

Arai R, Nimura A, Yamaguchi K, Yoshimura H, Sugaya H, Saji T, <b>Matsuda S</b> , Akita K	The anatomy of the coracohumeral ligament and its relation to the subscapularis muscle.	J Shoulder Elbow Surg	23	1575-81	2014
Arai R, Kobayashi M, Harada H, Tsukiyama H, Saji T, Toda Y, Hagiwara Y, Miura T, <b>Matsuda S</b>	Anatomical study for SLAP lesion repair.	Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc	22	435-41	2014
Akiyama H, Hachiya Y, Otsuka H, Kurisuno M, Kawanabe K, Katayama N, Ohura H, Yamamoto K, Sato K, <b>Matsuda S</b>	Low-intensity pulsed ultrasound therapy stimulates callus formation between host femur and cortical onlay strut allograft.	Ultrasound Med Biol	40	1197-203	2014
Ikeguchi R, Kakinoki R, Tsuji H, Yasuda T, <b>Matsuda S</b>	Peripheral nerve regeneration through a silicone chamber implanted with negative carbon ions: Possibility to clinical application.	Applied Surface Science	310	19-23	2014
Kimura H, Fujibayashi S, Takemoto M, Otsuki B, <b>Matsuda S</b>	<u>Spontaneous Reduction in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Thoracic Spine After Posterior Spinal Fusion without Decompression: A Case Report.</u>	Spine	39	E417-9	,2014
Ohta S, Kakinoki R, Noguchi T, Kaizawa Y, <b>Matsuda S</b>	Reconstruction of active elbow flexion in patients with radial ray deficiency: report of two cases.	J Shoulder Elbow Surg	23	e313-e317	2014

Goto K, So K, Kuroda Y, Kawanabe K, <b>Matsuda S</b>	Two-staged reconstruction for ankylosed hip with severe limb shortening: a case report.	Hip Int	24	660-663	2014
---	---	---------	----	---------	------

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Matsuda S</u>	Catering to ethnic differences in Total Knee Arthroplasty —Is it necessary?	Arun Mullaji (Editor)	Arthropaedia	Arthro JOURNAL	India	2014	pp.31-35
<u>中山功一</u>	細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication System の開発		Bio Industry Vol. 31(1)	株式会社シーエムシー出版	東京	2014	pp.20-27
川勝美穂、大嶋利之、田中麻衣、 <u>中山功一</u>	細胞だけで立体的な構造体を作製する バイオラピッドプロトタイピングシステムの開発		遺伝子医学 MOOK別冊	株式会社メディカルドゥ	大阪	2014	pp.190-194
川勝美穂、大嶋利之、 <u>中山功一</u>	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		日本印刷学会誌 Vol.51	一般社団法人日本印刷学会	東京	2014	pp.18-22
<u>三角一浩</u>	外傷治療	稲葉睦他監修	子牛の医学	株式会社緑書房	東京	2014	pp.124-129
<u>三角一浩</u>	馬学一般，馬臨床学総論	樋口徹監修	馬臨床学コアテキスト	株式会社緑書房	東京	2014	pp.12-49
<u>三角一浩</u>	脊髄および末梢神経疾患	猪熊壽他監修	獣医内科学第2版(大動物編)	文永堂出版株式会社	東京	2014	pp.233-236
<u>松田秀一</u>	卒後研修講座 小児の膝関節痛 診断と治療.		整形外科 65	株式会社南江堂	東京	2014	pp.1077-1083
栗山新一、 <u>松田秀一</u>	高度外反変形膝に対する対処法		Orthopaedics 27	株式会社全日本病院出版会	東京	2014	pp.5-82

細胞だけで立体的な構造体を作製する  
Scaffold-free 3D Biofabrication system の開発  
A Development of Scaffold-free 3D Biofabrication System for Regenerative Medicine

中山功一

佐賀大学 大学院工学系研究科 先端融合工学専攻  
先端融合工学講座 医工学 教授

シーエムシー出版刊『月刊バイオインダストリー 2014年1月号』抜刷

# 細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemの開発

2019年10月15日

本研究は、細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemを開発した。このシステムは、細胞の自己組織化能力を利用して、複雑な3次元構造を構築できる。従来の Scaffold-based 3D Biofabrication systemでは、細胞を支持する Scaffold が必要であったが、このシステムでは、細胞が自然に集積して構造体を形成する。このシステムは、再生医療や組織工学に大きく貢献する。また、このシステムは、細胞の自己組織化能力を研究するためのツールとしても有用である。本研究の結果は、細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemの開発に成功したことを示している。

本研究は、細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemを開発した。このシステムは、細胞の自己組織化能力を利用して、複雑な3次元構造を構築できる。従来の Scaffold-based 3D Biofabrication systemでは、細胞を支持する Scaffold が必要であったが、このシステムでは、細胞が自然に集積して構造体を形成する。このシステムは、再生医療や組織工学に大きく貢献する。また、このシステムは、細胞の自己組織化能力を研究するためのツールとしても有用である。本研究の結果は、細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemの開発に成功したことを示している。

