

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23246027

研究課題名(和文)高代謝速度大型臓器再構築用3次元担体の粉末焼結積層造形に関する研究

研究課題名(英文)Laser sintering of tissue engineering scaffold for reconstruction of three dimensional, large scale and high metabolic rate organs

研究代表者

新野 俊樹(NIINO, TOSHIKI)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：70291929

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 38,600,000円

研究成果の概要(和文):再生医療の基礎となる組織工学は細胞に関する技術,培養と分化制御等に関する技術,細胞が培養する足場となる担体に関する技術から構成されている.本研究は,三次元的な臓器再構築を行うための,三次元的な担体のレーザー焼結に関するものである.本研究では,焼結用のレーザーの波長を11 $\mu$ mから波長1.1 $\mu$ mに小さくすることで,ビーム径を従来の1/3に縮小して担体材料であるPCLの造形に成功した.また,樹脂の予熱温度の低減,空孔率向上のために用いられるフィラーにアルカリ可溶性の樹脂をつかうことで,造形の分解能を倍に向上した.また,細胞の接着性をアルカリ処理により確立し肝癌由来細胞の安定的な培養技術を確立した.

研究成果の概要(英文):Tissue engineering is basically composed of the three technologies which are concerning cells, their culture and scaffold. This research is concerning the fabrication of tissue engineering scaffold with laser sintering, one of so-called 3D printer technology. In this research, short wave length of 1.1 microns was selected to reduce the laser spot diameter, while typical commercial systems employ 11microns, and a prototype scaffold was successfully developed out of typical scaffold material of Polycaprolactone. Fabrication technique that reduces powder bed temperature was developed. Material of porogen powder was switched from sodium chloride to less heat conductive and alkaline soluble plastic. Owing two these developments, precision of scaffold was roughly doubled. Hydrophilicity treatment of PCL scaffold with alkaline solution was established to improve cell adhesion. Resultantly, stability of cell culture of HepG2 cells was improved.

研究分野：生産加工

キーワード：additive manufacturing tissue engineering laser sintering 3D printing

### 1. 研究開始当初の背景

組織工学は、細胞に関する技術、培養と分化誘導に関する技術、担体等に関する技術の3要素から構成されており、この細胞と分化制御に関してはiPS細胞の作製成功以来、この細胞を中心に急速に発展している。一方、担体に関しては1990年代後半から活発に研究されているものの、皮膚や人工骨などの特殊なものを除いて実用化には至っていない。

生体組織において酸素や栄養の供給は、末端の直径が10~20 $\mu\text{m}$ の毛細血管網内の血流を介して行われる。毛細血管様の流路の人工的再構築は、極めて小スケールでは可能だが、肝臓など数百 $\text{cm}^3$ 以上の規模の臓器の再構築は現実的でない。本課題代表者らは、まずin vitro 培養で、ターゲットと同スケールであるが細胞密度は生体組織よりも小さい臓器を構築し、その後の生体内に移植するという方法を提案している。これまでに生体吸収性の樹脂であるポリカプロラクトン(PCL)の粉末と、100~150 $\mu\text{m}$ に篩われた食塩と混合して、レーザー焼結造形したのちに食塩を溶出することで、空孔径150 $\mu\text{m}$ 程度、最小流路径が800 $\mu\text{m}$ の流路網を配備した担体を作製<sup>(1)</sup>、灌流培養によってin vivo の1/10程度の細胞密度を得ることに既に成功している。

