

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300152

研究課題名（和文） 「イン・ファクトリー・ティッシュ・エンジニアリング」の
基盤技術の創出研究課題名（英文） Creation of the Basic Technologies for “In Factory Tissue
Engineering”

研究代表者 中村 真人（NAKAMURA MAKOTO）

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・教授

研究者番号：90301803

研究成果の概要（和文）：

臓器という精密かつ高度な生体複合組織を作製するには、多くの工程が必要である。本研究では、何種類もの機械がいくつもの工程を担当しつつ一つの製品を作り上げていく『工場生産』的な発想、すなわち『in factory Tissue Engineering』のコンセプトで、(1)細胞組織パーツの作製技術、(2)パーツ組み立て実装技術、(3)育成・組織化を制御する技術の3つを重要工程・重要技術と位置づけて、臓器作製のための『新しい機械の手』の創出に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

Many sequential processes are needed for manufacturing highly composite biological tissues which have micro-scaled and complicated structures. In this study, the concept of “In factory tissue engineering” was proposed, in which the tissues are produced through many processes where special manufacturing machines fabricate, assemble and process the biological products with cells, biomaterials and several tissue parts. Based on this concept, three major technologies were focused and developed; 1) manufacturing of tissue parts and tissue engineering materials, 2) assembly methods of tissue parts, 3) culture and control method for tissue formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオフィアブリケーション、機械の手、工場生産、バイオリクター、組織パーツ、毛細血管、転写技術、印刷技術、人工臓器工学・再生医工学、細胞操作

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織作製への研究モチベーション：21世紀、移植医療は他人の臓器を待ち焦がれる時代ではなく、臓器は科学の力で「作る」時代に移行せねばならない。

(2) 必要な組織工学のブレークスルー：2006年、山中伸弥教授らが「iPS細胞」を発明し、世界は再生医療で沸き返った。「iPS細胞」は、分化した細胞を初期化して、体中どんな細胞にも分化する能力を持つ細胞に変える革新

技術である。日本中、世界中の人々が「iPS細胞」で臓器を作って医療に役立てることに大きな期待を寄せている。しかし、望みの細胞が得られたとして、そこからいかにして臓器を作るのか？実は、ここにこそ、臓器を作る本質的な技術のカギがあり、組織工学のブレークスルーがなくてはならない。

(3)これまでの申請者らの取り組み：臓器は、細胞、タンパク質を最小単位として、毛細血管や筋線維、上皮組織、さらに大きな器官となり、最終的に臓器を形成する。すなわち、様々なパーツが階層的に構築・構成された構造物である。そこで、このような臓器を作り出すのに、細胞というマイクロのパーツを積み上げてマクロの臓器を作りあげるアプローチに取り組んできた。それを実現するための『機械の手』の開発するため、2002-4年度「Tissue Engineeringのための細胞組織マイクロ構築技術の基礎研究」、2005-6年度「オン・デマンド・ダイレクト・ティッシュ・エンジニアリング法の基礎研究」、さらに、神奈川科学技術アカデミー「バイオプリンティングプロジェクト」の活動を通して、インクジェット細胞プリンティング、マイクロマニピュレータ、細胞パターンング、そして、インクジェットによる3次元造形の技術を開発し、その可能性にチャレンジしてきた。

2. 研究の目的

複雑高度な生体組織や臓器を生きた細胞を用いて工学的に作製しようと、「機械の手」の必要性を想定してそのような装置技術の開発を行ってきた。しかし、複雑な組織であればあるだけ、本気で作製しようと目指すならば、実際には多くの工程が必要で、それぞれの工程で特殊な製造装置が特殊な作業を行い、最終製品を作り上げていく『工場生産』的な発想が臓器作製には必要となる。それが『in factory Tissue Engineering』のコンセプトで、本研究でこのコンセプトを世に提案するとともに、それぞれの工程に役立つ「機械の手」となる技術の探索と創出を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

