

# Readout

HORIBA Technical Reports

No. **29**  
NOVEMBER 2004

特集

HORIBA医用セグメントの製品と技術



**HORIBA**

[http://global.horiba.com/support/tech\\_info/index.html](http://global.horiba.com/support/tech_info/index.html)

今号は、HORIBA医用セグメントの製品と技術を集めています。血液分析装置を中心として、医療と健康に貢献することを目指しているHORIBAの分析技術を、Readout和文版初となるフルカラー化により、わかりやすく美しい形式でご紹介します。



表紙写真  
撮影：松井秀雄氏  
(二科会写真部関西支部)  
スイスのクライネシャイデックを訪れた時、辺り一面濃い霧となり、その中で草を食む牛達と出会いました。

誌名について  
誌名 Readout(リードアウト)には、「当社が創造・育成した製品・技術を広く世にお知らせし、多くの皆様に読み取っていただきたい」という願いが込められています。

## HORIBA 医用セグメントの製品と技術

### 巻頭言

- 2 生命と医療 - HORIBAの願い -  
堀場 厚

### 総説

- 4 HORIBA医用セグメントの世界戦略  
中峯 敦
- 8 患者のクオリティ・オブ・ライフ向上への貢献を目指して  
臼井 誠次
- 14 お客様のニーズを重視することこそ勝利への戦略  
Guy de Lanversin

### 特集論文

- 18 小型電極式血糖測定機器 アントセンス  
大森 陽一
- 24 自動血球計数CRP測定装置 LC-178 CRP  
長尾 俊治, 大上 創一, 山尾 泰生
- 30 POCTに向けた血球カウンタの開発  
宮村 和宏

### 特集寄稿

- 36 白血球分類における Pentra 120 SPS塗抹標本作製と用手法の  
標本作製との比較  
José María Jou

### 特集論文

- 40 ソフトウェア開発 ユーザ本位の設計プロセス  
Gwenaelle Collet, Lyonel Junillon, Patrick Iliou
- 46 Pentra DX 120 - 新技術による血液の全検査プラットフォーム -  
Pascal Berthet
- 50 血液細胞生物学・光学・関連技術  
Philippe Nérin, Didier Lefèvre
- 60 BIOPEPのコア技術とノウハウ  
Norbert Benattar
- 64 超音波による骨強度の定量測定  
長岡 洋樹, 須崎 琢而, 大谷 隆彦, 真野 功, 堀井 薫

### 特別寄稿

- 70 代謝異常による種々の体内形成結石の分析技術の高度化に向けて  
三好 憲雄, 中田 靖, 沼田 朋子, 田中 悟

### 一般論文

- 74 唾液緩衝能測定装置 チェックバフ™  
野村 聡
- 78 ホリバ・バイオテクノロジーの研究開発  
ライフサイエンス関連分野における先端計測技術の動向  
奥村 弘一

### トピックス

- 82 HORIBAの発明が「日本弁理士会会長賞」を受賞!

- 86 特許メモ
- 88 社外発表リスト
- 90 HORIBA World-Wide Network

# Foreword 卷頭言

## 生命と医療 - HORIBAの願い -



堀場 厚

Atsushi Horiba

HORIBA グループ CEO

株式会社堀場製作所  
代表取締役社長

堀場 厚

何十億年という生命の営みの中から人類が誕生し、文明の発達と共に高度な医療技術と医療の仕組みを作り上げてきた。医療は人類の長寿への願いと科学技術の発達があいまって発展してきたが、現在では、空気と同様に人類の営みになくってはならぬものとなったといつてよい。現に、誕生と臨終の時はほとんどの人が病院のお世話になる。世界の中でも日本の医療は先端をいっており、平均寿命は世界最高水準、また健康達成度では世界一と評価されている。国民はその恩恵に与っているが、一方でさまざまな課題にも直面している。それは、ストレスや生活習慣病の増加に代表される疾病構造の変化、高齢化社会の到来による医療からの介護の分離、医療費の増大、インフォームド・コンセントによる患者への情報公開、更に臓器移植やヒトクローンに代表される生命倫理などである。HORIBAは、これらの医療課題の解決に積極的に関わっていきたいと考えている。

もちろん、企業、個人にとって最も大切なことは自分自身をよく知り、存在意義を再認識することである。例えば、個人であれば自分が持つ価値観や信念あるいは柱は何か、企業であればルーツや文化は何か、メーカーであれば自社のコア技術は何か、それをよく認知し自覚することである。HORIBAの一番の強みは、広範な分野において世界レベルで評価を得ている分析技術を有していることである。私たちの体内でたゆまなく続いている維持機能に不具合が起こった場合に、詳細に血液分析することが診断・治療に役立つ。HORIBAに期待されているのは、まさにこのような分析システムの提供であろう。先端医療の分野で、分析・計測技術は極めて重要な役割を果たすものと認識している。広い裾野を持つ地域医療に対しても、分析技術は大いに貢献できるであろう。

