

2004 00198 A

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀池靖浩

平成 17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀池 靖浩

平成 17(2005)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
チップ作製微細加工プロセス技術、血液微小流体力学に関する研究	2
堀池 靖浩	
II. 分担研究報告	
1. ゼラチン比色実験、流路最適設計、及びチップ作製に関する研究	11
沖 明男	
2. Ni フリーSUS 鋼による彩管化と高剛性化研究に関する研究	14
黒田 大介	
3. 無痛針を用いた採血器に関する研究	18
守本 祐司	
4. ドライ比色診断チップシステム技術に関する研究	23
小川 洋輝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究年度終了報告書

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究
主任研究者 堀池靖浩 独立行政法人物質・材料研究機構フェロー

研究要旨

無痛針から採取した微量血液の血球分離後の血漿成分からドライケミストリー法に基づいて多項目を在宅で診断できる使い捨ての診断チップを開発している。まず、無痛針の管材料としてアレルギーを防止する Ni フリー SUS 管の素材の Fe-24Cr-2Mo をフェライト状態で 900°C の焼鈍温度で外径 100µm の細管化に成功した。また、ヒト正常線維芽細胞を用いた毒性試験を行い、既存の生体用ステンレス鋼である 316L 鋼よりも優れた細胞親和性が確認された。平行して、SUS304 を用い、内壁を超平滑化、先端を 10 度の 3 面カットにより無痛針を開発し、これを用いた電子的血管所在検出システムから素人でも血圧により採血を可能にした。診断チップでは、グルコース・肝機能などの診断に対して反応・検査試薬試料等を 1 流路の中でミキシング、検出を行う一段反応型と尿素窒素などの発生ガスが呈色させる二段反応型の 2 種類のチップを作製した。更に、前者で豚由来コラーゲンペプチドを基質緩衝液に抱かし、凍結乾燥し、血清と反応から GOT の測定を、後者で尿素窒素の測定を可能にした。

分担研究者

氏名 所属機関

職名

沖 明男 独立行政法人物質・材料研究機構
特別研究員

黒田大介 独立行政法人物質・材料研究機構
研究員

守本祐司 防衛医科大学
助手（指定講師）

小川洋輝 株式会社アドビック
代表取締役

のスライドは単項目ごとのため検査項目が増えればコスト面や血液量の多さが問題となる。そこで本研究は、極微量の血液から分離した血漿と直接反応するドライケミストリー法を使用し、薬剤含有ゲルをマイクロ流路に導入することで多項目を診断する安価・使い捨て可能で、簡便かつ保存性のよい診断チップを創製することを目的とし、究極的には、モバイル端末等から医療ネットワークを介して医療機関のデータベースに基づいて在宅診断を実現する新社会システムの構築を目指す。

B. 研究方法

16 年度研究では、(1) Ni フリー SUS 管の細管化と毒性テスト、(2) 無痛針を用いた電子的静脈存在位置検出による採血、(3) ドライ比色法を用いた診断チップの設計と製作、ゲルの選定、及び代表的な項目の測定を以下の方法により研究した。

(1) の研究では、まず 高周波真空溶解炉を使用し、図 1 に示す Fe-24 Cr-2Mo (重量 20 kg) の鋳塊を溶製した。得られた鋳塊に熱間鍛造および機械加工を施し、直径 30 mm、長さ 500mm の丸棒材を作製した。細管化は 900°C に設定して線引きで得ら

A. 研究目的

超高齢化社会の到来に伴い医療費が増大し、その削減には高齢者が元気に過ごすためには予防が重要である。その目的のため、我々は、無痛針から採取した微量血液の分析から在宅で多項目を診断するヘルスケアチップを開発してきた。これは電気化学的手法を用いた。本測定法は血漿などの秤量を必要としないが、校正液を必要とし、比色法による肝機能診断チップも試薬保存性に課題がある。一方、ドライケミストリー法を使った市販

れた細管は洗浄後、1200℃で45分の窒素吸収処理を実施した。処理後、1200℃から米水中に試料を投入して急冷した。試料表面を#600の耐水研磨紙にて湿式研磨した後に、窒素吸収処理前後の試

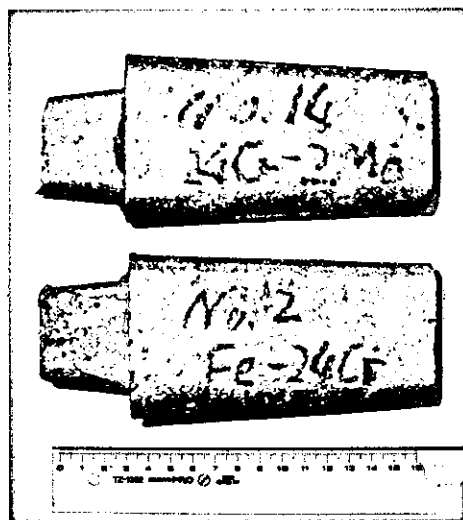


図1 高周波真空溶解法より溶製した Fe-24Cr-2Mo 鋳塊の外観

料についてX線回折装置による構成相の同定を行った。また、窒素吸収処理前後の試料に耐水研磨紙による湿式研磨とバフ研磨を施し、光学顕微鏡によるマイクロ組織観察を行った。

窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo の細胞親和性評価ではヒト正常線維芽細胞 (HEL299) を用いて、その板材の窒素処理前後の細胞親和性を評価した。比較材として 316L 鋼を使用した。試料表面を湿式研磨し、洗浄後、UV、又はオートクレーブ滅菌した。24穴マイクロプレートに試料を静置し、ウシ胎児血清 (FBS) を 10% 添加した培地 (E-MEM+NEAA+1mM Na-Pyr+0.1%LAN) 1ml 中に HEL299 を 4000 個播種した。5%CO₂ インキュベータ内で 1、4、7 日間培養後、グルタルアルデヒド固定、Giemsa 染色し、実体顕微鏡にて試料表面の細胞を観察した。また、動的条件での細胞親和性も評価した。テフロン容器に試料、ジルコニア球、FBS を添加していない培地 20 ml を入れ、オートクレーブ滅菌後に 310 K、300 rpm の条件で試料とジルコニア球を 14 日間巡回させて摩耗粉を含む溶液を抽出した。それら抽出液を希

釈して HEL299 の細胞生存率を評価した。

(2)の研究では、素人が自分自身で採血することは、血糖値測定用ランセット使用で可能であるが、リンパ液を含むので正確に多項目を診断するには、血管から採血することが必要である。そのためには、血管の所在が分からねばならず、850nm の近赤外光 (NIR) ダイオードアレーを腕に照射して静脈像を浮き上がらせ、針と腕との間に生じる電位を測定して、針の深さ方向を知り、採血する。無痛針は、Ni フリーSUS は研究中なので、一般に針材として使用されている SUS304 製の外径 150μm の細管を用い、内壁を超平滑化後、図2に示すように先端を 10 度で 3 面カットし、最後に電解研磨をした。

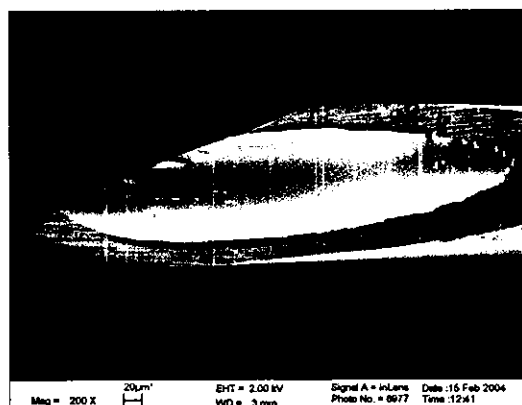


図2 無痛針の写真

(3)の研究では、血液生化学反応のうち、グルコース・肝機能などはすべての反応・検査試薬試料等を1流路の中でミキシング、検出が可能であるのに対し、尿素態窒素やクレアチンなどはガスの発生が呈色に関わってくるためガスの透過する層が必要となり、図3に示す2つの型のチップを作製した。本研究では、基質緩衝液をゲルに抱かして、真空乾燥や凍結乾燥によってドライ化し、血漿と反応させることがその反応も含めて特に重要である。富士フィルム(株)からドライケム比色測定用ゼラチン材の他、動物由来のゲルやコラーゲンペプチドなどの種々の材料を試し、種々の乾燥法と経過反応などを調べて最適ゲルを選定する。

