

ポリピロールの導電性が電気穿孔に及ぼす影響

東京都立大学 ○天木咲希, ◎金子新

要旨

柔軟かつ微細構造が作製しやすい導電性ポリマーのポリピロール (PPy) を電極とし, 細胞への電気穿孔を試みている. 本研究では, PPy の導電性が電気穿孔に及ぼす影響の調査をしている. ドーパント濃度と重合条件 (印加電圧, 重合量) を制御し, 導電性の異なる PPy を作製した. 作製した PPy 電極を用いて HeLa 細胞に電気穿孔した結果, 導電性の小さい PPy ほど細胞への分子導入率が大きいことが明らかになった.

1. 緒言

本研究では, 導電性の異なるポリピロール (以下, PPy) の作製を行い, それらを対向電極に用いた電気穿孔を試みている. 近年再生医療の発展に伴い, 遺伝子導入技術が注目されている. 図 1 に示す電気穿孔法 (エレクトロポレーション) では, 細胞に電界を与えて, 細胞膜に一過性の細孔をあけ, その細孔を通して遺伝子を導入する. ウイルスベクター法などと比較して, 細胞への毒性が発生しないという特長を有している. しかし, 細胞への不均一な電界負荷や, 細胞への高負荷による細胞死により導入効率が低いなどの課題がある^[1]. したがって, 高効率で細胞に低侵襲な電気穿孔法の確立が必要である.

導電性ポリマーである PPy は, 高い柔軟性と導電性をもち, 作製条件により表面形状や導電性を変化させることができ, 高い生体適合性も有している. すなわち, PPy は電気穿孔のための電極材料として有用であると考えられ, 著者らの既報で有効性を実証した.

電気穿孔法による細胞への遺伝子導入効率は, 電極の表面形状や物性, 極板間距離, 印加電圧値や波形などに影響するとされる. 加藤らは, PPy 電極の表面形状が導入効率に及ぼす影響を明らかにした^[2]. そこで本研究では, PPy 電極の導電性が電気穿孔に及ぼす影響の実験的に明らかにすることを目的とした.

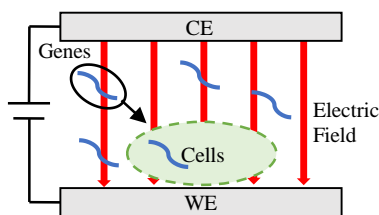


Fig. 1 Schematic illustration of electroporation.

2. 電気化学重合法による PPy の作製

導電性ポリマーの合成は可溶性前駆体法やマトリックス重合法などがあるが, 本研究ではプロセスが簡易な電気化学重合を採用した. 図 2 に示すように, PPy のモノマーであるピロールとドーパントを含む電解質溶液内で, 電圧を印加した作用電極 (陽極) にポリピロールが重合される^[3]. 重合条件は表 1 に示すとおりであり, 溶媒 (純粋) 量を一定のまま, ドーパントであるドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (以下, NaDBS) の量を 0.44 から 3.48g まで変えることで, 導電性の異なる PPy の作製を試みた. 作用電極は ITO 膜付きガラスで, 印加電圧は重合量 0.2C に達するまで 10V, その後 9C に達するまで 1V を印加した^[2].

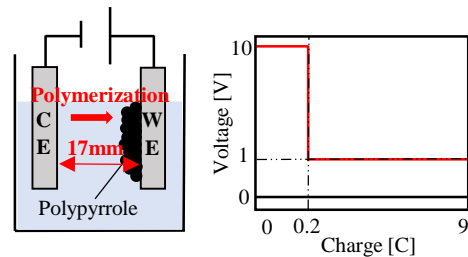
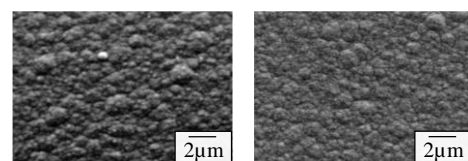


Fig. 2 Electrochemical polymerization of PPy.

Table 1 Experimental condition of PPy polymerization.

Pyrrole	104μl
NaDBS (=Dopant)	0.44g 0.87g 1.74g 3.48g
Ultrapure Water	50ml
Amount of charge	9C
Applied voltage	10V(Constant)→1V(constant)

図 3 に作製した PPy の表面観察結果の一例を示す. ドーパント量に拘わらず, 表面形状はほとんど同様となることがわかった. 図 4 に LCR メータで測定した PPy の導電率を示す. ドーパント量が多いほどほぼ線形に導電率が増加することが確認できた. そこで, これらの PPy を電極として以降の電気穿孔実験に使用した.



(a) NaDBS 0.44g (b) NaDBS 3.48g

Fig. 3 SEM images of PPy surfaces.

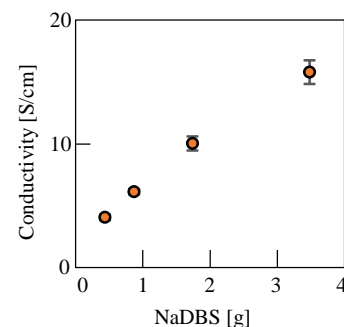


Fig. 4 Conductivity of fabricated PPy film.

