

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

2021 年 2 月

田中 龍一郎
Ryu-ichiro TANAKA

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

2021年2月

早稲田大学大学院 創造理工学研究科
総合機械工学専攻 マイクロ・ナノ工学研究

田中 龍一郎
Ryu-ichiro TANAKA

目 次

第一章 序論	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究目的	11
1.3 本論文の構成と概要	13
第二章 細胞シートとディスペンシング法による血管構造を有する人工生体組織の開発	15
2.1 緒言	15
2.2 実験方法	16
2.3 実験結果と考察	19
2.3.1 細胞シート間へ積層可能なジェランガムゲルのプリント方法	19
2.3.2 アルギン酸-フィブリンゲルを用いた血管様構造の作製	23
2.3.3 RGD修飾アルギン酸ゲルを用いた灌流可能な血管構造の作製	28
2.4 結言	36
第三章 静電インクジェットを用いた高精度なハイドロゲルの加工	38
3.1 緒言	38
3.2 実験方法	39
3.3 実験結果と考察	41
3.3.1 平衡塩溶液中へのジェランガムインクのプリント	41
3.3.2 温度制御されたステンレス面へのゼラチンインクのプリント	46
3.3.3 ゼラチンゲル上へのアルギン酸インクのプリント	48
3.4 結言	51
第四章 放電加工を応用したハイドロゲルの加工技術の開発	52
4.1 緒言	52
4.2 実験方法	54
4.3 実験結果と考察	54
4.3.1 マイクロワイヤからの放電による加工特性	54
4.3.2 加工油を用いた場合の加工特性の変化	61
4.4 結言	63
第五章 結論	63
謝辞	67
参考文献	68
研究業績	77

第1章 序論

1・1 研究背景

1・1・1 再生医療を実現するための生体組織構築技術

再生医療とは、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^[1-1]。経済産業省「再生医療の実用化・産業化に関する研究会」の報告書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、国内市場において2030年には1.6兆円、2050年には3.8兆円、世界市場においては、2030年には17兆円、2050年には53兆円になると予測されており、大規模の産業へと成長することが期待されている^[1-2]。また、日本における医療費の総計は少子高齢化によって年々増加しており、2017年には42.2兆円となり過去最高を記録していることから、医療費の削減は急務であるが、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、医療費の削減に寄与する可能性があるとされている^[1-3]。再生医療には、疾患部分に再生を促す薬剤を届けるドラッグデリバリーシステム^[1-4]や、細胞を注入する細胞治療法^[1-5]などがあるが、主な方法は、生体外で細胞から生体組織を構築し、これを疾患部分に移植することで治療を行う方法である。この方法を用いた、国内における研究開発は近年、筋芽細胞から作られるハートシート[®]（TERUMO Co.）の移植治療が保険適用されたことや^[1-6]、佐賀大学において細胞製人工血管移植の治験が開始^[1-7]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^[1-8]である。図1-1に示すように組織工学では、生体組織が細胞、成長足場、成長因子の3つ要素が重要と考えられ、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。それぞれの相互作用は極めて重要であり、生体内の環境を模倣し、構造を再現することで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。

また、人工生体組織の構築プロセスを図1-2に示す^[1-9]。材料として細胞、成長足場や構造維持に用いられる骨格基材、細胞の配置や接着を制御する成長因子や接着タンパクの表面設計が必要となる。骨格基材を加工し、これと細胞を組み合わせることで、人工生体組織が構築される。骨格基材は細胞の成長足場や、構造を維持するための材料であり、機械工学的手法を用いた骨格基材の成形加工技術は重要である。このことから人工

生体組織を構築する上で細胞の成長足場として用いられる多糖類やタンパク質ベースのハイドロゲルを加工する技術が必要となる。これらのハイドロゲルは、人工生体組織の骨組みとなり、全体の構造を決定する^[1-10, 1-11]。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。本研究においては、生体組織の構築プロセスにおける骨格基材の成形加工技術について取り組む。

しかし、ハイドロゲルを精密に立体へと加工することは困難である。現在の技術では、MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術の応用により、マイクロオーダーで平面上にハイドロゲルや細胞のパターニングが可能である。疾患の治療を実現する機能的な人

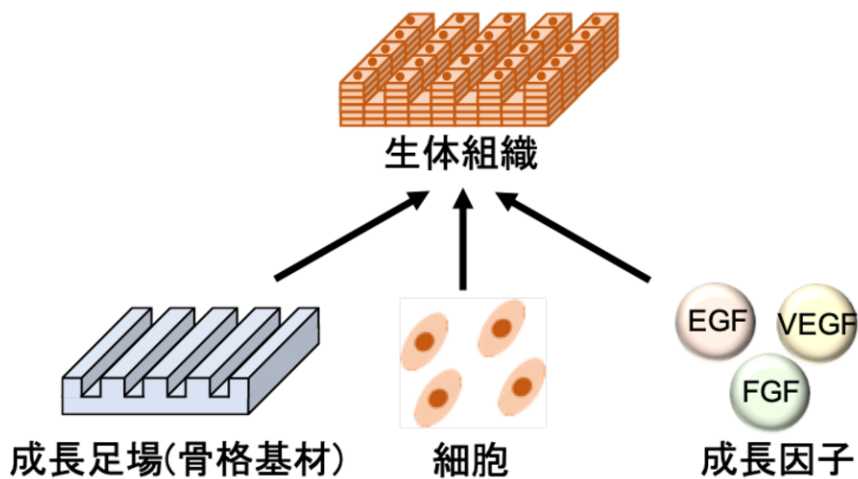


図 1-1 生体組織を構成する 3 要素.

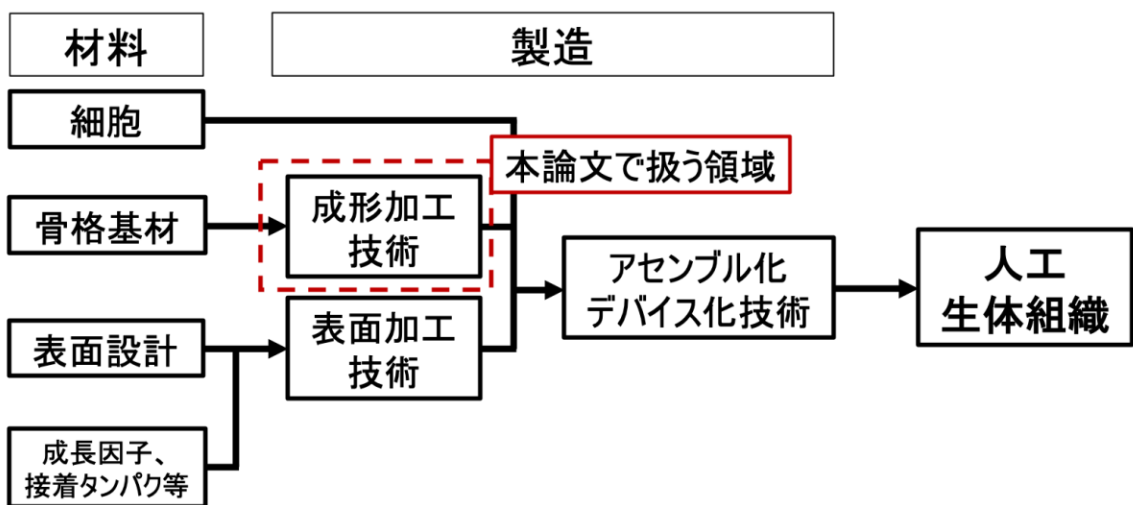


図 1-2 人工生体組織の製造工程^[1-9].

工生体組織の構築を実現するためには、立体的にハイドロゲルを加工する技術は不可欠である。そこで本論文では、人工生体組織を構築する上で重要な骨格基材となるハイドロゲルの成形加工技術の開発に取り組む。

1・1・2 人工生体組織構築のためのハイドロゲルの成形加工技術

人工生体組織構築のためのハイドロゲルの加工技術は、組織工学が提唱されてから、モールドイング、エレクトロスピンニング、マイクロ流体を応用した方法が開発されており、技術発展と共に高精度な加工が可能になってきた。各手法の概要を図 1-4 に示す。

組織工学が提唱された 1993 年には、ハイドロゲルをモールドイングによって成形していたが、MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術の発展によって、マイクロモールドイングとして、マイクロオーダーの微細な加工が可能になった。また 1990 年後半から、エレクトロスピンニングによってハイドロゲルを加工し、これを成長足場として用いる研究が報告され始めた。また、2013 年にはマイクロ流体技術を使ったハイドロゲ

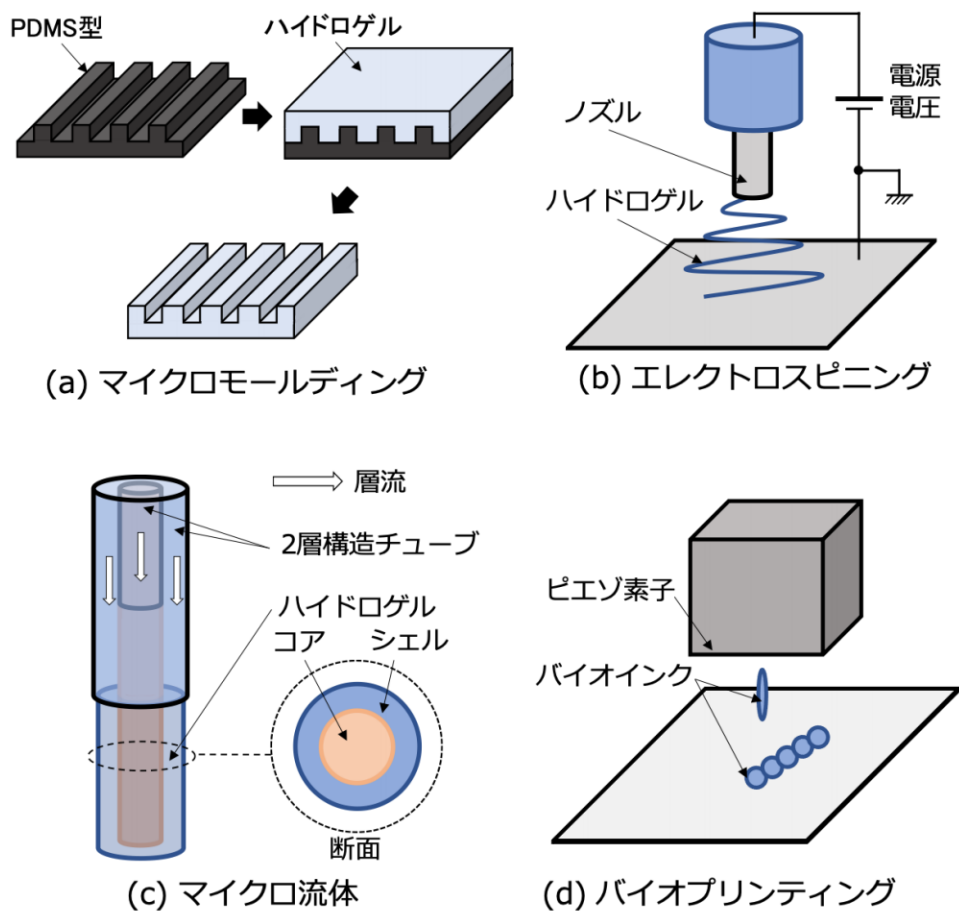


図 1-3 ハイドロゲルの加工方法. (a) モールドイング. (b) エレクトロスピンニング. (c) マイクロ流体. (d) バイオプリンティング.

表 1-1 ハイドロゲル加工方法.

	マイクロモールディング	エレクトロスピニング	マイクロ流体
特徴	型成形によるマイクロオーダーの微細構造を持ったハイドロゲル	不織布の様な多孔質のハイドロゲル	コア-シェル構造を持ったファイバー状のハイドロゲル
加工精度	1 μm ~	数百nm~のハイドロゲルファイバー 数 μm ~の孔構造	メートル単位の長さ 内径20 μm ~コア構造
メリット	微細構造によって細胞の配置や細胞の配向を制御可能	栄養素、酸素の透過率が良いため、立体組織の培養が可能	シェル部分に細胞を培養することでファイバー状の組織の作製可能
デメリット	型の作製が必要であるため、テーラードに加工することが難しい	ランダムな構造であるため、細胞の配置の制御が難しい	立体組織を作製することは難しい
Ref.	(1-12)~(1-16)	(1-17)~(1-19)	(1-20)~(1-22)

ルの加工技術が報告され、メートルオーダーの長さのファイバー状の組織の構築が実現された。また、3D プリンティングの応用で、ハイドロゲルを立体構築するバイオプリンティングが 2000 年初期に開発され、2003 年に最初の特許が出願されている。プリンティング方法や、材料の開発によって、制限はあるが、高精度に立体構造の構築が可能になってきている。各方法の詳細は後述する。

図 1-3(a)のマイクロモールディング手法は、MEMS 技術の応用で、PDMS 表面に微細加工を行い、これを成形型として用いてハイドロゲルを加工する^[1-12-1-16]。光によって硬化する SU-8 をフォトリソグラフィによってパターンニングした表面に、固化前の PDMS を流し込んだ後、これを剥離し、数 μm の微細なテクスチャーを持つ PDMS 型を作製する。さらにこれを成形型として用いることで、数 μm のテクスチャーを持ったハイドロゲルの加工が可能である。デメリットは、ハイドロゲル表面にしか加工できず、立体的な構造を構築することは難しい点と、PDMS 型を作製する必要があるため、テーラードで加工するには、工程が多くなってしまう点である。

図 1-3(b)のエレクトロスピニングは、静電力によってファイバー状のハイドロゲルを吐出し、不織布のような成長足場を作製する方法である^[1-17-1-19]。数十 μm のポアと直径数 μm のファイバー状のハイドロゲルから構成される成長足場は、栄養供給や剛性の点でメリットがある。しかし、ランダムにファイバー状ハイドロゲルが吐出されることから、全体構造を制御することは難しい。

図 1-3(c)のマイクロ流体技術を用いたコア-シェル構造を持つハイドロゲルファイバーを作製する手法は、メートル単位でファイバー状の組織を作製することが可能である

[1-20-1-22]。図に示すように層流を発生させて作製した二層構造のハイドロゲルファイバーのコア部で細胞を組織化させることで、ファイバー状の組織が作製される。この方法によって、ファイバー状の心筋、神経、膵島、血管組織の作製が可能で、特に、膵島ファイバーの腎臓移植は糖尿病への治療に効果があると実証された^[1-20]。ファイバー状の組織を織物のように編むことで立体的な組織を作製することができるとされているが、細胞の配置を制御することは難しい。

マイクロモーディング、エレクトロスピンニング、マイクロ流体の各手法の特性を表1-1にまとめた。それぞれの手法においてマイクロオーダーで加工が可能であるが、任意の立体構造を持ったハイドロゲルを加工することが困難であることが共通のデメリットである。上述したように、生体内の構造を再現した細胞、成長足場のコネクションが機能の向上につながるとされている。これを実現するために提唱された方法が、3Dプリンティング技術を応用したバイオプリンティングである。

1・1・3 バイオプリンティングに関する研究

図1-3(d)に示すバイオプリンティングは、3Dプリンティング技術の応用で、細胞を含むスキャフォールドをプリント積層し、立体組織を構築する手法である。2000年代に熱溶解性のプラスチックや光造形などの3Dプリンター市場が成長し、新しい製造技術として大きな注目を浴びる中、バイオ分野への応用として提唱されたのがバイオプリンティングである。国内では2009年に富山大学の中村教授らによって発表された論文が最初の報告である^[1-27]。この論文では、市販のプリンターで使用されていたインクジェット技術を用いて、細胞とアルギン酸ゲルによる立体組織が作製されたことを報告している。これ以降、インクジェット方式だけでなく、ディスペンサーを用いたディスペンシング方式、光造形法などのプリンティング技術や、プリンタブルなスキャフォールドの開発が行われ、バイオプリンティング技術は発展してきた。

バイオプリンティングに関する研究をプリンティング手法で大別すると、インクジェット法、ディスペンシング法、光造形法、静電インクジェット法の4つである。図1-4に各プリント手法をまとめた。これらの手法を用いて細胞を含む成長足場材料をプリント積層し、立体組織を構築する。プリンタブルな成長足場材料はバイオインクと呼ばれる^[1-28]。

インクジェット法は、一般的に、市販のプリンターに搭載されているようなピエゾ素子を用いてバイオインクをプリントする手法である。この手法は前述したように、富山大学の中村教授らによって報告された論文が最初である。プリントされた細胞の生存率

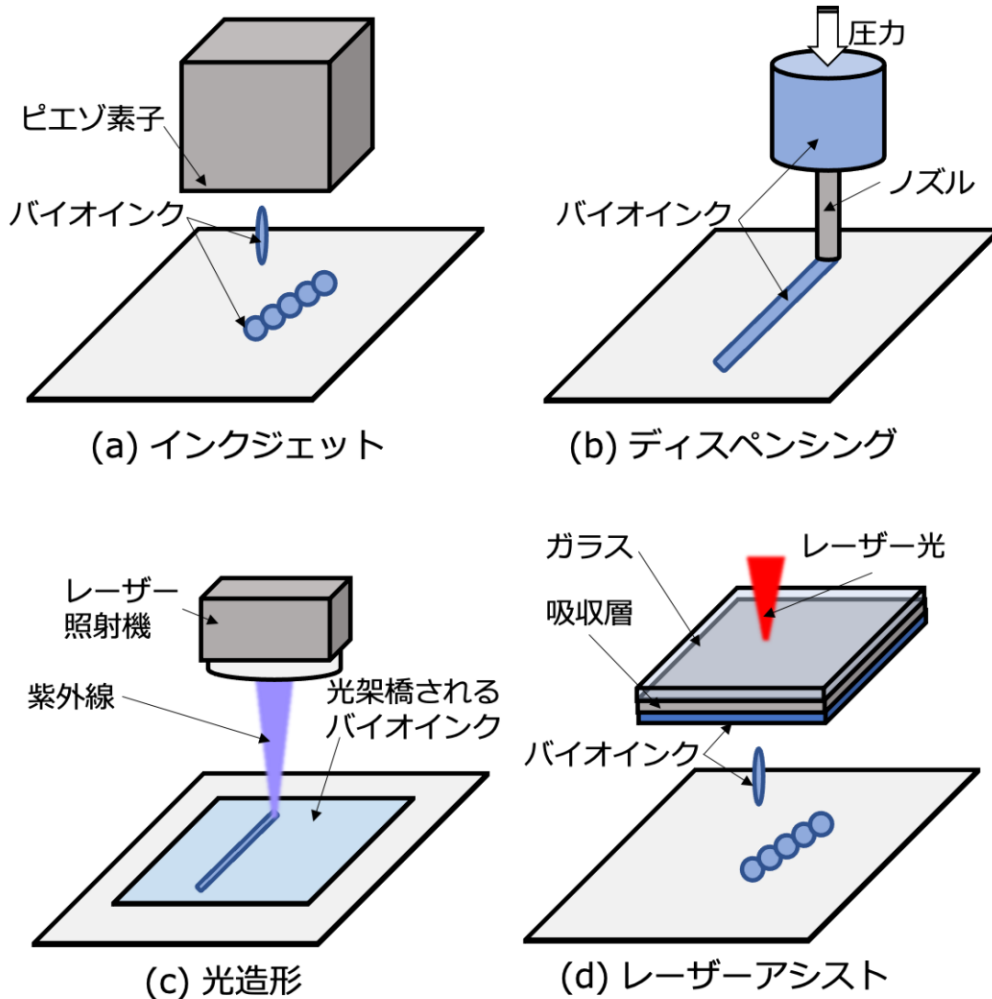


図 1-4 バイオプリンティングの各プリント方法. (a) インクジェット. (b) ディスペンシング. (c) 光造形. (d) レーザーアシスト.

は 85%以上とされている。インクジェット方式は毎秒に 10000 滴と、早い速度でプリントできるが、プリント可能なバイオインクの粘性は低い^[1-29, 1-30]。細胞が成長するための成長足場材料は粘性の高いものが多い。そのため高粘性のバイオインクをプリント困難であることはインクジェット法の大きな課題である。

ディスペンシング法は、空気圧などの圧力でバイオインクをノズルからプリントする手法である^[1-31-1-33]。ノズル口の大きさによるが、高粘性のバイオインクをプリント可能なことが大きなメリットである。機構が非常に単純で安価であることから、バイオプリンティングに関する論文の多くはこの手法が用いられている。問題点としては、プリントされた細胞の生存率が 40-80%であり、インクジェット方式に比べて低い。また、プリント速度は他の手法に比べて遅いことが課題として挙げられる。プリント可能なバイオインクの粘性は、ノズル径に依存する。ノズル口が小さいほど、バイオインクを押し

出すための高い圧力を要する。しかし、圧力が大きいほど、バイオインクに含まれる細胞への負荷が大きくなるため、生存率は低下する。

光造形法は、光架橋によってゲル化するバイオインクを用いることで、立体的にスキャフォールドを造形する方法である^[1-34-1-36]。これは光架橋可能なゼラチンインクが開発されたことで実現された^[1-36]。この手法は照射するレーザー光で架橋し造形するため、非常に分解能が高い。また、犠牲材料を用いずに管腔構造が作製可能である。犠牲材料を用いた管腔構造の作製手法については後述する。欠点としては、使用可能なバイオインクが光架橋可能なものに限定されてしまう点と、紫外線により細胞へのダメージが懸念される点である。

レーザーアシスト法は、ガラス、吸収層、細胞を含むインクの3層からなるプレートに、レーザーを照射し、加熱された部分から気泡が発生することで、プレートからインクを吐出する方法である^[1-37-1-39]。ノズルを用いないため、プリント可能な粘性の幅は広く、1-300 mPa·sである。さらに細胞生存率は95%以上と高い。最大で細胞濃度 10^8 cells/mlのインクはマイクロスケールの分解能でプリント可能である。しかし、細胞を的確な位置にプリントすることが困難である。皮膚組織のモデルの作製が行われているが、将来的にスケールアップが実現されるかは不明である。

各プリント方法におけるインクの粘性とプリント分解能の関係を図 1-5 にまとめた。インクジェットは幅広い分解能でプリント可能であるが、高い分解能でのプリントが困難である。また、ディスペンシング法は高粘性のバイオインクをプリントすることができるが、分解能は低い。いっぽうで、光架橋やレーザーアシスト法によって高粘性のインクを高い分解能でプリントすることができるが、光架橋はプリント可能なインクに制限があること、レーザーアシストは装置構成が複雑で非常に高価になることがデメリットである。これらのことから、バイオプリンティングにおける共通の課題は、高粘性インクを高い分解能でプリントすることが困難であるという点であった。そこで、本研究では静電力を用いてインクをプリントする静電インクジェット法がこの課題を解決する。図 1-6 に静電インクジェット法の概要を示す。高電圧をバイオインクに印加することで、バイオインクと着弾面との間に静電力をはたらかせ、インクがノズルからプリントされる^[1-40-1-42]。バイオインクの特性和印加電圧によって、スプレーモードやドロップモードにプリントモードが変化する。静電インクジェット方式では、高い粘性のバイオインクを数 μm の大きさでプリント可能である。また、プリントされた細胞は生存することがわかっている。しかし、市販されているインクジェット方式と比べると、安定的

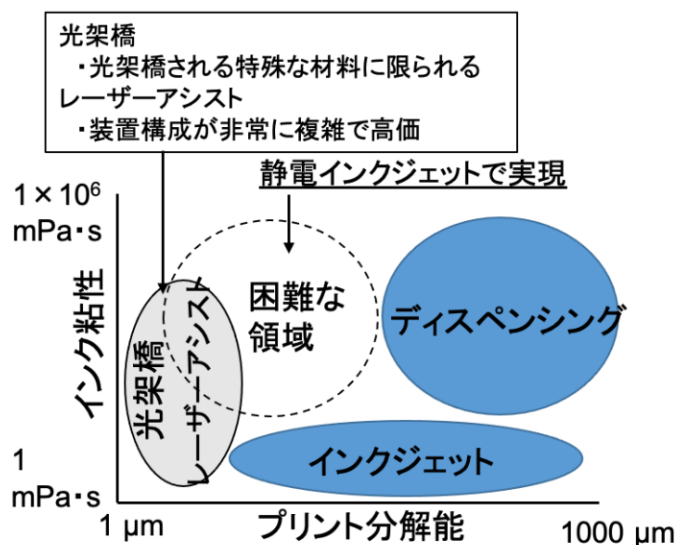


図 1-5 静電インクジェット法を用いた高精度な水素ゲルの加工技術の開発。

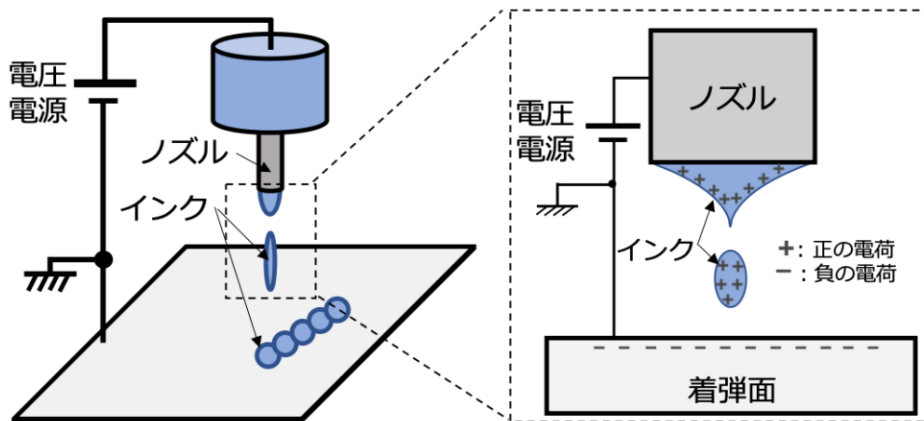


図 1-6 静電インクジェット法の概要図。

にプリントすることはまだ難しい。静電インクジェット法は、この問題を解決する機能を持っているが、バイオインクのプリント基礎特性に関する調査はまだ少ない。本研究では、この静電インクジェット法を用いた水素ゲルの加工の基礎特性について調査を行う。

また、人工生体組織の構築において、血管構造の構築は需要であるが、バイオプリンティングにおいても同様である。血管構造は、生体組織の内部へ栄養素を届け、老廃物を排出する機能があり、これがない生体組織は内部から壊死する。血管組織のない生体組織の厚さの限界は約 $200\ \mu\text{m}$ とされている^[1-43]。バイオプリンティングでは、血管構造を作製するために、図 1-7 に示すようなサポート水素ゲルを用いた方法が多く用いられる。血管構造を作製したい部分にサポート水素ゲルをプリントし、後にこれを溶解させることで、血管構造を作製する。この手法によって、様々な径の複雑な血管構造を持った生体組織の構築が実現されている。

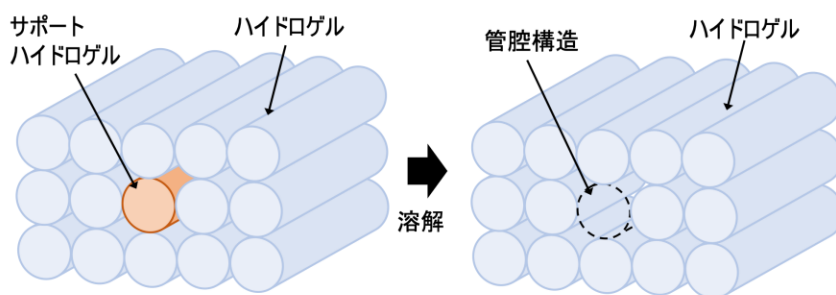


図 1-7 サポート水ゲルを用いた管腔構造の作製方法.

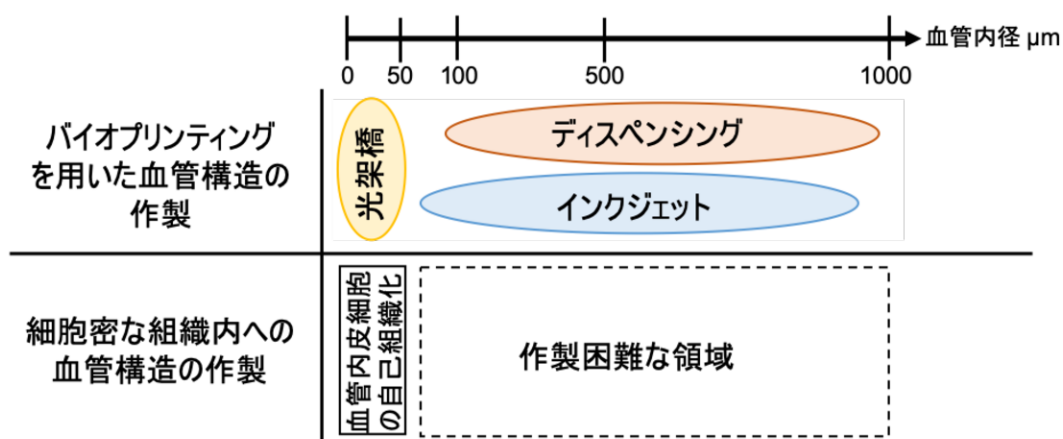


図 1-8 各手法における作製可能な血管構造の径.

