

(倫理面への配慮)

本申請研究の初期特性確立への実施は物質・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。

C. 研究結果

無痛針モジュールを用いた採血試験は図2に示すように行った。すなわち、被検者の上腕部の静脈より血液を採取するために、その近傍に近赤外LEDをセットしたハウジングを駆血帯とともに設置する。また無痛針の電位測定を行うための対極である電極はこの写真中では前腕部に設置されているが、別段この部位に限らずどこにでも設置可能である。この電圧とCCDカメラにより得られる採血部位の近赤外像はLCDモニタ上にリアルタイムで表示される。

図3に示すようにLCDモニタ上に表示される血管の近赤外像から血管位置を確認して、無痛針を穿刺し、そこへと導いていく。3名に穿刺試験した結果、疼痛を訴えたものはなかった。同時にLCDモニタ上に表示される針の電位は、血管に到達したときに電位が変化する。この電位変化は概ね10~30mV程度であり、SN比としては十分な変化量であり、血管検知機構の指標として用いることができる。このように電位変化により針先端が血管に到達したことを探知したならば、針の侵



図2 採血試験1。

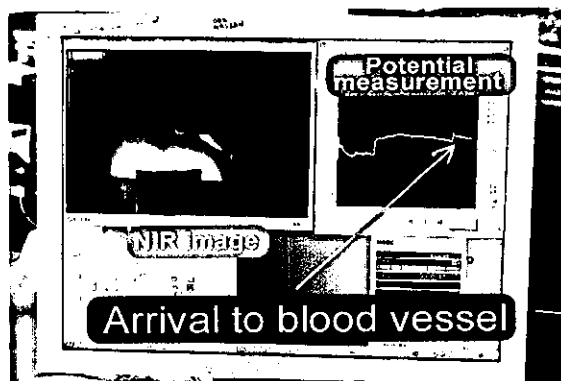


図3 採血試験2(LCDモニタ)。



図4 採血試験3。

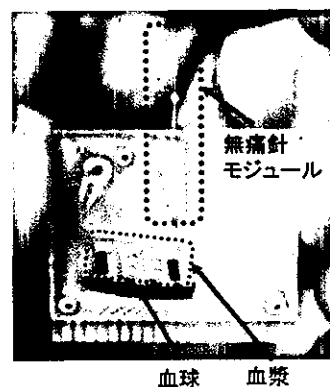


図5 on-chip遠心分離。

入を停止する。すると同時に血液が血圧により蓄血パイプ内へと導かれてくる。図4に示すレベルで採取できた血液量は約 $6\mu\text{L}$ であり、これを採取するに要する時間は概ね10~20秒であった。以上のように無痛針により疼痛なしに採血針を皮下に侵入させ、また血管可視化機構と血管検知機構を援用することで確実に針を血管内へと導き、さらになんらポンプを用いることなく血圧のみで微量の血液を採取することが可能であることが分かった。この成功率はほぼ100%を達成し

ており、これらの機構を用いて無痛自動採血装置が構成できる。

このように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 $100 \mu\text{L}/\text{min}$ 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、 $2\text{mL}/\text{min}$ 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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Kawauchi, Y. Morimoto, S. Sato, T. Arai, K. Seguchi, H. Asanuma and M. Kikuchi, "Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching", *Lasers in Medical Science*, (2004) **18**, 179-183.
2. M. Fujita, Y. Morimoto, M. Ishihara, M. Shimizu, B. Takase, T. Maehara and M. Kikuchi, "A New Rabbit Model of Myocardial Infarction without Endotracheal Intubation", *Journal of Surgical Research*, (2004) **116**, 124-128.
3. N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai and M. Kikuchi, "Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform-infrared spectroscopy", *Cancer Detection and Prevention*, (2004) **28**(1), 32-36.
4. M. Fujita, M. Ishihara, K. Ono, K. Matsumura, Y. Saito, H. Yura, Y. Morimoto, M. Shimizu, B. Takase, S. Ozaki, M. Kikuchi and T. Maehara, "Inhibition of neointimal proliferation in balloon-injured arteries using non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS)", *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, (2004) **43**, 31-38.
5. M. Fujita, M. Ishihara, M. Shimizu, K. Obara, T. Ishizuka, Y. Saito, H. Yura, Y. Morimoto, B. Takase, T. Matsui, M. Kikuchi and T. Maehara, "Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel", *Biomaterials*, (2004) **25**, 699-706.
6. M. Fujita, M. Ishihara, Y. Kusama, M. Shimizu, T. Kimura, Y. Iizuka, S. Ozaki, M. Muraoka, Y. Morimoto, S. Takeshima, M. Kikuchi and T. Maehara, "Effect of modified ultrafiltration (MUF) on inflammatory mediators, coagulation factors, and other proteins in blood after an extracorporeal circuit", *Artificial Organs*, (2004) **28**, 310-313.
7. N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai, K. Takeuchi, M. Yoshioka and M. Kikuchi, "Differences between infrared spectra of normal and neoplastic human gastric cells", *Spectroscopy*, (2004) **18**(1), 59-66.
8. M. Fujita, M. Kinoshita, M. Ishihara, Y. Kanatani, Y. Morimoto, M. Shimizu, T. Ishizuka, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, B. Takase, H. Hattori, M. Kikuchi and T. Maehara, "Inhibition of Vascular Prosthetic Graft Infection Using A Photocrosslinkable

Chitosan Hydrogel”, *Journal of Surgical Research*, (2004) **121**, 135-140.

10. 尾崎重之、菊地眞、岩崎清隆、守本祐司、人工弁の最近の進歩、*バイオマテリアル-生物材料-*、(2004) **22**(2)、89-98.
 11. S. Kawauchi, S. Sato, Y. Morimoto and M. Kikuchi, “Correlation Between Oxygen Consumption and Photobleaching During In Vitro Photodynamic Treatment with ATX-S10.Na(II) Using Pulsed Light Excitation: Dependence of Pulse Repetition Rate and Irradiation Time”, *Photochemistry and Photobiology*, (2004) **80**(2), 216-223.
 12. W.-Dong Jang, N. Nishiyama, G.-Dong Zhang, A. Harada, D.-Lin Jiang, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, and K. Kataoka, “Supramolecular Nanocarrier of Anionic Dendrimer Porphyrins with Pegylated Cationic Block Copolymer to Enhance Intracellular Photodynamic Efficacy”, *Angewandte Chemie International Edition*, (2004), in press.
2. 学会発表
1. 藤田真敬、守本祐司、石原雅之、志水正史、前原正明、菊地眞、“非挿管下、新しいウサギ心筋梗塞慢性モデルの開発”、第 49 回防衛衛生学会 (東京) .
 2. 藤田真敬、石原雅之、守本祐司、志水正史、前原正明、菊地眞、“光硬化性キトサン担体 FGF-2 徐放化による虚血性心疾患外科治療の補助療法の可能性”、第 34 回日本心臓血管外科学会総会(福岡).
 3. M. Fujita, Y. Morimoto, M. Ishihara, M. Shimizu, B. Takase, T. Maehara and M. Kikuchi, “New Rabbit Model of Myocardial Infarction without Endotracheal Intubation”, 第 68 回日本循環器学会(東京).
 4. 藤田真敬、石原雅之、守本祐司、志水正史、前原正明、菊地眞、“キトサンハイドロゲル担体 FGF-2 徐放化によるラット下肢虚血モデルにおける血管再生療法”、第 32 回日本血管外科学会 (東京) .
 5. 守本祐司、神山信也、中井完治、草野正一、菊地眞、“血管平滑筋に対する B 領域紫外線 (UV B) の影響 “、第 43 回日本 ME 学会(金沢).
 6. 守本祐司、藤岡直子、菊地眞、“赤外分光分析を用いた迅速胃癌診断法”、第 43 回日本 ME 学会(金沢).
 7. 岩崎清隆、尾崎重之、中澤剛、今井裕一、川井貴裕、石原雅之、大関泰宏、守本祐司、菊地眞、“海老根東雄、梅津光生革新的動的バイオリアクター技術による再生・自己化促進型組織大動脈弁の開発”、第 43 回日本 ME 学会(金沢).
 8. 川内聡子、守本祐司、佐藤俊一、阪田功、竹村健、中島進、菊地眞、“パルス光照射を用いた Photodynamic therapy における酸素拡散の効果：殺細胞効果の繰り返し周波数依存性に関する検討”、第 43 回日本 ME 学会(金沢).
 9. 川内聡子、佐藤俊一、守本祐司、阪田功、竹村健、中島進、菊地眞、“高強度パルス光励起を用いた ATX-S10・Na(II)による PDT の殺細胞機序”、第 14 回日本光線力学学会 (鳥取) .
 10. Y. Morimoto, K. Matsumura, S. Kawauchi, Y. Nakagishi and M. Kikuchi, “Up-regulated genes indicating a biphasic pattern are critical for cytotoxicity of PDT”, 32th Annual meeting of the American Society for Photobiology (Seattle).
 11. Y. Nakagishi, Y. Morimoto, S. Kawauchi, W.-Dong Jang, N. Nishiyama, Y. Ozeki, K. Kataoka and M. Kikuchi, “A study of photodynamic therapy using dendrimer phthalocyanine encapsulated