以下の3テーマを重要工程・重要技術と位置づけて、「機械の手」の創出に取り組んだ。

(1)細胞組織パーツの作製技術：生体組織は主として細胞とたんぱく質で作られているが、実際にはいろいろな小組織を形成し、それが集積して大きな組織を作っている。したがって、それらの組織パーツの作製を行うことができる技術が必要で、それを可能にする技術の探索と創出を行った。

(2)パーツ組み立て実装技術：さらに、作製した小組織パーツはたくさん集積して大きな組織となる必要がある。そこで、作製した

小組織パーツをくみ上げる技術の探索、創出を模索した。

(3)育成・組織化を制御する技術：工学的に積み上げた細胞やたんぱく質は、あるいは小組織パーツは、そのままでは単なる細胞の寄せ集めである。それが細胞生物学的に機能するためには、組織として成熟、熟成しなければならない。望みの組織に育成する技術が必要で、そこに関係する技術を探索した。

4. 研究成果

(1)細胞組織パーツの作製技術：

まず、組織パーツを作る「機械の手」として、これまでの技術がよく脱と考へ、インクジェット式3Dバイオプリンターの改良を行った。印刷方式を一筆書きで描くベクター式から一行一行必要に応じてインクを吐出して画像を描くドット・オン・デマンド・プリンティングであるラスター方式の描画方式を可能にし(図1)、さらに、Z軸ステージを装備してZ軸方向のずれの精度向上を図った。これにより、造形能力が向上し、これまで以上に複雑な構造物の作製が可能になり、また、コンピュータ上でデザインした画像データをもとに積層して3次元造形を行うことができるようになった。これにより、CAD/CAM/CAE (Computer aided Designing / Manufacturing / Engineering)のコンセプトでの組織構築が可能になった(図2)。

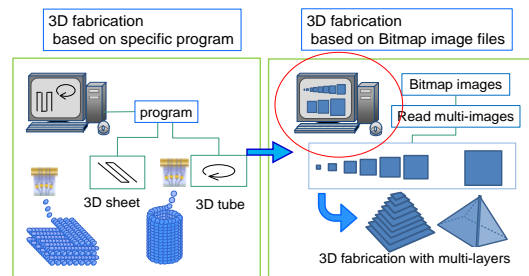


図1、3D BioprinterのPrinting modeの追加

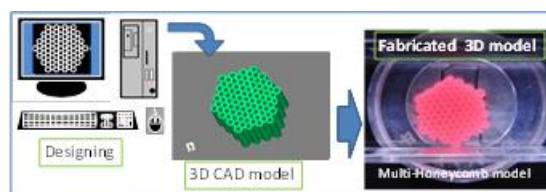


図2、Computer aided Biofabrication

また、これまで取り組んできた細胞パターンング技術も組織パーツ作製に有効であると考え、これまで光リソグラフィ技術を応用して行ってきた細胞培養用基板のパターンングをインクジェットでもできるようにとパターン基板の作製を試みた。それによって、パターンングを施した細胞培養基板の作製を自前でも可能にした。作製した培養基板を用いて、血管内皮細胞で毛細血管の作製、平

滑筋細胞、筋芽細胞、心筋細胞のパターニングから筋ファイバーの作製を試みた。その結果、毛細血管、筋組織ファイバーの作製に成功した(図3)。これらの組織は、臓器構築の際の有効な組織パーツとなると考えられる。

