
一般セッション(口頭講演)| インクジェット

[IJ5.2] インクジェット(5-2) 応用/3Dプリンティング/バイオプリンティング

Inkjet (5-2) Applications/3D Printing/Bio Printing

2018年6月21日(木) 10:50 ~ 11:50 コンファレンスルーム (工学系総合研究棟2二階)

[IJ5.2-02] 酵素架橋とインクジェットの融合による3Dバイオプリンティング技術の開発

Development of a Bioprinting Technique by Combining Inkjetting Technology and Enzyme-mediated Hydrogelation

*境 慎司¹、中村 真人² (1. 大阪大学、2. 富山大学)

*Shinji Sakai¹, Makoto Nakamura² (1. Osaka University, 2. University of Toyama)

3Dバイオプリンティングは、再生医療や組織工学分野で、その発展が期待されている。既存のプリンティング方式の中で、より機能的な組織体の構築につながるものとして期待されているのが、インクジェット方式によるものである。一方で、この方式の普及、発展を阻害しているのが、使用可能なインク材料が極めて限られていることである。我々はこれまでに、西洋わさび由来ペルオキシダーゼが触媒する架橋形成反応を利用して、高分子の水溶液からヒドロゲルを作製し利用することについて、様々な報告を行ってきた。本研究では、この酵素反応によるゲル形成を用いた、インクジェットバイオプリンティング技術の開発を行った。

酵素架橋とインクジェットの融合による 3D バイオプリンティング技術の開発

境 慎司*, 中村 真人**

*大阪大学 大学院基礎工学研究科

**富山大学 大学院理工研究部・教育部 (工学)

Development of a Bioprinting Technique by Combining Inkjetting Technology and Enzyme-mediated Hydrogelation

Shinji Sakai*, and Makoto Nakamura**

*Graduate School of Engineering Science.

**Department of Applied Imaging Engineering, Graduate School of Engineering, Imaging University of Japan

An inkjet-based bioprinting approach that enables the use of varieties of bioinks to produce cell-laden hydrogels with a wide range of characteristics is strongly desired. We attempted to develop it by using the hydrogelation system mediated by horseradish peroxidase (HRP) for stabilizing bioinks. Cell-laden constructs could be obtained through the sequential dropping of a bioink containing polymer(s) cross-linkable through the enzymatic reaction and H_2O_2 onto droplets of another bioink containing the polymer, HRP, and cells. The viability of the enclosed cells was more than 95%.

1. はじめに

生体は、直径数十 μm の細胞の集合体であり、さまざまな種類の細胞が、適材適所で配置され機能を発現することにより、恒常性が維持されている。そして、それぞれの細胞の周囲には、その機能発現と密接に関係する細胞外マトリックスが存在している。組織工学は、1つ1つの細胞から生体の組織を模倣構造体の作製を目指すものであり、生体と同様に、細胞周囲に配置される足場材料は、得られる構造体の機能に大きな影響を与える。

この組織工学において近年大きな注目を集めているのが、細胞を含む構造体をデジタルデータにもとづいて作製する 3D バイオプリンティングである。そして、複数存在するプリンティング方式の中で、より機能的な組織体の構築につながるものとして期待されているのが、インクジェット方式である。この方式では、細胞よりもわずかに大きなサイズのインク液滴を、設定した位置に1滴ずつ積み重ねながら造形を行う。したがって、さまざまな種類の細胞を、細胞種毎にその細胞に適した環境を提供する材料とともにカートリッジに充填し、別々のインクジェットノズルから吐出すれば、インク液滴1滴スケールで異なるゲルの特性や細胞を有する構造物を造形することができる。一方で、この方式の普及、発展を阻害しているのが、使用可能なインク材料が極めて限られていることである。具体的には、インク溶

液は、直径数十 μm のノズルから吐出できるよう、低粘度である必要があること、着液したインクは周囲に流れる前に極めて短時間にゲル化する必要があること、またそのゲル化は細胞に悪影響を与えないことなどが必要なためである。しかし、これらを同時に満たすインクは極めて限られており、多くの細胞の増殖や機能化には適していないにも関わらず、 Ca^{2+} などの多価金属イオンとの接触により瞬時にゲル化するアルギン酸 Na を含んだ水溶液が広く用いられてきた。細胞毎に異なる環境を作り出すことのできる、さまざまな材料をインクとして利用できるようになれば、この方式を使った組織構築が大きく進展すると考えられる。

我々はこれまでに、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) が、微量の過酸化水素の存在下にて触媒するフェノール性水酸 (Ph) 基間の架橋形成反応 (Fig. 1) を利用して、細胞を含有するヒドロゲル構造物を作製し、各種用途に利用する検討を行ってきた。この方法の利点は、Ph 基を導入することができれば、異なる性質を有するさまざまな材料からヒドロゲルを作製できる点である。本研究では、この酵素反応によるゲル形成を、インクジェットノズル

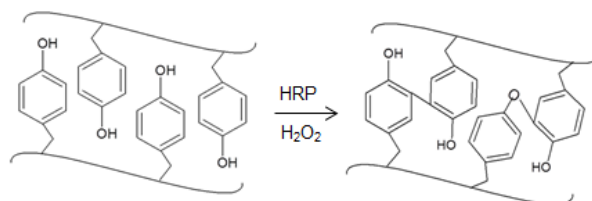


Fig. 1 Crosslinking of Ph moieties through HRP-catalyzed crosslinking.

