

厚生労働科学研究研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀池 靖浩

平成 18(2006)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究	2
堀池 靖浩	
II. 分担研究報告	
1. 比色法使用基質緩衝液のドライ化と保存性に関する研究	10
沖 明男	
2. Ni フリーSUS 鋼による彩管化と高剛性化研究に関する研究	13
黒田 大介	
3. 無痛針を用いた採血補助装置と診断チップの評価	19
守本 祐司	
4. 診断チップシステム技術、チップ信頼性研究	24
小川 洋輝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29

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

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

研究要旨

高齢者らが元気で過ごすためには生活習慣病などの疾病の予防が重要であり、無痛針より採取された微量血液を分析し在宅で出来るだけ多マーカーを診断するチップを創製することを目的としている。本年度は、(1)NiフリーSUS細管による無痛針作製時に生じた座屈を克服するため、鍛造温度などの改善で平均結晶粒径  $20\mu\text{m}$  の粒微細化を達成し、外径  $100\mu\text{m}$ 、内径  $50\mu\text{m}$  の細管を加工中である。(2)ドライ比色法の確立のため、基質緩衝液にレハロースを包含させ、凍結乾燥し、使用時は乾燥分の水を添加して試薬とする方法を開発し、保存性を大幅に向上させた。(3)  $6\mu\text{L}$  の全血から3項目を測定、全チップ動作を遠心力で実行、チップには無接触、血球と血漿の分離、及び血漿の同時秤量、二種類の試薬の秤量、基質緩衝液対血漿の高混合比などを実現する新比色法診断チップを開発し、恒温下でチップの計測する装置を試作した。そして、以上の成果を基に、中性脂肪値のメバロチン服用効果を長期間モニタリングし、中性脂肪値の漸減を観察し、本チップシステムの有効性を証明した。

分担研究者

氏名 所属機関

職名

沖 明男 独立行政法人物質・材料研究機構  
 特別研究員

黒田大介 独立行政法人物質・材料研究機構  
 研究員

守本祐司 防衛医科大学  
 助手（指定講師）

小川洋輝 株式会社アドビック  
 代表取締役

きるバイオセンシング技術を早急に確立しなければならない。そこで、本研究は、NiフリーSUS管を用いた無痛針により在宅で素人でも簡単に採血でき、採取された微量血液のドライ比色法により分析し、出来るだけ多くのマーカーから生活習慣病などの疾病を診断する安価・使い捨て可能な独創的な診断チップを創製することを目的とする。

図1は、本研究目的の概念を示す。本チップシス

A. 研究目的

我が国では近年、少子高齢化が進行し、高齢者が占める医療費のコストの激増が国家予算を圧迫すると共に、少子化による労働力の不足により国力を衰退させることが危惧される。この包括的解決の一策は、高齢者が働く意欲のある限り働き、培った知恵と経験を社会に還元できるよう元気で毎日を送れる「健康立国」を世界に先駆け我が国に創り出すことである。このためには予防が大切であり、在宅で簡便・迅速に多項目を同時診断で



図1 本研究の目的と目指すもの

テムが実現すると、まず医師は病状の迅速なファーストスクリーニングに使用できる。また各家庭に導入されると、携帯端末等を介してマーカー値を医療施設に送付し、医師により迅速な診断が可能になる。更に、検出マーカーを増やし、長期間にわたる使用により、医療施設に多数の方のマーカーの推移が蓄積されたデータベースが構築され、マーカーと疾病との相関が判明すると、高精細テレビを介しての在宅診断が実現されると期待される。

## B. 研究方法

### (1) NiフリーSUS製無痛針の開発

通常のステンレス(SUS)はNiを含んでいるため、アレルギーの発生が危惧され、主任研究者の所属機関では近年Niを除去したSUSを研究してきた。現在、ステントや歯列矯正器具に適用されている。昨年度は、NiフリーSUS(Fe-24Cr-2Mo重量%)では、通常のSUSと比べてHEL299細胞の増殖数が著しく多く、生体適合性が高いことが示された。このNiフリーSUSの細管化して無痛針を開発する。前年度は外径100 $\mu$ m、内径50 $\mu$ mの細管を作製したが、図2に示すように、鍛造時に座屈が生じたので、本年度は結晶粒の微細化と鍛造割れの防止に努め、SUS管材料を開発する。

### (2) トレハロース包含基質緩衝液による長期保存化

当初、富士写真フィルム㈱から提供されるドライケミストリ用ゼラチンに基質緩衝液を包含させ、

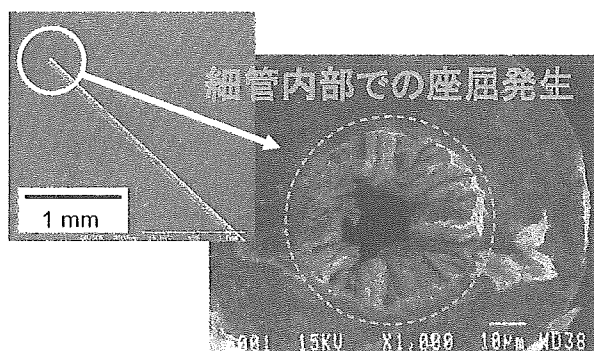


図2 外径100 $\mu$ m、内径50 $\mu$ mのFe-24Cr-2Mo細管化時に発生した座屈のSEM2次電子像

診断チップの流路に導入し、血漿と出会うと膨潤すると共に発色することを研究した。しかし、当該ゼラチンは網目状膜に浸み込ませ、薄膜に展開して血漿と反応させる場合には効果を発揮するが、本研究が目指す流路への適用は、基質緩衝液も血漿もゼラチンの中に十分浸み込まないことが判明した。この原因は、当該ゼラチンの分子量が1万以上と大きいことに起因すると考え、分子量の低い、魚由来ゲル(5000)と豚由来ゲル(3100-5000)を適用し、この水性ゲルの凍結乾燥を行なった。しかし、動物の有する不純物が基質緩衝液と反応し、日時が経つにつれ基質緩衝液と反応し、発色する問題が発生した。そこで、本年度は基質緩衝液を二糖類のトレハロース包含し、凍結乾燥後、乾燥分だけの水分を導入する方法を開発した。

### (3) 比色法診断チップの開発

昨年度は、グルコースなどの1段反応型と、ウレアーゼなどから発生したアンモニアガスからBUN検出する2段反応型の両方のチップ構造を開発した。2段反応型ではBUN(尿素窒素)で検量線を得ることが出来たが、1段反応型では上述のごとくゼラチンで問題が発生し、平成17年度は肝臓病のマーカーのGOTとGPTに関し、この試薬を二糖類のトレハロースに包み、凍結乾燥後、乾燥分だけの水分を導入して、更に血漿とミキシングして、GOTとGPTの酵素活性の検量線を得ることができた。上述のトレハロース包含基質緩衝液の凍結乾燥試薬を用いた新比色法診断チップを開発した。本チップでは、6 $\mu$ Lの全血から、血漿分離と血漿秤6 $\mu$ Lの全血から3項目を測定、全チップ動作を遠心力で実行、チップには無接触、血球と血漿の分離、及び血漿の同時秤量、二種類の試薬の秤量、GOT、GPT、コレステロール、中性脂肪などに必要な50~100:1の混合などを実現すると共に、恒温中でチップの計測する装置を開発した。

### (4) 新比色法診断チップによる中性脂肪値の抑制薬の内服による長期治癒効果

昨年度開発の電子採血補助装置、トレハロース包含基質緩衝液の凍結乾燥試薬、本比色法診断チ

ップ、及び試作恒温下測定装置を用いて、研究員の1人の異常に高い中性脂肪値が高脂血症治療薬メバロチン(三共製薬製)を内服した効果を長期的に観察した。

(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る。本機構では人血の採取、採血具などについて外部の有識者を含む倫理委員会が設立されておりその厳格な規定に基づいて研究を進める。動物実験にあたっては、動物の愛護および管理に関する法律(昭和48年法律第105号)ならび実験動物の飼養及び保管等に関する法律(昭和55年総理府告示第6号)を遵守する。前臨床実験にあたっては、各研究機関のガイドラインに沿った計画を倫理委員会で検討、承認を得た後に、書面でのインフォームド・コンセントを確認する。

C. 研究結果

(1) NiフリーSUS製無痛針、及び電子採血法の開発

NiフリーSUS鋼の製造技術は、詳しくは分担研究者の報告を参照戴き、簡略には、フェライト型SUS鋼の軟らかい状態で細管加工する。真空溶解したFe-24Cr-2Moを900~1000℃に熱し、急冷により結晶粒を微細化する。次に1000℃の鍛造温度で5分間の再加熱し、丸棒にする。そして酸化皮膜を除去後、直径30mm、長さ500mmの丸棒を冷間鍛造し、ガンドリル加工でパイプ加工を施し、900℃の焼鈍温度で細管にした。無痛針としては、硬度は高く靱性(粘り強さ)を保持させる