本研究は、細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemを開発した。このシステムは、細胞の自己組織化能力を利用して、複雑な3次元構造を構築できる。従来の Scaffold-based 3D Biofabrication systemでは、細胞を支持する Scaffold が必要であったが、このシステムでは、細胞が自然に集積して構造体を形成する。このシステムは、再生医療や組織工学に大きく貢献する。また、このシステムは、細胞の自己組織化能力を研究するためのツールとしても有用である。本研究の結果は、細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication systemの開発に成功したことを示している。

## 細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication system の開発

A Development of Scaffold-free 3D Biofabrication System for Regenerative Medicine

中山功一\*

再生医療研究では、立体的な臓器を人工的に作るためには、細胞と足場となる生体材料の組み合わせが世界の常識とされている。それに対し、筆者らは古典的な生物学の知見である細胞凝集と、骨折の外科的治療という、二つの古くからある知見を組み合わせ、全く新しい再生医療の技術を確立した。さらに複数のものづくり系企業と連携し、バイオ3Dプリンター（Biofabrication system）を開発した。稼働してまだ日が浅いが、予備的な実験で良好な成果が出始めている。将来的には自分自身の細胞だけで移植可能な臓器を体外で作製できることが期待されている。

### 1. はじめに

臓器移植が本邦でも行われるようになって十年近く経過しているが、慢性的なドナー不足の問題はいまだ解消されていない。特に、移植大国とされる米国でも、一番のドナー発生要因とされていた自動車事故が、エアバッグに代表される安全性能の飛躍的向上により臓器不足が深刻化していると伝え聞く<sup>1)</sup>。このような深刻な臓器不足を背景に再生医療研究の究極の目標として、人工的に移植可能な臓器を生体外で作るというのは多くの再生医療研究者の夢であるといっても過言ではない。

当時、九州大学整形外科で研修医として4年ほど関連する病院で研修を行った筆者は、2001年に臨床大学院に入り、研究テーマとして関節軟骨の再生を拝命した。ヒポクラテスの時代から一度

損傷した関節軟骨の自然治癒は困難とされていたが、体外で細胞を増殖して移植する方法により再生できるということが徐々に明らかになっていた頃であった。

すでに欧米では自家培養軟骨細胞移植（ACI）が臨床フェーズに到達しており、中長期的な臨床データが報告され<sup>2)</sup>、国内でもJ-TECのアテロコラーゲン包埋軟骨細胞移植が治験を開始しようとする時期であった。当時主流であった自家軟骨細胞移植は、患者さん自身の関節から内視鏡的に軟骨細胞を採取し、拡大培養を行った後に移植するという方法であったため、採取できる正常な軟骨細胞に量的な限界があると認識されていた。特に軟骨細胞は単層培養で継代を続けると、脱分化して正常な軟骨組織に必須のⅡ型コラーゲンの産生が低下するという問題があり、質の高い軟骨細胞で自家細胞移植を行うには拡大できる細胞数に

\*Koichi Nakayama 佐賀大学 大学院工学系研究科 先端融合工学専攻 先端融合工学講座 医工学教授

## 細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication system の開発

A Development of Scaffold-free 3D Biofabrication System for Regenerative Medicine

—中山功一\*

再生医療研究では、立体的な臓器を人工的に作るためには、細胞と足場となる生体材料の組み合わせが世界の常識とされている。それに対し、筆者らは古典的な生物学の知見である細胞凝集と、骨折の外科的治療という、二つの古くからある知見を組み合わせ、全く新しい再生医療の技術を確立した。さらに複数のものづくり系企業と連携し、バイオ3Dプリンター（Biofabrication system）を開発した。稼働してまだ日が浅いが、予備的な実験で良好な成果が出始めている。将来的には自分自身の細胞だけで移植可能な臓器を体外で作製できることが期待されている。

### 1. はじめに

臓器移植が本邦でも行われるようになって十年近く経過しているが、慢性的なドナー不足の問題はいまだ解消されていない。特に、移植大国とされる米国でも、一番のドナー発生要因とされていた自動車事故が、エアバッグに代表される安全性能の飛躍的向上により臓器不足が深刻化していると伝え聞く<sup>1)</sup>。このような深刻な臓器不足を背景に再生医療研究の究極の目標として、人工的に移植可能な臓器を生体外で作るとするのは多くの再生医療研究者の夢であるといっても過言ではない。

当時、九州大学整形外科で研修医として4年ほど関連する病院で研修を行った筆者は、2001年に臨床大学院に入り、研究テーマとして関節軟骨の再生を拝命した。ヒポクラテスの時代から一度

損傷した関節軟骨の自然治癒は困難とされていたが、体外で細胞を増殖して移植する方法により再生できるということが徐々に明らかになっていった頃であった。

すでに欧米では自家培養軟骨細胞移植（ACI）が臨床フェーズに到達しており、中長期的な臨床データが報告され<sup>2)</sup>、国内でもJ-TECのアテロコラーゲン包埋軟骨細胞移植が治験を開始しようとする時期であった。当時主流であった自家軟骨細胞移植は、患者さん自身の関節から内視鏡的に軟骨細胞を採取し、拡大培養を行った後に移植するという方法であったため、採取できる正常な軟骨細胞に量的な限界があると認識されていた。特に軟骨細胞は単層培養で継代を続けると、脱分化して正常な軟骨組織に必須のⅡ型コラーゲンの産生が低下するという問題があり、質の高い軟骨細胞で自家細胞移植を行うには拡大できる細胞数に

