

図8 無痛針による採血

ポンプを用いる必要はなくなった。このように採血した採血筒はそのままチップにはめ込み遠心輸送でチップ内部へと導くことができる。現状では以上のような方法により採血成功率はほとんど100%近くを達成している。

3. バイオセンサ

バイオセンサはヘルスケアチップの正に心臓部であり、開発当初から精力的に開発を行ってきた。電気化学センサは大別してpH、Na⁺、K⁺などのイオンセンサのように電位計測を行うポテンシオメトリと電圧を印加したときの電流計測を行うアンペノメトリとに分けられる。具体的にはpHセンサとして電解重合によりカーボン電極上に絶縁性ポリピロールを形成したものを、Na⁺、K⁺イオンセンサとしてBis(12-crown-4)、Bis(benzo-15-crown-5)などのイオン感応膜をPVCで固定化している。

またBUNセンサは図3で述べたようにpHセンサとウレアーゼを組み合わせて構成している。すなわちカーボン電極上に絶縁性ポリピロールを形成した後ポリイオンコンプレックス法によりウレアーゼを塗布しその上からポリ-L-リシン膜で覆い固定して形成している。しかしながら血液や校正液は緩衝液であることから、酵素反応で水素イオンが消費されてpHが増加したとしても、すぐさま元の中性へと戻ろうとする性質がある。このために、現在は酵素反応で生成されたアンモニアを検知する型に変更しつつある。グルコースセンサはアンペノメトリ型であり、グルコースオキシダーゼをポリイオンコンプレックス法でカーボン電極上に固定化し、同

時にメディエータとしてフェロセンを含ませ構成している。またポテンシオメトリ型の場合には、とくに電位計測時の基準電位となる参照電極は重要である。通例に従ってわれわれもAg/AgCl電極を用い、その電極直上の塩素イオン濃度が溶液に依存せず一定になるように(Ag/AgCl電極の電位は塩素イオン濃度に依存する)疎水性の膜で覆っている。

現状の電極面積はポテンシオメトリ型で約0.5 mmφ、アンペノメトリ型でその3倍程度となっている。今後チップのさら

なる縮小を考えたときに、どの程度まで電極を小さくできるかを見きわめる必要がある。センサ構造、組成を含むこのような評価は、単にセンサを作製して計測するのみではなく、長時間の保管後、あるいは保管条件などを含めて評価しなくてはならない。このため非常に地道な努力が必要とされるが実用化のためには避けて通ることができない。

現在実用化を目指しているヘルスケアチップ開発の歴史を簡単に紹介させていただいた。どのような思想で現在のようなデザインとなっていたのかがお分かりいただけたと思う。さらに採血機構については微細ステンレスパイプの加工から始まり、血管可視化、検知手法の開発など、素人ならではの発想で試行錯誤を繰り返しながら改良を繰り返す、現在では100%近くの採血成功率を達成することができた。将来的にはこれらの機構により自動採血装置ができると確信している。

バイオセンサはヘルスケアチップの心臓部であり、長期信頼性を含めて地道な努力が求められる。直近の目標は、電解質イオン、血糖、腎機能の評価を可能とすることであるが、将来的には肝機能、脂質検査のためのバイオセンサにも着手したいと考えている。

参考文献

- 1) A. Oki, et al., Jpn J Appl. Phys. 42 (2003) 3722
- 2) K. Ishihara, et al., J. Biomat. Mat. Res, 26 (1992) 1543
- 3) Handbook of Optical Biomedical Diagnostics V. V. Tuchin ed. SPIE press p. 425

第II編 ナノバイオプロセッシング

第3章 ヘルスケアチップ創製プロセッシングの基盤技術

物質・材料研究機構	生体材料研究センター	沖 明男
科学技術振興機構		小川洋輝
物質・材料研究機構	生体材料研究センター	堀池靖浩

『ナノバイオエンジニアリングマテリアル』

2004年3月 フロンティア出版刊 抜刷

第3章 ヘルスケアチップ創製プロセッシングの基盤技術

沖 明男*¹, 小川洋輝*², 堀池靖浩*³

1 はじめに

近年の我が国における急速な少子高齢化社会の進行は、医療費、社会保障費に対する多大な国民負担をもたらした深刻な問題となっている。このような状況の中で医療費を抑制し、活力ある社会を実現するためには、高齢者がいつまでも元気であることが肝要である。そのために各々が自己の健康は自ら管理することが今後ますます重要となってくる。また従来の医療は発病後の治療に重点をおいた「病気を治すための医療」であったが、医療費の抑制、高齢者のより高い生活の質を確保するという点から考えると、発病を未然に防ぐ「予防のための医療」へと今後の医療は展開していくものと予想される。そのような状況において、病気のわずかな前兆を知り、発病を予防するために血液検査は有効な手段である。なぜなら血液は生命維持に必要な体内調整機構（ホメオスタシス）や各臓器、循環器系の機能などに関する多くの情報を含んでいるため、血液を分析することで4000種以上の項目の診断が可能といわれているからである。この血液診断が在宅で可能になればきわめて画期的なものになるが、我々はこれを実現するため極微量の血液から健康状態を診断する「ヘルスケアチップ」の創製を目指し研究を進めている。

またヘルスケアチップはマイクロ化学分析システム（Micro Total Analysis System, μ TAS）あるいはLab on a chipと呼ばれる学術分野の一応用例とみなすことができる。 μ TASとは半導体微細加工技術等を駆使して数センチメートルのシリコン、ガラス、ポリマー基板上にマイクロ・ナノメートルサイズの溝を形成し、その中で数マイクロ～数ナノリットルの極微量試料を精製、分離、反応、検出といった一連の化学分析操作を一つのチップ上で行うシステムを指す。微小空間で微量試料の化学分析を行うと体積対表面積比が非常に大きいため反応が効率的に行われる、周辺回路の集積化が容易などの利点がある。この特性を利用し、システムの小型化、分析時間の短縮、試薬、廃液の減量化、廃棄物の少量化が可能である。本章ではヘルスケアチップ創製に必要な基盤技術と関連する技術について紹介する。

* 1 Akio OKI (独)物質・材料研究機構 生体材料研究センター 産学独連携チーム
NIMS博士研究員

* 2 Hiroki OGAWA (独)科学技術振興機構 研究員

* 3 Yasuhiro HORIIKE (独)物質・材料研究機構 生体材料研究センター 産学独連携チーム
フェロー

2 ヘルスケアチップ

ヘルスケアチップとは、外径 $100\mu\text{m}$ の微細な針を用いて静脈から採血した数マイクロリットルの血液を断面数十 μm ～ $100\mu\text{m}$ 程度の流路内に導入した後、全血を血球と血漿に分離し、血漿中に含まれる Na^+ （正常値： $135\sim 147\text{ mEq/l}$ ）、 K^+ （正常値： $3.5\sim 5.0\text{ mEq/l}$ ）、 Ca^{++} （正常値： $8.5\sim 10.1\text{ mEq/l}$ ）といった電解質や、尿素窒素（正常値： $7\sim 19\text{ mg/dl}$ ）、グルコース（正常値： $60\sim 110\text{ mg/dl}$ ）などの各種健康マーカーを微小イオンセンサー、バイオセンサーを使って電気化学的に検出する血液分析マイクロチップシステムのことである。図1にヘルスケアチップの概念図を示す。ヘルスケアチップを完成するためには以下の要素技術が必要である。

