

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

ドライ比色法による微量血液分析在宅診断チップに関する研究

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 堀池 靖浩

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
III. 研究成果の刊行物・別刷	27

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）  
（総合）研究報告書

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

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研究を行った。(1) 無痛針の管材料としてアレルギーを防止する Ni フリー SUS 管の素材の Fe-24Cr-2Mo をフェライト状態で 900℃の焼鈍温度で外径 100 $\mu$ m の細管化に成功し、ヒト正常線維芽細胞を用いた毒性試験を行い、既存の生体用ステンレス鋼である 316L 鋼よりも優れた細胞親和性を確認した。さらに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 $\mu$ m の粒微細化を達成し、高剛性化した外径 100 $\mu$ m 無痛針を試作したが、結晶粒粗大化や座屈により表面性状が良くなく、耐食性や靱性の低下などの問題点が明らかになった。これと平行して、外径 150 $\mu$ m の SUS304 パイプを用い、内壁を超平滑化、先端を 10 度の 3 面カットにより無痛針を開発し、これを用いた電子的血管所在検出システムから素人でも血圧により採血を可能にした。(2) 診断チップでは、グルコース・肝機能などの診断に対して反応・検査試薬試料等を 1 流路の中でミキシング、検出を行う一段反応型と尿素窒素などの発生ガスが呈色させる二段反応型の 2 種類のチップを作製した。更に、前者で豚由来コラーゲンペプチドを基質緩衝液に抱かし、凍結乾燥し、血清と反応から GOT の測定を、後者で尿素窒素の測定を可能にした。さらに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。さらに当方法を TG、TC、HDL の 3 項目の A と B の試薬に対しても適用し、3-5%のトレハロース濃度が最適で、数ヶ月の長期保存性を確認した。(3) 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、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た。(4) 恒温下でチップの自転公転、光学測定を全自動で行う計測装置を試作した。(5) 上記のドライ試薬、3 項目測定チップ、全自動計測装置により前臨床検査を行い、被検者から得られた血清検体を用いて、3つの生化学検査項目につき診断チップと従来検査法により測定して比較分析を行ったところ、TG と TC に関しては、非常に高い相関係数が得られた。しかし HDL 測定では、相関係数が必ずしも大きくなく、これは、HDL 試薬の粘性が高いため、チップ内貯留槽において血清と十分に混合していなかったと考えられる。

分担研究者

黒田 大介

独立行政法人物質・材料研究機構

防衛医科大学

小川 涼

守本 祐司

独立行政法人物質・材料研究機構

株式会社アドビック

中西 淳

小川 洋輝

独立行政法人物質・材料研究機構

沖 明男

A. 研究目的

鈴鹿工業高等専門学校

超高齢化社会の到来に伴い医療費が増大し、そ

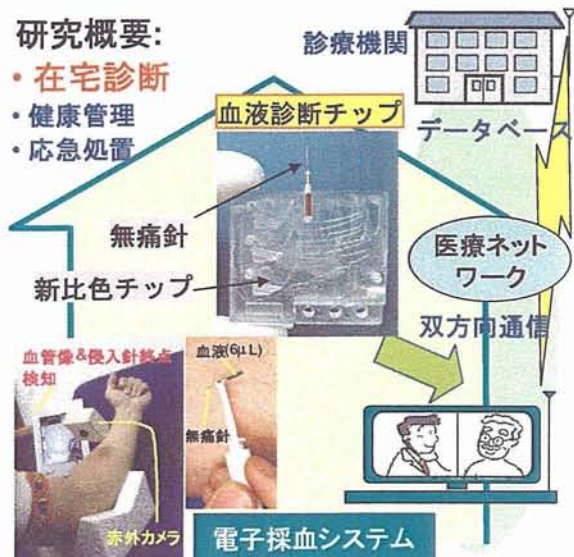


図1 本研究の目的と目指すもの

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。図1は、本研究目的の概念を示す。本チップシステムが実現すると、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の推移が蓄積されたデータベースが構築され、マーカ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。

この目的のため、我々は、無痛針から採取した微量血液の分析から在宅で多項目を診断するヘルスケアチップを開発してきた。これは電気化学的手法を用いた。本測定法は血漿などの秤量を必要としないが、校正液を必要とする。一方、現在の生化学検査のほとんどが比色法によって行なわれているが、血漿と試薬の秤量の正確度が測定信頼性を左右する。更に、マイクロ流路では流れは層流であり、ミキシングには工夫が求められる。従って、本研究は無痛針から採取した極微量血液の分析という基本コンセプトの基で、マイクロチップで比色法を適用した時の上述などの問題を解決した新比色法血液診断チップの開発を目的とする。その目的の一貫として、アレルギーの

原因となる Ni を排除した Ni フリー-SUS 管を用いた無痛針を開発し、比色法では薬液を用いるが、一旦試薬瓶の封を開けると一ヶ月程度で劣化し、在宅診断を目指しているため、どのような頻度で使われるのかも不明なため、その薬液の長期保存のためドライ化試薬開発も目的とする。

以上の開発を通じ、無痛針により採取した血液とドライ化試薬を薬液に戻して本比色法チップに導入して、チップ装着から計測まで全自動化された検査装置により測定可能な状況に到達させる。そして前臨床実験に入り、医師により患者の血液を従来の我々のチップ測定と検査会社と測定を比較し、課題を抽出する。本報告では、(1)Niフリー-SUS 管の細管化と無痛針の開発、(2)無痛針を用いた電子的静脈存在位置検出を援用した採血法の開発、(3)ドライ試薬開発、(4)比色法チップと全自動測定装置の開発、(5)前臨床実験の4部から構成される。

## B. 研究方法

### (1)Niフリー-SUS 管の細管化と無痛針の開発

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



図2 高周波真空溶解法より溶製した Fe-24Cr-2Mo 鋳塊の外観

洗浄後、1200℃で45分の窒素吸収処理を実施した。処理後、1200℃から氷水中に試料を投入して急冷した。試料表面を#600の耐水研磨紙にて湿式研磨した後に、窒素吸収処理前後の試料についてX線回折装置による構成相の同定を行った。また、窒素吸収処理前後の試料に耐水研磨紙による湿式研磨とバフ研磨を施し、光学顕微鏡によるミクロ組織観察を行った。

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

NiフリーSUS細管による無痛針の作製は以下のようにして行った。Fe-24Cr-2Mo(mass%)の鑄塊を高周波真空溶解し、900℃および1000℃で5分再加熱して直径40mmの丸棒材を熱間鍛造により作製後、直径38mmの丸棒材に加工し、冷間鍛造により直径30mm、長さ500mmの丸棒材を作製した。この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℃にて細管加工を行い、外径100μm、内径50μmのNiフリーSUS管を作製。

また、窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスを検討した。即ち、NiフリーSUS鋼の細管をN<sub>2</sub>ガス雰囲気中にて1200℃で30分保持した後に急冷し、細管に窒素

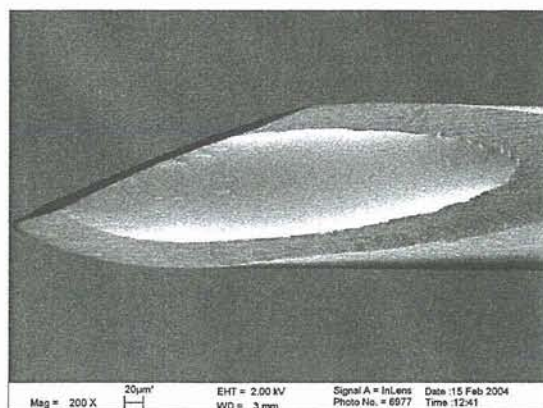


図3 無痛針の先端の写真

を吸収させる。次いで、吸収させた窒素を利用して高硬度相を生成させるために1000℃、1100℃および1150℃のそれぞれの温度で10分保持後水冷の熱処理を行なう。

(2)無痛針を用いた電子的静脈存在位置検出を援用した採血法の開発

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

(3)ドライ試薬開発

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る。本研究では、基質緩衝液をゲルに抱かして、真空乾燥や凍結乾燥によってドライ化し、血漿と反応させることがその反応も含めて特に重要で

ある。富士フィルム(株)からドライケム比色測定用ゼラチン材の他、動物由来のゲルやコラーゲンペプチドなどの種々の材料を試し、種々の乾燥法と経過反応などを調べて最適ゲルを選定する。

しかしその後、上記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。本方法を比色法試薬として1液タイプ、ならびに血液検査や臨床検査現場で一般的な2液タイプ適用することを試みた。

