



Title	導電性高分子を用いたマウス線維芽細胞培養実験
Author(s)	阿部, 弥生; 川北, 悠介; 多田, 和也 他
Citation	電気材料技術雑誌. 2010, 19, p. 27-32
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/76857
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

導電性高分子を用いたマウス線維芽細胞培養実験

阿部 弥生¹⁾, 川北 悠介²⁾, 多田 和也⁴⁾,

藤里 俊哉³⁾, 宇戸 祐仁³⁾, 小野田光宣⁴⁾,

¹⁾ 大坪電気株式会社 リニューアル事業部 〒130-0014 東京都墨田区亀沢 1-14-5

²⁾ 関西電力株式会社 滋賀電力所 〒520-0822 滋賀県大津市秋葉第 14 番 13 号

³⁾ 大阪工業大学 大学院工学研究科 生体医工学専攻 〒535-8585 大阪府大阪市旭区大宮 5-16-1

⁴⁾ 兵庫県立大学 大学院工学研究科 電気系工学専攻 〒671-2280 兵庫県姫路市書写 2167

培養細胞と情報交換できる新しい細胞培養システムを構築するため、ポリピロール(PPy)やポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン)(PEDOT)で被覆した導電性ガラス基板上で 7 日間線維芽 3 細胞を培養した。これら高分子は、それらの表面で培養した細胞の分泌機能をささえる機能を有していることが明らかとなった。PPy や PEDOT で被覆した電極は、細胞の培養に有効であるかも知れない。

キーワード：導電性高分子、ポリピロール、ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン)、培養細胞、生体親和性

Culture Experimental for Mouse Fibroblast using Conductive Polymers

Yayoi ABE¹⁾, Yusuke KAWAKITA²⁾, Kazuya TADA⁴⁾, Toshia FUJISATO³⁾, Sadahito UTO³⁾, Mitsuyoshi ONODA⁴⁾

¹⁾ Renewal Division, Otsubo Electricity Co., Ltd., 1-14-5 Kamesawa, Sumida-ku, Tokyo 130-0014, Japan

²⁾ Shiga Electricity, The Kansai Electric Power Co., Ltd., 14-13 Akihadai, Otsu, Shiga 520-0822, Japan

³⁾ Major in Biomedical Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology,

5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, Osaka 535-8585, Japan

⁴⁾ Major in Electrical Engineering and Computer Sciences, Graduate School of Engineering, University of Hyogo,
2167 Shosha, Himeji, Hyogo 671-2280, Japan

In order to develop a novel cell-culture system which makes it possible to communicate with cultured cells, fibroblasts were cultured on polypyrrole (PPy)- and poly(3,4-ethylenedioxothiophene) (PEDOT)-coated conductive glass substrates for 7 days. The result reveals that the PPy and PEDOT films support the secretory functions of the cells cultured on its surface. The PPy- and PEDOT-coated electrodes may be useful to culture the cells on.

Keywords : conductive polymers, polypyrrole, poly(3,4-ethylenedioxothiophene), culture cell, biocompatibility,

1. はじめに

近年の目覚ましい医療技術の進歩とともに、医療器具の改良や改質に関する研究が盛んに検討されている。例えば、人間の神経系に直接情報の入出力を行う神経インターフェース技術が注目されている。末梢神経系に対する多チャンネルで高精度の信号入力が可能であれば、運動指令信号による外部機器の制御や外部感覚信号による人工感覚など、従来技術では不可能であった治療法の実現が期待される。このような神経インターフェース技術を実現するためには、長期間の埋め込みに適した生体適合性を有し、その間安定した信号入力が可能で、目的とする装置の制御に十分なチャネル数を有する神経刺激電極の開発が不可欠である。

現在、神経刺激電極としては、ITO(Indium Tin Oxide)や白

金などの金属電極で作製されているが、生体組織と金属電極との親和性が問題となっている。その対策として、これまで細胞外マトリクス（生物において細胞の外に存在する超分子構造体）の一つであるコラーゲンや細胞接着因子（細胞間の接着）であるポリリジンを用いて電極表面を被覆して親和性を付与していた⁽¹⁾。しかし、電極表面を被覆することによりインピーダンスの増加をもたらし、入出力する刺激信号の効率が低下する原因となっている。そのため、生体組織との親和性を有し、刺激信号の効率を低下することの無い神経刺激電極の開発が必要で、神経インターフェース技術の展開においても極めて重要である。

