

は全体が同期して拍動する構造体が得られ、この剣山串刺し技術の可能性が一気に広がった。

4. 作業の自動化構想

しかし、直径0.5mm、場合によっては0.1mm程度のスフェロイドを手作業で細い針に、しかも任意のXYZの位置に刺入するのは非常に時間のかかる困難な作業であった。しかもクリーンベンチ内に実体顕微鏡を持ち込んで作業を行うが、あまりにも長時間かかるためか、高頻度でコンタミを起こしていた。

手作業で剣山にスフェロイドを刺していく作業はとても毎回できる実験ではなかった。基本的な原理が完成した次は作業をなんとか自動化できないかと考えた。しかし、共同研究先の企業は本業が多忙とのことで、なかなか自動化のための研究開発に時間を割いてもらえなかった。

なんとなく時間が過ぎていく中で、顕微鏡用のマイクロインジェクションの写真が掲載された科学雑誌の表紙が目にとまった。調べてみると、マイクロメートル単位の精度で受精卵を吸着・固定し、ガラス製の極細針を刺入している。まさに筆者らがやろうとしているのと基本的には同じ動作であった。

理化学機器の会社の方に相談して、マイクロインジェクションの装置のデモをお願いした。ジョイスティックを用いて手で操作する装置であったが、一週間借りる約束でいろいろ遊んでいるうちに、装置本体の裏にRS-232Cのポートがついてあるのに気付いた。日本ではサポート外であったらしいが、英文マニュアルにはRS-232Cのコマンド一覧が記載されており、いわゆるコマンド・スクリプトレベルで非常に簡単に操作できることが分かった。筆者が小学校高学年の頃、近所の電気屋でパソコン、特にNECのPC-6001シリーズを買ってもらったのに、足しげく通いプログラミングしていた頃の記憶がよみがえり（医者になってからはPCの自作を行うようにはなっていたが、プログラミングは小～中学生時代にN60-BASICとZ80のアセンブラを少々かじった程度で、Windows

のプログラミングの知識は皆無であった) ネットでRS-232Cを制御するための簡単なプログラミング方法がないか調べているうちに、数年前は10万円前後で販売されていたプログラミングの開発ソフトがほぼ無償で提供されているのに気付いた。マイクロソフト社のVisual BASICのexpress版という機能制限版ではあったが、筆者らの期待する動作はすべて可能であった。これら開発環境をダウンロードして書店で数冊の入門書を買って、数ヶ月試行錯誤しているうちに、このマイクロインジェクションの装置をパソコンから自由に制御できるようになった。こうして従来極細のピンセットやピペットでダイレクトにスフェロイドを捕まえ、剣山に刺していくという過酷で繊細な作業からの解放に目途がたった。しかし、未だ実体顕微鏡をのぞきながらスフェロイドを補足し、剣山に刺す作業はピンセットからマウスに変わっただけで、一個ずつ目視で操作を行うという意味では手作業のままであった。

なんとなくプログラミングの情報サイトを眺めていると、画像処理・画像認識の特集があり、USBの安価なWebカメラを使った顔認識や物体追跡といった近未来を予感させるような最新のテクノロジーを詰め込んだオープンソースプロジェクト(OpenCV)が無償で公開されていることに衝撃を受けた。早速入手してサンプルのプログラムを改造しているうちに、スフェロイドの自動認識ができるのではないかと確信できた。バイオ実験用の顕微鏡でパソコンにつないで画像を表示させることができる装置は非常に高価であったため、当時普及し始めたハイビジョンビデオカメラを中古で入手し、マクロレンズを装着した状態でスフェロイドを観察したところ、予想以上に良質な画像がリアルタイムで得られた。

これを標本撮影によく使われる雲台にセットした。画像の拡大縮小は赤外線リモコンを解析し、プログラムから制御できるようになった。フォーカスに関しては、リモコンからは制御できなかったため、フォーカシングにゴムベルトを着け、ステッピングモーターで回転させるという苦肉の

策をとった。この簡易的な顕微鏡—PCシステムを弄っているうちに、画像認識アルゴリズムのなかでも比較的単純なアルゴリズムの組み合わせで、画面に映っているスフェロイドの中心と半径、剣山の針の先端の位置などが算出できるようになった（一年近くを要したが）。

自分のデスク周りはプログラミングやPC関係の本で埋め尽くされ、バイオ・医学系の書籍がほとんどなくなったため、来客からは本当に医者なのかと冷やかされるようになっていた。九州大学整形外科での外来診療業務やカンファレンスなどの合間にコツコツとプログラミングとテストを繰り返しながら、着手して約2年である程度のデモンストレーションとして、スフェロイドの自動認識と捕獲、所定の剣山の位置への刺入ができるようになった。まさにガラクタを寄せ集めたような外観であったが、コンセプトを説明するには十分なプロトタイプであった（図5）。ちょうどプロトタイプのデモができるようになってきた頃、産総研の大串始先生の紹介で、金沢の澁谷工業^(株)という聞いたこともない企業から技術者の訪問を受けた。一般消費者向けのビジネスは行っていないため世間では無名な企業だったが、ビールやジュースの自動充填ラインや半導体製造装置、ニプロの透析装置、旧三洋のバイオ用のアイソレーターのOEM製造など、知る人ぞ知る技術力の高

い名門企業であった。別の案件での来訪であったがラボの案内をしているうちに、筆者の作っているプロトタイプのデモを行ったところ、剣山技術とプロトタイプに非常に興味を持っていただいた。彼らも再生医療の現場を広く熟知しており、足場材料を使わないと立体的な細胞構造体を作れないというのが再生医療、特にティッシュエンジニアリングの常識とされていた中、筆者らの細胞だけで立体構造体を作れるという独自の（変わった？）手法には大変興味を持っていただいた。筆者の素人感満載のプロトタイプをぜひ、澁谷工業の技術でより洗練したいとその場で申し入れられ、さっそく金沢の澁谷工業を訪問させてもらった。約半年間の仕様策定などの打ち合わせのうちに装置は完成した（図6）¹⁰⁾。