図4は、ドライケミストリー比色による測定装置を示す。チップは37°Cに温度制御したステージに乗せ、ハロゲンランプ光をファイバを介してバンドパスフィルターで所望の光をチップに導入し、光受光器で吸光度を検出した。

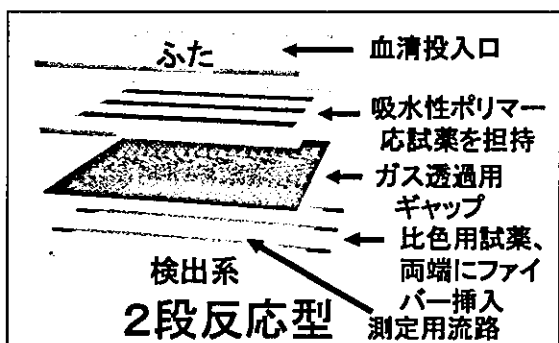
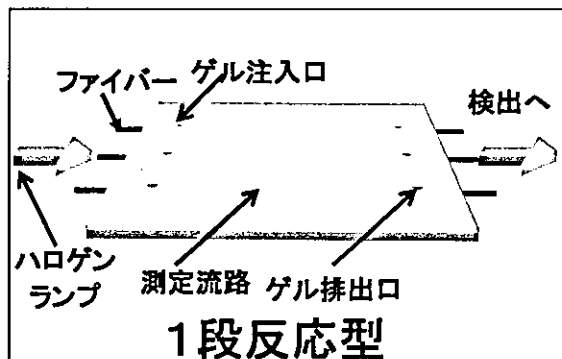


図3 異なる反応に対する2種類の構造のドライ比色チップ

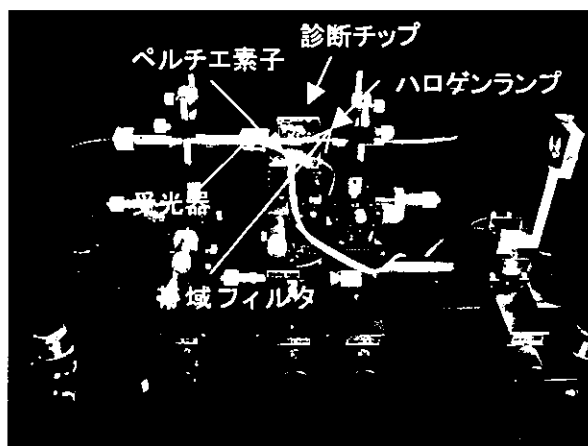


図4 比色測定装置

C. 研究結果

(1) NiフリーSUS管の細管化と毒性テスト

(1-1) NiフリーSUS管の細管化と窒素吸収処理によるマイクロ組織変化

焼鈍温度900°Cにて線引きしたFe-24Cr-2Moの外径100 μ m、内径50 μ mの細管の走査型電子顕微鏡(SEM)により撮影した2次電子像を図5に示す。Crを多く含むNiフリーフェライト型SUS鋼は特殊な合金系であり、さらに加工硬化しにくい金属材料であるため、線引きなどの成形加工は非常に困難である。しかしながら、結晶粒粗大化を抑制しつつ効率よく焼鈍できる処理温度の探索と線引きプロセスの最適化により図5に示すNiフリーSUS鋼の細管化に世界で初めて成功した。

また、フェライト状態で成形したNiフリーSUS管に1200°Cで45 minの窒素吸収処理を施した試料のX線回折試験結果から窒素吸収処理前は面心立方構造のフェライト組織(α)の回折パターンしか観察されていないが、窒素吸収処理を施した試料では体心立方構造したNiフリーSUS管の構成相が窒素吸収処理により変化したことが確認された。これまで種々の形状に成形したFe-24Cr-2Moにおいて窒素吸収による強度、耐食

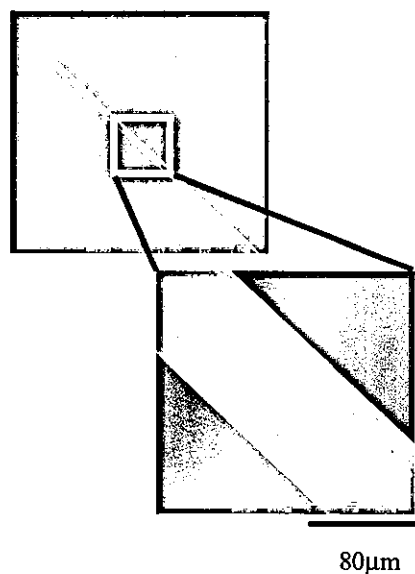


図5 外径100 μ m、内径50 μ mのFe-24Cr-2Mo細管のSEM2次電子像

性、剛性などの改善を確認しており、今年度に作製した Ni フリー SUS 細管についても同様な結果が期待できる。しかし、図 5 に示すように、細管の表面性状が必ずしも最適といえる状態ではないため、次年度は結晶粒微細化も含めた細管化プロセスを構築する必要がある。

(1-2) 窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo の細胞親和性

UV およびオートクレーブ滅菌したそれぞれの試料上で HEL299 を 7 日間培養した。試料を UV 滅菌した場合、316L 鋼上でヒト線維芽細胞の増殖が有意に阻害されたが、Fe-24Cr-2Mo-1N、Fe-24Cr-2Mo 上ではいずれも細胞はよく増殖した。一方、試料をオートクレーブ滅菌した場合、SUS316L 上でも他の材料と同様に細胞はよく増殖した。これは、316L 鋼をオートクレーブ滅菌した場合、表面酸化皮膜が厚くなるとともに皮膜組成が変化するため、316L 鋼に含まれている Ni の毒性が発現されにくくなったためと考えられる。また、摩耗により抽出したそれぞれの試料の抽出液濃度と細胞生存率の関係を図 6 に示す。いずれの試料でも抽出液濃度の増加にともない細胞生存率は減少する傾向があるが、どの抽出液濃度においても Fe-24Cr-2Mo 合金は 316L 鋼よりも高い細胞生存率を示している。また、窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo 合金の細胞生存率は、高濃度側にお

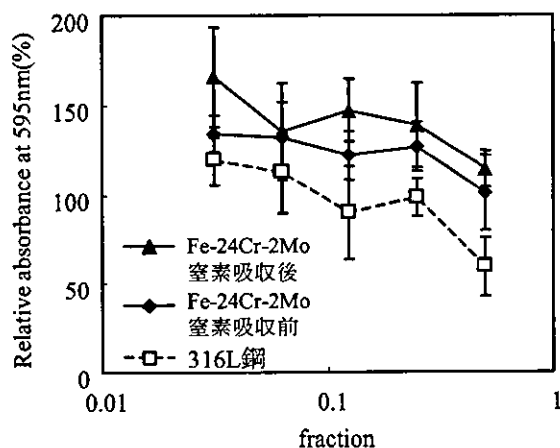


図 6 摩耗により抽出したそれぞれの試料の抽出液濃度と細胞生存率の関係

いてもコントロールの 1 よりも高い値を示した。

以上の結果から、窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo は、摩耗をともなう過酷な環境下でも優れた細胞適合性を示すことが明らかとなった。

(2) 無痛針を用いた電子的静脈存在位置検出による採血

在宅で健康を診断できるためには、痛みを伴わずに素人にも採血できることが不可欠である。痛みは、針を皮膚に穿刺する際、神経網を切断する時に感じる。そこで、図 2 に示す先述の SUS 管製針を製作した。従来の針の外径の 1/4 程度なので、腕に刺しても痛みは感じない。更に、図 7 に示すように、外径 0.15mm のステンレス製の管を作製した時に生成された粗い管の内壁(a)を、特殊な方法で超平滑化した結果(b)、針を皮膚に刺すと自分の血圧だけで血液が針を通過し、ポンプを必要とせずに採血が可能になった。針アセンブリは SUS