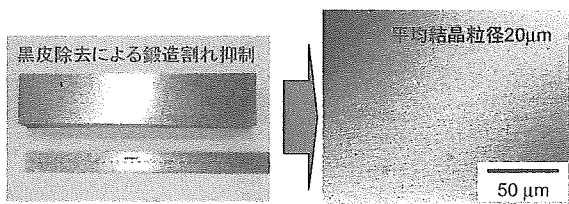


図3 鍛造温度1000℃、再熱時間5分の工程で鍛造し、黒皮除去後のNiフリーSUS表面の写真

ため、更に、1200℃の窒素気流中でN吸収処理を行ない、急冷する。その結果、オーステナイト型SUS鋼になり、強度、耐食性、生体適合性が著しく改善された。しかし、平成16年度では外径100mm、内径50mmの細管加工を行なったが、細管中に図2に示す座屈が生じた。この原因は、結晶粒の粒径が大きく、細管中に結晶粒が内部に押し出されたためであり、この座屈抑制のために、素材の鍛造条件の最適化、素材の結晶粒微細化、伸管条件の最適化を図った。鍛造温度900℃、再熱時間5分の工程を1000℃、再熱時間5分に変え、図3に示すように酸化皮膜を除去することにより、平均結晶粒径を20μmにまで微細化することが出来た。現在、この丸棒を外径100mm、内径50mmへの細管加工を鋭意行なっている。

(2) トレハロース包含基質緩衝液による長期保存化

図4は、GPTの基質緩衝液のみ場合と、これに10%、20%トレハロースを包含させた時の吸光度の時間変化を示す。実験は、基質緩衝液としてトランスアミナーゼ測定用キット(CII-テストワコー(和光純薬))を冷凍庫にて予備冷凍の後、凍結乾燥機内で、-40℃(24時間)に続いて-10℃(24時間)にし、140IUの標準血清滴下、混合後37℃で、GPT基準液が25Karmen単位時で、キューベ

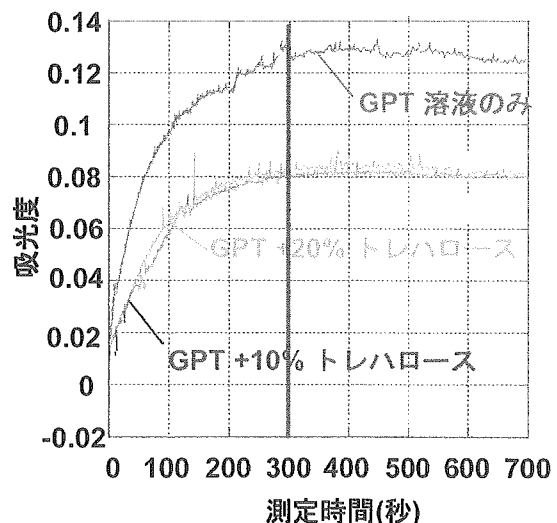


図4 GTP基質緩衝液のみの場合と、これに10%、20%トレハロースを包含させた時の吸光度の時間変化

ットの光路長が5mmで405nm光照射によってSSCCII法を使用して測定した。結果は、300秒あたりから飽和する。レートアッセイなので、値が上昇する勾配を測定することになるので短時間で測定可能である。

トレハロース包含のGPT基質緩衝液を用いてGPTの酵素活性の検量線を得るため、まず、図5に示す試作ミキシングチップで行なった。血漿と

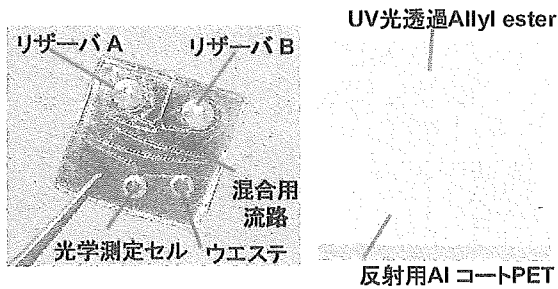


図5 試作ミキシングチップ

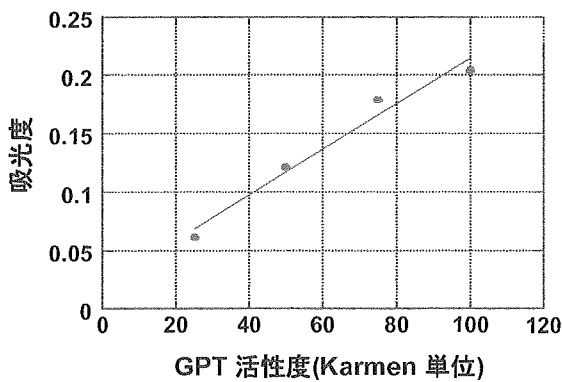


図6 GPTの酵素活性の検量線

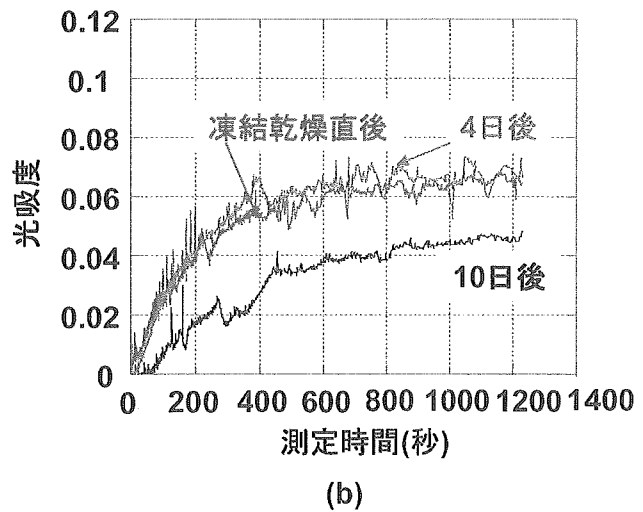
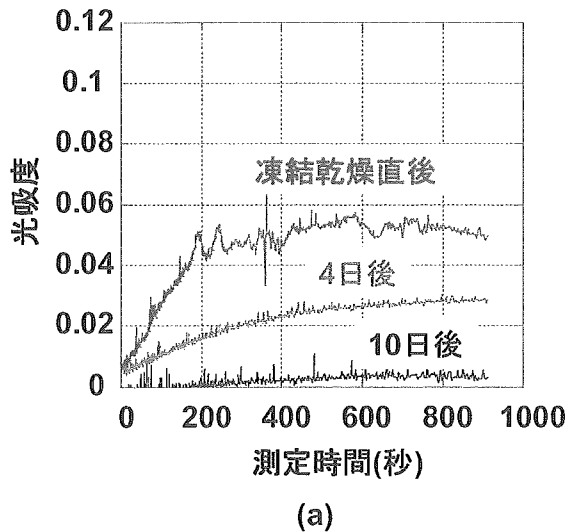


図7 凍結乾燥試薬の保存安定化。(a)中性脂肪基質緩衝液のみ、(b)中性脂肪基質緩衝液：20%トレハロース=1:1

GPTの混合比は、1:100であり、GPT基質緩衝液を半分ずつに分け、それぞれリザーバAとBに導入し、血漿をAに入れた。この混合液を、チップの上部を回転中心として遠心力を用いて混合するため、円弧より外側に設けたジグザグ様の流路を作製し、緩やかな遠心力を印加して流路を流れる。その際、この流路の上部には突起が形成され、ここで乱流を起こして、流路の出口の光学測定セルに達するまでにミキシングが完了する。このチップの表面にはアルミ膜を蒸着した。また、チップ上にはAllyl ester(昭和電工製)を用いてリザーバAとBと光学測定セル用の各孔を設けたものを貼り付けた。ミキシング後、混合液は光学測定セルの中に埋まり、白色光をビームスプリッターを通して入射し、アルミ板上での反射光はビームスプリッターを経て分光器で照射光の減衰度を検出する。図6は、この結果のGPTの酵素活性の検量線を示す。広範囲なGPTの酵素活性に対して線形の結果を得た。

図7は、中性脂肪(トリグリセライド)基質緩衝液のみの場合と20%トレハロースを包含した場合の吸光度と測定時間の関係を示す。基質緩衝液としては中性脂肪測定用キット(トリグリセライドE-テストワコー(和光純薬))を用い、試料溶液を冷凍庫にて予備冷凍の後、凍結乾燥機内で、 $-40^{\circ}\text{C}$ (24時間)に続いて $-10^{\circ}\text{C}$ (24時間)に保持し、