装置の調整とバージョンアップを行いながら、様々な細胞を使った構造体の作製を試みているが、予想以上の精度と性能、データに一同驚いている。まだまだ論文に投稿するにはデータが足りない案件がほとんどであるが、血管や肝臓など良好な予備実験が出始めている（図7）。懸案だった剣山も従来の手作業から量産の可能性を、大日本印刷^(株)を中心とした企業と追求している。また、当初は少人数での研究開発であったが、さまざまな方々のご支援をいただけるようになり、いくつかの研究室との共同研究や、企業とのコラボ

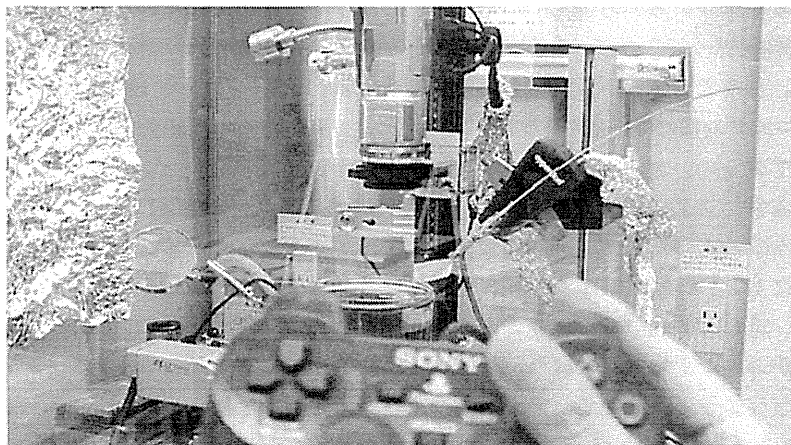


図5 手製バイオ3Dプリンター（初号機）



図6 澁谷工業との共同開発で完成したバイオ3Dプリンター（製品名Regenova：Cyfuse社より販売中）

レーションもすすんでおり、産学官連携の重要性をあらためて認識している。

将来的には、安全面とコスト性で他の技術よりも臨床応用、特に患者さんに優しい新しい医療技術が確立できるよう日々研究を行っている。そして、究極の目標である自分自身の細胞から拒絶反応の起きない自己臓器移植が実現できると期待されている。

文 献

1) International Summit on Transplant Tourism and

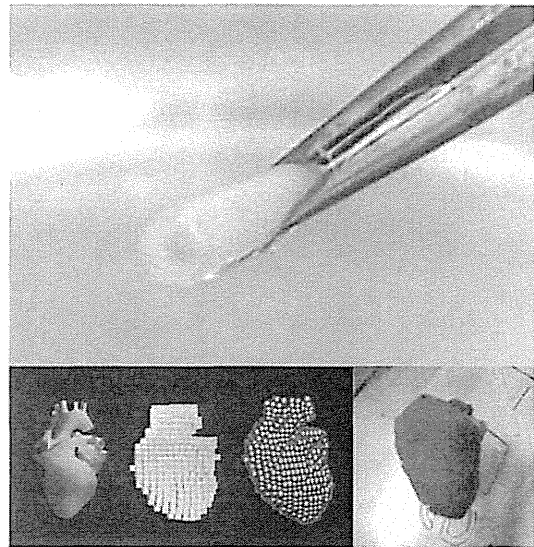


図7 Regenovaによって作製された細胞構造体（上段）血管様の中空構造（血管内皮細胞+繊維芽細胞）。（下段）心臓の3Dデータを変換して積層した心臓様構造体（繊維芽細胞のみで作られているため拍動しない）

Organ Trafficking, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 3, 1227 (2008)

- 2) M. Brittberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 331, 889 (1994)
- 3) M. F. Pittenger *et al.*, *Science*, 284, 143 (1999)
- 4) H. Wilson, *J. Exp. Zool.*, 5, 245 (1907)
- 5) P. L. Townes & J. Holtfreter, *J. Exp. Zool.*, 128, 53 (1955)
- 6) R. Langer & J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920 (1993)
- 7) 中山功一, *臨床評価*, 38, 766 (2011)
- 8) 中山功一ほか, *整形・災害外科*, 56, 585 (2013)
- 9) G. W. Paul, *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, 20, 1 (2003)
- 10) K. Nakayama, "Biofabrication: Micro-and Nanofabrication, Printing, Patterning and Assemblies", p.1 (2013)

1. バイオプリンター

1) 細胞だけで立体的な構造体を作製するバイオリピッドプロトタイピングシステムの開発

川勝美穂・大嶋利之・田中麻衣・中山功一

われわれは古典的な生物学の知見と整形外科医の骨折治療のテクニックから着想した、細胞だけで立体的な細胞構造体を作製する手法を開発した。さらに、微細加工技術、ロボット技術など様々なものづくりの技術を組み合わせた、バイオ3Dプリンターともいうべき、立体構造体自動形成装置も開発し、軟骨、血管、肝臓など様々な細胞で良好な初期データが得られており、いくつかのパイプラインは数年以内の臨床応用に橋渡しできると期待されている。

キーワード

再生医療、ティッシュエンジニアリング（組織工学）、scaffold free、細胞凝集、バイオ3Dプリンター、multicellular spheroid（スフェロイド）

はじめに

様々な臓器・組織が病気や外傷による損傷や機能障害・機能不全に陥った場合、臓器移植や人工臓器によって生命の維持を計る医療が近年実用化されるようになってきた。しかし、これらの治療法は、移植臓器の不足、免疫抑制剤の長期服用に伴う副作用のリスク、人工臓器の耐久性の問題やバイオフィーム¹⁾形成による感染の問題など多くの問題をかかえている。

