

## 2.2 Nitrogen absorption

Specimens for the torsion, tensile, and hardness tests of the alloy were polished with #600 SiC paper in water and then ultrasonically rinsed in acetone for 300 s. After rinsing, the specimens were separately located to a 304 steel reticular stage. The area for nitrogen absorption in the specimens did not contact the stage. The stage with the specimens was inserted into the nitrogen absorption furnace.<sup>1-3)</sup> The pressure of the inside of the furnace was reduced to 2 Pa, and nitrogen gas (<99.99%) was introduced and continuously flew into the furnace to maintain a pressure of 101.3 kPa. The temperature of the furnace was increased from ambient to 1473 K at a rate of 0.08 K s<sup>-1</sup> and kept for 7.2 ks, 10.8 ks, 14.4 ks, 18.0 ks, and 21.6 ks. Immediately after heating, the specimens were quenched into a water bath. The scale generated on each specimen was removed with #600 SiC paper in water after nitrogen absorption.

## 2.3 Examination of microstructure and mechanical properties

Gripped parts of torsion test specimens were employed for microstructural observation. Specimens for microstructural examination and hardness test were finally polished with #600 SiC paper and buffed. After etching with a Vilella reagent, the microstructure was observed with an optical microscope. Phases of specimens for the torsion test with and without nitrogen absorption were identified using X-ray diffractometry (XRD) with CuK $\alpha$  radiation (40 kV and 300 mA). The hardness test was performed using a micro Vickers hardness tester. The torsion test was performed in air using a torsion testing machine with a capacity of 0.2 N as shown in Fig. 2. The rotation speed of gripped part was 0.1 Hz. Torque and rotation angle to fracture were estimated throughout the torsion test. The torsional stress,  $\tau$  was calculated by the following equation:

$$\tau \text{ (N/m}^2 \text{ = Pa)} = T \text{ (N}\cdot\text{m)} / Z_p \text{ (m}^3\text{)} \quad (1)$$

where  $T$  is the torque and  $Z_p$  is the polar modulus of section. The polar modulus of section,  $Z_p$ , was calculated by the following equation:

$$Z_p \text{ (m}^3\text{)} = \pi d^3 / 16 \quad (2)$$

where  $d$  is the diameter of the specimen for torsion test.

Tensile tests were performed in air using an Instron-type tensile testing machine with a capacity of 10 kN. The

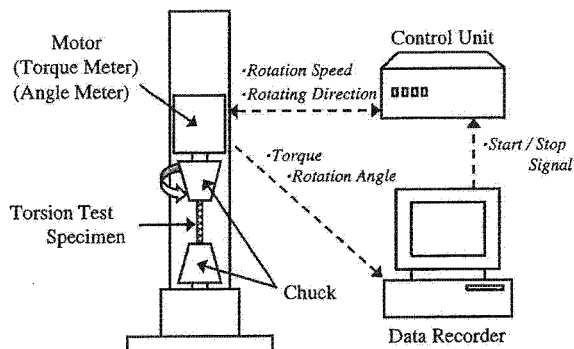


Fig. 2 Schematic illustration of the torsion test system.

crosshead speed was  $8.33 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ . Ultimate tensile strength, 0.2% proof stress, and elongation to fracture were estimated throughout the tensile test. At least, three measurements were carried out under the same conditions, and the mean values were calculated. The fractured surfaces were observed with a scanning electron microscope (SEM) after torsion and tensile tests.

For comparison, changes in phases, hardness and torsion and tensile properties that were the result of heating without nitrogen absorption were investigated by heating under the same temperature and time as the nitrogen absorption treatment in an argon atmosphere.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Changes in microstructures by nitrogen absorption

XRD profiles of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K in an argon atmosphere are shown in Fig. 3. Only diffraction pattern of ferrite ( $\alpha$  phase) was observed from Fe-24Cr-2Mo without nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K in an argon atmosphere (Figs. 3(a) and (b)), indicating that phase transformation from  $\alpha$  phase to austenite ( $\gamma$  phase) does not occur in an argon atmosphere. On the other hand, only peaks originating from  $\gamma$  phase were observed from the alloy with nitrogen absorption for over 7.2 ks, indicating that the thin wire of the alloy is completely austenitized with nitrogen absorption treatment for 7.2 ks (Fig. 3(a)). Using XRD, neither CrN nor Cr<sub>2</sub>N was identified in any specimen with nitrogen absorption, indicating that precipitation of nitride

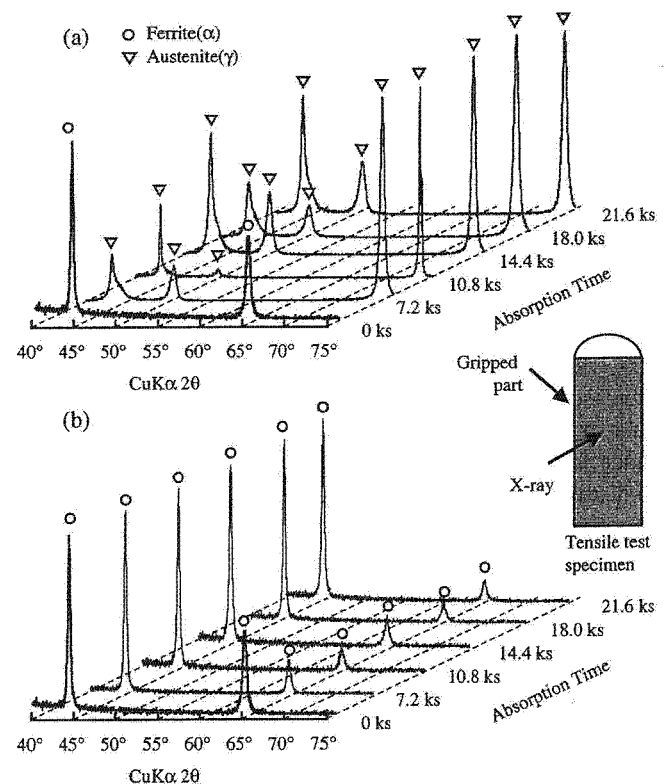


Fig. 3 X-ray diffraction patterns of (a) Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and (b) Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K in an argon atmosphere.

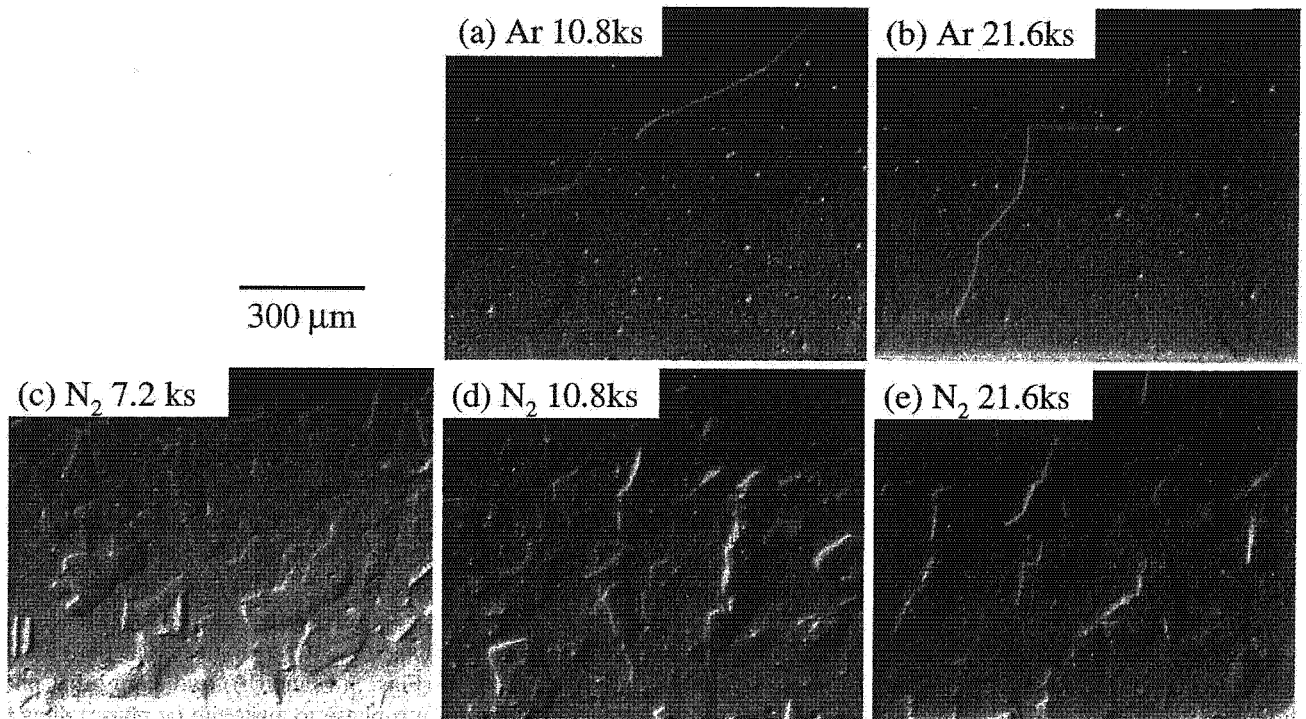


Fig. 4 Optical microstructure of Fe-24Cr-2Mo in each treatment. (a) and (b) heated at 1473 K in an argon atmosphere, and (c), (d) and (e) heated at 1473 K in a nitrogen atmosphere.

does not occur in Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption. The result of XRD in this study is in good agreement with that in the previous study.<sup>1-3)</sup>

