Advance Publication by J-STAGE

日本機械学会論文集

Transactions of the JSME (in Japanese)

DOI:10.1299/transjsme.21-00151

Received date : 6 May, 2021

Accepted date : 13 February, 2022

J-STAGE Advance Publication date : 22 February, 2022

空気圧押し出し式 3D バイオプリンタを用いた超音波ゼリーの 試用バイオインクとしての印刷評価

花之内健仁^{*1}, 松岡連太郎^{*2}, 青木僚汰^{*2}, 森田崇裕^{*3}, 境慎司^{*3}

An assessment of ultrasound transmission gel as trial bioink by pneumatic extrusion-based 3D bio-printer

Takehito HANANOUCHI^{*1}, Rentaro MATSUOKA^{*2}, Ryota AOKI^{*2}, Takahiro MORITA^{*3}
and Shinji SAKAI^{*3}

^{*1} Medical Engineering Laboratory, Department of Mechanical Engineering Faculty of Engineering, Osaka Sangyo University
3-1-1 Nakagaito, Daito-shi, Osaka 574-8530, Japan

^{*2} Department of Mechanical Engineering Faculty of Engineering, Osaka Sangyo University
3-1-1 Nakagaito, Daito-shi, Osaka 574-8530, Japan

^{*3} Division of Chemical Engineering, Department of Materials Engineering Science,
Graduate School of Engineering Science, Osaka University
1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka-shi, Osaka 560-8531, Japan

Abstract

Ultrasound transmission gel has been normally used as a material fills the gap between the transducer of the ultrasound and patient's skin. Alternatively, however, it can be used as a trial bioink for the 3D bio-printer, which is identified as one material for checking its printability at the preliminary phase. The purpose of this study was to clarify whether the ultrasound transmission gel can be used as the trial bioink. For this purpose, we investigated the viscosity of some kinds of the ultrasound transmission gel, and compared with commercially available one. And also we measured the width of the printed lines with the ultrasound transmission gel in comparison with the perspective width. According to our results, we concluded that the ultrasound transmission gel can be used as the trial bioink as long as selecting appropriate viscosity type.

Keywords : Bioink, 3D bio-printer, Pneumatic extrusion-based bioprinting, Ultrasound transmission gel, Viscosity

1. 緒 言

コンピュータ上でデザインした 3 次元立体画像を積層し、造形する 3D プリンタが近年登場し、いろいろな用途で利用されるようになってきている。さらに、そこから派生したもので、通常使用されるプラスチック樹脂でなく、生きた細胞を含入可能なゲルなどの液体性状をもつ材料（これをバイオインクという）を積層できる 3D バイオプリンタが市場に出てくるようになってきた（境，2019）。積層されたバイオインクは、その中で細胞を培養できるスキャフォールドとしての役割があり、最終的には、生体組織に代替できるような再生医療組織を製造する際の一端を担うものとして認識されている（境，2019）。積層の方法は、通常の 3D プリンタ同様にいくつかの方法があるが、主には、①空気圧連続押し出し方式、②インクジェット方式、③光造形方式などがある（境，2019）。今回の研究は、1 つ目の空気圧連続押し出し方式の 3D バイオプリンタに関わることである。

No.21-00151 [DOI: 10.1299/transjsme.21-00151]

^{*1} 正員，大阪産業大学 工学部 機械工学科 医工学研究室（〒574-8530 大阪府大東市中垣内 3-1-1）

^{*2} 大阪産業大学 工学部 機械工学科

^{*3} 大阪大学大学院 基礎工学研究科 物質創成専攻 化学工学領域（〒560-8531 大阪府豊中市待兼町 1-3）

E-mail of corresponding author: hananouchi@mech.osaka-sandai.ac.jp

バイオインクを積層していく場合、予定していた形状通りに積層できるかは、空気圧の値・積層のスピード・押し出し口の径・バイオインクの機械特性などさまざまなパラメータの調節が必要になってくる (Ozolat, 2017). しかしながら市販されている 3D バイオプリンタのバイオインクは、非常に高価 (5cc 程度で数万円) であり、なんども試行できる状況にないのが現状であった. 細胞を含めし実際に近い状況で施行する前に、細胞を含めない状態でバイオインクが予定通り計画した形状に積層できるか、繰り返し試行が必要である.

この背景から試用のバイオインク材が必要と考え、それが超音波ゼリーで代替しうると考えた. 超音波ゼリーは、超音波装置を使用する際に超音波探索子と皮膚の間隙を埋めるために塗布するもので、粘性の高いものから低いものまで多くのラインナップがある. また価格も比較的安価 (250 g で 1000 円未満のものもある) であり、これが試用のバイオインク材として利用できるのなら、3D バイオプリンタ研究の発展に寄与できる可能性がある.

