

## PPy メンブレン構造の作製と細胞刺激への応用

首都大学東京 ○川口晃大, 藤田裕人, 加藤健太, ◎金子新

### 要旨

本研究では、導電性ポリマーであるポリピロール (PPy) の薄膜を基材から剥離した後に、直径 5mm の微細穴をもつ PDMS と積層させて PPy 薄膜のメンブレン構造を作製した。電解溶液中で -1V を印加すると、イオンの侵入によって PPy メンブレン構造は 500 $\mu$ m 以上のたわみを発生する。さらに、同構造の変形を細胞への力学的刺激に応用するため、PPy メンブレン構造上で HeLa 細胞を培養した。

### 1. 緒言

細胞への電氣的または機械的的刺激に対する影響解明は、再生医療分野等への発展に必要とされている。しかし、既存の細胞刺激デバイスは装置が複雑であるため、簡易かつ微細構造化へ応用可能なプロセスや材料が求められている。本研究では導電性高分子であるポリピロール (PPy) を用いた細胞刺激デバイスの作製を試みている。PPy は酸化還元反応によって体積変化する。また、生体適合性を有し、微細構造化も可能である。先行研究において、細胞と同サイズのドット型の PPy の駆動に成功している。しかし、PPy ドットの駆動では、直径の変形率は最大で 10%であったが、電圧印加を繰り返すたびに変形率が減衰し、3回目には変形がほとんど見られなかった。

そこで本研究では、PPy の変位を拡大するため、圧電素子などの双安定アクチュエータを参考にした<sup>2)</sup>。図 1 に示すような PPy メンブレン構造を提案する。電圧印加による膜の面内方向の膨張を垂直方向の変位に変換し、イオンの吸収面積を拡大するため、大きな変位が期待できる。しかし、PPy による同構造の作製例、ならびに細胞刺激への応用事例はほとんどない。本報告では、PPy メンブレン構造の作製と細胞培養環境下で印加する電圧値が及ぼす影響の調査を行う。次いで、細胞培養を行い、同構造に電圧印加して駆動を行うことによる細胞に与える影響を調査する。

### 2. PPy メンブレン構造の作製

PPy メンブレン構造作製方法を図 2 に示す。まずは、同構造の実証を優先するため、ミリスケールでの作製を行い、その後にマイクロスケールに展開する。PPy 膜は電気化学重合で作製している。作製した膜厚 10 $\mu$ m の PPy 膜を作用電極から剥離させ、直径 5mm の微細穴を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) に積層させ、PPy メンブレン構造を作製した。以後の実験では、この方法で作製した PPy メンブレン構造を用いている。

### 3. PPy メンブレン構造の駆動

図 3 に示すように、電解質溶液 NaDBS (0.1mol/L) 中で PPy メンブレン構造を電圧印加した。図 4 に -1.0V の定常波を 120s 印加したときの PPy 膜を示す。PPy 膜は膨張して上方にたわみ、その大きさは時間と共に増加した。PPy 膜の垂直変位は中心ほど大きく、その頂点位置は時間経過と共に変わらず変わらなかった。膜頂点の位置は 120s で約 540 $\mu$ m に達した。実際には垂直方向にも膨張しているが、PPy 膜の厚さは 10 $\mu$ m 程度であり直径の大きさと比較して非常に小さい値のため、水平方向の膨張のみを考える。そして、膜頂点の垂直変位は面内方向の直径変化より大きく、図 1 に示すように、 $\delta > \Delta l$  が示された。よって、変位増加が実証された。

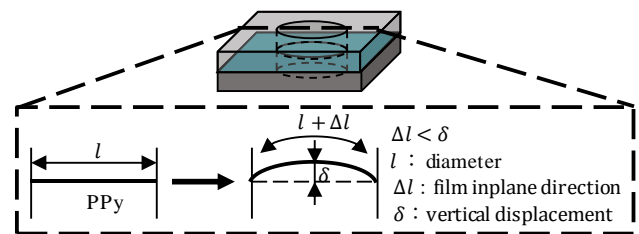


Fig. 1 Membrane structure.

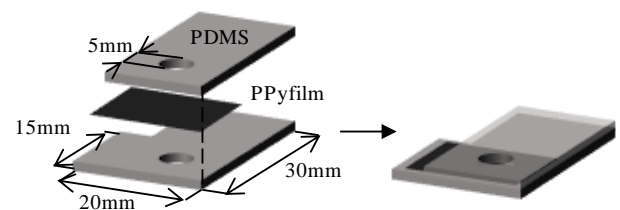


Fig. 2 Fabrication of PPy membrane.

