マイクロ光造形法への細胞適合性付与プロセスの開発

Development of Microstereolithography with Cytocompatibility

生田幸士（正会員）*, 田中訓史, 安藤豊, 井上佳則
名古屋大学工学研究科マイクロナノシステム工学専攻

Koji Ikuta Ph.D*, Tokifumi Tanaka, Yutaka Ando, Yoshinori F. Inoue
Department of Micro/Nano Systems Engineering, Nagoya University

Abstract

The microstereolithography, which was one of the pioneering 3D-microfabrication technology, was developed by Ikuta in 1992. In microstereolithography, 3D structures were made by micro solidification of photo curable resin irradiated by ultraviolet laser. But commercial resin for microstereolithography had a lack of biocompatibility, so it was impossible to apply the microstereolithography to biomedical devices which touched directly cells or living organisms. In this paper, new type photo curable resins were not developed, but new methods applying cytocompatibility to commercial photo curable resin which stably had a precise resolution were challengingly investigated. The cytotoxicity was examined on various conditions, and the cytocompatibility was evaluated quantitatively. Eventually, parameters of the process that cell culture even in microstereolithographic wells could proliferate in equal rate with a commercial tissue culture polystyrene dishes were discovered. This process did not limited a shape of structures. Moreover, although the transformation under heat-treatment of macro structures would happen, the advantage of scaling law for microstructures in which transformation under heat-treatment did not happen was taken. It was shown to applied to various photo curable resin. This process could be a basic key technology to accelerate exponentially application researches in biochemistry, biology and biomedical field of microstereolithography.

Key words

Microstereolithography biocompatibility polymer 3D-fabrication.

1. 緒論

マイクロ光造形法は光硬化性樹脂にレーザー照射して任意の立体的なマイクロ構造を作製可能な微細加工の手法である。1992年、生田らにより世界で初めて5 μ mの三次元分解能が達成され¹⁾, その後多くの研究が展開されてきた²⁾。さらにサブミクロンの分解能を

有したナノ光造形法も開発されている。近年では微細管路内で化学反応や分析を行なう μ -TASやMEMSデバイスの開発に応用も試みられ始めている³⁾⁴⁾⁵⁾。

しかし、市販されている光造形樹脂には生体適合性がないため、生体や細胞に直接接触するデバイスには使用できないという根本的な問題があった⁶⁾⁷⁾⁸⁾。

この問題を解決するため、生体適合性を持ち、かつ十分な硬化特性と硬化精度を有する新規の光硬化性樹脂を開発する研究アプローチではなく、光硬化特性が保証され、特性が安定している市販のエポキシ系光造形樹脂に細胞適合性を付与するという、より汎用性と実用性にこだわった研究アプローチに挑戦した。

従来、光造形物が直接細胞や生体と接触する応用と

* 名古屋大学工学研究科マイクロナノシステム工学専攻
464-8603 愛知県名古屋市中区不老町航空機械実験棟 3F
生田研究室

しては、以下の研究が存在する。

第1の研究は、細胞毒性の高い光重合開始剤を避け、caprolactone や poly (propylene fumarate) などの生分解性の高分子を素材に使用して光造形を行なう手法である⁸⁻¹¹⁾。この手法は樹脂の合成工程や調合工程が不可欠となる。さらに、再生医療用の生分解性の細胞の足場作製を目的にしているため、本論文の目的である非分解性のデバイスには適用できない。

第2の研究は、Polyethylene glycol などの hydrogel を材料に細胞の足場を作製する手法である^{7,13)}。hydrogel の表面や内部で細胞培養が可能であることが報告されているが、hydrogel は強度が低いため、デバイス作製には適用困難である。さらに、乾燥収縮に起因した加工精度の問題もあり本論文の目的を満たさない。

第3の研究は市販の光造形樹脂を用いて立体的な格子構造の表面に細胞を培養した研究がある。しかし平面構造での細胞培養には失敗している¹⁴⁾。

以上の研究結果から、われわれは光造形物の細胞毒性は光造形物に含まれる未硬化のモノマや光重合開始剤であると推定した。未硬化のモノマの重合を促進し、かつ光重合開始剤の影響を抑える目的で、各種の「ポストキュア」(光造形後にさらに重合硬化を進行させることを意味する)によって、細胞毒性を抑制する手法を検討した。