---

現在HORIBAは、世界22カ国に38のグループ会社と約3,900人の従業員を有するグローバル企業に成長したが、その背景にはHORIBAの企業文化である“常にチャレンジする姿勢”と“Open & fairの精神”があり、また、京都の文化とものづくり技術に培われた創造力と高付加価値の伝統が根付いていた。文化や伝統に対して誇りを持ち、自分自身に誇りを持つことで、国の異なる相手に対しても敬意を払う精神を醸成し、人と人との真のつながりを作っている。HORIBAは全グループ連携のもと“HORIBA Group is One Company.”を掲げ、グローバルレベルで統一したブランドで今後更に優れた製品とサービスを医療分野に提供していきたい。

---

生命にとって大切なものは“環境”、“健康”、“安全”であり、これらは今の時代のキーワードでもある。HORIBAの分析技術はそれらにかかわるあらゆる分析に幅広く応用されることを目指している。なかでも、医療現場に直結した分析技術の応用に独自の創造力を発揮することによって、世界の医療のレベル、ひいては人間の生命活動そのものの質を向上させて、人類の幸せのために貢献していくことがHORIBAの願いである。

## HORIBA医用セグメントの世界戦略

中峯 敦

HORIBA医用セグメントは、1996年にHORIBA ABXのグループ参入以来、臨床診断装置の世界市場に事業を展開している。人体より採取した検体を分析・診断する検体検査装置に特化し、血液分析装置80%、生化学分析装置18%、免疫機能分析装置2%の売上割合となっている。注力する市場分野は、高い疾患診断機能を必要とする検体検査ラボと、より小型で操作性に優れ迅速な診断を行える装置を必要とする医院や診療所、あるいは病院の緊急治療室・集中治療室や診療室・病室といった医療現場により近い市場である。今年度このような市場に向け、Pentra DX120、Pentra 400、Antsense など、いくつかの重要な新製品を投入した。

### 現在までの歩み

HORIBAの医用セグメントは、創立以来の基盤技術であるガラス電極電位差分析技術や赤外線ガス分析技術を応用した呼気ガス分析装置、血液・尿中電解質分析装置、化学発光反応のダイレクト計測技術による酵素免疫測定装置等の開発や、更にはフランスのABX社からの血液分析装置<sup>\*1</sup>の導入等で臨床診断装置市場への浸透を図っていたが、活動が日本市場に限られていたこともあり、10年前の1994年当時のHORIBAグループ連結売上に占める臨床診断装置の売上はわずか3%程度であった。一方、HORIBA ABX<sup>\*2</sup>は1990年代に入り、当時の株主であったスイスのホフマン・ラ・ロシュ社の方針のもと中型・大型の血液分析装置を開発、病院・検査センター市場への浸透を図っていた。1996年9月、ロシュ社からの買収でABXがHORIBAグループに加わったことにより、翌1997年度の臨床診断装置の売上割合はグループ連結売上の8%程度までに増加、同年事業統括部制を導入したHORIBAで、単独の事業部門（医用システム統括部）として認知されるに至った。

その後、世界規模でHORIBA ABX販売網の再構築を行うと共に小型・中型機器の後継機を市場投入、また同時に生化学検査装置事業への進出を図ることで2001年度までの4年間で同部門の売上を3倍に伸長させ、連結売上に占める医用セグメントの割合を19%までに増加させた。

\*1: 血液にはさまざまな種類の細胞、物質及び化学的成分が含まれ、健康状態にあるか、または疾患状態にあるかの診断を行うための情報を得ることができる。組成は55～60%が血漿、40～45%が赤血球、約1%が白血球及び血小板である。血漿の約90%が水で、残りが液体タンパク質（アルブミン、グロブリンなど）、ブドウ糖、脂質、ナトリウム、カリウム、カルシウム、リン、ホルモンである。図1に、赤血球、白血球、血小板の生成イメージを示す。

\*2: 2004年11月、ABXは社名をHORIBA ABXに変更。

この著しい成長は、欧州主要国、米国・ブラジルに子会社・支店を開設して、販売・技術・サービス面における顧客への迅速・直接的サポート力を強化したことと、既存他社事業の買収によりもたらされたのも大きな要因であるが、通常上位機種で提供される機能を盛り込むと共に操作をより自動化・簡便化した小型・中型の血液分析装置が、医院や診療所、あるいは病院の緊急治療室が求める“信頼性が高く迅速に診断できる小型装置を”というニーズを満たしたことも要因といえる。これら小型・中型の血液分析装置の性能は上位の競合他社にも認められ、長期のOEM供給契約を締結している。

