

## マイクロコイルを用いたバイオアクチュエータの作製

## Development of bioactuator using micro coil spring

○ 高橋優輔 (工学院大) 杉本健太 (工学院大) 日野遥 (工学院大) 橋本成広 (工学院大)

Yusuke TAKAHASHI, Kogakuin University  
Kenta SUGIMOTO, Kogakuin University  
Haruka HINO, Kogakuin University  
Shigehiro HASHIMOTO, Kogakuin University

**Abstract:** We reported to develop bio-actuator using micro coil. However, cell did not adhere on micro coil, and did not contract micro coil. In this study, adhesion of cell on the micro coil was accelerated with double seeding. Micro coil has following dimension: 85  $\mu\text{m}$  diameter of wire, 150  $\mu\text{m}$  pitch and 2 mm length. C2C12 (muscle cell) was used. Trials divided into 3 groups. In the first group electric stimulation was not applied (C-C group). In the second group electric stimulation was applied between first seeding to second seeding (E-C group). In the third group electric stimulation was applied every day. Electric stimulation terms was 30 min/day. C-C group and E-C group accelerated cell adhesion on the coil spring. But, E-E group did not accelerate cell adhesion on the coil spring. C-C group and E-C group showed that double seeding was effective to cell adhesion on micro coil.

**Key Words:** Biomedical Engineering, Cell Adhesion, Bioactuator, C2C12, Electric Stimulation

## 1. 背景

バイオアクチュエータは従来のアクチュエータと比較して、小型、軽量、柔軟性といったメリットを持つ。しかし、細胞単体では力学的強度が低いと、他の材料と複合して使用することが必要である。中尾らはマイクロ加工技術と骨格筋細胞を用いてバイオアクチュエータの作製を行っている<sup>(1)</sup>。また、Tanakaらは心筋を用いたバイオポンプの作製を行っている<sup>(2)</sup>。

我々もマイクロコイルを用いてバイオアクチュエータの作製を試みている<sup>(3)</sup>。先行研究ではマイクロコイルに繊維状のものが接着している様子を報告した。しかし、電気刺激を与えてもマイクロコイルの収縮は起こらなかった。これはマイクロコイル上に接着した細胞が少なかつたため、細胞の分化、収縮力不足によって、マイクロコイルを収縮させることができなかつたと考えた。そこで、繊維状の物質は細胞が生成した細胞外マトリクスであると仮定し、細胞を再度播種することで細胞の接着の影響を見ることを目的とした。

## 2. 方法

## 2.1 マイクロコイル

マイクロコイルは株式会社ハイレックス社から購入した。材質はJIS2種の純チタンである。マイクロコイルの寸法はチタン線の直径、ピッチ間距離、全体長さ、それぞれ85  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$ 、2 mmである。マイクロコイルは電気刺激を与えやすいように両端を引き伸ばし加工してあるものを用いた。

マイクロコイルを基板上に固定するために、生体適合性に優れた材料であるPDMS (Polydimethylpolysiloxane) の作製を行った。PDMSはダウコーニング社から購入し、主材と硬化剤を混合することで硬化が始まる樹脂材料である。本研究では、主材と硬化剤を10:1の割合で混合し、直径35 mmのガラス上に6 ml入れ、100°Cに加温したオーブン内で硬化させた。その後、直径10 mmのポンチと20 mmのポンチを用いてPDMSリングを作製した。

マイクロコイルに細胞をより多く接着させるために、ノントリートメントの6ウェルディッシュを用いた。6ウェルディッシュの3箇所マイクロコイルを置き、PDMSの



Fig. 1 Micro coil spring.

自己接着性を用いてPDMSリングでマイクロコイルを挟み固定した。

## 2.2 細胞培養

細胞はC2C12 (マウス横紋筋由来筋芽細胞) を用いて実験を行った。培地はD-MEM基礎培地にウシ胎児血清を10%、ペニシリンストレプトマイシンを1%添加した培地を使用し、培地交換は2日に1回行った。2度目の細胞の播種は1度目の細胞播種から8日後に行った。細胞の播種濃度は1度目、2度目ともに先行研究と同様に10000 cells/cm<sup>2</sup>とし、播種した。

先行研究では電気刺激を与えながら培養することでマイクロコイルのピッチ間に繊維状の物質が生成されることを報告した。そこで、繊維形状の影響を調べるために静置—静置 (C-C) 群、電気—静置 (E-C) 群、電気—電気 (E-E) 群の3群の比較を行った。電気刺激は30分/日の頻度で与えた。波形はパルス波を用い、周波数1 Hz、パルス幅1 msとした。電圧はマイクロコイルと直列に接続した抵抗間の電圧をオシロスコープによって観察した。回路図を図3に示す。