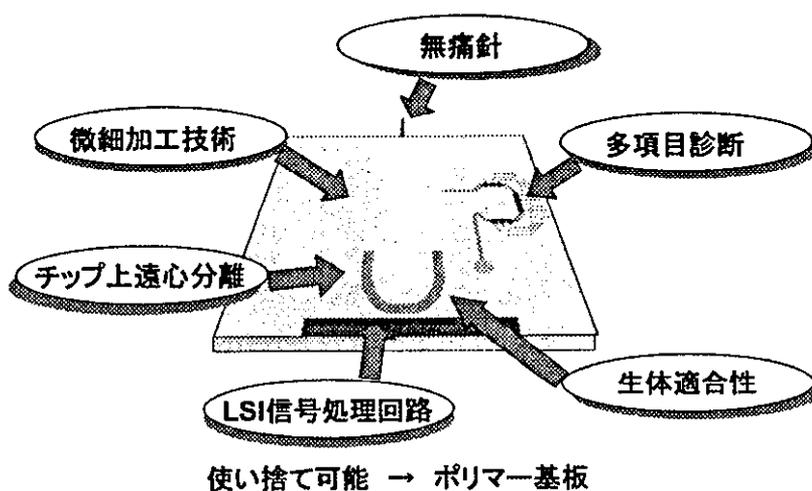


図1 ヘルスケアチップの概念図

- ① 無痛針の作製
- ② マイクロ流路の形成
- ③ マイクロ流路内壁の生体適合化
- ④ 血球と血漿の分離
- ⑤ 微小バイオセンサーによる健康マーカー測定

以下にこれらについて述べる。

3 無痛採血針

ヘルスケアチップのような在宅診断チップを創製する上でキーとなるのが採血であって、それには無痛針が不可欠である。これまでも微細採血針が数多く報告されてきた¹⁾。例えばマイクロマシン作製技術を駆使して作製したシリコン製の鋸形状針（太い部分で $85\mu\text{m}$ ）²⁾、Al-1%Siワイヤの表面にPtを電気めっきしてNaOH水溶液でAl-1%Siワイヤを溶解し中空にし

た針（内径 $50\ \mu\text{m}$ ）³⁾，毛細管現象を利用した自動吸引可能な採血針（外径 $500\ \mu\text{m}$ ）⁴⁾，シリコン基板上にKOHによるウェット異方性エッチングとRIE（reactive ion etching）を用いて作製した約 $100\ \mu\text{m}$ 程度の大きさのピラミッド形状をした針⁵⁾，マイクロ液体流路を集積化したシリコン製のアレイ状に配列した針⁶⁾ などである。しかし，実際に皮膚に刺して採血にまで至った例は皆無であり，無痛針の完成は実は古くて新しい人類の夢といえる。本節では半導体微細加工プロセスで基板の平坦化に用いるCMP（chemical mechanical polishing）技術を使った外径 $100\ \mu\text{m}$ のステンレス製の無痛針について紹介する”。

無痛針作製手順は以下のとおりである。まずステンレス内壁を平滑にするために，王水とリン酸水溶液の混合溶液中で電解研磨を行う。図2に研磨前と研磨後の内壁の様子を示す。研磨前は内壁が粗面であるが，電解研磨により平滑になっている。この内壁の平滑化処理は内壁の凹凸によって血球が壊れ細胞内物質が血漿中へ流出するのを抑えるために行っている。次にステンレス管を N_2/H_2 ガスプラズマ中で窒化し硬化する。次に先端を約 10° に小型旋盤で研磨し，さらに先鋭になるようリン酸水溶液中で電解研磨する。研磨後の針先端のSEM像を図3 (a)，(b) に示す。先端が先鋭になっている様子が分かる。また作製した無痛針を市販の採血針先端に取り付け，実際に採血も試みた。

その採血例を図3 (c) に示す。針を細くしすぎると剛性が低くなる，針先が血管に到達し難いなどの課題もあり，今後は個人差，年齢差に依らず皮膚に穿刺するのに十分な剛性を持つ無痛針用新素材の探索とその加工技術の確立が必要になるであろう。さらに血管特に静

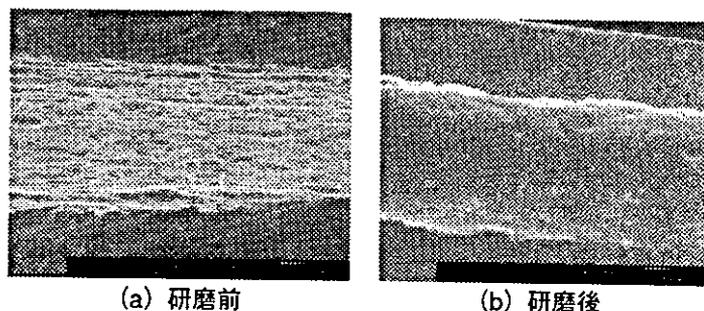


図2 ステンレス管（外径 $100\ \mu\text{m}$ ，内径 $60\ \mu\text{m}$ ）内壁の電解研磨

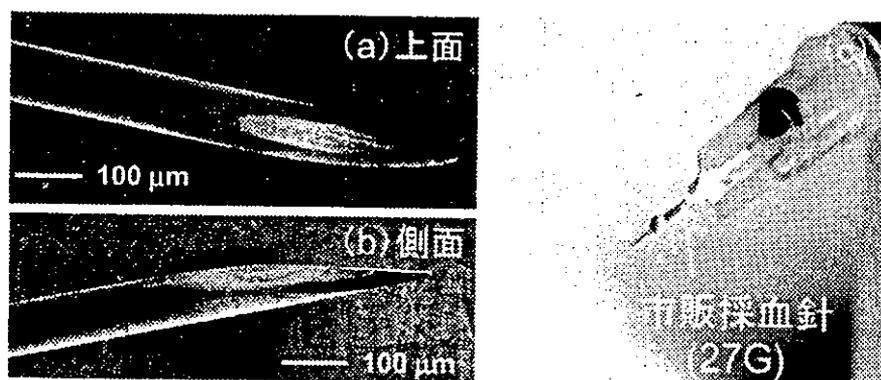


図3 ステンレス製無痛針の先端研磨 (a)，(b) と採血例 (c)

脈の位置、血流量や皮膚の硬さなどの生体情報を自動的かつ瞬時に検出する技術も必要である。

4 マイクロ流路形成とマイクロ流路内の生体適合化

4.1 マイクロ流路形成法

ヘルスケアチップのように血液に触れるものは医療廃棄物として処理するため、安価で使い捨てできるように、プラスチックを主な材料として作製するのが望ましい。プラスチックを用いたマイクロ流路の形成方法には、①加熱・加圧下でマスターをプラスチック板に型押しするホットエンボッシング法 ②熔融プラスチック材料を高圧で型に流し込んで成型する射出成型法 ③室温・加圧下で型押しするインプリント法 ④マイクロ加工を施した型に柔らかいシリコンエラストマー、例えばPDMS (poly(dimethylsiloxane)) を流し込んで成型するソフトリソグラフィ法 ⑤レーザーフォトアブレーション法 ⑥X線フォトリソグラフィ (LIGA) 法 ⑦三次元光造形法、などがある⁸⁾。ここではよく用いられるホットエンボッシング法と射出成型法について述べる。