一方、主鎖にπ電子共役系が高度に広がった導電性高分子は、相対的に小さい禁止帯幅を有する有機半導体と考えられ、物理化学の分野では新素材としてその基本的性質や機

能応用などが活発に研究されている。今まで、半導体素子やオプトエレクトロニクス素子として導電性高分子の様々な応用が提案されている。しかし、二次電池やコンデンサを除いて、これらの応用は実使用の段階に達していないのが現状である⁽²⁾。高分子の有する潜在的能力を充分活用するためには、環境安定性に優れ、高分子の形状で加工できること。さらに、優れた電気的、光学的、機械的性質なども有していることが望ましい。しかし、剛直な二重結合からなるこれら導電性高分子の多くは、強い分子鎖間相互作用を示し、通常は不溶、不融のため成形性、加工性に乏しい。これは、実際に導電性高分子を活用する場合、大きな障害でもあり解決すべき重要な問題である。しかし、これら導電性高分子の分子構造の適当な修飾、たとえば長いアルキル側鎖の導入、重合過程の検討などにより、ある溶媒に溶解し、比較的低温で溶融する導電性高分子が合成できるようになり、環境安定性にも優れていることがわかつてきて、導電性高分子の研究は新しい段階に差し掛かっていると考える。

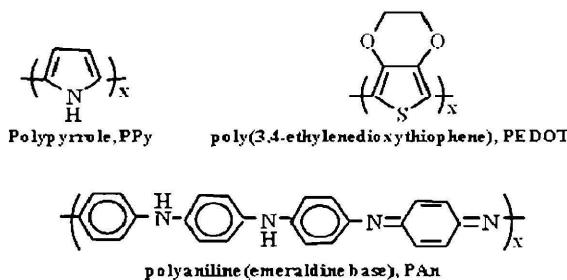


Fig. 1. Examples of conductive polymer with good environmental stability.

図1. 環境安定性に優れている導電性高分子の例

このような導電性高分子が金属と比較して高い生体適合性を有するならば、医用生体工学における新しい人工臓器材料としての機能応用が期待され、導電性を有することから人工視覚、人工聴覚あるいは人工網膜などに用いられる体内埋め込み型神経刺激電極の開発を基本とする神経インターフェース技術の新たな展開、進展が考えられる。これまで、数多くの導電性高分子が合成されているが、図1に示す分子構造のポリピロール (PPy) はドープ状態がもっとも安定で、ポリアニリン (PAn) やポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン) (PEDOT) などとともに環境安定性に優れ、比較的高い導電率を有しているので非常に魅力的な材料である。そこで、本研究では、体内埋め込み型神経刺激電極の開発を目的として、PPyを中心に生体との親和性について評価を行った。PPyの生体親和性については、神経細胞培養実験を行い評価した。作製したPPy膜上にマウスから摘出した線維芽細胞 (L929) や筋芽細胞(C2C12)などを培養し、その生存、成長を観察した。

2. 実験方法

〈2・1〉 導電性高分子膜の作製⁽³⁾ 電解重合法による導電

性高分子膜の作製は、一般に図2に示す電解重合装置を用いて行われる。電解重合反応に及ぼす溶媒、支持電解質、重合電圧、重合温度など種々の影響については十分に明らかになっていない。従って、電解重合法による導電性高分子合成の反応機構は、電解液の組成や電解条件など種々の諸因子が非常に複雑に電極反応と関与しているため明確には解明されていないのが現状である。

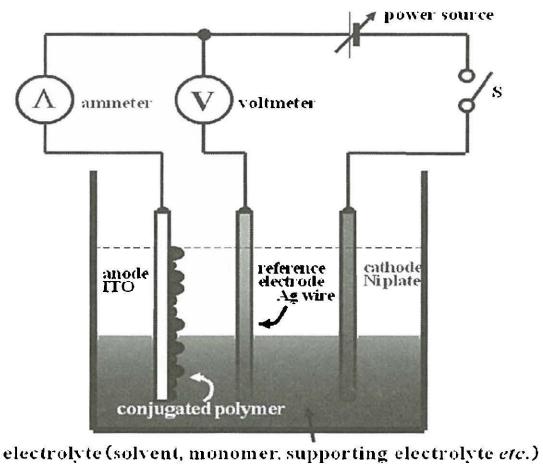


Fig. 2. Equipment of electrochemical polymerization.