#### ① 1液タイプ

1液タイプとしてトリグリセライドE-テストワコー(和光純薬製)を使用し、トレハロースを添加し、試薬を凍結乾燥し吸光度測定の見量線比較にて、保存温度、期間、添加量、PH影響などの最適化実験をした。トレハロースの添加量実験は、1%-20%添加と、添加しないままのものを使い凍結乾燥し液状試薬との吸光度の近似相関から最適濃度を調べた。トレハロースは林原バイオケミカル研究所製の無水トレハロースを使用した。凍結乾燥は、10mm層長のディスポーザブルセルに1500 $\mu$ lのトレハロース添加試液を入れ、液体窒素を満たした容器に15分入れて瞬間冷凍による予備冷凍の後、-85度にセットした凍結乾燥機で24時間凍結乾燥した。使用時に精製水を添加して元の液状試薬と等量にして実験を行った。

#### ② 2液タイプ

2液タイプとしてL-タイプワコーHLD-CM, L-タイプワコーCHO・M(和光純薬製)を使用

した。

#### (4) 比色法チップと全自動測定装置の開発

図4はBUNやクレアチニン測定用のチップを示している。いずれも結果としては反応に伴い生成されるアンモニアの見量を行うための構造を有している。また図5は、本ドライケムストリー比色による測定装置を示す。チップは37°Cに温度制御したステージに乗せ、ハロゲンランプ光をファイバを介してバンドパスフィルターで所望の

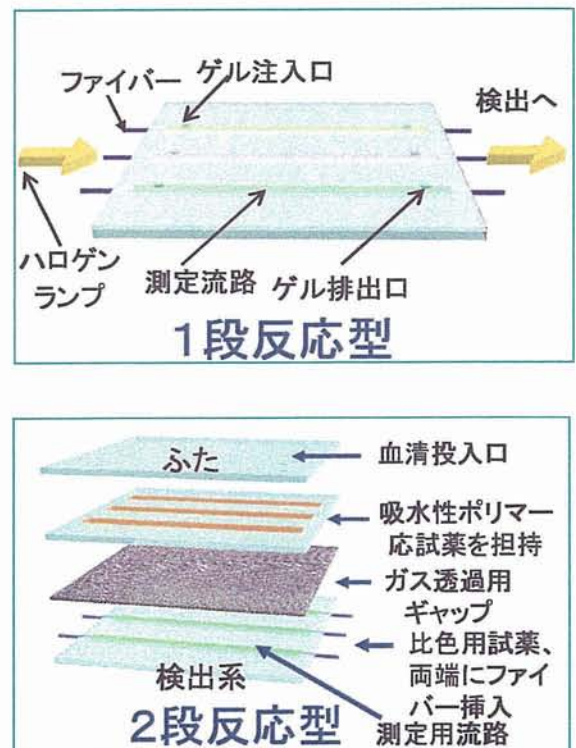


図4 異なる反応に対する2種類の構造のドライ比色チップ

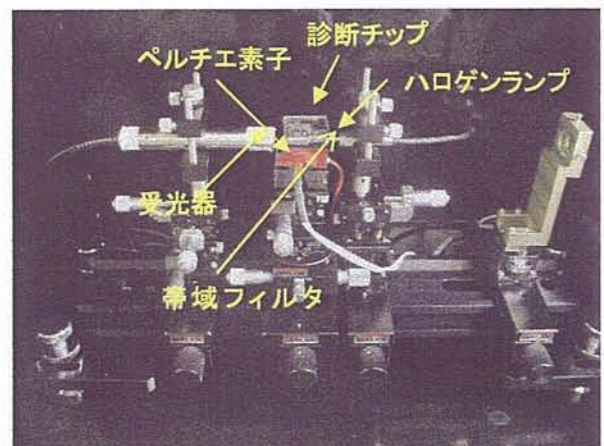


図5 比色測定装置

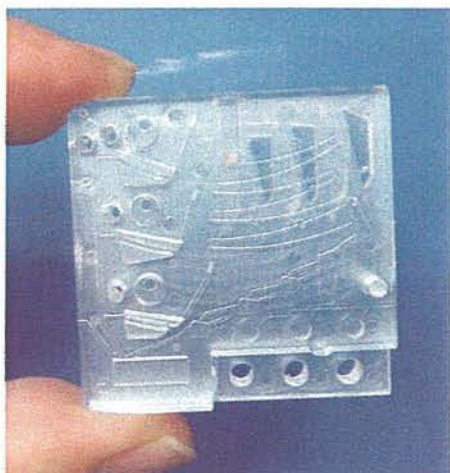


図6 3項目測定用比色法血液診断チップ

光をチップに導入し、光受光器で吸光度を検出した。

また、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チップを図6に示すように試作した。また、恒温中でチップの計測する装置を開発した。本チップは3層構造となっており、これを貼り合わせて一体のチップとする。さらにその後、チップの厚さを13mmから8mm厚に薄くした、更に第一層目の血球分離・同時血漿秤量の流路の変更し、改良した。全自動測定装置は前年度装置を基にチップ挿入から計測までパソコン制御の全自動化小型装置を日本精工(株)と共同開発した。

(5)前臨床検査：3つの血液検査項目が測定できる診断チップを用い、被検者のTG、TC、HDLを測定した。被検者（健康、高脂血症成人）の血液採取に際しては、インフォームド・コンセントを行う。採血した検体を遠心分離して得た血清の一部（約500 $\mu$ L）を診断チップ測定用に供し、残りを従来検査法による測定に使用する（SRL社）。

(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。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管の細管化と無痛針の開発

焼鈍温度900 $^{\circ}$ Cにて線引きしたFe-24Cr-2Moの外径100 $\mu$ m、内径50 $\mu$ mの細管の走査型電子顕微鏡(SEM)により撮影した2次電子像を図7に示す。Crを多く含むNiフリーフェライト型SUS鋼は特殊な合金系であり、さらに加工硬化しにくい金属材料であるため、線引きなどの成形加工は非常に困難である。しかしながら、結晶粒粗大化を抑制しつつ効率よく焼鈍できる処理温度の探索と線引きプロセスの最適化により図7に示すNiフリーSUS鋼の細管化に世界で初めて成功した。

また、フェライト状態で成形したNiフリーSUS管に1200 $^{\circ}$ Cで45minの窒素吸収処理を施

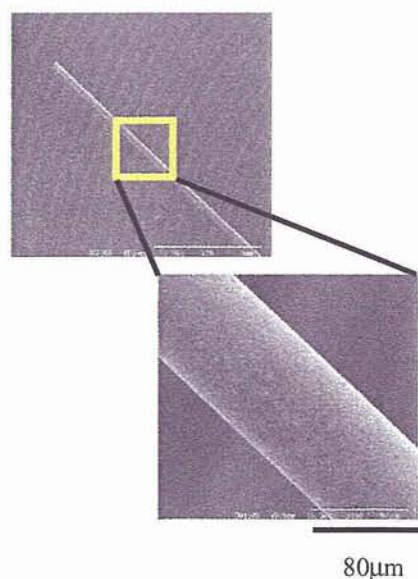


図7 外径100 $\mu$ m、内径50 $\mu$ mのFe-24Cr-2Mo細管のSEM2次電子像

した試料の X 線回折試験結果から窒素吸収処理前は面心立方構造のフェライト組織( $\alpha$ )の回折パターンしか観察されていないが、窒素吸収処理を施した試料では体心立方構造した Ni フリーSUS 管の構成相が窒素吸収処理により変化したことが確認された。これまで種々の形状に成形した Fe-24Cr-2Mo において窒素吸収による強度、耐食性、剛性などの改善を確認している。

(1-2) 窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo の細胞親和性

UV およびオートクレーブ滅菌したそれぞれの試料上で HEL299 を 7 日間培養した。試料を UV 滅菌した場合、316L 鋼上でヒト線維芽細胞の増殖が有意に阻害されたが、Fe-24Cr-2Mo-1N、Fe-24Cr-2Mo 上ではいずれも細胞はよく増殖した。一方、試料をオートクレーブ滅菌した場合、SUS316L 上でも他の材料と同様に細胞はよく増殖した。これは、316L 鋼をオートクレーブ滅菌した場合、表面酸化皮膜が厚くなるとともに皮膜組成が変化するため、316L 鋼に含まれている Ni の毒性が発現されにくくなったためと考えられる。また、摩耗により抽出したそれぞれの試料の抽出液濃度と細胞生存率の関係を図 8 に示す。いずれの試料でも抽出液濃度の増加にともない細胞生存率は減少する傾向があるが、どの抽出液濃度においても Fe-24Cr-2Mo 合金は 316L 鋼よりも

