

循環器領域におけるバイオプリンティングの現状, 方法, 今後の展開について

中村真人

富山大学大学院 理工学研究部(工学)

● はじめに

1. 始まった3Dプリンティングによるものづくりの時代

コンピュータの進歩と普及は、さまざまな装置や機械のデジタル化をもたらし、産業や社会に大きな変化をもたらした。ものづくりの世界でも、CAD・CAM・CAE(Computer aided Designing・Manufacturing・Engineering)の製法が導入され、そして今、種々の3Dプリンターが現れ、さまざまな産業分野に普及して世の中を変えようとしている。3Dプリンターは、コンピュータ上の3次元デジタルデータを出力し、実際の立体形状物を作り出すCAMマシンである。さらに、3Dプリンターの作り方は、ブロックを積み上げるが如く、適材適所、材料を積み上げて造り上げていく方式で、Additive Manufacturing(AM:付加製造法)と呼ばれている。それまで立体物を製造する時は、鋳型を作って造形する鋳型鋳造法(Molding)か、削り出しで作る切削加工(Subtractive manufacturing)が主流であった。3Dプリンターでは鋳型を準備する必要もなく、コンピュータからの直接出力で造形でき、加えて、立体物の内部構造も作ることができるという特徴がある。

2. 3Dプリンターが生命を救う3つの道

3Dプリンターのバイオ・医学・医療の分野への応用についても今、世界が注目している。2016年3月ワシントンポスト誌に「3Dプリンターが生命を

救う3つの道」と題しての記事が報道された¹⁾。3つの道とは、①医学的画像を再イメージングする道：CTやMRIから得られた3次元の解剖学的形状のデータを3Dプリンターに出力し、3次元臓器モデルを作製して、患者の診療・治療計画・手術のシミュレーション、あるいは教育訓練用として用いる道である。さらには、薬の効果を調べる組織モデル作りもここに記載されている。②組織や臓器を置換する道：患者の画像データをもとに3Dプリンターで作った移植用の組織や臓器を埋め込んで治療を行う道、そして③3Dプリンターによる患者中心の医薬品：これは3Dプリンターで作られた薬が認可されたことを受け、それぞれの患者に応じた治療薬を製造するオーダーメイド医療について述べている。これらの3つの中で、①についての詳細は、他の先生方にお任せするが、筆者も3Dプリンターで作った心臓の樹脂モデルや3Dプリンターで作ったヘモグロビン分子の3次元立体モデルを大学の授業等で用いているが、学生達からの受けはよい。②については、まさに筆者が取り組み目指して歩んできた道であり、バイオプリンティング研究を始めた原点でもあるので、本稿ではこの②について、特に循環器領域に焦点を当てて、解説する。③についても、とても興味深いですが、それは別の機会に譲る。

● 3Dプリンターで組織や臓器を作り、置換する道

1. なぜ、移植用の組織・臓器を作るのか？

この記事では、細胞を打ち出すbioprinterで、皮膚や骨、関節が作られていることを紹介し、そして

米国では12分に1名が新しく待機患者のリストに加わり、毎日21人が死亡のためリストから消されている移植医療の現状を挙げ、信頼できる Organ-printing system は革命的と述べている。

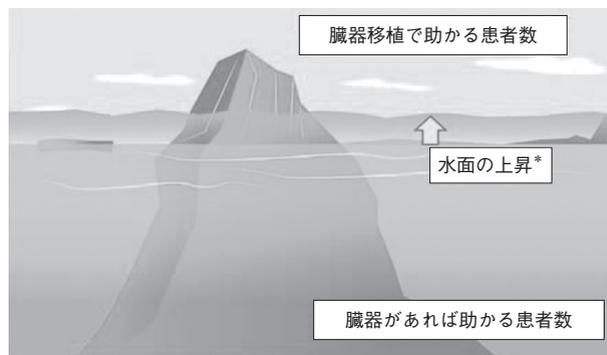
移植医療とは、説明するまでもなく、疾病や外傷、先天性欠損、あるいは外科手術などで失われたり機能が失われた臓器や組織に対して、代わりに機能する組織や臓器を移植し補完して治す治療法である。特に、心臓、肺、肝臓、腎臓の機能不全の治療法としては救命のための最終手段でもある。効果は絶大で、どんな治療にも反応しない重症例でさえも回復し社会復帰できる。ただし、周知の通り、移植医療には機能する臓器が必要である。ところがそれに使える臓器の数は必要としている患者数より圧倒的に少ない。その結果、臓器があれば助かるのに、順番を待ちつつ命を失う患者は年々増えている。日本を含めて世界で臓器不足が深刻化している。