その後、凍結乾燥試薬を常温(25°C)で保管した。  
トリグリセライド基準液を 100mg/dL、光路長は

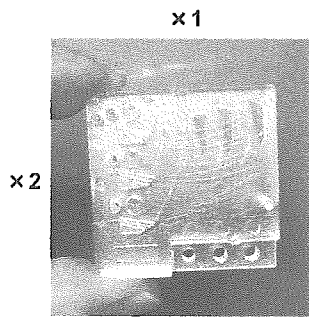


図8 試作した新比色法診断チップの概観

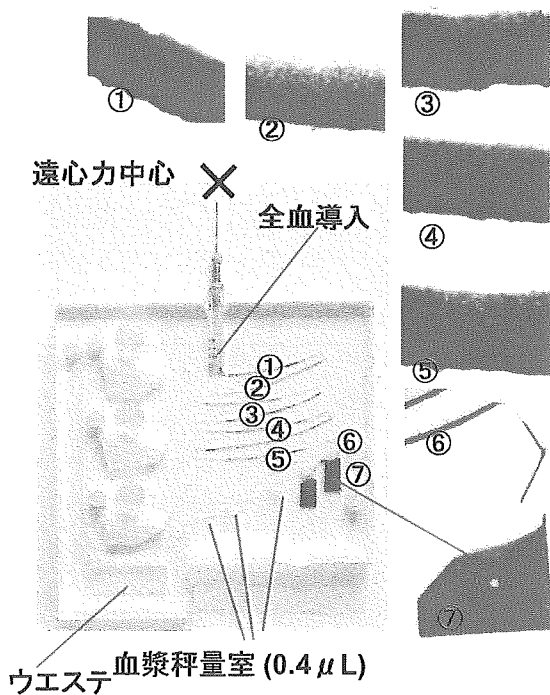


図9 血球・血漿分離と血漿定量を同時に遠心力で行う流路構造

5mmであった。本凍結乾燥基質緩衝液を乾燥分と等量の水で溶液に戻し、140IUの標準血清を滴下した。(a)の基質緩衝液のみの場合は、10日経ると活性度はほぼゼロになったが、20%トレハロースを包含した試薬は4日経ってもほぼ100%活性を保持10日後でも約80%の活性値を保持し、本方法の有効性が示された。

### (3) 比色法診断チップの開発

図8は開発した比色法チップを示す。×1と×2は遠心力印加用の回転中心を示す。3層からなっており、各層の接着板を含むと5層構造である。本チップ動作は順を追って説明する。まず、図9は1層目を示し、無痛針に採取された血液を×1を中心に回転し、血液を円弧から遠心力を受ける外側に配置されたジグザグの流路で、弱いが急速な加速で生じる遠心力によって、血漿は流路の上方に、血球は下方に分離され、最終段で、血球のみが捕獲され、血漿は0.4μLに秤量されて採取される。

次に、図10は基質緩衝液AとBの秤量と血漿とのミキシング過程を観察を容易にするため色素溶液を使用して示す。血漿、及び(a)の左側の大きい孔から試薬Aを導入後、×1を中心に回転させ、1層目では血漿が、2層目では基質緩衝液Aが秤量される。図11は、チップに遠心力を与える回転体を示す。公転しチップが遠心力を受けた後、回転体上で90度自転させ、貯溜層で試薬Aと血漿を混合する。このようにして(b)の状態から回転体上で90度自転させ、(c)で試薬Bは1層目の小さい円筒状入口

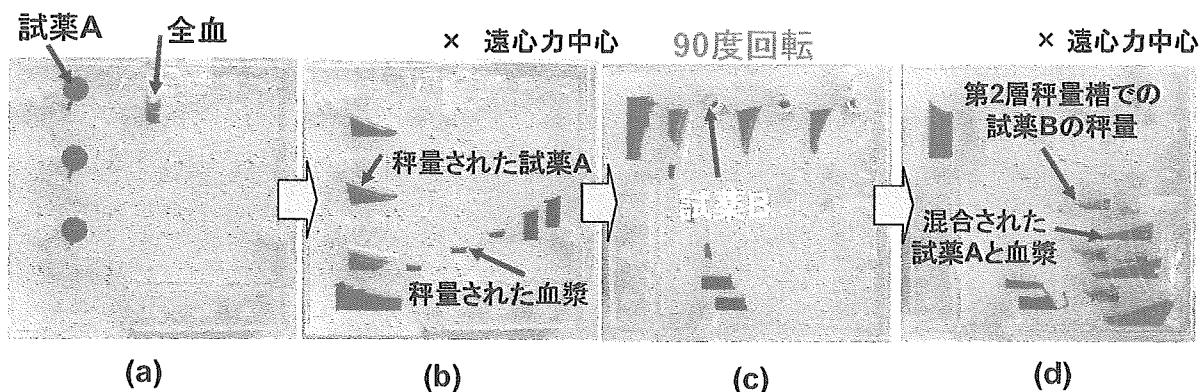


図10 基質緩衝液AとBの秤量と、Aと血漿とのミキシング過程

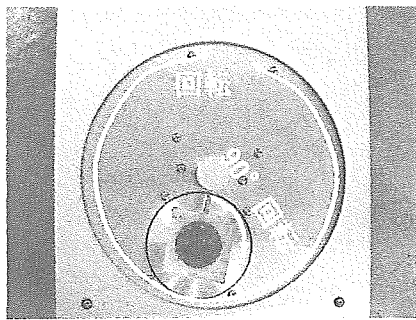


図 1.1 チップの 90° 公転・自転機構

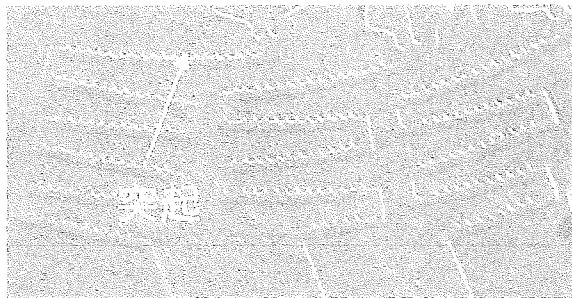


図 1.2 遠心力によるミキシング流路部の写真

より導入され、2層目を通過して、×2を中心に回転させ、(d)のように秤量される。

最終的には、図12に示すように、試薬A/血漿と試薬Bは3層目に設けられたジグザク流路内に×1を中心に回転させ、図13(b)に示すように流路の内壁の一方に設けられた突起により乱流を発生させ、(a)では層流によりミキシングされていない溶液は、(b)から(c)を経て、(d)に示すように計測セル内に均一にミキシングされ比色計測が行なわれる。このジグザク流路の特徴は、流路の折返し部の前後で流路外側と内側の流れが入れ替わり、乱流を受けた液は、次段では乱流を受けず、逆に乱流を受けない液は次段では乱流を受け、次第にミキシングされて行く。

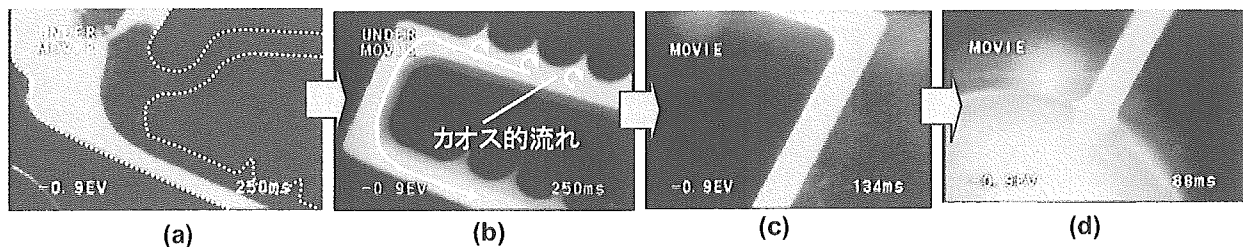


図 1.3 ミキシング流路での混合過程の観察

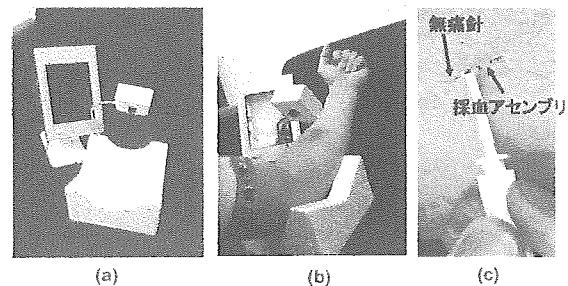


図 1.4 電子採血補助装置

#### (4)新比色法診断チップによる中性脂肪値の抑制薬の内服による長期観察

昨年度までに、SUS304 を用いた外径  $150\mu\text{m}$  の細管の内壁を超平滑化し、先端は 10 度に 3 面カットで研磨し、更に電解研磨をした無痛針を開発した。また、静脈位置を近赤外光照射により可視化し、更に針と皮膚表面の電位を測定することにより静脈の深さをモニタリングし、これらが液晶画面で表示され、それを見ながら無痛針を穿刺して自分の血圧から採血する電子的補助採血法を開発し、図 14 に示すようにその電子的採血補助装置を開発し、研究者間では実用化した。これを使用し、研究者の 1 人が異常に高い中性脂肪値を示し、その高脂血症治療薬であるメバロチンを内服しながら、今回開発したトレハロース包含基質緩衝液を用いて、4 ヶ月に及ぶ服用効果をモニタリングした。図 15 は、中性脂肪基質緩衝液として中性脂肪測定用キット（トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬））に 20%のトレハロースを包含させて凍結乾燥し、乾燥した水分と等量の水分を付加した試薬を用い、基準液濃度を希釈し、種々の濃度に対して得た検量線を示す。図 16(a)に示すように、チップの基質緩衝液に導入し、中性脂肪



