

3D バイオプリントのための単分散ゼラチン微粒子作製と細胞培養の実証

立教大学 理学部化学科

佐々木 直樹

1. はじめに

近年、生体組織を 3D プリンタで作製して創薬や再生医療への応用を目指す 3D バイオプリントの研究が盛んに取り組まれている¹⁾。立体的に構築した疑似生体組織を用いることで、創薬分野においては、平面的に培養された細胞を用いる従来の評価に比べ、実際の生体組織により近い環境での薬効評価が可能となる。また、再生医療分野においては、厚みのある生体組織を人工的に再構築し、これを患者の患部に移植することで、従来法では困難であった生体組織の修復や交換が可能になると考えられる。さらに、近年発展が目覚ましい 3D プリントを立体造形法として利用することで、種々の形状や構造、組成、特性を有する疑似生体組織を短時間で容易に造型できるものと期待される。

現在の 3D バイオプリントにおける代表的な造形法は、一般的な 3D プリントで言うところの材料押出法である。すなわち、プリントしたい細胞を種々のマトリックスと共に細いノズルから押し出し、ノズルを（或いは造形物が載るステージを）走査することで造形物を得る手法である。この手法は比較的単純で簡便ではあるが、造形の可否がマトリックスの物性に左右されるほか、細胞をマトリックスと混合してプリントするため、細胞の（プリント直後の）密度が原理的に低い。加えて、プリント後に細胞が増殖できるような空間をマトリックス内に形成することも重要となる。別の手法として、細胞を粒径数十 μm のゲル微粒子と共に吐出する手法²⁾がある。この方法では、微粒子の物性や密度で造形精度を制御でき、さらに微粒子を細胞培養の足場とすることで、増殖に十分な空間を保っての培養が可能である。しかしながら、既往研究では微粒子の粒径が大きく細胞の初期密度が低いほか、微粒子の生分解性が低く正常な組織構築には不向きといった課題がある。

ゲル微粒子を 3D バイオプリントに応用する上で、特に再生医療への応用を考えると、大きな生体組織を造形するには多量の微粒子が必要となる。従って微粒子作製の高スループット化が重要であり、その一手法として流路の並列化が挙げられる。既往研究では、並列な 200 本の流路を用い、流路終端近傍で流路の深さを急拡大すると液滴形成が促進されることを利用して、直径 90 μm の微粒子が CV 値 3% 以下で作製できている³⁾。別の既往研究では、十字型の流路を 4080 本並列化し、直径 40 μm の微粒子が CV 値 3.4% で作製できている⁴⁾。しかし、これを 3D バイオプリントに応用した際の細胞の初期密度を高めるには、微粒子のサイズをさらに縮小する必要がある。

我々は微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用い、単分散油中水滴の形成を報告しているほか⁵⁾、生分解性を有するゼラチンと低毒性の架橋剤であるゲニピンから成る微粒子を、平均粒径約 15 μm で作製することに成功している⁶⁾。しかし、微粒子を足場とする細胞培養は未実証である。そこで本研究では、油中水滴をゲル化して単分散ゼラチン微粒子とし、これを足場とする細胞培養を実証する。

2. マイクロ流体デバイスの作製

油中水滴形成部の模式図を図 1 に示す。水相と油相をそれぞれ一定の流量で送液し、水相の流れを油相の流れで挟み込むことで、一定体積の油中水滴を得る。この油中水滴は図 1 の円形領域で紙面垂直方向の貫通孔へ導かれる。

