

ヒトの組織を3次元印刷

*¹富山大学大学院理工学研究部(工学), *²ポエック株式会社

中村 真人*¹, 荒井 健一*^{1,2}

Makoto NAKAMURA, Kenichi ARAI



1. はじめに

科学の進歩に伴い、いろいろな動物の細胞を培養することができるようになると、ヒトの細胞を培養して生体組織を作って病気の治療に活かそうと研究が始まった。皮膚への応用から始まったこの研究は、いろいろな組織や臓器に広まった。Tissue Engineering(組織工学・再生医学)の始まりである。1993年Langerらは、「Tissue Engineeringとは、失われた組織や臓器機能を修復、置換、増進するための臓器代替物の開発を目指した学際的な学問分野である」と定義して、この概念を確立した¹⁾。これ以来、Tissue Engineeringの研究は、世界中に広がった。現在、日本の臨床でも培養皮膚、培養軟骨が活躍を始めた。研究対象は、移植に必要な臓器に進んだ。しかし、重要臓器では、従来の手法では歯が立たない。その障壁をブレイクする技術が切望されている。

そんな背景のもと、生体組織を3次元印刷する試みが始まった。生体組織の3次元印刷は、今日、バイオプリンティング(Bioprinting)、バイオファブリケーション(Biofabrication)と呼ばれるようになったが、従来手法の問題点と限界を克服するチャレンジなのである。本稿では、そのコンセプトと取り組みについて紹介する。

2. 従来のTissue Engineering手法と重要臓器での問題点と限界

従来のTissue Engineering手法を簡単に復習する。細胞、足場材料(スキャフォールド)、増殖因子の3つを3要素と

し、以下のように組織構築が行われる。

体内で分解される生分解性材料で3次元のスキャフォールドを作る→そのスキャフォールドに細胞を播き(細胞播種)、細胞を刺激する増殖因子を加えて培養する→細胞がしっかり接着した後、体内に埋め込む→移植された細胞が体内でも増殖し組織を形成する→周囲組織から毛細血管を引き込む→スキャフォールドは徐々に分解・吸収される→最終的に細胞だけからの組織が残って組織として働く。

このスキャフォールドを用いた手法は、今なお、Tissue Engineeringの基本となっている。しかし、対象が重要臓器となった時、この手法では困難で、未だ実現できていない。なぜ、難しいのか、重要臓器の特徴から考えてみる。

心臓、肝臓、腎臓、肺など、移植に必要な重要臓器は、生理学的に重要な機能を担っている。各臓器に特殊な構造があり、特殊な臓器の機能を果たしている。たとえば、腎臓にはネフロン構造がある。糖尿病などでこの構造がつぶされると尿は作れなくなり腎不全となる。このような特殊構造こそ、重要臓器の生理学的、組織学的な本質である。また、重要臓器はどれも生理学的な活動性は高く、多くの酸素を消費する。さらに、全身を維持する生理機能を十分果たすには、数多くの細胞が必要である。それらすべての細胞に酸素と栄養を十分に送り老廃物や生産物を運搬するには、十分に発達した血管、胆管、尿管などの脈管機構が要る。このような複雑な構造が内部までぎっしり詰まった大きな3次元の複合構造体が重要臓器の特徴で、Tissue Engineeringの次のターゲットなのである。

従来の手法では有形のスキャフォールドに後から細胞を播種する。しかし、スキャフォールドの表面にしか細胞は播種できない。ミクロの臓器特有の特殊な構造を作らねばならないのに、バラバラに播くので、細胞の分布・多種細胞での構成、ミクロの構造は全く制御することができない。

■ 著者連絡先

富山大学大学院理工学研究部(工学)
(〒930-8555 富山県富山市五福3190)
E-mail. maknaka@eng.u-toyama.ac.jp

表1 3次元組織構築における3次元印刷技術の特徴と利点

作りたい組織	印刷技術の特徴	細胞・生体材料の実装における利点
1) 高度な構造を持つ組織	高精細印刷	高精細での配置操作
2) 多種細胞・多種材料の複合組織	カラー印刷	多種細胞・多種材料の配置操作
3) 3次元組織・3次元複合組織	3次元積層印刷	3次元での配置操作 Additive Manufacturingの利点
4) 高速な組織構築	高速印刷	高速な配置操作・大量の細胞操作
5) マルチスケール組織	大判印刷	高速な配置操作・大量の細胞操作
6) コンピュータ制御・生産	デジタル印刷	配置操作のコンピュータ制御