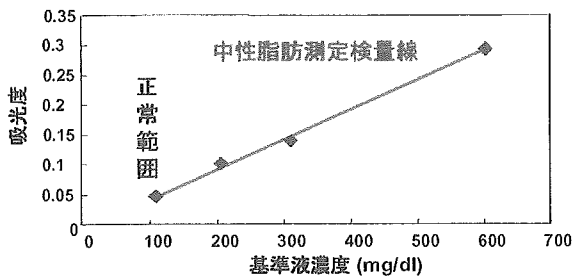


図15 中性脂肪の検量線

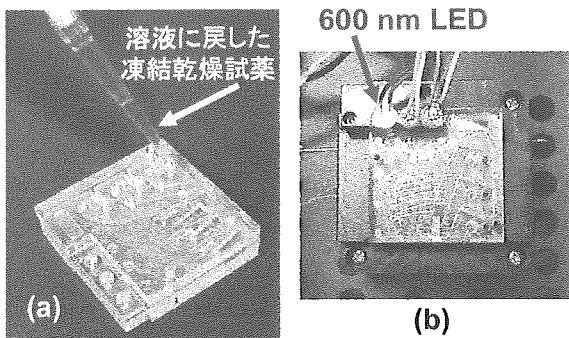


図16 (a)チップへの基質緩衝液の導入、(b)チップ内測定

値は(b)のようにチップ内で測定した。

図17にはこのように測定した中性脂肪値のメバロチン服用効果を示す。メバロチン服用前の中性脂肪値は406 mg/dLと高値であったが、メバロチン内服開始に伴い、中性脂肪値の漸減されていく様子が観察された。従来検査法による検証を行っていないため、診断チップによる測定値の

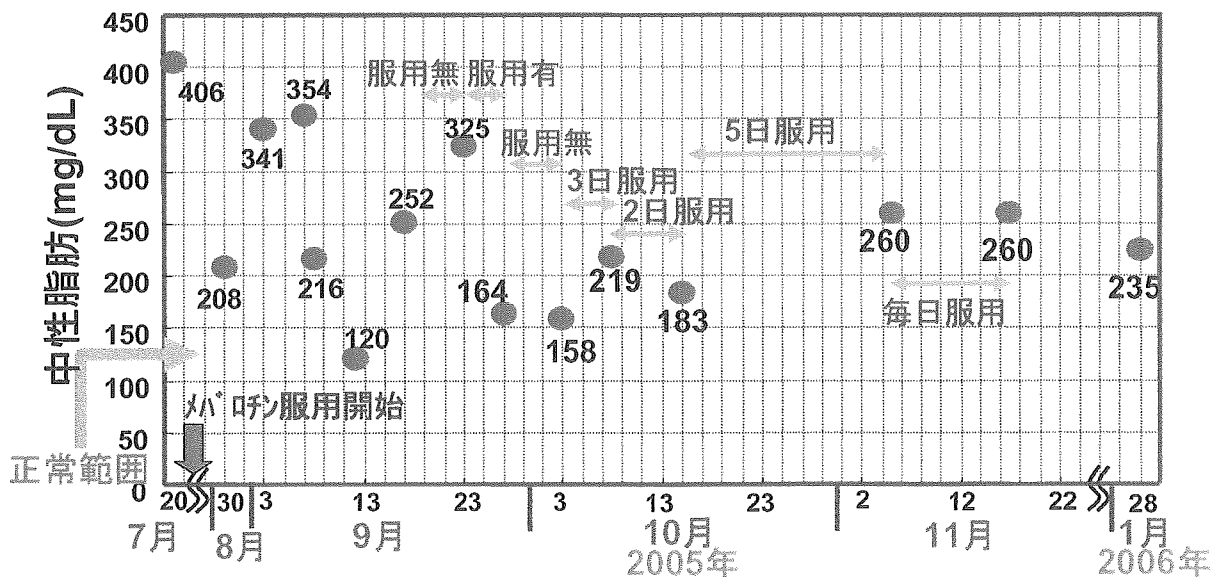


図17 中性脂肪値のメバロチンの長期服用効果

精度・誤差に関して今後検討する必要があるものの、高脂血症治療薬による中性脂肪値の減少を捉えることに成功しており、本チップが簡易診断・モニタリング法として有用であることが示された。

最後に、本年度研究を以下にまとめる。

1. NIR 光照射と電位測定により静脈位置を検出し、電子的補助採血装置を実現した。
2. NiフリーSUSを用いた無痛針開発が着実に進捗している。
3. 血漿・試薬の秤量、高混合比などを可能にした新比色法チップを開発した。
4. 比色法検査用試薬へのトレハロース添加で保存性を改善した。
5. 中性脂肪値を長期計測し、薬剤服用効果をモニタリングした。

最終年度では以下の展開を行なう。

1. 比色用試薬の保存性を一層向上させる。
2. 極力早期に前臨床実験に入る。
3. チップ流路の高密度により10 $\mu$ Lの全血より多項目を診断し、生活習慣病を予防するヘルスケアチップを開発する。

#### D. 健康危険情報

特に無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Chia-Hsien Chang, Hiroki Ogawaa, Akio Oki, Madoka Takaib, Masao Nagaia, Hideaki Hisamotoc and Yasuhiro Horiike, "Healthcare Chip Based on Integrated Electrochemical Sensors Used for Clinical Diagnostics of Bun", Japanese Journal of Applied Physics, (in press).

2. 学会発表

1. C.-H. Chang, S. Hashioka, Hiroki Ogawaa, Akio Oki, Madoka Takaib, Masao Nagaia, Hideaki Hisamotoc and Yasuhiro Horiike, "Healthcare Chip on Integrated Droplet Electrowetting Sensors used for Clinical Diagnostics", 第 53 回応用物理学関係連合講演会, 3, 1387, (2006).
2. 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", 平成 17 年度 厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業 萌芽の先端医療技術推進研究 ナノメディシン研究成果発表会(2006).
3. C.-H. Chang, H. Ogawa, M. Nagai, A. Oki, M. Takai, H. Hisamoto, and Y. Horiike, "Health Care Chip based on Integrated Electrochemical Sensors used for Clinical Diagnostics, Bun and Creatine", Proceedings of  $\mu$ TAS 2005 Conference, 2, 1312-1314, (2005).
4. Y. Horiike, A. Oki, M. Nagai, M. Takai, C-H. Chang, H. Hisamoto and H. Ogawa, "Development of Clinical Chips for Medical

Diagnostics", Extended Abstract of the 2005 Intern. Conf. on Sol. St. Dev. And Mat., 2-3, (2005).

15. 堀池靖浩, "ナノテクノロジーによる医療の革新", つくば発ナノバイオ融合テクノロジーシンポジウム (2005).
16. 堀池靖浩, "無痛針による在宅健康診断チップ", 第 43 回茅コンファレンス(2005).

3. 解説・総説

1. 堀池靖浩、小川洋輝, "株式会社アドビック - 在宅で健康診断できるヘルスケアチップの実用化開発 -", NIMS NOW, 3, 6, (2006).
2. 堀池靖浩、C.-H. Chang、沖明男、小川洋輝、長井政雄, "在宅で健康診断できるヘルスケアチップの開発", Bionics, 5, 30-34, (2005).
3. 小川洋輝、長井政雄、堀池靖浩, " $\mu$ -TAS 応用によるバイオセンサ式ヘルスケアチップ", 電子材料, 11, 67-71, (2005).
4. 堀池靖浩, "無痛針採血による在宅医療健康診断チップ", 第 19 回「大学と科学」人体にやさしい医療材料, 52-60, (2005).

