

導電性ポリマーを応用した細胞刺激に関する研究

首都大学東京 ○加藤健太, ◎金子新

要旨

導電性ポリマーを用いた細胞刺激デバイスの作製を試みている。電気化学重合したポリピロール (PPy) 表面上で HeLa 細胞を培養したところ、同細胞は PPy 上に接着し、仮足を伸展させた。PPy へ $\pm 1V$ の電圧印加して細胞への電気刺激を行うと、PPy 上の HeLa 細胞は減少し、かつ同細胞の仮足が退縮した。マイクロドット状の PPy を使用すると、同マイクロドットへ HeLa 細胞が選択的に接着した。

1. 緒言

細胞は外部から刺激を受けると分化や増殖など様々な応答を示すことが報告されており、この細胞機能の解明は再生医療分野への応用が期待される¹⁾。しかし、細胞刺激の多くの研究では細胞の集合に刺激を与えるため、単一細胞の応答を調査することは困難である。

本研究では、単一細胞に刺激を与えるデバイスの作製にあたり、導電性ポリマーであるポリピロール (PPy) に着目した。PPy は電解質溶液中で酸化還元反応によるイオンの出入りで体積変化を起こす²⁾。したがって図 1 に示すように PPy に接着している細胞に対して、電気的刺激と機械的刺激を与えることが可能である。青戸らは、PPy を単一細胞と同サイズのドット形状に加工し、その変形特性について明らかにした³⁾。

しかし、PPy マイクロドットに電圧を印加した状態での細胞培養については未着手である。そこで本研究では PPy マイクロドットを細胞刺激デバイスに応用するため、PPy 膜およびマイクロドットへの細胞接着、ならびに電圧印加時の細胞形態の変化について実験的に調査している。

2. PPy 膜およびマイクロドットの作製

PPy の作製には電気化学重合を用いた。図 2 に示すように基板となる作用電極には酸化インジウムスズ (ITO) 膜付きガラス、対向電極にはアルミ板、参照電極には銀塩化銀電極 (北斗電工株式会社, HX-R6) をそれぞれ使用した。超純水にピロール (Sigma-Aldrich) を 0.2mol/L とドーパントとしてドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich) を 0.1mol/L 混合した溶液を作製した⁴⁾。PPy 膜は+1V の定常波を電荷量 1C に達するように印加して重合した。

一方、PPy マイクロドットの作製は、ITO 膜付きガラス上に絶縁層のホール型パターンをマスクとした絶縁層であるポジ型フォトレジスト (OFPR800-LB) を用いた。ピロール溶液中で+1V の定常波を電荷量 200mC に達するように印加した。作製した PPy マイクロドットは、SEM (キーエンス, VE-9800) と AFM (島津製作所, SPM-9700) を用いて観察を行ったところ、図 3 の結果を得た。複数の PPy マイクロドットが配列した構造をしており、マイクロドットは単一細胞と同サイズの直径を持っているため、単一細胞を接着および刺激を付与するのに適した形状であった。

3. 電圧を印加した PPy 上における細胞培養および刺激付与

3.1 PPy 膜上における細胞培養

図 4 に示すような細胞に刺激を与えるデバイスを作製した。PPy 膜を作用電極として HeLa 細胞を 20000cells/cm² 播種した。HeLa は、播種して

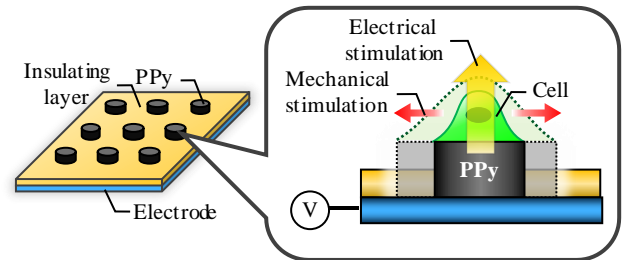


Fig. 1 Conceptual diagram of cell stimulation device using PPy.

