高代謝速度臓器再構築を目的とした3次元担体の水溶性フィラを援用した粉末焼結積層造形法*

—微細流路ネットワークが配置された生分解性ポリマ製多孔質体の造形—

新野俊樹** 成毛宏道*** 大泉俊輔† 酒井康行†† 黄紅雲†††

Fabrication of Three-dimensional Scaffolds for Regeneration of High-metabolic-rate Organs
by Selective Laser Sintering Using Water Leachable Filler

- Fabrication of Porous Bodies with Fine Flow Channel Network from Biodegradable Plastic -

Toshiki NIINO, Hiromichi NARUKE, Shunsuke OIZUMI, Yasuyuki SAKAI and Hongyun HUANG

Fabrication of very porous scaffold for regeneration of organs with high metabolic rate is reported. Polycaprolactone (PCL) powder was mixed with fine grains of sodium chloride as filler and SLS (Selective Laser Sintering) processed to develop an object including fine flow channel network. The object was rinsed with water to dissolve the salt, and a high porosity of 90% was successfully obtained. In addition, unsintered powder in the channels was effectively removed owing to disappearance of the filler. Through micro-CT observation, it was confirmed that channels of which diameter was smaller than 1mm were fabricated. Measurement for the amount of residual salt proved that the salt can increase salt concentration of culture media no more than 1% of that for physiological saline solution. Result of culture test is also reported.

Key words: laser sintering, solid freeform fabrication, scaffold, rapid prototyping, tissue engineering, regenerative medicine, liver reconstruction

1. 結 言

病気や事故や遺伝的な要因、また加齢や長期にわたる生活習慣によって自然治癒力のみでは回復できないほどの損傷や機能低下を来した臓器の回復に対する治療法としては、従来、人工の臓器、他人の臓器、外国では死体の臓器を移植する以外の選択の余地はなかった。コンタクトレンズは水晶体のレンズとしての機能を補助する人工臓器であり、補助すべき機能が単純であるため人工物でも十分な機能を発揮することができることから広く利用され、もっとも成功した人工臓器の例といえる。しかし一方、そのようなコンタクトレンズでも生体の全ての機能を有するわけではなく、何ヶ月も装着したまま過ごすことはできない。また、体内に埋め込むタイプの人工臓器では、異物に対する拒絶反応を完全に排除することは多くの場合難しく、材料を中心にまだまだ研究が必要である。他人の臓器の移植では、ドナー不足の問題を解決することはほぼ不可能であると同時に、死体からの臓器も含めて倫理上の問題も残る。

これに対して近年脚光を浴びている再生医療は、自分の細胞を培養して臓器や組織を再構築でき、適合性やドナー不足の問題を一気に解消できる治療法として期待されている¹⁾。臓器や組織の再構築を実現するための技術は、その素となる前駆細胞に関するものと、増殖された組織に形状付与するための担体(足場)に関するものと、増殖するための培養液や培養条件に関するものとの3要素から構成される(図1)。これまでに、皮膚などの平面的なものでは既に臨床レベルに技術が進んでおり、立体的なものでも骨などの比較的代謝速度が遅く必要とされる機能が少ないものでは、臨床に非常に近いレベルまで技術が進んでいる。立体的な組織の再生においては、多くの場合3次元的な形状を有する担体が必要となる。近年、担体の製作に自由形状造形法(Solid Freeform Fabrication, 以降SFF)を利用しようとする研究が盛んに行われている²⁻⁴⁾。SFFを利用する主な理由は3つある。まず第1に組織の形は自由形状であり、従来の除去加工で加工できることが保証されていない。第2に形状は個人によって異なるため担体はテーラーメイドすることが好ましいが、形状データはX線CTなどからデジタイズされたデータであり、このようなデータからの造形はSFFに適している。第3に組織には内部にも3次元構造を持つことがあり、このような内部構造は切削加工などの除去加工や変形加工では造形できないためである。

Fig. 1 Three elements of regenerative medicine

これまで骨などの代謝速度の小さいものの再生がほぼ実用レベルに達している^{5,6)}ことはすでに述べたとおりであるが、肝臓などの内臓器においてはその実現はまだ難しい。内臓器の再生が難しい理由はいくつかあるが、大きな要因として臓器の代

* 原稿受付 平成19年2月15日

** 正会員 東京大学生産技術研究所(東京都目黒区駒場4-6-1)

*** 学生会員 東京大学大学院(現、松下電器産業、大阪府門真市大字門真1006)

† 学生会員 東京大学大学院(東京都文京区本郷7-3-1)

