

図 5 モデルのブロック図

このモデルに従うと、送信時間と周囲の上昇温度は図 6 のようにある一定のサイクルで通信の ON、OFF を繰り返す。全通信時間のうち ON の時間をデューティサイクルと定義する。また、生体内の熱伝搬は、一般的に用いられる生体熱輸送方程式を適用する。

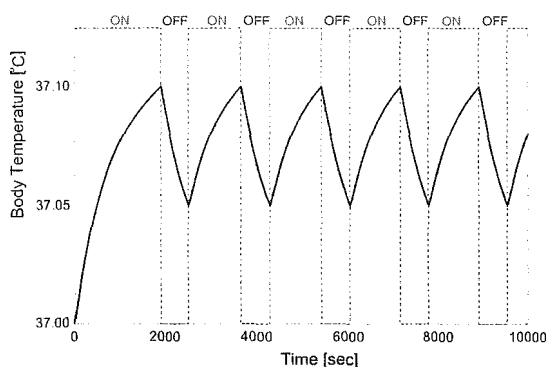


図 6 温度上昇とデューティサイクル

### C-2-3 通信方式の評価モデル

通信方式の比較において、下式のようにスループットを定義し、それを用いて評価を行う。

$$\text{Throughput} = (1 - \text{BER}) \times \text{DataRate} \times D_c$$

$D_c$  は前節で述べたデューティサイクルである。式からわかるように、熱影響がスループ

ットへのペナルティとして課されることがわかる。

### C-2-4 計算機シミュレーション

今回は、UWB-IR 通信方式を想定し、その変調方式に OOK(On-Off Keying) と BPSK(Binary Phase Shift Keying)の2つの変調方式に関して比較した。図 3 にその結果を示す。横軸に  $E_b/N_0$  (1 ビット当たりの電力に対する雑音電力密度比)、縦軸をスループットとした。

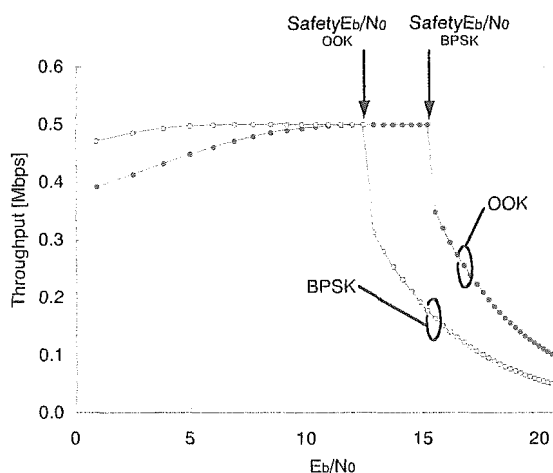


図 7 OOK、BPSK 変調の比較

ここで、熱影響および通信品質の劣化によるスループットの低下が見られない  $E_b/N_0$  を Safety  $E_b/N_0$  として定める。この値が高いことは熱影響を与えることなく安全に通信が行えることを意味している。

この Safety  $E_b/N_0$  は BPSK 変調が 12.4 dB、OOK 変調が 15.2 dB となった。すなわち、OOK 変調が約 3 dB 優位であることが言える。

### C-3 体内埋め込みデバイスの位置推定

体内埋め込みデバイスが体内外で通信するとき、デバイスの位置推定を行うことが重要となる。理由は以下二点である。

一点目は、伝搬路特性の推定の為である。体内には導電率や誘電率などの電気定数の異なる臓器が複雑に存在するため、デバイスの位置によって伝搬路の特性は大きく変化する。よって、伝搬特性の算出に送信位置情報は不可欠である。

二点目は、情報の正確な解析の為である。例として、カプセル型内視鏡を挙げる。カプセル型内視鏡とは、電源を搭載した錠剤サイズのカメラであり、それを錠剤のように飲み込み、消化器内部の撮影ができる機器である。このデバイスが撮影した映像を解析するとき、体内のどこの部分であるかを特定するため、このデバイスの位置や姿勢などの情報が重要となる。

### C-3-1 相関方式

提案する位置推定方式について、その具体的方法として以下の二段階で説明する。一段階目としては事前に体内情報を取得し、それに基づいて、体内伝搬を推測しておくこと。二段階目において、実際に診察の段階でデータを取得し、一段階目で得たデータとの照合をすることにより、体内インプラントの位置を推定するものとする。

なお、このときの体内デバイスの用いる送信信号として、高精度の推定精度が期待できる UWB 信号を用いる。

この方式の特徴の一つは。上記にあるように、事前に体内データ（CTやMRIによるスライスデータ）を事前に保持していることにある。そのデータから、仮想的な3次元人体モデルを計算機上で作成し、そこに平均的な体内電気定数を割りあてる。人体モデルに格子点を配置し、格子点上にインプラントと同じ送信信号を放射するの送信点を置き、FDTD法により体外アンテナでの受信波形を算出しテンプレート波形として保存する。こ

のときの格子点の配置を図8に示す。

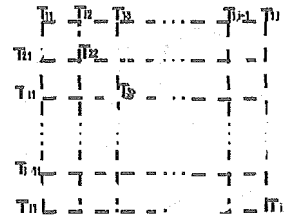


図8. 人体モデルでの格子点配置

この図において示しているのは、人の直立方向をz軸にとり、z軸に対して水平にスライスした人体画像とその平面上に配置した格子点を表している。

診断ににおいて、体内のインプラントからの実際の信号を受信する。その受信信号とデータベースに保存してある推定受信信号群と相関をとる。

そして、最大の相関値を与える格子点の位置を体内デバイスの位置と決定する。

ここで、図9、図10にて、この方式のフローチャートを以下に示す。

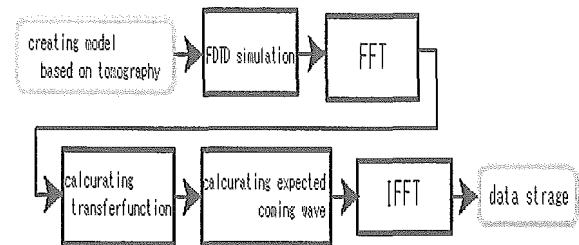


図9. 第一段階

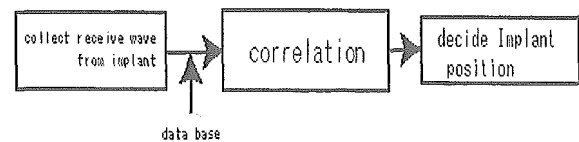


図10. 第二段階

この方式を用いた結果を図11に示す。なお、中心部に送信アンテナが存在していると仮定した。5cm程度の推定精度が得られているこ

とがわかる。

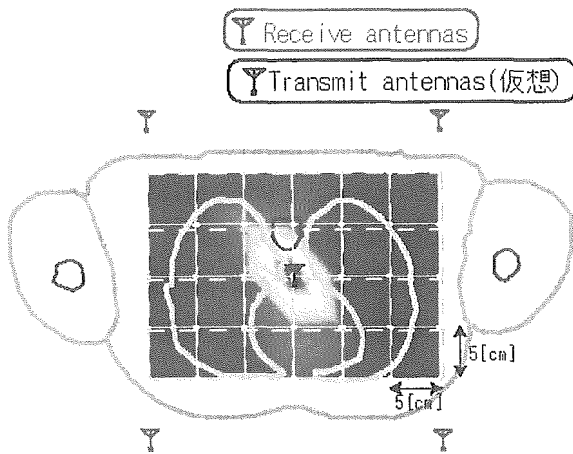


図 11. 相関を用いた位置推定結果

この方式を用いるに当たり、体内のデバイスが用いる信号の使用周波数帯域について考える。位置推定精度を考えると、高周波を含んだ周波数帯域の送信信号を用いるべきではあるが、体内では高周波ほど減衰してしまうので、送信電力を一定としたときの受信信号電力を考えると、高周波を用いることに弊害が生じる。よって、今回、シミュレーションにより、一例として、体内のある場所に送信源があったときの使用周波数帯域と推定誤差の関係を図 12 にて示す。