これらの成果は、本手法が今後の発展していく可能性を示唆したが、いくつかの課題も残った。まず、この例では流路の網の目の大きさがおよそ900 $\mu\text{m}$ 程度であるのに対して、流路表面から担体内部への細胞の浸透は200 $\mu\text{m}$ 程度あり、担体の大部分が培養に寄与しない。細胞密度を向上するには、まず流路網の微細性を向上させなければならない。また、担体の材料には造形に適したPCLを用いたが、この材料は疎水性が強く細胞の活着を下げる。担体を培養に供するには担体の表面の細胞接着性を向上のための処理が必要である。一方、微細な流路に血液凝固因子を含んだ生体血を流した場合、血栓の発生が懸念される。臨床では、血栓形成のリスクから直径6mm以下の人工血管が使用されることはない。流路の微細性の要請と血栓のリスクは二律背反する問題であり、本手法を実現させるには、微細性を維持したまま抗血栓性を向上させる技術の開発が不可欠である。

### 2. 研究の目的

以上の状況を鑑み、本研究では、(1)担体の微細性と、(2)細胞の接着性を向上し、(3)抗血栓性を評価することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 担体の微細性の向上

**フィラの変更による微細性の向上** 組織工学担体では細胞が増殖するためのスペースを確保しなくてはならないため、高い空孔率が要求される。これまでの研究では食塩粉と担体材料のPCL粉末を混合して造形し、造形後に食塩を溶出することによって空孔を得る。レーザー焼結は熱加工であるため、

粉体床の熱伝導率が高いと、熱の拡散が増大して余剰焼結が増加し、加工の微細性が低下する。そこで本研究では、食塩に代えて、樹脂材料であり、かつアルカリで容易に分解できるポリグリコール酸(PGA)を用いることとした。

#### 低温造形による微細性の向上

一般的なレーザー焼結造形では、造形物のいわゆる「そり」を防止するために、粉末床を融点近くまで加熱している。このため、レーザーが照射された部位とされていない部位の境界付近での温度勾配が小さく、非照射部の温度が大きいため余剰焼結が容易に生じ、造形の微細性が下がってしまう。そこで本研究では、造形床の温度を低温に保ち、造形物の反りは造形物を、強固なベースプレートに固定することで防止することとする。

**波長の変更による微細性の向上** 現在、商業的に入手可能な樹脂の一般的なレーザー焼結装置には、樹脂に対する吸収のよい炭酸ガスレーザーが搭載されているが、集光が困難であるという問題がある。そこで本研究では、炭酸ガスレーザーの波長が10.6 $\mu\text{m}$ であるのに対し、1.06 $\mu\text{m}$ のファイバーレーザーを用いることとした。一方、ファイバーレーザーは、樹脂の吸収が小さいため、吸収を確保するため、粉末に吸収剤を添加することとした。

(2) 接着性の向上 担体の材料として使用するポリカプロラクトンはポリエステル的一种で親水基を持たない高分子であるため、親水性が低く、細胞が接着しにくい。疎水性の高い表面を改質する方法として、酸素プラズマによる疎水基の親水化や、エステル結合を加水分解して親水性のカルボキシル基とヒドロキシ基を作る方法がある。平板表面の親水性は物理的には濡れ角で評価できるが、その細胞の接着性への効果との関係は素材や表面の形状にも影響されるため定式化されておらず、都度の評価が必要である。本研究では細胞培養も行って親水性と接着性との関係を得る。樹脂の親水化処理に用いられるプラズマ処理では、希薄気体に高周波電場を印加して電子を加速、気体分子に衝突させることでプラズマをえるが、多孔質体の微細な空孔の中ではプラズマを維持するのに十分な加速距離がとれない可能性があり、平板表面の親水化とは事情が異なる。本研究ではプラズマの発生条件と表面処理の効果を調査する。また、カップリング剤を用いた親水化も試みる(図1)。

(3) 抗血栓性の向上 血管内皮細胞が血栓の発生を低減することが報告されている<sup>(2)</sup>。本研究では、流路内に凝固因子が流入するin vivo の培養時に血栓を生じないように流路面を血管内皮細胞で被覆する(図2)。まず、試験用の2次元的な担体を用いて血管内皮細胞の培養を行い、担体条件を整える。次に試験用担体において内臓細胞(肝細胞を予定)を行い、その後血管内皮細胞による被覆を試

