

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(平成20年度～平成24年度)

生体医工学研究センター (BERC) 研究成果報告書

平成25年3月

工学院大学総合研究所

# 目 次

## B E R C (Biomedical Engineering Research Center)

スマート機械システム創成技術に基づいた生体医工学研究拠点の形成

.....センター長 大竹 浩靖.....	1
基礎生体医工学プロジェクト.....プロジェクト長 小野 幸子.....	5
1.1.幹細胞等バイオメカニクス..... 大家 溪.....	7
1.1.1 幹細胞をベースとした生体組織再生用材料の創成..... 大家 溪, 藤江裕道.....	9
1.1.2 マイクロ流体デバイスを用いた流体による刺激と細胞の応答に関する研究..... 橋本成広.....	11
1.2.バイオマテリアル・デバイス..... 阿相英孝, 何 建梅.....	13
1.2.1 マイクロ・ナノ規則性構造材料創製技術の開発とマイクロバイオシステムへの 応用に関する研究..... 小野幸子, 阿相英孝.....	15
1.2.2 超音速フリージェット PVD によるハイドロキシアパタイト膜の開発に関する研究 ..... 湯本敦史.....	17
1.2.3 メッシュ構造の適用によるチタン金属製インプラント人工骨の高性能化検討..... 何 建梅.....	19
1.3.医用エネルギー工学..... 大竹浩靖.....	21
1.3.1 マイクロスケール下の熱流体挙動、医用エネルギー機器およびマイクロエネルギー機器の 開発に関する研究..... 大竹浩靖.....	23
1.3.2 体内埋込用ポンプ開発のための基礎的研究..... 佐藤光太郎.....	25
1.3.3 微生物による水素ガス生産..... 小野寺一清.....	27
1.3.4 酵素反応マイクロリアクターの反応成績..... 長本英俊.....	29
1.4.バイオミメティクス・ロボティクス..... 鈴木健司, 金野祥久.....	31
1.4.1 昆虫の機能に基づくマイクロ機械とそのロボット化に関する研究 ..... 鈴木健司, 高信英明, 三浦宏文.....	33
1.4.2 生物の水中運動メカニズムの解明とそのスマート機械による模倣 ..... 水野明哲, 伊藤慎一郎, 金野祥久.....	35
1.5.マイクロ構造の評価・加工技術..... 立野昌義, 西谷要介.....	37
1.5.1 バイオマイクロ構造体における強度特性評価システムの開発と力学的特性評価 ..... 立野昌義, 後藤芳樹.....	39
1.5.2 マイクロスケール機構の製作と評価に関する研究..... 鈴木健司, 小林光男.....	41
1.5.3 マイクロポーラス金属の材料特性評価..... 塩見誠規.....	43
1.5.4 光造形による3次元マイクロ部品の成形加工と医用工学への応用に関する研究 ..... 西谷要介, 武沢英樹.....	45
応用生体医工学プロジェクト.....プロジェクト長 藤江 裕道.....	49
2.1.幹細胞を用いた組織再生工学..... 藤江裕道.....	51
2.1.1 幹細胞を用いた軟骨再生..... 藤江裕道.....	53
2.1.2 幹細胞を用いた靭帯、腱の再生..... 木村雄二, 藤江裕道.....	55
2.2.マイクロバイオデバイスの開発..... 疋田光孝.....	57
2.2.1 Ni-Ti 形状記憶合金のバイオデバイスへの適用..... 木村雄二.....	59
2.2.3 バイオメトリクス環境センサの研究..... 疋田光孝.....	61
2.3.医療支援ロボットの開発..... 高信英明.....	63
2.3.1 歯科患者ロボット..... 高信英明.....	65
2.3.2 6軸ロボットシステムを用いた関節再建術の評価..... 藤江裕道.....	67
2.3.3 生体信号処理に基づく医療装置の開発と応用..... 中荃 隆.....	69



## スマート機械システム創成技術に基づいた生体医工学研究拠点の形成

### Establishment of the Biomedical Engineering Research Center (BERC) on the basis of the Technologies Derived from the Smart Machine and Bio-System Research Center (SMBC)

センター長：大竹 浩靖（工学院大学工学部機械工学科教授）

高齢化が進む我が国において、医療・福祉に関する研究の重要性は益々高まるばかりである。なかでも整形外科や循環器外科などの外科領域は、生活の質（QOL）に直接かかわる分野であり、その重要性が非常に高い。これらの外科領域では、身体運動の機械力学、関節軟骨のトライボロジー、血液等循環の熱流体力学、生体組織特性解析のための材料力学、生体材料開発のための材料科学、生体計測のための計測学など、機械工学、材料科学を基礎とした研究手法が問題解決の道筋を与えてくれる。

一方、我々は、2003-2007年度にハイテクリサーチセンター事業として採択・実施された「スマート機械・バイオシステム(SMBC)」の研究において、マイクロ加工技術等に関する多くの成果をあげた。その中には細胞培養技術、生体模倣、生体材料開発などの研究も含まれていた。そこで機械工学、材料科学に加えて、SMBCでの技術的蓄積を基盤として、生体医工学領域における特色ある研究を展開できると考えた。

上記の研究スキームは、いわば工学の医学への応用展開である。しかし、それだけでは工学側の基盤技術に限りが生じるため、事業の継続的・効果的発展が望めない。ネタ切れになってしまう。逆に、永い年月をかけて獲得された生体の機能や構造等の優れた特徴を学び取り、それを工学に应用すること（生体模倣）で、新たな工学分野を開拓することが可能となる。SMBCでは生体規範のロボットやスマート機械等の開発を行っており、その基盤技術を我々はすでに獲得している。それらを新事業に取り入れれば、「工学の医学への応用」という車輪だけでなく「医学の工学への応用」の車輪が回転し、両輪駆動により、ブレークスルーも期待できる新たな研究事業を展開することができる。

そのような考えの下に、2008年度、本研究事業をスタートさせた。SMBCで得られた技術体系を基本にして、基礎生体医工学研究プロジェクトと応用生体医工学プロジェクトを展開する。両プロジェクトには中テーマが5つ、および3つ含まれている。応用プロジェクトは医療研究機関や医療系企業と密接な結びつきを有しており、研究成果が実質的な医療に有効利用される点が特徴である。

これまでの研究期間5年の間に、多くの成果が上げられた。特に応用生体医工学プロジェクトのすべての中テーマと、基礎生体医工学プロジェクトのなかの「1.1 幹細胞等のバイオメカニクス」と「1.2 バイオマテリアル・デバイス」の中テーマでは学外の医学系研究機関との共同研究がスタートし、関連病院の手術術式や臨床処置を改善するなど、臨床医学のレベル向上・改善に結果を残している。また、臨床応用の実現と並行して医療系企業との共同研究も

進め、医療系産業における製品開発や試験法開発なども着手した。

研究報告会などを通して、中テーマ間の連携も活発に行っている。数例にすぎないが、2.1「幹細胞等を用いた組織再生工学」では、1.5「マイクロ構造の評価・加工技術」の成果を取り入れて、マイクロパターン加工を施した培養皿上で幹細胞を培養し、異方形構造を有する組織の生成に成功している。また、1.3のマイクロチャンネル・ポンプおよび2.2のバイオトリクスセンサの作製には、前出1.5のマイクロ加工技術を用いている。

一昨2010年度は、中間成果報告として、2010年9月25日に『進捗状況報告書』を文部科学省に提出した。この報告書による『中間評価の結果』が平成23年2月10日付で通知され、進捗が見られるとの評価を頂いた。ただし、改善すべき点も指摘された。

この改善すべき点は2009年度実施した独自の外部評価でも指摘されておき、2010年度は、この外部評価委員の評価結果を反映し『10の小テーマを重点テーマ』と選定し、2010年度の研究費の配分にメリハリをつけ、次ステップへと踏み出した。昨2011年度は、さらに前出の改善すべき点を強力に推進すべく、2010年度の外部評価委員の評価結果を反映し、『重点テーマの再検討』を行った。また、研究費の配分にも、2010年度以上のメリハリをつけた。本2012年度も、外部評価委員の評価結果を反映し重点テーマの再検討を行い（結果、重点テーマの変更はなし）、研究費の配分にメリハリをつけ、現在に至っている。

2012年度も2008、'09、'10および'11年度同様、多くの成果が得られました。本報告書にて報告致します。

なお、特に優れた成果があがった点を、下記に加筆します。「2.1 幹細胞を用いた組織再生工学」より、幹細胞ベース滑膜由来自己生成組織（scSAT）を用いた組織再生工学の成果は、Biomaterials (Impact factor; 7.4, 2011)で2編掲載され、eCells and Material Journal (Impact factor; 9.7, 2011)で1編、掲載可となった。Journal of Biomechanical Science & Engineeringに掲載された論文が『年間最優秀論文』に選出されるなど、組織再生工学の研究領域において、世界的な評価を得るに至っている。また、「1.4 バイオミメティクス・ロボティクス」より、「表面張力を利用した水面移動ロボットの研究」は、『2010年度日本機械学会賞（論文）』を受賞した。国内のみならず国外での評価も高い。

最後に、5年間、ご支援を頂きまして、誠にありがとうございました。Post-BERCも計画しております。今後とも、ご支援の程、よろしくお願い申し上げます。



# 基礎生体医工学プロジェクト



## 基礎生体医工学プロジェクト

### Basic Project of the Biomedical Engineering Research Center (BERC)

プロジェクト長：小野 幸子（工学院大学応用化学科教授）

本プロジェクトでは、医療デバイスや医療支援ロボットの技術を支える基礎工学体系を構築し、この工学体系を研究・教育する新たな研究拠点を形成することを目的としている。具体的には、2003～2007年度にハイテクリサーチセンター事業として採択された「マイクロ先進スマート機械・マイクロバイオシステム実現へ向けてのテクノロジー開発」によって得られた多くの成果・知見に基づき、それらを集約した中テーマ 1.5 と、それらを基盤とした基礎的な中テーマ.1,1, 1.2, 1.3, 1.4 を展開する。得られた成果は応用生体医工学プロジェクトに応用される。

プロジェクトを構成する中テーマおよび中テーマ内の小テーマと担当者は以下のとおりである。

2012年度は最終年度でもあり、各グループとも研究成果が多く発表され、著書や特許申請と共に論文発表業績が充実した。また、充実した設備・装置の活用が一層進展して、メンバー相互の連携研究が進み、論文投稿に結実する例も増えた。応用研究プロジェクトへの成果提供も進展している。

#### 基礎生体医工学研究プロジェクト

##### 1.1. 幹細胞等バイオメカニクス

- 1.1.1. 幹細胞をベースにした生体組織再生用材料の創成  
大家 溪，藤江裕道，中村憲正（阪大医），  
中田 研（阪大医）
- 1.1.2. マイクロ流体デバイスを用いた流体による刺激と細胞の応答に関する研究  
橋本成広

##### 1.2. バイオマテリアル・デバイス

- 1.2.1. マイクロ・ナノ規則性構造材料創製技術の開発とマイクロバイオシステムへの応用に関する研究  
小野幸子，阿相英孝，Anawati
- 1.2.2. 超音速フリージェット PVD によるハイドロキシapatite膜の開発に関する研究  
湯本敦史（芝浦工大）
- 1.2.3. 金属光造形複合加工法による焼結チタン合金インプラント人工骨の創製  
何 建梅

##### 1.3. 医用エネルギー工学

- 1.3.1. マイクロスケール下の熱流体挙動，医用エネルギー機器およびマイクロエネルギー機器の開発に関する研究

- 大竹浩靖，小泉安郎（信大），田中 学（千葉大），木倉宏成（東工大）
- 1.3.2. 体内埋込用ポンプ開発のための基礎的研究  
佐藤光太郎，横田和彦（青山学院大）
- 1.3.3. 微生物による水素ガス生産  
小野寺一清，志澤泰彦（日大）
- 1.3.4. 酵素反応マイクロリアクタの反応成績  
長本英俊，大島榮次（東工大）

##### 1.4. バイオミメティクス・ロボティクス

- 1.4.1. 昆虫の機能に基づくマイクロ機械とそのロボット化に関する研究  
鈴木健司，高信英明，三浦宏文
- 1.4.2. 生物の水中運動メカニズムの解明とそのスマート機械による模倣  
水野明哲，伊藤慎一郎，金野祥久，飯田明由（豊橋技科大）

##### 1.5. マイクロ構造の評価・加工技術

- 1.5.1. バイオマイクロ構造体における強度特性評価システムの開発と力学的特性評価  
立野昌義，後藤芳樹
- 1.5.2. マイクロスケール機構の製作と評価に関する研究  
鈴木健司，小林光男，福田勝己（東京工専）
- 1.5.3. マイクロポーラス金属の材料特性評価  
塩見誠規
- 1.5.4. 光造形による3次元マイクロ部品の成形加工と医用工学への応用に関する研究  
西谷要介，武沢英樹





## 1.1. 幹細胞等バイオメカニクス

### Stem Cell Biomechanics

#### 1.1.1. 幹細胞をベースとした生体組織再生用材料の創成

大家 溪, 藤江 裕道, 中村 憲正 (阪大医学部), 中田 研 (阪大医学部)

#### 1.1.2. マイクロ流体デバイスを用いた流体による刺激と細胞の応答に関する研究

橋本 成広

関節軟骨や、靭帯、腱などの線維性組織を治療するため、さまざまな方法について研究が行われている。その中で近年最も注目されているのが、幹細胞を用いた再生医療手法である。幹細胞は分化能と増殖能を併せ持つ細胞であり、その高い分化能により治療対象組織の細胞を創り出し、かつ高い増殖能でその効果を長く保つことが可能である。幹細胞の能力を最大限活用することで、さまざまな生体組織の再生、修復を高効率で達成できると考えられ、多くの研究者がしのぎを削って研究を行っている。幹細胞研究では、受精卵から得られる胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) が 1981 年にマウスから、1988 年にヒトから樹立されて以来、活発に研究が進められてきた。ES 細胞は成体を構成するあらゆる細胞に分化できる能力 (全能性; totipotency) を有しており、万能細胞とも呼ばれている。しかしながら、ES 細胞は受精卵を破壊して作られることに対する倫理問題や、免疫拒絶反応などの技術的問題を拭い去ることができていない。最近では、2006 年に京都大学の山中教授らが樹立した人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) が大きな注目を集めている。iPS 細胞は、成体から得た細胞に 4 つの遺伝子 (現在では 3 つでよいことがわかっている) を導入して作製された細胞であり、ES 細胞とほぼ同等の分化能を有していると考えられている。iPS 細胞は ES 細胞が抱える倫理問題を解決していることから、新たな幹細胞として期待されている。しかし、iPS 細胞は ES 細胞と比較してガン化のリスクが高く、分化能の範囲が不明であるなど、今後、解決していかなければならない問題も山積している。さらに最近では、遺伝子操作により iPS 細胞が免疫拒絶反応を引き起こす可能性も報告されている。一方、成体のさまざまな組織中にも造血幹細胞や間葉系幹細胞など、多種多様な幹細胞が存在することがわかっている。これらの幹細胞を総じて体性幹細胞 (adult stem cell) といい、これらは ES 細胞や iPS 細胞ほどの全能性は有していないものの、多分化能 (多能性; multipotency) を有することがわかっている。体性幹細胞は、患者本人から得ることができ、遺伝子操作が不要であるため、ES 細胞や iPS 細胞が抱える問題は解決でき、実用化の面では最も研究が進んでいる。しかし、すべての幹細胞に共通する問題として、幹細胞はそれのみではある程度の組織を作製できないという技術的問題に直面している。そのため、細胞を適当な足場材 (スキャフォールド) に播種して培養し、患部に置換して治療するのが一般的方法となっている。

小テーマ 1.1.1 では、我々が腱や靭帯の再生医療用材料として開発した、体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞が細胞外基質を自己生成して作製される scSAT

(stem-cell-based self-assembled tissue) に着目している。scSAT は、関節滑膜から採取した間葉系幹細胞を 4~6 回程度の継代培養によって幹細胞密度を高めた後、アスコルビン酸により線維生成を促進させ、自然収縮により肥厚させた組織である。scSAT は患者の自己細胞を用いて作製できることから、免疫拒絶反応の懸念もなく、組織修復に最適な材料であるが、腱や靭帯にかかる荷重に耐えるには強度が不足しているため、高強度化が要求されている。この解決には、培養基板への細胞の接着性を向上して基質生成を促進させることが有効となる。また、scSAT の組織配向は等方的であるが、腱や靭帯は構造異方性を持つ組織であり、それによって一方向への強度を増していることから、scSAT に異方性を付与することでも高強度化を図れると期待できる。これまでに、チタン表面上にフェムト秒レーザーを用いてナノ周期構造を形成し、その上で間葉系幹細胞を培養することにより、細胞の接着性を向上し、配向性を付与できることを明らかにしている。一方、フェムト秒レーザーの加工条件を変化させると、チタン表面に形成されるナノ周期構造がどのように変化するのかが明らかになっていないため、本年度は、フェムト秒レーザーの加工条件を変化させるとチタン表面に形成されるナノ周期構造がどのように変化するのかを調査し、形成された表面形状の違いが細胞接着特性に及ぼす影響を調べた。その結果、フェムト秒レーザーによる加工時にレーザーの操作速度を速めると、ピッチが広く、深さが浅く、粗さが小さいナノ周期構造が形成されることが示され、その上で培養された間葉系幹細胞は接着や伸展が促進され、配向性も高くなることが示された。

小テーマ 1.1.2 では、動脈硬化や血栓、閉塞などに関与している血液の流体力学因子を明らかにするために、マイクロ加工技術を用いた微小循環モデル内において、細胞に力学的な刺激を加える *in vitro* 実験システムを開発すること、力学的な刺激に対する細胞の応答について実験的に調べることを目的としている。ポリジメチルシロキサン平板に挟まれたシリコンゴムプレートに菱形の孔を空けて流路を構成し、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞、マウス筋芽細胞、マウス繊維芽細胞、ラット肋軟骨細胞、ラット骨格筋細胞、ラット大動脈平滑筋細胞を用いて平行平板間流路試験を行った結果、細胞の延伸、移動、剥離が観察された。さらに、継続的に流れ刺激を加えながら細胞の挙動を調査するために、培養皿底面に密着させたシリコンゴム円板の周囲にドーナツ型の流路を構成し、この培養皿をシェーカーの上に載せて、シェーカーの動作によって、培養液が連続的に時計回りに流れるようにした。その結果、流れ刺激が細胞の分化・配向に影響を与えること、その効果は細胞種によって異なることを実験的に明らかにした。



# 1.1.1. 幹細胞をベースとした生体組織再生用材料の創成 Development of stem cell-based tissue-engineered constructs for regenerative medicine

大家 溪, 藤江 裕道, 中村 憲正 (阪大医学部), 中田 研 (阪大医学部)  
Kei OYA, Hiromichi FUJIE

Norimasa NAKAMURA, Ken NAKATA (Osaka University Medical School)

**Keywords :** Stem cell-based self-assembled tissue (scSAT), Tissue engineering, Tensile property

## 1. 緒言

ヒト膝滑膜由来間葉系幹細胞 (MSCs) に細胞外基質を自己生成させて作製される細胞シート (Stem cell-based self-assembled tissue : scSAT) が腱や靭帯の新たな再生医療材料として期待されている<sup>1)</sup>。しかしながら、現状の scSAT は臨床応用のためには力学強度が不足している。この問題を解決するためには、scSAT の細胞外基質の生成を促進し、組織を高強度化することと、組織に異方性を付与して一方向に対する強度を向上させることが有効である。この2つを同時に実現する方法の一つとして、ナノ・マイクロレベルの溝構造をもつ培養基板上で scSAT を生成する方法が挙げられる。一般に粗い培養表面は細胞の接着性を向上させるため、細胞外基質の生成促進が期待でき、溝構造が細胞の配向を制御できる。これまでに、我々はフェムト秒レーザーによりチタン表面に形成したナノ周期構造上で MSCs を培養することにより、細胞の接着特性が向上し、配向も制御できることを明らかにしている<sup>2)</sup>。一方、フェムト秒レーザーの加工条件を変化させると、チタン表面に形成されるナノ周期構造がどのように変化するのは明らかになっていない。そこで本研究では、フェムト秒レーザーの加工条件を変化させることでチタン表面に形成されるナノ周期構造がどのように変化するのかを調査し、形成された表面形状の違いが MSCs の細胞接着特性に及ぼす影響を調べた。

※本研究は工学院大学「ヒトを対象とする研究倫理審査」の承認を受けている。

## 2. 材料および実験方法

### 2-1. ナノ周期構造の形成

基本波長 780 nm のフェムト秒レーザー装置 (IFRIT, サイバレーザ) を用いて、研磨紙 320, 600, 800, 1000 番まで湿式研磨を施した直径 8 mm, 厚さ約 2.0 mm の JIS2 種の工業用純チタンを試料とした。パルス時間幅 190 fs, レーザフルエンス 0.5 J/cm<sup>2</sup> とし、走査速度を 50 mm/min, 300 mm/min, 600 mm/min, 1200 mm/min に変化させてナノ周期構造をチタン表面に形成した。以下、走査速度 50 mm/min, 300 mm/min, 600 mm/min, 1200 mm/min の条件で作製した試料を、それぞれ N50, N300, N600, N1200 と表記する。各試料表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、得られた SEM 画像から画像解析ソフト (ImageJ) を用いてナノ周期構造のピッチを測定した。さらに、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて表面形状を観察し、溝の深さと表面粗さを測定した。なお、溝のピッチは隣り合う山の頂点間の距離と定義した。

### 2-2. 細胞接着性の評価

ヒト膝滑膜由来 MSCs を、作製したナノ周期構造をもつ各チタン表面上に初期細胞密度 3.0×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> で播種した。播種後 1, 6, 24 時間後の細胞接着の様子を SEM を用いて観察した。得られた SEM 像を用いて ImageJ により細胞の接着面積を測定した。また、一細胞の輪郭を楕円近似し、長軸と短軸の比 (アスペクト比) を計測した<sup>3)</sup>。さらに、播種 24

時間後の各細胞の SEM 像から、細胞の形状を近似した長軸とナノ周期構造の溝の方向がなす角度 (配向角度) を計測した。

## 3. 結果

### 3-1. ナノ周期構造表面の形状

形成したナノ周期構造のピッチ, 深さ, 粗さ (R<sub>a</sub>) を Table1 に示す。走査速度の増加に伴い、ピッチが広くなり、溝が浅く、粗さの小さい表面が形成される傾向が示された。N50 は最もピッチが狭く、溝が深く、粗い表面だった。N300 と N600 は、ピッチと粗さに有意差はなかったが、N300 の方が N600 と比較して有意に深い溝を有していた。N1200 はピッチが他の試料と比較して有意に広く、さらに、溝が有意に浅く、滑らかな表面だった。

Table1 各走査速度で形成されたナノ周期構造の形状

	走査速度 [mm/min]	ピッチ [nm] (n=60)	深さ [nm] (n=20)	R <sub>a</sub> [nm] (n=15)
N50	50	331 ± 51	126 ± 46	43 ± 9
N300	300	498 ± 75	92 ± 37	40 ± 6
N600	600	506 ± 49	75 ± 35	32 ± 4
N1200	1200	540 ± 54	55 ± 23	27 ± 4

### 3-2. 細胞接着性試験結果

培養 6 時間後の各試料上の MSCs の接着の様子を Fig.1 に示す。また、各培養時間における MSCs の接着面積測定結果を Fig.3 に示す。さらに、各培養時間における MSCs のアスペクト比測定結果を Fig.4 に示す。Fig.1 より、走査速度が速い試料上の MSCs ほど大きく伸展している様子が観察された。この傾向は Fig.2 の接着面積測定結果からも伺える。一般に MSCs は接着前は球形で、接着後は等方的に伸展し、最

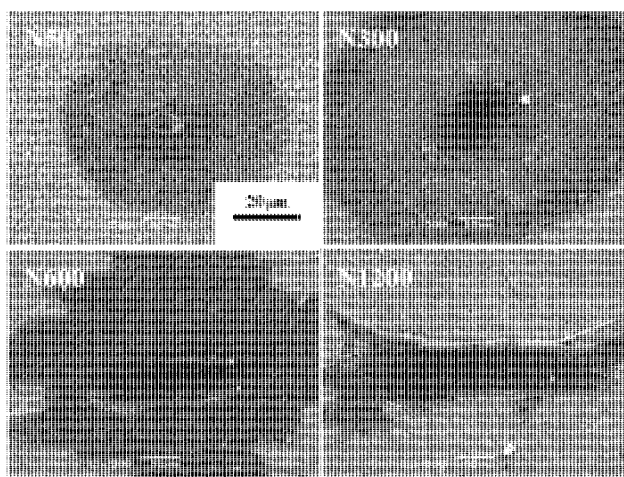


Fig.1 培養 6 時間の各試料上の MSCs の接着の様子

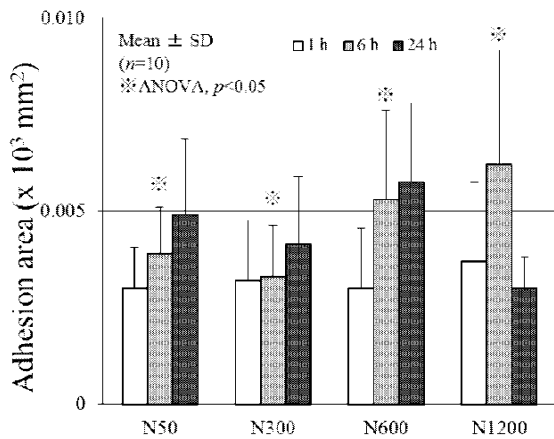


Fig.2 各試料上の MSCs の接着面積

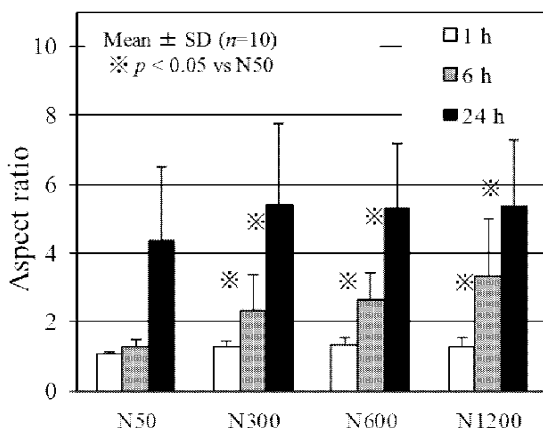


Fig.3 各試料上の MSCs のアスペクト比

後は紡錘型となる。Fig.1 より、N600 および N1200 上の MSCs は培養 6 時間において既に紡錘型をとり始めている様子が観察できた。また、Fig.3 より、播種 1 時間後および 6 時間後において、N50 上の MSCs のアスペクト比は他の試料上の細胞と比較して有意に低い値を示した。

### 3-3. 異方性解析結果

播種 24 時間後における各試料上の MSCs の配向角度を Fig.4 に示す。すべての MSCs が等方的に分布した場合の割合は、点線で示される約 11%となる。すべての試料において、多くの MSCs が -30°から 30°の間に分布していることがわかった。特に、N1200 では 70%以上の細胞が分布していた。

### 4. 考察

チタン表面へのナノ周期構造形成において、レーザーの走査速度の増加とともにピッチが拡大し、溝深さが浅くなり、粗さが減少した。したがって、フェムト秒レーザー加工におけるナノ周期構造表面の形成には、レーザーフルエンスの他に走査速度も加工表面形態に影響をおよぼす因子であることが示された。

上述のとおり、MSCs は基板に接着する前は球状であり、接着後、最初は等方的に伸展し、最終的に紡錘型になる。各試料上の MSCs のアスペクト比から、播種 1, 6 時間後の N300, N600, N1200 の細胞は、N50 の細胞と比較してアスペクト比が有意に高かった。したがって、N300, N600, N1200 は N50 と比較して細胞の伸展を促進する表面であると考えられる。一方、配向角度測定結果より、ナノ周期構造をもつすべてのチタン試料は細胞の配向を制御できることが示された。特に、N1200 は他の試料と比較して細胞配向度を最も高められる表面であることがわかった。N1200 は他の試料と比較して有意にピッチが広く、深さが浅く、さらに粗さが小さい表面で

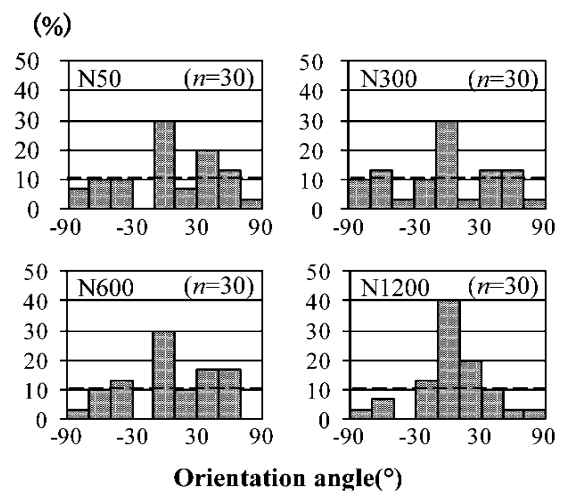


Fig.4 各配向角度に分布する各試料上の MSCs の割合

あり、これらのパラメータが細胞配向に影響をおよぼしたと考えられる。

### 5. まとめ

本実験では、フェムト秒レーザーの走査速度を変化させてチタン表面にピッチ、深さ、粗さの異なるナノ周期構造を形成した。形成した各ナノ周期構造上で MSCs を培養し、その接着特性を評価した。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) フェムト秒レーザーの走査速度の増加とともに、表面に形成されるナノ周期構造のピッチが拡大し、溝は浅くなり、粗さが小さくなる。
- 2) ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の伸展と配向は、培養表面のナノ周期構造の影響を受け、ピッチが広く、溝が浅く、粗さが小さいときに大きく伸展し、強く配向する。

### 参考文献

- 1) W. Ando, H. Fujie, et al, *Biomaterials* **28**, 2007.
- 2) K. Oya, et al, *Jpn J Appl Phys* **51**, 125203 (2012)
- 3) S. Fujita, et al, *Biomaterials* **29**, 4494-4500 (2008)

### 論文投稿

- 1) K. Oya, S. Aoki, N. Nakamura, H. Fujie, et al, Morphological observations of mesenchymal stem cell adhesion to a nanoporous-structured titanium surface patterned using femtosecond laser processing, *Jpn J Appl Phys* **51**, 2012

### 研究発表等

- 1) S. Aoki, K. Oya, N. Nakamura, H. Fujie, et al, Effect of nano-periodic structures on the properties of stem cell-based self-assembled tissue (scSAT), 9th World Biomaterials Congress, 2012
- 2) K. Oya, N. Nakamura, H. Fujie, et al, Effect of cell freezing preservation on the biological and mechanical properties of a stem cell-based self-assembled tissue (scSAT), 9th World Biomaterials Congress, 2012
- 3) 青木, 大家, 中村, 藤江, 他, フェムト秒レーザーにより形成したナノ周期構造表面上での滑膜由来幹細胞自己生成組織の作製, 第 39 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2012
- 4) 谷, 大家, 中村, 藤江, 他, フェムト秒レーザーによりチタン表面に形成したナノ周期構造が間葉系幹細胞の接着特性に及ぼす影響, 第 4 回日本材料化学会 医用・生体材料分科会講演会, 2013
- 5) 青木, 大家, 中村, 藤江, 他, ナノ周期構造表面を用いた幹細胞自己生成組織の創成, 第 4 回日本材料化学会 医用・生体材料分科会講演会, 2013

## 1.1.2. マイクロ流体デバイスを用いた流体による刺激と細胞の応答に関する研究

### Responses of Cells Cultured in Micro-channel under Fluid Shear Stress

橋本 成広

Shigehiro HASHIMOTO

Keywords: Cell, Micro-channel, Shear Stress

#### 1. 背景

3大疾病のうち、がんを除く脳血管疾患と心血管疾患は、いずれも血液循環に異常が生じる疾病である。これらは動脈硬化や血栓、閉塞などと密接に関連している。その発症と進展には、血液の流体力学因子が影響すると考えられている。これらの原因究明や予防のために、血管の内側を覆っている内皮細胞など血管を構成する細胞の機能が注目されている。細胞の機能は血流による機械的刺激と関係があると報告されている<sup>1)</sup>。これまでに *in vivo* や *in vitro* の実験において、流体によるせん断応力と細胞の応答との間の関係が調べられている<sup>2)</sup>。他方、近年注目されている再生医療においては、*in vitro* において、細胞の分化・組織化を加速する技術が必要とされている。細胞は、電気<sup>3)</sup>・磁気<sup>4)</sup>・力学<sup>5-7)</sup>などの様々な刺激に応答して、増殖・分化・配向すると考えられている。

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて細胞に力学的な刺激を加える *in vitro* 実験システムを開発すること、力学的な刺激に対する細胞の応答について実験的に調べることが目的としている。

#### 2. 材料と方法

##### 平行平板間流路試験

せん断応力に対する細胞の挙動を観察するために、平行平板間流路を作成した。ポリジメチルシロキサン平板に挟まれた厚さ 0.1 mm のシリコンゴムプレートに菱形の孔を空け、高さ 0.1 mm、幅 2 mm~4 mm、長さ 52 mm の流路を構成した。実験で使用した細胞は、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、マウス筋芽細胞 (C2C12)、マウス繊維芽細胞 (L929)、ラット肋軟骨細胞、ラット骨格筋細胞 (L6)、ラット大動脈平滑筋細胞 (A7r5) である。培養液 (D-MEM) 中に分散された細胞を流路に導入して 24 時間培養し、細胞をガラス面に付着させた。シリンジポンプによって培養液を一定の流量 ( $Fr$ ) で吸引することにより、ガラス壁面に一定のせん断応力を発生させた (Fig.1)。平行平板間の放物線状の速度分布を仮定し、壁面せん断速度 ( $Sr$ ) と流体の粘性係数からせん断応力を算出した (Fig.2)。流量 (4 ml/hour-60 ml/hour) を段階的に調節することによって、壁面せん断応力 (0.2 Pa-6 Pa) を変えながら、ガラス面に付着した細胞の挙動を光学顕微鏡で観察した (Fig.3)。また、マイクロ加工 (Fig.4) によって壁面に円柱・穴・溝を設け、せん断流れ下における細胞の挙動を観察した。

##### 持続流れ下培養

継続的に流れ刺激を加えながら細胞を培養するために、培養皿底面に密着させたシリコンゴム円板の周囲にドーナツ型

の流路を構成した。この培養皿をシェーカーの上に載せて、シェーカーの動作によって、培養液が連続的に時計回りに流れるようにした。この装置をインキュベーター内に置いて、仔牛胎児血清 10% を含む D-MEM 中で細胞を 7 日間培養した (Fig.5)。実験で使用した細胞は、マウス筋芽細胞 (C2C12)、ラット骨格筋細胞 (L6)、ラット大動脈平滑筋細胞 (A7r5)、ブタ大動脈血管内皮細胞 (CS-2P2-C75)、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、マウス繊維芽細胞 (L929) である。

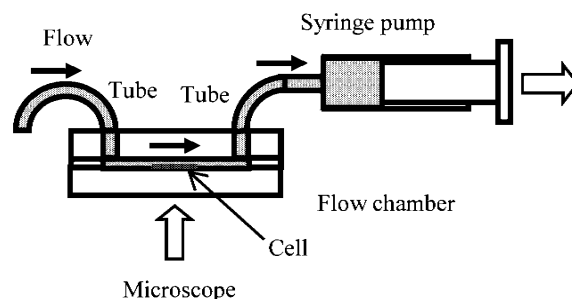


Fig.1 マイクロ流路への流れ供給

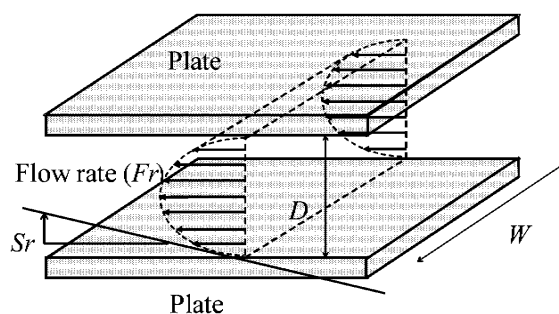


Fig.2 壁面せん断速度

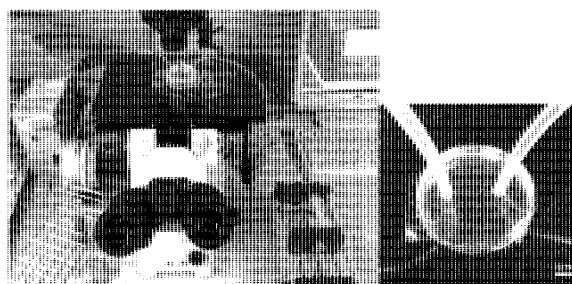


Fig.3 平行平板流路試験装置 (左)  
平行平板間流路 (右)

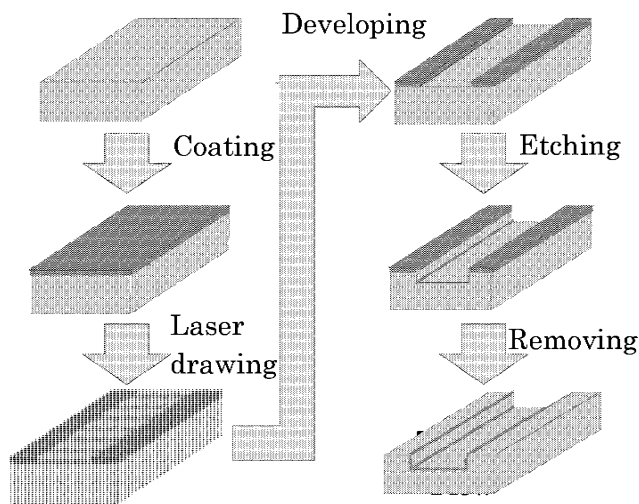


Fig.4 マイクロ加工

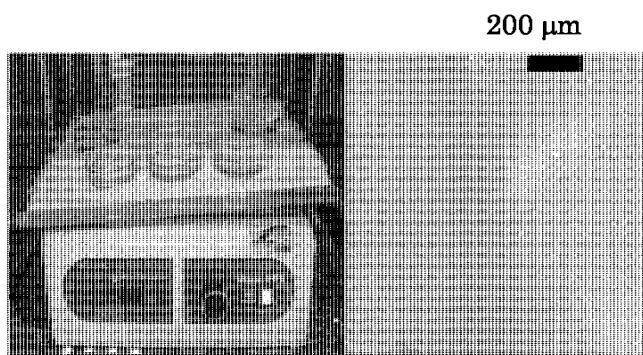


Fig.5 持続流れ下培養 Fi.6 C2C12 流れ刺激後

### 3. 結果および考察

平行平板間流路試験において、細胞の延伸、移動、剥離が観察された。持続流れ下培養において、流れによる細胞の剥離、流れの遅い中心側から周辺側への細胞付着の進行が観察された。HUVEC, A7r5, CS-2P2-C75 は流れに沿った方向、C2C12, L6, L929 は流れに対して垂直な方向に配向する傾向が観察された (Fig.6)。せん断応力の高いところから細胞が剥離する様子が観察された。C2C12 は、流れ刺激によって筋管への分化が促進された。

### 4. 結言

「マイクロ流体デバイスを用いて細胞に力学的な刺激を加える in vitro 実験システム」を開発し、流れ刺激に対する細胞の回転、延伸、移動、剥離を観察できた。持続流れ下培養装置を用い、流れ刺激が細胞の分化・配向に影響を与えること、その効果は細胞種によって異なることを実験的に示した。

### 文献

- 1) Pries, A. R., and Secomb, T. W., "Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, pp. H2657-H2664 (2005).
- 2) Gouverneur, M., Berg, B. V. D., Nieuwdorp, M., Stroed, E. and Vink, H., "Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress," *J. Inter. Medicine.*,

259(4), pp. 393-400 (2006)

- 3) Nakajima A., Uemura R., Hashimoto S., Susa T. and Sato Y., "Effect of pulsatile electric field on cultured muscle cells in vitro," *Proc. 15th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 129-133 (2011)
- 4) Sakatani Y., Hashimoto S. and Yoriki J., "Effect of static magnetic field on muscle cells in vitro," *Proc. 14th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 280-284 (2010)
- 5) Motoda S., Hashimoto S., Iwagawa T. and Nakajima A., "Effect of excess gravitational force on cultured myotubes in vitro," *Proc. 15th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 118-123 (2011)
- 6) Nakajima A., Iwata H., Hashimoto S., Susa T. and Sato F., "Effect of shear flow on cultured cartilage cells," *Proc. 15th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 124-128 (2011)
- 7) Hashimoto S. and Okada M., "Orientation of cells cultured in vortex flow with swinging plate in vitro," *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol. 9(3), pp.1-7 (2011)

### 論文投稿・研究発表等

- 1) Hashimoto S., Sato F., Oya K., Fujie H., Iwata H. and Sakatani Y., "Responses of cells to flow in vitro," *Proc. 16th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 91-96 (2012)
- 2) Sato F., Hashimoto S., Oya K. and Fujie H., "Responses of cells to fluid shear stress in vitro," *Proc. 16th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 97-102 (2012)
- 3) Sato F., Hashimoto S., Ooshima T., Oya K., Fujie H. and Yasuda T., "Design of micro-channel for controlling behavior of cells in vitro," *Proc. 16th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, pp. 103-108 (2012)
- 4) Hashimoto S., Sato F., Uemura R. and Nakajima A., "Effect of pulsatile electric field on cultured muscle cells in vitro," *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol. 10(1), pp. 1-6 (2012)
- 5) Iwata H., Nakajima A. and Hashimoto S., "Flow chamber system for evaluation of effect of shear on cells," *Proc. 10th IASTED International Conference on Biomedical Engineering*, pp. 1-8, (2012)

