



Title	光架橋性キトサンインクに着目した3Dバイオプリンティング材料・プロセスの開発
Author(s)	日高, 光将
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101700
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

光架橋性キトサンインクに着目した
3Dバイオプリンティング材料・プロセスの開発

令和 7 年 3 月

日高 光将

光架橋性キトサンインクに着目した
3Dバイオプリンティング材料・プロセスの開発

博士(工学)論文提出先

大阪大学大学院基礎工学研究科

令和 7 年 3 月

日高 光将

序文

本論文は、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の境 慎司教授の指導のもと、2020年から2025年になされた研究成果についてまとめたものである。

本論文は、光架橋性のキトサンインクに着目し、3Dバイオプリンティングの材料および造形の開発に関してまとめた。これまで、バイオプリンティングへの応用が限られていたキトサン材料に関して、押し出し式および液層光重合式の造形手法に応用できる光架橋性インクの開発と、これにイオン架橋を組み合わせた二重架橋キトサンヒドロゲルの開発および、Schiff塩基を組み合わせることによる機能化に取り組んだ。さらに、3Dバイオプリンティングにおける造形プロセスの開発の観点から、造形中に材料を高い混合率で、かつ細胞を傷つけることなく混合することができるノズルの開発も行った。

本研究を通して、キトサンインクのバイオプリンティングへの応用性を広げたものであると著者は考える。

要約

本博士論文は、光架橋性のキトサンインクに着目した3Dバイオプリンティング材料およびプロセスの開発について論述したものである。第一章では、3Dバイオプリンティングの研究の動向や、課題について記載した。3Dバイオプリンティングは、細胞や機能的な特性を持つインクを、3Dプリンタを用いて三次元の構造体を造形する技術であり、再生医療や創薬など、さまざまな分野への応用が期待されている。3Dバイオプリンティングの諸分野への応用を進めるためには、造形に用いる材料と造形を行うためのプロセスの高度化という2つの課題に取り組む必要がある。材料の開発では、造形に用いる材料が、造形を行った後に3次元の構造を維持するだけの十分な機械的強度をもつヒドロゲル化特性をもつことや、細胞の接着・生存を促すような生理活性を持つものを開発することが求められる。一方で、開発した材料を特定の用途や目的に応じて、設計図に基づいて高い忠実度で配列することができるような造形プロセスを開発することも重要である。本研究では、光架橋性のキトサンインクに着目し、3Dバイオプリンティングにおける材料・造形プロセスの開発に取り組んだものである。本博士論文の検討は、全体で4つの章に分かれる。

まず第二章では、光架橋性のキトサンインクの3Dバイオプリンティング用材料としての応用について記載した。キトサンは、カニなどの甲殻類や、キノコなどの菌類から抽出可能なキチンの脱アセチル化合物であり、抗菌性や創傷治癒効果などの優れた特性を持つ材料である。また、セルロースに次いで天然で2番目に多く存在し、資源としても豊富である。そのため、3Dバイオプリンティングのための材料として有用な材料である一方でバイオプリンティングへの研究は十分になされてこなかった。その理由として、三次元の構造を維持できるだけの十分な機械的強度を持ちかつ均一なヒドロゲルを得るためのヒドロゲル化手法が乏しいことが挙げられる。3Dバイオプリンティングの材料としては、3Dプリンタで材料が吐出されてから、短時間でヒドロゲルとして均一に固まるような特性が望ましい。そこで、光架橋によるヒドロゲル化手法に着目し、これをキトサンによるバイオプリンティングに活用できないかどうかを検討した。フェノール性水酸基は、過硫酸ナトリウム(SPS)を反応犠牲剤、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を光架橋の触媒として青色の可視光照射条件下で、フェノール性水酸基間同士で架橋反応を進行させることができる。これまでに、キトサンにフェノール性水酸基を導入した化合物(ChPh)の光架橋時の特性や、これを用いたバイオプリンティングへの応用は行われていなかった。ChPhインクにおける、SPSおよび $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 濃度がゲル化時間や、機械的強度に与える影響について調査し、これら特性を踏まえた上で、押し出し式3Dプリンティングや液層光重合式の3Dプリンティング手法において光架橋性のキトサンインクの活用が可能かどうか検討した。また、キトサン固有の特性である抗菌性や生分解性が保持されているかどうかについても評価を行った。開発したインクは、キトサン固有の特性を維持し、かつ汎用性のある3Dバイオプリンティング用インクであることを示した。

第三章では、光架橋性キトサンヒドロゲルの機能化を目指し、三リン酸ナトリウム(TPP)を用いたキトサンのイオン架橋が、フェノール架橋されたキトサンヒドロゲルに与える効果について記述した。フェノール性水酸基の架橋によって得られるヒドロ

ゲルは、機械的強度が脆いことが問題であった。そこで、フェノールの架橋に加えて、三リン酸アニオンとキトサンのアミノ基間で形成されるイオン結合を組み合わせることで、機械的特性や保水性などの諸特性に対してどのような効果が得られるのか検討を行った。まず、形状を維持し、安定的なヒドロゲルを得るには、フェノール架橋とイオン架橋を行う順序が重要であることを明らかにした。さらに、TPP イオン架橋をフェノール架橋と組み合わせることで、フェノール架橋のみによって得られるヒドロゲルよりも最大で 20 倍ヤング率の大きいヒドロゲルを得ることができた。さらに、良好な保水性と電気伝導性を示し、フレキシブルな回路の作製の実現に繋げられることを示唆した。

第四章では、光架橋性キトサンインクの造形精度を高めるために、酸化グルコマンナンと組み合わせることで形成される Schiff 塩基ヒドロゲルに着目し、3D バイオプリンティング用材料としての特性評価について記述した。多くのバイオプリンティング用材料は、液体として吐出を行い、その後ヒドロゲル化を行うことにより、3 次元の構造体を構築するが、このような液体材料は、ノズルから吐出された後に、低い界面張力によりプラットフォーム上を広がり、造形精度の低下を招いている。自己修復性を持つヒドロゲル材料は、剪断のかかっている状態では、その構造が崩壊し、流動的特性を示すが、剪断のない状態では、そのヒドロゲルの特性が復元される。このような特性は、バイオプリンティング用材料として、材料がノズルから吐出された後に、ヒドロゲルとしてその形状を維持するために、望ましい特性であると考えられる。Schiff 塩基反応によって形成されるヒドロゲルは自己修復性の特性を持つことが知られており、生体にとって有毒な架橋剤を必要とせず、室温でヒドロゲル化するというメリットが存在する。本研究では、より高い造形精度、インクとしての機能性を実現するために、酸化グルコマンナンと ChPh によって得られる Schiff 塩基ヒドロゲルをバイオプリンティング用材料として活用することを試みた。酸化グルコマンナン濃度がレオロジーと生理活性に与える影響について調査を行った。そして、3D プリンティングを行い、造形精度の評価を行った。開発した ChPh-酸化グルコマンナン複合ヒドロゲルは、ChPh インク単体と比べて、高い造形精度と、細胞適合性をもつことを明らかにした。

第五章では、キトサンインクを用いた高度な造形を行うための造形プロセスの開発として、効率的に材料を混合するためのノズルの開発について記述した。従来の材料混合技術には、受動的に材料を混ぜるパッシブミキサと、外的刺激により能動的に混ぜるアクティブミキサの 2 つの手法があったが、前者ではバイオプリンティング材料のような粘性のある材料を効率的に混ぜることができず、後者は、材料中に含まれる細胞に損傷を与える可能性があった。そのため、バイオプリンティングプロセス中で材料を効率的かつ穩やかに混合する技術が求められていた。そこで、音波による刺激により材料を混合する技術に着目した。音波は細胞にとって温和で、その強度の調整が容易な刺激である。本章では、バイオプリンティング用材料のモデル材料として活用されているアルギン酸インクを用いて、材料の混合を効率的に行うための、音波で誘起するマイクロミキサの適切な運転条件やデザインの決定をおこなった。開発したノズルは、材料を効率的に混合し、3D バイオプリンティングに有効なことを示した。

さらに、本論文の主題材料である ChPh インクの混合にも有効であることを示した。加えて、細胞に対する適合性が示された。

本研究は、材料開発と造形プロセス開発の観点から、光架橋性キトサンインクのバイオプリンティングでの有用性について述べたものであり、キトサン材料を用いた 3D バイオプリンティング研究の発展、ひいてはこれを用いた再生医療や創薬などの応用に寄与するものであると考える。

目次

第一章

序論.....1

第二章 押し出し式 3D プリンティングおよび液層光重合式 3D プリンティングに
応用可能な光架橋性キトサンインクの開発.....13

2.1. 導入.....13

2.2. 材料と方法.....14

2.2.1. 材料

2.2.2. ChPh の合成

2.2.3. ゲル化時間の測定

2.2.4. 粘弾性測定

2.2.5. 押し出し式 3D バイオプリンティング

2.2.6. 液層光重合式プリンティング

2.2.7. ChPh ヒドロゲルの膨潤試験

2.2.8. ChPh ヒドロゲルの生分解性

2.2.9. ChPh ヒドロゲルの抗菌性評価

2.3. 結果と考察.....17

2.3.1. ChPh の可視光によるゲル化とヒドロゲル特性

2.3.2. ChPh の造形精度

2.3.3. 生分解性

2.3.4. 抗菌性試験

2.4. 結論.....23

第三章 光架橋性キトサンのさらなる機能化を目指した TPP のアニオ
ン架橋とフェノール架橋のディアル架橋ヒドロゲルに関する研

究.....24

3.1. 導入.....24

3.2. 材料と方法.....24

3.2.1. 材料

3.2.2. ChPh の合成

3.2.3. 4 種類のゲル化手法によって得られるキトサンヒドロゲルの比較

3.2.4. フーリエ変換赤外分光法(FTIR)

3.2.5. ヤング率の測定

3.2.6. 膨潤性の評価

3.2.7. 保水性の評価

3.2.8. 抗菌性の評価

3.2.9. 導電性の評価

3.2.10. 3D プリンティングによる回路様構造体の造形

3.3. 結果と考察.....	28
3.3.1. 4種類のゲル化手法によって得られるキトサンゲルの比較	
3.3.2. FTIR	
3.3.3. ヤング率の評価	
3.3.4. 膨潤性の評価	
3.3.5. 保水性の評価	
3.3.7. 導電性の評価	
3.3.8. 3D プリンティングによる回路様構造体の評価	
3.4. 結論.....	35

第四章 3D バイオプリンティングのための光架橋および Schiff 塩基架橋性酸化グルコマンナン-キトサンヒドロゲルの開発.....	36
4.1. 導入.....	36
4.2. 材料と方法.....	37
4.2.1. 材料	
4.2.2. 酸化グルコマンナン(Ox-glucomannan)の合成	
4.2.3. ChPh の合成	
4.2.4. Schiff 塩基ヒドロゲルの調製	
4.2.5. FTIR	
4.2.6. 吐出性	
4.2.7. 動的弾性率(G')/損失弾性率(G'')	
4.2.8. 膨潤性の評価	
4.2.9. 細胞生存率	
4.2.10. 抗菌性	
4.2.11. 3D プリンティング	
4.3. 結果と考察.....	42
4.3.1. FTIR	
4.3.2. 吐出性	
4.3.3. Schiff 塩基と光架橋ヒドロゲルのレオロジー	
4.3.4. 膨潤性の評価	
4.3.5. 細胞特性	
4.3.6. 抗菌性	
4.2.7. 3D プリンティング	
4.4. 結論.....	50

第五章 音波によって引き起こされる回転流を用いた材料の混合が可能なバイオプリンティング用ノズルの開発.....	51
5.1. 導入.....	51
5.2. 材料と方法.....	52
5.2.1. 材料	

5.2.2. ノズルの作製	
5.2.3. 実験系のセットアップ	
5.2.4. 音波による回転流の強度評価	
5.2.5. 音波による回転流の混合率評価	
5.2.6. 音波が細胞の生存率に与える影響	
5.3. 結果と考察	57
5.3.1. 穴のサイズが回転流に与える影響	
5.3.2. 穴の角度が回転流に与える影響	
5.3.3. SA 水溶液の濃度が回転流に与える影響	
5.3.4. ピエゾに印加する電圧が回転流に与える影響	
5.3.5. 穴の配置が混合に与える影響	
5.3.6. 効率的な混合を起こすノズルの提案と粘性流の混合	
5.3.7. 異なる粘性の SA 溶液の混合	
5.3.8. 3D プリンティング	
5.3.9. 音波が細胞の生存率に与える影響	
5.3.10. 光架橋性のキトサンインクの混合	
5.4. 技術の限界と制約	68
5.5. 結論	68
第六章 結論	70
第七章 今後の展望	72
参考文献	75
業績欄	95
謝辞	97

第一章：序論

背景

事故や病気によって生じる人体組織の損傷・喪失に対して、人体の持つ再生能力には限界がある。このため、そのような損傷を修復するための治療法を確立することを目的とした研究が近年進められている。従来から用いられている治療法として、組織や臓器の損傷を受けた患者に対して、ドナーからこれらを移植する方法が挙げられる。しかしながら、患者に対してドナーの数が不足していることや、仮にドナーがいたとしてもこの移植手術が適用できるかどうかは、患者にとって適合的なドナーであるかどうかに依存するという問題点がある[1]。例えば、2021年のデータによると、アメリカでは病気や事故により組織や臓器を損傷し、その移植の手術を待っている患者が10万人以上存在しているが、移植手術を受けられるのはわずかに年間5000人程度にすぎない[2]。また、ドナーを待つ患者のうち、36%の患者が一年以内に死亡し、69%の患者が5年以内に死亡するとされ[3]、患者に対して、ドナーの数が追いついていないことが問題となっている。加えて、彼らが治療を受けられたとしても、移植された組織・臓器の細胞は患者の持つ細胞の遺伝情報と異なるため、体内の免疫系は移植された組織・臓器を異物と認識し、拒絶反応を引き起こす[4]。このため、移植手術の前には、ドナーの組織・臓器の遺伝情報が患者に対して適合的、すなわち起こりうる拒絶反応が重篤でないかどうかを確認する必要がある。また、移植手術後には、拒絶反応を抑える薬を服用し続けなければならない。このように、人体組織の損傷を修復するための移植手術による治療法は、ドナー不足や拒絶反応などの問題を抱えている。

3Dバイオプリンティングとは

前述の問題点を解決するべく、近年研究が進められている再生医療のためのアプローチの一つが3Dバイオプリンティングである。3Dバイオプリンティングとは、細胞や機能的な材料を含んだインクを、3Dプリンタを用いて3次元状の構造物に構築する技術のことである[5-7](図1-1)。3Dプリンタは、必要な材料と3Dデータがあれば、手軽にテーラーメイドに3次元の構造体を造形できるという利点がある。3Dバイオプリンティングは、このような利点を再生医療や新薬開発などの分野に活かすことを目的に、研究が進められている。例えば、患者の体細胞から得たiPS細胞を培養し、特定の臓器や組織の細胞に分化させ、この細胞を含んだインクを用いて、3Dバイオプリンティングにより人工組織・臓器を作製することができれば、ドナーからの組織・臓器の移植手術に依存しない治療法の確立が期待される[8]。また、患者自身の細胞を用いることにより、移植手術後の拒絶反応のリスクを回避することができるという利点もある。

3Dバイオプリンティング



図 1-1. 3D バイオプリンティング概略図

3D バイオプリンティングには、主に 3 つの造形手法が用いられている（図 1-2）。1 つ目は、材料をシリンジなどで押し出し、立体的造形物を作製する押し出し式 3D プリンティングである[9,10]。この手法は、多様な材料で応用可能であり、人間の組織や臓器の模倣体を作るのに要求されるような cm^3 スケールの大きさの構造体を作製することに適している手法であるが、造形精度及び造形速度に問題が存在する[11]。

2 つ目は、液体のインクを光によって重合させ、これを積層することで造形物を作製する液層光重合式 3D プリンティングである [12,13]。底面が光を透過する素材でできた液槽に、光で硬化する材料をみたし、液層の底部から液晶ディスプレイ等で光を照射し、液層に浸されたプラットフォーム上で材料を硬化させ、その積層を繰り返すことで 3 次元状の構造体を作製する手法である。造形速度が早く、数十 μm -数百 μm の小さなパターンを作製するのに適した手法である一方で、高粘性の材料を使用できないことや、材料や材料を架橋させるための架橋剤に毒性があるものが多く、細胞を用いるバイオプリンティングの分野で使用するには、制約が多く存在することが問題点である[12]。

3 つ目は、熱や電圧によって形の変形する素子を用いて、微小液滴を吐出し、その液滴を配列することで 3 次元構造体を作るインクジェット式プリンティングである [14,15]。その造形速度および造形精度は押し出し式 3D プリンティングと液層光重合式プリンティングの中間的な性能を示す。これら 3 つの造形手法のうち押し出し式 3D プリンティングが、造形できる構造体のスケールの大きさや、簡便性から幅広く利用されている[16]。

押し出し式 液層重合式 インクジェット式

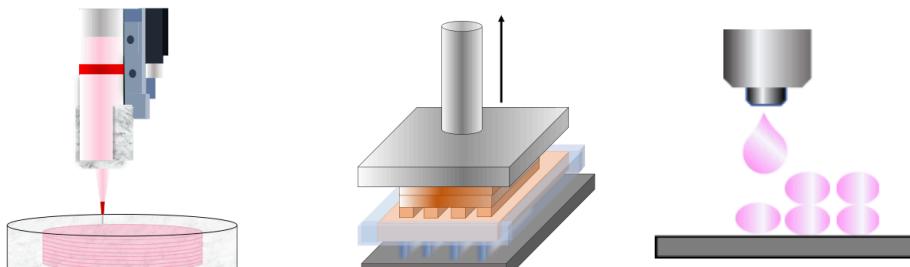


図 1-2. 主な 3D バイオプリンティングの造形手法

3D バイオプリンティングの研究の動向

バイオプリンティングの医療分野への応用研究の動向として、まず 1988 年に Klebe ら [17] がインクジェット式のプリンタを用いて、ヒト類表皮癌細胞由来の A431 細胞を含有したフィブロネクチンゲルのパターンの作製に成功したことにその歴史は始まる。2002 年には、Landers ら [18] が、押し出し式 3D プリンタを用いたアルギン酸ヒドロゲルによるバイオプリンティングを報告した。その後さらに研究は発展し、2019 年には Nadav ら [19] は押し出し式 3D プリンタを利用して、ES 細胞を含んだ細胞外マトリクス由来ヒドロゲル用いて心臓様構造体の作製に成功した他、Kim ら [20] は 3D プリンティングにより作製した筋肉シートをマウスに移植し、これがマウスの筋肉の機能を回復させることに成功したという報告をした。

また、バイオプリンティングは、薬剤のスクリーニングプロセスにも応用されようとしている。一般に、新薬の開発には、12-15 年の時間がかかるとされている [21]。特に非臨床試験の段階が最も時間がかかるプロセスであり [22]、このプロセスの効率化が新薬開発の効率化を加速させる鍵となっている。現状、薬剤スクリーニングでは、細胞ディッシュ上で育成した細胞の組織に対して、その薬効を調査しているが、このような二次元の組織では、実際の三次元組織やその周辺環境を再現することが難しく、正確な薬効を調べることが困難である [23,24]。そこで、より生体組織の機能に近い 3 次元組織様構造体を 3D バイオプリンティングで造形を行い、これを薬剤スクリーニング用いることで、薬効のより正確な評価と、これによる新薬開発プロセスの効率化を図る研究が行われている。これまでに、新薬開発を目的として、3D バイオプリンティングを用いた乳がんモデル [25] や、子宮頸がんモデル [26] が提案された。

他にも、食品の生産にも 3D プリンティング技術は応用が進められている [13]。例えば、食用肉を生産する畜産プロセスでは、環境に対する負荷が大きいことが問題となっており、人工的にかつ環境に優しい手法で食用肉を生み出す新たなプロセスが求められている。そのため、肉を構成する細胞を用いて、肉を模倣した組織をバイオプ

リンティングにより成型することができれば、環境に優しい食用肉の生産につなげることができると期待されている[27]。

このように、3Dバイオプリンティングは、再生医療、薬剤スクリーニングや食品生産など様々な分野への応用が進められている。

3Dバイオプリンティングの課題

3Dバイオプリンティングの諸分野への応用をさらに進めていくためには、造形に用いる材料の開発と、造形プロセスの高度化という2つの課題に取り組む必要がある(図1-3)。以下に、これら課題について記述する。

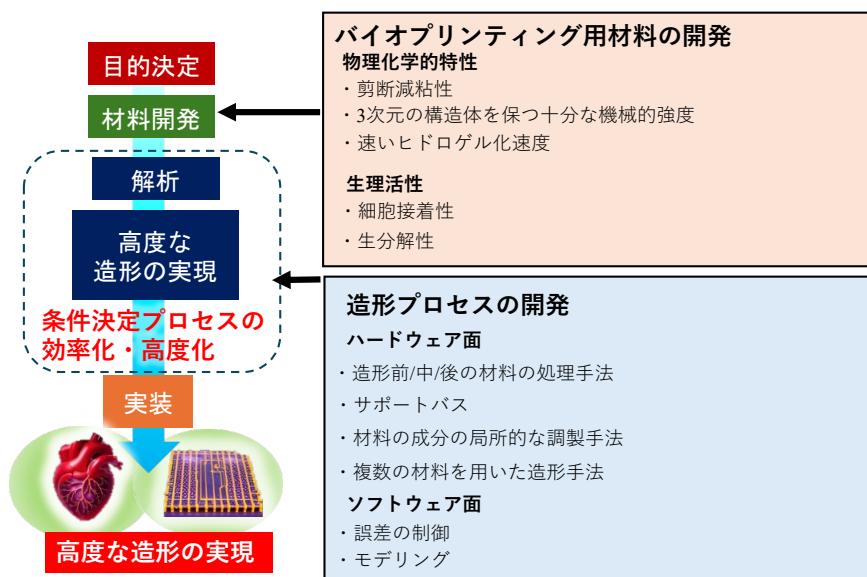


図1-3. 3Dバイオプリンティングプロセスの全体像

1.材料の開発

3Dバイオプリンティングの課題として、造形に用いる材料の開発が挙げられる。例えば、押し出し式3Dバイオプリンティングに用いられる材料は、レオロジー的特性の観点から、高い造形精度で造形するためには剪断減粘性な特性をもつことが望ましいとされる[28]。この特性は、剪断が与えられていない条件では、粘性が高く流動性が低い状態になるが、剪断が与えられている条件では粘性が低くなり、流動性が高まる。これにより、バイオプリンティング中に材料がスムーズに吐出され、吐出後はその形状が維持され、バイオプリンティングにおける造形精度の向上が見込める。また、造形に用いる材料がその構造を維持するだけの十分な機械的強度を持つ必要があり、このための材料のヒドロゲル化も重要である。このヒドロゲル化には、これまで共有結合架橋[29,30]、イオン架橋[31,32]などの架橋手法が用いられてきた。バイオプリンティングに主に使用されているヒドロゲル化手法について表1-1にまとめた。

表 1-1. バイオプリンティングに用いられている主なヒドロゲル化手法

ヒドロゲル化手法	特性	短所	Reference
温度架橋	・架橋剤を必要とせず、架橋手法がシンプル	・ヒドロゲル化に時間を要する ・ヒドロゲル化には、細胞にとって高温を要する可能性	[33,34]
イオン架橋	・温和で速いゲル化	・機械的強度が脆く、追加で架橋が必要	[35,36]
光架橋	・機械的特性の調節が容易	・生成する自由ラジカルが細胞生存率に影響を与える可能性	[37,38]
酵素架橋	・細胞に対する高い適合性	・ヒドロゲル化を制御するための造形用の複雑なノズルが必要	[39,40]

さらに、3D バイオプリンティングに用いられる材料には生理活性も求められる。例えば、バイオプリンティングでは細胞を使用するので、材料中で細胞が生存・成長するというような細胞に対する適合性を持つ必要がある。また、細胞が十分に材料中で成長し切った後には、細胞のさらなる成長を促す必要があるので、材料が酵素等によって分解可能な生分解性[41]を持つことも重要である。加えて、雑菌等の繁殖を防ぐための抗菌性[42]といった性質を持つことも望ましいと考えられる。

このような特性を満たす材料として、これまでに天然由来の高分子や[43–45]、合成高分子をベースとしたバイオプリンティング用材料の開発が行われてきた。例として、天然由来の高分子材料として、海藻由来の多糖類であるアルギン酸が挙げられる。アルギン酸のナトリウム塩は、良好な水溶性を示す材料である。この水溶液に塩化カルシウムを添加することによって、分子内のカルボキシ基間でイオン架橋を形成し、ヒドロゲル化する。また、天然に豊富に存在し、生体適合的であるため、アルギン酸をベースとしたバイオプリンティング材料の開発がおこなわれている。しかしながら、生理活性が低く、この材料のヒドロゲル上で細胞が接着しないことや、粘性が低いために3D プリンティングが行われた後の造形忠実性が低いことが問題点として挙げられる。生理活性の高い材料として、ゼラチンをベースとした材料の開発も行われており[46]、こうした材料を組み合わせたバイオプリンティング用材料の開発が行われている[35,47]。表 1-2 に、バイオインク材料として使用されている天然由来の高分子についてまとめた。

表 1-2. 3D バイオプリンティングで主に使用されている天然高分子

材料	特性	短所	References
アルギン酸ナトリウム	・イオン架橋による 瞬時なヒドロゲル化	・細胞接着性が無い	[48,49]
ヒアルロン酸	・高い細孔性 ・高い保水性	・ヒドロゲル化には化学的 修飾が必要	[50]
ゼラチン	・細胞接着性 ・温度架橋性	・弱い機械的強度	[35,47]
キトサン	・抗菌性 ・創傷治癒効果	・弱い機械的強度	[51]
ポリグルクロン酸	・イオン架橋による 瞬時なヒドロゲル化	・細胞接着性が無い	[52]
セルロース	・生分解性 ・強い機械的強度	・水溶性が低い	[53]

また、天然材料の他にも、合成高分子をベースとしたバイオプリンティング用材料の開発も行われている。例として、ポリビニルピロリドン[54]や、ポリカプロラクトン[55]などの合成高分子がバイオプリンティング用の材料として開発されている。現状では、バイオプリンティングの研究において、合成高分子材料の使用は全体の 10 % 程度の使用にとどまっている[56]。これは、合成ポリマーが、細胞の分化や成長を促すことができるような生理活性が欠如しているものが多いことや、材料の調製に有毒な溶媒を使うことが多いことが原因として挙げられる[57]。表 1-3 にバイオプリンティング用材料として開発されている合成高分子についてまとめた。

表 1-3. 3D バイオプリンティングで主に使用されている合成高分子

材料	特性	短所	References
ポリビニルピロリドン	・低い毒性 ・高い水溶性	・アレルギー反応が起こり うる ・高い吸湿性のため保管が 困難	[54]
ポリカプロラクトン	・疏水性 ・生分解性	・低い生理活性 ・分解されにくい	[55]
ポリビニルアルコール	・低い毒性	・機能性を示す官能基 が無い	[58]
ポリウレタン	・強い機械的強度 ・温度応答性	・液体の粘性が高く、扱いが 難しい	[59]

2.造形プロセスの開発

また、バイオプリンティングに用いる材料の開発に加えて、造形プロセスの開発は、開発した材料を用途や目的に応じて高精度に配列する上で重要である[60]。主な課題について以下に記述する。

・造形前/中/後の材料の処理手法

バイオプリンティングに用いられる材料の多くは高分子の溶液であり、この材料をヒドロゲル化することによって3次元の構造体の構築を行うが、用いる材料の特性や造形の目的に応じて、造形を行う前/中/後にどのような処理を施すかを決定する必要がある[47]。例えば、ゼラチンは温度応答性の材料であり、バイオプリンティングに用いる時には、この材料の温度制御が重要となる。そのため、ゼラチンをベースとした材料を用いて造形精度高く造形を行うためには、3Dバイオプリンタのノズル、エクストルーダー、プリンティングを行うプラットフォームの温度条件の決定を行う必要がある[61]。

・サポートバス

より高い造形精度で三次元の構造体を構築するために、造形される構造体の形状を維持することを目的として、サポートバスを用いたプリンティング手法が提案されている[62-64]。これは、高粘性の高分子溶液や、ヒドロゲルの浴中で材料を吐出して造形を行う手法である。このような環境下で造形を行うことにより、重力によって造形中の構造体が変形することを防ぐといった機能や、風などの造形精度を低下させる外的な要因を排除できるという利点がある[65]。用いるサポートバスの濃度条件の検討[64,66]や、造形に使用するノズルからのインクの吐出速度の検討[67]、造形後にサポートバスから材料を取り出すための条件の決定[68]などを行うことによって、サポートバスなしの造形と比較してより高い造形精度で造形を行うことができる。

・材料の成分の局所的な調製手法

細胞の成長や分化は、足場の硬さに大きく影響される。また、その特性は細胞種によって異なるため、生体組織を模倣した構造体の実現において、複数の材料を混ぜ合わせ、その成分を調製しながら造形を行う技術の開発は重要である[69,70]。押し出し式のバイオプリンティングにおいては多くの場合、層流の条件でインクを吐出して造形が行われ[71,72]、このような条件では、外界から力を加えることなしには材料を混ぜることが難しい。そのため、効率的に材料の混合を行うための技術を押し出し式3Dバイオプリンティングと組み合わせることは、造形プロセスの高度化において重要である。これまでに、物理的な攪拌により材料を混合するアクティブミキサ[73]や、流路を複雑に蛇行させることで材料の流れのみで混合を行うことができるパッシブミキサ[29]をバイオプリンタに搭載することによって、材料の成分を局所的に変化させながらプリンティングを行う手法が提案してきた。

・複数材料を用いた造形手法

生体中の臓器や組織では、複数の細胞がマイクロオーダースケールで複雑に配列している[74]。このような生体組織を模倣した構造体を造形するためには、複数の材料を高精度に配列するような技術の開発が重要である。一般に、押し出し式3Dプリンティングにおいては、複数のノズルを用いた造形手法が広く用いられている[75,76]。また、より速い材料切り替え速度でかつ高い造形精度で造形を行うことを目的に、一つのノズルから複数の材料を切り替える造形システムやノズルの開発も行われている[77,78]。

これらのハードウェアの面での造形プロセスの課題の他に、ソフトウェア面での課題が存在する。例えば、バイオプリンティング中に、造形されている構造体のデータを取り込み造形精度の評価を行い、そのフィードバックをリアルタイムで造形システムに反映させ、造形精度の誤差を最小にするようなソフトウェアの開発[79]や、造形する3次元構造体のモデルを作製する時に、造形に用いる材料の特性に応じてモデルの生成を行うソフトウェアの開発[80,81]が挙げられる。

本研究の目的

本博士論文では、天然由来の高分子の一種であるキトサンに着目し、3Dバイオプリンティングにおける材料と造形プロセスの開発に取り組んだ。キトサン(キチン)は、甲殻類や昆虫の外骨格、そしてキノコなどの菌類の細胞壁から抽出される多糖である

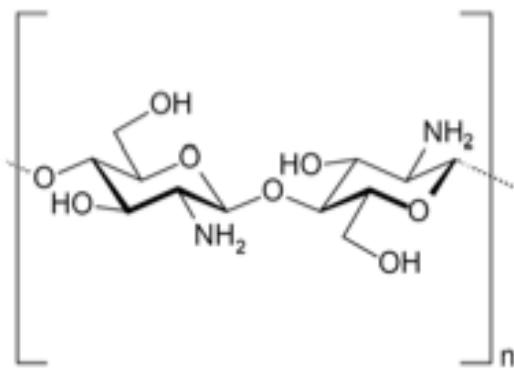


図1-4. キトサンの構造式

(図1-4)[82,83]。自然界では、セルロースに次いで2番目に多く存在し、資源として豊富である。キトサンはその構造中にアミノ基をもち、これが水溶液中でプロトン化されてカチオンとして存在するため、カチオン性のポリマーである。天然に存在する他の多糖類のほとんどがアニオン性であるため、これらと比較するとキトサンは特異的な性質を持った多糖類である。そして、キトサンは、このカチオン性に由来する、抗菌性や創傷治癒効果といった性質をもち、組織工学において望ましい性質を持つ材料である[84,85]。そして、このキトサン材料をバイオプリンティングに利用する試みがいくつか報告されている。例えば、Jieらの研究では、カルボキシメチルキトサン、

アルギン酸ナトリウムそしてゼラチンを組み合わせたインクによる3Dバイオプリンティングの研究を報告している[35]。このインクはゼラチンを含んでいるため温度応答性の特性をもち、マイクロニードルから、プリンティングプラットフォームに吐出され、その上で冷却される過程でゲル化が起こる。そして、得られたゲルに塩化カルシウムを加えることで、アルギン酸ナトリウム間でイオン架橋を引き起こし、二次的に架橋する。他の研究例として、Liuらは、可視光によって「事前に架橋された」光架橋性のプレゲル材料によって3Dバイオプリンティングを行う手法を提案している[86]。この研究においても、3Dバイオプリンティングを行った後に、造形した構造体を安定させるために再度光による架橋処理を行っている。これら研究の共通点としては、造形した構造物の機械的強度の安定を図るために、造形後に架橋するプロセスが必要であるということである。そのような複数の架橋プロセスがなく、高い造形忠実性を持つインクを開発することは、キトサンインクの応用性を高める上で重要なと考えられる。

そこで、本研究では、前述の問題点を解決し、キトサン材料のバイオプリンティングへの汎用性を高めることを目的として、キトサンのフェノール誘導体であるChPhに着目した。フェノール性水酸基は、Ru(bpy)₃を光触媒、過硫酸ナトリウム(SPS)を反応犠牲剤として、可視光によってフェノール性水酸基間同士で架橋を行うことができる。この架橋反応は、光による架橋反応のため、反応系全体で均一に架橋反応を行うことができるというメリットがある。これまでに、この反応を応用して、アルギン酸やヒアルロン酸のフェノール誘導体を用いた光架橋による3Dバイオプリンティングに関する研究が行われてきた[87,88]。また、キトサンのフェノール誘導体の開発(ChPh)やその酵素架橋に関する研究も行われてきたが[89,90]、これを用いたバイオプリンティングの研究や、光架橋を行った時の諸特性の評価は行われていなかった。本研究では、この光架橋性のキトサン材料であるChPhインクの3Dバイオプリンティング材料としての応用を、材料開発と造形プロセス開発の両面から取り組んだものである。本博士論文の検討は、大きく分けて4つの章に分かれる(図1-5)。