\*Koichi Nakayama 佐賀大学 大学院工学系研究科 先端融合工学専攻 先端融合工学講座 医工学教授



限りがあることが問題とされた。

そこで、筆者らは骨髄由来の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: 以下 MSC) が軟骨細胞に分化誘導できるという報告<sup>3)</sup>に着目し、幹細胞から軟骨再生を行うことを目標にした。当時九大整形外科の医局では誰も細胞培養を中心とした再生医療の実験・研究を実施しておらず、ゼロからの研究立ち上げであった。

まず先行研究にならって、ウサギから採取した骨髄由来 MSC を軟骨細胞に分化誘導する実験を開始した。そのプロトコルでは、単層培養で拡大した MSC をトリプシン/EDTA で単離した後、1.5cc の培地に回収して 15cc のコンカルチューブで遠心、沈殿した細胞ペレットを崩さないようにチューブごとインキュベーターで培養し、翌日にはチューブを軽く指で弾いてペレットをチューブから浮遊させて数日間培養するという方法であった。

これは一本のチューブに一個のペレットが 1.5cc の培地中に形成され、数日に一度は細長いチューブの底のペレットをロストせずに行う培地交換が必要であった。たくさんの誘導軟骨細胞塊を作製するにはその分のチューブと丁寧な培地交換作業が必要であり、当時一台のインキュベーターを複数人とシェアしていた筆者にはチューブ数本をスタンドで並べてインキュベーター内のスペースを占拠するのは色んな意味で大変な作業であった。

## 2. 細胞凝集塊 (スフェロイド) とモールド方式

ペレットを一人で量産しようと悪戦苦闘していた大学院一年目の秋ごろ、ヒト肝癌由来の細胞株である HepG2 の細胞塊 (スフェロイド) を効率よく形成できるという 96 ウェルのマルチプレートの広告を偶然見つけた。これは、接着系の培養を強制的に高密度浮遊培養系に持ち込むと、細胞が自然凝集するという古典的知見<sup>4,5)</sup>を応用した製品であり、肝臓系の細胞以外に神経細胞系のニューロスフェアの形成も容易と記載されていた。

さっそくサンプルのプレートを手し、MSC を播種したところ、見事にきれいな球状のスフェロイドが 96 個得られ軟骨への分化誘導が確認できた。

この細胞塊 (スフェロイド) を眺めていた時に、複数のスフェロイドを同じウェルに入れると、軟骨細胞が吐き出す細胞外マトリックス (ECM) 同士が融合し、大きな立体構造体ができるのではないかと思いついた。さっそく、ピペットで 4 個ほどのスフェロイドを一つのウェルに入れ一晚培養した翌日、予想外の現象がみられた。通常、MSC を分化誘導かけた場合、軟骨細胞に分化するにはおよそ 10 日程度はかかると思われる。しかし、ウェルに入れられたスフェロイドは翌日には接着・融合している印象であった。さらに翌日には完全に融合し、大きな塊となっていた。この現象に驚いた筆者は、このスフェロイドを大量に使えば、細胞だけで立体的な構造体、将来的には曲面を持った立体的な関節様の構造体を作製できるのではないかと考えた (当時、再生医療の実現にはポリマーなどの足場材料に細胞を付着させて立体的な臓器を作製するティッシュエンジニアリングのコンセプトが主流であった<sup>6)</sup>が、培養液中で加水分解されずに長期安定している高分子量の生分解性ポリマーは市販されておらず、入手困難であった)。

そこで巨大なスフェロイドを作るべく  $1 \times 10^6$  個の単離された細胞を入れてみた (通常 1 ウェルあたり  $1 \times 10^3$  個未満の細胞を播種している)。すると、数時間後にはウェル内の培地が黄色になり、翌朝には全細胞が浮遊し細胞塊を形成していなかった。今度は、一旦  $1 \times 10^3$  個の細胞を用いたスフェロイドを作製した翌日に、1 ウェルに 96 個のスフェロイドを投入したところ、その翌日にはスフェロイド同士が結合していた。