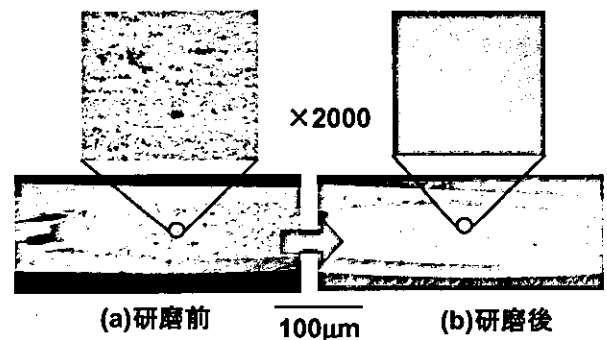


図 7 ステンレス製の管の内壁の研磨前(a)、超平滑化後(b)の SEM 写真



図 8 NIR 光を腕に照射した時の血管の可視化

製針を外径 2.3mm の硝子管製の蓄血パイプに接続したものである。蓄血パイプに溜まる採血量は 6 μ L (1mm³×6)であり、在宅診断ではこの量程度が限度と考え、また本研究でこの程度で多項目を測定できることも目的の1つである。

しかし、静脈から採血する際、その所在が見えない場合が多い。そこで、図 8 に示すように近赤外光(Near Infrared: NIR, 850nm)を照射して血管を可視化した。NIR 光は水には透過し、皮下で拡散乱して伝播するが、血液中のヘモグロビンには透過できず、血管の存在が分かる。更に、皮膚表面から静脈の存在深さを知ることが重要である。その深さを知るため、針と皮膚表面との間に生じる電位を測定し、針が血管に到達したことを検出できるようにした。図 9 は、穿刺時から内部に針が導入されていく経過時間に対する電位変化を示す。静脈の存在しない筋肉中では電位変化は

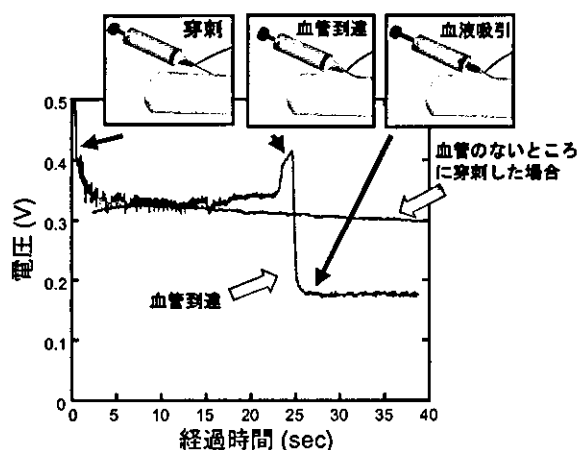


図 9 穿刺時から内部に針が導入されていく経過時間に対する電位変化

無いが、針が静脈に刺さると電位はわずかに上昇し、血液を引き込むや否や、電位は急激に減少(少)することが分かる。この結果、これらを組み合わせ、液晶ディスプレイ画面を見ながら我々でも採血できるようになった。図 10 は無痛針でディスプレイ画面を見ながらいわば電子的に採血している様子である。採血者は自分の腕と針アセンブリを直視しているわけではなく、ディスプレイ上で NIR イメージと電位変化を見て、針アセンブリを



図 10 採血者がディスプレイ画面を見ながら無痛針で採血している様子と蓄血パイプに採取された全血の写真

静脈に穿刺する。将来的には画像処理を駆使して自動採血を目指す。当面は、本採血機構の携帯型装置一式を平成 16 年度に試作した。

この採取した血液を無痛針モジュールごとチップに挿入し、これを遠心操作により血液をチップに導くとともに血球と血漿に分離する。目視検査によればこのようにして得られた血漿は溶血に由来する赤色着色は観察されなかった。すなわち血圧を利用した採血の場合の血液採取速度は速くても 100 μ L/min 程度であり、このような場合、明瞭な溶血は生じていないことを意味する。一方蓄血パイプ端をポンプに接続して吸引した場合、2mL/min 程度の採取速度において明瞭な溶血が認められ、これ以上の速度で採取すると溶血してしまうことを意味している。血圧のみで採血を行った場合の溶血の有無の詳細は、今後遠心分離により得られた血漿中のカリウムイオン濃度や乳酸脱水素酵素(LDH)濃度を測定することにより詳細に調査する予定である。

- (3) ドライ比色法を用いた診断チップの設計と製作、ゲルの選定、及び代表的な項目の測定
- (3-1) 2 段反応型による尿素窒素(BUN)測定

発生するアンモニアガスが発色色素に作用して呈色する図 11 に示す BUN 診断チップを製作した。4 層からなり、最上層は反応層であり、ウレアーゼ溶液を高吸水性ポリマー担持(セミドライ状態)

させる。血清との反応で発生したアンモニアガスを次の透過層を経て、発色色素のプロモクレゾールグリーンをエタノールに溶解し、高分子のPVB 5%重量比をIPAに溶解したものを塗布した流路を設けた検出層の構造である。最下層の吸光度測定用流路内には、Al をスパッタ堆積後、CMP(化学的機械研磨)で除去する工程によってAl をコートして迷光の侵入と光ファイバーを介して導入された測定光のリークを防止した。図 12 に示すように 620nm にて吸光測定良好な検量線

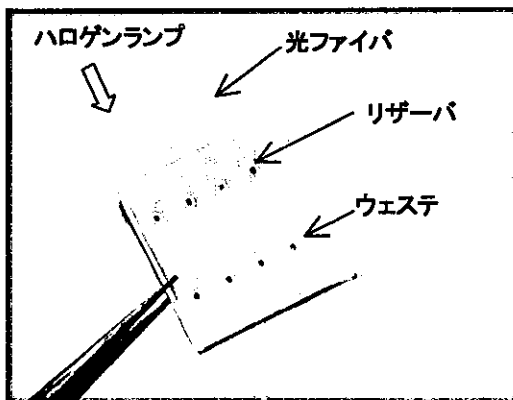


図 11 BUN 検出チップ

を得た。

本方式で BUN が測定可能になったので、次はクレアチニン測定に入る。これは電気化学法では難しく、血液に内在しているアンモニアを除去できれば、本二段方式で測定可能と考えている。こ

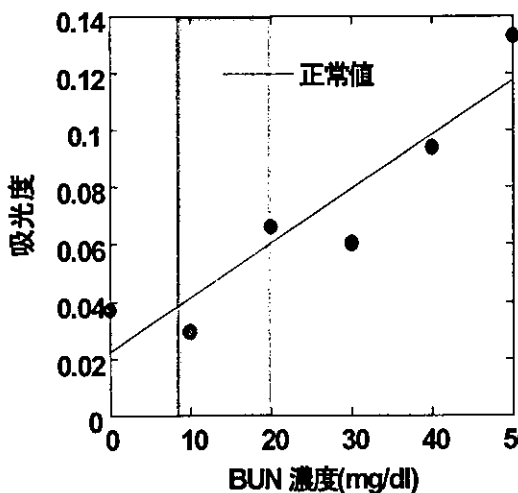


図 12 尿素濃度—吸光度

の実現で腎臓病を自宅で診断できるようになる。

(3-2) 1 段反応型による γ -GTP と GOT 測定

図 13 は一段反応測定用のミキサー付きチップを示す。PET(ポリエチレンテレフタレート)板に流路を形成し、キャップ PET 板で蓋をする。遠心力で動作し、上部に回転中心があり、下方に向かって遠心力が発生する。導入した標準血清は、試薬と合流し、ミキシング流路で混合され、2 段用と同様に Al が流路内壁にコートされた測定用流路に導入される。測定用流路の両側には測定光の導入と減衰光の検出用の光ファイバーが挿入されている。

まず、 γ -GTP 測定について述べる。反応時間の短縮目的で血清を点着した瞬間から反応開始とする従来のレートアッセイの SSCCII 法を採用し、更に難溶性の試薬でも均一にゲル中に分散させた試薬の乾燥法を検討した。試薬は、和光純薬製のテストワコー γ -GTP・J(L- γ -グルタミル-4-ニトロアニリド+グリシルグリシン)を用いた。これは、 γ -GTP との反応で生じた 4-NA を 405nm で測定する。試液のみで自然室温乾燥、及び室温真空乾燥を試みたが酵素の失活が著しいため、保護コロイドとして各種ゼラチン、コラーゲンペプチドなどセミドライ状態での酵素活性の検討を行った。試薬担持のためのゼラチンはドライケミストリー