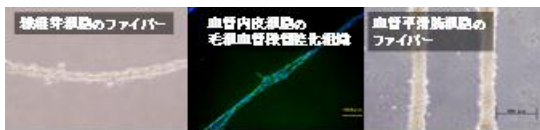


図3、細胞のファイバー、管腔化組織

さらに、作製した組織パーツはこの後組立実装技術で大きな組織に組み上げられ、その次の育成のプロセスに進む。そこでその時に細胞の遊走、増殖、分化を制御し、望みの組織を形成するように誘導する必要がある。そこで、重要な鍵となるのは、細胞への増殖因子の刺激、細胞への薬物刺激を行う増殖因子や分化因子、遊走因子、さらにはそのような作用を持つ薬剤であり、しかもそれらが局所的な作用を可能にする方法と技術が必要と考え、DDS (Drug delivery system) の必要性と加えてDDSを組織パーツと一緒に組み込むためのDDSパーツの必要性を想定して、それに利用できる技術の開発を目指した。ゲルに増殖因子を加えても、拡散現象で因子はすぐに流れ出てしまう。ゲル中にとどまるサイズのDDSが必要と考えて、インクジェットの均一な微小液滴作製能力を利用して、微粒子作製のための技術として利用を試み、開発を進めた。このコンセプトで、JST, A-Step シーズ探索研究で、作製装置を提案して技術を進めてきたが、それをさらに微粒子作製技術として発展させる工夫を行った。その結果、均一なサイズの微粒子の作製、さらに、粒子サイズの制御が可能になった(図4)。

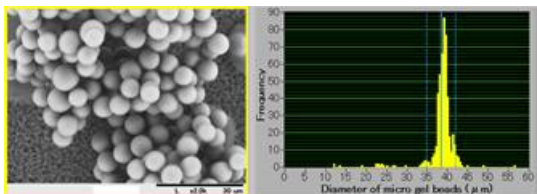


図4、マイクロビーズの電顕像と粒径分布

また、印刷技術の利点を活かして、細胞組織や細胞の足場材を成型する培養モジュールの作製、それを実施する技術を考案し、装置化を目指して、技術力があり積極的な企業とともに開発を協議した。

これらの研究を通して、組織パーツの作製、DDSパーツの作製、培養モジュールの作製に有効な技術とその装置開発をテーマに、2件のJSTのA-Stepシーズ顕在化プログラムのプロジェクトに提案した。結果は1件採択、1件採択に至らなかったが、ともに有効な「機械の手」のためのシーズ技術になりうると考える。

(2) パーツ組み立て実装技術:

作製した小組織パーツを組み立てる有効技術として、パターニング培養の技術を発展させて、パターニング基板に培養した細胞組織を転写することを試みた(図5)。転写のみならず、重ねての転写も可能であることが分かり、今後の発展に期待している。

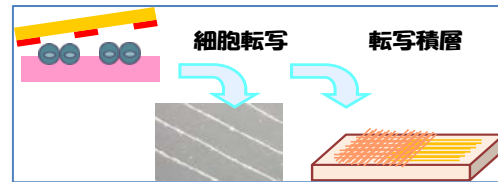


図5、細胞・組織の転写積層

また、かつて開発したマイクロマニピュレータロボットを活用して、作製した小組織のハンドリングを行えるよう微細操作を発展させようと試みた。また、マイクロマニピュレータの備えたヒンジの機構を応用した微細加工装置を考案し、企業と共同開発についての協議をおこなった。JSTのプロジェクトに応募した。これも採択されなかったが、実装のための「機械の手」となりうるシーズ技術と考える。

(3) 育成・組織化を制御する技術:

細胞を培養・育成するための「バイオリアクター」「培養用酸素運搬体」の創出に取り組んだ。バイオリアクターでは、3D Bioprinterで作製した組織の培養を想定し、マイクロ流路を含んだ培養チャンバーを自作し、流れの可視化などの検討を行った。細胞組織培養の実験も進めたが、現段階では、細菌汚染が問題となり、手持ちのEOG滅菌装置が環境問題で禁止され使えなくなった状況での実験器具、実験回路の滅菌法が当研究室での課題としてあがった。

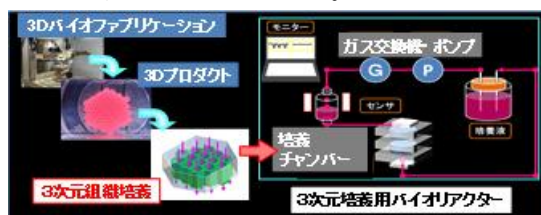


図6、3次元培養用バイオリアクターの開発

(4) その他: Biofabrication 国際学会主催

2011年10月、代表者が主催者となって、『Biofabrication』の国際学会の年大会を日本に招致し、富山で開催した。世界各国からの研究者を招請し、日本にアジアに先進的なBiofabricationの技術と研究を紹介し、この分野の研究活動を啓蒙するとともに、参加者達に、『in factory Tissue Engineering』の構想の精神を発信した。