また、待機患者数が臓器提供数を圧倒するようになった現在、もはや移植医療は患者を助ける医療ではなく、誰を助けるか患者を選別する医療(誰かを助けると誰かが助からなくなる医療)となっている。需要と供給の関係から移植適応患者を厳しく制限するのはやむを得ないが、高齢だからとか糖尿病を患っているとかりスクがあるとたちまち移植ができない理由とされ除外される。最初から登録もされない患者も少なくない。特に日本では移植は非常に受け難い。

これらのことを総合して素直に考えると、臓器があれば助かる、または助けられる潜在的な患者数はまちがいに莫大で、しかも海に沈む氷山も、年々大きくなっている(図1)。寿命とあきらめるのはたやすい。しかし、それでいいのか？

2. 移植用の組織・臓器は作るもの(1)：人工臓器

臓器があれば助かるのに手に入らない。この問題の解決の道は、必要な臓器は他人の臓器をあてにするのではなく、人の手で作ることである。それができれば、すべてが解決する。21世紀は、治療用の臓



*水面の上昇は移植医療の適応条件が厳しくなることを表す

図1 臓器があれば助かる患者数と氷山の関係

器は待つのではなく作る時代なのである。

筆者は人工心臓の研究開発の道に進んだ。機械式人工心臓の研究開発が始まって60年の時を経て、2011年日本製2種を含む4種の世界の最新型小型ロータリー式補助人工心臓が日本の臨床に導入された²⁾。「移植ができずに心不全が悪化し命を失うのなら、人工心臓で心不全を改善して社会に復帰して生きる」という選択ができる時代が日本にも来た。内科治療より補助人工心臓による治療のほうがQOLが高いと実証した無作為多施設臨床試験(REMATCH試験)の報告から今や15年も経っており³⁾、装置もずっと小型化され耐久性のある装置に進歩した。今後、厳しく適用を絞った日本の移植適用基準に縛られる必要もなく、日本の心不全臨床で人工心臓が有効な心不全治療オプションとして心不全からの離脱とQOLの向上、そして患者の社会復帰に貢献することが期待される。

3. 移植用の組織・臓器は作るもの(2)：生きた細胞から生きた臓器を作る技術

機械式人工心臓の実用化の一方で、細胞から臓器を作る研究も進められてきた。機械式人工心臓では力学的補助はできても、体内でのエネルギー産生や抗血栓性因子の産生、成長や適応などの生化学的、生物学的な機能に対してはいまだ全くお手上げ状態である。これらの問題に対応するには、生きた細胞

の力を用いるしかない。ES細胞やiPS細胞の研究も追い風で、望みの細胞を得る研究も進んでいる。今最も注力して研究すべきは、生きた細胞から自在に生きた心臓を作り提供する技術である。

1970年代、細胞培養技術で作った培養組織を治療に活かそうと培養皮膚や培養軟骨の開発が進んだ。1990年代、3次元の足場材(スキャホールド)に細胞を播種して組織を作る手法が提唱され、Tissue Engineering(再生医工学)として世界に広まった。スキャホールドの作製は、例えば耳を模った鋳型に生分解性材料の不織布やメッシュを詰め込んだり、ゲルで固めたりして作られた。多孔質のスポンジも使われた。2000年に入る頃、スキャホールドの作製に、押し出し式や紛体固化型3Dプリンターが利用され始めた。生きた細胞が3Dプリンターに使われ出したのはその後のことである。筆者は細胞を含めた3Dバイオプリンティングを提案し、その研究開発に深く関わってきた。それは従来の再生医工学の限界を破るためである。