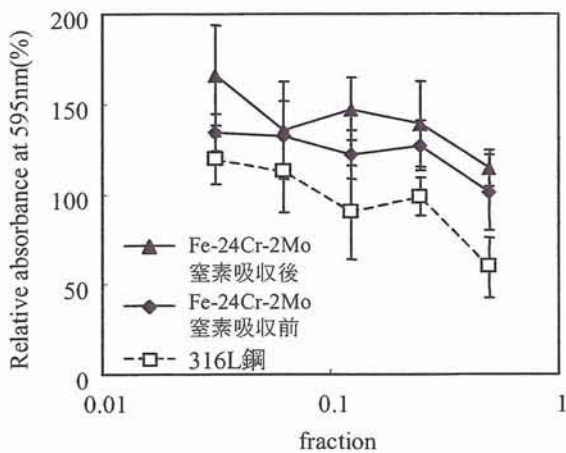


図 8 摩耗により抽出したそれぞれの試料の抽出液濃度と細胞生存率の関係

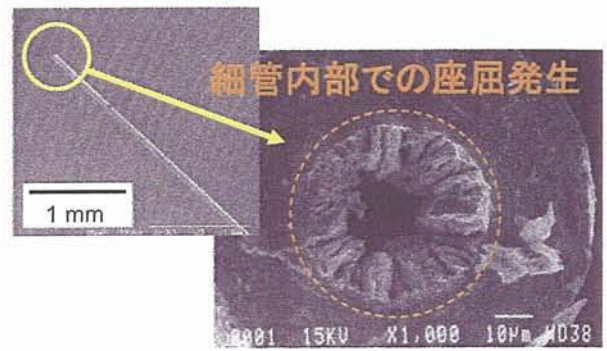


図 9 外径 100  $\mu$ m、内径 50  $\mu$ m の Fe-24Cr-2Mo 細管化時に発生した座屈の SEM2 次電子像

高い細胞生存率を示している。また、窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo 合金の細胞生存率は、高濃度側においてもコントロールの 1 よりも高い値を示した。以上の結果から、窒素吸収処理した Fe-24Cr-2Mo は、摩耗をともなう過酷な環境下でも優れた細胞適合性を示すことが明らかとなった。

(1-3) 細管化時の座屈発生とその改善

外径 100  $\mu$ m、内径 50  $\mu$ m の細管を図 7 に示すように作製したが、その詳細を調べたところ図 9 に示すように、鍛造時に座屈が生じていることが判明した。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 $^{\circ}$ C、再熱時間 5 分の工程を 1000 $^{\circ}$ C、再熱時間 5 分に変え、図 10 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 20  $\mu$ m にまで微細化することが出来た。

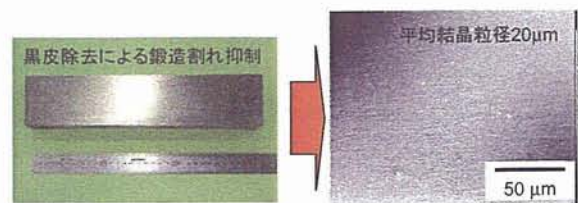


図 10 鍛造温度 1000 $^{\circ}$ C、再熱時間 5 分の工程で鍛造し、黒皮除去後の Ni フリーSUS 表面の写真



### ①NiフリーSUS 鋼細管の表面性状

引抜加工により作製した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 鋼細管の表面性状および断面の光学顕微鏡写真から、細管表面では引抜加工方向に対して平行な粒界割れが多数認められた。この要因として、引抜加工途中の焼鈍しによる結晶粒粗大化が考えられる。また、細管表面だけでなく細管内面においても結晶粒粗大化およびミクロ組織の座屈に起因する多数の凹凸が認められた。無痛針として使用できる平滑な表面性状を得ることは現状では容易でないと考えられ、今後はシームレスパイプの製造技術を応用した薄板(箔)からの細管加工プロセスを試みる。

②窒素吸収処理と熱処理による相変態を組み合わせた高剛性化プロセスの検討

1200  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分の窒素吸収処理後に 1000 $^{\circ}\text{C}$ 、1100  $^{\circ}\text{C}$ および 1150  $^{\circ}\text{C}$ のそれぞれの温度で 10 min 保持後水冷の熱処理を施した Ni フリーSUS 鋼のビッカース硬さを図 11 に示す。比較として市販の SUS 鋼製鍼灸針のビッカース硬さもあわせて示した。本処理により既存のステンレス鋼製鍼灸針よりも高いビッカース硬さ(Hv 636)を得ることができた

窒素は高温相であるオーステナイト組織には比較的多く固溶することができるが、低温域で安定なフェライト組織にはほとんど固溶することができない。したがって、窒素吸収処理により高濃度の窒素を固溶させた Ni フリーSUS 鋼を 1200  $^{\circ}\text{C}$ 以下のフェライト状態の温度で熱処理した場合には、その熱処理温度での固溶限を超えた余剰の窒素は窒化物生成に利用されると考えられる。図 11 において熱処理温度の低下とともにビッカース硬さが増加しているのは、窒素の固溶限低下に起因する窒化物析出量の増加を示唆しており、ビッカース硬さの増加には、析出した窒化物が寄与していると考えられる。しかし、過剰の窒化物の析出は靱性および耐食性の低下要因となる。安全性を確保するために、これらの点についても今後詳細に検討する必要がある。

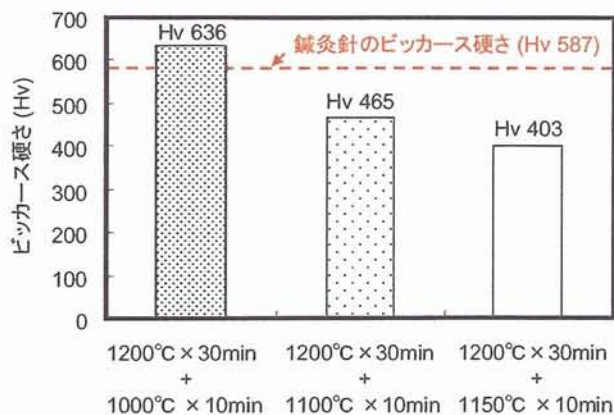


図 11 種々の熱処理を施したNiフリーSUS 鋼細管ならびに市販のステンレス鋼製鍼灸針の硬さ比較

### ③ 試作した無痛針の特性

高剛性化した外径 100  $\mu\text{m}$ 、内径 50  $\mu\text{m}$  の Ni フリーSUS 鋼の細管を用いて図 12 に示す無痛針の試作を行った。しかし、高剛性化プロセス中に生成した褐色の酸化皮膜が強固に固着し、細管表面においては皮膜の剥離も認められ、さらに刃先性状も良好とはいいがたい。また、細管内部では粒界割れも多数認められ、更に検討を要す。

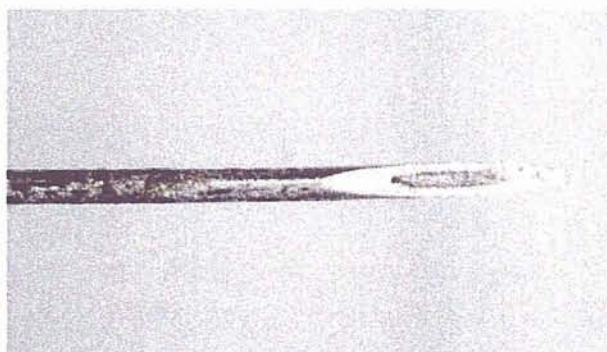


図 12 試作した 304 鋼および Ni フリー SUS 鋼製の無痛針の外観

### (2)無痛針を用いた電子的静脈存在位置検出を援用した採血法の開発

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、神経網を切断する時に感じる。そこで、図 3 に示す先述の SUS 管製針を製作した。従来の針の外径の 1/4 程度なので、腕に刺しても痛みは感じない。更に、図 13

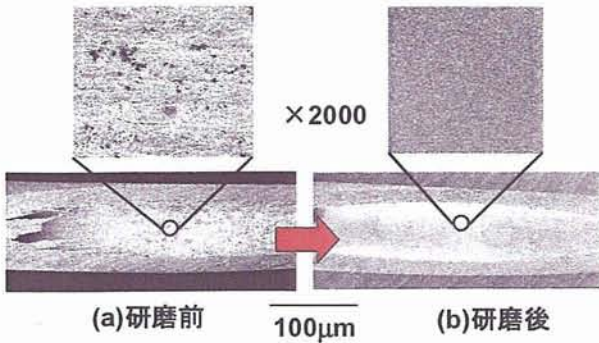


図 13 ステンレス製の管の内壁の研磨前 (a)、超平滑化後(b)の SEM 写真



図 14 NIR 光を腕に照射した時の血管の可視化

に示すように、外径 0.15mm のステンレス製の管を作製した時に生成された粗い管の内壁(a)を、特殊な方法で超平滑化した結果(b)、針を皮膚に刺すと自分の血圧だけで血液が針を通過し、ポンプを必要とせずに採血が可能になった。針アセンブリは SUS 製針を外径 2.3mm の硝子管製の蓄血パイプに接続したものである。蓄血パイプに溜まる採血量は 6 $\mu$ L (1mm<sup>3</sup>×6)であり、在宅診断ではこの量程度が限度と考え、また本研究でこの程度で多項目を測定できることも目的の 1 つである。