The microstructures of Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated in an argon atmosphere are shown in Fig. 4. The microstructures of the alloy before nitrogen absorption and heat treatment in an argon atmosphere were a fine  $\alpha$  phase expanded along the radial forging direction. The  $\alpha$  phase was only observed in Fe-24Cr-2Mo heated in an argon atmosphere (Figs. 4(a) and (b)). Fine grains in Fe-24Cr-2Mo were grown and coarsened with the nitrogen absorption treatment and heat treatment in an argon atmosphere. The mean grain size of the alloy after heated for 21.6 ks in an argon atmosphere was 433  $\mu\text{m}$ . The grains were the largest with 21.6-ks nitrogen absorption (Fig. 4(e)). The mean grain size of the alloy after 21.6-ks nitrogen absorption was 126  $\mu\text{m}$ . The mean grain size of the alloy slightly increased with increasing nitrogen absorption time. The grain size of Fe-24Cr-2Mo heated in an argon atmosphere was much larger than that of the alloy with nitrogen absorption, indicating that nitrogen works as a strong inhibitor against the coarsening. In addition, that of the alloy after 21.6-ks nitrogen absorption and heated for 21.6ks in an argon atmosphere in the previous study was 132  $\mu\text{m}$  and 527  $\mu\text{m}$ , respectively.<sup>3)</sup> The grain size of the alloy in this study was smaller than that in the previous study,<sup>3)</sup> indicating that the resultant grain in the alloy was refined with the grain refinement process attempted in this study.

### 3.2 Changes in hardness by nitrogen absorption

The changes in micro Vickers hardness of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption treatment and the alloy heated in an argon atmosphere are shown in Fig. 5. For

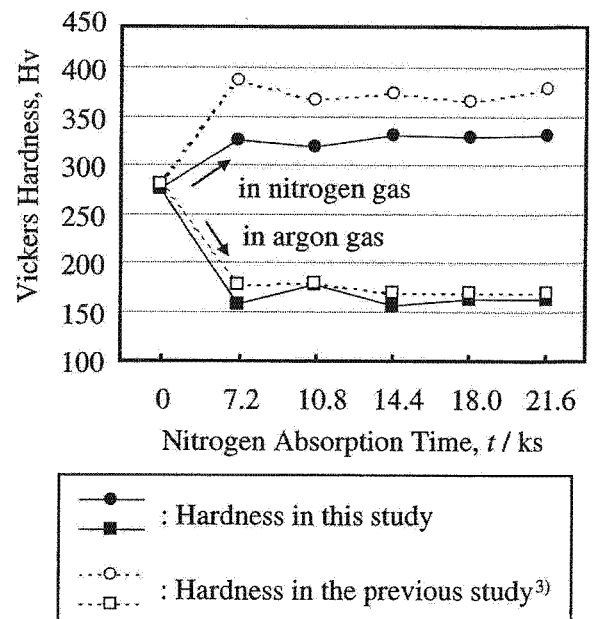


Fig. 5 Comparison of the micro Vickers hardness of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K in an argon atmosphere. For comparison, that of the alloy with and without nitrogen absorption treatment and heated in an argon atmosphere in the previous study<sup>3)</sup> is also shown.

comparison, that of the alloy with and without nitrogen absorption treatment and heated in an argon atmosphere in the previous study<sup>3)</sup> is also shown. Although the micro Vickers hardness of the alloy after annealing was 150, that of thin wire of the alloy after 99.99% cold forging was 280 because of work hardening. The hardness of the alloy without nitrogen absorption in this study was the same as that in the

previous study. However, the hardness of the alloy with nitrogen absorption in this study was smaller than that in the previous study. On the other hand, the hardness of the alloy heated in an argon atmosphere in this study was the same as that in the previous study. The hardness of Fe-24Cr-2Mo increased with 7.2-ks nitrogen absorption, and the value was maintained when the duration of the nitrogen absorption was extended. The hardness of the alloy showed the maximum value ( $H_v=337$ ) at 21.6-ks nitrogen absorption. On the other hand, the hardness decreased in an argon atmosphere with heating for 7.2 ks. This indicates that the release of residual stress by heat treatment in an argon atmosphere.

### 3.3 Changes in tensile properties by nitrogen absorption

Figure 6 shows the ultimate tensile strength, 0.2% proof stress, elongation to fracture, and reduction of area of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption treatment and Fe-24Cr-2Mo heated in an argon atmosphere. The tensile strength, 0.2% proof stress, and reduction of area of the alloy decreased with nitrogen absorption, while elongation to fracture of the alloy increased with nitrogen absorption. Elongation to fracture of the alloy increased with increasing nitrogen absorption time. The value of tensile strength of the alloy with nitrogen absorption is much larger than that of 0.2% proof stress of the alloy with nitrogen absorption,

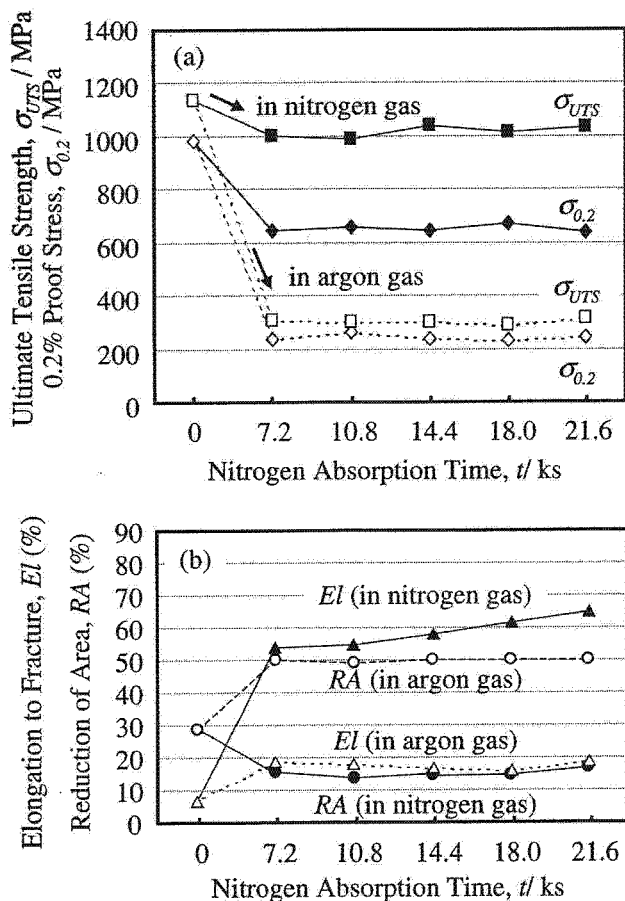


Fig. 6 (a) Ultimate tensile strength and 0.2% proof stress and (b) elongation to fracture and reduction of area of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K in an argon atmosphere.

indicating that magnitude of work-hardening increased with solid-solution strengthening of nitrogen. Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption for 14.4 ks showed maximum ultimate tensile strength (1033 MPa). Elongation to fracture of the alloy showed the maximum value (65%) at 21.6-ks nitrogen absorption. The maximum values of tensile strength and elongation obtained from the alloy with nitrogen absorption in this study are larger than those of the alloy with nitrogen absorption in the previous study (985 MPa and 41%).<sup>3)</sup> In this study, the amounts of nitrogen in the thin wires of Fe-24Cr-2Mo at 7.2-ks and 21.6-ks absorption were 0.92 mass% and 0.95 mass%, respectively. The amount of nitrogen in the thin wire of the alloy increased with 7.2-ks nitrogen absorption, and the amount was maintained when the duration of the nitrogen absorption was extended. On the other hand, the amounts of nitrogen of the thin wires of Fe-24Cr-2Mo at 7.2-ks and 21.6-ks absorption were 0.92 mass% and 0.93 mass% in the previous study. The amount of nitrogen of the alloy with nitrogen absorption in this study was the same as that in the previous study. Therefore, tensile properties of the alloy with nitrogen absorption in this study improved with the grain refinement process attempted in this study. The tensile strength and 0.2% proof stress decreased and elongation to fracture and reduction of area increased with a heat treatment in an argon atmosphere. The hardness of the cold-forged Fe-24Cr-2Mo was also decreased with the heat treatment (Fig. 5). These results suggest the residual stress was released by the heat treatment. Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K for 21.6 ks in an argon atmosphere showed maximum ultimate tensile strength and elongation to fracture, 310 MPa and 19%, respectively. The tensile strength and elongation to fracture obtained from the alloy heated in an argon atmosphere in this study are the same as those of the alloy heated in an argon atmosphere in the previous study.<sup>3)</sup> The tensile strength,

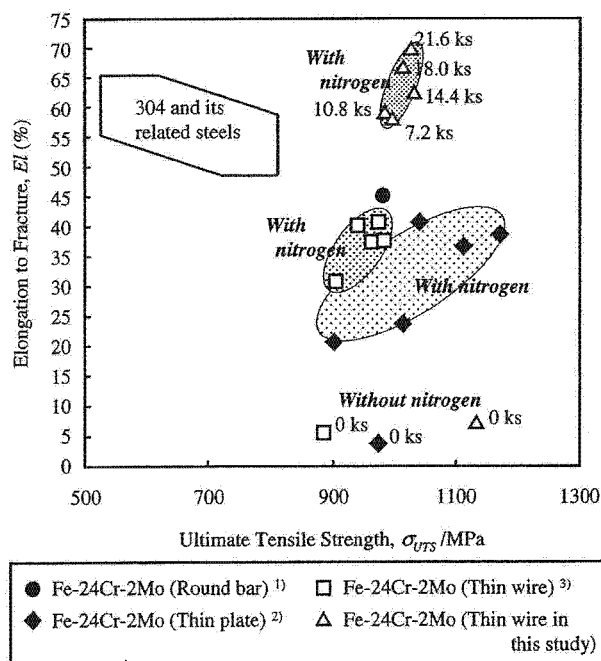


Fig. 7 Ultimate tensile strength and elongation to fracture of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and of conventional austenitic stainless steels.