日本市場においては、1998年にHORIBAがHORIBA ABXと共同で開発した小型血液分析装置に免疫学的診断項目であるC反応性蛋白(C-Reactive Protein: CRP)測定機能をハイブリッドした自動血球計数CRP測定装置が、炎症が細菌性かウイルス性かを診断する際の重要な指標である白血球数とCRP濃度情報を一計測で短時間に提供してくれるとして、罹患当初軽度の自覚症状を伴う炎症性疾患患者の初期診療・初期治療を担当することの多い医院・診療所の医師に広く受け入れられている。同時に“医療現場で有用な情報を即時に提供する分析診断装置の提供を図る”というコンセプトのもと、血液中ブドウ糖濃度計、血液中CRP濃度計、血液中テオフィリン濃度計等小型の特定疾患診断装置を開発、市場投入を行っている。

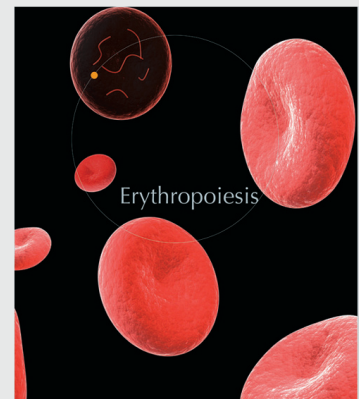
他方、この著しい成長をもたらすために要した既存事業の買収・独自販売ネットワークの構築等の投資により多大な償却費負担が生じ、1998年以降大幅な赤字体質に陥っていたため、2001年半ばから意図的な成長の鈍化と運営経費の圧縮を図ったことにより、2001年度から2003年度にかけての医用セグメント売上の年平均伸び率は、それ以前の4年間の32%から10%に低下したものの、2003年度は6年ぶりに医用セグメントとして最終利益を計上できるまでに体質の改善が図られた。昨2003年度の医用セグメント売上は約175億円と連結売上の21%にまで上昇、HORIBAグループ事業の中でも重要な地位を占めている。

HORIBA医用セグメントの事業は、臨床診断装置の中でも人体より採取した検体を分析・診断する検体検査装置に特化しており、うち血液分析装置が80%、生化学分析装置が18%、免疫機能分析装置2%の売上割合となっている。地域的には、50%が欧州域、19%が米国、15%が日本、16%がブラジル・中国・東南アジアを中心とするその他地域の売上割合となっており、上位の競合メーカーが米国・日本を拠点としていることもあるが、臨床診断装置市場の50%を占める米国・日本市場にいかにか浸透するかがHORIBA医用セグメントの課題といえる。

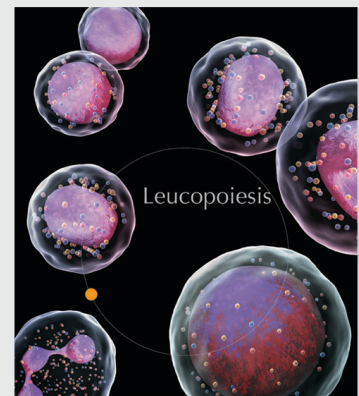
## 今後の方向性

各国政府においては社会・医療保険財政を健全化するために、医療の高度化を図りつつ全体として医療費削減を図ることを主要な課題の一つとしており、HORIBA医用セグメントの中核事業である検体検査分野においても激しいコスト削減が求められている。医療費削減と医療の高度化という相反する課題に対応するために進行している市場の分化は次のように類型化できよう。

(a) 赤血球の生成



(b) 白血球の生成



(c) 血小板の生成

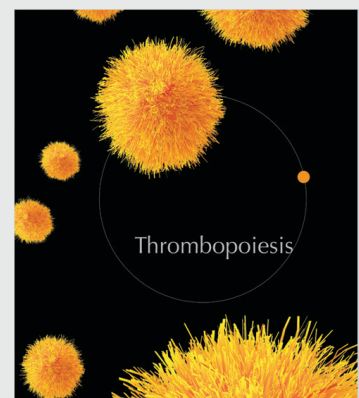


図1 赤血球、白血球、血小板の生成イメージ

検体検査を工業的に処理する、自動化された大型・超大型の検査ラボ。  
疾患診断に重要な項目をより詳細に専門的に診断する検査ラボ。  
小型・高性能でかつ信頼度の高い分析結果をもたらす検査機器を必要とする医療現場。  
健康状態を自ら管理するための自己検査機器・キットの市場。