しかし、静脈から採血する際、その所在が見えない場合が多い。そこで、図 14 に示すように近赤外光(Near Infrared: NIR, 850nm)を照射して血管を可視化した。NIR 光は水には透過し、皮下で拡散散乱して伝播するが、血液中のヘモグロビンには透過できず、血管の存在が分かる。更に、皮膚表面から静脈の存在深さをすることも重要

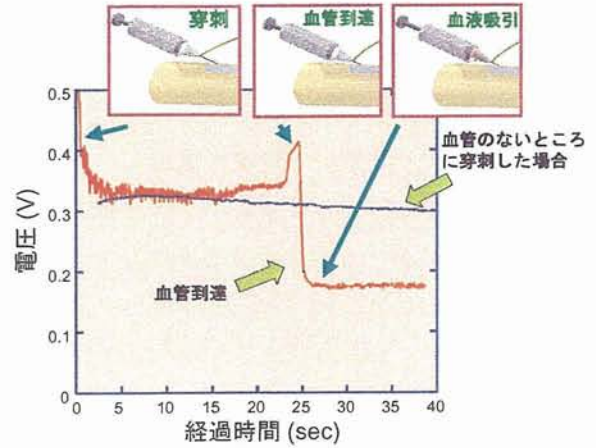


図 15 穿刺時から内部に針が導入されていく経過時間に対する電位変化

である。その深さを知るため、針と皮膚表面との間に生じる電位を測定し、針が血管に到達したことを検出できるようにした。図 15 は、穿刺時から内部に針が導入されていく経過時間に対する電位変化を示す。静脈の存在しない筋肉中では電位変化は無いが、針が静脈に刺さると電位はわずかに上昇し、血液を引き込むや否や、電位は急激に減少することが分かる。この結果、これらを組み合わせで、液晶ディスプレイ画面を見ながら我々でも採血できるようになった。図 16 は無痛針でディスプレイ画面を見ながらいわば電子的に採血している様子である。採血者は自分の腕と針アセンブリを直視しているわけではなく、ディスプレイ上で NIR イメージと電位変化を見て、

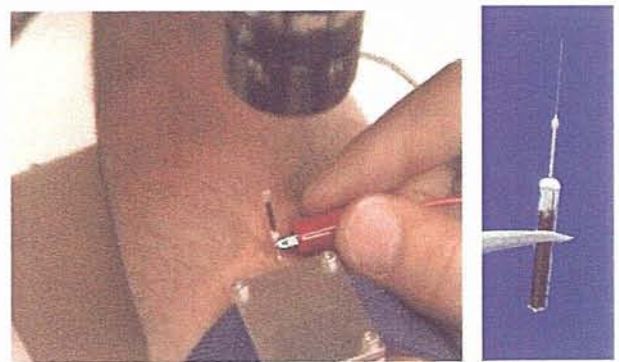


図 16 採血者がディスプレイ画面を見ながら無痛針で採血している様子と蓄血パイプに採取された全血の写真

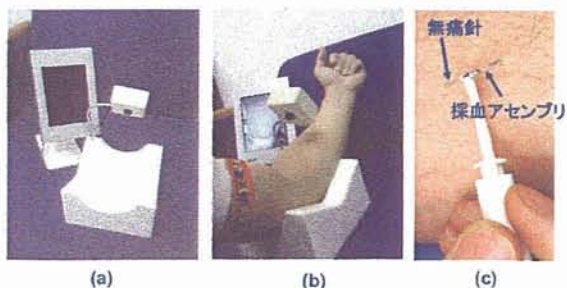


図 17 電子採血補助装置

針アセンブリを静脈に穿刺する。将来的には画像処理を駆使して自動採血を目指す。当面は、本採血機構の携帯型装置一式を図 17 に示すように試作した。

この採取した血液を無痛針モジュールごとチップに挿入し、これを遠心操作により血液をチップに導くとともに血球と血漿に分離する。目視検査によればこのようにして得られた血漿は溶血に由来する赤色着色は観察されなかった。すなわち血圧を利用した採血の場合の血液採取速度は速くても  $100\mu\text{L}/\text{min}$  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。

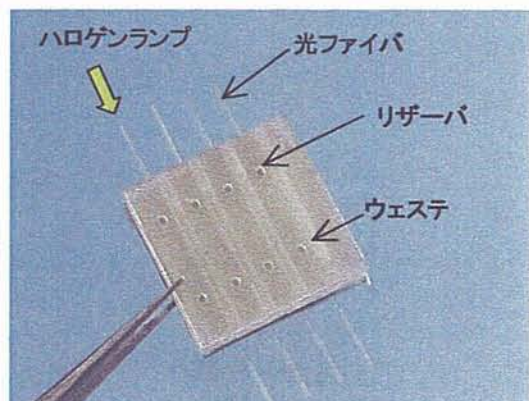


図 18 BUN 検出チップ

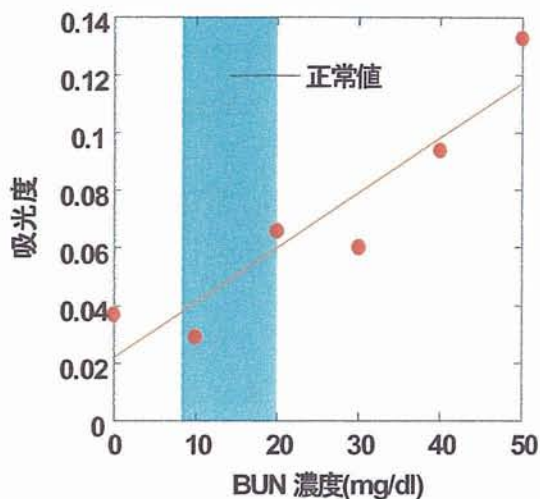


図 19 尿素濃度—吸光度

### (3) ドライ試薬開発

#### (3-1) 2 段反応型による尿素窒素(BUN)測定

発生するアンモニアガスが発色色素に作用して呈色する図 18 に示す BUN 診断チップを製作した。4 層からなり、最上層は反応層であり、ウレアーゼ溶液を高吸水性ポリマー担持(セミドライ状態)させる。血清との反応で発生したアンモニアガスを次の透過層を経て、発色色素のプロモクレゾールグリーンをエタノールに溶解し、高分子の PVB 5% 重量比を IPA に溶解したものを塗布した流路を設けた検出層の構造である。最下層の吸光度測定用流路内には、AI をスパッタ堆積後、CMP(化学的機械研磨)で除去する工程によって

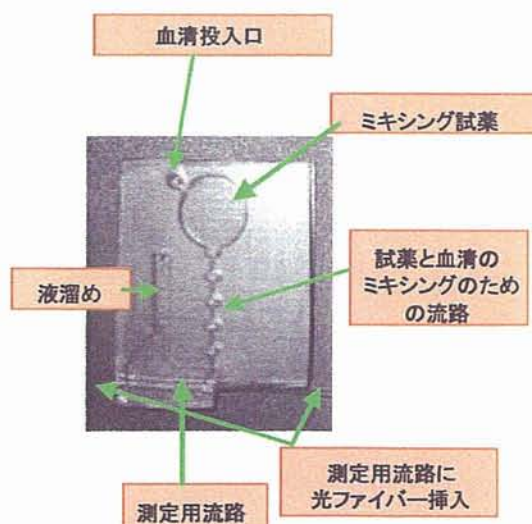


図 20 1 段反応型  $\gamma$ -GTP 測定用チップ

Al をコートして迷光の侵入と光ファイバーを介して導入された測定光のリークを防止した。図 19 に示すように 620nm にて吸光測定良好な検量線を得た。

### (3-2) 1 段反応型による $\gamma$ -GTP と GOT 測定

図 20 は一段反応測定用のミキサー付きチップを示す。PET(ポリエチレンテレフタレート)板に流路を形成し、キャップ PET 板で蓋をする。遠心力で動作し、上部に回転中心があり、下方に向かって遠心力が発生する。導入した標準血清は、試薬と合流し、ミキシング流路で混合され、2 段用と同様に Al が流路内壁にコートされた測定用流路に導入される。測定用流路の両側には測定光の導入と減衰光の検出用の光ファイバーが挿入されている。