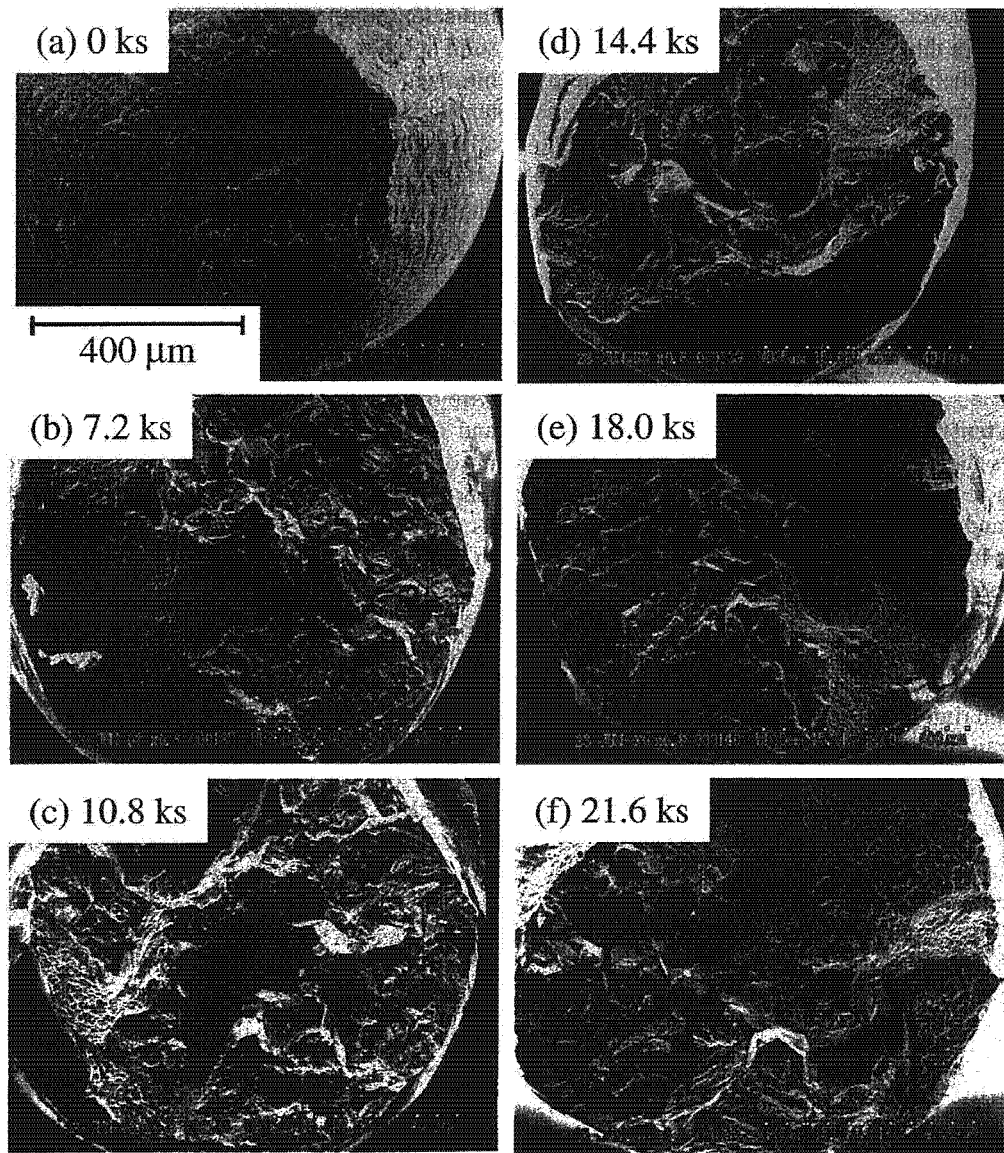


Fig. 8 Scanning electron micrographs of fractured surfaces of Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption for (a) 0 ks, (b) 7.2 ks, (c) 10.8 ks, (d) 14.4 ks, (e) 18.0 ks, and (f) 21.6 ks after tensile test.

0.2% proof stress, and elongation to fracture of the alloy with nitrogen absorption were larger than those of the alloy heated in an argon atmosphere.

The relation between ultimate tensile strength and elongation to fracture of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption is shown in Fig. 7. The figure also contains the data on a round bar, thin plate, and thin wire of Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption and 316L steel previously reported.<sup>1-3</sup> The best balance between strength and elongation was given by 21.6-ks nitrogen absorption in Fe-24Cr-2Mo, and the balance was larger than that in the thin wire in the previous study<sup>3</sup> and conventional austenitic stainless steel.<sup>1</sup> However, the balance between strength and elongation of thin wire of the alloy with nitrogen absorption was lower than that of the thin plate in the previous study.<sup>2</sup>

Figure 8 shows the scanning electron micrographs of fractured surfaces of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption treatment. Specimen without nitrogen absorption shows a ductile fracture surface (Fig. 8(a)). Fe-24Cr-2Mo

with nitrogen absorption specimens showed good elongation (Fig. 6(b)), whereas the fractured surface of specimens with nitrogen absorption showed a brittle fracture surface. The addition of nitrogen reduces the formability because it increases the brittleness of the  $\gamma$  phases.<sup>4</sup> In addition, the grain boundary cracks generate during cold rolling in a highly nitrogen contained (0.9 mass%) Fe-Cr-Mn-N steel.<sup>5</sup> Over 0.9 mass% nitrogen can be absorbed by Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption treatment.<sup>1</sup> Therefore, the brittle fractures observed in the alloy with nitrogen absorption were caused by brittleness of the  $\gamma$  phase.

The tensile strength of Fe-24Cr-2Mo is governed by the refinement of grains, according to the results of microstructural observations, tensile test, and observation of fractured surface.

#### 3.4 Changes in torsion properties by nitrogen absorption

Figure 9 shows the torsional stress and rotation angle to



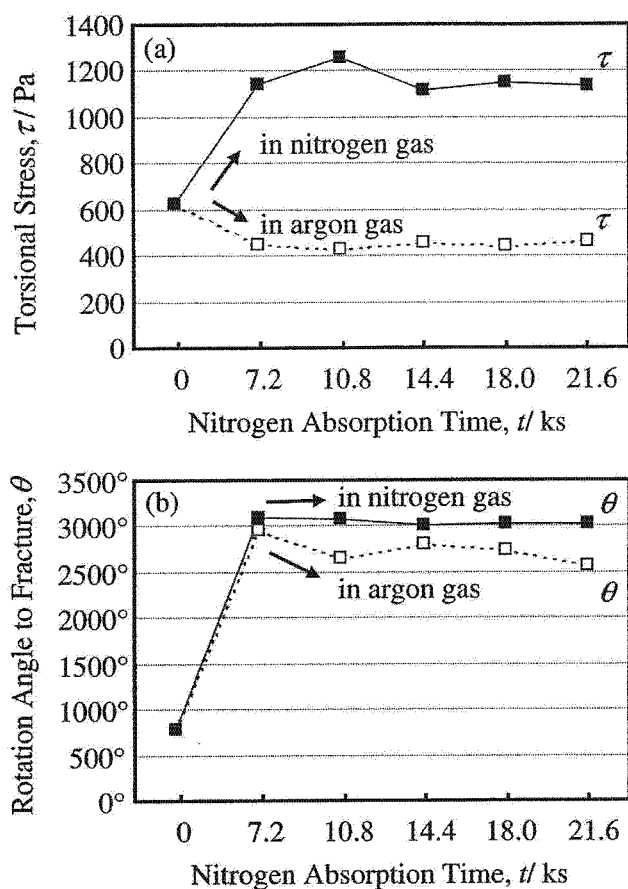


Fig. 9 (a) Torsional stress and (b) rotation angle to fracture of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated at 1473 K in an argon atmosphere.

fracture of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and Fe-24Cr-2Mo heated in an argon atmosphere. The torsional stress and rotation angle to fracture of the alloy increased with nitrogen absorption. Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption for 14.4 ks showed maximum torsional stress (1258 Pa). Rotation angle to fracture of the alloy showed the maximum value (3094°) at 7.2-ks nitrogen absorption. On the other hand, the torsional stress of the alloy decreased and rotation angle to fracture increased with a heat treatment in an argon atmosphere. Fe-24Cr-2Mo with heated for 21.6 ks showed maximum torsional stress (465 Pa). Rotation angle to fracture of the alloy showed the maximum value (2964°) at 7.2-ks heat treatment in an argon atmosphere. The torsional stress and rotation angle to fracture of the alloy with nitrogen absorption were larger than those of the alloy with heating in an argon atmosphere. Therefore, torsion properties of the alloy increased with nitrogen absorption.