そのような中、1990年代にティッシュエンジニアリング（組織工学）の概念が提唱され¹⁾、ヒトの耳を背中に生やしたマウスの報告に注目が集まった²⁾。このことから、細胞と成長因子、細胞が育つ足場（scaffold）があれば様々な移植用の組織・臓器の作製ができる可能性が示され、ティッシュエンジニアリングの手法を用いた再生医療の新たな治療法の確立が求められた。これまで、多くの研究者がこの分野に参入し、開発・研究が推進されている。

ティッシュエンジニアリングのコンセプトとして立体的臓器を細胞から作製するためには、①細胞、②成長因子または遺伝子、③細胞の足場および形状の維持

のための scaffold の3点の適切な選択が必要とされている。実際には、scaffoldとして人工的に用意した生体材料を任意の形状に加工し、その表面もしくは内部に細胞を播種することによって立体的な細胞構造体を作るという方法が一般的である（図1）。これまで様々な材料が scaffold として用いられ、成長因子や遺伝子、細胞の各種組み合わせによって各種組織・臓器の作製が試みられており、関節軟骨などで臨床応用が開始されている³⁾。近年、新たに岡野らにより、scaffoldを用いることなく細胞シートを積層し、各種臓器の再生を図る細胞シート工学という手法が開発され⁴⁾⁻⁶⁾、角膜⁷⁾⁸⁾、心臓⁹⁾の再生で臨床フェーズに入っている。

I. 細胞凝集現象を応用した立体的な細胞構造体構築法

単離された細胞群が凝集して細胞凝集塊を形成するという現象は、100年ほど前の報告を皮切りに様々な生物で報告されており、海綿などの下等生物から高等生物まで保存されている¹⁰⁾。この現象は、多細胞生物の生体を構成する足場依存性（接着性）のほぼすべての細胞がアノイクス（anoikis）¹¹⁾¹²⁾を回避するため

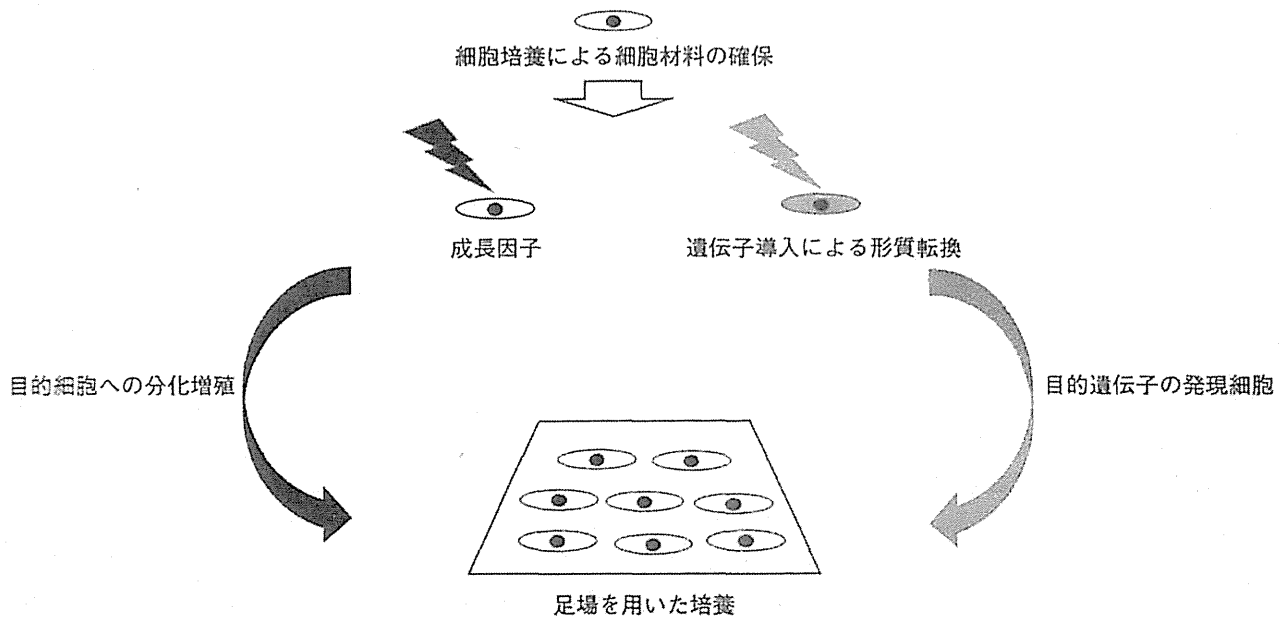
に、カドヘリン (cadherin) という細胞間接着分子が中心となって起こると考えられている^{11) 12)}。

この細胞凝集塊は発生学、腫瘍学、毒物学、薬学などの研究の様々な分野で用いられ、肝細胞、神経細胞、ES細胞、iPS細胞の細胞生物学的な分野で特に用いられている。ティッシュエンジニアリングの分野では multicellular spheroid (スフェロイド) と呼ばれることが多い。スフェロイドは、旋回培養^{13) 14)} やハンギ

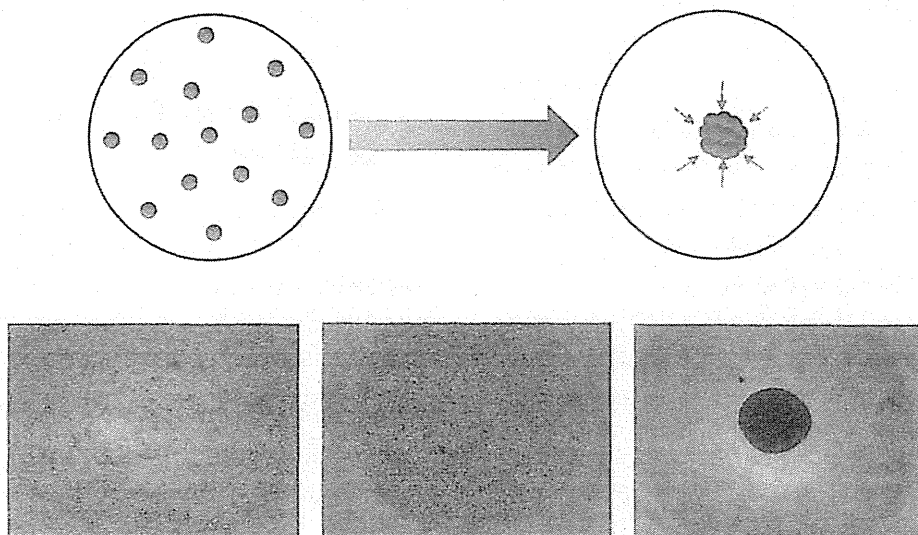
ングドロップ¹⁵⁾ など様々な方法で作製されるが、基本的な原理としては、接着細胞を非接着環境で培養することにより、細胞凝集が誘導され形成される(図②)。