macromolecular polymeric micelle”, 32th Annual meeting of the American Society for Photobiology (Seattle).

12. 守本祐司、藤岡直子、菊地眞、“分子指紋領域”赤外光による癌の迅速診断技術“、第 18 回日本 ME 学会秋期大会(松山).

13. 守本祐司、菊地眞、“ナノ粒子を用いた非蛍光細胞標識技術の基礎的検討”、第 25 回日本レーザー医学会総会(東京).

14. 守本祐司、中岸義典、川内聡子、張祐銅、西山伸宏、尾関雄一、前原正明、片岡一則、菊地眞、“光増感剤内包高分子ミセルを用いた光線力学的治療の担癌マウスに対する効果“、第 25 回日本レーザー医学会総会(東京).

15. 中岸義典、守本祐司、川内聡子、張祐銅、西山伸宏、尾関雄一、前原正明、片岡一則、菊地眞、“新規バイオメテック高分子材料による光線力学的治療“、第 25 回日本レーザー医学会総会(東京).

F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ドライ比色診断チップシステム技術に関する研究

分担研究者 小川 洋輝

研究要旨

ドライ比色診断チップシステム構築のための特に光学検出系の基礎的検討を行った。最適光路長は 3 乃至 5mm であることを明らかにするとともに、光の導入、導出法などの問題点の抽出を行った。

A. 研究目的

ドライ比色診断チップは、血液、緩衝液等の種々の溶液の“容器”としてのチップ自体はもちろんのこと、光学的測定、自動搬送、微量薬液注入などを司る外部システムも非常に重要であり、当該外部システムの要請により、当然チップ構造も制約を受ける可能性があることからチップとともに並行して研究開発を進めなければならない。本研究では診断チップシステムの心臓部である吸光度測定システムの評価系を試作し、実際にチップ上の微小セルでの測定を行い、システム構築のための基礎的な指針を得た。

B. 研究方法

ドライ比色診断チップにおいて吸光度測定を行う光の波長域は 340nm~600nm と紫外域から可視光域まで広い範囲に及んでいる。光源としては可視光域には白色であるハロゲンランプを、紫外域には重水素ランプを用いた。これらの光源から放射された光は光ファイバを介してチップ近

傍まで伝搬させ、バンドパスフィルタを通過させて所望の波長の光のみ抽出した後にチップ上の測定セルへと導入する。そしてそこを透過した光はチップ外部へと伝搬させて再度光ファイバに入射してフォトダイオードを検出器とする分光器(浜松ホトニクス(株)製)へと導かれる。図1に構成した光学系の外観を示す。なお、チップをセットするステージ上にはペルチェ素子が設置されており、血漿と試薬の混合したものの反応条件である 37°C に調節できるようになっている。

評価用のチップは血漿と試薬のミキシング流路と測定用のセルから構成される。(図2)ここでは例として γ -GTP の検査を従来の SSCII 法を擬似的にドライ法へと応用した手法を用いて行った。すなわち通常は L- γ -グルタミル-4-ニトロアニリドとグリシルグリシンの混合溶液に血清(γ -GTP)を混合したときの 4-ニトロアニ

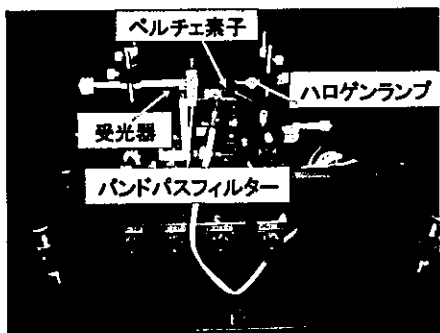


図1 測定光学系

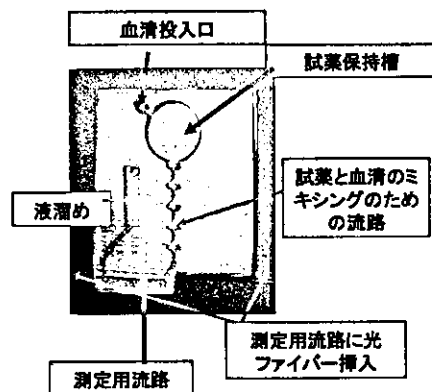


図2 試作チップ(γ -GTP 検査用)

リドの吸収(405nm)をレートアッセイする。ここでは本方法をドライ化するために、はL-γ-グルタミル-4-ニトロアニリドとグリシルグリシンの混合液中にゼラチンを添加し、これを図2中の試薬保持槽に入れて水分を蒸発乾燥させ試薬をチップ内に保持する。使用時には、まず血清投入口より水を所定量、試薬保持槽に導き、試薬を溶解し、その後に同じく血清投入口より血清を所定量投入して、図2のチップの下部方向に遠心力が印加されるようにチップを回転させ、血清と試薬溶液とともにミキシング流路を経て測定セルへと導かれる。そこで光ファイバを介して外部光学系とチップ上の測定セルとを結合し、透過測定を行う。

(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。

C. 研究結果

まず、チップに結合する光ファイバ径と光路長の検討を行った。通常のSSCCH法での推奨光路長(セル長)は10mmであるので図2のセル長もそのようになるように0.5mmφの光ファイバの位置を調整して設置した。しかしながらこのような場合、セル内に溶液がない場合においても十分な光量を得ることができなかつた。その理由は光路長が長いために途中でセル外部へと光が漏洩していき、ということが考えられた。これに関しては以前の研究でも問題となっており、これを抑制するためにセル内壁表面をアルミニウムで被覆して光の漏洩を遮断していたが、これはスパッタリングによるアルミニウムの成膜と化学機械研磨(CMP)による局所的なアルミニウムの除去という煩雑な工程によって作製していたので、今回はまず光路長の最適化を行うことを試