Figure 10 shows the relation between torsional stress and rotation angle to fracture of the alloy with and without nitrogen absorption and that of the thin wire of 316L steel in annealed condition. The balance between torsional stress and rotation angle to fracture of the alloy increased with nitrogen absorption. The balance between torsional stress and rotation angle to fracture of the alloy with nitrogen absorption was larger than that of the annealed 316L steel, while that of the alloy with a heating in an argon atmosphere as smaller than that of 316L steel. The best balance between torsional stress

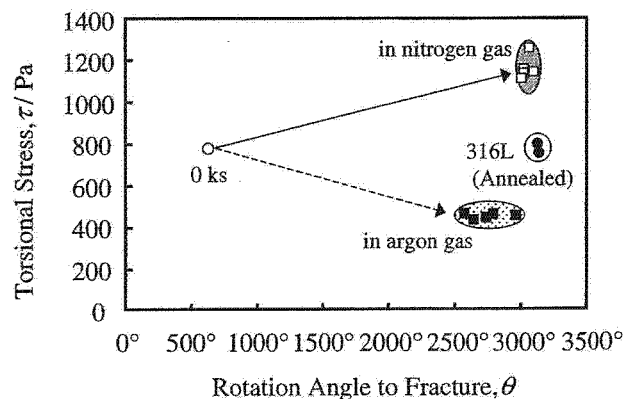


Fig. 10 Torsional stress and rotation angle to fracture of Fe-24Cr-2Mo with and without nitrogen absorption and of conventional austenitic stainless steel.

and rotation angle to fracture was given by 18.0-ks nitrogen absorption in Fe-24Cr-2Mo, and the balance was larger than that in 316L.

#### 4. Conclusions

The refinement of grains of Fe-24Cr-2Mo in mass% was attempted by thermo-mechanical treatment before nitrogen absorption treatment in order to increase the mechanical properties after nitrogen absorption treatment. Torsion and tensile properties and microstructures of Fe-24Cr-2Mo before and after nitrogen absorption treatment were evaluated to understand the effects of grain refinement on nitrogen absorption. The results obtained are as follows:

(1) The mean grain size of Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption decrease with the grain refinement process attempted in this study.

(2) The tensile properties of the alloy with nitrogen absorption in this study improved with the grain refinement process attempted in this study. The best balance between strength and elongation is given by 21.6-ks nitrogen absorption in Fe-24Cr-2Mo, and the balance was larger than that in conventional austenitic stainless steel.

(3) The torsion properties of the alloy increase with the grain refinement process and nitrogen absorption. The balance between torsional stress and rotation angle to fracture in Fe-24Cr-2Mo with nitrogen absorption at 1473 K for over 7.2 ks is larger than that in conventional austenitic stainless steel.

(4) The thin wire of the alloy with nitrogen absorption is expected to have good mechanical properties than conventional austenitic stainless steels.

#### Acknowledgements

We would like to thank Mr. Kenshi Morita, Mr. Hironori Kawasaki and Mr. Morihide Makino for their valuable support during the experiments.

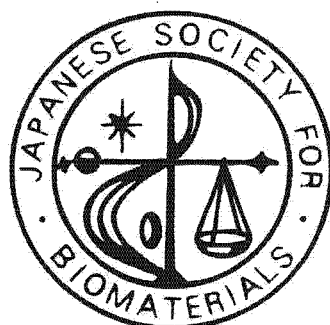
**REFERENCES**

- 1) D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi and T. Kobayashi: *Mater Trans.* **44** (2003) 414-420.
- 2) D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi and T. Kobayashi: *Mater Trans.* **44** (2003) 1363-1369.
- 3) D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, M. Kobayashi and T. Kobayashi: *Mater Trans.* **44** (2003) 1557-1582.
- 4) G. Stain and J. Menzel: *Stahl Eisen* **112** (1992) 47-52.
- 5) K. Kataoka, T. Tsuchiyama, H. Goto and S. Takaki: *J. Jpn. Soc. Powder Metallurgy* **46** (1999) 922-926.

# 日本バイオマテリアル学会 シンポジウム2004

第11回つくばバイオマテリアル研究会

## 予稿集



## J S B

- 2004年11月15日 ~ 16日
- つくば国際会議場 エポカル

大会長 田中 順三

日本バイオマテリアル学会

(物質・材料研究機構 生体材料研究センター) ○黒田大介

## 1. 緒言

金属系医療用デバイスの素材として、素材価格が安く、優れた加工性を有するオーステナイト型ステンレス鋼(316L鋼)が主に使用されている。しかし、316L鋼に含まれるNiは金属アレルギーの原因物質として問題視されていることから、Niのかわりに高濃度のNを添加した高濃度窒素含有オーステナイト型ステンレス鋼(以下、Niフリーステンレス鋼)の開発がEU諸国を中心に精力的に進められている。一方、アジア地域におけるNiフリーステンレス鋼の研究・開発は日本以外では行われていない。これは、金属アレルギーは黄色人種には少ないため、Niのアレルギー性がEU諸国ほど問題視されていないからである。また、高濃度のNを含むNiフリーステンレス鋼は生体用金属材料として優れた特性を示すが、溶解、成形加工などに特殊な設備や技術が必要であり、加工条件によっては素材が非常に脆くなってしまうため、Niフリーステンレス鋼のインゴットから医療用デバイスや民生品を安価かつ簡便に製造する技術は未だ開発されていない。これらの問題がNiフリーステンレス鋼の実用化を困難にしている。

そこで、これまでの生体用Niフリーステンレス鋼の研究開発動向を概説するとともに、Niフリーステンレス鋼製の製品を安価かつ簡便に製造するために演者らが開発した“成形加工と窒素吸収処理を組み合わせたNiフリーステンレス鋼製品の製造技術”について紹介する。さらに、開発した技術で製造したNiフリーステンレス鋼の力学的特性、耐食性、生体適合性などについても紹介し、Niフリーステンレス鋼の生体、民生分野への適用の可能性、新しい製造技術の実用の可能性について述べる。

## 2. 生体用Niフリーステンレス鋼の研究開発動向

高濃度窒素含有オーステナイト型ステンレス鋼は、もともと海洋構造物材料として開発された合金である。これら合金には耐塩化物腐食性、耐隙間腐食性、耐孔食性を改善させるためにN、Mn、Niが複合添加される。EU諸国で開発された生体用Niフリーステンレス鋼には力学的強度や耐食性を改善するためにNやMnが複合添加される傾向があるが、Mnの発癌性も近年報告されていることから、日本ではNiだけでなくMnも含まない生体用Niフリーステンレス鋼が開発されている。NiやMnはオーステナイト形成元素であるため、これら元素の添加量の減少にともないN添加量を増加させる必要がある。0.3 mass%以上のNをステンレス鋼に添加するために、加圧ESR(Electro Slag Remelting)法という特殊な溶解技術が使用される。しかし、加圧ESR法では成分設計に制約が多く、さらに消耗電極の製造にコストがかかるため、素材は非常に高価になる。また、加圧ESR法で製造した素材は非常に硬いため、成形や機械加工によってインゴットから直接製品を製造することは困難である。

## 3. 新しいNiフリーステンレス鋼の製造技術

Nを含まない軟らかいフェライト型ステンレス鋼の状態では製品形状に加工し、最終製品にNを吸収させることで形状を変化させることなく製品全体をオーステナイト組織化する製造技術を開発した。窒素を含まないFe-24Cr-2Mo (mass%)合金において厚さ200 $\mu$ mの箔材や直径350 $\mu$ mの線材が容易に成形できること、開発した技術で0.9 mass%以上のNを含む直径あるいは厚さが最大で4 mmのNiフリーステンレス鋼製品を製造できることなどを確認している。また、N吸収したNiフリーステンレス鋼は、優れた細胞適合性、組織適合性を有することも確認している。現在、種々の製品の試作を行っている(Fig. 1)。

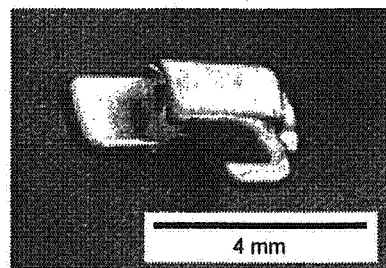


Fig. 1 試作したバックルチューブ

Development of Nickel-free Stainless Steel for Biomedical applications  
(Biomaterials Research Center, National Institute for Materials Science.)

D. KURODA

Tel: 029-860-4179 FAX: 029-860-4715, E-mail: KURODA.Daisuke@nims.go.jp

(36)

窒素吸収処理した Ni フリーステンレス鋼の生体親和性

(物・材機構 生体材料研究センター) ○黒田大介

(北海道大学大学院歯学研究科) 横山敦郎

(物・材機構 生体材料研究センター) 山本玲子, 埴 隆夫, 廣本祥子

【はじめに】我々は、窒素吸収処理を利用した Ni フリーステンレス鋼の新しい製造技術を開発した。この技術により、発癌性・アレルギー性が指摘されている Ni を添加することなく高い力学的強度、耐食性および細胞適合性を有する小型の Ni フリーステンレス鋼製品を製造できる。本研究では、新技術で製造した Ni フリーステンレス鋼の生体親和性をラットモデルにより評価し、既存の生体用金属材料である純チタンおよび SUS316L 鋼と比較した。

【実験方法】新技術で製造した直径1 mmの Fe-24Cr-2Mo-1N (mass%) ワイヤー、市販の直径1 mmの純チタン胸骨針ワイヤーおよび直径0.8 mmの SUS316L 鋼胸骨針ワイヤーを供試材とした。それらワイヤーをそれぞれ長さ5 mmに切断後、切断部のみを#2000までのエメリー紙により湿式研磨した。さらにアセトンおよびアルコールで洗浄、オートクレーブ滅菌し、生後12週齢雄のウイスター系ラットの左側大腿骨に2本、腹部皮下組織に1本埋入した。1週および4週間埋入した後に、試料を周辺組織とともに摘出した。周辺組織から試料を除去して標本を作製し、HE染色後に観察した。