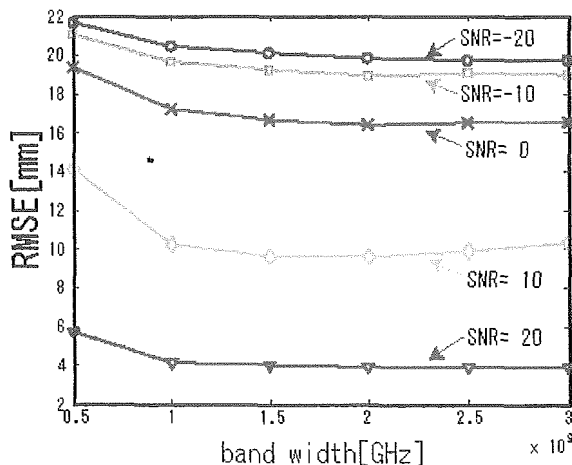


図 12. 使用帯域と位置推定誤差

このグラフの横軸は使用帯域幅を示し、縦軸は推定位置の平均二乗誤差を表している。

この結果より、体内において、1.5[GHz]から2.0[GHz]あたりの帯域で誤差が低くなることが確認され、最適な使用帯域が存在する可能性があることが分かった。

## D. 考察

### D-C-1 体内伝播特性解析

動物やファントムなどのより複雑な媒質の実験の際、今回の結果を用いて整合を行うことにより、事前のシミュレーションから実験結果を推定でき、より効率的に実験を行うことができる。

シミュレーション結果と実験結果で 10dB の差が生じたが、この要因として、使用アンテナの違いや、媒質電気定数のばらつきが挙げられる。

### D-C-2 生体への熱影響を考慮した通信方式

今回定義したスループットは実際的に有効な伝送速度を表すものではなく、比較のための評価値としての意味合いを込めて定義したものである。今回の検討では、BPSK、OOK のみの比較にとどまったが、より実際に近い通信システムでの評価が必要である。

また、今回のモデルと伝搬路モデルを組み合わせることによって、実際に近い検討が可能となる。更に、今後の検討課題として、モデルの理論的解析を進めると共に、実証実験が必要である。

### D-C-3 体内埋め込みデバイスの位置推定

今回の検討は 2 次元空間における手法であり、実際には 3 次元に拡張する必要がある。3 次元に直接拡張した場合、計算量の増大の問題が生じる。そこで、計算量を削減する手法として、狭帯域信号を用いて広い範囲の推定を行い、広帯域信号を用いて範囲を絞り込んで行くアルゴリズムの検討、実証を今後行

っていく。

更に、今後の検討課題として、モデルの理論解析及び実証実験を行う必要がある。

## E. 結論

### E-C-1 体内伝播特性解析

精製水を媒質とした実験とシミュレーションを行い、結果の整合を行った。シミュレーション結果実験結果共に 1~2GHz の間でゲインのピークがあり、3GHz 以上では減衰が大きくなっており、補正項は 10dB が得られた。

### E-C-2 生体への熱影響を考慮した通信方式

通信方式の評価検討のために必要なモデルを示した。それに基づき、UWB-IR 通信の OOK 変調と BPSK 変調を比較することにより、OOK 変調が安全性の面で優れていることを示した。

### E-C-3 体内埋め込みデバイスの位置推定

体内において、1.5[GHz]から 2.0[GHz]あたりの帯域で誤差が低くなることが確認され、最適な使用帯域が存在する可能性があることを確認した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文

1. Kentaro IKEMOTO, Ryuji KOHNO, "Maximum Likelihood Estimation of Trellis Encoder and Modulator Transition Utilizing HMM for Adaptive Channel Coding and Modulation Technique," IEICE TRANS. FUNDAMENTALS,

Vol.E88-A No.3pp.669(2005-3)

2. Kentaro Taniguchi, Ryuji Kohno, "Design and Analysis of Synthesized Template Waveform for Receiving UWB signals," IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences - Special Issue on Ultra Wideband Systems, vol.E88-A, No.9, pp.2299-2309 (2005-9)
3. Craig Mitchell, Giuseppe Abreu and Ryuji Kohno, "Adaptive RAKE Receivers with Subspace-based Hadamard-Hermite Template Design for UWB Communications," IEICE TRANS. FUNDAMENTALS, Vol. E88-A, No.9, pp.2327-2338, (2005-9)
4. K. Ishibashi, H. Ochiai, and R. Kohno, "Low complexity bit-interleaved coded DAPSK for Rayleigh fading channels," IEEE Journal on Selected Areas in Communications, Special Issue on Differential and Noncoherent Wireless Communications, vol.23, no.9, pp.1728-1738, (2005-9)
5. Kouji Ishii, Ryuji Kohno, "Space-Time-Frequency Turbo Code over Time-Varying and Frequency-Selective Fading Channel," IEICE TRANS. FUNDAMENTALS, vol.E88-A, No10, pp.2885-2895, (2005-10)
6. Susu Jiang, Kentaro Ikemoto and Ryuji Kohno, "A Differential STBC Integrated with Trellis Coded Modulation," IEICE, Vol.E88-A, No.10, pp.2896-2904(2005-10)

### G-2. 学会発表

#### G-2-1. 査読付き国際会議論文

1. Tomoko Matsumoto and Ryuji Kohno, "Performance of Super-Orthogonal Convolutional Coding for Ultra-Wideband Systems in Multipath and Multiuser Channels," International Symposium on Wireless Personal Multimedia Communications 2005 (WPMC2005), Aalborg, Denmark, pp955-959 (2005-9)
  2. Shumpei Ida and Ryuji Kohno, "Non-Linear Swept Chirp Waveforms for UWB Multiple Access Communication and Ranging," International Symposium on Wireless Personal Multimedia Communications 2005 (WPMC'05), Aalborg, Denmark, pp.1051-1055(2005-09)
  3. Gabriel Porto Villardi, Giuseppe Thadeu Freitas de Abreu, Ryuji Kohno, "An Adaptive Frame-Based Interpolation Method of Channel Estimation for Space-Time Block Codes in Moderate Fading Channels," Proceeding International Symposium on Wireless Personal Multimedia Communications 2005, Aalborg, Denmark, 2005, pp.1056-1060
  4. Tomoko Matsumoto and Ryuji Kohno, "Transmission Power Control of UWB-PAN to Avoid Interference in the Presence of both Wireless LAN and PAN," 2005 Software Defined Radio Technical Conference and Product Exposition (SDR'05), Orange County California, USA. (2005-11)
  5. Hiroki Harada and Ryuji Kohno, "Interference Reduction Using Novel Pulse Set Based on Hermite Polynomials for UWB Systems," 2005 International Workshop on UWB Technologies (IWUWBT2005), Yokohama, Japan, pp.231-235(2005-12)
- G-2-2.研究会・国内シンポジウム
1. 松田 慧, 原田浩樹, 石橋功至, "人体内通信路における確率論的モデリングと搬送波伝搬モデルの検討," 信学技報 WBS2005-59, pp. 19-22 (2005-12)
  2. 久世直樹, 原田浩樹, 石橋功至, 河野隆夫, "体温上昇評価による体内無線通信方式の検討," 信学技報 RCS(2006-01)
- G-3.新聞報
- 「な」
- F 著作権の取得状況
- 「し」

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発  
I バイオニックナノメディスンによる循環器調節機能デバイスの開発研究  
複合酵素を用いるグルコース燃料電池の開発

分担研究者 西澤松彦（東北大学大学院工学研究科 教授）

末永智一（東北大学大学院環境科学研究科 教授）

研究要旨：

超小型心臓ペースメーカの駆動電源として機能する生体内埋め込み型の「バイオ燃料電池」の研究開発である。ビタミン  $K_3$  / ジアフォラーゼ / グルコースデヒドロゲナーゼからなる2層構造をカーボン電極上に調製して、グルコースを酸化するアノード極（マイナス極）としての動作を確認した昨年度の成果を受け、17年度は、①NADH（および  $NAD^+$ ）の膜内固定、②カソード極（プラス極）の酵素電極化、③血清や血液といった体液からの発電、および④微細加工技術を用いる小型デバイス化、などを検討し、埋め込み実験に向けた具体的な取り組みを一層進めることができた。