## 1.2 バイオマテリアル・デバイス

### Biomaterials・Devices

#### 1.2.1 マイクロ・ナノ規則性構造材料創製技術の開発とマイクロバイオシステムへの応用に関する研究

小野 幸子, 阿相 英孝, アナワチ

#### 1.2.2 超音速フリージェット PVD によるハイドロキシアパタイト膜の開発に関する研究

湯本 敦史

#### 1.2.3 金属光造形複合加工法による焼結チタン合金インプラント人工骨の創製

—焼結リン酸カルシウム製人工骨と補強用メッシュプレート—

何 建梅

2008年のプロジェクト発足時、基礎生体医工学プロジェクトの中テーマ1.2は、本学の応用化学科、機械システム工学科、機械工学科に所属する3つの研究グループから構成され、いずれもバイオマテリアル・デバイスの開発を主目的に研究を開始した。共通する材料としては金属チタンあるいはその合金材料であり、いずれも生体内使用のインプラント材を研究対象として、生体組織適合性向上や力学的特性等を評価してきた。試料の作製方法は、小テーマごとに異なり、電気化学的手法あるいは超音速フリージェットPVD法を用い、形状ならびに組成を制御した生体活性表面をチタンなどの基板上に構築する研究や、3次元金属光造形加工法を用いてチタン合金等の人工骨の強度等材料特性を把握し、内部メッシュ構造を持った人工骨の構造信頼性向上を図ることなど、いずれの小テーマも積極的に研究を展開してきた。

2010年度、小テーマ1.2.2の担当が他大学に転出し所属の変更があったが、本研究プロジェクトの進行に対する影響は無く、最終年度まで研究を遂行した(図1)。

平成24年度(2012年度)の研究成果として、小テーマ1.2.1では、メカニカルミリング法と放電プラズマ焼結法を組み合わせて作製した高硬度の純Ti、あるいはTi-HAp複合材料に対し、PD研究員Anawati博士が基材の耐食性、耐アルカリ性、生体親和性に関して関連成果を学術論文としてまとめ、腐食科学を扱う国際誌に投稿し、2013年1月に受理された。その他に、生体吸収性金属材料として関心の高いMgに対して、アノード酸化で酸化皮膜を形成後、硬組織適合性を付与するため交互浸漬法を用いてアパタイトを皮膜上に析出させ、*in vitro*試験として、各種試料上で骨芽細胞を培養し、細胞接着性及び耐食性に対する皮膜構造の効果に関して研究を遂行した。関連成果に関しては積極的に学会等で発表を行った。

小テーマ1.2.2では、超音速フリージェットPVDに分散粒子供給機構を組み込み、アパタイト粒子分散Ti膜の形成を試みた。Ti基材上に形成させたアパタイト粒子分散Ti膜は緻密であり、SBFに14日間浸漬させた結果、骨類似アパタイトの生成が確認され、本法によるアパタイト粒子分散Ti膜は生体活性性能を有することを明らかとした。また、Ti膜-SUS304基材間の密着性を界面剪断試験により評価した結果、最大界面剪断応力は348MPaであった。

小テーマ1.2.3では、チタン金属製インプラント人工骨に注目し、チタン金属製人工骨の材料剛性・重量特性について改善検討を行った。従来のチタンプレートにない優れた柔軟性を持ったインプラント用メッシュプレート構造を考案し、各種設計パラメータの変動でメッシュ基本形状によるメッシュプレートの力学的特性をモデル解析によって評価することで、メッシュプレートの柔軟性及び追随性に影響を与える設計パラメータを把握した。また、従来ステントの問題点を改善するため、応力集中を低減したメッシュステントの3Dモデルを考案し、既製品ステントと近い圧縮特性のメッシュステント設計することで、メッシュステントの圧縮剛性を調整し、各年齢、生体管腔内の部位にインプラント可能であることを確認した。

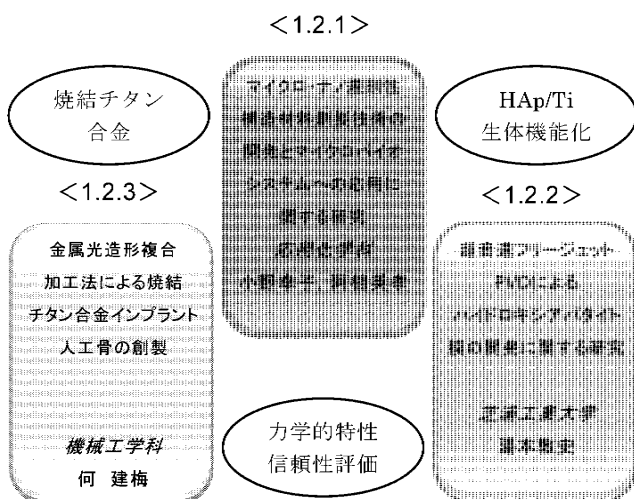


図 1: 中テーマ 1.2 のグループ構成





## 1.2.1 マイクロ・ナノ規則性構造材料創製技術の開発と マイクロバイオシステムへの応用に関する研究

### Fabrication of Micro-/Nano-Ordered Structures and Their Application to Micro-biosystem

小野 幸子, 阿相 英孝, アナワチ  
Sachiko ONO, Hidetaka ASOH, and Anawati

**Keywords :** Micro-/nano-ordered structures, Biomaterials, Titanium,  
Hydroxyapatite, Biocompatibility

#### 1. チタン-アパタイト複合材の耐食性, 生体親和性評価

2008年のプロジェクト開始時からこれまでに、軽量、高強度、低ヤング率などの特徴を持ち骨補填材として期待されているチタンを研究対象として、チタン多孔体、チタン-アパタイト (Ti-HAp) 複合材などの表面形態制御、硬組織適合性の評価などを進めてきた。

前年度は、メカニカルミリング (Mechanical Milling : MM) 法と放電プラズマ焼結 (Spark Plasma Sintering : SPS) 法を組み合わせて作製した高硬度の純 Ti, あるいは生体材料への適用を考慮し純 Ti に HAp を添加しメカニカルアロイイング (Mechanical Alloying : MA) 処理と SPS プロセスによって固化成形した Ti-HAp 複合材料に対し、PD 研究員 Anawati 博士が基材の耐食性, 耐アルカリ性, 生体親和性に関して研究を進め, 関連成果を 2011 年 9 月に開催された国際電気化学会で報告した。その後, 同内容を学術論文としてまとめ, 腐食科学を扱う国際誌に投稿し, 2013 年 1 月に受理された<sup>1)</sup>。

#### 2. アノード酸化により耐食性を制御したマグネシウムの in vitro 試験

##### 2.1 はじめに

近年, マグネシウム(Mg)を生体吸収性金属材料として血管内ステントや骨固定材等へ応用する研究が活発化している。著者らはこれまでに, Mg の生体活性化処理として水酸アパタイト [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2:\text{HAp}$ ] を交互浸漬法あるいはカソード電着法で, Mg 基板又は酸化皮膜上に付与し, その際の HAp の析出形態や析出分布が下地基板の表面形態に強く影響を受けることを報告した<sup>2,3)</sup>。また, 純度 99.6% の Mg をアルカリ性電解液中, 5~7 V の低電圧領域でアノード酸化することで生成した直管状ポーラス酸化皮膜に対し, 交互浸漬法を用いて HAp を付与した場合, ポーラス皮膜表面及び内部への HAp の析出量増加に伴い Mg の耐食性が著しく改善され, HAp 未付与に比べ細胞接着性も向上することを明らかにした<sup>4,5)</sup>。2012 年度は, Mg 基板上に形成した直管状及び火花放電で生成した溶岩状のアノード酸化ポーラス皮膜に対し, 硬組織適合性を付与するため交互浸漬法を用いて HAp を析出させ, in vitro 試験として, 試料上で骨芽細胞を培養し, 細胞接着性及び耐食性に対する皮膜構造の効果を明らかにすることを目的に研究を遂行した。

##### 2.2 実験方法

前処理した高純度 Mg (純度 : 99.6%, 試料面積 : 1, 5  $\text{cm}^2$ ) を 0.5  $\text{mol dm}^{-3}$   $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (25  $^{\circ}\text{C}$ ) 中, 5 V で 20 分定電圧アノード電解を行い直管状の孔を持つポーラス皮膜を作製した。一方, 溶岩状のポーラス皮膜は, 電流密度 200  $\text{Am}^{-2}$  で 170 V に達するまで 10 分定電流電解を行い, 火花放電を伴う電解条件下で作製した。皮膜作製後, 0.02  $\text{mol dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{OH})_2$  と 0.02  $\text{mol dm}^{-3}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  に 1 分ずつ試料を交互に浸漬し HAp を付与した。この操作を 20 サイクル行い, 最後に 0.02

$\text{mol dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{OH})_2$  に 1 分浸漬後, 水洗, 風乾した (交互浸漬法)。各試料上における接着細胞数の測定は, マウス由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) 播種後, 6 時間及び 24 時間培養の時点で行った。またその際の, 細胞形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察することにより細胞接着性を評価し, 細胞培養後の試料外観から耐食性を評価した。

##### 2.3 結果及び考察

Mg 基板を 5 V で 20 分定電圧電解し生成したポーラス皮膜は, 孔径約 50 nm, セル径約 200 nm の直管状セル構造を持ち, 膜厚は 10~15  $\mu\text{m}$  であった。この皮膜に対し交互浸漬 20 サイクル行った結果, 皮膜表層に長径最大 200 nm, 短径 50 nm の楕円形状の HAp が析出し, 析出層の厚さは 1~2  $\mu\text{m}$  であった (図 1a)。一方, Mg 基板を 200  $\text{Am}^{-2}$  で定電流電解し生成した皮膜は, 溶岩状のポーラス構造であり表面に直径 1~10  $\mu\text{m}$  の孔を持ち, 膜厚は最大 40  $\mu\text{m}$  であった (図 1b)。この皮膜に対し, 交互浸漬を 20 サイクル行った結果, 析出した HAp は長径約 80 nm, 短径約 30 nm の楕円形状であった (図 1c)。しかしながら, 直管状ポーラス皮膜に比べ HAp のサイズは小さく, 析出量も少なかった。

各試料上における 6 時間培養後の細胞の形態を観察した結果, 直管状ポーラス皮膜に HAp を付与した試料上の細胞は, 比較的丸い形態であり, 細胞及び仮足の伸展は見られなかったが, 下地に溶岩状ポーラス皮膜を用いた試料上の細胞は, 良好に伸展しており糸状仮足も伸展していた。さらに, 24 時間培養後の細胞を観察したところ, 下地に直管状ポーラス皮膜を用い HAp を付与した場合は, 6 時間培養後と同様に細胞は丸い形態で伸展していなかったが (図 1d), 下地に溶岩状皮膜を用いた試料では, 6 時間培養後に比べ, 細胞が伸展しサイズも大きくなっていったが, 糸状仮足の伸展は少なかった。 (図 1e, f)。

24 時間培養後の接着細胞数を測定した結果を図 2 に示す。下地に直管状ポーラス皮膜を用いた試料と未処理の Mg 素地の接着細胞数に有意差は見られなかったが, 下地に溶岩状ポーラス皮膜を用いた試料の接着細胞数は有意に多く, 細胞接着性は良好であった。一方, 溶岩状ポーラス皮膜上において, 細胞接着性に対する HAp の有無による差異は見られなかった。溶岩状ポーラス皮膜上の HAp の析出量が直管状ポーラス皮膜に比べて少ないことから, 細胞接着性に対する HAp 付与の効果は低いと考えられる。

一方, 細胞培養 6 時間後の各試料の外観を観察した結果, HAp 付与の有無に関わらず, 下地に直管状ポーラス皮膜を用いた場合は試料が腐食に伴い黒色に変化した。一方, 下地に溶岩状ポーラス皮膜を用いた場合は腐食は観察されなかった。直管状ポーラス皮膜に比べ溶岩状ポーラス皮膜を用いた場合に良好な細胞接着性を示した原因の一つとして, 皮膜の耐食性が高いことが考えられる。Mg はアルカリ領域で安定であるが, 使用した培養培地は pH 7.4 である

ため、細胞培養中はどちらの皮膜を用いた場合でも素地の腐食に伴う水素ガスの発生が観察された。耐食性が低い直管状ポーラス皮膜を下地に用いた場合では、細胞培養中の腐食に伴う水素ガスの発生や  $Mg^{2+}$  イオンの溶出による pH の上昇が、細胞の接着を阻害すると考えられるが、溶岩状ポーラス皮膜の場合では水素ガスの発生及び pH の上昇が少ないため、良好な細胞接着性を示したと考えられる。

#### 参考文献

1. Anawati, H. Tanigawa, H. Asoh, T. Ohno, M. Kubota, and S. Ono, *Corrosion Science*, **70**, 212-220 (2013).
2. S. Ono, A. Kiyotake and H. Asoh, *ECS Transactions*, **11**, 1 (2008).
3. 阿相英孝, 黒田雄二, 小野幸子, 第 119 回無機マテリアル学会講演要旨集, p.60 (2009).
4. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, 第 58 回材料と環境討論会講演集, p.361 (2011).
5. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, 材料と環境 2012 講演集, p.117 (2012).

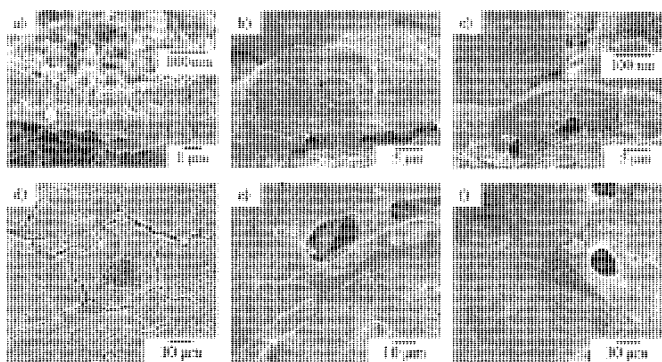


図 1 : a) HAp を付与した Mg の直管状ポーラス酸化皮膜, b) Mg の溶岩状ポーラス酸化皮膜, c) HAp を付与した Mg の溶岩状ポーラス酸化皮膜, d)~f) 播種後 24 時間の a)~c) 上における MC3T3-E1 細胞の伸展の様子

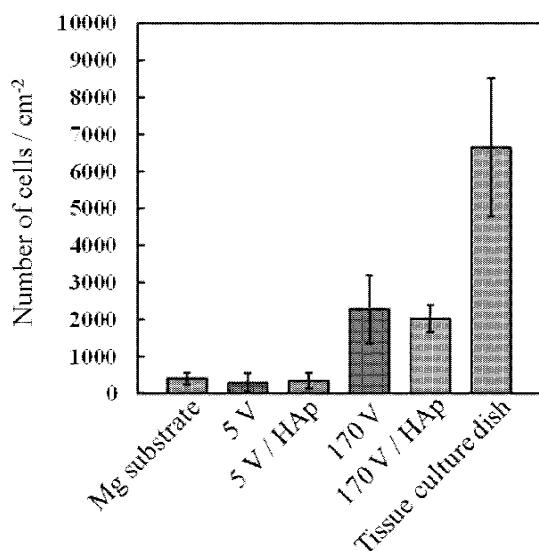


図 2 : 播種後 24 時間の各 Mg 試料における MC3T3-E1 接着細胞数の比較

#### 査読付論文

1. Anawati, H. Tanigawa, H. Asoh, T. Ohno, M. Kubota, and S. Ono, *Electrochemical Corrosion and Bioactivity of*

*Titanium-Hydroxyapatite Composites Prepared by Spark Plasma Sintering*, *Corrosion Science*, **70**, 212-220 (2013).

2. 阿相英孝, 小野幸子, 電着法によるチタン基板上へのアパタイトコーティング (解説), *材料の科学と工学*, **49**, (6), 246-249 (2012).

#### 学会発表

1. 阿相英孝, 小野幸子, 電着法によるチタン基板上へのアパタイトコーティング (依頼講演), 第 4 回日本材料科学会 医用・生体材料分科会講演会 (2013.3)
2. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, アノード酸化およびアパタイト付与したマグネシウムの細胞接着性, 第 4 回日本材料科学会 医用・生体材料分科会講演会 (2013.3)
3. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, 交互浸漬法を用いたアパタイト付与によるマグネシウムの耐食性および生体親和性の改善, コロージョン・ドリーム 2012 - 若手研究者セミナー (2012.12)
4. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, アノード酸化により耐食性を制御したマグネシウムの *in vitro* 試験, 軽金属学会 第 123 回秋期大会 (2012.11)
5. 菅原康祐, 阿相英孝, 小野幸子, アノード酸化ポーラスアルミナ上への HAp の位置選択的析出, 金属のアノード酸化皮膜の機能化部会 第 29 回伊豆長岡コンファレンス (2012.11)
6. 小林涉, 阿相英孝, 今村保忠, 小野幸子, 構造制御したアノード酸化ポーラスアルミナ皮膜上における細胞増殖, 金属のアノード酸化皮膜の機能化部会 第 29 回伊豆長岡コンファレンス (2012.11)
7. D. Kobayashi, H. Asoh and S. Ono, Evaluation of corrosion resistance and biocompatibility of anodized magnesium as bioabsorbable materials, The 11th International Symposium on Advanced Technology (ISAT-Special)(2012.10)
8. D. Kobayashi, H. Asoh and S. Ono, Biocompatibility and Corrosion Resistance of Magnesium Coated with Hydroxyapatite using Alternative Immersion Method, 222nd Meeting of the Electrochemical Society - 2012 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan (PRiME 2012)(2012.10)
9. 小林涉, 阿相英孝, 今村保忠, 小野幸子, 細胞増殖性に対するアノード酸化ポーラスアルミナ皮膜の微細構造の影響, 軽金属学会 関東支部 第 3 回若手研究者ポスター発表会 (2012.8)
10. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, 交互浸漬法を用いたアパタイト付与によるマグネシウムの耐食性及び生体親和性の改善, 軽金属学会 関東支部 第 3 回若手研究者ポスター発表会 (2012.8)
11. 小林涉, 阿相英孝, 今村保忠, 小野幸子, 細胞増殖性に及ぼすアノード酸化ポーラスアルミナ皮膜の構造の影響, 無機マテリアル学会 第 124 回学術講演会 (2012.6)
12. 菅原康祐, 阿相英孝, 小野幸子, 局所アノード酸化により作製したアノード酸化アルミナパターン上へのカルシウム塩の位置選択的析出, 無機マテリアル学会 第 124 回学術講演会 (2012.6)
13. 小林大記, 阿相英孝, 小野幸子, 交互浸漬法によりアパタイトを付与したマグネシウムの耐食性及び生体親和性, 腐食防食協会 材料と環境 2012 (2012.4)

## 1.2.2. 超音速フリージェット PVD によるハイドロキシアパタイト膜の開発に関する研究

### Development of Apatite-Titanium Composite Coatings with Supersonic Free-Jet PVD

湯本 敦史 (芝浦工業大学)

Atsushi Yumoto (Shibaura Institute of Technology)

**Keywords:** Hydroxy-apatite, Titanium, nanoparticle, supersonic free-jet

**1. 緒言** 高齢化社会が進む中、欠損した骨や関節に代わり、人工骨・人工関節を生体内に埋め込むことで生体機能の回復・改善を試みる治療法に大きな期待が持たれている。生体内に埋め込むインプラント材に最も必要とされる機能は、生体内環境下(体液、細胞、体温など)において生体毒性(細胞刺激性、発がん性、突然変異誘発性、催奇性)が低く拒絶反応を起こさないことである。さらに日常生活において可動頻度の多い股関節や膝関節の代替材には、体重の2倍以上の荷重に耐え、かつ関節の摺動運動を可能とする磨耗特性も有していることが要求されている。現在、人工骨や人工関節などには、ステンレス鋼、Co-Cr合金、Ti合金などが広く活用されている。特に、Tiは生体毒性が最も低く生体親和性に優れている材料の一つであることが既に臨床的に証明されており、様々な部位の骨や関節への代替材としての利用が検討されている。しかし、生体内でイオンの溶出が少ないなど優れた生体適合性を示すTiであっても生体内の骨と結合するまでに約半年かかると言われており、早期に骨と結合し、短期間での生体機能の回復が可能となることが要求されている。Tiと骨の結合にはTiと骨の間に新生骨が生成する必要があり新生骨生成の短縮化を狙い、Ti基材に対して骨の主成分(人間の骨の約65%)の一つであるハイドロキシアパタイト(Hydroxyapatite;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ : 以下HApと略記)を皮膜としてコーティングする試みが多くの研究者によってなされているが、HAp皮膜の組成、結晶構造を制御することが困難であること、HAp膜の密着性が低いことなど解決しなければならない技術的課題が存在する。

超音速フリージェット PVD (Supersonic Free-Jet PVD: SFJ-PVD) は、生成直後の活性なナノサイズの粒子(ナノ粒子)を5km/s以上の超音速ガス流によって加速・基板まで搬送し、高い速度を付加したナノ粒子を基板上に堆積させることにより膜形成させる新しいコーティング法である。本研究は、超音速フリージェット PVD に分散粒子供給機構を組み込み、アパタイト粒子分散Ti膜を形成させ、疑似生体環境下での骨類似アパタイトの生成速度を評価することを目的とした。本研究の成果により、既存の成膜法によるHAp膜の技術的課題を克服し、生体組織活性能の高く人工骨や人工関節などとして利用可能な新しい生体適合性膜の成膜法としての本法の確立を目指す。

**2. 実験装置および実験方法** 超音速フリージェット PVD装置の概略図を Fig.1 に示す。本装置は、ナノ粒子を生成する「ナノ粒子生成室」(Fig.1 中の下のチャンバ)と、基板上にナノ粒子を堆積、皮膜形成をおこなう「膜形成室」(上のチャンバ)、加振機の上に設置されたガラス製の分散粒子供給室(図中ナノ粒子生成室の左)、合計三つのチャンバおよび排気システムで構成されている。ナノ粒子生成室と膜形成室の間は、ナノ粒子を搬送するための「搬送管」により連結されている。不活性ガス雰囲気とした生成室内では、膜素材となる材料を加熱・蒸発させ、それに伴いナノ粒子の生成がおこなわれる。生成室と膜形成室の差圧により発生するガスの流れを超音速ノズルにより超音速に加速し、各々の生成室で生成

させたナノ粒子を、搬送、基板上に堆積させ成膜させる。さらに、分散粒子供給室に充填されている粒子は、ガスを供給することによりキャリアガスと共に膜形成室まで搬送、基板上で生成室から搬送されるナノ粒子と混合し膜中に粒子が分散させることが可能である。

本研究では、ナノ粒子生成室に膜原料となるTiを設置、市販のHAp粉末を分散粒子供給室に充填することにより、生成室で生成させたTiナノ粒子と供給室からのHAp粉末を膜形成室内の基板上で混合させ、Tiマトリックス中にHAp粒子を分散させた膜の形成を試みる。従来技術と比較して基板温度を上げずに緻密な膜形成が可能となるなどの本法の特徴をいかに、緻密なTi膜中に生体適合性の高い結晶構造・組成のHAp粒子を分散させることが可能となることを期待している。

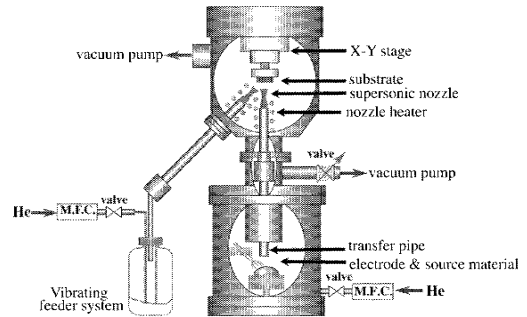


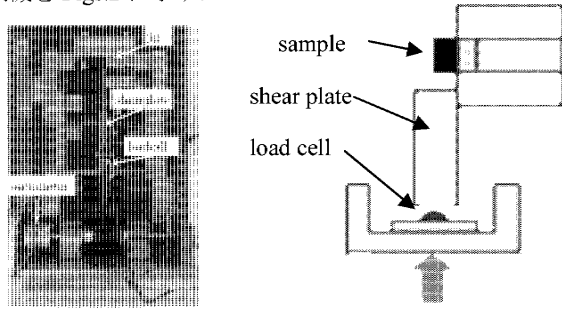
Fig 1: Schematic diagram of SFJ-PVD apparatus.

Table 1: Preparation conditions of HAp/Ti coating films.

Supersonic Free-Jet PVD apparatus	
Source material	Pure Ti
Primary gas	He
Nozzle	Mach 4.2
Evaporation power	400W
Nozzle temperature	873K
Substrate material	CP-Ti, SUS304
Substrate temperature	423K
Vibrating feeder system	
Supplying powder	HAp powder
Carrier Gas	He
Carrier gas flow rate	0-4.25SLM
Vibration	0-1200rpm

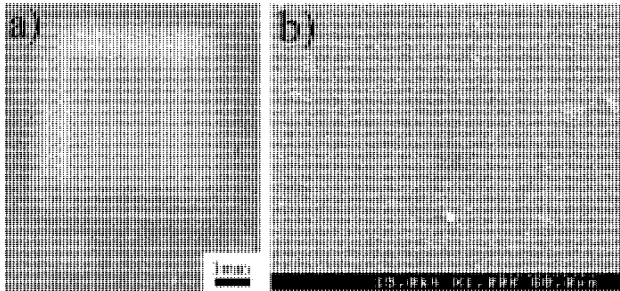
基板には、20mm角・板厚1mmのJIS-2種Ti板を用い、基板の前処理はアセトン中で10分間超音波洗浄のみ行った。また、皮膜原料には純Ti(3N)、Tiマトリックス中に分散させるアパタイトは天然由来水酸アパタイト(粒径0.7~0.3μm)を使用した。成膜条件をTable 1に示す。成膜した皮膜はpH7.4液温37℃の疑似体液(SBF)<sup>1)</sup>に14日間浸漬させ、骨類似アパタイトの生成の有無を観察した。

また、密着性を評価するために SUS 基板上に Ti 膜を成膜し、Ti 膜-SUS304 基材間の密着性を BS EN15340:2007 規格<sup>2)</sup>に準拠した界面剪断試験機により検討した。作製した界面剪断試験機を Figs.2 に示す。

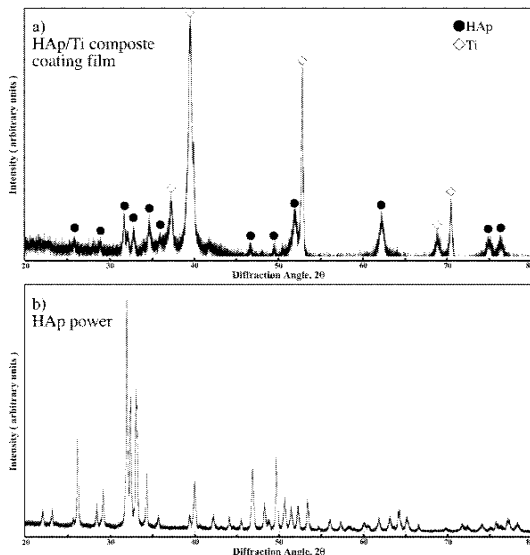


Figs. 2: shear tester.

**3. 実験結果および考察** Figs.3 は、Ti 基材上に形成させたアパタイト粒子分散 Ti 膜の表面写真である。皮膜表面にはき裂などの欠陥は確認されず Ti マトリックス中にアパタイト粒子が分散した緻密な皮膜が形成されていることが確認された。また、皮膜を XRD 分析した結果を Figs.4 に示す。Figs.4 から Ti と HAp のピークが確認された。



Figs. 3: Photographs of surface of a graded HAp/Ti composite coating film. (a) Observation with OM and (b) higher magnification observation on (a) with SEM.

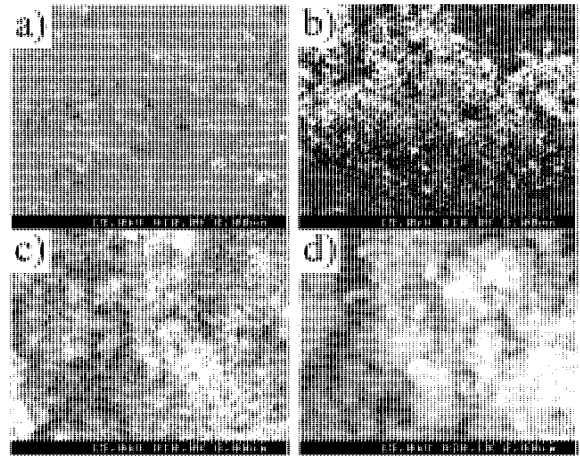


Figs. 4: X-ray diffraction profiles of (a) HAp/Ti composite coating film, (b) HAp powder.

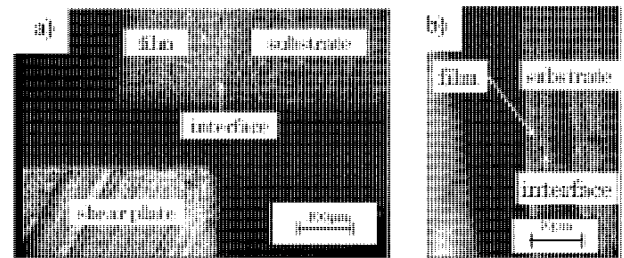
皮膜を SBF に 14 日間浸漬させた結果を Figs.5 に示す。SBF 浸漬による骨類似アパタイトの生成が確認された。

Figs.6 に剪断試験前後の膜断面写真と Fig.7 に試験結果を

示す。Fig.6(a)試験前の膜断面写真より、膜中および基材界面にき裂などの欠陥は観察されず、緻密な皮膜が形成されていることがわかる。また、試験後の膜断面写真 (Fig.6(b)) からは基材界面に皮膜の一部が残存し、膜中にき裂が伝播し破壊されていることが明らかとなった。Fig.7 より最大剪断応力は 348MPa であり、高い密着性を有していることが明らかとなった。



Figs. 5: Surface morphology of composite coating films in SBF. (a) As deposited, (b) after 7 days, (c) after 14 days and (d) higher magnification for (c).



Figs. 6: Cross sectional morphology of Ti film on substrate. (a) before shear test, (b) after shear test.

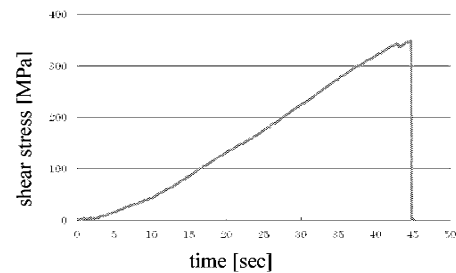


Fig. 7: Result of shear test.

**4. 結言** 本研究は、超音速フリージェット PVD に分散粒子供給機構を組み込み、アパタイト粒子分散 Ti 膜の形成を試みた。Ti 基材上に形成させたアパタイト粒子分散 Ti 膜は緻密であり、SBF に 14 日間浸漬させた結果、骨類似アパタイトの生成が確認され、本法によるアパタイト粒子分散 Ti 膜は生体活性を有することが明らかとなった。また、Ti 膜-SUS304 基材間の密着性を BS EN15340:2007 規格に準拠した試験機により評価した結果、最大界面剪断応力は 348MPa であった。

**参考文献** (1) T. Kokubo, and H. Takadama, *Biomater.*, 2006, 27, p.2907-2915. (2) BS EN15340 (Thermal spraying-Determination of shear load resistance of thermally sprayed coatings), (2007)

## 1.2.3 メッシュ構造の適用によるチタン金属製インプラント人工骨の高性能化検討 High-performance of Titanium Alloy Bone Implants by Mesh-structural Application

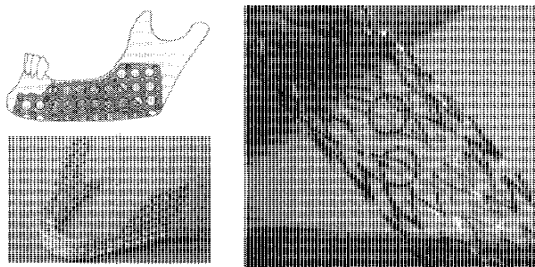
何 建梅 (工学院大学・機械工学科)  
Jianmei He (Kogakuin University, Dept. of Mechanical Engineering)

**Keywords:** Titanium Alloy Bone Implants, Meshed-structure, High-performance

### 1. 緒言

人や動物が事故などによる怪我、癌などの病気などで骨に欠損が起こった場合に骨移植手術が行われる。骨移植方法には大きく分けて、(1)自家骨移植(患者自らの正常な骨の一部を摘出し、移植を施す手法)、(2)他家骨移植(死者から提供された骨を移植する手法)、(3)人工骨移植(人工的に作られた骨を使い、移植を施す手法)がある。人工骨移植について、骨主成分であるリン酸カルシウム製人工骨と生体親和性の良いチタン金属製人工骨が挙げられる。本研究ではチタン金属製インプラント人工骨に注目し、問題とされている人骨より高すぎるチタン金属製人工骨の材料剛性・重量特性について改善検討を行う。

現状のチタン金属製人工骨は、図1に示すようにインプラント用チタンプレートや人間の生命維持に重要な血管、胆管、気管など生体内の管腔に動脈硬化などの狭窄や閉塞が起こった場合に使用されるステントがある。これらの人工骨インプラントは高価で、応力集中による破断で壊れやすいこと、またチタンプレートの追随性が不十分などの問題が挙げられる。そこで本研究はこれらの問題を解決するため図2に示すようなメッシュ基本形状を考案・設計し、チタン金属製インプラント人工骨に適用することで高性能化を図った。



(a) Plates (b) Stents  
Fig.1 Existing Titanium Plates and Stents

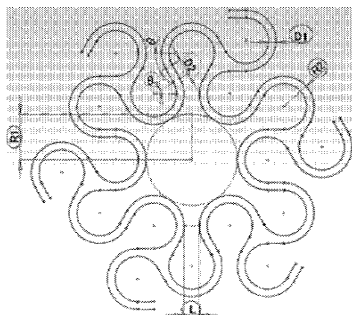


Fig.2 Basic Mesh Shape with Design Parameters

### 2. メッシュ基本形状の考案・設計

メッシュ基本形状の考案・設計において、60°回転対称性を有するポリゴン六角形からスタートし、

- ①加工及びコストの観点から1つ基本形状からの構成
- ②均一メッシュ線幅と折角無き形状で応力集中の緩和
- ③S字カーブの弯曲調整で構造柔軟性の寄与

④手術固定用ビスに合わせた空間の設置を考案コンセプトとした。それを基に図2に示す必要最低限に抑えた5つの基本設計パラメータを抽出して以下にまとめた。これらの基本設計パラメータは式(1)から式(4)の幾何的拘束条件を満足する必要がある。図3にR<sub>2</sub>とLを変化させたメッシュ基本形状の設計例を示す。

R<sub>1</sub>: 六角形の中心円半径 (固定用ビスの半径)

R<sub>2</sub>: 六角形の各頂点の円半径

D<sub>1</sub>: メッシュ線幅

L: 加工条件による制約(ワイヤとレーザビームの径等)

θ: Sカーブの弯曲 (D<sub>2</sub>の値はθによって決まる)

$$R_1 = R_2 + D_1 + L \quad (1)$$

$$\frac{L}{2} \leq (-1 + \cos \theta)D_1 + (-1 + 2\cos \theta)R_2 \quad (2)$$

$$D_2 = \frac{(-1 + 2\cos \theta)R_2 + (1 + \cos \theta)D_1 - \frac{L}{2}}{\sin \theta} \geq 0 \quad (\theta > 0^\circ) \quad (3)$$

$$L = 2R_2 \quad (\theta = 0^\circ) \quad (4)$$

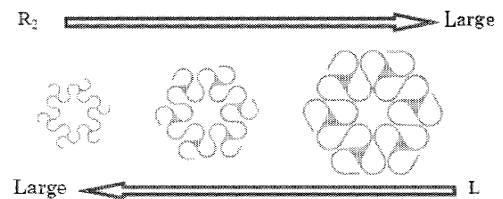


Fig.3 Meshes with Different Design Parameters

### 3. チタンメッシュプレートの試作による力学的特性評価

ここでは、板厚さ0.3mmと0.8mmの2種類純チタンプレート(TP270)を用いて、図4に示す2種類のメッシュ線幅(0.8mmと1.2mm)を有するメッシュ基本形状によるチタンメッシュプレートの試作を行った。

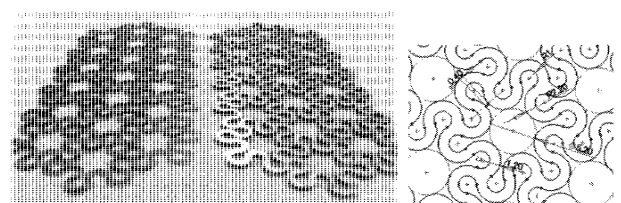


Fig.4 Meshed Titanium Plates for Experiments

チタンメッシュプレートの加工方法について、ワイヤークット放電加工を採用した。試作したチタンメッシュプレートの引張試験はJIS Z 2241(金属材料引張試験方法)、また三点曲げ試験はJIS Z 2248(金属材料曲げ試験方法)に準じて行った。図5に示すように試作チタンメッシュプレートの引張特性及び曲げ特性を評価するモデル解析も実施し、得られたモデル解析結果と実験結果の比較を表1と表2に示す。これらの結果から、モデル解析の妥当性を確認できた。

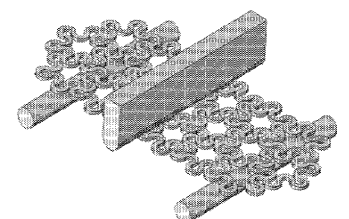


Fig.5 3D Analytical Modeling

Table 1 Tensile Property of Meshed Titanium Plates

線幅[mm]	板厚[mm]	引張弾性係数[MPa]		誤差
		実験	解析	
0.8	0.3	109.09	103.96	5%
	0.8	116.80	104.78	10%
1.2	0.3	263.36	245.05	7%
	0.8	265.83	246.76	7%

Table 2 Bending Property of Meshed Titanium Plates

線幅[mm]	板厚[mm]	曲げ剛性[N·mm <sup>2</sup> ]		誤差
		実験	解析	
0.8	0.3	343	369	8%
	0.8	4486	4449	1%
1.2	0.3	571	541	5%
	0.8	8812	8990	2%

4. 設計パラメータによるメッシュプレート力学的特性への影響評価

ここでは、第2項で示したメッシュ基本形状における5つ設計パラメータの変化によるメッシュプレートの力学的特性をモデル解析によって系統的に評価する。三種類の固定用ビスの半径  $R_1$  (0.8mm, 1.0mm, 1.2mm) で各種設計パラメータの組み合わせ変動によって計58種類のメッシュ基本形状を考案・設計し、第3項で示したメッシュプレートの引張特性及び曲げ特性を評価するモデル解析方法に基づいて各種設計パラメータの変動によるメッシュプレートの引張弾性係数と曲げ剛性を把握した。得られたメッシュプレートの体積密度、引張弾性係数と曲げ弾性係数の解析結果は図6~図8に示す。これらの結果から、メッシュプレートの引張弾性係数を下げる(追随性を上げる)には曲率  $R_2$  を上昇させ、また引張・曲げ弾性係数を上げるにはメッシュ線幅  $D_1$  を上昇させること等で対応できるとわかった。

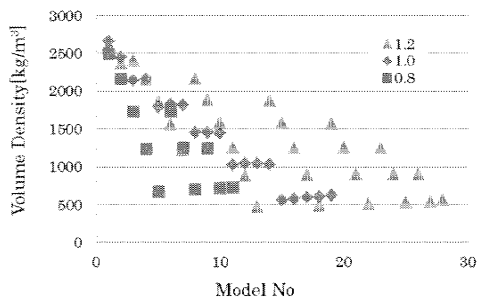


Fig.6 Tensile Elastic Modulus of Meshed Plates

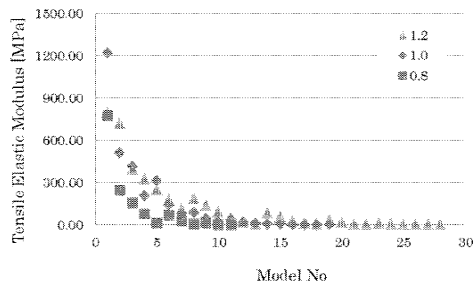


Fig.7 Tensile Elastic Modulus of Meshed Plates

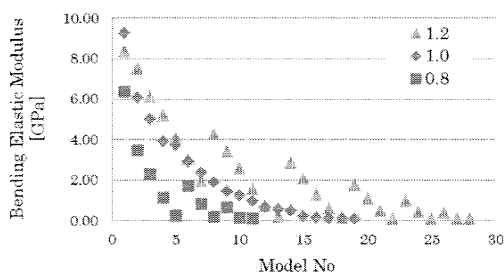


Fig.8 Bending Elastic Modulus of Meshed Plates

5. 3次元モデリングによるメッシュステントの評価

円筒にメッシュ基本形状を適応したメッシュステントの3次元モデリング評価を行った。3次元CADソフトSolidWorksを用いて、直径10mmの円筒にメッシュ線幅0.1mm~0.4mm、円周方向にメッシュ基本形状の数3~8個の組み合わせで計24のメッシュステントモデルを設計した。図9にメッシュ線幅が0.3mmのメッシュステントモデルを示す。

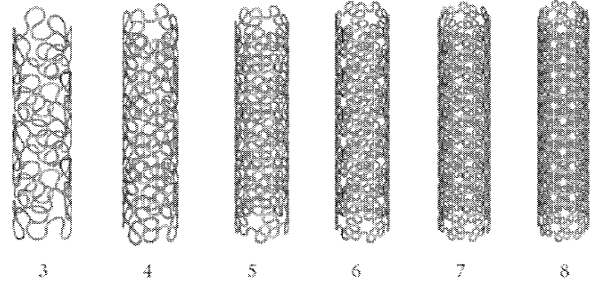


Fig.9 Meshed Stent Models with 0.3mm Line thickness

上記の3次元メッシュステントモデルを対象に図10に示す圧縮特性を評価するモデル解析を行った結果、既製品のインプラントステントとの差率を表3に示す。

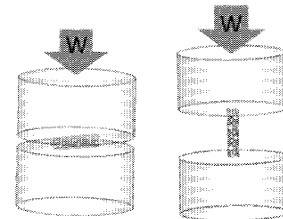


Fig.10 Compression Model of Meshed Stents

Table 3 Compression Property of Meshed Stents

Line Thickness	Gap with Reference Data [%]				
	0.1mm	0.2mm	0.3mm	0.4mm	
Basic Shape Number	3	91.8	70.4	34.1	7.7
	4	82.3	45.8	22.5	58.1
	5	72.3	21.9	42.2	123.1
	6	59.4	5.8	96.2	213.2
	7	54.1	54.4	201.6	254.8
	8	52.6	95.1	254.8	268.9