【結果】皮下組織に埋入した SUS316L 鋼の周辺組織では腐食生成物が認められたが、Fe-24Cr-2Mo-1N および純チタンを埋入した部位の周辺組織では腐食生成物は認められなかった。また、骨組織に埋入した Fe-24Cr-2Mo-1N および純チタンの表面では、線維性結合組織を介することなく新生骨が形成された。以上の結果から、Fe-24Cr-2Mo-1N は SUS316L 鋼よりも優れた生体親和性および骨伝導性を有することが明らかとなった。



バイオテクノロジーシリーズ

# ナノテク・バイオ MEMS 時代の 分離・計測技術

*Technologies for Separation and Measurement  
in the Age of Nanotechnology and bioMEMS*

監修：馬場嘉信

*Supervisor: Yoshinobu Baba*

HIGH TECHNOLOGY  
INFORMATION

シーエムシー出版

## 第2章 医療・診断, 環境応用

### 1 血球・血漿分離チップ

小川洋輝\*1, 長井政雄\*2, 堀池靖浩\*3

#### 1.1 はじめに

血液は生体情報の宝庫であり, 生体の状態を的確に把握するために, これを分析することは必要不可欠である。実際に年1回ほど行われる健康診断においては, 血液を採取して, 腎機能, 肝機能, 血液脂質, 血糖などの指標を反映する検査項目を分析することでおおまかな健康状態を把握することができる。通常, 各々の検査項目は, 医師により採取された数mLから数十mLという“多量”の血液に遠心分離を施し, 得られた血清と種々の試薬とを混合したときに生じる発色の度合いを光吸収分析により調べ, 濃度に換算する。このような自動分析装置は, 高いスループット, 高感度, 高精度であるという反面, 高価で大型, 操作は熟練の検査技師に限られ, また一般的には検査結果の通知には時間を要するなどの欠点もある。

一方, 半導体産業において発達した微細加工技術を援用してガラスやプラスチックの基板上に溶液が流れる微小な溝(チャンネル)のネットワークを形成し, 実験室で行うような生化学・化学の操作や検出を1枚のチップ上に集積化・小型化した $\mu$ TAS (micro total analysis system) は, 近年様々な分野への応用が盛んに試みられている。その一例として, 多項目分析を行う血液診断チップ挙げられる。昨今の社会的情勢もこのような血液診断チップの出現を促している。すなわち, 我が国では近年高齢者層の医療費が増大し続けており, 今後の少子高齢化に伴い, この傾向にますます拍車がかかることは必定である。このような傾向を少しでも緩和するためには, 高齢者が元気で毎日を送ることができるように日々の健康管理が重要である。このような健康管理のツールとして, 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血液診断チップの実現に大きな期待が寄せられている。図1に本開発の目的とその展開をまとめたが, 種々の診断チップが整うと, 計測された多項目のマーカ値を医療施設に通信回線で送り, 医療ブロードバンドネットワークと高精細ディスプレイを介して医師による問診が在宅で可能になる。さらに, 検出マーカを増やし, 長期間の使用によって, 医療施設に多数の方の健康・疾病マーカの推

\*1 Hiroki Ogawa (株)アドビック

\*2 Masao Nagai (株)アドビック

\*3 Yasuhiro Horiike (独)物質・材料研究機構 フェロー

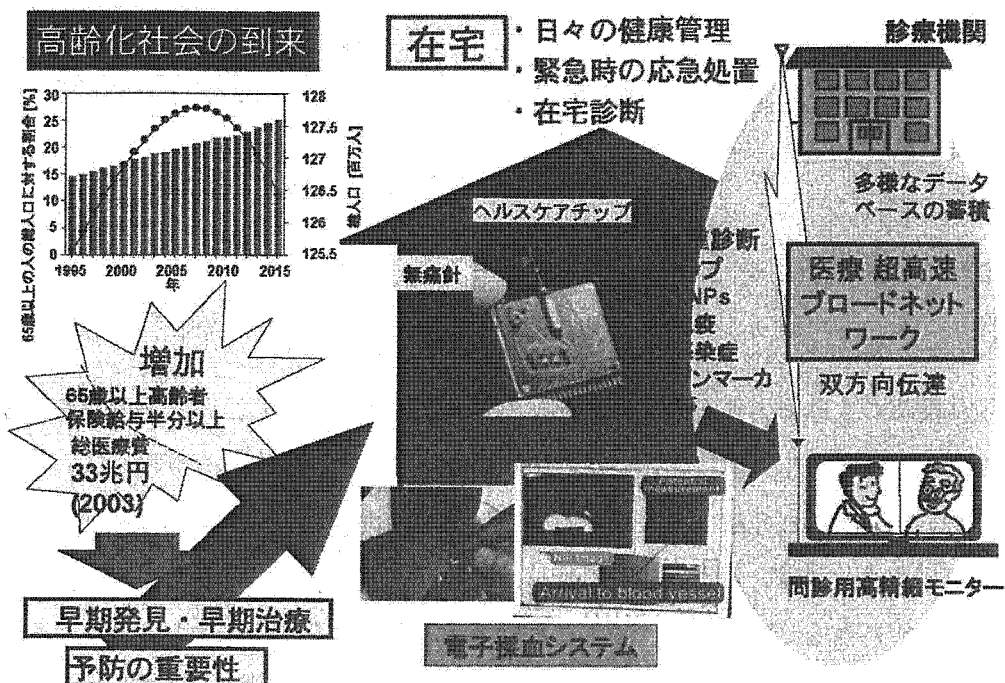


図1 診断チップ・ブロードバンド在宅問診システム

移が蓄積されたデータベースが構築され、そのマーカーと疾病との相関関係を解明が可能になる。また、医師不在の寒村や離島の人々の遠隔診断等が実現され、医療の大変革が期待される。

現在、電気化学的バイオセンサによって多項目を測定するチップとして i-STAT<sup>1)</sup> が広く病院で使われているが、100 $\mu$ L 程度の血液を必要とし、採血には医師が行わねばならず、在宅では到底使用できない。我々は、本目的を実現すべく、8年ほど前から無痛針から微量の血液を採取して、その血漿から電気化学センサによってマーカーを測定するヘルスケアチップ<sup>2)</sup>を開発してきた。ヘルスケアチップは、血管可視化、血管検知機構を援用して無痛針を介し採取した6 $\mu$ L という極微量血液より遠心分離によって抽出した約3 $\mu$ L の血漿中の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> などの電解質イオン、グルコース、尿素、窒素などの多項目の健康マーカーの測定が可能である。

## 1.2 無痛針の作製と電子採血

ヘルスケアチップにおいて、検体である血液の採取は不可欠であり、特に在宅での使用を考慮するとほとんど無痛で素人でも簡単に採血できることが求められる。現状の採血においては20～22ゲージ(外径0.6～0.7mm)の針が用いられ、これを皮膚に穿刺する際に痛点神経網を切断することで痛みを感じる。可能な限りこの痛みを緩和するためには、針の径を小さくして痛点に接触する確率を低減させることが必要である。我々の無痛針は、採血時の剛性を確保し得る最小限の径に近い外径150 $\mu$ m、内径100 $\mu$ m のステンレスパイプの内壁全体にわたって超平滑化処理を施した後に、端面を3面研磨加工し作製している(図2)。このような針を用いることでほとん

ど痛みを感じずに皮膚に穿刺することができ、また後述するように内壁を平滑化した結果、血液中の血球にダメージを及ぼすことなく、かつポンプを用いることなく血圧のみで血液が採取することが可能となった。さらに、ヘルスケアチップが必要とする血液量が6  $\mu\text{L}$  と極微量であることも、このような極細針の使用を可能にしている理由である。

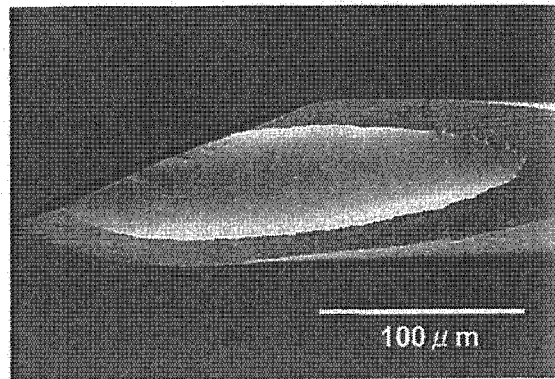
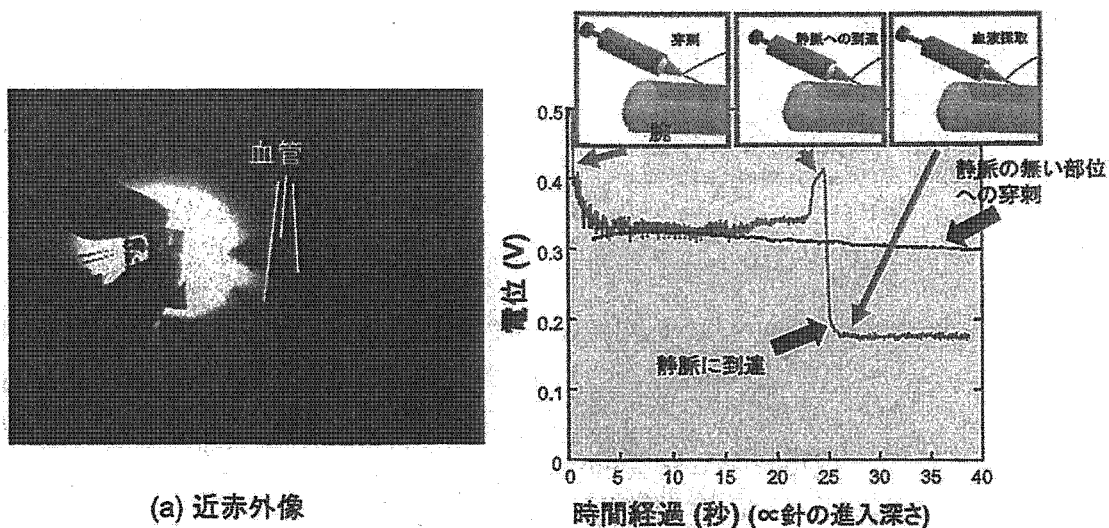