しかしながら、超音波ゼリーがどの程度の精度をもって積層できるか検討をした報告は乏しい. 理論上は、粘性が低いものであれば、塗布先端の間口と塗布排出速度が一定なら、印刷される形状物は広がりやすくなるはずで、逆に粘性が高いものであれば、広がらず排出できるかもしれない. しかしながら、逆に必要な空気圧が高くなり、押し出せない可能性もある.

そこで本研究では、市販される超音波ゼリー数種類を使用し、3D バイオプリンタの試用のバイオインク材として用いることができるか、どの程度の精度をもって印刷できるかを評価することにした. その目的のため、5 種類の超音波ゼリーを用意し、同一の形状を印刷し、それを評価することとした.

2. 方法

本研究では 3D バイオプリンタのなかで、CELLINK 社 (スウェーデン) 製の「INKREDIBLE」を使用した (図 1) (花之内他, 2018) .

Fig.1 3D bio-printer used in this study, the left image shows an overview of it, and the right image shows a large scale one, which indicates syringe-like tube with a bioink and red colored nozzle. The top of the transparent tube is connecting with an air compressor. On the basement, there are printed lines by one ultrasound transmission gel.

INKREDIBLE は、デュアルプリントヘッドと UV 硬化システムを備えた空気圧押し出し式バイオ 3D プリンタであり、シリンジに入れた超音波ゼリーを空気圧で押し出し、ノズルからバイオインクが射出され、ノズル先の台座に成形される. シリンジが固定されているところが地面と並行に動作し、台座の部分が鉛直方向に動作する事で、立体に印刷することができる. バイオプリンタの仕様について、閲覧できる情報 (cellink, 2021) から抜粋したものを表 1 に示す.

Table 1 Specification of the 3D bio-printer in this study.

Specification	Information
Build Volume	130×80×50mm
Positioning Precision	XY:10 μ m; Z:2.5 μ m
Layer Resolution	100 μ m
Hydrogel's viscosity range	0.001~250Pa. S
Set Pressure Range	5~400kPa
Sensitivity	0.2% F. S. (0.8kPa)
Repeatability	$\pm$ 1% F. S. (0.4kPa)
Minimum Unit Setting	1kPa

本研究で使用した超音波ゼリーは、アクアソニッククリアゲル（パーカー社，組成：逆浸透水・保湿剤・ポリマー・防腐剤），エコーゼリーソフト・ミドル・ハード（株式会社ちばら，組成：不詳），プロシア中粘度タイプ（アズワン株式会社，組成：純水・グリセリン・防腐剤）の5種類を使用した。

各超音波ゼリーをレオメーター（HAAKE MARS III, Thermo Scientifi 社製）を用いて，粘弾性の評価を行った。温度を25度で一定とし，測定プレートに各サンプルを設置して，コーンジオメトリ（直径50 mm パラレルプレート）を用いて，せん断速度を変化させた場合の粘度の変化を測定した解析には，専用の解析ソフトウェア（HAAKE Rheo Win Data Manager, Thermo Scientifi 社製）を用いた。使用した3D バイオプリンタ用の試用バイオインク（CELLINK START, セルインク社製）も同様の評価を行った。また2試験数で結果が変わらない予備実験から，各種の試験数を1とした。

続いて，上述の粘弾性結果について盲検的に，著者のうち2名によって超音波ゼリー各種のバイオプリンタ精度評価のために印刷物形状の評価を行った(花之内他, 2022)。盲検的施行の理由としては、粘弾性の結果を知ることによる計測のバイアスを無くすためであった。一辺が1cmの長さの正方形内に十字を加えた形状物（便宜的に「田」とする）を，1回の印刷で横に3列，縦に2行印刷できるように計画し，3回印刷を施行した（図2）。使用したノズルの径は0.5 mmであった。空気圧は，本研究で使用した全ての試料が連続的に押し出される最小圧20 kPaに設定した。使用したバイオプリンタでは，単位時間あたりの試料の吐出量は直接調節できない。ノズル径と同じ幅で試料が吐出されるわけではないので，吐出量を単位時間あたりの長さとして表現できないが，印刷時のノズルの高さを印刷シート上から0.4 mm（印刷シートとノズルとの間に，0.1 mmの間隙を設ける設定なので），移動速度を毎秒12mmとすることで，印刷される線の幅は，0.5-1mm程度に収まると予測した。そして，1つの印刷した「田」に対して以下に示す1区域の辺を1箇所として，12箇所の線の中央の幅を計測した（図3）。

Fig. 2 A representative sample by the 3D bio-printer in this study.