バイオプリンティングにおける課題として、作製される生体組織の細胞密度が低いという点である。バイオプリンティングによって作製される立体組織は、成長足場となる水ゲルが組織の大部分を占める。そのため、実際の生体内の組織に比べて細胞密度が 4-20 倍低い立体組織しか作製できないため、細胞密度が低いことで、生体内の組織と同様な機能が得られないことが課題であった^[1-44]。

細胞シートや細胞スフェロイドによって、細胞だけで構築される立体組織へ血管構造を作製するためには、血管内皮細胞による自己組織化によって血管網を構築する手法が用いられる。しかし、径が直径 20 μm 以下の血管構造しか構築されず、実際の生体組織のような大小様々な径を持った血管構造を有する立体組織の構築は困難である。いっぽうで、図 1-8 に示すようにバイオプリンティングの様々なプリント方法によって、直径 1~1000 μm の管腔構造を水ゲル内に作製可能である。ディスペンシング法によって、細胞スフェロイドや細胞シートでは作製困難であった領域の径を持つ管腔構造を作製できることから、バイオプリンティングを用いた管腔構造作製手法、すなわちサポート水ゲルを用いた手法をこれらに応用することができれば、大小様々な径を持った管腔構造を有する立体組織の構築が実現できると考えられる。過去に細胞スフェロイ

ドと組み合わせた手法が報告されており^[1-45]、バイオプリンティングは犠牲インクを用いることで、立体組織内部に管腔構造が作製可能である。この手法を、細胞スフェロイドを積み上げて作製した立体組織に応用することで、大小様々な管腔構造を持った細胞密な立体組織を作製可能になった。しかし、細胞スフェロイド同士の接着が不十分であることから、組織断面を観察すると、隙間が多いことが依然として課題である。

1・1・4 放電加工に関する研究

放電加工は、これまで金属を加工する方法として用いられてきた^[1-46]。加工電極に印加電圧を加え、加工する対象の金属との間にアーク放電を発生させることで、熱が発生し、非接触で金属表面を削るように加工する。加工したい形状に成形した加工電極を材料に対して放電現象を起こしながらゆっくり当てていくことを行う型彫り放電加工や、金属製のワイヤを加工電極として用いることで、加工したい金属を任意の形状に切断するワイヤ放電加工が可能である。さらに加工するための電極の先端や放電エネルギーを小さくすることで、マイクロオーダーで溝加工が可能である。特に切削が困難な硬い金属を加工可能であり、また、放電加工された部分はバリがなく滑らかに仕上がることがメリットである。材料の任意の箇所に加工を行うことができるので、型を用いた成形では難しい3次元の複雑形状に加工が可能である。

ここで金属とハイドロゲルの加工について比較をする。金属加工は切削加工、成形加工、付加加工の3種類に分類される。前述したハイドロゲルの加工を同様に分類した表を表 1-2 に示す。成形加工として、マイクロ流体、エレクトロスピンニング、マイクロモールディング、付加加工として、バイプリンティングを分類した。このように、ハイドロゲルの加工では、切削加工として分類される方法がない。ハイドロゲルは柔らかいため、工具を用いて接触しながらの加工を行うと、材料の変形を考慮しながら加工を行う必要があるため、任意の形状に加工することが難しいためである。いっぽうで、放電加工は非接触の加工であることから、この課題を解決する可能性がある。また、ハイドロゲルを切削加工できるようになることで、設計の幅が広がり、複雑形状を持ったハイドロゲルの加工が可能になると考えた。

そこで、本研究では図 1-9 に示す様に、人工生体組織の構築に用いられるハイドロゲルを対象に放電加工を行う方法を開発する。これまで、ハイドロゲルへの微細加工は、前述した MEMS 技術の応用による PDMS 型を用いた成形法のみであった。型を作製する必要はなく、直接、ハイドロゲルの微細加工が可能になる。人工生体組織を作製するためには、目的に応じてテーラーメイドで加工を行う必要があるため、型を作製しない

表 1-2 金属とハイドロゲルの加工の種類.

	金属	ハイドロゲル
切削加工	切削 研削	切断 放電加工 非接触加工
成形加工	鋳造 焼結	マイクロ流体 エレクトロスピンニング マイクロモールディング
付加加工	積層造形	バイオプリンティング

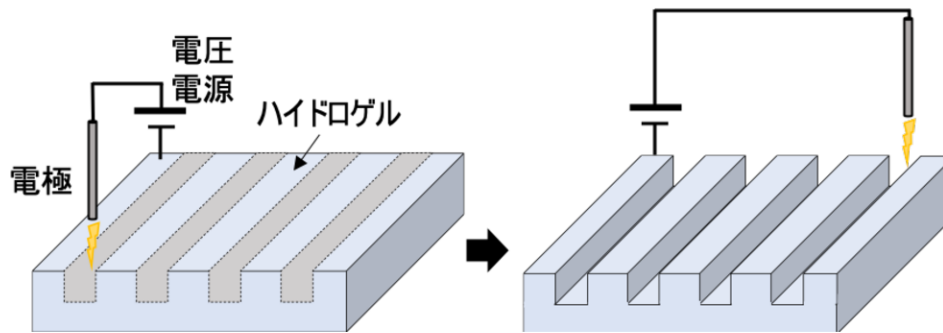


図 1-9 放電加工によるハイドロゲルの加工.

放電加工を用いた方法は、人工生体組織構築において、有用な方法になると考えられる。

1・2 研究目的

本研究の目的は、人工生体組織を作製するためのハイドロゲルのマイクロ加工技術を開発することである。生体組織の構築を目的としたハイドロゲルの加工方法において、エレクトロスピンニングやマイクロ流体を用いた加工方法では、複雑な立体構造を持ったハイドロゲルの構築が難しい点、また、マイクロモールディングでは、テーラーメイドに加工することは難しい点であった。そこで、本研究では、これを解決する方法として、バイオプリンティング、放電加工を用いたハイドロゲルの加工方法を用いる。それぞれの加工方法の課題解決を行うために、本研究では、以下の3つ技術開発に取り組んだ。

(1) ディスペンシング法によるサポートハイドロゲルの加工技術の開発

厚みのある生体組織を構築するためには、血管構造を有していることが重要である。これまで、血管構造を有するハイドロゲルベースの生体組織の作製は実現されてきたが、細胞スフェロイドや細胞シートなど、細胞密度が高い生体組織を作製する方法において、血管新生を用いた血管網の構築手法以外では、血管構造を作製する方法はなかった。そ

人工生体組織を作製するためのハイドロゲルのマイクロ加工技術の開発

本研究で開発するハイドロゲルの加工技術

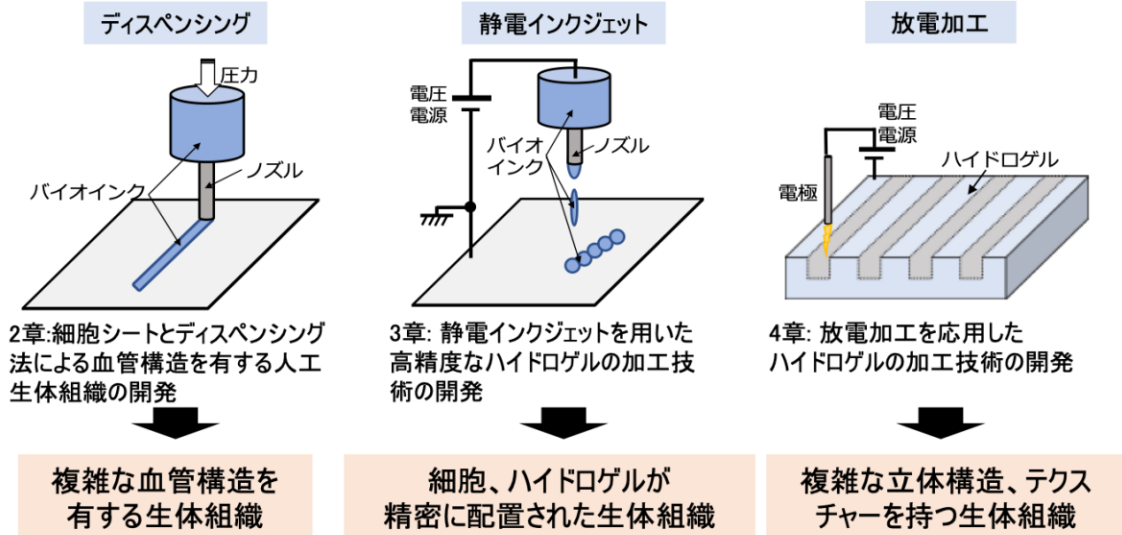


図 1-10 本研究の目的。

ここで、バイオプリンティングにおけるデイスペンシング法を用いて、細胞密度の高い生体組織に血管構造を作製するためのサポートハイドロゲルの加工方法を開発する。本研究では、細胞シート間に積層可能なサポートハイドロゲルの加工方法の開発を行う。

(2) 静電インクジェットを用いた高精度なハイドロゲルの加工技術の開発

バイオプリンティングにおいて、高粘性のバイオインクを高分解能でプリントすることは、特に課題となっている。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。そこで、静電インクジェット法を用いることで、この問題を解決する。静電インクジェット法は、高粘性の液体を高分解能でプリントすることが可能であるが、細胞の成長足場材料となるようなハイドロゲルのプリント特性についての報告はまだ少ない。そこで、本研究では静電インクジェット法を用いて高い分解能でハイドロゲルをプリントする条件を検討し、その特性を調査する。

(3) 放電加工を応用したハイドロゲルの加工技術の開発

主に金属加工に用いられている放電加工を応用し、ハイドロゲルの加工を実現する。ハイドロゲルは柔らかいため、切削加工は難しい。ハイドロゲルの加工には PDMS 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、工程が多くなることが課題であった。そこで放電加工によって、ハイドロゲルを削るように加工できるようになれば、複雑な立体構造やテクスチャーを

持った形状へと加工できる様になると考えた。本研究では、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、その特性を調査する。

本論文における研究目的を図 1-10 に示す。バイオプリンティングにおけるディスペンシング法と静電インクジェット法、さらに放電加工技術を応用したハイドロゲルへのマイクロ加工方法の開発を行う。上述の通り、人工生体組織の機能向上には、細胞同士のコネクションが重要であり、これを制御するためには細胞の成長足場であるハイドロゲルのマイクロ加工が求められる。以上の通り、ハイドロゲルのマイクロ加工の開発は、高い治療効果を持った人工生体組織が求められる再生医療分野の発展に貢献できると考える。

1・3 本論文の構成と概要

本研究では、人工生体組織の構築を目指したハイドロゲルの加工技術として、3つの手法の開発を行った。それぞれ、ディスペンシング法によるサポートハイドロゲルの加工法、静電インクジェット法を用いた高精度なハイドロゲルの加工法、放電加工を応用したハイドロゲルへのマイクロ加工法である。

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

第1章では、研究の背景と本研究の目的と意義を示す。人工生体組織を構築するためのハイドロゲルのマイクロ加工技術とそれらの課題について述べる。

第2章では、血管構造を有する立体組織を構築するためのディスペンシング法によるサポートハイドロゲルの加工方法について述べる。人工的に作製された細胞密な立体組織に任意形状の血管構造を作製することは依然として課題である。本研究では、ディスペンシング法によって血管構造を作製するためのサポートハイドロゲルの加工方法を開発する。また、作製したサポートハイドロゲルを用いて、積層された細胞シートに血管構造が作製可能であるか実証を行う。

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加工法について述べる。バイオプリンティングにおいて、高粘性のバイオインクを高分解能でプリントすることは大きな課題である。本研究では静電インクジェット法を用いて高い分解能でハイドロゲルをプリントする条件を検討し、その特性を調査する。

第4章では、放電加工を応用したハイドロゲルの加工法について述べる。ハイドロゲルを切削加工することは難しく、人工生体組織の設計、加工において切削加工は選択肢としてなかった。また、ハイドロゲルの加工にはPDMS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り、テーラーメイドで加工を行うには、加工の度、型を作製する必要があることが課題であった。そこで、放電加工を用いてハイドロゲルの加工が可能になることで、直接、任意の複雑形状の加工が可能になる。本研究では、放電加工を用いて、ハイドロゲルの表面に加工を行うことで得られる基礎特性について調査する。

最後に第5章では、本論文における結論について述べる。

第2章 細胞シートとディスペンシング法による 血管構造を有する人工生体組織の開発

2-1 緒言

本章では、血管構造を有する人工生体組織を作製するサポートハイドロゲルの加工方法を開発する。人工生体組織のスケールアップにおいて、栄養素、酸素を供給する血管構造の構築は難しく、依然として課題である。特に細胞シートや細胞スフェロイドなど、細胞密な立体組織の構築手法ではこれが大きな障壁となっており、作製可能な立体組織の厚さに限界がある。そこで、本研究で開発する手法を細胞シート技術と組み合わせることで、任意の血管構造を有する細胞密な生体組織の構築を実現する。本研究によって開発された手法によって血管構造を作製することで生体組織のスケールアップに寄与できると期待できる。

先行研究において、バイオプリンティングを用いた複雑な血管構造を有する立体組織の構築方法が報告されている^[2-1~2-8]。第1章で述べたように、バイオプリンティングにおいて血管構造の作製方法は、サポートハイドロゲルを用いた方法が多く用いられている。プリント方法によって作製可能な血管構造の大きさは異なり、ディスペンシング法、インクジェット法は ϕ 100-1000 μm 、光架橋法は ϕ 1-50 μm の精度である^[2-1]。これまで、細胞を含んだハイドロゲル内にサポートハイドロゲルを用いて血管構造が作製され、腎臓モデルや血栓モデルなどの組織モデルとして活用できることが報告されてきた。しかし、バイオプリンティングによって作製される人工生体組織は、生体内の組織に比べて4-20倍細胞密度が低いことがデメリットである^[2-9, 2-10]。プリントするインク内の細胞濃度を高くすれば、作製される人工生体組織の細胞濃度も高くなるが、細胞の生存率が低下するため困難である。

細胞シート技術のような、細胞密な生体組織を作製する手法において、構築可能な血管構造は、血管内皮細胞の自己組織化による ϕ 20 μm 以下の血管である^[2-11-2-13]。細胞シート技術とは、温度応答性培養皿を用いることで作製される平面状の組織である^[2-13]。これを複数枚積層することで、成長足場を使用せず、細胞密な立体組織が作製可能である^[2-14]。また、血管床と呼ばれるマイクロ流路を用いた手法によって、構築した血管網に培養液を灌流することが可能である^[2-16, 2-17]。この手法によって、血管網がない立体組織に比べて厚い立体組織の構築が実現されたが、未だ生体内の組織と比べると厚さの限界はある。そこで、バイオプリンティングにおけるサポートハイドロゲルを用いた手法を細胞シート技術と組み合わせることで、 ϕ 100-1000 μm の血管構造が作製できると

考えた。これらの技術を組み合わせるためには、細胞シート間に積層可能なサポートハイドロゲルの加工方法を開発する必要がある。

そこで本研究では、ディスペンシング法によって細胞シート間に積層可能なサポートハイドロゲルの加工方法を開発する。ディスペンシング法は、圧力によってハイドロゲルのプリントを行うが、プリント速度が遅いデメリットがある一方、安定してプリント成形できることがメリットである。また、加工したサポートハイドロゲルを用いて実際に細胞シート間に血管構造を作製し、血管構造を有する人工生体組織の作製手法として有用であることを実証する。

2・2 実験方法

2・2・1 サポートハイドロゲルを用いた細胞シート間への血管構造作製方法

本研究では、プリントしたサポートハイドロゲルを細胞シート間に積層し、これを溶解させることで血管構造を作製する。図 2-1 にその概要を示す。ディスペンシング方式のバイオプリンタを用いてサポートハイドロゲルをプリントする。次に、温度応答性培養皿によって作製した細胞シート上に、サポートハイドロゲルを積層し、さらに別の細胞シートをその上に積層し、上下の細胞シートを接着させる。接着後、サポートハイドロゲルの溶解液に漬け、サポートハイドロゲルを溶解させることで、血管構造を有する人工生体組織を作製する。本研究では、サポートハイドロゲルとして、ジェランガムゲル、アルギン酸-フィブリンゲル、RGD 修飾アルギン酸ゲルを用いて、作製方法の検討を行なう。

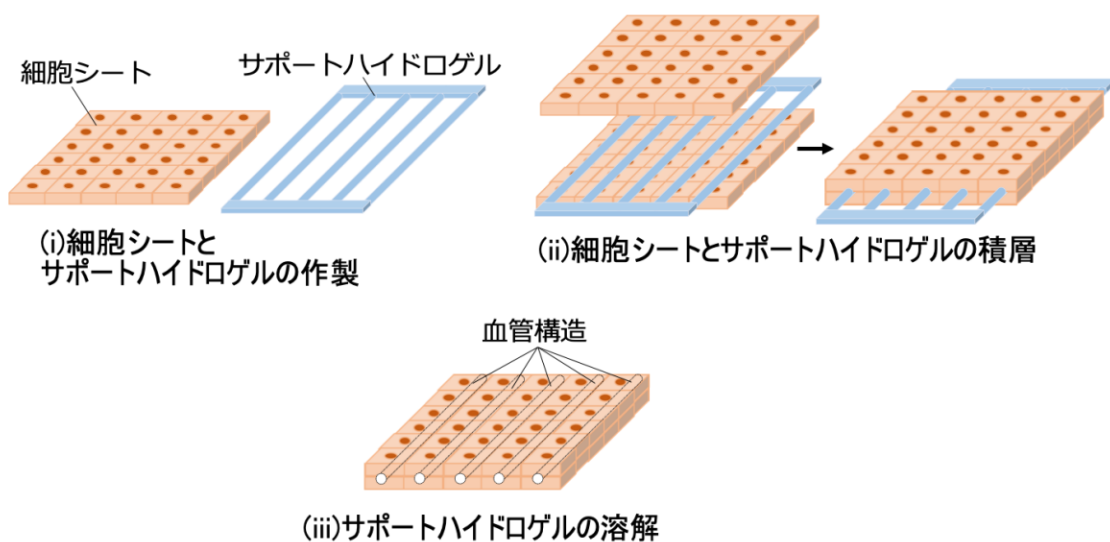


図 2-1 サポートハイドロゲルを用いた血管構造作製方法の概要図.

2・2・2 細胞シート間への積層可能なサポートハイドロゲルのプリント方法

a. 実験装置 本研究では、サポートハイドロゲルのプリントを行うために 2 つのバイオプリンタを用いた。その 1 つを図 2-2 に示す。20 ml シリンジ、アダプターチューブ、5 ml シリンジの順番につなげ、プリントしたいインクの中に入れる。20 ml シリンジは、シリンジポンプ (IC-3210, ASONE)へ装着する。さらに、ニードルノズル(内径 200 μm) を 5 ml シリンジの先端に装着する。ノズルが装着された 5 ml シリンジは、地面に対して垂直になるように設置する。また、XY 自動ステージ(OSM-33, シグマ光機)は、2 軸コントローラ(GSC-02, シグマ光機)に制御され、コマンドソフトからステージの動きをプログラムによって指示された動きを行う。XY 自動ステージ上に作製したゼラチンゲ

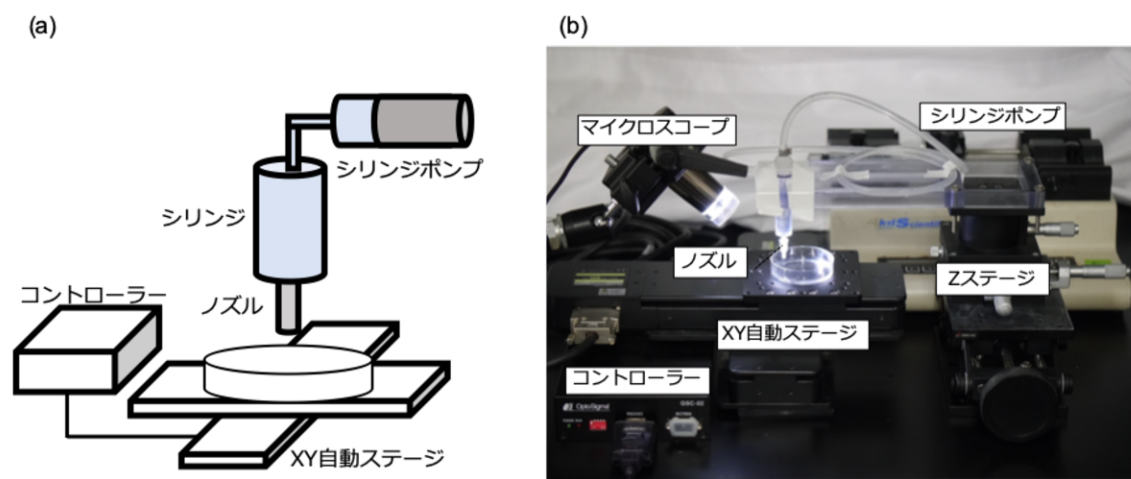


図 2-2 シリンジポンプの押出によってプリントを行うバイオプリンタ。(a) 概要図。(b) 実際の装置の写真。

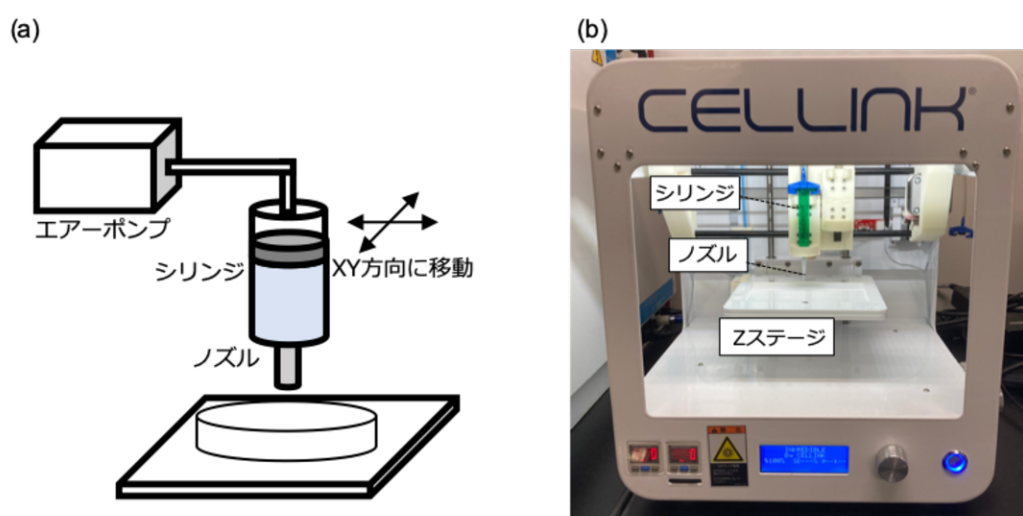


図 2-3 空気圧による押出によってプリントを行うバイオプリンタ(INKREDIBLE、CELLINK). (a) 概要図。(b) 実際の装置の写真。

ルが入ったディッシュを設置し、マイクロスコープ(DINOAM4815T, ANMO)で観察しながら、ノズル先端と着弾面となるゼラチンゲルの距離を調整する。このバイオプリンタは、ジェランガムゲルをプリントする際に用いた。

もう1つは、空気圧によってインクをプリントするバイオプリンタ(INKREDIBLE, CELLINK)である。図 2-3 にバイオプリンタの概要図と実際の写真を示す。このバイオプリンタは、アルギン酸-フィブリンゲル、RGD 修飾アルギン酸ゲルをプリントする際に用いた。

b. プリント方法 本研究では、ゼラチンゲル上にサポートハイドロゲルをプリントする。その概要図を図 2-4 に示す。本研究で用いるジェランガムインクはナトリウムやカルシウムイオン、アルギン酸-フィブリンインク、RGD 修飾アルギン酸インクはカルシウムイオンに反応してゲル化される。そこで、ゼラチンゲル上にこれらのイオンを含有させることで、図 2-4 に示すように、ゼラチンゲルからイオンが浸透して、ゼラチンゲル上でゲル化される。ゲル化後、ゼラチンゲルを 37°Cで溶解することで、プリントしたサポートハイドロゲルを取り出すことが可能である。本研究では、それぞれのインクに対して下記の構成でゼラチンゲルを作製した。

ジェランガムインクのプリントに用いるゼラチンゲル

- ・ 平衡塩溶液(084-08345 、富士フイルム和光純薬)
- ・ ゼラチン粉末(G1890、 Sigma-Aldrich) 70 mg/ml
- ・ NaOH 50%水溶液 0.6 μ l/ml

アルギン酸-フィブリンインクのプリントに用いるゼラチンゲル

- ・ 生理食塩水
- ・ ゼラチン粉末(G1890、 Sigma-Aldrich) 70 mg/ml

RGD 修飾アルギン酸インクのプリントに用いるゼラチンゲル

- ・ 生理食塩水
- ・ ゼラチン粉末(G1890、 Sigma-Aldrich) 70 mg/ml
- ・ 塩化カルシウム 5 mg/ml

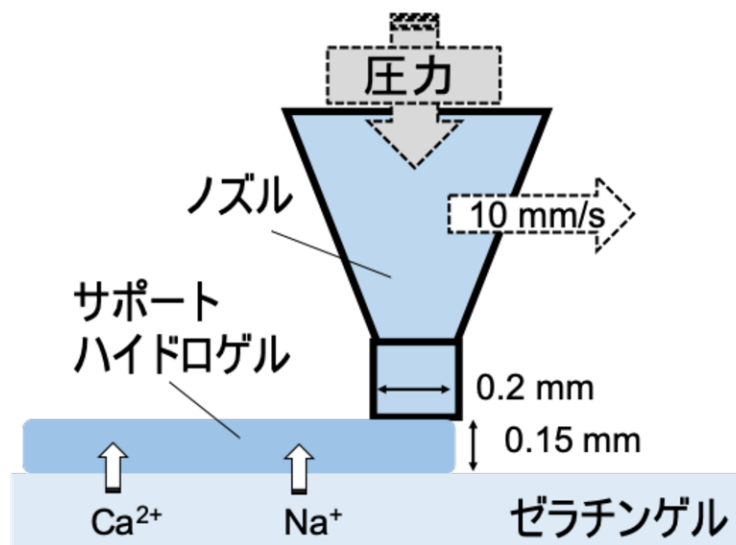


図 2-4 ゼラチンゲル上へのサポートハイドロゲルのプリント。

2・3 実験結果と考察

2・3・1 細胞シート間への挿入可能なジェランガムゲルのプリント方法の開発

a. ゼラチンゲル上へのジェランガムインクのプリント

ゼラチンゲル上へジェランガムインクをプリントしたときの流量とライン幅の関係を調査した。比較対象として、培養ディッシュのポリスチレン表面へ同様にプリントした。その結果を図 2-5 に示す。これは、1 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流量でプリントした。同じ流量でもゼラチンゲル上にプリントした場合の方が、ポリスチレン上にプリントした場合に比べて、ライン幅は小さかった。他の流量についても同様に調査し、ライン幅を比較した。

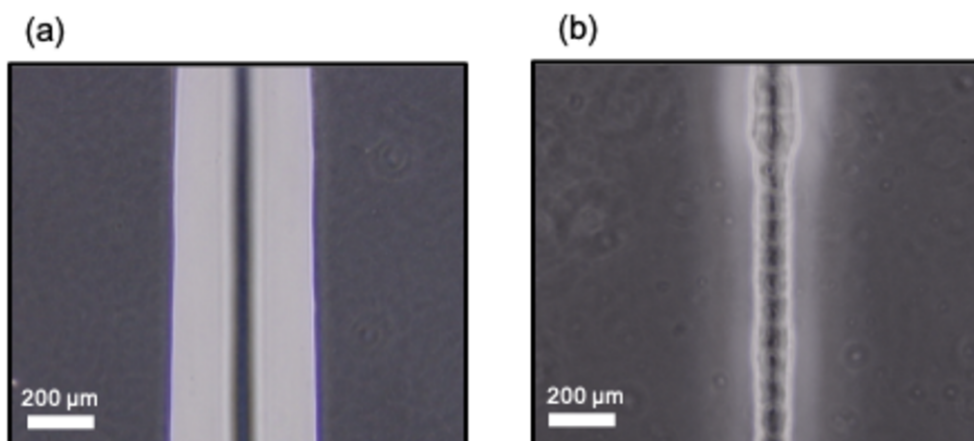


図 2-5 ジェランガムゲルのプリント特性. (a) ポリスチレン上にプリントされたジェランガムゲル. 流量は 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. (b) ゼラチンゲル上にプリントされたジェランガムゲル. 流量は 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

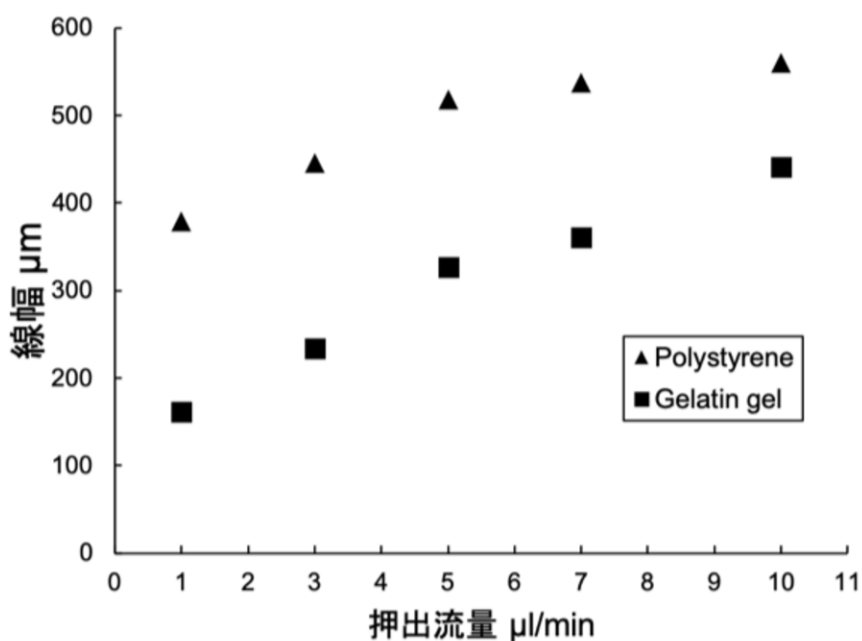


図 2-6 押出流量とプリントされる線幅の関係. ステージ速度は 10 mm/s.