みる。さらに、一般に内臓細胞は接着性に乏しく、血管内皮細胞は接着性が強い。そこで、前項の担体の選択的親水化を用いて流路内面より、担体内部をより強く親水化し、担体内部に内臓細胞を流路表面に血管内皮細胞を選択的に培養する。

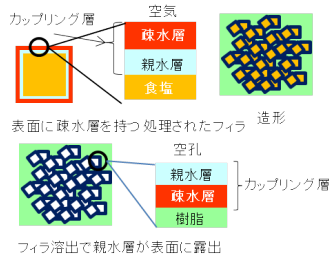


図1 カップリング剤による親水化

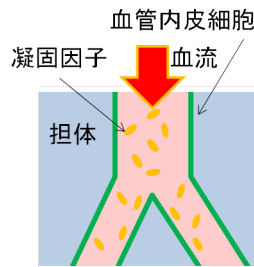


図2 被覆による血栓性の低減

#### 4. 研究成果

##### (1) 担体の微細性の向上

**フィラの変更による微細性の向上** 図3に、造形材料のPCLとPCLにフィラとして食塩を混合したもの、フィラとして樹脂であるPGAを混合したもので造形をおこない、造形できる最も小さい穴径を示す。

これらのグラフに示されるように、フィラを樹脂とすることで、微細性が向上し、より小さな穴が開けられることが分かった。

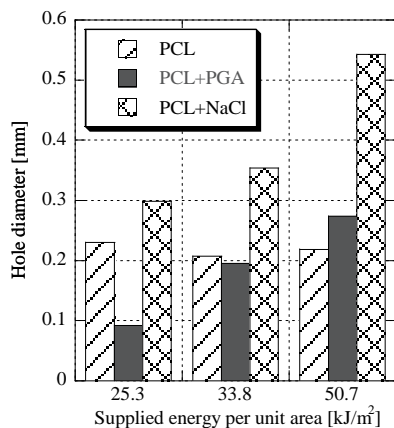


図3 造形可能な最小穴径の比較

##### 低温造形による微細性の向上

図4に、予熱を行った場合(上段)と行わなかった場合(下段)での薄壁(左側の2列)と穴(右側2列)の様子を示す。なお、造形条件は、各造形物の密度が等しくなるように調整した。ここに示されるように、予熱を行わないことにより、壁が薄くなり、穴が大き

くなっていることから、余剰焼結がへり造形物の縁部での形状の制御が容易になっていることが分かる。

**波長の変更による微細性の向上** 図5に、PCLにレーザーの吸収剤を混合し、ファイバーレーザーで造形した造形物の写真を示す。吸収剤無しでは、粉末床が全く反応せず、あるところで分解が生じたのに対し、吸収剤があることで造形が可能になった。

| Profile Dimension | Wall 0.1mm | Wall 0.2mm | Hole 1.2mm | Hole 1.0mm |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| High Temperature  |            |            |            |            |
| Actual Value      | 0.32mm     | 0.43mm     | 0.50mm     | 0.54mm     |
| Low Temperature   |            |            |            |            |
| Actual Value      | 0.24mm     | 0.37mm     | 0.40mm     | 0.45mm     |

図4 予熱の有無による微細性の向上

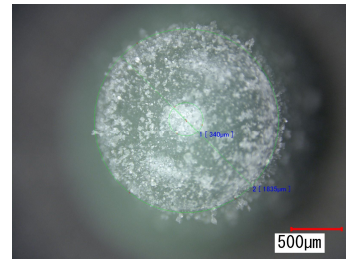


図5 ファイバーレーザーによるPCLの造形

##### (2) 親水性の向上

本補助金の申請後、補助金の支給が開始される前に、予備実験を行ったところ以下のこと

が分かった。親水性の向上方法として、アルカリによる加水分解処理、プラズマ処理、カップリング処理を検討した。図6にスポンジ状(空孔率86%)の担体の保水率を示す。いずれの方法でも保水率が向上し、親水性が向上していることが分かる。また、マウス繊維芽細胞を培養した際のグルコース消費量を図7に示す。なお、シランカップリングについては、処理無しに比べてグルコース消費量が減ってしまう。

