

関西学院大学 研究成果報告

2019年 3月 15日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：箕嶋 涉

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	Bull`s eye プラズモニックチップを用いた神経ネットワーク解析
研究実施場所	理工学部 田和研究室
研究期間	2018年 4月 1日 ～ 2019年 3月 31日 (12ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

脳における認知や学習といわれる高度な機能は、多数の神経細胞がシナプスによって結合されて形成された神経ネットワークが担っている。神経細胞は外部からの刺激がない場合でも自発活動と呼ばれる数ミリ秒の間に収束するスパイク状の膜電位変動が自律的に発生しており、自発活動が脳機能の源泉であると考えられている。神経細胞が形成するネットワークの活動をシンプルな実験系で計測・解析するため、生体の持つ脳神経回路を一度分断し、培養過程で再構成させた培養神経ネットワークを用いた研究が広く行われている。

個々の神経細胞の膜電位変化は、電位感受性色素を負荷することで蛍光変化として観察できる。しかしながら、電位感受性色素自体の蛍光変化が乏しく、一過性でかつ数ミリ秒で収束する自発活動を計測するためにはノイズが大きいという問題がある。そこで、本研究では表面プラズモン共鳴による電場増強効果で明るい蛍光を観察できるプラズモニックチップ（波長オーダーの周期構造が調製され、金属薄膜でコーティングされたガラス基板）上で神経ネットワークを培養し、電位感受性色素の蛍光を増強することで神経細胞の膜電位変化を光学的に検出する研究に従事した。

プラズモニックチップ上では入射光が表面プラズモンと結合することにより励起場のエネルギーを増強させ、増強された蛍光がプラズモンと再結合するというプロセスで顕微鏡下で蛍光を増強する。昨年度まで用いていた金属層として金を製膜したプラズモニックチップでは、

電位感受性色素の励起波長である500 nm前後の入射光では励起場増強効果が得られない。一方、金属層として銀を製膜したプラズモニックチップでは励起場の増強が期待できるが、銀イオンが細胞接着面に漏出することによる細胞毒性の影響で長期的な神経細胞の培養が困難であった。そこで本研究では新たにプラズモニックチップ表面にポリスチレンを製膜した銀プラズモニックチップを作製し、チップ上で電位感受性色素による増強蛍光測定を行った。

洗浄したカバーガラスにUVナノインプリント法でBull's eye構造を調製し、RF-スパッタ法によりTi/Au/Ti/SiO₂、又はTi/Ag/Ti/ZnO/SiO₂を成膜してプラズモニックチップを作製した。プラズモニックチップ表面にポリスチレンを製膜し、プラスチック製の培養皿底面に張り付けることでプラズモニックディッシュとした。

プラズモニックディッシュにラット胎児海馬由来の神経細胞を培養した。初期播種密度海馬細胞を500 cells/mm²の密度で播種し、ニューロベーサル培地を基礎培地とした培養液下で20-30日培養した。本研究では市販のガラスベースディッシュ、金および銀プラズモニックディッシュ上で神経細胞を培養した。

電位感受性色素としてDi-4-ANEPPSを、蛍光像の観察・検出装置としてCMOSカメラ、Cy3励起フィルター（波長域: 510 nm - 550 nm）、Cy5蛍光フィルター（波長域: 670 - 710 nm）20倍の水浸対物レンズを搭載した正立落射型顕微鏡を用いた。また、数ミリ秒単位で発生する活動電位を測定するため、露光時間は1 msとし、光源にはキセノンランプを用いた。細胞外液として神経活動を起こすために必要十分な電解質と、エネルギー源であるブドウ糖を含んだ記録外液を用いた。

培養した神経細胞に12 μM Di-4-ANEPPSを負荷し蛍光変化を測定した。観察された画像から細胞体領域（10 × 10 μm）を切り出し、領域内の平均蛍光強度を評価した。キセノンランプを照射することで色素の褪色により蛍光強度が低下するため、蛍光強度の時間変化を指数関数でフィッティングした曲線をベースラインとしてベースラインからの蛍光強度変化の割合（ $\Delta F/F$ ）を $(F(t)-F_0(t))/F_0(t)$ で算出した。ここでは、 $F(t)$ を時間 t における蛍光強度、 $F_0(t)$ をフィッティングで求めた時間 t におけるベースラインの蛍光強度とした。本研究では試薬操作なし、抑制性神経活動の阻害薬であるピクロトキシン（PTX）下で蛍光シグナルを計測した。活動電位阻害薬であるテトロドトキシン（TTX）下で大きな振幅のシグナルを抑制した状態でノイズを評価し、標準偏差の3倍以上のピークを自発性神経活動を表すスパイクとして検出した。

銀プラズモニックディッシュ上では金のディッシュに対して2.5倍明るい蛍光が観察された。金プラズモニックディッシュ上で得られた蛍光強度で自発活動は十分評価できるため、銀プラズモニックディッシュでのみ照射光強度を50%に弱めて1 ms時間スケールで蛍光変化を観察した。照射光を弱めたことで蛍光褪色が小さくなった上、検出されたスパイク数の有意な変化は見られなかった、このことは、銀プラズモニックディッシュ上で長時間の自発活動蛍光観察が可能となったことを示す。

金プラズモニックディッシュ上で自発活動を計測した論文が現在査読後の修正中であり、銀プラズモニックディッシュ上での膜電位観察結果を纏めた論文を投稿準備中である他、2件の国内学会、1件の国際学会で発表した（別紙参照）。

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。