3. 導電性の異なる PPy 電極を用いた電気穿孔法

図 5 に使用した電気穿孔装置を示す。上部に対向電極として作製した PPy 電極を、下部に作用電極として ITO 膜付きガラス電極を極板間距離 100 μm で固定した。2 つの電極にファンクションジェネレータを接続し、培養液中で電圧を印加した。

細胞にはヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa) を用い、作用電極である ITO 膜付きガラス上に 10,000cells/cm² で播種し、72 時間培養した。また、分子導入効率の評価には Calcein-AM (Thermo Fisher) と Propidium Iodide (PI, タカラバイオ) の 2 種類の細胞染色液を用いた。Calcein-AM は生細胞の染色液であり、細胞膜透過性をもつ。一方、PI は細胞膜透過性がないため、死細胞または電気穿孔で細孔が生成された細胞には浸透して蛍光を示す。すなわち、電気穿孔によって生細胞に遺伝子を模した PI 試薬が導入されれば、細胞は Calcein-AM と PI の両方で染色される。図 5 の装置内に PI 溶液を添加した培養液で満たし、パルス電圧 (10V, 1kHz, パルス幅 100 μs) を 3 秒印加し、20 分間静置した。その後 Calcein-AM 溶液を添加した培養液と交換し、さらに 30 分間静置した。

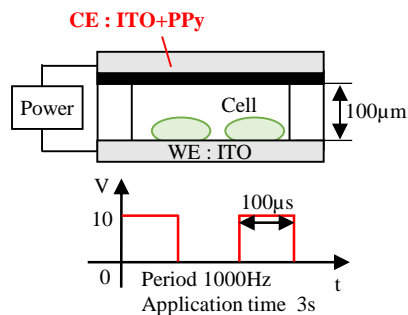


Fig. 5 Set up for electroperforation.

電気穿孔のプロセス実施後、HeLa 細胞を蛍光顕微鏡 (Olympus, BX-53) で観察した結果を図 6 に示す。Calcein-AM (緑) と PI (赤) の両方に染色された細胞が観察できているため、細胞が生きたまま細胞膜に細孔が生成され、PI 分子が細胞内に導入されたことを示している。したがって、PPy 電極を用いた電気穿孔が実現できたことを確認した。

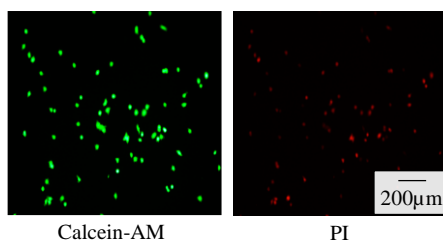


Fig. 6 Stained cells by electroperforation.

電気穿孔の導入効率を定量的に評価するため、分子導入率 R_I と細胞生存率 R_S を式(1)および(2)のように定義した。分子導入率は電気穿孔後の総生細胞数に対し、電気穿孔で細孔が生成された割合とした。また、細胞生存率は、電気穿孔前の総生細胞数に対する電気穿孔後の総生細胞数の割合とした。蛍光観察画像から細胞生存率と分子導入率を計算した結果を図 7 に示す。導電性の小さい PPy 電極を用いた電気穿孔の方が、分子導入率、細胞生存率ともに大きい値となった。

$$\text{分子導入率 } R_I \quad R_I = \frac{N_{CAL+PI}}{N_{CAL}} \quad (1)$$

$$\text{細胞生存率 } R_S \quad R_S = \frac{N_{CAL}}{N} \quad (2)$$

N : 電気穿孔前の総生細胞数 N_{CAL} : 電気穿孔後の総生細胞数
 N_{CAL+PI} : 分子導入に成功した細胞数

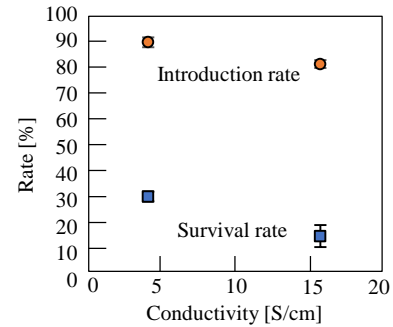


Fig. 7 Introduction and survival rate after electroperforation.

このような結果となった要因として、電圧印加によって発生する電場の違いとともに、特に生存率については PPy からのドーパント (NaDBS) イオンの放出の影響が考えられる。PPy に電圧印加すると電解液中のイオンを吸収または放出して、体積変化を生じる^[4]。今回の電気穿孔においても、PPy から NaDBS イオンが放出され、同イオンが細胞に対して悪影響を及ぼした可能性は高く、そのため導電性の大きい、つまりドーパント量の多い PPy 電極で細胞生存率が低下したと考えられる。しかし、これらの結果については、さらなる調査を行う必要がある。

4. 結言

導電性の異なるポリピロール (PPy) を作製し、電気穿孔の対向電極として利用した。HeLa 細胞に電気穿孔を行った結果、導電性の小さい PPy 電極を用いた電気穿孔の方が分子導入率、細胞生存率ともに増加することが明らかになった。

謝辞

実験にご協力いただいた東京立大学の三好洋美准教授に感謝申し上げます。また、本研究の一部は 2021 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。

参考文献

- [1] Viktoriya STina Batista Napotnik, Tamara Polajzer, Damijan Miklavcic, Cell death due to electroperforation – A review, *Bioelectrochemistry*, 141, (2021), 107871
- [2] 金子新, 加藤陽平, 数藤智美, 微細構造化 PPy 電極の作製と細胞の電気穿孔への応用, 2021 年度精密工学会春季大会, (2021), 741-742
- [3] Richard Balint, Nigel J. Cassidy, Sarah H. Cartmell, Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 10, (2014), 2341-2353
- [4] Koudai Kawaguchi, Kenta. Kato, Arata Kaneko, Sustained Drug Release System using Poly-pyrrole Membrane Micro-actuator, *Proc. 18th ICPE*, (2020), F-2-6.