ラフが図 2-6 である。他の流量の場合でも、ポリスチレンに比べて、ゼラチンゲルにプリントした場合の方が、ライン幅が小さくプリントできていることがわかった。

ハイドロゲル上へプリントするため、プリントされたインクが滲む可能性があったが、今回使用したゼラチンゲルでは、滲む様子が確認されず、乾いた表面より濡れ広がらずにプリントされることを確認した。平衡塩溶液を溶媒として作製したゼラチンゲルには、ナトリウムイオンが含まれるため、プリントされたジェランガムゲルは、プリント直後にゼラチンゲル上でゲル化する。そのため、ポリスチレンに比べて横に広がりづらく、細くプリントできたと考えられる。

b. プリントされたジェランガムゲルファイバーの積層

次に、細胞シートの中に積層するためのジェランガムゲルをプリントした。その結果を図 2-7 示す。ファイバー状のジェランガムゲルを細胞シートの中に積層するために、図 2-7(a)のデザインを元にプリントを行い、図 2-7(b)に示すジェランガムゲルをプリントした。濃度 8 mg/ml のジェランガムインクを 1 mm 間隔でファイバー状のジェランガムゲルがプリントされるようにした。押出流量を 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、ステージ速度: 1 cm/s、gap: 0.1 mm に設定した。プリント後、細胞シート間に積層する際、ゼラチンゲルを溶解した後に、図 2-7(c)で示しているようなファイバー状のジェランガムゲルが動かないように、両端を図 2-7(d)に示す格子状のジェランガムゲルで固定されている。

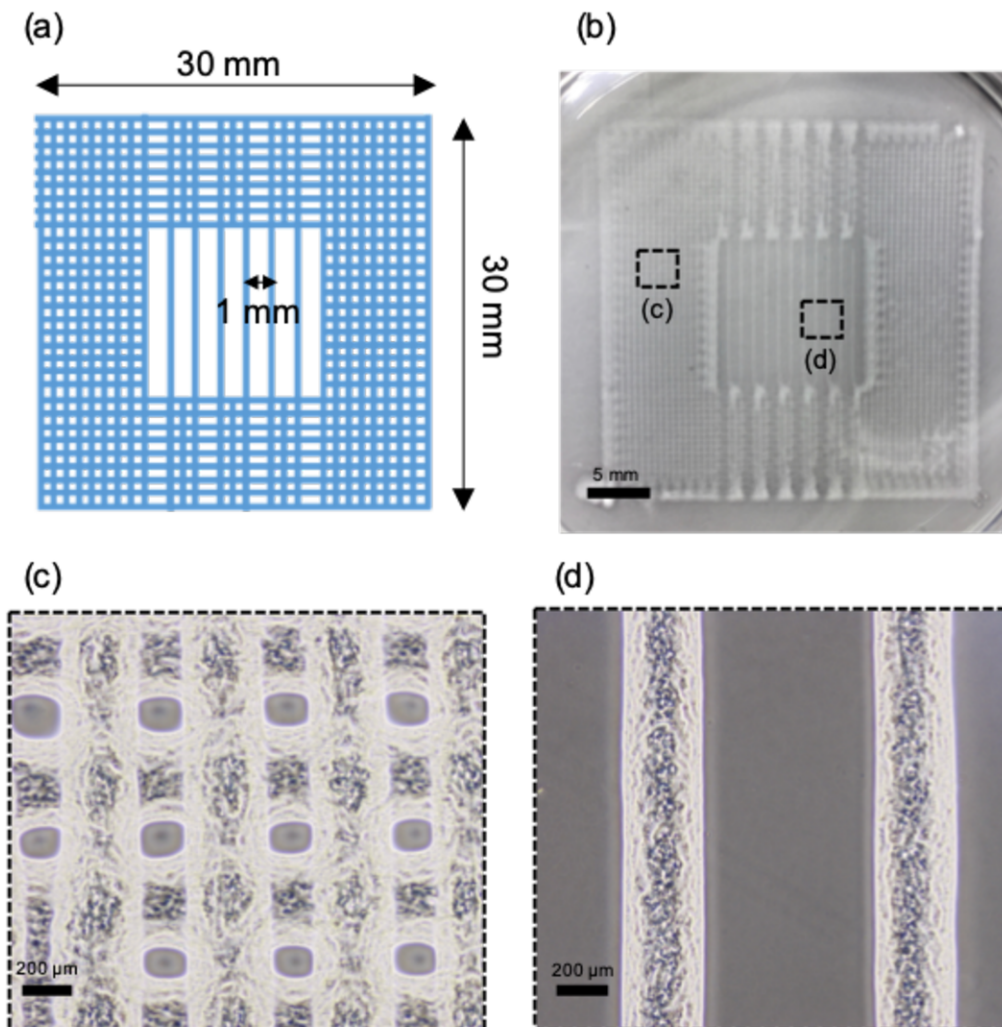


図 2-7 細胞シート間へ積層するためにプリントされたジェランガムゲル. (a) プリントパターン図. (b) 実際にゼラチンゲル上にプリントされたジェランガムゲル. (c) 格子状部分のジェランガムゲル. (d) ファイバー状部分のジェランガムゲル.

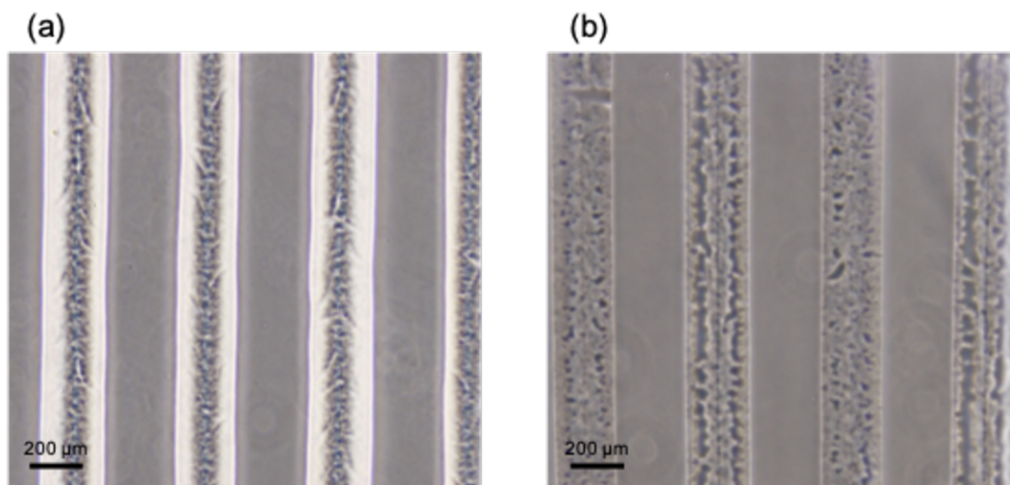


図 2-8 ジェランガムゲルがプリントされたゼラチンゲルの溶解. (a) ゼラチンゲル上のジェランガムゲル. (b) ゼラチンゲルを溶解した後のジェランガムゲル.

また、ジェランガムゲルがプリントされたゼラチンゲルを溶解した際に、ジェランガムゲルの構造が維持されるか確認を行った。図 2-8 にその結果を示す。図 2-8(a)はゼラチンゲル上にプリントされたファイバー状のジェランガムゲルである。ゼラチンゲルの溶解後の状態を示したのが、図 2-8(b)である。これに示すように、ゼラチンゲル溶解後もファイバー状のジェランガムゲルの形状が維持されていることを確認した。

次に、2枚の細胞シートの中に、ジェランガムゲルファイバーを積層し、サポートハイドロゲルとして構造を維持できるか確認を行った。図 2-9 にその結果を示す。細胞シートは過去に報告された方法^[2-14, 2-15]を参考に温度応答性培養皿(UpCell, CellSeed)とヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)を用いて作製した。ジェランガムゲルファイバーが間に積層された細胞シートが図 2-9(a)である。また、積層されている様子を位相差顕微鏡で確認した写真が図 2-9(b)である。細胞シート内に均等間隔で、ジェランガムゲルファイバーが配置されていることを確認した。また、OCT によってジェランガムゲルファイバーを積層した細胞シートの断面を観察した。撮影し画像を図 2-10 に示す。OCT によって観察した断面から、積層したジェランガムゲルファイバーが細胞シートの中に積層され、サポートハイドロゲルとして構造を維持していることを確認した。

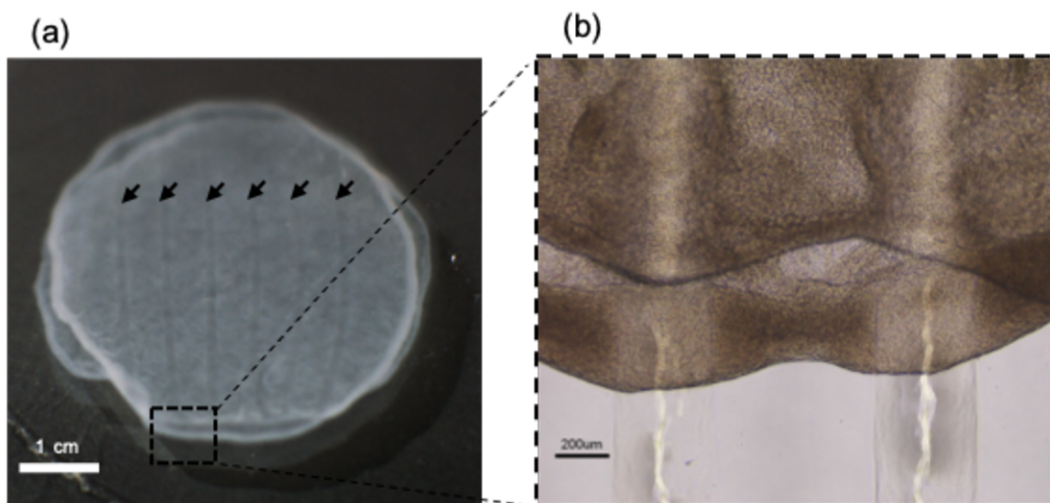


図 2-9 ジェランガムゲルの細胞シート間への積層. (a) ジェランガムゲルファイバーが挿入された細胞シート. 矢印はジェランガムゲルファイバーの部分を示している. (b) 細胞シートの中に積層されているジェランガムゲルファイバー.

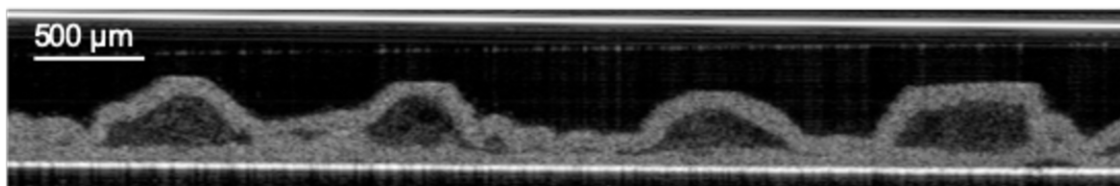


図 2-10 ジェランガムゲルファイバーが積層された細胞シートの断面画像.

ジェランガムゲルは、トリス塩酸バッファーによって溶解することが報告されている^[2-18]。本研究では実施しなかったが、これらを用いて管腔構造の作製が可能である。

2・3・2 アルギン酸-フィブリンインクを用いた血管様構造の作製

a. ゼラチンゲル上へのアルギン酸-フィブリンインクのプリント

CELLINK 社の空気圧を用いるバイオプリンタを用いてゼラチンゲル上にアルギン酸-フィブリンインクをプリントし、圧力ごとの線幅と厚さを計測した。ステージ速度は 1 cm/s、ゼラチンゲルとノズルの距離は 0.15 mm でプリントを行なった。プリントされたアルギン酸-フィブリンインクを上から撮影した写真を図 2-11、断面の画像を図 2-12 に

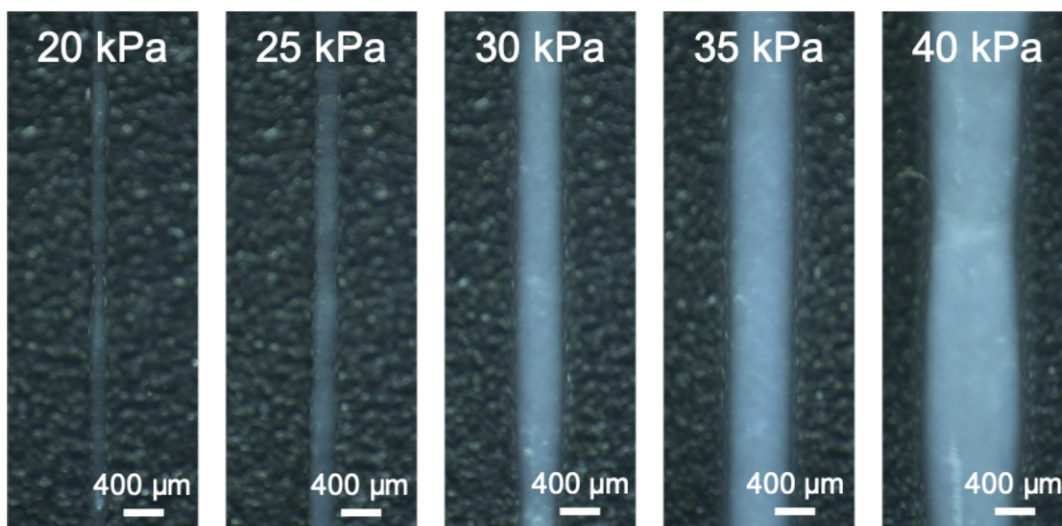


図 2-11 ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸-フィブリンインク。

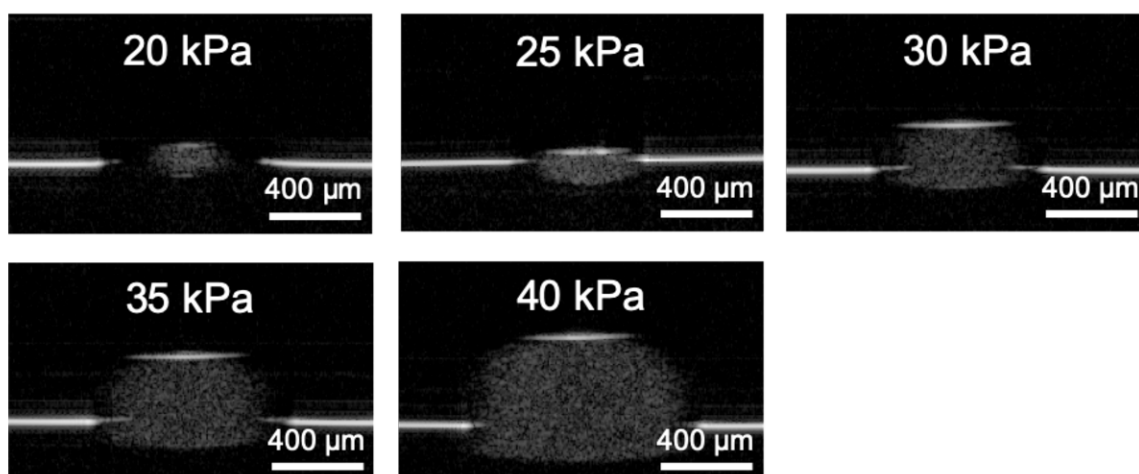


図 2-12 ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸-フィブリンインクの断面。

示す。また、線幅と圧力の関係のグラフを図 2-13、厚さと圧力の関係のグラフを図 2-14 に示す。20 kPa でプリントした場合、ノズル径より小さい線幅でプリントされる。また、圧力に対して線幅は線形に大きくなる。圧力が 20 kPa 以下の場合、ノズルからインクがシームレスに吐出されず、プリントは困難であった。

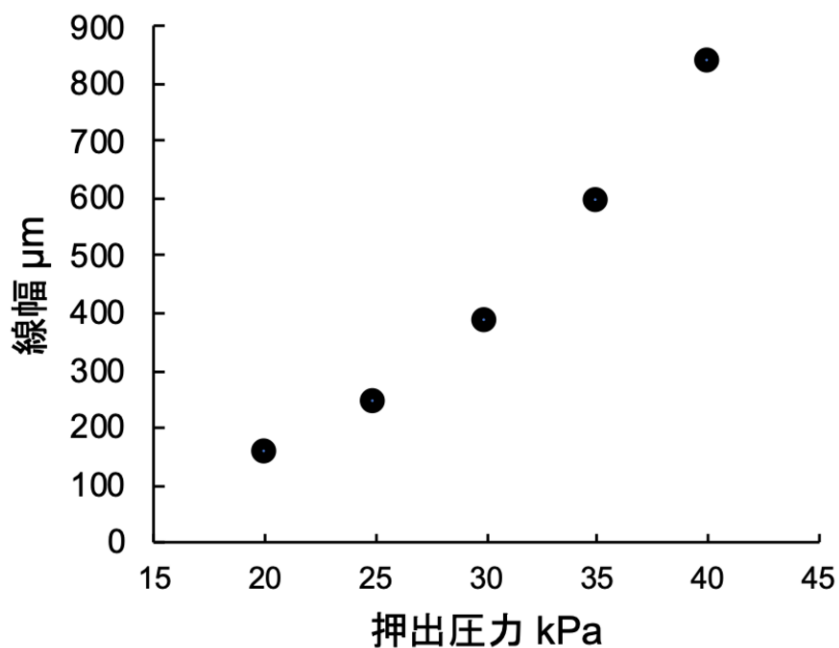


図 2-13 ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸-フィブリンインクの線幅と押出圧力の関係.

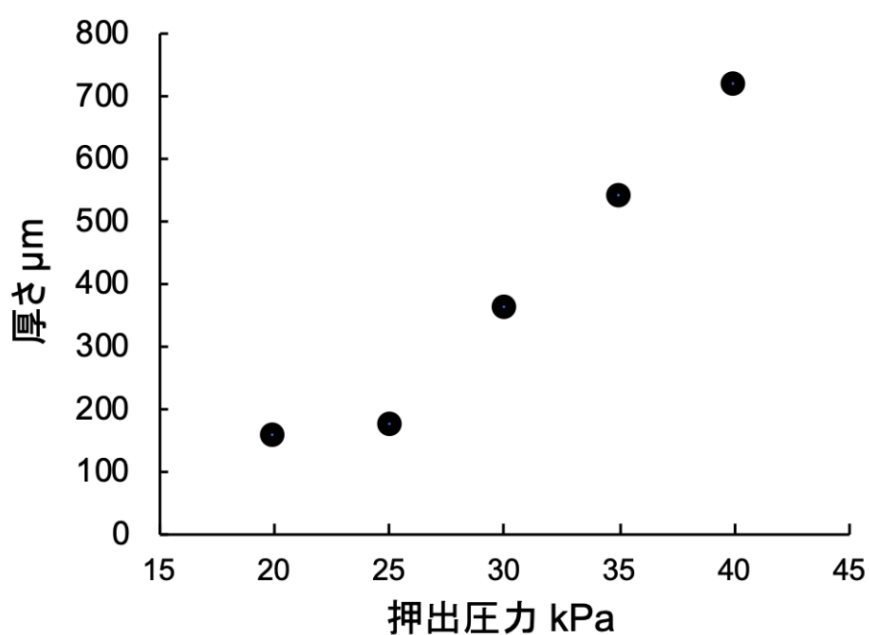


図 2-14 ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸-フィブリンインクの厚さと押出圧力の関係.

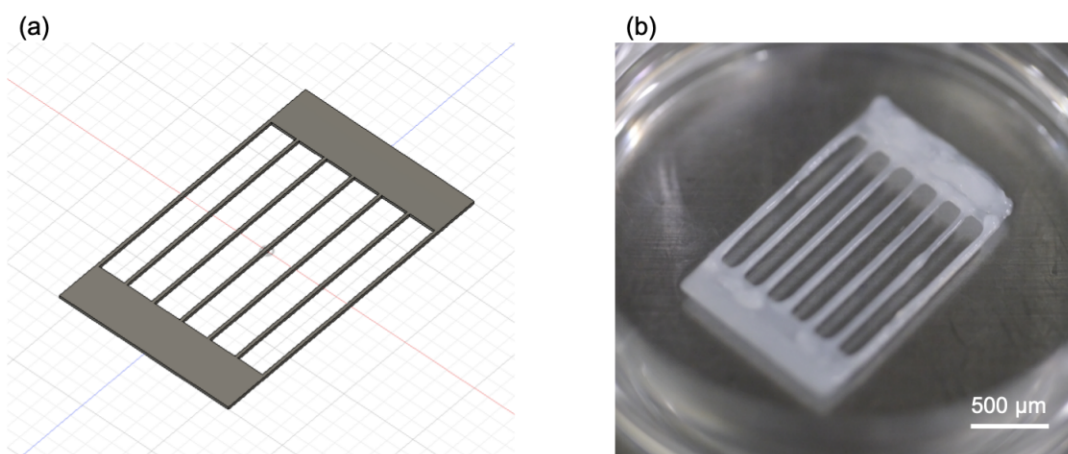


図 2-15 CAD 上での設計とバイオプリンタを用いた出力. (a) CAD 上で設計された 3D データ. (b) CAD データを元にプリントされたアルギン酸-フィブリンゲル.

次にゼラチンゲル上で様々な形状にアルギン酸-フィブリンインクをプリントした。図 2-15 にその結果を示す。図 2-15(a)のように CAD ソフトを用いて設計し、バイオプリンタでプリントした。CAD データを元にプリントされたアルギン酸-フィブリンゲルが図 2-15(b)である。またプリントしたインクを塩化カルシウム溶液でゲル化後、ゼラチンゲルを溶解させることでプリントした形状が保持されていることを確認した。このことから、この手法を用いることで様々な形状に管腔構造を作製するためのサポート材がプリント可能であることを確認した。

今回はステージ速度を 1 cm/s のみ行なったが、ステージ速度を遅くすることで圧力が 20 kPa 以下の場合でも吐出可能になると考えられる。20 kPa、25 kPa の場合は 200 μm 以下の値を示しており、ノズルとゼラチンゲル間の距離とほぼ一致するが、30 kPa より大きい場合は、この距離より大きい。30 kPa より大きな圧力の場合は、圧力が大きいほど厚さは大きくなっている。細胞シートのために挿入するため、ハイドロゲルの厚さは重要であり、細胞シートの厚さに対して大きすぎない方が好ましい。ノズルとゼラチンゲル間でこれをコントロールする場合は、20~25 kPa でプリントを行うことが適切であると考えられる。

b. 血管内皮細胞が播種されたアルギン酸-フィブリンゲルの積層

次にプリントしたアルギン酸-フィブリンゲルの表面に励起光によって緑色に発光する血管内皮細胞(GFP-HUVEC)を播種し、それをヒト皮膚繊維芽細胞シートの上に積層した。図 2-16 にその結果を示す。図 2-16(a)より、GFP-HUVEC が表面に接着していることが蛍光顕微鏡の観察によって観察された。GFP-HUVEC が播種されたアルギン酸-

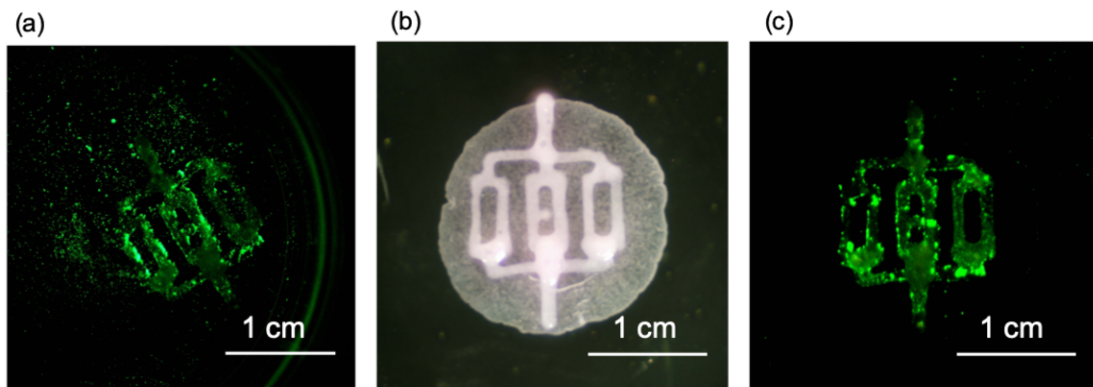


図 2-16 血管内皮細胞(GFP-HUVEC)が播種されたアルギン酸-フィブリンゲルの積層. (a) GFP-HUVEC が播種されたアルギン酸-フィブリンゲルを蛍光顕微鏡によって観察. (b) NHDF シートの中に積層されたアルギン酸-フィブリンゲル. (c) NHDF シートの間の GFP-HUVEC を蛍光顕微鏡によって観察.

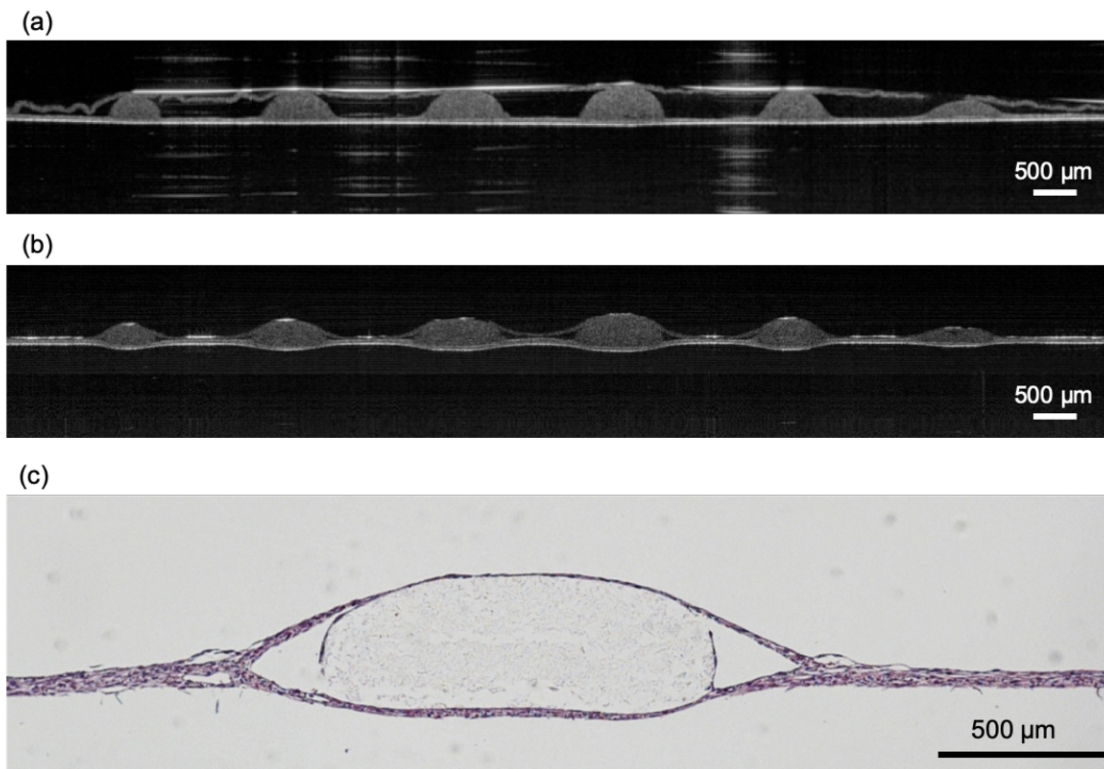


図 2-17 遠心積層を用いた細胞シートとアルギン酸-フィブリンゲルの積層. (a) 遠心積層前. (b)遠心積層後. (c) 遠心積層後の組織の HE 染色切片.

フィブリンゲルを積層し、それを明視野と蛍光によって観察した写真を図 2-16(b)(c)に示す。プリントしたアルギン酸-フィブリンゲルをプリントした形状で NHDF シートの間に積層できたことを確認した。また、GFP-HUVEC が播種された状態でも同様に積層可能であることを確認した。

NHDF 細胞シートでアルギン酸-フィブリンゲルを積層した直後の断面を撮影した写

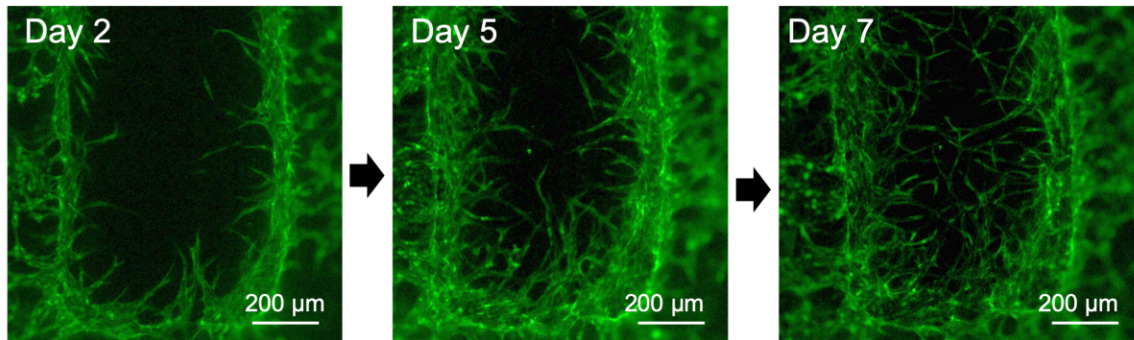


図 2-18 NHDF シート間の GFP-HUVEC が血管新生する様子.