Fig. 3 The location of the measurements for the width (two direction arrow) of the printed lines.

線中央の幅を計測する為に、デジタルカメラ（DSC-HX30V, SONY）を使用した。6つ印刷したシートの横幅が画面横幅（3648 ピクセル）に収まるように撮影（バイオプリンティング印刷後3分以内に）した。画像処理ソフトウェア「ImageJ, 1.53k」（アメリカ国立衛生研究所）を使用し、10 mmのピクセル数を計測することでキャリブレーションした後計測した。各々の超音波ゼリーおよび試用バイオインクで印刷した線の幅に差があるかどうか、統計解析（The Kruskal-Wallis 検定）を行って評価した。3D バイオプリンタの試用バイオインクとして超音波ゼリーが使用できるかの判断基準としては、「上記空気圧で、試用バイオインクを印刷した時よりも有意に線幅が細く印刷できたもの」とした。

3. 結果

超音波ゼリー各種および市販の試用バイオインクの粘度を、レオメーターで測定した結果を示す(図 4)。

Fig. 4 Viscosity of five kinds of ultrasound transmission gel and one commercially available bioink for trial.

各種超音波ゼリーおよび試用バイオインクで印刷した形状物について線の中央幅を計測した結果、アクアソニッククリアゲルは、平均0.88 mm (0.24 mm (カッコ内は標準偏差)), エコーゼリーソフトは、1.52mm (0.27 mm) , エコーゼリーミドルは、0.90mm (0.24 mm) , エコーゼリーハード0.96 mm (0.16 mm) , プロシェア 2.01 mm (0.43 mm), 試用バイオインク 1.40mm (0.14 mm) となった(図 5). 6 種は、統計学的に有意な差を認めた.

Fig. 5 Width of the printed lines with the ultrasound transmission gel used in this study.

4. 考察

今回の研究は、3D バイオプリンタの試用バイオインクとして超音波ゼリーが使用できるかどうかを明らかにする目的で、数種類のゼリーを用いてせん断と粘性の評価を行うとともに、バイオインクとして 3D バイオプリンタで印刷した際に、印刷の線の幅で評価した.

超音波検査用ゼリーの粘度の評価については、これまでほとんど行われてこなかった. 市販されているゼリーにとって代わるものを”Carpol”というポリマーを含める溶液で検討した AL-Nima らの報告で、市販のゼリー (Aquasonic 100, Parker, Italy)の粘度が $1.46 \times 10^4 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ と報告される (AL-Nima et al., 2019). しかし、この粘性の値は、調べる条件 (回転する形状・回転数) によって大きく異なることもわかっている. 例えば同じ商品のメーカーの資料(biomedical, 2021)によると、 $1.30 \times 10^5 - 1.95 \times 10^5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (Brookfield Viscometer, Model RVT, Spindle T-C, 2.5 RPM) と報告される. 今回使用したゼリーの 1 つであるアクアソニック クリアゲルもメーカーの資料によれば、Aquasonic 100 と同様の数値であった(biomedical, 2021). これまでバイオインクの機能評価の 1 つとしての粘度の報告には、せん断速度を変化させ、それら各せん断速度における粘度を計測する報告 (Sakai et al., 2018, Sakai et al., 2019) があることから、本研究もそれに則った測定を行った. 過去に濃度の異なる (2,3 および 4%) アルギン酸溶液をバイオプリンタで印刷した研究において (Markstedt et al., 2015), 各溶液の粘性を調査しているが、各溶液の粘性は、せん断速度 0.1 (1/s) において 10 倍程度異なる結果であった. 一方、本研究で用いた超音波ゼリーは、市販の試用バイオインク (CELLINK START, セルインク社製) に比べて、アクアソニック クリアがやや高粘度、エコーゼリー ソフトはやや低粘度であるものの、せん断速度が 0.1-1000 の間においては、上記の報告ほどの粘性の違いはなく、せん断速度が増加するにつれ粘性が低下していくという変化については、各超音波ゼリーでほぼ同様の傾向であった.