4. 再生医工学の壁：スキャホールド法の限界

スキャホールド法での臓器作りの研究は世界中で行われてきたが、その問題点として、①細胞の分布を制御できない、②多種細胞の構成や位置を制御できない、③スキャホールドの異質性、すなわち局所的な構造や構成成分を制御できない、④増殖因子の濃度勾配や局在が制御できない、⑤スキャホールド内に毛細血管の導入ができない、などがあげられてきた。また、スキャホールド法は、前もって作られたスキャホールドに後から細胞を播く手法である。それゆえ、⑥細胞は表面にしか届かず内部構造・内部の細胞構成は全く制御ができない。また、⑦細胞を播いた後は細胞任せ、⑧生体内に埋め込んでからも生体任せで、細胞の増殖・分化もスキャホールドの生分解も全く制御ができない。

5. スキャホールド法の限界をブレイクする挑戦的戦略

重要臓器を作るためには、これらの限界を破る作り方が必要である。そこで、具体的に、(1)個々の細胞や生体材料を生体に近いミクロの配置で配置する、(2)多種の細胞、多種の材料を適材適所配置する、そして、(3)内部に細胞や材料を配しながら内部構造ごと3次元構造を作る、さらに、(4)内部の細胞がすべて生きられるように流路や毛細血管を設計して構築する、というアプローチを構想した。もちろん、このような組織や臓器の作り方は前代未聞で、細胞培養や従来の再生医工学の常識を超え、しかも組織や臓器は発生により作られるという自然の摂理も無視している。しかし、発生にこだわってすべて受精卵から分化させて作るとなると、移植用大人サイズの臓器を作って提供するのに10年も20年もかかる。それでは論外なので、実際には数週間から数カ月以内に作るという無謀を実現する技術を開発せねばならない。だからこのような作り方もありである。加えて、従来、細胞培養では、研究者もしくは技師やテクニシャンがピペットで細胞を播いて培養しているが、(1)から(4)の作業は、とてもヒトの手作業でできることではない。そこで、(5)細胞組織の構築作業は機械の手で行う。それを可能にする機械の手を開発すれば人の手ではできないことでも実現できる。如何にしてそれを実現するかを熟考し、それを実現する機械の手として、印刷技術に着目し、さらに積層することを考えた。これが3Dバイオプリンティングの始まりである。「機械で臓器を作るか?」というのが筆者の研究室のテーマであるが、このような挑戦的な取り組みなのである。

表に、3Dバイオプリンティングの革新の要素をまとめた⁴⁾。印刷技術の能力には革新の要素がいくつもあり、まさに革命的な高度な作り方ができる可能性がある。

表 3D バイオプリンティングの革新の要素

革新の要素	内容
1) 機械化	ヒトの手から機械の手へ 高度化・高速化・自動化・無人化
2) 3次元化	2次元から3次元へ Additive Manufacturing へ
3) デジタル化	アナログからデジタルへ CAD/CAM/CAE の導入
4) バイオ化	非生物から生物へ 生きた材料で生きた製作物
5) 実装 (細胞含む)	模型から実物へ 実物の材料で実物を作製
6) カラー化	単種から多種の材料へ 複合化
7) 高精細化	よりマイクロへ 細胞サイズに対応
8) ハイブリッド化	非生物と生物のハイブリッド

3D バイオプリンターの開発と応用

1. インクジェット 3D バイオプリンターの開発

このコンセプトのもと、機械の手として筆者が目したのは、カラー印刷が容易なインクジェット技術である。インクジェットでは、目に見えない極小のインクドットを打ち出して、カラー写真を印刷しているが、驚くべきことに、A4サイズ1枚に1億個を超えるインクのドットを場所、色、密度、配合すべてをコンピュータで制御している。そこで、細胞を打ち出すのに適したインクジェット方式を選び、3次元化するためにゲル化材料を用い、細胞が乾燥しないように液体中での3次元造形を実現した。これをもとに神奈川科学技術アカデミーの支援でオリジナルの3D バイオプリンターを開発した⁵⁾。