A.研究目的

本研究は、生体内で長期使用が可能なグルコース/ $O_2$  型のバイオ燃料電池の構築を目的としている。特に、生体毒性が懸念される物質を一切使わないことを開発方針とする。

昨年度は、ナフトキノン類の一種であるビタミン  $K_3$  をポリマー化してジアフォラーゼ（NADH を酸化する酵素）と混合し、グルコースデヒドロゲナーゼ（ $NAD^+$ 依存性のグルコース酸化酵素）の固定膜と二層構造にすることで、再現性のある出力密度が得られるようになった。また、導電助剤として乾電池や燃料電池に用いられているカーボンブラックを修飾膜に混練することで、飛躍的な電流値の向上を達成した。

本年度の研究課題①は、NADH の固定である。これまでは、NADH を固定化しておらず適宜添加せねばならなかった。血中の NADH の濃度は低いことが予想されるため、NADH の修飾膜内への固定化は必須である。

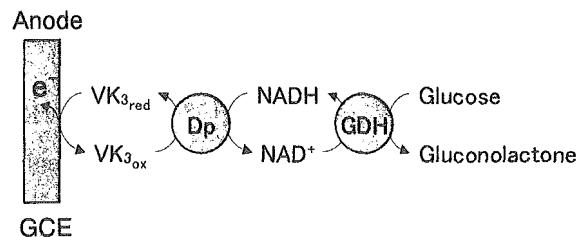


図 A-1 本研究におけるアノードの反応

研究課題②は、カソード極（プラス極）の酵素電極化である。これまで PDMS エマルジョンを Pt 電極に被覆することで、酸素還元極としてきたが、白金電極は中性条件においては酸素還元過電圧が大きく、また低濃度の  $Cl^-$  などによっても被毒されてしまうことも報告されている。そこで、カソードもカーボン電極とし、酵素を用いることで過電圧を小さくする取り組みを行う。

研究課題③として、血液などの体液に含まれるグルコースや酸素を燃料とすることで発電を行う。しかしながら血液中にはアスコル

ビン酸などの電極反応を阻害する物質があり、またタンパクの付着により血栓を形成し、電極反応を阻害、また血流を乱すなどの悪影響が考えられる。そこで実際に血液などの体液からの発電実験を行うことで、血液中で得られる出力や、電極表面の様子を観測することで、体液発電の問題点を検討する。

さらに、研究課題④として、微細加工により流路型、直列型の小型電源を作製に取り組んだ。流路型の燃料電池は流速を制御した環境で測定を行えるといった測定装置としての利点や、さらにこのタイプの燃料電池を発展させることで血管ジョイント型の燃料電池などの可能である。またバイオ燃料電池は電圧が1V以下程度と小さいため、駆動できる機器が限られてしまう。バイオ燃料電池の可能性を広げるためにも直列接続型のバイオ燃料電池の製作は必須であり、今回はその試作を行った。

## B. 研究方法

### B-1. NADH の修飾膜内への固定化

ビタミン K<sub>3</sub>(VK<sub>3</sub>)のポリマー (PAA-VK<sub>3</sub>, 図 B-1) と Dp, Poly (ethylene-glycol) diglycidyl ether (PEGDGE), NADH, ケッチエンブラック (KB) 分散液の混合溶液をディスク形状のグラッシーカーボン電極 (電極表面積: 0.07cm<sup>2</sup>) に 4μL 塗布して室温で乾燥させる。乾燥の過程で、PEGDGE のエポキシ基が PAA-VK<sub>3</sub> および酵素のアミノ基と反応して架橋する。また NADH はアニオン性であり、カチオン性の PAA と静電的に結合することで修飾膜内へ固定化できると考えた。さらに二層目として GDH を Poly-L-lysine(PLL), PEGDGE, NADH を含む溶液に溶かし、4μl を塗布して乾燥させた。以上の過程で構成される修飾電極の模式図を図 B-2 に示した。

作製したアノード電極の評価には、ジャケットタイプの電気化学セルを用い、測定溶液

の液温を 37°C に保って三極式の電気化学計測を行った。溶存酸素を除去する場合には、高純度の N<sub>2</sub> ガスで十分バブリングを行った。参照電極は Ag/AgCl (sat. KCl) である。

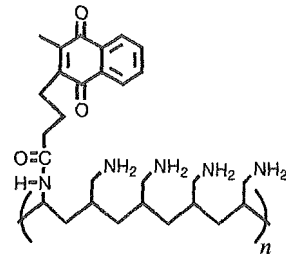


図 B-1 PAA-VK<sub>3</sub> の構造式

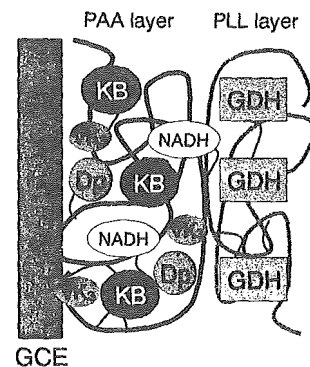


図 B-2 酵素二重膜によるアノード電極

### B-2. カソード極の酵素電極化

Bilirubin oxidase (BOD) を用いた。BOD は中性条件下で酸素の 4 電子還元反応を行い、反応速度、電位などが優れた酵素であり、バイオ燃料電池のカソード触媒として有望である。またそのメディエータとしては 2,2'-azino bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) (ABTS) が反応速度、電位などが優れたメディエータとし

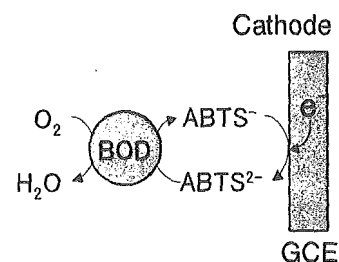


図 B-3 酵素を用いたカソードの反応

て報告されている。本研究ではこの BOD 及び ABTS を用いたカソードの製作を行った。

ABTS と BOD の固定化には静電相互作用を利用した。固定化方法としては以下のようになっている。

- ① 先ず研磨，洗浄したグラッシーカーボン電極（電極表面積： $0.07\text{cm}^2$ ）にカチオン性のポリマーである PLL の溶液を  $4\mu\text{L}$  塗布する。
- ② 乾燥後，アニオン性の ABTS と BOD の水溶液を  $4\mu\text{L}$  塗布する。
- ③ さらに PLL を塗布し，乾燥後アニオン性の Heparin を塗布する。

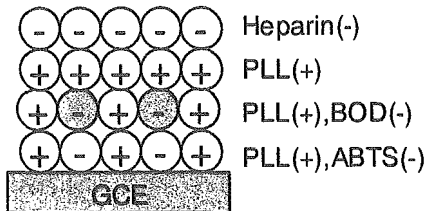


図 B-4 酵素修飾電極表面の概念図

ABTS, BOD は反対の電荷をもつ PLL と静電的に引かれることで，電極に固定できると考えた。また，同電荷を持つ Heparin とは反発するため，溶液への溶出を防いだ。ここで Heparin は血液の抗凝固剤としても用いられており，電極表面の血液適合性に寄与することも期待できる。また電極の評価は B-1 で述べたような電気化学測定により行った。さらに固定化の安定性を調べるために数日にわたって耐久性の測定を行った。

### B-3. 体液からの発電

Dp, GDH, VK3 及び KB を修飾したアノード電極，3wt% の PDMS エマルジョン (Toray Dow Corning Silicone, Type DC 84) を  $36\mu\text{L}/\text{cm}^2$  塗布した白金板を  $\text{O}_2$  選択性カソードとすることで，血清や血液からの発電実験を行った。血清には牛胎児血清 (FBS) を，血液には食後二時間程度のヒト静脈血を用いた。測定中に凝固しな

いように少量の Heparin を添加し，測定を行った。また全ての測定は  $37^\circ\text{C}$  条件下で行った。

### B-4. 小型燃料電池の製作

スライドガラス上にフォトリソグラフィ，スパッタリングなどの半導体微細加工により図 B-5 のような Pt (カソード) と Au (アノード) の電極を作製した。さらに流路やセル同士のセパレートのために鋳型を用い PDMS (シリコンゴム) を成型した。Au 電極表面には B-1 の方法で酵素 2 層膜を作成し，Pt 電極には PDMS エマルジョンを修飾した。

