

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H05504・20K20430

研究課題名(和文) 生分解性シルクタンパク足場材料の創成と3D印刷による細胞培養用プレートへの応用

研究課題名(英文) Development of Biodegradable Silk Protein Scaffolding Material and Application to Cell Culture Plates by 3D Printing

研究代表者

成田 史生(Narita, Fumio)

東北大学・環境科学研究科・教授

研究者番号：10312604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、はじめに、シルクファイバーにセルロースナノファイバーを分散し、引張特性を評価して、特性向上メカニズムについて明らかにした。次に、シルクフィブロインの濃度を変えた PEGDMA/シルクフィブロインハイドロゲルの光造形に成功した。開発されたハイドロゲルは、幅広い圧縮弾性率を示し、筋肉組織、脂肪、骨などの様々な幹細胞の代替となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、工業分野では3D印刷技術が著しく発達し、大きな注目を集めている。本研究では、シルクタンパクの3D印刷を実施し、PEGDMA/シルクフィブロインハイドロゲルの光造形に成功して、ハイドロゲルが生体足場材料として使用できる可能性を示した。今後発展が予想されるヒトの組織を造形する3Dバイオプリンティング技術において、本研究から得られる基礎的知見は極めて有用である。

研究成果の概要(英文)：First, this study showed that the enhanced mechanical properties of the cellulose nanofiber (CNF)/silk fibers are attributed to the improved alignment and enhanced dispersion of CNFs inside the silk fiber. Then, PEGDMA/silk fibroin (SF) hydrogels with varying concentrations of SF were developed by digital light projector. The elastic compressive modulus of the printed hydrogel had a wide range of values, suggesting that it could be a good substitute for various stem cells from cartilage, muscle tissue, fat, and bone.

研究分野：複合材料設計学

キーワード：材料力学 3D印刷 複合材料 生体材料 人工臓器

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、怪我や病気の際に欠損した臓器の代わりに、人工的に作製した材料を埋入する人工臓器に関する研究が行われており、生体内で炎症などの副作用を示さない生物学的安定性が人工臓器材料に不可欠である。しかしながら、生体内で半永久的に存在可能な材料の作製は極めて困難であることから、生分解性ポリマーを用いた組織工学的アプローチが注目されている。これは、図1に示すように、生分解性ポリマーからなる足場を利用して細胞組織を構築し、生体に生着したあとで徐々に足場は分解される一方、組織が発達することで生分解性の足場が最終的に本来の組織に置換される方法である。

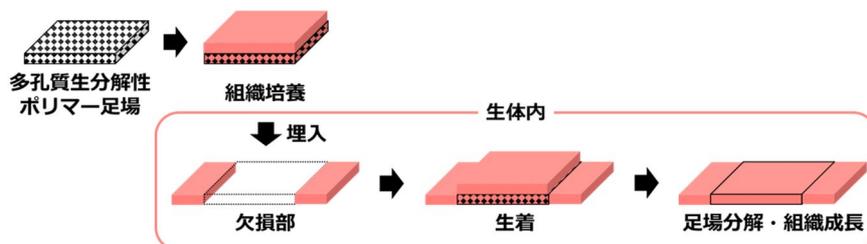


図1. 生分解性ポリマーを用いた組織工学的アプローチ

絹糸は蚕の体内にある左右一対の絹糸腺と呼ばれる器官で生成され、1本の絹糸の内部には約70%を占める2本の多孔質繊維状のフィブロイン(タンパク質)とその周囲に存在する約30%を占めるセリシン(絹膠)で構成されている(図2)。生体適合性を有するフィブロインは、手術用の縫合糸として利用されており、細胞が再生しやすい特長を持っている。したがって、フィブロインを用いた生体足場材料は、現在大きく注目されている。

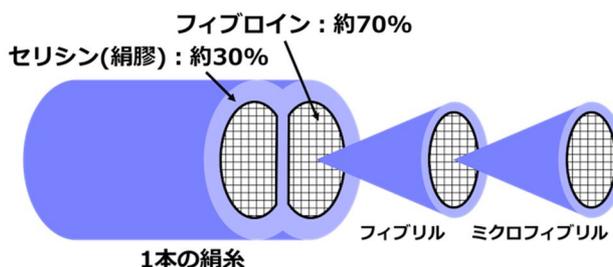


図2. 絹糸の構造

### 2. 研究の目的

本研究では、フィブロインを抽出し、水溶液中で光造形三次元(3D)プリンタによって硬化させることで、あらゆる人工臓器に適用可能で、細胞再生能力の高い生分解性シルクタンパク足場材料の創成とその3D印刷技術の確立を目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 【実施項目1】シルクの力学・物理特性に及ぼすセルロースナノファイバーの影響評価