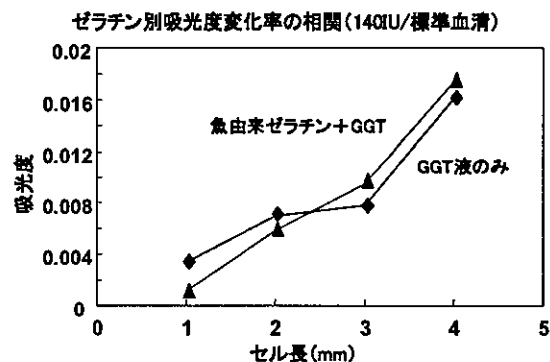


図3 140 IU γ -GTP を GGT で反応させたときの吸光度のセル長依存性。GGT 液のみの場合と GGT を魚由来ゼラチンで凍結させた場合。

みた。その結果、反応試薬の吸光度は光路長が3mm乃至5mmあれば許容できるSNでの吸光度測定が可能であることが様々な光路長を有するセルを用いた検討から明らかになった。(試薬は γ -GTP, GOT, GPT用のものを使用) 図3には一例として γ -GTP濃度が140 IUの標準血清を様々な光路長のセル内で試薬と反応させたときの吸光度変化率を示している。ノイズレベルは吸光度で0.001ほどであったので、光路長が3乃至5mmあればSNは許容レベルとなることが分かる。

次に実際にチップ上のセルにおいて光ファイバ間の距離を3mmとしたときの吸光度の変化を図4に示す。吸光度は時間とともに増加していき、このときの傾きが γ -GTP濃度に比例することに

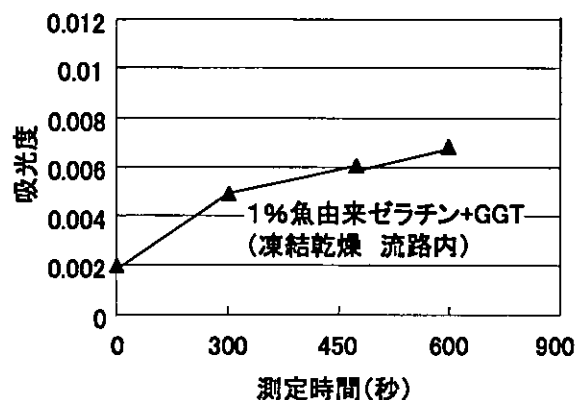


図4 γ -GTP(140 IU)をチップ流路内に1%魚由来ゼラチンで固定化したGGTと反応させたときの吸光度の経時時間変化。

なる。これよりよい直線性が得られていることが分かる。なお本実験系における光ファイバの径は1mmであった。

以上のように光路長を短くすることが可能であることは分かったが、新たな問題が生じた。それは光導入ならびに導出に用いている光ファイバとチップの接続部に必ずデッドスペースがあり、そこには血清を含む溶液が入り込めないために空気が残留し、それが測定時にセル内へと移動した結果、セル長が微妙に短くなってしまふということがたびたび起こるということである。我々が光ファイバを導入した動機は紫外光を伝送できる（石英製）ということであったが、本問題に関しては作りやすさなどのコスト、チップ構造を含めて検討していく。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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

1. 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**(2004) 81-85.

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堀池靖浩、 沖 明男 (分担)	比色チップ		ナノバイオ事典	テクノシ ステム	東京	2005	in press
沖 明男、 小川洋輝、 堀池靖浩 (分担)	ヘルスケア チップ創製 プロセッシ ングの基盤 技術	石原一彦	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	東京	2004	133-140

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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)	837-843	2004
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)	555-560	2004
H. Koda, C.C-Hsien, A. Oki, H. Ogawa and Y. Horiike	Biosensing with Dry Chemistry in Microchannel	Proceedings of 4th Asian International Symposium on Biomaterials		220-221	2004
M. Takai, S. Shinbashi, H. Ogawa, Y. Horiike and K. Ishihara	Biocompatible Microglucose Sensor with Newly Designed Phospholipid Polymer for Healthcare Chip	Proceedings of 4th Asian International Symposium on Biomaterials		228	2004
C.C-Hsien, M. Nagai, H. Ogawa, S. Shinbashi, H. Hisamoto and Y. Horiike	Development of Ammonia sensor	Proceedings of 4th Asian International Symposium on Biomaterials		229	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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		0-28	2005
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
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
堀池靖浩	無痛針採血による在宅健康診 断チップ	自動車技術	58(7)	116-117	2004
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
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
堀池靖浩	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		23-26	2004
堀池靖浩、甲田裕 子、小川 洋輝	ドライ比色法による微量血液 分析在宅診断チップ	ナノメディシン研究成 果発表会要旨集		27-28	2005
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	737-743	2004
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	112-118	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	2004
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)		127	2004



Development of healthcare chips checking life-style-related diseases

Akio Oki^a, Hiroki Ogawa^a, Masao Nagai^a, Satomi Shinbashi^a, Madoka Takai^c,
Akinori Yokogawa^b, Yasuhiro Horiike^{a,*}

^a*Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan*

^b*ROHM Co., Ltd., 21, Saiin Mizosaki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 615-8585, Japan*

^c*Department of Material Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan*

Received 27 July 2004; received in revised form 1 August 2004; accepted 11 August 2004

Abstract

We investigated biochips that provide a home medical diagnosis as an application of miniaturized analysis systems. As the objective, an electronic blood collection system employing a painless needle was developed. Both the healthcare chip and hepatic function examining chip were studied based on the introduction of plasmas separated from a trace amount of blood. The former electrochemically measures pH, Na⁺, K⁺, glucose and BUN, and the latter measures the γ -GTP, GOT and GPT using a colorimetric analysis. The fluids of the blood in the micro-channel were controlled by centrifugal force. These chips are useful for checking life-style-related diseases.

© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Healthcare chip; Hepatic function examining chip; Electrochemical; Colorimetric analysis; Mixer; μ -TAS

1. Introduction

It has become a serious issue in Japan that the recent increase in the aging society with fewer children especially increases the medical cost for person of advanced years. Prevention is important for them in order to live a healthy life. To realize such a society, we have to urgently establish biosensing technologies which allow simultaneous diagnosing of multiple items while at home. As the objective of the research field is called micro-Total Analytical System (μ -TAS) or Lab-on-a-chip [1–3], a large expectation is being placed for the development of various clinical chips for the quick diagnosis by a doctor at the patient's bedside, and in addition, a person's self examination at home.

Especially, we have to prevent kidney trouble and liver disease which are known as representative life-style-related diseases, which cause often serious illnesses. For this goal, in

this report, our recent development situations are described for a healthcare chip [4–6] and a hepatic function examining chip [7,8].

2. Healthcare chip

2.1. Painless needle

The healthcare chip enables us to check our health/disease condition by analyzing multi components in a trace amount of blood. First, the needle collecting the blood should be painless. A stainless (SUS) tube 150 μ m in diameter and with a 80 μ m bore was used because the thin tube reduces cutting the nerves in the skin. The tube surface was hardened by plasma nitridation. The edge of the tube was polished at 10° and the chip with three planes was fabricated as shown in Fig. 1. Finally, the tip was electrochemically polished in a phosphoric acid solution. In addition, the inner wall of the tube was also polished. A SEM photograph after

* Corresponding author.

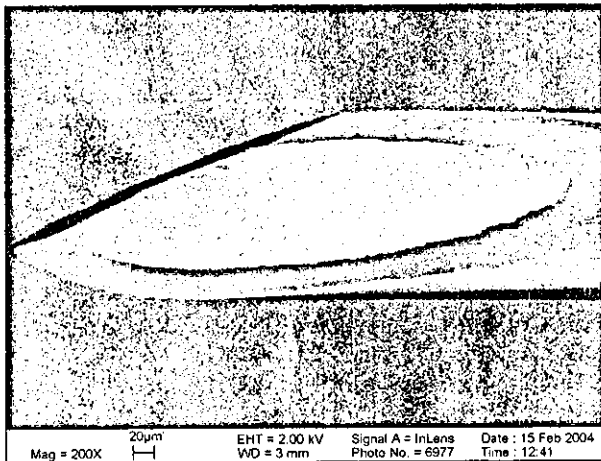


Fig. 1. Photograph of the tip of the painless needle.