真を図 2-17(a)に示す。積層した直後は、NHDF 細胞シートとアルギン酸-フィブリンゲルの間に隙間が生じるため、上下の NHDF 細胞シート同士が接着していない。そこで遠心装置を用いて、遠心力を上から与えることで、上下の NHDF 細胞シート同士を接着させる。遠心力を用いた積層方法については、過去に報告された手法を用いた^[2-19]。図 2-17(c)に 859g の遠心力を 10 分与えることで、上下の NHDF 細胞シートを接着させ、OCT で断面を観察した結果を示す。遠心力を与えたことで、NHDF 細胞シート同士の隙間が埋まっていることが確認された。また、この組織から切片を作製し、HE 染色を行った。HE 切片から上下の NHDF 細胞シートが接着されていることが確認できた。また、アルギン酸-フィブリンゲルが NHDF 細胞シートの間でサポート材として、構造を維持していることを確認した。

GFP-HUVEC を接着させたアルギン酸ゲルが間に積層された NHDF 細胞シートを 7 日間培養した。図 2-18 に培養を始めて 2、5、7 日目に蛍光顕微鏡によって、GFP-HUVEC が伸展して行く様子を確認した写真を示す。アルギン酸-フィブリンゲルに接着していた GFP-HUVEC が NHDF シート中に毛細血管サイズの血管網を形成していく様子を確認した。本手法を用いることで、サポート材を用いた血管様構造の作製と同時に、血管内皮細胞の自己組織化による血管網の構築を同時に行うことができると考えられる。前述した通り、厚い生体組織を作製するためには、毛細血管網の構築も重要であり、組織内へ灌流する培養液の流量から栄養素供給のバランスを考え、大小の血管網を最適に配置する必要がある。本手法によって、内径数百 μm の血管様構造は、任意の位置に配置できるため、アルギン酸-フィブリンゲルの配置を最適化することで、栄養素が十分に組織内に浸透する血管網を構築することができると考えられる。

2・3・3 RGD修飾アルギン酸ゲルを用いた灌流可能な管腔構造の作製

a. ゼラリンゲル上への RGD 修飾アルギン酸ゲルのプリント

本節では、細胞の接着因子である RGD 分子が修飾されたアルギン酸インクをサポート材として用いることで、積層された細胞シートの上に灌流可能な管腔構造を作製する。ゼラチンゲル上に、バイオプリンタを用いて、RGD 修飾アルギン酸インクをプリントする。プリントされたアルギン酸インクは、ゼラチンゲルに含まれるカルシウムイオンと反応して、ゲル化される。この条件でのプリント特性を調べるために、ノズルとゼラチンゲルとの距離を 0.15 mm、プリント速度を 10 mm/s に設定して、圧力を変化させることで変化するプリントされる線幅を調査した。図 2-19 ゼラチンゲルに塩化カルシウムが含まれる場合と含まれない場合、温度環境を 4°C、25°C の場合でそれぞれ調査した結果を示す。4°C の温度環境下でプリントを行った場合、塩化カルシウムの有無によるプリント特性の変化は得られなかった。いっぽうで、25°C の温度環境下でプリントを行った場合、塩化カルシウムを含んでいる場合の方が、細い線幅でプリントされる傾向が得られた。

4°C の温度環境下では、アルギン酸インクの粘性が高くなるため、塩化カルシウムによるゲル化の効果より、粘性の影響が大きくなったと考えられる。また、25°C の温度環境下では、粘性の影響を受けず、塩化カルシウムが含有される場合プリント直後にゲル化するため、線幅が細くプリントされた。塩化カルシウムが無い場合は、ゼラチンゲル

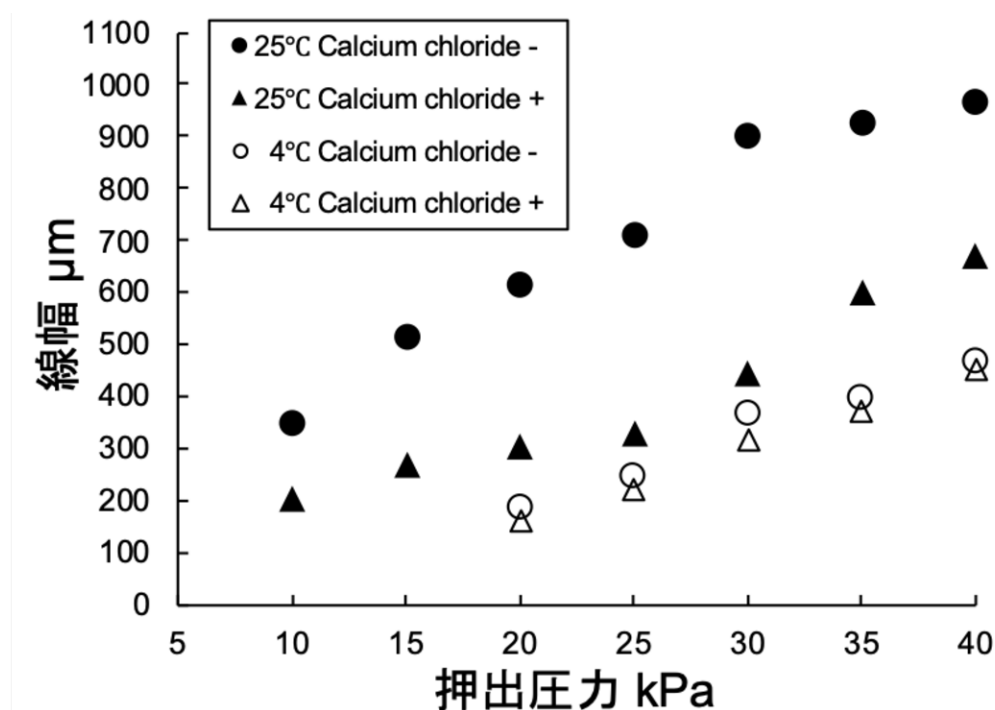


図 2-19 塩化カルシウム含有ゼラチンゲル上でのアルギン酸インクのプリント特性。

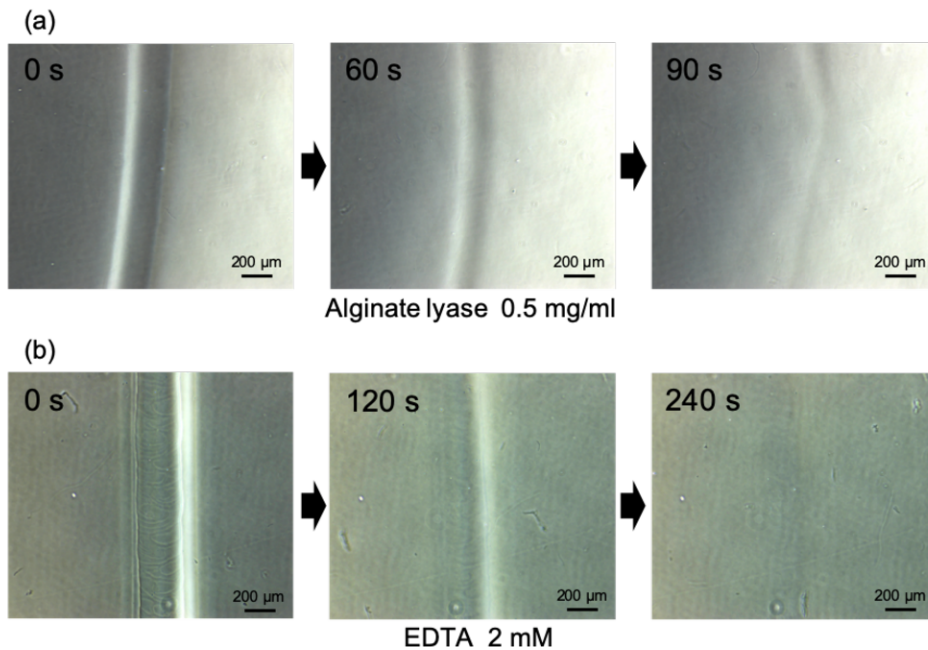


図 2-20 RGD 修飾アルギン酸ゲルの溶解. (a) アルギン酸リアーゼ溶液(濃度:0.5 mg/ml)による溶解の様子. (b) EDTA 溶液(濃度:2 mM)による溶解の様子.

表面で濡れ広がってしまうため、線幅は広くプリントされる。

次に、プリントしたアルギン酸ゲルが溶解可能であるか、アルギン酸リアーゼ溶液と EDTA 溶液の 2 種類を用いて、溶解する様子を撮影した。アルギン酸リアーゼはアルギン酸ゲルを溶解するための酵素である。EDTA は金属キレーション剤で、アルギン酸分子を架橋するために作用しているカルシウムイオンをキレーションする効果によって、アルギン酸ゲルが溶解される。図 2-20 に 2 つの溶液を用いてアルギン酸ゲルを溶解する様子を示す。いずれの場合でも溶解されることから、管腔構造を作製するためのサポート材として利用可能であることを確認した。

アルギン酸リアーゼ溶液(0.5 mg/ml)の場合の方が EDTA(2 mM)に比べて溶解速度が速かった。それぞれ濃度を上げると溶解速度が上がるのが考えられるが、EDTA の場合、細胞同士の接着に障害が生じる可能性があるため、これ以上の濃度を上げることは難しい。アルギン酸リアーゼは細胞への毒性がないとされていることから、プリントされたアルギン酸ゲルの溶解にはアルギン酸リアーゼを用いることが適切であると考えられる。

b. プリントした RGD 修飾アルギン酸ゲルの細胞シート間への積層と管腔構造の作製

次にプリントした RGD 修飾アルギン酸ゲルを細胞シート間に積層する。本実験ではマウス筋芽細胞(C2C12)シートを用いた。C2C12 細胞シートは過去に報告された方法¹²

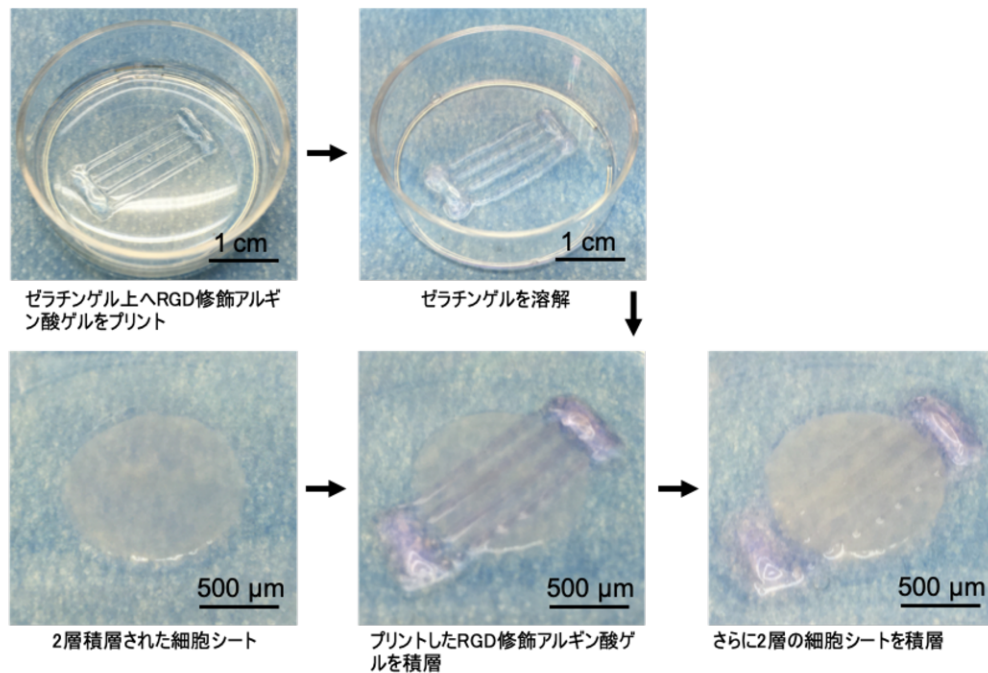


図 2-21 RGD 修飾アルギン酸ゲルの積層の過程.

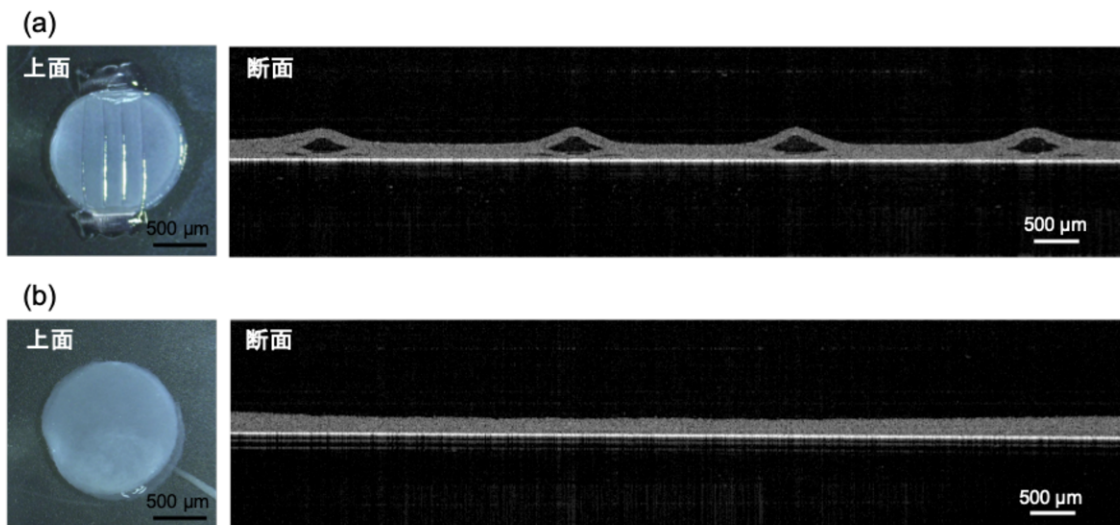


図 2-22 細胞シート間へのアルギン酸ゲルの積層. (a) アルギン酸ゲルファイバーが積層された細胞シートの断面の観察. 上はアルギン酸ゲルファイバーが積層された細胞シート (b) C2C12 シートのみを 4 層積層.

^{14, 2-15]}を参考に作製した。図 2-21 に C2C12 細胞シートの中に RGD アルギン酸ゲルを積層している過程を示した。管腔構造を作製するために、アルギン酸ゲルをファイバー状にプリントし、ファイバーの位置が固定されるように、両端をゲルで固めた。プリント後、ゼラチンゲルを溶解し、2 枚積層された C2C12 細胞シート上にプリントした RGD 修飾アルギン酸ゲルを乗せ、接着させる。接着後、さらに 2 枚の C2C12 細胞シートを

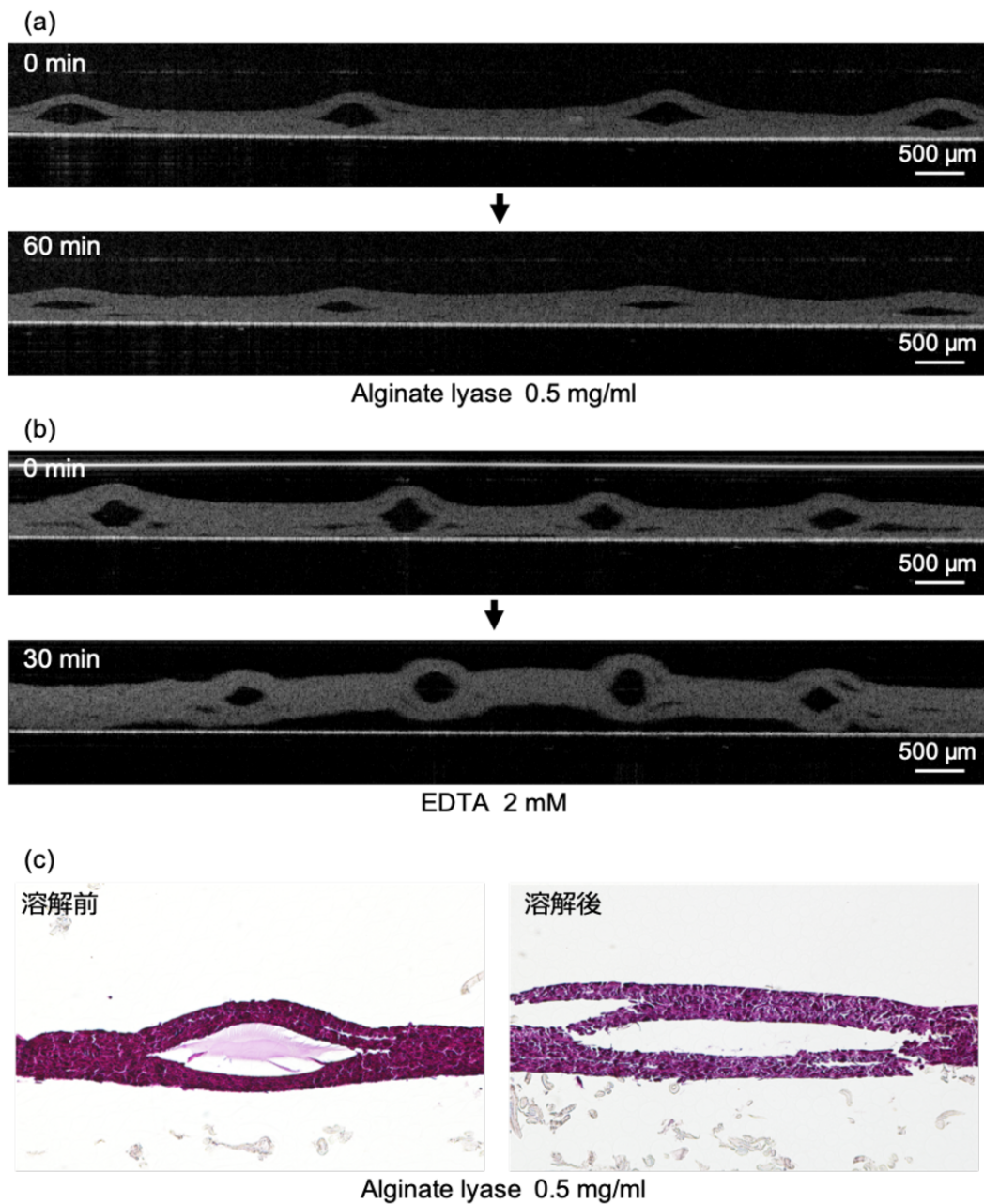


図 2-23 細胞シートの上に積層された RGD 修飾アルギン酸ゲルの溶解. (a) アルギン酸リアーゼ溶液(濃度:0.5 mg/ml)による溶解. (b) EDTA 溶液(濃度:2 mM)による溶解. (c) アルギン酸リアーゼ溶液によって RGD 修飾アルギン酸ゲルを溶解する前と後の HE 染色組織切片.

積層し、アルギン酸ゲルを C2C12 細胞シートの上に積層させた。アルギン酸ゲルを積層した C2C12 細胞シートの断面を OCT によって観察した結果を図 2-22 に示す。OCT 画像が示す様に、RGD 修飾アルギン酸ゲルのファイバーを積層していない C2C12 細胞シートと比べて、間に RGD 修飾アルギン酸ゲルファイバーが積層されることで、管腔構造を作製するためのサポート材としてはたらいっていることを確認した。

C2C12 細胞シートの上に積層されたアルギン酸ゲルをアルギン酸リアーゼ溶液と

EDTA 溶液を用いて溶解させた。その結果を図 2-23 に示す。濃度 0.5 mg/ml のアルギン酸リアーゼ溶液を用いて 37°C 環境下で 60 分静置させた結果、アルギン酸ゲルによって作られた隙間が縮小していることが OCT 画像から確認された。また、2 mM の EDTA 溶液を用いて 37°C 環境下で 30 分静置させた結果、C2C12 シートがディッシュから剥離している様子が OCT 画像から確認された。アルギン酸リアーゼによって C2C12 シート間のアルギン酸ゲルを溶解する前の組織と、後の組織の切片を作製し、HE 染色した結果を図 2-23(c) に示す。アルギン酸リアーゼによって、溶解する前は、C2C12 シート間にアルギン酸ゲルが残存しているが、溶解処理後、アルギン酸ゲルがなくなっていることが確認された。このことから、C2C12 シートの間に積層したアルギン酸ゲルはアルギン酸リアーゼを用いることで、溶解可能であることが確認された。

上記でも述べたように EDTA はカルシウムやマグネシウムイオンをキレーションしてしまうため、細胞への毒性があることや、細胞同士の接着に用いられるカドヘリンに影響を与えてしまうため、結果に示す様に細胞シート間に積層したアルギン酸ゲルを溶解するには適していない。いっぽうで、アルギン酸リアーゼは消化酵素であることから、細胞シート同士の接着には影響せず、管腔構造の作製が可能である。

c. 灌流デバイスを用いた管腔構造への培養液の灌流

アルギン酸リアーゼによって、細胞シートの上に積層した RGD 修飾アルギン酸ゲルを溶解し、管腔構造を作製可能であることを確認したことから、この作製した管腔構造に液体を灌流するデバイスを開発し、灌流可能であるか検証を行なった。作製した管腔構造に培養液を灌流するためのデバイスを開発した。作製した灌流デバイスの概要を図 2-24 に示す。流入口となる部分はハイドロゲルによって埋め立てられ、C2C12 細胞シートの部分を培養液で浸し、ステンレスワイヤを引き抜くことで、水頭差から発生する圧

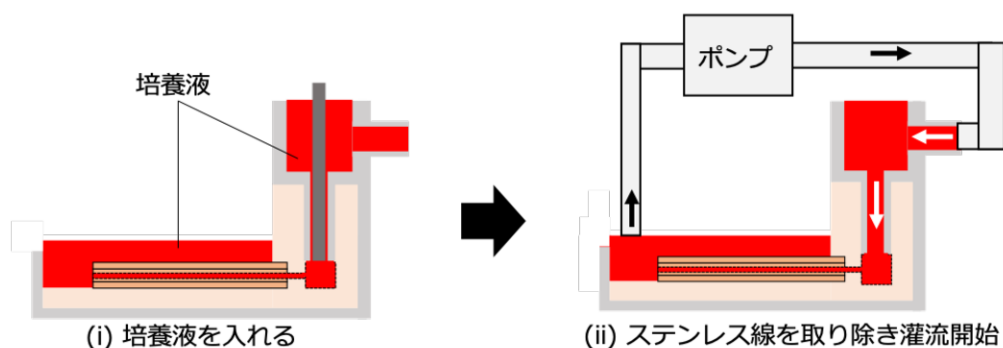


図 2-24 灌流デバイスを用いた血管構造への灌流.

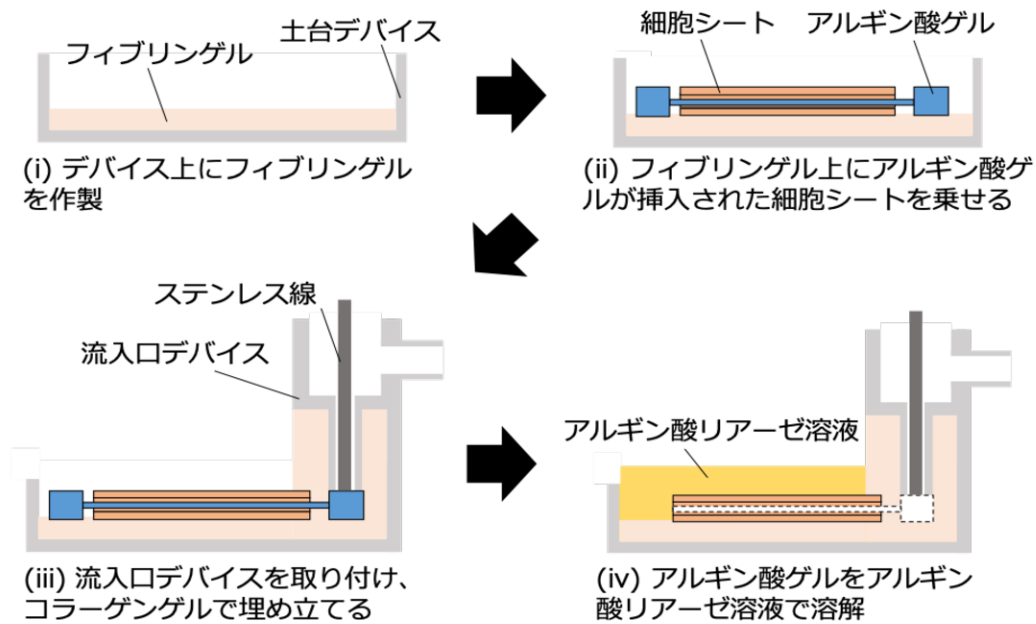


図 2-25 灌流デバイスの組み立て方法.

力によって、作製した管腔構造に培養液が流れる。流入口デバイスにはチューブポンプがつながっており、培養液が流入口デバイスに流され続け、常に満たされた状態になるため、水頭差は維持され、圧力は一定に維持される。

図 2-25 に灌流デバイスの組み立て方法を示す。濃度 10 mg/ml のフィブリンノーゲンと 2 U/ml のトロンビンを 1 ml ずつ混合し、灌流デバイスの底面に流し込んだ後、37°C インキュベータで 30 分静置し、フィブリンゲルを作製する。フィブリンゲル作製後、ゲル上に C2C12 シート 2 層、プリントされたアルギン酸ゲル、C2C12 シートの順番に積層する。積層後、流入口部分に流入口デバイスとステンレスワイヤを装着し、コラーゲンゲルによって、埋め立てる。コラーゲンゲルは 50 mg/ml のコラーゲン酸性溶液を 1 ml と 100 mM の HEPES 溶液を 12.5 μ l、1000 mM の炭酸水素ナトリウム溶液を 25 μ l、5 mg/ml のアルギン酸リアーゼ溶液を 125 μ l を混合させて作製した。コラーゲンゲルによって流入口を埋め立てた後、積層された C2C12 シートを、5 mg/ml のアルギン酸リアー

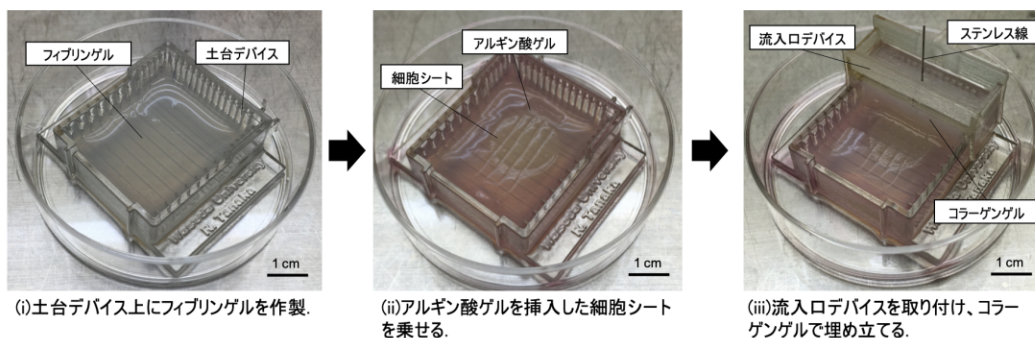


図 2-26 灌流デバイスを組み立てる過程。

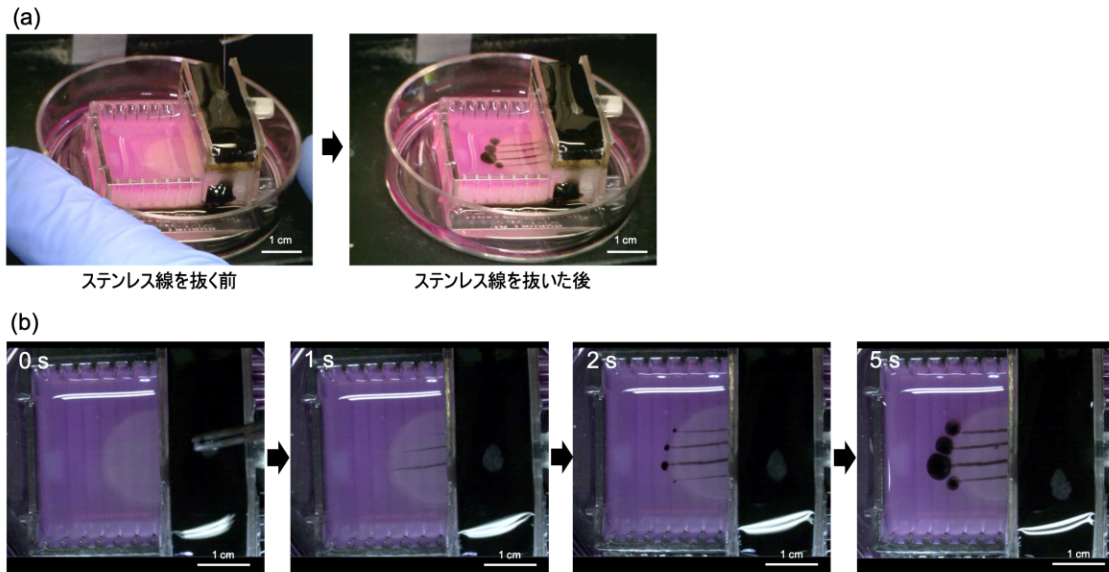


図 2-27 灌流デバイスによる作製した管腔構造への墨汁の灌流. (a) 管腔構造へ灌流が開始される様子. (b) 墨汁が細胞シートの中に作製した管腔構造を流れる様子.