まず、 $\gamma$ -GTP 測定について述べる。反応時間の短縮目的で血清を点着した瞬間から反応開始とする従来のレートアッセイの SSCCII 法を採用し、更に難溶性の試薬でも均一にゲル中に分散させた試薬の乾燥法を検討した。試薬は、和光純薬製のテストワコー  $\gamma$ -GTP・J(L- $\gamma$ -グルタミル-4-ニトロアニリド+グリシルグリシン)を用いた。これは、 $\gamma$ -GTP との反応で生じた 4-NA を 405nm で測定する。試液のみで自然室温乾燥、及び室温真空乾燥を試みたが酵素の失活が著しいため、保護コロイドとして各種ゼラチン、コラーゲンペプチドなどセミドライ状態での酵素活性の検討を行った。試薬担持のためのゼラチンはドライケミストリーで一般的に使用される高分子ゲルも検討した。実験は、2 種類のゼラチン(10%溶液)と 3 種類のコラーゲンペプチド(10%溶液)を各 1/10 重量比で混合後、吸光度変化率の相違を検討した。

まず、 $\gamma$ -GTP 測定では、液状試薬を富士写真フィルム社製の動物由来ゼラチン担持したものを試みたが、流路内(図 19)への導入は、37°Cでの温度管理の下で可能にもかかわらず、一旦ゼラチンを溶かし薄膜を形成後は、血清を導入しようとしても容易には再びゾル化せず、流路内流動を必要とする今回の研究には使用できなかった。一方、37°Cでゾル状の Fish gel では凍結乾燥による酵

素活性低下などの問題はほとんど見られなかった。この理由は分子量が 5000 程度と低いからである。また、Fish gel は親水性に優れ、そのため乾燥試薬に血清と純水を添加した時、高還元性を示し、マイクロ流路内での移動に適している。

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

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

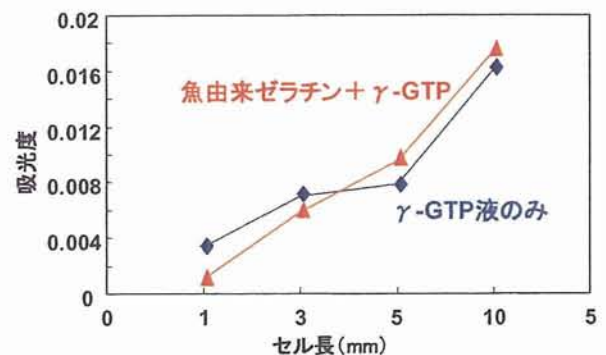


図 21  $\gamma$ -GTP 用基質緩衝液のみと Fish gel+ $\gamma$ -GTP の場合に対してガラスセルのセル長の変化による吸光度の変化率

の後 $-10^{\circ}\text{C}$ 、12時間の乾燥をガラスセル内で行った。図21は、140IU標準血清を用い、 $\gamma$ -GTP用基質緩衝液のみとFish gel+ $\gamma$ -GTPの室温で真空乾燥した場合に対してガラスセルのセル長の変化による吸光度の変化率を示す。測定は、真空乾燥後標準血清と純水を乾燥前の液量分を添加後直ぐに行った。両方共、セル長の増大に対して吸光度が指数関数的に変化することが分かり、チップ設計上の最適光路長の値が判明し、更にFish gel+ $\gamma$ -GTPの有効性が示された。

図22は、Fish gelに $\gamma$ -GTPを担持させ、チップのマイクロ流路内で各種乾燥法によるゲル特性の経過時間変化を示す。時間が経過すると共に、室温真空乾燥のFish gelを用いた場合、吸光度は本来Fish gelの持っている吸光色(黄色)や乾燥時に腐敗によると考えられる原因により時間と共に急激に増加し、 $\gamma$ -GTP用試薬は途中で失活した。しかし、凍結乾燥したゲルは親水性、酵素活性の低下は避けられ、凍結乾燥の優位性が判明した。

次にGOT測定について述べる。秤量、反応の複雑化によるチップ構造の複雑化を避けるため、トランスアミナーゼCII-テストワコーPOP・TOOS法のキット(基質酵素と発色剤等が混和された凍結乾燥品で、緩衝液のみを加える)を使い全混合して試薬「GOT用基質発色液」として使用した。まず、本試薬を使用するチップ内の光路長検討の



図22 各種乾燥法における $\gamma$ -GTPを担持したFish gel特性の経過時間変化

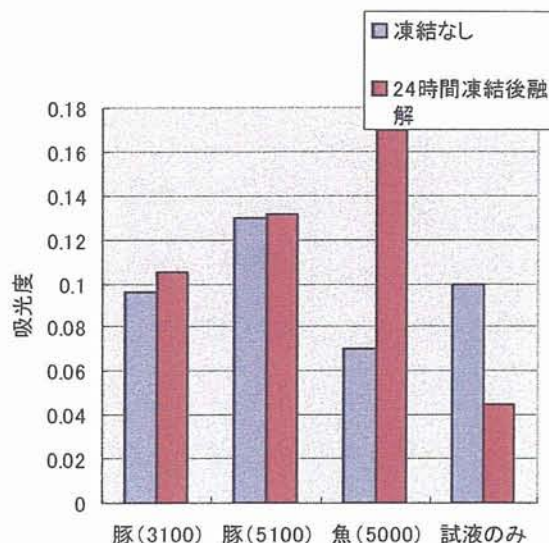


図23 ゲル担持の凍結影響(活性値 25Karmen 時)

ため、1、3、5、10mmの各光路長のガラスセルによる検量線を求めた後、ゲル担持の有無による試薬凍結の影響実験を行った。実験には光路長10mmセル使用し、混合試薬そのままの物とコラーゲンペプチド(10%溶液)3種類を各1/10重量比で混合、24時間、 $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結後、自然に融解させ、液状に戻したものの吸光度から、酵素活性の減衰などを比較した。その結果を図23に示す。溶液系のみを凍結融解させると酵素活性が大きく減衰するが、豚由来のコラーゲンペプチドでは、凍結融解による影響はほとんど見られなかった。一方Fish gelについては本来の黄色が担持時の吸光度の高値化を生じた。そこで、本研究において、豚由来のコラーゲンペプチドのゲルが適していると判明した。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、発色する問題が発覚した。

(3-3) トレハロース包含基質緩衝液による長期保存化

図24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、140/IUの標準血清滴下、混合後37℃

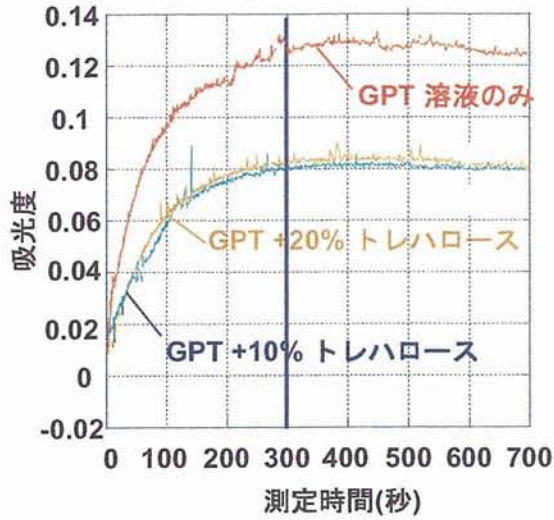


図 24 GTP 基質緩衝液のみの場合と、これに10%、20%トレハロースを包含させた時の吸光度の時間変化

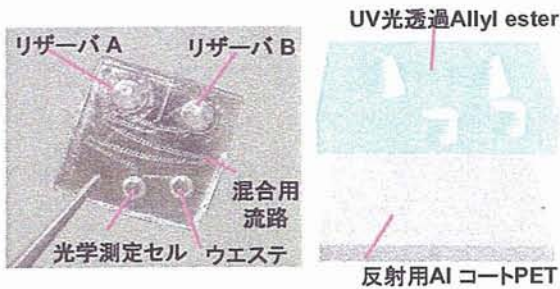
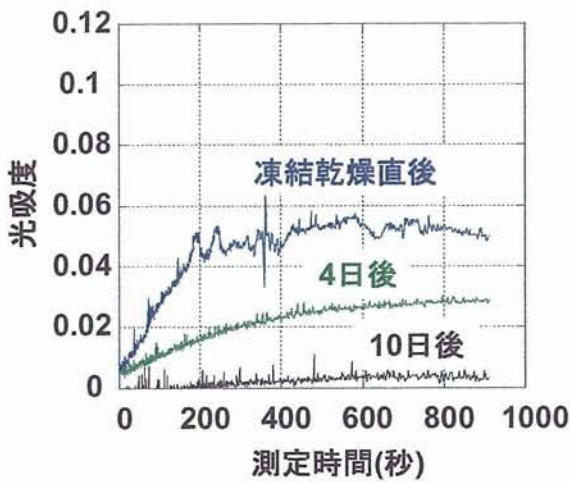
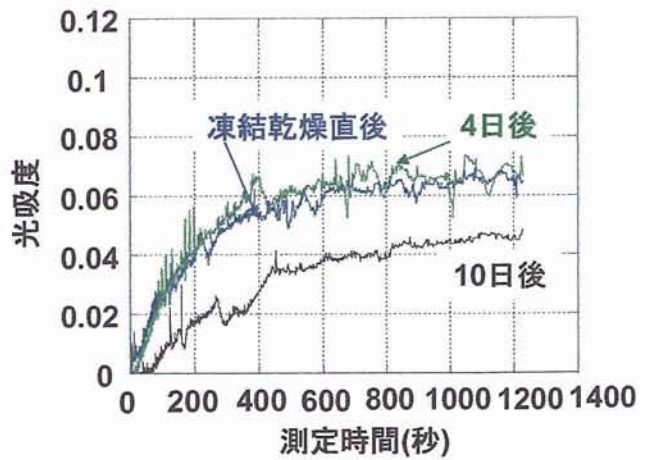