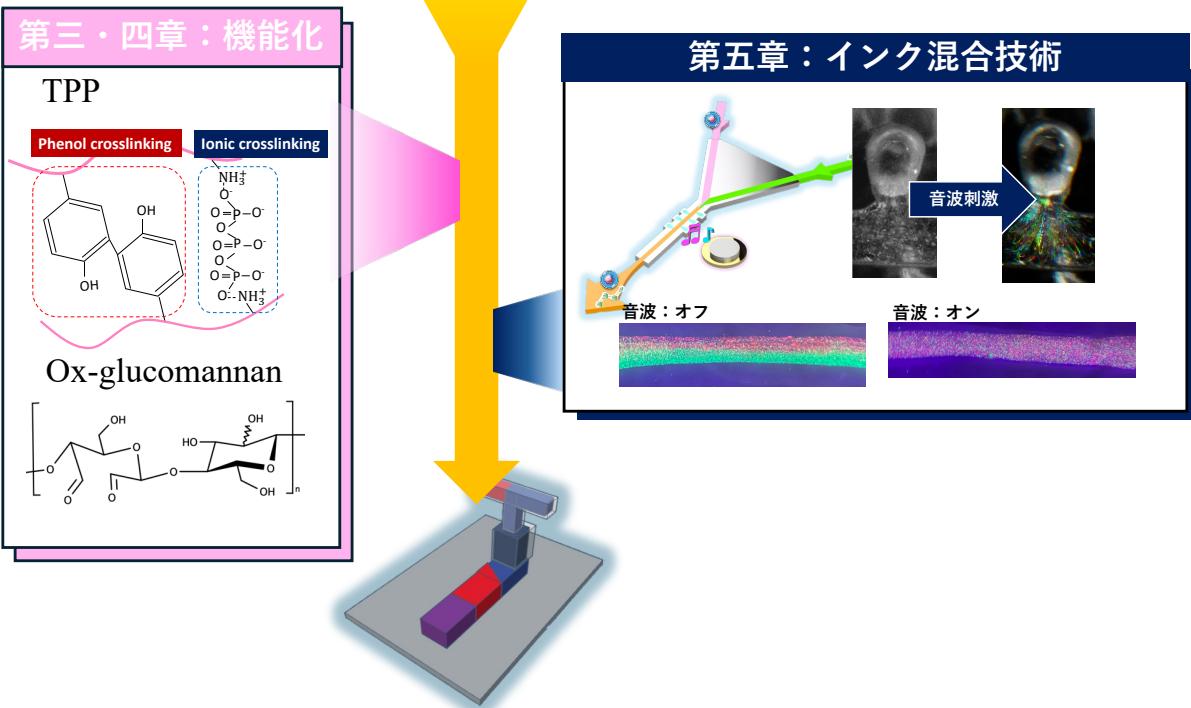
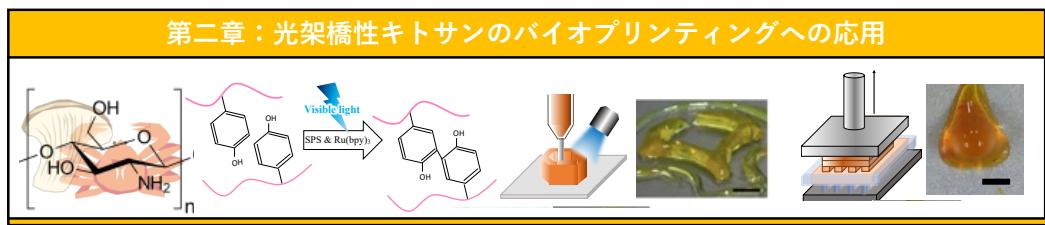


図 1-5. 本研究の概要図

第二章：押し出し式 3D プリンティングおよび液層光重合式 3D プリンティングに応用可能な、光架橋性キトサンインクの開発

前述のように、キトサンを用いた 3D バイオプリンティングでは、安定した構造体を得るために複数の架橋プロセスが必要であるという課題があった。そこで、フェノール性水酸基間の光架橋反応に着目した。この反応は、SPS を反応犠牲剤、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を光触媒として、青色光($\lambda = 452 \text{ nm}$)の条件で引き起こされる。光を用いた反応であるため、反応系全体で均一に架橋を起こすことができるというメリットがある。これをキトサンのバイオプリンティングに活用することで、造形前・造形後の複数の架橋プロセスを必要としない 3D バイオプリンティング用インクの実現につながると考えた。本研究では、キトサンにフェノール誘導体を導入したインク(ChPh インク)において、SPS や、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ の濃度がゲル化速度や材料の機械的特性に与える影響について調べた。そして、これら特性が造形精度に与える影響について評価し、造形前・造形後の架橋プロセスを必要とせずに押し出し式 3D バイオプリンティングに応用可能であることを示した。さらに、この光架橋性のキトサンインクは、より造形精度の高い手法である液層光重合式 3D プリンティングに使用可能であり、汎用性のあるインクであることを示した。

第三章：キトサンヒドロゲルの機能性調整を目的とした TPP イオン架橋とフェノール架橋による二重架橋ゲルに関する研究

材料開発の観点から、キトサンインクのさらなる機能化を行うべく三リン酸ナトリウム(TPP)によるイオン架橋に着目した。フェノール性水酸基の架橋により得られるヒドロゲルの機械的強度は脆く、より物理的な安定性を得るには、他の架橋法をこのヒドロゲルに加えることが必要であると考えられる。三リン酸ナトリウムは水溶液中で三リン酸アニオンを形成する。このアニオンはキトサンのプロトン化されたアミノ基とイオン結合を形成する。この結合によって得られるキトサンヒドロゲルは、薬剤送達用のキャリアとして使用することを目的に研究されており[91]、生体適合的なヒドロゲル化手法である。本研究では、フェノール架橋とこの TPP イオン架橋を組み合わせた二重架橋キトサンヒドロゲルの特性評価を行った。機械的強度、抗菌性、膨潤性、などの諸特性の評価を行った。提案した材料は、フェノール架橋と比べて最大で 20 倍大きいヤング率を有することを明らかにした。また、良好な保水性、電気伝導性を示した。最後に、3D プリンタを用いて回路用構造体の構築を試み、フレキシブルな回路、センサとしての応用の可能性を示した。

第四章：3D バイオプリンティングのための光架橋および Schiff 塩基架橋性酸化グルコマンナン-キトサンヒドロゲルの開発

三章と同様に、材料開発の観点から、キトサンインクのさらなる造形精度・機能性の向上を試みた。第二章で開発した光架橋性のインクは、押し出し式 3D プリンティングにおいて、液体のインクとして吐出するため、すぐにプリンタのプラットフォーム上で広がってしまい、その形状を維持することが容易でない。そのため、早いヒドロゲル化速度で材料を吐出後にすぐにヒドロゲル化する必要があり、高い SPS 濃度と強い光強度が必要であった。高濃度(>2 mM)の SPS は細胞にとって毒性があり、インク内に細胞を封入するに当たり、望ましくない条件である。また、高い強度の光の照射は、SPS のラジカルによるインクの分解を引き起こし、最終的な構造体の強度の不安定さを引き起こす可能性がある。これらの背景から、より高機能なキトサンインクを実現するためには、低い SPS 濃度、光強度において、材料が吐出された後に形状を維持することが望ましい。そこで、本章では、酸化グルコマンナンとキトサン間で形成される Schiff 塩基ヒドロゲルに着目した。酸化グルコマンにはアルデヒド基があり、一方のキトサンにはアミノ基があり、これら 2 つの官能基は Schiff 塩基反応によるイミン結合を形成する[92]。この反応により得られるヒドロゲルは、自己修復性の特性を持つ。また、架橋において、細胞にとって毒性のある架橋剤を必要としない点もこの反応の利点である[93]。このため、Schiff 塩基ヒドロゲルは、押し出し式 3D バイオプリンティングにおいて、材料の吐出後にその形状を維持する点、細胞にとって適合的であるという点で望ましいと考えられる。本研究では、酸化グルコマンと光架橋性のキトサンを組み合わせた新たなバイオプリンティング用材料を提案した。まず、酸化グルコマンナンと光架橋性のキトサンを混ぜることで Schiff 塩基によるヒドロゲルを調製した。これは、シリングに充填

可能であり、また自己修復性を持つため 3D バイオプリンティングにおける材料の吐出後に形状の維持が期待される。さらに、光架橋によるキトサンのフェノール架橋で、その形状はさらに固定化され、これによってより高度な造形物の造形が、低い反応犠牲剤濃度と、低い光強度条件下で可能となる。提案する材料のレオロジー、細胞適合性、抗菌性、造形精度の評価を行った。開発したヒドロゲル材料は、ChPh の液体インクと比べ、低い反応犠牲剤濃度(2 mM)で高い造形精度を示し、かつ細胞に対する高い適合性を示した。

第五章：音波によって引き起こされる回転流を用いた材料の混合が可能なバイオプリンティング用ノズルの開発

第五章では、開発した 3D バイオプリンティング用材料の機能を引き出すことを目的に、造形プロセスの開発に取り組んだ。材料の混合は、造形に用いる材料の成分を調製し、造形される構造体の剛性を制御する上で重要な役割を果たす[29,94]。例えば、細胞の足場の硬さは、生体の組織の分化に影響を与える因子ということが明らかになっている[95,96]。このため、バイオプリンティングに用いる材料を小さな混合体積で混合しその成分を調製し、配列を行う技術の開発が、バイオプリンティングの高度化において重要である。また、バイオプリンティングでは、細胞をインクの成分として用いるため、細胞にダメージを与えることのない温和な条件で混合する技術が必要である。温和な条件で効率的に材料を混合する手法のひとつが、音により誘起するマイクロミキサ（音波マイクロミキサ）である[97-99]。この方法では、音波が流路内の流体に圧力変動を起こし、これによって回転流を生み出し、材料の混合を実現する。これは室温で起こり、多様な特性を持つ溶液に応用できるという点が利点である[100,101]。本研究では、3D バイオプリンティングにおけるインクの混合が可能な、音波マイクロミキサの開発と実装を目的とした。まず、剪断減粘性を有するインクの混合のための適切な流路のデザインや、周波数や電圧などの運転条件の決定を行った。この検討には、バイオプリンティングの材料として幅広く用いられるアルギン酸ナトリウム (SA) 溶液を用いた[31,102]。適切な条件を決定した後、混合効率の高いノズルを提案した。最後に、提案したノズルを 3D バイオプリンタに実装し、その有効性を示した。さらに、本論文の主題材料である光架橋性キトサンインクの混合にも、本手法は有効であることを示した。

本博士論文は、光架橋性のキトサンインクの 3D バイオプリンティングへの応用を、材料開発および造形プロセス開発の両面から推進したものである。

第二章：押し出し式 3D プリンティングおよび液層光重合式 3D プリンティングに応用可能な光架橋性キトサンインクの開発

2.1. 導入

3D バイオプリンティングの主な手法としては、序章で述べたように、押し出し式 3D プリンティング、液層光重合式プリンティング、インクジェット式プリンティングの 3 つの方式が主に用いられている[102–105]。その中でも、押し出し式と液層光重合式プリンティングが 3D バイオプリンティングにおいて幅広く用いられている手法である。そして、これら 3D バイオプリンティング手法の汎用性を高めていくためには、応用の目的に適したバイオプリンティング用材料の開発が重要である[5]。これまでに、天然由来の高分子材料であるゼラチン、アルギン酸、ヒアルロン酸やこれらの誘導体が、バイオプリンティング用材料として開発されてきた[106–108]。これら高分子の中で、甲殻類の外骨格類由来のキトサンは、抗菌性、生分解性、生体適合性といった優れた特性を持つ材料であり、このような特性を利用した 3D バイオプリンティングへの応用に関する研究が行われている。例えば、Jie らの研究では、カルボキシメチルキトサン、アルギン酸ナトリウムそしてゼラチンを組み合わせたインクによる押し出し式 3D バイオプリンティングの研究を報告している[35]。このインクは、ゼラチンを含んでいるため温度応答性の特性をもち、マイクロニードルから、プリンティングプラットフォームに吐出され、この上で冷却される過程でヒドロゲル化が起こる。そして、得られたヒドロゲルに塩化カルシウム水溶液を加えることで、アルギン酸ナトリウム間でイオン架橋を引き起こし、二次的にゲル化する。他の研究例として、Liu らは、可視光によって「事前に架橋された」光架橋性のプレゲル材料によって 3D バイオプリンティングを行う手法を提案している[86]。この研究においても、3D バイオプリンティングを行った後に、造形した構造体を安定させるために再度光による架橋処理を行っている。これら研究の共通点としては、造形した構造物の機械的強度の安定を図るために、造形後に架橋するプロセスが必要であるということである。そのような複数の架橋プロセスがなく、高い造形忠実性を持つ構造体を得られるインクを開発することは、キトサンインクの 3D バイオプリンティングへの汎用性を高める上で重要になると考えられる。加えて、既報の「事前に架橋が必要なインク」では、液層光重合式のバイオプリンティングに応用することはできない。この造形手法は、液体のインクを必要とするからである[109]。本研究は、押し出し式および、液層光重合式プリンティングのような多様な造形方式に応用可能な、新規光架橋性キトサンインクについて報告したものである。

フェノール性水酸基が修飾された高分子は、過硫酸ナトリウム (SPS) を反応犠牲剤、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を光触媒として、可視光によってフェノール性水酸基間の架橋を介してヒドロゲル化することができる。SPS と $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を用いたフェノール性水酸基による架橋プロセスは、光のオン・オフや強度によってその反応の進行を制御することが容易であることから、このフェノール性水酸基を導入した多糖類のヒドロゲルを利用したバイオプリンティングの研究が報告されている[87,88]。

本研究では、このフェノール性水酸基を導入したキトサンについて、光架橋によって得られるヒドロゲルの特性の評価と、これを踏まえた3Dバイオプリンティングへの応用を試みたものである。これまでに、フェノール性水酸基を導入した光架橋性のヒアルロン酸やアルギン酸インクを用いたバイオプリンティングの研究が行われてきたが[87,88]、フェノール性水酸基を導入したキトサンインクの光架橋におけるヒドロゲルの物性や、これをバイオプリンティングに用いる時の特性に関しては知られていなかった。使用するキトサンインクは、光の照射によって10秒以内という短時間でヒドロゲル化し、押し出し式3Dバイオプリンティングおよび液層光重合式プリンティングの両手法において適用可能であることを示した(図2-1)。さらに、光架橋で得られるヒドロゲルは抗菌性があり、また酵素によって分解できるという生分解性があることを示した。これら結果は、光架橋性のChPhインクの3Dバイオプリンティングのための優れたポテンシャルがあることを示すものである。

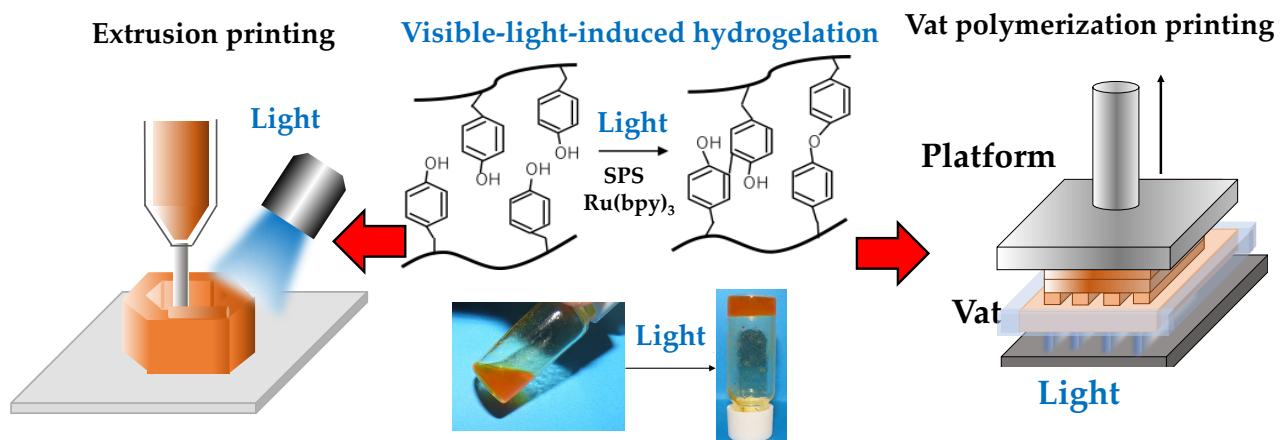


図2-1. 光架橋可能なChPh(中央)による、押し出し式(左)及び液層光重合式(右)3Dプリンティング

2.2.材料と方法

2.2.1. 材料

キトサン(Chitosan LL, deacetylation: 80%, weight average molecular weight: 50–100 kDa)は焼津水産化学工業(Shizuoka, Japan)から入手した。Lactobionic acid、*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine(TEMED)、とSPSは和光純薬(Tokyo, Japan)で入手した。Ru(bpy)₃·Cl₂·6H₂O、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC·HCl)、と3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid(HPP)はそれぞれ、Sigma-Aldrich(St. Louis, Missouri, United States of America(USA))、ペプチド研究所(Osaka, Japan)と東京化成工業で入手した(Tokyo, Japan)。キトサン分解酵素を主成分とするヤタラーセは、タカラバイオ(Shiga, Japan)で入手した。グラム陰性菌である大腸菌株OP50は、0.5 wt%の塩化ナトリウム、1 wt%のバクトリプロト(Becton Dickinson and Company, Flanklin Lakes, New Jersey,

USA)とバクトイーストイクストラクト(Becton Dickinson and Company)を含んだ Luria Broth(LB)培地で培養された。また、大腸菌の培養に、1.5 wt%の寒天を含んだ LB 寒天培地を使用した。

2.2.2. ChPh の合成

ChPh の合成は既報の文献に基づいて行った [89,90]。まず、7 wt%のキトサンを 20 mM の HCl 溶液に溶かした。続いて、2 wt%となるように TEMED を加え、その後 HCl と NaOH を用いて pH が 4 となるように調製した。この溶液に、HPP、Lactobionic acid、そして EDC · HCl をそれぞれ、1.5, 0.04, 1 wt%となるように加えて室温にて 20 時間攪拌を行った。その後、アセトンにて、反応物の沈殿を行い、80 wt%のエタノール水溶液で沈殿物を洗い不純物を取り除き、真空乾燥を行った。キトサンに修飾されたフェノール性水酸基の量は UV-vis にて測定され、 $3.0\text{--}4.8 \times 10^{-4}$ mol-Ph/g-ChPh であった[110]。

2.2.3. ゲル化時間の測定

文献に基づき、ゲル化時間を測定した[39]。まず、100 μL の 1.0 wt%ChPh 溶液を 48 ウエルプレートのウェルに加え、マグネチックスターラで 20 rpm の回転条件で攪拌子を用いて攪拌を行った。なお、ChPh 水溶液には SPS が 1-10 mM、Ru(bpy)₃ は 0.5-2 mM 含まれているものを用意した。これら溶液に可視光を照射した。攪拌に用いる攪拌子の表面にヒドロゲルが付着するまでにかかる時間をゲル化時間とした。なお、光強度は 452 nm で 3.18 W/m^2 であった(3.18 W/m^2 @452 nm、図 2-2)。

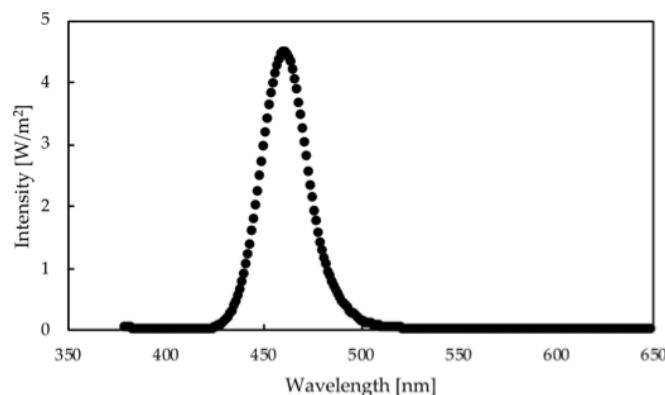


図 2-2. 押し出し式 3D プリンティングに用いた可視光のスペクトル。スペクトルは光量計(CL-70F、Konica Minolta、Tokyo、Japan)を用いて測定

2.2.4. 粘弾性測定

ChPh ヒドロゲルの粘弾性の測定は、レオメータ(HAAKE MARS III、Thermo Fisher Scientific、Waltham、Massachusetts、USA)を用いて行った。SPS が 1-10 mM、Ru(bpy)₃ が 0.5-2 mM 含まれた 1 wt% の ChPh 水溶液を用意し、20 分にわたって可視光(3.18 W/m^2 @452 nm、図 2-2)を照射して、この時の貯蔵弾性率の測定を行った。なお、測

定に用いるプローブは、直径 40 mm のパラレルプレートであり、プローブとプラットフォームのギャップは 0.1 mm、測定条件は 25 °C で 1.6 Hz の周波数、歪みを 1 % とした。

2.2.5. 押し出し式 3D プリンティング

3D プリンティングシステム (FLSUN-QQ-S、Zhengzhou Chaokuo Electronic Technology Co.、Henan、China) に光源 (LK-5BL、EK Japan、Fukuoka、Japan) を取り付けたものを用意し、ChPh インクを用いた 3D プリンティングを試みた。光の強度は図 2-2 の光源に合わせた。ChPh を 1.0 wt%、1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだインクを 21G の針から吐出し (外径: 0.81 mm、内径: 0.51 mm)、3 次元の構造体の造形を試みた。なお、SPS 濃度を 1-10 mM の濃度範囲で含んだ ChPh 溶液を用意し、造形精度の評価を行った。

2.2.6. 液層光重合式プリンティング

液晶ディスプレイ方式の液層光重合式 3D プリンタ (NOVA 3D、Shenzhen Nova Intelligent Technology Co.、Shenzhen、China) を用いて 3D プリンティングを試みた。なお、造形には 7 mM の SPS、2 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 1.0 wt% の ChPh 水溶液を用いた。このインクをプリンタの液層に注ぎ、0.14 W/m² @ 405 nm (図 2-3) の光強度で青色光を照射する条件でプリンティングを行った。一層あたりの造形厚さを 50 μm、露光時間を 8 s とした。

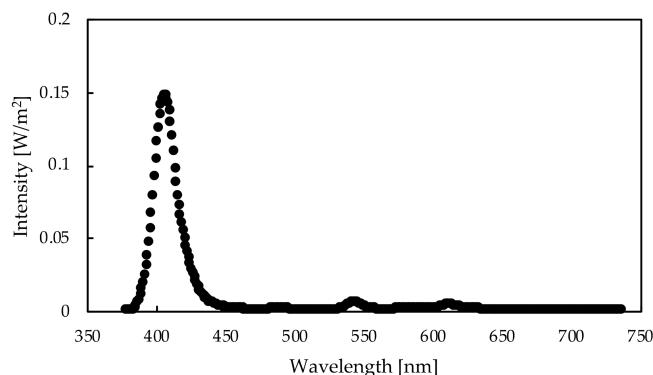


図 2-3. 液層光重合式プリンティングに用いた可視光のスペクトル。スペクトルは光量計 (CL-70F、Konica Minolta、Tokyo、Japan) を用いて測定

2.2.7. ChPh ヒドロゲルの膨潤試験

厚さ 1 mm、直径 7 mm の ChPh インクからなるヒドロゲルディスクを、押し出し式 3D プリンタで造形した。なお、SPS を 4 mM、Ru(bpy)₃ を 1 mM を含んだ 1.0 wt% の ChPh 水溶液を造形に用いた。得られたヒドロゲルのディスク構造体をリン酸緩衝液 (PBS) に浸漬し、37 °C の条件でインキュベートした。ヒドロゲルディスクの

直径から、膨潤率を 5 日間にわたって評価した。

2.2.8. ChPh ヒドロゲルの生分解性

上記手法によって作製したキトサンヒドロゲルディスクを酵素によって分解することを試みた。 1.9×10^{-2} U/mL ヤタラーセ溶液にヒドロゲルディスクをつけ、37 °C でインキュベートした。60 分間ヒドロゲルディスクの様子を観察した。

2.2.9. ChPh ヒドロゲルの抗菌性

グラム陰性菌を用いて抗菌性の評価を行った。バクテリアは、LB 培地で培養を行った。100 μ L の 10^8 - 10^9 CFU/mL のバクテリア溶液を寒天培地に均一に撒き、その上に 10, 50, 100 μ L の ChPh 溶液(1.0 wt%、4 mM SPS、1 mM Ru(bpy)₃)をスポットし、可視光(図 2-2)で 10 s 間架橋をした。この寒天プレートを 37 °C で一晩インキュベートした。比較として、アルギン酸ナトリウムのフェノール誘導体(Alginato-Ph)[87]を、同様の操作でバクテリア培養寒天培地上にスポットし、インキュベートを行った。そして、ChPh ヒドロゲル上とアルギン酸ヒドロゲル上でのバクテリアの増殖度の観察結果から、抗菌性について評価を行った。

2.3.結果と考察

2.3.1. ChPh インクの可視光によるゲル化とヒドロゲル特性

SPS を 2 mM、Ru(bpy)₃ を 1 mM 含んだ 1.0 wt% の ChPh 水溶液が可視光照射(3.18 W/m²@452 nm、図 2-2)によって架橋することを確認した(図 2-1, 中央)。次に、SPS および Ru(bpy)₃ の濃度がゲル化時間に与える影響について調査した。ゲル化時間は 3D プリンティングを行うにあたって、造形精度において重要なパラメータである。SPS 濃度の増加に応じて、ゲル化時間が短くなることを確認した(図 2-4(a))。なお、最も短いゲル化時間は、SPS 10 mM で 5.5 ± 1.3 s であった。また、Ru(bpy)₃ 濃度の増加に応じても、ゲル化時間は短くなることを確認した(図 2-4(b))。これら結果は、先行研究であるアルギン酸のフェノール誘導体の可視光によるゲル化反応の特性を一致するものである[87]。ゲル化時間のメカニズムは以下の通りである[111]: (1)光の照射によって、Ru(bpy)₃ の一電子が励起し、その電子が SPS を攻撃する。(2)SPS は開裂し、ラジカルを形成する。(3)形成されたラジカルが、キトサンに修飾されたフェノール性水酸基間の架橋反応を行う。そのため、SPS と Ru(bpy)₃ の濃度の増加が、ゲル化時間を早くすることが考えられる。

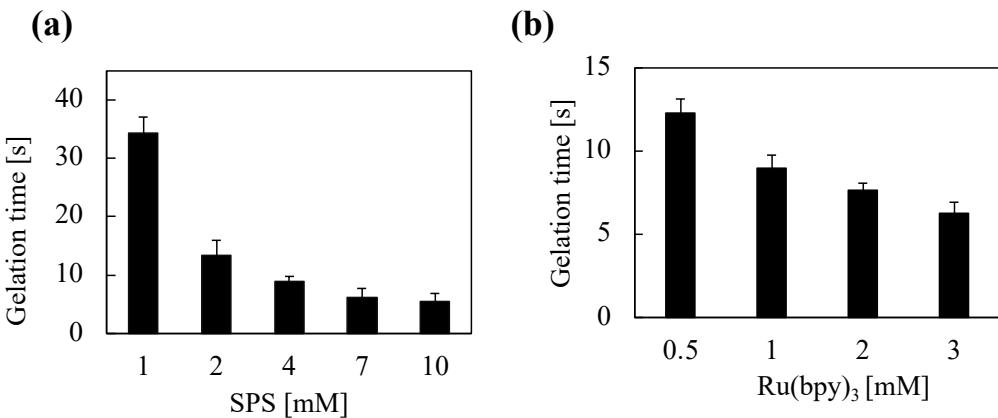


図 2-4. 光照射下(3.18 W/m^2 @452 nm) における 1.0 wt%の ChPh 水溶液のゲル化時間に(a) SPS 及び(b)Ru(bpy)₃ が与える影響、Ru(bpy)₃ 及び SPS 濃度はそれぞれ(a)1、(b)4 mM で固定。Data: Mean±S.D. ($n=10$).

続いて、異なる SPS、Ru(bpy)₃ 濃度条件下における ChPh インクの粘弾性の評価を行うために、レオメータを用いて貯蔵弾性率(G')の測定を行った。図 2-5(a) で示すように、貯蔵弾性率は、7 mM までの範囲で、SPS 濃度の上昇に伴って上昇することを確認した。そして、10 mM の SPS 濃度では貯蔵弾性率が 7 mM と比較して低くなることがわかった。Hong [112] らの研究では、ヒアルロン酸のフェノール誘導体が、SPS により形成されるラジカルによって分解されることが報告されている。ChPh インクの光架橋の反応系においても、光照射後に SPS から形成される遊離ラジカルが、キトサンのグリコシド結合を攻撃し、高分子鎖を破壊したことが考えられる。一方で、Ru(bpy)₃ の濃度上昇は ChPh の G' に大きく影響を与えることがなかった(図 2-5(b))。上記の架橋メカニズムでは、Ru(bpy)₃ は光架橋の触媒として機能するが、

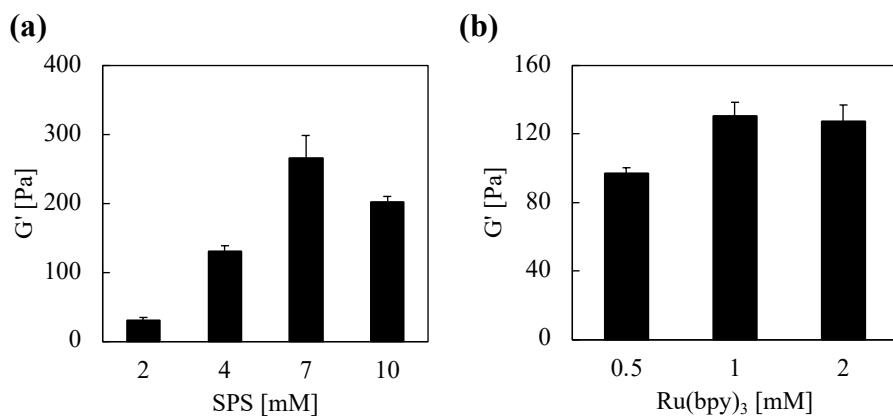


図 2-5. 光照射下(3.18 W/m^2 @452 nm) における 1 wt%の ChPh 溶液の貯蔵弾性率(G')に(a) SPS 及び(b)Ru(bpy)₃ が与える影響、Ru(bpy)₃ 及び SPS 濃度はそれぞれ(a)1、(b)4 mM で固定、Data: Mean±S.D. ($n=10$).

その存在が、キトサンの高分子鎖そのものに影響を与えることがないので、ゲル化時間の増減には寄与するが、G'には影響を与えることがないことが考えられる。これら結果から、SPS 濃度は、3D バイオプリンティングにおいて重要な役割を果たすことが推測される。

2.3.2. ChPh の造形精度

SPS と $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ の濃度がゲル化特性に与える影響の検討に基づき、ChPh インクの造形精度について検討を行った。SPS 濃度が造形精度に与える影響について、高い SPS 濃度($>2 \text{ mM}$)では、図 2-6 に示すように高い造形精度を可能にした。しかしながら、7 mM の SPS 濃度では、急速なゲル化のために造形中にノズル中でインクの詰まりを引き起こし、造形精度を低下させた。

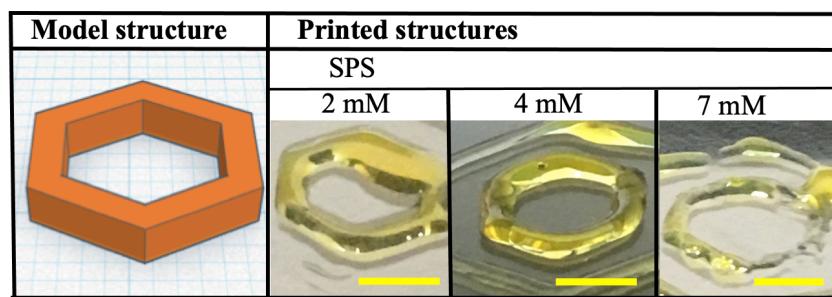


図 2-6. SPS 濃度が、設計図(左)に基づいた造形に与える影響。スケールバー: 5 mm.

これら結果に基づき、4 mM の SPS 濃度、1 mM の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を含んだ ChPh インクを用いて、押し出し式 3D プリンティングで、半球、格子などの構造体の造形を試みた。今回決定した造形条件において、キトサンの構造体を安定的に造形することができることを確認した(図 2-7(a))。そのヒドロゲル構造体は 5 日間に渡り、PBS 中、すなわち生理的環境下で安定性を示した(図 2-7(b))。ポリマーのフェノール誘導体の構造安定性については、過去の文献で報告されているものと一致している[39,110]。さらなる構造体の安定には、Acid red のような光吸収剤を添加することによりゲル化時間の緻密な制御が必要になると考えられる[87]。過去に、キトサンを用いたバイオプリンティングに関しては、複数の報告がなされている[86,113]。これら先行研究では、安定的な構造体を得るために複数の架橋プロセスを必要としている。本研究で開発したキトサンインクは、ノズルから吐出された後、光の照射によって 10 秒以内に架橋され、事前あるいは事後の架橋プロセスを必要としないというメリットがある。

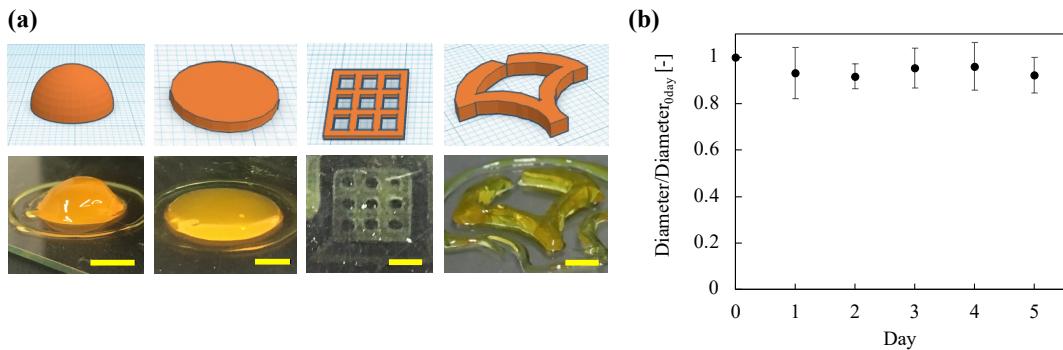


図 2-7. (a) 4 mM の SPS と 1 mM の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を含んだ 1 wt% ChPh 水溶液を用い、設計図(上)に基づいて押し出し式 3D プリンティングでプリントした構造体(下)、スケールバー : 5 mm, (b) PBS におけるディスク構造体の直径の経時変化。ディスク構造体はガラス基盤上にプリントした。Data: Mean \pm S.D. ($n=5$).