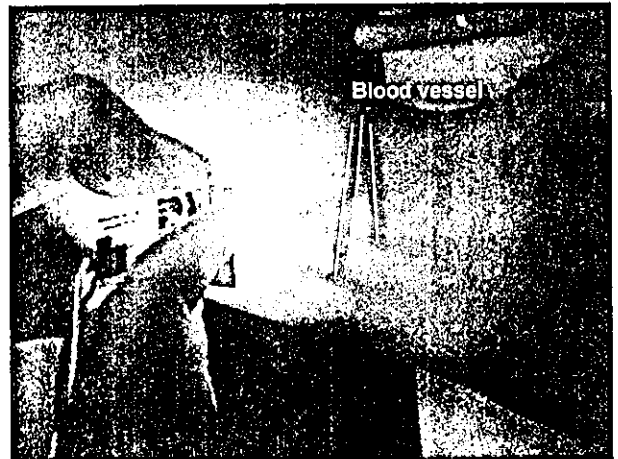


Fig. 3. IR image of veins irradiated by IR light emitting diode array.

polishing shown in Fig. 2(b) shows the smooth surface like a mirror as compared with a jagged feature shown in Fig. 2(a).

The needle did not cause any pain but skill was needed to pierce the needle into the blood vessel through the muscle, because we frequently lost sight of the vein and did not have information on its location from the skin surface. Therefore, the position of the blood vessel was visualized using an array of near infrared (NIR) light emitting diode with a wavelength of 850 nm as shown in Fig. 3. Furthermore, measurement of the potential between the skin and the blood vessel surfaces allowed detecting the depth of the blood vessel, where one terminal was an electrode which was pasted on the skin surface and elapsed time for the piercing of the needle into the arm (Fig. 4). When the needle did not hit the blood vessel, the potential did not change, while it drastically dropped once it touched the blood vessel surface. Fig. 5 shows photographs demonstrating the collection of the blood with the needle and the needle assembly after collecting the blood. This man, who was collecting his blood, did not look at his own arm, but observed a display in which the position of the blood vessel was imaged by the NIR irradiation and the potential change was monitored during

piercing of the needle. The blood flows out due to his own blood pressure without a pump after the needle pierces the blood vessel, because the inner surface of the needle is extremely smooth. Indeed, this may be called electronic blood collection [8].

2.2. Healthcare chip operation

Fig. 6(a) and (b) shows photographs of the recently developed healthcare chip, where (a) shows the chip before inserting the needle assembly, and (b) shows introduction of the blood to the biosensor region. The chip is fabricated by bonding two plates. One is the channel pattern which is printed on a 27×24×1.5 mm polycarbonate plate using an injection mold method. The other is the electrode pattern screen-printed one on a 27×27×1.5 mm polyester plate. In this state, when the chip is rotated around the 1st rotation axis of ×1, the centrifugal force introduces a calibration solution into the channels equipped with biosensors. After calibration, the rotation around the 2nd rotation axis of ×2 conveys

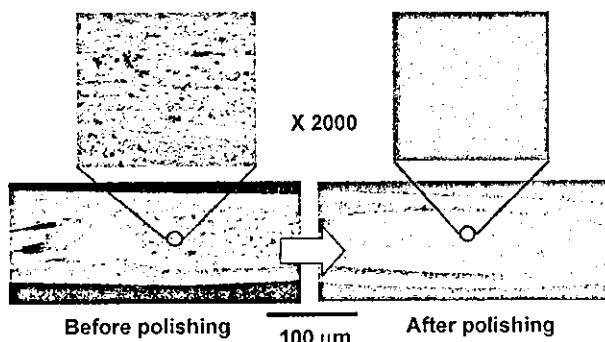


Fig. 2. SEM photograph before and after polishing the SUS needle.

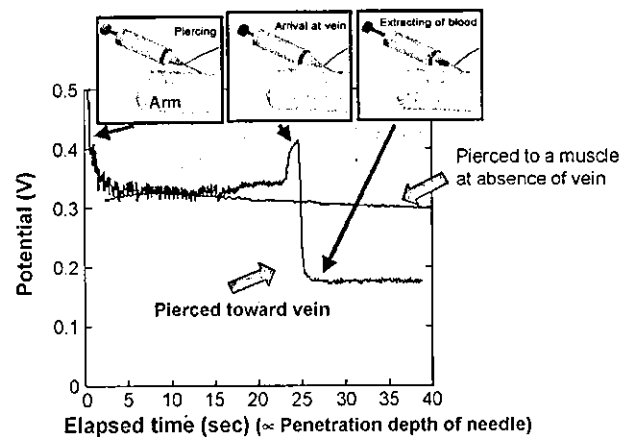


Fig. 4. Potential between the skin surface and the needle vs. elapsed time of piercing the needle.

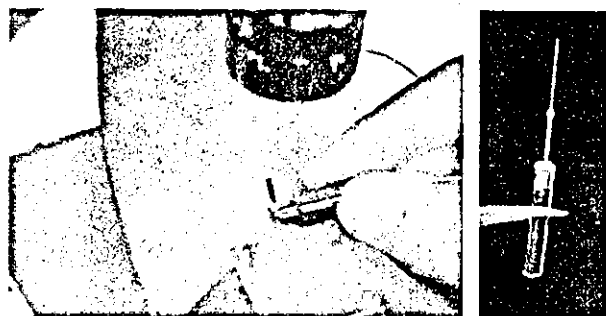


Fig. 5. Photograph of the blood collection with the needle and the needle assembly after collecting the blood.

the solution to a waste channel. Subsequently, the needle assembly filled by the blood is inserted into the top of the chip. The rotation around the 1st rotation axis of $\times 1$ introduces the blood to the biosensor channels and simultaneously separates the blood into plasmas in the upper regions of the channels and blood cells to the bottoms of the channels as shown in Fig. 6(b). The biosensor surfaces are covered by plasmas, thus measuring the following components.

2.3. Biosensors and measurements

We plan to measure the pH and concentrations of Na^+ , K^+ , glucose, BUN (blood urea nitrogen), creatinine and lactate. These items are measured by an electrochemical method. Fig. 7 shows a photograph of part of the electrodes printed on the polyester plate. Carbon electrodes and KCl saturated Ag/AgCl reference electrodes were formed on carbon–silver wires. The Ag/AgCl layer was also a screen-printed. A Teflon membrane was coated on the AgCl surface to protect the AgCl from dissolving in the electrolyte. These membranes were coated using an automatic dispenser. The ion or enzyme sensitive membranes were coated on the carbon electrodes. The membrane structures for measurement of the pH, Na^+ , K^+ , glucose and BUN are listed in Table 1. Bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-

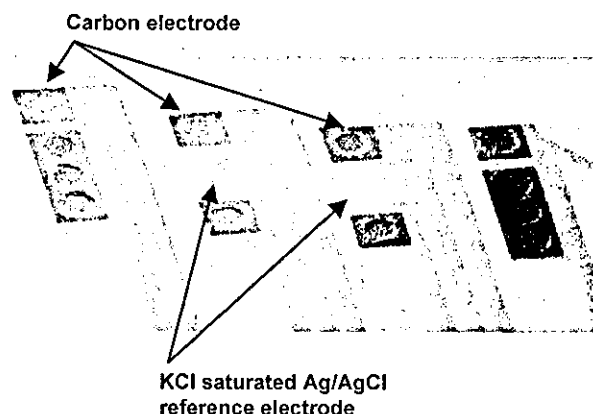


Fig. 7. Photograph of electrodes printed on a polyester plate.

methylmalonate and bis[(benzo-15-crown-5)-4-methyl]pimelate were used for Na^+ and K^+ ionophores. The selectivities of $\text{Na}^+/\text{K}^+=10^2$ and $\text{K}^+/\text{Na}^+=10^3$ are obtained due to the adequate anion exclusion agents shown in Table 1.