プラズマ処理には形状の制限があり、一方、アルカリ処理はPGAをフィラーとして用いていれば、溶出と同時に親水化処理が行われるため、本研究ではアルカリ処理を基本の親水化処理として扱うこととした。

##### (3) 抗血栓性の向上

今回開発したPGAのフィラーを用いて造形したスcaffoldを用いて培養を行ったところ、初日の活着数に対して10日後の細胞数は3.6倍であり安定した培養が行われていることがわかった。また、PGAを溶質しない状態で培養を行ったところ細胞数の増加は1.6倍にとどまり、PGAによる毒性が示唆された。また、ヒト血管内皮細胞の培養を行ったところ初日の活着率は良かったが、そ

の後の細胞数の増加がなく、血管内皮細胞の培養を行うことができなかった。このため抗血栓性の向上の評価には至らなかった。

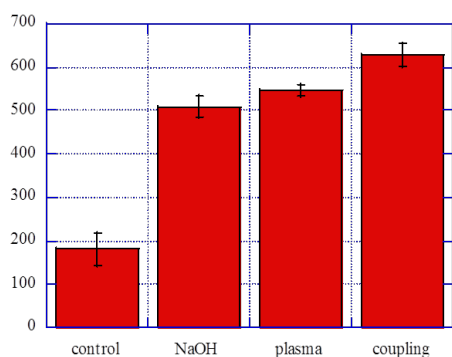


図 6 保水率の比較

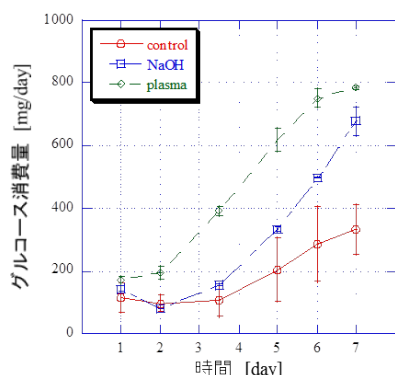


図 7 プラズマ処理とアルカリ処理の効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Niino, Hamajima, Montagne, Oizumi, Naruke, Huang, Sakai, Kinoshita, Fujii, "Laser sintering fabrication of three-dimensional tissue engineering scaffolds with a flow channel network" Biofabrication, (査読有り) vol. 3 (2011) p034104,
2. 新野, 「よく分かる RP (積層造形) の活用法 - 粉末焼結積層造形の基礎」素形材 Vol. 52 (2011) No. 10, pp46-51
3. NIINO, Haraguchi, Itagaki, "Feasibility study on plastic laser sintering without powder bed preheating," Solid Freeform Fabrication Symposium 2011 Proceeding, 査読有り (2011) pp17-29
4. Toshiki NIINO, Hitoshi HARAGUCHI and Yutaro ITAGAKI, Microstructural Observation and Mechanical Property Evaluation of Plastic Parts Obtained by Preheat Free Laser Sintering, Solid