次に、この ChPh インクを用いて、液層光重合式プリンタで 3 次元の構造体を造形することを試みた。溝を持つ構造体を造形し、その溝幅を測定することで造形精度の評価を行った(図 2-8(a))。図に示すように、設計図上において、200 μm の溝の幅を持つものは、溝のパターンが現れたものの、100 μm の幅の溝パターンでは、その溝は消失した。造形プロセス中において、光が液層中で散乱するために、数十 μm の誤差は生じるもの、数百 μm 程度のオーダーの溝パターンを造形することができた。使用するプリンタのパラメータの調節等を行うことにより、より高い造形制度で構造体を構築することにつながると考えられる[60]。さらに、この造形精度を活かして、鼻や耳のような形をした構造体の造形を行うことができた(図 2-8(b))。また、液層光重合方式のプリンティング技術は、構造体を一層ごとに積層して造形することができ、早い造形速度で造形を行うことができる。このメリットを活かして、複数の構造体を同時に造形することができることも確認した(図 2-8(c))。本研究はキトサン材料を用いた、最初の液層光重合方式の 3D プリンティングの報告である。

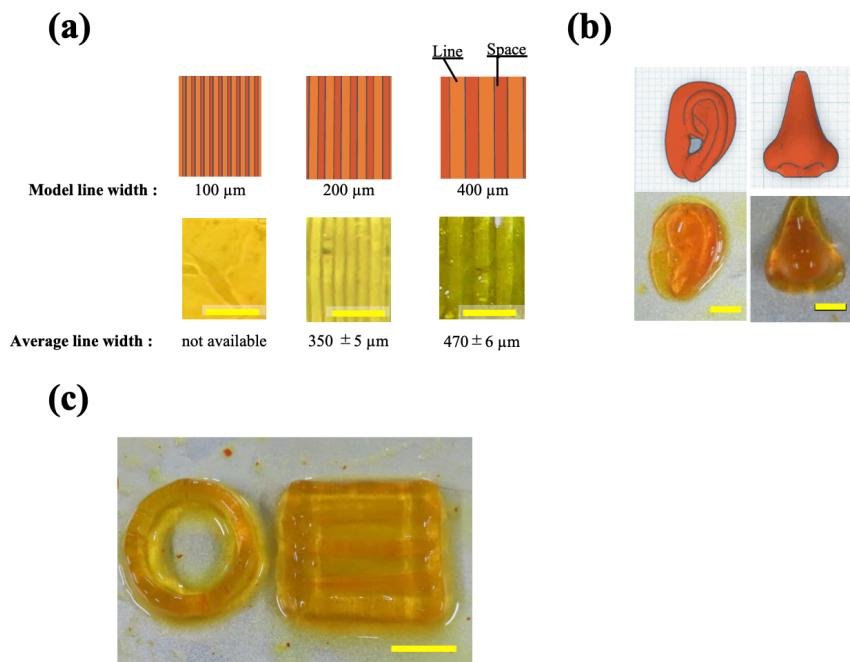


図 2-8. (a) SPS 7 mM, Ru(bpy)₃ 2 mM を含んだ 1 wt% の ChPh を用いた、液層光重合式プリンティングによるパターン構造体の造形。スケールバー: 200 μm 、(b)耳と鼻様構造体、スケールバー: 2 mm、(c)同時に構築した複数の構造体、スケールバー: 10 mm

2.3.3. 生分解性

次に、ChPh ヒドロゲルの生分解性の評価を行った。SPS 4 mM、Ru(bpy)₃ が 1 mM を含んだ 1 wt% の ChPh 水溶液を用いて押し出し式 3D バイオプリンティングでディスク構造体を造形し、この構造体を 1.9×10^{-2} U/mL のヤタラーセを含んだ PBS に、37 °C の条件で浸漬した。ディスク構造体は 60 分で分解され、光架橋性のキトサンヒドロゲルが酵素により分解されることを確認した(図 2-9)。生分解性は、生体にヒドロゲルを移植し、これを取り除く過程において、外科的に取り除くというプロセスを必要としないという点で有用な特性である[114,115]。

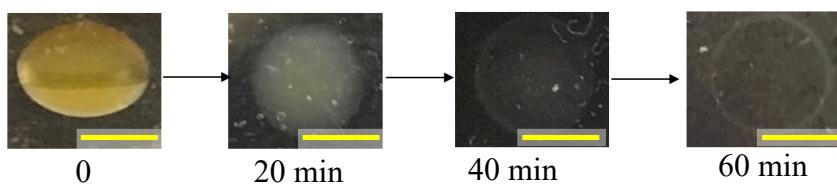


図 2-9. SPS 4 mM と $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 1 mM を含んだ 1 wt% の ChPh のディスク構造体を、 1.9×10^{-2} U/mL のヤタラーセ溶液中に 37 °C の条件で静置した時の様子、スケールバー：5 mm.

2.3.4. 抗菌性試験

最後に、ChPh ヒドロゲルの抗菌効果について調査した(図 2-10)。グラム陰性菌を抗菌試験に用いた。比較試験として、アルギン酸のフェノール誘導体を用いて同様の実験を行った。アルギンヒドロゲルでは、大腸菌が増殖しているが、キトサンヒドロゲルをスポットした領域およびその周辺で、バクテリアの増殖が抑えられていることを確認した。これらの結果から、ChPh ヒドロゲルは抗菌性の特性を持っていることがわかった。キトサン材料の抗菌性は、過去に文献で報告されている[116–118]。キトサンの抗菌性のメカニズムは、以下のように考えられている[119]。キトサンは、分子中にプロトン化されたアミノ基をもち、これによってカチオン性の特性を持つ。バクテリアの細胞膜は、アニオン性であり、これによってバクテリアにキトサンが吸着し、バクテリアの代謝を阻害する。抗菌性は、生分解性と同様に重要な特性である。例えば、創傷皮膚等の目的でこの材料を使うことにおいて、バクテリアが引き起こす感染症を防ぐという点で、重要な役割を果たすと考える。

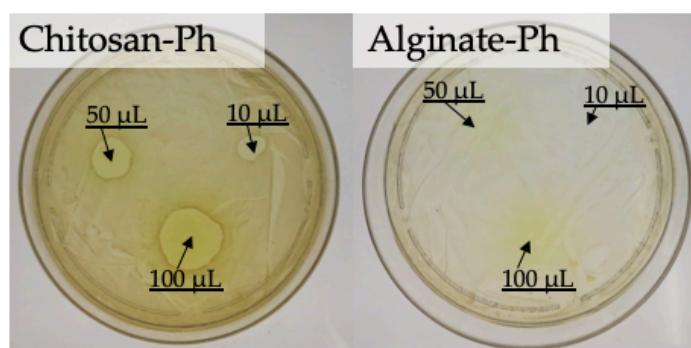


図 2-10. *E.coli* を用いた ChPh ヒドロゲルの抗菌性評価。寒天培地上で 37 °C の条件で一晩培養。

2.4. 結論

本研究では、押し出し式および、液層光重合式の3Dバイオプリンティング手法に、光架橋性のキトサンインク(ChPhインク)の応用を試みた。ゲル化時間や機械的特性はSPSやRu(bpy)₃濃度で制御可能であることを示した。また、押し出し式3Dバイオプリンティングにおいて、造形前、造形後のヒドロゲル化プロセスを必要としないというメリットを示した。さらに、この材料は液層光重合方式のプリンティングに応用可能であることがわかった。加えて、キトサンにフェノール性水酸基が導入されたChPhヒドロゲルは、キトサン固有の特性である生分解性・抗菌性を損なうことなく保持していることを確認した。これらのことから、光架橋性のキトサンインクは、汎用性・機能性の点で有用であると考える。

本章の一部図・内容は、”Visible Light-Curable Chitosan Ink for Extrusion-Based and Vat Polymerization-Based 3D Bioprintings”というタイトルで日高らによって国際誌 Polymers の 2020, 13(9), 1382 に掲載されたものである。本内容は、出版社 MDPI(Basel, Switzerland)から許可を得て掲載している。

第三章：光架橋性キトサンのさらなる機能化を目指した TPP のアニオン架橋とフェノール架橋のディアル架橋ヒドロゲルに関する研究

3.1. 導入

第二章では、光架橋性のキトサンインクが 3D バイオプリンティングへの応用に有効であることを示した。しかしながら、フェノール架橋によって得られるヒドロゲルは、そのゲル化時間が 10 秒以内と早く、均一な特性を持つものの、機械的強度が乏しいことが問題点として挙げられる[120]。本研究では、フェノール架橋によって得られるキトサンのヒドロゲルにさらに、三リン酸ナトリウム(TPP)によるイオン架橋を組み合わせた二重架橋ヒドロゲルを提案した。TPP は水溶液中で三リン酸アニオンとして存在し、プロトン化されたアミノ基とイオン結合を形成する[91,121]。フェノールの共有結合性の架橋と、TPP によるイオン結合性による、機械的強度や膨潤性に与える影響について考察を行った。また、3D プリンティングで使用できる材料であるかどうかの検証も行った。

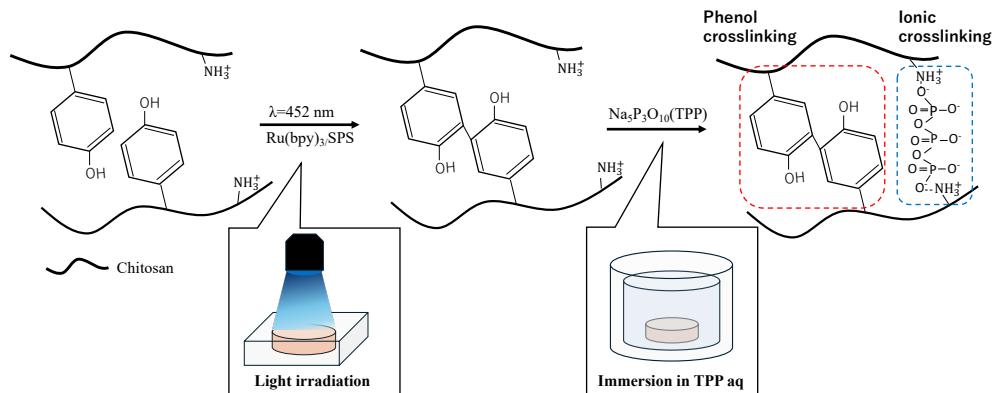


図 3-1. フェノール・TPP イオン架橋により得られるキトサンヒドロゲルの模式図。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 材料

キトサン(かに由来、500 kDa、脱アセチル化度 75 %)、過硫酸ナトリウム、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3 \cdot \text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodi-imide hydrochloride (EDC · HCl)、3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (HPP)、N,N,N,N' Tetramethylethylenediamine (TEMED) と TPP はシグマアルドリッヂ

(St.Louis、 MO、 USA)で入手した。大腸菌 (OP50)は、 0.5 wt%の NaCl、 1wt%のバクトトリプトン、 バクトイーストイクストラクト (Becton Dickinson and Company、 Franklin Lakes、 NJ、 USA)で培養した。

3.2.2. ChPh の合成

ChPh の合成は 2.2.2. と同様にして行った。既報の文献に基づき [89,90]、 7 wt%のキトサンを 20 mM の HCl 溶液に溶かした。次に、 2 wt%となるように TEMED を加えた。HCl と NaOH を用いて pH が 4 となるように調製した。この溶液に、 HPP、 Lactobionic acid、 そして EDC・HCl をそれぞれ、 1.5, 0.04, 1 wt%となるように加えて室温にて 20 時間攪拌を行った。その後、アセトンにて、反応物を沈殿させ、 80 wt% のエタノール水溶液で沈殿物を洗い不純物を取り除き、 真空乾燥を行った。

3.2.3. 4 種類のゲル化手法によって得られるキトサンヒドロゲルの比較

4 つのゲル化手法でヒドロゲルを調製した。 (a) 125 μ L の ChPh (2 wt%) 水溶液を直径 12 mm の円形の型に流し入れ、 1.5 wt% の TPP 溶液を加えた。 (b) 4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 125 μ L の ChPh (2 wt%) 水溶液を型に流し入れ、 可視光によって 20 分架橋した (8.0 W/m²@452 nm)。 (c) 4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 125 μ L の ChPh (2 wt%) 水溶液を型に流し入れ、 直後に 1.5 wt% の TPP 水溶液を加えた。 5 分後、 20 分間青色光を照射した。 (d) 4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 125 μ L の ChPh (2 wt%) 水溶液を型に流し入れ、 20 分間青色光で架橋を行った。その後、 1.5 wt% の TPP 水溶液を加えて、 架橋を行った。

3.2.4. TPP-フェノール架橋ヒドロゲルの調製

1-4 mM の SPS、 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 125 μ L の水溶液を型に流し入れ、 青色光 (8.0 W/m²@452 nm) による 20 分間架橋を行った。その後、 ヒドロゲルサンプルを 30 mL の 1.5 wt% の TPP 水溶液に入れ、 1, 5, 10 分間 TPP の架橋を行った (ChPh-TPP1、 ChPh-TPP5、 ChPh-TPP10)。このようにして調製したゲルを以下の実験で用いた。

3.2.5. フーリエ変換赤外分光法(FTIR)

ChPh、 ChPh-TPP1、 ChPh-TPP5、 ChPh-TPP10 ヒドロゲルの FTIR スペクトルを FT/IR-4100 (JASCO、 Tokyo、 Japan) を用いて測定した。 それぞれのヒドロゲルは乾燥して粉碎し、 KBr とともに混ぜ合わせた (KBr:試料 = 100:1)。 4 cm⁻¹ で 30 回の積算回数でスキャンを行った。

3.2.6. ヤング率の評価

ChPh-TPP1、 ChPh-TPP5、 ChPh-TPP10 のヤング率の測定を材料試験機 (EZ-test、 Shimizu、 Kyoto、 Japan) を用いて 6 mm/s で行った。 SPS 濃度は 1-4 mM、 Ru(bpy)₃

濃度は 1 mM とした。なお、ヤング率は 1-10 % の歪みを与えた条件で計測を行った。計測されたヤング率は、TPP 架橋なしのゲルの機械的強度と比較した。

3.2.7. 膨潤性の評価

膨潤性は、文献地に基づいて評価を行った[122]。なお、ChPh-TPP1, ChPh-TPP5 と ChPh-TPP10 ヒドロゲルは、1-4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ の条件で用意した。用意したヒドロゲルは、リン酸緩衝液(PBS, pH=7.4)に 20 °C の環境下で浸した。以下の式を用いて膨潤性の評価を行った。

$$\text{Swelling degree } [-] = \frac{w_w}{w_0} \quad (1)$$

ここで、W₀ は初期重量、W_w は最終的なゲルの重さである。この値が 1 よりも大きいと、ゲルは膨潤したことを示し、1 よりも小さいと収縮したことを示す。

3.2.8. 保水性の評価

保水性は文献に基づく手法で評価を行った[122]。24 ウェルプレートにヒドロゲルが置かれ、20 °C、5 時間で静置した。4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ ChPh、ChPh-TPP1、ChPh-TPP5 と ChPh-TPP10 を使用した。以下に示す式を用いて保水性を評価した。

$$\text{Water retention } [-] = \frac{w_t}{w_0} \quad (2)$$

ここで、W₀ は初期の重さ、W_t は t 時間後の重さである。

3.2.9. 抗菌性の評価

グラム陰性菌である大腸菌を用いて抗菌性の評価を行った。LB 培地を用いて大腸菌を培養した。振とう培養機を用いて、37 °C、初期濃度 10⁸ CFU/mL で一晩培養を行った。その大腸菌の濃度は、文献に基づき、CFU 値の計算を行うことで算出した[123]。

3.2.10. 導電性の評価

125 μL の四角の型を用意し、4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 2 wt% の ChPh 水溶液を流し入れ、光を照射し、ヒドロゲル化を行った。ヒドロゲル化後に、1.5 wt% の TPP 水溶液に 5 分間浸した。ゲルの両極に、電極を取り付けた下図に示

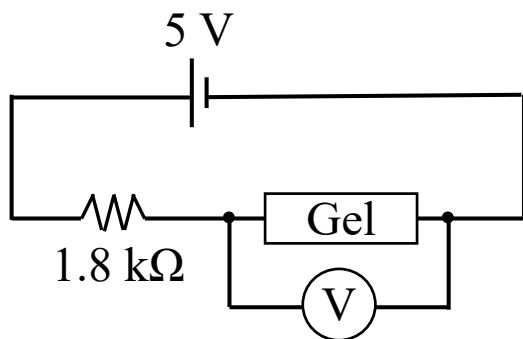


図 3-2. 抵抗測定用回路図。

す回路を作製し、マイクロコントローラ(Arduino uno、Italy)を用いて 5 V の電圧を印加し、電圧の測定を行った。

そして、回路中の電流値の計算を以下の式で行った。

$$I = \frac{V - V_{gel}}{R}$$

I は回路の電流、 V は回路全体の電圧(5 V)、 V_{gel} はヒドロゲルに印加されている電圧、 R は抵抗である。そして、得られた電流値から、ヒドロゲルの抵抗 R_{gel} を以下の式で計算した。

$$R_{gel} = \frac{V_{gel}}{I}$$

比較として、TPP イオン架橋なしのフェノール架橋ゲルの抵抗の計測を行い、比較した。

3.2.11. 3D プリンティングによる回路様構造体の造形

市販の 3D プリンタ(BioX、Cellink、Sweden)を用いて、光照射下において PDMS シートの上に回路様構造体の構築を行った。その後、造形物に 1.5 wt%の TPP 溶液を加えた。その後、回路に PDMS をかけて覆い、75 °C のオーブンで加熱し、回路の作製を試みた。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 4種類のゲル化手法によって得られるキトサンヒドロゲルの比較

まず、4種類の異なる架橋順序で得られるヒドロゲルの評価を行った(図 3-3)。最初の架橋方式では、125 μL の ChPh の水溶液を 12 mm の直径の型にいれ、1.5 wt% の TPP 水溶液を加えた。TPP 溶液を加えた後に、ゲルが縮んでいる様子を確認した(図 3-3(a))。2つ目の方法では、4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 125 μL の ChPh 水溶液を型にいれ、20 分間にわたって光を照射し(8.0 W/m²@452 nm)、架橋を行った。試料は安定しており、収縮は起こらなかった(図 3-3(b))。3つ目の方法では、4 mM の SPS と 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ 125 μL の ChPh 水溶液を型にいれ、1.5 wt% の TPP 水溶液を加えて 5 分間静置した(図 3-3(c))。その後、青色光を照射した(8.0 W/m²@452 nm)が、最初の試料と同様にして、収縮を確認した。最後の手法は、4 mM の SPS の 1 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ ChPh 溶液を型に流し入れ、青色光で 20 分間架橋を行った。その後、1.5 wt% の TPP 水溶液を加えて、5 分間 TPP による架橋を行った。これによって得られたゲルは収縮が起こらなかった(図 3-3(d))。キトサンヒドロゲルを諸分野に応用するためには、構造体がその形状を維持することが重要である[6,124]。光架橋の後に TPP イオン架橋を行うことによって得られるゲルは、構造が崩壊しない安定的なヒドロゲルであるということがわかった。

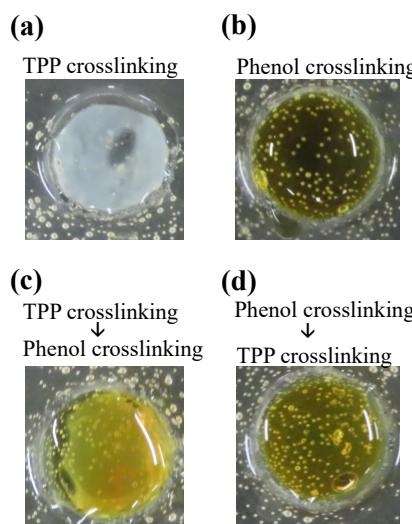


図 3-3. 異なるヒドロゲル化順序により得られるヒドロゲルの形状の比較: (a) 5 分間の TPP イオン架橋、(b) 青色光による 20 分間のフェノール架橋、(c) TPP イオン架橋の後にフェノール架橋、(d) フェノール架橋の後に TPP イオン架橋。

3.3.2. FTIR

上記で、架橋の順序が安定的なヒドロゲルを得るために重要なことを示した。続いて、化学的構造をさらに詳しく理解するために、光架橋で架橋された後に TPP イオン架橋されたキトサンヒドロゲルの FTIR スペクトルを測定した(図 3-4)。まず ChPh では、-OH や-NH₂ に帰属する 3300 cm⁻¹ でブロードなピークを確認した。2900 cm⁻¹ では C-H の対称および非対称伸縮に帰属する特徴的なピークを観測した。1645 cm⁻¹ にはアミド I の伸縮に帰属するピークが見られた。1580 cm⁻¹ には、一級アミンの N-H 変角振動由来のピークが見られた。1060 cm⁻¹ には C-O の伸縮由来のピークが見られた。これら結果は、先行研究に一致していた[125,126]。Ch-TPP1, ChPh-TPP5, ChPh-TPP10 において、890 cm⁻¹ に TPP がヒドロゲル中に存在することを示す P-O-P の対称振動由来のピークが見られた[125]。しかし、Ch-TPP1, ChPh-TPP5, ChPh-TPP10 にスペクトルの違いは見られなかった。

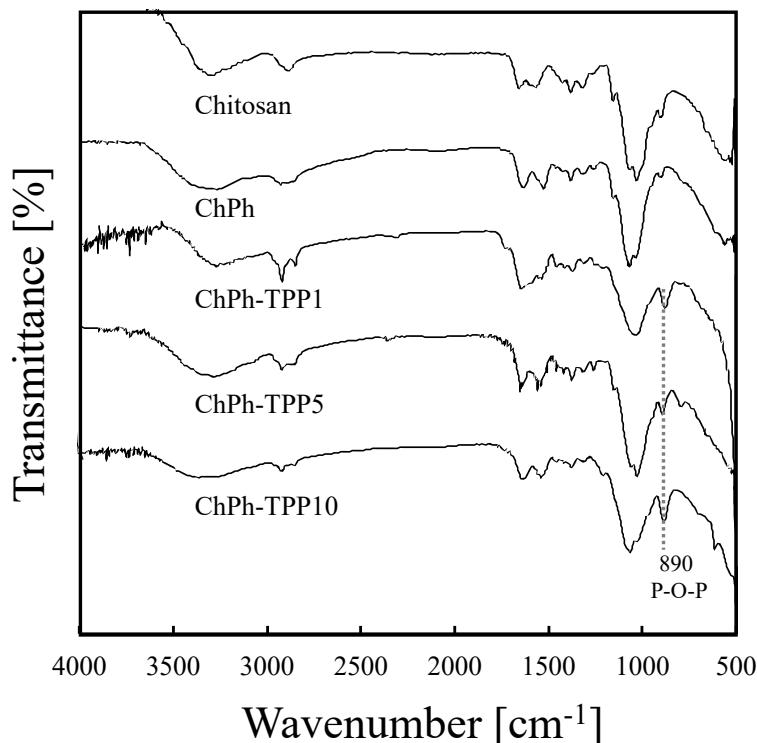


図 3-4. ChPh、ChPh-TPP1、ChPh-TPP5、ChPh-TPP10 の FTIR スペクトル。

3.3.3. ヤング率の評価

TPP の浸漬時間が、フェノール架橋と TPP イオン架橋によって得られたヒドロゲルの機械的特性に与える影響を調べるために、ヤング率の評価を行った(図 3-5)。TPP 浸漬時間の増加に伴ってヤング率の上昇が見られた。例として、SPS1 mM の ChPh-TPP1 は 10.7 ± 3.1 kPa であり、同様の ChPh 濃度、SPS 濃度で TPP 架橋のないサンプルでは 0.53 ± 0.06 kPa であった($p < 0.05$)。最大のヤング率は 2 mM の SPS 濃度における ChPh-TPP10 で 23.7 ± 7.6 kPa であった。TPP 架橋のないヒドロゲルと

比較して、TPP とフェノールによる二重架橋のヒドロゲルは最大でおよそ 20 倍ヤング率が大きくなった。報告されるところによると、フェノール架橋によって得られるヒドロゲルは生体適合的であるが、その硬さは弱くて脆い(<10 kPa) [52,127]。機械的強度は、ヒドロゲルの安定性に加えて、細胞の接着・成長性に大きく影響を与える [29,69]。ChPh のフェノール架橋によって得られるゲルを TPP 架橋で処理することによって、機械的強度の改善、調節ができることがわかった。

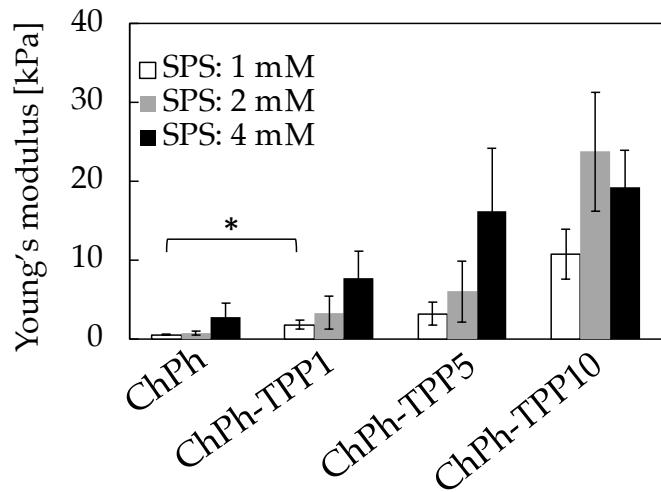


図 3-5. TPP の浸漬時間がヤング率に与える影響。SPS と $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を含んだ ChPh 水溶液を可視光によってフェノール架橋し、その後 TPP 水溶液に 1、5、10 分浸した（それぞれ ChPh、ChPh-TPP1、ChPh-TPP5、ChPh-TPP10）、Data: Mean \pm S.D. ($n = 3-5$)、* $p < 0.05$ 。

3.3.4. 膨潤性の評価

ChPh-TPP ヒドロゲルの膨潤性の評価を行った（図 3-6）。用意した ChPh、ChPh-TPP1、ChPh-TPP5、ChPh-TPP10 を PBS に 5 時間浸した。フェノールと TPP で二重架橋されたヒドロゲルは収縮することを確認した。例えば、1 mM で架橋した ChPh は膨潤率が 197 ± 59 % であるのに対して、ChPh-TPP10 では 55 ± 5 % であった ($p < 0.01$)。SPS 濃度が 2 mM でも 4 mM でも同様の収縮効果を確認した。SPS 2 mM と 4 mM において、ChPh-TPP5 と ChPh-TPP10 の膨潤度について、顕著な差は見られなかった ($p > 0.1$)。これら発見は、ヒドロゲルが TPP 溶液から取り除かれた後でも、TPP の架橋が保持されていることが示唆され、これによりキトサンのアミノ基と TPP 間の相互作用が平衡に達するまで、収縮を起こしていると考えられる。また、収縮の原因のもう一つの理由として、フェノール基の疎水性の効果も考えられる [128,129]。通常の ChPh は、水溶液中でアミノ基がプロトン化されており、水と相互作用する。しかしながら、この親水的な効果は、アミノ基が TPP と相互作用することによって減少されることが起こりうる。疎水的な材料は、薬剤のキャリアとして

幅広く使用される[130,131]。この結果は、フェノールと TPP の二重架橋ヒドロゲルのドラッグキャリアとしての可能性を示すものである。

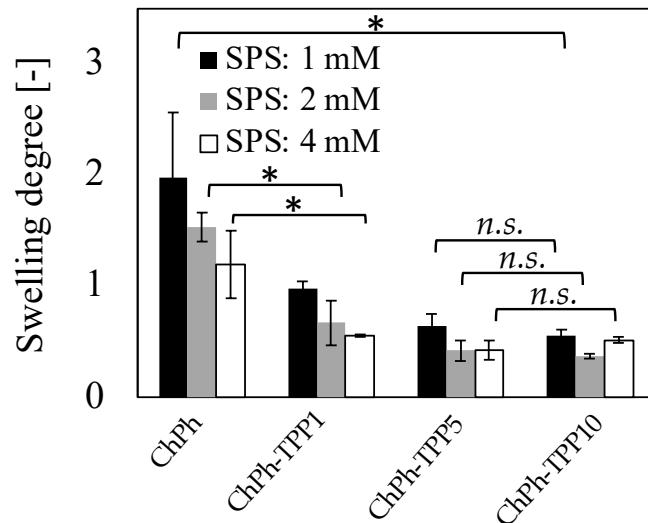


図 3-6. PBS 中に 5 時間浸した時の TPP 浸漬時間が重量比に与える影響、Data: Mean \pm S.D. ($n = 3$)、* $p < 0.05$ 、n.s. > 0.1 。

3.3.5. 保水性の評価

膨潤性に加えて、保水性の評価を行った。4 mM の SPS と 1 mM の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を含んだ ChPh、ChPh-TPP1、ChPh-TPP5、ChPh-TPP10 ヒドロゲルを用意し、20 °C の室温にて乾燥を行い、その重量変化の評価を行った(図 3-7)。最初の 1 時間における ChPh の保水性は、ChPh-TPP5、ChPh-TPP10 よりも高い数値を示した($p < 0.01$)。3.3.4. で述べたように、ChPh-TPP5 と ChPh-TPP10 はヒドロゲル内部で起きている TPP 架橋によって収縮するということが考えられる。他方で、5 時間後には、TPP なしの ChPh ヒドロゲルは、用意されたサンプルの中で最低の保水性を示した。また、ChPh-TPP5 と ChPh-TPP10 のヒドロゲル内部の水の現象は緩やかであり、最終的には ChPh よりも高い数値を示した($p < 0.05$)。一般に架橋ネットワークは膨潤や収縮に大きく影響する。高い架橋密度では、ヒドロゲル中の溶媒の大気への拡散が架橋に阻害される[47,48]。したがって、ChPh-TPP5 や ChPh-TPP10 のヒドロゲルのネットワークが、保水性を向上させたと考えられる。保水性は、長期間におけるヒドロゲルの使用や、ヒドロゲル内部に担持させる成分の放出能のコントロールにおいて重要な[132,133]。TPP の浸漬により、キトサンゲルの保水性が向上することを確認した。

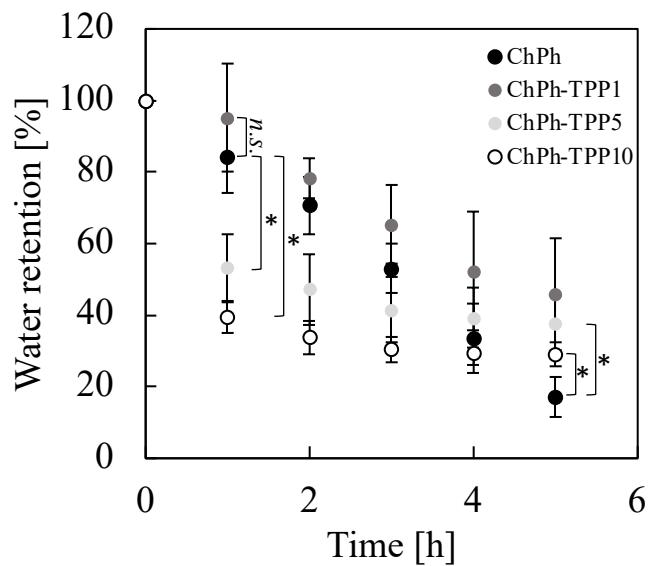


図 3-7. TPP 浸漬時間が保水性に与える影響、Data: Mean \pm S.D. ($n = 5$)、 $*p < 0.05$.

3.3.6. 抗菌性評価

抗菌性の評価を、LB 培地中で、大腸菌を用いて行った。ヒドロゲルの入っていない大腸菌懸濁液および、ChPh, ChPh-TPP1, ChPh-TPP5, ChPh-TPP10 を含んだ懸濁液を用意し、一晩培養を行った(図 3-8)。ヒドロゲルの入っていないサンプルと比較し、ChPh の CFU 値は、低くなることを確認した($p < 0.05$)。この結果は、キトサンのアミノ基由来のカチオン性に第二章の結果と一致した。一方で、TPP で架橋を行うと、その抗菌性が低下することを確認した。TPP とアミノ基が相互作用することによって、大腸菌とキトサンとの静電気的相互作用が減少したからであると考えられる。カチオン性は、薬剤の送達や細胞の接着において重要な特性である。本研究では、ChPh ヒドロゲルのカチオン的特性の制御を行うことができなかった

が、TPP 濃度や、TPP への浸漬時間を調節することによってこれが実現しうる可能性がある[91]。

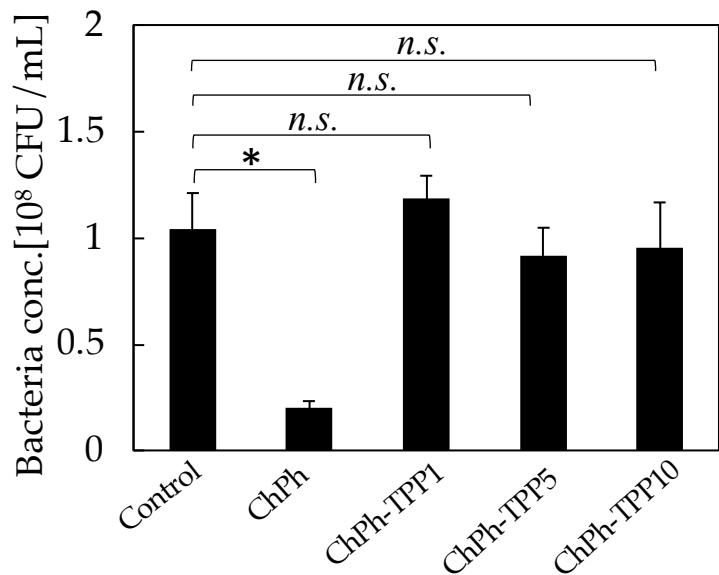


図 3-8. TPP 浸漬時間が抗菌性に与える影響、Data: Mean \pm S.D. ($n = 3$)、* $p < 0.05$, n.s. > 0.1 .

3.3.7. 導電性の評価

フェノール架橋と TPP イオン架橋によって得られる二重架橋ゲルの抵抗の測定を行った(図 3-9)。イオン架橋あり/なしでの抵抗値はそれぞれ $7592 \pm 1210 \Omega$ 、 4981

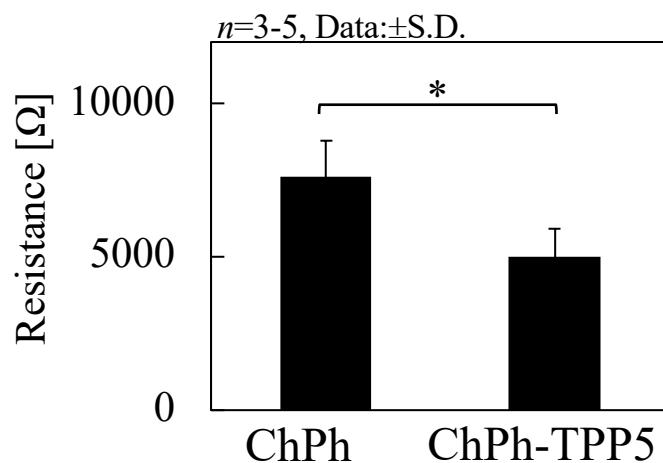


図 3-9.TPP に浸漬したヒドロゲルの導電性、Data: Mean \pm S.D. ($n = 3$)、* $p < 0.05$, n.s. > 0.1 .