本研究では、このせん断速度と粘性の結果以外に実際 3D バイオプリンタで印刷したものでも評価を行った. 材料押し出し式 3D バイオプリンタにおける、バイオインクについての報告はあるものの (Ozolat, 2017), 印刷物の形状を評価した報告は少ない (Markstedt et al., 2015). その報告では、本研究と同様、印刷物の線の幅を計測することで評価していた. しかし、圧力を一定とせず、2%では 12kPa, 3%では 36kPa, 4%では 39kPa で行ってい

た．今回のように空気圧を一定にし，印刷物の形状（印刷の線の幅）を計測することで空気圧押し出し式バイオ 3D プリンタの評価をした報告は今までにない．本研究の結果からは，市販の試用バイオインクより細い幅に印刷できたものは，アクアソニック クリアゲルとエコーゼリーハードおよびミドルであった．エコーゼリーソフトは，試用バイオインクより統計的に有意差はないものの，平均では太い値となった．プロシエアの線の幅は試用バイオインクより有意に太かった．また，同じ会社が製造する製品の“ソフト”，“ミドル”，“ハード”の違いが，今回の手法では一部明らかにならなかった．“ソフト”は，“ミドル”や“ハード”より粘性が小さい傾向があり，印刷したものにおいても，“ミドル”と“ハード”より統計学的に有意に太いことわかったが，ミドルとハード間では大きな違いはなかった．有意な差ではなかったものの，ハードの方が線幅は太かった．せん断速度と粘度の関係同様に，実際の印刷物の評価も大事であると考えられた．

他，本研究で明らかになった点としては，どの材料で印刷するにせよ，空気圧押し出し式 3D プリンタにて高い精度の印刷を期待する場合、直接吐出量を調節できないため、空気圧の設定・印刷速度などによる試行錯誤が幾度となく必要であることであった．また、各試料における印刷物の線幅の標準偏差を見ると、1 mm程度の制御は可能であるが、0.1 mm程度の制御は難しいと考えた．今後、この種の 3D バイオプリンタによる結果には、印刷初期段階における小さくない印刷の誤差が含まれる可能性があることを念頭に置くべきだと考える．

本研究の限界としては、扱っている超音波ゼリーの種類が、市販化されている種類と比べると数が少ないこと、評価方法としての印刷したもののサンプルが一つしかないことがある．さらには、使用したコンプレッサの圧力に関して、一つの値のみしか検討しなかった．しかし、市販されている超音波ゼリーにおいて、粘度自体の表記も少ない中で、数種類でも、試用バイオインクとして代用できるものを見つけられたことは価値があると考ええる．印刷サンプルについては、もう少し容積があり複数の層で構成されるもの、および形状の複雑なもの等も試す必要があったかもしれない．しかしながら、それら印刷したものを評価するための機器の準備がなかった（例えばいわゆる 3D スキャナでは、ゼリーのような透明なものはスキャンできない）ことから検討しなかった．今後は、ある程度の高さを持つゲル状の物質の立体形状を評価できる機器が用意できれば、さらなる研究を行っていきたいと考える．

5. 結言

今回 3D バイオプリンタを用いて、超音波検査用のゼリーがバイオプリンタの印刷材料である、バイオインクにおける試用バイオインクになりうるかの検討を行った．結果から、市販の超音波ゼリーの中には、粘度・造形性のいずれの点においても、3D バイオプリンタのバイオインクの代替として、プリント時の操作条件の探索などの検討に使用できるものがあることが明らかとなった．

謝辞

本研究は JSPS 科研費 19K09658 の助成を受けたものです．また、バイオプリンティングに関し、キコーテック株式会社事業開発部 井上道雄氏よりご助言を頂きました．深謝いたします．

文献

- Al-Nima, A. M., Al-Kotaji, M., Al-Iraqi, O. and Ali, Z. H., Preparation and evaluation of ultrasound transmission gel, Asian J Pharm Clin Res, Vol. 12, Issue 1 (2019), pp. 422-427.
- Biomedical, aquasonic-100-blue-technical-datasheet, available from <<https://bio-medical.com/media/support/aquasonic-100-blue-technical-datasheet.pdf>>, (参照日 2021 年 3 月 4 日).
- Biomedical, aquasonic-clear-technical-datasheet, available from <<https://bio-medical.com/media/support/aquasonic-clear-technical-datasheet.pdf>>, (参照日 2021 年 3 月 4 日).
- Cellink, Inkredible manual, available from <<https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2019/03/Inkredible-manual-2018-final.pdf>>, (参照日 2021 年 3 月 4 日).