近年、様々な種類の細胞を単層培養よりも立体培養、特にスフェロイド培養にすることで、生体に近い機能発現をすることが報告されるようになった¹⁶⁾。そのため、スフェロイドを立体構造体の基本単位として、細胞だけで立体化 (scaffold free) をめざすグループ

図① 構造体作製の流れ



図② 細胞凝集現象



(グラビア頁参照)

がいくつか出現し、様々な細胞を用いた立体構造体の作製に成功している。彼らの方法は、あらかじめ目的の形状に加工した鋳型に大量のスフェロイドを流し込み、細胞同士のさらなる融合による立体化を図るというアプローチがほとんどであり、単純拡散によって培地供給とガス交換が期待できるサイズ（細胞の種類によるが肝臓細胞で厚さ200 μ m程度、軟骨細胞で1~2mm）の細胞だけの構造体を作製することが可能となっている¹⁷⁾。

われわれは、さらに大型の立体的細胞構造体の作製技術として、スフェロイドを針に刺し仮止めすることにより、目的の立体的な構造へ積層する方法を考案した¹⁸⁾。この仮止めをする方法は、創外固定と呼ばれる整形外科の骨折治療法からヒントを得たものである(図3)。これは、皮膚から金属のピンを各骨片に固定し、ピン同士を固定器で保持し、骨折部の安定と癒合

治療を促す手術手技である。一般的な金属プレートを用いた骨折治療の場合、骨融合後に再度患部を切開し、プレートを抜去する。このピンを用いた手法では、骨折治療後に簡単な局所麻酔で、皮膚からピンを除去できるため、患者および医師にとっては負担の軽い手技である。

この仮固定の方法によって、刺されたスフェロイドをそのままの位置で数日間培養すると隣接したスフェロイド同士が融合する。融合後に作製した構造体をピンから抜去することにより目的の形状をもった細胞だけからなる構造体を作製できるようになった(図4)¹⁸⁾。

当初は小さなスフェロイドを複雑な形状をもつ組織・臓器の位置に合わせて、手作業でピンに刺し、立体的な配置を試みていたが、精度面、作業時間の面などで再現性と効率化を得ることは困難であった。そこでわれわれは、ラピッドプロトタイプング¹⁹⁾(rapid prototyping)にインスパイアされ、スフェロイド配置図をデザインした3次元データを作成し、そのデータに合わせて構造体を構築するというバイオリapidプロトタイプングシステム(bio-rapid prototyping system)の開発を行った(図5)¹⁸⁾。

このシステムによって、作成したデータに沿った任意の3次元空間的な位置に、スフェロイドが配置することが可能になった(図6)¹⁸⁾。現在、様々な種類の細胞を用いて、1cm³の立体的な構造体の作製が可能となっている。また、均一な細胞からなるスフェロイド以外にも、複数種の細胞を混ぜたスフェロイドを用意し立体化することにも成功しており、正常に近い肝代謝能をもった細胞構造体や、正常の血管に類似した

図3 創外固定模式図

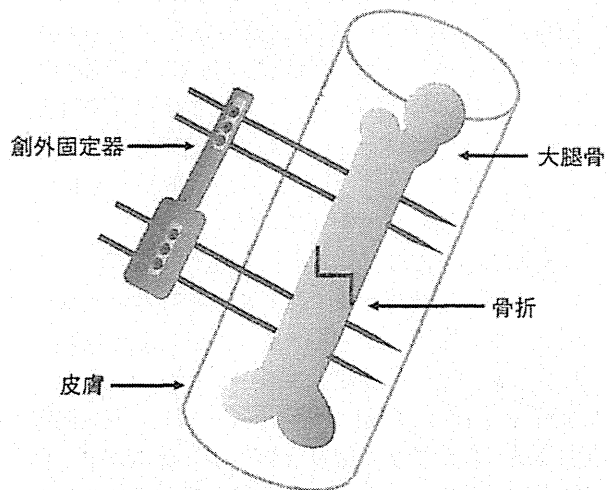
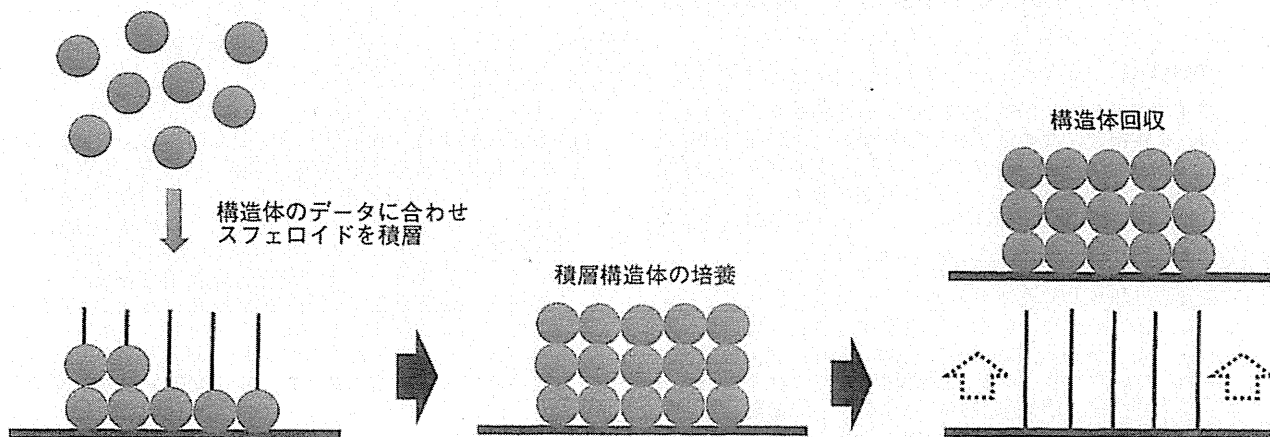