±923 Ωであった($p<0.05$)。TPP 架橋により、ヒドロゲル内のイオン伝導度が高くなかった結果抵抗値が下がったと考えられる。TPP の架橋によって得られるキトサンゲルは、その導電性から有機溶媒を検出するための柔軟で軽量なセンサとして利用されていることが知られており[134,135]、今回の実験結果においても良好な導電性を示した。

3.3.8. 3D プリンティングによる回路様構造体の評価

最後に、3D プリンタを用いて回路様構造体の造形を試みた。PDMS のシートの上に光を照射しながら構造体を構築し、その後、1.5 wt% の TPP 溶液をかけ、PDMS

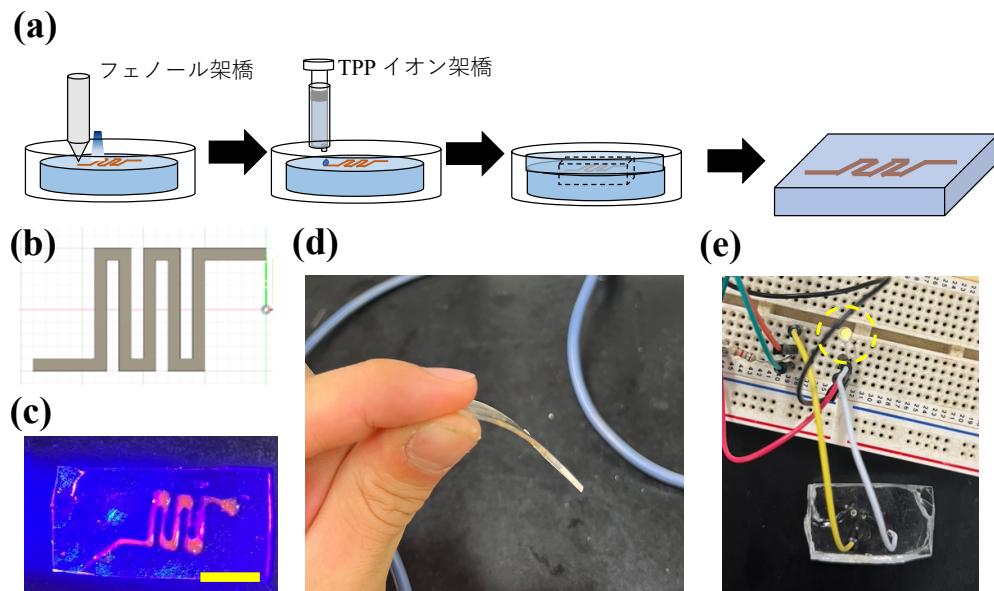


図 3-10. (a)3D プリンティングを用いた回路様構造体作製手順、(b)回路用構造体設計図、(c)造形した回路様構造体(スケールバー：10 mm)、(d)造形した回路の横からの図、(e)造形した回路様構造体に電極を繋いで電球を光らせている(黄色丸部分)様子。

を再度この上に注いで、キトサンヒドロゲルを PDMS シート中に封入した(図 3-10(a))。設計図(図 3-10(b))に基づいて回路様の構造体が構築されている様子を確認した(図 3-10(c))。さらに、これは薄くフレキシブルであり(図 3-10(d))、電極を繋ぐことで回路として使用することができた(図 3-10(e))。ChPh をフェノール架橋、イオン架橋することによって得られた二重架橋ヒドロゲルは、このような回路の作製、ひいてはバイオセンサなどを作製するのに有効であることを示唆した。

3.4. 結論

本研究では、フェノール架橋による共有結合と、TPP アニオンとアミノ基のカチオン間のイオン結合によって得られたヒドロゲルを提案し、その特性について調査を行った。TPP 架橋のないフェノール架橋ヒドロゲルと比較し、二重架橋ヒドロゲルの硬さは最大でおよそ 20 倍大きくなることがわかった。また、硬さは TPP 溶液への浸漬時間で調節できることが明らかになった。この結果は、フェノール架橋と TPP 架橋のキトサンヒドロゲルの応用の可能性を広げるものである。加えて、膨潤性と保水性の評価を行った。二重架橋ヒドロゲルの膨潤性は、TPP イオン架橋なしの材料と比較して低下するものの、TPP 浸漬時間の増加に伴って保水性は向上することを確認した。さらに、導電性の評価を行ったところ、イオン伝導性のため、TPP イオン架橋ありの材料の抵抗値が低くなることが示され、そして 3D プリンティングによるフレキシブルな回路の造形に活用できることを示唆した。

本章の一部図・内容は、"Characterization of chitosan hydrogels obtained through phenol and tripolyphosphate anionic crosslinking" というタイトルで日高らによって国際誌 Polymers の 2024, 16(9), 1274 に掲載されたものである。本内容は、出版社 MDPI(Basel, Switzerland) から許可を得て掲載している。

第四章：3D バイオプリンティングのための光架橋および Schiff 塩基架橋性酸化グルコマンナン-キトサンヒドロゲルの開発

4.1. 導入

第二章では、光架橋性のキトサン(図 4-1(a)(b))のバイオプリンティングへの応用のための研究を行った。しかし、このインクは、液体として吐出して造形を行うため、インクがノズルから吐出された後に、プラットフォーム上ですぐに界面張力で広がってしまうため、造形精度の低下を招くことが問題となっている。そのため、ChPh インクの吐出度すぐにヒドロゲル化を行う必要があり、反応犠牲剤である SPS 濃度を高くする(4 mM)必要があった。この濃度は細胞にとって毒性のある濃度であるとされている[136,137]。また、高い光強度(3.2 W/m²@452 nm)をヒドロゲル化に必要としており、このような SPS 濃度と光強度下では、キトサンの高分子鎖の分解を引き起こしてしまう可能性もあった[111]。以上のような点から、開発した光架橋性のキトサンインクのバイオプリンティングへの応用性を広げるためには、より低い反応犠牲剤濃度で高い造形精度を確保できるプロセスの開発や材料の改質が重要であると考える。

そこで本研究では、Schiff 塩基反応に注目した[138,139]。Schiff 塩基はアミノ基とアルデヒド基間で形成される動的な共有結合である。この結合によって得られるヒドロゲルは、自己修復性があり、かつシリンジから吐出できるような柔らかい機械的強度を持つ[140]。3D バイオプリンティングにおいて、このような特性は、材料をノズルから吐出した後に、形状を維持する点で望ましい。このため、本研究では、開発した光架橋性のキトサンインクに、酸化グルコマンナンを混合することで形成される Schiff 塩基による架橋を組み合わせた新たなインクを提案した。

酸化グルコマンナン(Ox-glucomannan, 図 4-1(c))のアルデヒド基は、ChPh のアミノ基と Schiff 塩基を形成する(図 4-1(d)) [139,141]。加えて、このヒドロゲルは、光架橋によって安定化されるため、造形精度の向上が見込める(図 4-1(e))。本研究では、この提案するインクの機械的特性、細胞適合性、抗菌性といった機能性についてまず評価を行い、そして押し出し式 3D プリンティングによる造形を試みた。開発したインクは、ChPh 単体と比較して、低い SPS 濃度(2 mM)で良好な造形性を確保することができた。Schiff 塩基と光架橋が可能な、酸化グルコマンナン-キトサンインクは、押し出し式の 3D バイオプリンティングにおけるキトサンの応用性を広げるものであると考える。

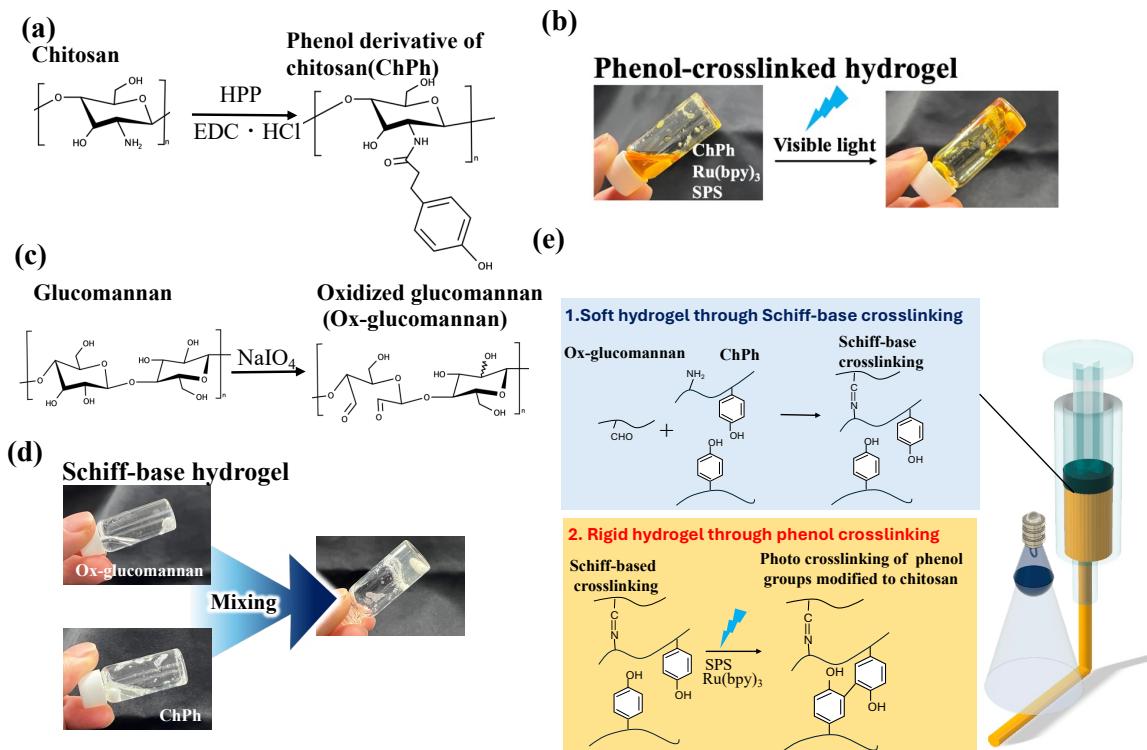


図 4-1. (a) キトサンのフェノール修飾、(b) 可視光によるフェノール架橋、(c) グルコマンナンの酸化、(d)酸化グルコマンナンと ChPh による Schiff 塩基反応、(e)本研究で開発した 3D バイオプリンティング用ヒドロゲルのコンセプト

4.2. 材料と方法

4.2.1. 材料

キトサン(Chitosan LL、deacetylation: 80%、weight average molecular weight: 50–100 kDa) は焼津を化学工業 (Shizuoka, Japan) で入手した。Lactobionic acid、*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED)、と SPS は和光純薬 (Tokyo, Japan) で入手した。Ru(bpy)₃Cl₂·6H₂O、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl)、と 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (HPP) はそれぞれ、Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States of America (USA))、ペプチド研究所 (Osaka, Japan) と東京化成工業で入手した (Tokyo, Japan)。グルコマンナンと過ヨウ素酸ナトリウムは、和光純薬で入手した。グラム陰性菌である大腸菌株 OP50 は、0.5 wt% の塩化ナトリウム、1 wt% のバクトトリプトン (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) とバクトイーストイクストラクト (Becton Dickinson and Company) を含んだ Luria Broth (LB) 培地で培養した。マウス由来の纖維芽細胞である 10T1/2 は細胞材料開発室 (Ibaraki, Japan) で入手した。この細胞は、10 vol% のウシ胎児血清を含むダルベッコ培地 (DMEM, ニッスイ, Tokyo,

Japan)で、5 %の CO₂濃度のインキュベータで培養した。

4.2.2. 酸化グルコマンナン(Ox-glucomannan)の合成

Ox-glucomannan の合成は、文献に基づいて行った(図 4-1(c))[139]。まず、1.0 wt% の濃度でグルコマンナンを純水に溶かした。そして、この溶液を 1 wt% の濃度で過ヨウ素酸ナトリウムを加えて 5 時間攪拌した。その後、10 vol% のエチレングリコールを加えて、2 時間攪拌し、未反応の過ヨウ素酸イオンを取り除いた。この混合物の透析を行い、透析中の外液を一部取り出し、これに硝酸銀を加えてヨウ化銀による白色沈殿ができるかどうかを確認することにより、未反応物の除去ができたかどうかの確認を行った。未反応物の除去後、得られた反応物は真空凍結乾燥によって乾燥され、白色の固体粉末を得た。

4.2.3. ChPh の合成

ChPh の合成は文献に基づいて行った[89,90]。まず、7 wt% のキトサンを 20 mM の HCl 溶液に溶かした。続いて、2.0 wt% となるように TEMED を加え、HCl と NaOH を用いて pH が 4 となるように調製した。この溶液に、HPP、Lactobionic acid、そして EDC・HCl をそれぞれ、1.5, 0.04, 1 wt% となるように加えて室温にて 20 時間攪拌を行った。その後、アセトンにて、反応物を沈殿させ、80 wt% のエタノール水溶液で沈殿物を洗い不純物を取り除き、真空乾燥を行った。

4.2.4. Schiff 塩基ヒドロゲルの調製

Ox-glucomannan と ChPh からなる Schiff 塩基ヒドロゲル(図 4-1(d)) は、以下の方法を用いて調製した; ChPh 溶液と Ox-glucomannan 溶液を表 4-1 の濃度条件で混同し、10 分静置することによってヒドロゲルを得た。溶媒は PBS とした。ChPh 濃度は 1 wt% で固定した。

表 4-1. 本研究で用いるキトサンインクの成分と通称

ChPh [wt%]	Ox-glucomannan [wt%]	The abbreviated symbol
1.0	-	ChPh
1.0	0.25	ChPh-Ox25
1.0	0.50	ChPh-Ox50
1.0	1.0	ChPh-Ox100
1.0	2.0	ChPh-Ox200
1.0	3.0	ChPh-Ox300

4.2.5. FTIR

ChPh、グルコマンナン、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 のサンプルの FTIR スペクトルの測定を、FT/IR-4100 instrument (JASCO、Tokyo、Japan)を用いて行った。それぞれのサンプルは、測定前にオープンで十分に乾燥させた。各サンプルについて、 4 cm^{-1} で 90 回の積算回数で測定を行った。

4.2.6. 吐出性

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100、ChPh-Ox200、ChPh-Ox300 の吐出性を、シリンジを用いて評価した。それぞれのサンプルは 2.0 mM の SPS と 1.0 mM の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を含んでいた。これらサンプルはシリンジに手動で充填し、その後吐出を試み、吐出性があるかどうか評価を行った。

4.2.7. 動的弾性率(G')/損失弾性率(G'')

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 の G' および G'' の測定を、レオメータ(HAAKE MARS III、Thermo Fisher Scientific、MA、USA)を用いて行った。まず、文献[72,73]に基づき、自己修復性を評価した。レオメータのプローブは直径 25 mm のステンレス鋼板で、底部プラットフォームは鋼製であった。ChPh の液体試料 (0.65 mL) は、プローブとプラットフォームとの間に 0.5 mm の隙間をあけて、プラットフォーム上に流し込んだ。25°C、周波数 1.6 Hz、歪み 5-1000 %の条件で 4 分間の経時変化を測定した。また比較として、0.5 wt% のグルコマンナン溶液、1 wt% の ChPh と 0.5 wt% のグルコマンナン溶液の混合物、1 wt% の酸化グルコマンナン溶液においても同様の評価を行った。

さらに、光照射条件におけるレオロジーの測定を行った。SPS を 2.0 mM、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を 1.0 mM 含んだ ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 を用意した。測定に用いるプローブは直径 25 mm であり、また底面のプラットフォームは透明のガ

ラスでできており、これによって、下部から青色光の照射が可能である。なおプローブとプラットフォームのギャップは 0.5 mm となっており、サンプルの体積は 0.65 mL とした。G' と G'' を 0.3 Hz, 歪み 5 %, 25 °C の条件で 10 分間にわたって測定した。そして、計測 120 秒後に、青色光(0.2 W/m²@452 nm)の照射をプラットフォームの下部から行った。

4.2.8. 膨潤性の評価

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50 と ChPh-Ox100 の PBS 中での膨潤性の評価を行った。150 μL の各サンプルを直径 12 mm の型に流し入れ、10 分間青色光(0.2 W/m²@452 nm)を照射し、ヒドロゲル化した。その後、ヒドロゲルを取り出し、30 mL の PBS について膨潤性の評価を行った。なお、膨潤は以下の式で評価を行った。

$$\text{Swelling}[-] = \frac{\text{Area of hydrogel at } x \text{ hour}}{\text{Initial area of hydrogel}} \quad (1)$$

同様の方法を用いて、フェノール架橋のない Schiff 塩基ヒドロゲルの安定性を評価した。SPS と Ru(bpy)₃ を含んでいない ChPh-Ox50 ヒドロゲルを用意し、30 mL の酢酸緩衝液および、PBS に浸漬した。また、比較として光照射によりヒドロゲル化した、2.0 mM の SPS と 1.0 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ ChPh-Ox50 ヒドロゲルも用意し、膨潤性を比較した。

4.2.9. 細胞生存率

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50 と ChPh-Ox100 のヒドロゲル上での細胞の生存率の測定を行った。100 μL のサンプルを 48 ウエルプレートのウェル中で用意し、10 分間にわたって青色光(0.2 W/m²@452 nm)を照射することでヒドロゲル化させた。それぞれのサンプルは 2.0 mM の SPS と 1.0 mM の Ru(bpy)₃ を含んでいる。このゲルを PBS で数度洗い、200 μL の細胞懸濁液(2.0 × 10⁴ cells/mL)を播種し、5 % の CO₂ 濃度、37 °C の条件でインキュベートした。インキュベートから 1 日後、3 日後に、播種した細胞はカルセイン-AM および、ヨウ化プロピジウムを用いて染色し、細胞の生存率の評価を行った。コントロールとして、細胞ディッシュ上で細胞の培養を行い、同様の評価を行った。

4.2.10. 抗菌性

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50 と ChPh-Ox100 ヒドロゲルの抗菌性を評価した。2.0 mM の SPS、1.0 mM の Ru(bpy)₃ を含んだ、150 μL のヒドロゲルサンプルを用意し、これを 2.5 × 10⁶ CFU/mL の *E.coli* を含む 2 mL の LB 培地に入れ、37 °C の条件で攪拌培養を行った。その大腸菌の濃度は、文献に基づき、CFU 値の計算を行うことで算出した[123]。

4.2.11. 3D プリンティング

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50 と ChPh-Ox100 のヒドロゲルの三次元構造体を、3D プリンタを用いて造形を行った。なお、3D プリンタは、第二章で用いたものと同様である[142]。それぞれのサンプルは、2.0 mM の SPS と 1.0 mM の Ru(bpy)₃ を含んでおり、これをシリンジに充填した。サンプルは、20 G の針を通じて、シリンジポンプ(PHD2000、Harvard Apparatus、MA、USA)によって 2.0 mm/s で吐出した。

4.3. 結果と考察

4.3.1. FTIR

4.2.2.において、グルコマンナンが酸化されたかどうかを確認するために(図4-2)、Ox-glucomannanのFTIRスペクトルを測定した。まず、比較としてグルコマンナンでは、1700と1254 cm⁻¹にC=OとC-Oの伸縮振動由来の特徴的なピークが観測され、アセチル基の存在を示した[143]。1635 cm⁻¹のピークは、分子内の水素結合に由来していると考えられる[144,145]。1054と1015 cm⁻¹のピークは、ピラノースのC-O-C

の伸縮と、C-OHの変角振動であると考えられる[143,146]。872と805 cm⁻¹のピークは、それぞれグリコシド結合とマンノースの伸縮に帰属する[143,146]。Ox-glucomannanについて、類似するピークを測定したが、1716 cm⁻¹に小さなピークが観測され、これはグルコマンナンの酸化により生じるアルデヒド基(図4-1(c))に帰属すると考えられる[141,147,148]。さらに、805 cm⁻¹に特異なピークが現れ、これはマンノースの開環を示している[92]。これら結果からグルコマンナンの酸化を確認した。

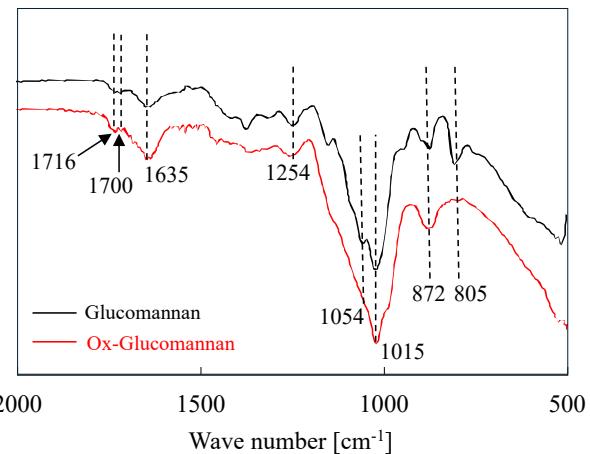


図4-2. グルコマンナンと酸化グルコマンナンのFTIRスペクトル

4.3.2. 吐出性

次に、Schiff塩基ゲルの吐出特性について調査したOx-glucomannanの溶液をChPhに混ぜることによってヒドロゲルを調製した。そのサンプルはシリジンに、手動で充填され、吐出を試みた(図4-3)。ChPh単体では、図に示すように、液体として吐出された。これとは対照的に、0.25, 0.50, 1.0 wt%のOx-glucomannanを含んでいるChPhのサンプル(ChPh-Ox25, ChPh-Ox50, ChPh-Ox100)は、ゲルとして吐出されている様子が確認できた。これは、ChPh溶液とOx-glucomannan溶液の2種類を混ぜることによって、シリジンから吐出可能なヒドロゲルを、容易に調製できることを示している。しかしながら、高い濃度のOx-glucomannanの条件(2.0, 3.0 wt%)では、ゲルが固く、シリジンに充填することができなかった。3Dバイオプリンティングでは、ソフトなヒドロゲルは、シリジンから吐出後にその形状を維持することができるので、造形精度の向上につながることが期待される[149,150]。

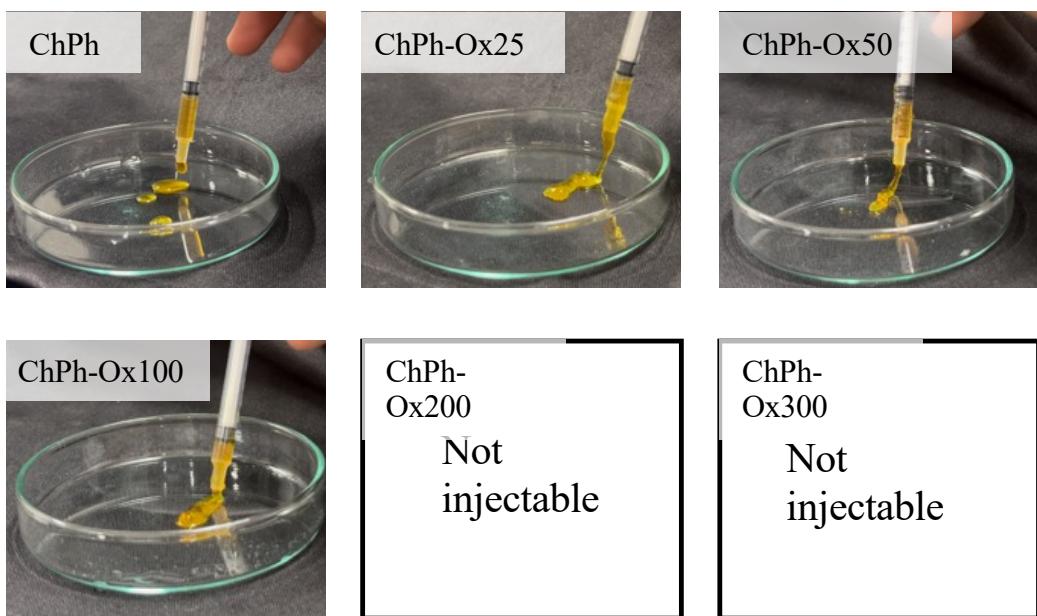


図 4-3. ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100、ChPh-Ox200 と ChPh-Ox300 ヒドロゲルの吐出特性の評価

4.3.3. Schiff 塩基と光架橋ヒドロゲルのレオロジー

Schiff 塩基により得られるゲル的特性のさらなる理解のために、 G' と G'' の経時変化をレオメーターを用いて歪みを変えながら測定した。ChPh と比較し、小さな歪み(5%)では、酸化グルコマンナン濃度の増加に伴い、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50 および ChPh-Ox100 の貯蔵弾性率が損失弾性率を大幅に上回ったが、大きな歪み(1000%)では逆の関係を観察した(図 4-4(a)-(d))。さらに、この特性は複数回の歪みの変化後も保持されており、自己修復特性を示している。Schiff 塩基反応は、平衡反応であり、アミノ基とアルデヒド基の間で脱水縮合を伴い、イミン結合を形成する反応である[151]。高い歪みの与えられている状態では、水の分子の運動が増え、イミン結合の加水分解が引き起こされてヒドロゲルが分解され、一方小さな歪みでは水の運動が抑えられ、イミン結合の形成に平衡が傾き、これが自己修復性を引き起こすメカニズムであると考えられる。今回のインクは、Schiff 塩基特有の自己修復性を示している。自己修復性は、生体印刷プロセス中にシリングに充填されたり、針から押し出されたりする際に、適用される高いせん断応力の後でもゲル状態を維持することができる。この特性は、印刷プロセス中に印刷された構造を修復し、印刷性の向上につながる可能性がある[152,153]。ChPh に関しても、小さい歪みでは G' と G'' が上回り、高い歪みでは G'' が G' を上回っていて、見かけ上は自己修復性があるように見える。ChPh は高分子の溶液であり、剪断減粘性の特性を持つことが知られている。このような溶液では小さい歪み(剪断応力)を与えた時には、それに対する弾性が発生し、数値上ゲルのような特性を示したと考えられる。一方で、大きい歪みの時には、流動性が高まり、液体的特性を示す。このため、 G' と G'' がこのような値を示したと考えられる。

また、比較として、グルコマンナン、ChPh とグルコマンナン混合物、Ox-glucomannan を用いて同様の評価を行った。グルコマンナンと、ChPh-グルコマンナン混合物は、歪みが高い状態でも小さい状態でも、貯蔵弾性率が損失弾性率を上回ることがなく、流動的な材料であることを示した(図 4-4(e)(f))。また、酸化グルコマンナン単体では、高い歪みを与えたときに、貯蔵弾性率が損失弾性率を上回ったが、そ

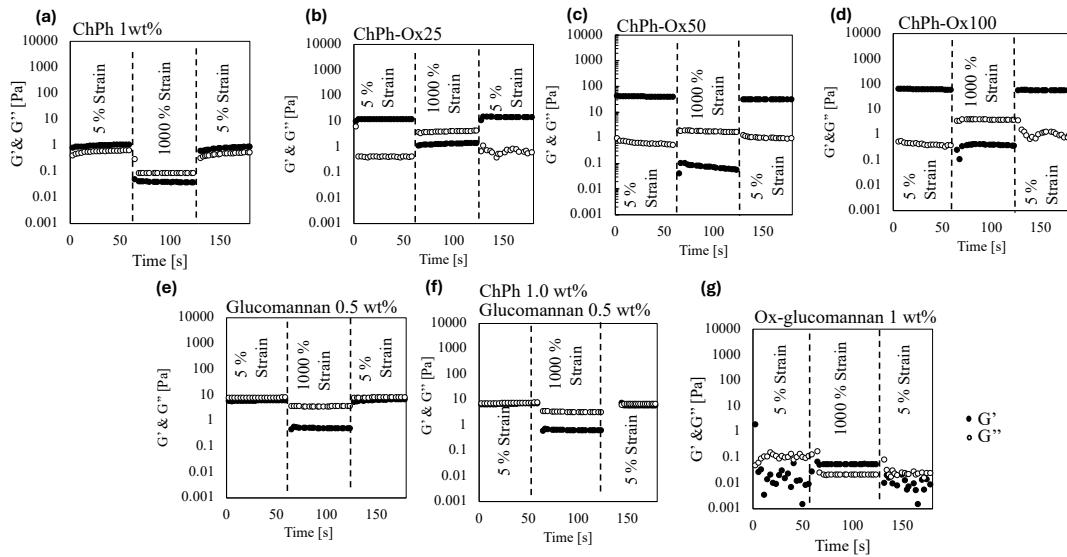


図 4-4. (a)ChPh、(b)ChPh-Ox25、(c)ChPh-Ox50、(d)ChPh-Ox100、(e) 0.5 wt% Glucomannan、(f) 1 wt% ChPh と 0.5 wt%Glucomannan 混合溶液、(g)1 wt% Ox-glucomannan の歪み変化時の G' & G'' の変化測定

の値は小さい(約 0.1 Pa、図 4-4(g))。これらのことから、グルコマンナンやキトサン間でヒドロゲルを形成することではなく、ヒドロゲル化は酸化グルコマンナンと ChPh の組み合せで起こる現象であることを示した。

次に、光照射条件において、フェノール架橋の効果を理解するために、貯蔵弾性率(G')および損失弾性率(G'')を測定した。この測定では、測定の 120 秒後に、青色光を照射して、フェノール基による架橋も行った(図 4-5(a)-(d))。光を照射することにより、 G' が時間と共に増加し、フェノール基による架橋が起きていることを示した[87,142]。どのサンプルにおいても G' は 120-180 Pa の値を示しており、Ox-glucomannan 濃度の増加とともに最終的な G' はやや増加する傾向が見られたものの、明確な違いは見られなかった。これら結果は、フェノールによる架橋が起こる前は、Ox-glucomannan 濃度が高いと、Schiff 塩基の架橋がヒドロゲルの特性に大きな影響を与えるが、光架橋後には大きな影響を与えることがないということを示している。Schiff 塩基の短所の一つとして、得られるゲルは、動的な共有結合のため温度や pH に対して不安定であるということである[24,43,44]。他方で、フェノール架橋によって得られるゲルは、安定した共有結合のため安定的である[154,155]。押し出し式 3D バイオプリンティングのプロセスにおいて、Schiff 塩基による自己修復性を活かすことにより、吐出後にその形状を保持し、かつフェノール架橋による機械的特性の安定

化をすることで、造形精度の向上が見込める。

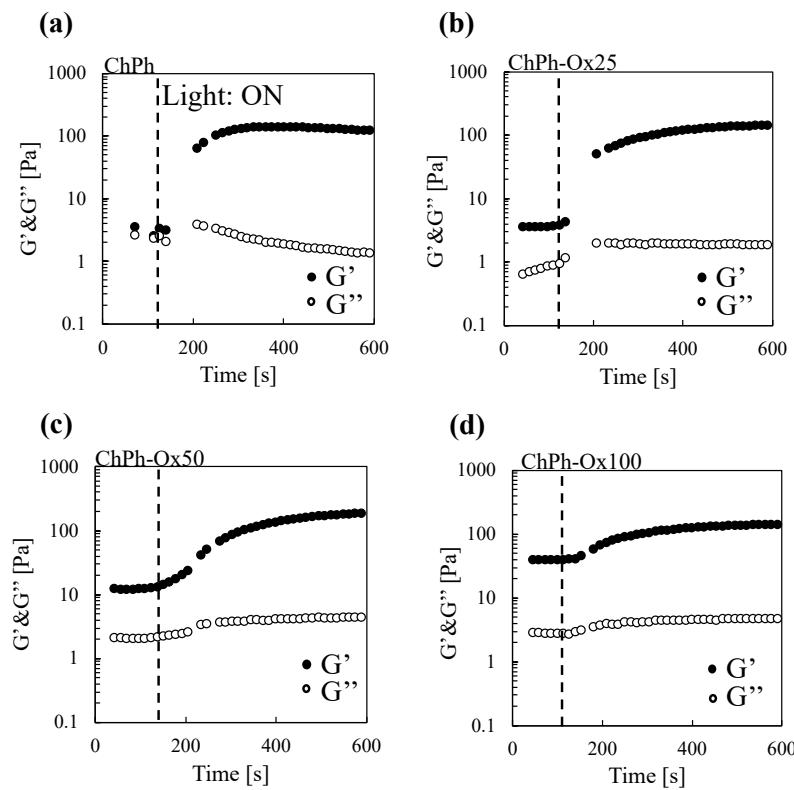


図 4-5. (a)ChPh、(b)ChPh-Ox25、(c)ChPh-Ox50、(d)ChPh-Ox100 の G' と G'' の経時変化測定

4.3.4. 膨潤性の評価

キトサンと酸化グルコマンナンを組み合わせたヒドロゲルの膨潤性を、PBS 中において、72 時間観察した (図 4-6(a)(b))。サンプルは 72 時間にわたって分解されなかった。ヒドロゲルの安定性は、再生医療において、長期の使用を行うために重要な特性である [156,157]。しかしながら、それぞれのサンプルが縮んだことを確認した (図 4-6(b))。なお、これらサンプルの 72 時間後の収縮の違いに明確な差は見られなかった。収縮の原因は、キトサンに修飾されたキトサンの疎水性が考えられる。既報によると、フェノール基はその化学的構造によって疎水性があることが知られている [128]。このような特性によって、ヒドロゲル中の水が放出されヒドロゲルが収縮したと考えられる。加えて、分子量がこの収縮に影響を与えた可能性がある。本研究では、低分子量(75 kDa)のキトサンを使用しており、これが収縮を引き起こした可能性

がある。より高い分子量のキトサン[158]で本ヒドロゲルを作製した時には、より収縮が抑えられることや、膨潤する可能性がある。

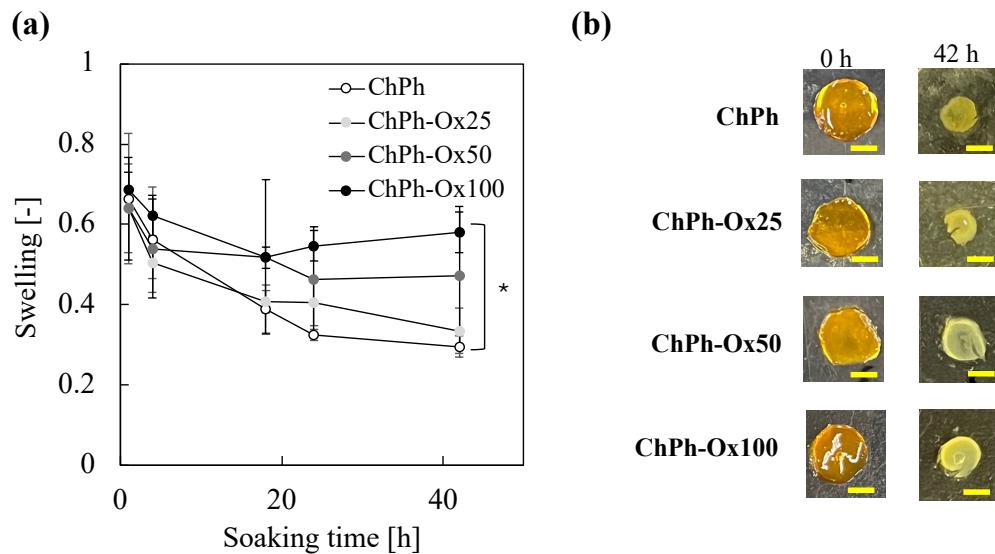


図 4-6. (a) ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 ヒドロゲルの膨潤度の経時変化、Data: Mean \pm S.D. ($n=3-4$)、* $p<0.05$ 、(b) PBSへの浸漬前/後の ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 ヒドロゲルの写真。スケールバー: 5 mm.

