



Title	2光子顕微鏡法を用いた補償光学による生体組織深部の可視化解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山口, 和志
Citation	北海道大学. 博士(情報科学) 甲第14592号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/81412">http://hdl.handle.net/2115/81412</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kazushi_Yamaguchi_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (情報科学) 氏名 山口 和志

審査担当者 主査教授 雲林院 宏  
副査教授 平田 拓  
副査教授 館野 高

### 学位論文題名

2光子顕微鏡法を用いた補償光学による生体組織深部の可視化解析  
(Two-photon microscopic characterization within deeper layers in biological tissues utilizing adaptive optics)

生体組織機能の維持には細胞間の物理・化学的な相互作用が必須であるため、相互作用を損なわない低侵襲な計測法が求められる。蛍光顕微鏡法は非接触かつ単一細胞レベルで計測できるが、組織内部の計測は困難だった。そこで、組織の三次元構造を保ちつつ、非侵襲的に計測できる2光子顕微鏡法が有用である。生命科学研究に貢献の大きい顕微鏡法ではあるが、組織内の細胞の微細形態や生理活性の計測深度には向上の余地がある。深部到達性の低下は、組織内での光吸収と散乱による励起光強度の低下と収差による焦点体積の増大によって、組織深部で2光子励起効率が低下することが原因である。本論文は、組織深部の2光子励起効率を高めるために、組織による光吸収・散乱・収差を低減するための汎用性の高い改良法の開発を目指したものである。また、三次元多細胞系において、細胞の生理活性変化やその細胞間伝搬を可視化・解析する手法の確立することを目的にしている。

本論文の第3章では、マウス生体脳深部での2光子励起効率向上のため、励起光の照射条件を探索した。顕微鏡に標準搭載されている機構で調整できるレーザー光のビーム径、および、水とグリセリンを混合することで簡単に調整できる対物レンズの浸液の屈折率に着目し、マウス生体脳内部で焦点体積を可視化・解析する手法を開発した。通常条件では大脳皮質下の構造を観察できなかったが、至適条件を用いることで海馬CA1細胞が可視化することに成功した。第4章では、さらに複雑な収差を補正するために、光波面の制御によって任意の収差を補正できる空間光位相変調器SLMを既存の顕微光学系に外部導入した。実測した試料の表面形状の三次元情報を基に、光線追跡によって試料内部で発生する収差量を推定し、SLMに与える位相変調量の分布を算出するプログラムを新たに作成した。本手法の適用によって、これまで観察報告のないマウス生体脳第二次運動野領域第V層のシナプス構造の可視化を低侵襲に実現した。

第5章では、三次元多細胞系における細胞間シグナル伝搬の可視化・解析法の確立を行った。ここでは、細胞密度が高く、三次元的な細胞移動が起こるために、解析の難易度が極めて高いがんスフェロイドを三次元多細胞系のモデルとして用いた。また、がんスフェロイドは固形がんモデルとして治療法のスクリーニングに用いられるが、詳細な治療機構の解明のために単一細胞レベルでの生理活性変化の可視化・解析法の開発が求められており、この系で解析法を確立する意義は大きい。今回は、光熱治療適用時に用いられる金ナノ粒子から発せられる局所熱に応答する細胞間シグナル伝達を可視化した。具体的には、ERK活性をモニターする蛍光プローブを発現させたがん細胞

胞株を用いたスフェロイドを利用した。その結果、2光子顕微鏡を用いることで、局所熱による刺激に応答したスフェロイド内シグナル伝達を三次元的に初めて撮影することに成功した。取得したビックデータを、深層学習に基づく三次元核自動検出・追跡プログラムを用いて解析することで、スフェロイドを構成する800個以上の細胞から独立なERK活性変化を抽出することに成功した。以上のように、本論文では、生体組織深部の構造可視化、局所刺激、シグナル伝達をシームレスに解析するための多光子顕微鏡法を新たに提案した。その手法を用いて、マウス生体脳第二次運動野領域第V層のシナプス構造の可視化に世界で初めて成功し、更には固形がんモデルであるがんスフェロイド内部での細胞間シグナル伝搬の様子を空間・時間的に解析することに成功した。生命現象の解明に重要である生体深部における構造やシグナル伝達を解析する新たな手法を提案したものであり、学位取得に値すると認める。