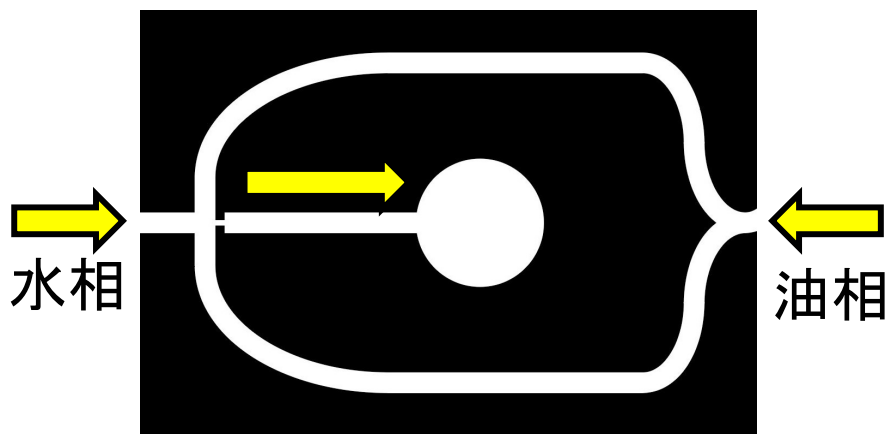


図 1. 油中水滴形成部の模式図. 白は流路、黄色は液の流れる向きを示す. 中央の円形領域に到達した液は紙面垂直方向の貫通孔へ導かれる.

これを基にしたマイクロ流体デバイスの流路デザインを図 2 に示す。上層（図 2A）には 8 つの油中水滴形成部とそこに至る流路、さらに油相や水相の導入孔と油中水滴の回収孔が配置されている。水相は、微粒子の主材料となるゼラチンの水溶液と、その架橋剤となるゲニピンの水溶液をそれぞれ別々の導入孔から導入し、流路内で混合したのちに油相と合流させる。形成された油中水滴は中層（図 2B）の貫通孔を通して下層（図 2C）に送られ、8 本の流路が合流し、中層を通して上層の回収孔へ送られる。このように、流路を三次元的に配置することで油中水滴形成部の並列化を実現し、スループットの向上を図ることとした。

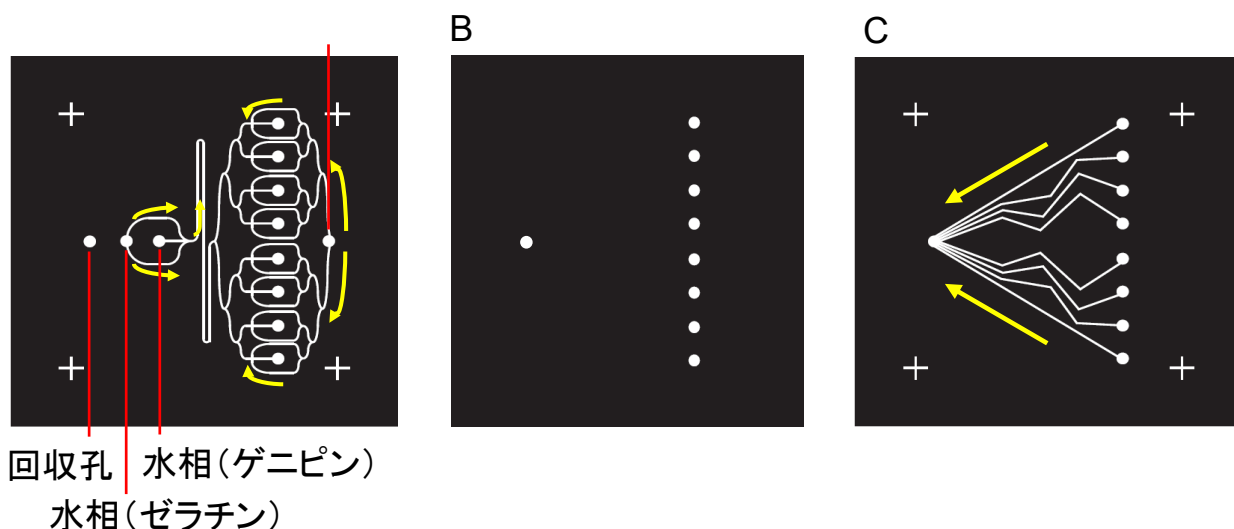


図 2. マイクロ流体デバイスの流路デザイン. (A) 上層. (B) 中層. (C) 下層. 白は流路、黄色は液の流れを示す.