この結果が意味するところは、単層培養で増殖していた細胞を一旦スフェロイド化することによって、細胞の栄養要求性が低下するのではないかと考えた。

そこで、クライオチューブの底に穴をあけ滅菌

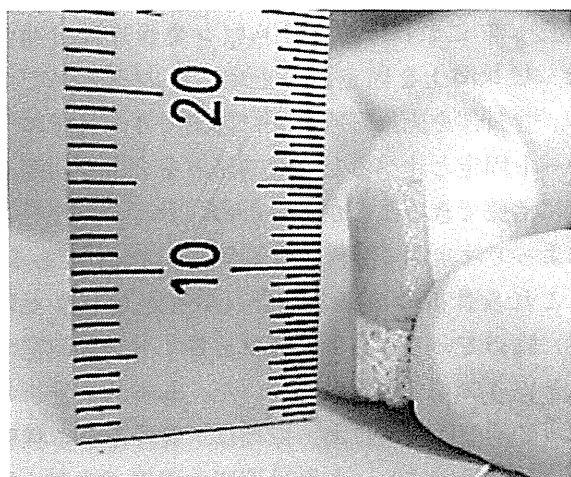


図1 モールド方式で作製された円柱状の細胞だけの構造体

し、そこに手元にあったありったけのスフェロイドを流しこんでみた。すると、翌日にはチューブの形状に沿った形で、細胞だけの立体構造体を得られた(図1)。

当時、細胞だけで円柱状の構造体を作製した類似の論文が複数発表されていたが、どれも数ヶ月の培養期間を要し、その結果の厚み(高さ)は約2mmが上限であった。

筆者らのこの型枠方式(モールド方式と呼んでいる)では、細胞の条件がよければ厚みが1cm程度の構造体を作製することが可能になった。

いくつか条件を試行錯誤したのち、家兎の骨髄由来の間葉系幹細胞で円柱状の構造体を安定して作製することが可能となった。早速、家兎の膝関節に自家細胞移植を行ったところ、非常に良好な関節軟骨の再生が得られた。

他の骨軟骨再生のシステムと異なり、拡大培養しスフェロイド化した間葉系幹細胞を未分化なままで移植しただけで、細胞が適材適所に(骨の層は骨に、軟骨の層は軟骨に)分化し、関節軟骨に特徴的な微細な構造まで再生されていた<sup>7,8)</sup>。

このモールド方式の軟骨再生は、現在ヒト幹細胞指針にそって臨床研究の準備を進めている。おそらく、関節軟骨は相対的に低酸素な組織であるため、この培地循環に関してはあまり細胞にとって望ましくないモールド方式でも立体的な細胞だ

けの構造体を作られると考えていた。

ただし、大量のスフェロイドを手作業で準備して型枠に流し込むという方法は単純だが単調な作業が続くため、なんとか自動化できないかと思うようになっていた。ちょうど、光硬化型のラピッドプロトタイピングが九大医学部の共同実験室に設置されていたことを思いだし、ラピッドプロトタイピングの原理、とくに積層方式を応用して、スフェロイドを自動で積層する装置が作れないかと考えた。一個一個のスフェロイドを積み木のように積み上げて立体化することで、モールド方式では理論的に困難な中空状の構造体や、複数の種類の細胞を任意の位置に積みあげて臓器を模した細胞だけの構造体ができるのではないかとという発想である。

そこで、機械工学や制御の知識が全くなかった当時の筆者は、企業に装置の開発をお願いしようと考え、地元のロボットメーカーや複数のものづくり系の企業に装置のコンセプトを提案し、共同開発ができないか相談した。しかし、当時大学院生であった筆者には研究資金に乏しいという致命的な問題があり、ほとんどの企業にことごとく断られた。2年ほど複数のものづくり系企業を回った後、最終的に開発に応じてくれた企業は二足歩行のロボットを使ったアミューズメント系ベンチャーとクリーンベンチを製造販売する地場のバイオ系メーカーであった。これらの企業と一緒になってJST育成研究に“バイオリピッドプロトタイピング”プロジェクトとして研究資金を応募したところ、見事採択され、具体的な開発に着手できた。このメンバーとの議論の際に、ロボットベンチャーの開発者が、スフェロイドを針で刺してハンドリングするという突拍子もないアイデアを持ちかけてきた。当初はそんな細胞を針で刺すなんて非常識だ、バイオ・細胞に関して無知な工学系エンジニアの変わった発想だということで、針で刺す案は却下されていた。

### 3. 創外固定法

JST採択前の会議で、具体的にスフェロイドを

どのように積層していくのか、単純にモールド方式では複雑な形状を作製するのは困難で何か別の方法が必要だと議論がつづいていたが、具体的なアイデアがなかなか浮かばない日が続いた。そんなある日、整形外科の術後カンファレンスで学生たちが眺めていた教科書のページが目にとまった。それは骨折の治療法が記載されていた章であった。通常、骨折の治療では、ずれた骨片をおおよそその位置に整復しギプスなどで固定を行う。できるだけ、非観血的に行うのが望ましく、うまく整復できれば1~2ヵ月程度固定を行うと骨癒合が得られリハビリを開始する。しかし、骨折の転位（ずれ）が著しい場合などはやむを得ず手術となる。その場合は、骨片を解剖学的に（ある程度）正しい位置に整復し、チタンやステンレス製のプレートやスクリュー、ピンなどで骨片を固定する（内固定）。整形外科医以外の医師には驚かれることが時々あるが、小児の骨折の場合はある程度ずれた位置や少々折れ曲がった状態で骨が融合しても成長と共に骨がまっすぐになり、数年で正常な骨と見分けのつかない骨になる（骨のリモデリングと呼ばれる）。通常の内固定では骨癒合が得られてから、約半年以降に、固定材を抜去・摘出する抜釘と呼ばれる手術を行うのが一般的である。