6. 結言

(1) 従来のチタンプレートにない優れた柔軟性を持ったインプラント用メッシュプレート構造を考案でき、各種設計パラメータの変動でメッシュ基本形状によるメッシュプレートの力学的特性をモデル解析によって評価し、メッシュプレートの柔軟性及び追随性に影響を与える設計パラメータを把握した。(2) 従来ステントの問題点を改善するため、応力集中を低減したメッシュステントの3Dモデルを考案し、既製品ステントと近い圧縮特性のメッシュステント設計することが可能で、メッシュステントの圧縮剛性を調整することで各年齢、生体血管内の部位にインプラント可能であることを確認した。

参考文献

- (1) 日本機械学会, 生体機械工学, 100-108, (1997)
- (2) 池内健著『ステントの力学的特性』他

査読付国際学会

R. Abiko, K. Zama, S. Suzuki, J. He, Experimental Investigation on Mechanical Properties of Meshed Titanium Plates for Reinforcement of Tricalcium Phosphate Bone Implants, The 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics (ICTAM2012), Peking China, 2012/08

特許: PCT/JP2011/070747, 特願 2012-533997

## 1.3. 医用エネルギー工学 Medical Energy Engineering

1.3.1 マイروسケール下の熱流体挙動、医用エネルギー機器およびマイクロエネルギー機器の開発に関する研究  
大竹 浩靖（工・機械工学科）、小泉 安郎（信州大）、田中 学（千葉大）、木倉 宏成（東工大）

1.3.2 体内埋込用ポンプ開発のための基礎的研究  
佐藤 光太郎（GE・機械創造工学科）、横田 和彦（名工大）

1.3.3 微生物による水素ガス生産  
小野寺 一清（総合研究所）、志澤 泰彦（日大短大・生物資源学科）

1.3.4 酵素反応マイクロリアクタの反応成績  
長本 英俊（工・環境化学工学科）、大島 榮次（東工大）

### 1. はじめに

1.3. 医用エネルギー工学は、『生体医工学研究センター』の先行プロジェクトである文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業『マイクロ先進スマート機械・マイクロバイオシステム実現へ向けてのテクノロジー開発：SMBC（平成15年度～平成19年度）』内の大テーマ4「マイクロエネルギーシステムに関する研究」および小テーマ3.2「マイクロリアクタの反応成績評価」の研究結果、すなわち、スマート機械システム創成技術に基づいて、生体医工学研究拠点の形成、特に、エネルギー工学分野の研究を推進するものである。

具体的には、上記の組織で4つの小テーマの研究が遂行されている。下記に、各小テーマの研究概要および今2012年度（最終年度）の成果をまとめる。

### 2. 各小テーマの研究概要

1.3.1. マイروسケール下の熱流体挙動、医用エネルギー機器およびマイクロエネルギー機器の開発に関する研究

ドラッグデリバリーシステム（DDS：Drug Delivery System）とは薬物送達システムとも呼ばれ、体内における薬物放出の速度、時間、場所（空間）などをコントロールすることにより治療効果を改善するための処方または投与形態である。このDDSの歴史は、20世紀初頭に「薬物を体内の特定部位に送達しようとする最初の構想が提唱された」のを諸とし、現21世紀では、ナノテクノロジーとDDSとの融合や再生医療などの先端医療へのDDSの応用が積極的に行われている。

本年度は、この基礎的研究として、細管（管内径5mm）および極細管（管内径1.6mm）内の固気液三相流中の気体プラグ上昇速度および固相粒子（ステンレス鋼粒子  $d_s = 1.58\text{ mm}$ 、ガラス粒子  $d_s = 1.00\text{ mm}$  および  $0.432\text{ mm}$ ）の挙動、輸送特性に及ぼす流路径および粒子径の影響を実験的に検討した。この結果、内径5mmの細管に対しても気体プラグ周りの液膜に固相粒子が入り込む条件で気相の上昇速度が上昇することを見出し、この系に対して、固相粒子輸送特性は液膜厚さと粒子径の比が重要なパラメータであることを明らかにした。一方、内径1.6mmの極細管に対しては、固気液三相流下で気体プラグ上昇速度が減少した。粒子径が大き過ぎ流動損失となったためと考えられる。

1.3.2. 体内埋込用ポンプ開発のための基礎的研究

シンセティックジェットによる液体輸送あるいは自走式カプセル内視鏡の開発のための基礎的研究であり、本研究で提案する液体輸送モデルの性能特性について推力を評価することで調べる。主として流れ場と流体力との関係につ

いて無次元ストロークをパラメータとして調べ、シンセティックジェットによるポンプ性能向上に向けた流路形状および振動条件について議論する。

その結果、噴出・吸入口同一型並びに噴出・吸入口分離型推進器モデルでシンセティックジェットを利用して推力が生成されること、コアンダ効果を用いて流れの方向を制御した噴出・吸入口分離型の下流では噴出・吸入口同一型と比較して大きな噴流中心速度を得ることができた。また、シンセティックジェットの推力特性を示し、連続噴流の推力特性と比較した。

1.3.3. 微生物による水素ガス生産

今年度は、本ニトロゲナーゼ系の本体である St1 を構成する種々のタンパク質を大腸菌につくらせて、それらの組合せにより水素ガス生産を可能にすることがゴールである。

その結果、ニトロゲナーゼのバイオリアクターが作成された。よって、ニトロゲナーゼの研究は多くの研究者に解放されたことになり、この酵素反応の機構の研究も進展が期待される。ニトロゲナーゼが水を分解して水素が発生されるのは、アンモニアを生成する反応の一部であると考えられると、今回発表した遺伝子の組換え DNA 技術により作られるタンパク質を組み合わせることにより、水素ガスを常温で生産することは近い将来成功すると考えられる。BERC では Bioengineering を使いバイオリアクターを作成できたことは、水素ガスの常温下で生産できる日も近いと考えている。

1.3.4. 酵素反応マイクロリアクタの反応成績

今年度は、物質移動速度に着目して、酵素反応マイクロリアクタの反応成績に関する数値計算を行って検討した。次に、他の要因を探るために、酵素-補酵素系による酵素反応を行い、分子量の大きく異なる酵素、補酵素および基質の3者の組み合わせを変えて、物質移動や流れの剪断力による反応速度への影響を検討した。

その結果、Y字型マイクロリアクタでの酵素反応速度が、回分式反応器での反応速度と比して大きいことを、二次元拡散方程式を用いてシミュレーションを通して、実験条件では差が現れなかったことを確認した。拡散混合が十分迅速なことが理由であることを示した。LDH と NADH の酵素-補酵素での反応実験を行い、マイクロリアクタでの反応速度を定量化した。以上、拡散が影響していることが示唆された。

### 3. まとめ

次ページ以降に各小テーマ（1.3.1.～1.3.4.）の平成24（2012）年度の主な研究成果の詳細をまとめる。





### 1.3.1. マイクロスケール下の熱流体挙動、医用エネルギー機器および マイクロエネルギー機器の開発に関する研究

— ドラッグデリバリーシステムに関する基礎的研究（気液二相流を利用した細管内の固相粒子輸送） —

## Fundamental Study on Drug Delivery System (Transportation of Solid Particles in Fine Pipe by using Liquid-Gas Two-Phase Flow)

大竹 浩靖（工・機械工学科）、小泉 安郎（信州大学）、田中 学（千葉大学）、木倉 宏成（東工大）  
Hiroyasu Ohtake,  
Yasuo Koizumi (Shinshu Univ.), Gaku Tanaka (Chiba Univ.), Hiroshige Kikura (TITech)

**Keywords:** Drug Delivery System, Solid Particles, Liquid-Gas Two-Phase Flow, Plug Flow

**1. 緒言** 1.3.1 テーマは「マイクロスケール下の熱流体挙動、医用エネルギー機器およびマイクロエネルギー機器の開発に関する研究」と題し、低温治療用の液体窒素によるクライオプローブシステムや気泡を利用したドラッグデリバリーシステム、熱電発電素子等の開発を目的とする。クライオプローブとは、主として液体窒素を利用して、病理細胞を破壊する凍結手術用の器具である<sup>(1)</sup>。このクライオプローブは、サブミリメートルの同軸二重パイプからなり、内側に液体窒素が流れ、先端で蒸発することによる冷却効果で治療を行う。蒸発後は窒素ガスとなり、外側の環状流路を経て外部へガスが排出される。すなわち、この器具は、マイクロスケール下の熱工学（蒸発、二相流動、流体力学）を積極的に利用したものである。近年、より小さな病変にも適用できるマイクロクライオプローブの開発が注目されている。

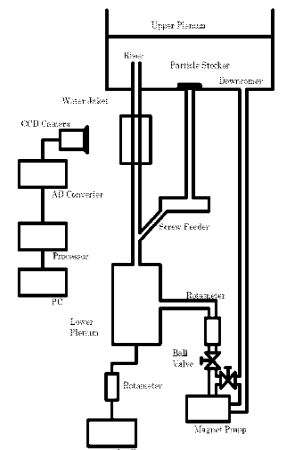
また、ドラッグデリバリーシステム（DDS: Drug Delivery System）は薬物送達システムとも呼ばれ、体内における薬物放出の速度、時間、場所（空間）などをコントロールすることにより治療効果を改善するための処方または投与形態である。このDDSの歴史は、20世紀初頭に「薬物を体内の特定部位に送達しようとする最初の構想が提唱された」のを諸とし、1970年代になりDDSの概念が広まり、放出制御製剤やインスリン注入デバイスが開発された。1980年代に入り、蛋白質（ペプチド）をデリバリーするための研究が進展し、1990年代に桂皮治療システムの開発並びに遺伝子治療が開始された。さらに21世紀に入ると、ナノテクノロジーとDDSとの融合や再生医療などの先端医療へのDDSの応用が積極的に行われている。DDSは、一般には、放出制御、吸収障壁の克服、標的指向性の3つに大別され、究極のDDSは、放出制御、吸収障壁の克服、ターゲティングを生体や病態にとって理想的な形で行い、最適な薬物療法を達成することとされている<sup>(2)</sup>。

本報告は、後者（前者は昨年度参照）のドラッグデリバリーシステムの開発のための基礎的研究および固気液三相流動の基礎研究として、気液二相流、すなわち気体プラグ流を利用した固相粒子の輸送を検討したものである。特に、細管内の固気液三相流中の気体プラグ上昇速度および固相粒子の挙動、輸送特性に及ぼす流路径および粒子径の影響を実験的に検討した。

**2. 実験装置および手順** 内径30mm、鉛直高さ3,000mm、内径5mm、鉛直高さ1,000mmおよび内径1.6mm、鉛直高さ320mmの3種類の透明アクリル製円管をテスト流路とし、気相に空気、液相に水（水道水）、固相にガラス球およびステンレス鋼球を使用して実験を行った。

実験装置は、大気開放循環ループで構成される。その概略図をFig. 1に示す。主な装置構成要素は、上部プレナム、下部プレナム、テスト流路である上昇管、下降管、循環ポンプ、

粒子貯蔵管、粒子スクリーフフィーダおよび空気供給用のコンプレッサである。循環液流量、空気流量は浮き子式流量計にて測定した。管内径30mmでの実験ではテスト流路上端から下方1,200mm、管内径5mmでは上端から400mmの位置にウォータージャケットを設置し、外部からCCDカメラにて流動挙動を撮影し、気体プラグ上昇速度の測定および固相粒子の挙動の観測を行った。固相粒子供給装置は螺旋状回転子（木工用ドリル）とモータ（ハンドドリル）から成り立っている。モータ回転数の制御は電圧調整器にて行い、螺旋状回転子の回転数を制御することにより、任意の一定体積流束の固相粒子をテスト流路内へ供給した。実験手順は、テスト流路を水道水で満たし、循環ポンプを駆動させ、循環ループ内に一定流量の循環流を形成させる。次いで、空気コンプレッサから空気をテスト流路下部プレナム内空気吹き込みノズルに送り、テスト流路内に上昇気体プラグ流を形成させる。固相粒子供給装置から一定流束の固体粒子をテスト流路内へ供給する。なお、上昇できない粒子は、下部プレナムに蓄積される。一方、流れに乗って上昇した粒子は上部プレナムで流れから分離され、上部プレナム内に蓄積される。一定時間経過後、粒子供給および液循環を停止し、下部プレナムおよび上部プレナム内に貯められた固相粒子の質量を測定し、経過時間と測定されたそれぞれの蓄積粒子質量から、上昇粒子、落下粒子および正味の上昇粒子の体積流束を求めた。 Fig. 1 Experimental Apparatus



### 3. 実験結果および考察

まず、固相粒子のリフト限界、すなわち、投入した固相粒子の全量が落下する条件および全量が上昇する条件について検討する。紙面の都合上、実験結果の図示およびその検討結果は前々年度の報告書を参照頂きたい。まとめると、管内径の微細化、すなわち管内の層流化および気相（あるいは、密度の小さい混ざらない液相）の添加は、固相粒子の輸送量を増加する効果があることがわかった。

次に、Fig. 2に、管内径5mmにおいて、固相にステンレス鋼粒子  $d_p = 1.58 \text{ mm}$ 、ガラス粒子  $d_p = 1.00 \text{ mm}$  および  $0.432 \text{ mm}$  を添加した場合の気液二相流時に対する気体プラグ上昇速度の上昇率と固相容積流束との関係を示す。Fig. 2より、粒子径が小さい場合、固相容積流束の増加に伴い、気体プラグ上昇速度の上昇率が大きくなることが認められた。一方、粒

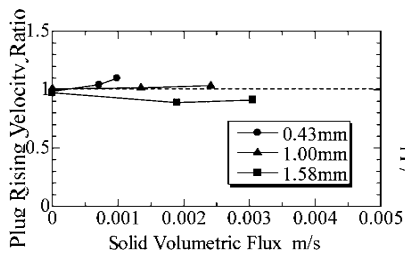


Fig. 2 Relation between Plug Rising Velocity Ratio and Solid Volumetric

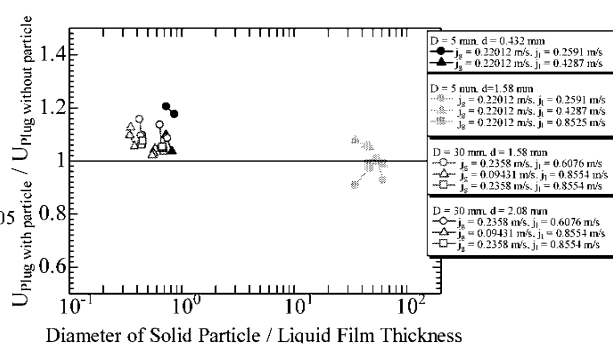


Fig. 3 Relation between Ratio of Plug Rising Velocity and Ratio of Diameter of Particle and Liquid Film Thickness on Pipe with 5mm in-diameter

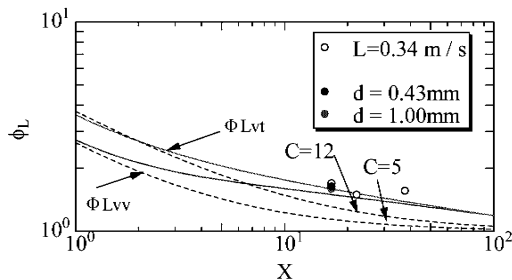


Fig. 4 Pressure Loss on Two-phase Flow and Three-phase Flow on Pipe with 5mm in-diameter

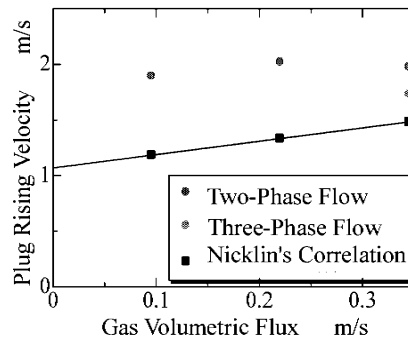


Fig. 5 Plug Rising Velocity on 1.6mm in-diameter Pipe

子径 1.58mm の場合には、気体プラグ上昇速度の増加は見られない。紙面の都合上、実験結果の図示は前々年度を参照頂きたいが、管内径 30mm においては、気体プラグ上昇速度は、固相積流束 0 で気液二相流時の理論式に一致し、固相を加えることで上昇し、固相容積流束の増加とともに上昇していることがわかった。この傾向は、静止液柱内を粒子が落下する場合の気体プラグ上昇速度の落下固相流束への依存性とほぼ同一であった。

続いて、気体プラグ上昇速度に及ぼす流路径および粒子径の影響を検討する。紙面の都合上、基礎的データ（固相粒子の添加による各気体プラグ上昇速度（の気液二相流時に対する上昇率）と固相容積流束との関係、固相粒子の添加による各気体プラグ上昇速度の気液二相流時に対する上昇率と液膜厚さの観測値（平均値）と管内径との比の関係）の図示は、同じく前々年度を参照頂きたい。簡単にまとめると、多くの条件で、固相粒子の添加により気体プラグの上昇速度が増加することが認められた。しかしながら、管内径 5mm、粒子径 1.58mm の条件では、気体プラグ上昇速度の増加は見られなかった。これは流路径に対して粒子径が大きいためであると思われる。すなわち、気体プラグ上昇速度を律するのは、気体プラグ周りの液膜流れであることに起因する。つまり、流路径に比して粒子径が小さい場合にはこの気体プラグ周りの液膜に固相粒子が入り込み、気体プラグ周りから下方への液体の運動量の増加を期待されるのに対し、流路径に比して粒子径が大きい場合にはこの液膜内に固相粒子が入り込まず、気体プラグ周りから下方への液体の運動量の増加がないことが要因と思われる。

上記の事実を明確にするため、Fig. 3 に、固相粒子の添加による各気体プラグ上昇速度の気液二相流時に対する上昇率を粒子径と液膜厚さの観測値（平均値）との比に対して示す。Fig. 3 より、気体プラグ上昇速度の増加が見られない、管内径 5mm、粒子径 1.58 mm の条件では粒子径と液膜厚さとの比が大きくなり、1 を大きく超えていることがわかる。なお、幾何学的な第 1 次評価として、気体プラグ上昇速度を増加させるためには、粒子径を管内径の 10% 以下に、また流体力学

的な第 2 次評価として、粒子径を液膜厚さの 100% 以下、すなわち粒子径は気液二相流下のプラグ流の液膜厚さ以下にする必要があることがわかった。

次に、固気液三相流下の管内摩擦損失について考察する。考察は、気液二相流の管内摩擦損失<sup>(3)</sup>を基礎とする。Fig. 4 に、管内径 5mm における、固気液三相流下の管内摩擦損失特性を示す。Fig. 4 中の縦軸  $\phi_L$  は二相増倍係数 (two-phase multiplier)、横軸 X は Lockhart and Martinelli parameter である。Fig. 4 中には、気液二相流の管内摩擦損失の典型的な相関式<sup>(3)</sup>である Lockhart and Martinelli 相関式 (Chisholm 相関式) による計算結果も併せて示した。なお、添字 v は層流、t は乱流を示す。

Fig. 4 より、気液二相流下および固気液三相流下ともに、Chisholm 相関式による計算結果とよい一致を示していることがわかる。この事実は、気体プラグ速度が上昇する（管内径 5mm、粒子径 0.43mm 条件）にもかかわらず、流路全体の管内摩擦損失は変化しないことを示している。詳細メカニズムは、今後の検討課題ではあるが、このような系（固気液三相流）に関する応用上の利点の一つと考えられる。

最後に、より微細な管内径 1.6mm に対する実験結果を示す。Fig. 5 に、気液二相流下および粒子添加下、すなわち固気液三相流下の気体プラグ上昇速度を気相容積流束に対して示す。液相容積流束は 0.85m/s である。Fig. 5 に示すように、気液二相流下で、一般的な Nicklin の相関式の値より大きいことがわかる。また、固気液三相流下では、気体プラグ上昇速度は減少した。これは、管内径に対して粒子径が十分に大きかった (60%) ためだと考えられる。なお、気体プラグ長さは短くなっていた。今後、詳細に検討を加えていく。

**4. 結論** 固気液三相流中の気体プラグ上昇速度および固相粒子の輸送特性に及ぼす流路径および粒子径の影響を実験的に検討し、細管に対しても気体プラグ周りの液膜に固相粒子が入り込む条件で気相の上昇速度が上昇することを見出し、この系に対して、固相粒子輸送特性は液膜厚さと粒子径の比が重要なパラメータであることを明らかにした。

**参考文献** (1) 円山ほか、第 41 回伝熱シンポジウム講義集、(2004)、395. (2) 有馬、混相流、Vol.19-No.4、(2005)、312. (3) 植田、気液二相流、(1981)、養賢堂。

査読付国際学会

H. Ohtake and Y. Ando, "Study on Condensation Heat Transfer of Micro Structured Surface (Effect on Condensation Heat Transfer of Metal-Spattering Surfaces)", The 11th International Symposium on Advanced Technology, USB ISAT-S 10453, (2012). ほか 1 編。

学会発表

小野・大竹 (原田)、日本混相流学会年会講演会 2012、(2012). ほか 7 編。(他、招待講演 2 件)

# 1.3.2 体内埋込用ポンプ開発のための基礎的研究

## — シンセティックジェットによる流体輸送について —

佐藤光太郎（工学院大） ， 横田和彦（青山学院大）

Kotaro SATO, Kogakuin University, 1-24-2 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo  
Kazuhiro YOKOTA, Aoyama Gakuin University, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa

Key Words: Synthetic Jet, Thrust, Stroke, Velocity Distribution, Numerical Simulation

### 1. はじめに

シンセティックジェット・アクチュエータには様々な方式のものが考案されているが、いずれも回転部が無く機械的駆動部分も少ないため小型化・軽量化に適している。また、駆動源が多様であることもシンセティックジェットの大きな特徴であり、将来的には非接触でのエネルギー供給も可能と思われる。このため流体制御では連続噴流に代えてシンセティックジェットを利用する試みがなされている<sup>(1)-(6)</sup>。しかし、シンセティックジェットにより推力や吐出圧を得るための研究例は少なく、詳細な推力発生機構や流体力と流れ場との関係については未だ不明な点が多く残されている。

本研究はシンセティックジェットによる液体輸送あるいは自走式カプセル内視鏡の開発のための基礎的研究であり、本研究で提案する液体輸送モデルの性能特性について推力を評価することで調べる。主として流れ場と流体力との関係について無次元ストロークをパラメータとして調べ、シンセティックジェットによるポンプ性能向上に向けた流路形状および振動条件について議論する。

### 2. 主な記号

- $b_0$ : スロット幅 [m]
- $C_F$ : 推力係数
- $f$ : スロット出口の振動数 [1/s]
- $F$ : 推力 [N]
- $t$ : 時間 [s]
- $u_0$ : スロット出口流速 [m/s]
- $U$ : 主流速度 [m/s]
- $U_0$ : 代表速度 [m/s]
- $Re$ :  $U_0$ に基づくレイノルズ数  $=U_0 b_0/\nu$
- $l_0$ : ストローク長さ [m]
- $L_0$ : 無次元ストローク  $=U_0/fb_0$
- $\nu$ : 作動流体の動粘性係数 [m<sup>2</sup>/s]

### 2. 推進器モデルおよび数値シミュレーション

数値シミュレーションには、非構造格子系熱流体解析システム SCRYU/Tetra for Windows [(株)ソフトウェアクレイドル]を用いた。本研究では乱流モデルに  $k-\epsilon$  モデルを用い、二次元非圧縮粘性流れを仮定して流れ場の解析を行った。

図1に推進器モデルの概形並びに主な記号を示す。(a)は噴出・吸入口同一型推進器モデル、(b)は噴出・吸入口分離型推進器モデルである。吹き出しスロットは推進器のほぼ中央に設けられており、スロットは内部流路に対しほぼ45°傾いており、さらにスロット出口近傍は曲面形状となっている。

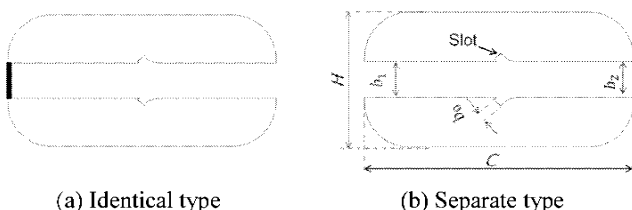


Fig. 1 Thruster model diagram

シンセティックジェット噴出時に流れはコアンダ効果によって円柱曲面噴流となる。特に(b)の噴出・吸入口分離型推進器モデルでは主に推進器後方から流出し、吸引時にはポテンシャル流れ同様、流れ場全体から吸い込むため前方、後方の両方から流入するため、時間平均をすると推進器内部には一方向流れが形成されることになる。したがって、前方が吸入口、後方が噴出口とみなすことができる。本研究では噴出・吸入口分離型推進器モデルで得られた結果と前方を塞いだ噴出・吸入口同一型モデル(図1(a))の結果とを比較した。

図2に計算領域および境界条件を示す。数値シミュレーションの境界条件として主流並びに推進器噴流出口(スロット)では流速を与え、計算領域出口境界では圧力一定条件を与えた<sup>(6)</sup>。図2の上下壁面はslip境界として計算を実行した。ところで本研究における推力評価は推進器の中央を中心と置くと、 $x/C = -2, 6$ をそれぞれ検査面として運動量並びに圧力から求めており、この位置では流れが定常になると仮定して推力を算出した。ここでは噴流速度  $U_0 = 8.0$  [m/s]、噴流速度とスロット出口幅に基づくレイノルズ数  $Re = 1058$  の結果について述べる。

### 3. 結果および考察

図3に本研究で提案する2つのシンセティックジェット推進器モデルのフローパターンを示す。(a)は噴出・吸入口同一型、(b)は噴出・吸入口分離型の時間平均速度ベクトルである。(a)、(b)ともに無次元主流速度  $Ub_1/2U_0b_0 = 0.5$ 、無次元ストローク  $L_0 = 30$ 、推進器出口ストローク  $L_2 = 3.75$  における流れ場で(i)は最大噴出時、(ii)は最大吸引時の様子である。(i)の最大噴出時において(a)、(b)両者のスロット下流は類似の流れ場になっており、推進器下流でも噴流状の流れを形成していることから推力の発生が期待できる。また、(b)では推進器前方からよどみ圧とエントレインメントによる流入が見られる。(b)の最大吸引時(ii)において、(a)では出入口が1つであるため後方のみから流体を吸い込んでいるのに対して、(b)では主に前方から吸い込んでいる様子が明らかである。なお、本条件では推進器出口でもシンセティックジェット発生条件<sup>(7)</sup>である  $L_2 > \pi$  を満足しているため、(a)、(b)のいずれにおいても最大吸引時にもかかわらず推進器下流に噴流形成が確認される。

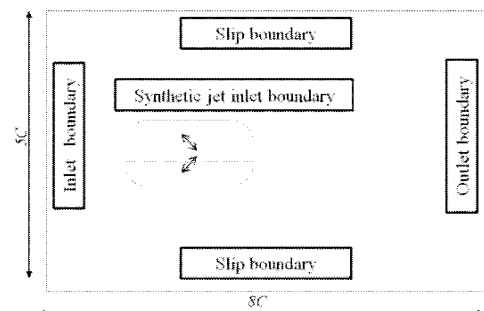


Fig. 2 Numerical simulation domain and boundary condition

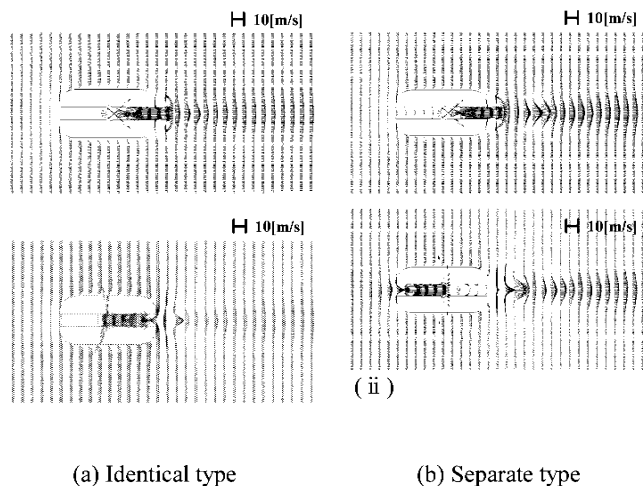


Fig. 3 Velocity vector field with maximum suction and maximum ejection

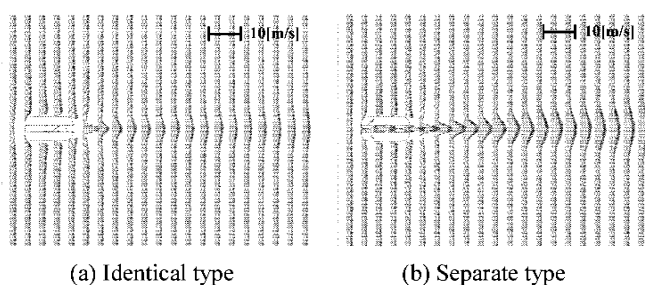


Fig. 4 Time-averaged velocity vector

図4は図3と同条件で得られた時間平均速度ベクトルである。(a)は噴出・吸入口同一型、(b)は噴出・吸入口分離型である。(b)では推進器内部を貫通する流れが生成され、推進器下流には(a)と比較してより明確な平均流形成が見られ、噴流状の速度分布が確認できる。ちなみに $x/C=2.0$ における噴流中心速度は(a)が $u/U=1.60$ なのに対して、(b)  $u/U=2.65$ と約1.7倍であった。この時に物体に働く推力係数は(a)噴出・吸入口同一型で $C_F=-0.11$  (抗力)、(b)噴出・吸入口分離型では $C_F=2.97$ である。単純な比較はできないが、予備計算で得られた物体抵抗、(a)  $C_F=-0.69$ 、(b)  $C_F=-0.45$ を考慮しても噴出・吸入口分離型の方が実質的に大きな推力が得られるものと推察される。

図5に噴出・吸入口分離型の推力特性を示す。横軸は無次元主流速度  $Ub_1/2U_0b_0$ 、縦軸は流速とスロット出口幅に基づく推力係数  $C_F=F/2\rho b_0U_0^2$  であり、パラメータは無次元ストローク  $L_0$  である。なお、参考のために連続噴流での推力特性も同図に示す。いずれの場合も右下がりの特性を有していること、シンセティックジェットの特性曲線は無次元ストローク  $L_0$  に依存し、特に無次元主流速度が小さい領域では  $L_0$  が大きくなるにしたがって推力が大きくなる傾向にある。また、無次元主流速度が小さい領域ではシンセティックジェットの推力が連続噴流の推力よりも大きい。無次元主流速度が大きくなると連続噴流の推力がシンセティックジェットを上回る。

#### 4. おわりに

本研究ではシンセティックジェットを利用した液体輸送システムについて、推力特性を用いて評価した。主な結果を以下に示す。

- (1) 噴出・吸入口同一型並びに噴出・吸入口分離型推進器モデルでシンセティックジェットを利用して推力が生成されることがわかった。

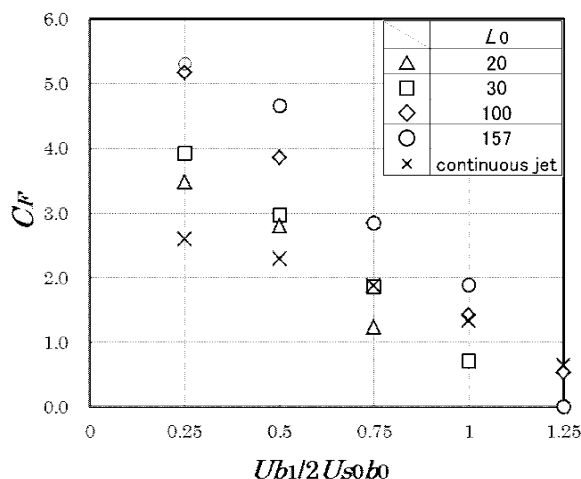


Fig. 5 Thrust characteristic diagram

- (2) コアンダ効果を用いて流れの方向を制御した噴出・吸入口分離型の下流では噴出・吸入口同一型と比較して大きな噴流中心速度を得ることができた。
- (3) シンセティックジェットの推力特性を示し、連続噴流の推力特性と比較した。

#### 引用文献

- (1) Whitehead, J. and Gursul, I., AIAA Journal, Vol. 44, No.8 (2006), pp.1753-1766
- (2) M. Amitay et al. AIAA Journal, Vol. 39, No.3 (2001), pp.361-370
- (3) Tensi, J. et al, Journal of Visualization, Vol.5, No.1 (2002), pp.37-44
- (4) Duvigneau, R. et al., ASME J. Fluids Engineer., 2007, 129, 825-833.
- (5) You, D. and Moin, P., Annual Research Briefs 2007, Center for Turbulence Research, 311-321.
- (6) Smith, B. L. and Glezer, A., 1998, 10(9), 2281-2297.
- (7) Holman, R. and Utturkar, Y., AIAA Journal, 2005, 43, pp.2110-2116, 2005.
- (8) Koichi, et al. , Journal of Fluid Science and Technology 6(4), 425-436, 2011

#### 査読付論文

なし

#### 査読付国際会議

1. Donghyuk Kang, Daichi Oka, Naoto Kawamura, Kazuhiko Yokota and Kotaro Sato, A NEW PUMP/ THRUST WITH AN ASYMMETRIC FLOW CHANNEL EXCITED BY A RECIPROCATING PISTON, 5th International Symposium on Fluid Machinery and Fluids Engineering (ISFMFE 2012)
2. Koichi Nishibe, Kotaro Sato, Donghyuk Kang and Kazuhiko Yokota, Investigation on a synthetic jet actuator using bubble produced by electric discharge, Int. Conf. on Jets, Wakes and Separated Flows September, 2013, Nagoya (発表予定) 他2編

#### 学会発表

1. 東美佳, 西部光一, 横田和彦, 佐藤光太郎, 壁面近傍におけるシンセティックジェットの流動特性に関する一考察, 日本混相流学会年会講演会 2012 (千葉), 2012.8.10
2. 田中雄貴, 西部光一, 佐藤光太郎, 横田和彦, シンセティックジェット推進に関する基礎研究, 日本機械学会流体工学部門講演会講演論文集 (京都), 2012.11.18
3. 藤原万理恵, 姜東赫, 島村泰輔, 横田和彦, 佐藤光太郎, 離散渦法によるシンセティックジェット流れのシミュレーション, 日本機械学会関東支部第19期総会講演論文集 (東京), 2013.3.15 他3編

### 1.3.3. 微生物による水素ガス生産 –新規ニトロゲナーゼを用いた水素ガス生産– Hydrogen production by a novel nitrogenase from CO-oxidizing bacterium

小野寺 一清

志澤 泰彦 (日本大学短期大学部 生物資源学科)

Kazukiyo ONODERA

Yasuhiko SHIZAWA (Dept. of Bioresource Science, Nihon University Junior College)

**Keywords:** Hydrogen production, *Streptomyces thermoautotrophicus*, Nitrogenase, Bioreactor

#### 1. 緒言

水素ガスを微生物の力を使って、効率的に生産することを目指し、SMBCでの研究を始めて10年になる。その間には、東日本大震災による原子力発電所の事故を経験し、われわれが今後の社会におけるエネルギー問題について議論する必要性が高まった。水素ガスによるローカルなエネルギー消費型の社会基盤の育成が期待されている。そのためには、水素発生のための技術基盤が必要となる。そういった意味では、われわれが、取り上げた微生物の機能を利用するシステムは、大変意義深いものであると考えている。

SMBCにおける研究では、主に土壤中に生息する微生物の中から、窒素固定を行うことのできる好気性細菌のうち水素を発生する活性を有する菌株の単離を試みたところ、培養気相に効率よく水素ガスを産生する菌株としてYTK-1を得ることができた。(独立行政法人製品評価技術基盤機構NITEに菌株をYTK-1として受託登録済み)

微生物による水素ガス産生では、有機物のエネルギーが必要となり、結果的にCO<sub>2</sub>を排出することになる。真にクリーンな水素ガスの産生のためには、微生物の酵素だけによる触媒を構築する必要がある。そこでわれわれは、窒素固定菌のニトロゲナーゼによる

$N_2 + 6H^+ + 6e^- + 12ATP + 12H_2O \rightarrow 2NH_3 + 12ADP + 12Pi$ の反応に着目した。

空気中の窒素を還元して、アンモニアを生成する反応を窒素固定といい、工業的にはハーバー・ボッシュ法によって行われる。これが近代の化学工業(1913)の始まりである。これと同じ反応を行う酵素をニトロゲナーゼという。多くの窒素固定菌がこの酵素を持っている<sup>1)</sup>。

ニトロゲナーゼは Component I と Component II とに分離できる。活性測定用反応液には dithionite(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)を還元剤として、Mg-ATPをエネルギーとして加えるので下記の反応は不可逆となる。

$N_2 + 6H^+ + 6e^- + 12ATP + 12H_2O \rightarrow 2NH_3 + 12ADP + 12Pi$   
この反応だけでなく、アンモニア合成と同時に反応液中のプロトンが還元されて、水素ガスが生成される。

$2H^+ + 2e^- + 4ATP + 4H_2O \rightarrow H_2 + 4ADP + 4Pi$   
水が分解されて水素が発生していることは、D<sub>2</sub>O から D<sub>2</sub> が生成されることで以前から確認されている。生化学の反応としては次のように表現される。

$N_2 + H_2O + nATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + nADP + nPi$   
ここで n の値はどの微生物から得られたニトロゲナーゼによるかにより変化する。

ニトロゲナーゼは 2 つのサブユニットから構成されており、そこに含まれる金属により Fe タンパク質、FeMo タンパク質と呼ばれる。

Fe タンパク質は細胞内で代謝により生産される電子を集める働きがあり、electron sink と呼ばれる。FeMo タンパク質は N<sub>2</sub> および H<sup>+</sup> を還元する活性中心である。Fe タンパク

質が Mg-ATP と結合して、ATP を分解して ADP を生成するときに発生するエネルギーを利用するとともに、FeMo タンパク質とドッキングして、電子を伝達することにより N<sub>2</sub> または H<sup>+</sup> を還元する。この反応は生化学反応の中でもっとも複雑なものの一つである。FeMo タンパク質には Fe と Mo を中心とする cofactor と呼ばれる金属錯体がありこれは FeMo cofactor と呼ばれている (Fig.1)<sup>2)</sup>。Fe タンパク質には 1 個の 4Fe4S cluster があり、これは鉄-硫黄タンパク質によく見られるものである。FeMo タンパク質には 2 個の金属-硫黄 cluster があり、それらは P cluster および FeMo cofactor である。P cluster は 8 個の Fe を含み、後者は 1 個の Mo と 7 個の Fe を含んでいる。ドッキングの際に電子はまず P cluster に伝達され、その後 FeMo cofactor に伝達される。FeMo cofactor は基質である N<sub>2</sub> の結合部位と考えられている。このとき ATP は分解されて ADP となる。現象論的には以上のように説明されているが反応の機構は明らかではない。これらの基質の中で注目すべきものは、H<sup>+</sup>、CH≡CH である。H<sup>+</sup> は 1 電子還元で H<sub>2</sub> を生成し、CH≡CH は 2 電子還元で CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub> を生成する。この反応はニトロゲナーゼ活性の簡便な活性測定法としても用いられている。また一方では CO (一酸化炭素) はニトロゲナーゼの非拮抗的阻害剤であることが知られている<sup>3)</sup>。もし CO と O<sub>2</sub> の存在下で生育する窒素固定微生物があれば、これまで知られたニトロゲナーゼとは異なる性質を持つことが期待される。現在までによく知られたニトロゲナーゼは極めて酸素に弱く酸素の無い嫌気条件でしか活性をもたない。このようなバイオリアクターに不利なニトロゲナーゼとは性質の異なるニトロゲナーゼをもつ微生物を検索した。このような微生物は実際に多種単離され、これらを carboxydrotroph という<sup>4)</sup>。この中でもとりわけ興味深い菌として、*Streptomyces thermoautotrophicus* がある。化学独立栄養細菌であるこの菌は、CO を唯一の炭素源として、生育し空気中の窒素を固定する。つまり CO によって阻害されず、かつ酸素に耐性の新しいニトロゲナーゼ系をもつ。(Fig.2)

昨年度までに報告したように、この菌のニトロゲナーゼ系を用いることで、水素を発生させることについては、その実効性が示された。しかしながら、酵素を菌から分離するためには、菌を大量に培養する必要があり、それには多大な労力と危険が伴い、実用的ではない。つまり微生物を培養することなく、水素ガス産生を可能にするシステムを構築することを目指すことにした。

昨年度の研究で、St2 タンパク質については、遺伝子クローニングが終了し大腸菌組換えタンパク質として発現させ、熱処理による簡易な精製によって SOD(superoxide dismutase)活性のある組換えタンパク質として調製することが可能となった。今年度は、本ニトロゲナーゼ系の本体である St1 を構成する種々のタンパク質を大腸菌につくらせて、それらの組合せにより水素ガス産生を可能にすることがゴールである。

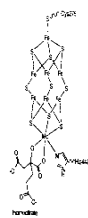


Fig.1 Structure of FeMoco active center of nitrogenase<sup>2)</sup>

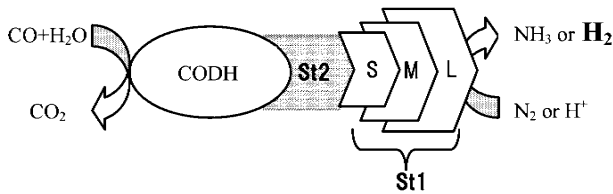


Fig.2 *S.thermoautotrophicus* のニトロゲナーゼ系模式図

St1 は、ニトロゲナーゼ活性を持つ本体である。ヘテロ 3 量体で構成され、分子量の大きいものから順に sdnL, sdnM, sdnS と呼ばれている。

## 2. 実験結果

### 1) St1 (SdnS) と St1 (SdnM) の組換え発現

sdnS と sdnM の構造遺伝子をそれぞれ、pET11a 発現ベクターにクローニングし、大腸菌 BL21(DE3)に導入後、IPTG にて発現を誘導した。これを、リン酸バッファー中で超音波処理し細胞内に発現した組換えタンパク質の溶解度を確認した。(Fig.3) SdnM については、約 80%が可溶性画分に画分された。しかしながら、SdnS については、ほぼ不溶性画分に画分された。一般的には、不溶性の状態でのタンパク質としての機能発現は期待できないため、SdnM と SdnS を同時に大腸菌の菌体内に発現させ、翻訳と同時に複合体形成させることを試みた。