図4 スフェロイドの積層化



図⑤ バイオ 3D プリンター

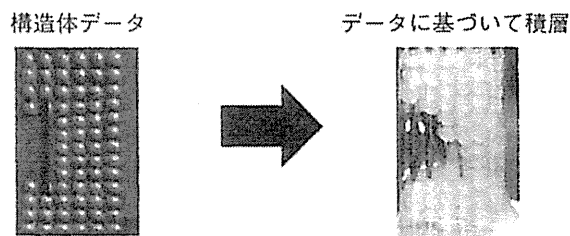


強度特性をもつ血管様のチューブ状構造体、半月板を模した軟骨細胞からなる構造体などで、有効な初期データが得られている。特に大型の細胞構造体を作製すると、構造体内部への培地やガス交換が問題となるが、われわれのシステムでは任意の位置に空洞を設置することが可能になるため、血管網に類似した構造をもつ大型の細胞だけの構造体を作製可能である。

おわりに

われわれは生物学の古典的な現象である細胞凝集と、骨折治療の一般的なテクニックである創外固定という2つの古い(枯れた)知見により、従来の再生医

図⑥ データからの構造体作製



療/ティッシュエンジニアリングのコンセプトとは異なるアプローチで立体的な細胞だけの構造体を作製することに成功した。さらに、微細加工やロボット制御技術、画像認識技術を組み合わせることにより、バイオリピッドプロトタイピングシステム(昨今の3Dプリンターの世間への認知とブーム化に迎合し、原理的には「プリンター」ではないものの、あえてバイオリピッドプリンターとわれわれも呼ぶことが多くなっている)の開発に成功し、様々な細胞で移植可能なミニ臓器の作製が可能となっており、血管様の構造体の動脈置換や軟骨欠損に対する再生実験などを進めている。今後、①どのような細胞の組み合わせを、②どのような3次元空間に配置し、③どのようなバイオリアクター^{川原⁴}で成熟させ、④どのように移植するか、といった様々な課題が存在するが、常に臨床応用を見据えて、安全面、機能面、コスト面で実用性の高い方法を模索していく計画である。近い将来、iPS細胞や分化誘導された細胞を組み合わせることにより、他人の臓器に頼らない自己臓器移植が実現可能になると期待される。

用語解説

1. バイオフィーム: 微生物が形成する多糖類からなる膜様物。生体内材に埋め込まれた医療デバイス表面に黄色ブドウ球菌などが付着しバイオフィームが形成されると抗生剤の効果が減弱され、感染が遷延しやすくなり、デバイス摘出しが有効な治療法がないなど、医療現場で問題となっている。
2. アノイクス (anoikis): 多くの接着系正常組織細胞は、細胞や細胞外基質などを足場として接着した状態で増殖する。細胞培養においても、細胞は培養皿の底面に接着することで生存し増殖をすることが可能となっている。しかし、細胞が接着できず浮遊状態に保たれると、増殖できず細胞死が誘導される。このように細胞が、足場となるものに接着できなかった結果、誘導される細胞死のことをアノイクスと呼ぶ。

3. ラピッドプロトタイピング: 製品開発において用いられる試作品を製造する方法。製品の3次元CADデータを元として、積層造形法と呼ばれる方法で作製を行う。様々な方法があり、光造形法、粉末法、熱溶解体積法、シート積層法、インクジェット法などに分類される。
4. バイオリアクター: 微生物や動植物細胞を触媒として反応させ、分解や合成により生成物を得る装置。発酵・醸造などの食品工学をはじめ、研究用試薬の生産など様々な分野において使用されている。再生医療の分野では細胞構造体内部への栄養供給、ガス交換を促す循環システムを指すことが多い。

参考文献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue Engineering Science 260, 920-926, 1993.
- 2) Cao Y, Vacanti JP, et al: Plast Reconstr Surg 100, 297-302, 1997.

- 3) Patrascu JM, Freymann U, et al : J Bone Joint Surg Br 92, 1160-1163, 2010.
- 4) Yamada N, Okano T, et al : Makromol Chem Rapid Comm 11, 571-576, 1990.
- 5) Okano T, Yamada N, et al : J Biomed Mater Res 27, 1243-1251, 1993.
- 6) Shimizu T, Yamato M, et al : Tissue Eng 7, 141-151, 2001.
- 7) Nishida K, Yamato M, et al : N Engl J Med 351, 1187-1196, 2004.
- 8) Ishino Y, Sano Y, et al : Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 800-806, 2004.
- 9) Sawa Y, Miyagawa S, et al : Surg Today 42, 181-184, 2012.
- 10) Wilson H : J Exp Zool 5, 245-258, 1907.
- 11) Townes PL, Holtfreter J : J Exp Zool 128, 53-120, 1955.
- 12) Steinberg MS : Science 137, 762-763, 1962.
- 13) Freed LE, Langer R, et al : Proc Natl Acad Sci USA 94, 13885-13890, 1997.
- 14) Sakai S, Mishima H, et al : J Orthop Res 27, 517-521, 2009.
- 15) Kelm JM, Timmins NE, et al : Biotechnol Bioeng 83, 173-180, 2003.
- 16) Chang TT, Hughes-Fulford M : Tissue Eng Part A 15, 559-567, 2009.
- 17) Miyazaki T, Miyauchi S, et al : Tissue Eng Part A 16, 1575-1584, 2010.
- 18) Nakayama K : Biofabrication : Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies, 1-16, Elsevier, 2013.