2. ポストキュアによる細胞適合性化実験

光硬化後にさらに樹脂の重合度を向上させるポストキュアの細胞適合性への影響を調べる実験を行なった。

2. 1 材料と方法

光造形法：光造形法とは微細加工法の一つであり、三次元形状を光硬化性樹脂で作製する。本研究では自由液面法とスキージ法を利用するタイプのマイクロ光造形法を用いた。

マイクロ光造形法の手順は以下のようである。

1. 三次元 CAD に三次元造形モデルを設計データを元に入力する
2. 三次元造形モデルを Z 軸に水平な面で切り取った n 層の X-Y 平面データに変換する
3. 1 層目から X-Y 平面でレーザーを走査させて樹脂を硬化させる
4. 1 層レーザーの走査が終わる毎に次の未硬化樹脂層

Fig.1 Scheme Image of Microstereolithography.

を張り、n 層まで繰り返す (Fig.1)。

以上の行程で作製された光造形物は、超音波洗浄機にて Glycol ether ester 中で 3 分、その後引き続いて 99.5% Ethanol 中で 3 分間洗浄した。光造形物はその後デシケータ内で保管した。

マイクロ光造形装置の光源には He-Cd レーザ (325nm, KIMMOM KOHA Co., Ltd.) を用いた。

光造形で使用した各条件はレーザーパワー 15mW, レーザスキャン速度 800mm/s, スキャン間隔 15 μ m, 積層間隔 100 μ m でおこなった。

光造形法を用いて作製した培養容器での細胞適合性を評価するために細胞培養容器を作製した。細胞培養容器は W.D.16mm, I.D.15mm, 底面厚さ 0.8mm, 高さ 2mm で作製した。

光硬化性樹脂：光造形にはエポキシ系の汎用光硬化性樹脂 (SCR-751, D-Mec : 臨界露光量 20mJ/cm², 硬化後のガラス転移温度 108℃) を使用した。

細胞培養：神経毒の評価の際にモデル細胞としてよく用いられるラット褐色腫由来細胞株 (PC12, RBC0009, Riken Cell bank, Tsukuba) を使用した¹⁵⁾。使用培地は DMEM (MED-006, IWAKI) +10% Fetal Bovine Serum +10% Horse Serum で、 5.1×10^2 cell/mm² に細胞懸濁液を調整し、37℃, CO₂ 5% 環境で培養をおこなった。

ポジティブコントロールは 96well MicroWellplate (3860-096, IWAKI) で培養した。

経過観察と計数および評価：マイクロ光造形で作製した培養容器内に播種した細胞の観察は位相差顕微鏡でおこなった。培養容器底面の中心から 3, 4, 5, 6mm の位置で位相像を撮影した。この写真から細胞の形態を観察し、細胞密度を計測した。初期濃度の分散の影響を低減させるために、細胞増殖率とポストキュアの条件の関係を評価した。細胞増殖率 γ は、播種後 1 時間後の細胞密度 x と、48 時間後の細胞密度 y を測定し、 $\gamma =$

$y/x \times 100$ で算出した。

細胞適合性：本報で検討する細胞適合性とは，光硬化性樹脂の表面に細胞が接着し，増殖することと定義する。

統計：得られた細胞増殖率のデータは student's t-test を用いて統計処理をおこなった。ポジティブコントロールと比較して $\alpha < 0.05$ において有意に差があるとした。各条件のサンプル数は $n=12$ である。

2. 2 ポストキュア手法の検討

重合反応を完全に終了させるために後工程を行なうポストキュアには，マイクロ光造形終了後に水銀ランプ等にあてる「後露光法」と環境温度をあげて硬化を促進させる「ポストベイク法」の2種類がある。

本研究ではマイクロ光造形法で作製した培養容器を，後露光とポストベイクの両者を併用したポストキュア処理を行なった。具体的には造形終了後 Xenon ランプ (L2423, Hamamatsu Photonics) に1時間露光する。その後さらにオープン (DRD360DA, Advantec) で R.T. (室温), 150, 175, 200℃の温度で 0.5, 3, 6, 9, 12,

24 時間の各条件で処理をおこなった (Table1:1~20)。これら培養容器は，細胞培養試験に使用する前に滅菌のために UV ライト下で1時間滅菌処理してから培養試験に使用した。

2. 3 実験結果

後露光とポストベイクを経た光造形培養容器はうすい褐色に変色していた。ポストキュア前の光硬化時点の樹脂はうすい黄色の透明であるが，ポストベイクの温度が高いほど，また加熱時間が長くなるほどに褐色が濃くなり光の透過性が低くなっていた。

培養実験の結果は以下である。

- 1) ポストキュア処理を行なわなかった光造形培養容器内では3時間後に大半の細胞は死滅した。
- 2) Fig.2 に示すように光造形培養容器にポストキュアをおこなったサンプルでは，条件により細胞の生存が確認された。48 時間後に Fig.2-P に示すようにポジティブコントロール群では細胞がほぼコンフルエントになり，同様に 175℃で 24

Table 1 Experimental parameters of postcure processes.