シルクフィブロインを抽出する前のシルクに関し、力学・物理的特性に関する基礎的検討を行った。具体的には、シルクファイバー内部にセルロースナノファイバー(CNF)を配向させ、引張試験を行って、縦弾性係数、引張強さ、比強度に及ぼすセルロースナノファイバーの影響を解明した。また、有限要素解析を行い、シルク内部のセルロースナノファイバー含有率を予測した。

### 【実施項目 2】生分解性シルクタンパク足場材料の作製

図 3 にシルクフィブロインの作製プロセスを示す。蚕の繭を 4 つに切断し、 $\text{NaHCO}_3$  を加えた脱イオン水で煮沸して、セリシンを除去した。引き続き、室温で乾燥させたシルクフィブロインを 9.3M LiBr 溶液に溶解させ、塩を除去した後、遠心分離を行った。最後に、ろ紙で不純物を除去し、溶液を真空乾燥した。

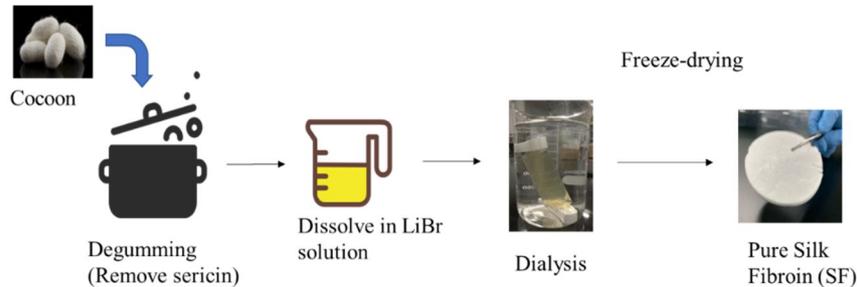


図 3. シルクフィブロイン（タンパク）の作製プロセスの模式図

### 【実施項目 3】生分解性シルクタンパク足場材料の 3D 印刷

開始剤としてフェニル-2, 4, 6-トリメチルベンゾイルホスフィン酸リチウムを脱イオン水に、紫外線硬化ポリマーであり、光硬化性ポリマーでもある PEGDMA を滴下し、撈拌して濃度 30 w/v% の PEGDMA 溶液とした。そして、実施項目 1 で得られたシルクフィブロインを脱イオン水に完全に溶解させ、濃度 2, 5, 8 w/v% のシルクフィブロイン溶液を調製した。その後、PEGDMA 溶液をシルクフィブロイン溶液に滴下し、シルクフィブロイン濃度の異なる 1 : 1 混合溶液を得た。

### 【実施項目 4】生分解性シルクタンパク 3D 印刷体の圧縮特性評価

円柱状の試験片を光造形し、試験片が破断するまで圧縮応力を各試験片に加えた。応力-ひずみ曲線から、5%ひずみ時の圧縮弾性率を算出した。また、圧縮試験前に純水およびリン酸緩衝液中で保管した試験片の圧縮強度の経時変化も評価した。複雑形状を有する人工臓器部品の試作には到達しなかったが、造形パラメータを変更しながら櫓状の構造体を造形し、造形精度向上の可能性を模索した。

## 4. 研究成果

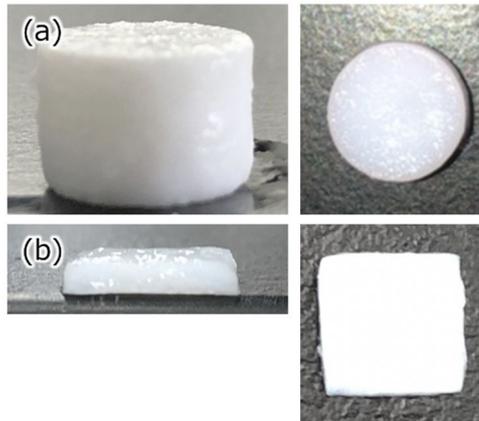
### 4.1 シルクの力学・物理特性に及ぼすセルロースナノファイバーの影響評価