作製した流路型の燃料電池は流量を変化させ， $30\text{k}\Omega$  の抵抗をつなぐことで放電電流の流速依存性を評価した。また直列型の燃料電池は，抵抗を  $3\text{M}\Omega \sim 1\text{k}\Omega$  まで変化させることで，出力特性を評価した。また全ての測定は室温で行い，燃料溶液には  $5\text{mM}$  グルコースを添加した緩衝溶液を用いた。

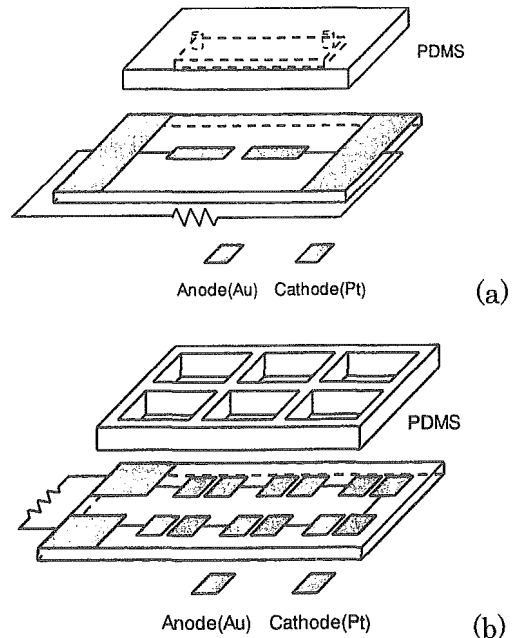


図 B-5 作製した流路型(a)，直列型(b)燃料電池の模式図

## C. 研究結果と D. 考察

### C-1. NADH の修飾膜内への固定化

NADH を修飾膜内に固定化した電極につい



て評価した. 図 C-1 は, NADH を修飾膜内に固定化した電極のサイクリックボルタモグラムである. グルコース 5mM, 40mM の添加に対してそれぞれ酸化電流の増大が見られ, これにより, 図 A-1 に示した電極-NADH 間の電子移動スキームが機能していることが示された. NADH の存在なくしては図 A-1 の反応が成り立たないため, NADH は修飾膜内に固定化されているものと考えた.

ここで NADH の固定化は静電的なものであるため, 結合が弱く溶液へ溶け出している可能性がある. そこで, 電極の耐久性を測定することで NADH の固定強度を検討した. 図 C-2 は NADH を固定化した場合と固定化していない場合の CV の 0.2 V における酸化電流値の推移をプロットしたものである. NADH を固定化したものの方が早く減衰してしまうが, 5 日目においても 70%ほどの電流値を保っている. この両者の差は NADH 固定化電極において, NADH が徐々に溶出していることによるものと考えられる.

この NADH の溶出を防止するために, 二層構造膜の上にさらにプロトン透過性である Nafion<sup>®</sup>膜を形成することで, -に帯電してい

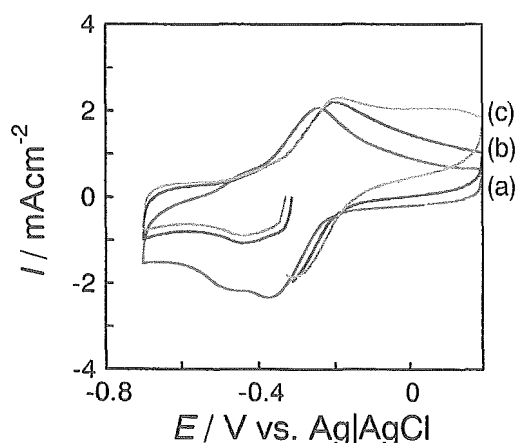


図 C-1 PAA-VK<sub>3</sub>, Dp, GDH, NADH 固定化電極の CV. 測定溶液: (a)リン酸緩衝液 (pH7.0), (b)5 mM Glucose, (c)40 mM Glucose, 5 mV/s.

る NADH の溶出を防げるのではないかと考えた. 結果を図 C-3 に示す. Nafion<sup>®</sup>膜をコートしているものの方が, 電流を保てることと示された. これにより NADH の溶出は Nafion<sup>®</sup>膜をコートすることでさらに防止できると考えた.

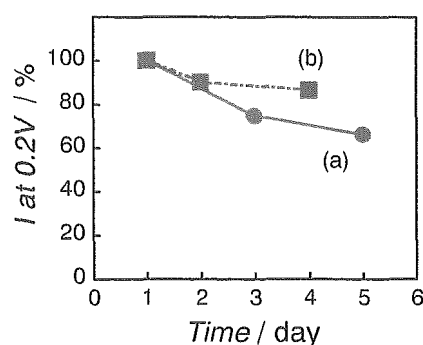


図 C-2 NADH 固定化電極(a)と非固定化電極の CV 0.2V における酸化電流値の推移. 測定溶液: 5 mM Glucose を含むリン酸緩衝液 (非固定化電極の場合は 0.5 mM NADH をさらに添加).

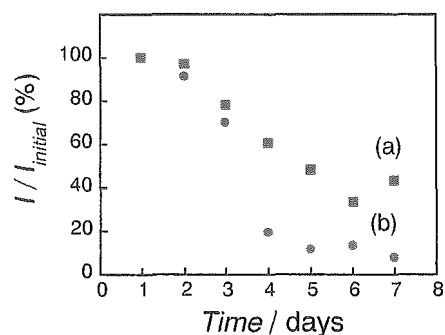


図 C-3 Nafion<sup>®</sup>修飾電極(a)と非修飾電極(b)の電流値の推移. 測定溶液: 5 mM Glucose を含むリン酸緩衝液.

## C-2. カソード極の酵素電極化

B-2 の方法で製作した ABTS-BOD 修飾電極のサイクリックボルタモグラムを図 C-4 に示す. 窒素飽和下において 0.5 V 付近で ABTS の酸化還元反応が観測された. さらに空気飽和下では窒素飽和条件下に比べマイナスに電流が大きくなっており, 還元電流の増大が確

認できた。これにより B-3 に示すような反応系が機能していることがわかった。

さらに作製した ABTS-BOD 修飾カソードと前述したアノードを用いて電池としての性能を評価した。また比較のため、PDMS で被覆した Pt 電極をカソードとして用いた場合とあわせ、図 C-5 に示す。ABTS-BOD を修飾したカソードを用いた場合には 0.9 V 程度の起電力を得ることができ、0.6 V 程度の Pt カソードに用いたものに比べ、起電力を大きくすることができた。しかしながら、電流値は Pt 電極を用いた場合よりも小さかった。よって、例

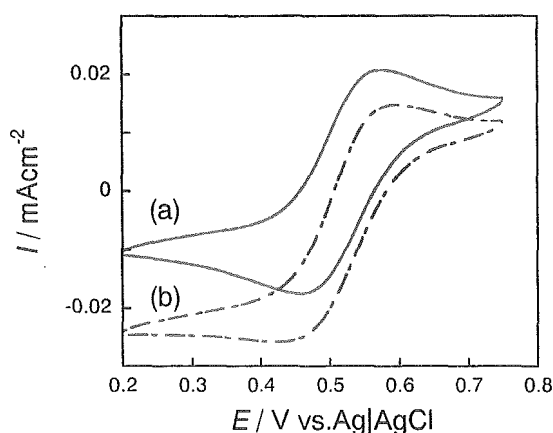


図 C-4 ABTS-BOD 修飾電極の CV. 測定溶液：リン酸緩衝液(pH7.0), (a)窒素飽和, (b)空気飽和, 5 mV/s.