これらの骨折の外科的な治療の一つに、創外固定（External fixation）というテクニックがある

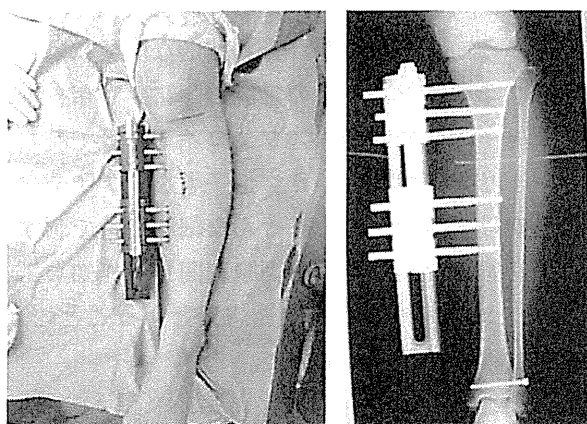


図2 創外固定 (External fixation)  
九州大学整形外科 中島康晴先生 提供

(図2)<sup>9)</sup>。これは、皮膚からピンを骨片に貫通させ、ピン同士を固定器で止めるという方法である。骨折部を直接解放せずに固定でき、通常のプレート固定と比べると皮膚や筋肉を大きく切開せずに治療できることが多いため、骨折のパターンによっては非常に便利で有効なテクニックである。

これら骨折の治療の章を（学生から取り上げて）眺めているうちに、スフェロイドを仮固定するというアイデアを思いついた。基本的に骨折の外科的治療の根底にある原理は、骨片をある程度の位置に仮固定し、あとは適切な環境（清潔、栄養管理）で維持すると、生体の自己治癒能力に任せて、骨同士が融合するのを待つということである。治癒後に仮固定材を抜去することで、治療が完了し、リハビリを本格的に行う。

細胞、特にスフェロイドにダメージを与えることなく、仮固定を行えば、スフェロイド同士が結合・融合するのではないかと仮説を思いついた。半年前にロボットエンジニアから出たスフェロイドを刺すアイデアとリンクした。

つまり、細い針でスフェロイドを刺して串団子を作り、強制的にスフェロイド同士を隣接させるというアイデアであった。さっそく、手持ちにあったリード線をほぐして、スフェロイドに刺してみると、悪戦苦闘したがとりあえず串刺しに成功した（図3左）。しかし、銅線はイオンが出て細胞毒性があるのではないかと危惧し、様々な材料を探してみた。特に生体に無害な材料ということで、当初着目したのは菌ブラシの毛であった。近くスーパーで極細と記載されている菌ブラシを数種類購入し、毛を一本ずつ切離して、実体顕微鏡下でスフェロイドの刺入を試みた。毛のコシが弱く、たった2個のスフェロイドを刺入するのに2、3時間かかったが、何とかうまく刺入できた（図3右）。この“串団子”を10cmの培養皿に入れた培地に入れ、インキュベーターに一晩おいたところ、翌朝培養皿は真黄色になっていた。コンタミだった。

やはり抗菌コート云々記載されていた製品でもオートクレーブが必要だろうと認識したが、菌ブ

ラシの毛はほとんどがナイロン製であったため、別の素材を探すことにした。

特に直径 0.5mm の細胞団子に刺せるほど細い針は、なかなかスーパーや DIY センター、手芸店には置いていなかった。そんなとき、たまたま整形外科の外來に置いてあった医療系の雑誌に、世界で一番細い注射針“ナノパス”(テルモ社製)の開発者である岡野工業の社長の記事が目に入った。この針だと思い、さっそくネットで岡野工業の電話番号を調べ、電話をかけてみるといきなり開発者の岡野社長が出てこられた。単刀直入に生の針だけをくださいとお願いすると、二つ返事で OK と快諾いただいた。後日、加工前の針を販売

元のテルモからいただき、滅菌してスフェロイドを刺入したところ、翌日には見事にスフェロイドの融合が得られた。

悪戦苦闘して、針を 3×3 本正方形に配置し、実体顕微鏡下でスフェロイドを刺せるようになったのはさらに数ヵ月後のことであった(図 4)。こうして細胞だけである程度任意の形状の立体構造体ができるようになってきた頃、この技術が整形外科領域、すなわち軟骨細胞や MSC 以外の細胞でも応用できる可能性に気付いた。

