

## ポリピロールナノドットの作製と細胞培養への応用

首都大学東京 ○加藤陽平, ◎金子新

### 要旨

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。本研究では、PPy と細胞の接着性の低さを改善するために、PPy 表面をナノ構造化した PPy ナノドットの作製を行った。先行研究において作製された PPy ナノドットは重合面積が小さいという課題が挙げられたが、新たな作製方法により重合面積を拡大することに成功した。そして、作製した PPy ナノドットを足場として HeLa 細胞の培養を行った。

### 1. 緒言

細胞は、各種刺激により増殖や分化等の機能の発現・向上を示し、これらの応答の解明が、再生医療分野等の発展につながると期待される。

導電性高分子であるポリピロール (PPy) は、生体適合性を有しており、図 1 のような細胞刺激のためのマイクロアクチュエータへの応用が期待されている。特に、PPy 表面をナノ構造化した PPy ナノドットは、細胞の接着性向上や PPy 変形率の拡大が期待でき、PPy ナノドット上での細胞の増殖能向上を示唆する結果も得られている<sup>2)</sup>。しかし、PPy ナノドットの作製条件や細胞接着への影響調査が不十分である。

そこで本研究では、PPy ナノドットの作製条件を解明し、細胞成長への影響調査を行っている。特に、PPy ナノドットの生成では、2 種類の重合法を採用し、主要な条件と重合結果の関係から適切な条件を探索する。

### 2. PPy ナノドットの作製

#### 2.1 二相電気化学重合法による PPy ナノドットの作製

PPy ナノドットの生成には、適切な密度で PPy 核を発生させ、かつ優先的に垂直方向への成長を促す必要がある<sup>3)</sup>。そこで先行研究では、図 2 の二相電気化学重合法<sup>3)</sup>が採用された。下相 (有機溶媒相) から上相 (水溶液相) へピロールが拡散し、基板近傍で低いピロール濃度が達成されることで、核発生密度を制御できる。さらに、図 3 のように、矩形波電圧を印加することで、電界集中の原理<sup>3)</sup>より、PPy 核に選択的にピロールが集まり、垂直方向への成長が促進され、PPy ナノドットが形成できる。しかし、二相電気化学重合法は、再現性の低さと、溶液の境界面から数百  $\mu\text{m}$  の範囲でしか PPy ナノドットが生成されないことが課題とされている。

そこで本研究では、これらの課題解決のため印加電圧の Duty 比がナノドットの形成に及ぼす影響を調査した。クロロホルム (和光純薬株式会社) 30ml にピロール (Sigma-Aldrich) 208 $\mu\text{l}$  (0.1M) を分散させた有機溶媒相と、超純水 9ml にカンファースルホン酸 0.002g を加えた水溶液相の二相の溶液を用意した。なお、基板となる作用電極 (WE) は、ECR イオンシャワー装置 (エリオニクス, EIS-200ER) で Pt をスパッタ成膜した Si である。重合後の基板観察結果と重合時の電流値を図 4 に示す。電流値を比較から、Duty 比 66% の方は重合量が、Duty 比 33% の方はピロールの拡散量が向上したことが分かる。しかし、観察結果から、ナノドットが所々生成されているが、明らかに数密度が低いことが分かる。この実験結果から、Duty 比を変更することで重合量と拡散量を制御できることが分かったが、これらが PPy ナノドットの生成に及ぼす影響が小さく、他に生成に大きく影響する因子があることが示唆される。

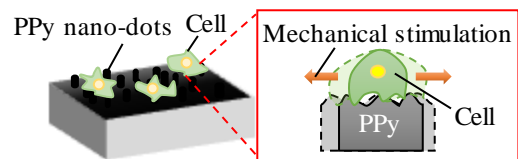


Fig. 1 Cell stimulation device using PPy nano-dots.

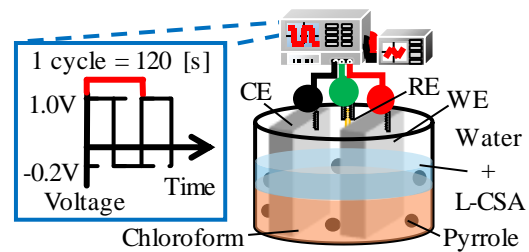


Fig. 2 Two-phase electrochemical polymerization method.