ホットエンボッシング法は、まずマイクロ流路パターンの原型となるマスターを作製する。このマスターはスタンプとも呼ばれ、シリコンスタンプ (シリコンの異方性エッチングにより作製)、金属スタンプ (ニッケルめっきにより作製) を使うことが多い⁹⁾。マスターとプラスチックを加熱条件下で水圧あるいは空気圧により加圧しパターン転写する。一方射出成型の場合は、アルミ、ステンレス製金型に熔融したプラスチックを流し込む。ヘルスケアチップの場合、当初は石英製マスターをドライエッチングで微細加工して、PET (ポリエチレンテレフタレート) へホットエンボッシング法により転写していた¹⁰⁾。しかし現在開発中のチップは量産するために射出成型機を用いてPC (ポリカーボネート) でマイクロ流路を形成している。

4.2 マイクロ流路内壁の生体適合化

マイクロ流路の内壁に血球、アルブミンやグロブリンといった血漿タンパク質が吸着するのを防ぐことは、微量血液分析においては特に重要である。筆者らはその一つの解決策として、優れた生体適合性材料として知られている2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマー¹¹⁾に着目した。MPCポリマーは生体膜の主な構成成分であるリン脂質極性基 (ホスホリルコリン基) を側鎖に持ったメタクリレート樹脂であり、ホスホリルコリン基が表面に配向することで血球、タンパク質等の吸着を防いでいる。このMPCポリマーは簡便に材料本来の特性は保ったまま生体適合表面を実現できるためコンタクトレンズの保存液、化粧品、人工血管など幅広く応用されている¹²⁻¹⁴⁾。

MPCポリマー表面の血液に対する生体適合性は、図4に示すFTIR-ATR (Fourier transformed

infrared- attenuated total reflection)

測定により評価した¹⁰⁾。FTIR-ATR測定は以下のように行った。まずSiプリズムの両端は45度に鏡面研磨しSiに熱酸化膜SiO₂を形成した。一方の端面から入射した赤外線はSiプリズム内を全反射しながら伝播し他方の45度端面から出る。この透過赤外線を検出することはSiO₂表面においてわずかにしみ出すエバネッセント光の吸収を測定することになり、MPCポリマー表面の情報が得られる。図5にそのままのSiO₂ (a)と0.05 wt%(b), 0.3 wt%(c)のMPCポリマーでコートしたSiプリズム上にウシ血清を滴下したときの、FTIR-ATRスペクトルの時間変化を示す。MPCポリマーはエタノールで溶解・希釈した。ウシ血清滴下後の (a) と (b) のスペクトルは、NHxとC=Oで表されるタンパク質の吸収が見られる。一方 (c) にはそのタンパク質による吸収がない。(c) の場合MPCポリ

マーが厚いためエバネッセント光が溶液まで到達していないのでピークがないのではないかという懸念が残る。しかし、血清が乾燥した時、タンパク質によく見られるピークが観察された。この結果は、0.3 wt%のMPCポリマー膜と血清との界面にまでエバネッセント光が到達していることを示唆している。タンパク質のスペクトルが16.6分まで観測されないので、タンパク質はMPCポリマー表面に吸着していないことを示している。以上の結果から、MPCポリマーをコートすることがマイクロ流路内壁の生体適合化に有効であることを示している。

MPC ポリマーコートによるマイクロ流路内壁の生体適合化の評価は以下のとおり行った。MPCポリマーをマイクロ流路内壁にコートしたPET製マイクロ流路、MPCポリマーをコートし

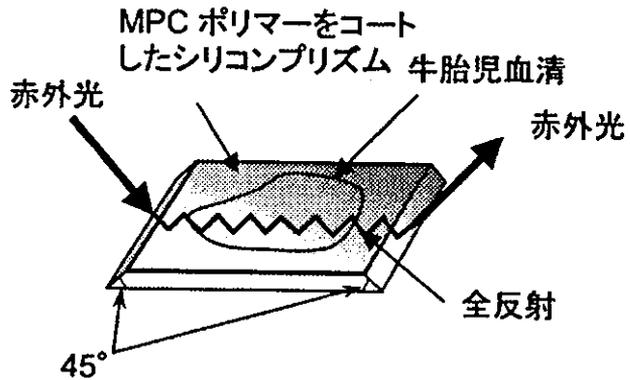


図4 FTIR-ATR (Fourier transformed infrared-attenuated total reflection) 測定

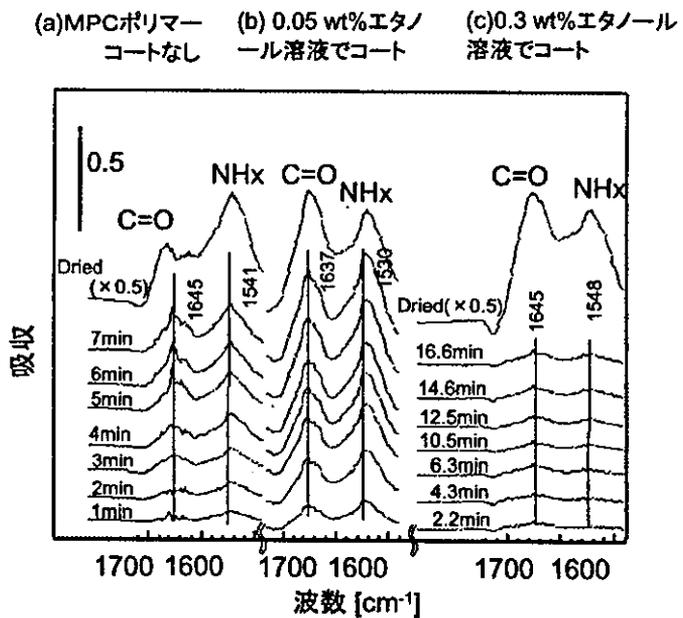


図5 FTIR-ATRスペクトルの時間変化

ていないPET製マイクロ流路，MPCポリマーをコートしていない石英製マイクロ流路の3つを用意した。MPCポリマーのコート方法は上述したのと同様に，MPCポリマーの0.3wt%エタノール溶液をマイクロ流路に満たしては乾燥させるという操作を2回繰り返した。図6にそれぞれMPCポリマーをコートしたPET製マイクロ流路，コートしていないPET製マイクロ流路，コートしていない石英製マイクロ流路についての赤血球の吸着度を示す。図6にMPCポリマーをコートしていないPETマイクロ流路内壁の写真を示す。MPCポリマーをコートしたPETマイクロ流路の場合には6個/mm²と赤血球の吸着が最も少なかった。MPCポリマーが，マイクロ流路内壁の生体適合化にも十分な効果があることを示している。