そこで心筋細胞を入手し個別に拍動する心筋細胞スフェロイドを剣山に刺してみたところ、個別に拍動していた心筋細胞のスフェロイドが翌日に

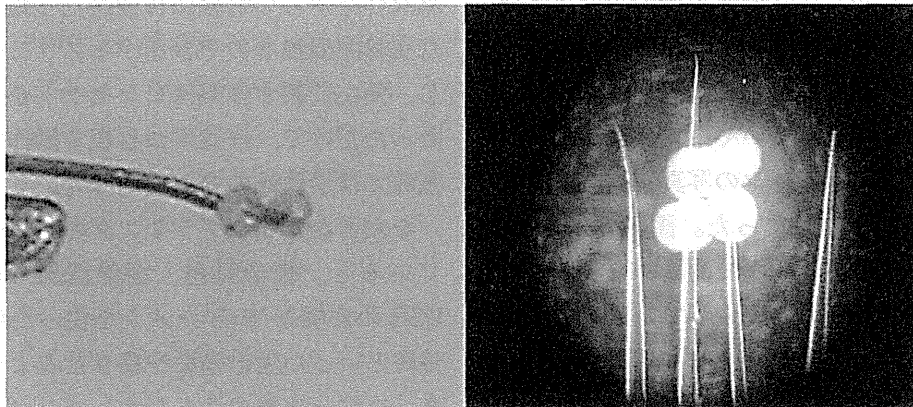


図 3 針で刺入された細胞塊  
(左) リード線、(右) ナイロン歯ブラシの毛先

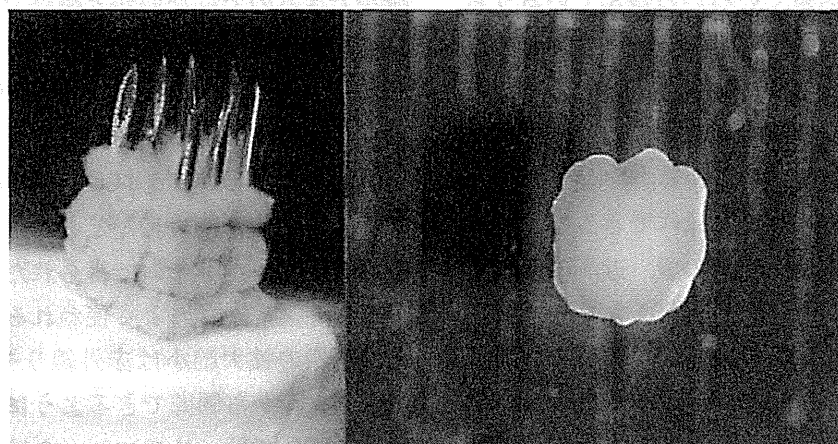


図 4 (左) 3×3 の剣山に刺入されたスフェロイド、(右) 翌日針から抜くと、立体的な細胞構造体を得られた

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、顕微授精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、フォーカスリ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は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）<sup>10)</sup>。

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

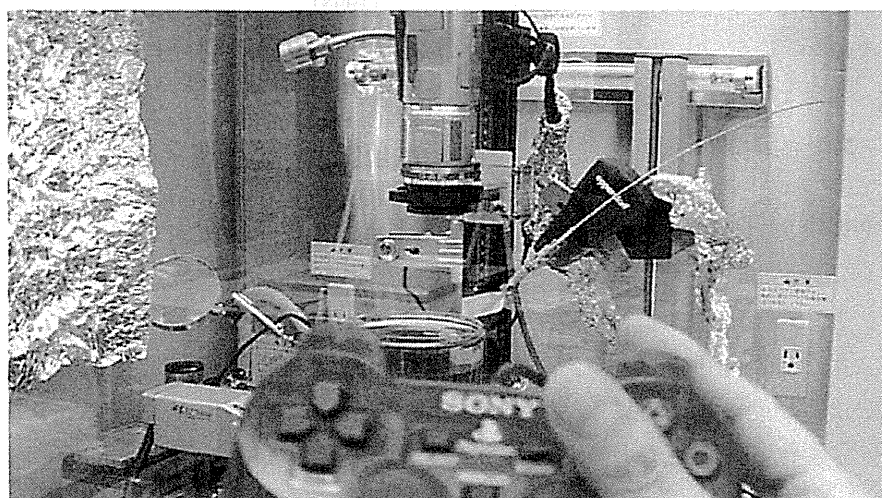


図5 手製バイオ3Dプリンター（初号機）

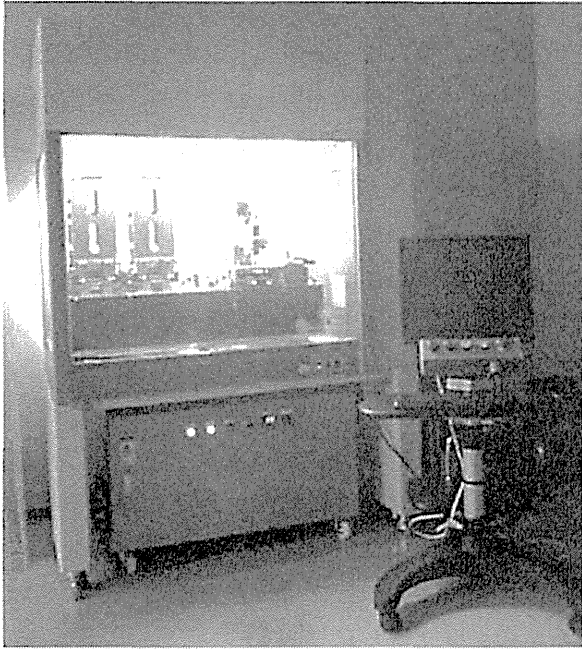


図6 澁谷工業との共同開発で完成したバイオ 3D プリンター (製品名 Regenova : Cyfuse 社より販売中)