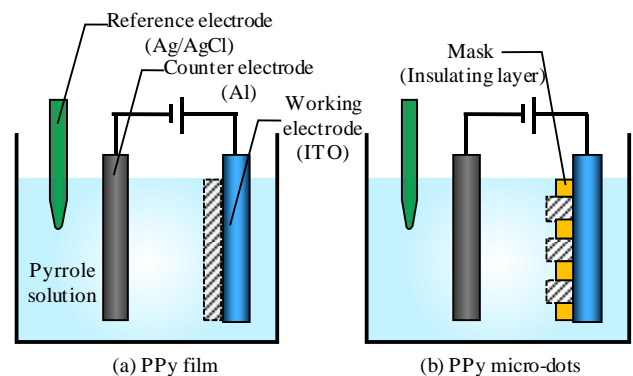


Fig. 2 Electrochemical polymerization of poly-pyrrole (PPy).

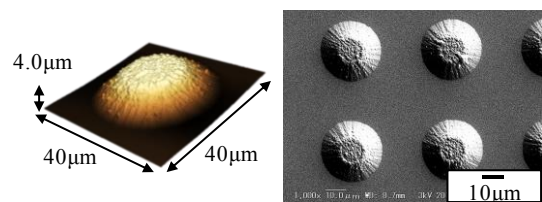


Fig. 3 Examples of fabricated PPy micro-dots.

24 時間後に PPy と接着した。対向電極には、PDMS 上に白金を成膜したものを、参照電極には銀塩化銀をそれぞれ使用した。作用電極には青戸らと同様に $\pm 1V$ の電圧を 1 周期 120 秒の矩形波で 24 時間印加した。

観察は蛍光観察と SEM 観察の 2 種類を行った。蛍光観察はカルセイン AM (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, C3099) で生細胞を染色し、蛍光顕微鏡 (オリンパス株式会社, FSX1000) を用いて観察を行った。観察画像で緑色が生細胞 (HeLa) を示している。SEM 観察は試料を t -ブチルアルコールを用いて脱水し、凍結乾燥した後 SEM を用いて観察を行った。Control として電圧印加しない静値培養も行った。

図5に蛍光顕微鏡および凍結乾燥後のSEMで観察した結果を示す。静置培養時のPPy上のHeLaと比べて、電圧印加時のPPy上のHeLaは図中の赤枠で示しているものであり数が少なく、形状も球形であった。HeLa細胞の長さを計測したところ、図6のように、電圧印加時は仮足の退縮により細胞の長さが減少していた。

以上の結果を整理すると、本実験における電圧印加はPPyに対するHeLaの接着性低下を促したと考えられる。先行研究によれば、0.1V程度の電気刺激はむしろ細胞の成長を促すとされる¹⁾。本実験ではPPyの体積変化(イオン出入)のために必要な1Vとしたが、同電圧はHeLa細胞の接着には高すぎるといえる。したがって、機械的刺激のために、PPyをさらに低電圧で体積変化を生じさせる必要があると考えられる。

3.2 PPyマイクロドット上における細胞培養

次に、PPyマイクロドットを作製した基板にHeLa細胞を播種し、24時間培養後に同細胞の接着を確認した後に、前節と同様に電圧を印加してさらに24時間培養を行った。なお、Controlとして電圧印加しない静置培養も行った。図7に蛍光顕微鏡および凍結乾燥後のSEMで観察した結果を示す。静置培養と電圧印加の両方で、HeLa細胞はPPyマイクロドットへ接着が確認でき、かつ接着細胞数はほとんど同じだった。しかし、静置培養の場合には、図中の赤枠で示しているように、HeLa細胞がPPyマイクロドットに沿って列状に連なっている箇所が確認されたが、電圧印加の方では観察されなかった。SEMの観察結果によれば、静置培養と電圧印加のいずれの場合も、HeLa細胞は仮足を伸展している様子が確認できる。すなわち、前章の平滑なPPy膜の場合のように、電圧印加による極端な退縮はなかった。ただし、HeLa細胞の接着位置にやや相違が見られた。静置培養ではPPyマイクロドット上が主体であるが、電圧印加した場合にはPPyマイクロドット間であることが多い。そのような接着位置の違いが、上記の細胞の連なりに反映したと考えられる。