CNF を 5 wt.% 含む餌を食べた蚕の繭から採取した蚕糸は、一般的な蚕糸と比較して 2 倍以上の縦弾性係数を示し、引張強さや比強度も増大した。また、原子間力顕微鏡像から、シルクの長手方向に CNF の一方向配向が確認された。さらに、有限要素解析の併用により、CNF 添加によるシルクの特増大要因も明らかにされた。

### 4.2 生分解性シルクタンパク材料の光造形

図 4 は 光造形した生分解性シルクタンパク試験片を示したもので、(a)は円柱状、(b)は平板状の場合である。すべての試料を 50  $\mu\text{m}$  の層厚で印刷した。PEGDMA の濃度が 10% 以下の場合、造形できても造形体が柔らかく、造形台から取り外す際に破損してしまった。圧縮試験と膨潤挙動試験片の光強度と露光時間の差は試験片の厚さに関係し、厚さを増大させ

ると、印刷中に造形物から剥離するか、バット内で部分的に分離した。



4. 光造形した生分

図 解性シルクタンパク試験片

#### 4.3 生分解性シルクタンパク光造形体の膨潤挙動

図 5 は、各シルクフィブロイン濃度によるシルクタンパク光造形体の膨潤比を示したものである。高い膨潤率は栄養分や老廃物を輸送するのに重要であり、生体材料の組織工学において重要なデータとなる。

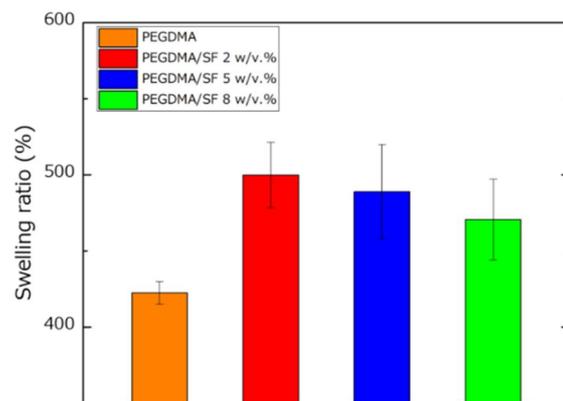


図 5. 各シルクフィブロイン濃度によるシルクタンパク光造形体の膨潤比

#### 4.4 生分解性シルクタンパク光造形体の圧縮特性

圧縮強度は、図 6 (左) に示すように、PEGDMA/シルクフィブロイン 5 w/v.% で最大となり、PEGDMA/シルクフィブロイン 2 w/v.% は PEGDMA 単体の場合とほとんど差がなかった。また、PEGDMA/シルクフィブロイン 8 w/v.% はすべての中で最小の圧縮強度を示した。