図2 無痛針の先端

このように作製した無痛針を用いて採血を試みたが、静脈の位置が不明瞭のため、的確にそこへ導くことが困難であったという理由で、採血成功率はそれほど高いものではなかった。そこで血管の可視化機構の検討を行った。一般的に700から1000nm程度の波長域の近赤外光 (Near Infrared: NIR) は、その他の波長域の光と比較して、体を構成する水やヘモグロビン、また皮膚のメラニン等によって吸収されにくく、体内を透過しやすい<sup>3)</sup>。このような光を体内へと導き、体内で拡散、反射を繰り返しながら伝播して再度体外へと放射される時、その放射される部位表面直下の血管中の水やヘモグロビンにより光は吸収されて、それ以外の部分では比較的吸収されることなく体外へと放射されるために、この部分を CCD 等の撮像素子で観察すると血管部分からの光強度は弱いために血管は暗く浮かび上がる。図3 (a)には中心発光波長850nmのLEDから光を皮膚表面に対し斜めに入射したときの反射してくる光の像を CCD カメラで捉えたものである。光源の近傍に血管が暗く浮かび上がって



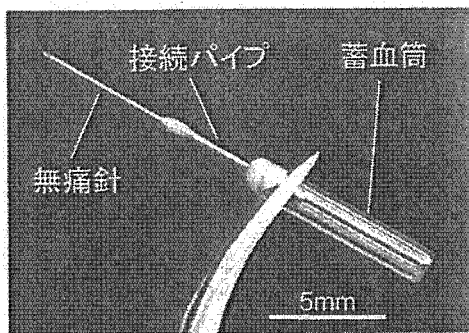
(a) 近赤外像

(b) 血管到達検知機構

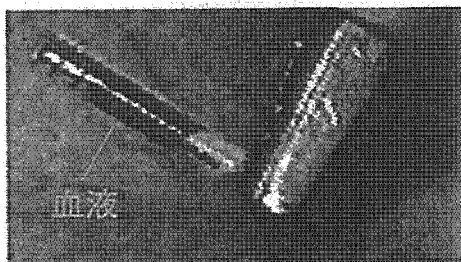
図3 血管可視化, 検知機構

いることが分かる。このような方法で血管の二次元的な位置は確認できるようになった。しかし、採血針をどの程度の深さまで導くかということは未だ明らかではない。血液を採取する際には必ず採血針を皮膚に穿刺し、これを血管まで導いていくことになるので、この採血針を積極的にプローブに用いるということを考えた。すなわち針はステンレスのような金属で構成されているので、これを体内へと侵入させていったとき、この電位は血管の内外での電解質イオン濃度や水分濃度に依存して変化し、これにより針先端が血管内に到達したかどうかを判断できると推察した。図3 (b)には針を静脈へと導いていったとき、血管の無いところに導いていったときの針の電位の変化を示している。血管の無いところに針を導いていっても針の電位はほとんど変化しないが、静脈へと導いていったときにはその電位があるところで大きく変化することが分かる。そしてこの変化が現れた直後に注射筒内を陰圧としてみたところ、血液が採取することができた。この結果から、このような電位の変化は針の先端が血管に到達したか否かを反映したものであり、これにより針をどの程度侵入すればよいのかが判断できるようになった。なお、このような針の侵入深さの判定は、針に微弱な交流電流を流したときの応答から得られるインピーダンスと位相の変化からも可能であることを確認している<sup>4)</sup>。

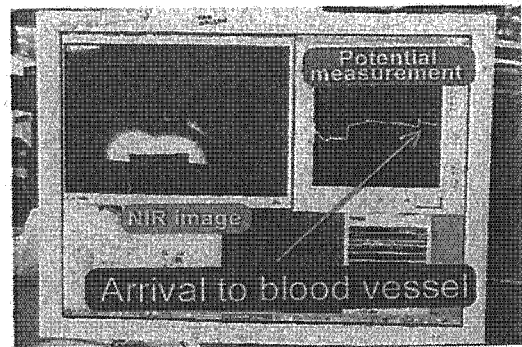
図4 (a)は無痛針を含む採血アセンブリの外観を示している。また同図(b)には上腕部の静脈より採血を行っている様子を示しているが、実際に採血を行っている間はコンピュータ画面上に表示される近赤外血管像と針の電位変化(同図(c))を観察しながら行っており、穿刺部を直接



(a)



(b)



(c)

図4 (a) 採血アセンブリ外観, (b) 採血の様子, (c) 液晶画面を見ながら NIR 像で静脈を探し (左図), 穿刺し, 皮膚表面と針との間の電圧を右図で検知する



見ることはほとんど無い。針の電位は穿刺時に上昇し、また血管到達時に再度上昇（図中の矢印）することから、血管に到達したことを検知することができる。そして針内壁研磨の効果は、針を血管に導いたときに血圧のみで血液を針に接続されている蓄血筒へと導けるということであり、これにより何らポンプを用いる必要は無い。この蓄血等を満たすと約6 $\mu$ Lの血液が採取できたことを意味し、後述のように採血アセンブリを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。

### 1.3 バイオセンサ

ヘルスケアチップの心臓部は電気化学式バイオセンサである。まず、センサ電極、参照電極として、図5に示すようにカーボン、銀/塩化銀電極、配線、パッドとして銀ペーストをポリエステル基板にスクリーン印刷法で形成した。センサ材の電極上の塗布に専用の自動デイスペンサーも開発した。電気化学的計測においては、基準電位を発生する参照電極は極めて重要である。参照電極には検体溶液、イオン種およびイオン強度にかかわらず常に一定の電位を出力することが求められる。同時に微量の血液を含む液体を扱う使い捨てチップの微小電極においては、①100秒以下の迅速応答、②1000秒以上の長寿命、③検体溶液を汚染しないなどの条件をも満足しなければならない。本チップとしてはイオンセンサのメンブレンとして用いているPVC（塩化ビニール）を用いて非液絡型参照電極を開発した。図6に示すように基板上に金属マスクを介してAg/Gr膜をスパッタ堆積し、その上にコートしたポリイミド膜に100 $\mu$ mの開口部を開け、その開口部のAgを溶液処理でAgCl化した。また、その上にSU-8レジストでリング状井戸を形成し、その中にPVA（ポリビニールアルコール）とKClを混ぜたものを塗布、乾燥し、さらにそ

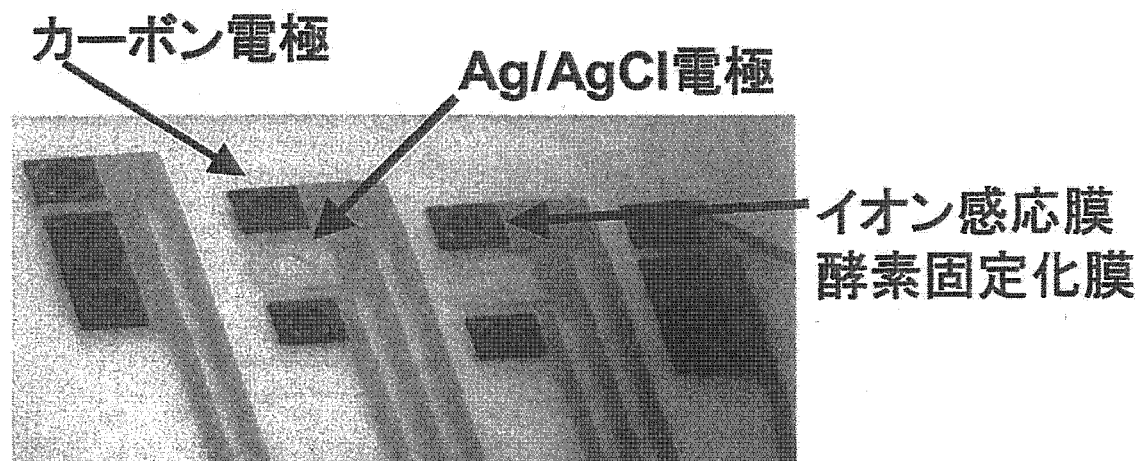


図5 電気化学測定用電極の写真

の上に THF (テトラヒドロフラン) で溶解した可塑剤含有の PVC を滴下して覆った。同図には、0.1M リン酸緩衝液 (PBS) 中で 3 種類の PVC 膜厚に対する出力電圧の時間変化を示す。いずれの電極でも、まず水が下層の Ag/AgCl 電極に浸透し、 $-42\text{mV vs. 標準カロメル電極 (SCE)}$  という飽和 KCl 溶液中での Ag/AgCl 電極の本来の出力電圧を出すまで時間を必要とし、その後

安定し一定時間後、KCl が PVC 膜を通してバルク液側へと流出していくと、KCl が希釈されるため電圧が上がるのが分かる。この結果から、迅速応答と長寿命を両立する PVC の最適膜厚を  $10\sim 20\mu\text{m}$  と決定した。

