

博士論文概要

論文題目

ハイドロゲルを加工するための
マイクロ加工技術に関する研究

Study on Microfabrication Technologies
for Processing Hydrogels

申請者

田中 龍一郎

Ryu-ichiro TANAKA

総合機械工学専攻 マイクロ・ナノ工学研究

2020年12月

再生医療は、疾患や事故などによって損傷、機能低下した生体組織の再生を目指す、新しい医療である。厚生労働省によると産業として再生医療は、製品とその周辺産業を含めると、国内において2030年には1.6兆円、2050年には3.8兆円規模になると予測されている。再生医療は、慢性疾患や高齢化に伴う疾患等を根本治療することから、医療費の削減に貢献する可能性があると考えられている。さらに臓器の再生により、必要な移植治療の数を削減することから、長年問題になっている臓器提供者不足の解決が期待されている。これらのことから国内においては近年、骨格筋細胞由来であるハートシート[®]（TERUMO Co.）の移植治療が保険適用されたことや、佐賀大学において細胞製人工血管移植の治療が開始されたなど、実用化に向けた動きが盛んである。

生体組織の構築手法の開発が再生医療において重要になるが、これを学問分野として確立したのが1993年に提唱された組織工学である。組織工学では、生体組織が細胞、成長足場、成長因子の3つ要素から成るものとして捉え、それぞれ生体内環境の模倣や細胞の成長に適切な足場の設計、培養方法など様々な観点から技術開発を行う。治療効果の高い機能的な人工生体組織の構築を目指し、これらに関する研究開発がこれまで行われてきた。

生体組織の構築において重要となるのは細胞の成長足場となるハイドロゲルの加工である。人工生体組織の構築において、細胞の成長足場となるハイドロゲルの構造は、人工生体組織の構造を決定する。高い機能を持った人工生体組織を作製するためには、細胞同士や成長足場の相互作用が重要で、生体内の構造を模倣することで機能が向上することがわかっている。細胞は直径10~30 μm であり、生体内の構造を模倣するような、精密に細胞が配置された生体組織を人工的に作製するためには、細胞の成長足場として用いるハイドロゲルをマイクロオーダーで加工する必要がある。

これまでハイドロゲルの加工法として、MEMS(Micro Electro Mechanical Systems) 技術を応用したモールドイング、エレクトロスピンニング、マイクロ流体技術を応用した方法が報告されており、マイクロオーダーで加工できるが、細胞やハイドロゲルの配置が制御された立体構造の構築は困難である。精密な立体構造を構築できるような確立されたハイドロゲルのマイクロ加工技術はなく、精密な人工生体組織の構築を実現するためには、これを解決する必要がある。

そこで本論文では、精密な構造を持つ人工生体組織の構築を目的としたハイドロゲルのマイクロ加工技術の開発に取り組んだ。バイオプリンティングにおけるディスペンシング法、静電インクジェット法、また放電加工を応用したハイドロゲルの加工技術の開発を行う。これらの加工技術によって、これまで作製困難であった人工生体組織の構築へと繋がる可能性を示す。

本論文は、全5章で構成されており、第1章では序論、第2章から第4章までは本論、第5章は結論を述べる。

第1章では、研究の背景とハイドロゲルの加工に関する先行研究と課題、本研究の目的、最後に本論文の構成について説明する。

第2章では、血管構造を有する立体組織を作製するためのサポートハイドロゲルのプリント方法を開発した。本研究では、細胞シートを積層することによって作られる立体組織に血管構造を作製する方法を検討した。細胞シートの積層によって作製された立体組織への血管構造のこれまでの作製方法は、血管内皮細胞による自己組織化のみであり、 ϕ 20 μm 以下であった。実際の生体内の血管の径は数十 μm から数 mm と様々である。生体内の組織を人工的に作製可能になるためには、これらの血管構造の作製が可能になる必要がある。そこで本研究では、 ϕ 100~500 μm の血管構造を細胞シート間に作製することを目指し、サポートハイドロゲルのプリント方法の開発を行った。細胞シートへ直接、サポートハイドロゲルをプリントすることは困難であったため、ゼラチンゲル上にプリントしたサポートハイドロゲルを細胞シート上に転写する方法を開発した。この方法により厚さ数百 μm の薄いハイドロゲルでもゼラチンゲルを溶解させるだけで、壊れることなく取り出すことが可能である。この方法を用いて細胞シート間に血管構造の作製を行った。細胞接着性の高いアルギン酸-フィブリンゲルをプリントし、表面に血管内皮細胞を播種した。これを細胞シートの間に積層した結果、血管内皮細胞を含んだ血管様構造を作製することに成功した。また、作製した組織を培養したところ、作製した血管様構造から血管新生が起こり、毛細血管網が構築されていることが確認された。これにより大小様々な複雑な血管構造を有する人工生体組織の構築の実現可能性が示唆された。また、RGD修飾アルギン酸ゲルを細胞シート間に積層し、これを溶解させることで、灌流可能な管腔構造の作製を行った。作製した管腔に開発した灌流デバイスによって墨汁を流すことに成功した。以上より、複雑な血管構造を有する人工生体組織の作製に応用可能なサポートハイドロゲルの加工方法を確立し、血管内皮細胞を含んだ構造や、灌流可能な管腔構造の作製を実証したことから、これまで作製困難であった厚い立体組織の構築の実現可能性を示した。