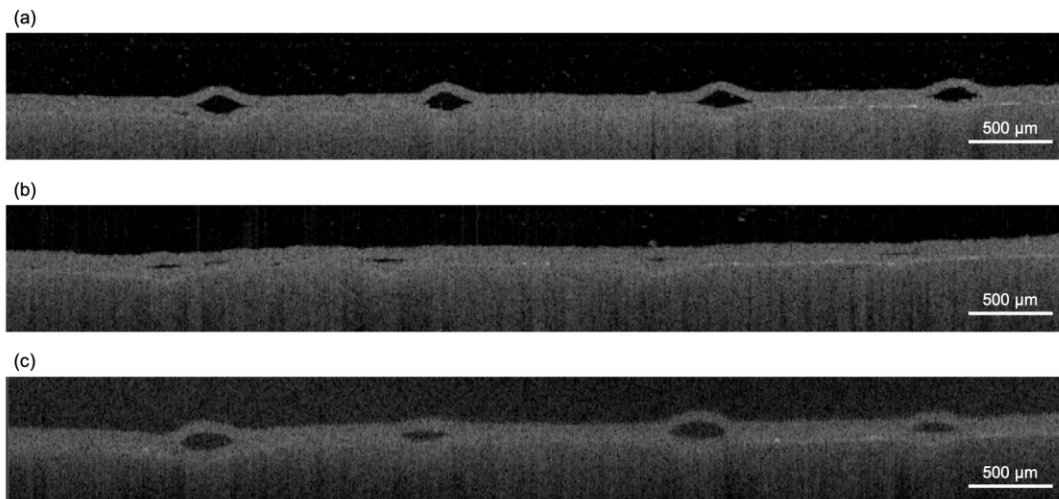
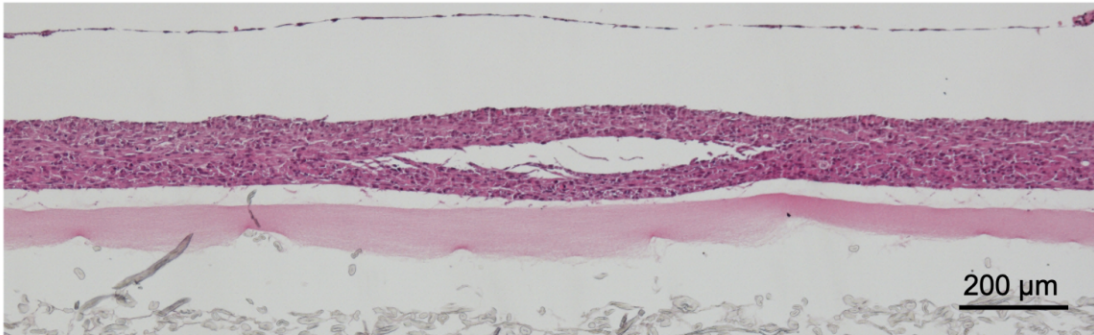


図 2-28 作製した管腔構造への墨汁の灌流前後の断面の様子. (a) アルギン酸リアーゼによる溶解前. (b) アルギン酸リアーゼによる溶解後 (c) 灌流デバイスによる 2 時間灌流を行なった後.

ゼ溶液と培養液を 1:9 で混合することで最終濃度 0.5 mg/ml に調整されたアルギン酸リアーゼ溶液でアルギン酸ゲルを溶解する。

実際に開発した灌流デバイスに RGD 修飾アルギン酸ゲルが積層された細胞シートを乗せ、流入口を埋め立てていく様子を図 2-26 に示す。灌流デバイスを組み立てた後、細胞シート間に作製した管腔構造に墨汁を灌流した結果が図 2-27 である。墨汁は視認性が良いため、本実験では用いた。本実験ではまず、水頭差の高さを 14 mm と 11 mm の 2 つの灌流デバイスを用いて灌流を行なったところ、14 mm の場合ではバーストし、

(a)



(b)

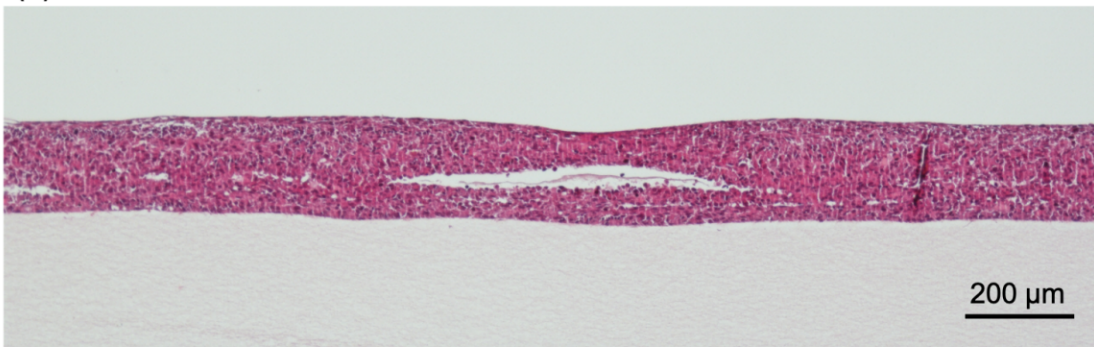


図 2-29 灌流デバイスを用いて 1 日培養された組織の HE 切片. (a) 管腔構造に灌流を行なった場合. (b) 管腔構造に灌流を行わなかった場合.

11 mm の場合で灌流することができた。図 2-27(a)は墨汁を流している様子をデバイスの斜め上から、2-27(b)は真上から撮影した動画をキャプチャした写真を示している。ステンレスワイヤを引き抜いた後、積層した C2C12 シート間に作製した 4 本の管腔構造に墨汁が流れている様子が確認された。また、積層された C2C12 シート間のアルギン酸ゲルを溶解する前、溶解した後、2 時間墨汁を灌流した後にそれぞれ OCT によって断面を観察した。図 2-28 にその結果を示す。アルギン酸ゲル溶解後、溶解前に比べて、管腔部分の面積が小さくなりアルギン酸ゲルが溶解されていることが確認され、さらに 2 時間灌流後、管腔の構造が維持できていることを確認した。生体内の直径 100~1000 μm の血管の圧力は約 60 mmHg から約 100 mmHg の間^[2-20]であり、11 mm の水頭圧は換算すると、0.8085 mmHg である。血管内の圧力の大きさは栄養素や酸素の拡散に関係^[2-21, 2-22]することから、立体組織の培養には圧力が高い方がよい。血管の強度は、生体外において平滑筋や外膜の成熟で向上する^[2-23]ことが報告されていることから、高い圧力で灌流を実現するためには、これらを再現することが重要であると考えられる。

細胞シート間にアルギン酸ゲルを積層し、アルギン酸リアーゼによって溶解することで管腔を作った後、灌流デバイスを用いて灌流しながら培養と灌流せずに 1 日培養した

場合の比較実験を行なった。図 2-29 にその結果を示す。両者とも管腔が残っていることが確認できた。

灌流しない場合、上下の細胞同士が接着し、管腔が塞がることを予想していたが、本実験では、塞がらなかった。これは溶解したアルギン酸ゲルが管腔に残存し、細胞同士の接着を阻害した可能性が考えられる。

2・4 結言

本章では、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、細胞シートを積層することで作製する立体組織内部に管腔構造を作製するための方法を検討した。

細胞シートの積層によって作製された立体組織への管腔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、 $\phi 20 \mu\text{m}$ 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、 $\phi 100\sim 500 \mu\text{m}$ 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移し、積層する方法を開発した。この方法によって、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。

まず、ジェランガムゲルを用いて、サポートハイドロゲルの作製を行った。ファイバー状のジェランガムゲルをプリントし、これを細胞シート間に積層することで、積層された細胞シート間でサポート材として、はたらいていることが確認された。しかし、ジェランガムゲルは、細胞接着性がないため、細胞シート間への積層が手技に依存することが課題であった。次に、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、血管内皮細胞が作製した血管様構造から血管新生が起り、毛細血管網が構築されていることを確認した。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。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。これにより立体組織内部に培養液を灌流しながら

培養可能であることを示唆している。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 静電インクジェットを用いた 高精度なハイドロゲルの加工技術の開発

3.1 緒言

本章では静電インクジェットを用いたハイドロゲルの加工法について述べる。バイオプリンティングにおいて、高粘性のバイオインクを高分解能でプリントすることは困難である。いっぽうで、細胞の成長足場となるインクは粘性が高いものが多く、また、細胞のサイズはおおよそ 10-30 μm であることから、精密な人工生体組織を作製するためには、高い精度でプリントを行う必要がある。そこで、高粘性のインクの高分解能でのプリントを実現するために、静電インクジェットに着目した。静電インクジェットは、プリントするインクに高い電圧を印加することで、アースとなっている着弾面に向かって静電力がはたらき、ノズル口からインクを引っ張るようにプリントする方法である^[3-1-3-3]。この方法はノズルの管摩擦抵抗を受けにくいいため、高粘性の液体をプリントすることに適している。静電インクジェットを用いた細胞の成長足場となるハイドロゲルのプリントに関して、その特性を調査した報告は少ない。そのため、様々な材料、プリント条件において、静電インクジェットに関する特性を調査する必要がある。

バイオプリンティングでは第1章で述べた様に、様々なプリント方法がある。これらの共通する課題は、数百から数千 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ の高い粘性のバイオインクを数 μm の高い精度でプリントすることである。高い精度でプリントを行うためには、ノズル口を小さくする必要はあるが、管摩擦が大きくなる。また、粘性が高いインクをプリントする際にも、管摩擦が大きくなる。そのため高い精度でインクをプリント可能なインクジェット方式は、数 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ が限界である^[3-4, 3-5]。

生体組織の機能は、細胞や成長足場になるハイドロゲルとのコネクションが重要である。これらをプリントによって精密に配置可能になることで、機能的な人工生体組織を得ることができると考えられる。このことから、静電インクジェットによって、細胞の成長足場となるハイドロゲルを高精度にプリントにできるようになることで、これまで作製困難であった精密な人工生体組織の構築が可能になると期待できる。これを実現するためには、明らかになっていない静電インクジェットのプリント特性を把握する必要がある。

本研究では、ジェランガムゲル、ゼラチンゲル、アルギン酸ゲルのそれぞれを静電インクジェットによってプリント成形を試み、それぞれの特性を把握する。

ジェランガムは多糖類であり、その水溶液は微量なカチオンと反応してゲル化する^[3-6]。ジェランガムは培養液に反応してゲル化することができるので、毒性の少ない細胞

の成長足場としてバイオプリンティングの研究で注目されている^[3-7-3-10]。これまでに、細胞の接着因子を修飾したジェランガムを用いて 3 次元脳モデルや軟骨組織再生に関する研究が報告されている^[3-11~3-13]。しかし、ゾル-ゲル反応を起こす濃度領域では、ジェランガム水溶液の粘性は低く、ディスペンシング方式でのプリント成形は難しい。いっぽうで、インクジェット方式では低い粘性のバイオインクを高分解能でプリント可能であるが、可能な粘性の値は数 mPa・s である。

ゼラチンはタンパク質であり、その水溶液は温度によってゾル-ゲル変化を起こす^[3-13-3-16]。ゼラチンゲルは、37°C付近で溶解するため、細胞の培養の際には、架橋をする必要がある^[3-17-3-19]。37°C付近で溶解する性質から管腔を作製するサポートハイドロゲルとして用いられることが多い。過去に静電インクジェットによって、ゼラチンインクを数 μm のオーダーでプリント可能であることが報告されているが、着弾面の条件について検討されてこなかった。温度変化によってゾル-ゲル変化する特性から、本研究では、温度制御されたステンレス板上にプリントすることで、その特性について調査した。

アルギン酸ナトリウムは、バイオプリンティングで最も用いられている多糖類である^[3-20-3-24]。アルギン酸インクは、カルシウムイオンと反応することで、瞬時にゲル化する。この性質からバイオプリンティングに適しており、主に軟骨組織の作製に関する研究で用いられている。アルギン酸インクは、粘性が高いため、主にディスペンシング方式でプリントされる。インクジェット方式は、数%程度の低い濃度の 20 mPa・s 以下の粘性のインクに限られ報告されている。アルギン酸インクをプリントする際の着弾面は、瞬時にゲル化させるために塩化カルシウム水溶液に対してプリントされるが、本研究では、ゼラチンゲル上にプリントする。個体上にプリントするため水溶液中に比べてインクが広がりづらく、高い精度でプリントされることが期待できる。

それぞれのインクで、高い分解能でプリントを行うための条件を設定し、得られるプリント特性について評価する。

3・2 実験方法

a. 実験装置 図 3-1 に本研究で用いた実験装置の概要図を示す。XY 自動ステージ上に着弾面となる温度制御されたステンレス板、塩化カルシウム含有ゼラチンゲル、平衡塩溶液を設置し、アースに繋がれる。着弾面に対して垂直にノズル(内径 200 μm)が装着されたシリンジが Z ステージに取り付けられている。シリンジ内のインクから電線で電圧電源に繋がれ、電圧が印加される。使用した電圧電源の印加可能な電圧の範囲は 0~5 kV である。ノズル口と着弾面との距離はシリンジを取り付けた Z ステージによって調

整する。電圧が印加されることで、ノズル先端のインクと着弾面の間に静電力が発生し、インクが着弾面に引っ張られる。静電力により、ノズルのインクから液滴が千切れ、着弾面にプリントされる。

b. 本研究で用いたハイドロゲル

①ジェランガムゲル

インク組成：ジェランガム粉末(4, 8, 16 mg/ml)、脱イオン水

プリント条件：平衡塩溶液中へプリント

②ゼラチンゲル

インク組成：ゼラチン粉末(10 wt%)、脱イオン水

プリント条件：温度制御されたステンレス板上へプリント

③アルギン酸ゲル

インクの組成：アルギン酸ナトリウム粉末(10 wt%)

プリント条件：ゼラチンゲル(200 mg/ml)上へプリント

ジェランガムインクは、ジェランガム粉末(富士フィルム和光純薬, 073-03071)から作製する。ジェランガムインクは、微量のカチオンと反応してゲル化する性質を持つことから、平衡塩溶液(1760-45, nacalai tesque)に対してプリントを行い、溶液中でゲル化を行う。静電インクジェットによって溶液中にインクをプリントし、ゲル化させた場合のプリント特性についての把握する。

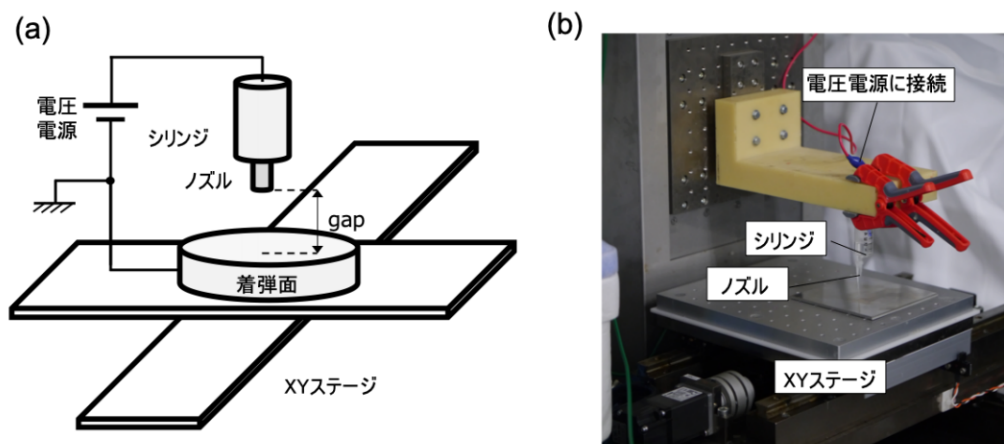


図3-1 静電インクジェットによってインクをプリントするバイオプリンタ。(a) 装置の概要図。(b) 実際の写真。

ゼラチンインクは、ゼラチン粉末(G-1017K, 新田ゼラチン)を 10wt%の濃度で、90°Cの蒸留水に 15 分溶解させることで作製した。また、着弾面となるステンレス板は、ペルチェ素子(LVPU-30, VICS)の上に乗せられ、コントローラー(VPE-20, VICS)によって温度制御される。着弾面の温度変化によるプリント特性は、マイクロスコープ(VH-Z100R, KEYENCE)によって撮影された画像から得られる線幅の変化と、レーザー変位によって得られる表面変位の変化によって把握する。

アルギン酸インクはアルギン酸ナトリウム粉末(IL-2, KIMICA)を 10 wt%の濃度で脱イオン水に溶解させて作製した。また、着弾面となるゼラチンゲルは、ゼラチン粉末を 200 mg/ml と塩化カルシウムを 10 mg/ml の濃度に調整した。アルギン酸インクをシリンジに入れ、これと電圧電源に接続し、高電圧を印加する。ゼラチンゲルの比較として、1 wt%の塩化カルシウム水溶液中にもプリントを行う。プリントされたアルギン酸ゲルは、位相差顕微鏡によって観察し、そのプリント特性を把握する。

3・3 実験結果と考察

3・3・1 平衡塩溶液へのジェランガムインクのプリント

a. ジェランガムインクの濃度検討

まず、濃度 4、8、16 mg/ml のジェランガムインクの粘性を粘度測定器で計測した。表 3-1 に結果を示す。濃度が 16 mg/ml の場合では、58.7 mPa・s を示すことから、インクジェットヘッドを用いた方法では吐出困難である。静電インクジェット法を用いることで、高い粘性のジェランガムインクを高い精度でプリントすることが可能である。

平衡塩溶液中に濃度 8 mg/ml と 16 mg/ml のジェランガム水溶液を滴下し、形成されたジェランガムゲルの形状を観察した。位相差顕微鏡によって撮影した形成されたジェランガムを図 3-2 に示す。濃度 8 mg/ml の場合では、リング状の形状のゲルが形成された。また、濃度 16 mg/ml の場合では、ドット状にジェランガムゲルが形成された。

ジェランガムインクの濃度によって、粘性と分子量が異なることで、平衡塩溶液中に滴下された際のゲル化速度、液中での拡散速度が異なる。これによって、濃度が低い 8 mg/ml の場合では、平衡塩液中に滴下されたジェランガムインクは、ゲル化前にリング状に広がった後、ゲル化したことでユニークな形状に形成されたと考えられる。

表 3-1 ジェランガムインクの濃度と粘度の関係。

濃度 mg/ml	4	8	16
粘度 mPa・s	2.46	12.3	58.7

温度: 25-26°C

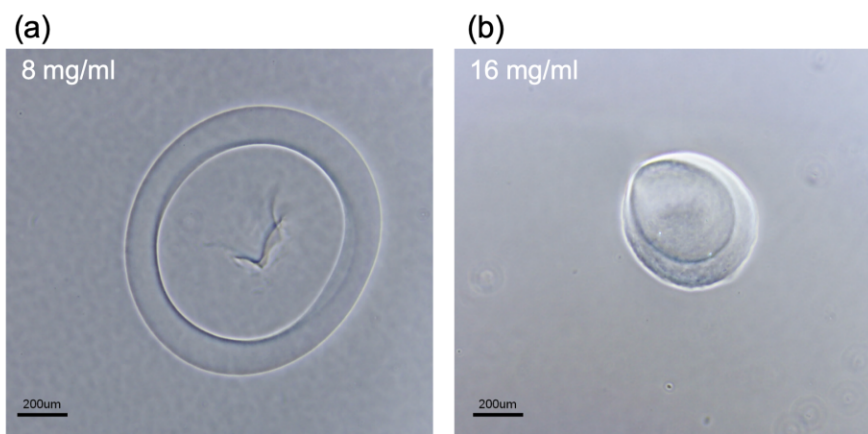


図 3-2 ジェランガムインクの濃度によるゲルの形状の変化. (a) 8 mg/ml. (b) 16 mg/ml.

b. 印加電圧の影響によるジェランガムゲルの形状の検討

濃度 16 mg/ml のジェランガムを静電インクジェット法によってプリントを行い、形成されるジェランガムゲルの形状を観察した。押し出し流量、gap は固定し、印加電圧値の変化によって、プリントされるジェランガムゲルの形状に変化が現れた。印加された電圧によって異なる形状を持つジェランガムゲルを図 3-3 に示す。3.5 kV の場合には、ドット状、3.9 kV では縁がジグザグになった形状、4.6 kV では薄いシート状のジェランガムゲルが形成された。

静電インクジェットは、印加電圧によって吐出モードが変化する^[3-4]。最初はドロップ状であるが、印加電圧が大きくなるとスプレー状にインクが吐出される。図 3-3 (a) はドロップレットモードであるが、図 3-3 (b) から図 3-3 (c) にかけて、スプレーモードに変化したと考えられる。図 3-3 (c) はスプレー状に吐出しているため、薄いシート状のゲルが形成されている。図 3-3 (b) はドロップレットモードとスプレーモードの間であると考えられるため、写真のようなユニークな形状が形成されたと考えられる。

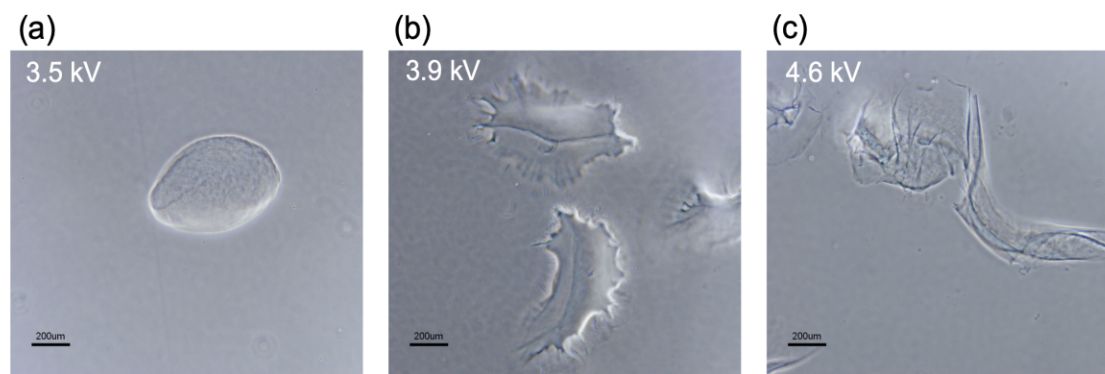


図 3-3 濃度 16 mg/ml のジェランガムインクのプリント. Gap: 4.0mm. Flow rate: 5 μl/min. (a) 印加電圧: 3.5 kV. (b) 印加電圧: 3.9 kV. (c) 印加電圧: 4.6 kV.

c. 静電インクジェットによるジェランガムゲルのプリントに関する基礎特性

ノズルと平衡塩溶液面間の距離を 5 mm、印加する電圧を 3.5 kV に固定して、シリンジポンプの押し出し速度を変化させることで、平衡塩溶液中にプリントされるドロップ状のジェランガムゲルのサイズを計測した。ジェランガムが入ったシリンジはシリンジポンプに接続され、インクを押し出しながら電圧を印加し、プリントを行った。流量は、1、3、5、7、10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の条件でそれぞれ行なった。また、図 3-4 にそれぞれの流量でプリントされたドロップ状のゲルのサイズの変化を表したグラフを示す。最も小さいドロップ状のジェランガムゲルがプリントされた条件は、流量が 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ であった。静電インクジェットは、gap と印加電圧を最適化させることで、数マイクロオーダーでプリント可能であるが、本実験ではこれらの条件を固定したため、数百マイクロオーダーでプリントされた。しかし、流量によって、プリントされるドロップ状のジェランガムゲルのサイズが変化し、最も小さくプリントするための最適条件が存在することがわかった。

次に、印加電圧とプリントされるドット状のゲルの大きさの関係を調べた。印加電圧

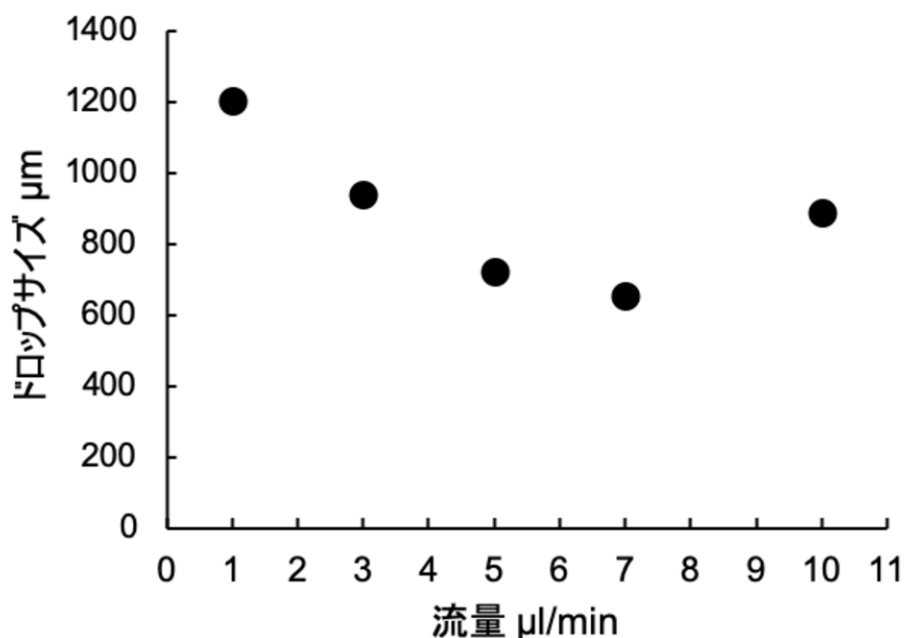


図 3-4 流量の変化に対するゲルの直径の変化.

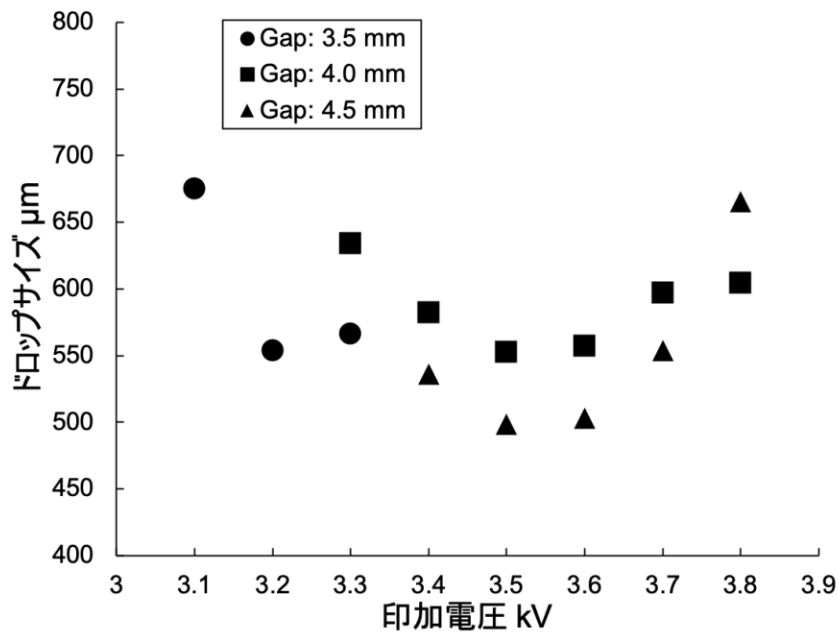


図 3-5 印加電圧とゲルの直径の関係. Flow rate: 2 μ l/min.

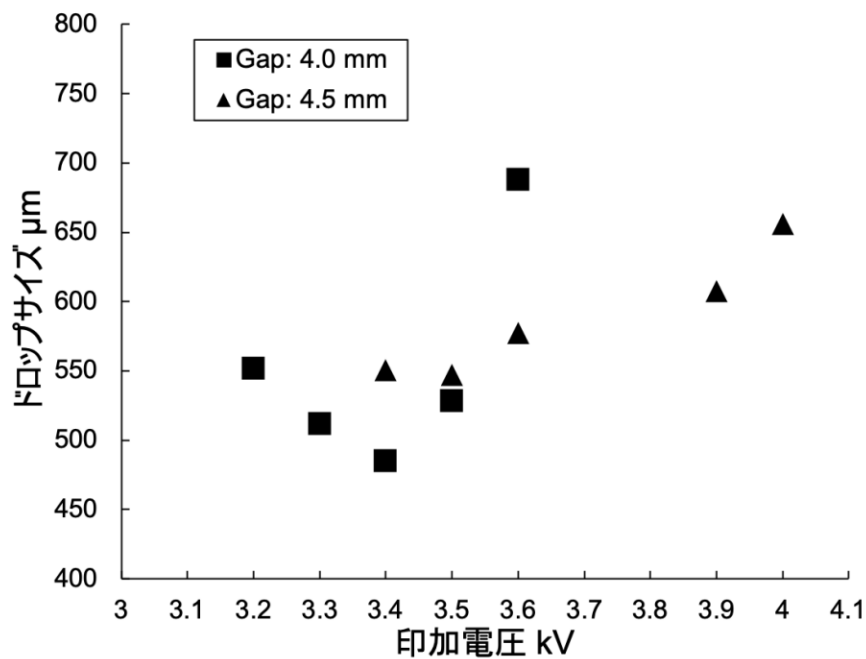


図 3-6 印加電圧とゲルの直径の関係. 押出流量: 5 μ l/min.