M 1 2 3 4

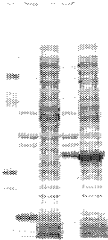


Fig.3 大腸菌に発現させた r-SdnS. と r-SdnM の溶解性

Lane1:r-SdnS を発現させた大腸菌の菌体を超音波破砕後、不溶であった画分  
Lane2:r-SdnS を発現させた大腸菌の菌体を超音波破砕後、可溶であった画分  
Lane3:r-SdnM を発現させた大腸菌の菌体を超音波破砕後、不溶であった画分  
Lane4:r-SdnM を発現させた大腸菌の菌体を超音波破砕後、可溶であった画分  
M: 分子量マーカー

### 2) St1(SdnM/SdnS)の組換え発現

封入体化した SdnS を機能性の可溶性タンパク質として発現させる目的で、

*Streptomyces thermoautotrophicus* のゲノム上の遺伝子配列を維持したまま、pCold I プラスミドベクターに sdnM と sdnS をタンデムに挿入した。pCold I ベ

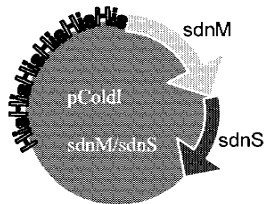


Fig.4 sdnM/sdnS の共発現用ベクター

クターは、コールドショック遺伝子である *cspA* 遺伝子のプロモーターを利用したプラスミドで、これによって形質転換された大腸菌を 37°C で培養後、15°C に温度をシフトさせ大腸菌由来タンパク質の発現を抑制した状態で、組換え遺伝子の誘導発現を期待できるものである。構築したプラスミドは、Fig.4.の通りである。これを DH5 $\alpha$  または BL21(DE3)宿主菌に導入して、sdnM/S の共発現を試みたところ、BL21(DE3)に良好な発現が認められた。また、SdnM の N 末には、His-tag を導入しているため、Co<sup>2+</sup>のキレートカラムで簡易に精製することができる。予想どおり、大腸菌の菌体内に発現した SdnM と SdnS は、可溶性の各分に溶出し、imidazole を含むリン酸バッファーによりカラムからの溶出するときに SdnM だけでなく、SdnS とともに溶出された(Fig.5)。このことは、大腸菌の菌体内に発現させたそれぞれのサブユニットが菌体内で発現後再構成された結果であると考えられる。SdnS 単独では可溶化しなかったが SdnM との共発現によって複合体となり、可溶化した可能性が高い。

M 1 2 3 4 5 6 7

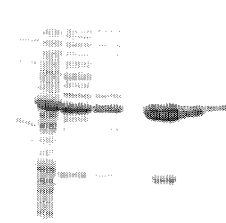


Fig.5 His-Tagged SdnM/SdnS の精製

Fig.4 のプラスミドを BL21(DE3)に導入し低温で 24 時間発現誘導後、菌体を超音波処理した可溶性画分を HisTalon カラムにて精製した。Lane1:total cell lysate, Lane2:可溶性画分, Lane3:不溶性画分, Lane4~7 HisTalon カラムに吸着した His Tagged-SdnM を imidazole buffer で溶離した画分。Lane 5 では、SdnS がともに溶出していることが分かる。M:分子量マーカー

## 3. 考察

*S.thermoautotrophicus* は、CO の還元力によって得られる電子を flow させて窒素固定に用いている。われわれが目指すものは、この新しいニトロゲナーゼ系を水素ガス生産に特化した再構成系である。系全体を部分に分けて、その部分的な機能解析もまた科学的には大変重要であるが、生物体内での統合された機能性を局部分品の足し算で再現できるかという問題が確かにある。今後の研究では、ニトロゲナーゼ系としての機能維持または強化も視野に入れるべきであろう。また、この微生物の細胞抽出液に、riboflavin と空気と可視光を作用させると分子状窒素がアンモニアへと還元されることが分かっている、これは光エネルギーでニトロゲナーゼ系が機能することを示している<sup>5)</sup>。われわれの新しいニトロゲナーゼ系の大きな課題は、酵素の機能発現に ATP の関与が必要となることがあげられる。仮に、エネルギー供与体としての ATP を光エネルギーで代用することが可能となれば、まさに人工の水素合成システムの構築という夢の技術につながるのではないかと考えている。

## 4. おわりに

このようにニトロゲナーゼのバイオリクターが作成されたので、ニトロゲナーゼの研究は多くの研究者に解放されたことになり、この酵素反応の機構の研究も進展が期待される。ニトロゲナーゼが水を分解して水素が発生されるのは、アンモニアを生成する反応の一部であると考えられる(これは私の個人の仮説ではあるが)、今回発表した遺伝子の組換え DNA 技術により作られるタンパク質を組み合わせることにより、水素ガスを常温で生産することは近い将来成功すると思っている。SMBC「地球上のバイオマスを利用する水素ガス生産」で発見した新しい窒素固定菌については、最近発見された新しい触媒の発見<sup>6)</sup>により実用化の可能性が開けたと考えられる。BERC では Bioengineering を使いバイオリクターを作成できたことは、水素ガスの常温下で生産できる日も近いと考えている。長年にわたり研究を支援していただいたことを感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 佐藤健太郎: 化学 100 年の夢窒素固定を追う 現代化学 489 pp.18-21 2012
- 2) Louis Noodleman, et al: Quantum Chemical Studies of Intermediates and Reaction pathways in Selected Enzymes and Catalytic Synthetic Systems, Chem.Rev, 104, pp.459-508, 2004
- 3) J.R.Postgate,:"The Fundamentals of Nitrogen Fixation," p.39, Cambridge University Press 1982
- 4) Ortwin Meyer et al: Biology of Aerobic Carbon Monoxide-Oxidizing Bacteria, Ann.Rev.Microbiol. 37,pp277-310,1983
- 5) Markus Ribbe et al :N<sub>2</sub> Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couples N<sub>2</sub> Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O<sub>2</sub> by a Molybdenum-CO Dehydrogenase, J.Biol.Chem 272 ,pp26627-26633,1997
- 6) 堀田雅一郎: 二酸化炭素を利用した水素貯蔵に向けて 一水中常温常圧で行う二酸化炭素の水素化とギ酸分解による高压水素の放出ー現代化学 503 pp.42-46 2013

## 発表論文

Y Shizawa, K.Onodera et al :Construction of a Small Bioreactor Using Nitrogenase of *Streptomyces thermoautotrophicus* Advances in Medicine and Biology. Volume 62 pp.123-136 2013

### 1.3.4. 酵素反応マイクロリアクターの反応成績

#### Reactor Performance on Microreactor with Enzyme

長本 英俊 (工・環境エネルギー化学科)、大島 榮次 (東工大)  
Hidetoshi Nagamoto and Eiji Oshima (TITech)

**Keywords :** Micro-reactor, Reactor performance, Enzymatic reaction

#### 1. 緒言

マイクロリアクター内で化学反応を行うと、通常の間分式反応器や管型反応器と比べて高収率が得られるという報告があり、狭い反応流路での反応物質の速やかな混合によることが明らかとなってきた。酵素や微生物の反応の場合にも反応促進の報告があり、マイクロ流路の中で流体中に大きな剪断力が働くことなどが原因と推測されているものの、その理由は未解明である。一方、流路の材料によって、生体物質の分離特性が異なるという報告もある。

我々も Y 字流路のマイクロリアクターに酵素 catalase を用い、過酸化水素の分解反応に応用し、間分式の反応器と比べて円形流路のマイクロリアクターは数倍以上に反応速度が増大することを示した。今回物質移動速度に着目して、数値計算を行って検討した。

次に、他の要因を探るために、酵素-補酵素系による酵素反応を行い、分子量の大きく異なる酵素、補酵素および基質の3者の組み合わせを変えて、物質移動や流れの剪断力による反応速度への影響を検討した。

#### 2. 反応シミュレーション

Catalase による過酸化水素の分解反応について、矩形流路である Y 字流路マイクロリアクターでの反応として取り扱った。2つの流れの合流部を反応器入り口として、一方を酵素溶液、他方を基質溶液とし、層流の流れの中での反応とした。矩形流路中の流れの速度分布は次式を用いた。

$$v(x, y) = \frac{\Delta p}{\mu L} \left\{ \frac{1}{2} (b^2 - y^2) + \frac{16b^2}{\pi^3} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n-1)^3} \cos \frac{(2n-1)\pi y}{2b} \frac{\cosh \frac{(2n-1)\pi x}{2b}}{\cosh \frac{(2n-1)\pi a}{2b}} \right\} \quad (1)$$

ここで、 $x, y, a, b$  は、それぞれ流路中心を原点とした  $x$  座標 (幅)、 $y$  座標 (深さ) および幅の半分、深さの半分である。 $\Delta p$  は長さ  $L$  の流路による圧力損失で、

$$\Delta p = \frac{16\mu L \bar{u}}{b^2 K} \quad (2)$$

式中の  $K$  は流路の幅と深さによって決まる定数で、

$$K = \frac{16}{3} - \frac{1024b}{\pi^3 a} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \tanh \frac{(2n-1)\pi a}{2b} \quad (3)$$

反応速度と断面方向の拡散を考慮した物質収支式は、次式となる。

$$v(x, y) \frac{\partial C}{\partial z} - D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) = R(x, y, z) \quad (4)$$

ここで、 $C, R$  は基質濃度、基質の反応速度 (生成を正とする) を表す。反応速度式として、間分式反応器の実験結果に基づき、一次速度式を用いた。

$$-R = 3.27 \times 10^{-4} C \quad (5)$$

(5)式には、酵素濃度が見かけの速度定数に含まれている。

#### 2. 1 モデル

拡散する物質は、基質、酵素、生成物であるが、酵素 Catalase のモル分子量(250,000)は大きく、その拡散係数は十分小さいものと考えられるため、ここでは無視した。基質の溶液と酵素溶液が合流した地点を  $z=0$  として、そこでの境界条件は

$$\begin{aligned} C(x, y, 0) &= 2C_0 & -a \leq x \leq 0, -b \leq y \leq b \\ C(x, y, 0) &= 0 & 0 < x \leq a, -b \leq y \leq b \end{aligned} \quad (6)$$

流路壁での境界条件は

$$\begin{aligned} \frac{\partial C(x, y, z)}{\partial x} &= 0 & x = \pm a, -b \leq y \leq b \\ \frac{\partial C(x, y, z)}{\partial y} &= 0 & y = \pm b, -a < x \leq a \end{aligned} \quad (7)$$

反応速度は、酵素濃度の仮定より

$$\begin{aligned} R(x, y) &= 0 & -a \leq x \leq 0, -b \leq y \leq b \\ R(x, y) &= -6.54 \times 10^{-4} C & 0 < x \leq a, -b \leq y \leq b \end{aligned} \quad (8)$$

これらの二次元拡散方程式および境界条件を Forward-Euler 法で解き、得られた濃度分布より反応率を計算した。

#### 2. 2 計算結果と考察

Fig. 1 に間分式反応器の反応率の経時変化を示すが、上記のモデルを用いた計算結果は、用いたマイクロ流路のサイズに関係なくほとんど一致した。このことは、流路サイズが  $500\mu\text{m}$  であっても基質の拡散速度が反応速度に比して十分大きいためと推論できる。Thiele modulus,  $\phi$  の値も 0.14 と小さく、触媒有効係数がほぼ 1 となり、基質と酵素の混合の様式はマイクロリアクターと間分式反応器とは異なるものの反応率の経時変化は同一のものとなる。

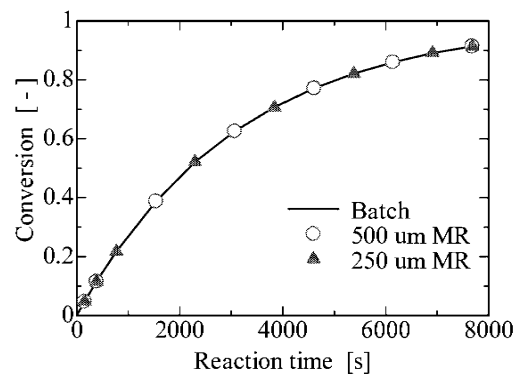


Fig. 1 Time course of hydrogen peroxide

Fig. 2 に実験結果を示すが、マイクロリアクターの反応率は反応開始初期に急激に上昇していることが分かる。この急上昇は、サイズが小さい程大きい。このことは、2つの液が合流点からある程度の区間で何らかの現象が起こっているも



のと推察される。

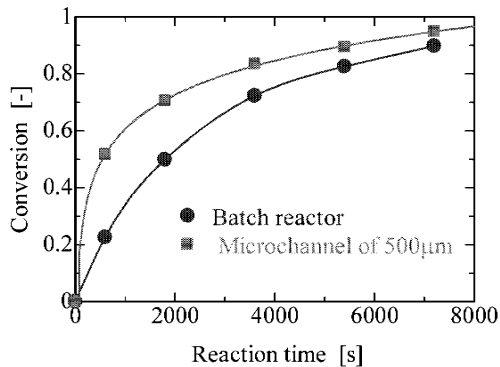


Fig. 2 Comparison of conversions

もしそうであれば、異なった酵素-基質の反応系でも同じような結果が観測されるはずであり、次に酵素-補酵素-基質の反応系を用いて実験をおこなった。

### 3. 酵素-補酵素系反応

#### 3.1 反応実験

酵素-補酵素反応系として乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase (LDH) と nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) によるピルビン酸からの乳酸生成反応<sup>2)</sup>を選択した。反応に関与する分子の分子量の桁が、ピルビン酸(88.06)、NADH(709.40)、LDH(22~24万)と異なるからである。

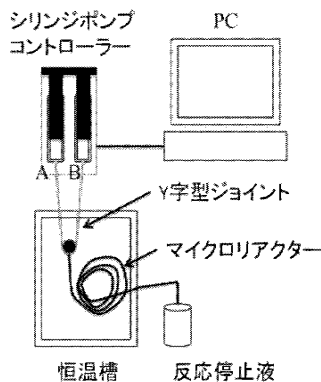


Fig. 3 Experimental apparatus

実験装置の概略を Fig. 3 に示す。反応に用いる 2 つの溶液 A, B は、3 成分のうち一つを溶液 A に、残りの 2 成分を溶液 B として、3 つの場合を比較した。I が酵素単独、II が補酵素単独、III が基質単独の場合を表す。A, B の溶液の濃度は、混合後の濃度が、[LDH] = 0.25Unit/ml, [NADH] = 0.60mM, [ピルビン酸] = 3.0mM となるように調製した。A, B 溶液の供給流量は同一とし、Re 数を変えずに反応時間を変えるために用いる管の長さを 25cm から 2.0m の範囲で変えた。反応液の pH を至適の 7.0 とするために中性リン酸溶液を用いた。また反応を停止するために pH11 のホウ酸緩衝液を用いた。

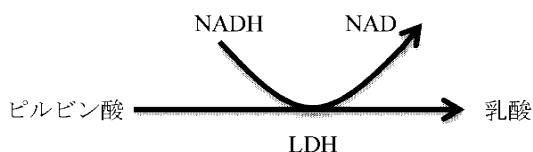


Fig. 4 Reaction scheme

Fig 4 に反応スキームを示す<sup>2)</sup>。

マイクロリアクターでの反応と比較するために、回分式反応器での反応を行った。反応温度は 20°C である。

反応率は、NADH のものを用いた。NADH は UV 分光光度計を用い、340 nm の吸光度から計算して求めた。

### 3.2 実験結果と考察

#### (1) 回分式反応器

NADH の反応率の経時変化から求めた反応次数は 0.08 でほとんどゼロ次といえる。NADH 初濃度を変えた実験より、ゼロ次であることを確認した。

#### (2) 円管流路マイクロリアクター

マイクロリアクターの流量を 4.42ml/h (500 µm ; 250 µm では 1.10 ml/h)としたときの NADH の反応率を Fig. 4 に回分式のものと一緒に示す。

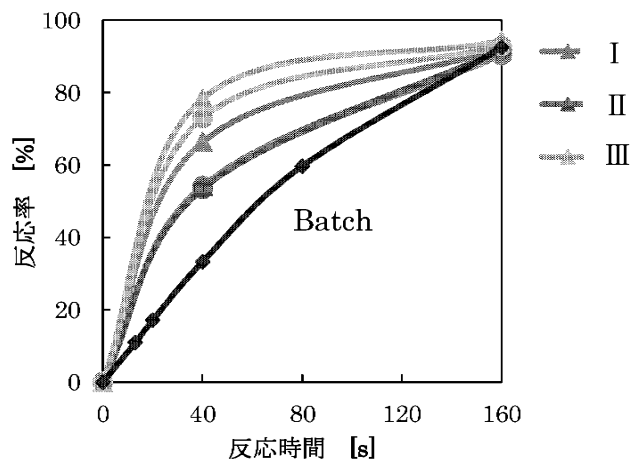


Fig. 4 Comparison of NADH conversions

図中の●はサイズが 500 µm の場合、▲は 250 µm の場合の実験結果である。いずれの場合も、マイクロリアクターでの反応率が高く、初期の立ち上がりの部分で差がついている点は、Catalase の場合と同一であった。

反応系は、I が酵素単独系、II が補酵素単独系、III が基質単独系を表すが、反応率の大きさは基質単独系、補酵素単独系、酵素単独系の順となった。この順番は、分子量、即ち拡散係数の順と一致しており、物質移動のし易さが関係していることを示唆する。しかしながら、円管のサイズによる差が酵素単独系以外ほとんど見られないことから、定量的な物質移動の影響とは断定できなかった。

### 4. 結論

Y 字型マイクロリアクターでの酵素反応速度が、回分式反応器での反応速度と比して大きいことを、二次元拡散方程式を用いてシミュレーションした結果、実験条件では差が現れなかった。拡散混合が十分迅速なことが理由であった。

LDH と NADH の酵素-補酵素での反応実験を行い、マイクロリアクターでの反応速度が確認された。拡散が影響していることが示唆されたが、猶も詳細な検討が必要であろう。

#### 引用文献

- 1) 尾曲隼, 工学院大学卒業論文, (2009); 荻野他, 化学工学学会第34回秋季大会, W314 (2001).
- 2) E.Simonet et al, *J. Phys. Chem.*, 100,19148-19152

#### 研究発表

- 1) 長本、小尾、大島、化学工学学会横浜大会 (8月, 2012)
- 2) 長本、尾曲、大島、化学工学第 44 回秋季大会 (東北大学、9月, 2012) 「マイクロ流路内での酵素反応の促進効果」

## 1.4. バイオミメティクス・ロボティクス

### Bio-mimetics and Robotics

#### 1.4.1. 昆虫の機能に基づくマイクロ機械とそのロボット化に関する研究

鈴木 健司, 高信 英明, 三浦 宏文

#### 1.4.2. 生物の水中運動メカニズムの解明とそのスマート機械による模倣

水野 明哲, 伊藤 慎一郎, 金野 祥久, 飯田 明由 (豊橋技術科学大学工学部)

本課題は、生物の優れた機能のメカニズムを工学的に解明し、その機能をスマート機械により実現することを目的としている。本課題は2つの小テーマにより構成されている。小テーマ1.4.1では、微小な生物である昆虫の機能に着目し、マイクロファブリケーション技術を用いてその機能を実現する機構や表面構造、センサ、アクチュエータ等を製作し集積化することにより、小型自立移動ロボットを開発することを目標としている。さらに、開発したロボットを、家庭内での監視や防犯、被災地、狭所、自然環境等での情報収集に応用することを目指す。小テーマ1.4.2では、生物の水中運動のメカニズムを流体力学的に解析し、その機能をスマート機械により模倣することを目標とする。特に、ウミガメやペンギンのように胴体の後方に推進機構を持たず、2対のヒレを横に配置した生物の遊泳を研究対象とし、人間との協調動作をしやすくすることで、水中ロボットによるリハビリテーション支援、スポーツレクリエーション支援等への応用を目指す。マイクロスケールや水中という人間とは異なる環境で動作する機械やロボットは、その環境で最適化された生物に学ぶことによって、より合理的で効率のよい設計指針が得られると考えられ、実用的なスマート機械の開発につながる事が期待される。また、ロボットによる生体機能の実現を通して、生物の構造や動作原理の解明にもつながる可能性がある。

小テーマ1.4.1では、サイズの小さい昆虫に特有な運動機能や、反射などを利用した自律分散型の制御システムに着目し、MEMS技術を用いて昆虫の構造や機能を集積化して小型ロボットに埋め込むことにより、マイクロスケールに適した新しいロボットの開発を目指している。前年度までに、撥水性の脚を持ち、表面張力を利用して水面を移動するアメンボ型ロボット、アリの脚の付着機構を規範とした壁面歩行ロボット、コオロギの感覚毛を規範とした気流センサをロボットの表面に集積化し、気流の強さに応じて行動するロボットなどを開発してきた。

2012年度は、トンボの羽ばたき飛翔に着目し、4枚翼による自立飛翔が可能な羽ばたき飛翔ロボットの開発を行った。昆虫の中でも、トンボは4枚の翅を筋肉により複雑に動かすことにより、低レイノルズ数領域に特有なホバリングや急旋回などの高度な飛翔が可能である。また、前後の翅の羽ばたき位相差を変えることで、状況に応じて飛び方を変化させていることが知られている。本研究では、トンボの飛翔を模倣するために、まず翅の共振を利用することで、ロボットに搭載したバッテリーによる低電圧で効率の良い飛翔が可能な4枚翼の羽ばたき飛翔ロボットを開発した。次に、このロボットの前後の翅の位相差を変化させて飛翔実験、風洞による流体力計測、流れの可視実験を行い、羽

ばたき位相差が飛翔特性に及ぼす影響を調べた。

共振を利用したロボットについては、翅の根元にCFRPの薄板を用いることにより11Hz程度の低い羽ばたき周波数で共振を利用可能な翅を製作した。この翅をロボットに装着し、小型バッテリーにより4Vを印加したときに共振を発生させることにより、翅の振幅が約10度増加し、推進力を約15%増加させることができた。このロボットの前後の翅の位相差を変化させ、飛翔特性を調べた結果、位相差が0度のときは、上昇飛翔が可能であり、抗力と推進力が釣り合うときの揚力が最も高く計測され、前後の翅による流れの干渉も少なかった。この結果は実際のトンボの飛翔特性ともよく一致した。一方、位相差180度の場合は、ロボットは安定な飛翔には至らずに降下し、発生する流体力も低く、前後の翅による流れの干渉が見られた。このように羽ばたき位相差が飛翔特性に及ぼす影響を実験的に明らかにすることができ、飛翔実験、流体力計測、流れの可視化のそれぞれの結果の整合性が確認できた。

小テーマ1.4.2では、2012年度は(1)小テーマ1.4.1と連携してトンボ型羽ばたきロボットの流体力計測を行ったほか、2011年度からの継続で(2)群行動ロボットの実験システムの拡張および(3)羽ばたき運動の数値解析などに取り組んだ。(2)群行動ロボットの拡張に関しては、2011年度の水の中実験では3体以上では指示した通りに動作しない機体が生じたこと、水中通信および制御のアルゴリズムに起因する不具合もあることが分かっていた。3体以上では指示した通りに動作しない機体が生じた原因として、制御信号がロボットに正しく伝わりアクチュエータ(スラスト)も動作しているが、スラスト出力が不十分であるために適切に動作していない場合が多かった。そこで新たにスラストを開発し、これを搭載したロボットを作成した。旧スラストより強力なモータ(マブチRS-380PH)の出力を、クラウンギアにて減速し、スクリュープローペラに伝達する。ローペラ直径も昨年度より拡大した(20mm→30mm)。

新旧スラストの出力比較実験を行ったところ、新型スラストは旧型の約1.8倍の出力を有していることが分かった。強化したスラストを備えた水中ロボットでの単独水中試験を行ったところ、左右の旋回動作は意図通りに動くことが分かった。浮上動作では左右のスラストの推力差のために直上せず、斜めに浮上する結果となった。鉛直方向スラストを並列に制御できず、直列接続としたことが原因であり、電子回路の改造が必要である。

(3)羽ばたき翼の数値解析では、解析格子の改良および解析の上流化に取り組み、2011年度の問題点だった翼境界層付近の流れ場に非物理的な逆流が発生を抑制することに成功した。



# 1.4.1. 昆虫の機能に基づくマイクロ機械とそのロボット化に関する研究 Micromachine and Its Robotization Based on Functions of Insects

鈴木 健司, 高信 英明, 三浦 宏文

Kenji SUZUKI, Hideaki TAKANBU, and Hirofumi MIURA

**Keywords:** Biomimetics, Microrobot, Insect, Flapping flight, Resonance

## 1. 緒言

機械の寸法を小さくしていくと、体積に対する表面積の割合が増加するため、表面の機能が重要な役割を果たすようになる。また、スケールが小さくなれば、レイノルズ数が減少し、空中飛翔や水中移動の方法も変化する。このように、マイクロ機構の設計では、スケール効果の考慮が必要である。

微小な生物である昆虫は、羽ばたきを利用して空中を自由に飛翔し、ホバリングや急旋回など大型の鳥とは異なる高度な飛翔が可能である。本研究では、昆虫の中でも4枚の翅を筋肉により複雑に動かして高度な飛翔を実現しているトンボに着目した。トンボは前後の翅の位相差を変えることで、離陸やホバリングなどの優れた飛翔を行っている<sup>(1)</sup>。羽ばたき位相差が飛翔に与える影響を調べるために、これまでもいくつかのトンボ型のロボットが開発されているが<sup>(2)</sup>、実際に飛翔可能なロボットを用いて、はばたき位相差の影響を調べている研究は少ない。そこで、本研究では、まず、共振を利用して効率良く自立飛翔を行う4枚翼の羽ばたき飛翔ロボットを開発した。次に、このロボットの前後の翅の位相差を変化させて飛翔実験や風洞による流体力計測を行い、羽ばたき位相差が飛翔特性に及ぼす影響を実験的に調べた。

## 2. はばたきロボットと共振翅

羽ばたきロボットの機構を図1に示す。モータの回転運動をギヤで減速させ、シャフトによって前後に伝達する。この回転運動をてこクラック機構を用いて揺動運動に変換し、左右の翅が同時にはばたくようにした。クラック部分を調整することで、はばたき位相差を90 deg ずつ変えられるようにした。また本研究では、翅の根元に薄板を取り付けることで、ロボットに搭載した小型バッテリーで共振可能な低い固有振動数を持つ翅を考案した。製作した翅を図2に示す。薄板には質量0.046 g、厚さ0.4 mmのCFRP(Carbon Fiber Reinforced Plastics)を用いた。ロボットのはばたき時にこの薄板が1次の曲げ振動モードで共振することで効率良くはばたく。これに対し、薄板を付けていない翅も製作した。薄板を付けた翅を共振翅、薄板を付けていない翅を非共振翅

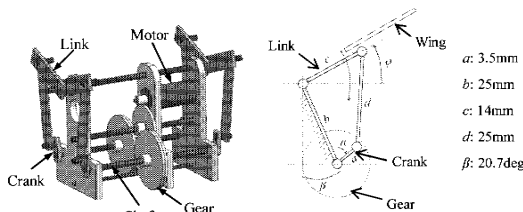


Fig.1 Flapping mechanism of the robot

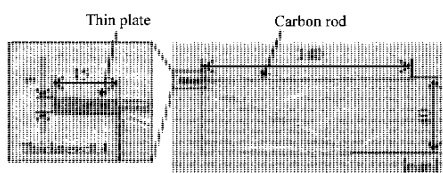


Fig.2 Resonant wing with a thin plate

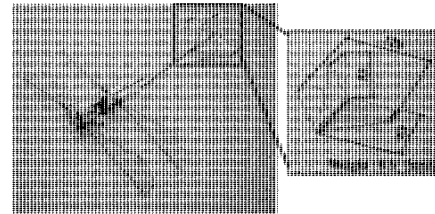


Fig.3 Flapping robot with resonant wings

と表記する。図1の機構に共振翅と尾翼を取り付けたロボットの全体図を図3に示す。

## 3. 翅の振動解析

製作した翅の特性を調べるため、共振翅と非共振翅の周波数に対する振幅の変化を計測した(図4)。共振翅の固有振動数は約11 Hzであり、このときの振幅は非共振翅と比べて10degほど大きくなることが分かった。次に、共振翅と非共振翅をそれぞれ4枚装着し、前後の翅を同位相ではばたかせた時の推進力を計測した(図5)。使用するバッテリーの満充電時の電圧である4Vを印加した時の推進力は、共振翅は10.0 gf、非共振翅は8.7 gfとなり、推進力は約15%増加した。以上のことから、翅の根元に薄板を取り付けた共振翅は、ロボットに搭載可能な小型バッテリーの電圧で効率良く流体力を発生できることが確認された。

## 4. 飛翔実験

前後の翅の位相差を後翅先行で90 deg ずつ変化させたロボットを、手で初速を与えて自由飛翔させ、高速度カメラを

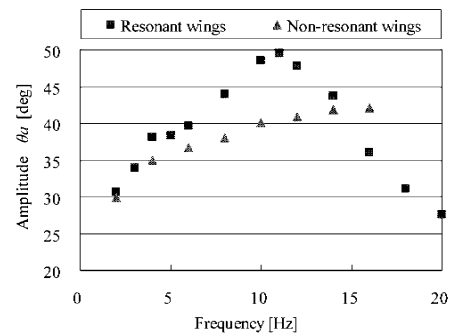


Fig.4 Resonant curves

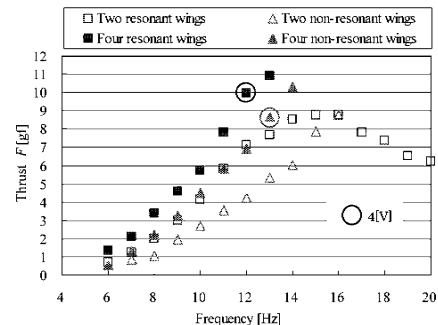


Fig. 5 Thrust forces of resonant and non-resonant wings

用いて飛翔軌跡を撮影した。位相差 0, 90, 180 deg のときの飛翔の軌跡をまとめたものを図 6 に示す。それぞれ 3 回ずつ実験を行った結果、位相差 0 deg のときは上昇飛翔、位相差 90 deg のときは水平飛翔が可能であるが、位相差 180 deg では安定した飛翔ができず、降下することが確認された。

### 5. 流体力計測と翅周りの流れの可視化

図 7 のように固定したロボットに風洞により 2.1m/s の流れを与え、各位相差で約 12Hz で羽ばたかせた時の揚力、抗力の測定値を図 8 に示す。この図から、揚力が高い位相差は 270~0 deg で、抗力が低い位相差は 0~90 deg であると判断できる。このため、揚力・抗力を合わせて考えた結果、抗力が 0 の（推進力と釣り合う）ときの揚力は位相差 0 deg のときが最大、位相差 180 deg が最小となることがわかる。

実際のトンボでも、同位相のはばたきは、位相差があるのはばたきよりも大きな流体力が得られ、離陸や上昇、また、逃避行動を行うときに使用していることが知られている。この結果と、本研究のロボットの飛翔傾向と流体力特性は一致することがわかった。

次に、スモークワイヤ法を用いて位相差 0, 180 deg 時の流れの可視化を行ったものをそれぞれ図 9 の(a), (b)に示す。位相差 0 deg では打ち上げ、打ち下げ共に、前後の翅の流れが互いに干渉していないのに対して、位相差 180 deg では打ち上げ、打ち下げ共に前翅と後翅が作った流れが互いに干渉し、流れが打ち消しあっていることが確認できた。

### 6. 結言

- (1) 共振を利用して低電圧で効率良くはばたくロボットを製作した。
- (2) 各はばたき位相差における飛翔実験と流体力の計測、流れの可視化で整合性が確認できた。
- (3) 位相差 0 deg のとき抗力に対する揚力が最も高く計測され、実際のトンボが使用する位相差の影響と一致した。

#### <参考文献>

- (1) Alexander, D. E., *The Journal of Experimental Biology*, Vol.109 (1984) pp.379-383.
- (2) Maybury, W. J. and Lehmann, F. O., *The Journal of Experimental Biology*, 207 (2004) pp.4707-4726.

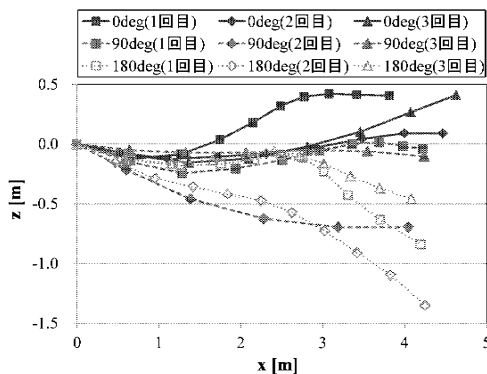


Fig.6 Flight path of the robot

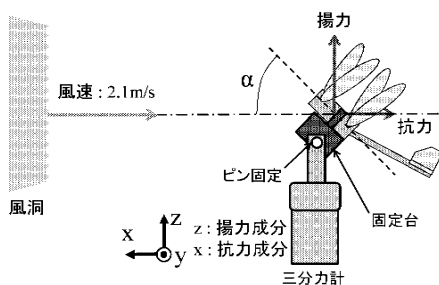


Fig.7 Experimental setup for measuring fluid forces

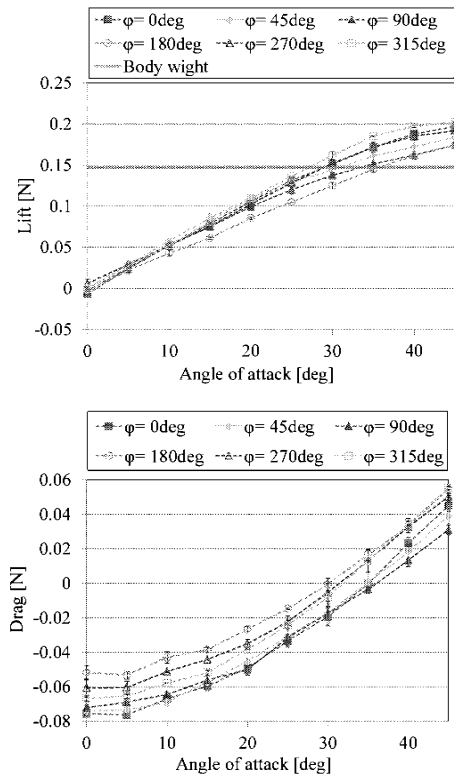


Fig. 8 Lift and drag curves

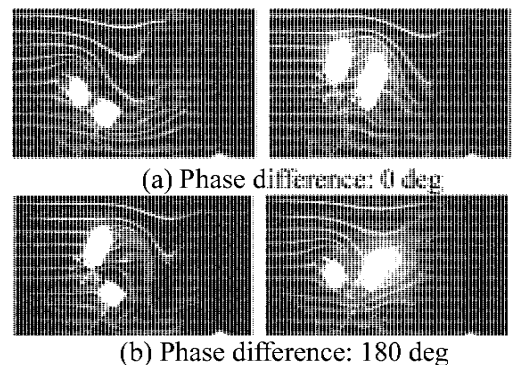


Fig.9 Flow visualization around the wings

#### 査読付き論文

- (1) Kensaku Kudo, Kenji Suzuki, Akihiro Nakamura, Shinichiro Ito, Hideaki Takanobu, Hirofumi Miura, Study on Resonant-Driven Flapping-Wing Robot, *Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms*, 3, 1 (2013) pp. 45-50.
- (2) 柏原稔樹, 野中昂平, 鈴木健司, 高信英明, 三浦宏文, MEMS 技術を利用した気流センサの研究, 計測自動制御学会論文集, 49, 4 (2013), 掲載決定.
- (3) 工藤憲作, 鈴木健司, 高信英明, 三浦宏文, 共振を利用したはばたき飛翔ロボットの研究, *日本機械学会論文集 C 編*, 78, 792 (2012) pp.2914- 2923.

#### 解説

- (1) 鈴木健司, 表面張力を利用した機能性表面の創成と機械設計, *トライボロジスト*, 57, 8 (2012) pp.540-546.

#### 学会発表

- (1) Kenji Suzuki, Biomimetic Water Strider Robots with Microstructured Hydrophobic Legs, *The 11th International Symposium on Advanced Technology (ISAT2012)*, 2012, pp.3-4.

他 5 件.

## 1.4.2. 生物の水中運動メカニズムの解明とそのスマート機械による模倣

### Investigation of motion mechanism of underwater creature and its implementation with smart machine

水野 明哲, 伊藤 慎一郎, 金野 祥久, 飯田 明由 (豊橋技術科学大学機械システム工学系)

Akisato MIZUNO, Shinichiro ITO and Akihisa KONNO

Akiyoshi IIDA (Dept. of Mech. Eng., Toyohashi Univ. of Tech.)

**Keywords:** underwater mechanism, biomimetics, smart machine

#### 1. 緒言

本課題は、人間を含む生物の水中運動のメカニズムを流体力学的に解析し、その機能をスマート機械により模倣することを目標とする。これに基づき、水中生物を規範とし、人間との協調動作を容易にした水中ロボットの開発を目指している。2012年度は、(1)小テーマ 1.4.1 と連携してトンボ型羽ばたきロボットの流体力計測を行ったほか、2011年度からの継続で(2)群行動ロボットの実験システムの拡張および(3)羽ばたき運動の数値解析などに取り組んだが、紙面の都合からここでは(1)と(2)を中心に報告する。

#### 2. 実験方法・装置

羽ばたきロボットの流体力計測についてははじめに述べるが、実験に用いた羽ばたき飛行ロボット (Fig. 1) の概要は 1.4.1 にて報告されているので、ここでは詳細を省略する。このロボットは、11Hz において翼根で翼が共振し、その共振を利用して羽ばたき振幅を大きくし、揚力を稼ぐ機構を有している。実験は羽ばたき振動数を 11Hz に限定して行った。

マーキングした壁近傍で手投げによってロボットを射出し、それを高速度カメラで撮影し、Fig. 2 に示すような画像を得る。この画像を解析し、ロボットの飛行速度および姿勢角度、羽根への迎角を求めた。手投げの初速による影響を考慮してマーカー前半部、後半部で姿勢角、速度を計測し、その結果をもとに風洞実験解析を行った。

風洞を使った流体力計測では自律飛行実測結果に従って風速を 2.1m/s とし、羽ばたきなしの状態と羽ばたきありの状態を計測した。迎角は  $0^\circ$  から  $20^\circ$  までは、 $5^\circ$  刻みで計測し、 $20^\circ$  から  $46^\circ$  までは、 $2^\circ$  刻みで計測を行った。流体力計測には、定格揚抗力 50KN の日章電機の 3 分力計 (LMC-3531A-50N)、角度トラバース装置を用いた。流体力計測の計測条件は、羽ばたきありの状態においては、羽ばたき周波数 11Hz で、後翅先行の位相角度  $0^\circ$ 、 $180^\circ$  及び  $90^\circ$  の 3 パターンにおいて計測した。

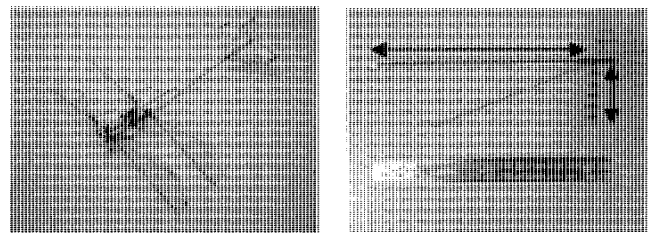
群行動ロボットの実験システムの拡張に関しては、はじめに 2011 年度の水中実験の問題点を再検討した。

過去の問題点として、水中では 2 体まで動作させることができたものの、3 体以上では指示した通りに動作しない機体が生じたこと、水中通信および制御のアルゴリズムに起因する不具合もあることが分かっていた。これを再度検討し、これらの問題点の中でも特に 3 体以上では指示した通りに動作しない機体が生じたことが重大であると判断した。指示どおりに動作しない原因として、信号の不達に起因する動作不良もあるものの、むしろ信号は水中ロボットに正しく伝わっており、アクチュエータ (スラスト) を動作させているが、アクチュエータの出力が不十分であるた

めに適切に動作していない場合が多かった。

これを解消するためにはアクチュエータを強化し、これに合わせて水中ロボットの構造を変更する必要があると判断した。

Fig. 4 に新たに開発したアクチュエータ (スラスト) を示す。2011 年度のスラストより強力なモータ (マブチ RS-380PH) の出力を、クラウンギアにて減速し、スクリュプロペラに伝達する。プロペラ直径も昨年度より拡大した ( $20\text{ mm} \rightarrow 30\text{ mm}$ )。このスラストを 4 基搭載した水中ロボットを Fig. 4 に示す。水平方向のスラスト 2 基が移動および方向転換を司り、鉛直方向のスラスト 2 基を上



(a) Robot-dragonfly

(b)Wing

Fig. 1 Photographs of robot-dragonfly

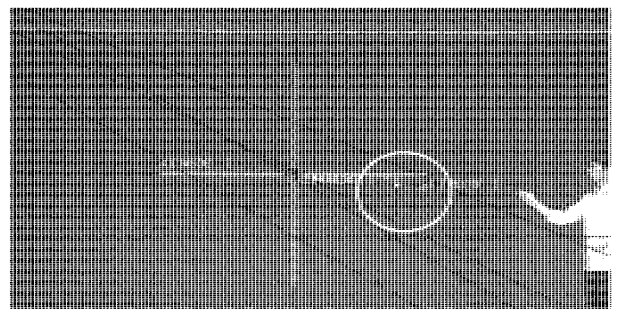


Fig. 2 Flight posture measurement in free flight

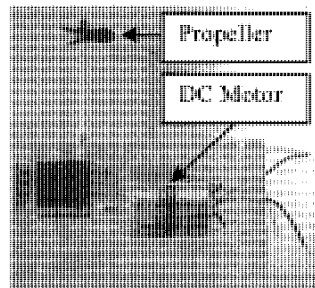


Fig. 3 A new actuator

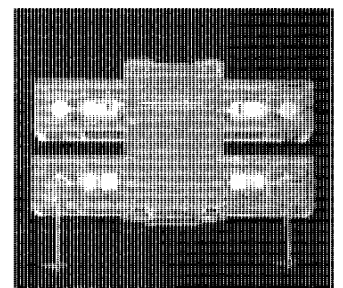


Fig. 4 A new underwater robot with four actuators. Upper view.