Freeform Fabrication Symposium 2012 Proceeding, 査読有り (2012) pp 617-628

5. 新野俊樹, 酒井康行, 生体組織工学用担体の付加製造技術, 材料の科学と光学, 査読無し, Vol. 50 (2013) pp241-245 ISSN 1347-4774
  6. 新野俊樹, 付加製造の現状と可能性, レーザ加工学会誌, 査読無し, vol. 20 (2013) pp1-7, ISSN 1881-6797
  7. 新野俊樹, 付加製造による製品および生産設備製造適用 - アディティブの長所を生かした活用を考える, 機械設計, 査読無し, Vol. 58 (2014) pp20-27,
  8. 酒井康行, Pang Yuan, 新野俊樹, 堀本洋平, 安齋正博, マイクロ三次元流路ネットワークと小型チャンバーからなる組織再構築用担体, バイオインダストリー, 査読無し, Vol. 31 (2014) pp45-50, ISSN 0910-6545
  9. 新野俊樹, 金属の付加製造技術の最新動向と期待, 型技術, 査読無し, Vol. 29, (2014) pp 18-23, ISSN 0912-5582
  10. 新野俊樹, 付加製造 (Additive Manufacturing) 技術の概要, 成形加工 (査読無し) vol. 26 (2014) 142-147, ISSN 0915-4027, ISSN 0915-4027
  11. 新野俊樹, 付加製造技術への期待, 高分子 (査読無し) Vol.63(2014) 517-518, ISSN 0454-1138
  12. 新野俊樹, 付加製造技術 (Additive Manufacturing) と 3D プリンティング - 材料の付着をベースにした自動製造技術の魅力と可能性 - 粉体技術 (査読無し) Vol. 6 (2014) 1125-1131, ISSN 1883-3292
  13. 新野俊樹, Additive Manufacturing 現状と可能性, 機械学会誌 (査読無し) Vol. 118 (2014) 12-17, ISSN 0021-4728
- 〔学会発表〕(計 29 件)
1. Toshiki NIINO, Feasibility study on plastic laser sintering without powder bed preheating, Solid Freeform Fabrication Symposium 2011, 2011 年 08 月 08 日 ~ 2011 年 08 月 10 日, Austin TX USA
  2. 新野俊樹, 機能形状創製 ~ 高付加価値複雑形状を実体化する特殊加工法 ~, 2011 年度精密工学会秋季大会学術講演会 (招待講演), 2011/9/20-9/22, 石川県金沢市
  3. 板垣裕太郎, 新野俊樹, 無予熱での粉末焼結積層造形における造形物の機械強度の評価, 011 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2011/9/20-9/22, 金沢市石川県
  4. 原口仁志, 新野俊樹, 熱可塑性樹脂を用いた無予熱粉末焼結積層造形法の開発, 2011 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2011/9/20-9/22, 石川県金沢市
  5. 板垣裕太郎, 新野俊樹, 粉末焼結積層造形における熱履歴制御による造形物の組織制御 2012 年度精密工学会春季大会学術講演会, 2012/3/14-3/16, 東京都
  6. 原口仁志, 新野俊樹, 無予熱粉末焼結積