MPCポリマーをコートしていないマイクロ流路内壁

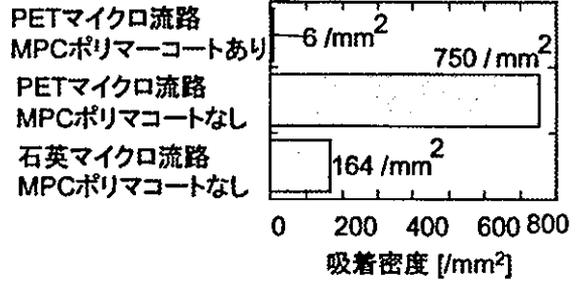
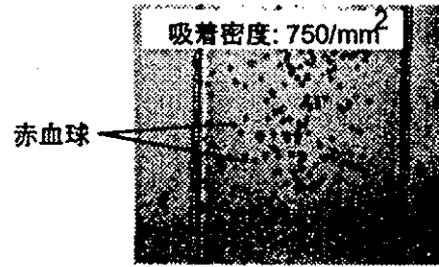


図6 遠心分離後の赤血球のマイクロ流路内壁への吸着密度

5 マイクロ流路内での血球・血漿分離

マイクロ流路内で全血から血球を取り除く方法の候補として ①マイクロマシン技術を用いて作製したフィルタリング法^{15,17)} ②遠心分離法 ③マイクロ流路内に絶縁体円柱を周期的に形成し，その中で細胞を電気泳動させて分離する誘電泳動分離法¹⁸⁾ ④電気泳動分離法¹⁹⁾などが考えられる。当初はフィルタリング法でマイクロ流路において血球分離を試みたが血球が頻繁に目詰まりを起こした。目詰まりした血球を除去する機構を設けてもよいがチップの構造が複雑になり好ましくない。③，④の場合は血液に電界を印加すると血漿中の電解質，タンパク質は電荷をもっているため電気泳動により成分が変わることが容易に予想され，血球と血漿を分離するには適さない。したがって全血から血球と血漿に分離するには②の遠心分離法がよいと考えている。現在のヘルスケアチップはこの遠心分離法を採用している⁷⁾。例えば回転半径3cmの遠心分離機で全血を導入したヘルスケアチップを約2000rpmで回転させるとおよそ1分間で血球と血漿の分離が完了する。

6 微小バイオセンサーによる健康マーカー測定

電気化学に基づいた微小イオンセンサー，バイオセンサーとして，①ISFET（イオン感应型

電界効果トランジスタ), LAPS (表面光電圧法) ②小型化ガラス電極 ③表面にイオン感応膜・酵素膜を形成したマイクロ電極, が現在のところ中心技術となっている。①はシリコン微細加工技術を用いた全固体型の微小センサーである。センサーをアレイにすることで集積化が可能なこと, 信号処理回路も一体化して小型化できるなどの利点がある。②は従来からあるガラス電極を小さくしたもので, 実用化されているものが多い。③も①と同様に微細加工技術やスクリーン印刷技術等を用いた全固体型センサーである。①と比べるとセンサー構造が単純で, 基板, 電極材料にポリマーを用いることもでき製造コストが安くできる。当初, ヘルスケアチップのイオンセンサーはISFETを用いていた²⁰⁾。Na⁺, K⁺イオン感応膜は, イオノフォアとしてそれぞれbis (12-crown-4), bis (benzo-15-crown-5) と, アニオン排除剤としてK-TCPB (tetrakis (4-chlorophenyl) borate potassium salt) をPVC (poly (vinyl chloride)) に混合したものをを用いた。このときのセンサー感度は良好で, K⁺センサーのNa⁺イオンに対する選択性, Na⁺センサーのK⁺イオンに対する選択性もそれぞれ100, 1000と血液分析用としては十分な値を得た。最近ではチップを安価で使い捨て可能にするためカーボン電極を用いて, Na⁺, K⁺イオンと尿素窒素濃度測定はポテンシオメトリ法で, グルコース濃度測定はアンペロメトリ法で行っている²¹⁾。なお微小バイオセンサーの作製方法, 特性の詳細に関しては第II編第6章で述べている。

7 将来展望

我々の研究への取り組みは, 無痛針により微量血液を採取して, 健康・疾病に関する生体物質を可能な限り分離・分析し, 計測する安価・使い捨て型バイオチップを創製し, 医療の高度化に貢献することにある。この開発には半導体微細加工・量産技術が不可欠であり, さらに異分野との密接な連携により, 近い将来, 病院の検査機能をワンチップで実現することも夢ではない。多項目同時計測がワンチップで可能になると, モバイル端末とITネットワークを通じて診療機関に蓄えられた多くの人のデータとの参照により, 在宅で日々の健康・病状を診断できる時代が到来すると期待される。

文 献

- 1) 江刺正喜 *et al.*, マイクロマシーニングとマイクロメカトロニクス, 培風館 (1992).
- 2) K. Oka *et al.*, *Sensors and Actuators A*, 97-98, 478 (2002).
- 3) M. Yamaguchi *et al.*, *BME*, 40 (2), 14 (2002).

- 4) K. Kobayashi *et al.*, *Sensors and Actuators B*, 80 1 (2001).
- 5) A. van den Berg *Proceedings of μ TAS 2001*, Monterey, U.S.A. 207 (2001).
- 6) E. Mukerjee *et al.*, *Proceedings of μ TAS 2001*, Monterey, U.S.A. 379 (2001).
- 7) H. Ogawa *et al.*, *Proceedings of μ TAS 2003*, Lake Tahoe, U.S.A. 741 (2003).
- 8) J. C. McDonald *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 35 (7), 491 (2002).
- 9) Carol T. Schembri *et al.*, *Clin. Chem.*, 38 (9), 1665 (1992).
- 10) A. Oki *et al.*, *IEICE transactions E*, 84-C (12), 1801 (2001).
- 11) K. Ishihara *et al.*, *J. Biomed. Mat. Res.*, 26, 1543 (1992).
- 12) T. Yoneyama *et al.*, *Biomaterials*, 23, 1455 (2002).
- 13) K. Ishihara *et al.*, *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 25, 325 (2002).
- 14) S. H. Ye *et al.*, *J. Membrane Sci.*, 210, 411 (2002).
- 15) G. Kittilsland *et al.*, *Sensors and Actuators A*, 21-23, 904 (1990).
- 16) H. Anderson *et al.*, *Sensors and Actuators B*, 67, 203 (2000).
- 17) S. Metz *et al.*, *Proceedings of μ TAS 2002*, Nara, Japan, 727 (2001).
- 18) Y. Fintschenko *et al.*, *Proceedings of μ TAS 2003*, Lake Tahoe, U.S.A., 65 (2003).
- 19) 北川慎也 *et al.*, *分析化学*, 47 (6), 355 (1998).
- 20) A. Oki *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42, 3722 (2003).
- 21) M. Takai *et al.*, *Proceedings of μ TAS 2003*, Lake Tahoe, U.S.A. 403 (2003).