図2. 電解重合装置

(a) ポリピロール (PPy) 膜の作製 図2に示す電解重合装置の作用極としてITO (インジウム-錫酸化物) 導電性ガラス板、対向電極をニッケル (Ni) 板、参照電極に銀 (Ag) 線を用いて、電解重合をおこなった。電解重合に用いた重合液の組成はモノマーとしてピロール0.1mol/l (東京化成、純度98%) 支持電解質として四フッ化ホウ酸テトラブチルアンモニウム (TBABF₄, 東京化成), p-トルエンスルホン酸ナトリウム (p-TSNa, 東京化成), 硫酸水素テトラ-n-ブチルアンモニウム (TBAHSO₄), テトラメチルアンモニウム-p-トルエンスルホネート (TMA-p-TS, 東京化成), テトラブチルアンモニウムプロミド (TBABr), n-デジルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS), テトラ-n-ブチルアンモニウムクロリド (TBACl)などを用い0.3~1mol/lの範囲で濃度を変えた。溶媒には蒸留水を使用した。

電解重合にはポテンシオスタット (北斗電工, HSV-100) を用い重合電位1.5V (vs Ag/Ag⁺) で、重合時の通過電荷量を変化して重合した。また、製膜したPPy膜の厚さは、多重干渉顕微鏡 (オリンパス, USPM-RU) を用いて多重干渉法により測定した。厚さ約300nmのPPy膜を主として実験に用いた。得られたPPy膜の導電率は約30~50 S/cm程度であった。

(b) ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン) (PEDOT) 膜の作製 F.Jonasら⁽⁴⁾は図1に示す分子構造のPEDOTが極めてすぐれた透明性を有し、また通常の環境下で安定性が非常に優れていることを見出している。導電性高分子を実際に応用しようとする場合、環境安定性は極めて重要となり、ドープしたPPyやポリチオフェン、PTが比較的環境安定性に優れているのは、窒素原子や硫黄原子による正電荷の安定

化効果に起因していると考えることができる。一方、PEDOTは酸化されやすいβ位がエチレンジオキシ基でブロックされているため、熱的安定性が高くPPyに比べてより高温、長時間の安定性に優れている。

図2に示す電解重合装置を用いて、ITO導電性ガラス基板を作用極、対向電極をNi板、参照電極をAg線として、電解重合をおこなった。電解重合に用いた重合液の組成はモノマーとして3,4-エチレンジオキシチオフェン0.1mol/l(東京化成、純度98%) 支持電解質として四フッ化ホウ酸テトラブチルアンモニウム(TBABF₄、東京化成)、0.3mol/l～1mol/lの範囲で濃度を変えた。溶媒にはアセトニトリルを使用した。電解重合にはポテンシオスタット(北斗電工、HSV-100)を用い重合電位2.0V(vs Ag/Ag⁺)で、重合時の通過電荷量を変化させて厚さ約400nmのPEDOT膜を得た。得られたPEDOT膜の導電率は、約120～200S/cm程度であった。

(2・2) 細胞の継代 継代とは植え継ぎ(subculture)のことである。細胞を他の培養容器に移し替えることをいう。ここでは、線維芽細胞L929および筋芽細胞C2C12の継代をそれぞれ次のような手順で行った。尚、細胞培養に使用したディッシュは、線維芽細胞L929の培養ではコラーゲン無被覆ディッシュ(コラーゲンの被覆をしていないディッシュ)を、筋芽細胞C2C12の培養にはコラーゲン被覆ディッシュを使用した。細胞培養の様子を図3に示す。