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特願 2005-234992 “検体分析チップおよび検体チップの使用方法”

特願番号未取得(平成 18 年 2 月 27 日提出)  
“試薬調製方法”

2. 実用新案登録 なし

3. その他 特に無し

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

比色法使用基質緩衝液のドライ化と保存性に関する研究

分担研究者 沖 明男

研究要旨

比色法において基質緩衝液の保存性を高めるため、当初、ドライケミストリ用ゼラチンに基質緩衝液を包含させようとしたが、本ゼラチンは分子量が高く、薄膜としては使えるが、流路にゼラチンを担持させる本計画の使い方には使用不可であることが判明した。そこで、トレハロースに注目し、試薬を包含し凍結乾燥後、乾燥分と等量の水を補い溶液に戻す方法を開発した。まず、GPT 測定に用いるため、1:100 の血漿と GPT 基質緩衝液の混合用にチップを開発し、良好な検量線を得た。また、保存安定化に関しては、中性脂肪基質緩衝液に関してトレハロースの包含の有無を調べ、トレハロース包含基質緩衝液は、10 日経ても 80%の活性度を保持させることが出来た。

A. 研究目的

在宅で無痛針を用いて微量採血から簡便・迅速に多項目を同時診断できる診断チップを構築するため、本研究では、多項目を測定できる比色法に注目し、従来の基質緩衝液を液状で使用する際、試薬特性の劣化の発生を防止するため、そのドライ化を目指し、長期保存性を有する基質緩衝液試薬を創製することを目的とする。

B. 研究方法

当初、富士写真フィルム㈱から提供されるドライケミストリ用ゼラチンに基質緩衝液を包含させ、診断チップの流路に導入し、血漿と出会うと膨潤すると共に発色することを研究した。しかし、当該ゼラチンはドライケミストリ用、即ち網目状膜に浸み込ませ、薄膜に展開して血漿と反応させる、いわば 2 次元的方法として用いる場合には効果を発揮するが、本研究が目指す流路、長手方向の 1 次元的方法では、基質緩衝液も血漿もゼラチンの中に十分馴染まないことが判明した。この原因は、当該ゼラチンの分子量が 1 万以上と大きいことにあることに気付いた。そこで、分子量の低い、魚由来ゲル(5000)と豚由来ゲル(3100-5000)を適用し、この水性ゲルの凍結乾燥を行なった。しかし、

動物の有する不純物が日時が経つにつれ基質緩衝液と反応し、発色し、問題が発生した。そこで、本年度は基質緩衝液を二糖類のトレハロース包含し、凍結乾燥後、乾燥分だけの水分を導入する方法を開発した。

C. 研究結果

図 1 は、GPT の基質緩衝液のみ場合と、これに 10%、20%トレハロースを包含させた時の吸光度

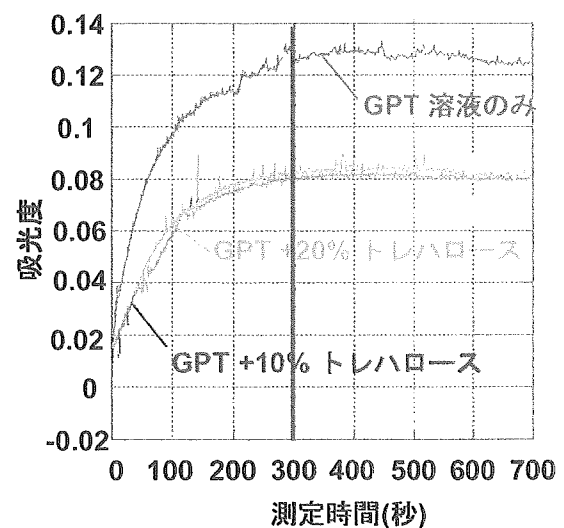
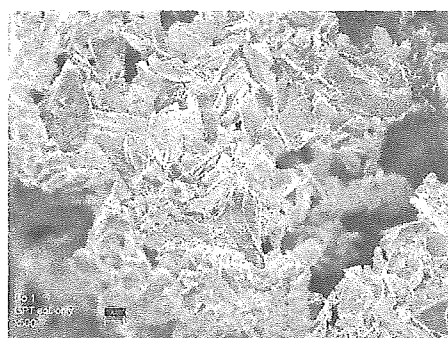


図 1 GPT の基質緩衝液のみ場合と、これに 10%、20%トレハロースを包含させた時の吸光度の時間変化

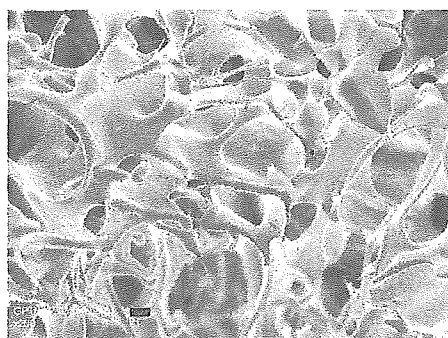
の時間変化を示す。実験は、基質緩衝液としてトランスアミナーゼ測定用キット（CII-テストワコー（和光純薬）を冷凍庫にて予備冷凍の後、凍結乾燥機内で、 $-40^{\circ}\text{C}$ （24時間）に続いて $-10^{\circ}\text{C}$ （24時間）にし、140/IUの標準血清滴下、混合後 $37^{\circ}\text{C}$ 下で、GPT 基準液が 25Karmen 単位時で、キュベットの光路長が 5mm で 405nm によって SSCCII 法を使用(全試薬を混合後、血清点着直後からのレートアッセイ)して測定した。結果は、300秒あたりから飽和する。レートアッセイなので、値が上昇する勾配を測定することになるので短時間で測定可能である。

図 2 に、GPT 基質緩衝液のみ(a)、それに 20%トレハロースを包含したもの(b)を凍結乾燥し、それらの SEM 写真を示す。GPT 基質緩衝液からトレハロースに含まれているように見える。

トレハロース包含の GPT 基質緩衝液を用いて GPT の酵素活性の検量線を得るため、まず、図 3



(a)



(b)

図 2 SEM 写真(a)GPT 基質緩衝液のみ、(b)GPT 基質緩衝液に 20%トレハロースを包含したもの(b)

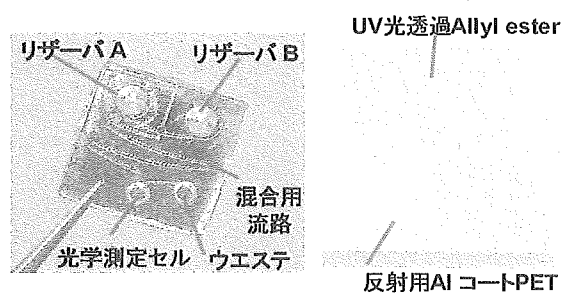


図 3 試作ミキシングチップ

に示す試作ミキシングチップで行なった。血漿と GPT の混合比は、1:100 であり、GPT 基質緩衝液を 1:1 に分け、それぞれリザーバ A と B に導入し、血漿を A に入れた。この混合液を、チップの上部を回転中心として遠心力を用いて混合するため、円弧より外側に設けたジグザグ様の流路を作製し、緩やかな遠心力を印加して流路を流れる。その際、この流路の上部には突起が形成され、ここで乱流を起こして、流路の出口の光学測定セルに達するまでにミキシングが完了する。このチップの表面にはアルミ膜を蒸着した。また、チップ上には Allyl ester(昭和電工製)を用いてリザーバ A と B

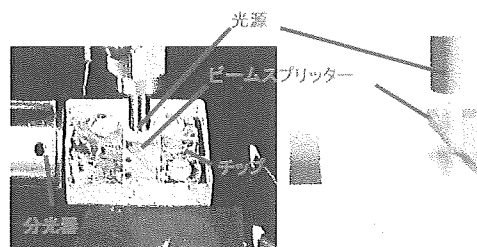


図 4 測定光学系

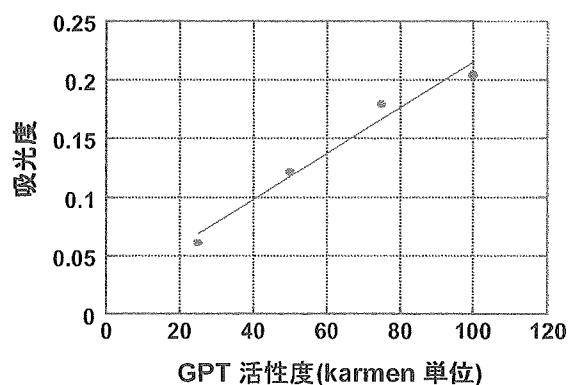


図 5 GPT の酵素活性の検量線

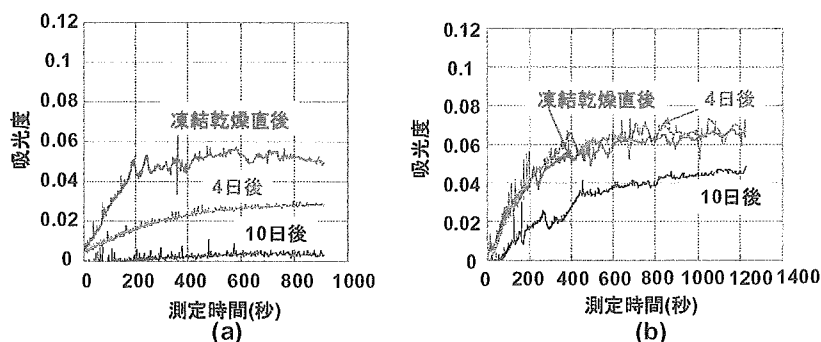


図6 凍結乾燥試薬の保存安定化。(a)中性脂肪基質緩衝液のみ、(b)中性脂肪基質緩衝液：20%トレハロース=1：1

と光学測定セル用の各孔を設けたものを貼り付けた。そして、図4に示すような光学系を組んで測定した。混合液は光学測定セルの中に埋まり、光源からの白色光はビームスプリッターを通過して混合液を照射し、アルミ板上で反射し、反射光はビームスプリッターを経て分光器でその減衰度を検出する。図5は、この結果のGPTの酵素活性の検量線を示す。広範囲なGPTの酵素活性に対して線形の結果を得た。