川勝美穂

2011年 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程
修了

2013年 佐賀大学大学院工学系研究科非常勤博士研究
員

総説

バイオ 3D プリンティング技術を用いた立体的細胞構造体の作製

Fabrication of Three-dimensional Cell Structures Using Bio-three-dimensional Printing Technology

川勝美穂*・大嶋利之*・中山功一*

Miho KAWAKATSU*, Toshiyuki OSHIMA* and Koichi NAKAYAMA*

*Graduate School of Science and Engineering, Saga University

1, Honjo-machi, Saga-shi, Saga, 840-8502 JAPAN

1. はじめに

医療分野における技術進歩に伴い、プリンティング技術は、これまでと異なる視点から様々な分野に利用の用途を広げながら開発が進められている。

印字印刷などの平面空間への2D印刷から、立体的な3Dへの印刷という印刷技術の広がり、印刷業などの産業・工業のみならず、医療や医学研究分野に新たな可能性を与えることとなった。

医療において、臓器・組織が損傷や機能障害・機能不全に陥った場合、臓器移植や機能を補う人工臓器の置換などによる治療法が近年実用化されつつある。しかしながら、これらの治療法の普及には、移植臓器不足や移植後に長期にわたる免疫抑制剤の服用が必要となること、置換した人工臓器の耐久性や長期的な視野からの安全面の保障などの克服すべき問題点が残されている。

今回、最近話題になっている3Dプリンタ技術が、研究または医療の分野で利用されることによって、これらの問題点の解決に寄与していることをわれわれの研究を交えて紹介をする。

2. 印刷技術の多様性

最近、比較的安価な一般用3Dプリンタが市販化され、簡単に3D構造体の作製が可能となっている。目的物の構造を反映した3Dデータを元に用途に合わせて多種多様な

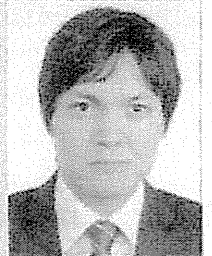
2013年佐賀大学大学院工学系研究科非常勤博士研究員

川勝美穂



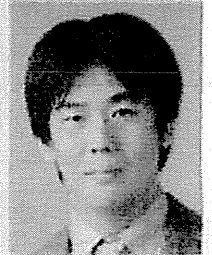
2013年佐賀大学大学院工学系研究科非常勤博士研究員

大嶋利之



2009年佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻医工学 教授

中山功一



*佐賀大学大学院工学系研究科
(〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1番地)

材料・デザイン of 構造物が作成出来るため、工業用の部品や特殊梱包材など多方面で使用されている。また、無機物のみならず食用の資材を利用した食べられる構造体の作製も可能であり、すでに食品分野でも、砂糖を使用した3D構造体作製などについて報告がされている。その他にも、3Dプリンタを利用した食肉製造法についての報告もされており¹⁾、今後、食品製造分野における3Dプリンタ利用の選択多様化も望めるかもしれない。

このように様々な分野での利用が進められている3Dプリンタ技術だが、研究・医療分野でも、生体内の組織・臓器として代用可能な立体的構造体を作製する取り組みに注目が集まっている。

3. 再生医療への広がり

再生医療分野で、治療困難な症状や失った組織・臓器の治療のため、臓器移植や人工臓器など様々な方法が模索されている。さらに、これまで確立・開発されてきた生命科学分野の基本的実験手技や組織・臓器に関する研究も治療実現の基盤となっている。また、どのような材料を用いて、どのような方法で生体内の組織・臓器様の機能を持つものが作製できるかを解決するため、多様なアプローチがとられている。

すでに再生医療の現場で、関節軟骨などの臨床応用が開始されているものもあり²⁾、近年、岡野らが開発した細胞シートを積層化し、様々な臓器の再生を行う細胞シート工学手法³⁻⁵⁾を用いて作製された角膜^{6,7)}、心臓⁸⁾などで臨床フェーズに入っている。

3.1 生体外での細胞生存環境の模倣と再現

生体は、多種多様な細胞により形作られている。これらの細胞が立体構造をとり、組織・器官を形成して機能することで生命維持活動を行うことが可能となる。また、細胞を正常に維持、機能させることは立体的な構造である組織・臓器の恒常性を保つことにつながる。

細胞で構成された、組織・臓器を正常に維持させるためには、細胞の機能や性質を解明する必要がある。細胞を生体外の人工的環境下で、生存・分化・増殖させることを可能とした細胞培養法の確立により、医療・研究分野でも様々な研究や臨床応用の推進が可能となった。生体外で培養可能な細胞は、一部の細胞を除き、培養容器に接着する接着系細胞と呼ばれる細胞がほとんどである。

とはいえ、単純に細胞が接着しても正常な機能を維持し増殖できるわけではない。生体外環境に適応させ培養する

ためには、生体内環境を模倣し再現する必要がある。生存や増殖を可能とさせる因子（増殖・成長因子）などを補うため、培養用培地成分や培養条件の検討など細胞に合わせた最適な培養方法の改良が進められ、生体外でも安定した細胞培養ができるようになった。その結果、それらを基本手技として利用した実験や研究が可能となったのである。

3.2 組織工学（ティッシュエンジニアリング）

細胞培養法の確立以降、それらを材料として組織・臓器を作製する技術の研究・開発が急速に進められている。組織工学（ティッシュエンジニアリング）という言葉が頻繁に使用されているが、この分野を簡単に説明すると、研究・医療で必要とされている組織・臓器を作製することを示している。ティッシュエンジニアリングの概念は1990年代後半には提唱され⁹⁾、背中にヒト耳形状の立体構造体を生やしたマウスの報告¹⁰⁾以降、多くの研究者がこの分野の研究に参入し、様々な研究が推進されている。