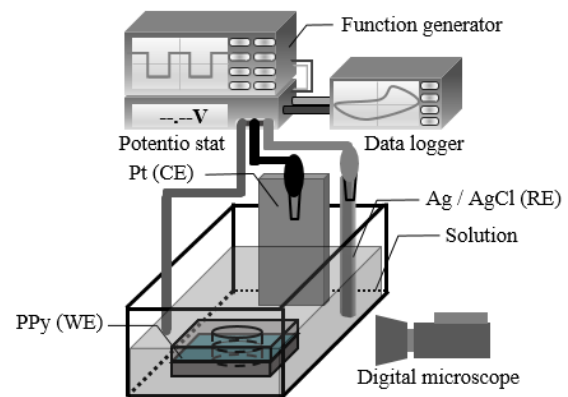


Fig. 3 Experimental set-up for actuation.

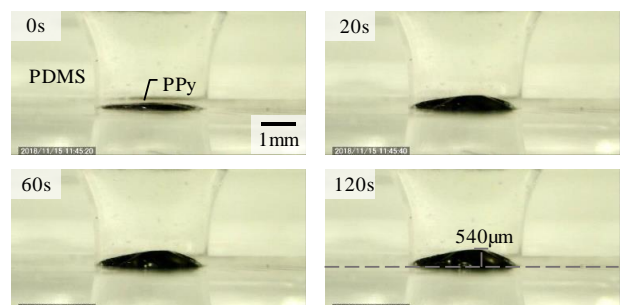


Fig. 4 Actuation of PPy membrane.

PPy メンブレン構造の電圧値による変位量との関係性を調査した。NaDBS 溶液中で-1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2V の定常波で 120s 印加した変位量を図5に示す。-1.0V と-0.8V の最大変位量は526.3 $\mu\text{m}$ 、-0.6V の時に354.2 $\mu\text{m}$ 、-0.4V の時に131.6 $\mu\text{m}$  変位した。電圧-0.2V では変位が確認できなかった。

次に、細胞培養で用いられる培養液 (DMEM) での結果を図6に示す。駆動の確認を行えたので、細胞培養環境への応用が可能であると考えられる。培養液中のほうが NaDBS と比較して、PPy 内部に入るイオンの種類や濃度によって変位が飽和するのが早く、変位量が小さくなる点を確認した。

#### 4. 細胞培養環境への応用

細胞の接着性を調査するため、PPy メンブレン構造で培養を行った。本研究では、同構造による細胞の培養と刺激のテストを主目的としているため、取り扱いのしやすい HeLa 細胞を用いた。同構造を細胞培養用ディッシュ内に設置して、HeLa 細胞を播種密度 20,000 cells/cm<sup>2</sup> で微細穴の中に選択的に播種した。その後、培養液で一面を満たした。培養から 48h 後、カルセイン AM で生細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

観察結果を図 8-a に示す。細胞は PPy メンブレン構造に接着し、かつ仮足が伸展していた。同構造は細胞接着性があることが実証された。

次に、図 7 に示す装置構成で、PPy メンブレン構造に電圧を印加させて、その駆動による細胞刺激を行った。播種から 24h 後に電圧印加 (PPy の駆動) を開始し、さらに 23 時間培養した蛍光顕微鏡で観察した。電圧印可の条件は、 $\pm 1.0\text{V}$  (1h)、 $1\text{h} \pm 0.6\text{V}$  (1h)、 $\pm 0.6\text{V}$  (10min)、 $\pm 0.4\text{V}$  (1h) である。その結果を図 8-b, c, および d に示す。

HeLa 細胞の生存を $\pm 0.6\text{V}$  (1h)、(10min)、および $\pm 0.4\text{V}$  (1h) で確認したが、 $\pm 1.0\text{V}$  (1h) では確認できなかった。0.6V の場合に HeLa の形状がコロニー形状に変化していた。HeLa 細胞は、1.0V で 2 時間の印加で、全体の 90% が死滅したと報告があり<sup>3)</sup>、細胞数の減少は過剰な電圧印加による影響と考えられる。すなわち、本実験では PPy 膜の変形による力覚刺激よりも電気刺激の方が大きく、細胞成長に適さない条件であったと言える。今後は、さらに低電圧駆動できるような設計変更を行うとともに、より電気刺激等に耐性のある細胞種において試験を行うことを検討している。