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

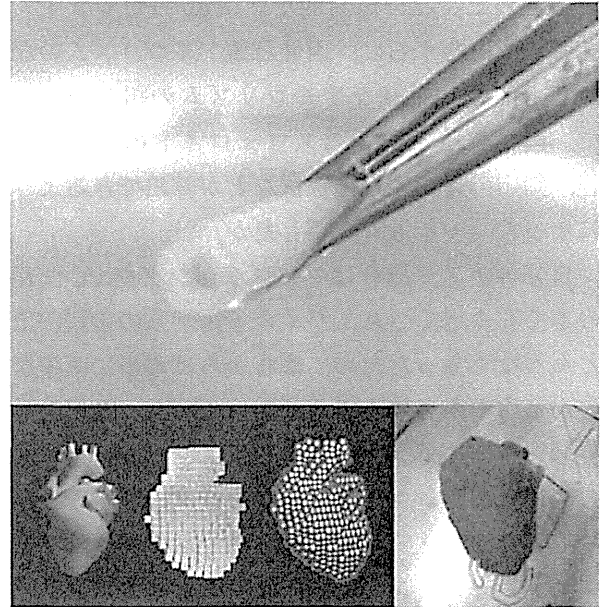


図7 Regenova によって作製された細胞構造体 (上段) 血管様の中空構造 (血管内皮細胞 + 繊維芽細胞)。 (下段) 心臓の 3D データを変換して積層した心臓様構造体 (繊維芽細胞のみで作られているため拍動しない)

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ラ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、いくつかのバイブ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ルム<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)5)</sup>、角膜<sup>7)8)</sup>、心臓<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>。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）のほほすべての細胞がアノイクス（anoikis）<sup>11)12)</sup>を回避するため



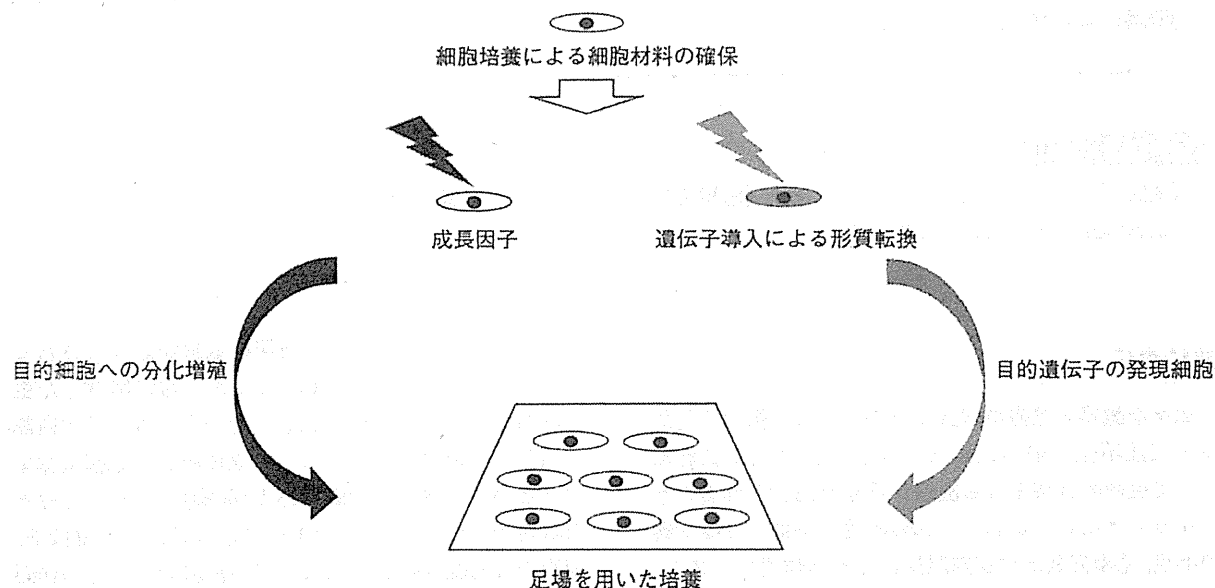
に、カドヘリン (cadherin) という細胞間接着分子が中心となって起こると考えられている<sup>11) 12)</sup>。

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<sup>13) 14)</sup> やハンギ

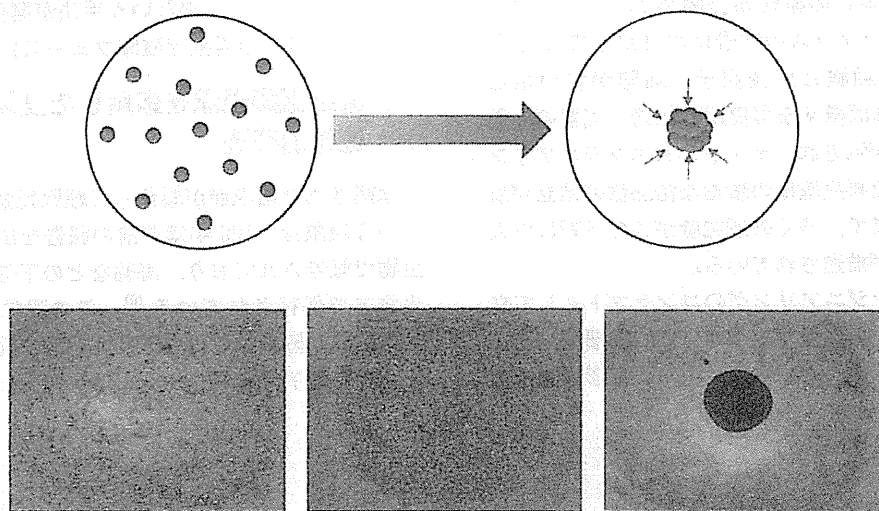
ングドロップ<sup>15)</sup> など様々な方法で作製されるが、基本的な原理としては、接着細胞を非接着環境で培養することにより、細胞凝集が誘導され形成される(図②)。