4. 立体的な構造体の作製

一般的にティッシュエンジニアリングの基本的な手技として、細胞、足場（scaffold）、成長因子・遺伝子が必要となる。それぞれに関しては、後述の事項で説明をするが、印刷という観点からすると解りにくい言葉の羅列となっている。よって、印刷におけるインクを細胞、用紙を足場、書体を成長因子・遺伝子に置き換えてイメージすると解りやすいかもしれない。

4.1 用紙に描くように組織・臓器を作る

臨床分野において、ティッシュエンジニアリングの最終目的は、移植可能な組織・臓器の作製である。

どのような方法で、安易、安全、安価、安定的に臓器をつくるかが論点となり、これまで多くの方法でアプローチがなされてきた。人工臓器の置換や臓器移植による治療も行われているが、いまだ抜本的治療には至っていない。そのような中で、新たな治療法として最近注目を浴びているのが印刷技術を用いた組織・臓器の作製法である。

4.2 印刷のインクとティッシュエンジニアリングの細胞

紙印刷の手技として、最も普及しているインクジェット式プリンタは、ドットプロットと呼ばれるノズルからインク球を印刷媒体に噴霧することにより印字・印刷するという方式である。この方式を応用し、インクの代わりに細胞をノズル穴から噴射して組織・臓器を作製する方法が開発

されている。また通常、印刷インクは平面に散布されるため、印刷物は平面的になるが、インクとして使用する細胞をある程度のまとまった数で球状化し大型化、あるいは積層することで立体的なものを作製することも可能となっている。

4.3 印刷の用紙とティッシュエンジニアリングの足場

印刷する際、印字・印刷する用紙などが必要である。最も利用されているものは紙であるが、印刷技術の進歩によって、無機物・有機物様々な素材に印刷が可能となった。ティッシュエンジニアリングにおいて、細胞をインクとして印刷した場合、細胞が接着し生存可能となる環境が必要となる。さらに、細胞は乾燥状態では生存は出来ないため、液性環境下で細胞が接着しその場に留まり、生存できる環境が必要である。このように、細胞が接着して留まり生存するための居場所は、足場 (Scaffold) と呼ばれるており、あらかじめ形状を立体化したものに細胞を留め生存させることなどの方法で、平面から立体的な構造物を作製することが可能となっている。現在、様々な素材・形状の足場素材が開発・研究されている。

4.4 印刷の書体とティッシュエンジニアリングの成長因子・遺伝子

印刷物を作成する際、公文書に使用するなら明朝体、ポスターならゴシック体、あるいは文字の大きさを変えるなど用途に合わせて書体を変更し最適化を行う必要がある。3Dプリンタで構造体を作製する場合も、目的とする組織・臓器のために細胞を最適化することが必要となる。その為に必要なものとして成長因子・遺伝子などがあげられる。

現在、作製時に組織・臓器から得た細胞からそれらを作製するのではなく、間葉系幹細胞から、分化・誘導をすることにより細胞を最適化し、様々な組織・臓器を作製する試みがなされている。近年、間葉系幹細胞のみではなく iPS 細胞等を用いた再生医療やティッシュエンジニアリングの進展も望まれている。

5. バイオ 3D プリンタを用いた立体的細胞構造体の作製

簡便に安定的に組織・臓器を作製するため、ティッシュエンジニアリング分野では様々な装置が開発され導入されている。CAD などのシステムを利用した、コンピュータ技術の導入により、光学造形法、粒子体積法、シート堆積法など様々な三次元積層造形法が開発された。そのよう

な中で、近年 3D プリンタの利用用途の広がり注目が集まっている。

われわれも、独自に開発したバイオ 3D プリンタを用いて、細胞のみ (Scaffold-free) で作製した立体的な細胞構造体の作製を行っている。

5.1 バイオ 3D プリンタを用いた細胞凝集塊積層技術の開発

単離した細胞を非接着状態で培養すると細胞間接着による胞凝集塊を形成し、アノイクシ (anoikis) を回避する。この細胞凝集現象は (図 1)、100 年程前には報告されており¹¹⁾、カドヘリン (Cadherin) という細胞間接着分子により起こると考えられ^{12, 13)}、下等生物から高等生物まで保存されている。この現象を利用して形成された細胞凝集塊は、ティッシュエンジニアリングの分野では Multicellular spheroid (スフェロイド) とも呼ばれ、単層培養に比べて細胞が生体に近い機能を発現すると報告されている¹⁴⁾。現在、スフェロイドを用い、構造体の立体化を試みているいくつかのグループは、鋳型にスフェロイドを流し込み、細胞の融合により立体化させる方法を用いている。この方法で、肝臓細胞で厚さ 200 μm 程度、軟骨細胞で 1~2mm 程度の構造体の作製が可能となっている¹⁵⁾。

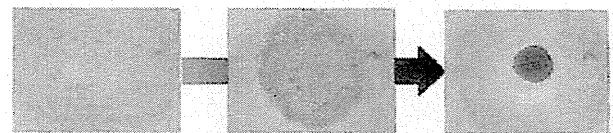


図 1 細胞凝集現象

しかし、臨床応用可能な組織・臓器を作製するためには、さらに大型の構造体を作製する必要がある。そこで、われわれは生け花の剣山状に配置された針にスフェロイドを仮止めし、目的の構造に積層する方法を開発した¹⁶⁾。これは、スフェロイドを仮止めし、数日培養することによりスフェロイド同士を融合させる方法である。スフェロイドの融合後、構造体から針を除去することにより、目的の構造体を維持した立体的細胞構造体の作製が可能となった¹⁶⁾ (図 2)。