†† 東京大学生産技術研究所

††† 東京大学大学院

謝速度が大きいことがある。生体臓器の細胞は、細かく分岐した毛細血管が細胞のすぐそばまで血液を運び、その血液から酸素の供給を受けることによってその代謝を維持している。平面上の培地の上に肝臓の細胞を増殖させてある程度の厚さが生じた場合、培地側には培養液からの供給が行われないため壊死が生じ、厚さ200 μm 以上に培養することはできないと言われている⁹⁾。Vacantiらはこのような問題を解決する方法として、毛細血管を模擬した流路構造を担体内に配置することを提案、ICプロセスを用いて毛細血管レベルの微細な2次元流路を作製し、それを積層することによって、3次元的な担体を作製して肝臓を完全に再構築することを目指している⁸⁾⁹⁾。一方、本論文の共著者である酒井らは、2次元網目構造の積み重ねでは無く、3次元的な網目構造の流路をできるだけ微細になるよう作製し、粗い流路でも培養できる程度までの細胞密度までin-vitroで培養し、その後は幹細胞の再生能力に期待しin-vivoで培養することの可能性を探ろうとしている¹⁰⁾。これまでに機械加工により細穴を加工した薄いシートを積層したり、光造形による作製を試みてきたが、機械加工では積層厚さを薄くすることに限界があり、設計の変更も難しいこと、光造形では樹脂の変更が難しいことなどの問題があった。そこで本研究では、多くの材料が有する熱可塑性を利用して造形を行う造形法の中で、比較的高い微細性が得られる粉末焼結積層造形法を利用して高代謝速度臓器を再生するための担体を製作することを目指す。本報では、その最初の段階として、流路ネットワークを有し、かつ高い空孔率の担体を造形するための手法として、水溶性フィラを用いた造形方法を提案し、担体の試作を行う。試作した担体のX線CT観察や残留フィラ量などの評価とともに肝細胞の培養の基礎試験を行い、その利用可能性を評価する。

2. 担体造形の要件と問題点

2.1 担体造形の要件

担体は細胞の増殖する位置を案内することによって再構築される組織に形状を付与しつつ、最終的には全体が培養された細胞で満たされる必要がある。すなわち担体は高い空孔率を有する多孔体であることが望ましく、通常90%以上の空孔率が必要とされている。

また前述したように、担体には培養されている細胞に酸素を供給するための流路が配置されていなければならない。酒井らは、肝臓の再構築を目標として正四面体を積み重ねたような、分岐と合流を繰り返す3次元網目構造の流路(図2)を提案しており、正四面体の各辺の長さや流路径については、各流路中の培養液が酸素で飽和して流路から先は拡散によって供給されると仮定して、担体内の細胞密度が生体肝の1/10とした場合、

Fig. 2 Flow channel network in accumulated tetrahedron structure

流路から最も離れた場所の細胞に十分な酸素を供給するためには、辺の長さや流路径がそれぞれ510 μm と1080 μm 以下である必要があるとしている¹⁰⁾。

さらに再構築が完了後は足場として利用された担体が消滅することが好ましく、多くの研究において、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン等の生体吸収性ポリマやそれらの共重合体が利用されている。

2.2 担体造形の問題点

粉末焼結積層造形法では、100 μm ~200 μm 程度の厚さで粉末を積層し、必要な部分だけをレーザーで加熱して粒子どうしを焼結(融着)して目的の形状に造形する。融着をする際、各粒子が十分に熔融して液状化されていれば、粒子間の空間はほぼ完全に充填され、充填率は100%近くまで向上する。また、粒子の表面のみが熔融もしくは軟化している場合でも、重力と表面張力によって、空隙部の体積は溶着前よりも小さくなる。すなわち、造形物の空孔率は、造形装置内で積層されたが焼結されていない粉末(以降ケーキ)の密度よりも低い。ケーキの空孔率は、粉末粒子の材質、形状、粒度分布また、粉末を供給する方法によっても影響を受けるが、筆者らがローラを用いた粉末供給機構で積層したポリアミド12粉末(DuraForm™ PA, 3D Systems製)のケーキの充填率は40%¹²⁾、すなわち空孔率は60%で、樹脂の材質を生分解性のものに変更したり形状を変更するだけで要求されている90%を達成できるとは想像しにくい。

また、粉末焼結積層造形法においては、レーザーによる焼結プロセスが終了した際、造形物は未焼結樹脂粉末に埋まっており、造形物の周りの未焼結樹脂を取り除かなければならないが(以降ブレイク作業)、本研究の担体のように微細で複雑に折れ曲がった流路から未焼結粉末を取り除くことは実質的に不可能である。