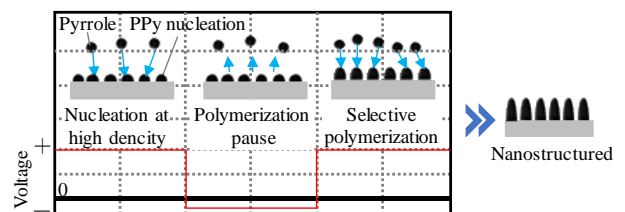


Fig. 3 Principle of PPy nano-dots production.

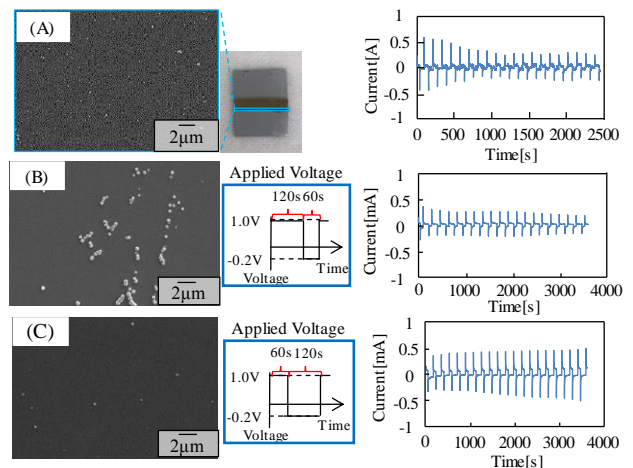


Fig. 4 Fabrication by changing applied voltage.

((A): Duty ratio : 50% (B): Duty ratio : 66% (C): Duty ratio : 33%)

## 2.2 低濃度モノマー溶液中でのPPyナノドットの作製

本節では、二相溶液ではなく、あらかじめモノマー濃度を低くした溶液中でのPPyナノドットの形成を試みている。同手法はポリアニリンナノファイバーの作製で実証されており<sup>4)</sup>、PPyナノドットの作製にも応用できると考えられる。そこで本研究では、同手法によるPPyナノドットの形成を試みるとともに、モノマー濃度の影響を調査した。

本実験では、ピロールの量を208, 104, 52 $\mu$ l (0.1, 0.05, 0.025M)の3条件で作製を行った。超純水25mlにドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (NaDBS) (Sigma-Aldrich) 0.8712gとピロールを加え分散させた溶液を用意した。また、基板となる作用電極に酸化インジウムスズ (ITO) 膜付ガラスを用いて、電圧最大値2Vの矩形波を印加し、電荷量1Cに達するように重合を行った。重合後の基板観察結果を図5に示す。ピロール量208, 104 $\mu$ lでは、PPyの核同士が結合してマイクロサイズになっている。一方で、52 $\mu$ lでは核が独立した状態でナノサイズのドット状にPPyを作製することに成功した。また、図5の写真の赤枠に示すように、基板の溶液中に浸かっている部分全体でPPyナノドットが生成されていることが確認され、先行研究において、二相電気化学重合法により作製したPPyナノドット基板よりも重合面積が拡大した。したがって、ピロール量52 $\mu$ lの条件でPPyナノドットを作製し、その基板を用いて、細胞培養を行った。

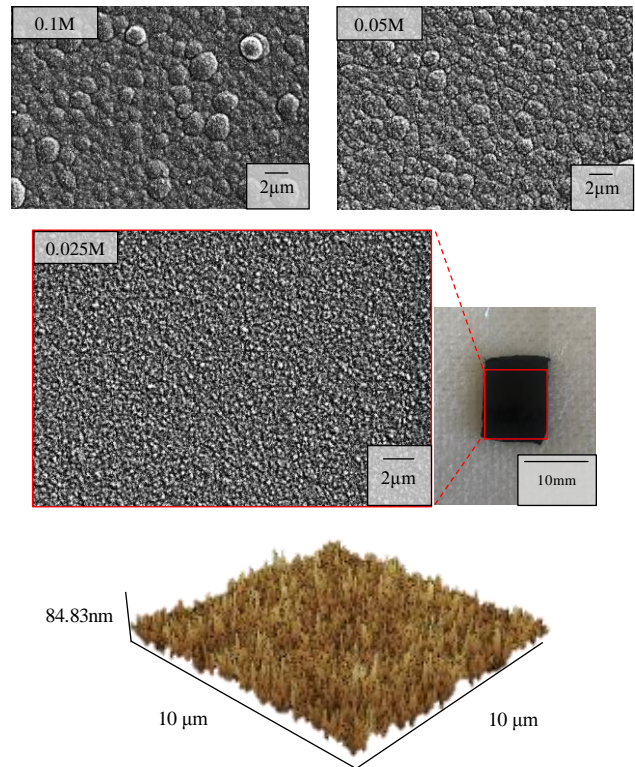


Fig. 5 Examples of fabricated PPy nano-dots.