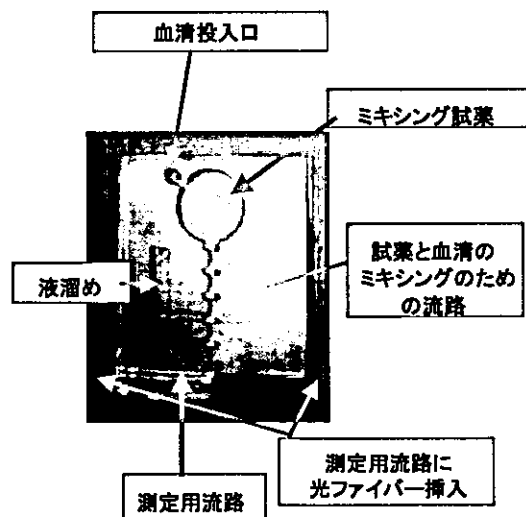


図 13 1 段反応型 γ -GTP 測定用チップ

で一般的に使用される高分子ゲルも検討した。実験は、2種類のゼラチン(10%溶液)と3種類のコラーゲンペプチド(10%溶液)を各 1/10 重量比で混合後、吸光度変化率の相違を検討した。

まず、 γ -GTP 測定では、液状試薬を富士写真フィルム社製の動物由来ゼラチン担持したものを試みたが、流路内(図 13)への導入は、37°Cでの温度管理の下で可能にもかかわらず、一旦ゼラチンを溶かし薄膜を形成後は、血清を導入しようとしても容易には再びゾル化せず、流路内流動を必要とする今回の研究には使用できなかった。一方、37°Cでゾル状の Fish gel では凍結乾燥による酵素活性低下などの問題はほとんど見られなかった。この理由は分子量が 5000 程度と低いからである。また、Fish gel は親水性に優れ、そのため乾燥試薬に血清と純水を添加した時、高還元性を示し、マイクロ流路内での移動に適している。

まずチップにより測定するため、10%ゼラチン溶液 1mL と γ -GTP 基質緩衝液 9mL と血清をチップに入れ、遠心力によりミキシング流路を移動させ、測定用流路に注入し、ファイバを介して、405nm 光を照射した。しかし、ミキシングが不十分、測定流路の光ファイバー導入部に空気が溜まる、凍結乾燥時に PET 板が剥がれるなどの問題が時々起こり、検量線を得られるまでは到らなかった。現在、遠心力を用いて均一な混合が可能なミキサーを開発しており、その基本は確立し、新血球分離法、新ミキサー、新測定法などで改善に鋭意努めている。特にミキサーに関し、 γ -GTP は基質緩衝液と血漿の混合比が 10:1 なのに対して、GOT と GPT のその比は 50:1 であり、ミキシングに特別な配慮が要求される。

そこで、マイクロ流路での測定のための最適光路長の検討も含め、生化学検査用ガラスセル(1~10mm)によって各ゲル使用に対する吸光度変化率を調べた。乾燥方法の検討として溶液状、真空乾燥(室温)、凍結真空乾燥の 3 方法を検討した。凍結乾燥は 冷凍庫で凍結後 -40°C、24 時間の後 -10°C、12 時間の乾燥をガラスセル内で行った。図 14 は、140 IU 標準血清を用い、 γ -GTP

用基質緩衝液のみと Fish gel + γ -GTP の室温で真空乾燥した場合に対してガラスセルのセル長の変化による吸光度の変化率を示す。測定は、真空乾燥後標準血清と純水を乾燥前の液量分を添加後直ぐに行った。両方共、セル長の増大に対して吸光度が指数関数的に変化することが分かり、チップ設計上の最適光路長の値が判明し、更に Fish gel +

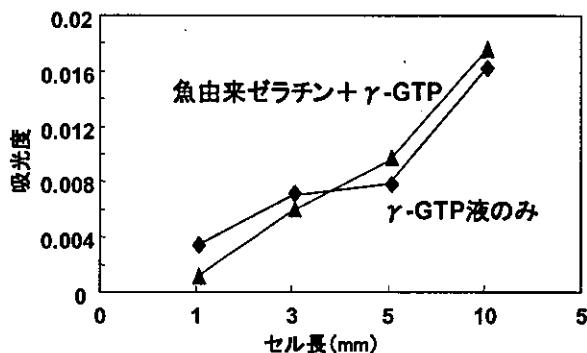


図 14 γ -GTP 用基質緩衝液のみと Fish gel + γ -GTP の場合に対してガラスセルのセル長の変化による吸光度の変化率

γ -GTP の有効性が示された。

図 15 は、Fish gel に γ -GTP を担持させ、チップのマイクロ流路内で各種乾燥法によるゲル特性の経過時間変化を示す。時間が経過すると共に、

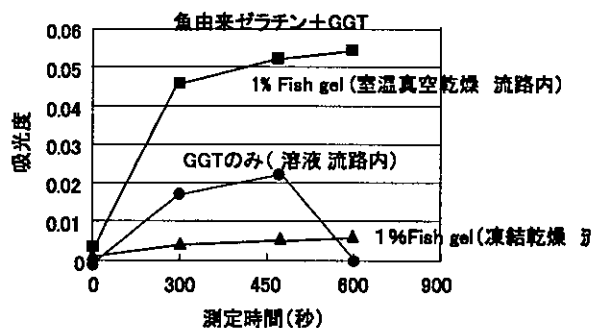


図 15 各種乾燥法における γ -GTP を担持した Fish gel 特性の経過時間変化

室温真空乾燥の Fish gel を用いた場合、吸光度は本来 Fish gel の持っている吸光色(黄色)や乾燥時に腐敗によると考えられる原因により時間と共に

急激に増加し、 γ -GTP 用試薬は途中で失活した。しかし、凍結乾燥したゲルは親水性、酵素活性の低下は避けられ、凍結乾燥の優位性が判明した。

次に GOT 測定について述べる。秤量、反応の複雑化によるチップ構造の複雑化を避けるため、トランスアミナーゼ CII-テストワコーPOP・TOOS 法のキット(基質酵素と発色剤等が混和された凍結乾燥品で、緩衝液のみを加える)を使い全混合して試薬「GOT 用基質発色液」として使用した。まず、本試薬を使用するチップ内の光路長検討のため、1、3、5、10mm の各光路長のガラスセルによる検量線を求めた後、ゲル担持の有無による試薬凍結の影響実験を行った。実験には光路長 10mm セル使用し、混合試薬そのままの物とコラーゲンペプチド (10%溶液) 3 種類を各 1/10 重量比で混合、24 時間、 -20°C 凍結後、自然に融解させ、液状に戻したものの吸光度から、酵素活性の減衰などを比較した。その結果を図 16 に示す。溶液系のみを凍結融解させると酵素活性が大きく減衰するが、豚由来のコラーゲンペプチドでは、凍結融解による影響はほとんど見られなかった。一方 Fish gel については本来の黄色が担持時の吸光度の高値化を生じた。そこで、本研究におい

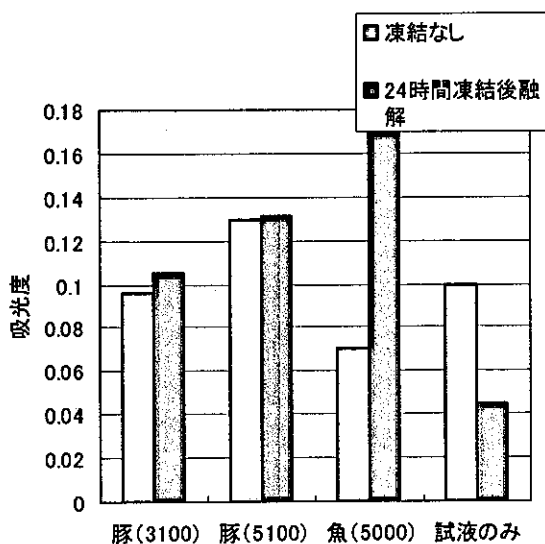


図 16 ゲル担持の凍結影響 (活性値 25Karmen 時)

て、豚由来のコラーゲンペプチドのゲルが適していると判明したので、来年度から更に診断項目を増やして確証していく。

(倫理面への配慮)

本申請研究の初期特性確立への実施は、(独)物質・材料研究機構で行われた。生体試験に関しては、本機構倫理委員会の承諾を得たのち実施した。実施に際して、被検者に対してインフォームド・コンセントを行った。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Oki, H. Ogawa, M. Nagai, S. Shinbashi, M. Takai A. Yokogawa and Y. Horiike "Development of healthcare chips checking life-style-related diseases", *Materials Science and Engineering C*, **24**(6-8) (2004), 837-843.
2. 高井まどか、新橋里美、小川洋輝、長井政雄、石原一彦、堀池靖浩、"多項目同時測定ヘルスケアチップ用マイクログルコースセンサーの創製"、*高分子論文集*, **61**(10) (2004)、555-560.