図6は、中性脂肪(トリグリセライド)基質緩衝液のみの場合と20%トレハロースを包含した場合の吸光度と測定時間の関係を示す。基質緩衝液としては中性脂肪測定用キット(トリグリセライドE-テストワコー(和光純薬))を用い、試料溶液を冷凍庫にて予備冷凍の後、凍結乾燥機内で、 $-40^{\circ}\text{C}$ (24時間)に続いて $-10^{\circ}\text{C}$ (24時間)に保持し、その後、凍結乾燥試薬を常温( $25^{\circ}\text{C}$ )で保管した。トリグリセライド基準液を $100\text{mg/dL}$ 、光路長は $5\text{mm}$ であった。本凍結乾燥基質緩衝液を乾燥分と等量の水で溶液に戻し、 $140\text{IU}$ の標準血清を滴下した。(a)の基質緩衝液のみの場合は、10日経ると活性度はほぼゼロになったが、20%トレハロースを包含した試薬は4日経ってもほぼ100%活性を保持10日後でも約80%の活性値を保持し、本方法の有効性が示された。

#### D. 健康危険情報

該当なし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

1. Y. Horiike, A. Oki, M. Nagai, M. Takai, C-H. Chang, H. Hisamoto and H. Ogawa, "Development of Clinical Chips for Medical Diagnostics", Extended Abstract of the 2005 Intern. Conf. on Sol. St. Dev. And Mat. (SSDM), (Kobe).

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許出願

特願 2005-234992 "検体分析チップおよび検体チップの使用方法"

特願番号未取得(平成18年2月27日提出) "試薬調製方法"

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

Ni フリーSUS 鋼による細管化と高剛性化に関する研究

分担研究者 黒田大介

研究要旨

平成 16 年度に加工した Ni フリーSUS 管の内部では、結晶粒粗大化に起因する座屈が認められた。そこで、平成 17 年度は細管加工時の結晶粒粗大化を抑制するために、高周波真空溶解炉にて溶製した Fe-24Cr-2Mo (mass%)の鋳塊に対して 1000°Cでの熱間鍛造と減面率 20%以上の冷間鍛造を施した。その結果、細管加工前のフェライト状態において平均結晶粒径 20  $\mu\text{m}$  まで結晶粒を微細化することに成功した。また、Ni フリーSUS 管を無痛針として使用するためには高い力学的強度と硬度が必要である。そこで、外径 350  $\mu\text{m}$ 、内径 270  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 管を用いて窒素吸収処理による高剛性化プロセスを検討した。窒素吸収処理と冷間加工を組み合わせることにより無痛針として必要な力学的特性および硬さを付与できることが確認された。

A. 研究目的

平成 16 年度に作製した Ni フリーSUS 管内部では図 1 に示すような座屈が発生し、細管厚さ約 2  $\mu\text{m}$  に対して約 12  $\mu\text{m}$  の板圧増加が認められた。



図 1 外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Fe-24Cr-2Mo 細管の SEM2 次電子像

平成 17 年度の本研究課題の目標は、平滑な内部性状を有する Ni フリーSUS 管の形成と高剛性化プロセスの検討である。そこで、以下に示す 2 点を本年度の研究目的とし、無痛針への適用を検討した。

(1) 結晶粒を微細化した Ni フリーSUS 鋼

(Fe-24Cr-2Mo (mass%))について、平滑な内部性状を有する外径 100  $\mu\text{m}$  および内径 50  $\mu\text{m}$  の細管を作製する。

(2) 窒素吸収処理による Ni フリーSUS 管の高剛性化プロセスを検討する。

B. 研究方法

(1) Ni フリーSUS 管の細管化

重量 20 kg の Fe-24Cr-2Mo (mass%)の鋳塊を高周波真空溶解炉により溶製した。平成 17 年度はフェライト状態において結晶粒径を可能な限り微細化するために、得られた鋳塊表面の庇を機械加工

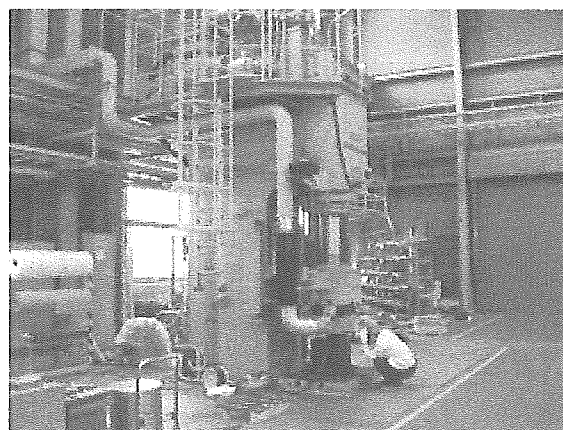


図 2 300 ton プレス加工機

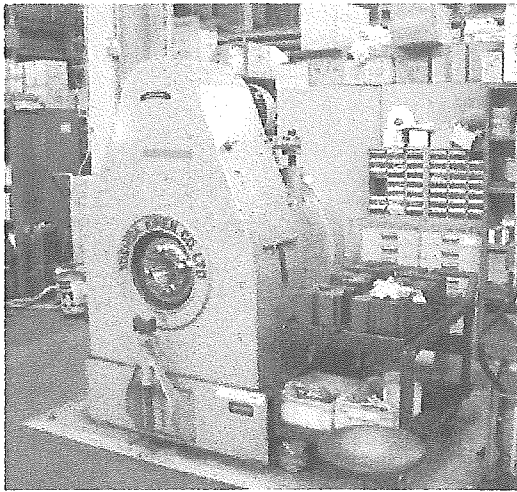


図3 18 ton スウェージング加工機

により完全に除去し、素材に対して高いひずみを付与できる鍛造方案を提案した。900℃および1000℃の鍛造温度にて再加熱時間を5 minとして、まず図2に示す鍛造最大荷重300 tonのプレス加工機により直径40 mmの丸棒材を作製した。次いで、旋盤により表面酸化皮膜(黒皮)を除去し、直径38 mmの丸棒材に加工した。さらに、図3に示す鍛造最大荷重18 tonのスウェージング加工機により冷間鍛造し、直径30 mm、長さ500 mmの丸棒材を作製した。得られた丸棒材にガンドリル加工を施しパイプ形状とし、焼鈍温度900℃にて細管加工を行った。

## (2) 窒素吸収処理による高剛性化プロセスの検討

NiフリーSUS管を無痛針として使用するためには高い力学的特性と硬度が必要である。一般に、金属材料の硬度を増加させると靱性(粘り強さ)が減少するため、非常に脆性的な破壊を生じる危険性がある。硬度は高いが靱性が著しく低い無痛針を採血に使用した場合、被験者の体内に折損した針を留置するという最悪の結果を招く危険性がある。したがって、NiフリーSUS鋼の引張強さ、破断伸び、硬さなどをバランス良く増加させることが重要である。本研究課題においては、窒素吸収処理したNiフリーSUS管に加工ひずみを付与し応力誘起変態させることによりNiフリーSUS

管の高剛性化を試みた。なお、高剛性化プロセスについては、窒素吸収処理後に引張試験した試験片の硬さを評価することにより実用可能性を検討した。高剛性化プロセスの検討には、外径350 μm、内径270 μmのNiフリーSUS管を使用した。窒素吸収処理は、細管をアセトンにて脱脂、洗浄後、図4に示す窒素吸収処理装置により1200℃でN<sub>2</sub>ガス雰囲気中にて20 min、30 min、60 min保持した後に氷水中にて急冷することにより行った。