細胞の増殖や分化、遊走、組織形成を制御する増殖因子も培養液全体に混合するしかできず、濃度勾配も作れない。重要な毛細血管を構造内部深くに迅速誘導する方法もない。毛細血管が形成されなければ内部の細胞は生きられないので、それが作れる大きさの限界になる。さらに、バラバラに播いた細胞がいかに接着して増殖し、いかに組織を形成するかという組織形成については、すべて運と細胞に任せることになる。また、体内に埋め込めば最適な培養環境と思われがちだが、そう簡単ではない。体内では埋め込んだ周辺には種々の液性因子が溢れており、増殖盛んな線維芽細胞や炎症細胞との生存競争が始まる。結局、線維性組織、瘢痕組織にしかならないのも深刻な問題である。体内埋め込み後の組織形成もやはりすべて細胞任せ、生体任せで、組織が育ってくれるよう祈るしかない。祈ってできるならいくらかでも祈ればいいが、どんなに手を合わせて祈っても、重要臓器の要である臓器特有の特殊構造はそう簡単には作れない。

このような問題点があり、重要組織や臓器を人工的に作るのは今なお、難題である。

3. 生体組織の3次元印刷

細胞シート、スキャフォールド法、体内埋め込みで作れる組織はそれで作ればよい。しかし、それらの手法では作ることのできない重要臓器を作るには、従来と同じ手法を繰り返しては何も変わらない。そこから生まれたのが、生体組織の3次元印刷の発想である。

印刷技術は、そもそも、インクをあるべき場所に配置する技術である。文書、画像、写真印刷など2次元でのインク配置を行いながら、高精細印刷、カラー印刷、写真印刷、さらに、高速印刷、大判印刷を実現している。電子回路や液晶ディスプレイなど、材料を実装する生産技術としても印刷技術が応用されている。

そこで、この高品質の印刷技術で、生きた細胞や生体組織の材料を配置し、そして1層ごと積層して3次元化できれば、3次元組織の内部までデザインして作りこめる革新的な作り方が可能になる。この発想から生体組織の3次元印刷の研究が始まった。表1に作るべき組織の特徴に対する3次元印刷技術の特徴と利点をあげる。

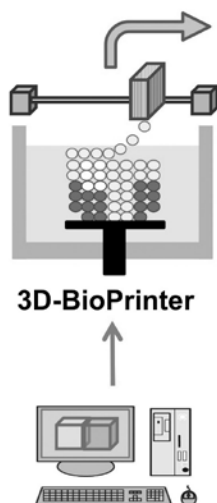
これまで研究者や技師の手作業で播いていた細胞播種の工程は、印刷技術を利用することで、とんでもなく高度な細胞播種が可能になる。印刷技術がすでに実現しているインク材料配置技術の多くのノウハウが活かされる。また、3次元積層印刷のコンセプトは、1層1層断面画像を積層してボトムアップ的に作り上げる作り方である。

これまで、3次元立体物の製作には、形状をかたどった鋳型や金型を用いて鋳造する方法(Molding)、圧印する方法(Imprinting)、または切削加工で削り出して造る方法(Subtraction)が主であった。これらの方法では、外形は成形できるものの内部構造は作れない。

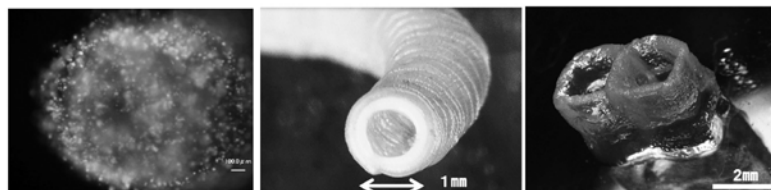
ところが、3次元積層の作り方は、Additive Manufacturingとも呼ばれるように、複雑な内部構造まで厳密にデザインして作れる手法である。Tissue Engineeringの3次元スキャフォールドも、外形だけでなく内部構造までデザインして造形できる。また、Tissue Engineeringの従来手法では、内部の細胞構成、内部構造は作れないという問題に対しても、このアプローチであれば、内部の細胞構成までデザインして作ることができる。3次元積層印刷は、内部の構造が重要なものを造るには、きわめて有効な方法となる。