- 層造形に関する研究～レーザパラメータの影響についての考察～,2012年度精密工学会春季大会学術講演会, 2012/3/14-3/16, 東京都
7. Toshiki NIINO, Microstructural Observation and Mechanical Property Evaluation of Plastic Parts Obtained by Preheat Free Laser Sintering, Solid Freeform Fabrication Symposium 2012, 2012/8/6-8/8, Austin TX USA
  8. 原健太郎, 新野俊樹, 予熱を行わない粉末積層造形に関する研究～ポリプロピレンを用いた造形物の機械特性の評価～, 2012年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2012/9/4-9/16, 福岡県北九州市
  9. 原健太郎, 新野俊樹窒素を用いない無余熱造形の評価, 2013年度精密工学会春季大会学術講演会, 2013/03/13-3/15, 東京都
  10. 堀本洋平, 新野俊樹無余熱造形による細胞培養用の足場製作のための微細造形とその評価, 2013年度精密工学会春季大会学術講演会, 2013/03/13-3/15, 東京都
  11. Toshiki NIINO, Kentaro HARA, Florian DAVID and Susumu MORITA, Preheat Free and Slight Preheating Plastic Laser Sintering, Solid Freeform Fabrication Symposium 2013, 2013/8/12-15, Austin TX USA
  12. 原健太郎, 新野俊樹, 低温予熱造形の機械特性と微細性の評価, 2013年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2013/9/12-9/14, 大阪府
  13. 上原崇史, 新野俊樹, 高耐熱性樹脂を用いた低温予熱造形法による造形物の機械特性の評価, 2013年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2013/9/12-9/14, 大阪府
  14. 板垣裕太郎, 新野俊樹, アルカリ可溶性フィラ混合粉体のレーザ焼結造形における造形制度及び空孔率の評価, 2013年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2013/9/12-9/14, 大阪府
  15. 新野俊樹, 付加製造技術の現状と将来性, レーザ学会学術講演会第34回年次大会(招待講演), 2014/1/20-1/22, 福岡県北九州市
  16. 新野俊樹, 生体組織工学用積層造形, 日本材料科学会第5回医用・生体材料分科会(招待講演), 2014/3/8, 東京都
  17. 板垣裕太郎, 新野俊樹, アルカリ可溶性樹脂フィラを用いたレーザ焼結造形物の空孔率制御に関する研究, 2014年度精密工学会春季大会学術講演会, 2014/3/18-3/20, 東京都
  18. 原健太郎, 新野俊樹, 低温造形による造形物の特性評価, 2014年度精密工学会春季大会学術講演会, 2014/3/18-3/20, 東京都
  19. 上原崇史, 新野俊樹, 高耐熱性樹脂を用いた低温造形法による造形物の充填率向上について, 2014年度精密工学会春季大会学術講演会, 2014/3/18-3/20, 東京都
  20. 堀本洋平, 新野俊樹, アイランドスキャン方式を用いた樹脂レーザ焼結による造形物の機械特性の評価, 2014年度精密工学会春季大会学術講演会, 2014/3/18-3/20, 東京都
  21. 新野俊樹, 付加製造技術(三次元プリンター)の現状と展望, 第17回国際P2M学会研究発表大会(招待講演), 2014/4/19, 東京都
  22. 新野俊樹, 付加製造の現状と可能性, 第81回レーザー加工学会講演会(招待講演) 2014/5/27-5/28, 大阪府
  23. 新野俊樹, Additive Manufacturingの可能性, 第39回光学シンポジウム(招待講演) 2014/6/26-6/27, 東京都
  24. 新野俊樹, 付加製造による新しいモノづくり, 第132回微小光学研究会(招待講演) 2014/7/25, 東京都
  25. 新野俊樹, Additive Manufacturingを核にした新しいモノづくり-「3Dプリンタ」の未来像-, 第27回日本工作機械見本市(招待講演) 2014/10/30-11-4
  26. 新野俊樹, 付加製造技術の概要, 成形加工学会第145回講演会(招待講演) 2015/1/20, 東京都
  27. 新野俊樹, Additive Manufacturing技術の現所と展望, 第29回エレクトロニクス実装学会春季講演大会(招待講演) 2015/3/16-3/18, 東京都
  28. 上原崇史, 新野俊樹, PEEK (Poloyetheretherketone)の粉末床溶融結合造形, 2015年度精密工学会春季大会学術講演会, 2015/3/16-3/18, 東京都
  29. 堀本洋平, 新野俊樹低温予熱造形における露光方法の違いの効果と特性の評価, 2015年度精密工学会春季大会学術講演会, 2015/3/16-3/18, 東京都
- 〔図書〕(計2件)
1. 赤木誉志, プラスチック・エージ, PLASTICS AGE ENCYCLOPEDIA 進歩編 2013, 2012, 75 - 86
  2. プラスチック成形加工学会編, プラスチックエージ, 先端成形加工技術 II (2014) p223-272
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計0件)
  - 取得状況(計0件)
- 〔その他〕
- <http://lams.iis.u-tokyo.ac.jp>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
新野 俊樹 (NIINO TOSHIKI)  
東京大学 生産技術研究所 教授  
研究者番号: 70291929
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
無し