マイクロ流体デバイスはソフトリソグラフィーにより作製した。図 3A に示すように、シリコン基板にフォトレジストを塗布し、フォトマスク越しに UV 光を照射することで、上層と下層の鋳型をそれぞれ作製した。これをポリジメチルシロキサン (PDMS) で型どりして上層と下層の基板をそれぞれ作製した。中層の基板は業者に貫通加工を依頼した。各層の積層時の位置関係を図 3B に示す。上層の溶液導入口となる位置に貫通孔を作製した後、上層と中層の基板をプラズマ処理して重ね合わせ、バイクして接合した。さらに、回収孔となる位置に貫通孔を作製し、同様の手順で下層の基板と接合した。シリコンチューブを配管し、その端にアンプル針を固定してデバイスとした。

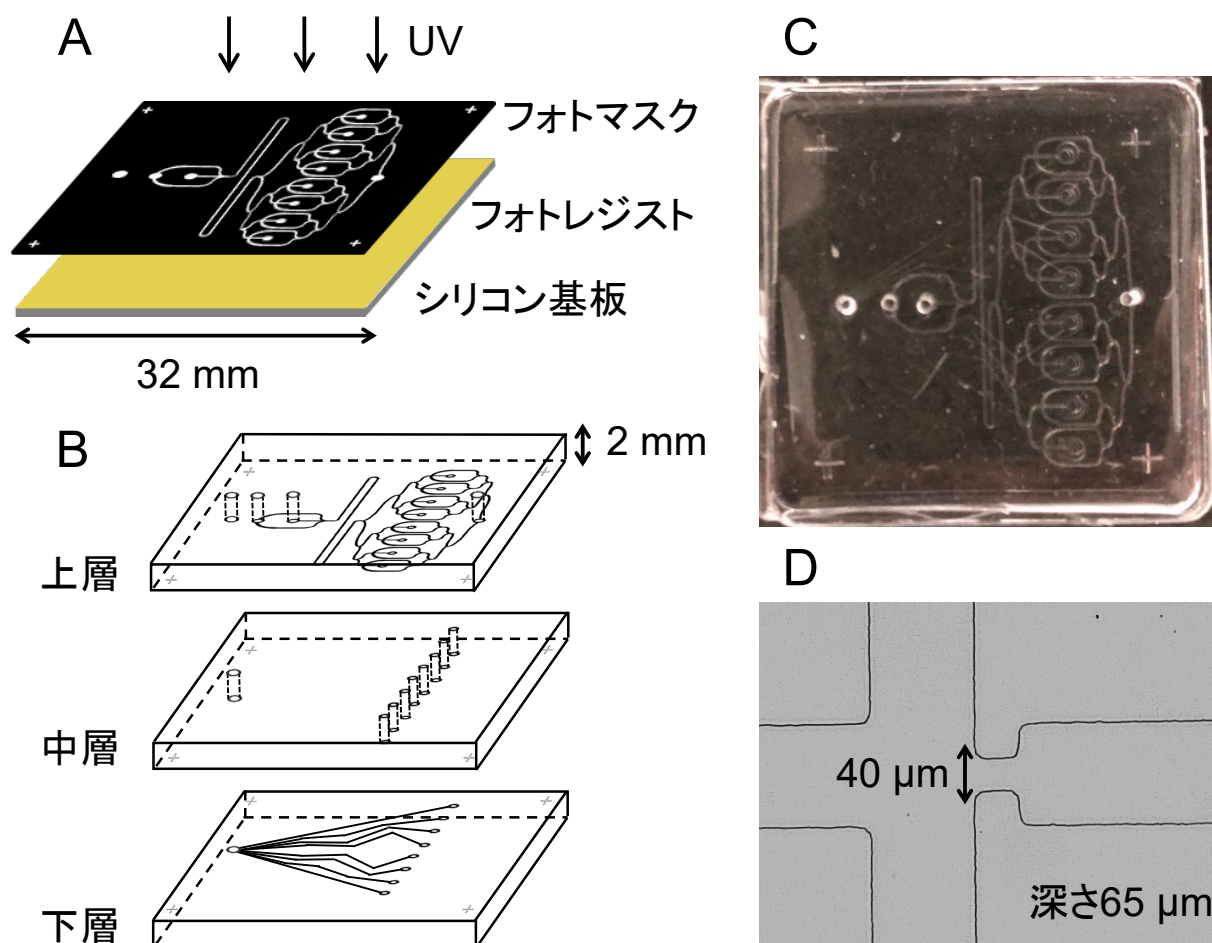


図 3. マイクロ流体デバイスの作製. (A) 鋳型作製. (B) デバイスの各層の積層時の位置関係. (C) デバイスの光学像. (D) 油中水滴形成部の顕微像.