また、生体組織の3次元印刷は、生きた細胞ごと3次元実装するコンセプトである。模型でなく実物を作ることを目的としている。しかし、細胞や生体材料を直接印刷する、しかも3次元積層することは、Tissue Engineeringではもちろん、工学技術、印刷技術としても前例がない。生体組

＜革新の要素＞



1 機械化	ヒトの手から機械の手へ
2 実装	模型から実物へ、生体組織の構成材料を実装
3 高精細化	マクロからマイクロへ、さらに、マルチスケールへ
4 カラー化	単種から多種材料へ、複合構造物の作製
5 3次元化	2次元から3次元へ、積層造形の利点
6 デジタル化	アナログからデジタルへ、コンピュータ技術の活用
7 バイオ化	非生物から生物へ、幹細胞、再生工学の利用
8 ハイブリッド化	非生物と生物のハイブリッド、ハイブリッド人工臓器へ



3次元積層印刷で造形した3次元構築物(細胞・アルギン酸ゲル)

図1 生体組織の3次元印刷と革新の要素

織の3次元印刷は、ここから始まったチャレンジングな試みでもある。

筆者らは、生体組織の3次元印刷の構想から、印刷技術の中でも写真画質のカラー印刷ができるインクジェットに着目し、1層1層印刷しながら積層する3次元積層印刷手法の実現を目指してきた。インクジェットで生きた細胞を吐出できるかどうかを確認し、さらに2液混合でゲル化する材料の利用を試み、生きた細胞を吐出しながら3次元積層印刷を行ってきた^{2)~5)}。このように、前例のないアプローチを目指して取り組んできたが、振り返ると、いくつもの革新のコンセプトが込められている。図1にまとめてみた。

4. 積層印刷の次の工程

筆者らは、重要臓器を作ることを目指して生体組織の3次元印刷の研究開発に取り組んできた。細胞とゲルで3次元積層を実現したものの、それはまだ細胞播種の段階に過ぎない。積層したからと言って臓器や組織ができたわけではない。機能する組織、臓器となるには、細胞が接着し、増殖して組織を形成する過程が必要である。

そこで、次の課題として考えられる事項をあげたい。

①構築した3次元細胞組織を培養維持する技術の開発：培養維持するためには、灌流機構をどうするか？ すなわち酸素や栄養を供給する毛細血管循環系をいかに誘導構築するか？ また、どのように灌流するか？ 血管新生を含めて、それらを解決する技術の開発が必須である。

②組織化を誘導制御する技術の開発：組織形成に関して

は、幹細胞を使ったとしても、今は、すべてが細胞任せである。いかに組織化を誘導するののかの有効な手法はまだわかっていない。細胞の挙動に影響を及ぼす因子には、細胞外マトリクスや増殖因子、さらには他の細胞の存在や酸素やグルコースの濃度勾配なども大きな影響を与えられられるが、それらを制御する技術の開発が必要である。

③スケールアップ技術の開発：細胞数個の組織ができて、ヒトの臓器の代替は賄えない。多数の細胞を擁する大きな組織を作らねばならない。いかにしてスケールアップするかの技術はまだほとんどない。

④多プロセスの連合：高度な組織・臓器であればあるだけ、多くの工程が必要となる。しかも、確実に、迅速に、再現性良く組織・臓器を作らねばならない。したがって、多くのプロセスを順次実行する生産ラインなどの工場生産的な視点で、研究開発を進める必要がある⁶⁾。

以上、筆者がこれまで生体組織の3次元印刷の研究開発に携わってきた経験からの独断と偏見で述べさせていただいた。本稿では、ほとんど項目の列挙にとどめるが、詳しくは、組織工学の次世代技術を記した別著⁶⁾をご覧くださいけると幸いです。

5. 3次元印刷技術の発展と期待

生体組織の3次元印刷技術は今日「バイオプリンティング(Bioprinting)」「バイオフィabrication(Biofabrication)」と呼ばれ、世界的に研究が進められている⁷⁾。2010年に国際Biofabrication学会が立ち上がった。