#### 5. 結言

PPy 膜頂点の垂直変位は電圧印加 120s で約 540 $\mu\text{m}$  に達し、面内方向の直径変化より大きく変形実証された。また、PPy メンブレン構造は生体適合性を有し、かつ細胞の接着が可能であることが実証された。そして同構造上で細胞に刺激を与えることが可能であることを確認した。

#### 謝辞

本研究の一部は、平成 30 年度生体医歯工学共同研究拠点共同プロジェクトの助成を受けて実施しました。ならびに、実験にご協力いただいた首都大学東京の藤田裕氏に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 青戸ら, 精密工学会春季大会講演論文集, (2017), 369-370
- 2) 長田義仁, 田口隆久, “未来を動かすソフトアクチュエータ”, シーエムシー出版, (2010), 245-247
- 3) M.Yaoita et al., *Bioelectrochem Bioenerg*, 20, (1998), 169-177.

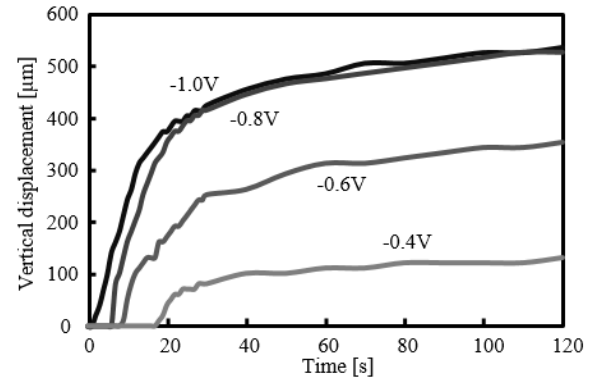


Fig. 5 PPy membrane actuation in NaDBS.

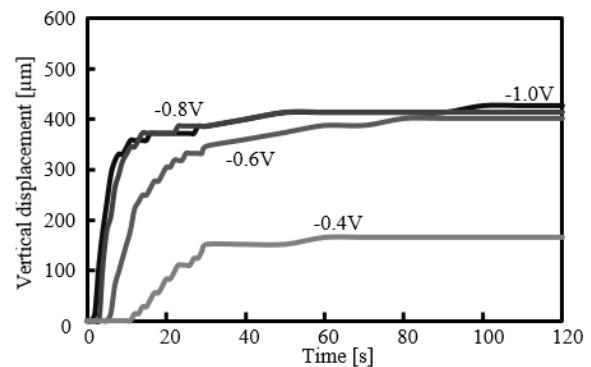


Fig. 6 PPy membrane actuation in DMEM

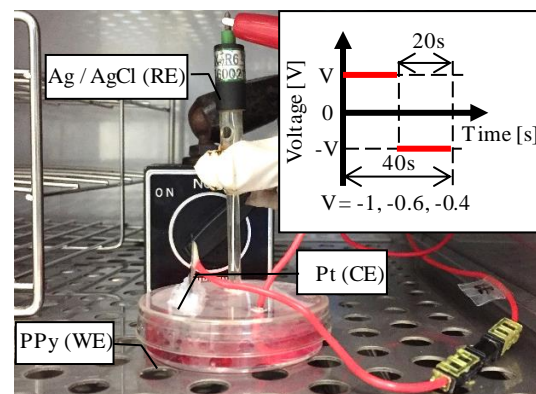


Fig. 7 Cell stimulation device.

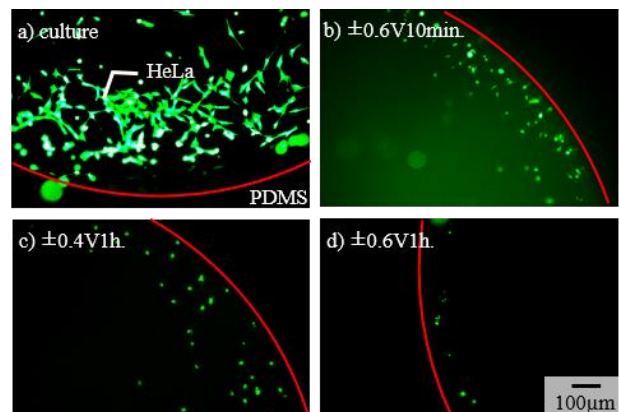


Fig. 8 Fluorescence observation.