2. 学会発表

1. 甲田裕子、張 嘉顕、沖 明男、小川洋輝、堀池靖浩、"ドライケミストリ法のマイクロ流路への適用によるバイオセンシングの基礎的検討"、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム* (2004) 174.
2. H. Koda, C.H. Chang, A. Oki, H. Ogawa and Y. Horiike, "Biosensing with Dry Chemistry in Microchannel", *Proc. 4th Asian Int. Symp. Biomaterials* 220-221 (2004).
3. H. Ogawa, A. Oki, M. Nagai, J. Kikuchi and Y. Horiike, "Painless Venous Blood Collection System for Healthcare Chip", *Proc. 4th Asian Int. Symp. Biomaterials* (2004) 219-220.

4. C.C-Hsien, M. Nagai, H. Ogawa, S. Shinbashi, H. Hisamoto and Y. Horiike, "Development of Ammonia sensor", Proc. 4th Asian Int. Symp. Biomaterials (2004) 229.
 5. M. Takai, S. Shinbashi, H. Ogawa, Y. Horiike and K. Ishihara, "Biocompatible Microglucose Sensor with Newly Designed Phospholipid Polymer for Healthcare Chip", Proc. 4th Asian Int. Symp. Biomaterials (2004) 228.
 6. Y. Horiike, A. Oki, H. Ogawa, M. Nagai, M. Takai, C.C-Hsien, H. Hisamoto and K. Koda, "Development of Clinical Chips Checking Life Style-Related Diseases", Abstracts of Biosensors & Biomaterials Workshop 2005, (2005) O-28.
 7. 堀池靖造, "無痛針採血による在宅健康診断チップ", 第19回「大学と科学」公開シンポジウム「人体にやさしい医療材料」予稿集、(2004)、23-26.
3. 解説・総説
1. 堀池靖造、一木隆範、沖 明男、"プラズマプロセスによるバイオチップの開発と展望"、応用物理、73(4)、470-475、(2004).
 2. 小川洋輝、新橋里美、沖 明男、高井まどか、長井政雄、堀池靖造、"ヘルスケアチップの開発"、化学装置、9、81-85、(2004).
 3. 堀池靖造、沖 明男、小川 洋輝、高井まどか、百瀬 俊、横川昭徳、高村 禅、"高齢化社会の
 4. 沖 明男、堀池靖造、"医療用バイオチップの現状と将来展望"、電気学会誌、124(4)、219-222、(2004).
 5. 沖 明男、小川洋輝、堀池靖造、"ヘルスケアチップ創製プロセッシングの基盤技術"、ナノバイオエンジニアリングマテリアル、フロンティア出版、133-140、(2004).
 6. 堀池靖造、沖 明男 (分担執筆)、"ナノバイオ事典"、テクノシステム、(2005) (in press).
- F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 1. 特願2004-232638 発明の名称：血液分析装置及び血液分析方法 発明者氏名：堀池靖造、沖明男
 2. 特願2004-232639 発明の名称：血液分析装置及び血液分析方法 発明者氏名：堀池靖造、沖明男
 - 3.) 特願 2004-238910 発明の名称：血液分析装置 発明者氏名：堀池靖造、甲田裕子、沖明男
 2. 実用新案登録
 - なし
 3. その他
 - なし

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業） 分担研究年度終了報告書

ゼラチン比色実験、流路最適設計、及びチップ作製に関する研究 分担研究者 沖 明男

研究要旨

ドライ比色法による微量血液診断チップを作製を目指して、試薬を担持した吸水性ポリマーをマイクロ流路内に充填しチップを試作した。すべての反応試薬、検出試薬、試料のミキシングと検出を1本の流路で行う1反応型と、反応系と検出系が分離した2段反応型のチップを作製した。尿素態窒素を試作チップ内で測定し良好な結果を得た。

A. 研究目的

本分担研究では、ドライ比色法による健康マーカー測定に必要な、試薬のゼラチンへの固定化技術、血漿あるいは血清による溶解と反応、および比色測定とそれにとまなうチップ作製技術の研究を行う。比色試薬の固定化の要件は（1）血漿への溶解性（2）長期（1～3ヶ月程度を想定）にわたって酵素活性を失わない保存性（3）血漿と試薬の混合溶液をマイクロ流路内で容易に搬送できる流動性などである。これらの要件を満たす最適なゼラチン材料を本研究では見出す。次に、前述の固定化されたドライ比色用試薬は、血漿あるいは血清と反応させるがその方法にはドライケミストリのように直接血漿を固定化試薬に接触させる方法や、いったん試薬を溶解してから血漿あるいは血清とミキシングする方法などが考えられる。本研究ではドライ比色診断チップにおいて上述の方法の中から最適な方法を検討するとともにその測定プロトコル（血漿、試薬の秤量、ミキシング）に従ったマイクロ流路の設計を行う。さらにはマイクロ流路を試作して固定化試薬の溶解性、各酵素の活性、血漿と試薬との混合溶液の搬送などの基礎データを取得する。

B. 研究方法

グルコースおよび肝機能診断マーカーである

γ -GTP、GOT、GPT などの1段階の反応で測定

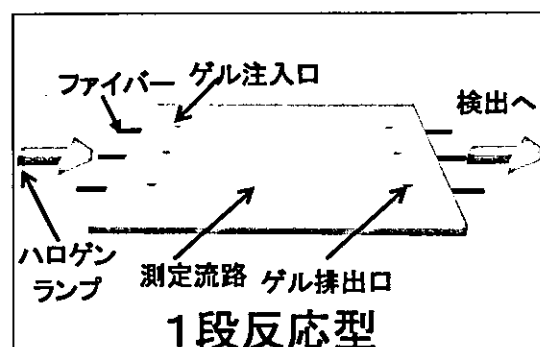


図1 1段階反応型ドライ比色チップ

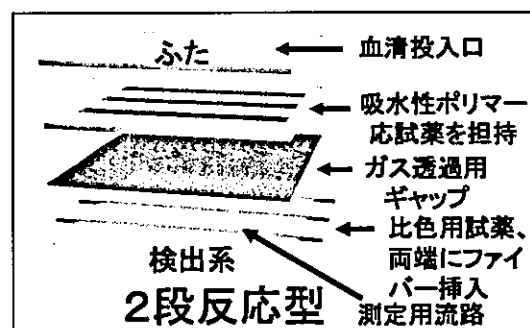


図2 2段階反応型ドライ比色チップ

可能なチップ構造を図1に示す。すべての反応試薬、検出試薬、試料のミキシングと検出を1本の流路で行う。光源はハロゲンランプを用い、検出は分光器を用いた。一方、尿素態窒素やクレアチ

ニンを検出するには2段階の反応が必要でありそのチップ構造を図2に示す。反応系と検出系の間にガス透過層としてギャップを有する構造になっている。最上層は反応系流路のふたとなる層で血清投入用の穴を開けた。第2層の反応系流路内にはゼラチン、吸水性ポリマーなどに反応試薬を担持したものを充填した。第3層は第2層で生成したガスを最下層へと透過させる。最下層に形成した流路には発色用試薬を担持したゼラチン、吸水性ポリマーが充填してあり流路両端には検