Fig. 8 shows the measurement results of the Na^+ and K^+ ions regarding their concentrations. The concentrations of the Na^+ and K^+ ions in human plasma are slightly lower than those in PBS (phosphate buffer solution), which are 144 and 4.2 mmol dm^{-3} , respectively, while the reliability of the sensors is considered to be satisfactory for actual use. The BUN and glucose concentrations were measured using calibration curves whose data were obtained by the on-chip measurement as shown in Figs. 9 and 10 [9].

Since the present BUN measurement follows the reaction of NH_2CONH_2 (urea) + $2\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4 + \text{HCO}_3^-$ in the presence of urease, urea is measured by the decrease in the proton (H^+). However, many protons exist in blood. Therefore, we are now developing a detection method of ammonia ions in urea. Creatinine is not measured yet, because ammonia ions generated from creatinine and intrinsic urea present in the blood have to be separated

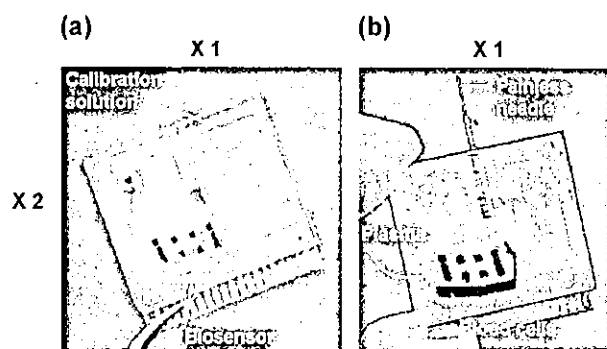


Fig. 6. (a) Photographs of the healthcare chip before inserting the needle assembly. (b) Photographs of the healthcare chip after centrifugal introduction of the blood from the needle assembly to the biosensor region.

Table 1
Composition of the ion selective and enzyme membranes

pH	Non-conductive poly-pyrrole (PPy)
Na^+	Na^+ ionophore (bis[(12-crown-4)methyl]-2 dodecyl-2-methyl malonate), plasticizer (2-nitrophenyl)dodecyl ether (NPOE), anion-exclusion agent (K-TCPB) and poly vinyl chloride (PVC)
K^+	K^+ ionophore (bis[(Benzo-15-crown-5)-4-methyl] pimelate), plasticizer (NPOE), anion-exclusion agent (K-TCPB) and PVC
BUN	Immobilized urease by poly-ion-complex method/ non-conductive PPy
Glucose	Immobilized glucose-oxidase by poly-ion-complex method/ferrocene

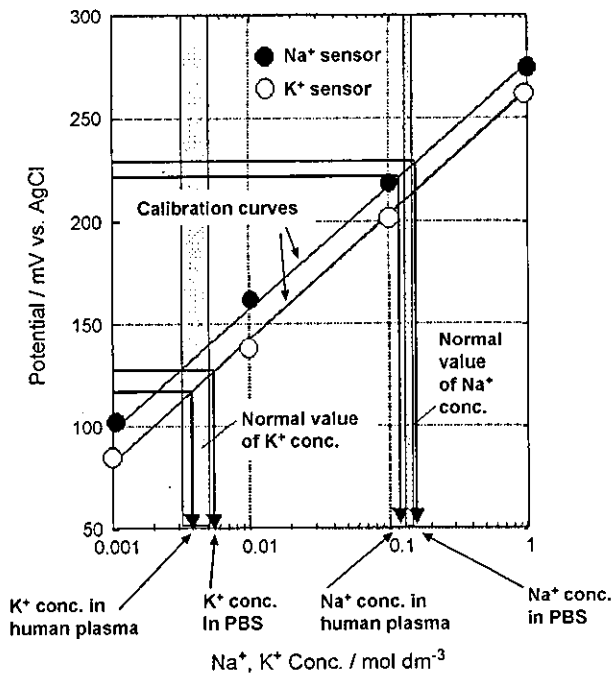


Fig. 8. On-chip measurement results of Na⁺ and K⁺ ions.

[10]. The ammonia ion detection will be used for the measurement of creatinine.

3. Hepatic function chip

3.1. Mixer

The hepatic function chip measures the three enzymes of γ -GTP, GOT and GPT, which flow into the blood from liver

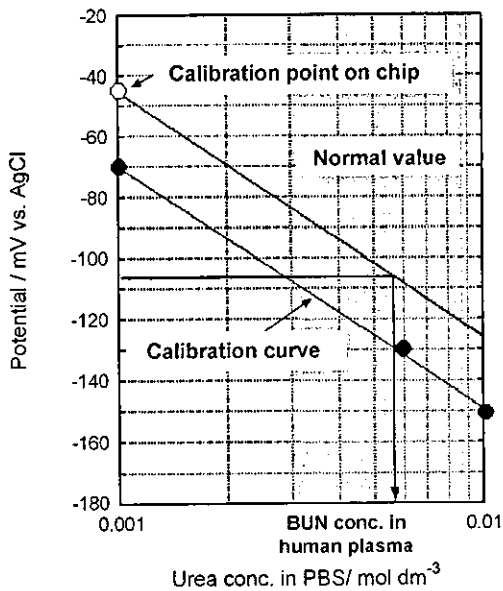


Fig. 9. On-chip measurement results of BUN.

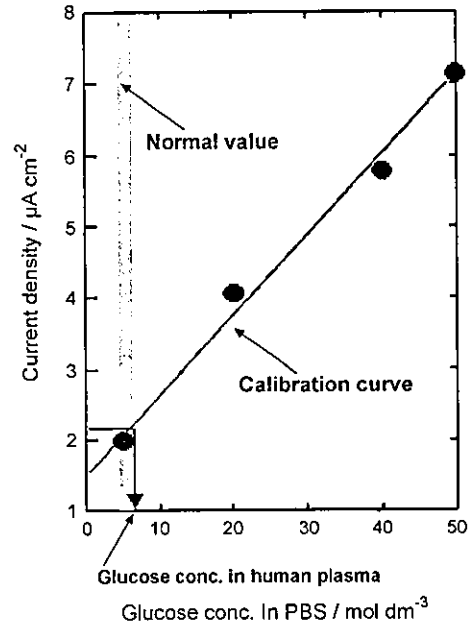


Fig. 10. On-chip measurement results of glucose.

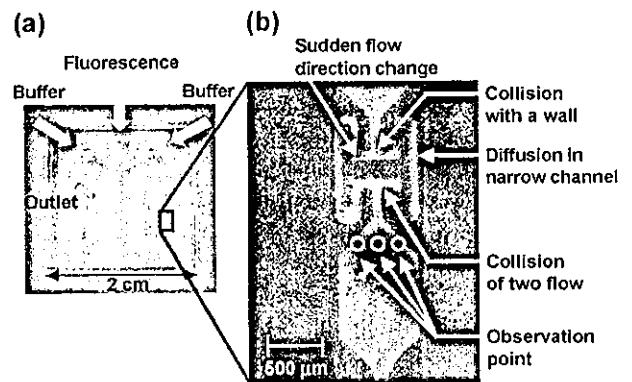


Fig. 11. (a) Experimental chip with multi-stage mixing chambers. (b) Mixing chamber connected to an observation chamber.