### 3. 実験結果および考察

羽ばたきロボットの流体力計測において、風速 2.1m/s, 羽ばたき周波数 11Hz の風洞実験にて、羽ばたき時の揚抗力の状態を3分力計で計測した結果の平均値を Fig. 5 に示す。ここで抗力は主流方向を正としている。

前後翅の羽ばたき位相差の異なる Fig. 5 (a)~(c)において、翼固定状態におけるそれぞれ実丸、白丸で示す揚力と抗力に関しては羽ばたき・非定常状態の実四角で示す揚力は、実飛行状態である 30° 近傍においては定常状態の3倍程度であり、白四角で示す抗力は固定時よりも小さい。

前後翅の位相差同位相の時 (Fig. 5 (a)) では迎角の上昇とともに揚抗力とも増加し、迎角 34° の時の抗力は、ほぼゼロとなっていた。すなわち、主流速度 2.1m/s の等速で飛翔している状態と考えられる。またその時の揚力はロボットの自重である 15g 相当の揚力が出ていた。また、これらは実測の自律飛行時とほぼ等しい状態であった。

位相差 180° (Fig. 5 (b)) では抗力がゼロになった迎角 30° 時に揚力は自重以下であり、飛翔には至らないことがわかる。逆に揚力が自重を支える迎角 40° 近傍では抗力が生じており、減速状態にあることを示す。実際にロボットの自律飛行状態は落下し始めるが、落下により飛行速度が上がり、再度飛翔に転じ、その後落下していた。

位相差 90° (Fig. 5 (c)) では迎角の上昇とともに揚抗力とも増加し、迎角 30° の時に、ロボットの自重である 15g 相当の揚力が出ていた。この時の抗力はほぼゼロとなっていた。この状態も自律飛行時とほぼ等しい状態である。

群行動水中ロボットの拡張において、ロボットでの実験に先立ち、2011 年度の実験で使用したアクチュエータと新型のアクチュエータの出力比較実験を行ったところ、前者の推力が 41 N であったのに対し、新型アクチュエータは 75 N と、約 1.8 倍の出力を有していることが分かった。強化したスラストを備えた水中ロボットでの単独水中試験を行った。その様子を Fig. 6 および Fig. 7 に示す。水中動作実験では、左右の旋回動作は意図通りに動くことが分かった。浮上動作では左右のスラストの推力差のために直上せず、斜めに浮上する結果となった。

新型スラストは大型のモーターを備えており消費電力が大きい。電子回路は旧ロボットのものをういたため、同時に4基のスラストを動作させると回路がオーバーヒートする。このため鉛直方向スラストを並列に制御できず、直列接続とした。上記の結果はこれに起因している。

### 4. 結言

羽ばたき飛翔ロボットの流体力計測、および群行動水中ロボットのスラスト強化により以下の知見を得た。

- 1) 羽ばたきロボットの自由飛行条件を風洞計測で実現し、非定常状態及び羽ばたきで高い揚力の発生を確認した。位相差が 0° 90° の時、高い揚力が得られた。
- 2) 新型スラストにより旧型の約 1.8 倍の推力を得たが、浮上動作に課題を残した。電子回路の改造が必要である。

### 学会発表

- 1) Nakamura, Ito, Kudo, Suzuki, Aerodynamic characteristics of the wings of a robot dragonfly in flight conditions, The 5<sup>th</sup> Int. Symp. Aero Aqua Bio-mechanisms (2012), USB Memory (S14).
- 2) Ito, Konno, Why do sparrows hop and doves walk?, The 5<sup>th</sup> Int. Symp. Aero Aqua Bio-mechanisms (2012), USB Memory (S32).
- 3) Konno, Ito ほか 3 名, Development and Preliminary

Study of Experimental System of Swarm Formation by Underwater Robots, The 5<sup>th</sup> Int. Symp. Aero Aqua Bio-mechanisms (2012), USB Memory (S34).

- 4) 中村, 伊藤, 工藤, 鈴木, メカトンボ飛行状態の非定常空力特性, 日本機械学会流体工学部門講演会講演論文集 (2012.11.17-18, 京都)

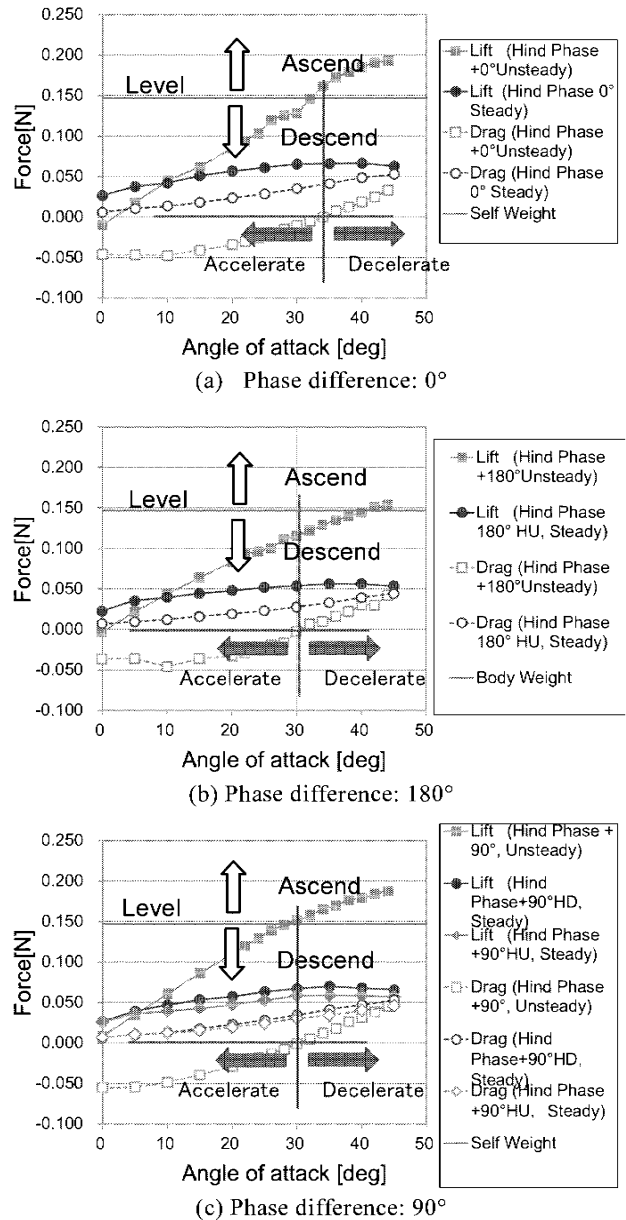


Fig. 5 Lift and drag performances in the flapping and in the fixed conditions. Results with three phase differences of the hind wing advancing to the rear wing are shown.

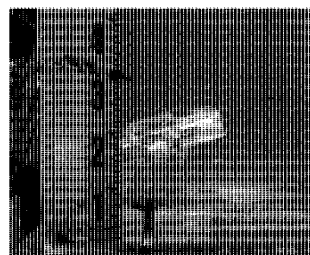


Fig. 6 A photograph of ascending motion

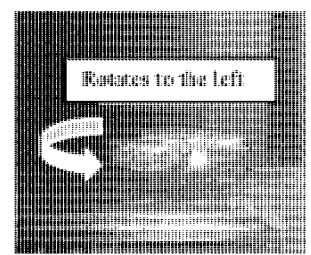


Fig. 7 A photograph of rotating motion

## 1.5. マイクロ構造の評価・加工技術

### Evaluation and Processing Technology of Micro Mechanisms

1.5.1 バイオマイクロ構造体における強度特性評価システムの開発と力学的特性評価  
後藤 芳樹, 立野 昌義

1.5.2 マイクロスケール機構の製作と評価に関する研究  
鈴木 健司, 小林 光男, 福田 勝己 (東京工業高等専門学校)

1.5.3 マイクロポーラス金属の材料特性評価  
塩見 誠規

1.5.4 光造形による3次元マイクロ部品の成形加工と医用工学への応用に関する研究  
西谷 要介, 武沢 英樹

#### 1. はじめに

マイクロスケール下のスマート機械システム創成技術に基づいた生体医工学向けマイクロ構造や機構の開発に必要な不可欠な評価および加工技術の構築, さらには, それらを用いた生体医工学向けマイクロマシンやマイクロシステムへの応用展開を目的に, 本中テーマ(1.5 マイクロ構造の評価・加工技術)は4つの小テーマを検討している. 具体的には, バイオマイクロ構造体における強度特性評価システムの開発と力学的特性評価(1.5.1), マイクロスケール機構の製作と評価に関する研究(1.5.2), マイクロポーラス金属の材料特性評価(1.5.3)および光造形による3次元マイクロ部品の成形加工と医用工学への応用に関する研究(1.5.4)の4つを中心に, マイクロ構造の評価・加工技術を構築する. 以下に, 本年度の成果を中心に, 4つの小テーマに分けて概要を示す.

#### 2. バイオマイクロ構造体における強度特性評価システムの開発と力学的特性評価

本小テーマでは, 医療用 MEMS (微小電子機械システム: Micro Electro Mechanical Systems) の構造信頼性を確保するために必要な基盤技術の確立を目的に, マイクロサイズ試験片における力学的特性評価システムの構築, およびそれらを用いたマイクロサイズの材料および構造体の力学的特性を検討している.

本研究は, 医療用として広く用いられているチタン材料の微小機械要素への実用的な応用として, チタンねじの耐久性について調べることとし, 以下の二つの疲労試験を行った. 第一に, M0.5 チタンねじの大気中および疑似生体環境中における疲労試験である. 第二に, M1.0 チタンねじを用いた, 大気中および生理食塩水環境中における疲労試験である. なお, M1.0 チタンねじについては, 繰返し速度の効果についても調べた. 検討の結果, 前者の M0.5 チタンねじの疲労限度は大気中の 90MPa に対し, 疑似生体環境中で 80MPa と低下したこと, 後者の M1.0 チタンねじの疲労限度は大気中と生理食塩水中とでほぼ等しく 90~95MPa 付近にあり, さらには繰返し速度 2~20Hz の範囲で速度依存性を示すことを明らかにした.

#### 3. マイクロスケール機構の製作と評価に関する研究

本小テーマでは, 半導体加工技術を応用した微小な運動機構の開発, および微小液滴をハンドリングするデバイスの開発を目的に, EWOD (Electrowetting on Dielectric) により輸送される液滴の変形挙動の解析, および液滴を斜面や曲面上で輸送する3次元輸送デバイスの開発を検討している. ここでいう EWOD とは, 静電力により材料表面の濡れ性を制御することにより微小な液滴の輸送・操作を行う技術である.

今年度は, EWOD デバイスを製作する際に, 歩留まりに大きな影響を与える絶縁層に着目した. 種々の材料, 加工条件により絶縁層を形成したデバイスを用いて液滴輸送実験を行い, 輸送性能を比較することにより, 安定して液滴輸送が行える絶縁層の条件を明らかにすることを目的とする. 検討の結果, 絶縁層の成膜方法は, 蒸着など段差の被覆性の高い均一な膜ができる方法が望ましいこと, また誘電率が高く, 膜厚が薄い方が低電圧で輸送が可能であること, さらには3種類の絶縁膜の中ではパリレン C が一番安定した輸送が可能であることなどを明らかにした.

#### 4. マイクロポーラス金属の材料特性評価

本小テーマでは, ポーラス構造を有する金属中の空孔が材料特性に与える影響について明らかにするとともに, ポーラス金属の内部構造設計および作製方法の確立を目的に, ポーラス構造を有する金属の作製および成形方法について検討している. ポーラス構造を有する金属について材料試験を行い, 微小空孔のサイズ, 形状構造, 密度などが機械的特性や変形挙動に及ぼす影響について調べ, 多孔質体の力学を応用してマイクロポーラス金属の変形における構成則を構築し, 有限要素法による解析手法および空孔構造設計の方針を確立するとともに, アルミニウム合金粉末と発泡剤の混合粉末を用いたポーラス金属の作製方法の確立を進めている.

今年度は, ポーラス構造を有する金属の作製および成形方法を確立するために, 発泡剤を混合したアルミニウム合金粉末を使用して発泡させながら金型内に充填成形するときを受ける重力の影響を考慮した加工方法について検討した.



前年度の研究成果において円筒形金型の直径が大きくなると重力の影響を大きく受けることが明らかとなった。そこで重力による加工不良を低減するために、金型を回転させながら充填する方法について検討した。その結果、自重の影響により充填が困難であった金型上部への充填が可能となり、加工精度が向上した。

#### 5. 光造形による3次元マイクロ部品の成形加工と医用工学への応用に関する研究

本小テーマでは、3次元かつマイクロスケールの複雑形状を有する医用向けマイクロデバイスの開発を目的として、光造形を用いた3次元マイクロ部品の成形加工技術の構築を検討している。

本年度は光造形用エポキシ樹脂材料の高性能化を中心に、光造形による3次元マイクロ部品の成形加工技術の構築を検討した。具体的には、(1)ポリマー微粒子充填系 PESP の摩擦摩耗特性の改質メカニズムを解明するため UHMWPE 充填系の摩耗挙動の観察を中心に、また(2)リバーエンジニアリング (RE) 技術を用いた3次元マイクロ部品の開発については可動部を有する複数部品の同時造形を中心に、実験的に検討したものである。検討の結果、物理的溶融分散法を用いた UHMWPE 微粒子充填により、リングオンディスク型（連続式）だけでなく、ピンオンディスク型（間欠式）の異なるすべり摩耗試験においても、PESP の摩擦摩耗特性を改質できること、またその改質は、摩耗挙動を観察した結果、相手材への移着膜形成の仕方や摩耗粉の排出が異なるためであることを明らかにした。一方、リバーエンジニアリング技術 (RE) については、RE を用いて、可動部を有する複数部品の造形が可能であることを示した。

# 1.5.1. バイオマイクロ構造体における強度特性評価システムの開発と力学的特性評価 —チタン微小ねじの腐食環境中における疲労強度—

## Fatigue Strength of Titanium Small Screw in Corrosive Environment

後藤芳樹 (工・機械工学科)、立野昌義 (工・機械工学科)

Yoshiki GOTOH, Masayoshi TATENO

**Keywords:** Fatigue strength, Titanium small screw, Corrosive environment

### 1. はじめに

医療機器を小型化することにより、患者の負担を低減することができるため、その進展が強く望まれている。機器を小型化することにより、これまでの体外設置型 (extracorporeal) から、体内埋め込み型 (implantable) へとその可能性が広がりつつある。しかし、このような微小機器が、生体環境内において長期間の使用に耐えられるように設計するためには、構成される微小機械要素の強度や耐久性についての知識が不可欠である。

本研究は、医療用として広く用いられているチタン材料の微小機械要素への実用的な応用として、チタンねじの耐久性について調べることとし、以下の二つの疲労試験を行った。一つは、M0.5 チタンねじの大気中および疑似生体環境中における疲労試験である。もう一つは、M1.0 チタンねじを用いた、大気中および生理食塩水環境中における疲労試験である。なお、M1.0 チタンねじについては、繰返し速度の効果についても調べることにした。

### 2. M0.5 チタン微小ねじの疑似生体環境中における疲労試験

**2.1 試験片および試験方法** M0.5 チタンねじの耐久性を調べるために、大気中および疑似生体環境中において疲労試験を行った。試験片には、JIS 2種純チタン製のボルト・ナットを用いた。表 1 に M0.5 チタンねじの形状寸法を示す。このチタン素材の引張強さは 570MPa である。Fig.1 に疲労試験機を示す。試験機は (有) 旭製作所製の Wave Maker 05 に自作のステンレス製ホルダーを取り付けたものである。上部ホルダーはピン継手を介してロードセルにつながっている。下部ホルダーは XYZ ステージ上に固定されており、XYZ ステージを調節することにより試験片に加わる偏心荷重を避けるようになっている。このホルダーに試験片であるボルト・ナットを取り付けて試験を行った。なお、ボルト・ナットの締付けは行っておらず、面圧はゼロの状態である。試験機の加振力 49 N、最大荷重 100N、繰返し周波数 20Hz、荷重制御による片張り引張疲労試験を実施した。疑似生体環境中における疲労試験は、Fig.2 に示すように、試験機に腐食液槽を取付け、試験片全体が 0.9%NaCl 水溶液につかるようにして実施した。試験中、液温を 310K 一定に保った状態で窒素ガスを導入し、溶存酸素濃度を 4%に保持した。このとき pH は 7.4~7.5 である。

Table 1 Dimensions of M0.5 Titanium screw (mm)

ネジの呼び ×ピッチ	山の高 さ	外径	有効系	谷の径	有効断面 積
M0.5×0.125	0.068	0.500	0.419	0.365	0.115

**2.2 実験結果および考察** 大気中における疲労試験結果を Fig.3 に示す。S-N 曲線より  $10^7$  回の疲労限度は 90MPa となり、素材の引張強さの約 16% と大きく低下した。破断繰返し数データのばらつきは大きく、この原因としては、ボルトの破断がナットとのかみ合い部外で生じているものも有り、M0.5 と試験片が小さいため、ホルダーへの取付け時に荷重が掛かったり、試験中に偏心による曲げ荷重が加わっている可能性も考えられる。

疑似生体環境中における S-N 曲線から、 $10^7$  回の疲労限度は 90MPa となり、明らかに大気中よりも疲労限度は低下した。S-N 曲線の低繰返し数領域では大気中の疲労強度との差は少ないが、高繰返し数領域では差が大きくなっており、長時間腐食環境に置かれて繰返し荷重を受けたことにより、腐食が進行し、疲労強度が低下したものと考えられる。

ボルトの疲労破断は、ボルト・ナットのかみ合う応力集中の大きい第 1 ねじ山付近で生じており、この部分の摩擦や摩擦により、チタンねじの酸化被膜が破壊されると、腐食環境においては、この箇所での腐食が進行することになる。とくに、

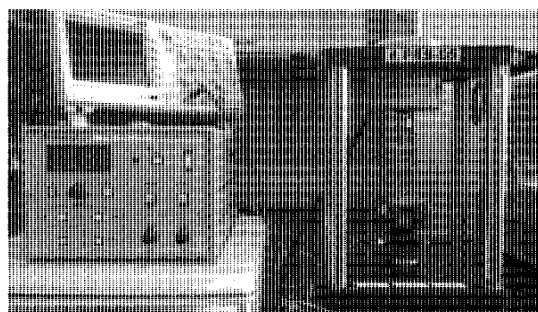


Fig.1 Fatigue tester for titanium small screw.

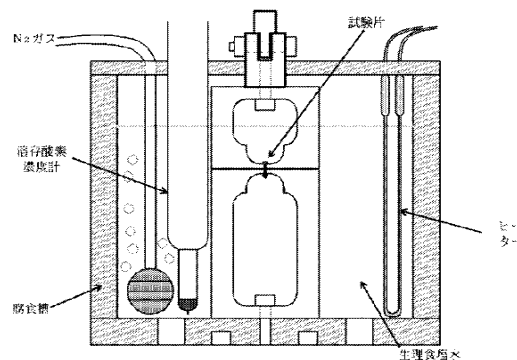


Fig.2 Schematic diagram of fatigue test in corrosive environment.

酸素濃度の低い疑似生体環境中においては、酸化被膜の修復は、大気中にくらべて時間を要する<sup>1)</sup>ため、疲労強度が低下したものと考えられる。

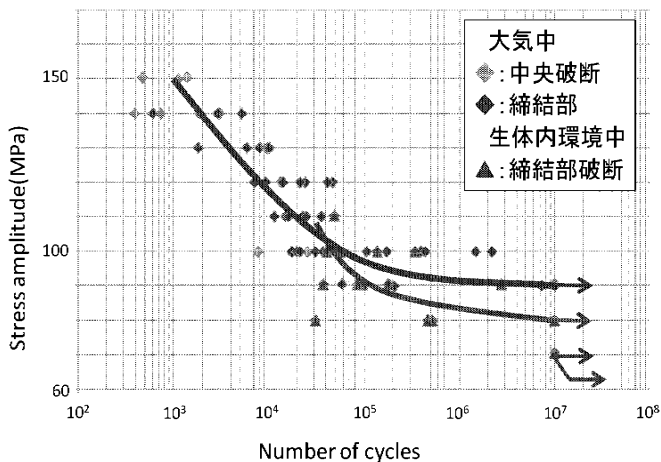


Fig.3 S-N diagram of M0.5 titanium small screw.

### 3. M1.0 チタン微小ネジの生理食塩水中における疲労試験

**3.1 供試材料および試験方法** M1.0 チタンねじの耐久性を調べるために、空気中および生理食塩水環境中において疲労試験を行った。試験片には、M1.0のJIS 2種純チタン製のボルト・ナットを用いた。寸法はM1.0×7mm、有効断面積は0.44 mm<sup>2</sup>、このチタン素材の引張強さは476MPaである。試験機は(有)旭製作所製のFRS-20、加振力100 N、最大荷重500N、を用い、繰返し周波数20Hz、荷重制御による片張り引張疲労試験を実施した。生理食塩水中における疲労試験は、試験機に腐食液槽を取付け、試験片全体が0.9%NaCl水溶液につかるようにし、約4リットルの液を循環させながら液温を37℃一定に保った状態で試験を行った。また、チタンねじの繰返し速度依存性を調べるために、繰返し速度を2Hz~20Hzまで変化させて疲労試験を行い繰返し破断回数を求めた。

**3.2 実験結果および考察** M1.0 チタンねじの大気中および生理食塩水中の疲労試験結果を Fig.4 に示す。S-N 曲線より、低繰返し数領域において、生理食塩水中の疲労強度は大気中に比べて明らかに疲労強度は低下するが、疲労限度については両者の差はわずかであり、約90~95MPa 付近にある。この結果は、M0.5 チタンねじの場合に、高繰返し数領域で腐食環境の影響が大きく表れた傾向とは異なっている。この理由としては、試験片に用いたチタンねじの大きさ、材料の強度などが異なるため、一概に述べることはできないが、腐食環境の溶存酸素濃度の違いが一つの要因であると考えられる。

Fig.5 に生理食塩水中における、繰返し速度と破断繰返し数の関係を示す。各応力レベルにおける3本の試験片の平均値を示したものである。図から繰返し速度の増加とともに破断繰返し数も増加しており、明らかに速度依存性がみられる。チタンの速度依存性については、低いひずみ速度で材料の粘性の影響が現れる<sup>2)</sup>ことが知られており、炭素鋼など他の材料に比べて速度依存性が大きい材料であるといえる。したがって、生体環境内でチタンねじが使用される状況では、1~

2Hz 程度の低い周波数において使用されることが予想されることから、今後は低周波数領域におけるチタンねじの耐久性について、さらに詳細な研究が必要と思われる。

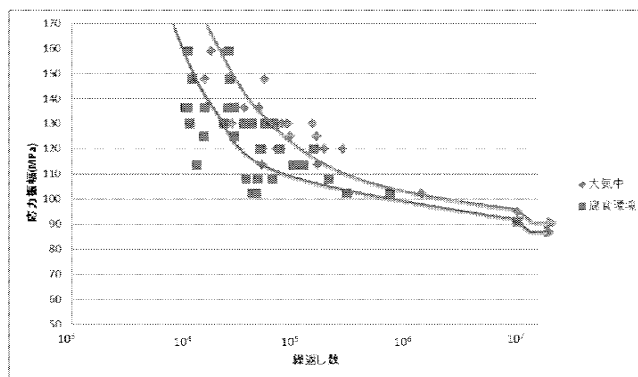


Fig.4 S-N diagram of M0.1 titanium small screw.

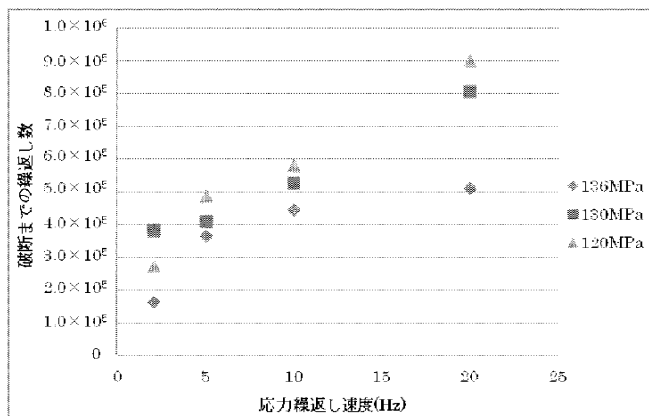


Fig.5 Influence of frequency on cycles to failure in fatigue test.

## 4. 結論

- 1) M0.5 チタンねじの疲労限度は大気中の90MPaに対し、疑似生体環境中で80MPaと低下した。
- 2) M1.0 チタンねじの疲労限度は大気中と生理食塩水中とでほぼ等しく90~95MPa 付近にある。また、繰返し速度2~20Hzの範囲で速度依存性を示した。

## 参考文献：

- 1) 丸山典夫, チタン合金の疑似生体環境下の疲労挙動, チタン, Vol. 57, No. 2, (2009), 121-125.
- 2) 竹園ほか, チタンの疲労き裂進展に及ぼす応力繰返し速度の影響, 材料, Vol. 31, No. 350, (1982), 1128-1134.

## 査読付論文:

- (1) 芝崎ほか, 材料試験技術, Vol. 58, No. 1, (2013), 49.
- (2) 井口ほか, 材料試験技術, Vol. 55, No. 1, (2010), 24.
- (3) 井口ほか, 材料試験技術, Vol. 54, No. 1, (2009), 47.

## 学会発表:

- (1) 小野澤友弥ほか2名, 単結晶シリコンウエハの高温破壊靱性評価, 日本機械学会山梨講演会(2012.10)
- (2) 石北凌ほか3名, CSF 法に基づく単結晶シリコンの破壊靱性評価, 日本機械学会山梨講演会 (2012.10)
- (3) 田村, 後藤, 機械学科北陸信越支部講演会(2012.3)ほか5編.

## 1.5.2. マイクロスケール機構の製作と評価に関する研究 Study on Fabrication and Evaluation of Microscale Mechanisms

鈴木 健司, 小林 光男, 福田 勝己 (東京工業高等専門学校)

Kenji SUZUKI, Mitsuo KOBAYASHI, Katsumi FUKUDA (Tokyo National College of Technology)

**Keywords:** MEMS, Electrowetting on dielectric, Digital microfluidics, Dielectric layer

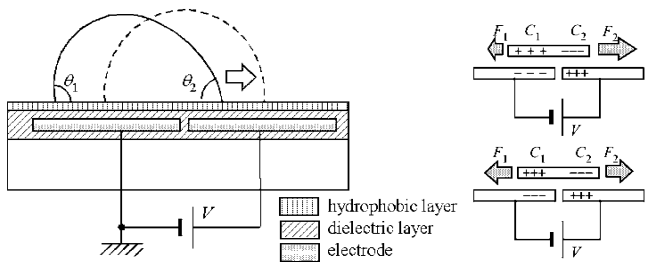
### 1. 緒言

マイクロの機構においては、スケール効果により、静電力、表面張力など表面間に働く力が大きな影響を及ぼすようになる。このため、これらの力を積極的に利用したデバイスの研究が盛んに行われている。本研究では、電圧の印加により材料表面の濡れ性を制御することによって微小な液滴の輸送やハンドリングを行う EWOD (Electrowetting on Dielectric)<sup>1)</sup> と呼ばれる技術に着目した。流路内に液体を連続的に流すのではなく、EWOD を利用して離散的な液滴の移動、混合、分離など行う技術は、Digital Microfluidics と呼ばれており、ポンプ、バルブなどの機械的な要素を必要とせず、微量の液体を無駄なく使用できることから、化学分析、医療、ヘルスケアなどへの応用が期待されている<sup>2)</sup>。また、液滴により微小物体を支持して搬送するマイクロ搬送システムの研究も行われている<sup>3)4)</sup>。

今年度は、EWOD デバイスを製作する際に、歩留まりに大きな影響を及ぼす絶縁層に着目した。種々の材料、加工条件により絶縁層を形成したデバイスを用いて液滴輸送実験を行い、輸送性能を比較することにより、安定して液滴輸送が行える絶縁層の条件を明らかにすることを目的とする。

### 2. EWOD を用いた物体搬送デバイス

EWOD を用いた液滴輸送の原理を Fig. 1 に示す。液滴の下部の基板には、導体の電極層、絶縁層、撥水層が順に成膜されている。液滴の下の2つの電極間に電圧を印加すると、電極と液滴との間に Fig. 1 (b) のように2つのコンデンサ  $C_1$ ,  $C_2$  が形成され、左右の電界の差により基板に平行な方向に静電力が働き液滴が移動する。このとき、液滴は静電力により変形し、移動する側の接触角が小さくなる ( $\theta_1 > \theta_2$ )。このことから、基板表面の濡れ性が電界により変化し、濡れ性の高い方に液滴が移動すると解釈することもできる。液滴が2つの電極の中央に移動すると左右の静電力が釣り合い、液滴は平衡状態に達して静止する。液滴を連続的に移動させるためには、多数の電極列を形成し、電極の間隔 (ピッチ) を液滴の幅の半分以下とし、電圧を印加する電極を順次切り替えていけばよい。



(a) EWOD device (b) Equivalent circuit  
Fig. 1 Principle of EWOD device

### 3. デバイスの製作

製作した EWOD デバイスの断面図を図 2 に示す。基板として、フレキシブルなポリイミド基板の上に、あらかじめシード層の Ni-Cr と電極層の Cu が成膜されているものを使用した。製作プロセスは、まず電極層 (Cu) をフォトリソグラフィにより電極形状にパターンニングし、ウェットエッチングにより不要部分を除去する。次に、電圧印加部をポリイミドテープでマスキングした後、絶縁層を成膜する。続いて撥水層として Teflon AF2400 をスピコートし、最後に電圧印加部のテープをはがして完成となる。絶縁層の材料は、フレキシブル基板を曲げて使用できることを条件に選定を行い、バリレン C, PDMS, SU-8 の 3 種類を用いた。表 1 に絶縁層に使用した材料の特性と成膜した膜厚をまとめて示す。

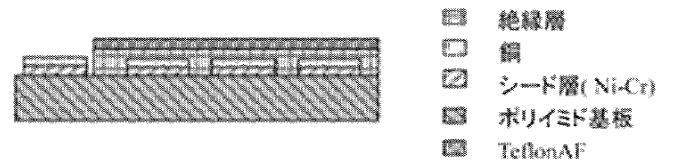


Fig.2 Structure of EWOD device

Table1 Material properties of dielectric layer

	主成分	誘電率	加工方法	膜厚[μm]
バリレンC	バラキシレン系ポリマー	2.95(1MHz下)	蒸着	1,2,2,7,3,7
PDMS	ポリジメチルシロキサン	2.7(100kHz下)	スピコート	1,1,2,7,3,6
SU-8	エポキシ樹脂	3.2(1GHz下)	スピコート	1,2,2,6,3,7

### 4. 実験

#### 4.1 水滴の接触角の変化

3 種類の絶縁層を用いたデバイス上にそれぞれ水滴を滴下し、0V~250V の範囲で電圧を 50V ずつ変化させた際の接触角を測定した。結果を図 2 に示す。全ての材料で電圧印加による接触角の減少を確認し、膜厚が薄いものほど同一電圧での接触角の減少が大きい傾向にあることがわかった。また、電圧が 250V まで上昇すると、接触角は膜厚によらずほぼ一定値に近づくことが確認された。接触角の減少が飽和することは他の文献<sup>2)</sup>でも述べられているが、その原因は現時点では明らかにされていない。

#### 4.2 水滴輸送実験

3 種類の絶縁層を成膜したデバイスを用いて液滴の輸送実験を行った。液体には純水を用い、印加電圧は 100V, 250V とし、電圧の切り替え周波数を 1Hz から 128Hz まで変化させ、水滴輸送が可能かどうかを調べた。ファンクションジェネレータにより一定周波数の方形波を生成し、PIC (Peripheral Interface Controller) により、1パルスずつシフトする信号に変換し、増圧器で 100V または 250V に増圧して、デバイスに印加した。実験結果を表 2 にまとめて示す。

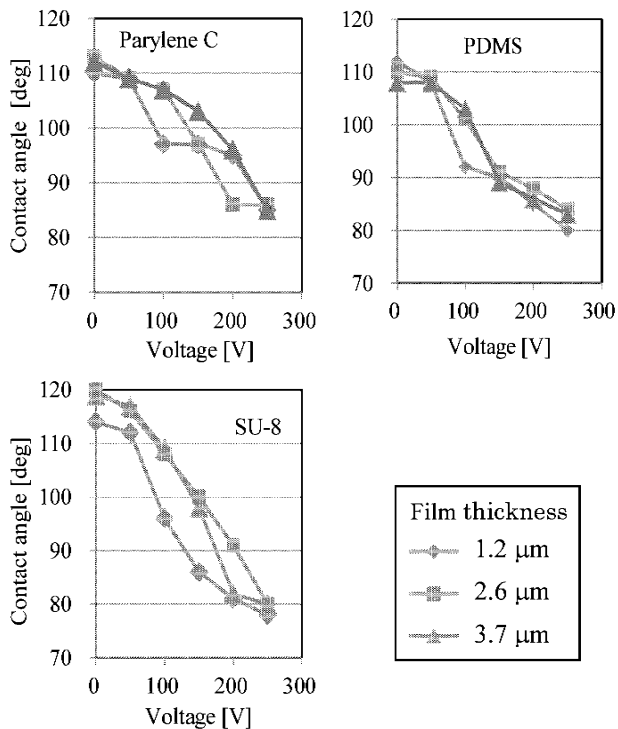


Fig.2 Variation of contact angle with applied voltage

Table2 Experimental results of droplet transportation

○輸送可能 △部分的に輸送可能 ×輸送不可

		100V		周波数 [Hz]							
				1	2	4	8	16	32	64	128
絶縁層 [μm]	Parylene C	1.2	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		2.7	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		3.7	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	PDMS	1.1	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		2.7	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		3.6	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	SU-8	1.2	△	△	△	○	○	○	○	○	○
		2.6	△	△	○	○	○	○	○	○	○
		3.7	△	△	○	○	○	○	○	○	○

		250V		周波数 [Hz]							
				1	2	4	8	16	32	64	128
絶縁層 [μm]	Parylene C	1.2	△	△	○	○	○	○	○	○	○
		2.7	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		3.7	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	PDMS	1.1	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		2.7	○	○	○	×	×	×	×	×	×
		3.6	○	○	×	×	×	×	×	×	×
	SU-8	1.2	△	△	△	△	○	○	○	○	○
		2.6	△	△	△	○	○	○	○	○	○
		3.7	△	△	△	○	○	○	○	○	○

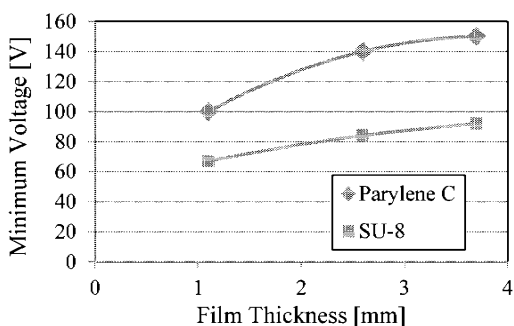


Fig.3 Minimum voltage for droplet transportation

デバイス上のすべての電極上で輸送可能なものを○、一部の電極上で輸送可能なものを△、輸送不可能なものを×で表示している。また、多くの条件で輸送可能であったParylene CとSU-8を用いたデバイス上で、水滴の最低輸送電圧を測定した。その結果を図3に示す。

Parylene Cは、電圧100Vのときは膜厚の薄い1.2μmの場合のみ輸送が可能で、電圧が250Vのときにははすべての場合に輸送が可能であった。その理由として、成膜方法が蒸着であり、段差の被覆性が高く、膜厚のムラが少ないことが考えられる。膜厚が薄く、電圧が高い方が輸送しやすいのは静電力が大きくなるためである。

一方、PDMSはほとんどの条件で輸送ができなかった。この原因は、PDMS自体がある程度撥水性であるために、撥水剤のTeflon AFが均一に成膜できなかったことが考えられる。しかしながら、Fig.2に示すように、電圧の印加により他の膜と同様に接触角は減少しているため、撥水剤の塗布方法を変更すればEWODの絶縁層としての使用は可能になると考えられる。

SU-8は、印加電圧が100Vでもすべての場合に輸送が可能であった。他の絶縁膜よりも低い電圧で輸送ができたのは、SU-8の誘電率が高いためだと考えられる。また、低い周波数のときに輸送しにくくなったのは、加工方法がスピコートであるため、電極の段差などによって膜が不均一になり、水滴にある程度の速度を与えないと段差などを乗り越えられないためと考えられる。

#### 4. 結言

EWODデバイスにおいて、絶縁層の材料や成膜方法が液滴輸送に及ぼす影響を調べ、以下の知見が得られた。

- 1) 絶縁層の成膜方法は、蒸着など、段差の被覆性の高く膜が均一になる方法が望ましい。
- 2) 誘電率が高く、膜厚が薄い方が低電圧での輸送が可能である。
- 3) 3種類の絶縁膜の中ではParylene Cが最も安定した輸送が可能である。

#### 文献

- 1) Fair R. B., Microfluid Nanofluid, 3 (2007) pp11-17
- 2) Cho S. K., Moon H. and Kim C-J., J. Microelectromechanical Systems, 12, 1 (2003) pp.70-80.
- 3) Moon I. and Kim J., Sensors and Actuators A, 130-131 (2006) pp.537-544.
- 4) Kenji Suzuki, Hiroaki Homma, et al., JSME Journal of Advanced Mechanical Design, Systems, and Manufacturing, 4, 1 (2010) pp.365-372.

#### 学会発表

- 1) 鈴木健司, 片山博紀, 高信英明, 三浦宏文, エレクトロウエッティングデバイスにおける水滴の摩擦力の測定, 日本機械学会年次大会講演論文集, 金沢, 2012, J164013.

### 1.5.3. マイクロポーラス金属の材料特性評価

#### Assessment of material properties of micro-porous metal

塩見 誠規  
Masanori SHIOMI

**Keywords:** Micro-porous metal, Foamed Aluminium,  
Fabrication process, Deformation behaviour

#### 1. 緒言

金属などで作製される人工骨は中実固体であるため骨に比べて非常に重く、使用範囲も限定される。実際の骨と同様にポーラス構造で作製されることが望まれるが、その特性は空孔のサイズ、形状、密度などに依存する<sup>1)</sup>。そこで本研究では、ポーラス構造を有する金属中の空孔が材料特性に与える影響について明らかにするとともに、ポーラス金属の内部構造設計および作製方法の確立を目的とする。

本報告では、ポーラス構造を有する金属の作製、成形方法を確立するために、発泡剤を混合したアルミニウム合金粉末を使用して発泡させながら金型内に充填成形するときを受ける重力の影響を考慮した加工方法について検討した。

#### 2. 実験方法

図 1 に金型へアルミを発泡させながら充填する成形方法の概要を示す。前年度の実験において円筒形金型の直径が大きくなると重力の影響を大きく受けることが明らかとなった。そこで重力による加工不良を低減するために、金型を回転させながら充填する方法について検討した。実験は発泡用ダイス内でプリカーサを十分に加熱し、発泡が始まると同時に金型を回転させて金型への充填を行う。充填後、加熱を停止して自然冷却させ、金型温度が 400℃以下になった時点で金型の回転を停止する。

発泡用ダイスの入口径は 11mm、出口径  $D_{out}$  は 9mm で加熱されたプリカーサがダイスに密着して十分加熱されるようにした。回転する金型の温度は放射温度計で測定して 750℃になるように IH 加熱を制御した。

プリカーサは母材にアルミ合金粉末 A6061 を使用し、発泡剤に水素化チタン  $TiH_2$  を用いた。アルミ粉末に  $TiH_2$  を 1mass% 混合し、122MPa で冷間圧粉した後、450℃に加熱して熱間押出しを行い、直径 10mm の丸棒を作製する。丸棒を約 10mm 間隔で切断し、質量が 1.8g になるようにした。

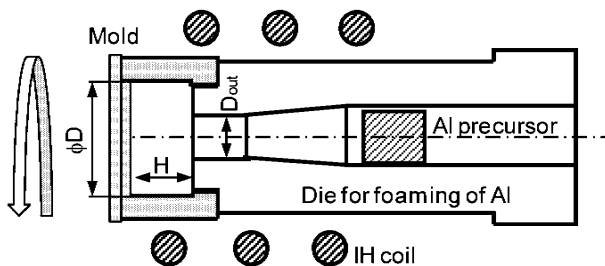


Fig. 1 Rotating mold and die for foaming of aluminium with foaming agent

金型の形状を図 2 に示す。図中上部を発泡用ダイスに取り付け、下部に蓋を付けて密閉型とした。金型容積はほぼ同じで直径  $D$  を 16, 22, 26.7mm として高さ  $H$  を決め、アスペクト比  $H/D$  を 0.26, 0.45, 1.25 として充填実験を行った。

#### 3. 実験結果

##### 3.1 金型回転の効果

図 3 に直径 22mm,  $H/D = 0.45$  の金型に発泡アルミを充填させたときの様子を示す。金型の回転速度は 5 rpm である。金型を回転させず静止した状態で充填させた場合、自重の影響により発泡アルミが金型上部にまで十分に膨張することができず、上部に空隙が生じている。これに対して金型を回転させた場合、金型上部に生じていた空隙が小さくなり、発泡アルミの形状が円形に近づいていることがわかる。発泡アルミの相対密度も金型静止では 0.29 であるが、回転させることにより 0.23 と減少がみられ、金型内での発泡、膨張が向上していることがわかる。また金型を回転させながら成形した発泡アルミの直径を 10 カ所測定して平均した平均直径は 19.8mm であり、円として面積を計算して金型断面積と比較すると断面充填率は 81% となった。金型を回転させることにより金型充填度は向上している。

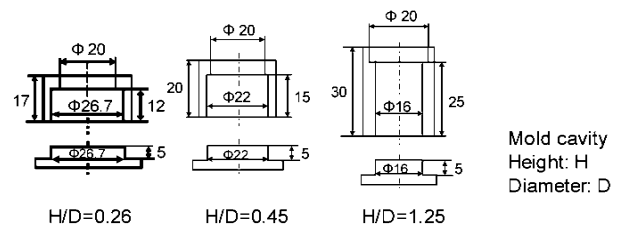
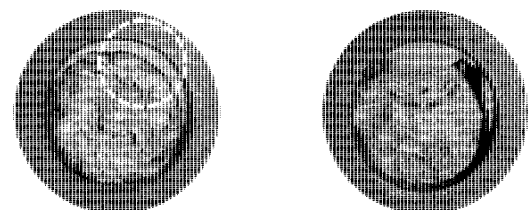


Fig. 2 Shape and size of mold



(a) Rotating mold (5rpm,  $\rho=0.23$ )  
(b) Stationary mold ( $\rho=0.29$ )

Fig. 3 Effect of mold rotation on molding of aluminum foam

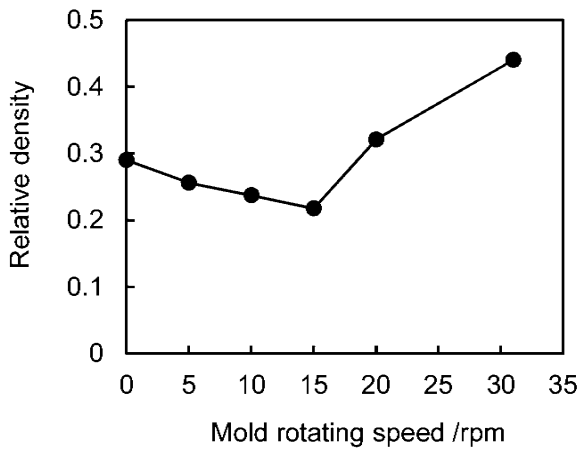


Fig. 4 Influence of mold rotating speed on relative density of foam ( $\phi D=22\text{mm}$ ,  $H/D=0.45$ )

図 4 に直径 22mm,  $H/D = 0.45$  の金型を使用して, 金型の回転速度を変化させたときの相対密度に与える影響について示す. 金型を回転速度 15 rpm 以下で回転させた場合, 作製される発泡アルミの相対密度は約 0.3 から約 0.25 と減少し, 金型回転により膨張割合が向上することがわかる. しかし, 回転速度が 20 rpm 以上になると逆に相対密度は上昇し, 発泡アルミが金型に十分充填できない. 回転速度が大きい場合, 冷却時に発泡アルミが金型内で大きく動き, 内部のガスが漏出することによると推察される.