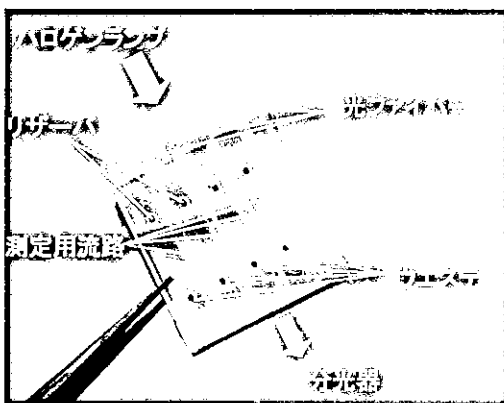


図3 尿素態窒素2段階反応検出用チップ

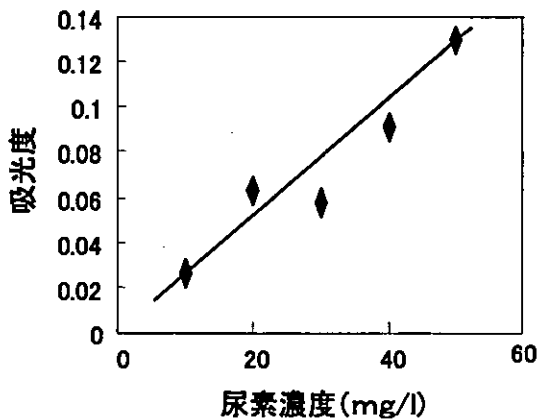


図4 尿素濃度に対する吸光度変化

出光を導出入するための光ファイバーを挿入した。

(倫理面への配慮)

本分担研究に関しては該当なし。

C. 研究結果

試作したチップの写真を図3に示す。基材はPET (ポリエチレンテレフタレート) であり、ガス透過層には SUS スクリーンを用いている。また検出系の流路断面は $0.5 \times 1.2\text{mm}$ で、光ファイバーの外径は 0.5mm である。測定は $15\mu\text{L}$ の尿素標準液を測定用流路に導入し、 37°C で 15 分間静置した後、波長 620nm の光で吸光度を測定した。反応系にはウレアーゼ溶液をアクリルにトリル系高吸水生ポリマーに担持し 4°C で簡素したモノを用いた。一方検出系にはプロモクレゾールグリーンをエタノール中に 1wt% で溶解した溶液と、VBP (ポリブチルピフェノール) 5wt% を IPA (イソプロパノール) に溶解した溶液を混合し、流路内壁に塗布した。図4に試作したチップでの尿素態窒素の測定結果を示す。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Oki, H. Ogawa, M. Nagai, S. Shinbashi, M. Takai, A. Yokogawa and Y. Horiike "Development of healthcare chips checking life-style-related diseases", Materials Science and Engineering C, (2004) 24(6-8), 837-843.

2. 学会発表

1. 甲田裕子、張 嘉顕、沖 明男、小川洋輝、堀池靖浩、"ドライケミストリ法のマイクロ流路への適用によるバイオセンシングの基礎的検討"、日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2004) 174.
2. H. Koda, C.H. Chang, A. Oki, H. Ogawa and Y. Horiike, "Biosensing with Dry Chemistry in Microchannel", Proc. 4th Asian Int. Symp. Biomaterials (2004) 220-221.
3. H. Ogawa, A. Oki, M. Nagai, J. Kikuchi and Y. Horiike, "Painless Venous Blood Collection System for Healthcare Chip", Proc. 4th Asian Int. Symp. Biomaterials (2004) 219-220.

3. 解説・総説

1. 堀池靖浩、一木隆範、沖 明男、“プラズマプロセスによるバイオチップの開発と展望”、応用物理、**73**(4)、470-475、(2004).
2. 小川洋輝、新橋里美、沖 明男、高井まどか、長井政雄、堀池靖浩、“ヘルスケアチップの開発”、化学装置、**9**、81-85、(2004).
3. 堀池靖浩、沖 明男、小川 洋輝、高井まどか、百瀬 俊、横川昭徳、高村 禪、“高齢化社会の到来とヘルスケアチップの創製—ドライエッチング技術の展開—”、表面技術、**55**(6)、385-390、(2004).
4. 沖 明男、堀池靖浩、“医療用バイオチップの現状と将来展望”、電気学会誌、**124**(4)、219-222、(2004).
5. 沖 明男、小川洋輝、堀池靖浩、“ヘルスケアチップ創製プロセッシングの基盤技術”、ナノバイオエンジニアリングマテリアル、フロンティア出版、133-140、(2004).

6. 堀池靖浩、沖 明男 (分担執筆)、“ナノバイオ事典”、テクノシステム、(2005) (in press).

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 特願2004-232638 発明の名称：血液分析装置及び血液分析方法 発明者氏名：堀池靖浩、沖 明男
 2. 特願2004-232639 発明の名称：血液分析装置及び血液分析方法 発明者氏名：堀池靖浩、沖 明男
 3. 特願 2004-238910 発明の名称：血液分析装置 発明者氏名：堀池靖浩、甲田裕子、沖 明男
- #### 2. 実用新案登録
- なし
- #### 3. その他
- なし

Ni フリーSUS 鋼による細管化と高剛性化に関する研究

分担研究者 黒田大介

研究要旨

Ni フリーSUS 管の素材となるフェライト型ステンレス鋼である Fe-24Cr-2Mo (mass%)を高周波真空溶解炉を使用して溶製し、フェライト状態での Ni フリーSUS 管の細管化を試みた。焼鈍温度 1000°Cにて細管加工を実施したところ、焼鈍処理に起因すると考えられる結晶粒粗大化によって細管の表面性状が粗くなる現象が認められた。そこで、焼鈍温度を再検討し、最適な処理温度を 900°Cに決定した。焼鈍温度 900°Cにて細管加工を実施した結果、目標とする形状（外径 100 μm 、内径 50 μm ）の Ni フリーSUS 細管の製造に成功した。得られた Ni フリーSUS 細管に窒素吸収処理を施した結果、フェライトからオーステナイトへ相変態することが明らかとなった。また、ヒト正常線維芽細胞を用いた毒性試験を行い、窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo において既存の生体用ステンレス鋼である 316L 鋼よりも優れた細胞親和性が確認された。

A. 研究目的

平成 16 年度の本研究課題の目標は Ni フリーSUS 管の形成と毒性テストである。そこで、以下に示す 2 点を本年度の研究目的とし、無痛針への適用を検討する。

- (1) Ni フリーSUS 鋼である Fe-24Cr-2Mo (mass%) について外径 100 μm および内径 50 μm の細管を作製する。
- (2) 窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo の細胞親和性を評価する。

B. 研究方法

(1) Ni フリーSUS 管の細管化

高周波真空溶解炉を使用して、図 1 に示す Fe-24Cr-2Mo (重量 20 kg)の鋳塊を溶製した。得られた鋳塊に熱間鍛造および機械加工を施し、直径 30 mm、長さ 500mm の丸棒材を作製した。細管化実験開始時はこれまでの経験から焼鈍温度を 1000°Cに設定して線引きを行っていたが、結晶粒粗大化に起因すると思われる表面性状の劣化が生じたため焼鈍温度を若干低い 900°Cに再設定し

て線引きによる細管化を行った。また、得られた細管をアセトンにて脱脂、洗浄後、図 2 に示す窒素吸収処理装置により 1200°Cで 45 min の窒素吸収処理を実施した。処理後は 1200°Cから氷水中に試料を投入して急冷した。試料表面を#600 の耐水研磨紙にて湿式研磨した後に、窒素吸収処理前後の試料について X 線回折装置による構成相の同定を行った。また、窒素吸収処理前後の試料に耐水研磨紙による湿式研磨とバフ研磨を施し、光学顕微鏡によるマイクロ組織観察を行った。