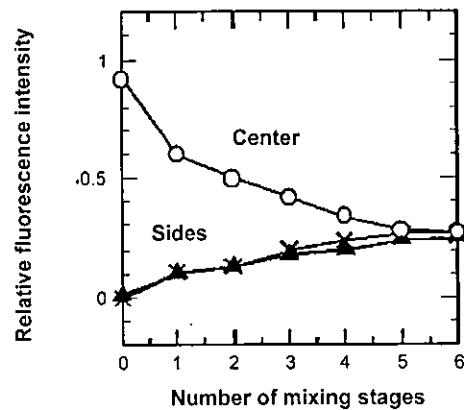


Fig. 12. Relative fluorescence intensity at three positions in the observation chamber shown in Fig. 11(b) vs. the number of mixing stages for the flow rate of 10 μ L/min.

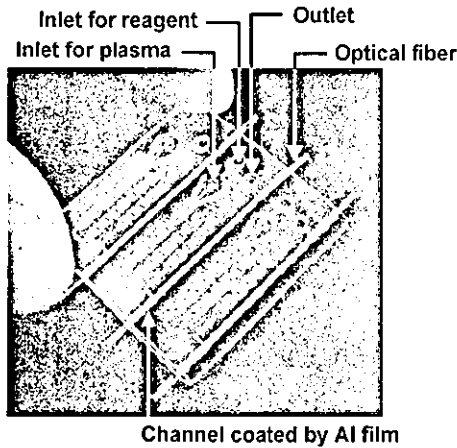


Fig. 13. Chip measuring three components for hepatic functions.

cells destroyed by a liver infection. The measurement method used a colorimetric analysis. This method requires good mixing of the plasma or serum with a substrate buffer solution. In general, however, the mixing is not easy in the microfluidics which are dominated by a laminar flow. So far, a lot of studies have been reported in the field of the microTAS [11]. We have also developed a novel mixer for the hepatic function examining chip.

Fig. 11(a) and (b) shows an experimental chip with multi-stage mixing chambers and a mixing chamber connecting to observation chamber, respectively. The inlet

consists of three channels with the middle one for a fluorescence reagent (FITC) and both sides for PBS. The channel width ratio of the middle to both sides was 1 to 10. As shown in Fig. 11(b), the mixture collides with a wall and then its flow direction is suddenly changed at a corner. The diffusion of molecules is also promoted in the narrow channels. The process is sequentially repeated for six stages. Fig. 12 shows the relative fluorescence intensity at three points in the observation chamber (see Fig. 11(b)) vs. the number of mixing stages at the flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Complete mixing occurred in the 6th chamber over a wide range of drawing velocities.

3.2. Chip fabrication and measurement

Fig. 13 shows a chip examining three components for hepatic functions. Since an incident light should propagate with minimal loss of the light for colorimetry, an Al film was coated on the inner walls of the channels as follows: (1) Channel patterns with a half depth were fabricated using a SU-8 resist and then molded on two PET plates. (2) The Al film was sputter-deposited on the surfaces with the channel pattern of both PET (polyethylene terephthalate) plates. (3) The Al film deposited on the upper PET surface was removed by chemical mechanical polishing (CMP) and both plates are thermally pasted together. Optical fibers were inserted into the inlet and outlet of the channel.

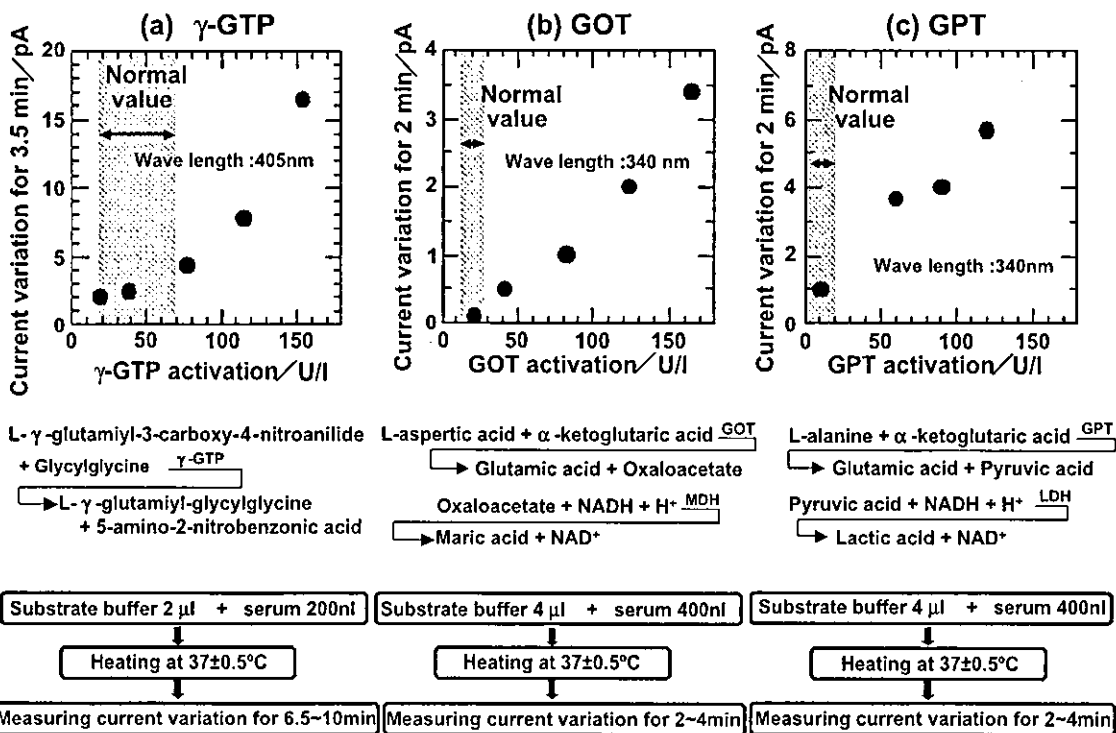


Fig. 14. (a, b and c) Calibration curves obtained for γ -GTP, GOT and GPT activities.

The temperature of the chip was maintained at 37 °C using a Peltier element. Lights of 340 and 405 nm, which were generated by the band-pass filtering of a D₂ lamp, were detected with a photodiode through the measurement channels. The plasmas to be mixed were obtained by the centrifugal separation of the blood. Fig. 14(a), (b) and (c) shows the obtained calibration curves for the γ -GTP, GOT and GPT activities. The photocurrent changes during 3.5, 2 and 2 min were measured for γ -GTP, GOT and GPT, respectively. The measurement methods and reagents are listed in each figure. Abnormal values as well as the normal ones were successfully measured [7].