4.3.5. pH による Schiff 塩基ゲルの安定性

さらに、フェノール架橋の有無と pH が、キトサンヒドロゲルの安定性にどのように影響を与えるかを調べるために、膨潤性の評価を行った。PBS (pH7) と酢酸緩衝液 (pH4) の溶液に、フェノール未架橋・架橋の ChPh-Ox50 のヒドロゲルを浸漬した。酸性の溶液 (pH4) では、フェノール未架橋のヒドロゲルは、測定を始めて 20 分以内に分解された(図 4-7(a))。キトサンのアミノ基は、水溶液中のプロトンと相互作用し、イミンの分解を引き起こす[159]。一方で、フェノールの架橋と Schiff 塩基で架橋しているキトサンヒドロゲルは、少なくとも 72 時間は分解されることなく安定して存在していた(図 4-7(b))。フェノール性水酸基の架橋は不可逆的な共有結合であり、pH の低い環境下でも安定する。フェノールと Schiff 塩基の二重架橋は、胃や肌のような酸性環境下[160]でヒドロゲルを使用するにおいて、安定性をもつ可能性がある。中性条件でのヒドロゲルの安定性について、フェノール架橋・未架橋の両ヒドロゲルは収縮したものの、72 時間安定して存在した。Schiff 塩基反応の形成は、pH が 4 よりも大きな条件では進行しやすくなり、そのため、PBS 中においてフェノール架橋なしでも安定して存在していると考えられる。

さらなる pH の効果を理解するために、ChPh-Ox50 を用いて、酢酸緩衝液中で膨潤試験を行った。4.3.4.で示すように、PBS 中ではヒドロゲルは収縮し、一方の酢酸

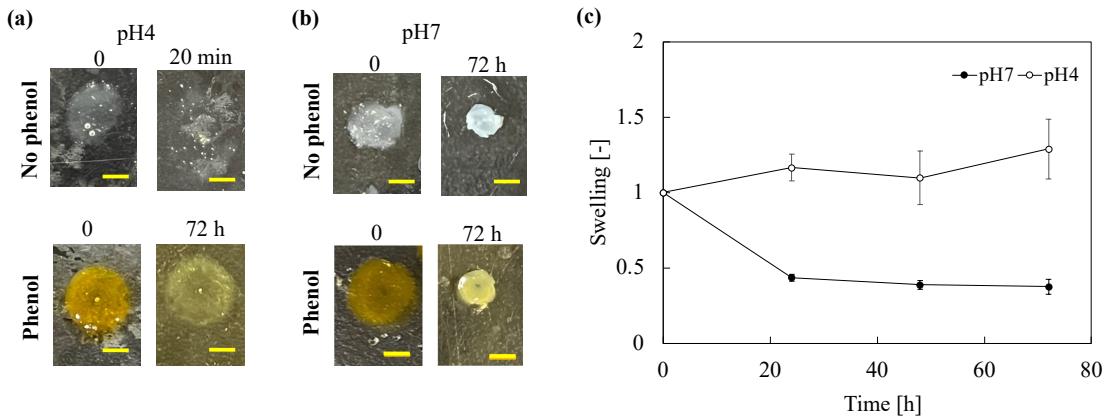


図 4-7. (a)酸性条件および(b)中性条件における、フェノール未架橋・架橋の ChPh-Ox50 ヒドロゲルの特性評価,スケールバー : 5 mm、(c)pH が膨潤に与える影響。フェノール架橋された ChPh-Ox50 を測定に使用、Data: mean±S.D.(n=4).

緩衝液では膨潤した(図 4-7(c))。酸性条件では、多くのアミノ基がプロトン化され、そのために水素結合的に水分子と相互作用し、より多くの水がヒドロゲル中に取り込まれるために、膨潤を引き起こしたと考えられる。

4.3.6. 細胞特性

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 ヒドロゲル上での細胞の特性を、10T1/2 細胞を用いて評価した(図 4-8)。細胞懸濁液はヒドロゲル上に播種され、3 日間培養した。培養一日目においては、すべてのサンプルにおいて細胞の接着と伸展が見られた。三日目には、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 において、細胞の成長が見られた。細胞の成長が改善した理由については、Ox-glucomannan 中のアルデヒド基の寄与が大きいものと考える。本研究では、DMEM を細胞の培養培地として用いた。これには、アミノ酸や血清といった細胞の成長を促す因子が含まれており、それらはアミノ基を持っている。これらのアミノ基は Ox-glucomannan のアルデヒド基と相互作用し、ヒドロゲル上での細胞の接着や成長を促した可能性がある。さらなる機能化には、RGD 配列のような細胞の成長を促す因子をゲルに修飾する必要があると考える[161,162]。

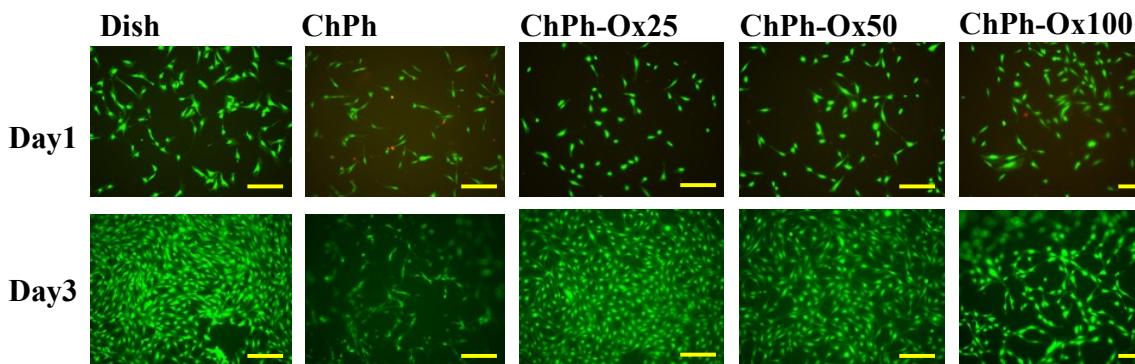


図 4-8. 10T1/2 細胞を用いた、ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 の細胞適合性評価。スケールバー：250 μ m.

4.3.7. 抗菌性

次に、ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 の抗菌性について評価を行った(図 4-9(a))。各ヒドロゲルサンプルが存在する中で、*E.coli* が LB 培地で培養された。ヒドロゲルが存在しない、コントロールサンプルでは *E.coli* が顕著に増殖する一方で、ヒドロゲルが存在することで、菌の増殖が少なくとも 24 時間抑えられていることがわかった(図 4-9(b))。キトサンの抗菌性は、主にキトサンのアミノ基のカチオン特性か来ていると考えられている。細菌の細胞の表面はアニオン性であり、キトサンが吸着することによって、細菌が周囲の環境下から栄養を取り込むことを阻害していると考えられている[163]。抗菌性は、細胞の培養において、バクテリアの増殖による汚染を防ぐ点で重要である[164,165]。また、創傷治癒において、感染症を引き起こすことを予防する役割も果たす。

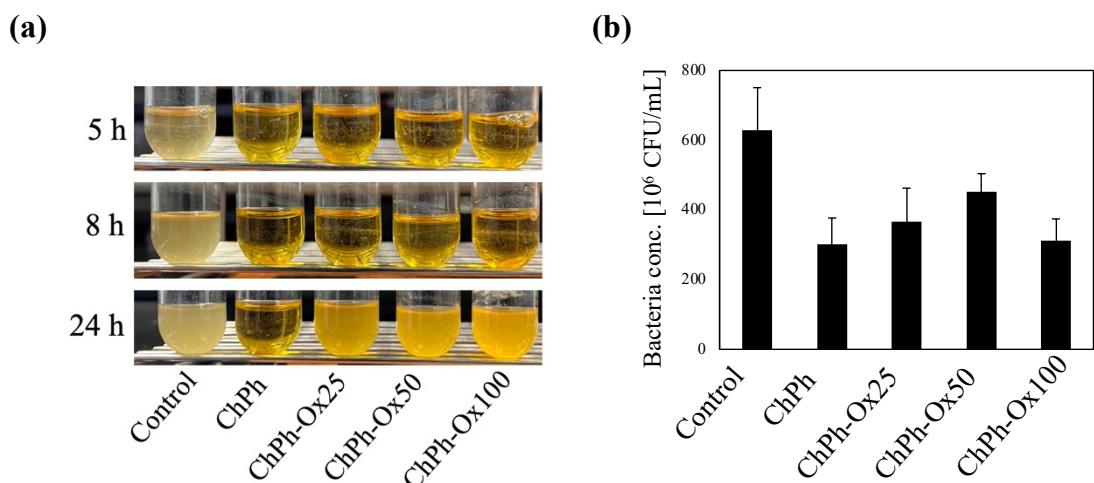


図 4-9. ChPh, ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 の抗菌性試験、(a)各サンプルの培養の様子、(b)24 時間後のバクテリア濃度、Data: Mean \pm S.D. ($n=3$).

4.3.8. 3D プリンティング

ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 の造形性を評価するために、円柱構造体の造形を試みた(図 4-10)。ChPh の構造体は低い SPS 濃度(2 mM)と光強度(0.20 W/m²@452 nm)のために、造形中に崩壊した。第二章の研究では、4 mM の SPS で、3.2 W/m²@452 nm の光強度で造形物の造形が可能であることを確認した。今回開発したインクはより低い濃度の SPS と光強度で、3 次元構造体の造形が可能である。一方で、ChPh-Ox100 については、今回使用したシリジポンプではインクを押し出すことができず、詰まったことを確認した。この材料を用いて造形を行うためには、より高い圧力で押し出しが可能なシリジポンプが必要である。さらに、良好な造形性を示した ChPh-Ox25、ChPh-Ox50 を用いて鼻の構造体の構築を試みた。開発したインクはさまざまな三次元構造体の造形を押し出し式 3D プリンティングで行うにおいて有用である。

これら結果は、低い SPS 濃度で押し出し式 3D プリンティングにおいてキトサン材料で 3 次元構造体の造形を行うことができるということを示している。バイオプリンティングでは、細胞の封入、播種において高い細胞生存率を保つことが求められる。これと同時に、デザインした通りの構造体を得るために造形精度も重要である[11,166]。このソフトなキトサンゲルは、押し出し式 3D プリンティングにおいて、針から吐出された後に、3 次元の構造を保ち、そして光の照射でその構造が固定化されるため、低い SPS 濃度で良好な造形精度を示した。

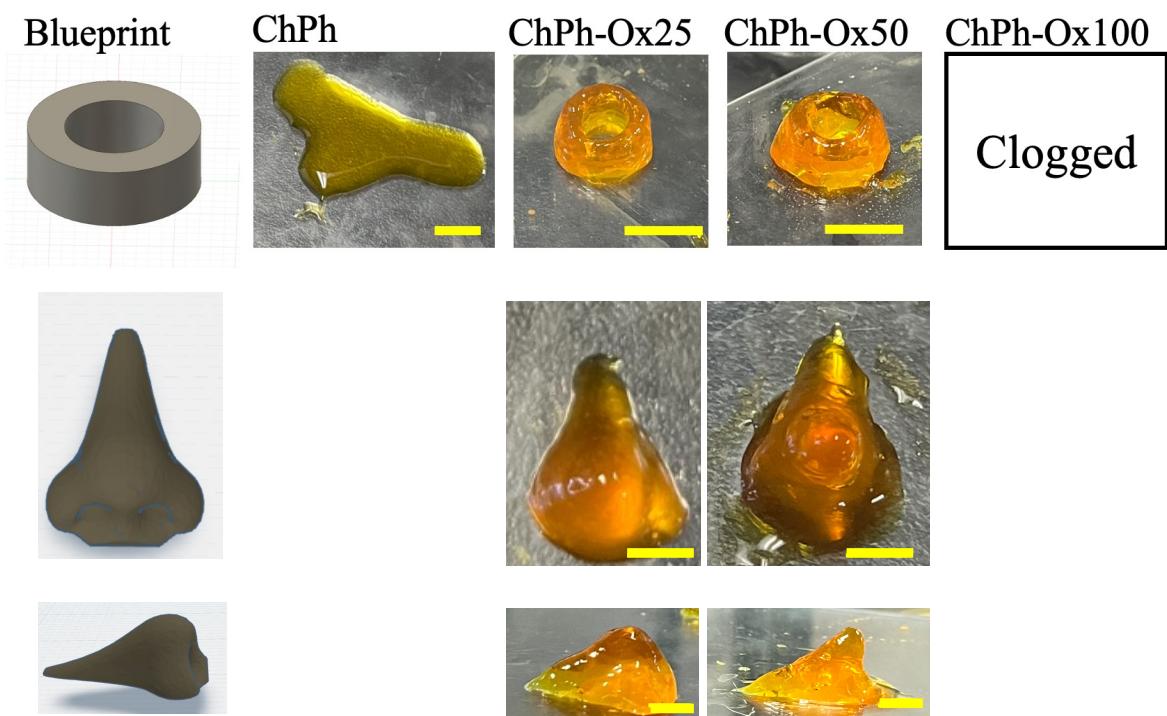


図 4-10. ChPh、ChPh-Ox25、ChPh-Ox50、ChPh-Ox100 のプリント特性試験、スケールバー：5 mm。

4.4. 結論

本研究では、キトサンと酸化グルコマンナンを組み合わせた、Schiff 塩基およびフェノール架橋が可能な新規ヒドロゲル材料を開発し、バイオプリンティングへの応用を試みた。Schiff 塩基架橋の導入により柔らかいヒドロゲルの形成が可能となり、吐出後の形状の維持を可能にした。またフェノール架橋を可視光によって引き起すことが可能であり、機械的安定性を強固にした。このヒドロゲルは、従来の配合に比べ、低濃度の SPS と低い光強度で良好な造形性を示した。さらに、抗菌活性と良好な細胞適合性を有し、組織工学などの医療用途に適していると考えられる。

第五章 音波によって引き起こされる回転流を用いた材料の混合が可能なバイオプリンティング用ノズルの開発

5.1. 導入

第二章から第四章では、光架橋性のキトサンインクを3Dバイオプリンティングに応用するにあたり、材料の観点から研究を行ってきた。本章は、造形プロセスの開発の観点から、材料混合技術の開発を行ったことについて記述する。第一章において言及したように、3Dバイオプリンティングの課題として、より複雑な構造体を造形するための、造形プロセスの高度化を行うことは重要である。

その中でも、複数のインクを造形中に混ぜる技術は、インク中の細胞の密度や、インクの成分を調節し、構造体の特性を制御する上で重要である[29,94]。例えば、細胞の成長や分化は、足場の硬さに大きく影響される。また、その特性は細胞種によって異なるため、これら細胞種に応じてインクの成分を調製しながら造形を行う技術の開発は、生体組織を模倣した構造体の実現において重要である[69,70]。通常、押し出し式のバイオプリンティングにおいては、層流の条件でインクを吐出して造形が行われることが多く[71,72]、このような条件では、外界から力を加えることなしに、材料を混合することが難しい。そのため、効率的に材料の混合を行うためのマイクロミキサを、押し出し式3Dバイオプリンティングに実装することが、造形物の高度化における課題の一つとなっている。

材料の混合技術は、パッシブミキサとアクティブミキサの2種類に分類される。パッシブミキサは外界の力を必要とせず、流体の流れのみで材料の混合を行う方式である。一般に、流路をジグザグ状の経路にすることや、邪魔板を設けることで、層流に乱れを生じさせ、混合効率を高める方法がとられる[167,168]。この手法は、細胞に対して温和な条件で材料を混ぜることができるものの、材料を混ぜるのに時間がかかることや、大きな混合体積が必要であること、そして、粘性のある材料の混合が難しいという問題がある[169,170]。一方の、アクティブミキサは、熱や物理的攪拌といった外界の力をを利用して材料を混合する手法であり、粘性の高い材料の混合が可能である[73,171]。しかし、このような力は、バイオプリンティングで用いる液体材料中の細胞を傷つける可能性がある[172]。また、物理的攪拌を行うミキサをバイオプリンタのノズルのようなマイクロなサイズの流路に搭載することは技術的に難しい。そのため、細胞を傷つけることなく、かつ材料を小さな混合体積で混合する技術が求められている。

音波の刺激は、材料を温和にかつ効率的に混ぜられる、有望な混合手法である[97,99]。これは、非侵襲的な手法であり、これまでに細胞の分離やパターニングを目的とした研究に使用されていた[98,173]。特に、泡により誘起される音波マイクロミキサは、材料を効率的に混合することができる手法である[97-99]。この手法は、流路中にトラップされた泡を、音波によって振動させ、これによって流路中の流体に回転流を引き起こすものである。この現象は室温で起こり、かつ様々な種類の材料に適用可能であり[100,101]、このような汎用性を活かしてバイオメディカルや化学合成に活用してきた[98,174,175]。

本研究では、押し出し式3Dバイオプリンティングにおいて、泡で誘起する音波マイクロミキサを、バイオプリンティング用材料の混合に応用することを試みた(図5-1)。まず、バイオプリンティング用材料のモデル物質として幅広く使用されているアルギン酸ナトリウム(SA)の水溶液[31,176]を混合する材料として、流路の設計を試みた。SAは生体適合的であり、バイオプリンティング用材料として幅広く使われてきた[31,176]。流路中にトラップする泡のサイズや、その配置、電圧などの運転条件の決定を試みた。このような条件決定ののちに、バイオプリンティングのため、効率的に混合を行うノズルの設計を試みた。開発したノズルは、パッシブミキサやアクティブミキサと比較し、SAインクを小さな混合体積で混合することができた。さらに、このノズルを用いてインク中で細胞を混合することを試み、高い細胞生存率を示した。そして、本博士論文の主題材料である光架橋性のキトサンインク(ChPh)の混合を試み、SAと同様、高い混合率で材料を混ぜることが可能であり、かつChPhを用いた3Dバイオプリンティングに応用可能であることを示した。本研究では、音波マイクロミキサを3Dプリンティング(バイオプリンティング)に応用した最初の研究である。

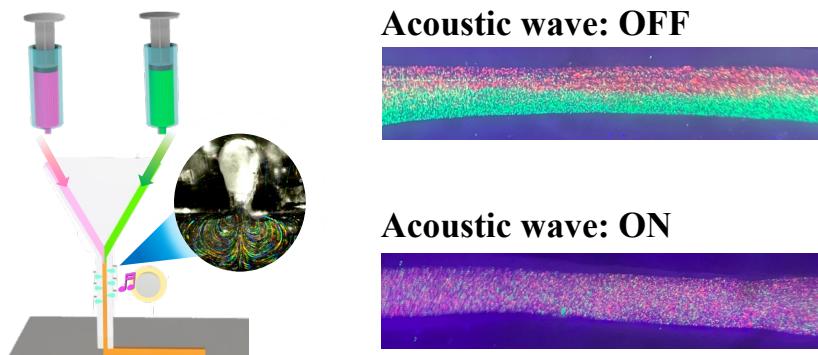


図5-1. 音波による混合技術を応用した3Dプリンティングの概要図。

5.2. 材料と方法

5.2.1. 材料

SA (molecular weight: 70 kDa; I-1G) は株式会社キミカから入手した (Tokyo, Japan)。キトサン(Chitosan LL、deacetylation: 80%、weight average molecular weight: 50–100 kDa) は焼津水産化学工業にて入手した。Lactobionic acid, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) と過硫酸ナトリウム (SPS) は和光純薬(Tokyo, Japan)で入手した。Ru(bpy)₃·Cl₂·6H₂O、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl)、3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (HPP) はそれぞれ、Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)、ペプチド研究所 (Osaka, Japan)、そして東京化成で入手し

た(Tokyo、Japan)。マウス纖維芽細胞である 10T1/2 細胞は理化学研究所(Ibaraki、Japan)で入手した。この細胞は、5 %の CO₂ インキュベータ中で、10 %のウシ胎児血清を含んだタルベッコ改変イーグル培地(DMEM; Nissui、Tokyo、Japan)で培養した。キトサンのフェノール誘導体は、第二章の方法に基づき合成した[89,142]。

5.2.2. ノズルの作製

図 5-2 に示すノズルを、CAD ソフト(Fusion360、Autodesk、California、USA)によって作製した。ノズルは、透明のプラスチックレジン(NOVA3D High Transparency UV Resin、Shenzhen Nova Intelligent Technology Co.、Shenzhen、China)を素材として、液層光重合式の 3D プリンタ(Anycubic Photon Ultra、Shenzhen Anycubic Technology, Shenzhen、China)で造形した。ノズルの深さと直径は 0.7 mm であり、2 つの入り口と 1 つの出口を持っている。また、ノズルの経路中には、0.3-0.9 mm の大きさを持つ穴が配置されている。3D プリンタにて造形したノズルは、上記のレジンを用いて、ガラス板に貼り付けた(C040501、Matsunami Glass, Ind. Ltd.、Osaka、Japan)。そして、22G の針を出口に取り付けた。この流路の脇にピエゾブザーを、シリコンボンド (Shin-Etsu Chemical Co.、Tokyo、Japan)を用いて貼り付けた。さらに、流路周辺をこのシリコンボンドでコーティングすることにより、流体の漏れを防ぐためのシーリングとした。

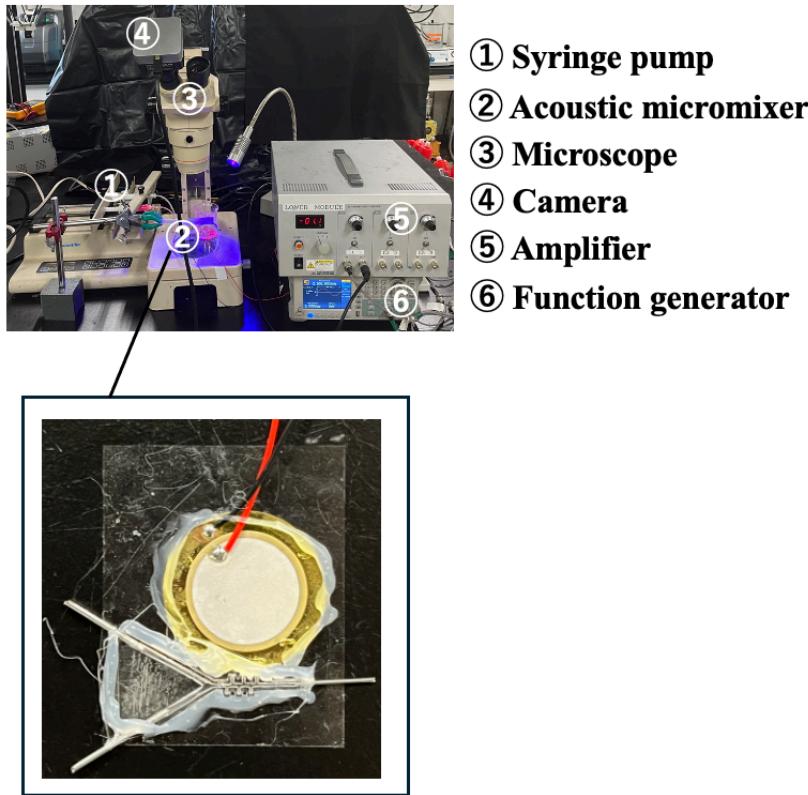


図 5-2. 実験系のセットアップ全体図。

5.2.3. 実験系のセットアップ

0.1 wt%の緑色の蛍光色素を含んだ SA 溶液をノズルから吐出する材料とし、シリジポンプ(KDS 220、KD Scientific Inc.、Massachusetts、USA)を用いて、流路へ吐出を行った。吐出された SA 溶液は、音波の刺激によって混合される。音波を発生させるピエゾブザーには、ファンクションジェネレータ(Fujian Lilliput Optoelectronics Technology Co.、Ltd.、Fujian、China)を用いて特定の周波数を持つ電流を供給し、その電圧はアンプ(HJPZ-0.15P×3、Matsusada Precision Inc.、Shiga、Japan)を用いて増幅した(図 5-2)。

材料の混合の評価は、実体顕微鏡(SZ-CTV、Olympus、Tokyo、Japan)を用いて行った。実験系を明瞭に観察するために、青色光を実験系に照射した。全体の実験系は、図 5-2 に示す通りである。また、開発したノズルは押し出し式 3D プリンティングシステム(FLSUN-QQ-S、Zhengzhou Chaokuo 114 Electronic Technology Co.、Henan、China)に実装し、これを用いて 3D プリンティングを行った[142]。SA インクを、シリジポンプによってノズルを介して外界に吐出し、3D プリントで直線構造に造形した。造形後、1.0 wt%の塩化カルシウム溶液が加えられ、ヒドロゲル化を行った。

さらに、このノズルの汎用性の評価を行うため、第二章で示した光架橋性の ChPh インクの混合と、3D プリンティングを行った。SPS 濃度は 2 mM、Ru(bpy)₃ 濃度を 1 mM とした。このインクに、造形中に青色光(0.14 W/m²@452 nm)を照射しゲル化を行った。造形した直線は、実体顕微鏡で観察した。

5.2.4. 音波による回転流の強度評価

泡のデザイン、SA 濃度(0.5-2.0 wt%)、ピエゾに印加される電圧が回転流の強度に与える影響について調べた。0.1 wt%の蛍光色素を含有した SA 溶液をノズルに満たした。音波がこのノズルに、5-60 V の電圧で、6 s 間与えた(図 5-3(a))。そして、動画を撮影した。この動画から、画像解析ソフトウェア ImageJ (version 1.53a, NIH, Maryland, USA)のプラグイン[177]を用いて、蛍光色素の軌跡の画像を取得し、これによって回転流の強度を評価した。

5.2.5. 音波による回転流の混合率評価

音波によって引き起こされる回転流による、材料の混合の混合率の評価には、0.5-2.0 wt%の SA インクおよび、ChPh インクを用いた。蛍光色素含有・非含有の溶液をノズルの 2 つの入り口から流入させた。ノズル中の溶液の流れを撮影し、ノズルの出口部分の溶液中の蛍光色素の色の強度を解析した(図 5-3(b))。混合率は、下記の式で定義される Mixing index (MI) から評価を行った[178]。

$$MI = 1 - \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N (I_i - \bar{I})}}{\bar{I}} \quad (1)$$

ここで、 I_i は図 5-3 の赤の四角中で示す、混合チャンバーの白色強度である。 \bar{I} はその領域中の白色強度であり、 N はサンプルポイントである。この MI の数値が 1 に近いと均一な混合を示す。

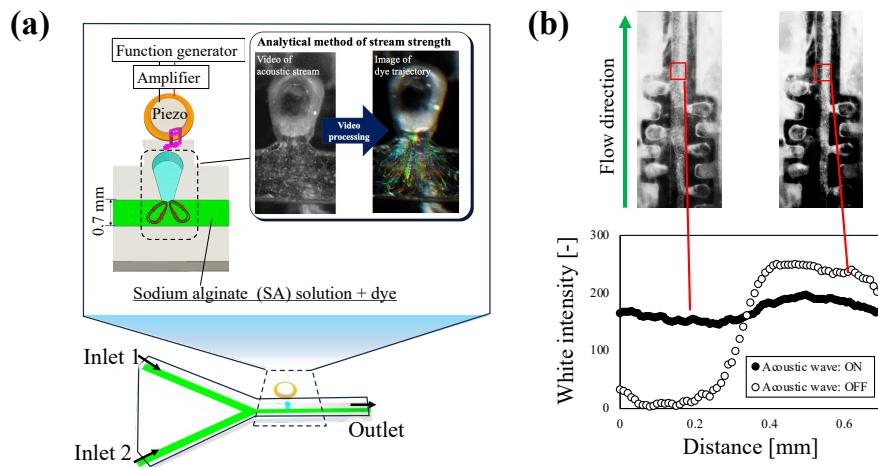


図 5-3. (a) 観察系の概要図、(b) 流路出口の色強度の評価法。

5.2.6. 音波が細胞生存率に与える影響

$1.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ の 10T1/2 細胞含有・非含有の 0.5 wt% の 2 種類の SA 溶液(溶媒:DMEM)を 0.9 mm/s の流速で 2 つの入り口から、ノズル中を介して、サンプル管へ吐出した。なお、吐出中に 45 V、3.0 kHz の条件で音波をノズルに印加した。吐出されたインクはトリリパンブルーで染色を行い、死細胞と生細胞のカウントを行った [179]。比較として、音波を非印加の条件で、ノズルを介して、上記の溶液の吐出を行い、細胞の生存率の計測を行った。

5.3.結果と考察

5.3.1. 穴のサイズが回転流に与える影響

まず、穴のサイズが 0.5 wt% の SA 溶液の回転流に与える影響について調べた。穴のデザインが回転流に大きな影響を与えると考えたためである。用意されたノズルは、異なるサイズの穴を持っており、流路に溶液を流し込んだ時この穴に空気の泡がトラップされる(図 5-4(a))。泡の最小の幅は 0.3 mm であり、75 °の角度を流路の壁面に対して持っている。なお、この流路中でトラップされる泡は、図 5-4(b)で示されるように、少なくとも 19 時間にわたって安定的に保持されることが確認されている。この泡に 15 V の電圧条件で音波を印加する。最も強い回転流を、泡のアスペクト比 1:3 で 3.0 kHz の周波数の時に観測した(図 5-4(c))。音波により生じる振動の強度は、それが固有周波数に達するまで増加することが知られている[180]。それよりも高い周波数が印加された時、泡と液体の振動の位相がずれ合い、振動を相殺するので、振動が起らなくなる。このような現象が、今回の実験系においても観測され、周波数や泡のデザインが回転流に大きな影響を与えることを確認した。

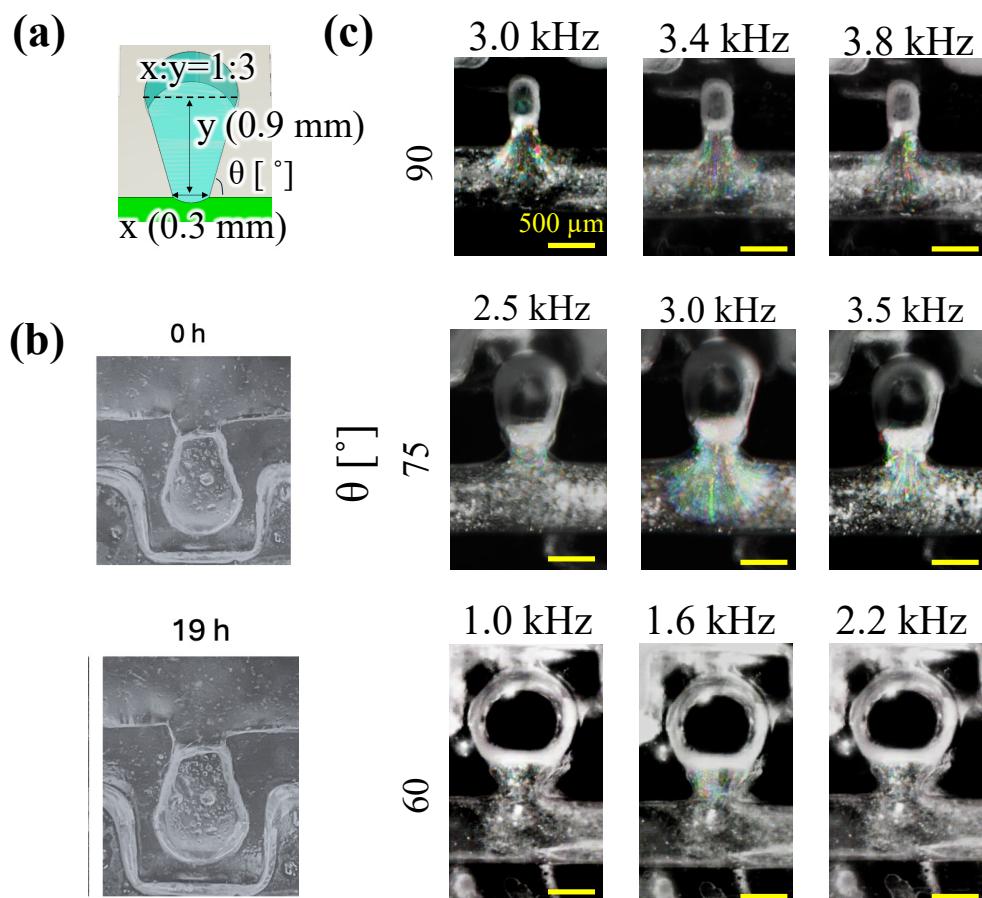


図 5-4. (a)泡をトラップする穴のデザイン、(b) 泡の安定性評価。0.5 wt% の SA 溶液で流路を 19 時間満たした。 (c)泡サイズが回転流に与える影響

5.3.1. 穴の角度が回転流に与える影響

流路の壁面に対する穴の角度もまた、材料の回転に大きな影響を与えるファクタであると考えた。そこで、穴の角度が、音波による回転流に与える影響について調べた。流路の壁面に対して異なる角度を持つ穴を3種類用意して(図5-5(a))、これら穴が引き起こす回転流の強度を調べた。図5-5(b)に示すように、角度90, 75, 60°を持つ穴において、最も強力な回転はそれぞれ、3.4, 3.0, 1.6 kHzで示された。最も強力な回転流は75°の角度を流路壁面に対して持つ穴であった。理論的には、より高い周波数で回転する回転流がより強い回転流を示すはずであるが、90°の穴では、流路の流体に対する接触面が小さいために、強い回転流を発生させることができなかったと考えられる。このような結果から、強い回転流を引き起こす75°の穴を今後の検討で用いることとした。

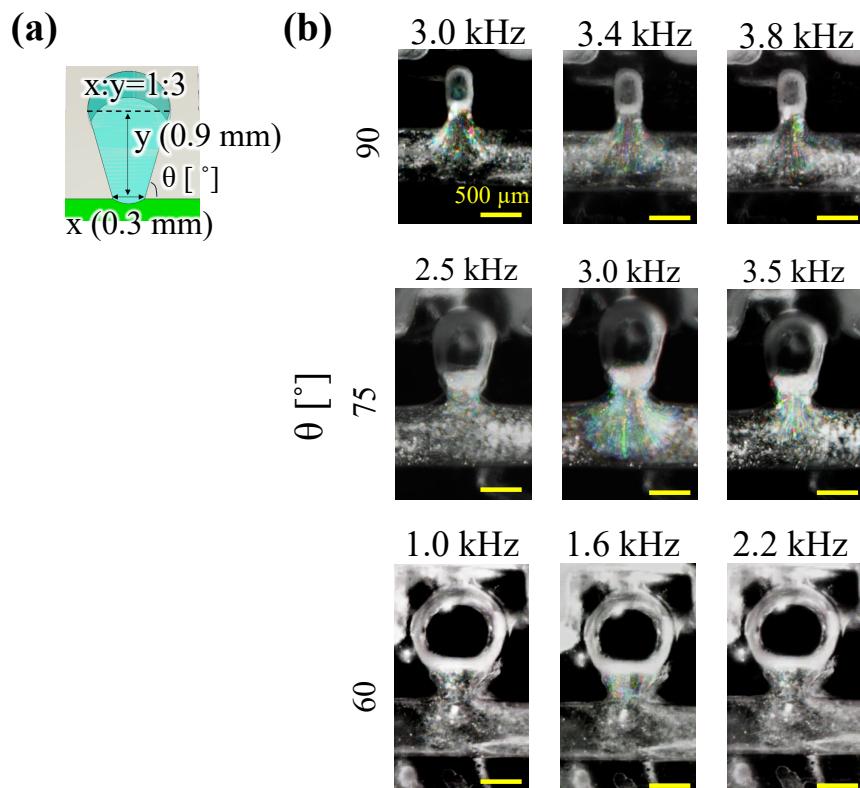


図 5-5. (a) 泡をトラップする穴のデザイン、(b)泡の角度が回転流に与える影響。

5.3.3. SA 水溶液の濃度が回転流に与える影響

上記の結果を踏まえて、1:3 のアスペクト比をもち、75 °の角度の穴にトラップされる泡が音波によって振動し、これによって流路中で引き起こされる回転流が、SA 溶液の濃度でどのように異なるかについて調査した。0.5, 1.0, 2.0 wt%の SA 溶液をこの流路に流し、15 V の電圧で、2.5, 3.0, 3.5 kHz の周波数を与えた。今回の結果では、どの濃度においても 3.0 kHz の条件で最も強い回転流を示した(図 5-6)。理論上、流体中の泡の引き起こす回転流の固有振動数は泡の半径や、流体と空気の間の界面張力に依存する[100]。本研究で用いた SA 溶液の界面張力は、どの濃度においても 10 mN/m 以内の違いしかなかったため(表 5-1)、振動数に影響を与えたものと考える。