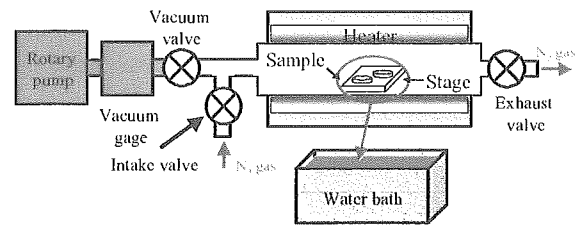


図4 窒素吸収処理装置の概略図

高剛性化させたNiフリーSUS管の引張特性は、容量1 kNのインストロン型引張試験機により評価した。引張試験片の長さは30 mmとし、標点間距離は10 mmとした。なお、試験片の断面積が非常に小さいため、破断荷重の検出には100 Nのロードセルを使用し、引張速度は0.5 mm/min一定とした。それぞれの処理に対して5回の引張試験を行い、それらの平均値により引張特性を評価した。また、種々の処理を行った細管を熱可塑性樹脂に包埋し、マイクロビッカース硬さ試験機により硬さを測定した。付加荷重を100 gとし、荷重保持時間は15 sとした。それぞれの処理に対して10点の硬さ測定を行い、それらの平均値により硬さを評価した。なお、高剛性化したNiフリーSUS管の特性を比較するために、市販のステンレス鋼製鍼灸針(直径0.2 mm)の引張特性および硬さについても同様に評価した。

## C. 研究結果

### (1) NiフリーSUS鋼の結晶粒微細化と細管化

溶製後に機械加工により底を除去したFe-24Cr-2Mo鋳塊の外観写真を図5に示す。底除



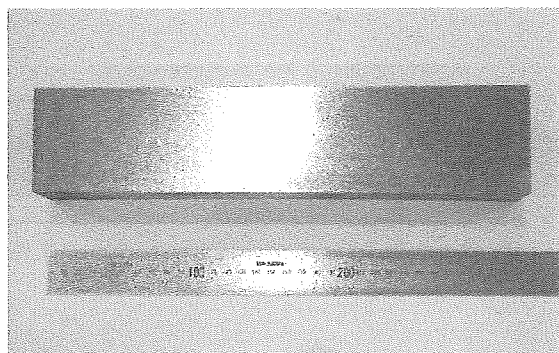


図5 機械加工により底を除去した Fe-24Cr-2Mo 鋳塊の外観

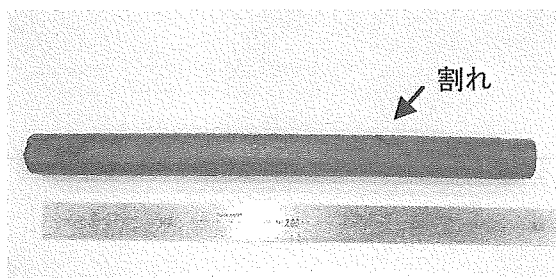


図6 鍛造温度 900°C、再加熱時間 5 min で鍛造した試料

去により高ひずみの付与が可能になった。また、鍛造温度 900°C、再加熱時間 5 min で鍛造した試料の外観写真を図 6 に示す。鍛造温度を 900°C とした場合、鍛造中に試料に割れが発生し、目的とする寸法まで鍛造することができなかった。一方、鍛造温度を 1000°C、再加熱時間を 5 min とした場合には目的とする寸法まで割れなどを生じることなく鍛造することができ、平均結晶粒径 20 μm までマイクロ組織を微細化することに成功した(図7)。

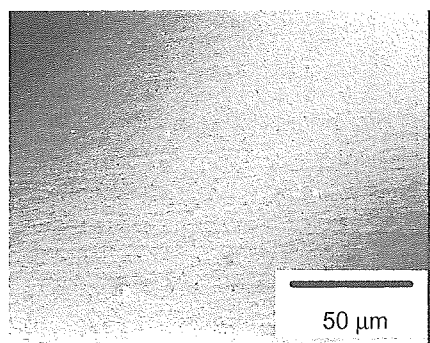


図7 鍛造温度 1000°C、再加熱時間 5 min で鍛造した試料のマイクロ組織写真

(2) 窒素吸収処理による Ni フリーSUS 管の高剛

性化プロセスの検討

窒素吸収処理前後の Ni フリーSUS 管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針のビッカース硬さを図 8 に示す。Ni フリーSUS 管に窒素吸収処理を

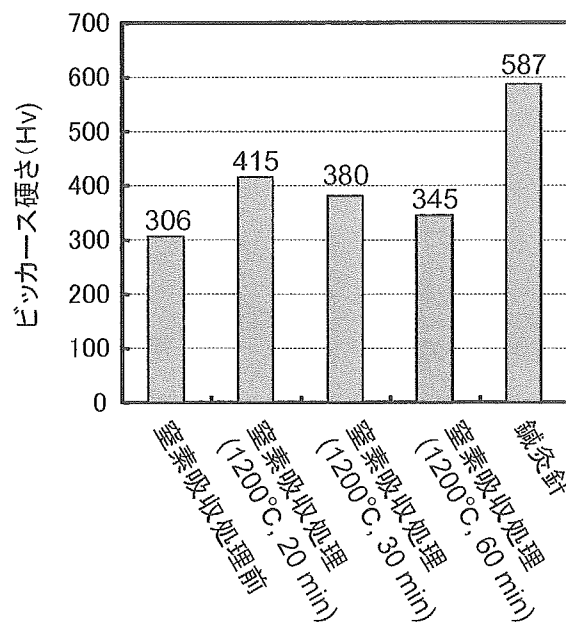


図8 窒素吸収処理前後のNiフリーSUS管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針の硬さ比較

施すことによりビッカース硬さは増加し、20 min の窒素吸収処理試料において Hv 415 の高いビッカース硬さが得られた。しかし、ビッカース硬さは窒素吸収処理時間の増加に伴い減少する傾向が認められた。これは、1200°Cでの熱処理による加工ひずみの減少および結晶粒の粗大化が原因であると考えられる。一方、ステンレス鋼製鍼灸針においては Hv 587 の高いビッカース硬さが得られた。通常、焼鈍状態でのオーステナイト型ステンレス鋼のビッカース硬さは Hv 350 程度であるため、比較材として使用した鍼灸針は冷間鍛造により加工硬化させていると考えられる。使用した鍼灸針においては磁性が確認されており、このことから応力誘起マルテンサイト変態を利用して高硬度化されていると考えられる。本研究課題では、比較材として使用した鍼灸針のビッカース硬さを無痛針として使用可能な硬さの基準とした。



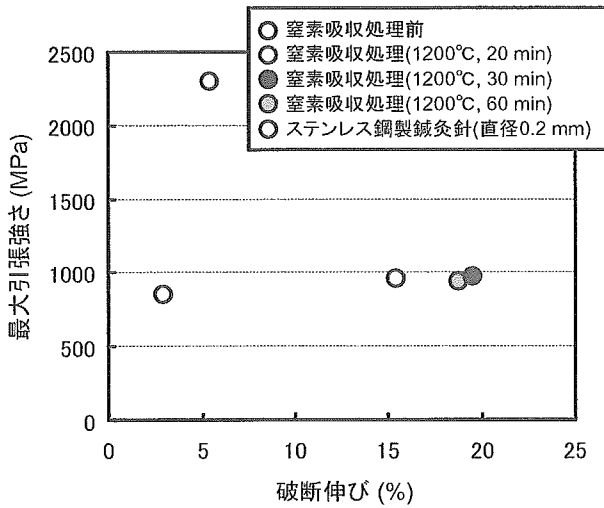


図9 窒素吸収処理前後のNiフリーSUS管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針の引張特性の比較

図9に窒素吸収処理前後のNiフリーSUS管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針の最大引張強さと破断伸びの関係を示す。窒素吸収処理前のNiフリーSUS管の最大引張強さおよび破断伸びはそれぞれ858 MPaおよび3%であったが、1200°Cで30 minの窒素吸収処理を施すことにより最大引張強さおよび破断伸びはそれぞれ977 MPaおよび19.5%まで増加した。引張試験後のNiフリーSUS管の代表的な破面写真を図10(a)および(b)に示す。窒素吸収処理前の細管の破面には微細なディンプルが多数認められており、結晶粒が比較的小さいことを示している(図10(a))。また、図10(b)に示した1200°Cで30 minの窒素吸収処理を施した細管の破面では、窒素吸収処理による若干の結晶粒の粗大化が認められた。窒素吸収処理前後において細管の直径が変化しており、窒素吸収処理した細管においてわずかな直径の減少が認められた。これは、窒素吸収処理によりNiフリーSUS管の加工硬化能が向上していることを示唆している。

一方、ステンレス鋼製鍼灸針においては2303 MPaもの高い最大引張強さが得られたが、その破断伸びは5%程度の低い値であった。ビッカース硬さ測定および引張試験の結果から、NiフリーSUS