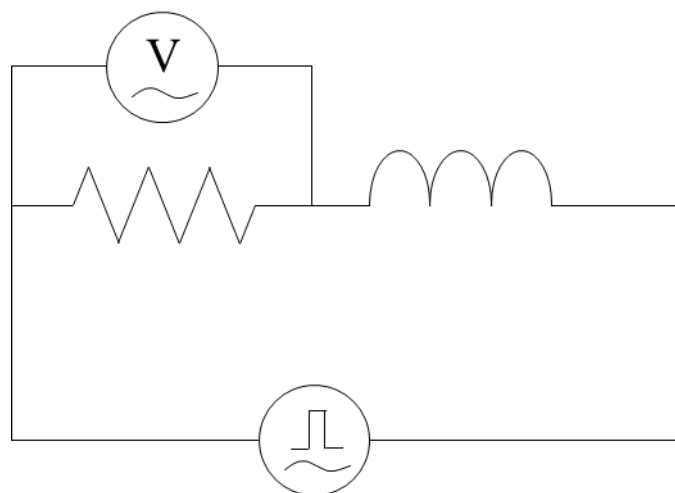


Fig. 2 Electric circuit

### 2.3 評価方法

マイクロコイルは光が投下しないため、位相差顕微鏡での評価は困難である。そこで、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行うために細胞の固定、脱水を以下の手順で行った。4%のパラホルムアルデヒドに20分間浸漬し前固定を行い、50%, 70%, 80%, 90%, 95%濃度のエタノールにそれぞれ15分ずつ浸漬した。続いて、99.5%濃度のエタノールに8分間浸漬を3回行った。続いて、臨界点乾燥を行い、完全に脱水を行った。固定、乾燥した試料に白金を蒸着し走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いてマイクロコイル表面に接着している細胞の観察を行った。

### 3. 結果

1度目の播種から培養8日目の細胞の図を図3に示す。コイルのピッチ間に細胞外マトリクス様の物質が形成されているのが確認できる。

続いて、2重播種を行うことで、C-C群、E-C群では細胞がチタンコイル上に接着している様子が観察できる。しかし、E-E群では細胞の接着はほとんど見ることができなかった。

### 4. 考察

本研究では、マイクロコイル上により多くの細胞を接着させるために細胞の2重播種を行った。1度目に播種した細胞が生成する細胞外基質がマイクロコイル上に接着することで細胞が接着しやすくなると考えた。SEM観察結果より、C-C群、E-C群ではマイクロコイル上の細胞接着が促進されたことを確認できた。しかし、E-E群では細胞の接着が促進されることはなかった。

先行研究ではマイクロコイルに細胞を播種し、静置培養、電気刺激培養の比較を行っていた。両群とも繊維状の物質は確認できるが、細胞の接着の確認はできなかった。本研究では、マイクロコイル上に細胞が周密状態で接着している様子が観察できている。このことから、細胞の2重播種はマイクロコイル上に細胞を接着させるための手段として有効であることがわかる。

本研究では、全ての群においてピッチ間に繊維状の物質が形成されていなかった。これは1度目の播種の培養日数が8日と少なかったことが考えられる。先行研究では30日間培養を行っていた。今後、バイオアクチュエータを作製するためには、マイクロコイルのピッチ間に繊維状の物質が接着し、その上に細胞が接着することが重要である。

そのため、1度目の播種の培養日数についても最適化する必要がある。



Fig. 3 Cell culture for 8 days.

E-E群では2重播種を行っても細胞接着の促進を促すことはできなかった。これは、2重播種の際にPDMSリングが取れてしまったことが原因として挙げられる。電気刺激を与える際にマイクロコイルが培地からコイルが出ないように十分気をつけて実験を行っていたものの、実験中はインキュベータ内に入れてしまうため、確認することができなかった。実際には培地からコイルが飛び出してしまい、栄養不足で細胞が剥がれてしまった可能性がある。

細胞の2重播種には多大な時間がかかってしまうことが問題として挙げられる。しかし、時間をかけることで、コイルのピッチ間に細胞外基質が生成されることが報告されている。これは単純なコーティングではできない可能性がある。今後はコラーゲンなどのコーティングと比較を行って行くことで、さらに2重播種の有用性を考察していく必要がある。

### 5. 結論

C2C12を2重播種することでマイクロコイルへの接着を促進させることが可能である。

### 参考文献

- (1) 中尾 誠, 赤土 和也, 山崎 健一, 寺田 堂彦, 藤里 俊哉, 吉浦 昌彦, 筒井 博司, 培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用, 生体医工学, Vol. 47, No. 6, pp. 560- 565, 2009.
- (2) Tanaka, Y., Morishima, K., Shimizu, T., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T. and Kitamori, T., An actuated pump on-chip powered by cultured cardiomyocytes, Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology, Vol. 6, No. 3, pp. 362-368, 2006.
- (3) Takahashi, Y., Noda, K., Hashimoto, S., Yarimizu, Y. and Hino, H., Culture of Myoblast on Micro Coil Spring with Electric Pulses, 19th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Proceedings, Vol. 2, pp. 298-303, 2015.