プラズモニックディッシュ上の Di-4-ANEPPS の増強蛍光を用いた神経自発活動のリアルタイム計測

Real-time measurement of spontaneous activity using enhanced fluorescence of Di-4-ANEPPS on the plasmonic dish

関学大理工 [1], 産総研バイオメディカル [2] ○(PC)箕嶋 渉 [1], 細川 千絵 [2], 工藤 卓 [1], 田和 圭子 [1, 2]

Kwansei Gakuin Univ. [1], AIST. [2], °(PC)Wataru Minoshima[1], Chie Hosokawa[2], Suguru N. Kudoh[1], Keiko Tawa[1, 2]

E-mail: w.minoshima@kawansei.ac.jp

神経回路網では自発活動と言われるスパイク状の電気活動が外部からの刺激に依存せず発生する．電位感受性色素（Voltage sensitive dye, VSD）を用いた蛍光観察により自発活動を単一細胞の分解能で計測できることが期待される．しかしながらVSDは蛍光変化が小さく自発活動を計測する目的では S/N が悪い．そこで，本研究では格子結合型表面プラズモン共鳴（Grating coupled surface plasmon resonance, GC-SPR）による増強蛍光が観察できるプラズモニックディッシュ [1]，低倍率対物レンズ，高速 CMOS カメラによって蛍光像をリアルタイムで計測し，広視野範囲にわたる自発活動を調べた．既報では電位感受性色素は Di-3-ANEPPDHQ であったが，本報告では Di-4-ANEPPS を用いた．

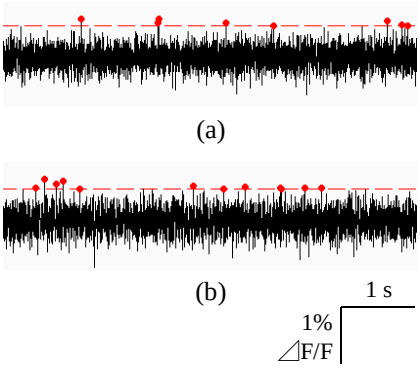

Fig.1 VSD signals of cultured neuron on the plasmonic dish. (a) Control neuron. (b) Under 50 μM PTX. Red dashed lines and circles indicate the thresholds and detected spikes.

UV ナノインプリント法により周期構造をカバーガラス上に調製し，金属薄膜を Ti/Au/Ti/SiO_2 の順に成膜してプラズモニックチップを作製した．さらに，ガラスボトムディッシュ底面をプラズモニックチップに貼り替えて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とガラスボトムディッシュ上で 20-24 日培養したラット胎児海馬神経細胞に Di-4-ANEPPS を負荷し，20 倍水浸対物レンズを用いて露光時間 1 ms で蛍光変化を観察した．蛍光変化は試薬を添加していない状態，GABA-A 受容体を阻害するピクロトキシン下でそれぞれ観察し，蛍光変化のデータからノイズの 3 倍以上のピークをスパイクとした．その結果，プラズモニックディッシュではスパイクが多く検出され，ピクロトキシン下でスパイク数が増加した（Fig.1）．より明るい Di-4-ANEPPS を用いたことで，低倍率対物レンズ下でも自発活動由来のスパイクを高感度に検出できた．

[謝辞] 本研究は JSPS 科研費 16H02092 の助成を受けたものです．光硬化性樹脂を提供いただいた東洋合成工業株式会社に感謝いたします．

[参考文献]K. Tawa et al., *ACS Appl. Mater. & Interface*, **6**, 20010-20015 (2014)