さらに、粉末焼結積層造形法は熱可塑性の多くの材料から造形することが原理的には可能であるが、高性能な造形物を得るためには様々な材料開発が必要である。粉末焼結積層造形や光造形法など流動性のある材料を選択的に固化して立体形状を得るタイプの積層造形手法では、ほとんどの材料において固化の際に材料の収縮が生じることから、既に収縮した物の上に新しい層が収縮しながら積層されるため、造形物をカールさせようとする応力が発生し(図3)、カールが積層厚さ以上になるとリコータやローラと干渉して造形そのものが破綻する。市販の粉末焼結積層造形用の粉末では、このような状況に陥らないような熱的な特性が詳細に制御されている¹³⁾。

Fig. 3 Curl distortion by layer by layer shrinkage

3. 水溶性フィラを援用した高空孔率担体の造形方法

3.1 水溶性フィラを援用することによる空孔率の向上

以上のような問題を解決するため、本研究では担体の素材となる粉末と水溶性のフィラを混合したものを材料として粉末焼結積層造形を行い、造形終了後にそのフィラを水によって溶出する方法を採ることとした。水溶性のフィラを用いる方法は、SFFのひとつである3D Printing(以降3DP)法を用いた方法

でも利用されたが¹¹⁾、粉末焼結積層造形が熱で樹脂を融着しているのに対し、3DP法では樹脂の有機溶媒を用いて溶着しており、培養の際の毒性への懸念を完全に排除することができない。

また、本方法にはフィラの溶出によって担体の空孔率が向上する以外にも以下に示すような効果が期待できる。

3.2 流路内からの未焼結樹脂の排出の促進

粉末焼結積層造形法では未焼結樹脂を取り除くブレイク作業が必要となるが、複雑に折れ曲がった流路に詰まった未焼結樹脂を取り除くのは実質的に不可能である。ところが、水溶性のフィラを利用した造形の場合、図4に示されるようにフィラが溶出したことにより、粉末の可動性が向上するとともに、流路内に実際に水などを流すことができるようになるため、未焼結粉末の排出が促進されることが期待できる。

3.3 カールの抑制

粉末焼結積層造形される材料中に、焼結される樹脂よりも焼結時の温度変化による熱膨張や収縮が小さく、剛性も高いフィラが含まれていると、樹脂の収縮によって内部応力が生じても、変形の少ないフィラが応力を受けるために、順次焼結されていく各層の収縮が小さくなり、結果としてカールが低減される。このため、熱的な設計が最適化されていない材料でも、比較的容易に破綻することなく造形することができる。

4. 担体の試作

4.1 試作担体のデザイン

図5に酒井らの概念に基づき試作した担体の基本構想図を示す。図5(a)は試作担体内に配置された流路ネットワークの上半分の基本構造図である。流路ネットワークは正四面体の稜を6段積み重ねた構造となっている。今回試作に使用した装置等の制限から(後述)、流路の径と稜の長さはそれぞれ1mmと3mmとした。また、分岐合流部の太さは2mmとした。担体全体は紡錘形をしており、流路ネットワークは図5(b)のように配置されており、上部と下部にそれぞれ灌流培養液の注入口と排出口が設けられている。担体の全高および最も太い部分の直径はそれぞれ46mmと30mmである。

Fig. 4 Enhanced removal of not sintered powder from narrow flow channel

4.2 材料

担体となる樹脂材料にはポリカプロラクトン(プラクセルH5, ダイセル化学製, 以降PCL)を利用した。本樹脂の分子量, 融点, 分解温度および密度は, それぞれ 50,000, 60°C, 230°C, 1.14g/cm³である。本樹脂は製造メーカーから射出成形用のペレットの形で供給され, PCL との相溶性の低い媒中で分散することによって, 平均粒径 50μm の球状粉末を得た(トリアル製)。フィラには食塩を標準ふるいによって 100μm から 150μm の間にふるったものを利用した。図6, 7に, PCL 粉末と食塩粉末の拡大写真を示す。造形にはこれらの粉末を重量比 1:4 に混合した物を用いた。さらに, 粉末の凝集を低減するため, ナノシリカ(日本エアロゾル製)をPCLに0.4%(w/w)添加した。

(a) Upper half of flow channel network

(b) CAD data for prototype scaffold.