第19回「大学と科学」公開シンポジウム

平成16年度文部科学省科学研究費補助金 研究成果公開促進費「研究成果公開発表(A)」補助事業

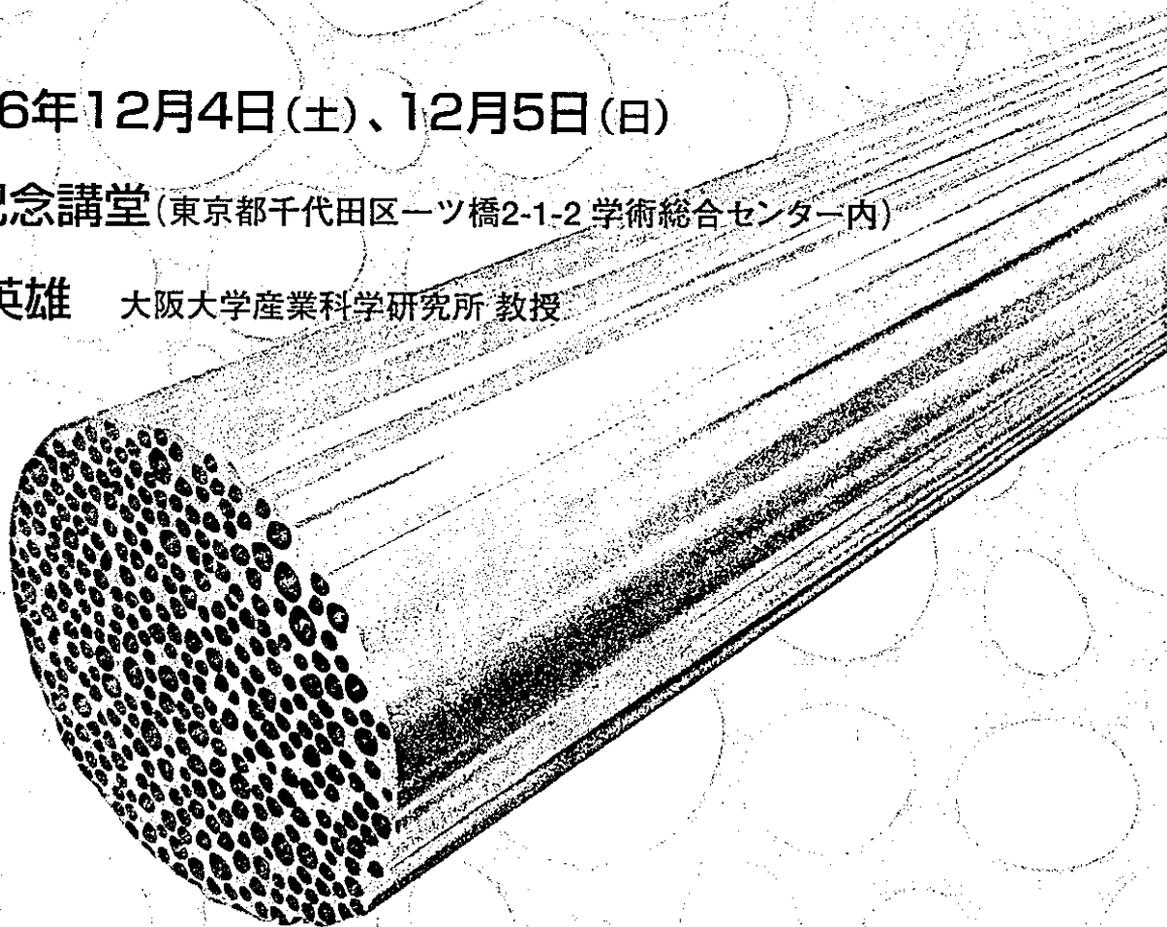
予稿集

人体にやさしい 医療材料

開催日 平成16年12月4日(土)、12月5日(日)

会場 一橋記念講堂(東京都千代田区一ツ橋2-1-2 学術総合センター内)

代表 中嶋 英雄 大阪大学産業科学研究所 教授



後援

(社)軽金属学会/(社)資源・素材学会/(社)日本アルミニウム協会/(社)日本化学会/(社)日本鋼構造協会/(社)日本機械学会/(社)日本金属学会/(社)日本材料学会/(社)日本セラミックス協会/(社)日本塑性加工学会/(社)日本チタン協会/(社)日本鋳造工学会/(社)日本鉄鋼協会/(社)日本表面科学会/(社)表面技術協会/(社)未踏科学技術協会/(社)溶接学会/(財)大阪科学技術センター/(財)金属系材料研究開発センター/国際歯科研究学会日本部会(JADR)/鋼及び銅合金技術研究会/日本医学会/日本口腔インプラント学会/日本再生医療学会/日本材料科学会/日本歯科医学会/日本歯科麻酔学会/日本歯科理工学会/日本人工臓器学会/日本バイオマテリアル学会/日本複合材料学会/日本補綴歯科学会/日本マグネシウム協会/日本老年歯科医学会/(株)日本経済新聞社



UNIVERSITY SCIENCE

明日の文化と産業を支える独創的・先端的研究の成果



無痛針採血による在宅健康診断チップ

独立行政法人物質・材料研究機構 フェロー 堀池 靖浩

はじめに

わが国では、近年、高齢者層の医療費が増大し社会問題となっている。高齢者が元気で毎日を送るためには予防が大切である。そのためには、微量の採血から在宅で簡便・確実に同時多項目を診断できる種々の診断用バイオチップの開発に大きな期待が寄せられている。この取り組みの一貫として、本稿では、ヘルスケアチップと肝機能診断チップについて私たちの最近の開発状況を述べる。

ヘルスケアチップ

ヘルスケアチップとは、無痛針を介して血管から極微量血液を採取し、チップ上で遠心分離によって全血の血球成分と血漿成分の分離を行い、血漿成分を電気化学バイオセンサに導いて、pH、 Na^+ 、 K^+ などの電解質イオンおよびグルコース、尿素窒素(BUN: blood urea nitrogen)、クレアチニン、乳酸などの生活習慣病健康マーカーを検出・計測して、在宅で私たちの健康状態を診断するチップシステムである。

まず、在宅で健康を診断するためには、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、神経網を切断するときに感じる。そこで、外径0.15mmのステンレス製管の先端を 10° に研磨し、端面を3面カットし、最後に電解研磨をした。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。さらに、粗い管の内壁を特殊な方法で超平滑化した結果、針を皮膚に刺すと自分の血圧だけで採血可能になった。採血量は $6\mu\text{L}$ ($1\text{mm}^3 \times 6$)。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、近赤外光(波長850nm)を照射して血管を可視化した。さらに、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。これらを組み合わせて、液晶ディスプレイ画面を見ながら私たちでも採血できるようになった。図1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。

図2は、ヘルスケアチップの写真であり、材料は安価・使い捨て可能なポリカーボネート製である。本チップは、無痛針、校正液の導入・排出、血液溜め、カーボンやAg/AgClのスクリーン印刷で形成したバイオセンサと参照電極からなり、各部はマイクロ流路で結合している。なお、チップ内流路表面は血球などの付着を抑制し、生体適合化を図るために生体膜表面を覆っているリン脂質膜を人工的に合成したMPCポリマーを塗布してある。図中の×(1)を中心に回転して校正液をセンサ群へ導入し、排出はチップを×(2)を中心に回転して行う。次に図1の採血後の血液溜めをチップに挿入し、元の×(1)を中心に回転するとチャンネルの下部に血球が、上部に血漿が分離され、血漿中のマーカをバイオセンサで計測する。現在、pH、Na⁺、K⁺、グルコース、BUNが検出可能である。