アスペクト比  $H/D$  が異なる金型を回転させて発泡アルミを充填させたときの相対密度の変化を図 5 に示す. 金型の回転速度は 5 rpm である.  $H/D = 0.26$  では相対密度は 0.29,  $H/D$  が 0.45, 1.25 と大きくなると相対密度は 0.26, 0.34 と変化し,  $H/D = 0.45$  のときに金型回転の効果が見られる.  $H/D$  が 1.25 の場合, 金型を回転させず静止した状態で充填させると相対密度は約 0.26 であり, 回転させることにより相対密度は増加, 金型充填度は低下した. 静止した状態でも発泡アルミが十分に膨張して充填する金型形状の場合, 広範囲で金型側面に接触した発泡アルミが金型を回転させることで大きくねじれて逆に金型から離れ, 内部ガスが漏出する結果になったと推測される.

### 3.2 金型内径とダイス出口

発泡アルミニウムの金型充填は発泡用ダイス出口径と金型内径の比  $D/D_{out}$  に影響を受ける. そこで金型を回転させたときの  $D/D_{out}$  と相対密度の関係を図 6 に示す. 金型を静止した状態で  $D/D_{out}$  が大きい, つまり直径の大きい金型に水平方向で充填させる場合, 発泡用ダイス出口径に対して金型内径が大きいために入部部で段差ができて自重の影響が大きくなり充填が困難であった. これに対して金型を回転させた場合, 充填が困難であった  $D/D_{out} = 3$  においても相対密度は約 0.3 になるまで膨張させることができている. 金型を回転させることにより入部部にできる段差の影響および自重の影響を小さくできると考えられる. しかし  $D/D_{out}$  が 1 に近い, 発泡用ダイス出口径と金型内径がほぼ同じ場合は摩擦の影響が大きいため, 金型を回転させる効果は見られない.

## 4. 結言

発泡アルミニウムの金型充填において自重の影響を受ける金型に対し, 金型を回転させる方法について検討を行っ

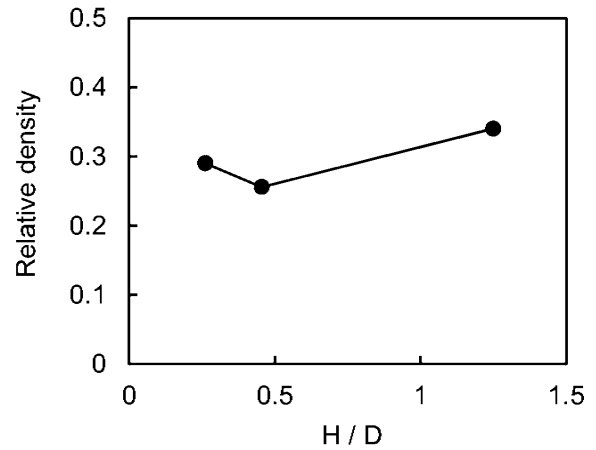


Fig. 5 Relationship between relative density of foam and ratio of height to diameter of mold cavity (Speed: 5 rpm)

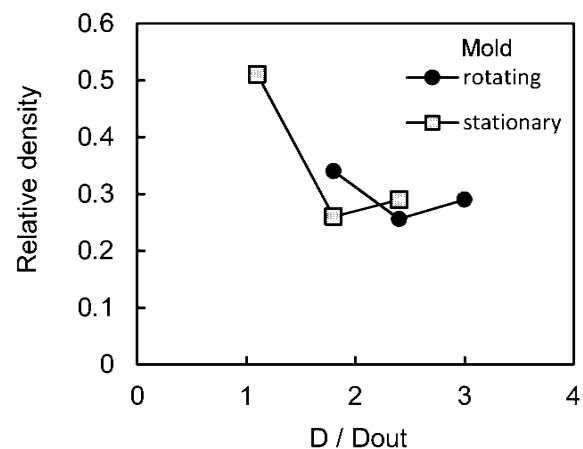


Fig. 6 Influence of mold rotation on relative density of foam for different diameter ratio of mold inlet and die outlet (Rotating speed: 5 rpm)

た. その結果, 自重の影響により充填が困難であった金型上部への充填が可能であることがわかった. しかし奥行き小さい金型形状に対しては摩擦の影響が大きくなり, 十分な効果は得られなかった.

### 参考文献

- 1) Ashby, M.F. et al.: Metal Foams, 2000, Butterworth-Heinemann.

### 査読付き論文

- 1) Shiomi, M. and Tanino, Y.: Metals, 2-2(2012), 136-142.

### 研究発表

- 1) Toya, A., Shiomi, M., Nakayama, R.: Proc. 11th Int. Symp. on Advanced Technology, Tokyo, 2012, 220-221.
- 2) 塩見誠規, 深谷友洋: 平成 24 年度塑性加工春季講演会, 2012, 373-374.
- 3) 塩見誠規, 深谷友洋: 日本機械学会第 20 回機械材料・材料加工技術講演会(M&P2012) CD-ROM 論文集, 2012.

# 1.5.4. 光造形による3次元マイクロ部品の成形加工と医用工学への応用に関する研究 Study on Fabrication of 3-Dimensional Micro Part Using Stereolithography and its Application to Medical Engineering

西谷 要介, 武沢 英樹  
Yosuke NISHITANI, Hideki TAKEZAWA

**Keywords :** Stereolithography, 3-dimension, Micro part, Mechanical properties

## 1. 緒言

光造形による3次元マイクロ部品の開発および医用工学への応用を目的として、3次元マイクロ部品の成形加工技術の確立およびそれらに適した高性能光硬化性樹脂系材料の開発を検討している。昨年度までに、光造形用エポキシ樹脂 (PSEP) に有機充填材を充填すること、特に物理的溶融分散法を用いて開発した超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) のポリマー微粒子を PSEP に充填することにより、機械的およびトライボロジック的性質などがバランス良く改質できることを明らかにした。また、マイクロ造形に最適な造形条件やリバースエンジニアリング (RE) に必要な X 線 CT の撮影条件などを明らかにしてきた。これらの結果を踏まえ、本年度は光造形用エポキシ樹脂材料の高性能化を中心に、光造形による3次元マイクロ部品の成形加工技術の構築を検討した結果を報告する。具体的には、(1)ポリマー微粒子充填系 PSEP の摩擦摩耗特性の改質メカニズムを解明するため UHMWPE 充填系の摩擦挙動の観察を中心に、また(2)リバースエンジニアリング (RE) 技術を用いた3次元マイクロ部品の開発については可動部を有する複数部品の同時造形を中心に、実験的に検討した結果を報告する。

## 2. UHMWPE 微粒子充填系 PSEP の摩擦摩耗特性

### 2-1 背景

昨年度までに、二軸押出機にて水溶性樹脂と対象となる熱可塑性樹脂を溶融混練し、水溶性樹脂中に熱可塑性樹脂を分散させてポリマー微粒子を製造する方法<sup>2)</sup>を検討し、マイクロサイズのポリアミド (PA6) や超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) などの微粒子を開発した。それらの開発したポリマー微粒子を光造形用エポキシ樹脂に充填した複合材料の各種物性を評価し、UHMWPE 微粒子充填系が最も改質効果が高いことを示した。本年度は、その続きとして、ポリマー微粒子充填系の摩擦摩耗特性の改質メカニズムを解明するため、最も改質効果の高い UHMWPE 充填系の摩擦挙動を中心に、実験的に摩擦摩耗特性を検討した結果を報告する。

### 2-2 実験

物理的溶融分散法により UHMWPE (旭化成ケミカルズ, UH950) をはじめとした各種ポリマー微粒子を調整した。今年度は UHMWPE 系ポリマー微粒子として、平均粒径が 50 $\mu\text{m}$  および 100 $\mu\text{m}$  の2種類を調整した。それら調整したポリマー微粒子を光造形用エポキシ樹脂 (PSEP, ディーメック社, SCR-751) に充填したポリマー微粒子充填系 PSEP 複合材料を注型法により製作した。なお、物理的溶融分散法および注型法などの成形方法は昨年度までと同じため、ここでは省略する。製作したポリマー微粒子充填系 PSEP 複合材料のトライボロジック的性質はリングオンプレート型 (連続式) およびピンオンディスク型 (間欠式) すべり摩耗試験の異なる2種類を用いて摩擦係数や比摩耗率などを評価した。また、摩擦挙動を明確にするため、SEM や高速度ビデオカメラなどを用い、すべり摩耗試験を観察した。

## 2-3 実験結果と考察

図1に試験片 (樹脂) と相手材の接触が間欠式であるピンオンディスク型すべり摩耗試験における摩耗進行曲線 ( $V-L$  曲線) を示す。ただし、試験条件は垂直荷重  $P=10\text{N}$ 、すべり速度  $v=0.2\text{m/s}$ 、すべり距離  $L=100\text{m}$ 、および相手材は耐水研磨紙 cc800 である。PSEP100% および UHMWPE/PSEP 複合材料とも試験開始から  $L=20\text{m}$  付近までの初期摩耗ではほぼ同様な傾向を示すが若干 UHMWPE 充填系の方が高い摩耗量を示す。しかしながら、 $L=20\text{m}$  以降では傾向は逆転し、UHMWPE 充填の効果も大きく現れ、PSEP100% よりも UHMWPE/PSEP 複合材料の方が緩やかな曲線を示す。この  $V-L$  曲線の傾きから算出した比摩耗率  $K$  は、PSEP100% では  $K=305 \times 10^{-5}\text{mm}^3/\text{Nm}$ 、UHMWPE/PSEP 複合材料では  $K=96 \times 10^{-5}\text{mm}^3/\text{Nm}$  である。したがって間欠式であるピンオンディスク型すべり摩耗試験においても、UHMWPE 微粒子充填により摩擦摩耗特性を改質できることがわかる。

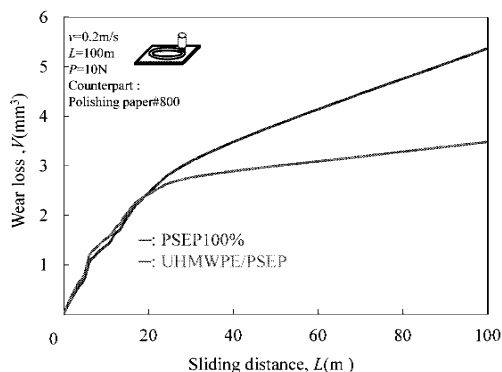


図1: ピンオンディスク型すべり摩耗試験の摩耗進行曲線

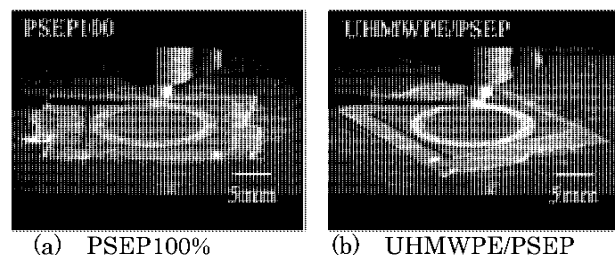


図2: ピンオンディスク型すべり摩耗試験 (試験開始直後)

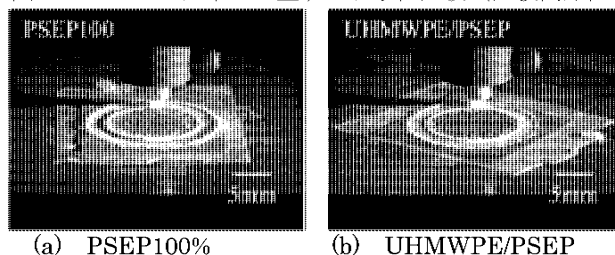


図3: ピンオンディスク型すべり摩耗試験 (L=50m)



図1のピンオンディスク型すべり摩耗試験時の摩耗挙動を観察した結果を図2および図3に示す。ただし、図2は試験開始直後(すべり距離  $L=0.08\text{m}$ ) および図3は  $L=50\text{m}$  の結果である。図2(a)に示す PEPS100%および図2(b)に示す UHMWPE/PSEP 複合材料ともに、試験開始直後にも関わらず、相手材である耐水研磨紙上に移着膜が形成されており、若干 UHMWPE 充填系の方がすべり面上に均一な移着膜が形成されている。一方、すべり距離  $L=50\text{m}$  の場合、図3(a)に示す PEPS100%はしゅう動面上の移着膜の厚みも増し、かつ削られた樹脂がしゅう動面の両脇に高い壁をつくっているのに対し、図3に示す UHMWPE/PSEP 複合材料では移着膜は均一に形成され、また両脇に排出される樹脂量も少ない。このような移着膜形成の仕方や摩耗粉の排出の違いなどが摩耗挙動に異なる影響を及ぼすものと考えられる。

### 3. リバースエンジニアリング技術の構築

#### 3-1 背景

昨年度に引き続き、光造形によるマイクロ機械部品の開発のため、マイクロサイズのリバースエンジニアリング技術の構築を目的とし、光造形を中心としたリバースエンジニアリング(RE)の技術構築および、それらを用いたマイクロ機械部品の開発を検討した結果を報告する。具体的には、これまでに検討してきたCT撮影条件、CADデータへの変換方法(メッシュ作成含む)や光造形条件の最適化を進めるとともに、単品での部品造形だけでなく、可動部を有する複数部品の同時造形も試みた。

#### 3-2 実験

リバースエンジニアリング(RE)による実験方法は昨年度までと同様のため、詳細は省略する。可動部を有する複数部品を同時造形するため、複数部品間の隙間の影響を検討して必要な最小隙間を把握し、また可動部は、造形するために必要なサポートの場所や形状なども検討した。

#### 3-3 実験結果と考察

図4に可動部を有する複数部品を同時造形した一例としてピンおよび平座金を組み合わせた部品を示す。図4(a)はリバースエンジニアリング(RE)により取得したCADデータである。また、図4(b)はそのCADデータをもとに、複数部品を同時造形したものである。ピンと平座金の間隔の変更およびサポートを設けることにより、可動部を有する部品の造形は可能であることがわかる。しかしながら、積層方向に重なる部分などは寸法誤差が大きくなるため、今後更なる造形条件等の見直しが必要である。

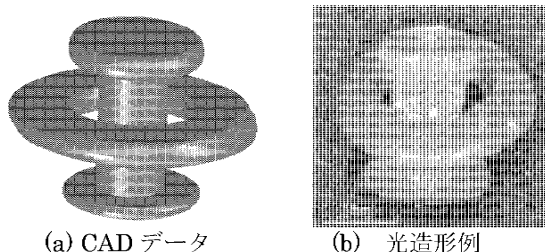


図4: REを用いた可動部を有する複数部品の同時造形例

### 4. 結言

エポキシ樹脂系光造形用材料(PSEP)の更なる高性能化としてポリマー微粒子によるトライボロジー特性の改質を中心に検討するとともに、リバースエンジニアリング技術を用いた光造形による3次元マイクロ部品の成形加工技術の構築を検討した結果、次の知見を得た。

- 1) 物理的溶融分散法を用いた UHMWPE 微粒子充填により、リングオンディスク型(連続式)だけでなく、ピンオンディスク型(間欠式)の異なるすべり摩耗試験においても、PSEPの摩擦摩耗特性を改質できること。
- 2) その改質は、摩耗挙動を観察した結果、相手材への移着膜形成の仕方や摩耗粉の排出が異なるためであることを明らかにした。
- 3) リバースエンジニアリング技術を用い、可動部を有する複数部品の造形が可能であることを示した。

### 参考文献

- 1) 丸谷洋二: 積層造形技術資料集, 2002, オプトロニクス
- 2) 金原幸雄: プラスチックス, Vol.60 pp.42-45, 2009

### 査読付き論文・著書

- 1) Nishitani, Y., Ishii, C., Kitano, T., "Rheological Properties of Surface Treated Glass Fiber Reinforced Polypropylenes in Molten State", *Polypropylene*, Dr. Fatih Dogan (Ed.), InTech, Chapter 15, (2012) pp.287-316. (著書)
- 2) Ichimura, Y., Takezawa, H., Mohri N., "Relationship between Magnetic Flux Density and Temperature Distributions of Permanent Magnets by EDM", *Key Engineering Materials*, vol.523-524 (2012), pp.322-327
- 3) Takezawa, H., Ichimura, Y., Suzuki, T., Muramatsu, T., Mohri N., "Relationship between Thermal Influence and Magnetic Characteristics in Electrical Discharge Machining of Magnetic Materials", *Key Engineering Materials*, vol.516 (2012), pp.575-579

### 学会発表

- 1) Nishitani, Y., Toba, T., Kitano, T., "Effect of Hardness of Elastomers on the Tribological Properties of Polymer Microparticles Filled Polyamide 12 Elastomer Composites", *Proceedings of the Polymer Processing Society 28th Annual Meetings*, (2012), P-07-319
- 2) Hasumi, M., Nishitani, Y., Kitano, T., "Effect of Surface Treatment on the Mechanical Properties of Hemp Fiber Reinforced Polyamide 1010 Composites", *Proceedings of the Polymer Processing Society 28th Annual Meetings*, (2012), P-07-324
- 3) Shitsukawa, M., Nishitani, Y., Kitano, T., "Effect of Addition of SEBS-g-MA on the Mechanical Properties of PA6/PP/CaCO<sub>3</sub> Composites", *Proceedings of the 3rd Thailand-Japan Rubber Symposium*, (2013), pp.104-105
- 4) 市村佳大, 武沢英樹, 毛利尚武, "永久磁石へのビーム照射による磁石内部温度と表面磁束密度の変化", 2012年度電気加工学会全国大会, (2012), pp.41-42
- 5) 草間智也, 武沢英樹, 毛利尚武, 齋藤長男, "液中放電表面処理における表面粗さの経時変化", 2012年度電気加工学会全国大会, (2012), pp.38-39
- 6) 黒田洋平, 武沢英樹, "液中ビーム加工における気泡挙動と材料除去過程の関係", 2012年度日本機械学会山梨講演会, (2012), pp.118-119
- 7) 石田圭佑, 武沢英樹, "高加速度極間制御による高速放電加工機の開発", 2012年度日本機械学会山梨講演会, (2012), pp.116-117
- 8) 武沢英樹, 市村佳大, 横手暢彦, 毛利尚武, "永久磁石の放電加工における表面磁束密度の変化", 2012年度精密工学会秋季大会, (2012), pp.119-120
- 9) 草間, 小川, 武沢英樹, "放電表面処理における面性状の経時変化", 2012年度日本機械学会茨城講演会, (2012), pp.116-117

# 応用生体医工学プロジェクト



## 応用生体医工学プロジェクト

### Applied Project of the Biomedical Engineering Research Center (BERC)

プロジェクト長：藤江 裕道（工学院大学総合研究所客員教授）

本プロジェクトでは、基礎生体医工学研究プロジェクトで得られた多くの成果・知見、および整備済みの種々のマイクロ加工装置や計測・評価装置を有効に活用して、生体医工学研究の応用面を進展させる。また、医療デバイス開発やロボット技術などを用いて、医学研究機関、医療系企業等との連携を行う。

プロジェクトを構成する中テーマおよび中テーマ内の小テーマと担当者は以下のとおりである。

研究プロジェクト（5年間）の最終年度となり、多くの研究成果が得られている。査読付論文等が数多く発行され、また、開発された技術や材料等の臨床治験が開始されている。

#### 応用生体医工学研究プロジェクト

##### 2.1. 幹細胞を用いた組織再生工学

###### 2.1.1. 幹細胞を用いた軟骨再生

藤江裕道，中村憲正（阪大医），中田 研（阪大医）

###### 2.1.2. 幹細胞を用いた靭帯、腱の再生

木村雄二，藤江裕道，中村憲正（阪大医），中田 研（阪大医）

##### 2.2. マイクロバイオデバイスの開発

###### 2.2.1. Ni-Ti 形状記憶合金のバイオデバイスへの適用

木村雄二，山内 清（東北大先進医工学研）

###### 2.2.3. バイオメトリクス環境センサの研究

疋田光孝，竹内正男（玉川大）

##### 2.3. 医療支援ロボットの開発

###### 2.3.1. 歯科患者ロボット

高信英明，高西淳夫（早大），横宏太郎（昭和大学歯）

###### 2.3.2. 6軸ロボットシステムを用いた関節再建術の評価

藤江裕道，大坪英則（札医大），坂根正孝（筑波大医），史野根生（大阪府立大総合リハ）

###### 2.3.3. 生体信号処理に基づく医療装置の開発と応用

中茎 隆，橋本洋志（産業技術大院）



## 2.1. 幹細胞を用いた組織再生工学 Tissue Engineering Using Stem Cells

### 2.1.1. 幹細胞を用いた軟骨再生

藤江 裕道, 中村 憲正 (大阪大学医学部), 中田 研 (大阪大学医学部)

### 2.1.2. 幹細胞を用いた靭帯・腱の再生

木村 雄二, 藤江 裕道, 中村 憲正 (大阪大学医学部), 中田 研 (大阪大学医学部)

軟骨は関節の潤滑性を良好に保ち、靭帯は関節の動きを拘束し、腱は筋力を骨に伝え、ともに四肢の運動効率を高めることに貢献している。これらの生体組織に共通している特徴は、過大な荷重がかかることである。たとえば歩行動作時において、膝前十字靭帯には数十 MPa の引張応力がかかるし、軟骨には数 MPa の圧縮応力がかかる。荷重が悪化すれば、これらの組織はいとも簡単に破壊されてしまう。そして、困ったことに、もうひとつの共通点は、その様にして破壊した軟骨、靭帯、腱の修復がきわめて困難であることである。軟骨は青白色をしているが、これは血行がほとんどないことを意味している。靭帯や腱も、軟骨ほどではないが血行に乏しい。そのため、これらの生体組織が変性、損傷すると、修復のための必要物質が運搬されにくく、自己修復はきわめて難しい。

これらの生体組織を治療するため、様々な方法について研究が行われている。最も一般的なものは、損傷した組織に代わり、これらと似た組織を体の別の場所から採取し、患部に移植する方法である。軟骨であれば軟骨形成術、靭帯であれば靭帯再建術と呼ばれ、一定の成績を上げている。しかし、再建組織を採取する部位で痛みが発生したり、機能不全が起こる、などの問題がある。また、再建組織の機能回復に限界があるという問題もある。関節の変性や損傷が重度の場合は、関節全体を人工物で置き換える人工関節置換術が適応されるが、形状適合性の低い膝関節などでは臨床成績は必ずしも良くなく、また、人工関節を構成する金属とポリエチレンの摩耗粉が生体にさまざまな悪影響をおよぼすという問題もある。

現在、これらの治療法の問題点を解決すべく、再生医療が注目されている。患者の体内から細胞や組織を取り出し、適当な足場材（スキャフォールド）に播種して培養し、患部に置換して治療するという方法である。その中で、特に幹細胞を用いた方法が脚光を浴びている。幹細胞は分化能と増殖能を併せ持つ細胞であるが、その高い分化能により治療対象組織の細胞を創り出し、かつ高い増殖能でその効果を長時間持続することが可能である。幹細胞の能力を最大限活用することで、さまざまな生体組織の再生、修復を高効率で達成できると考えられ、多くの研究者がしのぎを削って研究を進めている。

本研究では、我々が再生医療用材料として開発した、幹細胞を含む滑膜由来細胞を自己生成させた scSAT を用いた検討を行った。scSAT は、本研究プロジェクトの 1.1 で詳述されているように、関節滑膜から採取した幹細胞を含む細胞塊を取り出し、4~7 回程度の継代培養によって幹細胞

密度を高め、アスコルビン酸により線維生成を促進させ、自然収縮により肥厚させた生成した組織である。組織の強度を担うタイプ I およびタイプ III のコラーゲン線維や、周辺組織との連結を担うフィブロネクチンなどで構成されており、組織修復への応用が期待されている。特に、軟骨部分欠損の治療の場合、構造強度がさほど必要でないため、スキャフォールドを用いずに scSAT を欠損部に詰めるだけで移植治療が行え、移植後の成績も良好であることが分かっている。

2.1.1. では、scSAT で軟骨を修復するだけでなく、ハイドロキシアパタイトからなる Neobone により軟骨下骨の修復も同時に行った。軟骨変性関節においてみられる下骨の脆弱化の問題を解決する必要性が指摘されているのである。家兎を用いた動物実験で、骨・軟骨部分欠損部に他家由来の scSAT と Neobone を移植し、修復後の組織の圧縮特性や摩擦係数を求めた。その結果、本方法による修復軟骨の摩擦特性は正常軟骨に遜色なく、軟骨特有の摩擦係数依存性を有していることも分かった。また、昨年度に引き続き、軟骨の潤滑メカニズムを解明し、修復軟骨の特性を解明する目的から、固液二相性を考慮した多孔質弾性体モデルを改良し、解析を行った。その結果、軟骨表層の透水性を低下させると、摩擦係数が低下することが分かった。さらに、透水率低下層の厚さが 50  $\mu\text{m}$  のときに、動摩擦係数が最も低くなることが分かった。この厚さは、透水性が低いと考えられる軟骨表層のコラーゲン線維層の厚さに等しい。生体は最適設計されていると言われるが、関節軟骨の摩擦特性においてもそれがあてはまることが示唆された。

2.1.2. では、靭帯、腱の修復を目的として、前年度までは 1.5 「マイクロ構造の評価・加工技術」を応用して、培養皿にマイクロパターン加工を施し、細胞と生成組織を配向させ、靭帯・腱様 scSAT の創成を行ってきた。今年度は、さらに小さな加工スケールを狙い、フェムト秒レーザーによりナノ周期構造をチタン基盤上に作成し、その基盤上で scSAT の生成を行った。その結果、ナノ周期構造により細胞接着性と異方性が向上することが分かった。これとは別に、scSAT の強度を高めるために、コラーゲンペプチドシート上で scSAT を生成し、scSAT/コラーゲンペプチドシート複合体を生成した。この複合体を家兎の膝蓋腱欠損部に埋入して、6 ヶ月後の引張鏡を求めた。その結果、細胞を含まないコラーゲンペプチドシートのみを埋入した場合、線維性組織が満ちているものの、強度向上は得られないことが分かった。細胞含有の複合体に関しては現在実験中である。



## 2.1.1. 幹細胞を用いた軟骨再生 Application of stem cell-based self-assembled tissues (scSAT) to cartilage repair

藤江 裕道, 中村 憲正 (阪大医学部), 中田 研 (阪大医学部)

Hiromichi FUJIE

Norimasa NAKAMURA, Ken NAKATA (Osaka University Medical School)

**Keywords :** Stem cell-based self-assembled tissue(scSAT), Tissue engineering, Cartilage repair, Bi-phasic model

### 1. はじめに

関節軟骨は血行に乏しく、自然治癒能力が低いという特徴を有している。そのため、スポーツ事故や変形性関節症などで損傷すると外科的処置により修復させる必要がある。我々は患者の滑膜より採取した滑膜由来細胞を培養することで生成した幹細胞自己生成組織 (scSAT) (軟骨修復を目的に限定する場合は組織再生材料 (TEC) と呼ぶ) を用いた軟骨修復の方法について研究を進めており、昨年度までに修復軟骨の圧縮特性や摩擦特性について、実験と解析の両面から調べてきた<sup>1-3)</sup>。本年度は、実験動物に家兎を用い、軟骨と下骨をそれぞれ scSAT とハイドロキシアパタイトからなる Neobone で修復した。修復した骨軟骨試料のインデンテーション試験と摩擦試験等を行い、修復方法の評価を行った。また、前年度に引き続き、線維強化多孔質弾性体モデルを用いて軟骨の潤滑様式に関する検討を行い、特に軟骨最表面の透水性が摩擦特性に及ぼす影響について調べた。

### 2. 幹細胞由来材料 scSAT による軟骨修復

#### 2.1 実験動物モデル

3 週齢の未成熟家兎の膝関節滑膜から関節包組織を取り出し、継代培養を行った (Fig. 1)。細胞密度が 4 百万個/cm<sup>2</sup> になった時点で 0.2 mM のアスコルビン酸溶液を添加し、4 日~14 日たった時点で培養組織を剥離し、scSAT を生成した (Fig.1)。24 週齢以上の成熟ウサギ膝関節の片方の膝蓋大腿関節面に、直径 5 mm、深さ 6 mm の全層骨軟骨欠損を作製し、scSAT/NEOBONE 複合体を移植した。手術後 24 週で屠殺し、修復部と非手術側の膝の膝蓋大腿関節面から直径 4 mm の円柱状に切り出した組織を試験片とした (Fig.2)。

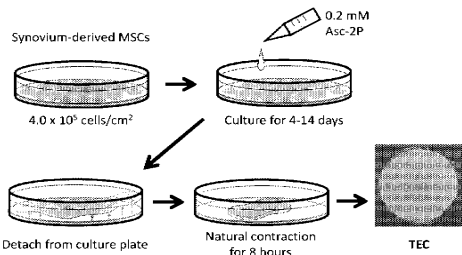


Fig. 1: 3 週齢の家兎滑膜組織より生成した scSAT (TEC)

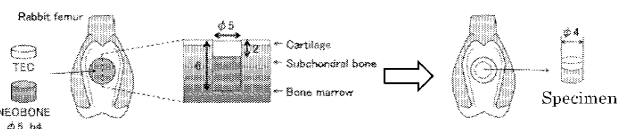


Fig.2 骨軟骨の移植実験と試料採取

#### 2.2 インデンテーション試験

Katakai らが作成した軟骨圧縮試験機<sup>4)</sup>を改良し、直径 3

mm の球プローブを有するインデンテーション試験機を製作し、圧縮速度 10  $\mu\text{m/s}$  または 100  $\mu\text{m/s}$  で試験を行っている。

#### 2.3 摩擦試験

Fig.3 に示す摩擦試験機を開発した。この摩擦試験機は、家兎軟骨のように平坦部分が少ない関節軟骨の摩擦試験を行うために開発したものである。軟骨面の傾斜面に直径 1 mm の球プローブが接触し、そのまま横方向に摩擦すると縦方向荷重計の出力が変化する。そこで、その出力を一定に保つように、2.3.2 のテーマで開発した速度コンプライアンス制御<sup>5)</sup>を用いて縦方向アクチュエータを荷重制御した。摩擦試験終了後、アクチュエータ変位から軟骨面形状が求められるので、荷重のつり合いから摩擦力と垂直力を計算し直し、摩擦係数を求めた<sup>6)</sup>。

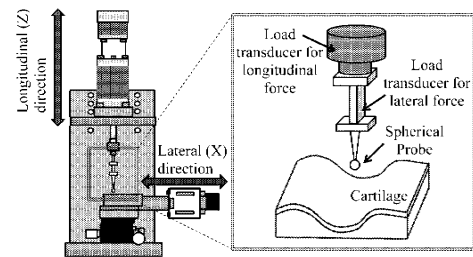


Fig.3, 平坦部分の少ない軟骨面に対応した摩擦試験機

#### 2.4 結果

Fig.4 に正常軟骨の摩擦試験結果の一例を示す。図の長破線から分かるように、家兎軟骨は平坦部が少なく、表面が大きくうねっている。これを無視して、単純に縦荷重計の出力/横荷重計出力で摩擦係数を計算すると、図の短破線のように、摩擦係数は部位ごとに大きく変動してしまう。ところが、2.3 に示したように形状の影響を除く計算をすると、実線で示すような、ほぼ一定の摩擦係数が求められる。

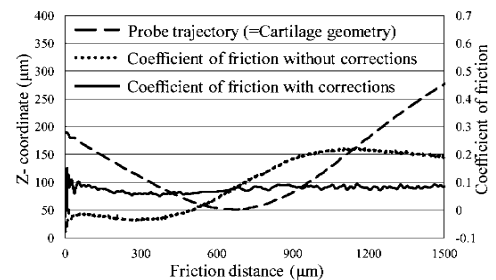


Fig.4 形状の影響を取り除いた家兎正常軟骨の摩擦係数

本結果より、scSAT と Neobone で修復した軟骨様組織の摩擦係数は、正常軟骨よりわずかに高いものの、有意差はなく、0.3~0.5 の範囲であることが分かった。また、正常軟骨と同じく、摩擦速度の増加とともに摩擦係数が有意に低下した。



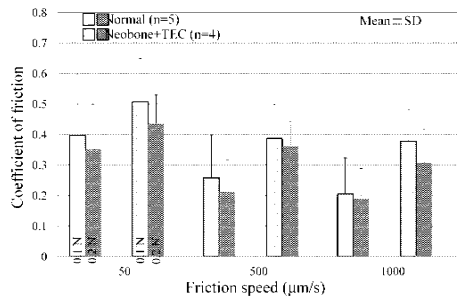


Fig. 5: 家兎修復軟骨の摩擦係数

### 2.5 考察およびまとめ

比較的安価で飼育が簡便な家兎を用いる場合、試料が小さいために、適正な条件で摩擦試験が行えないという問題が発生した。そこで、速度コンプライアンス制御を用いて、曲面状の軟骨でも摩擦試験が可能な摩擦試験システムを開発した。今後は、他の実験でもこのシステムを有効利用できる。

scSAT と Neobone による修復軟骨の摩擦係数は正常軟骨と同等であり、しかも、荷重増加により摩擦係数が低下する荷重依存性を示した。次項にも示すとおり、近年の軟骨の摩擦に関する研究では、直接接していると思われる軟骨内の水分が荷重を担うことにより、1/100 以下の摩擦係数が保たれることが分かってきている<sup>7)</sup>。scSAT による修復軟骨が、そのような性能を獲得していることが分かった。

## 3. 軟骨表層の透水性が摩擦特性に及ぼす影響

### 3.1 軟骨表層の透水性低下が摩擦特性に及ぼす影響

軟骨の摩擦係数が極めて小さな値に保たれる理由のひとつに、軟骨組織が固相と液相の二相性構造であることが挙げられる。本研究では、このことを明らかにするため解析的検討を行ってきた。本年度は、軟骨表層のコラーゲン線維の走行に着目し、これによる軟骨面に平行な透水性の著しい低下が軟骨の摩擦特性に及ぼす影響について調べた。

### 3.2 軟骨解析モデル

Fig.6 は膝関節部の軟骨表層の SEM 観察像である。表層に矢印で示した厚いコラーゲン線維層があることが分かる<sup>4)</sup>。



Fig.6 正常軟骨の断面 SEM 像で観察されるコラーゲン線維

この特異な構造のために、軟骨を 30%程度圧縮した時に、軟骨面に平行な方向の透水性が 1/10 程度まで低下することが報告されている<sup>9)</sup>。そこで、昨年度までの研究で開発した軟骨モデルを利用し、厚さ 100 μm の表層の透水性を 1/10 に低下させ、他は昨年度と同じ条件<sup>9)</sup>で、多孔質弾性体モデルによる摩擦解析を行った。また、摩擦速度を 100 μm/s に固定し、透水性低下層の厚さを変化させ、同様の解析を行った。

### 3.3 結果・考察・まとめ

Fig.7 に起動摩擦係数と速度を変化させたときの動摩擦係数を示す。表層の透水性を低下させると、起動摩擦係数および低速時の動摩擦係数が大きく低下することが分かった。透水性低下層を変化させた場合、起動摩擦係数は層が厚いほど低下したが、動摩擦係数は層厚さが 50 μm のときに最低と

なった。透水性の低下による担荷能力向上と剛性低下が相反して影響を及ぼすため、層厚さ 50 μm において動摩擦係数が最低値になったと考えられる。実際の軟骨のコラーゲンが豊富な表層の厚さは約 50 μm であり、みごとに一致している。修復軟骨でも、これに相当する表層を創成することで、より低摩擦特性が実現されると考えられる。時期プロジェクトにおける検討事項であろう。

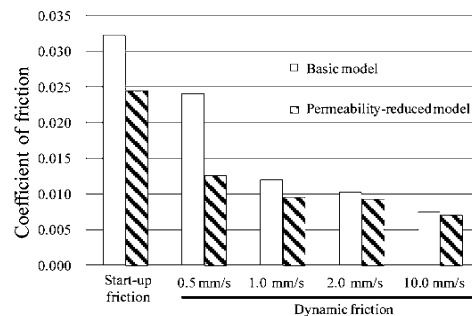


Fig.7 透水性低下軟骨における摩擦係数の速度依存性

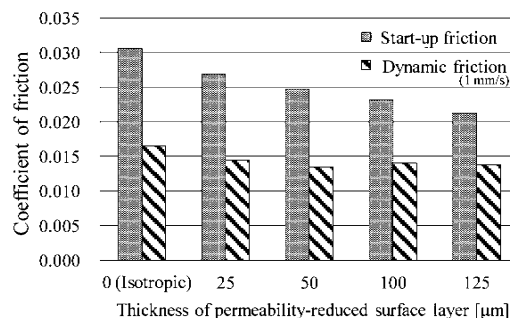


Fig.8 透水性低下層厚さの摩擦係数に及ぼす影響

## 文献

- 2009, 2010, 2011 BERC 報告書, 2) Ando, et al, Biomaterials 28, 2008, 3) Nansai, et al, J Biomech Sci Eng 6, 2011, 4) Katakai, et al, Clinical Biomechanics 21, 2009, 5) 平林, 他, 計測自動制御学会誌, 1986, 6) 望月, 他, 日本臨床バイオメカニクス学会, 2012, 7) 今出, 他, 日本臨床バイオメカニクス学会, 2012, 8) Reynaud et al, J Biomechanics 39, 2006.

## 査読付き論文

- Ando W, Fujie H, et al, Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells, e Cells and Materials Journal, 2012; 24: 292-307.
- 今出, 藤江, 他, 臨床バイオメカニクス 2012; 33: 7-12 (日本臨床バイオメカニクス学会研究奨励賞) .
- Fujie H, Nakamura N, et al, Depth-dependent integration strength of cartilage-like tissue repaired with a stem cell-based tissue engineered construct, Clinical Biomechanics, submitted.

## 学会発表

- 藤江, 組織レベルの再生: 骨軟骨の修復と機能適応, 精密工学会 2012 年度春季大会抄録集, 14-16, 2012, 3. 東京.
- Fujie H, et al, Frictional property of articular cartilage depends on the anisotropic permeability of the superficial layer, Proc. of the Int. Conf on Biotribology, 29, 2012.5, X'ian China
- Imade K, Fujie H, et al, Effects of interstitial fluid and boundary condition on the start-up friction behavior of cartilage, Proc. of the Int. Conf on Biotribology, 33, 2012.5, X'ian China.
- 望月, 藤江, 起伏のある関節軟骨面に対応した摩擦試験機の開発, 日本臨床バイオメカニクス学会抄録集, 2012, 11, 147, 幕張.
- 今出, 藤江, 他, 膝関節軟骨最表層の透水性が摩擦特性に及ぼす影響, 日本臨床バイオメカニクス学会抄録集, 2012, 11, 148, 幕張.