Fig. 5 Schematic views of scaffold

Fig. 6 Optical micrograph for PCL powder

Fig. 7 Optical micrograph for sodium chloride used as filler in prototyping of scaffold

4.3 造形装置およびプロセスパラメータ

図8に、高い空隙率を有する多孔質体を造形するためのプロセスを示す。粉末焼結積層造形にはCO₂レーザー（波長10.6μm）を光源とする造形装置（Semplice（試作バージョン）、アスペクト製）を用いた。本装置において、レーザーは粉末上で直径500μmに集光されており、粉末の表面は50°Cに制御されている。積層厚さ、レーザーパワー、走査間隔、スキャン速度に関しては、細径の鉛直穴を造形する予備試験を行って実験的に決定した。以上のパラメータがそれぞれ100μm、4.9W、0.10mm、3433mm/sの時に、直径0.5mm長さ3mmの鉛直穴を造形できたため、この値を造形パラメータとした。焼結終了後は担体外側の未焼結樹脂を取り除き、フィラの溶出を行った。まず2時間流水に晒したのち、超音波洗浄を10分行いさらに流水に10時間晒した。

5. 担体の評価

5.1 形状の確認

図9、10に試作した担体の外観と表面の拡大写真を示す。外形寸法をノギスにより計測したところ高さ46.0mm、最大太さ部の直径30.0mmとなった。見かけ体積及び質量はそれぞれ、13cm³と1.7gとなり、これらの値とPCLの真実密度から計算される空隙率は90%となった。担体の表面にはフィラが溶出したためにできたと思像される空隙が存在している。

試作した担体内部の流路をマイクロX線CT（島津製作所SMX-225CT）で観察した。撮像のコントラストを向上するために、造影剤（オムニパーク300、第一製薬を5倍希釈したもの）に一度浸し、ティッシュペーパーで流路に残留した造影剤を取り除いた後に観察を行った。図11、12にX線透過像と再構築断面

Fig. 8 Process for fabricate porous object

Fig. 9 Photo for developed scaffold

像を示す。再構築断面像を観察したところ流路につまりはなく、

Fig. 10 Close-up photo for surface of the developed scaffold

未焼結粉末の良好な排出が確認された。画像から平均的な流路径を計測したところ流路部で0.9mm、接続部では1.7mmであった。

5.2 フィラ溶出の確認

使用したフィラとして利用した食塩が十分に溶出可能かどうか確認するために、溶出操作前の担体を200cm³の純水に漬け、2時間ごとに塩分濃度を測定して純水を交換する実験を行った。表1に示されるように食塩濃度は毎回低下し4回目の交換時には $5.1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ まで低下した。この値は生理的食塩水の濃度、 $1.5 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$ (0.9%w/w)に比べ、十分低い値である。また、前述の溶出操作後の担体を粉碎し、純水に投入、純水の電気伝導度の変化から食塩濃度を測定し、その濃度から担体中に残留していたと考えられる食塩の量を算出したところ0.7mg以下であることが分かった。これと等しい量の食塩が瞬時に担体と同等の体積の水に溶け出したと仮定すると、その濃度は $5 \times 10^{-3} \%$ (w/w)であり、生理的食塩水のその1/100以下である。

5.3 灌流培養

試作した担体の有効性を確認するため、この担体を使用してヒト肝癌由来上皮細胞（Hep G2）の灌流培養試験を行った。比較のために、今回作製した担体の他に、同形状で流路のない担体、多孔質薄板に機械加工で穿孔したものを積層したものの培養結果を表2に示す。流路がないものと比べ流路があるものの方が明らかに良好な培養結果が得られている。また、機械加工による担体では14日の培養で細胞数が1.6倍に増加しているのに対して、今回の試作担体では11日間の培養で1.9倍の細胞数

Table 1 Variation of Salt Concentration

Rinse Time	[hours]	2	4	6	8
Salt Concentration	[mol/l]	5.5×10^{-1}	6.6×10^{-4}	1.1×10^{-4}	5.1×10^{-5}

Fig. 11 X-ray transmission image of the scaffold. Cross sectional views at lines (a) through (d) are shown in Fig. 12

Table 2 Cell Growth obtained by using various scaffolds. Perfusion culture was performed for 11days and 14days using SLS processed scaffolds and drilled one, respectively

Fabrication Method of Scaffold	Number of Cells [million]		Cell Growth [times]	Cell Density [$10^6/\text{cm}^3$]
	First Day	Day 11/14		
SLS with channel	53.0	99.4	1.9	7.6
SLS without channel	58.0	53.5	0.9	4.1
Drilled channel	6.0	9.6	1.6	7.2