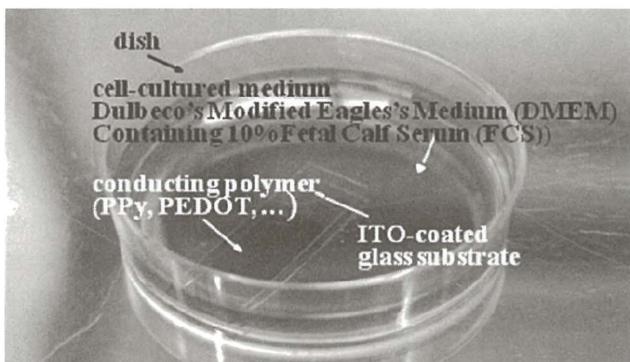


Fig. 3. Appearance of cell culture.
図3. 細胞培養の様子

(a) マウス結合組織由来の線維芽細胞L929の継代

- ・コラーゲン無被覆ディッシュの古い培養液を抜き取る。
- ・PBS (phosphate buffered saline, 磷酸緩衝生理食塩水) 5mlを加えて細胞を洗う。
- ・PBSを吸引除去し、コラーゲン無被覆ディッシュの底に張り付いている細胞を剥離するためトリプシン液3mlを加え、CO₂インキュベータ37°Cで約5分間放置する。
- ・コラーゲン無被覆ディッシュに増幅用の血清10%Fetal Calf Serum (FCS) 含有の培養液Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を加えL929細胞を培養した。

(b) マウス骨格由来の筋芽細胞C2C12の継代

- ・コラーゲン被覆ディッシュの古い培養液を抜き取る。
- ・PBS (phosphate buffered saline, 磷酸緩衝生理食塩水) 5mlを加えて細胞を洗う。

- ・PBSを吸引除去し、コラーゲン被覆ディッシュの底に張り付いている細胞を剥離するためトリプシン液3mlを加え、CO₂インキュベータ37°Cで約5分間放置する。
- ・コニカルチューブに入れ、遠心分離器にかけ、細胞を沈澱させトリプシン液を抜き取る。
- ・コラーゲン被覆ディッシュに増幅用の血清10% Fetal Bovine Serum (FBS) 含有の培養液Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)でC2C12細胞を培養した。

導電性高分子膜上での培養実験は、電解重合過程で導電性高分子膜表面に付着したり、内部に含有している不純物(未反応モノマー、反応過程で生成されるオリゴマーなど)を除去するため、ITO導電性ガラス基板からPPy、EDOTを剥離することなく蒸留水、アセトニトリル、エタノールで十分洗浄し、乾燥した。ディッシュに導電性高分子被覆ITO導電性ガラス基板を入れ、上述の継代を実行した。

3. 実験結果および検討

(3・1) 線維芽細胞L929培養実験 線維芽細胞は結合組織を構成する細胞の一つで、細胞質は核小体が明確な楕円形の核を有し塩基好性を示す。本実験ではマウス結合組織由来の線維芽細胞株L929細胞を用いた。細胞培養は、37°Cで数日5%CO₂/95%空気の加湿されたインキュベータ中で行った。図4はコラーゲン無被覆ディッシュにL929線維芽細胞を蒔いて24時間後、倒立顕微鏡を用いて観測した細胞の写真を示す。L929線維芽細胞がコラーゲン無被覆ディッシュ表面上に接着し紡錘状に伸展していることが観測された。