図 25 試作ミキシングチップ



(a)



(b)

図 27 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

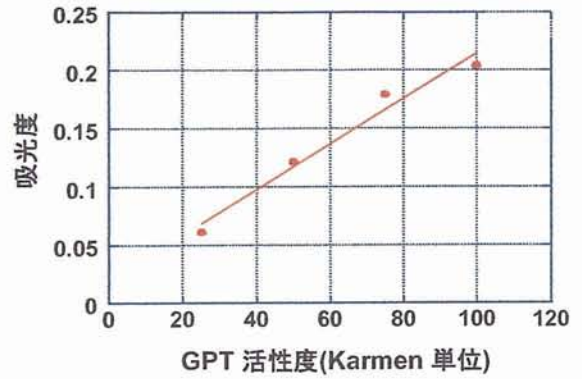


図 26 GTP の酵素活性の検量線

で、GTP 基準液が 25Karmen 単位時で、キュベットの光路長が 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 GTP 基質緩衝液を用いて GTP の酵素活性の検量線を得るため、まず、図 25 に示す試作ミキシングチップで行なった。血漿と GTP の混合比は、1:100 であり、GTP 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 26 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 27 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。

### (3-4) トレハロース包含試薬(TG, TC, HDL)の評価

図 28 は、1 液タイプを用いた場合の成人のトリグリセライド正常値 ( $125\text{mg/dl}$ ) と異常高値 ( $300\text{mg/dl}$ ) 時の添加濃度別吸光度を 0%、1%、3%、5%、10%、20%のトレハロース濃度変化に対して経時的に調べた結果を示す。液状試薬使用時の吸光度に最も近似した吸光度値は、3-5%添加後凍結乾燥したもので、凍結乾燥による活性の阻害が起こりにくいことが実証され、保存性も優

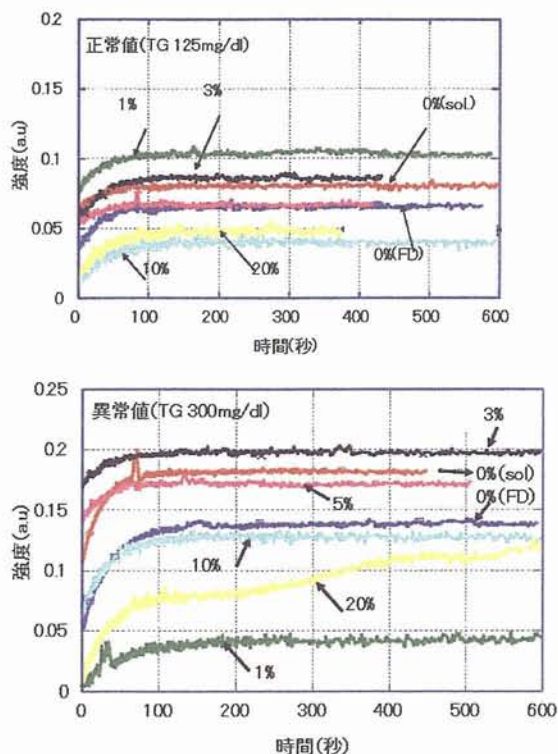


図 28 トレハロース添加量別吸光度

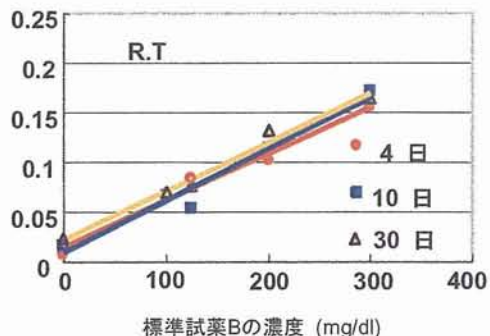


図 29  $25^{\circ}\text{C}$  保存時の濃度勾配の経時変化

れている。

凍結乾燥した後、精製水を加えて液状にする凍結乾燥試薬の保存性に対しては、図 29 液状試薬と違い  $4^{\circ}\text{C}$  保存、 $25^{\circ}\text{C}$  保存(常温)とも、1 ヶ月経過後も検量線に全く影響がなく良好な状態を保った。現在数ヶ月の長期保存性を確認している。従って、ドライ比色試薬として、液状試薬劣らぬと実証された。

2 液タイプの脂質 3 項目についても、3 項目についてトレハロースを 3-5%添加の凍結乾燥試薬が同様な長期保存性を有することが確認されている。

(4)比色法チップと全自動測定装置の開発

図30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31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0.4 μLに秤量されて採取される。

次に、図32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33は、チップに遠心力を与える回転体

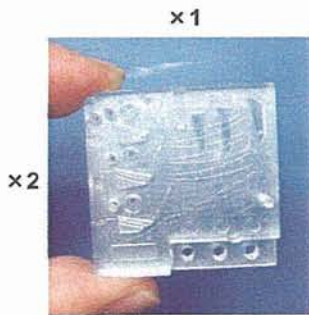


図 30 試作した新比色法診断チップの概観

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 34 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 35(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