## 3. PPyナノドット上における細胞培養

作製したPPyナノドットの基板を用いて細胞培養を行った。基板はPPyナノドットの他に、ドットがマイクロサイズのPPyマイクロドットとPPyの平滑膜の3種類を用意し比較を行った。細胞はHeLa細胞を用いて、播種密度10,000 cells/cm<sup>2</sup>播種し、播種後48時間培養をした。その後、蛍光観察と凍結乾燥後のSEM観察を行った。蛍光観察は、カルセインAM (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社, C3099) で生細胞を染色した後、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。図6の緑色が生細胞 (HeLa) を表している。SEM観察は、試料を凍結乾燥した後にSEMを用いて観察を行った。

観察結果を図6に示す。図6の右側の蛍光観察の結果から、PPy平滑膜上には、多数のHeLa細胞が接着しているが、PPyマイクロドットとPPyナノドット上にはHeLa細胞がほとんど接着していないことが分かる。原因としては、高電圧を印加したことで、陰イオンの親水基を有するNaDBSが、PPy平滑膜よりも多く取り込まれたことにより、PPy表面が負の電気特性を持つようになり、負の静止膜電位<sup>5)</sup>を有する細胞と反発してしまったことが考えられる。一方で、図6の左側の凍結乾燥の結果から、PPyマイクロドットとPPyナノドット上にいくつか細胞が接着していることが確認できた。したがって、PPyナノドット基板は、細胞毒性がなく細胞培養に用いることが可能であることが分かった。

## 4. 結言

低濃度モノマー溶液中での電気化学重合によりPPyナノドットを基板全体に作製することができた。また、細胞培養実験の結果から、PPyナノドット基板を細胞培養足場として用いることが可能であることを確認した。今後は、PPyナノドットに細胞が接着しなかった原因を解明すべく、PPyナノドット表面の特性の調査を行い、その後、再度細胞培養実験を行うことでPPyナノドットが細胞成長に及ぼす影響を調査していく。

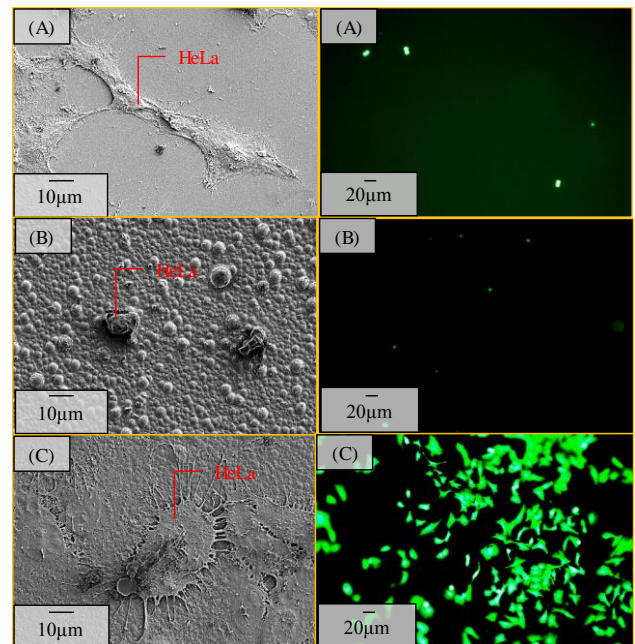


Fig. 6 HeLa cells on PPy film, micro-dots, nano-dots

## 参考文献

- 1) X. Chen et al, *Free Radical Biology and Medicine*, **126**, (2018), 187-201.
- 2) M. Li et al., *Journal of Materials Chemistry*, **18**, (2008), 2276-2280.
- 3) 岩本光正, “有機絶縁材料の最先端”, シーエムシー出版, (2007).
- 4) Y. Wang et al., *Applied Surface Science*, **428**, (2018), 315-321.
- 5) 日本生物物理学会, “生体膜の分子素子・分子機械”, 学会出版センター, (1990).