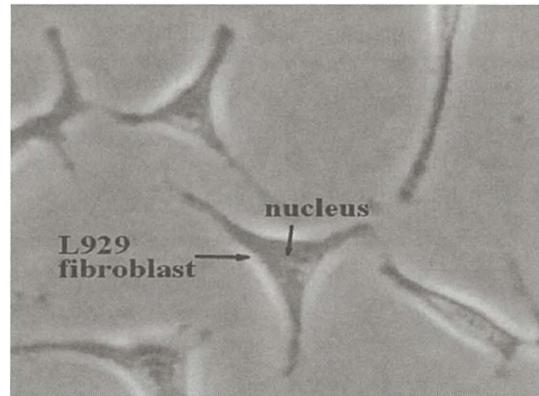


Fig. 4. A macro photograph of fibroblast L929.
図4. 線維芽細胞 L929 顕微鏡写真

図5はコラーゲン無被覆ディッシュにL929線維芽細胞を蒔いたのち、その増殖過程を観察した結果である。細胞はコラーゲン無被覆ディッシュ表面上で増殖し、96時間後にはコラーゲン無被覆ディッシュ全面に細胞が増殖している。同様の実験をPPy被覆ITO導電性ガラス基板をコラーゲン無被覆ディッシュに入れ、PPy膜上およびEDOT膜上にL929線維芽細胞を蒔いて増殖過程を観察した結果をそれぞれ図5(b), (c)に示す。コラーゲン無被覆ディッシュを用いた培養実験と同様に24時間後、細胞はこれら導電性高分子膜上に

接着し増殖している。96時間後には導電性高分子膜一面に細胞が増殖していた。導電性高分子膜の有するドーパントは、PPy膜でTBABr、PEDOT膜でTBABF₄と異なるが、細胞の増殖にはドーパントの種類の影響はなさそうである。

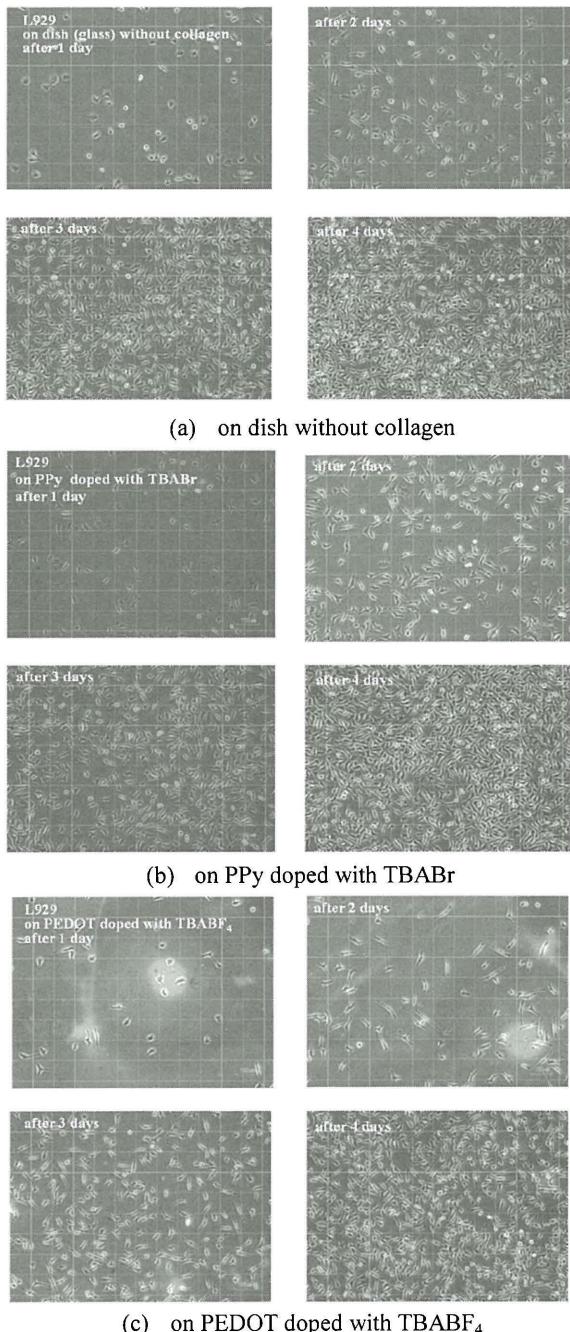


Fig. 5. Appearance of fibroblastic cell L929 culture.