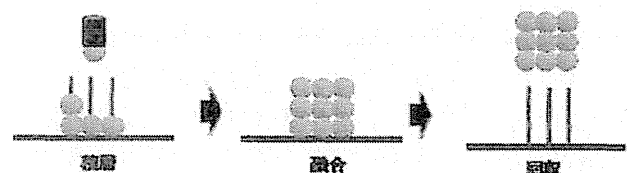


図 2 スフェロイド積層による立体的構造体の作製

5.2 バイオ 3D プリンタを用いた細胞積層の自動化

構造体作製に使用するスフェロイドサイズは、極めて小型で、強度についても手作業で作業するには頼りない。なにより、組織・臓器など複雑な構造に合わせてスフェロイドを配置化することは極めて困難で途方もない労力が必要である。そこで、われわれは、安定的で簡便なスフェロイド積層技術としてバイオリッドプロトタイプングシステム (Bio-rapid prototyping) の開発を行った。

これは、従来工業分野で使用されていたラピッドプロトタイプング (Rapid prototyping) にインスパイアされた方法である。ラピッドプロトタイプングとは、製品開発においてデザインマップに合わせ 3 次元 CAD データを作成し、立体構造体を作製する積層造形法の一つである。これらは、インクジェット法など様々な方法に分類されているが、総称して 3D プリンタと呼ばれるため、われわれの開発したバイオリッドシステムも厳密にはプリンタではないものの 3D バイオプリンタと位置付けて呼んでいる (図 3)。



図 3 バイオ 3D プリンタ

われわれの作製したシステムを用いて、作成したデザインマップに合わせた積層を行った立体的構造体の作製が可能となった (図 4)。また、細胞種の組合せも可能なため、将来的には、血管網など複雑な構造を持つ組織・臓器を作製することも十分に期待できる。

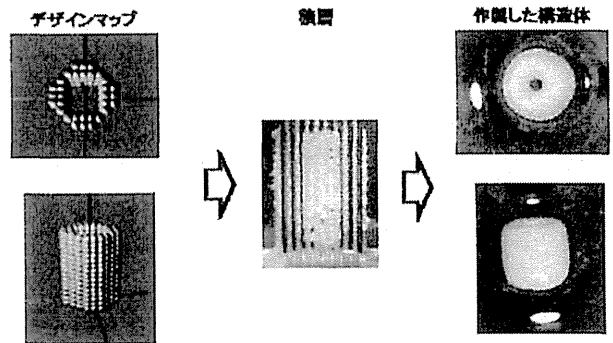


図 4 デザインマップに合わせて作製した構造体

6. おわりに

現在、医療・研究分野において、3D プリンタなどを利用した立体的構造物作製について様々な報告がなされている。細胞を採取培養後、組織・臓器を作製し移植するために (図 5)、どのような細胞や方法を用いれば、移植可能な組織・臓器の作製が出来るのかなど、現状では様々な課題が残されている。今後、プリンティング技術の開発やティッシュエンジニアリングの研究により、新たな組織・臓器の作製方法や治療法が確立していくことが望まれている。

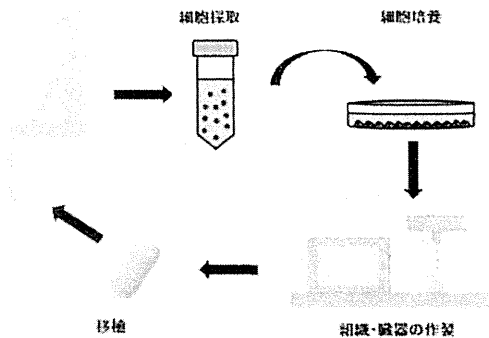


図 5 組織・臓器作製の流れ

また、プリンタ技術などを用いて作製した立体的構造体を用いることで、生体外でもより生体に近い研究が行える。可能性が示唆されている。実際、細胞毒性評価や動物実験にかわる有用な手段として応用化が進められている。

われわれも 3D プリンタによる簡単・安定的な組織・臓器の作製を目指し、様々な細胞種を用いて血管様管状構造体や軟骨様構造体作製を行っている。将来的には、安全面や安定供給やコストなどの課題をクリアした、自己細胞が

ら作製された組織・臓器の移植が可能となると期待している。

参考文献

- 1) Jones N, Nature. 468 (7325) : 752-3, 2010.
- 2) Patrascu JM, Freymann U, et al. J Bone Joint Surg Br. 92 (8) : 1160-1163, 2010.
- 3) Yamada N, Okano T, et al. Makromol Chem Rapid Comm. 11 (11) : 571-576, 1990.
- 4) Okano T, Yamada N, et al. J Biomed Mater Res. 27 (10) : 1243-1251, 1993.
- 5) Shimizu T, Yamato M, et al. Tissue Eng. 7 (2) : 141-151, 2001.
- 6) Nishida K, Yamato M, et al. N Engl J Med. 351 (12) : 1187-1196, 2004.
- 7) Ishino Y, Sano Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 45 (3) : 800-806, 2004.
- 8) Sawa Y, Miyagawa S, et al. Surg Today. 42 (2) : 181-184, 2012.
- 9) Langer R, Vacanti JP. Science. 260 (5110) : 920-6, 1993.
- 10) Cao Y, Vacanti JP, et al. Plast Reconstr Surg. 100 (2) : 297-302, 1997.
- 11) Wilson H, J Exp Zool. 5 (2) : 245-258, 1907.
- 12) Townes PL, Holtfreter J. J Exp Zool. 128 (1) : 53-120, 1955.
- 13) Steinberg MS. Science. 137 (3532) : 762-3, 1962.
- 14) Chang TT, Hughes-Fulford M. Tissue Engineering Part A. Vol.15, No.3: 559-567, 2009.
- 15) Miyazaki T, Miyauchi S, et al. Tissue Eng Part A. 16 (5) : 1575-84, 2010.
- 16) K. Nakayama: Biofabrication: Micro- and Nano-fabrication. Printing, Patterning and Assemblies, P1-16, ELSEVIER, 2013.

本報告書は、厚生労働省の再生医療実用化研究委託事業による委託業務として、九州大学病院 整形外科・岡崎 賢が実施した平成26年度「高密度スキャフォールドフリー脂肪由来幹細胞構造体を用いた骨軟骨組織再生の探索的臨床研究」の成果を取りまとめたものです。