加えて、代表者は、国内外の種々の国際学会、全国学会などで、特別講演や招待講演等

で発表の機会が得られたが、そこでも同様に、本研究『in factory Tissue Engineering』の精神を啓蒙することができた。

(4) 考察とまとめ：

以上、(1)細胞組織パーツの作製技術、(2)パーツ組み立て実装技術、(3)育成・組織化を制御する技術、の3つのテーマを掲げて研究開発を行ってきた。

現在の再生医療・組織工学では、細胞培養の過程はほとんどすべて技師や研究者の手作業で行われている。ここに、コンピュータと機械を導入し、ヒトの手作業をはるかに超えた作業を可能にするべく、本研究を行った。このようにコンピュータと機械で構築する技術は「Biofabrication バイオフアプリケーション」と呼ばれ(呼び)、前述のように国際学会も立ち上がり(立ち上げ)、世界の研究開発が進み始めている(それを推進してきた)。本研究では、(1)細胞組織パーツの作製技術、(2)パーツ組み立て実装技術が、Biofabricationの技術に当たる。インクジェット3Dバイオプリンターの開発と改良、細胞のパターニング、パターン培養した細胞の転写の技術を高めることができ、今後さらに発展させると、大きな波及性があると考えている。印刷技術は、ミクロの精度を保ちながらマクロの形状を制御できる、インクを再現性良く配置制御できるという特徴があるが、この特徴は、実装技術、生産技術としても非常に優れており、バイオフアプリケーションや組織構築にとっては、きわめて有望であることもわかった。今後の応用と発展をぜひ進め、成果を花開かせることに期待したい。

また、デザインして構築した細胞組織ができてくると、それを培養するバイオリクターが必要になる。3DBioprinterで多くの流路を持つ構造を作り、それを培養するバイオリクターの研究開発を試行してきたが、作製する組織、組織パーツの形状に応じた装置が必要であろうと思われた。そして、生体組織はやはり細胞を並べただけで作れるような単純なものではなく、もっと多くの工程を踏む必要があるのではないかと考えられる。足場材の工夫、増殖因子の投与の仕方の工夫、順々に進んで組織化していくのを制御する方法、など、わからないことだらけであるが、試行錯誤を続けるしかない。

コンピュータと機械工学技術を導入する利点は、人の手作業をはるかに超越した作業、再現性よく質のそろった製品の生産、高速に大量に作製する、さらにヒトが入れない極限環境で作業ができるなどの利点がある。完全滅菌環境で作業が可能なので、製品の品質を保証するためにも重要と考える。そして、もっと高度な細胞組織構築法、細胞培養法、組織培養法を開発するためには、日本の高い機