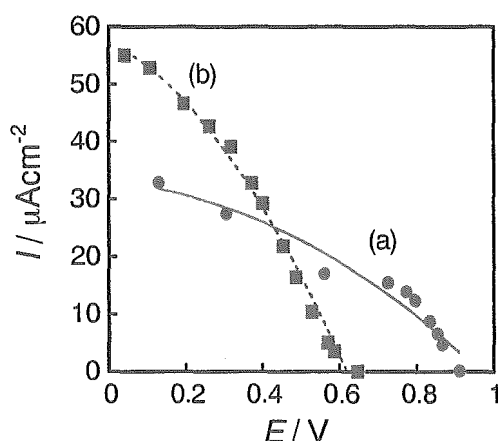


図 C-5 ABTS-BOD 修飾電極(a)および PDMS 被覆 Pt 電極(b)をカソード用いた電池の電流密度 vs. 電圧. 測定溶液：5 mM グルコースを含む空気飽和リン酸緩衝液(pH7.0).

えばアノードのようにカーボンブラックを混練することで、実効表面積を大きくする必要がある。

### C-3. 体液からの発電

作製した燃料電池を用いて血液など、体液からの発電を行い、その体液発電に伴う問題点を検討した。ここでアノードには NADH を固定していない時点のものを用い、カソードにはアノードに比べ表面積の大きな Pt 電極に PDMS エマルジョンを修飾し用いた。

図 C-6 はグルコース溶液、血清、血液からの発電を行ったものの電力密度-電圧曲線である。血清からの発電においてはグルコースを含む緩衝溶液と同等の電力密度を得ることができ、血液からの発電では 1/3 程度の最大電力密度が得られた。電力密度が低下してしまった原因は血清や血液に含まれる阻害物質が特にカソードに対して影響を与えているためと考えられる。PDMS エマルジョンをコートしただけでは完全な選択性は得られず、電極反応物質が Pt 電極の酸素還元反応を妨害している。ここでより反応選択性の高い酵素を用

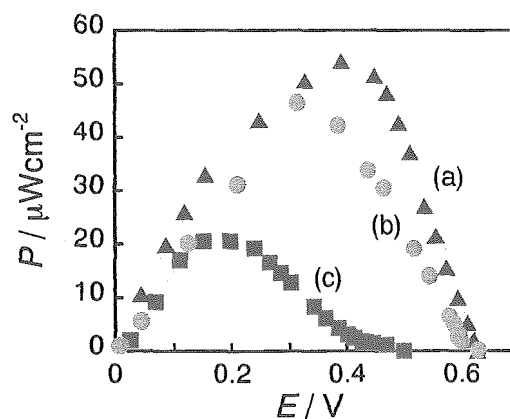


図 C-6 PAA-VK<sub>3</sub>-Dp / GDH アノードと PDMS 被覆 Pt カソードによる電池で得られた出力特性. 測定溶液：20 mM Glucose を含むリン酸緩衝液(pH7.0) (a), FBS (b), ヒト静脈 (c), それぞれ 0.5 mM の NADH を添加した. 37°C.

いたカソードにより影響の低減が期待できる。

また、血液を用いた実験の際の問題点にも着目した。図 C-7 は血液発電前後の血液や電

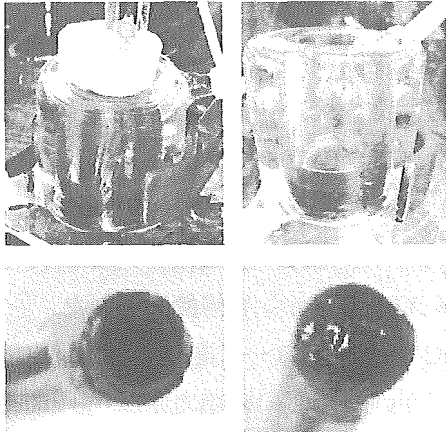


図 C-7 実験前後の血液と電極表面の様子

極の様子である。実験の初期段階では均一な溶液であったが、時間の経過とともに血球成分が沈んでしまい、血漿と血液に分離してしまった。血液が分離した状態での測定は、正確な測定とはいえないため、流路型のセルを製作し、血液を流しながら測定を行うなど、実験系の開発も必要である。

また、測定後のアノード電極を観察したところ、血栓状の物質ができていた。この物質は強固に接着しており、電極の反応や血流を乱す恐れがある。今後、MPC ポリマーやヘパリンの修飾を行うことで、このような物質の付着しづらい表面を実現していく予定である。

#### C-4. 小型燃料電池の製作

半導体微細加工を利用して小型燃料電池の製作を行った。作製した燃料電池は流路型の燃料電池と、直列型の小型燃料電池である。

流路型の小型燃料電池はポンプにより、流量を制御することができ、燃料の供給速度などを規制することができる。さらに血液を用いた実験の際に用いることで、血管を模擬した測定を行うことができる。作製した流路型燃料電池の写真と、実験系の模式図を図 C-8

に示す。

この流路型電池を用いて放電電流の流速依存性を検討した。その結果を図 C-9 に示す。燃料溶液を流していない場合、流速の遅い場合(10 $\mu$ L/min)には電流は早く減衰してしまうが、流速の早い場合(100 $\mu$ L/min)にはほぼ一定の電流を得ることができた。これは、流速の遅い場合には電極反応ではなく、燃料の供給が律速になっているためであると考えられる。これより、流路型燃料電池を用いて電池の耐久性を測定する場合は、流速を 100 $\mu$ L/min 程度と十分に速くし、燃料の供給を不足させない状態で測定することで電極の耐久性を検討できることがわかった。

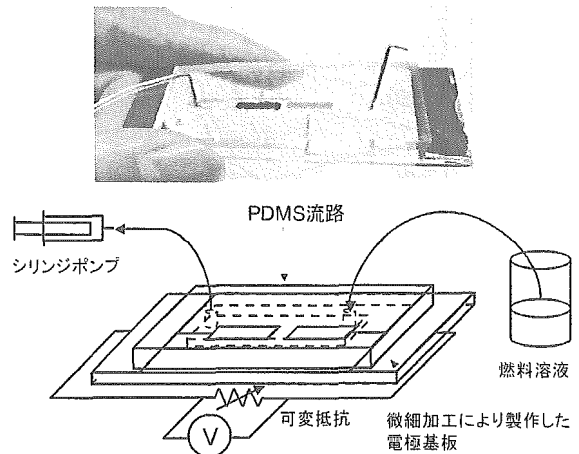


図 C-8 微細加工で製作した流路型燃料電池の写真(上)と測定系(下)の模式図

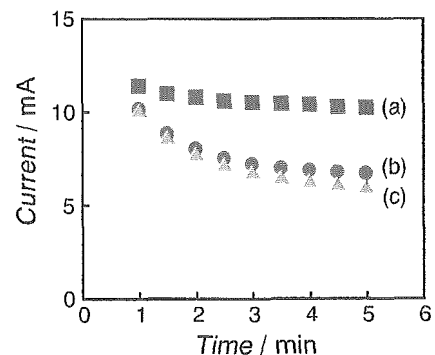


図 C-9 電流の流速依存性. 負荷抵抗:30k $\Omega$ , (a)100 $\mu$ L/min, (b)10 $\mu$ L/min, (c)no flow : 測定溶液:5mM Glucose を含むリン酸緩衝液(pH7.0).