機関誌の国際ジャーナル Biofabrication は2009年に発刊され、あっという間に Impact Factor 4.302 にアップした。昨今の3Dプリンターブームに乗って、いろいろなタイプの3次元積層装置や細胞プリンティングの技術が出てきている。細胞プリンティングでは、インクジェット^{8),9)}の他には、注射器で細胞のスフェロイド(集塊)を押し出して一筆書きで並べて3次元化するディスペンサー装置^{10)~12)}、パルスレーザーで細胞を転写印刷する技術^{13)~16)}がある。さらに細胞シートを重ねて分厚い組織を3次元積層する装置の開発、さらに最近ではMEMS(Micro Electro Mechanical Systems)の研究者たちが参入し、マイクロ流路やマイクロのモールドで培養する技術、それを組み立てて生体組織をスケールアップする技術など、世界中が様々な工学技術を導入して、先を競うように進み始めている。生体組織の3次元印刷から始まったこの研究が、これからますます熱い研究開発領域になって、バイオ人工臓器作りが加速されることを期待したい。

6. 最後に

いろいろな手法がある中で、日本の印刷技術のレベルは極めて高く、産業用途でも多くの精密部品の生産に精度高い印刷技術が貢献している。生きた細胞、生体材料を用いて、適材適所配置するバイオプリンティングについても、日本に最も技術力のアドバンテージがあると考えられる。今後の進歩に関係しそうな技術を他誌にも寄稿および特集号を監修し紹介させていただいたので、そちらもあわせてご参照いただければ幸いである^{17)~19)}。医療技術の進歩に、日本の高い科学技術が貢献できることを切に願う。

利益相反の開示

荒井 健一はボエック株式会社の社員である。
その他の著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* **260**: 920-6, 1993
- 2) Nishiyama Y, Nakamura M, Henmi C, et al: Fabrication of 3d Cell Supporting Structures With Multi-Materials Using The Bio-Printer. *Proceedings of MSEC2007*, MSEC2007-31064, 2007
- 3) 中村 真人: 中村「バイオプリンティングプロジェクト」研

- 究概要集. (財)神奈川科学技術アカデミー, 2008. 3.4
- 4) 中村 真人, 西山 勇一, 逸見 千寿香, 他: コンピュータ支援バイオプリンティング・バイオファブリケーション. *再生医療* **7**: 105-13, 2008
 - 5) Nakamura M: Reconstruction of biological three-dimensional tissues: bioprinting and biofabrication using inkjet technology. *Cell and Organ Printing*, ed by Ringeisen BR, Spargo BJ, Wu PK, Springer, 2010, 23-33
 - 6) 中村 真人: 再生医療・組織工学: 次世代技術. *再生医療叢書 2. 組織工学*, 岡野 光夫, 大和 雅之編, 朝倉書店, 東京, 2013, 148-77
 - 7) Guillemot F, Mironov V, Nakamura M: Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication* **2**: 010201, 2010.
 - 8) Cui X, Dean D, Ruggeri ZM, et al: Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* **106**: 963-6, 2010
 - 9) Xu T, Binder KW, Albanna MZ, et al: Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* **5**: 015001, 2013
 - 10) Yan Y, Wang X, Pan Y, et al: Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique. *Biomaterials* **26**: 5864-71, 2005
 - 11) Xu M, Wang X, Yan Y, et al: An cell-assembly derived physiological 3D model of the metabolic syndrome, based on adipose-derived stromal cells and a gelatin/alginate/fibrinogen matrix. *Biomaterials* **31**: 3868-77, 2010
 - 12) Duan B, Hockaday LA, Kang KH, et al: 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A* **101**: 1255-64, 2013
 - 13) Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR: Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann Biomed Eng* **33**: 121-30, 2005
 - 14) Guillemot F, Guillotin B, Catros S, et al: High-throughput biological laser printing: droplet ejection mechanism, integration of a dedicated workstation, and bioprinting of cells and biomaterials. *Cell and Organ Printing*, ed by Ringeisen BR, Spargo BJ, Wu PK, Springer, 2010, 95-113
 - 15) Yan J, Huang Y, Chrisey DB: Laser-assisted printing of alginate long tubes and annular constructs. *Biofabrication* **5**: 015002, 2013
 - 16) Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, et al: Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication* **2**: 014104, 2010
 - 17) 中村 真人監修: バイオファブリケーション~機械で臓器を作る~. *バイオインダストリー* 2014年1月号, 2014
 - 18) 中村 真人, 荒井 健一, 戸田 英樹, 他: 細胞プリンティング. *最新医学* **69**(7 Suppl): 1465-77, 2014
 - 19) 中村 真人: 工学技術で臓器不全の治療の道を! : 臓器を作る機械の開発と先端精密工学技術による医療支援への提言. *精密工学誌* **80**: 229-35, 2014