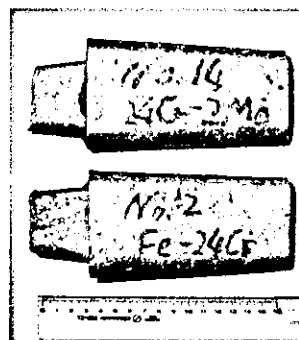


図 1 高周波真空溶解法により溶製した Fe-24Cr-2Mo 鋳塊の外観

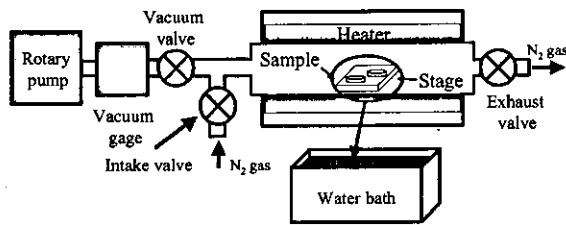


図2 窒素吸収処理装置の概略図

(2) 窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo の細胞親和性評価

ヒト正常線維芽細胞 (HEL299) を用いて、窒素吸収処理前後の Fe-24Cr-2Mo の板材の細胞親和性を評価した。窒素吸収処理前および 129.6 ks の窒素吸収処理を施した Fe-24Cr-2Mo の直径 12 mm、厚さ 1.5 mm の板材を試料として用いた。比較材として 316L 鋼を使用した。試料表面を #600 の耐水研磨紙にて湿式研磨し、アセトン洗浄後、UV あるいはオートクレーブ滅菌した。24 穴マイクロプレートに試料を静置し、ウシ胎児血清(FBS)を 10% 添加した培地 (E-MEM+NEAA+1mM Na-Pyr+0.1%LAN) 1ml 中に HEL299 を 4000 個播種した。5%CO₂ インキュベータ内で 1、4、7 日間培養後、グルタルアルデヒド固定、Giemsa 染色し、実体顕微鏡にて試料表面の細胞を観察した。また、動的条件での細胞親和性も評価した。テフロン容器に試料、ジルコニア球、FBS を添加していない培地 20 ml を入れ、オートクレーブ滅菌後に 310 K、300 rpm の条件で試料とジルコニア球を 14 日間巡回させて摩耗粉を含む溶液を抽出した。それら抽出液を希釈して HEL299 の細胞生存率を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究課題では、素材の安全性評価のためにヒト由来の細胞を使用しているが、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

- (1) Ni フリー SUS 管の細管化と窒素吸収処理によるマイクロ組織変化
焼鈍温度 900°C にて線引きした Fe-24Cr-2Mo の

外径 1.3 mm、内径 1.0 mm の細管の走査型電子顕微鏡(SEM)により撮影した 2 次電子像を図 3 に示す。また、外径 100 μm、内径 50 μm の Fe-24Cr-2Mo 細管の 2 次電子像を図 4 にそれぞれ示す。本研究課題で加工を試みた Cr を多く含む Ni フリーフェライト型 SUS 鋼は特殊な合金系であり、さらに加工硬化しにくい金属材料であるため、線引きなどの成形加工は非常に困難である。しかしながら、結晶粒粗大化を抑制しつつ効率よく焼鈍できる処理温度の探索と線引きプロセスの最適化により図 3 に示す Ni フリー SUS 鋼の細管化に世界で

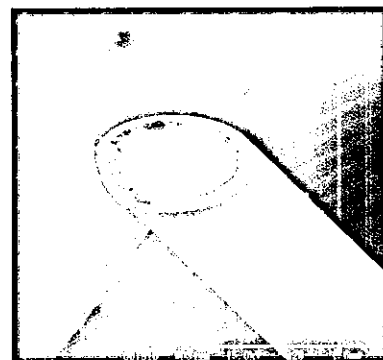


図3 外径 1.3 mm、内径 1.0 mm の Fe-24Cr-2Mo 細管の SEM2 次電子像

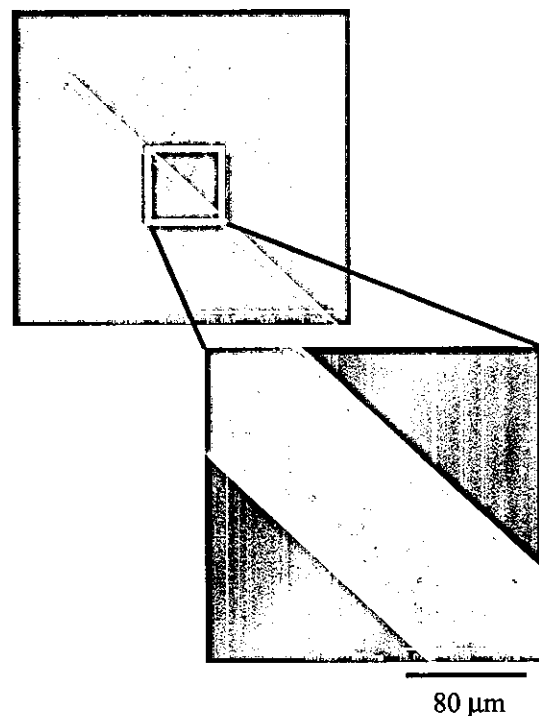


図4 外径 100 μm、内径 50 μm の Fe-24Cr-2Mo 細管の SEM2 次電子像

初めて成功した。また、フェライト状態で成形したNiフリーSUS管に1200°Cで45 minの窒素吸収処理を施した試料のX線回折パターンを図5に示す。窒素吸収処理前は面心立方構造のフェライト組織(α)の回折パターンしか観察されていないが、窒素吸収処理を施した試料では体心立方構造のオーステナイト組織(γ)の回折パターンが観察されている。これは、作製したNiフリーSUS管の構成相が窒素吸収処理により変化したことを示している。これまで種々の形状に成形したFe-24Cr-2Moにおいて窒素吸収による強度、耐食性、剛性などの改善を確認しており、今年度に作製したNiフリーSUS細管についても同様な結果が期待できる。しかし、図3および図4に示すように、細管の表面性状が必ずしも最適といえる状態ではないため、次年度は結晶粒微細化も含めた細管化プロセスを構築する必要がある。

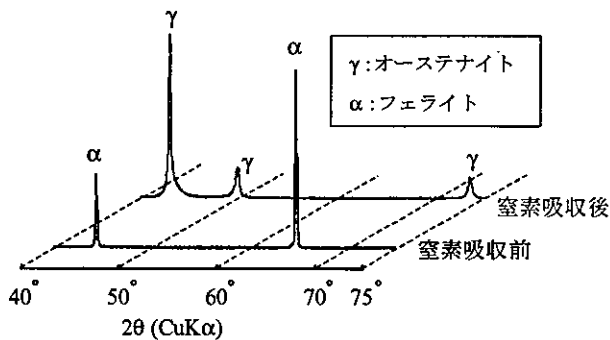


図5 窒素吸収前後のNiフリーSUS細管のX線回折パターン

(2) 窒素吸収処理したFe-24Cr-2Moの細胞親和性

UVおよびオートクレーブ滅菌したそれぞれの試料上でHEL299を7日間培養した場合の細胞の状態を図6および図7に示す。試料をUV滅菌した場合、316L鋼上でヒト線維芽細胞の増殖が有意に阻害されたが、Fe-24Cr-2Mo-1N、Fe-24Cr-2Mo上ではいずれも細胞はよく増殖した(図6)。一方、試料をオートクレーブ滅菌した場合、SUS316L上でも他の材料と同様に細胞はよく増殖した(図7)。これは、316L鋼をオートクレーブ滅菌した場合、表面酸化皮膜が厚くなるとともに皮膜組成が変