	Resin type	Fabrication method	Post-Cure			Ultraviolet Spectrometry
			Post-Exposure	Post-Bake		
				Temperature(°C)	Time(hour)	
1	SCR751	stereolithography		R.T.		○
2	SCR751	stereolithography	○	R.T.		
3	SCR751	stereolithography	○	150	0.5	
4	SCR751	stereolithography	○	150	3	
5	SCR751	stereolithography	○	150	6	
6	SCR751	stereolithography	○	150	9	
7	SCR751	stereolithography	○	150	12	
8	SCR751	stereolithography	○	150	24	
9	SCR751	stereolithography	○	175	0.5	
10	SCR751	stereolithography	○	175	3	
11	SCR751	stereolithography	○	175	6	
12	SCR751	stereolithography	○	175	9	
13	SCR751	stereolithography	○	175	12	
14	SCR751	stereolithography	○	175	24	
15	SCR751	stereolithography	○	200	0.5	
16	SCR751	stereolithography	○	200	3	
17	SCR751	stereolithography	○	200	6	○
18	SCR751	stereolithography	○	200	9	
19	SCR751	stereolithography	○	200	12	
20	SCR751	stereolithography	○	200	24	
21	SCR751	Xe lamp & casting		R.T.		
22	SCR751	Xe lamp & casting		200	6	
23	SCR701	Xe lamp & casting		R.T.		
24	SCR701	Xe lamp & casting		200	6	
25	SCR11120	Xe lamp & casting		R.T.		
26	SCR11120	Xe lamp & casting		200	6

Fig.2 Micrographs of cell culture 48hours after seeding: Upper line images show cell culture on Microstereolithographic wells which were postbaked at 150 degrees for 6hours(a-1) and 12hours(a-2). P shows positive control cell culture on TCPS. b-1, b-2 and b-3 were postbaked at 175 degrees for 6, 12 and 24hours. c-1, c-2 and c-3 were postbaked at 200 degrees for 3, 6, 12hours. Cell proliferation rate of b-3, c-2 and c-3 were almost same in statistics. All bars are 50 μ m.

時間以上加熱した条件, および 200℃で 6 時間以上加熱した条件で細胞がコンフルエントに達していることが観察された. (Fig.2-b-3, c-2, c-3)

3) **Fig.3(a)** に示すようにポストベイクの温度が 150℃では加熱時間によらずポジティブコントロールの細胞増殖率との間には有意な差が認められた.

4) **Fig.3(b)** に示すようにポストベイクの温度が 175℃では 30 分から 12 時間加熱の条件の細胞の増殖率はポジティブコントロールと有意な差が認められたが, 24 時間の加熱を行なった条件では差は認められなかった.

5) 200℃のポストベイクをした条件では **Fig.3(c)** に示すように 6 時間以上の加熱をした条件でポジティブコントロールと細胞増殖率の差が見られなかった.

以上の結果から, 加熱時間が最短で, 市販の細胞培養ディッシュと同じ増殖率を得るポストベイクの条件は 200℃, 6 時間であることが示された.

3. 光造形物からの溶出物の検定

前章の実験により, 重合開始剤を除去することが細胞適合化の条件であるとする独自の仮説に立脚したポストキュアの有効性と, その条件が明確になった. こ

Fig.3 Cell proliferation rate of cells on Post bake stereolithographic well 48hours after seeding: * means that there were not significant difference compared with cell proliferation rate of positive control in student's t-test. ($\alpha = 0.05$)

れを, より精密に検証するため, 光造形物からの溶出物質の検出の有無を確認した.

3. 1 材料と方法

マイクロ光造形法を用いて, 表面 496.8mm² 体積 135.9mm³ の培養容器形状を作製した. その他の条件は 2. 1 に同じである. この培養容器を前章で明確となった最適条件である 200℃, 6 時間のポストベイクによるポストキュアを行った.

比較のためポストキュア処理培養容器と, 未処理培養容器を 5mL の milliQ 水にそれぞれ 1 つ (Vol.=135.9mm³) と 2 つ (Vol.=271.8mm³) の条件で 40 時間浸けた. こ

Fig.4 Ultraviolet absorption spectrum.