配管前のマイクロ流体デバイスの光学像を図 3C に、油中水滴形成部の顕微像を図 3D にそれぞれ示す。各層の積層時の位置を合わせて接合することで、設計通りにデバイスを作製できた。このデバイスによる油中水滴形成の性能について、次節で述べる。

3. 単分散ゼラチン微粒子の作製

水相として 5 %魚ゼラチン水溶液、および 2 %ゲニピン水溶液を用いた。油相として 8 % span80 ミネラルオイル溶液を用いた。これらをホットプレートスターラーで加熱攪拌してから実験に用いた。

油中水滴は以下の要領で形成した。あらかじめ 30 分以上脱気したマイクロ流体デバイスのアンプル針に、水相および油相をとったマイクロシリンジを接続した。流路を油相で満たしたのち、油相流量 $5 \mu\text{L min}^{-1}$ 、水相流量 $0.5 \mu\text{L min}^{-1}$ で送液し、油中水滴を形成した。これを 2 % span80 ミネラルオイル溶液に、生理的温度で攪拌しながら 1 時間回収し、その後さらに 1 時間攪拌を続け、ゼラチン微粒子を作製した。微粒子を顕微鏡で撮像し、ヒストグラムを作成した。

油中水滴形成の様子を図 4A に示す。油中水滴形成部において、一定のサイズ・頻度で油中水滴を形成できていることがわかる。回収・攪拌後の微粒子の光学像を図 4B に示す。直径約 $20 \mu\text{m}$ の、細胞サイズの微粒子を作製できた。微粒子の粒径分布を図 4C に示す。細胞サイズの微粒子を変動係数 12 %で作製できた。ただし、平均粒径や変動係数は実験ごとに差が見られた。この原因として、流路内で混合するゼラチン水溶液とゲニピン水溶液が完全に混合しておらず、8 か所ある液滴形成部に溶液が均等に送られていないことが考えられる。流路デザインや流量を今後最適化することで、平均粒径や変動係数の制御が容易になると考えられる。