図1 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

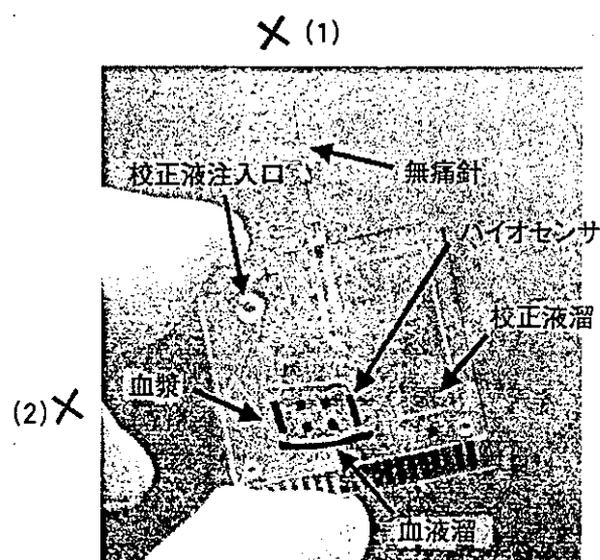


図2 採血針から遠心力で血液を送り、血球分離後のヘルスケアチップ

肝機能診断チップ

肝機能診断チップは、アルコール性肝障害や肝炎など肝機能障害を起こすと、壊れた肝細胞から血液中に流出する γ -GTP、GOT、GPTの酵素の活性値を血漿から測定する。測定法は、現在の自動血液検査の大部分を占める測定法の比色法を用いた。比色法では、血清または血漿を基質緩衝液と混合し、たとえば、 γ -GTPの場合は本来含有されている色素の光吸収(405nm)を、GOTとGPTの場合は基質緩衝液に含まれているNADH(ニコチンアミドジヌクレオチド)の光吸収(340nm)を各酵素活性値に対して測定する。そのため、血漿と基質緩衝液を正確に秤量し、均一に混合することが必須である。しかし、一般にマイクロ流路内では、溶液は層流(流体が層をなして秩序正しく流れる状態)となり、混合は困難である。そこで多段マイクロミキサという新混合法を開発した。本方法は、2種の溶液を壁と衝突させ、狭い流路で効率よく分子拡散を行い、さらに流体の進行方向を急激に変化させることにより流れを乱すことにある。これを何回も繰り返す。図3に作製したこの3マーカの検査を行う肝機能診断チップを示す。測定は、0.1~0.4 μ Lの血漿とそれに応じた1~4 μ Lの基質緩衝液をそれぞれ注入口に滴下し、マイクロミキサで混合後、検出流路に導入し、3種類の酵素の活性値を測定する。比色測定に用いる光量の減少を防止するため、検出流路の内壁はAl膜でコートした。測定は、チップを37°Cに温度制御し、光源には、重水素やハロゲンランプを用い、帯域濾過フィルターで405nmまたは340nmに単色光化し、光ダイオードを用いて光の減衰率を測定した。その結果、 γ -GTP、GOT、GPTの活性値の正常値から異常値まで広範囲にわたって検量線を得ることができた。

図3のチップはあらかじめ採取した血漿を導入したが、実用化には、無痛針採血、血球分離、秤量、混合、測定を1つのチップで実現する必要がある。図4は、 γ -GTPの一項目であるが、その測定チップを示す。まず、U字流路に導入した血液を図中の×(1)を中心に回転し血球を血球溜めに収め、U字流路内に血漿を満たす。次に×(2)を中心に回転し、血漿秤量する。元の×

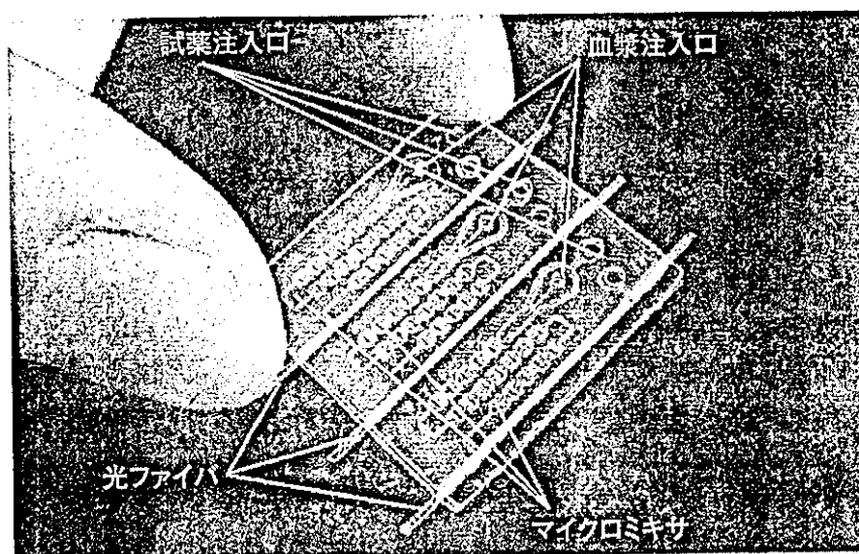


図3 3項目の肝機能マーカの肝機能検査用比色チップ

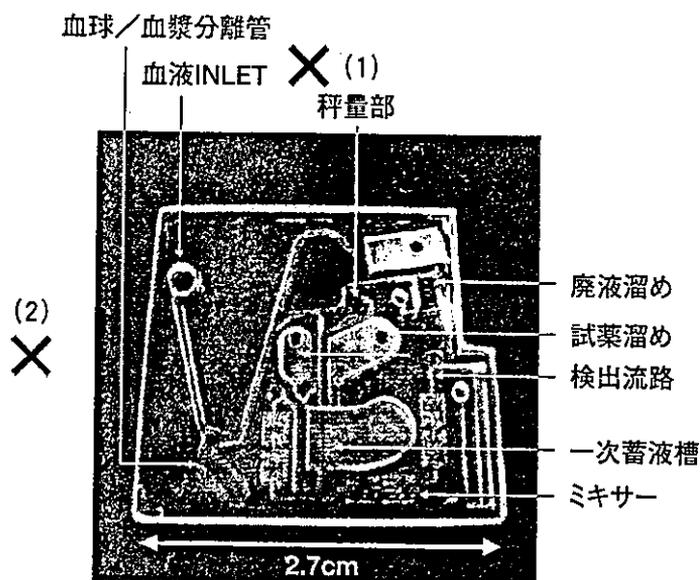


図4 採血から測定までの一連の工程を1チップで実現した γ -GTP用測定チップ

(1)を中心に回転し、あらかじめ秤量された基質緩衝液の部屋に導入する。その後この2液を、図示した引き口から減圧して、ミキサーの中に導入し、検出流路に入れて測定する。現在、3マーカーを測定できるチップを開発中である。

今後の展望

在宅診断で重要な無痛採血は古くて新しい人類の夢であり、個人差、年齢差にかかわらず100%の採血率の達成を今後共追求し、最終的には自動採血を実現する。紹介した両チップの実用化は間近であるが、本チップで生活習慣病の予防が可能となり、コレステロール、中性脂肪などの他の検査項目も追加していく。さらに、現在廃棄している血球成分から免疫検査、DNA解析などを行うため基礎研究もしている。種々のバイオチップによって診断機関と直結した医療ネットワークを介して在宅診断が実現すると、医療、さらには社会システムを大きく変革すると期待される。

謝辞：ヘルスケアチップ開発は、小川洋輝(JST)、新橋里美(JST)、長井政雄(JST)、肝機能診断チップ開発は、沖明男(物材機構)、横川昭徳(ローム)の各氏の努力の賜物であり、またヘルスケアチップ開発は、JSTのペレベンチャー事業の支援を受けた。紙面を借りて深く感謝の意を表します。