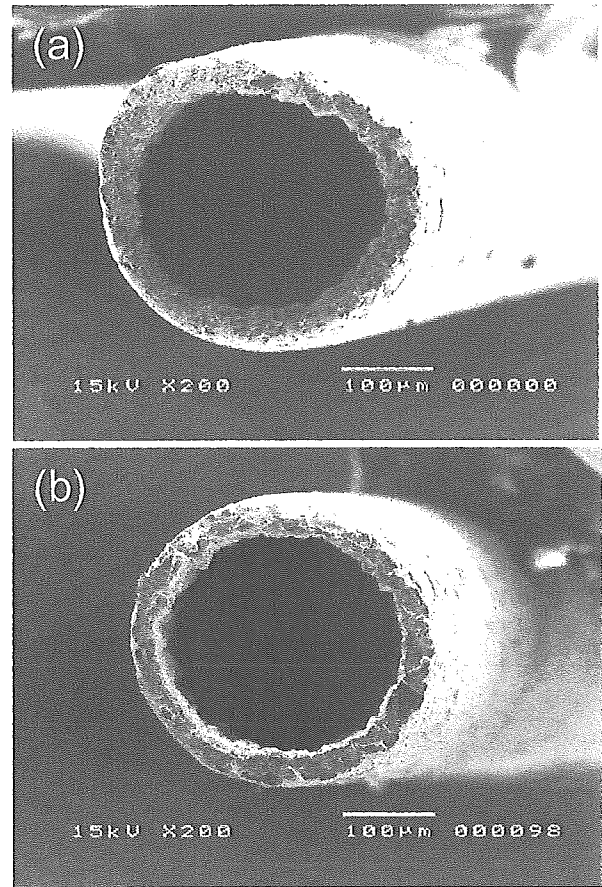


図10 (a) 窒素吸収処理前および(b) 1200°Cで30minの窒素吸収処理を施したNiフリーSUS管の引張試験後の破面

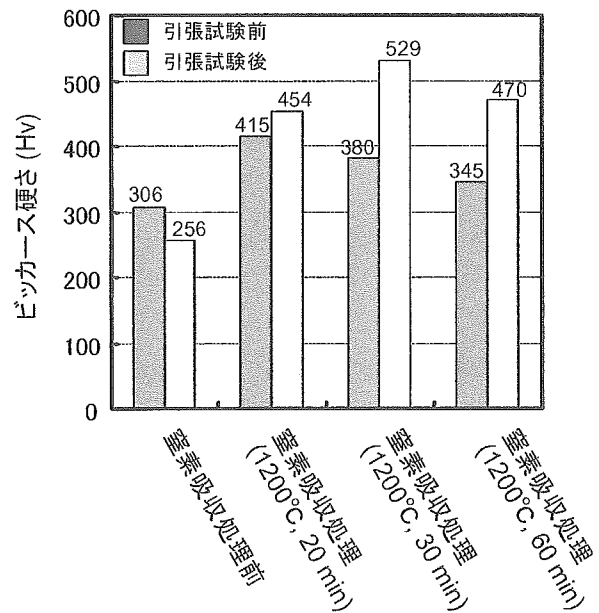


図11 窒素吸収処理前後のNiフリーSUS管の引張試験によるビッカース硬さ変化

鋼を無痛針として使用するためには、最大引張強さおよび破断伸びをそれぞれ 1000 MPa および 10%以上に維持しつつビッカース硬さを Hv 600 程度まで増加させる必要があると考えられる。

窒素吸収処理前後の Ni フリーSUS 管のビッカース硬さ変化を図 11 に示す。窒素吸収処理した Ni フリーSUS 管において引張試験によるビッカース硬さの増加が認められ、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理を行った試料において Hv 529 の高いビッカース硬さが得られた。この試料の破断伸びから計算した加工ひずみは約 20%である。また、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理を行った試料では、図 9 に示したように良好な引張特性が得られている。したがって、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理後に 20%以上の加工ひずみを導入することにより無痛針として使用可能な特性を Ni フリーSUS 鋼に付与できると考えられる。今後、窒素吸収処理後に加工ひずみを導入した Ni フリーSUS 管の引張特性を評価する必要がある。

#### 【次年度の目標】

平成 18 年度は、目的形状までの Ni フリーSUS 管の細管加工プロセスを最適化し、得られた細管から無痛針を試作する。さらに、試作した無痛針の毒性試験および前臨床試験を実施する。

#### D. 健康危険情報

該当なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi and T. Kobayashi "New Manufacturing Process of Nickel-Free Stainless Steel through Nitrogen Absorption Treatment", Journal of The Japan Institute of Metals, 70 (4) (2006), in press.

##### 2. 学会発表

1. 黒田大介、"新しい金属系生体材料の開発と高機能化"、学術討論会・若手生体材料研究者が目指す金属とセラミックス、高分子とのインテグレート生体多機能材料 (2006) 92-114.
2. 黒田大介、織田直樹、埴 隆夫、"粉末射出成形による低アレルギーNi フリーステンレス鋼の製造"、第 27 回日本バイオマテリアル学会予稿集 (2005) 120.
3. 三部真智、黒田大介、檜原高明、黒田秀治、藤原昌樹、埴 隆夫、金澤健二、"Ni フリーステンレス鋼の N 吸収挙動に及ぼす Cr 添加量の影響"、日本金属学会講演概要集 (第 137 回) (2005) 431.
4. 松尾太樹、福本信次、椿野春繁、黒田大介、"Ni フリーステンレス鋼の抵抗マイクロ接合"、日本金属学会講演概要集 (第 137 回) (2005) 433.
5. 黒田大介、織田直樹、埴 隆夫、"歯科用 Ni フリーステンレス鋼のミクロ組織と力学的特性"、第 49 回日本学術会議材料研究連合講演会講演論文集 (2005) 82-83.
6. 黒田大介、織田直樹、埴 隆夫、"窒素吸収した Ni フリーステンレス鋼 MIM 材の力学的特性"、日本金属学会講演概要集 (第 136 回) (2005) 200.
7. 奥田順子、黒田大介、山本玲子、埴 隆夫、"生体用金属材料に対する細胞応答の遺伝子レベルにおける解析"、日本金属学会講演概要集 (第 136 回) (2005) 240.
8. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi and T. Kobayashi, "New Manufacturing of Nickel-Free Austenitic Stainless Steel with Nitrogen Absorption Treatment", Proceedings of The 1st Japan-China Mini-Symposium on Biomaterials (2005) 98-101.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

無痛針を用いた採血補助装置と診断チップの評価

分担研究者 守本 祐司

研究要旨

プロトタイプ of 採血補助装置を試作して、その評価を行った。また、本採血補助装置と、保存性に優れた凍結乾燥試薬ならびに試作した3項目測定用のチップを用い、高脂血症被験者から採取した血液の中性脂肪値を診断チップで測定した。被験者は、高脂血症治療薬であるメバロチニン<sup>®</sup>（三共製薬製）を内服しており、診断チップにより治療効果をモニタリングすることができた。

A. 研究目的

昨年度の研究では、外径 150 $\mu$ m という微細針を作製し、微量血液採取が可能であることを示した。さらに、当該針を静脈に導くための近赤外血管可視化機構ならびに血管検知機構の基盤技術を開発し、確実な採血を実現するための基礎的なデータを取得した。本年度はまず、上記微細針の静脈刺入を確実にこなうためのプロトタイプ採血補助装置を試作し、その使用評価を行った。さらに、血液診断チップを試作し、これを用いて高脂血症被験者の中性脂肪値測定を行い、当該チップの有用性を評価した。

B. 研究方法

B.1. プロトタイプ採血補助装置の試作

図1に示すようなプロトタイプ採血補助装置を

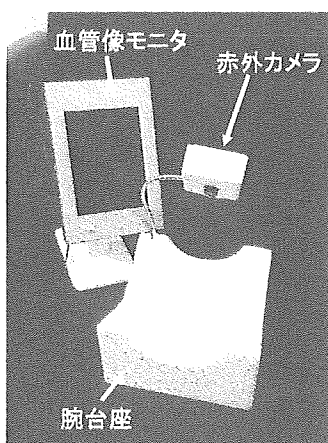


図1 プロトタイプ採血補助装置

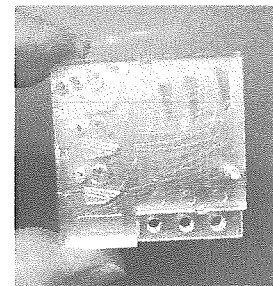


図2 試作したチップの外観

試作した。これは、腕の肘部を置く腕台座、位置や角度が可変調整可能な赤外カメラ、および画像を表示するモニタで構成されており、後述する採血モジュールとの組み合わせにより、無痛下に血液を採取することを可能にした。

B.2. 試作診断チップの予備的評価

分担研究者の開発・試作した、3つの血液検査項目が測定できる診断チップ（図2）を用い、高脂血症被験者の中性脂肪値を測定した。検査試薬には中性脂肪測定用キット（トリグリセライドE-テストワコー、和光純薬）を用いた。試薬の長期保存性を向上させるため、キットに二種類のトレハロースを添加し、冷凍庫で予備冷凍（-40 $^{\circ}$ C）したのち、凍結乾燥機内で、-40 $^{\circ}$ C（24時間）に続いて-10 $^{\circ}$ C（24時間）に保持し、凍結乾燥した。測定時には、凍結乾燥された試薬を水に溶解して使用した。

（倫理面への配慮）