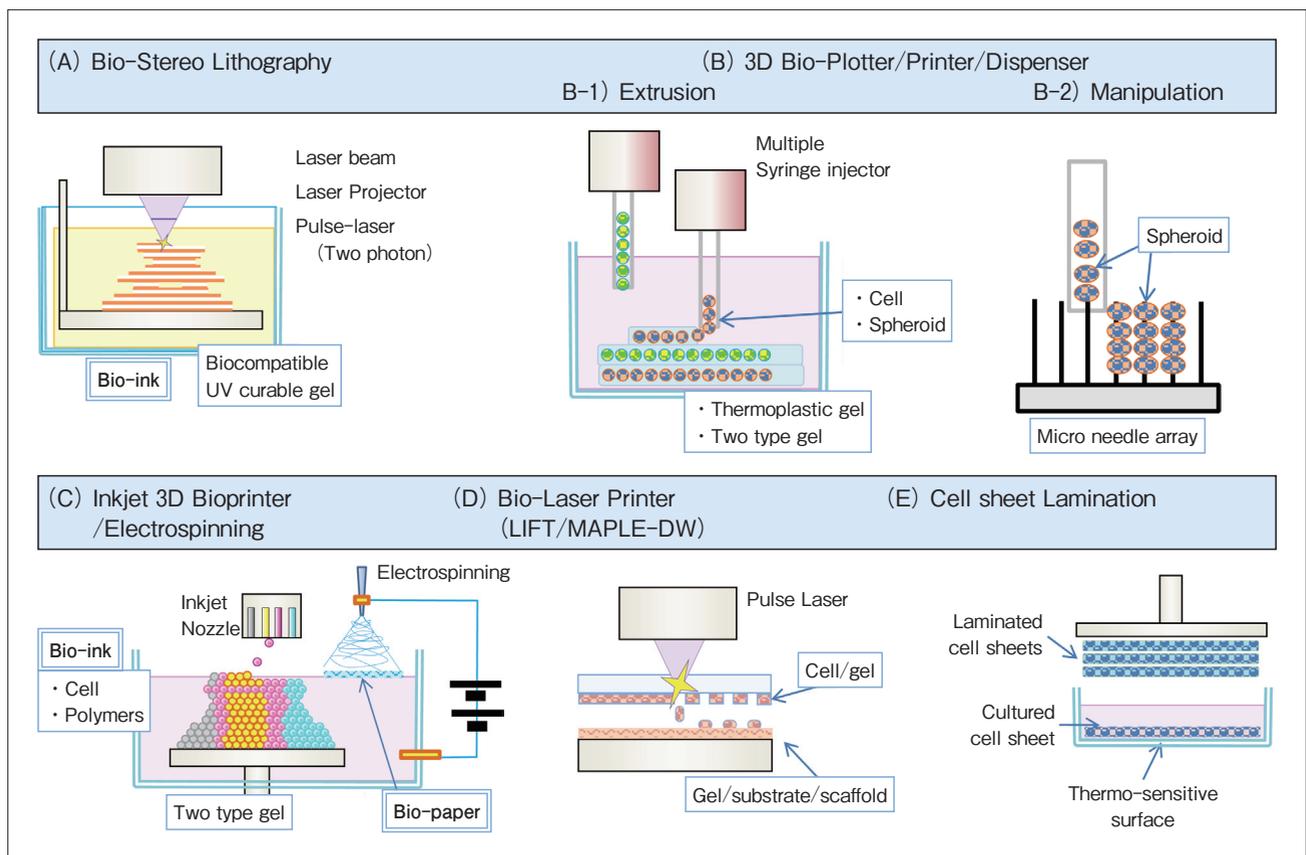


図2 バイオ 3D プリンターのいろいろ

(文献 11 より改変)

