審査結果の要旨

当学位審査論文審査委員会は、当該論文の発表会を平成30年2月23日に公開で開催し、詳細な質疑を行った。その発表を含む学位論文審査の結果を以下に記す。

近年、蛍光顕微鏡の親展により生体機能の可視化ができるようになったことから、例えば脳のような、高度な細胞間ネットワークによって構成された生体組織の観察に対する需要が高まった。しかし、そのような試料の観察は、蛍光顕微鏡にとっても、困難を極める課題であった。その理由は、空間分解能と観察可能な深さ、視野の広さ、時間分解能の間にあるトレードオフの関係である。例えば、極めて高い分解能を達成する超解像顕微鏡は、微弱な信号を用いているために、生体深部にゆくほど増大する背景光に、容易に埋もれてしまい、観察可能な深さが極めて浅い。一方で、深部観察の得意な二光子励起蛍光顕微鏡は、励起光の波長が長いために集光点の大きさが小さくならず、空間分解能は1 μm を切る程度となってしまう。また、レーザー走査型の顕微鏡の場合、視野を広げようとすると、走査する距離が伸びるため、必然的に時間分解能が悪化する。また、励起光の平均強度を上げた場合は、試料に熱などによる損傷を与える恐れがある。このような問題に阻まれ、脳のような生体組織の活動の観察は困難であった。

本研究においては、このトレードオフの関係を打破するため、広視野の超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡と、広視野照明の多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡とを組み合わせ、さらに三光子励起蛍光も用いることで空間分解能を向上させた、干渉時空間集光顕微鏡の開発を目的とした。このような顕微鏡の開発は、将来、脳組織の活動のような生体現象を観察する強力なツールとなりうる。例えば神経科学の分野において、この顕微鏡はシナプスの可塑性や樹状突起スパインの減少といった現象の観察に応用が可能であると考えられる。ニューロン同士のコミュニケーションを観察するためには視野を広げる必要があるが、視野面積の増加分だけ励起光の入射強度を増加させるだけで、時間分解能を下げることなく対応が可能である。試料に照射される全体としての平均強度が高くなることから熱による試料の損傷を招く可能性も考えられるが、励起光の繰り返し周波数を下げることによってこの問題は回避できる。

本論文の構成内容は以下のとおりである。

第1章は序章であり、本研究の背景および目的と意義が述べられており、その位置づけが明確にされている。

第2章は、本研究に関する理論及び実験方法について述べられている。本章の前半では、パルスレーザーの発振や分散などについて説明し、後半は、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡、多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡についての基本的な原理について説明している。

第3章では、蛍光顕微鏡の光源として作製したYbファイバー発振器とチャープパルス増幅器についてそれぞれ説明し、その出力光の分散補償とパルス幅の評価について報告している。

第4章は、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発に関する報告である。三光子励起蛍光を用いることによる深さ方向の分解能向上の原理について説明した後、装置の作製と実験結果およびノイズへの対処に関して述べている。

第5章は、三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の開発に関する報告である。三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の原理、開発と性能評価について説明した後、構造化照明を用いる本顕微鏡の原理に続いて装置の作製および実験結果とその考察について報告している。

第6章は緒言であり、本論文により得られた結果が総括されている。

以上、本研究では、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡と、多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡とを組み合わせ、さらに三光子励起蛍光を用いることで空間分解能を向上させた、干渉時空間集光顕微鏡を開発し、その性能評価を行なった。三光子励起蛍光を発生させるためには、Ybファイバーを利得媒質としたチャープパルス増幅器を作製し、中心波長 1060 nm、パルス幅 92 fs、パルスエネルギー 9 μ J、繰り返し周波数 200 kHz の出力パルスを得た。次に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発を行なった。深さ方向の分解能は、二光子励起蛍光を用いた場合は 2.1 μ m であったのに対し、三光子励起蛍光を用いた場合は 1.6 μ m であり、二光子励起蛍光を用いた場合と比べて 1.3 倍向上した。また、焦点面外において発生する蛍光を 5.9 倍抑制することに成功した。また、二光子励起蛍光を用いることの可能な状況であれば、二光子励起と三光子励起により異なる蛍光色素を同時に励起した二色イメージングを行うことが可能であることが示された。最後に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡を構造化照明顕微鏡と組み合わせた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。構造化照明の効果により、発生した背景光は除去され、深さ方向の分解能は 860 nm、面内方向の分解能は深さ 100 μ m において 106 nm に達した。つまり、深さ方向の分解能は励起光の波長 1060 nm を下回っており、面内方向に至っては、1/10 の大きさに相当する分解能を達成したことになる。また、時空間集光顕微鏡、干渉時空間集光顕微鏡のどちらにおいても、生体試料を用いたイメージングに成功しており、この顕微鏡が生体観察に極めて有効であることを示すことができた。本論文において開発した三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡は、脳組織の活動のような生体現象を観察を可能とする強力なツールであり、今後、生物・医学研究の分野の発展に大きく貢献するものと期待される。よって本委員会は、本論文が博士（工学）の学位論文に値するものと判断し、合格と認めた。