図5. 線維芽細胞L929培養の様子

一般に、微生物学の分野では、生存細胞数の指標としてコロニー形成単位 (colony-forming unit, CFU) が用いられ、液体中ではCFU/ml、固体表面上ではCFU/gで表わされる。本実験では、上述した観察写真から、単位面積当たりの生存細胞の数を求めた。得られた単位面積当たりの生存細胞の数を時間に対してプロットすると図6に示す細胞増殖特性が

得られる。同図に示すように、単位面積当たりの細胞含有量はコラーゲン無被覆ディッシュで培養した場合わずかに多いが、培養4日間でTBABrドープPPyとTBABF₄ドープPEDOTの両方の培養細胞の間で顕著な差は認められない。

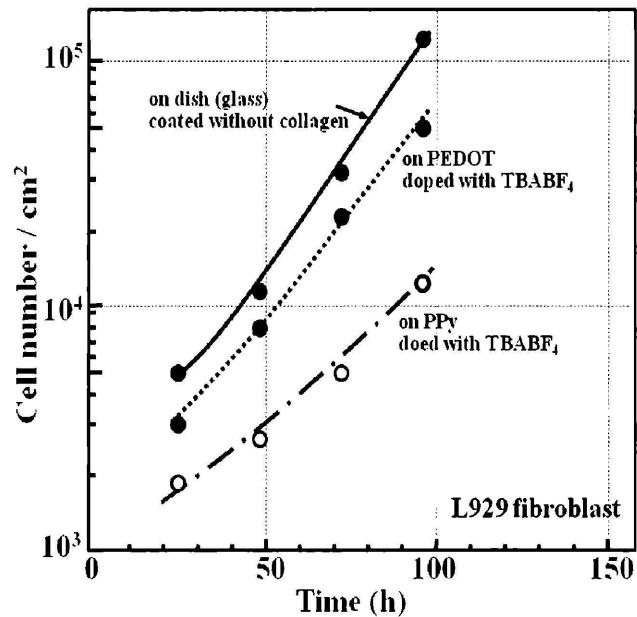


Fig. 6. Relation between number of cells for each unit area of fibroblast L929 and culture days.

図6. 線維芽細胞L929の単位面積当たりの細胞数と培養日数の関係

この曲線の傾きから求めた細胞数の倍加時間は、コラーゲン無被覆ディッシュ上で培養した場合、約23～28時間であった。市販のコラーゲン被覆ディッシュ上でも倍加時間は23時間前後となることが報告されている⁽⁵⁾。一方、電解重合法で得たPPy膜上およびPEDOT膜上でも、倍加時間は約25時間前後と求まり、市販されている培養ディッシュと同様に良好な培養基質であると考えられる。

(3-2) 筋芽細胞C2C12培養実験 筋芽細胞とは筋線維の由来となる单核の細胞で、この細胞が多数融合して合胞体を形成すると筋線維を形成する。図7に示すように筋線維の細胞質は筋形質と呼ばれ、筋細線維で占められている。

(3-3) 細胞増殖におよぼす支持電解質濃度の影響 図8は支持電解質をTBAClとし、その濃度を種々変化して電解重合したPPy膜を用いて行った培養4日後の観察結果から求めた単位面積当たりの細胞数と電解質濃度の関係を示す。培養細胞数は約8×10³～1.4×10⁴個/cm²の範囲にあり低濃度ほど培養細胞数が多くなっているが、PPy膜と導電性ITOガラス基板との密着性など外乱の影響を考えると、支持電解質の濃度によらず培養細胞は増殖するものと考える。

(3-3) 細胞増殖におよぼす支持電解質の種類の影響 第3.1節で細胞培養には導電性高分子の有するドーパントの影響は無いようであることを述べた。支持電解質の濃度を0.3mol/l一定として、LAS, TBAHSO₄, TBABr, TBAClおよびp-TSNaの5種類の電解質を用いてPPy膜を電解重合し、L929

線維芽細胞の増殖に及ぼすドーパントの種類による影響を把握するためPPy膜を用いた培養実験を行った結果を図9に示す。4日間培養した後の単位面積当たりの細胞数は、TBAHSO₄をドーパントとするPPy膜で多くなっており、見掛け上増殖が活発である。しかし、他の4種類のドーパントを含むPPy膜では、ほぼ同じ細胞数が得られており、細胞増殖におよぼす支持電解質の種類の違いは無いと考えるのが妥当ではないかと考える。しかし、細胞の培養は基板としているITO導電性ガラスとPPy膜との密着性に大きく影響され、本実験結果だけから単純には結論できない。密着性の問題を考慮しつつ、多種類の支持電解質を用いてさらに詳細な検討が必要である。



Figure 7 Appearance of myoblast C2C12 culture.