3.3. Chip integrating plasma separation, metering, mixing and measurement

The colorimetric analysis method needs a wide range mixing ratios of 1:10–40. In the experiment for the chip shown in Fig. 13, the amounts of the serum and the substrate buffer were correctly measured in advance. Therefore, a series of processes for the plasma separation, the metering, the mixing and the measurement has to be integrated into one chip for practical use. Fig. 15 shows a photograph of an integrated chip developed for the one item measurement of γ -GTP. This processing is as follows: (1) The blood is introduced into one end of a U-shape channel. The rotation of the chip around the 1st rotation axis of $\times 1$ separates the blood into the plasma in the U-shape channel and the blood cells into a storage portion at the bottom of this channel. (2) The chip is rotated counterclockwise at 90° and the rotation around the 2nd rotation axis of $\times 2$ introduces the plasma into the metering chamber. The residual plasma is simultaneously removed to the waste portion. (3) The chip is returned clockwise at 90° to the original position. The strong rotation of the chip around the 1st rotation axis of $\times 1$ conveys the metered plasma to the substrate buffer

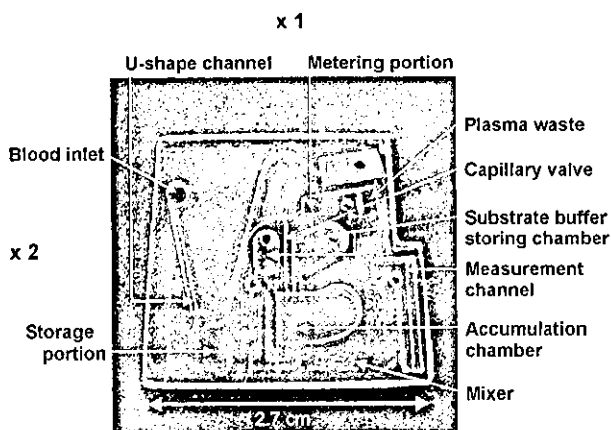


Fig. 15. Photograph of an integrated chip.

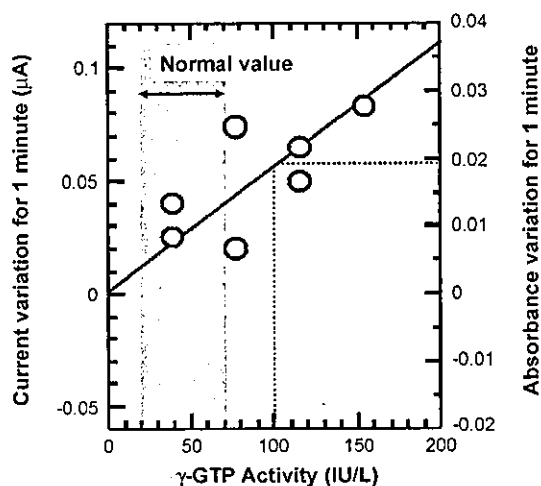


Fig. 16. Calibration curve of γ -GTP by the integrated chip.

solution storing chamber through the capillary valve. (4) The plasma and the substrate buffer stored in the accumulation chamber are drawn into the mixing channel by aspiration from an outlet of a measurement channel and subsequently into the measurement chip. (5) 405 nm light is transmitted to the measurement channel.

Fig. 16 shows a calibration curve of γ -GTP. The measurement was carried out using the rate assay method, where variations in a detector current and absorbance during 1 min are plotted. Although scattering of the values are seen, the calibration curve is obtained for a wide range of γ -GTP activities. We are now developing a chip system to simultaneously measure three items.

4. Conclusion and future prospect

To establish the home medical diagnosis, the electronic blood collection system necessary for this goal as well as the healthcare chip checking Na⁺, Ka⁺, BUN, etc., and the hepatic function examining chip for γ -GTP, GOT and GPT have been studied. However, we have some issues of utilizing both chips for personal diagnosis at home. One is the higher hardness of the needle to collect the blood at a 100% reliability. Furthermore, BUN and creatinine sensors by measuring ammonia ions and the simultaneous measurement of three items including γ -GTP, GOT and GPT have to be developed. These measurements will lead to recognizing kidney trouble, diabetes and liver disease when the home medical diagnosis is realized by various biochips and the diagnostic data are communicated to clinical systems through a medical network, and not only medical treatment but also the society system are expected to be significantly changed.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Japan Science and Technology Promotion Association (JST) for a grant to study the development of the healthcare chip.

References

- [1] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (12) (2002) 2623.
- [2] P. Auroux, D. Iossifidis, D.R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (12) (2002) 2637.
- [3] R. Edwin Oosterbroek, Albert van den Berg (Eds.), *Lab-on-a-Chip Minaturized System for (Bio)Chemical Analysis and Synthesis*, Elsevier B.V., The Netherland, 2003.
- [4] A. Oki, S. Adachi, Y. Takamura, K. Ishihara, H. Ogawa, Y. Ito, T. Ichiki, Y. Horiike, *Electrophoresis* 22 (2001) 341.
- [5] A. Oki, M. Takai, H. Ogawa, Y. Takamura, T. Fukasawa, J. Kikuchi, Y. Ito, T. Ichiki, Y. Horiike, *Jpn. Appl. Phys.* 42 (2003) 3722.
- [6] A. Oki, H. Ogawa, Y. Takamura, Y. Horiike, *Jpn. Appl. Phys.* 42 (2003) L342.
- [7] A. Yokogawa, A. Oki, T. Shimasaki, H. Takasu, Y. Horiike, *Proc. μ TAS2003, Squaw Valley, USA, 2003*, p. 895.
- [8] H. Ogawa, M. Nagai, J. Kikuchi, Y. Horiike, *Proc. μ TAS2003, Squaw Valley, USA, 2003*, p. 741.
- [9] M. Takai, S. Shinbashi, H. Ogawa, A. Oki, M. Nagai, Y. Horiike, *Proc. μ TAS2003, Squaw Valley, USA, 2003*, p. 403.
- [10] H. Suzuki, Y. Matsugi, *Sens. Actuators, B* 98 (2004) 101.
- [11] N.-T. Nguyen, S.T. Wereley, *Fundamentals and Applications of Microfluidics*, Artech House, Boston, 2002, p. 394.

高分子論文集

別刷

KOBUNSHI RONBUNSHU

*Japanese Journal of
Polymer Science and Technology*

Volume 61 Number 10 2004

高分子論文集 (Kobunshi Ronbunshu), Vol. 61, No. 10, pp. 555–560 (Oct., 2004)

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

高井 まどか*¹・新橋 里美*²・小川 洋輝*²
長井 政雄*²・石原 一彦*¹・堀池 靖浩*³



高分子学会

THE SOCIETY OF POLYMER SCIENCE, JAPAN

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

高井 まどか*¹・新橋 里美*²・小川 洋輝*²
長井 政雄*²・石原 一彦*¹・堀池 靖浩*³

(受付 2004 年 6 月 14 日・審査終了 2004 年 8 月 27 日)

要 旨 極微量な血液から日々の健康状態を診断する多項目同時測定ヘルスケアチップにおいて、グルコース測定に用いる血しょうは、数十 nL 程度となる。このような微量な血しょう中の微量グルコース濃度を高感度・高精度に測定するためのマイクログルコースセンサーを創製した。メディエーターとして用いたフェロセン粒子を、高密度に電極表面に分散させることにより電極間のバラツキを抑制できた。またフェロセンの分散媒体としてポリビニル系樹脂を用いることで、高濃度領域まで測定可能となった。酵素固定化に用いたポリイオンコンプレックス層を多層化することにより固定化酵素量が増加した。これにより出力電流値が増大し、S/N 比の高い分析が可能となった。また MPC-co-BMA ポリマーにより被覆を行うことにより、タンパク質のセンサー表面への付着を抑制でき、微量血しょう中のグルコース分析が可能となった。