平成16年度
厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業
萌芽的先端医療技術推進研究

ナノメディシン研究成果発表会 要 旨 集

日時：平成17年2月22日(火) 10時00分～16時50分
場所：財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館

主催：財団法人 医療機器センター

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップ

主任研究者・発表者：(独)物質・材料研究機構 生体材料研究センター フェロー 堀池 靖浩

(独) 物質・材料研究機構 生体材料研究センター 甲田 裕子
(株) アドビック 小川 洋輝

1. はじめに

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。しかし、電気化学的手法では校正液を必要とし、診断項目も限られ、溶液を用いた比色法では秤量・混和を必要とし保存性にも課題がある。一方、ドライケミストリー法を使った市販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、血液量の多さが問題となる。そこで血清・血漿と直接反応するドライ比色法を使用し、薬剤含有ゲルをマイクロ流路に導入することで多項目診断を微量血で、簡便かつ保存性のよいチップを研究している。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、2つの型のチップを研究した。

2. 実験結果

2-1 2段反応型による尿素態窒素(BUN)測定

BUN は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1に示すチップを製作した。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

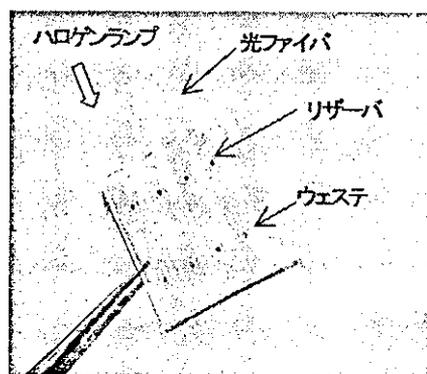


図1 BUN 検出チップ

(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。図2に示すように620nmにて吸光測定良好な検量線を得た。

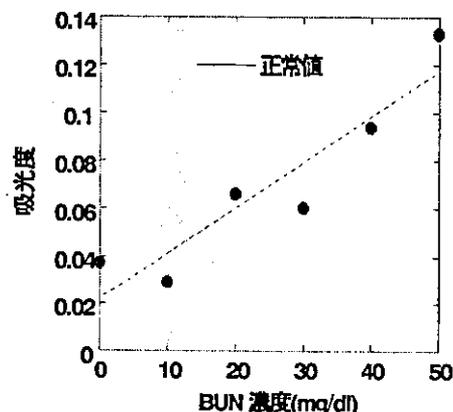


図2 尿素濃度—吸光度

2-2 1段反応型によるγ-GTP と GOT 測定

反応時間の短縮目的で血清点着を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ドライ化法を検討した。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

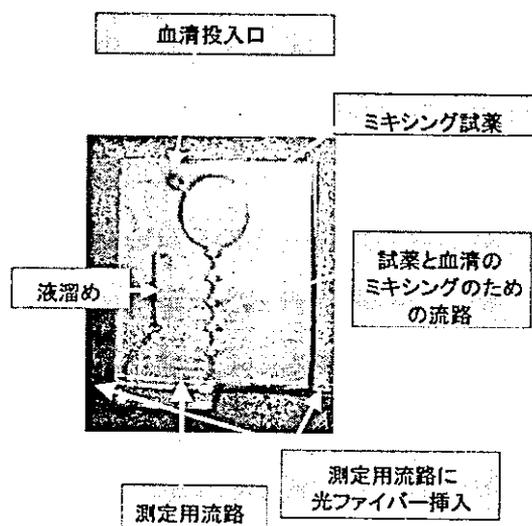


図3 1段反応型γ-GTP 測定用チップ

素活性の検討を行った。ゼラチンはドライケミストリーで一般的に使用される高分子ゲルで保水と試薬担持に適すると判断して使用した。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、液状試薬を動物由来ゼラチン担持したものを試みたが、PET(ポリエチレンテレフタレート)製の流路内(図3)への導入は、37℃温度管理の下で可能にもかかわらず、薄膜形成後は、血清導入時には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使用方法には不適と判断した。一方、37℃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。しかし、吸光度は本来 Fish gel の持っている吸光色(黄色)が強く影響し全体に高値を示す傾向があり、経時的にも高値になるので検討を要す。また、流路設計のための光路長を検討するため、吸光度変化率の検量線は、各ゲル使用時の最適光路長を生化学検査用ガラスセル(1~10mm)によって調べた。重要な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法を比較した。実験は、対象の基質緩衝液との吸光度(流路内、ガラスセル内で光路長を3mmに固定した時の γ -GTP活性140(IU/l)滴下時の吸光度)変化率の相関を検討した。凍結乾燥は冷凍庫で凍結後-40℃、24hr.の後-10℃12hr.の乾燥をガラスセル、流路内の両方で試みた結果、親水性、酵素活性の低下は避けられた。しかし、凍結法ではPET基板の剥がれが見られ、基材の検討も必要なことも分かった。

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、24hr.-20℃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4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。

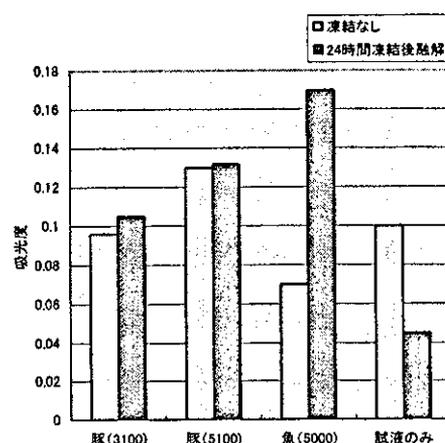


図4 ゲル担持の凍結影響
(活性値 25Karmen 時)

3. 結論

ガス発生を伴う2段階反応は透過層を介した多層の2段階構造のチップにより良好にBUNが測定された。1段階反応についてはゲルの選別に内在不純物の影響の少ないものを選び出す必要があり、有機由来だけでなく、PVAなど親水性の強い高分子も検討が必要と考えられる。



Cytocompatibility evaluation of Ni-free stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment

Akiko Yamamoto*, Yuko Kohyama, Daisuke Kuroda, Takao Hanawa

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

Received 1 June 2004; received in revised form 15 July 2004; accepted 11 August 2004
Available online 2 October 2004

Abstract

Cytocompatibility of nickel-free austenitic stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment, Fe–Cr–Mo–N, was evaluated and compared with a conventional austenitic stainless steel, 316L, and nickel-free ferrite stainless steel, Fe–Cr–Mo, before nitrogen adsorption treatment. Two types of cytotoxicity tests were performed; static and dynamic conditions. In static conditions, human normal diploid fibroblast HEL299 was cultured on the disks of the three materials and cell growth was examined. In dynamic conditions, the disks were rotated in extracting medium with zirconia balls at 37 °C for 14 days, and the collected extracting medium was added into HEL299 culture to examine its inhibitive effect on cell growth. Quantification of metallic elements in collected extracting medium was also performed. As a result, Fe–Cr–Mo–N had higher cell growth than 316L in static and dynamic conditions. Nickel was detected in the extracting media of 316L and Fe–Cr–Mo, whereas no nickel was detected in that of Fe–Cr–Mo–N. These facts indicate that Fe–Cr–Mo–N has higher cytocompatibility than 316L and that the nitrogen adsorption treatment contributes to the higher corrosion resistance of Fe–Cr–Mo–N in the presence of wear.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nickel-free austenitic stainless steel; Nitrogen adsorption treatment; Cytotoxicity evaluation; Nickel ion release; Biomaterials