この結果は、電圧印加によってPPyの細胞接着性が低下し、HeLa細胞がPPyを避けるように仮足を退縮させ、PPyとの接着性が低下した。今後は、PPyマイクロドットにさらに低電圧を印加させたときの細胞の応答を調査する。

4. 結言

PPy膜およびマイクロドットに電圧を印加してHeLa細胞に刺激を付与した。電圧印加によりHeLaは、仮足を退縮させ、PPyとの接着性が低下した。今後は、PPyマイクロドットにさらに低電圧を印加させたときの細胞の応答を調査する。

参考文献

- 1) M. Adel et al, *Microelectronic Engineering*, **173**, (2017), 1-5.
- 2) S. Skaarup et al, *Solid State Ionics*, **159**, (2003), 143-147.
- 3) 青戸ら, 2017年度精密工学会春季大会講演論文集, (2017), 369-370.
- 4) 金子ら, *精密工学会誌*, **81**, (2015), 80-85.

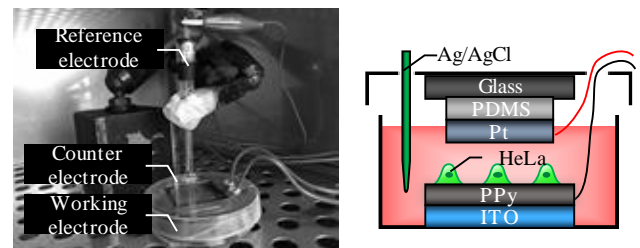


Fig. 4 Experimental set-up of cell stimulation using PPy film.

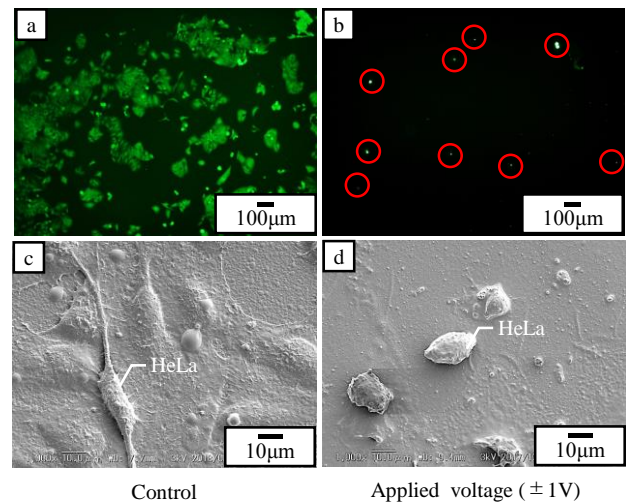


Fig. 5 HeLa cells on PPy film with/without applied voltage.

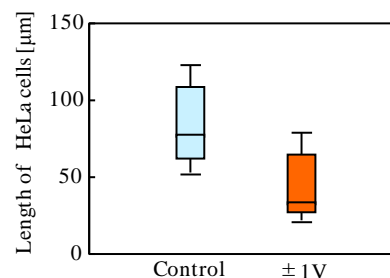


Fig. 6 Length of HeLa cells on PPy film.

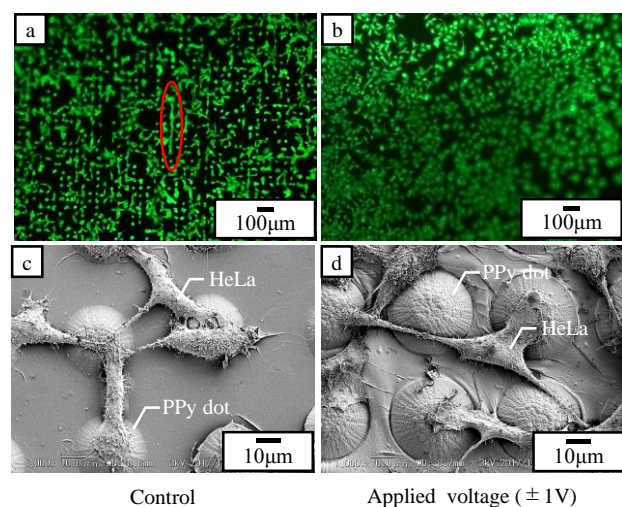


Fig. 7 HeLa cells on PPy micro-dots with/without applied voltage.