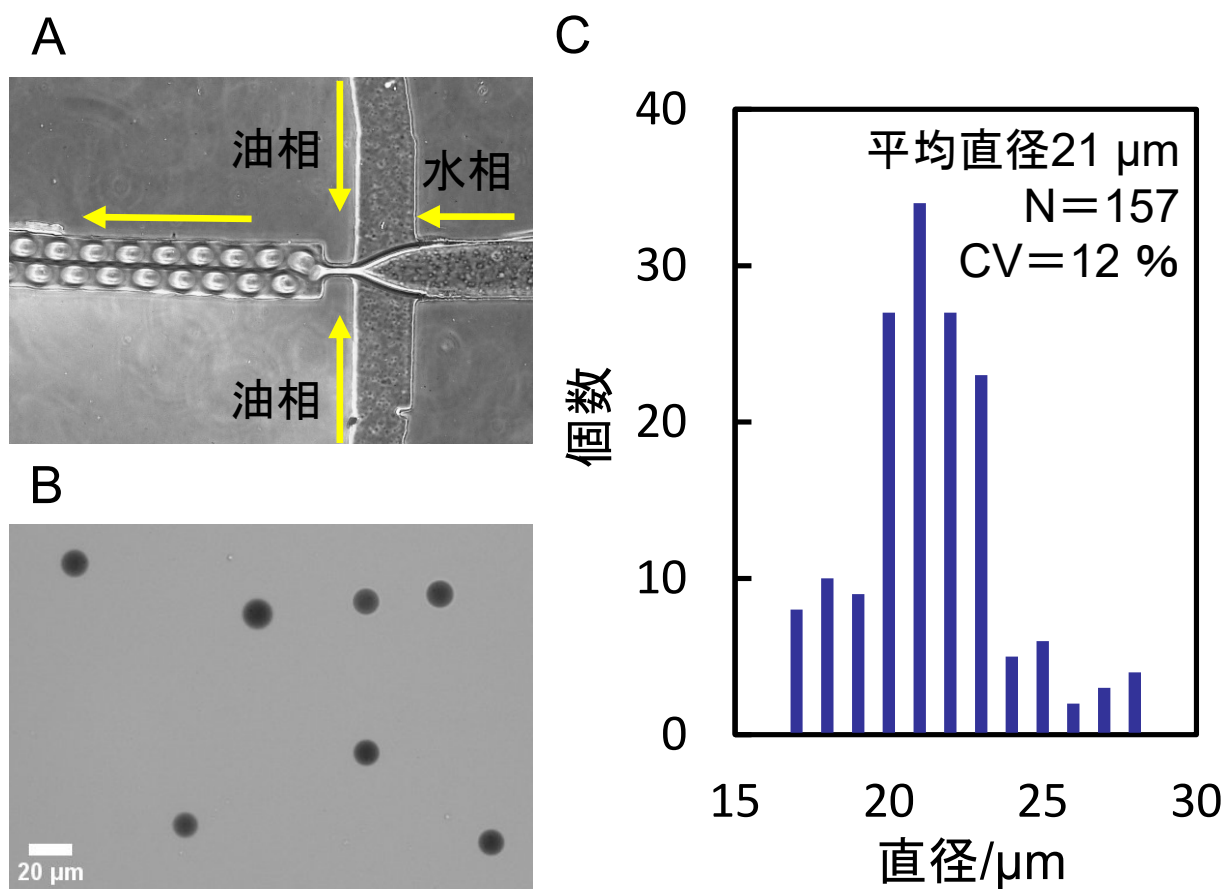


図 4. 単分散ゼラチン微粒子の作製. (A) 油中水滴の形成の様子. (B) 微粒子の光学像. (C) 粒径分布の例.

4. 細胞培養の実証

はじめにゼラチン微粒子の滅菌処理を行った。ミネラルオイル中に分散しているゼラチン微粒子を遠心分離し、上清を取り除き、1 % Tween20 水溶液を加えて再懸濁した後に、再度遠心分離して上清を取り除いた。この操作を繰り返してミネラルオイルを完全に除いたのちに、純水、70 %エタノールの順で同様の操作を繰り返し、滅菌した。