1. Introduction

Stainless steel is one of the representatives of metallic biomaterials and is widely used as dental and orthopedic devices as well as cardiovascular stents because of its low cost, good mechanical property, and high contrast in X-ray images. Metallic biomaterials implanted in the human body are exposed to aggressive environments, including a body fluid containing chloride ion, amino acids, and various proteins, at lower partial pressure of oxygen than in air [1]. Therefore, the implanted devices of stainless steels are sometimes reported to be corroded [2–5]. When stainless steels are corroded inside the human body, they may release metal ions into surrounding tissues, which may cause toxic effects on the tissues. Since 316L austenitic

stainless steel contains about 12% of nickel as a component element, it is often reported the release of nickel ion from the stainless steel specimens [2,3,6]. Nickel and its compounds are classified to the substances which cause cancer to humans by IARC [7], and their chromosomal effect is easily detected [8,9]. Nickel and its compounds are one of the major causes for metal allergic contact dermatitis [10].

To avoid the toxic effect of released nickel ion and compounds from the conventional stainless steels, nickel-free austenitic stainless steels, such as Fe–(19–23)Cr–(10–12)Mn–(3–6)Mo–(0.85–1.1)Ni (BioDur® 108), Fe–15Cr–(10–15)Mn–4Mo–0.9N, Fe–18Cr–18Mn–2Mo–0.9N, Fe–(15–18)Cr–(10–12)Mn–(3–6)Mo–0.9N, and Fe–23Cr–2Mo–1.5N in mass% are developed [11–15]. However, these nickel-free austenitic stainless steels are hard to work to form fine foils and wires [16]. To conquer this, a new manufacturing process was developed to produce nickel-free austenitic stainless steel

* Corresponding author. Tel.: +81 29 860 4169; fax: +81 29 860 4714.
E-mail address: yamamoto.akiko@nims.go.jp (A. Yamamoto).

by nitrogen adsorption treatment [16]. This manufacturing process enables us to produce fine wires by working corresponding ferric stainless steel and then applying nitrogen adsorption treatment for austenitization. However, the biocompatibility of the nickel-free austenitic stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment has never been evaluated *in vitro* or *in vivo*.

Recently, biocompatibility of materials is increasingly evaluated using cultured cells because of their lower cost, shorter term, higher reproducibility, and reliability than *in vivo* evaluation. Cytotoxicity evaluation has been performed for the specimens of pure metals and alloys [17–24], metal salts [25–27], particulate metals [28–31], and metallic debris [32,33]. In this study, the cytocompatibility of nickel-free austenitic stainless steels manufactured by nitrogen adsorption treatment is evaluated using human normal diploid fibroblasts in static and dynamic conditions. In dynamic conditions, the nickel-free austenitic stainless steel was soaked into cell culture medium with zirconia balls and rotated at 300rpm to cause wear. Then, the cell culture medium was collected for cytotoxicity test as well as quantification of metallic elements by high resolution inductively coupled plasma mass spectroscopy(ICP-MS).

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

The materials used are 316L austenitic stainless steel (JIS G4303 1988), and Fe–24Cr–2Mo (mass%) alloy. The chemical compositions of 316L steel and the ingot of Fe–24Cr–2Mo alloy are summarized in Table 1. The Fe–24Cr–2Mo specimens were prepared and applied to the nitrogen adsorption treatment as described in the previous study [16]. Briefly, the ingot of the Fe–24Cr–2Mo alloy was prepared by a vacuum high-frequency induction melting process, and applied 64% hot-forging followed by 46% cold forging to be a cylinder as a diameter of 12 mm. The cylinder was sliced into the thickness of 1.5mm. Then, the specimens were polished with #600 SiC paper in water and ultrasonically rinsed in acetone. The specimens were separately located onto a 304 steel reticular stage and inserted into the nitrogen adsorption furnace. The pressure of the inside of the furnace was reduced to 2 Pa, and nitrogen gas flew into the furnace to be the pressure of 101.3 kPa. The temperature of the furnace was kept at 1473 K for 86.4 ks, and then, the specimens were quenched into water. The scale generated on the specimen

was removed with #600 SiC paper in water and rinsed with acetone as described above. The Fe–24Cr–2Mo specimen after nitrogen adsorption treatment is abbreviated as Fe–Cr–Mo–N. The disks of Fe–24Cr–2Mo alloy before nitrogen adsorption treatment (abbreviated as Fe–Cr–Mo as the followings) are also applied to the cytocompatibility evaluation. The specimens of 316L steel (abbreviated as 316L) were prepared from the commercial 316L cylinder as the diameter of 12 mm by slicing into the disks with the thickness of 1.5 mm. Then, the disks were polished with #600 SiC paper in water and rinsed with acetone as described above.

2.2. Cytotoxicity test in static conditions

The disks of Fe–Cr–Mo, Fe–Cr–Mo–N, and 316L were sterilized by the irradiation of ultra-violet light (UV) for 5min or autoclaving at 121 °C for 20 min. Then, these disks were separately located into the bottom of 24-well microplate. Human normal diploid fibroblast HEL299 was cultured onto each disk at the concentration of 4000 cells/well in 1 mL culture medium; Eagle's minimum essential medium (E-MEM) with non-essential amino acid(NEAA), 0.1 M sodium pyruvate (N-Pyr), 0.1% lactalbumin hydrolysate(LAH), and 10% fetal bovine serum(FBS). The cells were cultured at 37 °C in CO₂ incubator for 1, 4, and 7 days. Then, the cells were fixed by 25% glutaraldehyde solution for 10 min and stained by 10% Giemsa's staining solution for 10 min. The stained cells were observed by microscope and their images were captured via CCD camera onto a Power Macintosh 8500 computer as an image of 640×480 pixels.

2.3. Cytotoxicity test in dynamic conditions

The disks of Fe–Cr–Mo, Fe–Cr–Mo–N, and 316L were sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. Then, two disks of each material were separately attached to the glass weight to control their total weight as 2.00±0.05 g in sterile condition. Then, two disks were placed into a Teflon vessel which was filled with 2 mm Ø zirconia balls as a single layer on its bottom and sterilized by autoclaving in advance. Then, 20 mL of the extracting medium, E-MEM with NEAA, 0.1 M Na-Pyr, 0.1% LAH and 20 mM HEPES, were poured into the vessel. The vessel was rotated at 300 rpm being kept at 37±2 °C over a sheet-type heater for 14 days. The extracting medium was collected aseptically and used for the cytotoxicity test and quantitative analysis of metallic elements. In advance to the cytotoxicity test, the

Table 1
Chemical composition of 316L steel and Fe–24Cr–2Mo alloy (mass%)

	C	Si	P	S	Ni	Cr	Mo	O	N	Fe
SUS316L	0.019	1.18	0.038	0.13	12.1	16.72	2.05	–	–	Bal.
Fe–24Cr–2Mo	0.002	<0.01	<0.002	0.0002	<0.01	25.80	2.04	0.016	<0.001	Bal.