1 緒 言

代表的な生活習慣病である糖尿病は、薬による治療が効果的でなく、さらに初期段階においては自覚症状があまりないため、治療をうける機会を逸してしまいがちである。そのため合併症を引き起こしやすく、最終的には直接命にかかわる危険を伴う。しかし、自覚症状のない初期段階において早期発見が行えれば、生活習慣の改善により完治する可能性が高いことが知られている。糖尿病の指標である血糖値は、健康な人なら食後ただちに追加分泌されるインスリンにより 30 分前後をピークとして下がる。糖尿病になりはじめの人は、インスリン分泌能力が低下しているため食後の血糖値の下がりが遅くなる。つまり食後の血糖値検査により糖尿病の初期段階を早期に発見できれば、糖尿病は生活習慣を改善することで予防できることになる。このような背景から在宅診断を目的とした医療用血糖値センサーは、すでに数社から販売されている。

筆者らは現状の血液分析装置と比較し、より微量な血液から、日々の総合的な健康状態を在宅で診断可能な小型のヘルスケアチップおよびシステムの開発を目的に研究を行っている^{1),2)}。在宅で日々の健康診断を行う装置

は、測定の手軽さ(短時間測定、小型な測定装置および検査用チップ)に加え安価であることが要求される。そこで本研究において、以前報告したヘルスケアチップ²⁾(測定項目: pH, Na⁺, K⁺)に用いられていた高価なイオン選択性電界効果型トランジスタ(ISFET)電極を安価な印刷カーボン電極へ変更し、さらに血糖値(血中グルコース)、血中尿素窒素(BUN)の項目を加えた同時多項目測定ヘルスケアチップの開発を行った。開発したヘルスケアチップは、測定項目すべてを同時に電気化学的に行うようにデザインされている。グルコース濃度は電流値計測、pH, Na⁺, K⁺, BUN(反応生成物の pH を測定)濃度の計測は電位差計測である。電流値測定を行うセンサーは、電位測定と比較し、出力特性が電極表面積に大きく依存する。したがって、多項目血液分析用のヘルスケアチップに用いるマイクロサイズのグルコースセンサーの特性は、血液中のタンパク質・細胞などが電極表面へ非特異的吸着することにより劣化することが容易に懸念される。そこで、無痛針から採血された数マイクロリットル以下の微量血液から、高感度・高精度分析の実現を目的として、ヘルスケアチップに用いるマイクログルコースセンサーについて検討した。

2 実験方法

2.1 チップ作製方法

Figure 1 にヘルスケアチップの作製工程を示す。基板材料は、2 cm 角のポリエチレンテレフタレート(PET)

*1 東京大学大学院工学系研究科(☎113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

*2 科学技術振興事業団(☎332-0012 川口市本町4-1-8)

*3 (独)物質・材料研究機構(☎305-0044 つくば市並木1-1)

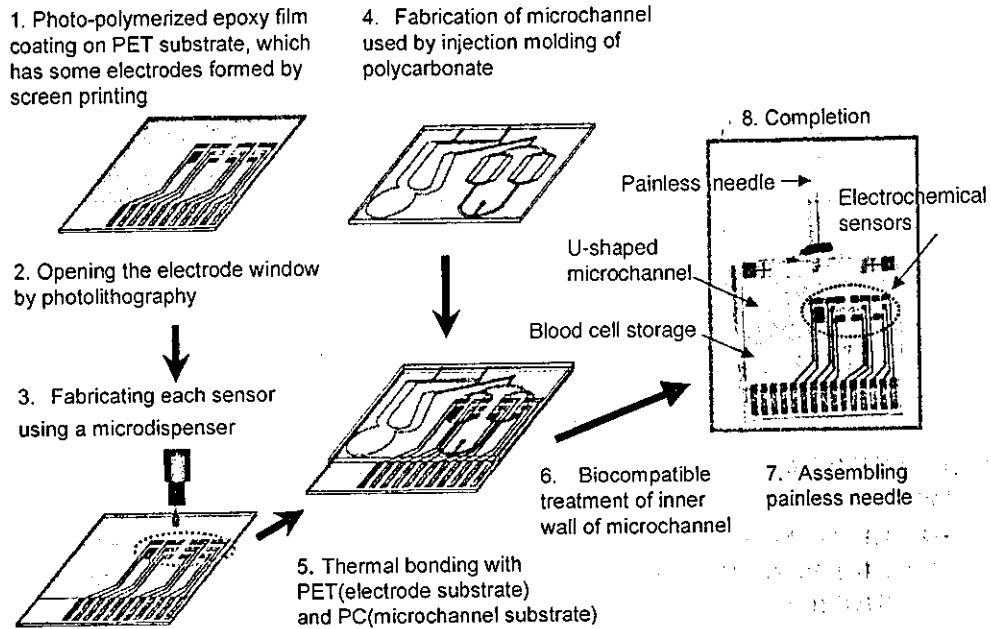


Figure 1. Fabrication process of healthcare chip.

Table 1. Chemical components of each sensor for healthcare chip

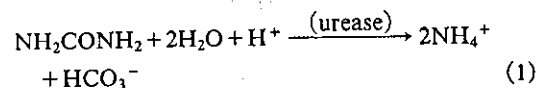
sensor	Chemical component
pH	Non-conductive Polypyrrole (PPy)
Na ⁺	Na ⁺ ionophore, plasticizer, anion-exclusion agent and Poly(vinyl chloride): PVC
K ⁺	K ⁺ ionophore, plasticizer, anion-exclusion agent and PVC
BUN	Urease immobilized by polyion complex method/non-conductive PPy
glucose	Glucose oxidase immobilized by polyion complex method/ferrocene

板を用いた。まず、作用電極材料にカーボン、参照電極材料に銀/塩化銀を用いて、それぞれをスクリーン印刷法により形成した。その後光硬化性エポキシ樹脂を張合せ、フォトリソグラフィーにより直径 300 μm の電極開口部を形成した。流路は、ポリカーボネート基板を用いて、射出成形により形成した。流路の幅は、電極開口部で 500 μm、高さは 100 μm とした。各種イオンセンサー (pH センサー除く)、血中尿素窒素 (BUN) センサー、グルコースセンサー膜は、カーボン電極上にディスペンサーを用いて塗布した。各イオンセンサー、BUN センサー、グルコースセンサーの膜構成を Table 1 に示す。電極膜形成後、2 枚の基板 (電極形成基板と流路形成基板) を、光硬化性樹脂を用いて熱圧着し、流路内を 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンと *n*-ブチルメタクリレート の共重合体 (MPC-co-BMA ポリマー: PMB)³⁾ を用いてコーティングした。用いた PMB の MPC と BMA の組成比は、3:7 である。最終

的に直径 70 μm、内径 50 μm の無痛針⁴⁾ を取り付けチップを完成させた。

2.2 センサー膜構成

各種センサーは、測定対象物質にのみ応答する反応膜を電極上に固定化し、電極表面で起こる化学反応を電気信号に変換して検出している。pH 電極材料には、電解重合法により形成した絶縁性ポリピロール (PPy)⁵⁾ を用いた。Na⁺、K⁺ イオンの測定に用いたイオン選択性電極材料は、ニュートラルキャリア型のイオン感応物質であるクラウンエーテルを用いた²⁾。BUN 濃度は、ウレアーゼ存在下で起こる式 (1)



の反応により消失する H⁺ 量もしくは生成された NH₄⁺ 量測定から求める検出方法がある。ここでは pH 検出型の BUN センサーの電極膜構成とした。pH 感応膜として絶縁性 PPy 膜を用い、その上部にウレアーゼをポリイオンコンプレックス (PIC)⁶⁾ により固定化した。このとき、絶縁性 PPy 膜は pH センサーとしての機能だけでなく、酵素の固定化における陰イオン性ポリマーとしての機能を果たしている。pH、Na⁺、K⁺、BUN 濃度は、参照電極 (Ag/AgCl) との電位差測定を行い評価した。グルコースの検出は、式 (2) に従い