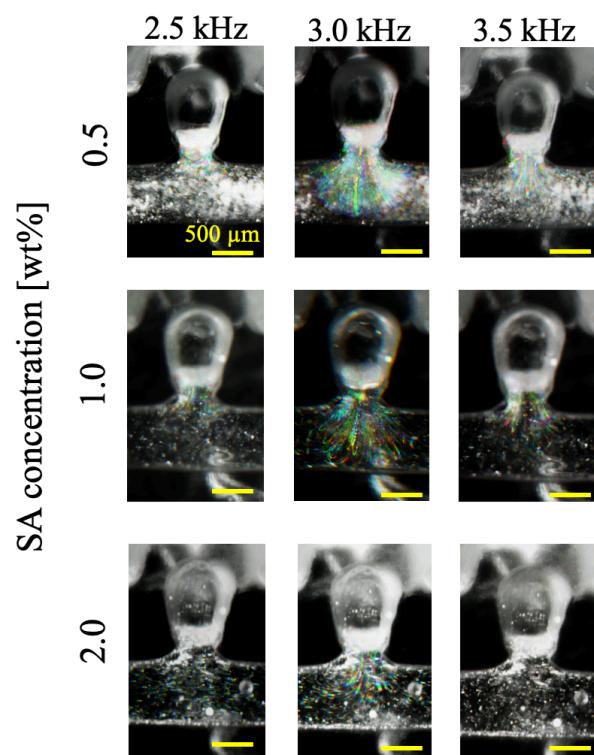


表 5-1. 0.5, 1.0, 2.0 wt%の SA の密度と表面張力

SA conc. [wt%]	Surface tension [mN/m]	Density [g/cm ³]
0.5	15.2 ± 0.4	1.001
1.0	15.7 ± 0.4	1.006
2.0	21.2 ± 0.5	1.016

図 5-6. SA 水溶液濃度が回転流に与える影響。

5.3.4. ピエゾに印加する電圧が回転流に与える影響

さらに、ピエゾに印加する電圧が、回転流に与える影響について調査した。3.0 kHz の周波数、5-60 V の条件で、回転流を生成させた。電圧の上昇に伴って、回転流が強くなっていることを確認した(図 5-7)。印加するエネルギーの量は、周波数や音波の波の振幅に密接に関係しており、高い電圧は音波の振幅をより大きくするので、このような強い回転流を生み出した。しかしながら、60 V の条件では、ピエゾが過度な電圧によって壊れてしまった。そのため、45 V で 3.0 kHz の条件が、今回の最適な運転条件とした。

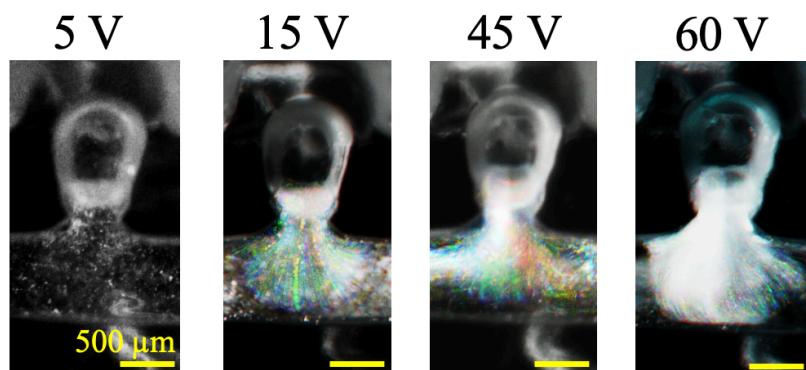


図 5-7. ピエゾに印加する電圧が回転流に与える影響。

5.3.5. 穴の配置が混合に与える影響

穴のデザインの決定を行った後、ノズルを用いて SA 溶液の混合を試みた。まず、一つの穴をもつノズルを用意し(図 5-8(a), A で示される)、0.5 wt% の SA 溶液を 0.10, 0.45, 0.90 mm/s の流速で流して混合を試みた。効率的な混合は、どの流速においてもこの流路では起こらなかった(図 5-8(b)(c))。この結果から、効率的な混合には、複数の穴が必要であることを示唆した。そこで、2 つの穴を並行または、ジグザグに配置した 2 種類の流路を用意した(図 5-8(a), B および C)。穴を並行に配置したノズルは、一つの泡から生成される回転流がお互いの回転流を打ち消しあって効率的な混合を行うことができなかった。一方の、ジグザグに穴を配置した流路では、最初の回転中に巻き込まれた流体が、次の回転流に効率的に巻き込まれ、他の流路よりも高い

混合率を示した(図 5-8(b)(c))。このようなデザインは、過去の研究ともよく一致しており、適切な泡の配置はジグザグ配置であると決定した。

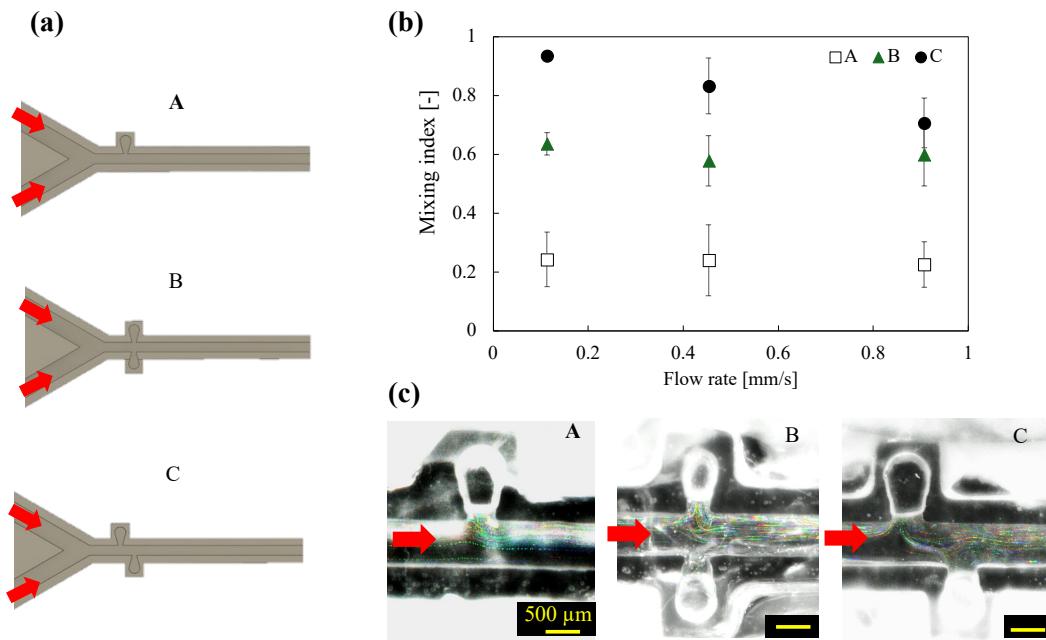


図5-8. (a) 異なる泡の配置をもつ流路、(b) 異なる流速における MI の評価、Data: Mean \pm S.D. ($n = 5$)。 (c) 各流路で生成される回転流の様子。

5.3.6. 効率的な混合を起こすノズルの提案と粘性流の混合

前述の結果に基づいて、効率的に混合を行うための、3D バイオプリンティング用ノズルの提案を行った(図 5-9(a))。このノズルは 6 つの穴をジグザグに配列している。材料の混合を行うためのチャンバーの体積は 2.45 mm^3 である(深さ = 0.7 mm 、幅 0.7 mm 、長さ 5.0 mm)。 $0.5, 1.0, 2.0 \text{ wt\%}$ の SA 溶液をこの流路で、異なる流路速で流し、混合を試みた。なお、蛍光色素含有/非含有のそれぞれの溶液を、2 つの入り口から流し、図 5-3(b)に示す評価法で評価した。80%以上の高い混合率は、 $0.5, 1.0, 2.0 \text{ wt\%}$ の溶液でそれぞれ、 $1.8, 0.9, 0.05 \text{ mm/s}$ の流速まで示された。

これら結果は、インクの混合率は、インクのもつ粘性に大きく影響することを示した。一般に、押し出し式の 3D バイオプリンティングでは、バイオプリンティング用材料は数 $\mu\text{m/s}$ から数 mm/s の速度で吐出され、造形を行う[88,142]。今回開発したノズルは、 $0.5, 1.0 \text{ wt\%}$ の SA 溶液の混合において、このような条件下で使用することができた。しかし、 2.0 wt\% の SA 溶液ではそのような条件下で混ぜることが困難であった。 2.0 wt\% の SA 溶液の粘性は、 0.5 wt\% のものと比べておよそ 20 倍程度粘

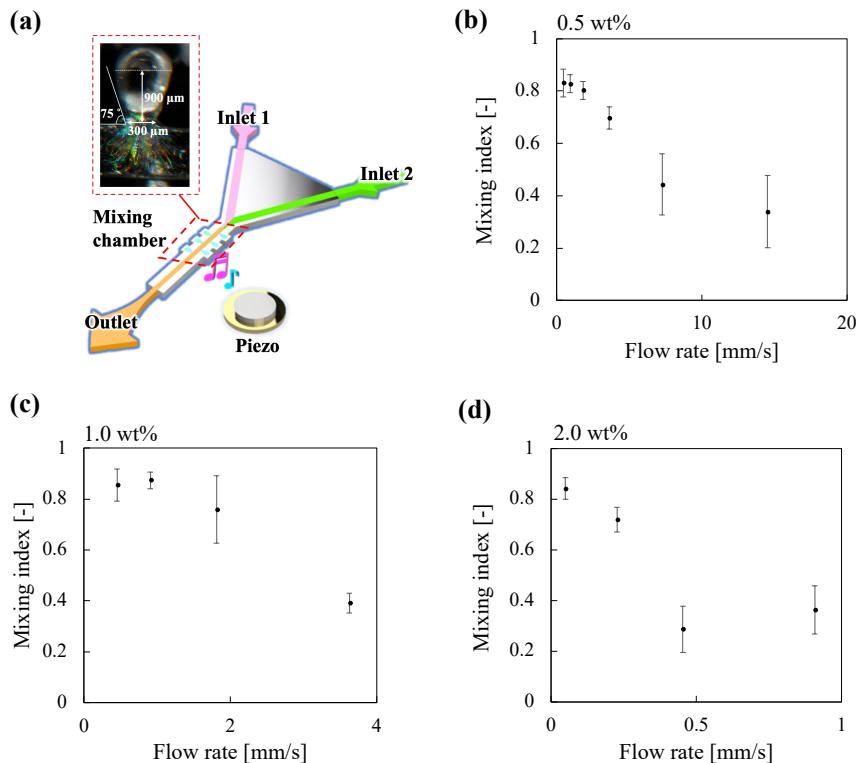


図 5-9. (a) 提案した効率的な混合を目的としたノズル、(b) 0.5, (c) 1.0 (d) 2.0 wt% の SA 溶液が混合に与える影響、Data: Mean \pm S.D. ($n = 5$).

性が高い(図 5-10)。そのような粘性の高い材料では、混合により大きなエネルギーを要する。より粘性の高い材料を効率的に混ぜるためにには、流路中に邪魔板を取り付けることや、穴の数を増やす、あるいは高い電圧にも耐えられるピエゾを用いて高電圧条件下で音波を印加できるようにする、といった流路デザインの工夫が必要になると考える。

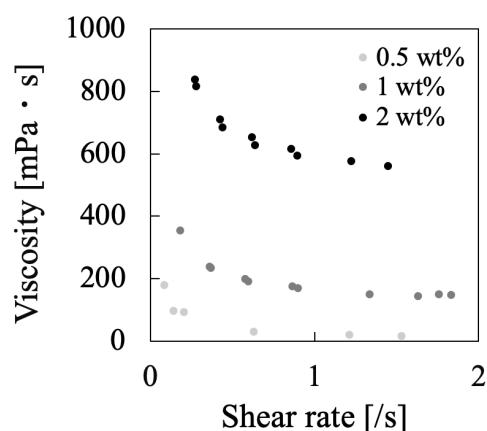


図 5-10. 0.5, 1.0, 2.0 wt% の SA 溶液の剪断速度に対する粘度。

5.3.7. 異なる粘性の SA 溶液の混合

さらに、このノズルを用いて、異なる粘性同士の材料の混合を試みた。0.5 wt%と1.0 wt%の SA 溶液の混合を行った。0.90 mm/s の流速まで高い 80 %以上の高い混合率を示した($MI = 80 \pm 4.7\%$, 図 5-11)。

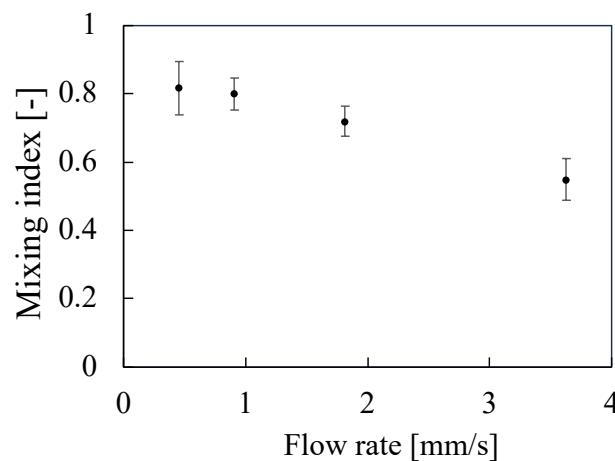


図 5-11. 0.5 と 1.0 wt% の SA 溶液の混合に流速が与える影響, Data: Mean \pm S.D. ($n = 5$).

マイクロ流体の混合技術は、バイオメディカルや化学のプロセスにおいて幅広く応用されている[178,181]。パッシブミキサは、ノズルの流路の構造や、流路中に取り付けられた邪魔板などによって、外界の力を加えずに、受動的に材料の混合を行う手法である[168]。細胞に対して温和な条件で材料を混ぜることができる一方で、流路の体積や長さが大きくなってしまう。加えて、粘性のある流体の混合を行うことが難しい。そのため、パッシブミキサは低粘性の材料である、水や有機溶媒の混合に限られている[182,183]。また、バイオプリンティングの研究において、パッシブミキサを利用した研究例は見られるものの、長い混合経路(>20 mm)や、早い流速(>375 $\mu\text{L}/\text{min}$)を必要とし、その造形性は限られている[29]。本研究で開発したノズルは、粘性のあるバイオプリンティング用の液体材料(20-150 mPa · s)を、より短い流路の長さ(< 5 mm)で、バイオプリンティングの条件(65 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1.8 mm/s)で混合を行うことができた。

一方で、アクティブミキサは、熱や物理的攪拌といった外界の力を用いて材料の混合を行う手法である[184,185]。この手法は、高い粘性のある材料を高い混合効率で混ぜることができる。しかしながら、材料の混合には高い剪断応力がかかり、細胞などの生体に応用することが困難である。さらに、バイオプリンティングで用いるノズルのようなマイクロ流体デバイスに、物理的なミキサを取り付けるには技術的に問題がある。例えば、Ober らは、粘性のある複数種類の流体を混ぜることができる 3D プリンタ用のアクティブミキサを報告しているが[73]、150 mm^3 程度の混合部分の体積を要し、それは本研究で開発したノズルの混合部分の体積(2.45 mm^3)よりもおよそ 60 倍大きな体積をもつ。バイオプリンティングの造形プロセス中に、材料を局所的に配列する技術は、高度な組織模倣体を構築する上で重要である。今回開発したノズ

ルは、このような既報のアクティブミキサやパッシブと比較し、より小さな混合部分の体積で材料を混ぜることができるという利点がある。

5.3.8. 3D プリンティング

開発したノズルが、インクを 3D バイオプリンティングの条件で混ぜることができるということは、上記で示した。次に、このノズルを 3D プリンタに搭載し、直線構造体の造形を行い、その有効性について検証を行った(図 5-12(a))。赤色と緑色の色素を含有した 0.5 wt% の SA 溶液を造形に用いた。図 5-9、5-11 の結果に基づき、0.9 mm/s の条件で、シリングポンプから各溶液の吐出を行った。吐出後に、1 wt% の塩化カルシウム溶液を加えて、ゲル化を行った。音波を印加していない条件では、緑色と赤色の二色で構成される直線が造形された。そして、音波を印加することによっ

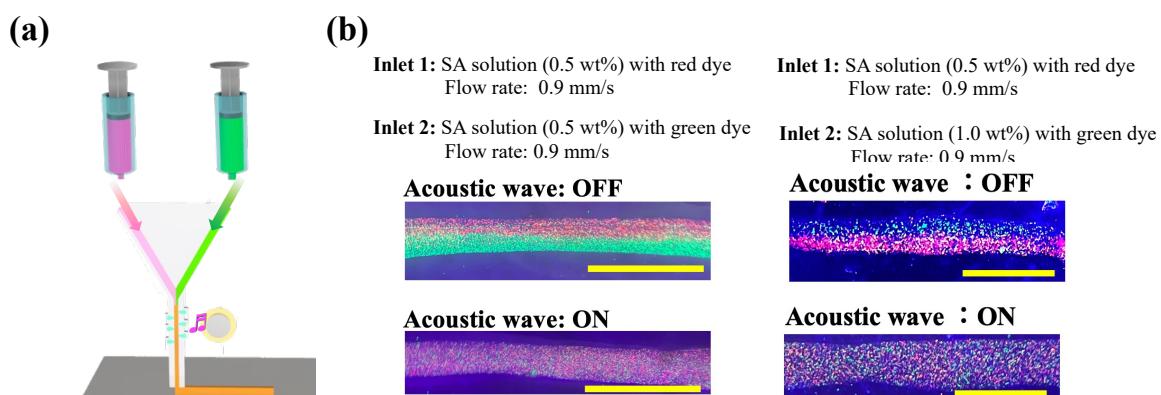


図 5-12. (a) 3D プリンティング概略図、(b) 音波印加/非印加条件における直線のプリンティング、スケールバー：2 mm。

て、これらの色が均一に混合された直線の構築を行うことができ、本研究で開発した音波ノズルの有効性を示した。また、0.5 wt%、1.0 wt% の粘性の異なる材料も混合しながらプリンティングに活用できることも示した(図 5-12(b))。

加えて、0.5 wt% の SA インクと 1 wt% の SA インクを交互に切り替えることで、色の勾配を生成しながら造形できないかどうかについても検討を行った。15 mm の長さの範囲で色の勾配が生成されている様子を確認した(図 5-13)。バイオプリンティングにおいて材料を局所的に配列する技術は、機能的な構造体を造形する上で重要な技術である。Lavrentievar らの研究では、パッシブなマイクロミキサを用いた GelMA のヒドロゲルの造形を行っているが、材料の混合に長い経路(>18 mm)を必要としており、インクの混合・制御にディレイが生じるため、複雑な制御系を必要とす

る[29]。これとは対照的に、本研究で開発したノズルは、粘性のある材料をバイオプリンティングのプロセスにおいて、短い経路(5 mm)で混ぜることができる。

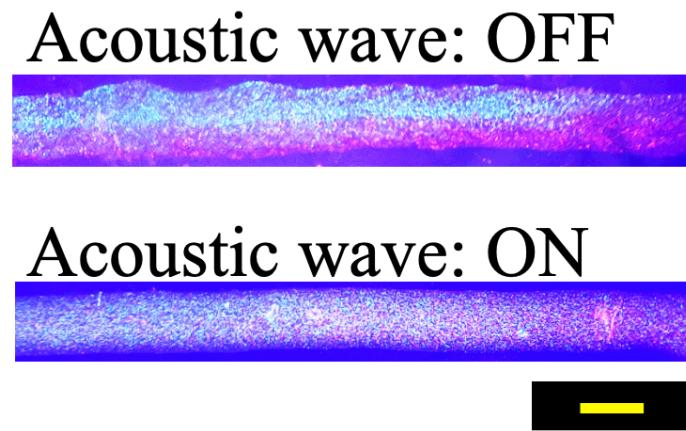


図 5-13. 音波印加/非印加条件における、0.5 wt%(赤)と 1.0 wt%(緑)の SA 溶液の流量を変化させながら造形を行った時の直線の様子。スケールバー：2 mm。

5.3.9. 音波が細胞の生存率に与える影響

多くのバイオプリンティングの研究において細胞を使用したプリンティングが行われている[138,186][80]。今回開発したノズルの音波が、細胞の生存率に与える影響について調査した。DMEM を溶媒とした 0.5 wt% の SA 溶液を用意し、これに細胞を含有したものとそうでないものを開発した流路の入り口から流し、ノズル内で音波の刺激を与えた。そして吐出した溶液中の細胞の生存率の測定を行った。ノズルから吐出する前では、細胞の生存率は $89.9 \pm 3.3\%$ であったのに対して、音波刺激を与えて吐出した後の生存率は、 $88.4 \pm 0.4\%$ 、音波刺激を与えないで吐出したものでは $86.9 \pm 1.0\%$ となり、細胞の生存率に大きな違いは観測されなかった(図 5-14, $p>0.05$)。この結果は、今回開発したノズルが細胞に対して適合的であるということを示している。バイオプリンティングのプロセスで細胞の密度をコントロールする技術は、細胞組織の成長や恒常化を制御する上で重要な技術である[187,188]。加えて、ノズルからインクを吐出した後に、高い細胞生存率を保つことは重要である[172,189]。このマイクロミキサはインクの効率的な混合を、細胞にダメージを与えることなく行うことができるという利点がある。

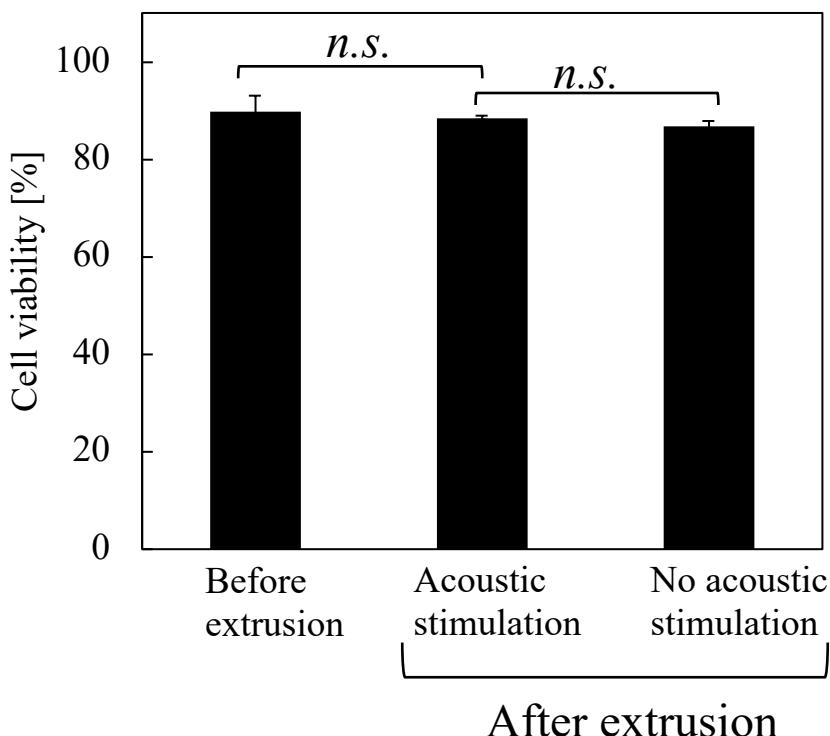


図 5-14. 音波刺激がノズル中の細胞の生存率に与える影響、Data:Mean \pm S.D. ($n=3$)、n.s.>0.1。

5.3.10. 光架橋性キトサンインクの混合

最後に、開発したノズルで、SA だけでなく他の材料の混合が可能かどうかについて検討を行った。まず、同じ濃度の ChPh 水溶液について、蛍光色素含有、非含有のものを用意し、これら溶液を開発したノズル内部で流し、音波を印加し、混合率の評価を行った(図 5-15(a)-(d))。0.5 wt%、1.0 wt% の ChPh インクの混合では、それぞれ、1.8, 0.9, mm/s で 80 %以上の高い混合率を示した。また、2.0 wt% ではバイオプリンティングの条件で高い今後率を示さなかった。そして、粘性の異なる ChPh インク同士の混合では、1.8 mm/s の流速まで 80 %以上の混合率を示した(図 5-15(c))。今回開発したノズルは、さまざまなインクの種類に応用可能であるということを示した。ChPh インクの粘性を図 5-15(e)に示した。SA 溶液とほぼ同等のオーダーの粘性であることがわかり、このような粘性の領域の液体材料ならば本研究で開発したノズルは、混合が可能であると考えられる。

そして、このノズルを用いて ChPh インクによる光架橋で押し出し式 3D バイオプリンティングを行ったところ、アルギン酸インクの時と同様にプリンティングを行う

ことができ(図 5-15(f))、開発したノズルは多様な造形手法にも対応することができた。

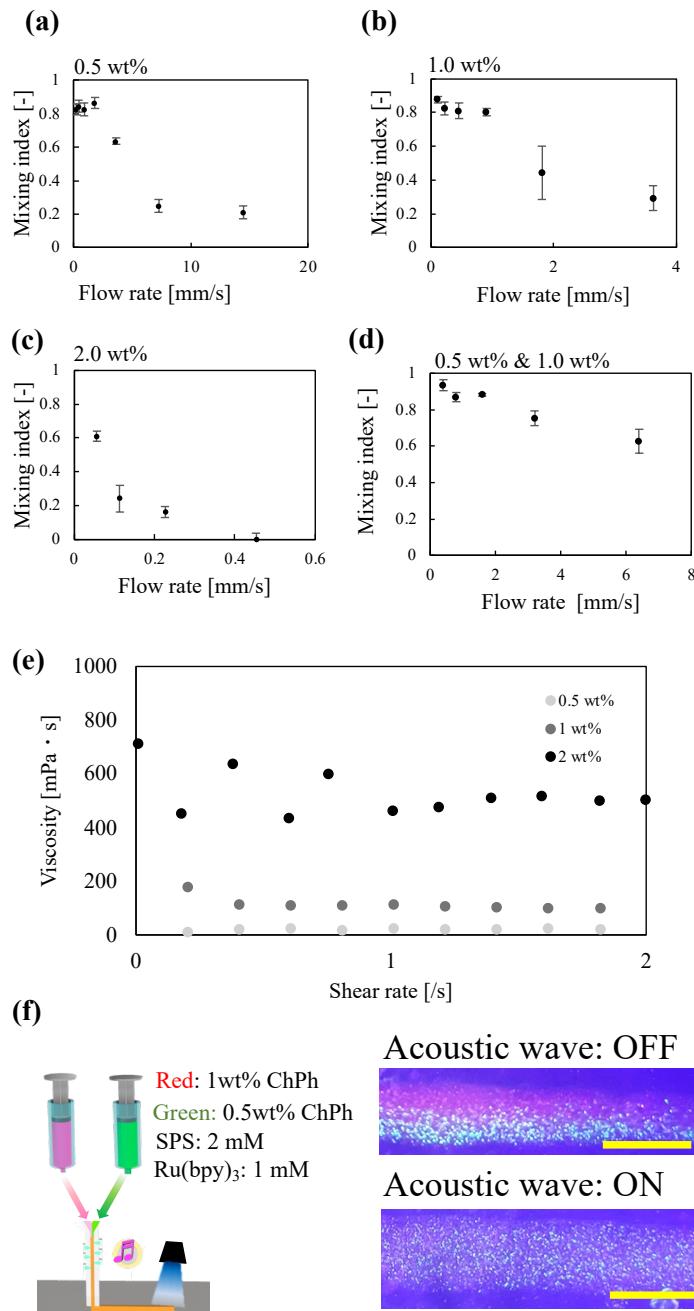


図 5-15. (a) 0.5 wt%、(b)1.0 wt%、(c)2.0 wt%、(d)1.0 wt%と 0.5 wt%の ChPh の混合率の評価、Data: Mean \pm S.D. ($n=5$). (e) ChPh インクの剪断速度に対する粘度、(f) 光架橋による音波ノズルの造形図とプリントした直線の様子、スケールバー：2 mm。

5.4. 技術の限界と制約

開発したノズルは、0.5 wt%、1.0 wt%のインクを効率的に混合することができた一方で、高い粘性のインク(>500 mPa · s)のインクの混合を、バイオプリンティングの流速条件で行うことができなかった。バイオプリンティングで用いられる材料は、50-1.0 × 105 mPa · s の幅広い粘性を持つものが使用されており[190,191]、このようなさまざまなインクへの適用が可能なマイクロミキサの開発が求められる。より粘性の高い材料の混合には、より小さな穴を持つ音波マイクロミキサを開発することが有効であると考えられる。小さな穴では、トラップされる泡のサイズが小さくなり、これによって回転流が生成する固有振動数が高くなり、より激しい回転流が生成されることが考えられるからである[192]。本研究では、市販の液層光重合式の3Dプリンタをノズルの作製に用いた。このプリンタは安価で、10分以内という短い時間で流路の作製をすることができるものの、その造形精度は200 μm程度である。これが、本実験で作製した流路の穴のサイズの制約となった。このような3Dプリンタよりも、より小さな構造体の造形が可能な造形技術(例えば、ステレオオリソグラフィ)を用いることで、より強力な回転流を生み出す流路の作製を行うことができると考える。しかしながら、高い周波数は、泡の振動を高いエネルギーで行うことになり、特に超音波領域の周波数では、細胞にダメージを与える恐れがある[193]。したがって、超音波領域におけるインクの混合においては、インクの混合率と細胞の生存率のバランスについて今後考慮しなければならないと考える。

また、流路を作製するための素材として、ガラスや金属は、ピエゾから流路に供給される音波の振動の減衰を抑え、より効率的な材料の混合に繋げられることが考えられる。

ノズルのデザインについても、より多くの入り口を持つようなデザインを作製することにより、より多くの材料の混合を行うことができ、機能的な構造体の実現に繋げられるようになると考える[78]。

5.5. 結論

本章では、3Dバイオプリンティングにおけるインクの混合技術として、音波によって生成する回転流に着目し、これによってインクの混合が可能なノズルの開発を行った。まず、穴のデザイン、周波数、電圧が回転流に与える影響について調査した。これらパラメータの最適化後、効率的な混合を行うためのノズルのデザインの提案を行った。開発したノズルは、バイオプリンティング用材料のモデルであるSAインクの混合を行うことができただけでなく、本博士論文で扱っている光架橋性のChPhインクのバイオプリンティング条件下での混合を行うことができた。既報のパッシブミキサやアクティブミキサと比較し、より小さな混合体積でインクの混合が可能であることを示した。より粘性の高い材料の混合には、さらなる流路のデザインの最適化が必要である。

加えて、音波による刺激は、細胞にダメージを与えることがなかった。本研究は、音波マイクロミキサを3Dバイオプリンティング(3Dプリンティング)に応用した最初

の研究例である。この技術は、3Dバイオプリンティングのさらなる発展に寄与するものと考える。

本章の一部図・内容は、"Micromixer driven by bubble-induced acoustic microstreaming for multi-ink 3D bioprinting"というタイトルで日高らによって国際誌 *Lab on a chip* の 2024, 24,4571 に掲載されたものである。本内容は、出版社 RSC (London, United Kingdom) から許可を得て掲載している。

第六章：結論

本博士論文は、光架橋性のキトサンインクに着目し、バイオプリンティングにおける材料の開発と造形プロセスの高度化という課題に両面から取り組んだものである。

まず、第二章では、光架橋性のキトサンインクにおける、反応犠牲剤 SPS や光触媒 Ru(bpy)₃ の濃度が、ゲル化時間や、硬さに及ぼす影響について検討を行った。そして、これら試薬の濃度によって各種特性のコントロールが可能であることを示した。さらに、これらを踏まえて押し出し式 3D プリンティングにおける適切な造形条件の決定を行い、3 次元構造体の造形が可能であることを示した。さらに、3D プリンティングの手法として、押し出し式 3D プリンティング手法の次に使用されている液層光重合式の 3D プリティングにこのインクの使用が可能かどうかの検討を行った。押し出し式の 3D プリンティング手法よりも造形精度の高い構造体の造形を行うことができ、開発したインクは様々な造形方式に適用可能であることを示した。加えて、生分解性、抗菌性などのキトサン固有の特性を保持することも示した。開発したインクは、これまでのキトサンインクと比べて早い速度でゲル化し、事前または事後のゲル化処理を必要としない点で、汎用性のあるインクであることを示した。

第三章では、開発したキトサンインクのさらなる機能化のために、TPP イオン架橋とフェノール架橋を組み合わせた二重架橋ヒドロゲルに関する特性の評価を行った。光架橋によって調製したキトサンヒドロゲルに対して、TPP 水溶液の浸漬時間を持つことで、ヤング率が最大で 20 倍程度大きい材料を調製することができた。また、イオン架橋によって架橋密度が高くなることで良好な保水性を示した。加えて、TPP 水溶液への浸漬により、ヒドロゲル中のイオン伝導度があがり、電気抵抗が下がることを確認した。最後に、PDMS シート上に 3D プリンタを用いて、回路構造体を構築し、この光架橋とイオン架橋による二重架橋キトサンゲルは、フレキシブルな回路の作製が可能であることを示唆した。

第四章では、開発したキトサンインクのさらなる機能化のために、Schiff 塩基に着目したバイオプリンティング用ヒドロゲル材料の開発を試みた。酸化グルコマンナンと ChPh を混合することにより自己修復性のあるゲルを得ることができ、シリジによって吐出後はゲルとして形状を維持することを示した。そして、ChPh 単体と比較し、細胞に対する良好な細胞適合性を示した。さらに、3D プリンティングにおいて、Schiff 塩基のヒドロゲルを活用することで、低い反応犠牲剤濃度で三次元の構造体の造形を行うことができた。加えて、キトサン固有の抗菌性を維持することを明らかにした。開発したヒドロゲル材料は、高い造形性と細胞適合性を示す、機能性のある材料であることを示した。

第五章では、このようなインクを特定の用途や目的に応じて配列するための材料混合技術の開発を行った。バイオプリンティングで用いられる粘性のある液体材料を細胞に損傷を与えない穏やかな条件で、かつ効率的に混ぜることを目標とし、非侵襲的かつ調整が容易な刺激により材料の混合が可能な、音によって誘起されるバブルマイクロミキサを、バイオプリンティングのためのノズルとして実装することを試みた。効率的に材料の混合を行うための、周波数、電圧などの諸条件の決定ののち、適切なノズルのデザインを決定した。開発したノズルは、アルギン酸インクの効率的な混合

を示した。さらに、本論文の主題である光架橋性のキトサンインクの混合も確認され、これら材料を混合しながらプリントイングできることを示した。そして、細胞に対する適合性も検討し、高い細胞生存率を示した。開発したノズルは、バイオプリンティングにおけるインクの混合に有効であることを示した。

以上のことから、本論文における、光架橋性キトサンインクに着目した、材料・造形プロセスの開発は、幾ばくかの進展を得ることができたものと考える。これら結果は、キトサンという資源のバイオプリンティングの有用性、ひいては再生医療への有用性を示したものと考える。

第七章：今後の展望

第二章から第五章を通じて、バイオプリンティングを目的とした光架橋性のキトサンインクの開発、造形プロセスの高度化に取り組んだ。このような材料や技術を、再生医療や食品生産などの諸分野により本格的に応用するための今後の展望について本章で記述する。本研究では、光架橋性のキトサンインクという一つの材料に着目したが、バイオプリンティングにおいてより複雑な構造体を造形するには、複数の材料を切り替え可能な3Dプリンティング技術が望ましい。押し出し式の3Dプリンティング手法において、材料を切り替えるには通常複数ノズルを用いた造形手法が用いられている。この手法は、ノズルの数が増えるほどに、使用することのできる材料が増える一方で、材料の切り替えに時間がかかること、ノズルの位置合わせが困難であるという問題点があった[194]。例えば、臓器様の構造体を構築するには2-10時間かかると言われており、造形中に構造体を大気中に晒し続けると造形に用いる材料中の細胞の生存率が低下する可能性がある[15]。このため、複数の構造体からなる構造体を早い造形速度で高い造形精度で造形を行う技術が必要である。