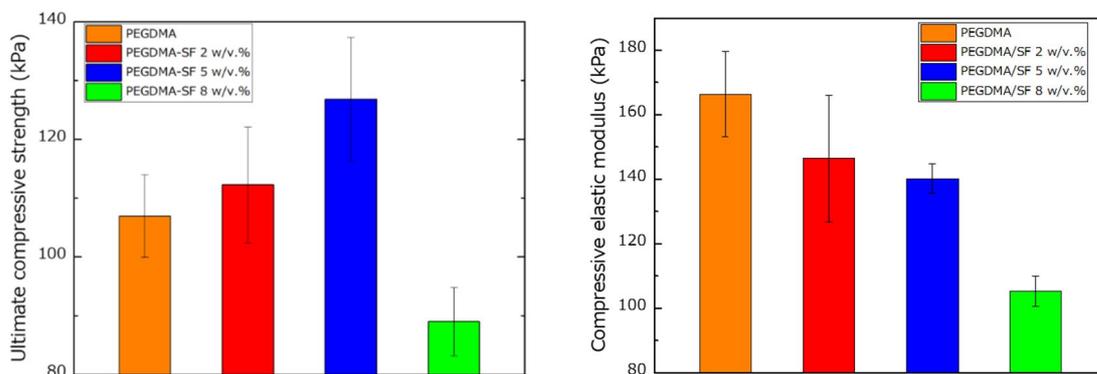


図 6. PEGDMA/シルクフィブロインハイドロゲル光造形体の圧縮強度と圧縮弾性率

一方、圧縮弾性率は PEGDMA 単体が最も大きく、シルクフィブロインの濃度が高くなるに

つれて低下する傾向が見られた (図 6 (右))。

#### 4.5 生分解性シルクタンパク光造形体の圧縮特性の経時変化

図 7 に純水に生分解性シルクタンパク光造形体試験片を保管した際の圧縮強度の変化を示す。その際、比較のために CNF を添加した生分解性シルクタンパク光造形体についても検討した。純水中に生分解性シルクタンパク光造形体試験片を保管した場合、はじめの数日間は強度が増加し、その後低下した。この強度増加は、保存中に可視光線を浴びたことによる二次硬化が原因である。そして、強度低下はハイドロゲルの加水分解によるものと考えられる。CNF を添加した場合、4 日目までは CNF を添加しない場合よりも強度が高く、その後はほぼ同程度となった。強度の増加は CNF 同士、シルクフィブロイン同士またはそれらの間の水素結合と、CNF のネットワーク構造によるものであり、その後の著しい強度低下はそれらの破壊によるものと考えられる。

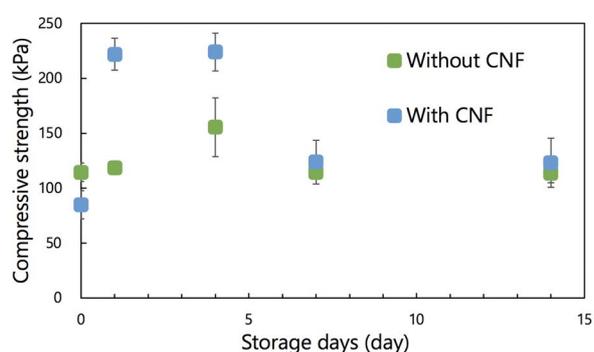


図 7. 純水中に生分解性シルクタンパク光造形体試験片を保管した際の圧縮強度の変化

#### 4.6 生分解性シルクタンパク光造形体の複雑構造造形の可能性

複雑形状造形試験の結果を表 1 に示す。光強度を変化させた場合、高強度では光散乱により意図しない部分が広範囲にわたって硬化した。低い光強度では、光散乱は抑えられたがモデルの再現性は良くなかった。結果的に、最も再現性が良かったのは光強度が 10 % の場合である。光強度を 10 % として CNF 濃度を変化させた場合、0.1, 0.2% では再現性が良いが、0.3, 0.7% ではシルクフィブロインのゲル化が確認された。最も再現性が良かったのは CNF 濃度が 0.2 w/v% の場合であった。

表 1. 複雑形状造形試験の結果

Light intensity (%)	8	<b>10</b>	20	30	50	100
CNF concentration (w/v%)	0	<b>0</b>	0	0	0	0
Results	Not well defined shape			Almost a mass		
Light intensity (%)	10	<b>10</b>	10	10		
CNF concentration (w/v%)	0.125	<b>0.2</b>	0.3	0.7		
Results	A reasonable reproduction			Intensely gelatinized		

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wu Chen, Egawa Satoshi, Kanno Teruyoshi, Kurita Hiroki, Wang Zhenjin, Iida Eiji, Narita Fumio	4. 巻 202
2. 論文標題 Nanocellulose reinforced silkworm silk fibers for application to biodegradable polymers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials & Design	6. 最初と最後の頁 109537 ~ 109537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.matdes.2021.109537	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Egawa Satoshi, Kurita Hiroki, Kanno Teruyoshi, Narita Fumio	4. 巻 23
2. 論文標題 Effect of Silk Fibroin Concentration on the Properties of Polyethylene Glycol Dimethacrylates for Digital Light Processing Printing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Engineering Materials	6. 最初と最後の頁 2100487 ~ 2100487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adem.202100487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 栗田大樹, 菅野晃敏, 王真金, 成田史生	4. 巻 579
2. 論文標題 植物ナノファイバーと蚕糸からなるグリーン複合系の創製	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 コンバーテック	6. 最初と最後の頁 72 ~ 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Daiki Kato, Satoshi Egawa, Hiroki Kurita, Fumio Narita
2. 発表標題 Mechanical Characterization of Silk-Based Scaffold Printed by Digital Light Processing
3. 学会等名 7th Asian Conference on Mechanics of Functional Materials and Structures（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Egawa, Teruyoshi Kanno, Hiroki Kurita and Fumio Narita
2. 発表標題 Test and Finite Element Analysis of Tensile Behavior in Nanocellulose/Silkworm Silk Composite Fibers
3. 学会等名 7th Asian Conference on Mechanics of Functional Materials and Structures (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	栗田 大樹  (Kurita Hiroki)  (40643226)	東北大学・環境科学研究科・助教    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------