械工学技術、ロボティクス技術、が有効に活用できる。そして新技術を工夫開発していく日本人の開発力がきつものを言う。デジタル化、ロボット化、ライン化、自動化などの技術を積極的に導入していけば、『in factory Tissue Engineering』の構想が実現し、生体組織、臓器作製を科学の力で作り出す時代、医学に提供できる日が必ずやってくると期待がわいた。これからの発展に尽くしたいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- 1) 中村 真人、荒井 健一、戸田 英樹、高度な生体組織生産のための工学技術 (特集 ライフエンジニアリングにおける計測と制御)、計測と制御 51(10), 907-911, 2012-10
- 2) 中村真人、インクジェットによる3次元組織工学へのチャレンジ, MATERIAL STAGE Vol.12, No.7 株式会社技術情報協会、8-11, 2012
- 3) 荒井 健一、中村 真人、バイオプリンティングによる組織形成、未来材料 12(11), 6-12, 2012-11
- 4) 中村真人、「バイオフアプリケーション」: 究極の再生医療技術の実現に向けた取り組みWeb Journal, No.132, アクトライエム, 2-7, 2012
- 5) Arai K, Iwanaga S, Toda H, Genci C, Nishiyama Y, Nakamura M, Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images. Biofabrication. 2011 Sep;3(3):034113. Epub 2011 Sep 7. (2011年度ハイライト論文に選出)
- 6) 中村真人、岩永進太郎、戸田英樹、荒井健一、細胞プリンティングからバイオフアプリケーションへ、医学のあゆみ、238(13)(2011年9月24日), 1217-1220, 2011.
- 7) 伊藤 紘造、荒井 健一、沖野 賢志、岩永 進太郎、戸田 英樹、ゲンツイ チャビ、中村 真人、人工生体組織の設計と製作技術の研究、電子情報通信学会技術研究報告. MBE, MEとバイオサイバネティクス 111(57), 5-8, 2011-05-13, 2011.
- 8) 渡辺 有、岩永 進太郎、中村 真人、細胞入り三次元構造物の培養に向けたバイオリオクターの開発、電子情報通信学会技術研究報告. MBE, MEとバイオサイバネティクス 111(57), 1-4, 2011-05-13, 2011.
- 9) 荒井 健一、山口 久美子、岩永 進太郎、伊藤 悟、齊藤 典彰、戸田 英樹、チャビ ゲンツイ、中村 真人、J0207-2-6

Bioprintingを用いた3次元造形物の作製及び形態評価(JO207-2) 医療・福祉工学のための3次元造形、年次大会講演論文集 : JSME annual meeting 2010(6), 249-250, 2010-09-04

- 10) 岩永 進太郎、荒井 健一、中村 真人、Computer-aided Tissue Engineeringに向けた3次元バイオファブ리케이션技術、(特集 未来社会を支える技術戦略)、化学工業 61(8), 602-608, 2010.
- 11) その他

[学会発表] (計 64 件)

うち、特別講演、招待講演等(29 件)

- 1) ランチョンセミナー講演 : 中村真人、細胞組み込み型ヒト人工組織の3次元に向けた戦略. 第 11 回日本再生医療学会総会 2012年6月13日 横浜
- 2) シンポジウム講演 : International Symposium on Biomedicine and Drug-Development from Bench to Enduser; Nakamura M, Shimatani T, Fukai N, Matsuba H, Ito H, Kawagishi T, Okino S, Kuyo H, Sekiguchi N, Kanamaru R, 3D Fabrication technology using Bio- and Nano-materials. BioValley Life Sciences Week, Basel, September 22-29, 2012
- 3) Special Plenary talk of VLSI symposium : Nakamura M, Iwanaga S, Arai K, Toda H, Capi G, Nikaido T. Computer assisted Biofabrication: Challenge to 3D tissue and organ engineering. VLSI Symposium. 2011, June 14, 2011, at Kyoto, Proceeding 2-6.
- 4) パネル講演 : 第 29 回 日本ヒト細胞学会 学術集会、中村真人、荒井健一、戸田英樹、伊藤紘造、チャピゲンツイ、二階堂敏雄、生体組織の再生医工学的設計と製作、2011年8月20日、富山
- 5) Organizers lecture, 2nd international conference of international society for Biofabrication, Biofabrication 2011 in Toyama, Nakamura M, Biofabrication: Emerging technology of tissue and organ engineering, October 6th, 2011, Toyama, Japan.
- 6) Invited lecture, 2011 MRS fall symposium, Nakamura M, Arai K, Toda H, Iwanaga S, Ito K, Capi G, Nikaido T, Computer-assisted designing and biofabrication of 3-D hydrogel structures towards thick 3-D tissue engineering, November 28 - December 2, 2011, Boston, USA
- 7) 特別講演 : 第 42 回化学工学会秋季大会 : 中村真人、岩永進太郎、荒井健一、科学技術で組織・臓器を作る挑戦「バイオプ