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<sup>16)</sup>。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

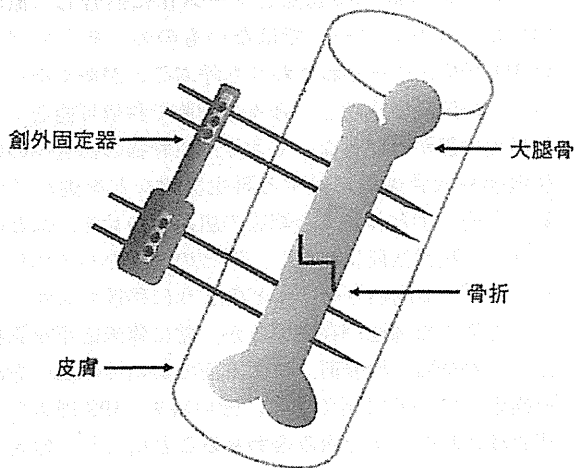


(グラビア頁参照)

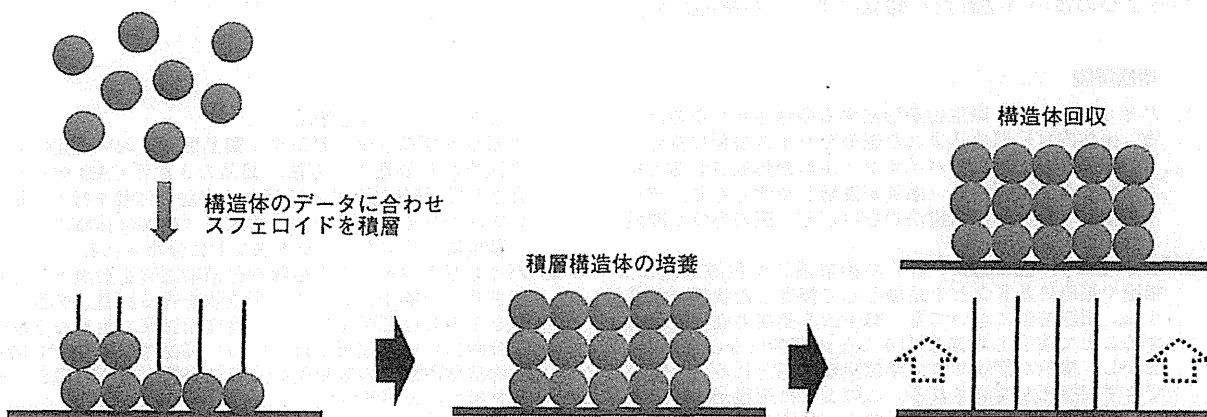
がいくつか出現し、様々な細胞を用いた立体構造体の作製に成功している。彼らの方法は、あらかじめ目的の形状に加工した鋳型に大量のスフェロイドを流し込み、細胞同士のさらなる融合による立体化を図るというアプローチがほとんどであり、単純拡散によって培地供給とガス交換が期待できるサイズ（細胞の種類によるが肝臓細胞で厚さ200 $\mu\text{m}$ 程度、軟骨細胞で1~2mm）の細胞だけの構造体を作製することが可能となっている<sup>17)</sup>。

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<sup>18)</sup>。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

図③ 創外固定模式図



図④ スフェロイドの積層化



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)<sup>18)</sup>。

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<sup>19)</sup>(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構造体を構築するというバイオリピッド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)<sup>18)</sup>。

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)<sup>18)</sup>。現在、様々な種類の細胞を用いて、1 $\text{cm}^3$ 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

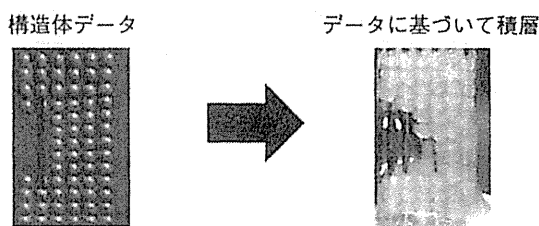


強度特性をもつ血管様のチューブ状構造体、半月板を模した軟骨細胞からなる構造体などで、有効な初期データが得られている。特に大型の細胞構造体を作製すると、構造体内部への培地やガス交換が問題となるが、われわれのシステムでは任意の位置に空洞を設置することが可能になるため、血管網に類似した構造をもつ大型の細胞だけの構造体を作製可能である。

### 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、バイオリッドプロトタイプリングシステム（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3D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<sup>川原4</sup>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. バイオフィルム：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ル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. ラビッドプロトタイプリング：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