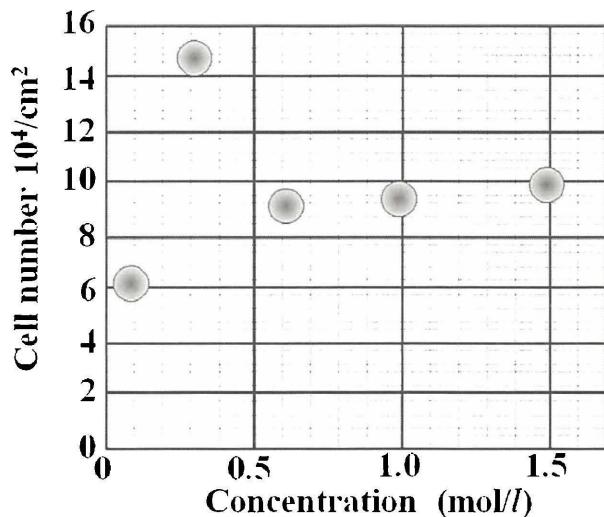
(on PPy doped with *p*-TSNa)図7. 筋芽細胞培養の様子 (*p*-TSNa でドープした
PPy 膜表面上)

Fig. 8 Relation between number of cells for each unit area and concentrations of supporting electrolyte.

図8. 単位面積当たりの細胞数と支持電解質濃度の関係

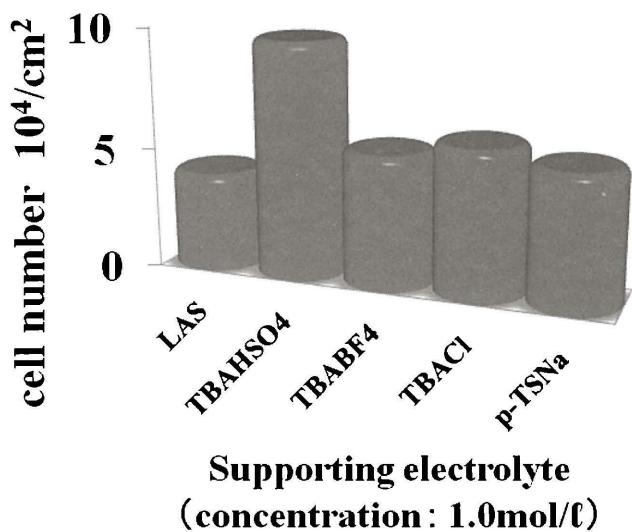


Fig. 9. Relation between number of cells for each unit area and kinds of supporting electrolyte.

図9. 単位面積当たりの細胞数と支持電解質濃度の関係

4.まとめ

マウス結合組織由来の線維芽細胞株L929細胞およびマウス骨格筋由来筋芽細胞株C2C12細胞を導電性高分子膜(PPyおよびPEDOT)上に蒔いて、これら細胞の増殖過程を観察した。L929線維芽細胞およびC2C12筋芽細胞は、形態を変えることなく市販の培養ディッシュ上で培養した細胞と比較して、ほぼ同様に増殖し親和性を保持していることを観察した。すなわち、本実験で用いた2種類の導電性高分子、PPy膜およびPEDOT膜は、表面で培養した細胞の分泌機能を保持していることが分かった。従って、PPy被服電極やPEDOT被服電極は、細胞を培養するのに有効であることから、生体適合性のある神経刺激電極として利用できる可能性を示唆した。