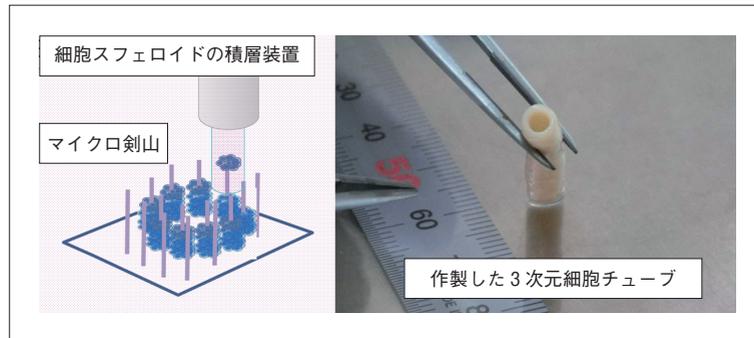


図3 剣山式バイオ 3D プリンター(イメージ図: 中村)とそれで造形した小口径 Scaffold free 細胞人工血管(写真: 佐賀大学中山功一教授のご提供)

装置のおかげで、生きた細胞とゲルで3次元構造を積層造形できるようにもなった(図2)⁶⁾。改良した2号機では、画像データを次々積層してより複雑な3次元構造物が造れるようになった^{7,8)}。現在、さらなる進歩を構想して、材料の工夫による革新に挑戦している^{9,10)}。

2. バイオフィabricationの研究の動向とバイオ 3D プリンターのいろいろ

バイオプリンティングの研究は、2009年国際誌 Biofabrication 創刊、2010年国際学会(International Society for Biofabrication; ISBF)が設立され、最近と同様な国際誌が複数加わり、一大ジャンルとなつつある。いろいろなタイプのバイオ 3D プリンターが世界で開発され、研究に利用されているのでまとめてみた¹¹⁾。

3. 国内の動向と循環器領域への応用

2014年「iPS細胞等を用いた立体組織・臓器の開発に着手: 骨や血管心臓などをバイオ 3D プリンターや細胞シート積層技術で製造へ」と題して、NEDO(新エネルギー産業技術総合開発機構)のプロジェクトがスタートした¹²⁾。このプロジェクトでは、5つの産学連携のチームがあり、5つの内1つが血管、3つが心臓組織を対象としている。現在AMED 国立研究開発法人日本医療研究開発機構に受け継が



図4 ナノテク 2016にて「nano tech 大賞」を受賞したインクジェット・バイオ 3D プリンターシステム(写真提供: (株)リコー)

れている¹³⁾。佐賀大学のチームはオリジナルの発想で剣山に細胞凝集体を刺して3次元化するユニークなバイオ 3D プリンターを開発し、作製した小口径の血管の臨床応用を進めている(図3)。大阪大学のチームは、ミクロの精密配置技術で微細な構造および形状が制御された機能的な立体心筋の開発を行っている。図4は大阪大学と(株)リコーが共同開発した装置である。京都大学のチームはヒトiPS細胞由来細胞シートにゼラチンハイドロゲル等の生体吸収性物質などをはさみ込み、従来にはない厚みのある立体心筋を、東京女子医大のチームは、細胞シート工学を基盤とした革新的立体臓器製造技術の開発で



図5 生体内組織形成術により作製した小型から大型までの大動脈弁，肺動脈弁置換用バイオバルブ(左)と経カテーテル的大動脈弁植え込み術用として開発したステント付バイオバルブ(中)とその「型」(右) (写真：国立循環器病研究センター中山泰秀先生のご提供)¹⁶⁾

厚い心筋組織作製を目指している。プロジェクトは今3年が経とうとしているので、これからもっといろいろな成果が報告されてくるだろう。また、どれも産学連携チームなので、産業化・実用化、そして現場医療への貢献が期待され、また、このような先進技術はその他産業へも波及が進むことが期待される。ただし、iPS細胞では未熟な細胞が1個でもあれば、他の組織に分化する可能性がある。慶應大学の遠山らのグループは心筋細胞の純化培養法を開発した¹⁴⁾。iPS細胞を使うならば、iPS細胞の確実な分化誘導技術と選別技術、純化技術の確立が臨床応用には極めて重要である。

また、組織や臓器を直接作るバイオ3Dプリンターというわけではないが、既存の3Dプリンターを活用して、循環器領域への活用を進めている研究開発がある。国立循環器病研究センターの中山らは、体内に異物を埋め込むと周囲を線維性の癒痕組織が覆いカプセルができる現象を利用して、3Dプリンターで血管や大動脈弁などの鋳型を作り、体内に埋め込んで体内で血管(Biotube)や弁(Biovalve)の形状を持つ線維性組織を作製し、人工血管や人工弁として臨床応用することを目指している(図5)^{15,16)}。「生体内組織形成術」と呼ばれる。患者の体内に埋め込む侵襲があり、またできるまでには数週間から数カ月かかるが、鋳型を抜き取ればすべて自己の組織であるため自己の細胞が接着しやすく拒絶反応もな