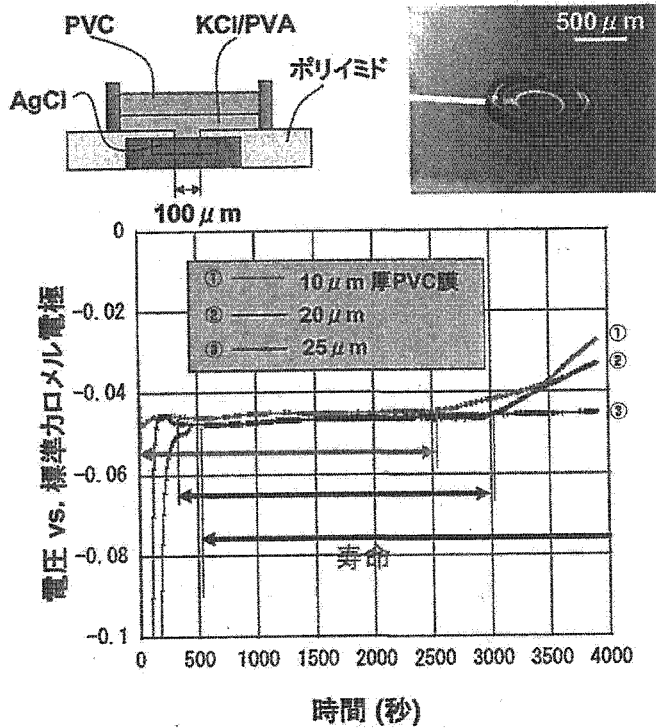


図6 開発した非液絡型 KCl 飽和参照電極の構造と 0.1M リン酸緩衝液中での応答の PVC の膜厚依存性

$\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  イオンセンサは、それぞれ Bis (12-crown-4) と Bis (benzo-15-crown-5) のイオン感応膜とアニオン排除剤と可塑剤を THF で溶解した PVC を電極上に固定化して形成した。図7は  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  のイオンセンサの種々の  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  イオン濃度の Tris-HCl 中での電位応答を示す。出力電位はほぼネルンスト応答 ( $59\text{mV/dec.}$ ) していることが分かる。

グルコースセンサは、当初グルコー

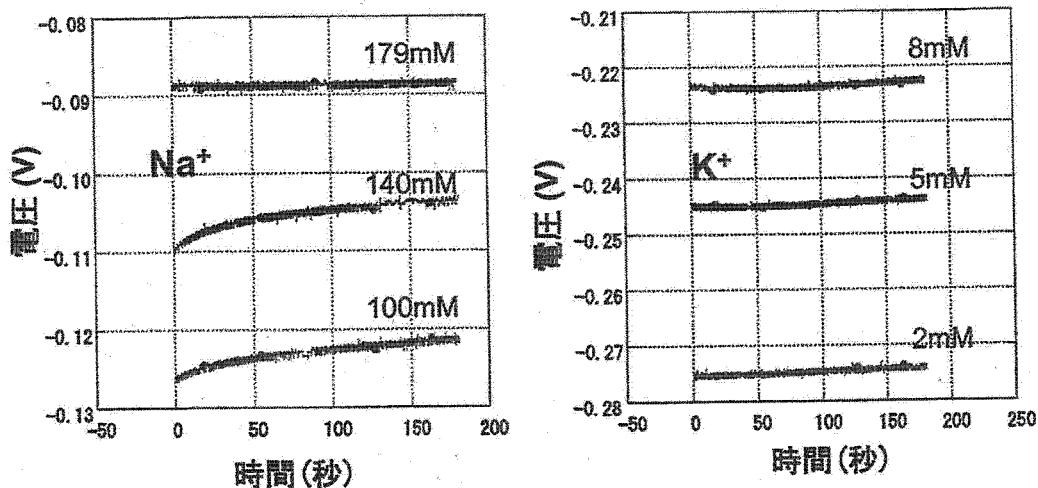


図7  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  イオンセンサの応答

スオキシダーゼ (GOD) を絶縁性ポリピロールとポリ-L-リシン膜のポリイオン複合体 (PIC) により, 同時にメディエータとしてフェロセンを含ませたものをカーボン電極上に固定化していたが, GOD 酵素と PIC 膜の固定化が弱いためフェロセン層が不均一になるという問題があった。そこで, VFc-co-HEMA 重合メディエータを使用してカーボン電極との固定化を改善し, 更に GOD の固定化のためグルタルアルデヒド (GA) を用いて化学的架橋を行った結果, 図 8 の GA 濃度が 3% の時に良好な特性を得ることができた。尿素態窒素 (BUN) センサも, 以前は尿素がウレアーゼによる酵素反応により  $H^+$  を消費することから, これを pH センサにより検出する方法を採用していたが, 血液は緩衝作用を有することから, 変化した pH 値が直ちに血液のそれに戻ってしまいうために安定に測定できなかつた。そこで酵素反応の結果生じるアンモニアをアンモニアセンサによって検出する方法に変えた。図 9 (a) には本 BUN センサの構造を示す。TD19C6 のイオノフォアを可塑剤とアニオン排除剤, 及び 0.1M  $NH_4Cl$  + 0.5% PVP を PVC 膜に取り込み, AgCl 電極上に固定化し, 更に BUN 検出のためウレアーゼとその上に固定化膜としてセルロースアセテートを塗布して形成した。同図 (b) は尿素検出の結果を示す。15mV/dec. ほどの感度であるが, 濃度に応じた電位応答をしている。クレアチニンセンサもクレアチニンアミデオヒドロラーゼ酵素反応を経由して尿素を生成してアンモニア検出をすることで測定することを試みているが, まだ 0.1mM 以下の検出には不安定性が残っている。

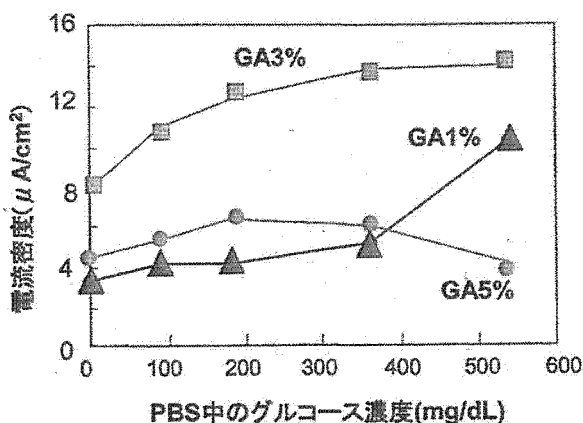
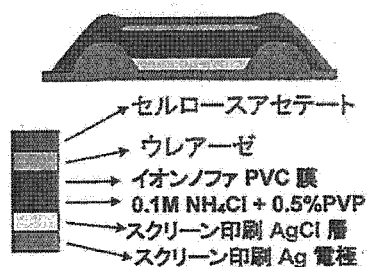
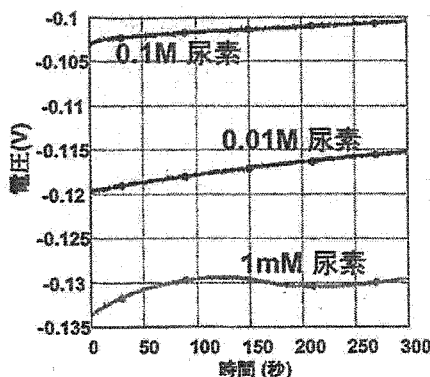


図 8 グルタルアルデヒド濃度をパラメータとしたときの電流の PBS 中グルコース濃度依存性



(a)



(b)