検査あたりコスト削減のために、特に欧米・日本等先進国においては、病院検査室や検査センターの大型化・集中化が進み、同時に検体前処理、搬送のシステム化、検査データの集中管理を含むラボラトリ・オートメーションの高度化が図られている。そこに使われる検体検査装置は大型で時間あたり検体処理能力が高く、十分な検査精度を保証し、かつ長時間安定して稼動する装置でなければならない。HORIBA ABXの持つ大型血液検査装置を改良した上でラボを構成する検査装置群の一つとして設置できる可能性はあるが、検査工場を構成する他の分野の検査装置や周辺装置を持たないHORIBA医用セグメントが、単独でこの市場に進出する可能性は当面非常に小さいと言わざるを得ない。

糖尿病等成人病や生活習慣病に罹患している人々、あるいは罹患する可能性のある健常人で常態管理を必要とする人々への簡便で安価な検査機器・キットの提供も医療費削減に効果があり、事実 Self-Testingの市場は確実に増大してきている。この分野においては、安価という要求を満たしつつ肉体的負担を軽減するために、検体を低侵襲あるいは無侵襲で検査できる技術の開発が必要となってくる。日仏双方の拠点において、検査キットに応用するバイオチップの研究・開発にも投資を行っており、広範なかつ多種の分析技術を有するHORIBAグループの技術を結集して、このような機器・キットを開発することは可能ではあるが、このような検査機器・セットの使用は医薬品の服用管理を目的とする場合が多く、医薬品会社により薬局を通じて販売されるのが通常であり、分析・診断装置を開発・提供するHORIBA医用セグメントが主体的に行う事業分野ではないと判断している。

上記のような観点から、また科学技術発展のために高精度の計測装置をより扱いやすくして計測現場に提供するというHORIBAグループの製品開発理念からも、HORIBA医用セグメントが当面注力する市場分野は、疾患診断に有用な項目の診断機能を高めた検体検査装置を必要とする検査ラボであり、それらの機能を持ちつつ、より小型で操作性に優れ迅速な診断を行える装置を必要とする医院や診療所、あるいは病院の緊急治療室・集中治療室や診療室・病室といった医療現場により近い市場である。HORIBA医用セグメントでは、このような市場に向け、今年度いくつかの重要な新製品を開発、投入した。

一つは、血液分析装置の分野で、HORIBA ABXの最上位機種であるPentra 120Reticをベースに、赤血球の前駆細胞の一つである有核赤血球の分類機能を強化、従来から既に定評のある白血球分類機能を強化し、かつその分類度合いを見やすくする表示機能を付加、更に装置操作・データマネージメントを容易にする Work Stationを追加したもので、新製品Pentra DX120は、特に特異疾患診断に有用な項目の分析診断を必要とする病院検査室に好評を得ている。HORIBA医用セグメントでは、機器管理に専任検査技師を確保することの難しい中規模・小規模の検査室

のニーズに応えるため、当該諸機能を中位機種（Pentra 80シリーズ）に展開して、検査室の運営に負担をかけない装置の提供を企画している。

一つは、1999年にHORIBA ABXが製造権を取得したロシュ社の生化学分析装置MIRAシリーズの顧客層及びその上位の顧客層をターゲットとしたこの分野では、HORIBA ABXが初めて自社開発した新製品Pentra 400（図2）であり、装置のみならず70種に及ぶ検査試薬の開発に多大な時間を要した。MIRAシリーズとの共有化を図ったことと、2003年12月発効の欧州IVD（In-Vitro Diagnostics）指令への対応を必要としたためである。この製品の開発で特筆すべきことは、分析部光学系ユニットの開発にHORIBA Jobin Yvonが、電解質分析部ユニットの開発にはHORIBA医用システム統括部が参加、HORIBAグループの持つ技術を結集したことにある。また、Pentra 80シリーズで新規に開発したタッチパネル方式のユーザインターフェイスを採用、操作の容易さのみでなく操作の類似性を提供したことで、既にPentra 80を使用しているユーザには、装置操作習熟の負荷を軽減頂いている。将来的には一台のWork Stationで複数の血液分析装置あるいは生化学分析装置を操作し、双方の分析診断データを統合する機能を提供できるであろう。