また図 B-5 の模式図に示したような直列型の燃料電池を作製した。この燃料電池は一枚のスライドガラス上に 6 つのセルを直列に配置し、それぞれのセルを形成した PDMS でセパレートする構造をとっている。これにより単セル当りの起電力(0.6 V)の 6 倍である 3.6 V の起電力を得ることを目的としている。

結果を図の C-10 に示す。この燃料電池に 5mM のグルコース溶液を充填することで、目的通り 3.6 V の起電力を得ることができた(C-10(a))。さらにこの燃料電池により市販のストップウォッチの液晶を表示させることができた(C-10(b))。また、血清(FBS)を用いた場合

でも表示させることができた。このように単セルでは、1 V 以下程度の電圧しか発揮できないバイオ燃料電池でも、直列に接続することで、実用的なデバイスを駆動することができることを示せた。今回のデバイスは試作品であり、実用的なものではないが、微細加工をより一層取り入れることで、このタイプの小型燃料電池も発展させていきたい。

## E. 結論

NADH の固定化、ABTS-BOD の固定化はさらに安定化させる必要があるが、それぞれ数日の使用ならば機能させ続けることができた。また血清や血液などの体液からの発電を行い、様々な物質の混在した混合溶液からの発電に成功した。しかしながら、出力の低下や電極への血栓状物質の付着が認められ、それぞれカソードに酵素電極を用いることや、抗血栓物質による表面修飾により、血液中でも安定した性能を発揮できる電池の作製が必要である。さらに微細加工により作製した流路型燃料電池を用いることで、血液を環流させた状態での発電を行い、血液中での電極の長期安定性を試験していきたい。体内埋め込み型のためのデバイスとしては難しいかもしれないが、直列接続型の小型燃料電池も発展させていくことで、バイオ燃料電池のアプリケーションをふやしていくことができるだろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文

#### 1. Enzyme-Based Glucose Fuel Cell Using Vitamin K<sub>3</sub>-Immobilized Polymer as an Electron Mediator.

F. Sato, M. Togo, M. K. Islam, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku, S. Kurosawa, M.

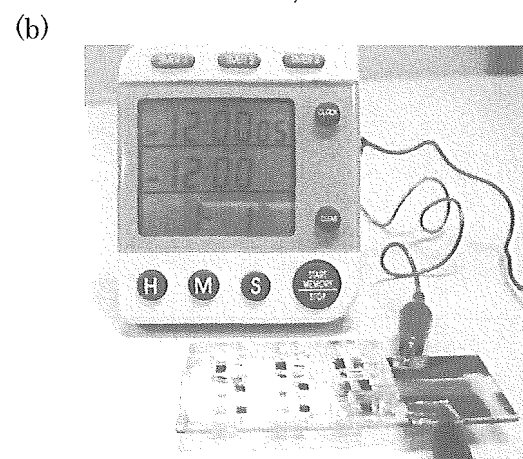
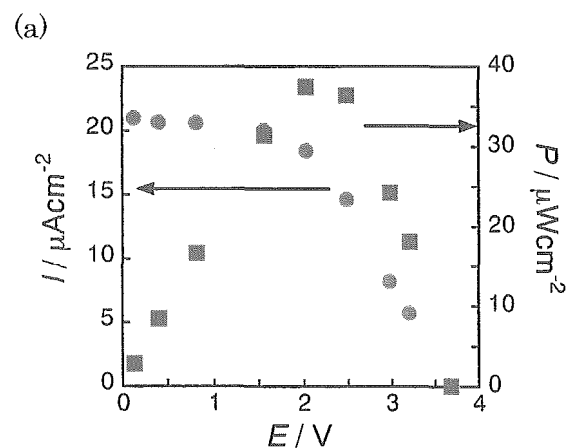


図 C-10 直列型燃料電池の出力特性。測定溶液：5 mM グルコースを含んだリン酸緩衝液(pH7.0)(a)。直列型燃料電池によりストップウォッチの液晶を表示。燃料溶液：5 mM グルコースを含んだリン酸緩衝液(pH7.0)(b)。

- Nishizawa, *Electrochem. Commun.*, 2005, 7, 643-647
2. Enzyme-Based Fuel Cells for Biomedical Microdevices  
M. Nishizawa and T. Togo, *Technical Digest PowerMEMS 2005*, 2005, 177-182.
  3. バイオマイクロ燃料電池の開発動向(解説記事)  
都甲真, 西澤松彦, *M&E*, 2005, 11, 120-122.
  4. ビタミン K3 ポリマーとバイオ燃料電池-体液発電への取り組み-(解説記事)  
都甲真, 西澤松彦, *燃料電池*, 2005, 5, 26-29.
  5. 体内エネルギー変換に学ぶバイオニック燃料電池(解説記事)  
西澤松彦, *機械学会誌*, 2005, 932-933.
  6. 医療用バイオマイクロ燃料電池への取り組み(著書「電池革新が拓く次世代電源」)  
西澤松彦(分担執筆), 73-82, エヌ・ティー・エス, 2006.

ディエーター固定化電極およびこれを用いた生物燃料電池」・第一化学薬品(株)・平成 15 年 9 月 2 日

## G-2.学会発表

1. 「ビタミン K3 修飾ポリマーを用いた複合酵素修飾電極の作製とグルコース/酸素型バイオ燃料電池への応用」  
都甲 真, 佐藤冬樹, 安部 隆, 末永智一, 小菅順一, 深作 昇, 西澤松彦  
電気化学会第 72 回大会, 熊本大学, 2005 年 4 月 1~3 日
2. "Enzyme-Based Fuel Cells for Biomedical Microdevices"  
M. Nishizawa  
PowerMEMS2005, Tokyo, Nov. 28-29

## G-3.新聞報道

日本経済新聞 2005 年 5 月 13 日  
「血液の成分使いバイオ燃料電池-東北大グループ」  
ほか

## H.知的所有権の取得状況

特願 2003-309946・西澤松彦, 末永智一, 小菅順一, 深作昇「電子メディエーター, 電子メ

厚生労働科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発  
ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究

分担研究者 妙中義之 国立循環器病センター研究所人工臓器部長

**研究要旨：**

本研究では、従来から研究を行ってきたナノ分子アーキテクチャー技術により、臨床段階にまで到達できる革新的循環器用医療デバイスの開発することが出来た。我々の開発した T-NCVC コーティングは、器材表面に固相化されたヘパリンの抗血液凝固作用を利用するヘパリンコーティングの一種であるが、その分子構造にナノ単位のアレンジを加え、長期間の抗血栓性の向上を実現した他に類を見ない独特な生体適合性表面処理法である。また、本手法は既存の人工心臓および人工肺に採用され、その抗血栓性を飛躍的に向上させることを可能としている。これまでの研究では、我々は本コーティングの抗凝血機序は、器材表面に接触する細胞の接着作用を著しく阻害する効果が主体であると見いだした。この細胞接着阻害作用は、従来提唱されていたヘパリンコーティングの作用機序とは異なり、ナノ分子アーキテクチャー技術により分子単位で新たに設計された器材表面が、血液中に含まれる多糖類やタンパク質と相互作用した結果、器材表面への細胞の接着を抑制している作用が主体であると推察された。

**A. 研究目的**

本研究の目的は、医療デバイスに使用される高分子素材に対し、我々が開発したナノ分子アーキテクチャー技術を用いることにより、その表面分子構造をナノサイズレベルで自在に設計操作し、既存の素材と生体組織の界面に、より優れた生体適合性や抗血栓性を付与し、循環器疾患克服のための新しい医療デバイスを開発することである。これまでも種々の医療デバイスが開発されてきたが、従来技術ではデバイス表面の生体適合性や抗血栓性に限界があり、長期使用時の信頼性が完全ではなかった。医療デ

バイスの表面構造を自在に設計して、生体適合性を高めることは、循環器疾患の根本治療につながる医療デバイスを開発する上で欠かすことができない技術である。本研究を通じて、産官学が密接に連携を図りながら集約的に研究開発することで、循環器疾患制圧のための新しい治療戦略の確立をめざす。医療デバイスの生体適合性を高め、循環器疾患の根本治療につながる医療デバイスを開発する意義は大きい。

**B. 研究方法**

**B-1. ナノ分子アーキテクチャー表面処理**

## 技術の効果発現メカニズムに関する研究

本年度の研究として、T-NCVC コーティングを施した高分子材料に血漿中タンパク質を吸着させ、その血漿蛋白質の存在が好中球に及ぼす影響について検討を行った。好中球は、血液細胞のなかでも液性炎症に関連する様々なメディエータの分泌を行う重要な細胞とされ、高分子素材に対する好中球の反応は、その素材の生体適合性を決める要因の一つである。本研究は、血漿タンパクを吸着させた T-NCVC コーティングプレート（ポリスチレン製）および無処理プレートを用い顆粒球分画を1時間インキュベーションし、その間に好中球内から遊離したラクトフェリンを測定することにより、器材表面での好中球の異物に対する活性化について検討した。