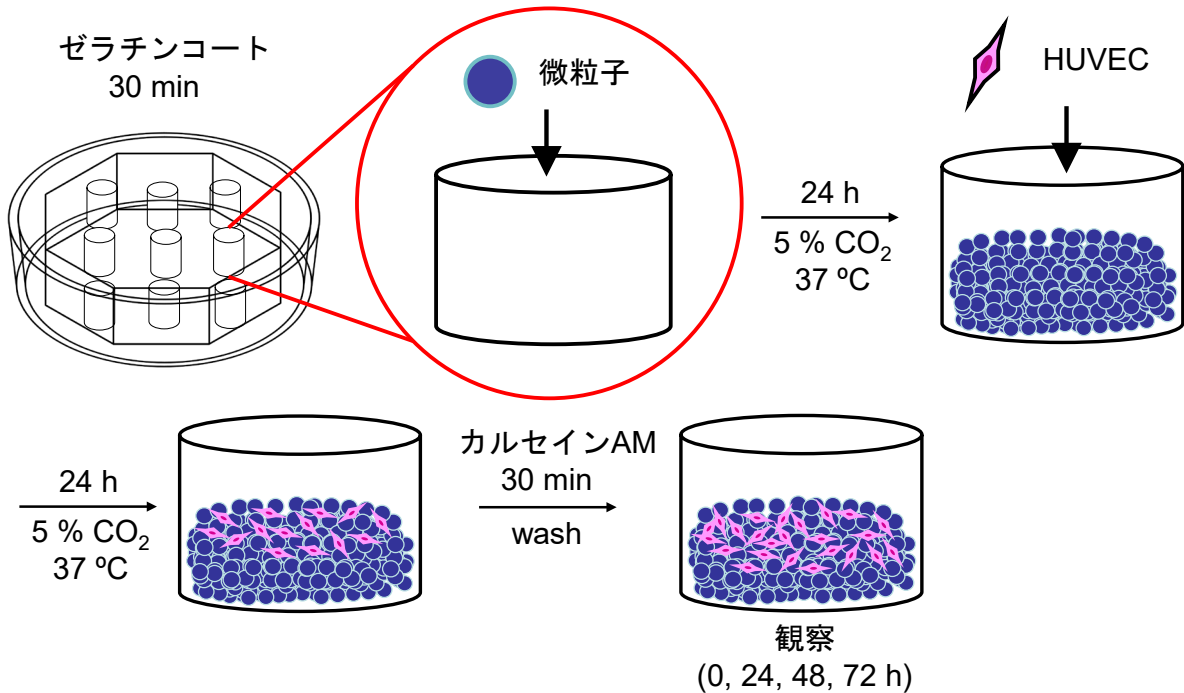


図 5. 細胞培養の実証の実験模式図.

実験手順を図 5 に示す。細胞培養用のウェルは、PDMS 基板に生検トレパンで貫通孔を作成し、これをガラススペースディッシュにプラズマ接合して作製した。ここに 2 %ゼラチン水溶液を加えて 30 分インキュベートし、ウェルの内表面をゼラチンコートした。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培地に懸濁したゲニピン架橋ゼラチン微粒子を加え、CO₂ インキュベーター内に一晩静置することで、粒子間、および粒子とウェルとの架橋を行い、微粒子をウェルに固定した。次に HUVEC の懸濁液を加え、一晩培養した。ここに生細胞染色試薬であるカルセイン AM を加えて 30 分反応させ、洗浄後に蛍光観察した。同時に複数のウェルに微粒子と細胞を播種し、生細胞染色のタイミングをずらすことで、0 から 72 h での生細胞の蛍光画像を得た。

図 6A-D に、微粒子上で培養された HUVEC の蛍光像と、微粒子の位相差像との重ね合わせ画像を示す。緑色の輝点の数が経時的に増加していることから、微粒子上で HUVEC が増殖していることがわかる。蛍光像を二値化し、細胞の面積を求めて作成した増殖曲線を図 6E に示す。細胞面積の対数値は培養時間に対して直線的に増加した。この直線の傾きから HUVEC の倍加時間は 28 h と求められ、微粒子上で HUVEC が正常に増殖していることがわかり、微粒子上での細胞培養を実証できた。今後、微粒子のサイズや HUVEC の播種密度、

培養期間等を検討することで、血管網様の構造を作製できると期待できる。血管網は多くの生体組織に必須の構造であることから、その形成を実証することで、本法の三次元生体組織構築への応用可能性が示されることが考えられる。