の水を紫外吸収分光器 (BioSpec-1600, Shimadzu Corporation) を用いて吸光度を測定し、吸収スペクトルを得た。吸光度は水の吸収スペクトルが 0 になるように補正した。光路長は 1cm で測定した。

3. 2 実験結果

Fig.4 に示すようにポストキュアを施さなかった光造形培養容器を浸した水からは、249nm と 200nm 近辺にピークを持つ吸収スペクトルが検出された。光造形樹脂の体積が多くなると吸光度が大きくなり、すなわち溶出物の濃度が高くなった。

一方ポストキュアをおこなった光造形培養容器を浸した水からは、これら 2 つのピークは検出されなかった。以上の結果は溶出物が細胞増殖を阻害していることを示しており、われわれの仮説と解決策が正しいことを証明するものである。

4. ポストキュアの汎用性検討

次に本ポストキュア手法が他種の光硬化樹脂にも有効であるかを実験的に検討した。

4. 1 材料と方法

前述の SCR751 に加え、エポキシ系の汎用、耐湿光硬化性樹脂 (SCR-701, D-Mec : 臨界露光量 33mJ/cm², 硬化後のガラス転移温度 81℃) およびエポキシ系の耐水靱性光硬化性樹脂 (SCR11120, D-Mec : 臨界露光量 12mJ/cm², ガラス転移温度 43℃) のこれら 2 種類を加えた 3 種類の樹脂を Xenon ランプで硬化させ培養試験に使用した。

3 種の光硬化性樹脂をそれぞれシリコンゴムの鋳型に光硬化性樹脂を流し込み ϕ 16mm 厚さ 0.8mm の円形プレートを Xenon ランプで露光、硬化させた。その後ポストベイクを 200℃, 6 時間行なって細胞培養試験をおこない (Table1:21-26), 細胞播種後 48 時間後

の細胞の様子を位相差顕微鏡像で観察した。

4. 2 実験結果

試料のエポキシ系光造形樹脂はどの種も、ポストキュアをおこなわずに細胞培養試験をおこなうと細胞がプレート表面に接着できずに死滅していた (Fig.5: d,e,f-1)。一方、ポストキュアをおこなった場合、実験に使用した 3 種類すべての光造形樹脂のプレート上で細胞が生存していた (Fig.5:d,e,f-2)。この結果から、ポストキュア処理の汎用性が実証された。

5. 考察

エポキシ系光造形樹脂に細胞適合性を付与するためには光造形物を 200℃で 6 時間のポストキュアおこなえばよいことが明確になった。これはマイクロ光造形法で作製した光造形物に直接細胞を接着させて市販の細胞培養皿と同等の培養に成功した世界で初めての成果である。200℃よりも高い温度でポストベイクをおこなうと光造形培養容器内が観察困難なほどに褐色に変色した。変質を最小限にするため、最短時間での光造形物への細胞適合性を付与するプロセスは 200℃ 6 時間であった。

Popov らは光硬化性ポリマと Hydroxyapatite 複合体の光造形物から炭酸ガスの超臨界洗浄を用いて細胞毒を取り除いたと報告している⁸⁾。また, Arcaute らは光重合開始剤の濃度と細胞毒性の相関を報告している¹³⁾。Lee らは光造形樹脂で作製した足場の形状で細胞活性が変動すると報告している¹⁴⁾。しかしこれらの報告は通常の培養法で得られた細胞活性と比較されているわけではなく、培養成績が向上する 1 つの条件を提

Fig.5 Micrographs of cultured cells 48hours after seeding: (d) cell cultured on SCR751, (e) on SCR701 and (f) on SCR11120. Upper line (suffix number 1) images show cell culture on non treatment photo curable resin, so cells did not adhere on the resin. Bottom line (suffix number 2) images shows on postcured photo curable resin in 200 degrees postbaked for 6hours. Bars are 50μm.