は、図 3-3 の結果を踏まえ、濃度 16 mg/ml のジェランガムインクを用い、ドロップ状のジェランガムゲルがプリントされる印加電圧値の範囲でプリント分解能の特性を調査した。図 3-5、図 3-6 に結果を示す。シリンジポンプによる押し出し流量が 5 μ l/min の

とき、gap の値が 3.5 mm 以下では、電圧を印加した際にノズル先端からジェランガムインクが伸びて、アースと繋がっている平衡塩溶液面に触れてしまい、放電が起きてしまうため、プリントが困難であった。同様に押し出し流量が 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ のとき、gap が 4 mm 以下ではインクが液面に触れてしまい、プリントが困難であった。すなわち、押し出し流量が大きい方が、プリント可能な gap が小さくなった。押し出し流量が 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ の場合、gap が大きくなるほど、最小サイズのドロップ状のジェランガムゲルがプリントされる電圧値が小さくなり、ドロップ状のジェランガムゲルのサイズが小さくなる。

過去に報告された静電インクジェットによるアルギン酸ナトリウム水溶液のプリントに関するものでは、gap は小さいほど、分解能は低い。しかし、ジェランガムインクの場合では、静電力によって引っ張られたとき、インクが伸びる。そのため、gap が大きい方が伸びる距離が大きくなり、インクが千切れてノズル先端から出るインクから分離するとき、より少ない量のインクが千切れるため、小さいドロップ状のジェランガムゲルがプリントされると考えられる。また、図 5-7 のような直径約 100 μm のサイズのジェランガムゲルがプリントされていることを確認した。このサイズのジェランガムゲルは他のサイズのものとは比べて微量であったため、計算には含めなかった。プリントされたほとんどのジェランガムゲルは、図 3-5、図 3-6 の結果の通り、直径 500 μm のジェランガムゲルが最小サイズであった。これは細胞のサイズである 10~30 μm のサイズと比較して大きく、精密な生体組織の構築を実現するためには、分解能が大きい。いっぽうで図 3-7 が示すように、わずかな数ではあるが直径約 100 μm のジェランガムゲルがプリントされていることが確認された。プリント条件を検討していくことで、さらに高分解能でジェランガムゲルがプリント可能になると考えられる。

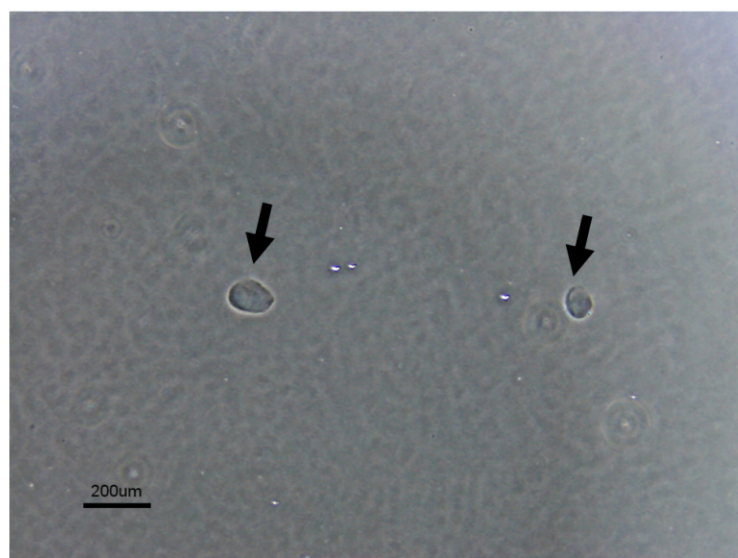


図 3-7 直径約 100 μm のジェランガムゲル. 矢印にプリントされたジェランガムゲルを示す.

3・3・2 温度制御されたステンレス板へのゼラチンインクのプリント

a. 温度制御されたステンレス板上におけるゼラチンインクの形状

ゼラチンインクを着弾面の温度によるプリントされたゼラチンインクの濡れ広がり方の変化を調査した。着弾面の温度をペルチェ素子によって変化させ、ステージを動かさず、一点にゼラチンインクをスプレーモードでプリントした。着弾面であるステンレス板は、20°Cと80°Cに設定した。実際にプリントされたゼラチン水溶液を図3-8に示す。着弾面の温度が20°Cの場合はプリントされたゼラチンが水平方向にぬれ広がっていく様子が観察された。これに対し80°Cの場合では、ゼラチンは広がらず、半球状の形に形成されることが観察された。半球状に形成されたゼラチンインクをプリントし続けることで、球のサイズが大きくなり、半球の形が崩れることが確認された。

b. 温度制御されたステンレス板上へのゼラチンインクの線状のプリント

ゼラチンインクをステンレス板上へ線状にプリントし、着弾面の温度による線幅の変化を調査した。プリントしたゼラチンインクを図3-9に示す。XY自動ステージの移動速度を1 cm/s、gap:を1.5 mm、印加電圧を2.2 kVの条件でプリントした。温度が20°Cの場合だと200 μm 以上の幅でプリントされるが、80°Cの場合ではライン幅は狭くなり、200 μm 以下の幅でプリントされる。また、温度制御されたステンレス板上記の条件でプリントされたゼラチンの断面形状をレーザー変位計によって計測した。図3-10に結果を示す。20°Cでプリントされたゼラチンインクの断面は、80°Cでプリントされた場合に比べて、中心部が凹んでいることが確認された。

液滴が乾燥するとき、マランゴニ対流が起こり、リング上に乾燥した粒子が残る現象はコーヒーリング現象と呼ばれているが、乾燥する速度が早い場合、粒子が中心に集まることで、リング状に乾燥しないことが知られている^[3-25]。本実験でも同様の現象が見

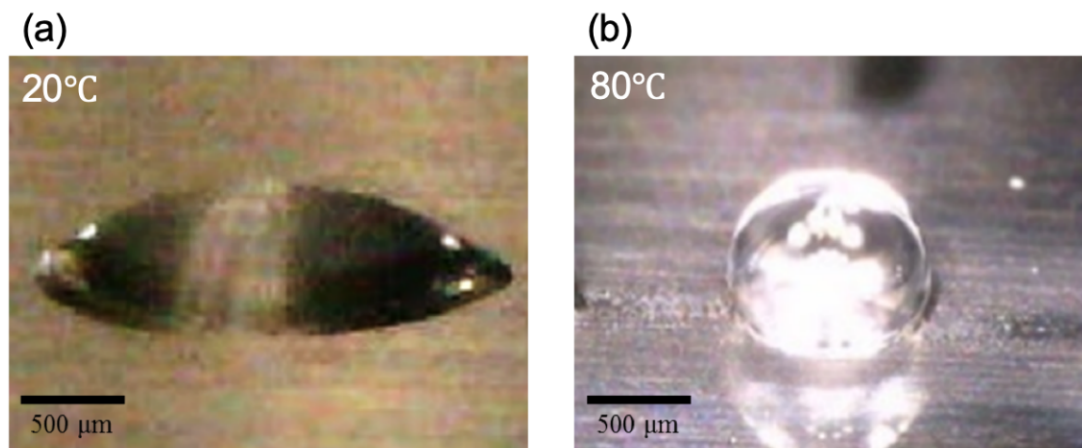


図3-8 温度制御されたステンレス板へのゼラチンインクのプリント. (a)ステンレス板が20°Cの場合. (b)ステンレス板が80°Cの場合.

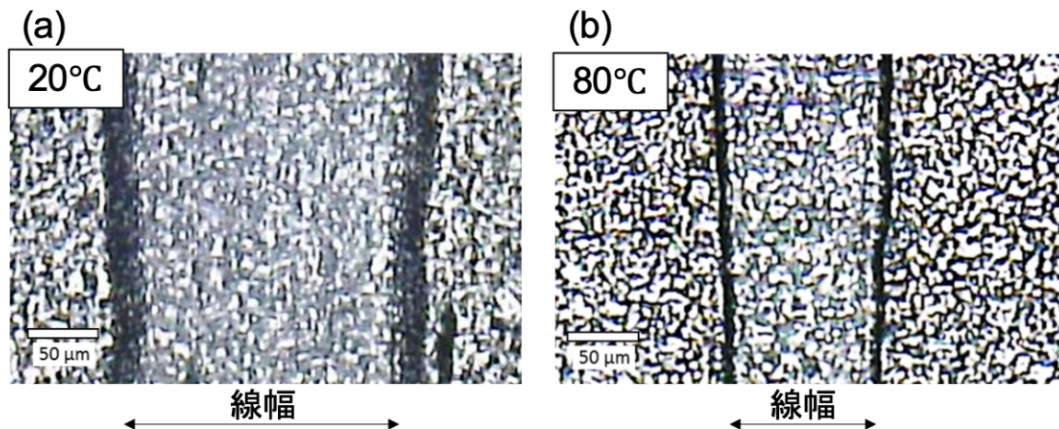


図3-9 温度制御されたステンレス板へのゼラチンインクを線状にプリント。(a) ステンレス板が 20°C の場合。(b) ステンレス板が 80°C の場合。

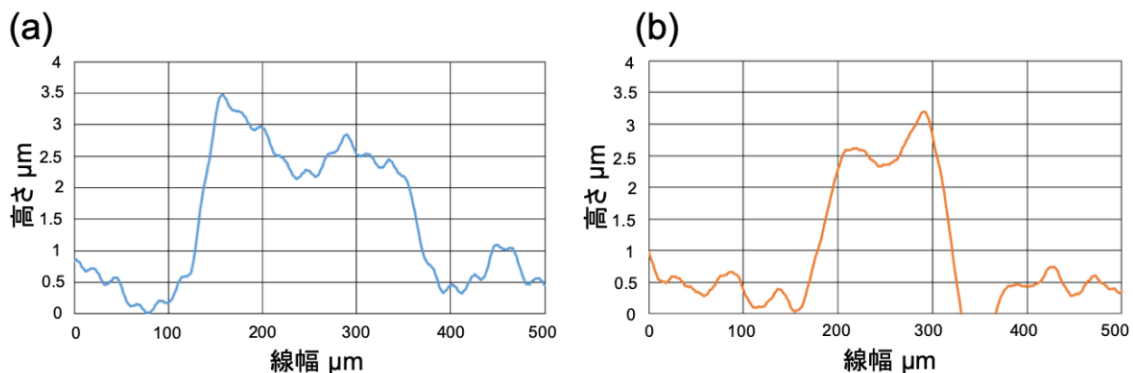


図3-10 プリントされたゼラチンインクの断面形状。(a) ステンレス板が 20°C の場合。(b) ステンレス板が 80°C の場合。

られたと考えられ、着弾面の温度が 20°C の場合、乾燥が緩やかであるため、縁に偏るようにゼラチンが乾燥し、中心部が凹んだ。また、80°C の場合は、乾燥が速かったため、ゼラチンが中心に集まるように乾燥し、中心部が凹まなかったと考えられる。

3・3・3 ゼラチンゲル上へのアルギン酸インクのプリント

a. ゼラチンゲル表面の濡れ性

静電インクジェットを用いてアルギン酸インクをプリントする前に、濃度 200 mg/ml のゼラチンゲルの濡れ性を調査した。比較としてステンレス板、濃度 50 mg/ml のアルギン酸ゲル、濃度 10 mg/ml のゼラチンゲルを用いた。25°C 下で、それぞれの着弾面に対して蒸留水 1 μl を滴下した直後、横方向から液滴を撮影し、接触角を求めた。図 3-11 にその結果を示す。アルギン酸ゲルは最も接触角が小さく、濃度 200 mg/ml のゼラチンゲルが最も接触角が大きかった。

b. ゼラチンゲル上へのアルギン酸インクのプリント

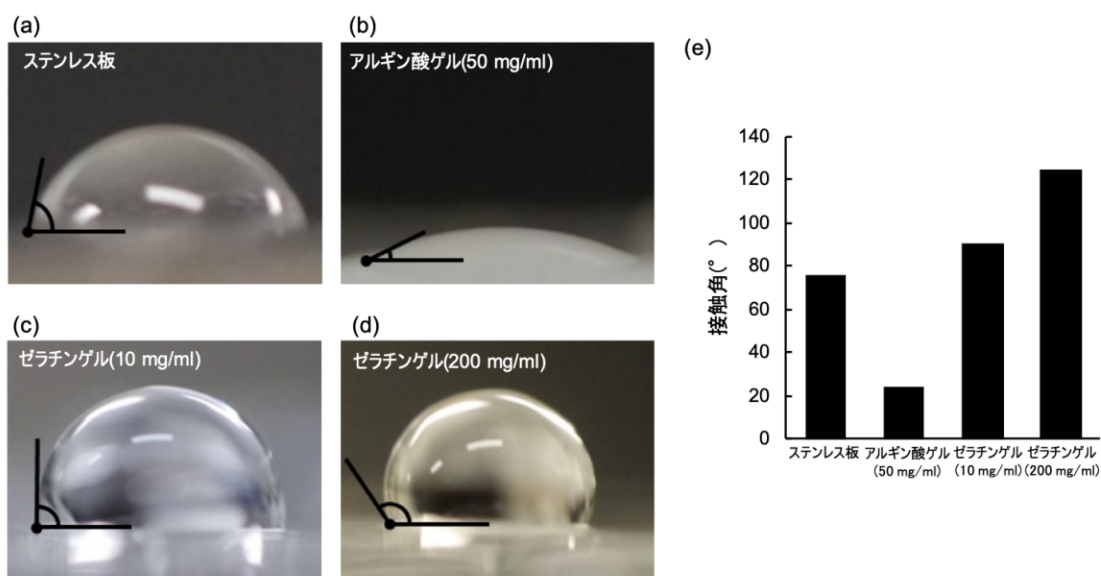


図 3-11 着弾面の材料による接触角の変化. (a) ステンレス板. (b) 濃度 50 mg/ml のアルギン酸ゲル. (c) 濃度 10 mg/ml のゼラチンゲル. (d) 濃度 200 mg/ml のゼラチンゲル. (e) 接触角の比較.

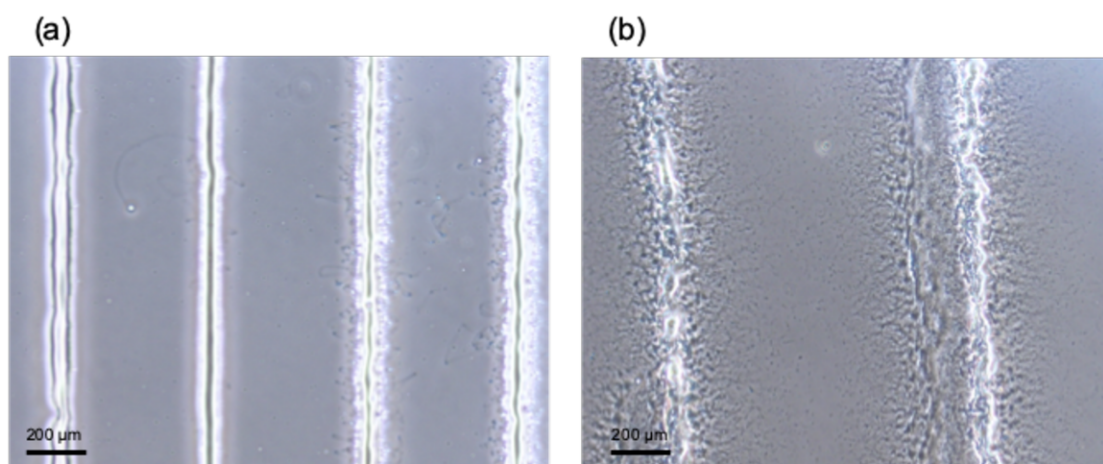


図 3-12 着弾面によるプリントされる線状のアルギン酸ゲルの形状の変化. (a) 濃度 200 mg/ml のゼラチンゲル上. (b) 濃度 1wt%の塩化カルシウム溶液中.

次に、静電インクジェット法を用いて、作製したアルギン酸インクを、濃度 200 mg/ml のゼラチンゲル上と、濃度 1 wt%の塩化カルシウム水溶液へプリントした。プリント条件は、gap を 1.5 mm、印加電圧を 2.5 kV に設定し、XY 自動ステージを 1 cm/s で動かし、線状にプリントした。図 3-12 にその結果を示す。ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸ゲルは線幅 100 μm 以下で綺麗な線状にプリントされていたが、塩化カルシウム水溶液中にプリントされたアルギン酸ゲルは、表面が荒い状態であった。

c. プリントされたアルギン酸ゲルの転写

次に、ゼラチンゲル上にプリントされたファイバー状のアルギン酸ゲルを転写する実験を行なった。図 3-13 にその結果を示す。図 3-13(a)の様に、ゼラチンゲルを切り出すことで、プリントされたアルギン酸ゲルファイバーをピックアップ可能である。これをアルギン酸ゲル側が下になるようにディッシュ表面に 30 分接着させた後、ゼラチンゲルを溶解させて、アルギン酸ゲルファイバーのみをディッシュ上に転写させた。転写されたアルギン酸ゲルファイバーが図 3-13(b)である。プリントされたアルギン酸ゲルファイバーが、ファイバー同士の間隔と形状を崩さずに転写されていることを確認した。また、アルギン酸ゲルファイバーが転写されたディッシュに細胞を播種した結果を図 3-7(c)に示す。アルギン酸ゲルは細胞が接着しないため、アルギン酸ゲルファイバーが存在する部分には細胞が接着せず、パターンニングが可能になると考えた。細胞を接着させた結果、ほとんどのアルギン酸ゲルファイバーはディッシュから剥離してしまったが、黒の矢印で示しているアルギン酸ゲルファイバーが残っている箇所には、細胞が接着していないことが確認できた。次に、ディッシュに播種された細胞に直接アルギン酸ゲル

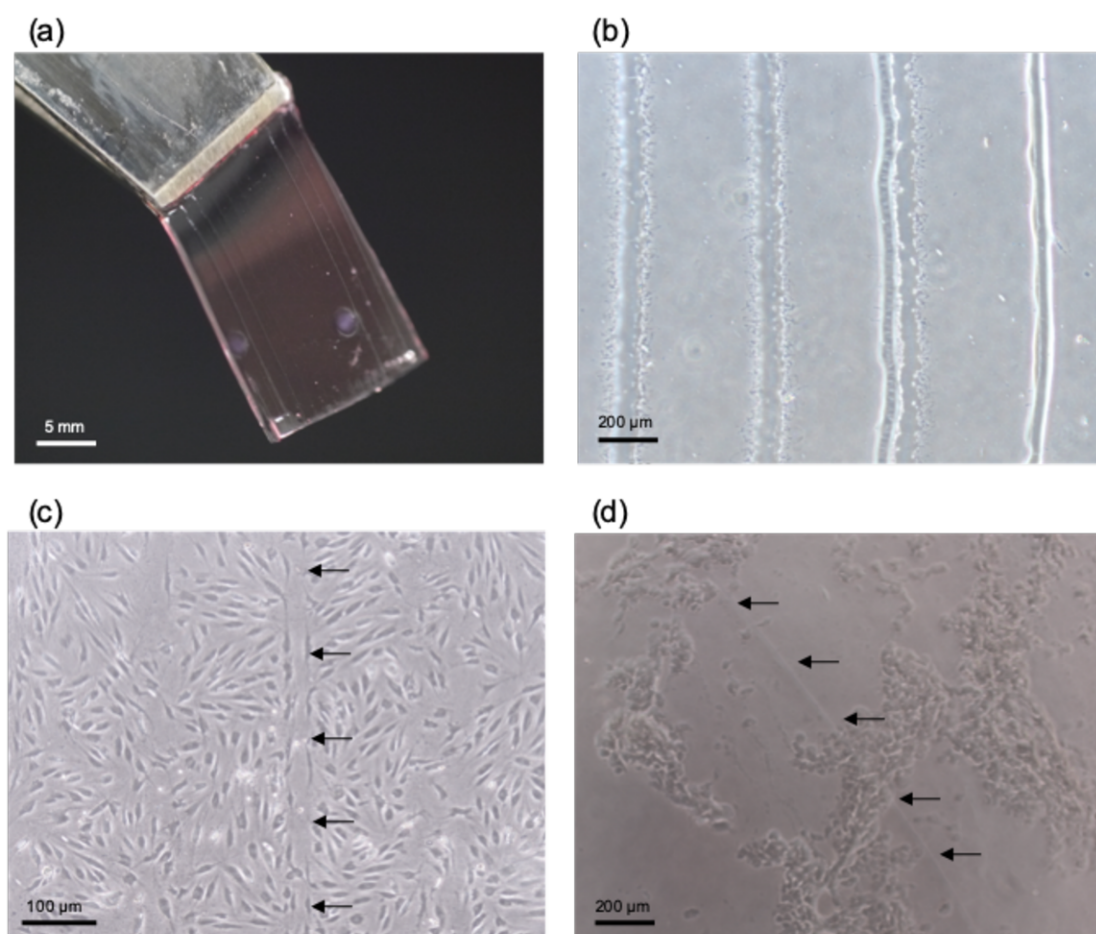


図 3-13 ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸ゲルの転写. (a) ゼラチンゲル上にプリントされたアルギン酸ゲルファイバー. (b) ディッシュ上へ転写されたアルギン酸ゲルファイバー. (c) 細胞が播種された(b)のディッシュ. (d) ディッシュに播種された細胞へ直接転写したアルギン酸ゲルファイバー. 矢印はアルギン酸ゲルファイバーの位置を示す.

ファイバーが転写可能であるか調べた結果が図 3-13(d)である。黒い矢印はアルギン酸ゲルファイバーを示している。ディッシュに接着していた細胞が剥離してしまった。

アルギン酸ゲルは、細胞が接着しないため、ディッシュ上に転写することで、転写部には細胞が接着せず、細胞の位置制御が実現された。本研究では、ファイバー状のアルギン酸ゲルの転写のみを行い、細胞の位置制御について検証を行なったが、プリントされるアルギン酸ゲルの形状を複雑にすることで、さらに複雑な細胞の位置制御が可能になると考えている。

3・4 結言

本章では、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性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、安定してプリントを行うことが困難である。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ことが明らかになった。いっぽうで、溶液中にプリントすることで、ユニークな形状を持ったハイドロゲルが形成されることから、高精度ではないが、特異的な形状を有する組織を構築する際に利用できる可能性がある。

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なことを把握した。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。

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可能なことを実証し、生体組織の精密な構造の制御に応用できることを示した。

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 放電加工を応用したハイドロゲルの加工技術の開発

4・1 緒言

本研究では、マイクロワイヤから発生する放電現象によってハイドロゲルに加工を行い、その特性について調査する。放電加工がハイドロゲルの加工法として適用できることを確認し、また、数 μm オーダーでの加工を実証する。

ハイドロゲルに微細加工を行う方法として、PDMS 型や、SU-8 を用いた方法^[4-1-4-3]が報告されている。人工生体組織を構築する上で、細胞や成長足場の微小環境を制御することは重要である。生体内の構造を模倣することで、機能的な組織が作製されることが知られており、細胞の成長足場であるハイドロゲルに微細構造を付与することで、実現される。生体内の筋肉組織を模倣するために、溝の加工が行われた培養面に、筋管組織を配向し、報告がある^[4-4-4-6]。しかし、型を用いた方法では、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、設計の度に型を作製する必要があり、工程が多くなることが課題であった。そこで放電加工によって、ハイドロゲルを削るように加工できるようになれば、設計の幅が広がると期待できる。

放電加工は、電極からのアーク放電によって発生する熱によって加工対象の表面を削る方法であるが、これまで金属材料を対象に行われてきた^[4-7-4-11]。放電加工では非接触で加工するため、工具へのダメージが少ないことから高硬度材料の加工に適している。マイクロワイヤを用いることで穴や溝をマイクロオーダーで加工することや、加工したい形状に加工された電極を材料に近づけていくことで、型を彫るように加工することが可能である。加工された部分はバリが少なく、滑らかな表面を持つことが特徴であり、金属材料の微細加工に用いられてきた。

これまでハイドロゲルを対象とした放電加工について報告はない。ハイドロゲルは柔らかい材料であるため、切削工具を表面に当てると、切削工具に合わせて表面が縮むことから、高い精度で切削加工することは困難であった。生体組織の切片観察のために液体窒素などを用いてハイドロゲルを凍結させ、剛性を高めて切削を行うことがある^[4-12]が、ハイドロゲルの成分のほとんどは水分であるために凍結や解凍の際に変形してしまう可能性がある。

ハイドロゲルは切削工具を接触させるような加工は困難であるが、放電加工のように非接触で加工が可能であれば、高い精度で切削加工が実現できると考えた。また、細胞のサイズは約 10-30 μm であることから、このスケールの加工精度を達成すれば、精密な人工生体組織の構築手法として応用できると考えられる。また、細胞の配置が制御さ

れることで、生体組織としての機能が向上すると考えられ、本手法によってこれを実現するようなハイドロゲルの表面加工が可能になると期待できる^[4-13-4-16]。

ハイドロゲルを削るように加工する、という方法はこれまでになく、放電加工によってこれが実現可能であれば、新しい加工方法として、これまでに作製が困難であった人工生体組織の構築手法として応用できる。本研究では、人工生体組織の構築に用いられるゼラチンゲルとアルギン酸ゲルを対象に放電加工を行い、その特性を調査する。

4・2 実験方法

a. 実験装置 図4-1に放電加工を行うために作製した実験装置の概要図と実際の写真を示す。XY自動ステージ(SGSP26-200, シグマ光機)の上にステンレス平板を置き、その上に加工する平面状のゼラチンゲルを乗せる。ステンレス平板はアースに接続されている。加工用のワイヤは直径50 μm のチタン製のマイクロワイヤを用い、ハイドロゲルに対して垂直になるようにZステージへ取り付けられている。マイクロワイヤとハイドロゲルの間の距離は、Zステージによって調整される。マイクロワイヤは高電圧電源装置に接続され、電圧がマイクロワイヤに印加され、マイクロワイヤとゼラチンゲルの間に放電現象が起き、ハイドロゲルが加工される。XY自動ステージによって一定の速度でハイドロゲルを動かすことでゼラチンゲルに溝加工を行う。加工中の様子は高速度カメラ(FASTCAM SA3, フォトロン)で撮影した。加工した溝は顕微鏡(VH-Z100R, KEYENCE)を用いて観察した。印加電圧、ハイドロゲルとマイクロワイヤとの距離の値による加工溝の変化から特性を把握する。

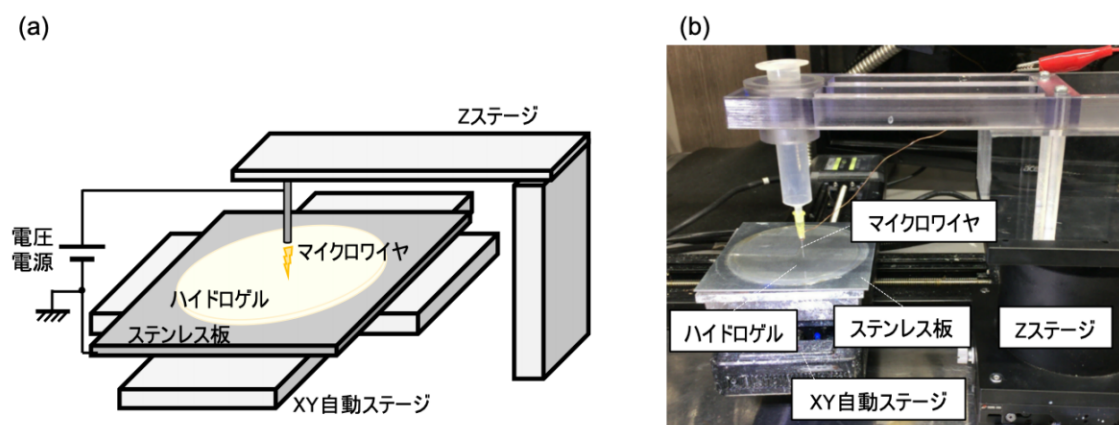


図 4-1 放電加工装置. (a) 装置の概要図. (b) 実際の実験装置.

b. 加工を行うハイドロゲル 本研究ではゼラチンゲルとアルギン酸ゲルを対象に放電加工を行い、加工特性を調査する。ゼラチンゲルは、純水にゼラチン粉末(G-1017K, 新田ゼラチン)を150 mg/mlの濃度で作製し、常温でゲル化させた。アルギン酸ゲルは、純水に50 mg/mlの濃度で作製した。それぞれ放電によって加工する際は、アースに接続され、XY自動ステージで移動させる。

4・3 実験結果と考察

4・3・1 マイクロワイヤからの放電による加工特性

a. 放電によるゼラチンゲルの加工

放電によってゼラチンゲルに溝が加工される様子をハイスピードカメラで撮影した。図 4-2 に撮影した動画のキャプチャを示す。XY 自動ステージによってゼラチンゲルを一定の速度で動かすことで、ゼラチンゲル表面に溝が加工される様子を確認した。

溝が加工されたゼラチンゲル上を実体顕微鏡により観察した。これを図 4-3 に示す。図 4-3(a)は加工した溝を上から、図 4-3(b)は加工したゼラチンゲルを溝に対して垂直方向に切断し、横から断面を観察したものである。放電加工によって、なめらかな溝がゼ