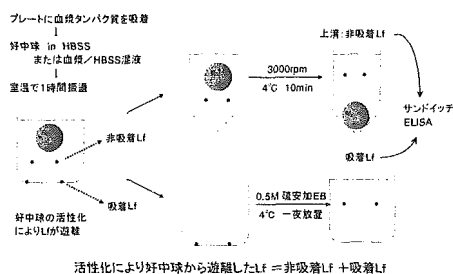


図 B-1. 好中球活性化測定法

## B-2. 高信頼性人工心肺の開発

本年度の研究では、昨年度より引き続き特殊ポリオレフィン製中空糸膜からなる小児用人工肺の血液接触面に本表面処理技術を適用し、より優れた抗血栓性および生体適合性を寄与した新規小児用人工肺を開発し、その長期にわたる性能安定性を検討することを目的とし

た。実験では、本 T-NCVC コーティングを施した小児用 ECMO システムを用いて、体重 20~30 kg の仔ヤギを用いた長期動物実験にて、システムのガス交換性能、抗血栓性、耐久性について検討を行った。長期動物実験は2例行われ、1例目 67 日間、2例目 50 日間にわたり小児用試験人工肺および遠心ポンプの交換を要することなく小児用 ECMO システムによる静動脈バイパスを維持することが可能であった。

## C. 研究結果

### C-1. ナノ分子アーキテクチャー表面処理技術の効果発現メカニズムに関する研究

実験において、生体での使用条件に近似した血漿・HBSS 混液に懸濁した顆粒球を各種プレート中でインキュベーションしたとき、好中球から遊離したラクトフェリンの割合は約 2-4 % であり、器材表面に対する好中球の活性化は軽度であった。しかし、血漿成分を含まず HBSS 液のみに懸濁した顆粒球を各種プレート中でインキュベーションして好中球の活性を検討したところ、好中球から遊離したラクトフェリンの割合は無処理プレートで  $6.6 \pm 0.5 \%$ 、1%T-NCVC コーティングプレートで  $13.9 \pm 2.5 \%$ 、3%T-NCVC コーティングプレートで  $22.4 \pm 4.2 \%$  であり、いずれのプレートにおいても血漿成分を含んだ培養液を使用した群と比較し器材面に対する好中球活性の亢進が認められ、特に T-NCVC コーティングプレートについては、有意に高値を示していた。以上より、T-NCVC コーティングについては、

培養液中にタンパク質を含んでいない状態では、逆に好中球が活性化されやすく、本来の生体適合性を発揮できない状態にあることが示された。

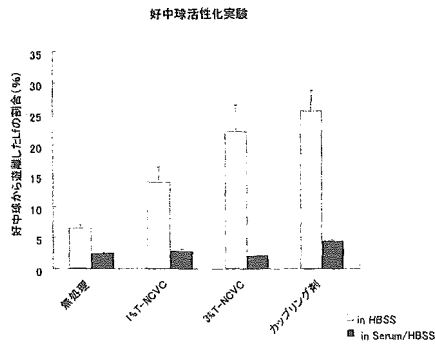


図 C-1. 各プレート群に対する好中球活性の変化

### C-2. 高信頼性人工心臓の開発

実験に使用された2例とも全灌流期間を通して全身状態の異常は一切認められず、小児用 ECMO システムによるバイパス血流量は約 1.5 L/min を維持することが可能であった。血中ヘパリン濃度は、全測定スケジュールにおいて 0.04 I.U./mL 以下を示していた。全血凝固時間 (ACT) は 111~167 sec、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は 39.9~72.5 sec と全測定スケジュールを通して生理的な範囲内で推移した。また、血小板数は1例目でECMO開始24時間後  $76.2 \times 10^4$  /mL から9週間後  $82.93 \times 10^4$  /mL、2例目でECMO開始24時間後  $61.0 \times 10^4$  /mL から7週間後  $55.3 \times 10^4$  /mL とほぼ正常範囲内に収まっていた。両実験において小児用試験人工肺にも明らかな血漿漏出はみられなかった。試験人工肺の酸素移動量は1例目で 67.3-81.3 mL/min、2例目で 58.9-73.5 mL/min、炭酸ガス移動量は1例

目で 15.9-65.0 mL/min、2例目で 24.4-57.6 mL/min の範囲で維持する事が可能であった。いずれの小児用試験人工肺も、24時間に一回 10min 程度ガス流量を上げて乾燥を行うことにより、ガス交換性能の著しい低下は認められず、全測定スケジュールを通して十分な性能を示していた。以上より、本小児 ECMO システムは高い抗血栓性、長期耐久性を保持したままさらに小型・低充填量化を達成しており、臨床応用にあたっては小児領域における重症呼吸・循環不全症例の救命に寄与するものと思われた。

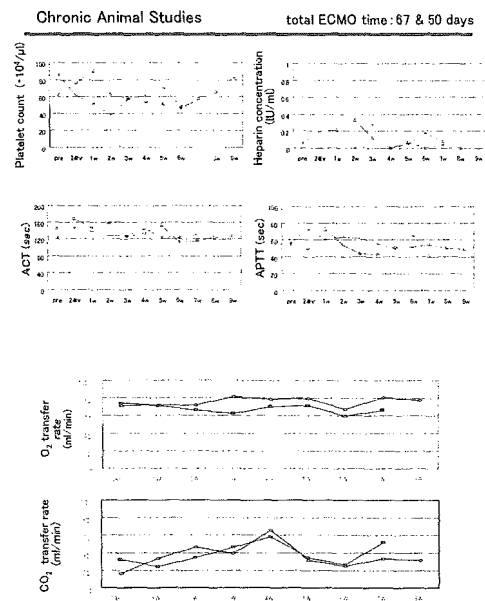


図 C-2. T-NCVC コーティング小児用人工肺の長期動物実験結果

### D 考察

#### D-1. フノ分子アーキテクチャー表面処理技術の効果発現メカニズムに関する研究

器材表面での血栓形成を防止するための理論的手法としては、1) 器材表面に血液凝固防止剤 (ヘパリンなど) を固



定化する(抗血栓物質の利用), ii) 器材表面への血中タンパク質吸着の防止(材料表面の性質の制御による抗血栓性の賦与), iii) 器材表面の均一化(平滑化)が挙げられている。一方, T-NCVC コーティングについては, これまでの研究により T-NCVC コーティングの長期にわたる抗血栓性効果が, コーティング剤に含まれているヘパリンの抗凝血作用のみで行われているのではないことが示されている。また, 従来から血栓形成の原因ともされた器材へのタンパク吸着が認められた状態においても, 本コーティングにおいては, 細胞接着阻害作用が十分に発揮されていることが明らかにされてきた。さらに, 本年度の研究では, T-NCVC コーティングが, 血栓形成過程で重要な好中球活性化に対し抑制効果を発揮するためには, やはり血漿タンパク質の介在が重要であること示され, T-NCVC コーティングの生体適合性能や抗血栓形成能は, コーティング本来の能力に加え, 周囲に存在する蛋白質や多糖類との相互作用により効果的に発揮されていることが示された。従って, T-NCVC コーティングの有する細胞接着抑制機序には, 従来の抗血液凝固性機序とは異なった新しい機序が存在する可能性が想起された。

#### D-2. 高信頼性人工心肺の開発

実験に用いた本システムの人工肺充填量は成人用では 130mL であるのに対して, 45mL と大幅に減量しており, 血液希釈を軽減し循環動態の安定化に有効であると思われた。また, 先行の 24

時間の体外循環実験で観察されなかったコーティングからのヘパリン溶出は, 長期灌流においても同様に観察されず, コーティングに起因する出血性合併症発症の危険性は極めて低いと考えられ, 高い安全性を保持しているといえる。さらに, ほぼ無ヘパリン投与で 3 週間の連続駆動を行ったにもかかわらず, 血栓形成は観察されず, 血栓・塞栓症を疑わせる身体所見もなく, 良好な全身状態を呈しており, 非常に高い抗血栓性を持つと考えられる。人工肺中空糸における血漿漏出に伴うガス交換能低下は 3 週間連続駆動でも一切認めず, 実験開始時と同等の性能を保っており, 長期耐久性に関しても十分な水準に達している。以上より, 本小児 ECMO システムは成人用で実証した高い抗血栓性, 長期耐久性を保持したままさらに小型・低充填量化を達成しており, 臨床応用にあたっては小児領域における重症呼吸・循環不全症例の救命に寄与するものと思われる。