示しているにすぎず、日常的に用いられている細胞培養ディッシュと遜色のない細胞適合性を達成した本研究の成果とは比較すべきものではない。

本論文で用いたポストベイク温度は光造形樹脂のガラス転移点を超えており、荷重がかかった状態や自重が重い構造の場合はポストベイク行程で形状が変形する可能性がある。しかし、マイクロ光造形法の場合、数ミクロンから 1mm 程度の微小構造の作製が主体となる。このような微小領域では、「スケール効果」により重力などの体積力が表面積力に比べ作用が小さくなるため、ポストキュア処理での熱変形は大幅に小さくなる。そのため本手法はマイクロスケールでは対象物の形状に制限がなく様々な応用が可能になる。

Fig.4 に示すように、ポストキュアにより光造形物から水への溶出物が激減することが紫外線分光法によって観測された。本論文の最初に立てた仮説である「未硬化モノマや光重合開始剤といった低分子が、ポストキュアによって溶出しなくなる」を裏付けるデータとなった。

3 種の市販エポキシ系光造形樹脂にすべて同じ条件で細胞適合性を付与できた。この試験によって本手法の妥当性と一般性が示された。

6. 結論

光造形物に細胞適合性を付与する汎用的手法を開発しその有効性を示した。本手法によって光造形物は市販の細胞培養ディッシュとほぼ同じ水準の細胞適合性を持つことを定量的に検証した。また、ポストキュア工程で光造形物内部の組成が変化したことを紫外線分光法により明らかにし、細胞毒性低減の原因を示した。他の光硬化樹脂に用いた検証実験を行ない、本手法が種々の樹脂で有効であることを示した。

本研究の成果はこれまで不可能であったマイクロ光造形法を用いたテーラーメイド体内埋込デバイスの設計や、三次元配置された細胞デバイス、化学 IC チップなどのマイクロ化学デバイスの細胞応用が可能になる。生体医用分野に新しい応用の道を拓くキーテクノロジーとなる。

謝辞：本研究は JST 戦略的創造研究推進事業 CREST「光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究」、文部科学省研究拠点形成費等補助金 21 世紀 COE プログラム「情報社会を担うマイクロナ

ノメカトロニクス」の援助を受けておこなわれた。また、本研究室の池内真志博士研究員、元研究員山田章博士には有益な助言を受けた。ここに記し感謝の意を表する。

文献

- 1) Ikuta K, Hirowatari K. Real three dimensional microfabrication using stereo lithography and metal molding. Proceedings of the IEEE Workshop on Microelectromechanical Systems. MEMS'93. 1993:42-47.
- 2) Bertsch A, Jiguet S, Bernhard P, Renaud P. Microstereolithography: a Review. Mat Res Soc Symp Proc 2003, LL1.1.1-LL1.1.13.
- 3) Maruo S, Ikuta K, Korogi H. Submicron manipulation tools driven by light in a liquid. Appl Phys Lett 2003;82:133-135.
- 4) Kawata S, Sun HB, Tanaka T, Takada K. Finer features for functional microdevices. Nature 2001;412:697-698.
- 5) Maruo S, Ikuta K. Submicron stereolithography for the production of freely movable mechanism by using single-photon polymerization. Sensor Actuat A-phys 2002;100:70-76.
- 6) Lu Y, Chen SC. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2004;11:1621-33.
- 7) Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. Adv Drug Deliv Rev 2004;11:1635-47.
- 8) Popov VK, Evseev AV, Ivanov AL, Roginski VV, Volozhin AI, Howdle SM. Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. J Mater Sci Mater Med 2004;2:123-8.
- 9) Lee JW, Lan PX, Kim B, Lim G, Cho DW. 3D scaffold-fabrication with PPF/DEF using macro-stereolithography. Microelectron Eng 2007;84:1702-1705.
- 10) Matsuda T, Mizutani M. Liquid acrylate-ended capped biodegradable poly(e-caprolacton-co-trimethylene carbonate). II. Computer-aided stereolithographic microarchitectural surface photoconstructs. J Biomed Mater Res 2002;3:395-403.
- 11) Lee KW, Wang S, Fox BC, Ritman EL, Yaszemski MJ, Lu L. Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters. Biomacromolecules 2007;4:1077-84.
- 12) Cooke MN, Fisher JP, Dean D, Rimnac C, Mikos AG. Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2003;2:65-9.
- 13) Arcaute K, Mann BK, Wicker RB. Stereolithography of Three-Dimensional Bioactive Poly (Ethylene Glycol) Constructs with Encapsulated Cells. Ann Biomed Eng 2006;34:1429-1441.
- 14) Lee SJ, Kang HW, Kang TY, Kim B, Lim G, Rhie JW, Cho DW. Development of scaffold fabrication system using axiomatic approach. J Micromech Microeng 2007;17:147-153.
- 15) Jones CE, Underwood CK, Coulson EJ, Taylor PJ. Copper induced oxidation of serotonin: analysis of products and toxicity. J Neurochem 2007;102:1035-1043.