* 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3

* 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka, 560-8531, Japan

e-mail: sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

から吐出されるインクのゲル化に用い、3D 構造物を造形する技術の開発を行った。

2. 実験方法

Ph 基を導入したアルギン酸 (Alg-Ph) とヒアルロン酸 (HA-Ph) は、それぞれの高分子中のカルボキシ基とチラミンのアミノ基を、水溶性カルボジイミドを用いて縮合させることにより作製した。また、Ph 基を導入したゼラチン (Gelatin-Ph) は、ゼラチンと 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸より同様の方法で作製した。これらの誘導体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4) に溶解させた溶液に、HRP もしくは過酸化水素を溶解させた。細胞を含む構造体は、HRP を含むインクに、マウス胎児由来線維芽細胞株 10T1/2 細胞を分散させたものから作製した。各インクを、直径 60 μm の吐出口を有するインクジェットノズルから 500 Hz にて吐出した。吐出したインクをゲル化・定着させるために、HRP を含むインクが滴下された直後に過酸化水素を含むインクを吐出するようにした (Fig. 2)。細胞への影響を調べるために、細胞を含有する構造物を作製した後、生存率を測定した。また、構造物中での細胞の伸展は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により評価した。

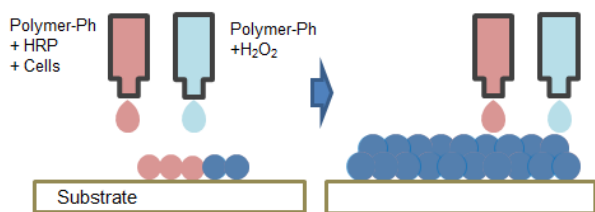


Fig. 2 Schematic of bioprinting of cell-laden hydrogel constructs using bioinks containing HRP + cells, and H_2O_2 .

3. 結果と考察

インクジェット方式のバイオプリンティングにおいて各種高分子を構成成分とするインクを利用するためには、安定して吐出可能な物性を明らかにする必要がある。このため、さまざまな濃度、種類の高分子水溶液を用い、インクジェットノズルからの安定した吐出可能性と、溶液の粘度、界面張力、曳糸性の関係を調べた。その結果にもとづいて調製した 0.75% Alg-Ph と 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP および 0.75% Alg-Ph と 10 mM 過酸化水素を含む 2 種類のインクを用いてプリントを行った。その結果、Fig. 3a のような三角柱の構造体を作製することができた。

動物細胞を含んだ構造体をプリントする場合には、過酸化水素が細胞に悪影響を与えることが危惧される。このため、過酸化水素の濃度はできるだけ少ない方が望ましい。したがって、過酸化水素の濃度と造形性に関する検討、および作製した構造物中に残存する過酸化水素の濃度に関する検討を行った。過

酸化水素を 1 mM とした場合には 10 mM の場合と同様の構造物を作製できたが (Fig. 3b)、0.1 mM に低下させると、設計図と乖離したいびつな形の構造物が形成した (Fig. 3c)。これは、HRP による架橋形成反応に必要な過酸化水素が、十分量なかったためと考えられる。過酸化水素の残留濃度を、試験紙を用いて調べたところ、10 mM の過酸化水素を含むインクを用いた場合には、作製して 10 分後にも測定可能な値を大きく超える 1 mM 以上の過酸化水素が残留していた。一方で、1 mM の過酸化水素を含むインクを用いた場合には、作製して 10 分以内に、過酸化水素濃度は、検出限界 (0.015 mM) 以下になった。

以上の結果にもとづいて、10T1/2 細胞を含むインクを用いて Alg-Ph ゲルの構造体をプリントしたところ、細胞の生存率は約 90%であった。しかし、この構造物中では、数日間の培養後も細胞は伸展することはなかった。一方で、同じ形状の構造体は、Gelatin-Ph と HA-Ph を含む水溶液からも作製でき、このゲル構造体に包括された 10T1/2 細胞は、培養開始から 1 日以内にゲル内部で伸展した。この結果より、本方法の細胞適合性の高いと、適切なインクを選定することで、細胞の挙動を制御できることが明らかになった。

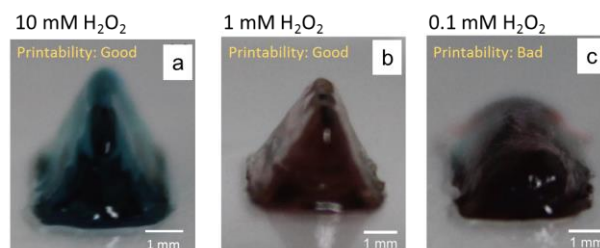


Fig. 3 Bioprinted hydrogel constructs obtained from bioinks difference in H_2O_2 content.²⁾

4. まとめ

本研究では、さまざまな材料をインクとして用いることができるインクジェット方式のバイオプリンティング技術の開発を行った。そして HRP によるゲル形成反応を用い、これを達成することができた。これまでに 20 種類程度の高分子について、同酵素反応よりゲル化させられるようになったことが報告されている。今後は、これらを使った複雑な造形に取り組みたい。

参考文献

- 1) Shinji Sakai and Masaki Nakahata, "Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical, biopharmaceutical, and biofabrication applications", *Chemistry: An Asian Journal*, **12**, pp. 3098-3109(2017).
- 2) Shinji Sakai, Kohei Ueda, Enkhtuul Gantumur, Masahito Taya and Makoto Nakamura, "Drop-on-drop multimaterial 3D bioprinting realized by peroxidase-mediated cross-linking, *Macromolecular Rapid Communications*", **39**, 1700534 (2018).