第3章では、静電インクジェットを用いたハイドロゲルのプリント特性の調査を行った。バイオプリンティングでは様々なプリント方法があるが、共通の課題は、高粘性の液体を高分解能でプリントすることが困難なことである。細胞の成長足場となるハイドロゲルのゲル化前のインクは高い粘性のものが多く、精密な生体組織をプリンティングによって構築するためには、この課題を解決することは重要である。高粘性の液体を高分解能でプリント可能な静電インクジェットを

用いて、ジェランガムゲル、アルギン酸ゲル、ゼラチンゲル、をプリントし、それぞれのプリント特性について調査を行った。

ジェランガムインクを平衡塩溶液へプリントを行った結果、静電インクジェットの特徴からユニークな形状のゲルを得ることができたが、高い分解能でプリントすることは困難であった。溶液中へのプリントは、ゲル化する前にインクが広がってしまう点や、溶液表面の揺れが起こるために、安定してプリントすることが困難である。そのため、高い分解能でハイドロゲルのプリントを行うには、固体上にプリントする必要がある。ゼラチンインクを温度制御されたステンレス板上にプリントを行うことで、分解能の制御が可能であることを把握した。ゼラチンインクの場合においては、高温のステンレス板上にプリントした場合、低温の場合に比べて分解能が向上することがわかった。アルギン酸インクをゼラチンゲル上にプリントすることで、高い分解能でアルギン酸ゲルをプリント可能であることを把握した。ゼラチンゲル上でアルギン酸ゲルをゲル化させることで、100 μm 以下のアルギン酸ゲルファイバーの作製に成功した。また、プリントされたアルギン酸ゲルを用いて細胞の接着の制御が可能であることを実証し、生体組織の精密な構造の制御に応用可能であることを示した。以上より、それぞれのインクと条件によるプリント特性から、静電インクジェットが高い分解能でハイドロゲルを加工可能な条件について把握し、細胞やハイドロゲルを精密に配置可能な加工技術として有用であることを示した。

第4章では、ハイドロゲルを対象にマイクロワイヤを用いて放電加工を行い、その特性について調査を行った。ハイドロゲルの溝加工には成形型を用いた方法があるが、必要な形状に応じて型を作製する必要があるため、テーラーメイドで加工を行うには、加工毎に、成形型を作製する必要があることが課題であった。そこで、放電加工によってハイドロゲルの溝加工が可能になることで、これを解決できると考えた。本研究では、放電加工を用いたハイドロゲルの加工を行い、加工される溝の幅、深さからその特性を把握した。ゼラチンゲル、アルギン酸ゲルを対象に放電加工を行い、加工特性を把握した。滑らかな加工面が得られる一方、最小の加工溝の幅は800 μm 以上であった。そこで、加工分解能を向上させるために、加工油を用いて加工を行ったところ、数 μm の加工分解能を得ることができた。この分解能は、細胞の大きさに対して十分であり、放電によるハイドロゲルの加工は、複雑な構造、テクスチャーを持つ人工生体組織の構築が可能な技術であることを示した。

以上、各章において、人工生体組織の構築へ応用可能なハイドロゲルのマイクロ加工技術の開発を行った。それぞれの手法において、精密で複雑な構造を持つ人工生体組織の構築へと寄与できる可能性を示した。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 田中龍一郎 印