- 花之内 健仁, Dorthe, E., Baek, J., Lee, J., Grogan, S. and D'Lima, D.D., Cellink 社製 3D バイオプリンタ Inkredible のバイオインクの機械特性調査, 医工学治療, Vol. 30, No. Supplement, (2018), p. 119.
- 花之内 健仁, 松岡連太郎, 青木僚汰, 境慎司, 3D バイオプリンタを用いた超音波検査用ゼリーの粘性評価, 整形外科, Vol. 73, No.2, (2022), pp. 151-154
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Ávila, H. M., Hägg, D. and Gatenholm, P., 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, 16(5): (2015), pp.1489-96. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00188.
- Ozbolat, I.T., Chapter 3 bioink, 3D Bioprinting Fundamentals, Principles and Applications, Elsevier (2017), pp. 41-92.
- Ozbolat, I.T., Chapter 4 Extrusion-based bioprinting, 3D Bioprinting Fundamentals, Principles and Applications, Elsevier (2017), pp. 93-124.
- 境慎司(監修), I 総論編, バイオ 3D プリント関連技術の開発と応用 (2019), pp. 3-9. シーエムシー出版
- Sakai, S., Mochizuki, K., Qu, Y., Mail, M., Nakahata, M. and Taya, M., Peroxidase-catalyzed microextrusion bioprinting of cell-laden hydrogel constructs in vaporized ppm-level hydrogen peroxide. *Biofabrication*, Vol.10, No. 4: 045007 (2018), pp.1-12., doi: 10.1088/1758-5090/aadc9e.
- Sakai, S., Ohi, H. and Taya, M., Gelatin/Hyaluronic Acid Content in Hydrogels Obtained through Blue Light-Induced Gelation Affects Hydrogel Properties and Adipose Stem Cell Behaviors. *Biomolecules*, Vol.9, No.8: 342 (2019), pp.1-14., doi: 10.3390/biom9080342.

References

- Al-Nima, A. M., Al-Kotaji, M., Al-Iraqi, O. and Ali, Z. H., Preparation and evaluation of ultrasound transmission gel, *Asian J Pharm Clin Res*, Vol. 12, Issue 1 (2019), pp. 422-427.
- Biomedical, aquasonic-100-blue-technical-datasheet, available from <<https://bio-medical.com/media/support/aquasonic-100-blue-technical-datasheet.pdf>>, (accessed on 4 March, 2021).
- Biomedical, aquasonic-clear-technical-datasheet, available from <<https://bio-medical.com/media/support/aquasonic-clear-technical-datasheet.pdf>>, (accessed on 4 March, 2021).
- Cellink, Inkredible manual, available from <<https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2019/03/Inkredible-manual-2018-final.pdf>>, (accessed on 4 March, 2021).
- Hananouchi, T., Dorthe, E., Baek, J., Lee, J., Grogan, S. and D'Lima, D.D., Mechanical property of the bioinks in 3D bio-printer (Cellink), *Therapeutics & Engineering*, Vol. 30, No. Supplement (2018), p. 119. (in Japanese)
- Hananouchi, T., Matsuoka, R., Aoki, R., Sakai, S., A viscosity evaluation of ultrasound transmission gel by 3D bio-printer D, *Orthopedic Surgery*, Vol. 73, No.2, (2022), pp. 151-154. (in Japanese)
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Ávila, H. M., Hägg, D. and Gatenholm, P., 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, 16(5): (2015), pp.1489-96. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00188.
- Ozbolat, I.T., Chapter 3 bioink, 3D Bioprinting Fundamentals, Principles and Applications, Elsevier (2017), pp. 41-92.
- Ozbolat, I.T., Chapter 4 Extrusion-based bioprinting, 3D Bioprinting Fundamentals, Principles and Applications, Elsevier (2017), pp. 93-124.
- Sakai, S., Chapter 1 General remarks, Development and Application of 3D Bio Printing Technology (2019), pp. 3-9. CMC Publishing Co., Ltd. (in Japanese)

- Sakai, S., Mochizuki, K., Qu, Y., Mail, M., Nakahata, M. and Taya, M., Peroxidase-catalyzed microextrusion bioprinting of cell-laden hydrogel constructs in vaporized ppm-level hydrogen peroxide, *Biofabrication*, Vol.10, No. 4: 045007 (2018), pp.1-12., doi: 10.1088/1758-5090/aadc9e.
- Sakai, S., Ohi, H. and Taya, M., Gelatin/Hyaluronic Acid Content in Hydrogels Obtained through Blue Light-Induced Gelation Affects Hydrogel Properties and Adipose Stem Cell Behaviors, *Biomolecules*, Vol.9, No.8: 342 (2019), pp.1-14., doi: 10.3390/biom9080342.