複数ノズルを用いた造形手法に加えて、一つのノズルから複数の材料を切り替える単一ノズルによる造形手法は、同じノズルから材料を切り替えて造形を行うため、材料を切り替える速度が早く、連続的に材料を吐出することができる[77,78]。Skylar-Scottらは、単一ノズルによってシリコンインクを高頻度で切り替えることができる3Dプリンティングシステムを開発し、0.5 mmの造形精度で材料を切り替えてプリンティングできることを報告しており、単一ノズルによる造形システムの有効性を実証した[195]。しかしながら、このようなインクの粘性($100 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ - $10 \text{ kPa} \cdot \text{s}$)は高く、バイオプリンティングで用いられるような低粘性($<10 \text{ Pa} \cdot \text{s}$)の液体材料で単一ノズルの造形システムを使用するには、単一ノズル中の液体材料の移動現象を解析する必要があった。

このような背景から、著書は複数の材料を切り替えることができる単一ノズルによる3Dプリンティングシステムを構築した(図7-1)。

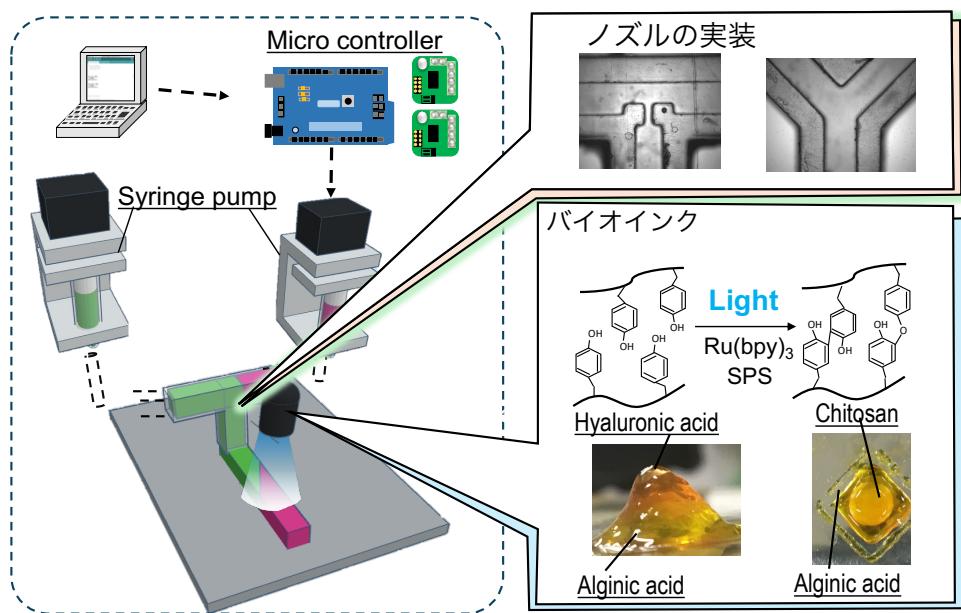


図 7-1. 単一ノズルによる複数材料の造形が可能な 3D プリンティングシステム。

さらに、流体解析シミュレーションを用いて、単一ノズル中の液体材料の解析を行い、材料の持つ粘性やノズルの形状が切り替えに与える影響について明らかにした(図 7-2)[196]。この研究では、バイオプリンティング用材料のモデルとして、幅広く使用されているアルギン酸ナトリウムを用いて解析を行ったが、光架橋性のキトサンにおいても、粘性や密度のデータがあれば適用することが可能である。

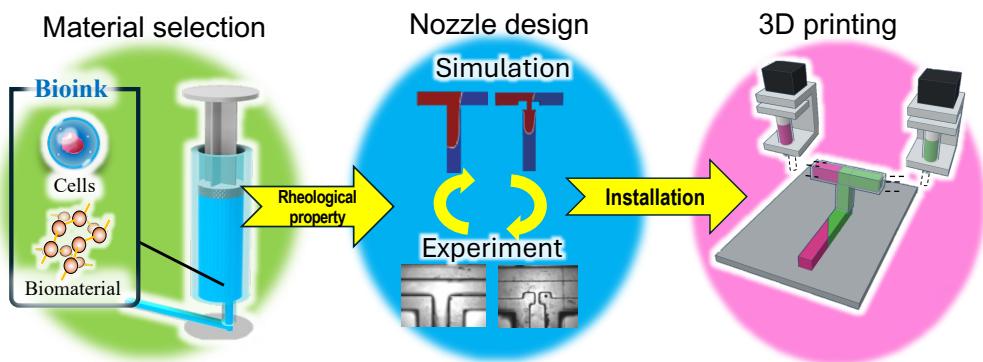


図 7-2. シミュレーションと実験を組み合わせた 3D プリンティング用単一ノズルの開発。

また、3D バイオプリンティングにおける造形精度や材料の造形性を高める手法として、材料にナノファイバを添加するような手法も取られている[197,198]。例えば、著者が関わった研究の一例として、キトサン材料にキトサンナノファイバを添加することによって、キトサンの持つ効果や抗菌性を損ねることなく、良好な造形精度を実現した[199]。ナノファイバのノズル中の流動状態についても、シミュレーションを

活用して解析を行うことができれば、バイオプリンティング用材料の開発や、ノズルの開発における設計指針の確立に繋げられると考えられる。このようなシミュレーションやプリンティングシステムを活用することにより、光架橋性のキトサンインクを用いて複雑な形状を持つ構造体の構築、あるいはこれを用いた再生医療や食品生産などの様々な応用に繋げられる可能性がある。

また、こうしたシステムに加えて、第四章で示した Schiff 塩基反応系や、第五章で示した音波による混合が可能なマイクロミキサを組み合わせることでより機能的な構造体の構築につながる可能性がある。すなわち、酸化グルコマンナンやキトサン材料をマイクロミキサ中で成分を調節しながら混ぜ合わせ、ゲル化させることで材料の硬さや素性を変えながらプリンティングを行うことができる可能性がある。

参考文献：

1. Chen, S.; Sade, R.M.; Entwistle, J.W. Organ Donation by the Imminently Dead: Addressing the Organ Shortage and the Dead Donor Rule. *Journal of Medicine and Philosophy (United Kingdom)*, **2024**, *49*, 458–469, doi:10.1093/jmp/jhae028.
2. Israni, A.K. *OPTN/SRTR 2020 Annual Data Report: Introduction*, **2022**, *2*:11-20, doi: 10.1111/ajt.16974.
3. Bakhtiyar, S.S.; Godfrey, E.L.; Ahmed, S.; Lamba, H.; Morgan, J.; Loor, G.; Civitello, A.; Cheema, F.H.; Etheridge, W.B.; Goss, J.; et al. Survival on the Heart Transplant Waiting List. *JAMA Cardiol*, **2020**, *5*, 1227, doi:10.1001/jamacardio.2020.2795.
4. Wood, K.J.; Bushell, A.; Hester, J. Regulatory Immune Cells in Transplantation. *Nat Rev Immunol*, **2012**, *12*, 417–430, doi: 10.1038/nri3227.
5. Duan, B. State-of-the-Art Review of 3D Bioprinting for Cardiovascular Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*, **2017**, *45*, 195–209, doi:10.1007/s10439-016-1607-5.
6. Chimene, D.; Kaunas, R.; Gaharwar, A.K. Hydrogel Bioink Reinforcement for Additive Manufacturing: A Focused Review of Emerging Strategies. *Advanced Materials*, **2020**, *32*, 1–22, doi:10.1002/adma.201902026.
7. Singh, S.; Choudhury, D.; Yu, F.; Mironov, V.; Naing, M.W. In Situ Bioprinting – Bioprinting from Benchside to Bedside? *Acta Biomater*, **2020**, *101*, 14–25, doi:10.1016/j.actbio.2019.08.045.
8. Romanazzo, S.; Nemec, S.; Roohani, I. iPSC Bioprinting: Where Are We At? *Materials* **2019**, *12*, doi: 10.3390/ma12152453.
9. Seol, Y.J.; Kang, H.W.; Lee, S.J.; Atala, A.; Yoo, J.J. Bioprinting Technology and Its Applications. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, **2014**, *46*, 342–348, doi:10.1093/ejcts/ezu148.
10. Askari, M.; Afzali Naniz, M.; Kouhi, M.; Saberi, A.; Zolfagharian, A.; Bodaghi, M. Recent Progress in Extrusion 3D Bioprinting of Hydrogel Biomaterials for Tissue Regeneration: A Comprehensive Review with Focus on Advanced Fabrication Techniques. *Biomater Sci*, **2021**, *9*, 535–573, doi:10.1039/d0bm00973c.
11. Ramesh, S.; Harrysson, O.L.A.; Rao, P.K.; Tamayol, A.; Cormier, D.R.; Zhang, Y.; Rivero, I. V. Extrusion Bioprinting: Recent Progress, Challenges, and Future Opportunities. *Bioprinting*, **2021**, *21*, e00116, doi:10.1016/j.bprint.2020.e00116.

12. Ng, W.L.; Lee, J.M.; Zhou, M.; Chen, Y.W.; Lee, K.X.A.; Yeong, W.Y.; Shen, Y.F. Vat Polymerization-Based Bioprinting - Process, Materials, Applications and Regulatory Challenges. *Biofabrication*, **2020**, *12*, doi:10.1088/1758-5090/ab6034.
13. Vithani, K.; Goyanes, A.; Jannin, V.; Basit, A.W.; Gaisford, S.; Boyd, B.J. An Overview of 3D Printing Technologies for Soft Materials and Potential Opportunities for Lipid-Based Drug Delivery Systems. *Pharm Res*, **2019**, *36*, doi:10.1007/s11095-018-2531-1.
14. Compaan, A.M.; Christensen, K.; Huang, Y. Inkjet Bioprinting of 3D Silk Fibroin Cellular Constructs Using Sacrificial Alginate. *ACS Biomater Sci Eng*, **2017**, *3*, 1519–1526, doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00432.
15. Li, X.; Liu, B.; Pei, B.; Chen, J.; Zhou, D.; Peng, J.; Zhang, X.; Jia, W.; Xu, T. Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chem Rev*, **2020**, *120*, 10793–10833, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00008.
16. Ng, W.L.; Chua, C.K.; Shen, Y.F. Print Me An Organ! Why We Are Not There Yet. *Prog Polym Sci*, **2019**, *97*, 101145, doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.101145.
17. Klebe, R.J. Cytoscribing: A Method for Micropositioning Cells and the Construction of Two- and Three-Dimensional Synthetic Tissues. *Exp Cell Res*, **1988**, *179*, 362–373, doi:10.1016/0014-4827(88)90275-3.
18. Landers, R.; Hübner, U.; Schmelzeisen, R.; Mülhaupt, R. Rapid Prototyping of Scaffolds Derived from Thermoreversible Hydrogels and Tailored for Applications in Tissue Engineering. *Biomaterials*, **2002**, *23*, 4437–4447, doi:10.1016/S0142-9612(02)00139-4.
19. Noor, N.; Shapira, A.; Edri, R.; Gal, I.; Wertheim, L.; Dvir, T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusionable Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science*, **2019**, *6*, 1900344, doi: 10.1002/advs.201900344.
20. Kim, J.H.; Seol, Y.J.; Ko, I.K.; Kang, H.W.; Lee, Y.K.; Yoo, J.J.; Atala, A.; Lee, S.J. 3D Bioprinted Human Skeletal Muscle Constructs for Muscle Function Restoration. *Sci Rep*, **2018**, *8*, 1–15, doi:10.1038/s41598-018-29968-5.
21. DiMasi, J.A.; Hansen, R.W.; Grabowski, H.G. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs. *J Health Econ*, **2003**, *22*, 151–185, doi:10.1016/S0167-6296(02)00126-1.
22. Nie, J.; Gao, Q.; Fu, J.; He, Y. Grafting of 3D Bioprinting to In Vitro Drug Screening:

- A Review. *Adv Healthc Mater*, **2020**, *9*, e1901773, doi: 10.1002/adhm.201901773.
- 23. Yamada, K.M.; Cukierman, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, **2007**, *130*, 601–610, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.006.
 - 24. Nelson, C.M.; Bissell, M.J. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **2006**, *22*, 287–309, doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315.
 - 25. King, S.M.; Presnell, S.C.; Nguyen, D.G. Abstract 2034: Development of 3D Bioprinted Human Breast Cancer for in Vitro Drug Screening. *Cancer Res*, **2014**, *74*, AM2034–2034, doi:10.1158/1538-7445.AM2014-2034.
 - 26. Zhao, Y.; Yao, R.; Ouyang, L.; Ding, H.; Zhang, T.; Zhang, K.; Cheng, S.; Sun, W. Three-Dimensional Printing of Hela Cells for Cervical Tumor Model in Vitro. *Biofabrication*, **2014**, *6*, 035001, doi:10.1088/1758-5082/6/3/035001.
 - 27. Kang, D.H.; Louis, F.; Liu, H.; Shimoda, H.; Nishiyama, Y.; Nozawa, H.; Kakitani, M.; Takagi, D.; Kasa, D.; Nagamori, E.; et al. Engineered Whole Cut Meat-like Tissue by the Assembly of Cell Fibers Using Tendon-Gel Integrated Bioprinting. *Nat Commun*, **2021**, *12*, 5059, doi:10.1038/s41467-021-25236-9.
 - 28. Wilson, S.A.; Cross, L.M.; Peak, C.W.; Gaharwar, A.K. Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting. *ACS Appl Mater Interfaces*, **2017**, *9*, 43449–43458, doi:10.1021/acsami.7b13602.
 - 29. Lavrentieva, A.; Fleischhammer, T.; Enders, A.; Pirmahboub, H.; Bahnemann, J.; Pepelanova, I. Fabrication of Stiffness Gradients of GelMA Hydrogels Using a 3D Printed Micromixer. *Macromol Biosci*, **2020**, *20*, 2000107, doi:10.1002/mabi.202000107.
 - 30. Condi Mainardi, J.; Rezwan, K.; Maas, M. Genipin-Crosslinked Chitosan/Alginate/Alumina Nanocomposite Gels for 3D Bioprinting. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2022**, *45*, 171–185, doi:10.1007/s00449-021-02650-3.
 - 31. Song, S.J.; Choi, J.; Park, Y.D.; Hong, S.; Lee, J.J.; Ahn, C.B.; Choi, H.; Sun, K. Sodium Alginate Hydrogel-Based Bioprinting Using a Novel Multinozzle Bioprinting System. *Artif Organs*, **2011**, *35*, 1132–1136, doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01377.x.
 - 32. Silvestro, I.; Francolini, I.; Lisio, V. Di; Martinelli, A.; Pietrelli, L.; Scotto, A.; Scoppio, A.; Piozzi, A. Preparation and Characterization of TPP-Chitosan Crosslinked Sca Ff

33. Liu, Y.; Luo, X.; Wu, W.; Zhang, A.; Lu, B.; Zhang, T.; Kong, M. Dual Cure (Thermal/Photo) Composite Hydrogel Derived from Chitosan/Collagen for in Situ 3D Bioprinting. *Int J Biol Macromol*, **2021**, *182*, 689–700, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.058.
34. Huber, T.; Clucas, D.; Vilmay, M.; Pupkes, B.; Stuart, J.; Dimartino, S.; Fee, C. 3D Printing Cellulose Hydrogels Using LASER Induced Thermal Gelation. *Journal of Manufacturing and Materials Processing*, **2018**, *2*, 42, doi:10.3390/jmmp2030042.
35. Huang, J.; Fu, H.; Wang, Z.; Meng, Q.; Liu, S.; Wang, H.; Zheng, X.; Dai, J.; Zhang, Z. BMSCs-Laden Gelatin/Sodium Alginate/Carboxymethyl Chitosan Hydrogel for 3D Bioprinting. *RSC Adv*, **2016**, *6*, 108423–108430, doi:10.1039/c6ra24231f.
36. Lee, S.J.; Seok, J.M.; Lee, J.H.; Lee, J.; Kim, W.D.; Park, S.A. Three-Dimensional Printable Hydrogel Using a Hyaluronic Acid/Sodium Alginate Bio-Ink. *Polymers (Basel)*, **2021**, *13*, 1–8, doi:10.3390/polym13050794.
37. Mirani, B.; Stefanek, E.; Godau, B.; Hossein Dabiri, S.M.; Akbari, M. Microfluidic 3D Printing of a Photo-Cross-Linkable Bioink Using Insights from Computational Modeling. *ACS Biomater Sci Eng*, **2021**, *7*, 3269–3280, doi:10.1021/acsbiomaterials.1c00084.
38. Ouyang, L.; Highley, C.B.; Sun, W.; Burdick, J.A. A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-Crosslinkable Inks. *Advanced Materials*, **2017**, *29*, 1604983, doi:10.1002/adma.201604983.
39. Sakai, S.; Mochizuki, K.; Qu, Y.; Mail, M.; Nakahata, M.; Taya, M. Peroxidase-Catalyzed Microextrusion Bioprinting of Cell-Laden Hydrogel Constructs in Vaporized Ppm-Level Hydrogen Peroxide. *Biofabrication*, **2018**, *10*, 045007, doi:10.1088/1758-5090/aadc9e.
40. Gantumur, E.; Nakahata, M.; Kojima, M.; Sakai, S. Extrusion-Based Bioprinting through Glucose-Mediated Enzymatic Hydrogelation. *Int J Bioprint*, **2020**, *6*, 43–52, doi:10.18063/ijb.v6i1.250.
41. Lei, M.; Wang, X. Biodegradable Polymers and Stem Cells for Bioprinting. *Molecules* **2016**, *21*, 1–14, doi:10.3390/molecules21050539.

42. McCarthy, R.R.; Ullah, M.W.; Pei, E.; Yang, G. Antimicrobial Inks: The Anti-Infective Applications of Bioprinted Bacterial Polysaccharides. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 1155–1159, doi:10.1016/j.tibtech.2019.05.004.
43. Zhu, T.; Mao, J.; Cheng, Y.; Liu, H.; Lv, L.; Ge, M.; Li, S.; Huang, J.; Chen, Z.; Li, H.; et al. Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogel Interfaces for Wound Healing and Tissue Engineering. *Adv Mater Interfaces*, **2019**, *6*, 1900761, doi:10.1002/admi.201900761.
44. Tai, C.; Bouissil, S.; Gantumur, E.; Carranza, M.S.; Yoshii, A.; Sakai, S.; Pierre, G.; Michaud, P.; Delattre, C. Use of Anionic Polysaccharides in the Development of 3D Bioprinting Technology. *Applied Sciences (Switzerland)*, **2019**, *9*, 2596, doi:10.3390/app9132596.
45. Wang, Y.L.; Han, L.; Zhang, X.L.; Cao, L.; Hu, K.; Li, L.H.; Wei, Y. 3D Bioprinting of an Electroactive and Self-Healing Polysaccharide Hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med.* **2022**, *16*, 76–85, doi:10.1002/term.3238.
46. Lim, K.S.; Schon, B.S.; Mekhileri, N. V.; Brown, G.C.J.; Chia, C.M.; Prabakar, S.; Hooper, G.J.; Woodfield, T.B.F. New Visible-Light Photoinitiating System for Improved Print Fidelity in Gelatin-Based Bioinks. *ACS Biomater Sci Eng* **2016**, *2*, 1752–1762, doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00149.
47. Gao, T.; Gillispie, G.J.; Copus, J.S.; Kumar, A.P.R.; Seol, Y.J.; Atala, A.; Yoo, J.J.; Lee, S.J. Optimization of Gelatin-Alginate Composite Bioink Printability Using Rheological Parameters: A Systematic Approach. *Biofabrication* **2018**, *10*, 034106, doi:10.1088/1758-5090/aacdc7.
48. Gong, Y.; Bi, Z.; Bian, X.; Ge, A.; He, J.; Li, W.; Shao, H.; Chen, G.; Zhang, X. Study on Linear Bio-Structure Print Process Based on Alginate Bio-Ink in 3D Bio-Fabrication. *Biodes Manuf.* **2020**, *3*, 109–121, doi:10.1007/s42242-020-00065-9.
49. Jessop, Z.M.; Al-Sabah, A.; Gao, N.; Kyle, S.; Thomas, B.; Badiei, N.; Hawkins, K.; Whitaker, I.S. Printability of Pulp Derived Crystal, Fibril and Blend Nanocellulose-Alginate Bioinks for Extrusion 3D Bioprinting. *Biofabrication*, **2019**, *11*, 045006, doi:10.1088/1758-5090/ab0631.
50. Lee, S.J.; Seok, J.M.; Lee, J.H.; Lee, J.; Kim, W.D.; Park, S.A. Three-Dimensional Printable Hydrogel Using a Hyaluronic Acid/Sodium Alginate Bio-Ink. *Polymers (Basel)* **2021**, *13*, 1–8, doi:10.3390/polym13050794.

51. Ramirez Caballero, S.S.; Saiz, E.; Montembault, A.; Tadier, S.; Maire, E.; David, L.; Delair, T.; Grémillard, L. 3-D Printing of Chitosan-Calcium Phosphate Inks: Rheology, Interactions and Characterization. *J Mater Sci Mater Med*, **2019**, *30*, 6, doi:10.1007/s10856-018-6201-y.
52. Sakai, S.; Kotani, T.; Harada, R.; Goto, R.; Morita, T.; Bouissil, S.; Dubessay, P.; Pierre, G.; Michaud, P.; El Boutachfaiti, R.; et al. Development of Phenol-Grafted Polyglucuronic Acid and Its Application to Extrusion-Based Bioprinting Inks. *Carbohydr Polym*, **2022**, *277*, 118820, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118820.
53. Wang, L.; Xu, M.E.; Luo, L.; Zhou, Y.; Si, P. Iterative Feedback Bio-Printing-Derived Cell-Laden Hydrogel Scaffolds with Optimal Geometrical Fidelity and Cellular Controllability. *Sci Rep*, **2018**, *8*, 2802, doi:10.1038/s41598-018-21274-4.
54. Ng, W.L.; Yeong, W.Y.; Naing, M.W. Polyvinylpyrrolidone-Based Bio-Ink Improves Cell Viability and Homogeneity during Drop-on-Demand Printing. *Materials*, **2017**, *10*, 190, doi:10.3390/ma10020190.
55. Nejad, Z.M.; Zamanian, A.; Saeidifar, M.; Vanaei, H.R.; Amoli, M.S. 3D Bioprinting of Polycaprolactone-Based Scaffolds for Pulp-Dentin Regeneration: Investigation of Physicochemical and Biological Behavior. *Polymers (Basel)*, **2021**, *13*, 4442, doi:10.3390/polym13244442.
56. Raees, S.; Ullah, F.; Javed, F.; Akil, H.M.; Jadoon Khan, M.; Safdar, M.; Din, I.U.; Alotaibi, M.A.; Alharthi, A.I.; Bakht, M.A.; et al. Classification, Processing, and Applications of Bioink and 3D Bioprinting: A Detailed Review. *Int J Biol Macromol*, **2023**, *232*, 123476, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123476.
57. Liu, F.; Wang, X. Synthetic Polymers for Organ 3D Printing. *Polymers (Basel)*, **2020**, *12*(8), 1765, doi: 10.3390/polym12081765.
58. Meng, Y.; Cao, J.; Chen, Y.; Yu, Y.; Ye, L. 3D Printing of a Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nano-Composite Hydrogel as an Artificial Cartilage Replacement and the Improvement Mechanism of Printing Accuracy. *J Mater Chem B*, **2020**, *8*, 677–690, doi:10.1039/c9tb02278c.
59. Huang, C.T.; Kumar Shrestha, L.; Ariga, K.; Hsu, S.H. A Graphene-Polyurethane Composite Hydrogel as a Potential Bioink for 3D Bioprinting and Differentiation of Neural Stem Cells. *J Mater Chem B*, **2017**, *5*, 8854–8864, doi:10.1039/c7tb01594a.
60. Oropallo, W.; Piegl, L.A. Ten Challenges in 3D Printing. *Eng Comput*, **2016**, *32*, 135–

- 148, doi:10.1007/s00366-015-0407-0.
61. Fischetti, T.; Celikkin, N.; Contessi Negrini, N.; Farè, S.; Swieszkowski, W. Tripolyphosphate-Crosslinked Chitosan/Gelatin Biocomposite Ink for 3D Printing of Uniaxial Scaffolds. *Front Bioeng Biotechnol*, **2020**, *8*, 400, doi:10.3389/fbioe.2020.00400.
 62. Jin, Y.; Compaan, A.; Bhattacharjee, T.; Huang, Y. Granular Gel Support-Enabled Extrusion of Three-Dimensional Alginate and Cellular Structures. *Biofabrication*, **2016**, *8*, 025016, doi:10.1088/1758-5090/8/2/025016.
 63. Compaan, A.M.; Song, K.; Huang, Y. Gellan Fluid Gel as a Versatile Support Bath Material for Fluid Extrusion Bioprinting. *ACS Appl Mater Interfaces*, **2019**, *11*, 5714–5726, doi:10.1021/acsami.8b13792.
 64. Compaan, A.M.; Song, K.; Huang, Y. Gellan Fluid Gel as a Versatile Support Bath Material for Fluid Extrusion Bioprinting, **2019**, *11*, 5714-5726, doi:10.1021/acsami.8b13792.
 65. Brunel, L.G.; Hull, S.M.; Heilshorn, S.C. Engineered Assistive Materials for 3D Bioprinting: Support Baths and Sacrificial Inks. *Biofabrication*, **2022**, *14*(3), 032001 doi: 10.1088/1758-5090/ac6bbe.
 66. Allencherry, J.; Pradeep, N.; Shrivastava, R.; Joy, L.; Imbriacco, F.; Özel, T. Investigation of Hydrogel and Gelatin Bath Formulations for Extrusion-Based 3D Bioprinting Using Deep Learning. In Proceedings of the Procedia CIRP; Elsevier B.V., **2022**, *110*, 362–367, doi:10.1016/j.procir.2022.06.064.
 67. Bhattacharjee, T.; Zehnder, S.M.; Rowe, K.G.; Jain, S.; Nixon, R.M.; Sawyer, W.G.; Angelini, T.E. Writing in the Granular Gel Medium. *Sci Adv*, **2015**, *1*, 4–10, doi:10.1126/sciadv.1500655.
 68. Seymour, A.J.; Shin, S.; Heilshorn, S.C. 3D Printing of Microgel Scaffolds with Tunable Void Fraction to Promote Cell Infiltration. *Adv Healthc Mater*, **2021**, *10*, 2100644, doi:10.1002/adhm.202100644.
 69. Ishihara, S.; Kurosawa, H.; Haga, H. Stiffness-Modulation of Collagen Gels by Genipin-Crosslinking for Cell Culture. *Gels*, **2023**, *9*, 148, doi:10.3390/gels9020148.
 70. Ashworth, J.C.; Mehr, M.; Buxton, P.G.; Best, S.M.; Cameron, R.E. Optimizing Collagen Scaffold Architecture for Enhanced Periodontal Ligament Fibroblast

- Migration. *J Mater Sci Mater Med*, **2018**, *29*, 166, doi:10.1007/s10856-018-6175-9.
71. Zhao, Y.; Li, Y.; Mao, S.; Sun, W.; Yao, R. The Influence of Printing Parameters on Cell Survival Rate and Printability in Microextrusion-Based 3D Cell Printing Technology. *Biofabrication*, **2015**, *7*, 045002, doi:10.1088/1758-5090/7/4/045002.
72. Serex, L.; Bertsch, A.; Renaud, P. Microfluidics: A New Layer of Control for Extrusion-Based 3D Printing. *Micromachines (Basel)*, **2018**, *9*, 86, doi:10.3390/mi9020086.
73. Ober, T.J.; Foresti, D.; Lewis, J.A. Active Mixing of Complex Fluids at the Microscale. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**, *112*, 12293–12298, doi:10.1073/pnas.1509224112.
74. Miri, A.K.; Mirzaee, I.; Hassan, S.; Mesbah Oskui, S.; Nieto, D.; Khademhosseini, A.; Zhang, Y.S. Effective Bioprinting Resolution in Tissue Model Fabrication. *Lab Chip*, **2019**, *19*, 2019–2037, doi:10.1039/c8lc01037d.
75. Khan, A.; Rahman, K.; Kim, D.S.; Choi, K.H. Direct Printing of Copper Conductive Micro-Tracks by Multi-Nozzle Electrohydrodynamic Inkjet Printing Process. *J Mater Process Technol*, **2012**, *212*, 700–706, doi:10.1016/j.jmatprotec.2011.10.024.
76. Ravanbakhsh, H.; Karamzadeh, V.; Bao, G.; Mongeau, L.; Juncker, D.; Zhang, Y.S. Emerging Technologies in Multi-Material Bioprinting. *Advanced Materials*, **2021**, *33*, e2104730, doi: 10.1002/adma.202104730.
77. Cameron, T.; Naseri, E.; Maccallum, B.; Ahmadi, A. Development of a Disposable Single-Nozzle Printhead for 3D Bioprinting of Continuous Multi- Material Constructs. **2020**, *11*, 459, doi:10.3390/mi11050459.
78. Hardin, J.O.; Ober, T.J.; Valentine, A.D.; Lewis, J.A. Microfluidic Printheads for Multimaterial 3D Printing of Viscoelastic Inks. *Advanced Materials*, **2015**, *27*, 3279–3284, doi:10.1002/adma.201500222.
79. Armstrong, A.A.; Norato, J.; Alleyne, A.G.; Waggoner Johnson, A.J. Direct Process Feedback in Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Biofabrication*, **2020**, *12*, 015017, doi:10.1088/1758-5090/ab4d97.
80. Pakhomova, C.; Popov, D.; Maltsev, E.; Akhatov, I.; Pasko, A. Software for Bioprinting. *Int J Bioprint*, **2020**, *6*, 41–61, doi: 10.18063/ijb.v6i3.279.
81. Lee, J.; Kim, K.E.; Bang, S.; Noh, I.; Lee, C. A Desktop Multi-Material 3D Bio-Printing System with Open-Source Hardware and Software. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, **2017**, *18*, 605–612, doi:10.1007/s12541-

82. Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *Eur Polym J*, **2013**, *49*, 780–792, doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
83. Pal, K.; Bharti, D.; Sarkar, P.; Anis, A.; Kim, D.; Cha, R.; Maksymiuk, P.; Stachurski, P.; Jarz, M. Selected Applications of Chitosan Composites, *Int J Mol Sci*, **2021**, *22*, 10968, doi: 103390/ijms222010968
84. Matica, M.A.; Aachmann, F.L.; Tøndervik, A.; Sletta, H.; Ostafe, V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Mol Sci*, **2019**, *20*, 5889, doi: 10.3390/ijms20235889.
85. Chen, C.Y.; Chung, Y.C. Antibacterial Effect of Water-Soluble Chitosan on Representative Dental Pathogens *Streptococcus Mutans* and *Lactobacilli Brevis*. *Journal of Applied Oral Science*, **2012**, *20*, 620–627, doi:10.1590/S1678-77572012000600006.
86. Liu, Y.; Wong, C.; Chang, S.; Hsu, S. An Injectable , Self-Healing Phenol-Functionalized Chitosan Hydrogel with Fast Gelling Property and Visible Light-Crosslinking Capability for 3D Printing Institute of Polymer Science and Engineering , *Acta Biomater*, **2020**, *122*, 211-219, doi:10.1016/j.actbio.2020.12.051.
87. Sakai, S.; Kamei, H.; Mori, T.; Hotta, T.; Ohi, H.; Nakahata, M.; Taya, M. Visible Light-Induced Hydrogelation of an Alginate Derivative and Application to Stereolithographic Bioprinting Using a Visible Light Projector and Acid Red. *Biomacromolecules*, **2018**, *19*, 672–679, doi:10.1021/acs.biomac.7b01827.
88. Sakai, S.; Ohi, H.; Hotta, T.; Kamei, H.; Taya, M. Differentiation Potential of Human Adipose Stem Cells Bioprinted with Hyaluronic Acid/Gelatin-Based Bioink through Microextrusion and Visible Light-Initiated Crosslinking. *Biopolymers*, **2018**, *109*, e23080, doi:10.1002/bip.23080.
89. Khoshfetrat, A.B.; Khanmohammadi, M.; Sakai, S.; Taya, M. Enzymatically-Gellable Galactosylated Chitosan: Hydrogel Characteristics and Hepatic Cell Behavior. *Int J Biol Macromol*, **2016**, *92*, 892–899, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.003.
90. Sakai, S.; Yamada, Y.; Zenke, T.; Kawakami, K. Novel Chitosan Derivative Soluble at Neutral PH and In-Situ Gellable via Peroxidase-Catalyzed Enzymatic Reaction. *J Mater Chem*, **2009**, *19*, 230–235, doi:10.1039/b812086b.

91. Gan, Q.; Wang, T.; Cochrane, C.; McCarron, P. Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan-TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2005**, *44*, 65–73, doi:10.1016/j.colsurfb.2005.06.001.
92. Qin, D.; Zhang, A.; Wang, N.; Yao, Y.; Chen, X.; Liu, Y. Hydroxybutyl Chitosan/Oxidized Glucomannan Self-Healing Hydrogels as BMSCs-Derived Exosomes Carriers for Advanced Stretchable Wounds. *Appl Mater Today*, **2022**, *26*, 101342, doi:10.1016/j.apmt.2021.101342.
93. Heo, D.N.; Alioglu, M.A.; Wu, Y.; Ozbolat, V.; Ayan, B.; Dey, M.; Kang, Y.; Ozbolat, I.T. 3D Bioprinting of Carbohydrazide-Modified Gelatin into Microparticle-Suspended Oxidized Alginate for the Fabrication of Complex-Shaped Tissue Constructs. *ACS Appl Mater Interfaces*, **2020**, *12*, 20295–20306, doi:10.1021/acsami.0c05096.
94. Puertas-Bartolomé, M.; Włodarczyk-Biegun, M.K.; Del Campo, A.; Vázquez-Lasa, B.; Román, J.S. 3d Printing of a Reactive Hydrogel Bio-Ink Using a Static Mixing Tool. *Polymers (Basel)*, **2020**, *12*, 1–17, doi:10.3390/polym12091986.
95. Wu, J.; Mao, Z.; Tan, H.; Han, L.; Ren, T.; Gao, C. Gradient Biomaterials and Their Influences on Cell Migration. *Interface Focus*, **2012**, *2*, 337–355, doi:10.1098/rsfs.2011.0124.
96. Chen, Z.; Luo, X.; Zhao, X.; Yang, M.; Wen, C. Label-Free Cell Sorting Strategies via Biophysical and Biochemical Gradients. *J Orthop Translat*, **2019**, *17*, 55–63, doi:10.1016/j.jot.2019.01.005.
97. Chen, Z.; Liu, P.; Zhao, X.; Huang, L.; Xiao, Y.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Hao, N. Sharp-Edge Acoustic Microfluidics: Principles, Structures, and Applications. *Appl Mater Today*, **2021**, *25*, 101239, doi: 10.1016/j.apmt.2021.101239.
98. Conde, A.J.; Keraite, I.; Ongaro, A.E.; Kersaudy-Kerhoas, M. Versatile Hybrid Acoustic Micromixer with Demonstration of Circulating Cell-Free DNA Extraction from Sub-Ml Plasma Samples. *Lab Chip*, **2020**, *20*, 741–748, doi:10.1039/c9lc01130g.
99. Sritharan, K.; Strobl, C.J.; Schneider, M.F.; Wixforth, A.; Guttenberg, Z. Acoustic Mixing at Low Reynold's Numbers. *Appl Phys Lett*, **2006**, *88*, 1–3, doi:10.1063/1.2171482.
100. Ahmed, D.; Mao, X.; Shi, J.; Juluri, B.K.; Huang, T.J. A Millisecond Micromixer via Single-Bubble-Based Acoustic Streaming. *Lab Chip*, **2009**, *9*, 2738–2741,

doi:10.1039/b903687c.