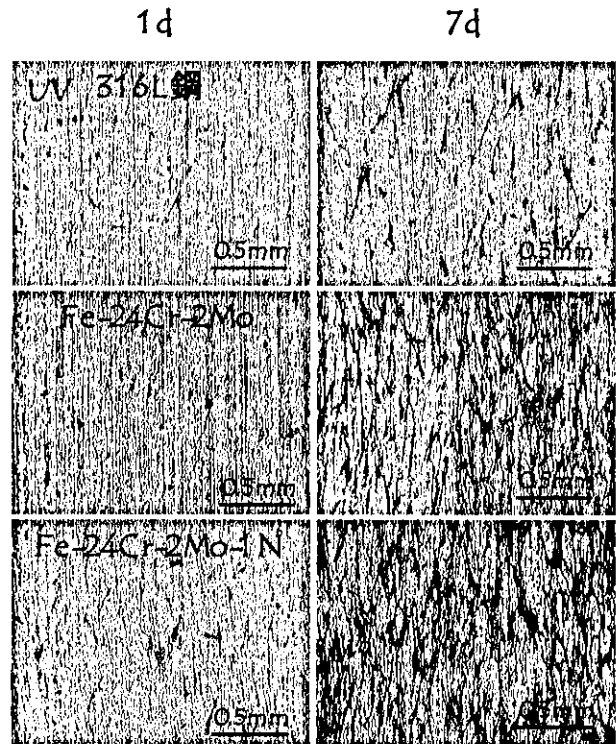


図6 UV滅菌後に各合金上で培養したHEL299の増殖形態

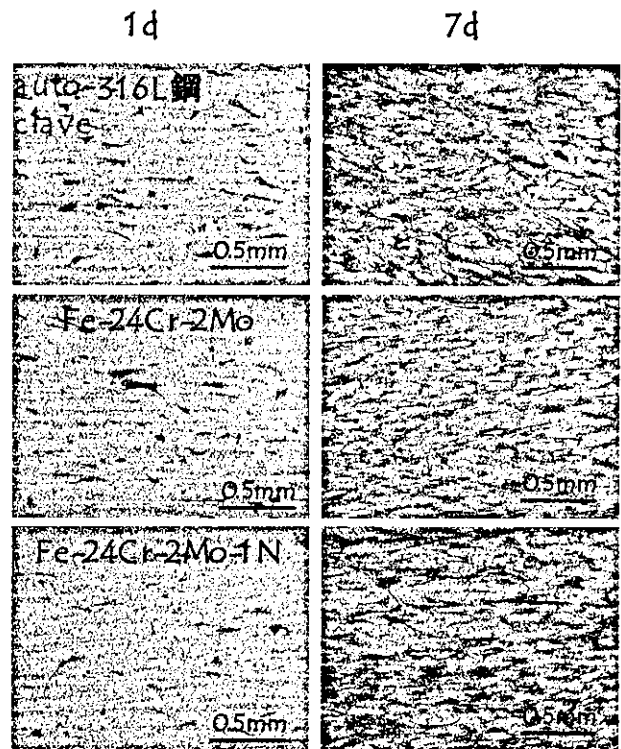


図7 オートクレーブ滅菌後に各合金上で培養したHEL299の増殖形態

化するため、316L 鋼に含まれている Ni の毒性が
 発現されにくくなったためであると考えられる。
 また、摩耗により抽出したそれぞれの試料の抽出
 液濃度と細胞生存率の関係を図 8 に示す。いずれ
 の試料でも抽出液濃度の増加にともない細胞生
 存率は減少する傾向があるが、どの抽出液濃度
 においても Fe-24Cr-2Mo 合金は 316L 鋼よりも高い
 細胞生存率を示している。また、窒素吸収処理し
 た Fe-24Cr-2Mo 合金の細胞生存率は、高濃度側
 においてもコントロールの 1 よりも高い値を示した。

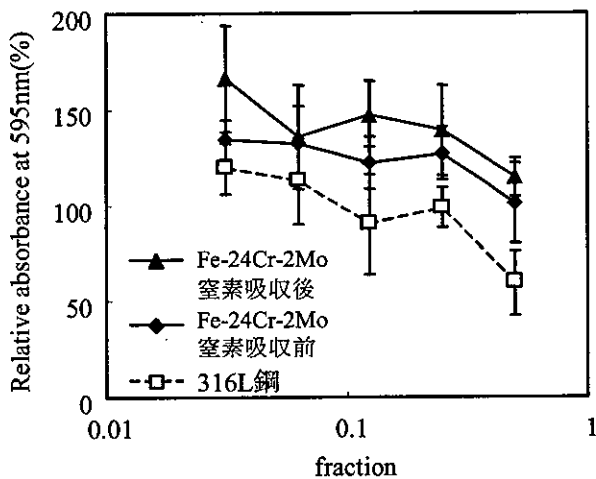


図 8 摩耗により抽出したそれぞれの試料の抽出液濃度と細胞生存率の関係

以上の結果から、窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo は、摩耗をともなう過酷な環境下でも優れた細胞適合性を示すことが明らかとなった。

【次年度の目標】

平成 17 年度は結晶粒の微細化、焼鈍温度の検討、伸管条件の最適化により細管化を試みる。また、薄板から細管への加工プロセスの検討も行う。現在、素材となるインゴットへの高加工歪み導入による結晶粒微細化を行っている。電子顕微鏡レベルでのマイクロ組織解析結果とあわせて最適な細管化プロセスを構築する。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Yamamoto, Y. Kohyama, D. Kuroda, and T. Hanawa, "Cytocompatibility evaluation of Ni-free stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment", *Materials Science & Engineering C Biomimetic and Supramolecular Systems*, 24 (2004) 737-743.
2. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda and M. Kobayashi, "Torsion and Tensile Properties of Thin Wires of Nickel-Free Austenitic Stainless Steel with Nitrogen Absorption Treatment", *Materials Transactions*, 45 (2004) 112-118.

2. 学会発表

1. 黒田大介, "生体用 Ni フリーステンレス鋼の開発", 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 予稿集, 104.
2. 黒田大介, 横山敦郎, 山本玲子, 埴 隆夫, 廣本祥子, 窒素吸収処理した Ni フリーステンレス鋼の生体親和性, 日本金属学会講演概要(第 134 回・東京), (2004) 127.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

無痛針を用いた採血器に関する研究

分担研究者 守本 祐司

研究要旨

外径 $150\mu\text{m}$ という微細な針を作製し、これを無痛採血用の針として使用できるか否か検討した。合わせて近赤外血管可視化機構、ならびに血管検知機構を援用しつつ採血試験を行い、これらの有用性を確認した。

A. 研究目的

無痛採血はおよび薬注は、医療関係者のみならず、多くの人々の望むところである。より穿刺時の疼痛を緩和するためには蚊の針のように、針の径を小さくしていけば良いことは自明である。しかしながらこのような針の作製は困難であることは勿論のこと、仮に作製できても従来の血液検査に必要な血液量(数 mL~数十 mL)を溶血無しに得るためには、できるだけゆっくりと採取しなくてはならず、長い採血時間を要するために実用的ではない。しかしながら本研究グループが研究開発を行っているドライ比色チップの場合、必要な血液量は数 μL ~10 μL 程度なので、微細針を用いても短時間に採取することが可能である。

本研究では外径 $150\mu\text{m}$ という微細針を作製し、これが微量血液採取に用いることが可能であるか検討するとともに、確実に針を静脈に導くための近赤外血管可視化機構ならびに血管検知機構を評価して、自動採血装置実現のための基礎的なデータを取得することを目的としている。

B. 研究方法

B.1. 微細針(無痛針)の作製

外径 $150\mu\text{m}$ 、内径 $100\mu\text{m}$ のステンレス(SUS304)パイプの端面に3面研磨加工を施し、鋭利な針を作製した。針の内壁は血液採取をより円滑に行い、また溶血を抑制するために、独自開発した研磨手法により平滑化されている。このよ

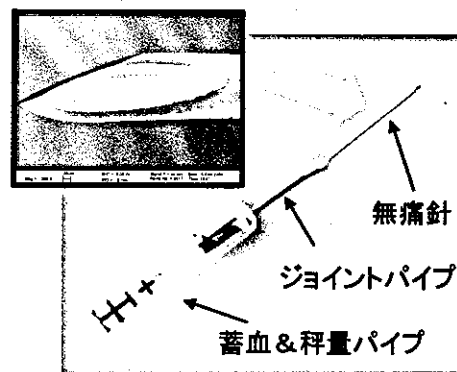


図1 無痛採血モジュール

うに作製した無痛針を図1に示すようにジョイントパイプを介して蓄血&秤量パイプと結合する。この蓄血&秤量パイプに採取した血液を一時的に蓄積し、また同時にこの血液を秤量する。なお、作製した採血モジュールにはすべてガンマ線滅菌処理を施している。

B.2. 血管可視化ならびに血管検知機構

血管可視化機構は体内を伝搬しやすく、無害な近赤外光を採血部位近傍に斜入射したときに再度体外へと放射される像を CCD により結像してディスプレイに表示することで実現する。これにより血管の二次元的な位置を確認する。そして図1に示した無痛針を皮膚に穿刺し、血管へと導いていく。このとき無痛針と皮膚表面間の電圧をモニターしておき、血管内外での電解質濃度等の違いに起因した電圧変化を捉えることにより、針先端が血管に到達したか否かを判定する血管検知機構を実現する。