参考文献

- (1) C. D. James, R. Davis, M. Meyer, A. Turner, S. Turner, G.. Withers, L. Kam, G. Bunker, H. Craighead, M. Isaacson, J. Turner, W. Shain: "Aligned Microcontact Printing of Micrometer-Scale Poly-L-lysine Structures for Controlled Growth of Cultured Neurons on Planar Microelectrode Arrays", IEEE Transactions on Biomedical Engineering, Vol. 47, No. 1, pp. 17-21 (2000).
- (2) 吉野勝美, 小野田光宣: 高分子エレクトロニクス, pp.266-367, コロナ社 (1996).
- (3) 阿部弥生, P. C. Mathur, P. K. Bhatnagar, 多田和也, 小野田光宣: "導電性高分子／絶縁性高分子複合膜の新規作製法", 電気学会論文誌A, Vol.128, No.12, pp.703-709 (2008).
- (4) F.Jonas and L.Schrader: "Conductive Modification of Polymers with Polypyrrole and Polythiophene", Synth.Met., Vol.41-43, pp.831-836 (1991).
- (5) K.Yamauchi, M.Maniwa T.Mori: "Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata", J.Biomater.Sci.Polym.Ed., Vol.9, No.3, pp.259-270 (1998).

(平成22年 10月31日受理)



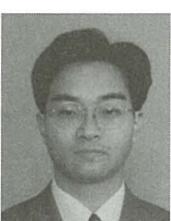
阿部 弥生

1981年3月6日生。2009年3月兵庫県立大学工学部電子情報電気工学科卒業。同年4月株式会社エヌデン入社。2010年10月大坪電気株式会社へ転職し、現在、同社リニューアル事業部にて電気工作物の設計に従事。在学中は、主として導電性高分子の電気化学的性質と生体適合性に関する研究に従事。電気設備学会会員。



川北 悠介

1984年5月13日生。2007年3月大阪工業大学工学部電気電子システム工学科卒業。2009年3月同大学大学院工学研究科修了。同年4月関西電力株式会社入社。現在、滋賀電力所にて電力の保守管理に関する業務に従事。在学中は、主として生体エレクトロニクスに関する研究に従事。電気学会会員。



多田 和也

1972年1月27日生。1992年3月奈良工業高等専門学校卒業。同年4月大阪大学工学部電子工学科へ編入学。1996年3月同大学大学院工学研究科博士前期課程修了。1998年同後期課程修了。同年4月姫路工業大学助手、助教授を経て、2006年4月兵庫県立大学大学院工学研究科准教授。博士(工学)。現在、主として導電性高分子の電子光物性と電子素子応用に関する研究に従事。電子情報通信学会、電気学会、応用物理学会、電気化学会会員。



藤里 慎哉

1963年2月18日生。1986年3月京都大学工学部高分子化学科卒業。1991年京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻博士後期課程認定退学。京都大学生体医療工学研究センター（現在、再生医科学研究所）研修員、マギル大学付属モントリオール総合病院研究所研究員、国立循環器病センター研究所再生医療部機能再生研究室長などを経て、2007年4月から大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻教授。現在に至る。工学博士。バイオマテリアル、再生医工学に関する研究に従事。バイオマテリアル学会、再生医療学会、日本生体医工学会、人工臓器学会、高分子学会、組織工学会会員。



宇戸 穎仁

1969年8月24日生。1990年3月奈良工業高等専門学校卒業。同年4月愛媛大学工学部電気工学科編入学。1992年4月同大学大学院工学研究科博士前期課程入学。1997年3月同大学同研究科博士後期課程修了。同年4月大阪工業大学工学部電気工学科講師、助教授を経て、2008年4月同大学大学院工学研究科生体医工学専攻准教授。現在、液晶の電気、光物性、電気生理に関する研究に従事。日本物理学会、電気学会、日本液晶学会、応用物理学会、日本神経学会、日本生体医工学会会員。



小野田 光宣

1951年8月19日生。1975年3月姫路工業大学工学部電気工学科卒業。1977年3月同大学大学院工学研究科修士課程修了。同大学助手、助教授、教授を経て、2004年4月から兵庫県立大学大学院工学研究科教授。工学博士（大阪大学）。1994年から1年間ペンシルベニア大学化学科客員教授（2000年ノーベル化学賞受賞者 Alan G. MacDiarmid 教授（2007年2月7日逝去）研究室に滞在）。現在、主として導電性高分子の電気化学物性と生体機能応用研究に関する従事。応用物理学会、電子情報通信学会、電気学会、高分子学会、日本液晶学会、IEEE 会員。