い。機械式人工弁は血栓に対して抗血栓治療をずっと継続せねばならないし、生体弁は異種動物由来のもので炎症や石灰化のため寿命が短い。ぜひ臨床応用に進んでほしいアイテムである。3Dプリンターの輝かしい活用例の1つである。

一方、海外では、今、Heart on a chip, Lung on a chip, Kidney on a chip, Liver on a chip など Organ on a chip, Tissue chip, Human on a chip の研究開発が精力的に進められている^{17~19)}。動物実験を何百何千するよりもヒトの3次元組織材料で評価できれば、極めて効率的で有用だからである。3次元組織モデルを作る、あるいは診断用チップを作るためにもバイオ3Dプリンターが使われている。細胞スフェロイドを分注したり、並べてミニ組織、ミニ臓器を作って評価する系を作ろうとするものである。Heart on a chip では、心筋組織だけでなく、心筋細胞の培養のためのウェル、培養基板、電極センサ、培養液の流路を含めて3Dプリンターで全体を順々に一体化して成形して作製したChipも報告されている。Human on a chip とは、それぞれの Organ on a chip を生体内の循環経路に合わせて直列・並列につないで、一人の固体を表すように統合したものである。このような Human on a chip の上で薬の薬効や毒性などがわかれば、ヒト組織ゆえ、動物実験に勝る開発ツールとなるだろう。

最も一般的に普及しているバイオ3Dプリンター

は、Bioplotter, すなわちシリンジで押し出す押し出し方式のプリンターである。しかし、スフェロイドを用いるタイプは肉眼で見えるものしか作れないのでより生体に近い組織を構築するには、もっと微細化が必要である。最近、押し出す針先を微細加工して2重ノズルとしてゲル化させながら描画し積層する報告がある²⁰⁾。中空構造をも作れるので、いろいろな発展性が期待できる。Bioprintingの研究は、世界で活性化されており、再生医療の面だけでなく、ノズルの微細加工、デバイスの工夫、作り方の工夫、デザインの工夫、材料の工夫など、さまざまな分野で着実に進化している。そして、スピードアップされている。世界の研究者人口が日本と比べて莫大であることが、その原動力になっている。

● 展望

最後に、循環器領域で望まれていた小口径の人工血管は、人工物ではなく細胞で作った人工血管、生体内で作ったバイオチューブなどの進歩により、細胞との親和性が高い人工臓器が開発され、臨床治験がまさに秒読み段階にきている。人工弁では現在、機械式人工弁、生体弁がすべてを占めている中へどれほど食い込めるか、期待したい。さらにカテーテル治療への対応ができる仕様へと開発が進められていることも心強い。これから研究開発をぜひ加速して進め、医療用製品として必要としている人々にぜひ届くようになってほしいものである。

心筋組織については、細胞で作れば、外部からエネルギー供給の必要ない人工心臓が作れる。念願の心臓移植、肺移植に代わる組織や臓器については、まだまだ手は届いていない。バイオ3Dプリンターで細胞を並べただけではまだまだ作製の道は見えない。如何に毛細血管をいきわたらせ、如何に心筋組織として成熟させるかが重要である。近年、心筋組織の再生医工学では心筋細胞の配向性が問題にされている。生体の心筋組織に配向があるので、必須の技術であるのだが、細胞の配向性や極性を形成するには、単に細胞に任せて培養するだけでは制御でき

