

## 2017年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 箕嶋 渉 (理工学研究科 田和研究室)

研究課題 Bull`s eye プラズモニクチップを用いた神経ネットワーク解析

研究期間 2017年4月1日～2018年3月31日

研究成果概要 (日本文 (全角) の場合は2,500字程度、英文 (半角) の場合は90字×65行程度)

脳は認知や学習を担う高度な情報処理器官であり、脳機能は多数の神経細胞がシナプスによって結合した神経回路が担っている。神経細胞は外部からの刺激がない場合でも活動電位と呼ばれる数ミリ秒で収束する膜電位変動を自律的に発生しており、この活動電位を情報として伝達することで脳機能が実現されている。本研究では、電位感受性色素を用いて膜電位変化を計測した。電位感受性色素は簡便に膜電位変化を蛍光変化として観察できるが、色素自体の蛍光変化が乏しく、数ミリ秒の露光時間ではS/Nの良好な蛍光観察が難しい。そこで、本研究では明るい蛍光を観察できるプラズモニクチップ (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) 上で神経回路を培養し、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計測し、通常ガラスディッシュ上では検出できない神経細胞の活動電位を光学的に検出する研究に従事した。

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/SiO<sub>2</sub>を製膜することでプラズモニクチップを作製した。続いてプラズモニクチップにラット胎児海馬由来の神経細胞を分散培養する際の条件検討を行った。培養液として、ニューロベーサル培地を基礎培地とした培養液を用いた。また、分散播種時の細胞密度を検討した。細胞の高密度に播種した場合、シナプスの形成確率が上昇し、高頻度に活動電位を起こす可能性が高まる一方、蛍光染色時に単一の細胞体を視認することが難しいという問題がある。本研究では培養細胞の播種密度を900, 1300, 2000 5000 cells/mm<sup>2</sup>の3条件で培養し、活動電位の頻度を高める目的で2000 cells/mm<sup>2</sup>で細胞を播種した。神経細胞は十分な回路形成が行われ、かつ自発的な活動電位が多く発生する20-30日培養し、対象条件として市販のカバーガラス、ガラスベースディッシュ上で同様の条件で神経細胞を培養した。

本研究では電位感受性色素としてDi-3 ANEPPDHQ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) 40倍の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1msとし、光源にはキセノンランプを用いた。染色実験の開始にあたり、カバーガラス上で20日以上培養した神経細胞を用いて染色条件を検討した。通常培養液は細胞の生存率を高めるため、実験とは無関係な栄養素が豊富に含まれている。従って本研究では、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、エネルギー源としてブドウ糖を含んだ人工脳脊髄液 (aCSF) を用いた。続いて、Di-3 ANEPPDHQをaCSFで2, 4, 8 μMに希釈し、神経細胞に負荷して顕微鏡下で観察した。濃度2 μMではカバーガラス上で細胞体が視認できず、8 μMでは神経細胞以外の細胞への非特異吸着が多く観察され

たことから、本研究では 4  $\mu$ M で実験した。

プラズモニクチップとガラス上で 20 日以上培養した神経細胞に 4  $\mu$ M Di-3 ANEPPDHQ 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  $\times$  10  $\mu$ m) を切り出し、領域内の平均蛍光強度を測定した。キセノンランプを照射することで色素の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。続いて、 $\Delta F/F$  の時間変化から活動電位と考えられるスパイクの検出を試みた。ノイズとスパイクを分離するため、一般的に用いられる平均値と標準偏差の整数倍を閾値とし、それを越えたピークをスパイクとした。また、計測した時間における活動頻度が高い場合標準偏差が大きくなり、振幅の小さいスパイクの検出精度が低下する可能性が考えられるため、本研究では通常状態の蛍光観察とともに活動電位阻害薬であるテトロドトキシン (TTX) 下で蛍光観察することで、スパイク検出のためのノイズとした。

プラズモニクチップ上の神経細胞とガラス上の神経細胞とで比較した場合、プラズモニクチップ上では最大で約 4 倍明るい蛍光が観察された。さらに、露光時間 1 ms で観察した蛍光強度の時間変化からスパイク検出したところ、ガラス上の神経細胞ではノイズが大きく埋もれていたが、プラズモニクチップ上の神経細胞からより多くのスパイクが検出された。このことは、プラズモニクチップを用いることで高感度な膜電位イメージングを実現し、自発的なスパイクを検出できた。また、神経回路全体の興奮性を向上させるピクロトキシンを投与した場合により高頻度にスパイクを検出できたことから、検出されたスパイクは活動電位であることが示唆された。これらの成果は研究業績リストの国内学会 1, 3-5, 国際学会 1, 2 で発表された。

以上に記した、金プラズモニクチップで培養した神経細胞の蛍光観察結果をまとめた論文を投稿準備中である。

現在は、より明るい蛍光を観察するためプラズモニクチップの構造を検討している段階である。今年度は金プラズモニクチップで神経細胞を培養しているが、銀プラズモニクチップを用いることでより明るい蛍光を観察することが期待される。細胞の接着面である  $\text{SiO}_2$  の膜厚、細胞接着性コートの材質コート時間などを再度検討し、銀プラズモニクチップでの細胞培養を進めている。

## 研究業績

### 国内学会における発表

1. ○箕嶋 渉、泉 章太、細川 千絵、工藤 卓、田和 圭子「Bull's Eye プラズモニクチップによる培養神経回路網の膜電位イメージング」、第 78 回応用物理学会秋季学術講演会、6p-A502、福岡、2017 年 9 月
2. ○箕嶋 渉、泉 章太、細川 千絵、工藤 卓、田和 圭子「プラズモニクチップによる増強蛍光を利用した神経回路網膜電位の顕微鏡イメージング」、応用物理学会関西支部平成 29 年第 2 回講演会、P-05、京都、2017 年 11 月
3. ○箕嶋 渉、泉 章太、細川 千絵、工藤 卓、田和 圭子「プラズモニクチップ上に培養した神経回路における膜電位の高速度・高感度顕微鏡イメージング」、光圧によるナノ物質操作と秩序の創生 第 2 回公開シンポジウム、P04、大阪、2018 年 1 月
4. ○箕嶋 渉、泉 章太、細川 千絵、工藤 卓、田和 圭子「プラズモニクチップ上における神経自発活動の高感度蛍光イメージング」、第 65 回応用物理学会 春季学術講演会、18p-F306-8、東京、2018 年 3 月

### 国際会議における発表

1. ○Wataru Minoshima, Shota Izumi, Chie Hosokawa, Suguru N. Kudoh, Keiko Tawa, "Sensitive Voltage Sensitive Dye Imaging in Living Neuronal Network on Bull's eye-Plasmonic Chips", The 30<sup>th</sup> International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2017), Jeju Island, Korea, November 2017
2. ○Wataru Minoshima, Shota Izumi, Chie Hosokawa, Suguru N. Kudoh, Keiko Tawa, "Sensitive Action Potential Imaging in Cultured Neuronal Network on the Plasmonic-chip", International Symposium on Nanomedicine 2017 (ISNM2017), Sendai, Japan, December 2017