101. Tang, Q.; Liang, F.; Huang, L.; Zhao, P.; Wang, W. On-Chip Simultaneous Rotation of Large-Scale Cells by Acoustically Oscillating Bubble Array. *Biomed Microdevices*, **2020**, *22*, 13, doi:10.1007/s10544-020-0470-1.
102. Gungor-Ozkerim, P.S.; Inci, I.; Zhang, Y.S.; Khademhosseini, A.; Dokmeci, M.R. Bioinks for 3D Bioprinting: An Overview. *Biomater Sci*, **2018**, *6*, 915–946, doi:10.1039/c7bm00765e.
103. Murphy, S. V.; Atala, A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nat Biotechnol*, **2014**, *32*, 773–785, doi:10.1038/nbt.2958.
104. Gillispie, G.; Prim, P.; Copus, J.; Fisher, J.; Mikos, A.G.; Yoo, J.J.; Atala, A.; Lee, S.J. Assessment Methodologies for Extrusion-Based Bioink Printability. *Biofabrication*, **2020**, *12*, 022003, doi:10.1088/1758-5090/ab6f0d.
105. Li, X.; Liu, B.; Pei, B.; Chen, J.; Zhou, D.; Peng, J.; Zhang, X.; Jia, W.; Xu, T. Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chem Rev*, **2020**, *120*, 10793–10833, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00008.
106. Xu, W.; Molino, B.Z.; Cheng, F.; Molino, P.J.; Yue, Z.; Su, D.; Wang, X.; Willför, S.; Xu, C.; Wallace, G.G. On Low-Concentration Inks Formulated by Nanocellulose Assisted with Gelatin Methacrylate (GelMA) for 3D Printing toward Wound Healing Application. *ACS Appl Mater Interfaces*, **2019**, *11*, 8838–8848, doi:10.1021/acsami.8b21268.
107. Jessop, Z.M.; Al-Sabah, A.; Gao, N.; Kyle, S.; Thomas, B.; Badiei, N.; Hawkins, K.; Whitaker, I.S. Printability of Pulp Derived Crystal, Fibril and Blend Nanocellulose-Alginate Bioinks for Extrusion 3D Bioprinting. *Biofabrication*, **2019**, *11*, 045006, doi:10.1088/1758-5090/ab0631.
108. Khalil, S.; Sun, W. Bioprinting Endothelial Cells with Alginate for 3D Tissue Constructs. *J Biomech Eng*, **2009**, *131*, 1–8, doi:10.1115/1.3128729.
109. Melchels, F.P.W.; Feijen, J.; Grijpma, D.W. A Review on Stereolithography and Its Applications in Biomedical Engineering. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 6121–6130, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.050.
110. Sakai, S.; Hirose, K.; Taguchi, K.; Ogushi, Y.; Kawakami, K. An Injectable, in Situ Enzymatically Gellable, Gelatin Derivative for Drug Delivery and Tissue Engineering.

Biomaterials, **2009**, *30*, 3371–3377, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.030.

111. Lim, K.S.; Ramaswamy, Y.; Roberts, J.J.; Alves, M.H.; Poole-Warren, L.A.; Martens, P.J. Promoting Cell Survival and Proliferation in Degradable Poly(Vinyl Alcohol)-Tyramine Hydrogels. *Macromol Biosci*, **2015**, *15*, 1423–1432, doi:10.1002/mabi.201500121.
112. Hong, B.M.; Park, S.A.; Park, W.H. Effect of Photoinitiator on Chain Degradation of Hyaluronic Acid. *Biomater Res*, **2019**, *23*, 19–26, doi:10.1186/s40824-019-0170-1.
113. Zhang, J.; Allardyce, B.J.; Rajkhowa, R.; Zhao, Y.; Dilley, R.J.; Redmond, S.L.; Wang, X.; Liu, X. 3D Printing of Silk Particle-Reinforced Chitosan Hydrogel Structures and Their Properties. **2018**, *4*, 3036-3046, doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00804.
114. Nishida, H.; Tokiwa, Y. Effects of Higher-Order Structure of Poly(3-Hydroxybutyrate) on Its Biodegradation. II. Effects of Crystal Structure on Microbial Degradation. *J Environ Polym Degrad*, **1993**, *1*, 65–80, doi:10.1007/BF01457654.
115. Lei, M.; Wang, X. Biodegradable Polymers and Stem Cells for Bioprinting. *Molecules*, **2016**, *21*, 1–14, doi:10.3390/molecules21050539.
116. Zheng, K.; Xiao, S.; Li, W.; Wang, W.; Chen, H.; Yang, F.; Qin, C. Chitosan-Acorn Starch-Eugenol Edible Film: Physico-Chemical, Barrier, Antimicrobial, Antioxidant and Structural Properties. *Int J Biol Macromol*, **2019**, *135*, 344–352, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.151.
117. Altiok, D.; Altiok, E.; Tihminlioglu, F. Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications. *J Mater Sci Mater Med*, **2010**, *21*, 2227–2236, doi:10.1007/s10856-010-4065-x.
118. Liu, T.; Wang, J.; Chi, F.; Tan, Z.; Liu, L. Development and Characterization of Novel Active Chitosan Films Containing Fennel and Peppermint Essential Oils. *Coatings*, **2020**, *10*, 1–10, doi:10.3390/coatings10100936.
119. Wang, H.; Qian, J.; Ding, F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *J Agric Food Chem*, **2018**, *66*, 395–413, doi:10.1021/acs.jafc.7b04528.
120. Sakai, S.; Komatani, K.; Taya, M. Glucose-Triggered Co-Enzymatic Hydrogelation of Aqueous Polymer Solutions. *RSC Adv*, **2012**, *2*, 1502–1507, doi:10.1039/c1ra01060c.
121. Sarkar, S.D.; Farrugia, B.L.; Dargaville, T.R.; Dhara, S. Physico-Chemical/Biological

- Properties of Tripolyphosphate Cross-Linked Chitosan Based Nanofibers. *Materials Science and Engineering C*, **2013**, *33*, 1446–1454, doi:10.1016/j.msec.2012.12.066.
122. Lohrasbi, S.; Mirzaei, E.; Karimizade, A.; Takallu, S.; Rezaei, A. Collagen/Cellulose Nanofiber Hydrogel Scaffold: Physical, Mechanical and Cell Biocompatibility Properties. *Cellulose*, **2020**, *27*, 927–940, doi:10.1007/s10570-019-02841-y.
 123. Wahid, M.H.; Eroglu, E.; LaVars, S.M.; Newton, K.; Gibson, C.T.; Stroehner, U.H.; Chen, X.; Boulos, R.A.; Raston, C.L.; Harmer, S.L. Microencapsulation of Bacterial Strains in Graphene Oxide Nano-Sheets Using Vortex Fluidics. *RSC Adv*, **2015**, *5*, 37424–37430, doi:10.1039/c5ra04415d.
 124. Itoi, D.; Altio, E.; Tihminlioglu, F. Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications. *J Mater Sci Mater Med*, **2010**, *21*, 2227–2236, doi:10.1007/s10856-010-4065-x.
 125. Martins, A.F.; de Oliveira, D.M.; Pereira, A.G.B.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Chitosan/TPP Microparticles Obtained by Microemulsion Method Applied in Controlled Release of Heparin. *Int J Biol Macromol*, **2012**, *51*, 1127–1133, doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.032.
 126. Queiroz, M.F.; Melo, K.R.T.; Sabry, D.A.; Sasaki, G.L.; Rocha, H.A.O. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Mar Drugs*, **2015**, *13*, 141–158, doi:10.3390/md13010141.
 127. Khoshfetrat, A.B.; Khanmohammadi, M.; Sakai, S.; Taya, M. Enzymatically-Gellable Galactosylated Chitosan: Hydrogel Characteristics and Hepatic Cell Behavior. *Int J Biol Macromol*, **2016**, *92*, 892–899, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.08.003.
 128. Tang, H.R.; Covington, A.D.; Hancock, R.A. Structure-Activity Relationships in the Hydrophobic Interactions of Polyphenols with Cellulose and Collagen. *Biopolymers* **2003**, *70*, 403–413, doi:10.1002/bip.10499.
 129. Stefani, R. Computational Study of Natural Phenolic Acid Solubility and Their Interactions with Chitosan., doi:10.13140/RG.2.1.2055.9123.
 130. Ahmad Shariff, S.H.; Daik, R.; Haris, M.S.; Ismail, M.W. Hydrophobic Drug Carrier from Polycaprolactone-b-Poly(Ethylene Glycol) Star-Shaped Polymers Hydrogel Blend as Potential for Wound Healing Application. *Polymers (Basel)*, **2023**, *15*, 2072, doi:10.3390/polym15092072.

131. Cui, P.F.; Zhuang, W.R.; Hu, X.; Xing, L.; Yu, R.Y.; Qiao, J. Bin; He, Y.J.; Li, F.; Ling, D.; Jiang, H.L. A New Strategy for Hydrophobic Drug Delivery Using a Hydrophilic Polymer Equipped with Stacking Units. *Chemical Communications*, **2018**, *54*, 8218–8221, doi:10.1039/c8cc04363a.
132. Cheng, D.; Liu, Y.; Yang, G.; Zhang, A. Water- and Fertilizer-Integrated Hydrogel Derived from the Polymerization of Acrylic Acid and Urea as a Slow-Release N Fertilizer and Water Retention in Agriculture. *J Agric Food Chem*, **2018**, *66*, 5762–5769, doi:10.1021/acs.jafc.8b00872.
133. Liu, T.Y.; Chen, S.Y.; Lin, Y.L.; Liu, D.M. Synthesis and Characterization of Amphiphatic Carboxymethyl-Hexanoyl Chitosan Hydrogel: Water-Retention Ability and Drug Encapsulation. *Langmuir*, **2006**, *22*, 9740–9745, doi:10.1021/la061471n.
134. Nasution, T.I.; Asrosa, R.; Nainggolan, I.; Balyan, M.; Indah, R.; Wahyudi, A. Sodium Tripolyphosphate Cross-Linked Chitosan Based Sensor for Enhacing Sensing Properties towards Acetone. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, **2018**, *309*, 012083, doi:10.1088/1757-899X/309/1/012083.
135. Bhumkar, R.D.; Pokharkar, V.B. Studies on Effect of PH on Cross-Linking of Chitosan with Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, **2006**, *7*, 1–7, doi:10.1208/pt070250.
136. Wordofa, D.N.; Walker, S.L.; Liu, H. Sulfate Radical-Induced Disinfection of Pathogenic Escherichia Coli O157:H7 via Iron-Activated Persulfate. *Environ Sci Technol Lett*, **2017**, *4*, 154–160, doi:10.1021/acs.estlett.7b00035.
137. Knight, D.K.; Shapka, S.N.; Amsden, B.G. Structure, Depolymerization, and Cytocompatibility Evaluation of Glycol Chitosan. *J Biomed Mater Res A*, **2007**, *83*, 787–798, doi:10.1002/jbm.a.31430.
138. Heinrich, M.A.; Liu, W.; Jimenez, A.; Yang, J.; Akpek, A.; Liu, X.; Pi, Q.; Mu, X.; Hu, N.; Schiffelers, R.M.; et al. 3D Bioprinting: From Benches to Translational Applications. *Small*, **2019**, *15*, 1–47, doi:10.1002/smll.201805510.
139. Korkiatithaweechai, S.; Umsarika, P.; Praphairaksit, N.; Muangsin, N. Controlled Release of Diclofenac from Matrix Polymer of Chitosan and Oxidized Konjac Glucomannan. *Mar Drugs*, **2011**, *9*, 1649–1663, doi:10.3390/md9091649.
140. Luo, H.; Xiong, G.; Hu, D.; Ren, K.; Yao, F.; Zhu, Y.; Gao, C.; Wan, Y. Characterization of TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose Scaffolds for Tissue

- Engineering Applications. *Mater Chem Phys*, **2013**, *143*, 373–379, doi:10.1016/j.matchemphys.2013.09.012.
141. Liu, C.; Li, J.; Li, K.; Xie, C.; Liu, J. Oxidized Konjac Glucomannan-Cassava Starch and Sucrose Esters as Novel Excipients for Sustained-Release Matrix Tablets. *Int J Biol Macromol*, **2020**, *156*, 1045–1052, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.146.
 142. Hidaka, M.; Kojima, M.; Nakahata, M.; Sakai, S. Visible Light-Curable Chitosan Ink for Extrusion-Based and Vat Polymerization-Based 3d Bioprintings. *Polymers (Basel)* **2021**, *13*, 1382, doi:10.3390/polym13091382.
 143. Li, Z.; Zhang, L.; Mao, C.; Song, Z.; Li, X.; Liu, C. Preparation and Characterization of Konjac Glucomannan and Gum Arabic Composite Gel. *Int J Biol Macromol*, **2021**, *183*, 2121–2130, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.196.
 144. Fan, J.; Wang, K.; Liu, M.; He, Z. In Vitro Evaluations of Konjac Glucomannan and Xanthan Gum Mixture as the Sustained Release Material of Matrix Tablet. *Carbohydr Polym*, **2008**, *73*, 241–247, doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.027.
 145. Jiang, Y.; Reddy, C.K.; Huang, K.; Chen, L.; Xu, B. Hydrocolloidal Properties of Flaxseed Gum/Konjac Glucomannan Compound Gel. *Int J Biol Macromol*, **2019**, *133*, 1156–1163, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.187.
 146. Chua, M.; Chan, K.; Hocking, T.J.; Williams, P.A.; Perry, C.J.; Baldwin, T.C. Methodologies for the Extraction and Analysis of Konjac Glucomannan from Corms of Amorphophallus Konjac K. Koch. *Carbohydr Polym*, **2012**, *87*, 2202–2210, doi:10.1016/j.carbpol.2011.10.053.
 147. Muhammad, M.; Willems, C.; Rodríguez - fernández, J.; Gallego - Ferrer, G.; Groth, T. Synthesis and Characterization of Oxidized Polysaccharides for in Situ Forming Hydrogels. *Biomolecules*, **2020**, *10*, 1–18, doi:10.3390/biom10081185.
 148. Peng, X.; Li, L.; Xing, J.; Cheng, C.; Hu, M.; Luo, Y.; Shi, S.; Liu, Y.; Cui, Z.; Yu, X. Cross-Linking Porcine Peritoneum by Oxidized Konjac Glucomannan: A Novel Method to Improve the Properties of Cardiovascular Substitute Material. *Collagen and leather*, **2023**, *5*, 5, doi:10.1186/s42825-023-00114-w.
 149. Zhou, Y.; Liao, S.; Chu, Y.; Yuan, B.; Tao, X.; Hu, X.; Wang, Y. An Injectable Bioink with Rapid Prototyping in the Air and In-Situ Mild Polymerization for 3D Bioprinting. *Biofabrication*, **2021**, *13*, 045026, doi:10.1088/1758-5090/ac23e4.

150. Birman, T.; Seliktar, D. Injectability of Biosynthetic Hydrogels: Consideration for Minimally Invasive Surgical Procedures and 3D Bioprinting. *Adv Funct Mater*, **2021**, *31*, 2100628, doi: 10.1002/adfm.202100628.
151. Li, S.; Pei, M.; Wan, T.; Yang, H.; Gu, S.; Tao, Y.; Liu, X.; Zhou, Y.; Xu, W.; Xiao, P. Self-Healing Hyaluronic Acid Hydrogels Based on Dynamic Schiff Base Linkages as Biomaterials. *Carbohydr Polym*, **2020**, *250*, doi:10.1016/j.carbpol.2020.116922.
152. Saha, D.; Talukdar, D.; Pal, I.; Majumdar, S.; Lepcha, G.; Sadhu, S.; Yatirajula, S.K.; Das, G.; Dey, B. Mechanically Flexible Self-Healing Mg(II)-Metallogel: Approach of Triggering the ROS-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Langmuir*, **2024**, *37*, 19816-19829, doi:10.1021/acs.langmuir.4c02627.
153. Chen, H.; Fei, F.; Li, X.; Nie, Z.; Zhou, D.; Liu, L.; Zhang, J.; Zhang, H.; Fei, Z.; Xu, T. A Facile, Versatile Hydrogel Bioink for 3D Bioprinting Benefits Long-Term Subaqueous Fidelity, Cell Viability and Proliferation. *Regen Biomater*, **2021**, *8*, rbab026, doi:10.1093/rb/rbab026.
154. Ikeda, R.; Tanaka, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *A New Crosslinking Method of Vinyl Polymers Having a Phenol Moiety via Oxidative Coupling*; **2001**, *33*, 959–961, doi: 10.1295/polymj.33.959
155. Kripotou, S.; Stefanopoulou, E.; Culebras-Martínez, M.; Morales-Román, R.M.; Gallego Ferrer, G.; Kyritsis, A. Water Dynamics and Thermal Properties of Tyramine-Modified Hyaluronic Acid - Gelatin Hydrogels. *Polymer (Guildf)*, **2019**, *178*, 121598, doi:10.1016/j.polymer.2019.121598.
156. Szymańska, E.; Winnicka, K. Stability of Chitosan - A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Mar Drugs*, **2015**, *13*, 1819–1846, doi: 10.3390/md13041819.
157. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review. *J Adv Res*, **2015**, *6*, 105–121, doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
158. Filimonova, E.; Bergmann, T.; Zhao, S.; Dyatlov, V.A.; Malfait, W.J.; Wu, T. Effect of Polymer Concentration and Cross-Linking Density on the Microstructure and Properties of Polyimide Aerogels. *J Solgel Sci Technol*, **2024**, *110*, 747–759, doi:10.1007/s10971-024-06390-0.
159. Xu, H.; Matysiak, S. Effect of PH on Chitosan Hydrogel Polymer Network Structure. *Chemical Communications*, **2017**, *53*, 7373–7376, doi:10.1039/c7cc01826f.

160. Gaohua, L.; Miao, X.; Dou, L. Crosstalk of Physiological PH and Chemical PKa under the Umbrella of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **2021**, *17*, 1103–1124, doi: 10.1080/17425255.2021.1951223.
161. Dettin, M.; Zamuner, A.; Roso, M.; Iucci, G.; Samouillan, V.; Danesin, R.; Modesti, M.; Conconi, M.T. Facile and Selective Covalent Grafting of an RGD-Peptide to Electrospun Scaffolds Improves HUVEC Adhesion. *Journal of Peptide Science*, **2015**, *21*, 786–795, doi:10.1002/psc.2808.
162. Sivaraman, K.; Muthukumar, K.; Shanthi, C. Adhesion and Proliferation Properties of Type I Collagen-Derived Peptide for Possible Use in Skin Tissue Engineering Application. *Cell Biol Int*, **2022**, *46*, 391–402, doi:10.1002/cbin.11737.
163. Ke, C.L.; Deng, F.S.; Chuang, C.Y.; Lin, C.H. Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers (Basel)*, **2021**, *13*, 904. doi: 10.3390/polym13060904
164. Singh, R.P.; Kumari, P.; Reddy, C.R.K. Antimicrobial Compounds from Seaweeds-Associated Bacteria and Fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2015**, *99*, 1571–1586, doi:10.1007/s00253-014-6334-y.
165. McCarthy, R.R.; Ullah, M.W.; Pei, E.; Yang, G. Antimicrobial Inks: The Anti-Infective Applications of Bioprinted Bacterial Polysaccharides. *Trends Biotechnol*, **2019**, *37*, 1155–1159, doi:10.1016/j.tibtech.2019.05.004.
166. Liu, Z.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Wang, Y. 3D Printing: Printing Precision and Application in Food Sector. *Trends Food Sci Technol*, **2017**, *69*, 83–94, doi:10.1016/j.tifs.2017.08.018.
167. Narayananamurthy, V.; Jeroish, Z.E.; Bhuvaneshwari, K.S.; Bayat, P.; Premkumar, R.; Samsuri, F.; Yusoff, M.M. Advances in Passively Driven Microfluidics and Lab-on-Chip Devices: A Comprehensive Literature Review and Patent Analysis. *RSC Adv*, **2020**, *10*, 11652–11680, doi:10.1039/d0ra00263a.
168. Yin, S. *Recent Advances of the Development and Optimization Design of Passive Microfluidic Mixers*, **2023**, *37*, 2022, doi: 10.54097/hset.v37i.6076
169. Liao, Y.; Mechulam, Y.; Lassalle-Kaiser, B. A Millisecond Passive Micromixer with Low Flow Rate, Low Sample Consumption and Easy Fabrication. *Sci Rep*, **2021**, *11*, 1–14, doi:10.1038/s41598-021-99471-x.

170. Luo, X.; Cheng, Y.; Zhang, W.; Li, K.; Wang, P.; Zhao, W. International Journal of Heat and Mass Transfer Mixing Performance Analysis of the Novel Passive Micromixer Designed by Applying Fuzzy Grey Relational Analysis. *2021*, *178*, 121638, doi:10.1016/j.ijheatmasstransfer.2021.121638.
171. Golobic, A.M.; Durban, M.D.; Fisher, S.E.; Grapes, M.D.; Ortega, J.M.; Spadaccini, C.M.; Duoss, E.B.; Gash, A.E.; Sullivan, K.T. Active Mixing of Reactive Materials for 3D Printing. *Adv Eng Mater*, *2019*, *1900147*, 1–7, doi:10.1002/adem.201900147.
172. Nair, K.; Gandhi, M.; Khalil, S.; Yan, K.C.; Marcolongo, M.; Barbee, K.; Sun, W. Characterization of Cell Viability during Bioprinting Processes. *Biotechnol J*, *2009*, *4*, 1168–1177, doi:10.1002/biot.200900004.
173. Dao, M.; Suresh, S.; Huang, T.J.; Li, P.; Mao, Z.; Peng, Z.; Zhou, L.; Chen, Y.; Huang, P.H.; Truica, C.I.; et al. Acoustic Separation of Circulating Tumor Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *2015*, *112*, 4970–4975, doi:10.1073/pnas.1504484112.
174. Chen, Z.; Shen, L.; Zhao, X.; Chen, H.; Xiao, Y.; Zhang, Y.; Yang, X.; Zhang, J.; Wei, J.; Hao, N. Acoustofluidic Micromixers: From Rational Design to Lab-on-a-Chip Applications. *Appl Mater Today*, *2022*, *26*, 101356, doi: 10.1016/j.apmt.2021.101356
175. Hao, N.; Liu, P.; Bachman, H.; Pei, Z.; Zhang, P.; Rufo, J.; Wang, Z.; Zhao, S.; Huang, T.J. Acoustofluidics-Assisted Engineering of Multifunctional Three-Dimensional Zinc Oxide Nanoarrays. *ACS Nano*, *2020*, *14*, 6150–6163, doi:10.1021/acsnano.0c02145.
176. Xu, H.; Han, C.; Liu, S.; Hao, X.; Rao, Y.; Gong, Z.; Sun, Z. Sodium Alginate-Chitosan Hydrogel-Based Soft Ionic Artificial Muscle with Different Moisture Content. *Ionics (Kiel)*, *2020*, *26*, 6371–6378, doi:10.1007/s11581-020-03773-5.
177. Uenoyama, A.; Miyata, M. *Gliding Ghosts of Mycoplasma Mobile*; *2005*, *102*(36), 12754-8. doi: 10.1073/pnas.0506114102.
178. Cai, G.; Xue, L.; Zhang, H.; Lin, J. A Review on Micromixers. *Micromachines (Basel)*, *2017*, *8*, 274, doi: 10.3390/mi8090274.
179. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, *2015*, *111*, A3.B.1-A3.B.3, doi:10.1002/0471142735.ima03bs111.
180. Okita, K.; Matsumoto, Y.; Takagi, S. Propagation of Pressure Waves, Caused by A Thermal Shock, in Liquid Metals Containing Gas Bubbles. In Proceedings of the Proceedings of the American Society of Mechanical Engineers Fluids Engineering

Division Summer Conference, **2005**, *2*, 575–580.

181. Hessel, V.; Löwe, H.; Schönfeld, F. Micromixers - A Review on Passive and Active Mixing Principles. In Proceedings of the Chemical Engineering Science, **2005**, *60*, 2479–2501, doi: 10.1016/j.ces.2004.11.033.
182. Shallan, A.I.; Smejkal, P.; Corban, M.; Guijt, R.M.; Breadmore, M.C. Cost-Effective Three-Dimensional Printing of Visibly Transparent Microchips within Minutes. *Anal Chem*, **2014**, *86*, 3124–3130, doi:10.1021/ac4041857.
183. Liao, M.; Liao, H.; Ye, J.; Wan, P.; Zhang, L. Polyvinyl Alcohol-Stabilized Liquid Metal Hydrogel for Wearable Transient Epidermal Sensors. *ACS Appl Mater Interfaces*, **2019**, *11*, 47358–47364, doi:10.1021/acsami.9b16675.
184. Ortega, J.M.; Golobic, M.; Sain, J.D.; Lenhardt, J.M.; Wu, A.S.; Fisher, S.E.; Perez Perez, L.X.; Jaycox, A.W.; Smay, J.E.; Duoss, E.B. Active Mixing of Disparate Inks for Multimaterial 3D Printing. *Adv Mater Technol*, **2019**, *4*, 1800717, doi:10.1002/admt.201800717.
185. Munaz, A.; Kamble, H.; Shiddiky, M.J.A.; Nguyen, N.T. Magnetofluidic Micromixer Based on a Complex Rotating Magnetic Field. *RSC Adv*, **2017**, *7*, 52465–52474, doi:10.1039/c7ra08073e.
186. Tasoglu, S.; Demirci, U. Bioprinting for Stem Cell Research. *Trends Biotechnol* **2013**, *31*, 10–19, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.005.
187. Figueroa, B.; Xu, F.X.; Hu, R.; Men, S.; Fu, D. Quantitative Imaging of Intracellular Density with Ratiometric Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, **2022**, *126*, 7595–7603, doi:10.1021/acs.jpcb.2c04355.
188. Hecht, V.C.; Sullivan, L.B.; Kimmerling, R.J.; Kim, D.H.; Hosios, A.M.; Stockslager, M.A.; Stevens, M.M.; Kang, J.H.; Wirtz, D.; Vander Heiden, M.G.; et al. Biophysical Changes Reduce Energetic Demand in Growth Factor-Deprived Lymphocytes. *Journal of Cell Biology*, **2016**, *212*, 439–447, doi:10.1083/jcb.201506118.
189. Malekpour, A.; Chen, X. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *J Funct Biomater*, **2022**, *13*(2):40. doi: 10.3390/jfb13020040.
190. Capecchi, E.; Piccinino, D.; Bizzarri, B.M.; Avitabile, D.; Pelosi, C.; Colantonio, C.; Calabrò, G.; Saladino, R. Enzyme-Lignin Nanocapsules Are Sustainable Catalysts and

- Vehicles for the Preparation of Unique Polyvalent Bioinks. *Biomacromolecules*, **2019**, *20*, 1975–1988, doi:10.1021/acs.biomac.9b00198.
191. Chawla, S.; Midha, S.; Sharma, A.; Ghosh, S. Silk-Based Bioinks for 3D Bioprinting. *Adv Healthc Mater*, **2018**, *7*, e1701204, doi: 10.1002/adhm.201701204.
 192. Deng, D.; Zeng, L.; Sun, W. A Review on Flow Boiling Enhancement and Fabrication of Enhanced Microchannels of Microchannel Heat Sinks. *Int J Heat Mass Transf*, **2021**, *175*, 121332, doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2021.121332
 193. Surdo, S.; Geven, M.A.; Donno, R.; Diaspro, A.; Tirelli, N.; Duocastella, M. Cavitation-Assisted Micromixing for Polymeric Nanoparticle Generation.; MDPI AG, December 10, **2018**; p. 942, doi: 10.3390/proceedings2130942
 194. Sodupe-Ortega, E.; Sanz-Garcia, A.; Pernia-Espinoza, A.; Escobedo-Lucea, C. Accurate Calibration in Multi-Material 3D Bioprinting for Tissue Engineering. *Materials*, **2018**, *11*, 1–19, doi:10.3390/ma11081402.
 195. Skylar-Scott, M.A.; Mueller, J.; Visser, C.W.; Lewis, J.A. Voxelated Soft Matter via Multimaterial Multinozzle 3D Printing. *Nature*, **2019**, *575*, 330–335, doi:10.1038/s41586-019-1736-8.
 196. Hidaka, M.; Kojima, M.; Zhang, C.; Okano, Y.; Sakai, S. Experimental and Numerical Approaches for Optimizing Conjunction Area Design to Enhance Switching Efficiency in Single-Nozzle Multi-Ink Bioprinting Systems. *Int J Bioprint*, **2024**, *10*, 4091, doi:10.36922/ijb.4091.
 197. Samimi Gharaie, S.; Habibi, S.; Nazockdast, H. Fabrication and Characterization of Chitosan/Gelatin/Thermoplastic Polyurethane Blend Nanofibers. *Journal of Textiles and Fibrous Materials*, **2018**, *1*, 251522111876932, doi:10.1177/2515221118769324.
 198. Tamo, A.K.; Tran, T.A.; Doench, I.; Jahangir, S.; Lall, A.; David, L.; Peniche-Covas, C.; Walther, A.; Osorio-Madrazo, A. 3D Printing of Cellulase-Laden Cellulose Nanofiber/Chitosan Hydrogel Composites: Towards Tissue Engineering Functional Biomaterials with Enzyme-Mediated Biodegradation. *Materials* **2022**, *15*, 6039, doi:10.3390/ma15176039.
 199. Sakai, S.; Yamamoto, S.; Hirami, R.; Hidaka, M.; Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, K. Enzymatically Gellable Chitosan Inks with Enhanced Printability by Chitosan Nanofibers for 3D Printing of Wound Dressings. *Eur Polym J*, **2024**, *210*, 112960, doi:10.1016/j.eurpolymj.2024.112960.

業績欄

投稿論文

1. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Masaki Nakahata, Shinji Sakai, Visible Light-Curable Chitosan Ink for Extrusion-Based and Vat Polymerization-Based 3D Bioprintings, *Polymers*, 13(9), 1382, 2021
2. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Shinji Sakai, Cedric Dellatre, Characterization of Chitosan Hydrogels Obtained through Phenol and Tripolyphosphate Anionic Crosslinking, *Polymers*, 16(9), 1274, 2024
3. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Shinji Sakai, Micromixer driven by Bubble-Induced Acoustic Microstreaming for Multi-ink 3D Bioprinting, *Lab on a chip*, 24, 4571, 2024

関連論文

1. Shinji Sakai, Shota Yamamoto, Ryo Hirami, Mitsuyuki Hidaka, Kelum Elvitagala, Enzymatically Gellable Chitosan Inks with Enhanced Printability by Chitosan Nanofibers for 3D Printing of Wound Dressings, *European Polymer Journal*, 210(32), 112960, 2024
2. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Colin Zhang, Yasunori Okano, Shinji Sakai, Experimental and Numerical Approaches for Optimizing Conjunction Area Design to Enhance Switching Efficiency in Single-nozzle Multi-ink Bioprinting Systems, *International Journal of Bioprinting*, 10(5), 4091

国際学会

1. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Masaki Nakahata, Shinji Sakai, Poster, 3D Printing of Cell-laden ,Hydrogels Through Visible Light-initiated Crosslinking, Pacific Polymer Conference, December, 2019, Singapore
2. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Masaki Nakahata, Shinji Sakai, Poster, Photocurable Chitosan Ink with Rapid Gelation for Extrusion-based/Vat polymerization-based Printings, Material Research Meeting, December, 2022, Yokohama
3. Mitsuyuki Hidaka, Masaru Kojima, Ikki Horiguchi, Shinji Sakai, Poster, Development of Bubble-induced Acoustic Micromixer for 3D Bioprinting Application, Biointerface international conference, August, 2024, Switzerland

国内学会

1. 日高 光将、小嶋 勝、中畠 雅樹、境 慎司、ポスター発表、多糖類のフェノール誘導体を基盤とした組織構築を目指したバイオプリンティング技術の開発, ROBOMECH, 2020 年 5 月、オンライン
2. 日高 光将、小嶋 勝、境 慎司、口頭発表、高度な細胞培養足場構築を目的としたマルチマテリアル 3D バイオプリンティング用単一ノズルの開発、化学工学会 第 53 回秋季大会、2022 年 9 月、オンライン
3. 日高 光将、小嶋 勝、堀口 一樹、境 慎司、口頭発表、バイオインク混合のための 3D プリンタ用バブルマイクロミキサの開発、化学工学会 第 89 回年会、2024 年 3 月、大阪

謝辞

著者は、博士論文執筆にあたり謝辞を以下に捧げる。

学位習得にあたり熱心な指導をされ、研究者のるべき姿を示した境慎司教授に。

日頃よりアドバイスをいただき、また肩を押していただいた小嶋勝准教授に。

研究室の運営、アドバイスをされた堀口一樹助教授、中畠雅樹助教授に。

建設的な議論・アドバイスをされ、また本博士論文の審査をされた岡野泰則教授に。

本博士論文の審査をされた西山憲和教授に。

学会・出張等の必要な事務処理を滞りなく行っていただいた薺田雅子秘書官、渋川真理子秘書官に。

フランスの留学プロジェクトを支援・円滑に進めていただいたフランス政府大使館に、そしてプロジェクトを指導された Cedric Delattre 准教授に。

研究費および研究奨励費を提供・支援していただいた次世代研究者挑戦的研究プログラムと、学術振興会に。

考えることを教えてくれた我が母に。

度胸を教えてくれた我が父に。

忍耐と寛容を示してくれた最良の友に。

そして、学問を希求することが何たるかを示した

“PHILOSOPHIA SAPIENTIA AMOR EST ET ADFECTATIO”

という言葉を紡いだ古来の人々と、これを現代にまで受け継いだ人々に。

Gratiarum Oblationes

Auctor sequentes gratias in hoc doctorali opere scribendo dedicat:

Professori Shinji Sakai, qui consilium assiduum dedit ad gradum perficiendum et exemplum veri investigantis praebuit.

Professori Associato Masaru Kojima, qui consilia pretiosa praebuit atque incitationem ad progrediendum dedit.

Professoribus Assistantibus Ikki Horiguchi et Masaki Nakahata, pro consiliis suis et administratione laboratoria.

Professori Yasunori Okano, qui disputationes constructivas et consilia cogitata praebuit atque hoc doctorale opus recensuit.

Professori Norikazu Nishiyama, qui hoc doctorale opus recensuit.

Membris Laboratorii Sakai

Scribis Masako Karita et Mariko Shibukawa, quae opera administrativa pro colloquiis et itineribus negotiatorum efficaciter tractaverunt.

Ambasciatae Francogallicae, quae consilium studii foris in Francia sustinuit et promovit, et Professori Associato Cedric Delattre, qui consilium prudenter direxit.

Next-Generation Researcher Challenging Research Program et Japan Society for the Promotion of Science, quae pecuniam atque incitationem investigationis largiter praebuerunt.
Matri meae, quae me docuit cogitare.

Patri meo, qui me docuit fortitudinem.

Optimis amicis meis, qui patientiam et tolerantiam praebuerunt.

Et hominibus antiquis, qui verba

“PHILOSOPHIA SAPIENTIAE AMOR EST ET AFFECTATIO” finxerunt, illustrantes quid significet scientiam quaerere, atque his qui hanc hereditatem ad hunc diem protulerunt.