(2020年 10月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 (査読有り)	<ol style="list-style-type: none"> ○Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Shinjiro Umezu, "Printing support hydrogels for creating vascular-like structures in stacked cell sheets", <i>Artificial Life and Robotics</i>, 25, 199-203, 2020. Takayuki Tamura, Ryotaro Akiyama, Ryu-ichiro Tanaka, Hiroyuki Kawamoto, Shinjiro Umezu, "Groove fabrication on surface of soft gelatin gel utilizing micro-electrical discharge machining (Micro-EDM)", <i>Journal of Food Engineering</i>, 277: 109919, 2020. ○Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Shinjiro Umezu, "Fundamental characteristics of printed gelatin utilizing micro 3D printer", <i>Artificial Life and Robotics</i>, 22 (3), 316-319, 2017. Takafumi Arai, Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Shinjiro Umezu, "Fabrication of micro-gelatin fiber utilizing coacervation method", <i>Artificial Life and Robotics</i>, 22(2), 197-202, 2017.
講演	<ol style="list-style-type: none"> Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Tatsuya Shimizu, Shinjiro Umezu, "Fabrication of gellan gum gel fibers by printing on the gelatin gel", 24th International Symposium on Biocomplexity, Oita, Japan, January, 2019. Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Tatsuya Shimizu, Shinjiro Umezu, "Toxicity evaluation of alginate lyase for dissolving alginate gel used as support material", International Symposium on BioComplexity (ISBC) 2019 Summer Symposium, Tokyo, Japan, August, 2019. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "立体組織構築のためのバイオプリンタを用いたハイドロゲルのマイクロ加工", 日本材料科学会 学術講演大会, 42, 神奈川県, 2019年5月. Takayuki Tamura, Ryotaro Akiyama, Ryu-ichiro Tanaka, Shinjiro Umezu, "Fabrication of Grooves on Gelatin Film Utilizing Micro-Electrical Discharge Machining (micro-EDM)", 9th International Conference on Flexible and Printed Electronics, P118, Changzhou, China, September, 2018. Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Tatsuya Shimizu, Shinjiro Umezu, "Development of gellan gum gel devices", 5th TERMIS World Congress, 02-P376, Kyoto, Japan, September, 2018. 田村隆行, 田中龍一郎, 秋山亮太郎, 梅津信二郎, "高電圧を印加したマイクロ放電加工におけるゼラチンゲルの加工特性", 日本機械学会 第26回茨城講演会, 茨城県, 2018年8月. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "静電インクジェット法を用いたユニーク形状を有するジェランゴムゲルの加工特性", 日本機械学会 第26回茨城講演会, 茨城県, 2018年8月.

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>8. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "ジェランガムゲルを用いたバイオデバイス開発のためのゲル濃度の検討", 日本材料科学会 第一回インフォマティク・バイオマテリアル研究会, 神奈川県, 2018年5月.</p> <p>9. 田村隆行, 田中龍一郎, 梅津信二郎, "マイクロ放電加工によるゼラチンゲルの3次元加工", 日本材料科学会 第一回インフォマティク・バイオマテリアル研究会, 神奈川県, 2018年5月.</p> <p>10. 田村隆行, 田中龍一郎, 梅津信二郎, "マイクロ放電加工によるゼラチンゲルの複雑形状加工", 日本機械学会 IIP2018 情報・知能・精密機器部門講演会, 埼玉県, 2018年3月.</p> <p>11. 松本夏輝, 田中龍一郎, 梅津信二郎, "超音波振動を用いたアルギン酸ゲル構造物の断面形状コントロール", 日本機械学会 IIP2018 情報・知能・精密機器部門講演会, 東京都, 2018年3月.</p> <p>12. 田村隆行, 田中龍一郎, 梅津信二郎, "ゼラチンゲルのマイクロ放電加工における加工形状の調査", 日本機械学会 第1回機械材料・材料加工部門 若手ポスターシンポジウム, 東京都, 2017年11月.</p> <p>13. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "バイオプリントにおけるノズル口の形状が与えるプリント精度への影響", 日本機械学会 第一回機械材料加工部門若手ポスターシンポジウム, 東京都, 2017年11月.</p> <p>14. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "マイクロバイオ 3D プリンタによるバイオマテリアルゲルのパターンニング", 日本機械学会 2017年度年次大会, S1620102, 埼玉県, 2017年9月.</p> <p>15. 田村隆行, 田中龍一郎, 梅津信二郎, "放電加工を用いたゼラチンゲルのマイクロ溝作製における基礎特性", 日本機械学会 第25回茨城講演会, 茨城県, 2017年8月.</p> <p>16. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "バイオマテリアルゲルの高精度パターンニング技術の開発", 第119回日本画像学会研究討論会, P13, 東京都, 2017年6月.</p> <p>17. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, "マイクロバイオ 3D プリンタの開発とバイオマテリアルのパターンニング", 日本機械学会 情報・知能・精密機器部門(IIP 部門)講演会, PH7, 東洋大学白山キャンパス, 東京都, 2017年3月.</p> <p>18. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, 静電インクジェットを用いた高精度なバイオマテリアルのプリント, 第16回日本再生医療学会総会, p441, 福島県, 2017年3月.</p> <p>19. Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Shinjiro Umezu, "Printing Gellan Gum Gel Utilizing Micro 3D Printer for Bio-devices", AROB 22st 2017, B-Con PLAZA, Oita, Japan, January, 2017.</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>20. 田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, “マイクロ 3D プリンタを用いた着弾面の材料による吐出精度の変化”, 第 118 回日本画像学会研究討論会, 京都府, 2016 年 11 月.</p> <p>21. 田中龍一郎, 坂口勝久, 梅津信二郎, "マイクロ 3D プリンタによるゼラチンの 3 次元造形", 日本画像学会 Imaging Conference JAPAN 2016, P7-9, 神奈川県, 2016 年 6 月.</p>