## 2.1.2. 幹細胞を用いた靭帯・腱の再生

### Application of stem cell-based self-assembled tissues (scSATs) to ligament and tendon repair

木村 雄二, 藤江 裕道, 中村 憲正 (阪大医学部), 中田 研 (阪大医学部)

Yuji KIMURA, Hiromichi FUJIE

Norimasa NAKAMURA, Ken NAKATA (Osaka University Medical School)

**Keywords :** Stem cell-based self-assembled tissue(scSAT), Tissue engineering, Ligament and tendon repair

#### 1. scSAT の多層化による高強度化

関節に存在する腱や靭帯は、一度損傷すると自己治癒が困難である。近年、患者自身から幹細胞を採取し、それを用いて損傷した組織を治す再生医療が注目されている。現在、膝滑膜由来間葉系幹細胞とその細胞外基質から成る自己生成組織 (Synovium-derived stem cell-based self-assembled tissue: scSAT) が新たな腱や靭帯の再生医療用材料として期待されているが、現状の scSAT は腱や靭帯への臨床応用には強度が不足している。一方、scSAT の作製に用いる間葉系幹細胞は、低酸素状態にある滑膜に由来しているため、scSAT は多層化できる可能性がある<sup>1)</sup>。scSAT を多層化することで、単層の scSAT と比較してより大きな荷重に耐えることが可能であると考えられる。さらに、多層化後に scSAT を培養することによって組織同士が癒合し、組織の強度が増加すると期待できる。本研究では、scSAT の多層化による高強度化を目指し、多層化した組織の力学的及び組織学的な評価を行った。

#### 1.1. scSAT の作製と多層化

ヒト膝滑膜から間葉系幹細胞を採取した。初期細胞密度  $6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、L-アスコルビン酸 2 リン酸を 0.2 mM となるように添加した培地 (DMEM + 10%FBS + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin) 中で培養した。28 日間培養後に培養皿から組織を剥離し、1 時間自己収縮させ、scSAT を作製した。以下、この試料を Co 群と表記する。その後、作製した scSAT を Cellshifter (CSD001, セルシード) を用いて別の scSAT 上に重ねた (M0 群)。さらに、多層化後、scSAT を培地中で 7 日間培養した (M7 群)。

#### 1.2. 力学試験

各 scSAT をスライドガラスに広げ、カバーガラスで挟んだ。顕微鏡を用いてスライドガラスとカバーガラス間の距離を 5 箇所測定し、その平均値を scSAT の厚さとした。

力学試験では永井らが開発した引張試験機<sup>2)</sup>を用いた。チャック部で scSAT を把持し、横幅 6 mm に切りそろえた。2 色のマーカを scSAT に取り付け、画像センサ (CV-700, KEYENCE) を用いてマーカ間の変位を計測し、非接触でひずみを測定した。ひずみゲージを用いてチャック部のひずみを計測し、荷重を測定した。プレロードを 4 mN 与え、その状態をひずみ 0 と定義し、引張速度 0.05 mm/s で scSAT が破断するまで引張荷重を与えた。試験片の断面積を求め、得られた荷重データを断面積で除し、公称応力を求めた。

#### 1.3. 組織観察

M0 群と M7 群を中性ホルマリン溶液で固定した後、エタノールを用いて脱水した。キシレンに浸漬後、パラフィンに浸漬した。パラフィンブロックを厚さ 4 µm に切り出し、薄切切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色後、組織の断面を観察した。

#### 1.4. 結果

Fig.1 に厚さ測定の結果を示す。Co 群の厚さは  $79.3 \pm 15.8 \mu\text{m}$ 、M0 群は  $202 \mu\text{m}$ 、M7 群は  $232 \mu\text{m}$  であった。

引張試験より取得した応力-ひずみ線図、破断強度を Fig.2 および Fig.3 に示す。

Co 群はひずみ  $0.10 \pm 0.06$

でピーク応力  $0.11 \pm 0.02 \text{ MPa}$ 、M0 群はピーク応力がひずみ 0.1 および 0.4 で 2 度観測され、その値は  $0.07 \text{ MPa}$  程度となり、M0 群と比較して低かった。M7 群はひずみ 0.34 でピーク応力  $0.21 \text{ MPa}$  となり、M0 群や Co 群と比較して高かった。

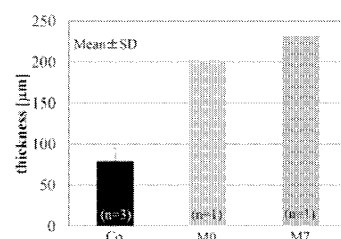


Fig.1 各 scSAT の厚さ

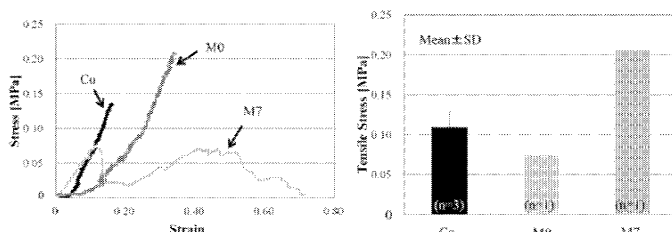


Fig.2 各群の応力-ひずみ線図

Fig.3 各群の破断強度

M0 群と M7 群の断面の観察結果を Fig.4 に示す。M0 群は組織間に空間があり、癒合は観察されなかった。一方、M7 群は組織間の境界面が癒合し、組織が一体化している様子が観察された。

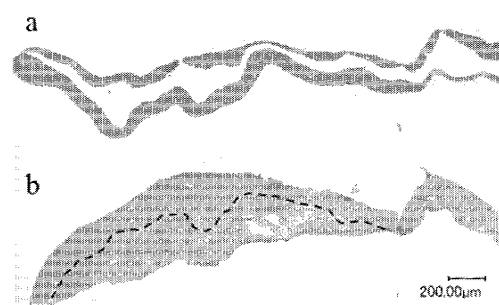


Fig.4 M0 群(a)と M7 群(b)の断面の組織観察結果

#### 1.5. 考察

M0 群は、scSAT 層間が癒合していないため、それぞれの scSAT が異なるひずみで破断し、2 つのピーク応力が観測されたと考えられる。これに比べ、scSAT の癒合が進んだ M7 群のピーク応力は一度観測されたのみであり、破断強度は Co 群や M0 群と比較して高くなった。形態観察の結果、7 日間の培養により、scSAT 内の細胞が基質を生成して組織同士が癒合することがわかった。基質生成と同時に、基質内のコラーゲン線維構造が線維間のクロスリンクなどにより、強固になったため、M7 群の破断強度は Co 群、M0 群と比べて高くなったと考えられる。

## 2. scSAT/コラーゲンペプチドシート複合体による腱・靭帯修復

scSAT を腱、靭帯の修復に用いる際の最も大きな問題は、強度不足である。本プロジェクトにおいて、scSAT の強度を高める手法について検討が行われ、これまでに、細胞培養表面にマイクロ・ナノ加工を施して様々な表面構造をあたえ、その構造上で scSAT を生成することで強度向上が実現できることが分かっている。特に、数 10 μm レベルの深さとピッチを有する溝周期構造上で scSAT を培養し、くり返しの引張刺激をあたえると、通常培養皿上で無刺激で培養した scSAT に比べ、4 倍以上の高い強度を有することが分かっている<sup>3)</sup>。マイクロ・ナノ加工を scSAT 生成に応用することによる、高強度 scSAT 生成の可能性が示唆されている。

一方、コラーゲンを溶解、分解して得られるコラーゲンペプチドを用いることで線維性組織の強度向上がはかれる可能性が示されている。Minaguchi らは、正常家兎にコラーゲンペプチドを一日 0.2 g/kg または 1.0 g/kg 投与し、56 日間、飼育したところ、アキレス腱のコラーゲン線維の直径が有意に増大したことを報告している<sup>4)</sup>。強度向上の直接的結果は得られていないが、線維性組織の強度が線維直径に依存することが示されていることから、修復靭帯強度向上の有効な方法と考えられる。そこで、本研究では、scSAT をコラーゲンペプチドシート (CPS) 上で培養することにより、scSAT のさらなる強度向上をはかることを目的とした。

### 2.1. コラーゲンシート

(株)ニッピから提供された CPS を用いた。これは、分子量 30 万程度の動物由来コラーゲン分子を、熱変性などによる変性を起こさず、架橋材も用いずにシート状に加工した材料である。コラーゲン密度は生体線維と同等の、20~30%程度である。

### 2.2 膝蓋腱欠損部の癒合実験

未成熟 SD ラット (体重 200 g, 雄) の膝関節より採取した間葉系幹細胞を含む細胞群を継代培養した後、1.1 の scSAT を生成する手法と同じ手法で、CPS 上で培養した。細胞密度が  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> になった時点でアスコルビン酸ナトリウムを滴下し、さらに 7 日間培養して scSAT/CPS 複合体を生成した。

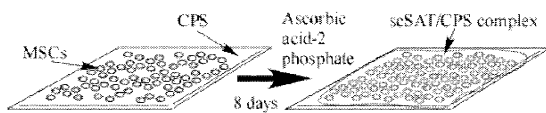


Fig.5 scSAT/CPS 複合体の生成

成熟 SD ラット (体重 250 g, 雄) を麻酔し、膝関節正面より関節包まで縦切開し、膝関節遠位の膝蓋腱の中央 1/3 を長さ 10 mm 分、切除した (Fig.2)。切除部分に、scSAT/CPS 複合体を埋入し、腱膜で包んだ後に周囲の膝蓋腱に縫合した (scSAT/CPS 群)。比較対照として、細胞を含まずに CPS だけを埋入した CPS 群、および、なにも埋入しなかった Sham 群も用意した。

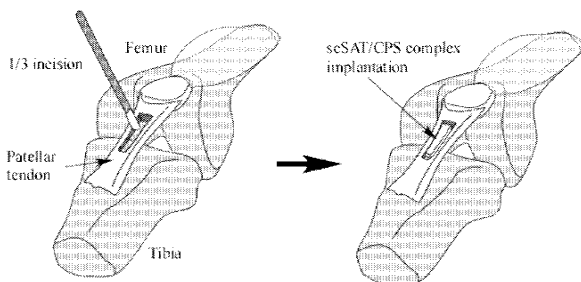


Fig.6 ラット膝蓋腱中央 1/3 の切除と scSAT/CPS 複合体の埋入

### 2.3 引張試験

埋入後、4 週、および 8 週で修復組織を両端骨ごと摘出し、形状計測・引張試験機<sup>5)</sup>を用いて断面形状と引張強度を求めた。

## 2.4 結果

Sham 群、および CPS 群の 4 週後の断面を Fig.7 に示す。Sham 群では切除部分の中央 1/3 に線維性に乏しい組織が残存しているのに対し、CPS 群では周囲組織と同等の線維性組織で満たされていることが分かった。しかし、CPS 群の引張強度は Sham 群とほぼ同等であり、有意差は観測されなかった (Fig.8)。

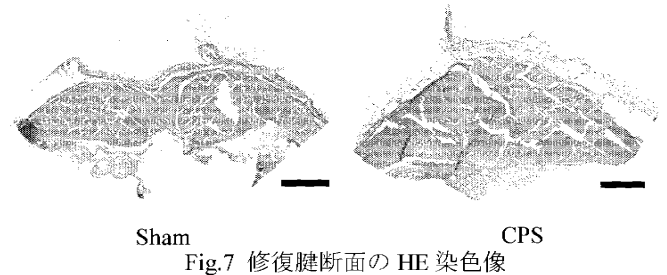


Fig.7 修復腱断面の HE 染色像

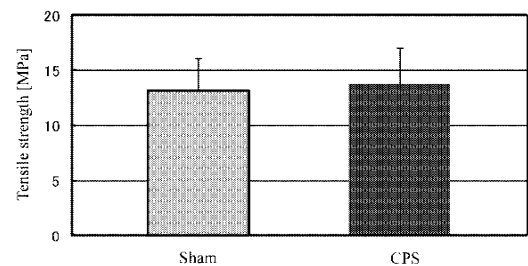


Fig.8 修復腱の引張強度

### 2.5 考察

CPS 群は、組織学的に良好な修復経過を示すものの、引張強度は、sham 群と同等の 14 MPa 程度であった。線維性組織の修復では、修復当初に強度低下が起こり、その後、線維生成にもなって強度が向上することが知られている。Fig.8 で示した引張強度は修復 4 週時点の結果であり、この後、8 週にかけて強度が向上する可能性がある。細胞を含有した scSAT/CPS 群では、コラーゲンペプチドによるシグナル伝達効果により幹細胞の基質生成が盛んになり、強度が向上すると予想される。今後、計測を行って解明していく。

## 3. まとめ

研究プロジェクト最終年度の本年度は、腱・靭帯の再生に対し、臨床応用可能な強度をもつ scSAT を創製するための 2 つの検討を行った。1 では、scSAT の多層化とその後の培養により、組織が癒合し、強度を向上できることを明らかにした。2 では、CPS を用いることによって組織の修復が促進され、強度向上に繋がる可能性を示した。今後、これらの成果を複合することにより、腱・靭帯の新たな再生医療用材料の創成が期待できる。

## 文 献

- 1) Sasagawa, et al, Biomaterials **31**, 2010, 2) Nagai, Fujie, et al, Jpn J Clin Biomech **27**, 2006, 3) 2010年度BERC報告書, 2011, 4) Minaguchi, et al, J Nutr Sci Vitaminol **51**, 2005, 5) 2009年度BERC報告書, 2010

### 投稿論文

- 1) 大家, 藤江, 他, 培養表面のマイクロ周期構造が間葉系幹細胞自己生成組織の力学特性におよぼす影響, 材料の科学と工学 **50**(1), 2013

### 学会発表

- 1) 佐藤, 藤江, 他, マイクロ周期構造表面が幹細胞の基質生成に及ぼす影響, 精密工学会 2012 年度春季大会, 2012
- 2) 大家, 藤江, 他, マイクロパターン培養皿上で作製した滑膜由来幹細胞自己生成組織の特性解析, 第 39 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2012
- 3) 池谷, 藤江, 他, 幹細胞自己生成組織の多層化, 第 4 回日本材料化学会 医用・生体材料分科会講演会, 2013

## 2.2. マイクロバイオデバイスの開発 Development of Micro-Bio-Devices

2.2.1. Ni-Ti 形状記憶合金のバイオデバイスへの適用  
木村 雄二, 山内 清 (東北大学先進医工学研究機構)

2.2.3. バイオメトリクス環境センサの研究  
疋田 光孝, 竹内 正男 (玉川大学工学部知能情報システム学科)

半導体 LSI, MEMS 更に液晶ディスプレイなどの高性能化に伴い、微細加工技術、新素材技術等は今後も絶えることなく研究開発が進む。これ等の所謂ハイテク技術がバイオ分野に対しても大きな波及効果をもたらしている。本中テーマ「マイクロバイオデバイスの開発」では、これ等の新技術に独自開発技術を加えた「Ni-Ti 形状記憶合金のバイオデバイスへの適用」、「バイオメトリクス環境センサの研究」を取り上げて研究/開発を進めている。

「Ni-Ti 形状記憶合金のバイオデバイスへの適用」では、形状記憶効果、超弾性効果というユニークな特性を有し、耐食性、耐摩耗性に優れるため有用なバイオマテリアルとして利用することを目指しており、また JIS にバイオデバイス用のマテリアルとしての使用が制定されるなど、これが実現されつつある。しかし、この Ni-Ti 合金は組成の約半分を Ni が占めるため、Ni イオンの溶出による Ni アレルギーの発症が懸念されている。高温酸化では表面の Ni を著しく減少させることができるが、表面から完全に Ni を消すことはできておらず、この表面に残留した Ni イオンが溶出し細胞にアレルギーを引き起こすのか否かは明らかでない。また、体の部位や、個体の感受性によってアレルギー反応の応答性は異なると考えられるため、複数種の細胞を用いて評価をする必要がある。本年度は、複数種の細胞に対し、溶出しイオン化した残留 Ni へのアレルギー反応の応答性と血小板粘着試験による血液適合性を評価することで高温酸化処理した Ni-Ti 合金(HTO)の生体材料への応用を検討した。Ni イオン溶液中で各種細胞培養を行った結果、イオン濃度が高くなるほど細胞の増殖率が低くなることが確認されたが、各細胞で応答性が異なった。これは体の部位により Ni イオンの許容摂取量が異なるため、アレルギーの反応性が異なることを示している。蛍光顕微鏡観察により、細胞数で有意差を得られた濃度では細胞骨格が収縮して線形化する傾向が見られた。SEM 観察でも細胞の線形化や収縮が見られ、仮足の伸展が阻害されていることが示された。したがって、表面から Ni を減らした HTO はアレルギー反応を引き起こす可能性が極めて低くなると考えられるため、細胞適合性に優れると考えられる。

また、血小板粘着試験を行った結果、10min では Ni, Ni-Ti の血小板の粘着量は変わらなかったが、フィブリンネットワークの形成傾向が見られた。HTO には血小板の付着、凝集の増加が見られたものの、フィブリンネットワークの形成は見られなかった。Ni, Ni-Ti がフィブリンネットワークの形成傾向を示したことからステント等で応用した場合血栓を作る可能性が高い。しかし、HTO にはフィブリンネットワークの形成傾向が見られなかったことから、HTO は血栓を作る可能性が低く、抗血栓性に優れ、血液適合性に優れることが示された。

「バイオメトリクス環境センサの研究」では、5 年間将来の介護ロボット等を想定した高度センシング技術の研究を行った。特に病院や要介護者の住環境中の「におい」に着目し、それをセンシングすることを目的とした。「病室や部屋のにおい」、「病人、老人の体臭や口臭」などの情報を介護ロボットや病室に敷設したセンサ・ネットワークが検知し、環境の維持、病状の変化等に対処する。

微量なガス分子等をセンシングする弾性表面波(SAW: Surface Acoustic Wave)センサの代表例である EST 社の装置は大型で、電力消費が大きいなどの問題があり、ロボットやセンサネットワーク等には採用出来なかった。東北大/凸版印刷がボール状の水晶に SAW を伝搬させ、センシング感度の向上と小型化を図っているが、伝搬損失が非常に大きいため消費電力が大きい。また、複雑な周辺回路を用いる点、水晶球が高価であるなど現状多くの解決すべき課題を内在している。

本研究では、5 年間幾つかの新技術を提案し、その有効性を確認してきた。特に、①自己温度補償機能の実現で水晶以外の圧電結晶を採用可能にした。②センサ用 SAW 遅延線が持っている固有の伝搬損失の低減には、センシング機能を持った SAW 共振器をラチス回路状に結線することで低損失なセンサを実現した。また、③センシング感度の向上のため、ガス分子等との相互作用領域を等価的に拡大する二重反射型の SAW 共振器を提案し、シミュレーションにより長遅延時間が得られることを示した。本報告では、従来技術と課題、課題に対する開発新技術と結果、今後の改良点等に関して報告する。



## 2.2.1. Ni-Ti 形状記憶合金のバイオデバイスへの適用

### Application of Ni-Ti Shape Memory Alloy to Bio-Devices

木村 雄二(工・環境エネルギー化学科) , 山内 清(東北大学先進医工学研究機構)  
Yuji KIMURA, Kiyoshi YAMAUCHI (Tohoku Univ. Biomedical Engineering Research Organization)

Key Word : Cytocompatibility, Nickel-Titanium Alloy, High-Temperature Oxidation

1. 緒言 現在、体内で用いられている生体材料において、機械的強度に優れるという特性を持った金属材料の利用が約 80%を占めている。この中の一つとして Ni-Ti 合金は形状記憶、超弾性という特性を持ち、耐食性、耐摩耗性に優れたバイオマテリアルとして循環器外科ではステント、歯科では歯科矯正用ワイヤーに利用されており、整形外科では人工股関節等に利用されている。しかし、この Ni-Ti 合金は組成の約半分を Ni が占めるため、Ni イオンの溶出による Ni アレルギーの発症が懸念されている。そこで、表面からの Ni イオンの溶出を抑制するため、Ni-Ti 合金の表面に酸化皮膜を成膜することにより材料表面の Ni を減少させることができる高温酸化という方法に注目した。高温酸化では表面の Ni を著しく減少させる事ができるが、表面から完全に Ni を消すことはできておらず<sup>(1)</sup>、この表面に残留した Ni イオンが溶出し細胞にアレルギーを引き起こすのかは解明されていない。また、体の部位や、個体の感受性によってアレルギー反応の応答性は異なると考えられるため<sup>(2)</sup>、複数種の細胞を用いて評価をする必要があると考えた。本年度は、複数種の細胞に対し、溶出しイオン化した残留 Ni へのアレルギー反応の応答性と血小板粘着試験による血液適合性を評価することで高温酸化処理した Ni-Ti 合金の生体材料への応用を検討した結果を述べる。

#### 2. 実験方法

##### 2-1 Ni イオン溶液中ならびに高温酸化処理した Ni-Ti 合金上での細胞培養

24h の前培養を行いポリスチレン製培養皿に細胞を接着させ、ここに 0~100ppm になるように Ni イオン溶液を入れ、72h の培養を行った。培養する細胞は線維芽細胞 L929、血管内皮細胞 HUVEC、骨芽細胞 MC3T3-E1 の 3 種類である。WST-8 を用いて細胞の増殖数の比較と位相差顕微鏡、SEM、蛍光顕微鏡を用いて形態変化の比較を行った。SEM にて細胞の観察を行う為に karnovsky 溶液、1%-四酸化オスミウム溶液にて固定を行い、脱水を行った後、臨界点乾燥を行った。スパッタリングにより白金パラジウムを付与し、SEM 観察を行い、蛍光顕微鏡ではアクチン、ビンキュリン、核の 3 種類の染色を行い、形態変化を比較した。72h での細胞の生存率を 0ppm とそれぞれの濃度と比較し、t 検定を行った。一方、Ni, Ni-Ti の  $\phi$ 15mm 棒材を 2mm 厚にカットし、表面を #1000 までエメリー研磨した後パフ研磨を行い鏡面に仕上げた。その後 Ni-Ti は 500℃ で 30 分間の高温酸化を行い、Ni 板、Ni-Ti 板、高温酸化処理を施した Ni-Ti(以下 HTO)板の 3 種類の試験片上での細胞培養を行った。

##### 2-2 血小板粘着試験

前述の 3 種類の試験片上での、血小板粘着試験を行った。

健常者の血液を採取し、PRP(多血小板血漿)、PPP(貧血小板血漿)を抽出した。この混合液に各試験片を 5, 10min 浸漬した。2%グルタルアルデヒドで固定し、脱水を行い、臨界点乾燥を行った後、SEM 観察を行った。

#### 3. 実験結果ならびにその考察

##### 3-1 Ni イオン溶液中ならびに試験片表面での細胞培養

Ni イオン溶液中で各種細胞培養を行った結果(Fig.1~3)、各細胞で応答性は違ったものの、イオン濃度が高くなるほど細胞の増殖率が低くなる事が確認され、各細胞で応答性が異なった。これは体の部位により Ni イオンの許容摂取量が異なるため、アレルギーの反応性が異なると考えられる。72h の細胞数を 0ppm と各濃度で比較し、t 検定を行った結果、L929 では 1, 5, 10, 100ppm で有意差が認められる結果となり、MC3T3-E1 では 5, 10, 100ppm で、HUVEC では 0.1, 1, 5, 10, 100ppm の全ての濃度で有意差が得られた。蛍光顕微鏡観察により、細胞数で有意差を得られた濃度では細胞骨格が収縮して線形化する傾向が見られた。さらに細胞の仮足付近でビンキュリンの減少傾向が見られた。これはビンキュリンが細胞骨格と細胞外とを結びつける因子であるため、これが減少している事から Ni イオンによって細胞の接着に影響が出ていると考えられる。有意差を得られた濃度では SEM 観察でも細胞の線形化や収縮が見られ、仮足の伸展が阻害されていることが示された。仮足は細胞

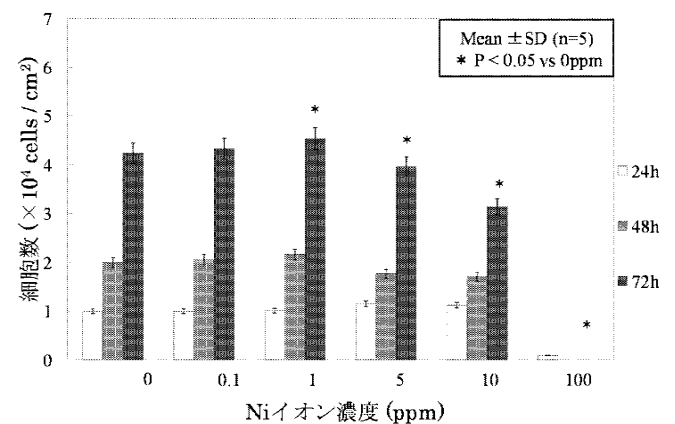


Fig.1 イオン濃度ごとの細胞数 (L929)

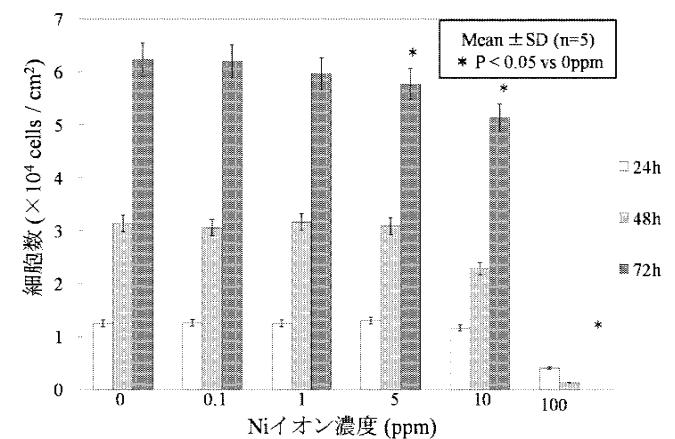


Fig.2 イオン濃度ごとの細胞数 (MC3T3-E1)

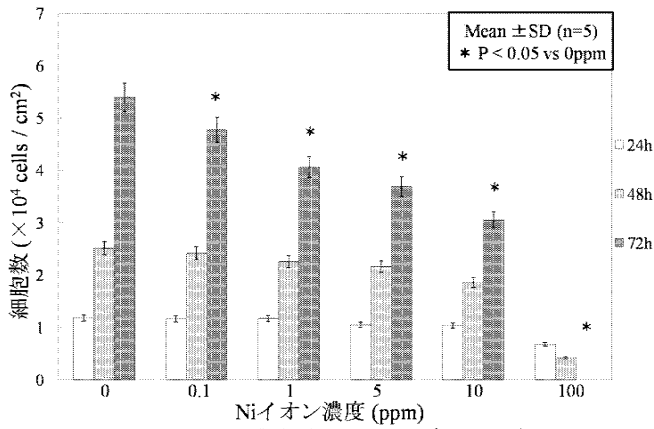


Fig.3イオン濃度ごとの細胞数 (HUVEC)

の成長、伸展の際に細胞から伸展していくものであり、この伸展が阻害されていたことから、Niイオンが細胞の成長、伸展を阻害していると考えられる。表面からNiを減らしたHTOはアレルギー反応を引き起こす可能性が極めて低くなると考えられるため、細胞適合性に優れると考えられる。

一方、3種類の試験片上での細胞培養の結果(Fig.4~6)、どの細胞種でもNiにのみ細胞が有意に減少した。3日間の培養ではNi-TiとHTOには有意な差が見られなかった。組織培養皿も含めての多重比較を行った結果、Ni、Ni-Ti、HTOが有意に減少しているという結果になった。

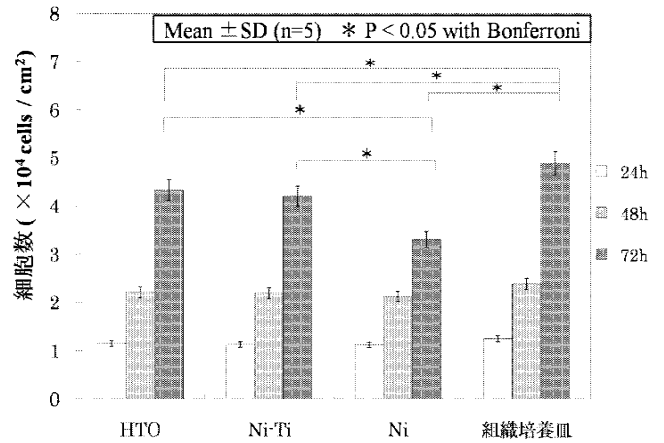


Fig.6 各試料ごとの細胞数 (HUVEC)

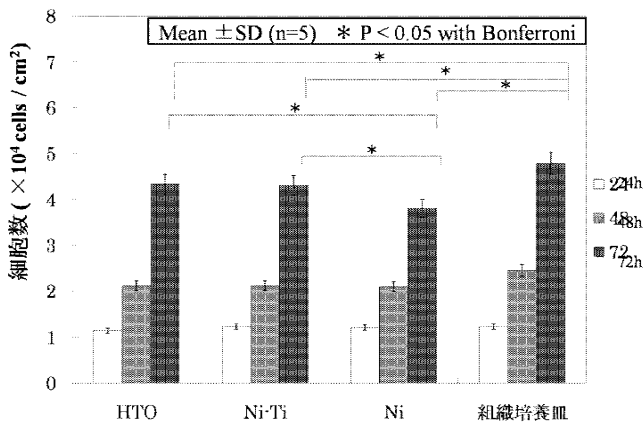


Fig.4 各試料ごとの細胞数 (L929)

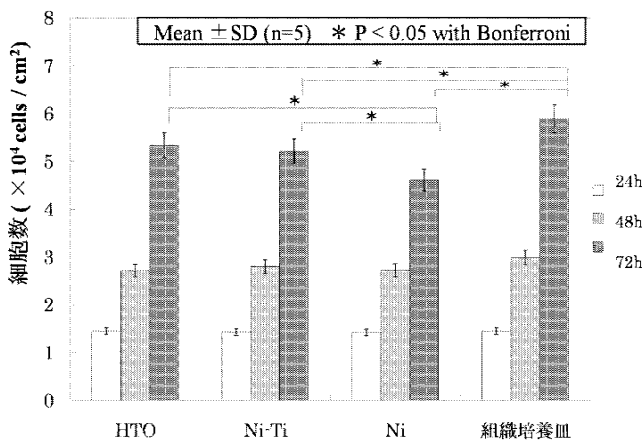


Fig.5 各試料ごとの細胞数 (MC3T3-E1)

### 3-2 血小板粘着試験による血液適合性の評価

血小板粘着試験を行った結果、下記の Fig.7 のような結果を得た。5min では HTO > Ni > Ni-Ti の順に血小板の粘着

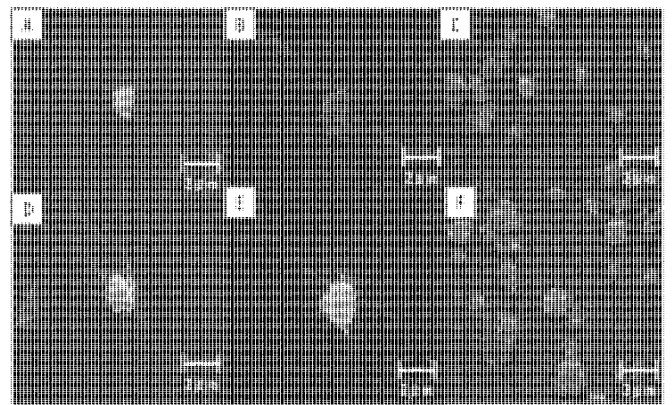


Fig.7 血小板粘着の様子(A, B, C:5min、D, E, F:10min)

が見られたが、どの試験片でもフィブリンネットワークの形成は見られなかった。10minではNi、Ni-Tiの血小板の粘着量は変わらなかったが、フィブリンネットワークの形成傾向が見られた。HTOには血小板の付着、凝集の増加が見られたものの、フィブリンネットワークの形成は見られなかった。Ni、Ni-Tiがフィブリンネットワークの形成傾向を示したことからステント等で応用した場合血栓を作る可能性が高い。しかし、HTOにはフィブリンネットワークの形成傾向が見られなかったことから、HTOは血栓を作る可能性が低く、抗血栓性に優れ、血液適合性に優れることが示された。

**4. 結言** 本研究では、体の部位でアレルギーの反応性が異なることが示された。高温酸化Ni-Ti合金(HTO)には血栓の原因であるフィブリンネットワークの形成が見られなかったことから、HTOは血液適合性に優れることも示された。

### 参考文献

- 1) 木村雄二他：高温酸化処理を施したNi-Ti合金の擬似生体環境下における耐食性評価とその改善,形状記憶合金シンポジウム講演論文集,形状記憶合金協会, pp.49-50, 2008.
- 2) A. Yamamoto, et al., Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. J Biomed Mater Res A, 331-40, 1998.

### 学会発表

近藤貴史, 大家 溪, 木村雄二, 高温酸化処理したNi-Ti合金の細胞適合性と血液適合性, 日本材料科学会第4回医用・生体材料分科会講演会講演予稿集, 2013. 他2篇.

## 2.2.3. バイオメトリックス環境センサの研究 Study on biometrics sensor for environment

足田 光孝、竹内 正男 (玉川大学工学部知能情報システム学科科)

Mitsutaka HIKITA, Masao TAKEUCHI (Dept. of Intel. & Info. System., Faculty of Eng., Tamagawa University)

Keywords: Network robot, Care robot, Health-care environment, Sensor technology, Smell sensor, Surface acoustic wave (SAW) sensor

### 1. 緒言

BERCの5年間では、将来の介護ロボット等<sup>(1)</sup>を想定した高度センシング技術の研究を行った。特に病院や要介護者の住環境中の「におい」に着目し、それをセンシングすることを目的とした。「病室や部屋のにおい」、「病人、老人の体臭や口臭」などの情報を介護ロボットや病室に敷設したセンサ・ネットワークが検知し、環境の維持、病状の変化等に対処する。

微量なガス分子等をセンシングする弾性表面波(SAW: Surface Acoustic Wave)センサでは、EST社が先行するが<sup>(2)</sup>、装置は非常に大型で電力消費も大きく、極端な低消費電力化が要求される上記の用途には採用出来ない。東北大/凸版印刷がボール状の水晶に SAW を伝搬させ、センシング感度の向上と小型化を図っているが、伝搬損失が非常に大きい消費電力が大きい。また、複雑な周辺回路を用いる点、水晶球が高価であるなど現状多くの解決すべき課題を内在している。

本研究では、幾つかの新技术を提案し、その有効性を確認してきた。特に、①自己温度補償機能の実現で水晶以外の圧電結晶を採用可能にした<sup>(3)</sup>。②センサ用 SAW 遅延線が持っている固有の伝搬損失の低減には、センシング機能を持った SAW 共振器をラチス回路状に結線することで低損失なセンサを実現した<sup>(4)</sup>。また、③センシング感度の向上のため、ガス分子等との相互作用領域を等価的に拡大する二重反射型の SAW 共振器を提案し、シミュレーションにより長遅延時間が得られることを示した<sup>(5)</sup>。本報告では、従来技術と課題、課題に対する開発新技術と結果、今後の改良点等を述べる。

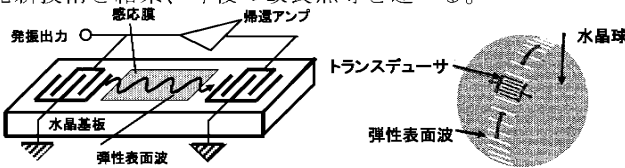


Fig.1 Conventional SAW sensors (left: SAW oscillator sensor - EST Corp., right: Ball SAW sensor - Tohoku U./凸版 Corp.)

### 2. 従来技術の課題と開発目標

Fig.1 に EST 社と東北大/凸版が採用している SAW センサの概略図を示す。Table1 に、Fig.1 の従来センサを介護ロボットやセンサ・ネットワークへ導入する場合の課題、および本研究の新 SAW センサの目標をまとめた。Fig.1 に示すように従来の SAW センサでは温度特性の良い水晶を用いるが、測定は室温(25°C)の状態で行う必要があり、温度変化のある病院等では使用は難しい。本研究では、温度に依存せず使用出来る自己温度補償機能を開発し、その結果、圧電効果の強い任意の圧電基板を採用可能にすることを目標とした。

消費電力は、従来センサの水晶基板では圧電効果が弱い変換効率が低くセンサ損失が非常に大きい。更に Fig.1 に示すように、センサ出力が発振器の周波数のシフトとなるため、そのモニター回路も必要で電力消費が増加した。SAW 共振器型センサを提案することで伝搬に伴う損失を抜本的に低減することを目標とした。

センシング感度は、Fig.1 に示すように、SAW が伝搬する感応膜部の長さに比例する。従来は伝搬路を増加することで感度の向上を図っていたが、伝搬損失も増加する、サイズの増加により価格も上昇する等の課題があった。本研究では、共振器内で励振トランスデューサと反射器間を、SAW を多重反射させることで等価的に感応膜部を増加させる新構造の開発を目標とした。

Table1. Problems and targets for sensors

	従来SAWセンサの課題	新SAWセンサの目標
温度条件	・温度特性の良い水晶基板 ・室温(25°C)で測定	・自己温度補償機能 ・任意の圧電基板可
消費電力	・SAW伝搬に伴う損失大 ・周波数モニター等の周辺回路で電力消費	・SAW共振器型センサ(ラチス回路)により損失低減
センシング感度	・SAW伝搬距離(ガス感応膜部)を増加 → 伝搬損失増加、大サイズ化	・多重反射型SAW共振器 → 感応膜部を等価的に増加

### 3. BERC 期間での研究開発結果

#### 3.1 自己温度補償機能の実現

Fig.2 に本研究で提案し、検討して来た自己温度補償機能を持つ SAW ガスセンサの構造を示す。SAW は、圧電基板の表面のみに沿って伝搬する機械的な振動波であり、数 100MHz 程度の高周波ではその振動周期(波長)は数ミクロンとなり極めて小さい。D-1-1~D-1-n はセンシング用 SAW 遅延線で嗅覚/ガス成分を検知するために外気と接する。図に示すように、特定の嗅覚/ガス分子に特異的に反応する感応膜(入出力トランスデューサ間部分)を形成すると、吸着成分の質量負荷効果により、SAW の伝搬速度が僅かに変化する。これはセンシング用 SAW 遅延線の出力位相変化となって表れる。この変化は、外気と遮断した基準直交位相を生成する SAW 遅延線(D-2、D-3)の出力位相と比較することで求めることが出来る。Fig.2 の右側に出力の位相関係を示す。温度に対しては、基準位相とセンサ出力位相の間で相対関係は不変である。従って、基準位相軸に対する各出力の射影成分を求めることで、センシング物質の影響のみを検知することが出来る。すなわち、温度に対しては自己温度補償機能を有する。

Fig.3 に実際に試作したセンシング用 SAW 遅延線の特性を示す。左側は周波数特性で、中心周波数は約 100MHz、損失は 15dB 程度の遅延線が得られた。Fig.3 の右側に各 SAW 遅延線(D-1, D-2, D-3)の中心周波数で



の位相の温度に対する変化を示す。温度に対して D-2、D-3 の出力位相は常に 90° 分離しており、上記の温度補償機能に対して予想を裏付ける結果が得られた。

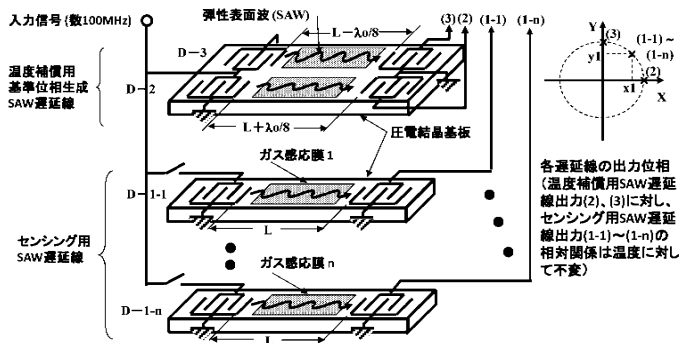


Fig.2 Proposed SAW sensor with self-temperature-compensation characteristics and expected phase constellations for outputs (2), (3), and (1-1) ~ (1-n).

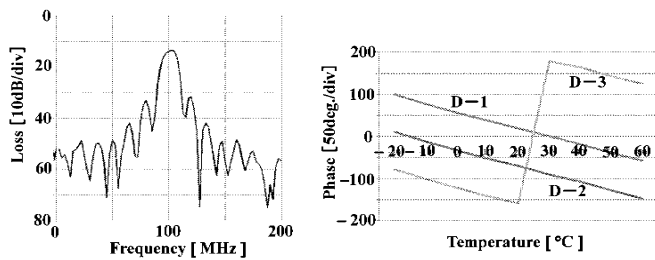


Fig.3 Experimental characteristics for Fig.2's SAW sensor delay line (left: Loss/frequency responses, right: Temperature characteristics for three outputs (1), (2) and (3))

### 3.2 SAW センサ用遅延線の低損失(低消費電力)化の実現

Fig.2 の遅延線の損失は約 15dB で、低消費電力の要求から採用は難しい。原因はトランスデューサから左右へ励振される SAW の一方しか利用しない点にある。上記の自己温度補償機能は維持し、かつ損失はロボットやセンサ・ネットワーク等に採用するためには 3dB 程度が必要である。Fig.4 に示す、トランスデューサの両側に SAW のグレーティング反射器を導入した SAW 共振器を 2 組用いるラチス回路型の SAW 遅延線を提案した。左右に励振される SAW を反射器で折り返すため、原理的にエネルギー損失は無い。

Z1 はトランスデューサと反射器の間隔が  $P + \lambda_0/4$  ( $\lambda_0$  は SAW の波長)、Z2 は間隔が P である。共振器 Z1、Z2 を用いて、Fig.4 のラチス回路を組むと低損失な遅延線が得られることをシミュレーションにより確認した。この場合、トランスデューサと反射器の間隔 P に感応膜を形成することにより、Fig.2 の構造と同様に嗅覚/ガス成分の検出が可能である。また、トランスデューサと反射器間が Fig.4 とは  $+\lambda_0/16$ 、 $-\lambda_0/16$  異なる 2 組の SAW 共振器を同様にラチス回路に組むことで、Fig.2 の温度補償用基準位相生成 SAW 遅延線に対応する遅延線も、低損失で実現できることが分かった(SAW 共振器の場合は、トランスデューサと反射器間を SAW は往復で 2 度伝搬するため  $\pm\lambda_0/8$  ではなく、 $\pm\lambda_0/16$  の相違を導入する)。

Fig.5 に実際に試作した SAW 共振器をラチス回路に組んだ遅延線の実験結果を示す。中心周波数は約 160MHz と Fig.3 の 50%増加にも関わらず損失は 4dB の値が得られ、目標の 3dB 以下に肉薄した。

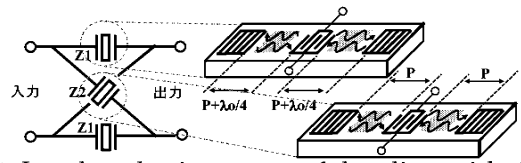


Fig.4 Low-loss lattice sensor delay line with SAW resonators (Propagation lengths differ by  $\lambda_0/4$  between Z1 and Z2, respectively)

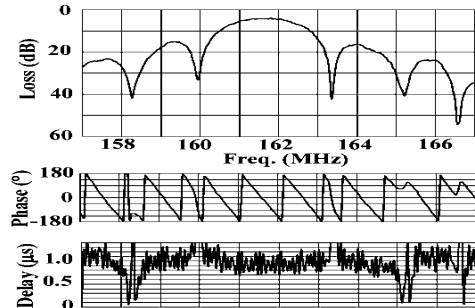


Fig.5 Experimental characteristics for Fig.4's lattice delay line (4dB loss at 160MHz)

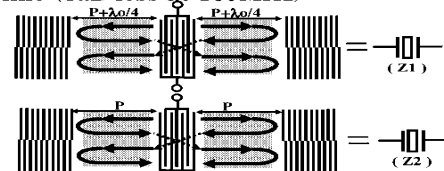


Fig.6 New SAW resonators with double reflections.