#### E. 結論

本研究により, T-NCVC コーティングの優れた細胞接着の抑制性能を解明することにより, 我々の有するナノサーフェステクノロジーを以てナノ構造的なアレンジを加え, 新しいコンセプトの次世代型生体適合性コーティングを生み出すことが可能と考えられた。また, 本ナノテクノロジー技術によりヘパリン表面固定技術を施行することで, ガス交換性能, 抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. 太田 圭, 巽 英介, 片桐 伸将, 水野 敏秀, 築谷 朋典, 本間 章彦, 武輪 能明, 妙中 義之, 北村 惣一郎, 松田 智昌, 酒井 一成, 田中 秀典, 佐藤 正喜: ヘパリンコーティング人工肺 Platinum Cube NCVC シリーズの開発の現状ー Platinum Cube NCVC 2000 の慢性動物実験による検討ー. 膜型肺, 28 : 48-50, 2005.
2. 片桐 伸将, 舟久保 昭夫, 築谷 朋典, 巽 英介, 武輪 能明, 妙中 義之, 福井 康裕, 高野 久輝, 北村 惣一郎: 中空糸膜充填体モデルを用いた数値流体解析手法による酸素・炭酸ガス移動量推定の検討. 膜型肺, 28 : 19-24, 2005.

### G-2. 学会発表

1. 太田 圭, 片桐伸将, 水野敏秀, 築谷朋典, 本間章彦, 巽 英介, 妙中義之, 武輪能明, 高野久輝, 北村惣一郎, 松田智昌, 酒井一成, 田中秀典, 佐藤正喜. Pulatinum Cube NCVC シリーズを用いた ECMO システム開発の現状ーPulatinum Cube NCVC 2000 の急性および慢性動物実験による検討ー. 人工心臓と補助循環懇話会(33). 鬼怒川. 1.28-29. 2005
2. 太田 圭, 片桐伸将, 水野敏秀, 築谷朋典, 本間章彦, 巽 英介, 妙中

義之, 武輪能明, 高野久輝, 北村惣一郎, 松田智昌, 酒井一成, 田中秀典, 佐藤正喜. Platinum Cube NCVC2000 を用いた小児用 ECMO システム開発の現状. PCPS 研究会 (15). 新宿区. 2.26. 2005

3. 太田 圭. 重傷外傷症例に適用可能な抗凝固療法を必要としない PCPS システムの開発. 日本外傷学会(19). 横浜市. 5.26-27. 2005
4. 太田 圭, 巽 英介, 片桐伸将, 水野敏秀, 築谷朋典, 本間章彦, 武輪能明, 妙中義之, 高野久輝, 北村惣一郎, 松田智昌, 酒井一成, 田中秀典, 佐藤正喜. 小児 ECMO 用小型人工肺 Platinum Cube NCVC 2000R の開発. 日本生体医工学大会(44). つくば市. 4.25-27. 2005.
5. Tatsumi E, Taenaka Y, Katagiri N, Mizuno T, Ota K, Tsukiya T, Takewa Y, Homma A, Sato M, Tanaka H, Sakai K, Matsuda T. Development and chronic animal testing of the National Cardiovascular Center heparinless ECMO system. American Society for Artificial Internal Organs(51). Washington DC. 6.9-11. 2005
6. Ota K, Tatsumi E, Taenaka Y, Katagiri N, Mizuno T, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Takano H, Sato M, Tanaka H, Matsuda T, Sakai K.. Prolonged heparinless animal testing of a newly developed antitholonbogenic heparin-coated pediatric ECMO system.. American

- Society for Artificial Internal Organs(51). Washington DC. 6.9-11. 2005
7. Katagiri N, Funakubo A, Tsukiya T, Tatsumi E, Taenaka Y, Takewa Y, Homma A, Fukui Y, Takano H, Kitamura S. An influence of concentration changes in the gas layer on a transfer of O<sub>2</sub> into blood through a hollow fiber membrane in an oxygenator with computational fluid dynamics(CFD). American Society for Artificial Internal Organs(51). Washington DC. 6.9-11. 2005
  8. 築谷朋典, 巽 英介, 妙中義之, 片桐伸将. 遠心ポンプ一体型人工肺の溶血低減を目的とした流路形状の改良. 日本流体力学会年会. 2005. 新宿区. 9.5-7. 2005
  9. 太田 圭, 巽 英介, 片桐伸将, 水野敏秀, 築谷朋典, 本間章彦, 妙中義之, 松田智昌, 酒井一成, 田中秀典, 佐藤正喜. 重傷外傷症例に有用な抗凝固療法を最小化するPCPSシステムの開発. 日本救急医学会総会・学術集会(33). 大宮. 10.26-28. 2005
  10. 片桐伸将, 舟久保昭夫, 築谷朋典, 巽 英介, 妙中義之, 本間章彦, 福井康裕. 血液ガス反応を組み込んだ数値流体解析手法による人工肺内ガス層濃度変化が血中酸素・二酸化炭素濃度分布に与える影響の検討. 生活支援工学系学会連合大会(3). 津市. 12.8-9. 2005.
- G-3. 新聞報道  
本年度は特になし
- H. 知的財産の出願・登録状況  
本年度は特になし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

装置化へ向けた各種素材および基盤技術の統合

分担責任者 絵野沢 伸 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部・室長

研究要旨：長期透析患者に高率に発症する透析アミロイドーシスは、痛みや運動機能障害といった著しいQOL低下を引き起こす。これは本来腎で代謝再利用される血中 $\beta 2$ -microglobulin(以下 $\beta 2M$ )が透析によっては十分に除去することができずに体内に蓄積することが病因とされる。現在、高濃度になった $\beta 2M$ は透析時にとヘキサデシルアミン製カラム（商品名リクセル）を併用して吸着除去しているが、非特異吸着が防げていない。本研究の目的のひとつとして、この原因物質である $\beta 2M$ を生理的リガンドである Megalin をもって除去するデバイスの開発を目指している。そこで腎近位尿細管に多く発現する生理的リガンド Megalin と $\beta 2M$ をともにリコンビナントタンパクとして得て、相互作用に関する研究を行った。

ラット Megalin の cluster II 部位発現用のトランスファーベクタープラスミドを構築し、バキュロウイルスで His-Megalin 融合タンパクの発現系および精製方法を確認した。また、ラット $\beta 2M$ タンパクを大腸菌で発現させ、精製し、修飾タグ分子を取り除く方法を確認した。この系において、 $\beta 2M$ 産生大腸菌を放射性 $[^{35}S]$ アミノ酸存在下で培養し、標識化 $\beta 2M$ を得、生理的タンパクと同様の挙動を示すことを、in vivo のオートラジオグラフィーによって確認した。次いで in vitro 実験でリガンドである Megalin との結合を調べた。さらに、現行医療機器であるリクセルと、血清タンパクの非特異的吸着について比較し、Megalin は非特異吸着が非常に低いことがわかった。将来的に想定される医療機器としての利用には、結合領域を特定し、限定した小分子化することが望ましいことから、現在、Megalin の $\beta 2M$ 結合領域を探索している。

本分担研究の統括者として、当班のもうひとつの基本課題であるトランスポーターMDR1 組込みプロテオリポソームの活性発現至適環境の検討を、久保井分担者（阪大院基礎工）および植田分担者（京大院農）らと、電子顕微鏡によるプロテオリポソーム視覚化を三枝分担者（産医研）と、トランスポートエネルギー供給系の開発について黒田分担者（広大院）と共同して行った。また、藤村分担者（自治医大）とは新規トランスポーターである縫合型ビリルビントランスポーターABCA8 大量発現系の構築を、大政分担者（阪大院工）とは再構築細胞における薬物代謝酵素電子伝達系の役割に関する研究を協力・分担して行った。

A. 研究目的

現在、我が国では約 22 万人が人工透析を受けており、年々増加している。この背景には、糖尿病性腎症をはじめとする新規発症と、透

析技術の進歩による長期透析患者の増加がある。腎臓の基本的機能は体内の老廃物除去と電解質平衡の維持であり、透析はこれらを代替するに優れた医療技術である。しかしなが