図 9 尿素態窒素 (BUN) センサ, (a) はその構造, (b) は特性

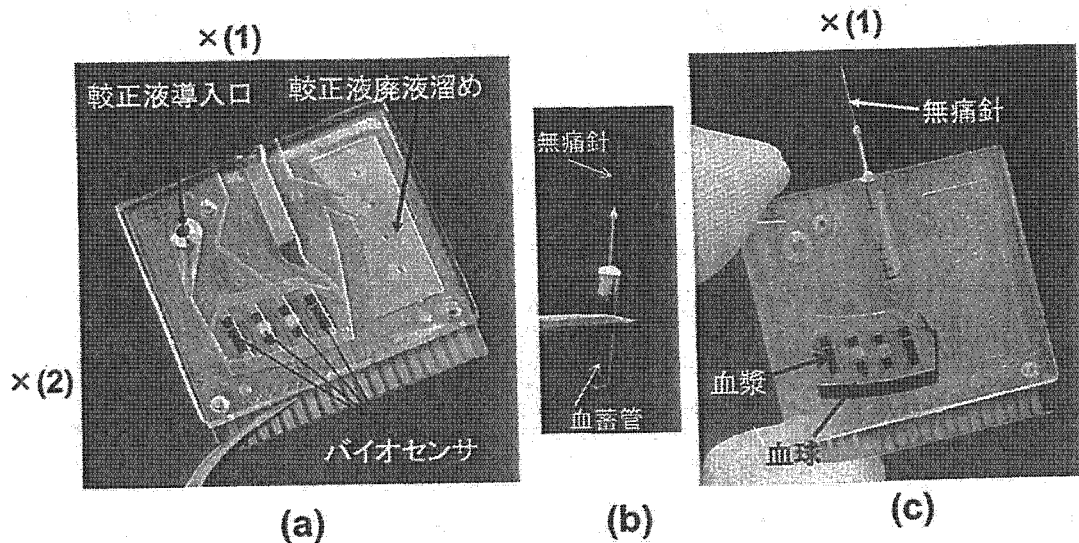


図10 ヘルスケアチップの構造 (a) に (b) の採血済み採血アセンブリを挿入して、遠心分離後 (c) に示すように血漿と血球が分離される

#### 1.4 チップ構造

図10(a)に示すヘルスケアチップは、射出成型で形成したポリカーボネート製の流路用基板と、ポリエステル基板上にセンサ電極をスクリーン印刷法で形成したものを貼り合わせて作製した。2000年に始めて開発したチップでは、無痛針を介して採血し、U字型流路に全血を導入する際、流路の末端に設けた石英製の EOF (電気浸透流) ポンプを用い、U字型流路の後に設けた IS-FET (イオン感応電界効果型トランジスタ) と参照電極によって  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  を始めて測定した<sup>2)</sup>。しかし、遠心分離抽出した血漿は U 字流路の片側しか使えず、また本チップは使い捨てであるため高価な ISFET と石英の使用は不可であるという問題があった。その後、U 字流路下部に血球溜め構造を設けることで抽出した血漿すべてを活用し、チップ外よりポンピングするオールポリマー製のチップを試作したが、センサ部の分岐流路で校正液や血漿が均等に流れない場合があるという問題を克服できず、結局、すべての液体の輸送をチップ回転の際に生じる遠心力で行う図10(a)の形に落ち着いた。当初、針を付けていたが滅菌時にバイオセンサを損ねることが危惧され、図10(b)に示す採血アセンブリで一旦採血後、それを図10(c)に示すようにチップに挿入後、チップへの血液の輸送と遠心分離を行った。遠心分離後にセンサ上は血漿成分のみに接触するように流路が設計されている。

#### 1.5 ヘルスケアチップ計測の動作

電気化学バイオセンサで計測するには、まず校正操作が必要である。前述のようにチップ流路内の液体の輸送には遠心力を利用している。図11は、流路の最適設計のために回転中の液体移動の様子をストロボ観察したものである。(a)の校正液の移送と排出では、(i)校正液導入口から

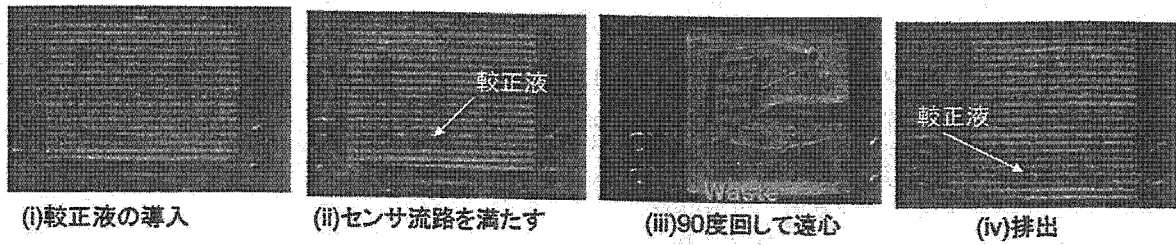


図11 (a) 較正液の導入と排出

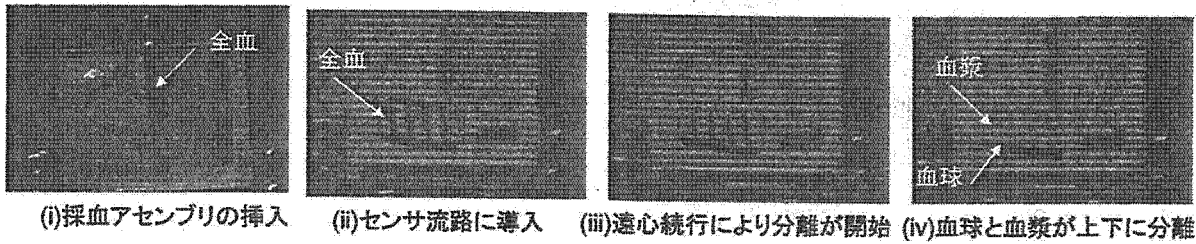


図11 (b) 血液導入と血球血漿分離

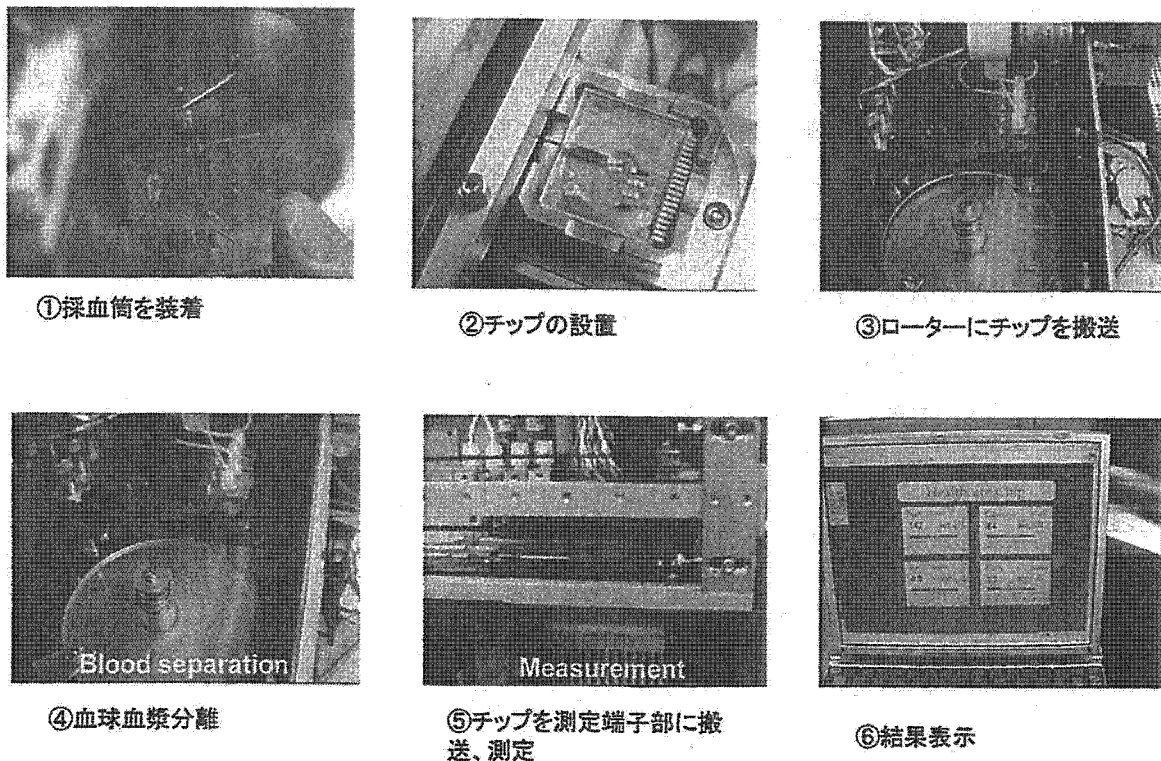


図12 試作計測器によるマーカ測定プロセス



較正液を導入し、(ii) 図10(a)の×(1)を中心として遠心力によってセンサ領域に移送して満たし、センサ較正後、(iii)チップを90度半時計回りに回転し、(iv)×(2)を中心として遠心力によって排液溜めに排出する。(b)の血球分離では、(i)採血アセンブリを導入し、(ii)図10(a)の×(1)を中心として遠心力によって全血がセンサ領域を満たした後、(iii)さらに回転をし続けると、(iv)血球のみが下方に分離して行き、最終的には血漿がセンサ領域のみに残る。

次に、図12で試作した計測器によって較正後のチップで測定した例を示す。まず①採血アセンブリをチップに装着し、②チップを計測装置に設置し、③遠心分離用回転器にチップを搬送し、④血球・血漿分離を行い、⑤チップを測定用端子部に搬送し、⑥測定結果が画面に表示される。ここでは、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、BUN、グルコースの4項目が表示されている。

## 1.6 おわりに

極微量の血液を無痛針を介して静脈より採取して、それを複数のバイオセンサを搭載するヘルスケアチップに導き、遠心分離により抽出した血漿中の健康マーカーを測定した。このような診断チップを家庭に持ち込むためには、チップ本体はもちろんの事、個人差に関わらず無痛で確実に採血できるシステム、微量血液から正確に健康・疾病マーカーの測定、安価・小型・安全・簡単操作の測定器などが要求される。今後、診断チップの検査項目は現状にコレステロール、中性脂肪なども加え20項目程度は測定できるようにする。更に、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行っている。種々のバイオチップによって診断機関と直結して在宅診断が実現すると、医療、更には社会システムを大きく変革すると期待される。その基盤が確立されると、幼少の頃からのデータの蓄積によって、各人の成長に応じた食事や社会環境等に起因する病気への予防体制が確立され、少子化問題の解決にも寄与する。更には、発展途上諸国の疾病診断・予防に我が国が大きく貢献できる。この実現には、多くの電子部品・システムが開発されねばならず、バイオとエレクトロニクスが融合する新学問、新技術、新産業が創出される。

## 文 献

- 1) "Lab-on-a-Chip Minaturized System for (Bio)Chemical Analysis and Synthesis", Eds. R. Edwin Oosterbroek and Albert van den Berg Elsevier B.V. The Netherland (2003)
- 2) A.Oki, M.Takai, H.Ogawa, Y.Takamura, T.Fukasawa, J.Kikuchi, Y.Ito, T.Ichiki and Y.Horiike,