

生体組織中における二光子励起の
4次元時空間制御

2022年7月

石川 智啓

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 第 号	氏 名	石川 智啓
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p style="text-align: center;">生体組織中における二光子励起の 4 次元時空間制御</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>集光されたパルスの伝播とともにパルス幅が劇的に変化する時空間集光 (TF) 技術の発明によって、生命現象を解明するために有用な多光子励起技術が開発されてきた。広視野 TF 顕微鏡は、走査型多光子顕微鏡のように集光スポットを走査することなく断層像が得られる高速なイメージング技術であるため、多細胞間相互作用の観察へ応用されている。また、TF 技術をホログラフィック技術と組み合わせたパターン照明は、細胞の活動を光で操作するオプトジェネティクスに応用され、離れて存在する複数の細胞の活動を同時に操作することが可能となっている。しかし、TF 技術にはまだ、いくつかの問題がある。例えば、厚みのある試料内部において歪んだ TF パルスの補償が困難であること、走査型多光子顕微鏡より深さ方向の分解能が低いこと、パターン照明において隣り合うマルチスポット間で生じる干渉縞がスポットの均一性を劣化させることなどである。これらの問題を解決するために、本研究では、生体組織において、TF パルスの歪み補償を行うための時空間ロックイン検出技術、走査型多光子顕微鏡と同等の深さ方向の分解能が得られる時間多重化 (TM) マルチライン (ML) TF 技術、均一なパターン照明が可能なマルチフォーカス (MF) TM-TF 技術の開発に取り組んだ。</p> <p>第 1 章では、背景および研究目的について述べた。</p> <p>第 2 章では、本研究の基礎となる理論や技術として、非線形光学、超短パルスレーザー技術、イメージング技術について説明した。</p> <p>第 3 章では、広視野 TF 顕微鏡において広い視野で同時に多光子励起するために、本研究で構築した Yb ファイバーレーザーの構成および出力特性について述べた。平均出力 3.9 W、ピーク波長 1059 nm、繰り返し 710 kHz、パルス幅 110 fs を達成した。</p> <p>第 4 章では、広視野 TF 顕微鏡の補償光学技術として開発した時空間ロックイン検出技術について述べた。従来は、TF 顕微鏡において厚みのある試料を用いると、パルスの時間特性を最適化することは困難であったが、本検出技術により厚みのある試料でもパルスの時間特性の最適化ができることを実証した。</p> <p>第 5 章では、TM-TF 顕微鏡において、視野と深さ方向の分解能の両立を可能とするためマルチライン化を組み合わせた TM-ML-TF 顕微鏡について述べた。従来の TM-TF 顕微鏡で達成されている視野を 5 倍に拡大し、TF 顕微鏡に対して深さ方向の分解能を 2.5 倍向上することに成功した。</p> <p>第 6 章では、均一なパターン照明が可能な技術として開発した MF-TM-TF 技術について述べた。マルチスポットを近接して配置しても、フリッジ・スペックルフリーを実現できるパターン照明技術を確立した。開発した技術を TM-TF 顕微鏡の視野拡大にも応用し、視野を 12 倍にまで拡大することに成功した。</p> <p>第 7 章では、本博士論文で開発してきた技術に関する知見をまとめ、開発した技術の生物学・医科学応用への展望について述べた。</p>			

Thesis Abstract

No. _____

Registration Number	<input checked="" type="checkbox"/> “KOU” <input type="checkbox"/> “OTSU” No. _____ <small>*Office use only</small>	Name	ISHIKAWA, Tomohiro
Thesis Title: <p style="text-align: center;">Four-dimensional spatio-temporal control of two-photon excitation in biological tissues</p>			
Thesis Summary <p>The invention of the temporal focusing (TF) technique, which provides cross-sectioned multi-photon excitation, has led to the development of a variety of tools to investigate biological phenomena, including scanless depth-resolved wide-field microscopy and patterned illumination for optogenetics. However, the TF technique still has some problems. For example, it is difficult to compensate a distorted TF pulse in biological tissues, the axial resolution of wide-field TF microscopy is worse than that of point-scanning multi-photon excitation microscopy, and the uniformity of pattern illumination is degraded by interference between the neighboring spots. In this thesis, three techniques are developed to solve these problems. The first one is the spatio-temporal lock-in detection technique for adaptive optics in wide-field TF microscopy. The second one is time-multiplexed (TM) TF microscopy combined with multi-line (ML) focusing to simultaneously achieve a wide field-of-view (FOV) and high axial resolution. The third one is uniform pattern illumination by combining multifocal (MF) TF with TM-TF.</p> <p>Chapter 1 describes the background and the objective of this thesis.</p> <p>Chapter 2 describes theories and techniques related to this thesis.</p> <p>Chapter 3 describes the configuration and the performance of the Yb-doped fiber laser for wide-field TF microscopy generating a multi-photon excitation in a wide area. The laser produced 3.9 W, 1059 nm, 110 fs pulses at a repetition rate of 710 kHz.</p> <p>Chapter 4 describes spatio-temporal lock-in detection for adaptive optics of wide-field TF microscopy. Although a conventional technique is possible to optimize the temporal profile only in a thin sample, the proposed technique achieved the optimization in a thick sample.</p> <p>Chapter 5 describes TM-ML-TF microscopy, in which the FOV was expanded by a factor of 5 compared with that of TM-TF microscopy and the optical sectioning capability was enhanced by a factor of 2.5 compared with that of TF microscopy.</p> <p>Chapter 6 describes the MF-TM-TF technique to achieve uniform patterned illumination. The technique enables us to demonstrate fringe- and speckle-free patterned illumination even though the MF spots are close to each other. In addition, by applying the technique to expansion of the FOV of TM-TF microscopy, the FOV became 12-times more than that of TM-TF microscopy.</p> <p>Chapter 7 summarizes the findings obtained in this thesis and describes the outlook of the application of the developed techniques to biological and medical research.</p>			