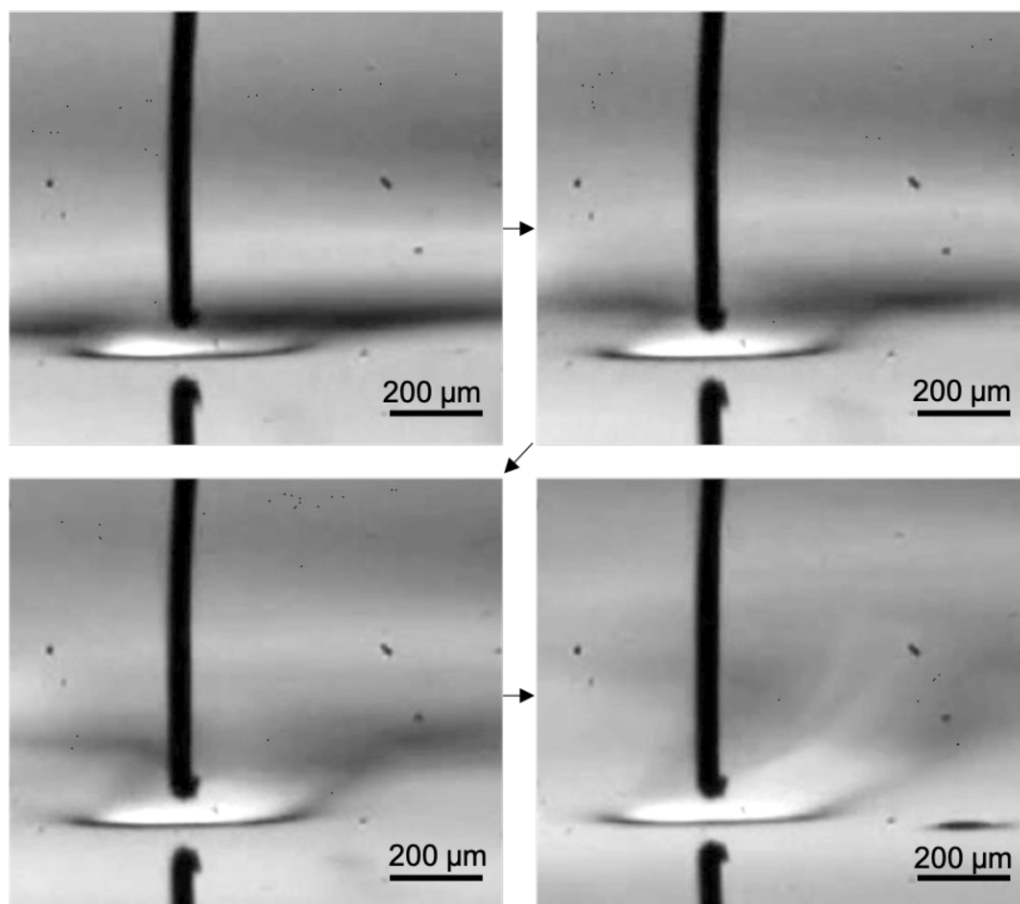


図 4-2 ゼラチンゲルへの放電によって溝が加工される様子。

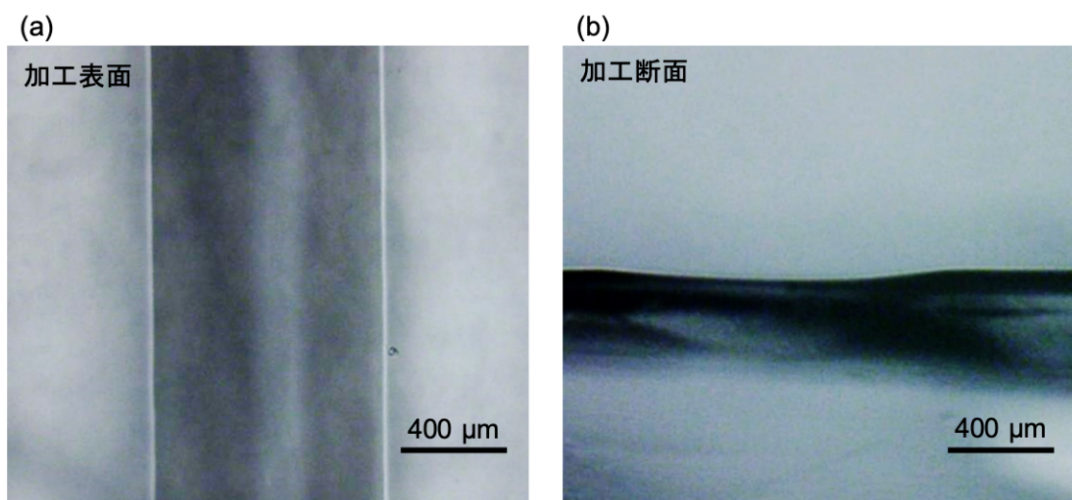


図 4-3 マイクロワイヤからの放電により溝加工されたゼラチンゲル. (a) 加工されたゼラチンゲルの表面. (b) 加工されたゼラチンゲルの断面.

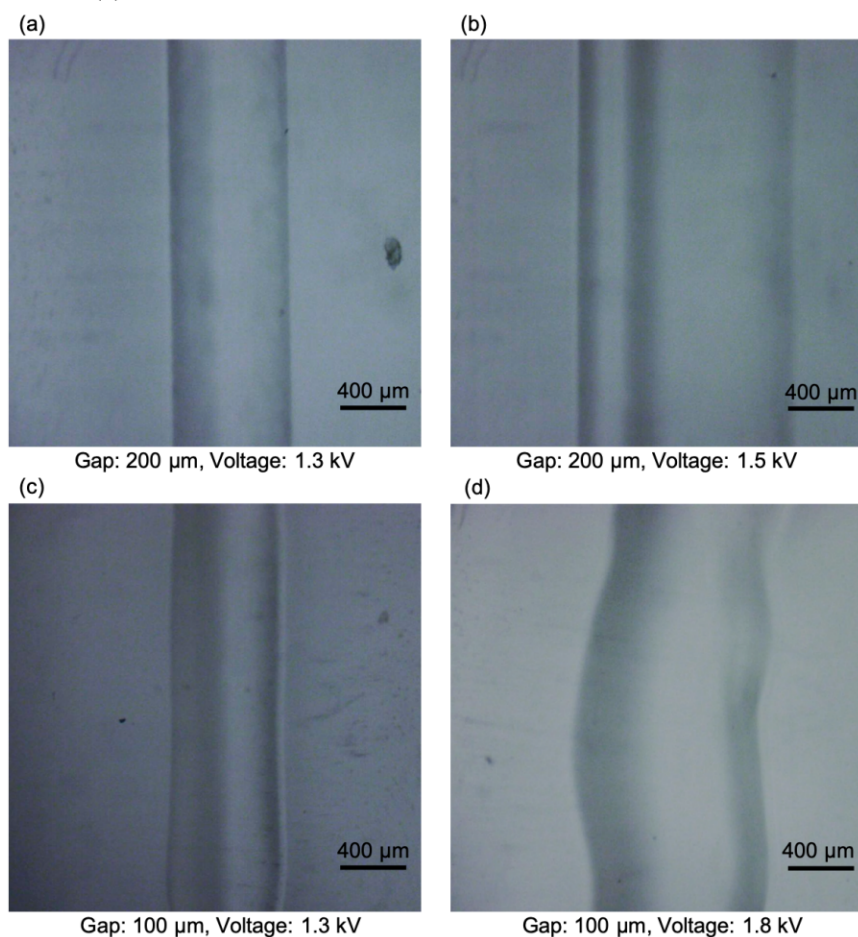


図 4-4 放電によって溝加工されたゼラチンゲル表面. (a) Gap: 200 μm , voltage: 1.3 kV. (b) Gap: 200 μm , voltage: 1.5 kV. (c) Gap: 100 μm , voltage: 1.3 kV. (d) Gap: 100 μm , voltage: 1.8 kV.

ラチンゲルに加工されていることが確認されたが、幅に対して、深さは大きくないことがわかった。

また、マイクロワイヤとゼラチンゲル間の距離を 50 μm 、100 μm 、200 μm に設定し、

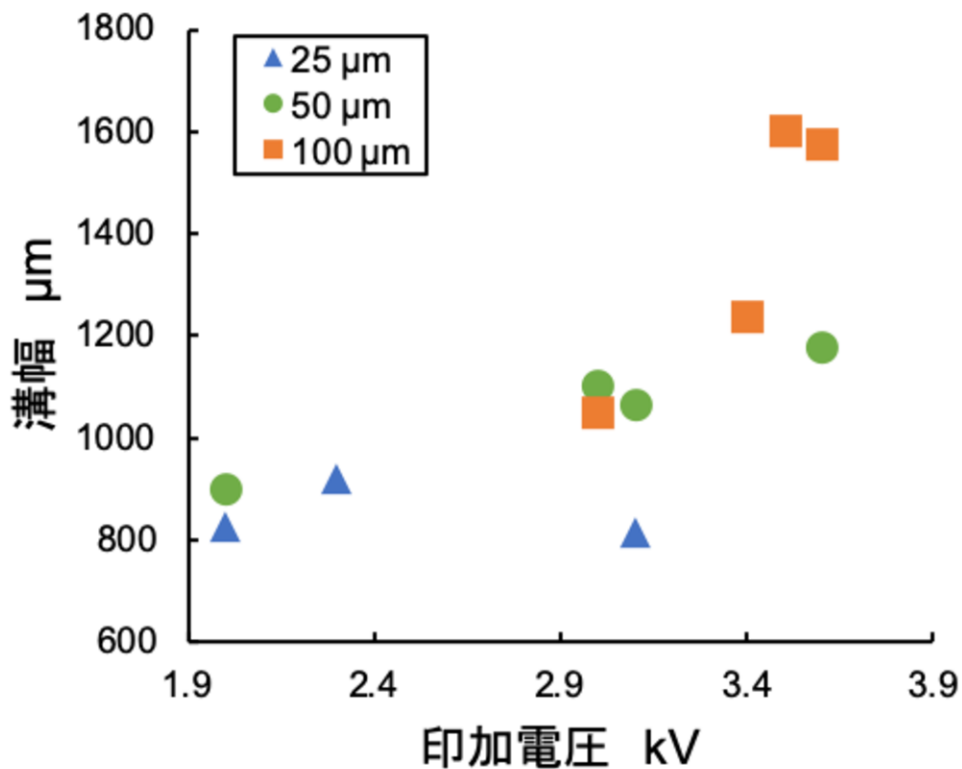


図 4-5 ゼラチンゲルを対象に放電加工を行った場合の印加電圧と加工幅の関係。

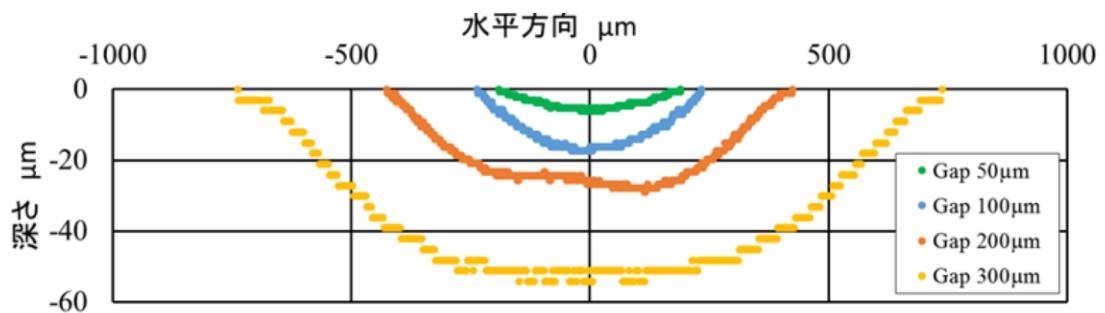


図 4-6 印加電圧と断面形状の関係。

それぞれ放電が起こる最小の印加電圧値を調査した。パッシェンの法則により gap が大きいほど、最小の印加電圧の値は大きくなる。50 μm の場合は 0.9 kV、100 μm の場合は 1.0 kV、200 μm の場合は 1.3 kV であった。また、一定以上の電圧を印加すると、ゼラチンゲルが飛び散り、マイクロワイヤ先端に付着し、連続で加工できない現象が確認された。50 μm の場合は 1.2 kV、100 μm の場合は 1.4 kV、200 μm の場合は、1.6 kV 以上でこの現象が確認される。

次に印加電圧とマイクロワイヤと hidroゲルとの距離(gap)の値で変化する加工溝の幅の傾向を調査した。図 4-4 に印加電圧を変化させてゼラチンゲルを溝加工し、実体顕微鏡により上から観察した様子を示す。図 4-4(a)(b)は gap を 200 μm に設定し、印加

電圧をそれぞれ 1.3 kV、1.5 kV で加工し、図 4-4(c)(d) gap を 100 μm に設定し、印加電圧をそれぞれ 1.3 kV、1.8 kV で加工した溝である。それぞれから、印加電圧が高いほど加工される溝の幅が大きくなる傾向を確認した。また、同じ印加電圧の値でも gap が小さいほど加工される溝の幅が小さくなる傾向が得られた。先述したように、gap が 100 μm では印加電圧が 1.4 kV 以上ではゼラチンが飛び散る現象が起きるが、図 4-4(d)に示す様に、加工される溝は滑らかではなく、不安定な形状が得られた。

印加電圧の値による加工幅の変化をまとめたグラフを図 4-5 に示す。Gap を 25、50、100 μm の 3 通りに設定し、上述した加工可能な電圧の範囲で加工を行う。実体顕微鏡によって撮影された写真から溝を 3 箇所計測し、その平均を加工された溝の幅とした。電圧の値が大きいほど、加工される溝の幅が大きくなる傾向が得られた。印加電圧と溝幅が単純な比例関係にならなかったが、これは、加工対象とマイクロワイヤの距離(gap)を目視によって定めている点、装置構成の問題からステージを移動することで gap が変化してしまう点から、印加電圧と溝幅の関係のグラフが単純な比例関係にならないと考えられる。

図 4-6 に放電加工によって加工したゼラチンゲルの断面の写真から、縁の部分をプロットし、表にまとめた結果を示す。それぞれの gap において放電が起こる最小の電圧値で加工を行なっている。そのため、gap が大きいほど電圧は大きい。電圧を高くすると溝が太くなることから、細い溝は浅く、太い溝は深いという傾向がある。

Gap の値が大きくなると、放電が発生する印加電圧が高くなり、1 回の放電に伴うエネルギーが大きくなる^[4-19]。このことから、gap の大きさに対して削られるゼラチンゲルの深さが大きくなったと考えられる。

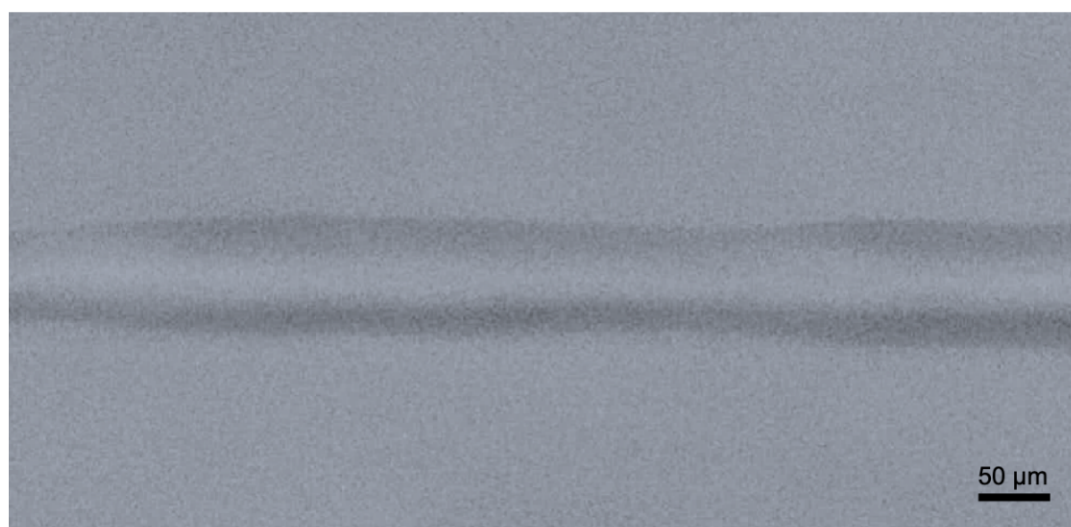


図 4-7 Gap を 10 μm 、印加電圧を 0.3 kV の条件で放電加工されたゼラチンゲル表面。

Gap を小さくするほど加工可能な溝の幅は小さくなることが図 4-5 の結果でわかったが、この実験で行なった最小の gap: 25 μm では、加工幅は 800 μm が最小の溝幅であった。そこで、マイクロワイヤの先端とゼラチン表面とのギャップを 10 μm として加工を行った。このギャップでは印加電圧を 0.3 kV としたときに火花放電が発生し、図 4-7 のような幅が 100 μm 以下の溝を作製することができた。しかし、XY 自動ステージの精度やゼラチンゲルの平面度から、マイクロワイヤとゼラチンゲルの間を 10 μm で維持しながら加工することは困難である。

c. 放電加工されたゼラチンゲル表面の FT-IR 解析

また、ゼラチンゲルへの放電加工前と後の表面のゼラチンゲルの組成をフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) の全反射測定法 (ATR 法) によって調査した。FT-IR は、対象となる物質に赤外光を照射し、各波長の分子結合の吸収スペクトルを計測する方法である。ATR 法は、赤外光を照射し、その反射光を解析する方法であるため、表面から数 μm 部分の解析に適している。図 4-8 に FT-IR によって放電加工前後の吸収スペクトルを比較した結果を示す。3300 cm^{-1} 付近のピークは、O-H や N-H の伸縮を示し、1650 cm^{-1} 付近は C-O、C-N のアミドバンドの伸縮を示している^[4-18]。放電による加工前と後ではピークが現れる波数の値に変化はなかったことから、炭化などが起こらず、ゼラチンの二次構造に変化がなかった。いっぽうで、報告されている食用のグミに対して放電加工を行なった研究では、放電加工前後で味の変化が現れなかった^[4-22]ことから、放電によるゼラチンゲルの物性の変化はないと考えられる。

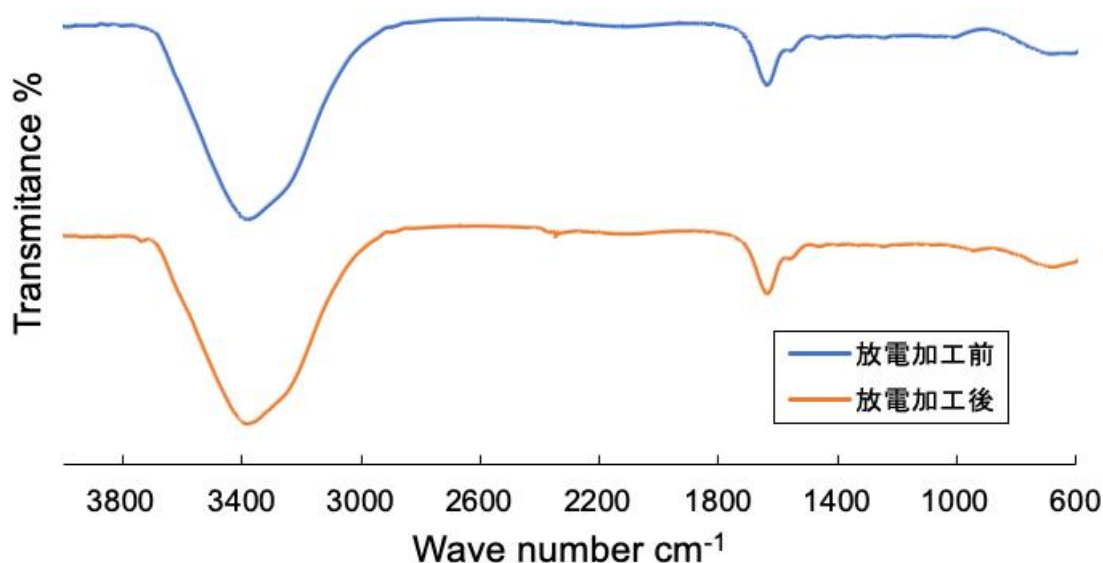


図 4-8 FT-IR ATR による放電加工前と後のゼラチンゲルの反射スペクトル。

d. マイクロワイヤの SEM 観察

加工に使用した直径 50 μm のチタン製のマイクロワイヤの先端を操作電子顕微鏡 (SEM) によって観察を行った。図 4-9 に加工前と後のマイクロワイヤの SEM 画像を示す。また、先端の状態から放電加工によって先端が削れていることは確認されなかった。

e. アルギン酸ゲルへの放電加工

また、ゼラチンゲルへの放電加工を行なったときと同様にアルギン酸ゲルを対象に放

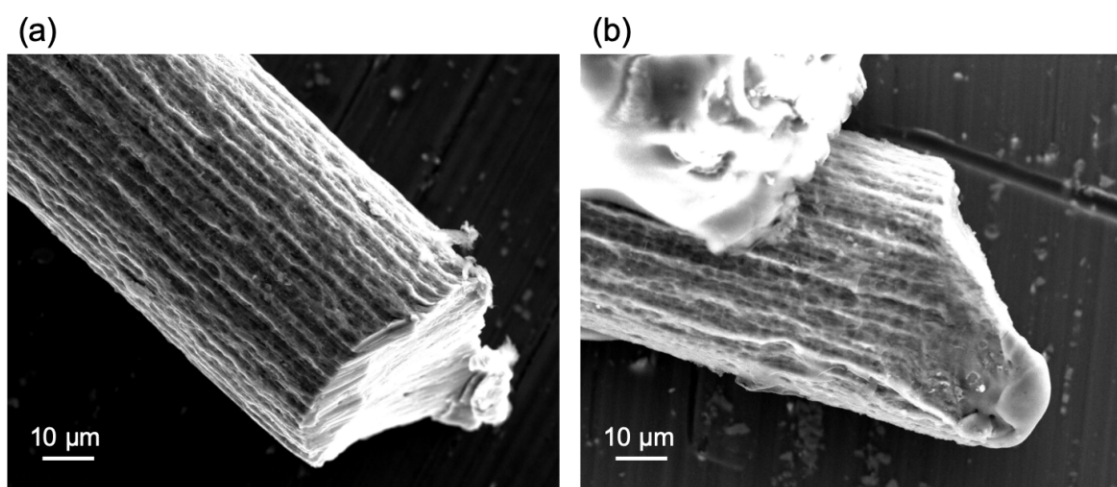


図 4-9 マイクロワイヤの SEM 画像. (a) 加工前のチタン製のマイクロワイヤ. (b) 加工前のチタン製のマイクロワイヤ.

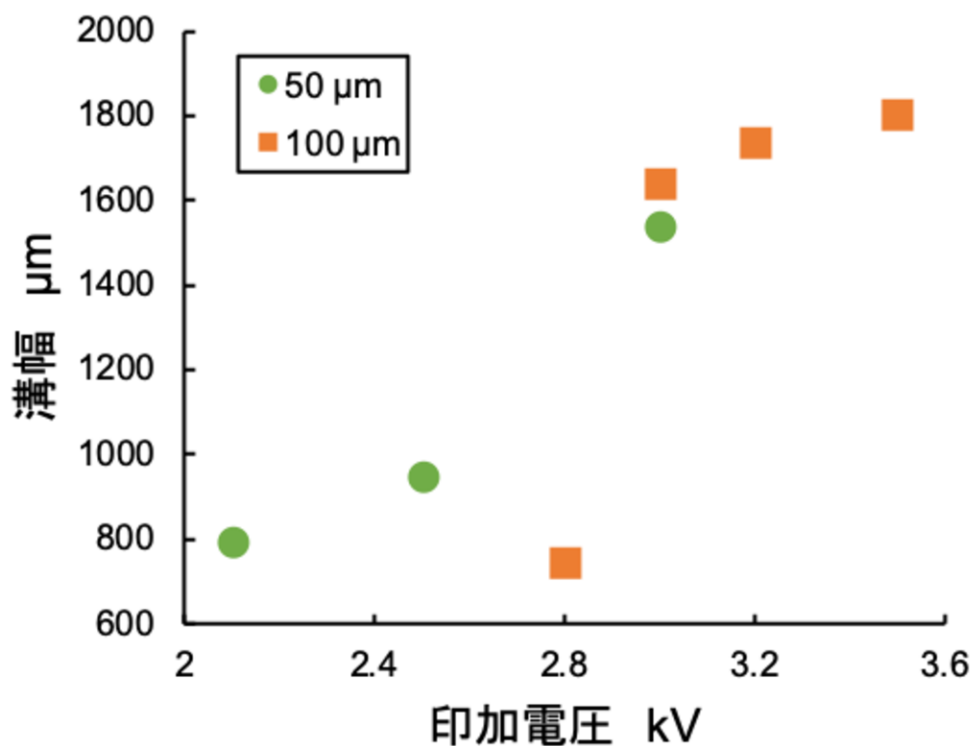


図 4-10 アルギン酸ゲルを対象に放電加工を行った場合の印加電圧と加工幅の関係.

電加工を行った。図 4-10 にその結果を示す。マイクロワイヤとアルギン酸ゲルとの距離(gap)は 50 μm 、100 μm に設定し、それぞれ印加電圧を変えて加工を行った。アルギン酸ゲルも放電加工によって溝加工を行うことができ、ゼラチンゲルの場合と同様の加工特性の傾向が得られた。

4・3・2 加工油を用いた加工分解能の向上

Gap を小さくする以外に加工幅を細くするための方法として、放電加工の際に油の冷却作用を利用して熱を分散させることができれば、蒸発するゼラチンの量を減らし、より細い溝の加工が可能になると考えた。使用した油は 20°Cでの動粘度が 10 mm^2/s のミシンオイルである。この方法では油の表面が反射してしまうため、ギャップのゼロ点合

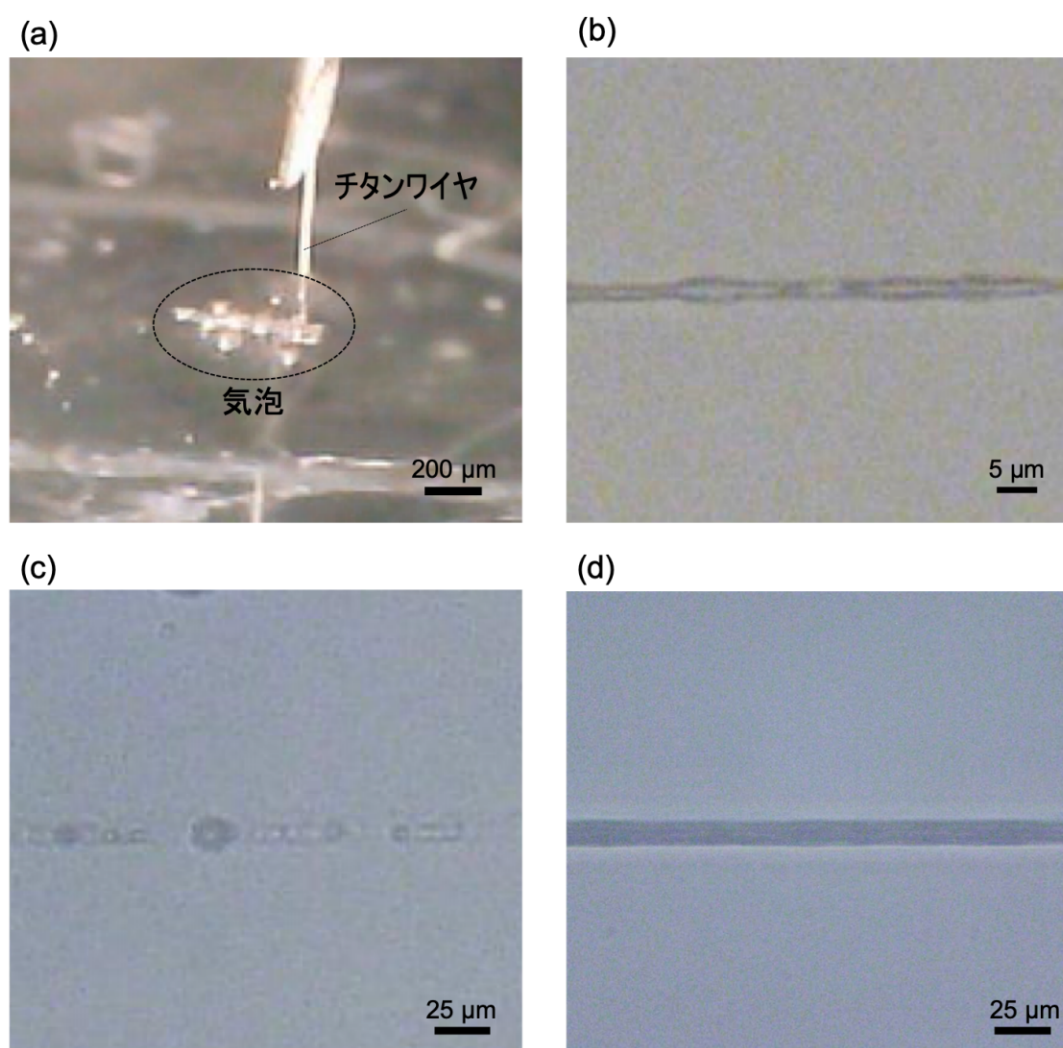


図 4-11 加工油を用いたゼラチンゲルへの放電加工. (a) ゼラチンゲルとチタンワイヤの間に放電が起こったときに現れる気泡. (b) ミシンオイルを用いて放電加工されたゼラチンゲル. 溝の幅は約 2 μm . (c) シリコンオイルを用いて放電加工されたゼラチンゲル. 溝の幅は約 10 μm . (d) チタン線がゼラチンゲル上に触れた状態で加工されたゼラチンゲル. 溝の幅は約 10 μm .