の増加が得られた。また、肝機能の指標となるアルブミン合成量に関しては、培養 11 日目において、細胞 100 万個あたり $6.3\mu\text{g}/\text{day}$ が得られている。この値は前述の機械加工の担体に比べて 6 倍の性能である。また、細胞密度 $7.6 \text{ million cells}/\text{cm}^3$ は、生体肝の 3%に相当する。

6. 考 察

本研究では、微細流路ネットワークを有する培養担体の粉末焼結積層造形を試みた。今回得られた流路の微細性ではヒト生体肝と同等の細胞密度を達成するには至っていないが、市販の粉末焼結積層造形装置のスポット径が今回使用した装置と同等の $500\mu\text{m}$ 程度であることを考えれば、市販造形装置でこれ以上の造形分解能を得ることは求めにくい。一方、Regenfuss¹⁴⁾らは $1\mu\text{m}$ 程度に集光された YAG レーザを用いて、厚さ $20\mu\text{m}$ の薄い壁を造形することに成功しており、今後造形装置の改良を行うことにより、担体に要求される造形分解能が得られることが期待できる。

7. 結 言

高代謝速度臓器の in-vitro 再構築を目指し、生分解性樹脂の担体を粉末焼結積層造形法によって造形することを試みた。通常の粉末焼結積層造形法には、

- (1) 材料設計やプロセスパラメータの選定に多くの時間と労力を必要とする。
- (2) 担体に要求される空孔率が得られない。
- (3) 微細流路ネットワーク内の未焼結粉末を取り除けない。

の問題があったが、これを解決するため、水溶性のフィラを樹脂粉末に混合して造形を行い、その後溶出するという方法を提案した。実際に PCL 粉末と食塩粉末を重量比 1 : 4 の割合で混

Fig. 12 Reconstructed cross sectional views at lines shown in Fig. 11. Height of each slice from the center of the scaffold is referred by z

合したものを使用して試作を行い、①格別な材料設計を行うことなく造形でき、②空孔率 90%の担体が得られ、③担体内に配置された微細流路ネットワークが造形され内部の未焼結粉末が排出されていることも X 線 CT 観察によって確認された。また、試作した担体中の残留食塩量を評価したところ、残留食塩による培養液の食塩濃度の増加量は、生理的食塩水の濃度のたかだか 1/100 であることも確認された。さらに培養試験を行い、流路を配置することの有効性と、従来の工法によって試作された担体に対する優位性を確認した。また、本報で試作した担体は流路の微細性において要求を十分に満たすものではなかったが、微細性だけについてみれば要求を満たすような文献もあり、十分な微細性を有する担体の実現の可能性もある。

今回生体肝の 3%の細胞密度が得られたが、今後この値の向上を目指すとともに、in-vivo 培養への移行およびそれによる微細構造の再構築の実現可能性も含めて研究を行っていく。

参 考 文 献

- 1) 立石他:図解 再生医療工学, (2004) など。
- 2) Yeong, W. Y. et al: Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential, *TRENDS in Biotechnology*, **22**, 12 (2004) 643.
- 3) Landers, R. et al: Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *J Mater Sci*, **37**, 15 (2002) 3107.
- 4) Sun, W. et al: Computer aided tissue engineering part I: overview, scope, challenges. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **39** (2004) 29.
- 5) Sun, W: Recent development on computer aided tissue engineering -a review. *Comp Method Prog Biomed*, **67** (2002) 85.
- 6) Das, S. et al: Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, **26**, 23 (2005) 4817
- 7) <http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/geka/research/reconst/clinical%20data/index.html>
- 8) Kaihara, S. et al: Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng*, **6**, 2 (2000) 105.
- 9) Vacanti, JP. et al: Translating technologies to build whole vital organs. *Tissue Eng*, **8**, 6 (2002) 1114.
- 10) Sakai, Y. et al: A novel poly-L-lactic acid scaffold that possesses a macroporous structure and a branching/joining three-dimensional flow channel network: its fabrication and application to perfusion culture of human hepatoma Hep G2 cells, *Mat Sci and Eng C*, **24**, 3 (2004) 379.
- 11) Kim, SS. et al: Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels. *Ann Surg*, **228**, 1 (1998) 8.
- 12) 新野他: 粉末焼結積層造形法における供給粉末密度向上に関する研究, 2005 年度精密工学会秋季大会学術講演会論文集 (2005) 1009.
- 13) ディケンズ他, 特許 3621703.
- 14) Regenfuss, P. et al: Industrial freeform generation of microtools by laser micro sintering, **11**, 1 (2005) 18.