ない。毛細血管の増生技術とともに人工的に細胞の挙動を制御しての組織・臓器作りが必要である。

世界では臓器移植で多くの人が助かり、臓器移植は極めて重要な治療法の1つと強く認識されている。ドナー臓器が今後足りなくなることに対して、海外の臨床家、研究者達は相当な危機感を持ち、解決することに真剣に取り組んでいる²¹⁾。日本にいると臓器移植はできないもので助からないのが当たり前、と慣れっこになりがちだが、臓器があれば助かるはずの人が日本では助かっていないという現実を正視すると、本当は日本が世界一、本気で移植に代わる臓器作りに取り組んでいて当然の国なのである。そのための科学技術を開発する取り組みがバイオプリンティング、バイオファブリケーションの本質であることをあらためて、強調したい。

謝辞：本稿執筆に際して、筆者のこれまでの歩みの中でご指導いただいた小児科、小児循環器専攻の先生方、人工心臓研究でご指導くださった先生方、また、バイオプリンティング研究でお世話になった関係者一同に対して心よりお礼申し上げます。また、本稿において、貴重な写真、資料を提供くださった佐賀大学教授中山功一先生、(株)リコー高木大輔様、国立循環器病研究センター中山泰秀先生にも心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) https://www.washingtonpost.com/news/innovations/wp/2016/03/07/3-ways-in-which-a-3d-printer-may-one-day-save-your-life/?utm_term=.e8eaa52dee9 (cited 2017 Aug 7)
- 2) 2015年度補助人工心臓レジストリー, 日本臨床補助人工心臓研究会 : <https://www.jacvas.com/adoutus/registry/> (cited 2017 Aug 7)
- 3) Rose EA, Moskomitz AJ, Packer M, et al : The REMATCH trial : rationale, design, and end points. Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure. *Ann Thorac Surg* 1999 ; 67(3) : 723-730
- 4) 中村真人, 荒井健一 : ヒトの組織を3次元印刷. 人工臓器学会誌 2015 ; 44(1) : 37-40
- 5) Nishiyama Y, Nakamura M, Henmi C, et al : Development of three-dimensional bio-printer : Construction of cell supporting structures using hydrogel and state-



- of-the-art inkjet technology. *J Biomech Eng* 2009 ; **131** (3) : 035001-035006
- 6) Calvert P : Cell Printing *Science* 2007 ; **318** : 208-912
 - 7) Arai K, Iwanaga S, Toda H, et al : Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images. *Biofabrication* 2011 ; **3**(3) : 034113
 - 8) 中村真人, 荒井健一, 戸田英樹, 小原千寿香 : 細胞プリンティング. *最新医学* 2014 ; **69**(7, Supple) : 1465-1477
 - 9) Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, et al : Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication* 2010 ; **2** : 014110-014116
 - 10) Arai K, Tsukamoto Y, Yoshida H, et al : The development of cell-adhesive hydrogel for 3D printing. *Int Bioprint* 2016 ; **2**(2) : 44-53
 - 11) Nakamura M, et al : Engineering of Artificial Lymph Node, in *Synthetic Immunology*, Watanabe T, Takahama Y, eds. Springer ; 2016. Chapter 9, p.181-200
 - 12) NEDO ニュースリリース : http://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_100328.html(cited 2017 Aug 7)
 - 13) 立体造形による機能的な生体組織製造技術の開発 日本の研究.com, より : <https://research-er.jp/categories/2983>(cited 2017 Aug 7)
 - 14) Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, et al : Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab* 2016 ; **23**(4) : 663-674
 - 15) Nakayama Y, et al : *Circulation* 2013 ; **128** : A13742
 - 16) 中山泰秀 : 生体内をバイオリクターとする組織構築. 三次元ティッシュエンジニアリング ~細胞の培養・操作・組織化から品質管理, 脱細胞化まで~ : 大政健史, 福田淳二編. 東京 : NTS Inc ; 2015. p.337-346
 - 17) Pati F, Jang J, Ha DH, et al : Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* 2014 ; **5** : 3935
 - 18) Lind JU, Busbee TA, Valentine AD, et al : Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater* 2017 ; **16**(3) : 303-308
 - 19) NIH National Center of advancing translational Sciences, Meet Chip : <https://ncats.nih.gov/tissuechip/chip> (cited 2017 Aug 7)
 - 20) Zhang YS, Arneri A, Bersini S, et al : Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials* 2016 ; **110** : 45-59
 - 21) Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, et al : The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol* 2017 ; **35**(6) : 530-542