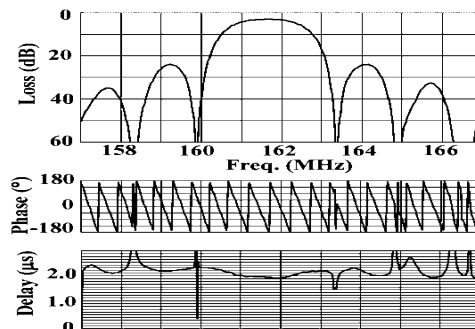


Fig.7 Simulation characteristics for lattice delay line using Fig.6's resonators with double SAW reflections

### 4. 結論と今後の改良点

Table1 の 3 個の目標中、センサの自己温度補償機能と SAW センサ遅延線の低損失化の 2 個は BERC 期間中にほぼ達成した。最後の感度の向上には、等価的に感応膜部を増加させる新構造が必要である。Fig.6 に示す、共振器内で SAW をトランスデューサと反射器間を 2 重反射させる構成を考案した<sup>6)</sup>。ラチス回路に組んだ遅延線のシミュレーション結果を Fig.7 に示す。遅延時間は 2µs (Fig.5 の倍)で、約 290 $\lambda_0$  に対応する。損失も小さく、等価的に感応膜部を増加出来る可能性が得られた。

### 参考文献

- 1) 電子情報通信学会誌 Vol.91, no.5, pp.346-352, 2008.
- 2) Electronic Sensor Tech., (<http://www.estcal.com>)
- 3) 特願 2007-280020  
論文投稿・研究発表等
- 4) M.Hikita, et al., IEEE 2012 Ultrason Symp. at Dresden, Oct. 2012.
- 5) N.Tobita, M.Hikita, 2012USE at Chiba, Nov. 2012.
- 6) M.Hikita, et al., 2013PIERS at Taipei, Mar. 2013.

## 2.3. 医療支援ロボットの開発 Development of Medical Assistance Robot

### 2.3.1. 歯科患者ロボット

高信 英明, 高西 淳夫 (早稲田大学), 榎 宏太郎 (昭和大学歯学部)

### 2.3.2 6軸ロボットシステムを用いた関節再建術の評価

藤江 裕道, 大坪 英則 (札幌医大医学部)

坂根 正孝 (筑波大医学部), 史野根生 (大阪府立大総合リハビリテーション学部)

### 2.3.3 生体信号処理に基づく医療装置の開発と応用

中荻 隆, 橋本洋志 (産業技術大学院大学)

2.3 では医療支援を目的としたロボット開発について研究している。具体的なテーマとして、患者の全身運動を再現する歯科患者ロボット、6軸ロボットを用いた関節再建術の評価、生体信号を用いた医療装置に関する研究である。

#### 2.3.1 歯科患者ロボット

現在、倫理上の観点から歯学教育における臨床実習が困難なため、歯学部の研修医師は実習用ファントムとよばれる頭部だけのモデルを用いて治療実習を行っている。歯科医師を目指す歯学部生は、実習用ファントムを用いた治療の実技実習および筆記のみの歯科医師国家試験で審査を受けている。

しかし、この実習用ファントムは静的モデルであるため、危険予測の実習が不可能である。よって実践的な実技訓練が困難なことから、医師免許を取得した直後の医師が行う治療では比較的事故が多い。

そこで本研究では、アクチュエータと各種センサを取り付けた患者ロボットで実際の患者動作や機能を再現した。これにより、治療行為に対して患者反応を再現し、より実習者が実際の患者を治療しているような臨場感を創出することを目的とする。よって、本ロボットでは、全身モデルであることを活かし、口腔内の機能以外に、危険動作を多く取り込むことで、実習において危険認識を学習することが可能である。

本年度は、歯科治療時に患者の状態を示す指標のひとつとして、呼吸を再現可能な機構開発を目指したので報告する。

#### 2.3.2 6軸ロボットシステムを用いた関節再建術の評価

本小テーマではこれまでに、開発した関節力学試験ロボットシステムを用いてヒト膝前十字靭帯再建術の評価等を行い、臨床的に重要な結果を求めてきた。研究プロジェクト最終年度の本年度は、これまでに検討が行われていなかった、膝靭帯損傷の好発姿勢である過伸展時の実験解析を行い、ヒト膝主要靭帯の張力を求め、靭帯損傷の予測と再建に関する検討を行った。また、関節再建の対象をヒトから動物に拡張することを目的に、手始めとして、二足歩行と四足歩行の歩行様式の違いによる靭帯機能の差異について検討を行った。さらに、これらとは別に、次年度以降の研究展開をにらんで、ロボットシステムによる荷重制御において制御目標値を時間の

関数としてあたえられるようなプログラムの改良を行い、改良プログラムの荷重制御動特性について調べた。

#### 2.3.3 生体信号処理に基づく医療装置の開発と応用

現在、日本の65歳以上の人口は、過去最高の3,074万人となり、総人口に占める割合（高齢化率）も24.1%となった。同時に少子化も進行している日本においては、要介護者数と介護従事者数の不均衡は深刻であり、介護従事者に掛かる身体的・精神的負担をどのように低減するかは、高齢社会が抱える主要な問題の一つとなっている。

そこで、我々は介護従事者を対象とし、介護労働における腰への負担低減を目的とした腰用パワーアシストスーツの製作を行っており、前年度の研究において、前後屈、左右捻りの腰4動作のアシストを可能とする機体の製作を行った。本年度は、装着者の介護動作に連動して素早く、適切な方向に、適切なトルクを供給する信号処理システムを提案する。

また、本小テーマでは、脊髄損傷患者向けの新しいヒューマンインタフェース(HI)の検討にも取り組んでいる。脊髄損傷は、現代医学でも治療することが不可能とされている。脊髄損傷患者における肢体の麻痺の現れ方は、損傷の場所や度合いにより様々であるが、損傷レベルの高い状況においては、頭部以外を自分の意思で動かすことができない。このような状況では、日常のほとんどの動作に介助を必要とするが、患者のQOL向上という観点から、脊髄損傷患者向けのHIの充実が求められている。そこで本研究では、重度の脊髄損傷患者でも利用可能な首の表面筋電位(sEMG)に着目し、応答性が良好で、多入力チャンネルを有するHIの検討を行う。

前年度の研究では、首の貼付け位置とチャンネル数の検討を行った。首側面左右の胸鎖乳頭筋、頭板状筋からの計5チャンネルのsEMG信号を用いて、首の6動作の識別が可能であることが示された。しかし、単純な閾値判定による動作識別では、識別精度に限界があり、より高度な信号処理が必要であることを報告した。今年度は、ニューラルネットワークを用いた知的な閾値判定処理を提案し、識別精度の向上を行う。



### 2.3.1. 歯科患者ロボット

#### Dental Patient Robot

高信 英明, 高西 淳夫 (早稲田大学), 槇 宏太郎 (昭和大学歯学部)  
Hideaki TAKANOBU, Atsuo TAKANISHI(Waseda Univ.), Kotaro MAKI(Showa Univ.)

**Keywords:** Patient robot, Odontology department, Education, Medical treatment, Practice

#### 1. 緒言

現在、倫理上の観点から歯学教育における臨床実習が困難なため、歯学部の研修医師は実習用ファントムとよばれる頭部のみモデルを用いて治療実習を行っている。歯科医師を目指す歯学部生は、実習用ファントムを用いた治療の実技実習および筆記のみの歯科医師国家試験で審査を受けている。

しかし、この実習用ファントムは静的モデルであるため、危険予測の実習が不可能である。よって実践的な実技訓練が困難なことから、医師免許を取得した直後の医師が行う治療では比較的事故が多い(Fig.1)1)。

そこで本研究では、アクチュエータと各種センサを取り付けた患者ロボットで実際の患者動作や機能を再現した。これにより、治療行為に対して患者反応を再現し、より実習者が実際の患者を治療しているような臨場感を創出することを目的とする。よって、本ロボットでは、全身モデルであることを活かし、口腔内の機能以外に、危険動作を多く取り込むことで、実習において危険認識を学習することが可能である。

本年度は、歯科治療時に患者の状態を示す指標のひとつとして、呼吸を再現可能な機構開発を目指したので報告する。

#### 2. 患者ロボット

患者ロボット(Fig.2(a))は身長 1700[mm]の全身モデルで、低圧圧縮空気を用いるアクチュエータにより駆動する。空気圧を ON/OFF 制御が可能な電磁弁や、圧縮制御が可能な電空レギュレータで制御することで駆動する。組立図を Fig.2 (b)に示す。治療実習を直接行う歯列モデルは実際に歯を削ることが可能で、取り外しも可能である。これにより、研修医師や歯学部生の歯の切削方法を監督医師が評価することができる。また、口腔内は防水対策を行っており歯を切削する際に必要不可欠な水の利用も可能である。動作においては角度センサを関節部に取り付け、動作角度を

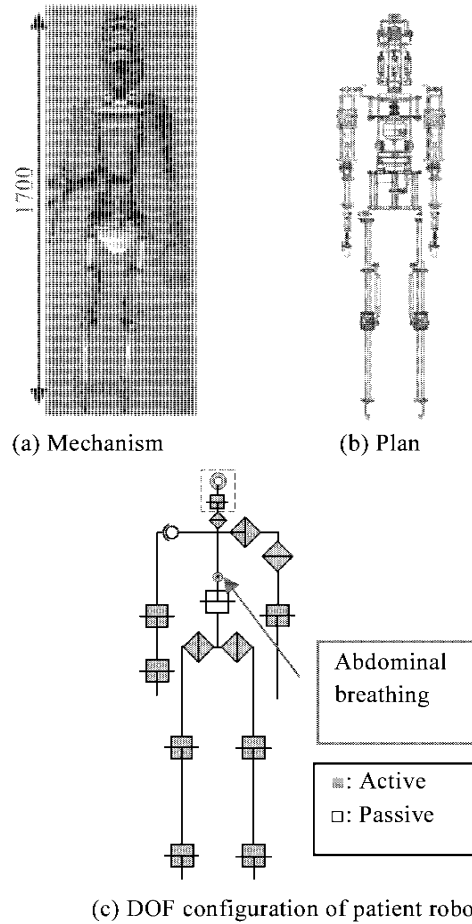


Fig. 2 Patient Robot

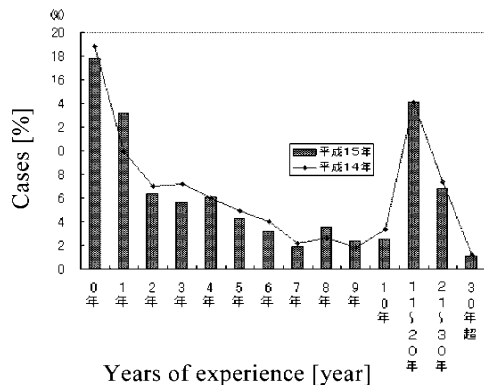


Fig. 1 Tense moment number of cases

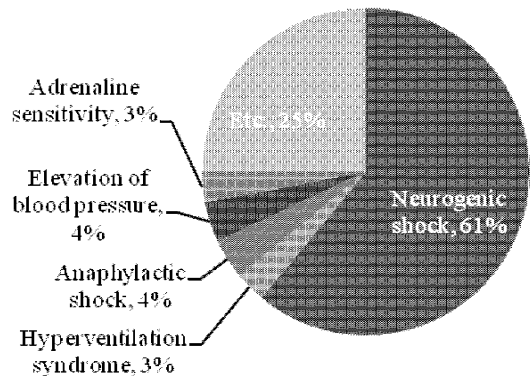


Fig.3 Immortal systemic illness in odontotherapy[2]

検知することで、眼球の左右動作、口の開閉動作、首の傾き動作、首の左右動作、肩や肘の動作を再現した。

### 3. 容体変化機能の開発

歯科医師は歯の治療、保健指導、健康管理などを業務としている。特に、歯科治療では、全身偶発症に遭遇する可能性があるため、健康管理は重要である(Fig.3)。

Fig.3 より、既往症を持たない患者に対して歯科治療を行うときに生じる頻度の高い全身偶発症として、精神的な緊張が引き起こす過換気症候群、一般に脳貧血と呼ばれる神経性ショック、歯科用局所麻酔薬のなかに含まれる血管収縮薬によって引き起こされるアドレナリン過敏症などがあげられる。何れの症状も患者のバイタルサインを知ることで、身体状態を把握することが可能となる。バイタルサインは主に、呼吸数、脈拍数、血圧、酸素飽和度で示される。

そこで本研究では、バイタルサインのひとつである呼吸に着目し、ロボットの呼吸機構をよりヒトに近づけることを目標とした。

### 4. 呼吸機構の開発

人間の呼吸パラメータを参考に、一分間の呼吸回数 0-30 回、一回換気量 0-1000[mL]を再現することができる呼吸機構を開発した(Fig.4)。

呼吸機構はピストン機構を使用して空気を出し入れするシステムを用いた。アクチュエータには、呼吸回数と一回換気量、呼吸リズムの変化を可能とするため、サーボモータを使用した。患者ロボットに取り付けるスペース問題解決と、人間の肺構造に似せるためピストン機構は 2 つ使用した。サーボモータは PWM 制御を用いて駆動させた。吸機構の最大換気量はピストン機構で体積は 1100[mL]になるよう設計した。この機構により、通常呼吸、多呼吸、過呼吸、徐呼吸、頻呼吸、低呼吸、小呼吸を再現した。

### 5. 呼吸機構の実験

開発した呼吸機構を患者ロボットに取り付けた図を Fig.5 に示す。通常時、増大時、減少時の換気量がそれぞれ 400-600[mL]、1000[mL]以上、250[mL]以下の理想値の再現実験を水上置換法を用いて行った。

実験の結果、換気量実験の平均値はそれぞれ 469[mL]、741[mL]、224[mL]となった。増大時のみ理想値を満たすことができなかったのは、ピストンの内側からの空気の漏れが大きくなったためと考えられる。

また、呼吸機構による各呼吸変化の呼吸数と換気量の変化についてアンケートを行った(Table 1)。呼吸の変化を感じ取ることが出来ているが、同じ換気量だと呼吸数が少ないと換気量は低い評価であった。

### 6. 結言

- ・呼吸動作可能な呼吸機構を開発した。
- ・開発した呼吸機構で人間の呼吸の再現実験を行なった。
- ・アンケートを取り、呼吸機構の呼吸再現についての評価を得た。

### 参考文献

1)厚生労働省：平成 15 年全般コード化情報集計結果  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/i-anzen/1/code03/4a.html>, 2011 年 7 月 22 日

2) 金子譲, 一戸達也：“計る・観る・読む モニタリングガイド-安心・安全な歯科治療のために-”, 医歯薬出版株式会社, pp.10, 2004

### 論文投稿・研究発表等

1) 高信英明：人間シミュレータとしてのロボット研究，耳鼻咽喉科手術システム・ナビ研究会招待講演，2012.

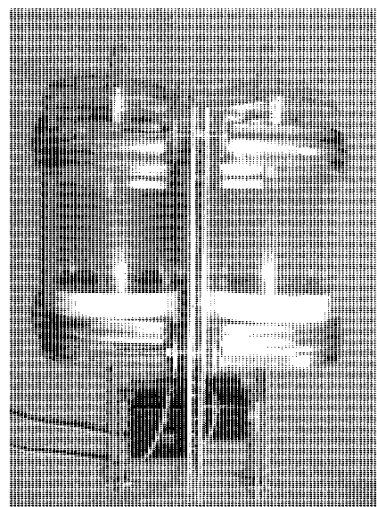


Fig. 4 Respiratory mechanism

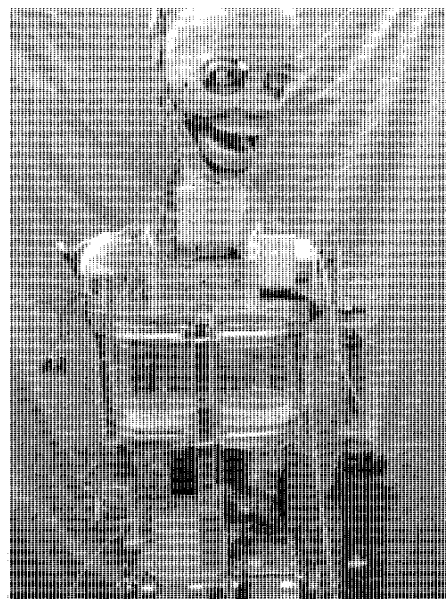


Fig. 5 Patient robot's lung

Table 1 Questionnaire

	換気量変化			呼吸数変化		
	増加	変化なし	減少	増加	変化なし	減少
多呼吸	5	0	0	5	0	0
過呼吸	4	1	0	1	0	4
徐呼吸	0	1	4	0	0	5
頻呼吸	3	2	0	4	1	0
低呼吸	0	1	4	0	2	3
小呼吸	0	1	4	0	0	5

## 2.3.2. 6軸ロボットシステムを用いた関節再建術の評価

### Assessment of Joint Reconstruction Surgery using a 6-axis Robot System

藤江 裕道, 大坪 英則 (札幌医大医学部)

坂根 正孝 (筑波大医学部), 史野根生 (大阪府立大総合リハビリテーション学部)

Hiromichi FUJIE, Hidenori OTSUBO (Sapporo Medical Univ.)

Masataka SAKANE (Tsukuba Univ. Medical School), and Konsei SHINO (Osaka Prefecture Univ.)

**Keywords :** Six-axis robot system, Joint reconstruction, Anterior cruciate ligament (ACL)

Rectangular bone-tunnel reconstruction, Calcium phosphate-hybridized tendon reconstruction

#### 1. はじめに

本小テーマではこれまでに、開発した関節力学試験ロボットシステムを用いてヒト膝前十字靭帯再建術の評価等を行い、臨床的に重要な結果を求めてきた<sup>1-5)</sup>。研究プロジェクト最終年度の本年度は、これまでに検討が行われていなかった、膝靭帯損傷の好発姿勢である過伸展時の実験解析を行い、ヒト膝主要靭帯の張力を求め、靭帯損傷の予測と再建に関する検討を行った。また、関節再建の対象をヒトから動物に拡張することを目的に、手始めとして、二足歩行と四足歩行の歩行様式の違いによる靭帯機能の差異について検討を行った。さらに、これらとは別に、次年度以降の研究展開をにらんで、ロボットシステムによる荷重制御において制御目標値を時間の関数としてあたえられるようなプログラムの改良を行い、改良プログラムの荷重制御動特性について調べた。

#### 2. ヒト膝過伸展時の靭帯張力と損傷予測

ヒト膝靭帯損傷姿勢として、過度な伸展(以下、過伸展)が知られている。しかしながら、過伸展時における膝靭帯張力などの定量的な力学データに乏しく、靭帯損傷機序に不明な点があった。そこで、ロボットシステムを用いて、ヒト膝の過伸展時における各靭帯の張力解析を行い、膝靭帯の力学機能について調べた。

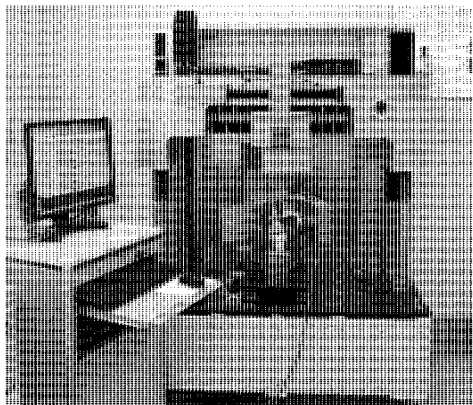


Fig.1 ロボットシステム

試料には札幌医科大学より提供されたヒト未固定凍結遺体の膝関節(n=5)を用いた。実験方法は以下のとおりである。

- (1) 伸展モーメント 10 Nm がかかるまで伸展させた(過伸展試験)。その際、屈曲伸展を除く残りの5自由度は力/モーメントが生じないように制御した。試験中、膝関節の6自由度に生じる荷重、変位及び6軸力センサの出力を記録した。
- (2) 記録した3次元運動を再現し、6軸力センサの出力を記録した。OPL 切除前後の6軸力の差をFujieらが開発した方法<sup>6)</sup>により、健常膝においてOPLに生じる張力を求めた。

(3)(1)(2)を半膜様筋の腱膜(AP)、膝窩腓骨靭帯(PFL)、外側側副靭帯(LCL)、膝窩筋腱(PT)、内側側副靭帯(MCL)、後斜靭帯(POL)、関節包(Capsule)、後十字靭帯(PCL)、前十字靭帯(ACL)の順で行い、伸展モーメントと10 N・m 負荷時のそれぞれの組織に生じる張力を求めた。

(4)(1)(2)(3)を脛骨近位方向荷重 30 N を負荷した状態(近位方向荷重下過伸展試験)および斜膝窩靭帯(OPL)切除後(OPL 切除後過伸展試験)で行った。

張力解析結果を Fig.2 に示す。いずれの過伸展試験においても、靭帯にかかる張力はOPLが他の組織に比べて大きく、ACLが最も小さかった。この結果から、純粋な過伸展モーメントが膝に生じる際には、OPLの損傷リスクが最も高いことが予想される。OPL 切除後過伸展試験では、特にPFLとLCLの張力が大きく増大した。過伸展時においてOPLが損傷した場合、これらの軟組織が損傷する可能性があると考えられる。

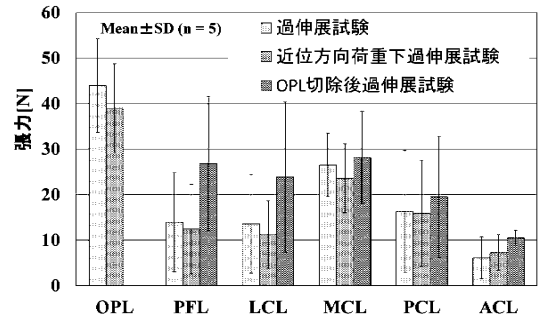


Fig.2 各過伸展試験時における各組織張力比較

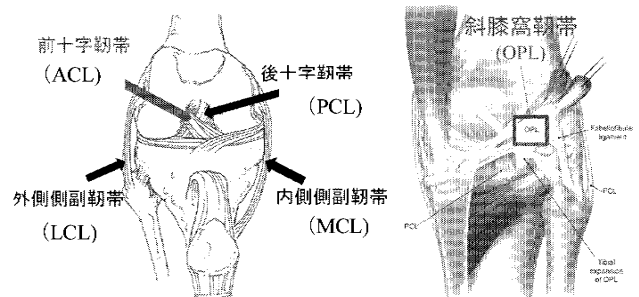


Fig.3 膝前面(左)<sup>7)</sup>と後面(右)<sup>8)</sup>および主要靭帯

#### 3. 動物関節靭帯再建に向けての検討：歩行様式と靭帯機能

四足歩行動物の膝関節に関する生体力学的検討はほとんど行われていない。そのため、動物関節再建手術において、指針とするべき基礎データが乏しく、ヒト膝の基礎データを参考に術計画がたてられているのが現状である。そこで、本研究では、四足動物膝関節を対象とし、前十字靭帯(ACL)、内側側副靭帯

(MCL)等の主要靱帯の力学機能を解明し、ヒト膝のそれらの機能と比較した。

試料にはイヌ(ビーグル)膝関節(n=8)、ブタ(三元ブタ)膝関節(n=3)およびヒト膝関節(n=5)を用いた。膝関節をロボットシステムに固定し、以下の方法で試験を行った。

- (1)膝関節を伸展位で固定し、前後方力 50 N または 100 N をあたえた。その際、前後方、屈曲伸展を除く残りの 4 自由度は力/モーメントが生じないように制御した。試験中、膝関節の 6 自由度に生じる荷重、変位及び 6 軸力センサの出力を記録した。
- (2)(1)を 45°, 60°, 90°, 120° 屈曲位で行った。
- (3)前十字靱帯(ACL)の一部である前内側線維束(AM 束)を切断し、(1)(2)で記録した健全膝の動きを再現し、6 軸力センサの出力を記録した。AM 束切断前後の 6 軸力の差から、正常膝において AM 束に生じる張力を求めた。
- (4)(3)の試験を ACL の後外側束(PL 束)、および MCL の頭側(aMCL)、尾側(pMCL)についても行い、正常状態の膝に前後方力 50 N または 100 N が作用したときの、それぞれの靱帯線維束に生じる張力を求めた。

データを解析したところ、ヒト膝では、ACL 張力は屈曲角度によらず常に高く、膝にあたえた前方力の約 70~80% であったのに対し、MCL 張力は常に小さく、前方力の 40% 程度であった(Fig.4)。これに対し、四足動物であるイヌとブタでは、ACL と MCL が協調して機能し、イヌでは屈曲角度 60°, ブタでは屈曲角度 90° において、MCL 張力が前方力の 90% 程度まで高まった。ヒト膝に比べて、イヌやブタの膝では、ACL が地面に対してほぼ鉛直方向に走行しているため、ヒト膝ほど荷重がかかりにくいことが理由であると考えられる。歩行様式の違いにより、膝靱帯機能が大きく異なることが分かった。このような検討をさらに行って、動物膝の力学機能の詳細データを蓄積することは、動物関節再建術の成績を向上させるために欠かせない。

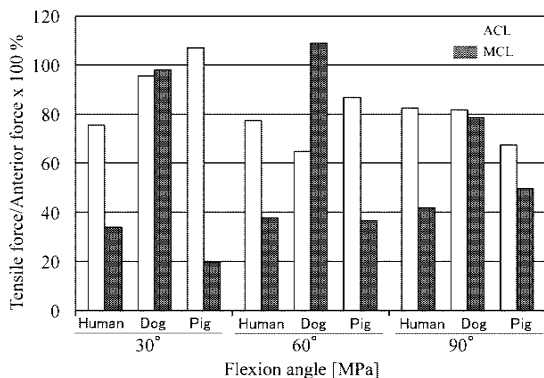


Fig.4 ヒト、イヌ、ブタにおける ACL と MCL の張力

#### 4. 力制御目標値の時間関数指定と動特性評価

関節力学試験ロボットシステムを用いた実験では、膝関節の力学挙動や靱帯などの構成組織の力学機能について、静的および準静的条件下での検討が行われてきた。しかし、日常動作におけるそれらの挙動や機能を詳細に調べるためには、動的条件下における検討が必須である。そこで、動的シミュレーションを可能にするため、ロボットシステムの力制御と位置制御の目標値を時間の関数としてあたえられるよう改良を行った。

前年度までに開発したロボットシステムの力制御は、制御対象である関節の運動方程式 1) を離散化し、弾性項を無視した 2) 式により関節に速度をあたえる、速度インピーダンス制御<sup>7)</sup>によっている。

$$M\ddot{x} = F - Kx - C\dot{x} \quad 1)$$

$$v_{n+1} = \Delta t M^{-1} F + (I - \Delta t M^{-1} C)v_n \quad 2)$$

$M, K, C$  は慣性、剛性、粘性項であり、 $\Delta t$  は制御周期、 $I$  は単位行列を表す。2) 式右辺の () 内を速度参照率 ( $R = I - \Delta t M^{-1} C$ ) と定義されている。2) 式により、現在の速度  $v_n$  を基に次の制御速度  $v_{n+1}$  が計算され、この速度を実現するようにアクチュエータが駆動する。位置制御は、目標位置に到達させるための速度  $v_{n+1}$  が計算され、同様に、この速度を実現するようにアクチュエータが駆動する。制御コンピュータと 6 つのアクチュエータを高速モーションネットワーク(メカトロリンク II, 安川電機)で通信させ、 $\Delta t = 10 \text{ ms}$  で力・位置制御を行っている。

本研究では、制御目標値を時間の関数として設定し、力制御に関しては 2) 式を用いて、位置制御に関しては速度制御を用いて、動的シミュレーションを実現できるように改良を行った。

改良プログラムの性能を調べるために、ブタ膝関節を 45° 屈曲位でクランプに固定し、圧縮力 15 N のステップ入力、および、圧縮方向に速度 3.3 N/s でランプ入力を与え、その応答を調べた。その結果、両入力に対して、 $M=14 \text{ kg}$ 、 $R=25\%$  のとき出力が入力に最も近似していることがわかった(Fig.5)。この条件のとき、動的シミュレーションを高精度で実現できることが分かった。

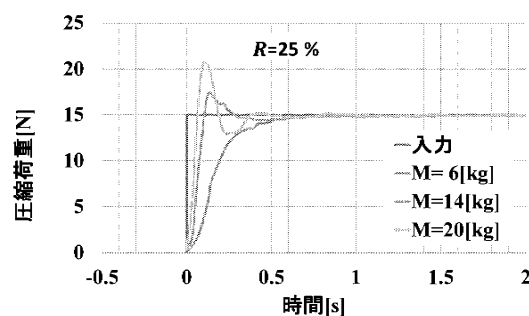


Fig.5 ステップ入力に対する応答

#### 5. まとめ

研究プロジェクト最終年度の本年度は、これまで行われてなかったヒト膝過伸展時の靱帯機能について詳細な検討を行った。その結果、斜膝窩靱帯が最も大きな張力を発揮することが分かった。過伸展時の膝靱帯のなかで斜膝窩靱帯がもっとも損傷しやすい靱帯であることが予想された。また、動物関節再建術の基礎データを得る目的で、四足歩行動物の主要靱帯についての検討を行った。その結果、ヒトとは異なり、四足歩行動物では前十字靱帯と内側側副靱帯が協調して機能することが分かった。最後に、関節バイオメカニクス実験の精度を高めるために、動的シミュレーションを行うことができる新たな制御方式を開発し、最適な設定パラメータを求めた。

#### 文献

- 1) Shino K, et al Arthroscopy 24, 2008, 2) Mutsuzaki H, et al J Biomed Mater Res A 70, 2004, 3) Fujie, et al, J Biomech Eng (ASME) 126, 2004, 4) Fujie H, et al, Proc of the ORS, 2010, 5) 2011 年度BERC報告書, 2012, 6) Fujie H, et al, J Biomech Eng (ASME) 117, 1995, 7) 平林, 他, 計測自動制御学会論文集23, 1986.

#### 査読付論文

- 1) 藤江, 中田, 史野, Resident's ridge 形成のメカニズム, 臨床バイオメカニクス 33: 69-74, 2012.

#### 学会発表

- 1) 木村, 藤江, 他, 膝関節運動の動的シミュレーションと靱帯張力解析, 第 4 回日本材料科学会 医用・生体材料分科会, 34, 2012.
- 2) 山川, 藤江, 他, Mechanical functions of anterior tarofibular and calcaneofibular ligaments determined with a 6-DOF robotic system, 第 4 回日本材料科学会 医用・生体材料分科会, 35, 2012.
- 3) 木村, 藤江, 他, 膝関節過伸展時の靱帯機能の評価, 日本機械学会関東支部総会(採択), 2013.

### 2.3.3. 生体信号処理に基づく医療装置の開発と応用 —介護従事者の腰痛予防のためのパワーアシストスーツの開発— —脊髄損傷患者のための新しいヒューマンインタフェースの開発—

#### Development of Waist Power Assist Suit for Lumbago Prevention Development of Surface EMG-based Human Interface for Spinal Cord Injuries

中荻 隆 (工・機械システム工学科), 橋本 洋志 (産業技術大学院大学)  
Takashi Nakakuki, Hiroshi Hashimoto (AIIT)

**Keywords:** Surface EMG, Motion Discrimination, Machine Learning, Signal Processing

#### 1. 緒言

「2.3.3 生体信号処理に基づく医療装置の開発と応用」では、主に表面筋電位を用いたスマートな医療装置の開発に取り組んでいる。これまで、表面筋電位信号に基づく信号処理システムを用いて筋電義手、外科鉗子ロボット、手指の動作識別に関する研究を行い、一定の成果を得ている。また、昨年度からは、介護従事者の腰痛予防のためのパワーアシストスーツと脊髄損傷患者のための新しいヒューマンインタフェースの製作に取り組み、5年間で5つのアプリケーションが創出されている。本稿では、パワーアシストスーツとヒューマンインタフェースに関する進捗を報告する。

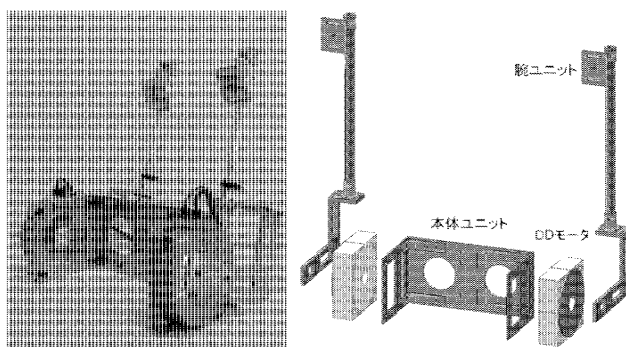


図1 製作した腰用パワーアシストスーツ  
Fig. 1. Developed waist power assist suit.

#### 2. 介護従事者の腰痛予防のためのパワーアシストスーツの開発

##### 2.1 研究の背景と目的

現在、日本の65歳以上の人口は、過去最高の3,074万人となり、総人口に占める割合(高齢化率)も24.1%となった<sup>(1)</sup>。今後、高齢化率はさらに上昇することが予想され、50年後には4人に1人が75歳以上になるという試算もある<sup>(1)</sup>。同時に少子化も進行している日本においては、要介護者数(需要)と介護従事者数(供給)の不均衡は深刻であり、介護従事者に掛かる身体的・精神的負担をどのように低減するかは、高齢社会が抱える主要な問題の一つとなっている。身体的負担という点では、介護は一般に重労働であり、慢性的な腰痛に苦しむ介護従事者も少なくない。例えば、介護従事者1,692人に対して行われた調査では、約85%が「今腰痛である」あるいは「腰痛になったことがある」と回答しており、その主要な原因として「ベッドからの移動介護」と「寝ている人の移動介護」を挙げている<sup>(2)</sup>。

そこで、我々は介護従事者を対象とし、介護労働における腰への負担低減を目的とした腰用パワーアシストスーツの製作を行っており、前年度の研究において、前後屈、左右捻りの腰4動作のアシストを可能とする機体(図1, 2)の製作を行った<sup>(3)</sup>。

本稿では、装着者の介護動作に連動して素早く、適切な方向に、適切なトルクを供給する信号処理システムを提案する。

##### 2.2 信号処理システム

信号処理システムには、装着者の動作開始を検出する「動作検出処理」、動作の種類を認識する「動作認識処理」、アシストするトルクを生成する「トルク制御系」が必要である。例えば、著者らの実験において、本スーツを装着した使用者に対して、抱え上げ作業のアシストを最大トルクにてスーツが先導して行った場合、スーツによるアシストが無い状態での筋活動量に対して、アシストした状態での筋活動量は、む

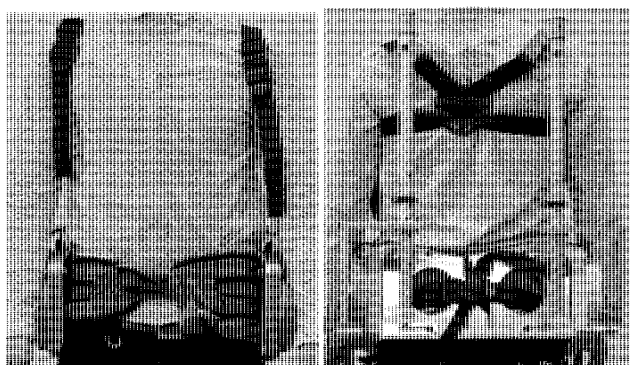


図2 装着図  
Fig. 2. Worn suit.

しろ増加傾向を示した。ここで、使用者の腰への作業負荷をモニタリングする方法として、表面筋電位センサを用い、左右の脊柱起立筋の筋活動量を測定した。これは、使用者の意図しないタイミングで、モーターがアシストを開始した結果、筋反射によってモーターの動きに反発した腰動作が瞬間的に行われたためと考えられる。

本研究では、使用者の動作検出と認識を素早く行い、適切なトルク制御を実現するため、表面筋電位信号ベースの信号処理システムを提案する。センサの貼付け位置は、腰の4動作を支配する左右の脊柱起立筋とし、2チャンネルのセンサ信号に基づいて、動作検出処理、動作認識処理、トルク制御が行われる(図3参照)。



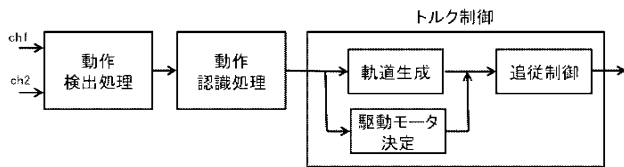


図3 提案する信号処理システム  
Fig. 3. Proposed signal processing.

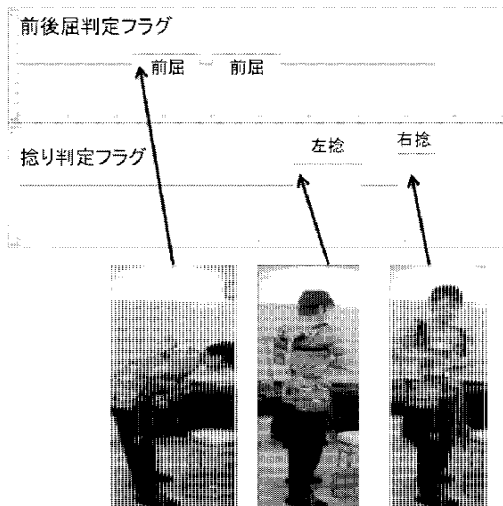


図4 オンラインでの評価風景  
Fig. 4. Evaluation of signal processing online.

### 2.3 実験結果

動作検出処理に関しては、DSP への実装とオンラインでの評価を行い、良好な結果を得ている。動作認識処理に関しては、サポートベクターマシンを用いた学習器を用いており、オフラインでの評価が完了し、現在、オンラインでの評価を行っている(図4)。トルク制御に関しては、トルク制御が可能な市販のサーボアンプを用いるが、前述のようにトルク指令値をステップ状に与えると、装着者の腰に負担が掛かるため、適切なトルク軌道を生成する必要がある。現在、表面筋電位信号を用いたトルク軌道生成手法を検討している。

## 3. 脊髄損傷患者のための新しいヒューマンインタフェースの開発

### 3.1 研究の背景と目的

脊髄損傷は、交通事故やスポーツ事故、転落事故において、脊柱に強い外力が加わり、脊椎が損壊あるいは損傷した状態をいう。脊髄は中枢神経の一部であり、一度損傷を受けると二度と再生・修復されることが無いため、現代医学でも治療することが不可能とされている。脊髄損傷患者における肢体の麻痺の現れ方は、損傷の場所や度合いにより様々であるが、損傷レベルの高い状況においては、頭部以外を自分の意思で動かすことができない。このような状況では、日常のほとんどの動作に介助を必要とするが、患者のQOL向上という観点から、脊髄損傷患者向けのヒューマンインタフェースの充実が求められている。現在、プレスセンサを用いたナースコールが病院において利用されているが、患者のQOL向上を目的としたヒューマンインタフェースは提案されていない。一般に、脊髄損傷患者においては、既存のヒューマンインタフェースを利用するために必要な身体機能が大幅に失われている



表面筋電位電極  
図5 ヒューマンインタフェースの評価風景  
Fig. 5. Evaluation of proposed HI.

るケースが多いため、通常のヒューマンインタフェース開発の常識が通用しないことが主な原因と考えられる。

そこで本研究では、重度の脊髄損傷患者でも利用可能な首の表面筋電位(sEMG)に着目し、応答性が良好で、多入力チャンネルを有するヒューマンインタフェースの検討を行う。前年度の研究では、首の貼付け位置とチャンネル数の検討を行った。首側面左右の胸鎖乳頭筋、頭板状筋からの計5チャンネルのsEMG信号を用いて、首の6動作の識別が可能であることが示された。しかし、単純な閾値判定による動作識別では、識別精度に限界があり、より高度な信号処理が必要であることを報告した。今年度は、ニューラルネットワークを用いた知的な閾値判定処理を提案し、識別精度の向上を行う。

### 3.2 システムの概略及び実験結果

首側面左右の胸鎖乳頭筋、頭板状筋からの計5チャンネルのsEMG信号をセンサにより観測し、マイコンで動作識別処理が行われる。識別結果は、予め用意された対応表に従って所望のアプリケーション上の動作としてUSBドライバを経由して、PCのアプリケーション側に送られる。図5に、テレビゲームのコントローラとして、本提案システムを用いた際の評価風景を示す。適切に学習を行うことで、単純な閾値判定処理より優れた性能を示す。

## 4. 結言

平成23年度は、パワーアシストスーツ及びヒューマンインタフェースともに、システムの仕様の作成とオフラインでの評価を行ったが、平成24年度は、オンラインでの評価を中心に検討を行った。

### 参考文献

- (1) 内閣府：「平成24年度版 高齢社会白書」，印刷通販(2012)
- (2) 城内博：“介護労働における腰痛対策”，産業衛生学雑誌，Vol. 45，pp.176-177 (2003)
- (3) K. Kashiwagi, et al：“Discrimination of Waist Motions Based on Surface EMG for Waist Power Assist Suit Using Support Vector Machine”，Proc. of The 50th IEEE Conference on Decision and Control and European Control Conference (IEEE CDC-ECC)，pp.3204-3209 (2011)

### 学会発表

1. 柏木・中荻：日本機械学会年次大会，富山，2012年
2. 栗田・中荻：日本機械学会年次大会，富山，2012年
3. 白石・栗田・中荻：SI2012，福岡，2012年
4. 甘楽・中荻：SI2012，福岡，2012年
5. 谷島・中荻：SI2012，福岡，2012年
6. 吉川・中荻：次世代産業システム研究会，東京，2013年