リンティング、バイオファブ리케이션」、2010年9月8日(京都)同志社大学

- 8) 特別講演 : 第 17 回門脈圧亢進症学会 : 中村真人、岩永進太郎、荒井健一、バイオファブ리케이션 : 機械で臓器を作る研究、2010年9月9日(富山)富山国際会議場
- 9) シンポジウム講演 : 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 : 中村真人 組織工学の新しい流れ : バイオファブ리케이션 : Biofabrication、2010年10月15日(京都)
- 10) 特別講演 : 日本機械学会バイオエンジニアリング部門バイオフロンティア講演会 : 中村真人、バイオファブ리케이션 : Biofabrication—細胞から臓器を作る技術の開発—、11月13日(金沢)
- 1) 学会発表 : ○渡辺有、中村真人、細胞入り三次元構造物の培養に向けた培養装置の開発とその検討平成 24 年度生体医工学会北陸支部大会、2012年12月、福井(研究奨励賞受賞)
- 2) 学会発表 : ○Satoru Ito, Shintaroh Iwanaga, Hiromi Kitano, Makoto Nakamura, Transfer printing of patterned cardiomyocytes, myoblasts and smooth muscle cells. 2nd international conference of international society for Biofabrication, Biofabrication 2011 in Toyama, October, 2011. (IOP poster award)
- 3) 学会発表 : 竹田朋恵 齊藤典彰 岩永進太郎 中村真人、培養用ヘモグロビン含有ゲルビーズの作製、平成 23 年度生体医工学会北陸支部大会、2011年12月、金沢(研究奨励賞受賞)
- 4) 学会発表 : 佐々木健太、岩永進太郎、中村真人、細胞パターンニング技術と細胞転写技術の組織工学への応用 : 毛細血管様構造物の作製、平成 22 年度日本生体医工学会北陸支部大会 2010年12月、金沢(研究奨励賞受賞)
- 5) 学会発表 : Arai K, Iwanaga S, Toda H, Capi G, Nakamura M, Three dimensional inkjet biofabrication based on the designed images, International conference on Biofabrication, 2010. October, 6. Philadelphia, USA, (IOP poster award)
- 6) 他

[図書] (計 3 件)

2012

- 1) 中村真人、荒井健一、戸田英樹、岩永進太郎、バイオファブ리케이션 : 3次元生体組織を生産するための製造加工技術、再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、岩田博夫、松岡厚子、岸田

- 晶夫監修、シーエムシー出版、146-156, 2012.
- 2) 中村真人、第13章バイオプリンティング技術、in「2012 プリントブルエレクトロニクス」、CD-ROM版、電子ジャーナル、2012年6月25日発刊
- 3) Nakamura M. Reconstruction of biological three-dimensional tissues: Bioprinting and biofabrication using inkjet technology, in Part II: Inkjet approaches, Cell and Organ Printing, Ringersen BR, Spargo BJ, Wu P editors, pp.23-34. Springer, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：マイクロビーズの製造方法
発明者：中村真人、渡邊昭彦
権利者：富山大学
種類：特許
番号：特許第4644786号
取得年月日：平成22年12月17日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等
<http://pse.eng.u-toyama.ac.jp/bio7A/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 真人 (NAKAMURA MAKOTO)
富山大学大学院理工学研究部 (工学) 教授
研究者番号：90301803

(2)研究分担者

堀江 三喜男 (HORIE MIKIO)
東京工業大学精密工学研究所 教授
研究者番号：00126327

(3)連携研究者

二階堂 敏雄 (NIKAIDO TOSHIO)
富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 教授
研究者番号：50180568
竹澤 俊明 (TAKEZAWA TOSHIKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・主任研究員

研究者番号：50301297

嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 准教授 (現 京都大学ナノバイオ医薬創成科学・客員准教授)

研究者番号：30216072

杉本 直俊 (SUGIMOTO NAOTOSHI)

金沢大学医学系 准教授

研究者番号：80272954