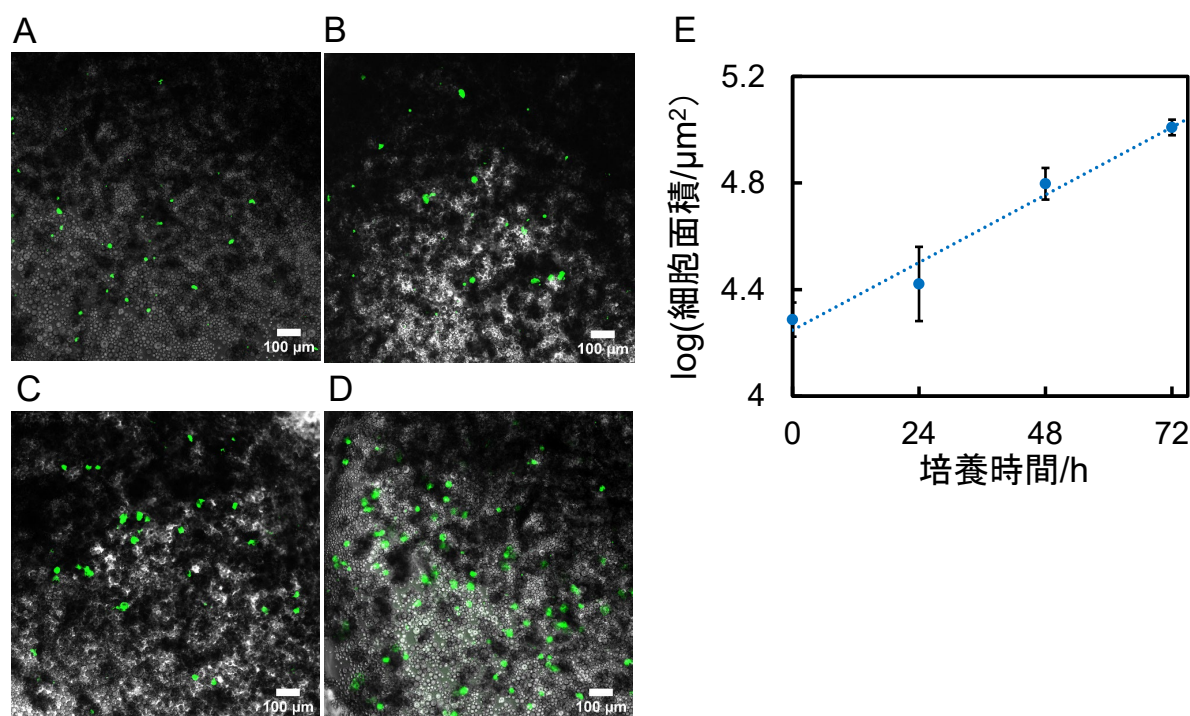


図 6. ゼラチン微粒子上での細胞培養の実証. (A-D)微粒子上で培養された HUVEC の蛍光像と、微粒子の位相差像との重ね合わせ画像. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. (D) 72 h. (E) HUVEC の増殖曲線.

N=3.

5. まとめ

本研究は、3D バイオプリントのための単分散ゼラチン微粒子の作製と細胞培養の実証を目的として進めた。8 つの油中水滴形成部を有し流路を三次元的に配したマイクロ流体デバイスを作製し、これに水相と油相を送液して油中水滴を形成できた。これを回収してゼラチン微粒子とし、平均直径 21 μm 、CV 値 12%で微粒子を作製できた。さらにこの微粒子をウェル中に配し、HUVEC を播種して培養したところ、正常に増殖することが示された。今後、細胞を微粒子と共に吐出するバイオプリントに本法を応用することで、三次元生体組織を自在に構築できると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) J. Jang, HG Yi, DW Cho. 3D Printed Tissue Models: Present and Future. ACS Biomater Sci Eng. 2016, 2, 1722-1731.

- 2) K. Flégeau, A. Puiggali-Jou, M. Zenobi-Wong. Cartilage tissue engineering by extrusion bioprinting utilizing porous hyaluronic acid microgel bioinks. *Biofabrication* 2022, 14, 034105.
- 3) J. M. de Rutte, J. Koh, D. Di Carlo, Scalable High-Throughput Production of Modular Microgels for In Situ Assembly of Microporous Tissue Scaffolds. *Adv. Funct. Mater.* 2019, 29, 1900071.
- 4) J. Wu, S. Yadavali, D. A. Issadore, D. Lee, Ultrahigh Throughput On-Chip Synthesis of Microgels with Tunable Mechanical Properties. *Adv. Mater. Technol.* 2022, 7, 2101160.
- 5) N. Sasaki, E. Sugunami. Fabrication of a T-Shaped Microfluidic Channel Using a Consumer Laser Cutter and Application to Monodisperse Microdroplet Formation. *Micromachines (Basel)*. 2021, 12, 160.
- 6) Manuscript in preparation.