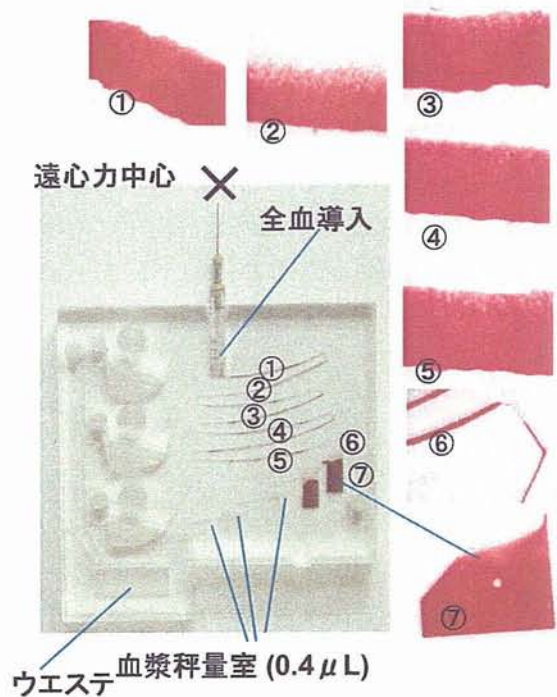


図 31 血球・血漿分離と血漿定量を同時に遠心力で行う流路構造

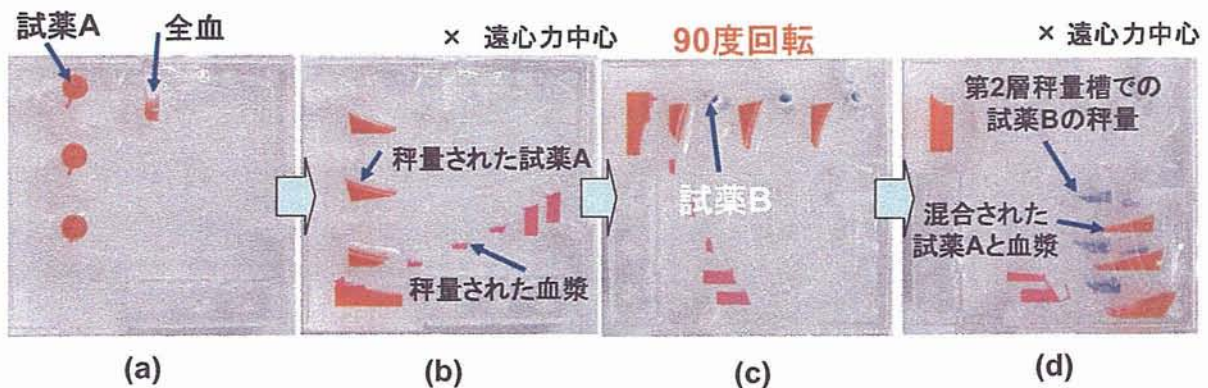


図 32 基質緩衝液 A と B の秤量と、A と血漿とのミキシング過程



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

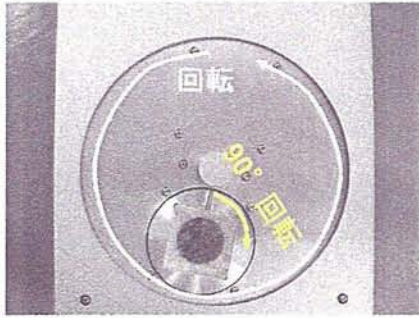


図 33 チップの 90° 公転・自転機構

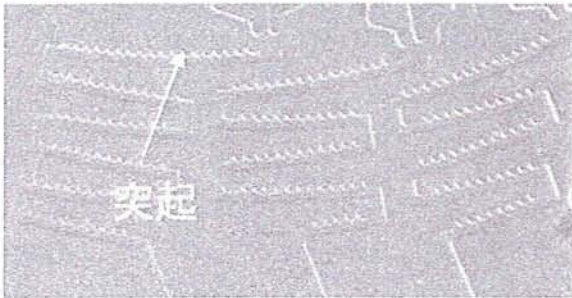


図 34 遠心力によるミキシング流路部の写真

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。

このようなチップを評価したところ、いかのよ  
うな問題点が判明した。すなわち、第一層の血球  
分離と同時秤量流路はジグザク様であり、加速時  
に、流路の上部に血漿、下部に血球に分離させよ  
うとしたが、高加速を得るには能力の高いモータ  
が必要であり、装置のコスト高になる。そこで、  
チップの厚さを 13mm から 8mm 厚と薄くして負  
荷を低減し、更に図 36 に示すように、(i)採血後  
の無痛針モジュールを装着後、(ii)低回転で血液を  
移動させ、(iii)引き続き血球分離を行い、(iii)高速  
回転を行い、キャピラリバルブ(細管流路)を通  
過させ、血漿を 3 つの秤量槽に移動・秤量させた。  
本方式の採用により、極めて良好に血漿・血球分  
離と血漿秤量が達成された。

また、図 37 に示すように、自動計測装置も新  
たに開発した。(a)は本体であり、下部に備えた温  
調器から 37°Cの空気を送り、恒温化されている。  
(b)は回転部の詳細を示し、チップは 2 個載置す  
ることができ、チップ構造と光源を変えることによ

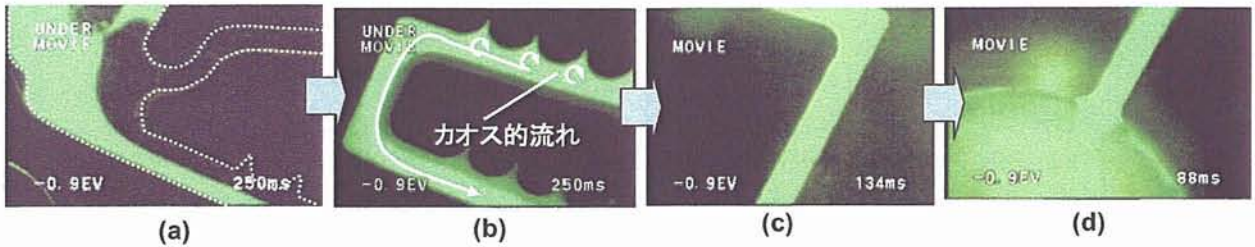


図 35 ミキシング流路での混合過程の観察

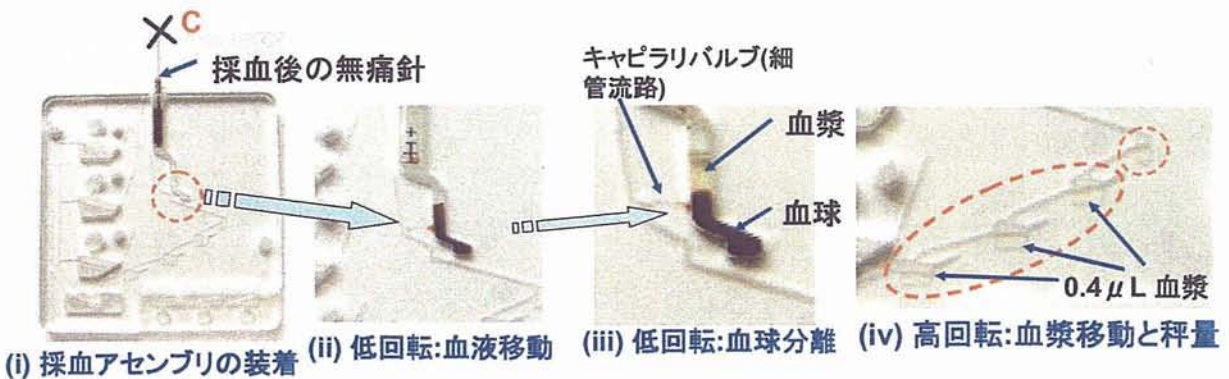


図 36 改良した血球分離・同時秤量プロセス

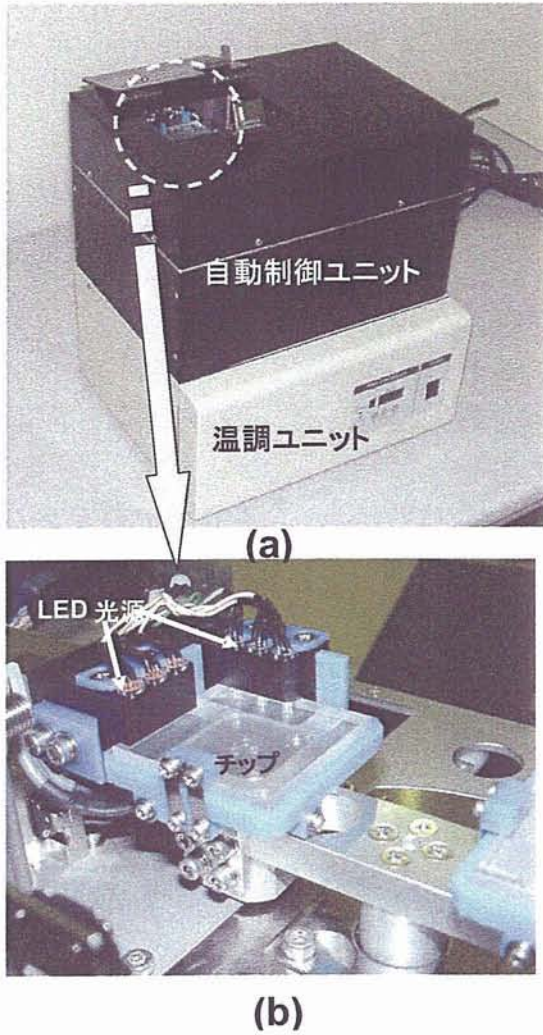


図37 全自動計測装置 (a)、(b)は遠心駆動用ロータの詳細

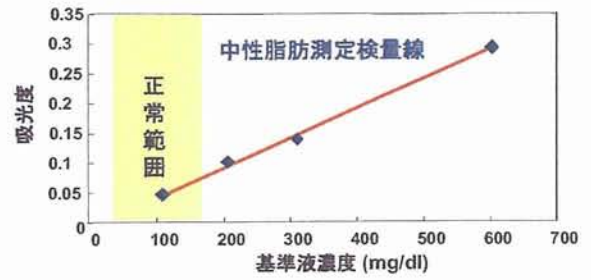


図 38 中性脂肪の検量線

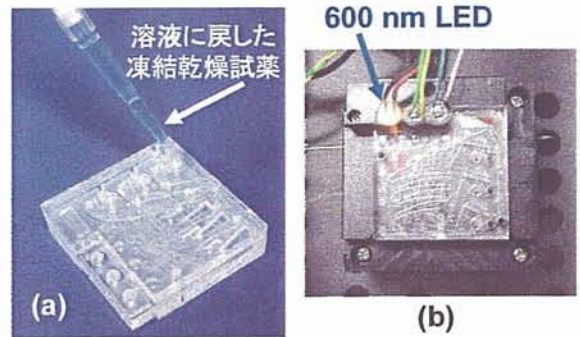


図 39 (a)チップへの基質緩衝液の導入、(b)チップ内測定

コンで制御され計測結果が表示される。

(5) 前臨床実験

前臨床実験の前に予備的な実験を行った。研究者の1人が異常に高い中性脂肪値を示しており、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