合わせが困難である。そこで、図 4-11(a)に油を使用して放電加工を行った際に気泡が発生するという現象を利用する。気泡が発生する様子を示す。チタン線をゼラチンから数 mm 程度離れた状態にしておき、印加電圧を 0.1 kV に設定してチタン線を少しずつ近づけていくと、ゼラチンが溶け始めた時点で気泡が発生する。電圧とギャップをこの状態に保ち、ステージを動かすことで溝が作製される。印加電圧を 0.1 kV、ステージ速度を 1 cm/s の条件で放電によりゼラチンゲルへ溝加工を行なった。図 4-11(b)に示すように、加工幅が約 3 μm の溝を加工することができた。シリコンなどの材料に対して数マイクロオーダーの溝を作製する際には、フォトリソグラフィなどを用いて加工するのが一般的であるが、この結果から、放電加工技術を利用した加工も可能になるということが示された。また、序章でも述べた、細胞のサイズが 10-30 μm であることも踏まえると、成長足場となるハイドロゲルの精密な加工方法として十分な加工分解能であると言える。シリコンオイルを加工油として放電加工を行なった場合、数 μm オーダーで加工でき、これは過去に報告されたフォトリソグラフィによって作製した PDMS を用いた方法(1 μm ~)と近い精度である。

また、細胞培養に用いられるシリコンオイル(10836, Sigma-Aldrich)を加工油として用いて、マシンオイルと同様に加工を行なった。このシリコンオイルは 20°Cにおける動粘度が 19.8 mm^2/s で、マシンオイルの倍程度の動粘度となっている。図 4-11(c)にシリコンオイルを使用して加工した溝の画像を示す。溝の加工幅は約 10 μm の細いものとなっているが、溝に気泡が入り込んでしまい、観察がしづらくなった。油を使用した溝作製では、図 4-11(a)で示した通り、加工時に気泡が発生する。粘性の低い油を使用した場合には気泡が発生するとすぐに油の表面まで浮上するが、粘性が高い場合、気泡の動きが鈍くなり、ゼラチンの表面に付着したまま浮上しなくなるため、図 4-11(d)のように、溝に気泡が入り込んだ状態となったと考えられる。

加工油を用いた実験では、ゼラチンゲルの表面がわかりづらく、ハイスピードカメラを使用してギャップの 0 点合わせをすることが困難であるため、図 4-11(a)のように気泡の発生によって最適なギャップに調整しなければならない。しかし、設定電圧は 0.1 kV としているため、ギャップは非常に小さくする必要があり、チタン線がゼラチンゲルに接触する場合がある。この状態で加工を行うと、図 4-11(d)に示したように加工幅は約 10 μm となった。加工条件は図 4-11(b)に示した加工幅 2 μm の溝を作製した際と同様であるが、チタン線が接触していたことにより、加工幅は約 5 倍となった。

本研究では、水に溶けやすいゼラチンゲルを用いたため、加工油を用いたが、水に溶けないアルギン酸ゲルやコラーゲンゲルなどは代わりに水を用いることが可能である。

水を用いることで、膨張することが考えられるが、食用のグミに対して放電加工を行なった研究では、水によって膨張させた後に加工を行い、後に水分を蒸発させ収縮させることで微細な加工を実現している^[4-24]。このことから、加工油の代わりに水を用いて、ハイドロゲルを膨張、収縮させることで、本研究によって達成した幅 10 μm のより高い分解能で加工が実現できると考えられる。

4・4 結言

本章では、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、加工特性を調査した。ハイドロゲルの溝加工には PDMS 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、加工の度、型を作製する必要で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 の加工分解能で加工することができた。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。

ハイドロゲルは、熱による乾燥や浸透圧によって構造が変化することが考えられ、放電を用いたマイクロ加工の方法論を確立するためには、これらを踏まえた加工特性の把握が必要になる。将来的にはハイドロゲルの特性を十分に把握した加工の方法論を確立する必要がある。これが実現されることで、金属材料で実現できている加工精度と同様に、ハイドロゲルに対しても放電加工が実現できると考えている。

第5章 結論

本論文では、人工生体組織の構築を目指したハイドロゲルの加工技術として、3つの手法の開発を行った。それぞれ、ディスペンシング法によるサポートハイドロゲルの加工方法の開発、静電インクジェット法によるハイドロゲルの加工方法の開発、放電加工を応用したハイドロゲルの加工法の開発である。

第2章では、血管構造を有する立体組織を構築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で作製する立体組織への血管構造を構築することを目指した。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、 $\phi 20 \mu\text{m}$ 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、 $\phi 100\sim 500 \mu\text{m}$ の管腔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管腔構造の作製を行った。

まず、ジェランガムゲルを用いて、サポートハイドロゲルの作製を行った。ファイバー状のジェランガムゲルをプリントし、これを細胞シート間に積層することで、積層された細胞シート間でサポート材として、はたらいていることを確認した。しかし、ジェランガムゲルは、細胞接着性がないため、細胞シート間への積層が手技に依存することが課題であった。

次に、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、血管内皮細胞が作製した血管様構造から血管新生が起り、毛細血管網が構築されていることを確認した。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。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。これにより立体組織内部に培養液を灌流しながら培養可能で

あることを示している。以上より、本研究で開発したサポートハイドロゲルの加工方法が、複雑な血管構造を有する人工生体組織の構築に応用できることを示した。課題として、本研究で作製した管腔構造は血管内皮細胞や平滑筋細胞が含まれておらず、実際の血管構造とは異なる。また、管腔構造への灌流培養においても長期では検証しておらず、長期培養における人工生体組織への影響を調査する必要があると考えている。

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。高い粘性の液体を高い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長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ことが明らかになった。いっぽうで、溶液中にプリントすることで、ユニークな形状を持ったハイドロゲルが形成されることから、高精度ではないが、特異的な形状を構築する際には、応用可能であると考えられる。

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、分解能を制御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を把握した。

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。

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。課題として、インク材料やゲ

ル化方法によってプリント分解能が異なり、様々な材料に対応するためには、静電インクジェット機構を改良する必要があると考えている。

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PDMS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、工程が多くな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、これを解決すると考えた。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。

本研究では、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。課題として、加工されたハイドロゲルの変質、マイクロワイヤにハイドロゲルの付着、加工油を用いた場合に加工油がハイドロゲルに残存する可能性が考えられる。

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加工技術の開発を行った。それぞれの加工方法の仕様と課題点を表5-1に示す。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。本研究の展望として、本技術を用いて、これまで再現が困難であった生体内の組織にある複雑な細胞、成長足場の配置や血管構造を実現し、高い機能を有する人工生体組織開発への応用されることが期待される。

表 5-1 各加工方法の仕様と課題点

	仕様	課題点
<p>第2章 細胞シートとディスペンシング法による血管構造を有する人工生体組織の開発</p>	<p>細胞シートで作製された立体組織内に Φ200~1000 μmの血管構造 を作製</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・血管内皮細胞を含んだ管腔構造の作製が未達成 ・管腔構造を用いた長期の灌流培養の効果検証
<p>第3章 静電インクジェット法を用いた高精度なハイドロゲルの加工技術の開発</p>	<p>平衡塩溶液中: 直径450 μm~のジェランガムゲル</p> <p>温度制御されたステンレス板上: 幅100 μm~のゼラチンファイバー</p> <p>ゼラチンゲル上: 幅70 μm~のアルギン酸ゲルファイバー</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・インク材料によってゲル化方法が異なるため、インク毎にプリント分解能が異なる
<p>第4章 放電加工を応用したハイドロゲルの加工技術の開発</p>	<p>加工油なし: 幅10 μm~の溝</p> <p>加工油あり: 幅 3 μm~の溝</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・加工されたハイドロゲルが変質する可能性 ・マイクロワイヤの欠片がハイドロゲルに残る可能性 ・加工油がハイドロゲルに残る可能性

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教員である梅津信二郎教授から長きにわたり懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました。心より深く感謝致します。

また大変ご多忙の中、早稲田大学総合機械工学科の宮下朋之教授、岩崎清隆教授、生命理工学専攻の坂口勝久准教授には、本論文をご審査頂き、有益なご指導、ご助言を賜りました。心より深く感謝致します。

東京女子医科大学先端生命医科学研究所の清水達也教授には、TWInsでの研究施設利用に関してご協力頂き、またバイオ分野の実験を進めるにあたり、貴重なご助言を賜りました。心より深く感謝致します。

また、共に過ごした梅津信二郎研究室の先輩、同期、後輩の皆様とは互いに励まし合い、研究を通して非常に有意義な時間を過ごすことができました。心より深く感謝致します。

最後に、学業に専念できる環境を整え、暖かく見守ってくれた両親に心から感謝致します。

田中 龍一郎

参考文献

第1章 序論

- [1-1] 岡野光夫, 大和雅之. “再生医療技術の最前線”. CMC, 2007.
- [1-2] 経済産業省, “再生医療の実用化・産業化に関する研究会. 最終報告書”, <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002v591-att/2r9852000002v5dn>. Pdf, 2020-09-28.
- [1-3] 厚生労働省, “医療費の動向調査”, https://www.mhlw.go.jp/bunya/iryohoken/database/zenpan/iryou_doukou.html, 2020-09-28.
- [1-4] Lavan, David A., Terry McGuire, and Robert Langer. "Small-scale systems for in vivo drug delivery." *Nature biotechnology* 21.10 (2003): 1184-1191.
- [1-5] Taylor, Doris A., et al. "Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation." *Nature medicine* 4.8 (1998): 929-933.
- [1-6] 独立行政法人医薬品医療機器総合機構, “再生医療等製品”, <https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/ctp/0001.html>, 2020-09-28.
- [1-7] 佐賀大学, “バイオ 3D プリンタで作製した「細胞製人工血管」を移植する再生医療の臨床研究を開始”, <http://www.saga-u.ac.jp/koho/press/2019111218102>, 2020-09-28.
- [1-8] Langer, Robert, and Joseph P. Vacanti. "Tissue engineering." *Science (New York, NY)* 260.5110 (1993): 920-926.
- [1-9] 松田武久. “組織工学におけるロボット成型加工技術.” *生体医工学* 46.4 (2008): 400-406.
- [1-10] Murphy, Sean V., and Anthony Atala. "3D bioprinting of tissues and organs." *Nature biotechnology* 32.8 (2014): 773.
- [1-11] Kang, Hyun-Wook, et al. "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity." *Nature biotechnology* 34.3 (2016): 312.
- [1-12] Rezaei Nejad, Hojatollah, et al. "Laterally confined microfluidic patterning of cells for engineering spatially defined vascularization." *Small* 12.37 (2016): 5132-5139.
- [1-13] Balaban, Nathalie Q., et al. "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." *Nature cell biology* 3.5 (2001): 466-472.
- [1-14] Tang, Xin, M. Yakut Ali, and M. Taher A. Saif. "A novel technique for micro-patterning proteins and cells on polyacrylamide gels." *Soft matter* 8.27 (2012): 7197-7206.
- [1-15] Yesildag, Cigdem, et al. "Micro-patterning of PEG-based hydrogels with gold nanoparticles using a reactive micro-contact-printing approach." *Frontiers in Chemistry* 6 (2019): 667.

- [1-16] Singh, Manjulata, et al. "Production of uniform 3D microtumors in hydrogel microwell arrays for measurement of viability, morphology, and signaling pathway activation." *Assay and drug development technologies* 13.9 (2015): 570-583.
- [1-17] Ding, Jianxun, et al. "Electrospun polymer biomaterials." *Progress in Polymer Science* 90 (2019): 1-34.
- [1-18] Tillman, Bryan W., et al. "The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction." *Biomaterials* 30.4 (2009): 583-588.
- [1-19] Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties." *Tissue Engineering Part A* 15.8 (2009): 2177-2187.
- [1-20] Onoe, Hiroaki, et al. "Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions." *Nature materials* 12.6 (2013): 584-590.
- [1-21] Sousa, Ana Rita, et al. "One-Step Rapid Fabrication of Cell-Only Living Fibers." *Advanced Materials* 32.2 (2020): 1906305.
- [1-22] Shima, Ai, Akane Itou, and Shoji Takeuchi. "Cell fibers promote proliferation of co-cultured cells on a dish." *Scientific Reports* 10.1 (2020): 1-7.
- [1-23] Singh, Manjulata, et al. "Production of uniform 3D microtumors in hydrogel microwell arrays for measurement of viability, morphology, and signaling pathway activation." *Assay and drug development technologies* 13.9 (2015): 570-583.
- [1-24] Levato, Riccardo, et al. "From shape to function: the next step in bioprinting." *Advanced Materials* 32.12 (2020): 1906423.
- [1-25] Datta, Pallab, Bugra Ayan, and Ibrahim T. Ozbolat. "Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication." *Acta biomaterialia* 51 (2017): 1-20.
- [1-26] Heinrich, Marcel Alexander, et al. "3D bioprinting: from benches to translational applications." *Small* 15.23 (2019): 1805510.
- [1-27] Nishiyama, Yuichi, et al. "Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology." *Journal of biomechanical engineering* 131.3 (2009): 035001.
- [1-28] Groll, Juergen, et al. "A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks." *Biofabrication* 11.1 (2018): 013001.
- [1-29] Gao, Guifang, et al. "Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA." *Biotechnology letters* 37.11 (2015): 2349-2355.

- [1-30] Chang, Carlos C., et al. "Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 98.1 (2011): 160-170.
- [1-31] Bertassoni, Luiz E., et al. "Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs." *Lab on a Chip* 14.13 (2014): 2202-2211.
- [1-32] Zein, Iwan, et al. "Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications." *Biomaterials* 23.4 (2002): 1169-1185.
- [1-33] Ozbolat, Ibrahim T., and Monika Hospodiuk. "Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting." *Biomaterials* 76 (2016): 321-343.
- [1-34] Zhang, Yu Shrike, et al. "Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip." *Biomaterials* 110 (2016): 45-59.
- [1-35] Zhu, Wei, et al. "Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture." *Biomaterials* 124 (2017): 106-115.
- [1-36] Nichol, Jason W., et al. "Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels." *Biomaterials* 31.21 (2010): 5536-5544.
- [1-37] Ali, Muhammad, et al. "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution." *Biofabrication* 6.4 (2014): 045001.
- [1-38] Guillemot, Fabien, et al. "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering." *Acta biomaterialia* 6.7 (2010): 2494-2500.
- [1-39] Guillemot, Fabien, et al. "Laser-assisted bioprinting to deal with tissue complexity in regenerative medicine." *MRS Bulletin-Materials Research Society* 36.12 (2011): 1015.
- [1-40] Umezumi, Shinjiro. "Precision printing of gelatin utilizing electrostatic inkjet." *Japanese journal of applied physics* 53.5S3 (2014): 05HC01.
- [1-41] Kim, Minseong, Hui-suk Yun, and Geun Hyung Kim. "Electric-field assisted 3D-fibrous bioceramic-based scaffolds for bone tissue regeneration: Fabrication, characterization, and in vitro cellular activities." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-13.
- [1-42] Phung, Thanh Huy, Seora Kim, and Kye-Si Kwon. "A high speed electrohydrodynamic (EHD) jet printing method for line printing." *Journal of Micromechanics and Microengineering* 27.9 (2017): 095003.
- [1-43] Rouwkema, Jeroen, Nicolas C. Rivron, and Clemens A. van Blitterswijk. "Vascularization in tissue engineering." *Trends in biotechnology* 26.8 (2008): 434-441.
- [1-44] Ip, Blanche C., et al. "Perfused Organ Cell-Dense Macrotissues Assembled from Prefabricated Living Microtissues." *Advanced Biosystems* 2.8 (2018): 1800076.

- [1-45] Skylar-Scott, Mark A., et al. "Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels." *Science advances* 5.9 (2019): eaaw2459.
- [1-46] DiBitonto, Daryl D., et al. "Theoretical models of the electrical discharge machining process. I. A simple cathode erosion model." *Journal of applied physics* 66.9 (1989): 4095-4103.

第2章 細胞シートとディスペンシング法による血管構造を有する人工生体組織の開発

- [2-1] Miri, Amir K., et al. "Multiscale bioprinting of vascularized models." *Biomaterials* 198 (2019): 204-216.
- [2-2] Miller, Jordan S., et al. "Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues." *Nature materials* 11.9 (2012): 768.
- [2-3] Song, Kwang Hoon, et al. "Complex 3D-printed microchannels within cell-degradable hydrogels." *Advanced Functional Materials* 28.31 (2018): 1801331.
- [2-4] Ouyang, Liliang, et al. "Void-Free 3D Bioprinting for In Situ Endothelialization and Microfluidic Perfusion." *Advanced Functional Materials* 30.1 (2020): 1908349.
- [2-5] Kolesky, David B., et al. "Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.12 (2016): 3179-3184.
- [2-6] Duchamp, Margaux, et al. "Sacrificial bioprinting of a mammary ductal carcinoma model." *Biotechnology Journal* 14.10 (2019): 1700703.
- [2-7] Cheng, Feng, et al. "Generation of cost-effective paper-based tissue models through matrix-assisted sacrificial 3D printing." *Nano letters* 19.6 (2019): 3603-3611.
- [2-8] Bertassoni, Luiz E., et al. "Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs." *Lab on a Chip* 14.13 (2014): 2202-2211.
- [2-9] Bhatia, Sangeeta N., et al. "Cell and tissue engineering for liver disease." *Science translational medicine* 6.245 (2014): 245sr2-245sr2.
- [2-10] Niklason, Laura E., and Robert S. Langer. "Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues." *Transplant immunology* 5.4 (1997): 303-306.
- [2-11] Asakawa, Nahoko, et al. "Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering." *Biomaterials* 31.14 (2010): 3903-3909.
- [2-12] Shimizu, Tatsuya, et al. "Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues." *The FASEB journal* 20.6 (2006): 708-710.
- [2-13] Sasagawa, Tadashi, et al. "Expression profiles of angiogenesis-related proteins in prevascular three-dimensional tissues using cell-sheet engineering." *Biomaterials* 35.1 (2014): 206-213.

- [2-14] Yamada, Noriko, et al. "Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells." *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 11.11 (1990): 571-576.
- [2-15] Haraguchi, Yuji, et al. "Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro." *Nature protocols* 7.5 (2012): 850.
- [2-16] Sekine, Hidekazu, et al. "In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels." *Nature communications* 4 (2013): 1399.
- [2-17] Sakaguchi, Katsuhisa, et al. "In vitro engineering of vascularized tissue surrogates." *Scientific reports* 3 (2013): 1316.
- [2-18] Matsusaki, Michiya, et al. "Fabrication of Perfusable Pseudo Blood Vessels by Controlling Sol-Gel Transition of Gellan Gum Templates." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5.11 (2019): 5637-5643.
- [2-19] Haraguchi, Yuji, et al. "Rapid fabrication of detachable three-dimensional tissues by layering of cell sheets with heating centrifuge." *Biotechnology progress* 34.3 (2018): 692-701.
- [2-20] Mulvany, M. J., and C. Aalkjaer. "Structure and function of small arteries." *Physiological reviews* 70.4 (1990): 921-961.
- [2-21] Zhao, Feng, et al. "Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: Experiments and mathematical model." *Biotechnology progress* 21.4 (2005): 1269-1280.
- [2-22] Ip, Blanche C., et al. "Perfused Organ Cell-Dense Macrotissues Assembled from Prefabricated Living Microtissues." *Advanced Biosystems* 2.8 (2018): 1800076.
- [2-23] Iwasaki, Kiyotaka, et al. "Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor." *Circulation* 118.14_suppl_1 (2008): S52-S57.

第3章 静電インクジェットによる高精度なハイドロゲルの加工技術の開発

- [3-1] Yogi, Osamu, et al. "On-demand droplet spotter for preparing pico-to femtoliter droplets on surfaces." *Analytical chemistry* 73.8 (2001): 1896-1902.
- [3-2] Yogi, Osamu, Tomonori Kawakami, and Akira Mizuno. "On-demand mixing droplet spotter for preparing picoliter droplets on surfaces." *Analytical chemistry* 76.11 (2004): 2991-2996.
- [3-3] Yogi, Osamu, Tomonori Kawakami, and Akira Mizuno. "Properties of droplet formation made by cone jet using a novel capillary with an external electrode." *Journal of Electrostatics* 64.7-9 (2006): 634-638.

- [3-4] Umezu, Shinjiro, et al. "Fundamental characteristics of printed cell structures utilizing electrostatic inkjet phenomena." *Sensors and Actuators A: Physical* 166.2 (2011): 251-255.
- [3-5] Umezu, Shinjiro, Tatsuru Hatta, and Hitoshi Ohmori. "Fundamental characteristics of bioprint on calcium alginate gel." *Japanese Journal of Applied Physics* 52.5S1 (2013): 05DB20.
- [3-6] Grasdalen, Hans, and Olav Smidsrød. "Gelation of gellan gum." *Carbohydrate polymers* 7.5 (1987): 371-393.
- [3-7] Ferris, Cameron J., et al. "Bio-ink for on-demand printing of living cells." *Biomaterials Science* 1.2 (2013): 224-230.
- [3-8] Oliveira, João T., et al. "Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* Vol. 93, No. 3 (2010) pp. 852-863.
- [3-9] da Silva, L. P., Cerqueira, M. T., Sousa, R. A., Reis, R. L., Correlo, V. M., & Marques, A. P. (2014). Engineering cell-adhesive gellan gum spongy-like hydrogels for regenerative medicine purposes. *Acta biomaterialia*, 10(11), 4787-4797.
- [3-10] Manda, Marianthi G., et al. "Gellan gum-hydroxyapatite composite spongy-like hydrogels for bone tissue engineering." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106.2 (2018): 479-490.
- [3-11] Oliveira, João T., et al. "Injectable gellan gum hydrogels with autologous cells for the treatment of rabbit articular cartilage defects." *Journal of Orthopaedic Research* 28.9 (2010): 1193-1199.
- [3-12] Manda, Marianthi G., et al. "Gellan gum-hydroxyapatite composite spongy-like hydrogels for bone tissue engineering." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106.2 (2018): 479-490.
- [3-13] Lozano, Rodrigo, et al. "3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates." *Biomaterials* 67 (2015): 264-273.
- [3-14] Tijore, Ajay, et al. "Contact guidance for cardiac tissue engineering using 3D bioprinted gelatin patterned hydrogel." *Biofabrication* 10.2 (2018): 025003.
- [3-15] Liu, Wanjun, et al. "Extrusion bioprinting of shear-thinning gelatin methacryloyl bioinks." *Advanced healthcare materials* 6.12 (2017): 1601451.
- [3-16] Luo, Yongxiang, et al. "Concentrated gelatin/alginate composites for fabrication of predesigned scaffolds with a favorable cell response by 3D plotting." *RSC Advances* 5.54 (2015): 43480-43488.
- [3-17] Bigi, Aea, et al. "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking." *Biomaterials* 22.8 (2001): 763-768.

- [3-18] Pahapale, Gayatri J., et al. "Hierarchically Curved Gelatin for 3D Biomimetic Cell Culture." *ACS Applied Bio Materials* 2.12 (2019): 6004-6011.
- [3-19] Gauvin, Robert, et al. "Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography." *Biomaterials* 33.15 (2012): 3824-3834.
- [3-20] Rowley, Jon A., Gerard Madlambayan, and David J. Mooney. "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials." *Biomaterials* 20.1 (1999): 45-53.
- [3-21] Bidarra, Sílvia J., et al. "Injectable in situ crosslinkable RGD-modified alginate matrix for endothelial cells delivery." *Biomaterials* 32.31 (2011): 7897-7904.
- [3-22] Markstedt, Kajsa, et al. "3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications." *Biomacromolecules* 16.5 (2015): 1489-1496.
- [3-23] Tan, Yu, et al. "3D printing facilitated scaffold-free tissue unit fabrication." *Biofabrication* 6.2 (2014): 024111.
- [3-24] Schütz, Kathleen, et al. "Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions." *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 11.5 (2017): 1574-1587.
- [3-25] Mampallil, Dileep, and Huseyin Burak Eral. "A review on suppression and utilization of the coffee-ring effect." *Advances in colloid and interface science* 252 (2018): 38-54.

第4章 放電加工を応用したハイドロゲルの加工技術の開発

- [4-1] Fukuda, Junji, et al. "Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures." *Biomaterials* 27.30 (2006): 5259-5267.
- [4-2] Paguirigan, A., and D. J. Beebe. "Gelatin based microfluidic devices for cell culture." *Lab on a Chip* 6.3 (2006): 407-413.
- [4-3] Paguirigan, Amy L., and David J. Beebe. "Protocol for the fabrication of enzymatically crosslinked gelatin microchannels for microfluidic cell culture." *Nature protocols* 2.7 (2007): 1782-1788.
- [4-4] Gingras, Jacinthe, et al. "Controlling the orientation and synaptic differentiation of myotubes with micropatterned substrates." *Biophysical journal* 97.10 (2009): 2771-2779.
- [4-5] Altomare, Lina, et al. "Biodegradable microgrooved polymeric surfaces obtained by photolithography for skeletal muscle cell orientation and myotube development." *Acta Biomaterialia* 6.6 (2010): 1948-1957.
- [4-6] Xu, Bin, et al. "Nanotopography-responsive myotube alignment and orientation as a sensitive phenotypic biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy." *Biomaterials* 183 (2018): 54-66.

- [4-7] Masuzawa, T., et al. "Wire electro-discharge grinding for micro-machining." *CIRP Annals* 34.1 (1985): 431-434.
- [4-8] Suzuki, K., T. Uematsu, and T. Nakagawa. "On-machine trueing/dressing of metal bond grinding wheels by electro-discharge machining." *CIRP Annals* 36.1 (1987): 115-118.
- [4-9] Klink, A. "Wire electro discharge trueing and dressing of fine grinding wheels." *CIRP annals* 59.1 (2010): 235-238.
- [4-10] Li, Yong, et al. "Micro electro discharge machine with an inchworm type of micro feed mechanism." *Precision engineering* 26.1 (2002): 7-14.
- [4-11] Wang, A. Cheng, et al. "Use of micro ultrasonic vibration lapping to enhance the precision of microholes drilled by micro electro-discharge machining." *International Journal of Machine Tools and Manufacture* 42.8 (2002): 915-923.
- [4-12] Kawamoto, Tadafumi, and Masaharu Shimizu. "A method for preparing 2- to 50- μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues." *Histochemistry and cell biology* 113.5 (2000): 331-339.
- [4-13] Sun, Baoce, et al. "Preferred cell alignment along concave microgrooves." *RSC advances* 7.11 (2017): 6788-6794.
- [4-14] Yang, Lung-Jieh, and Yu-Cheng Ou. "The micro patterning of glutaraldehyde (GA)-crosslinked gelatin and its application to cell-culture." *Lab on a Chip* 5.9 (2005): 979-984.
- [4-15] Kemkemer, Ralf, et al. "Cell orientation by a microgrooved substrate can be predicted by automatic control theory." *Biophysical journal* 90.12 (2006): 4701-4711.
- [4-16] Matsuzaka, K., et al. "The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblast-like cells in vitro." *Biomaterials* 20.14 (1999): 1293-1301.
- [4-17] Li, Ching-Wen, et al. "Optimization of micropatterned poly (lactic-co-glycolic acid) films for enhancing dorsal root ganglion cell orientation and extension." *Neural regeneration research* 13.1 (2018): 105.
- [4-18] Shaw, Gauri S., et al. "Development and characterization of gelatin-tamarind gum/carboxymethyl tamarind gum based phase-separated hydrogels: A comparative study." *Designed Monomers and Polymers* 18.5 (2015): 434-450.
- [4-19] 梅津信二郎, 曾我部広, and 川本広行. "针对平板電極系放電場における火花放電時に働く力について." *日本機械学会論文集 C 編* 70.692 (2004): 1149-1154.
- [4-20] Park, Hyo Seung, et al. "Biological evaluation of micro-patterned hyaluronic acid hydrogel for bone tissue engineering." *Pure and Applied Chemistry* 86.12 (2014): 1911-1922.

- [4-21] Chandra, Dinesh, J. Ashley Taylor, and Shu Yang. "Replica molding of high-aspect-ratio (sub-) micron hydrogel pillar arrays and their stability in air and solvents." *Soft Matter* 4.5 (2008): 979-984.
- [4-22] Tamura, Takayuki, et al. "Groove fabrication on surface of soft gelatin gel utilizing micro-electrical discharge machining (Micro-EDM)." *Journal of Food Engineering* 277 (2020): 109919.
- [4-23] Karlsson, Hanna L., et al. "Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano-and micrometer size." *Toxicology letters* 188.2 (2009): 112-118.

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)
論文 (査読有り)	<ol style="list-style-type: none"> 1. ○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. 2. 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. 3. ○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. 4. 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"> 1. 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. 2. 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. 3. 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. 4. 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. 5. 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. 6. 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. 7. 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ガムゲルの加工特性", 日本機械学会 第26回茨城講演会, 茨城県, 2018年8月.

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>

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 1 1 8 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>