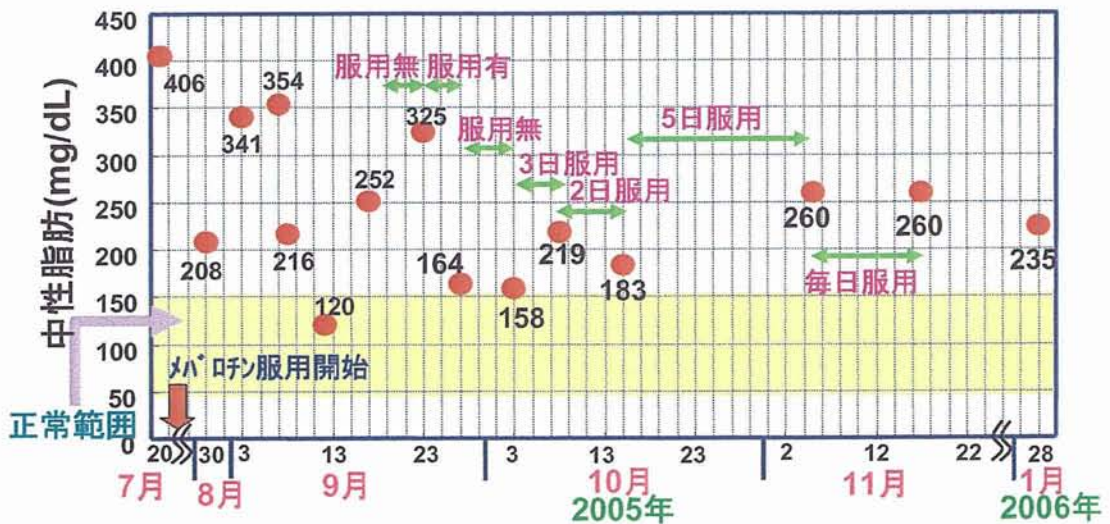


図 40 中性脂肪値のメバロチンの長期服用効果

衝液試薬とチップを用いて、4ヶ月に及ぶ服用効果をモニタリングした。図38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39(a)に示すように、チップの基質緩衝液に導入し、中性脂肪値は(b)のようにチップ内で測定した。

図40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。

次に開発・試作した3つの血液検査項目が測定できる診断チップを用い、被検者のトリグリセリド(TG)、総コレステロール(TC)、高比重リポタンパクコレステロール(HDL)をドライ試薬を乾燥前と同量の水添加により戻した薬液を用い、更に全自検査装置で測定した。被検者から得られた血清検体を用いて、3つの生化学検査項目につき、診断チップと従来検査法により測定して比較分析をおこない、図41に示す結果を得た。いずれの検査項目に関しても両方法による測定値の間には、高い相関性が認められた。とくに、TGとTCに関しては、非常に高い相関係数が算出され ( $r^2 > 0.98$ )、十分に信頼性の高い測定であることが示された。一方、HDL測定では、相関係数が必ずしも大きくなかった ( $r^2 = 0.51$ )。

今回、各測定項目ともに3~5回計測による測定値平均を採用している。変動指標である変動係数(CV: SD/平均値)を算出したところ、TG、TC、HDLの順に、3.0%、8.6%、10.3%であった。一方で従来測定法によるそれは(SRL社データ)、3.1%、1.7%、2.0%と報告されている。従って、診断チップによるTG測定に関しては、従来法に匹敵する信頼性を有していることがわかった。

HDL値の変動が大きいことに関しては、いずれの測定においても、手順として血清と2種類の試薬を混合する必要があり、HDL試薬の粘性が高いため、チップ内貯留槽において血清と十分に混合していなかった可能性がある。混合に関する問題は、チップ表面のコーティング処理などにより対応していくことを考えている。検討すべき問題点はあるものの、臨床前試験によって、本診断チップが誤差・精度に関して実用的には十分な信頼性をもっていることが示された。

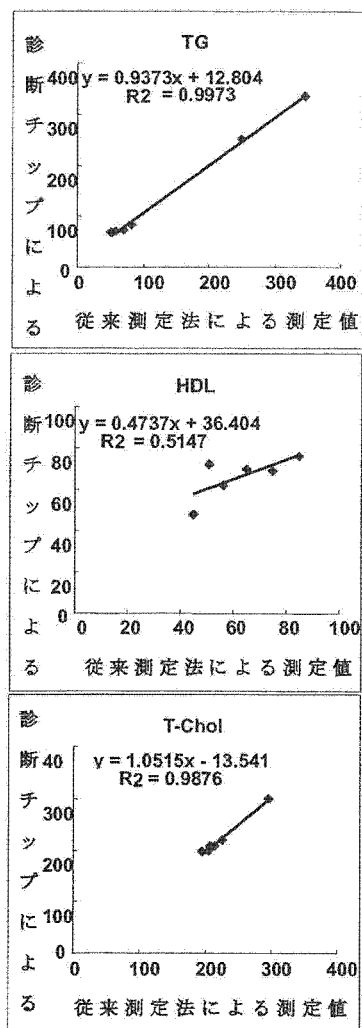


図41 TG、HDL、T-cholの計測値の従来測定値と本診断チップ測定値との相関関係

#### D.考察

高齢者の疾病の在宅での予防を目的として、3年間本研究を遂行した。NiフリーSUS管による無痛針では、外径100 $\mu\text{m}$ の針加工には成功したが、結晶粒粗大化による組織の座屈や耐食性および靱性の低下などの問題も判明した。一方、従来のSUS304を用いた外径150 $\mu\text{m}$ の無痛針を用い、偏光を用いた血管の可視化と皮膚と針間の電位測定から静脈位置が分かり、これらをディスプレイ上で示すことにより、手の表面からも全く痛みを感じずに採血が可能になり、電子採血と呼んでいる。この発展上には自動無痛採血が実現する。診断チップに関しては、比色法では試薬の保存に問題があったが、トレハロースとともに試薬をドライ化することで長期保存化を達成した。また、6マイクロリットルの微量血液を研究と血漿に分離し、この分離した血漿を3区画に秤量し、同時に6種類の試液を秤量、試液と血漿の混合等の機能を有する3項目測定用のチップを開発した。さらにこのチップの自転公転、恒温、光学測定を行う自動計測装置も開発し、上記3項目中、TGとTCに関しては、検査会社の値と非常に高い相関係数が算出され、十分に信頼性の高い測定であ

ることが示された。一方、HDL測定では、相関係数が必ずしも大きくなかったが、これは粘度が高いためミキシング不足と判明しており、その対策案は有している。以上、3年間の本研究課題は殆ど達成されたと考えられる。

#### E.結論

在宅でできる血液検査診断チップシステムを目指し、NiフリーSUS管による無痛針はまだ課題が残るが、SUS304を用いた無痛針による電子採血、小型自動計測装置を用いての上記3項目の計測技術を確立し、患者の血液を用いた全臨床実験も開始し、検討すべき問題点はあるものの、臨床前試験によって、本診断チップが誤差・精度に関して実用的には十分な信頼性をもっていることを示した。このような新しいコンセプトのものを世に浸透させていくためには、更なる製品化、商品化の努力はもちろんではあるが、これを受け入れる素地たる厚生行政の対応も切に望まれる。

#### F.健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. A. Oki, H. Ogawa, M. Nagai, S. Shinbashi, M. Takai A. Yokogawa and Y. Horiike "Development of healthcare chips checking life-style-related diseases", Materials Science and Engineering C, **24**(6-8) (2004), 837-843.
2. 高井まどか、新橋里美、小川洋輝、長井政雄、石原一彦、堀池靖浩、"多項目同時測定ヘルスケアチップ用マイクログルコースセンサーの創製"、高分子論文集、**61**(10) (2004)、555-560.
3. A. Yamamoto, Y. Kohyama, D. Kuroda, and T. Hanawa, "Cytocompatibility evaluation of Ni-free stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment", Materials Science & Engineering C Biomimetic and Supramolecular Systems, **24** (2004) 737-743.

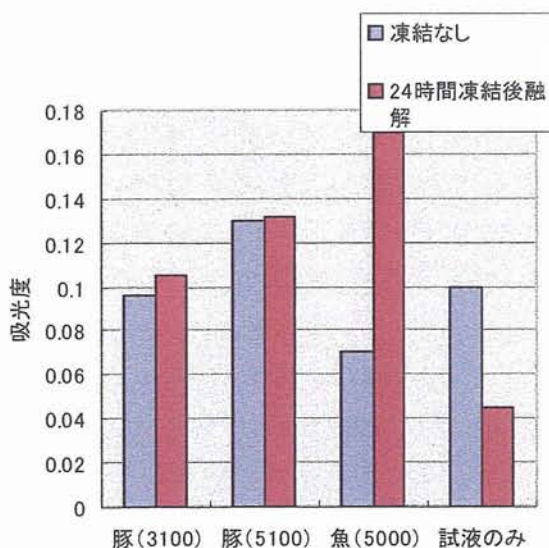


図16 ゲル担持の凍結影響  
(活性値 25Karmen 時)