他の一つは、少量の血液サンプルを全血でそのまま分析できるパームトップタイプの血中ブドウ糖濃度計Antsenseで、HORIBAが長年培った電極製造技術を応用、短時間で検査ラボに設置される生化学分析装置と同等精度の検出能力を有しているので、医師や看護師が糖尿病疾患の程度及び治療効果を診察室あるいは病室等の診療現場で確認することが出来る機器である。“患者を待たせない医療”への要求がますます高まってくるなか、医院、病院における初期診療や病室における状態把握のためのNear Patient Testingに最適なハンディタイプでかつ信頼度の高い臨床検査機器は単項目だけでなく、疾患の総合的診断を補助するために免疫化学、生化学、血液学、血液凝固学等検体検査の各分野の項目の複合化を含み、複数項目化が要請されよう。

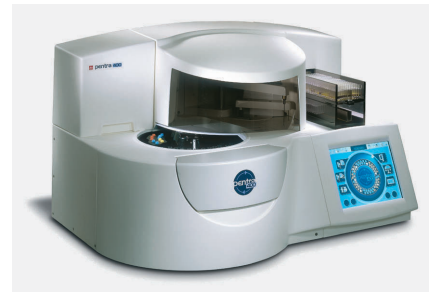


図2 Pentra 400

## おわりに

既述したように、米国・日本市場の更なる開拓・浸透が今後のHORIBA医用セグメントの世界戦略を考慮するうえで重要なファクタであるが、欧州・その他を含めて、地域ごとの市場区分・特性に従って必要とされる装置を明確に認識した上で、最適な診断結果をもたらす要素・応用技術を開発すると共に、それらの先端技術を適用しつつも、より簡便に操作できる装置を開発し顧客に提供していくことを、HORIBA医用セグメントの使命と考えている。



中峯 敦

Atsushi Nakamine

HORIBA ABX S.A.  
副社長、COO



## 患者のクオリティ・オブ・ライフ向上への 貢献を目指して

臼井 誠次

HORIBAは、一貫して各種分析計を開発してきた分析計の専門メーカーであるが、その創業期から医学分野にも展開してきている。長年蓄積してきた技術を医学分野に応用して、最終ユーザーである患者が「できるだけ早く健康的な生活に戻る」ために貢献する医療機器の開発を目指している。特に、医療現場と患者のニーズ・ウォンツとして注目しているのは、EBM( Evidence-based Medicine )推進のために臨床診断に直結するデータを提供すること、POCT( Point of Care Testing )に代表される迅速検査、更に、小さな医療施設でも導入できるように診断に必要な項目を1台で測定できる装置の開発である。

### はじめに

時代と共に、我々が罹患する疾病構造が変化してきている。生活習慣の変化から増加の一途をたどる糖尿病、心臓病などの生活習慣病、心の病、新興・再興感染症などである。また、医療事故も相次いで報道され、注目を集めている<sup>[1]</sup>。これらの疾病治癒・問題の解消のために、医療以外のいろいろな分野で開発された技術を応用し、医療現場の課題解決に役立つ機器が求められている。HORIBAでも創業以来綿々と医学用分析計の開発を続けている。この稿では、現在志向しているHORIBA医用システム事業の方向性について記述してみたい。

### 製品開発の歴史と将来の方向性

HORIBAは、創業以来一貫して各種分析計を開発してきた分析計の専門メーカーである。その創業期から各種分析計を医学分野に展開してきているが、血液、尿などの体液をサンプリングして測定する検体検査装置及びその消耗品やサービスが売上のほとんどを占めている。しかし、HORIBAの製品開発の歴史の中で医学向けに開発したものを他の事業分野に応用したものや、その逆で、他の事業分野で開発した技術を医学用に展開したものもある。

現在HORIBAの主力製品であるガス分析計は、当初呼気ガスモニタ用に開発したものだっただけである。最近のもので例に取れば、現在の医用事業の主力商品である炎症マーカーであるCRP (C-Reactive Protein)と白血球、赤血球、血小板などの血球計数を同時に行う自動血球計数CRP装置LC-178 CRP (図1)の基本原理は、水質分析分野で培われた技術、すなわち、CRP測定には濁度測定法が、血球数測定には導電率測定がノウハウと共に応用されている。

このような例は、医用分野だけでなくその他の分野でも多く見られる。このように、HORIBAの製品開発の歴史は、さまざまなものを測りたいといういろいろな分野からの要求に応えるために、多岐に渡る分析技術を蓄積し繰り返し応用し、多種多岐に渡る分野において使用される製品を世に送り出してきたと言える。また、こういうことができるのも、多種多様な分析技術を世に送り出してきたHORIBAにおいてないとも言えよう。

現在HORIBAが保有している技術を図2に示す。HORIBAの医療分野に対する貢献は、まさにこの長年蓄積してきた技術を医学分野に応用して提供することにあると考えている。



図1 自動血球計数CRP測定装置 LC-178 CRP

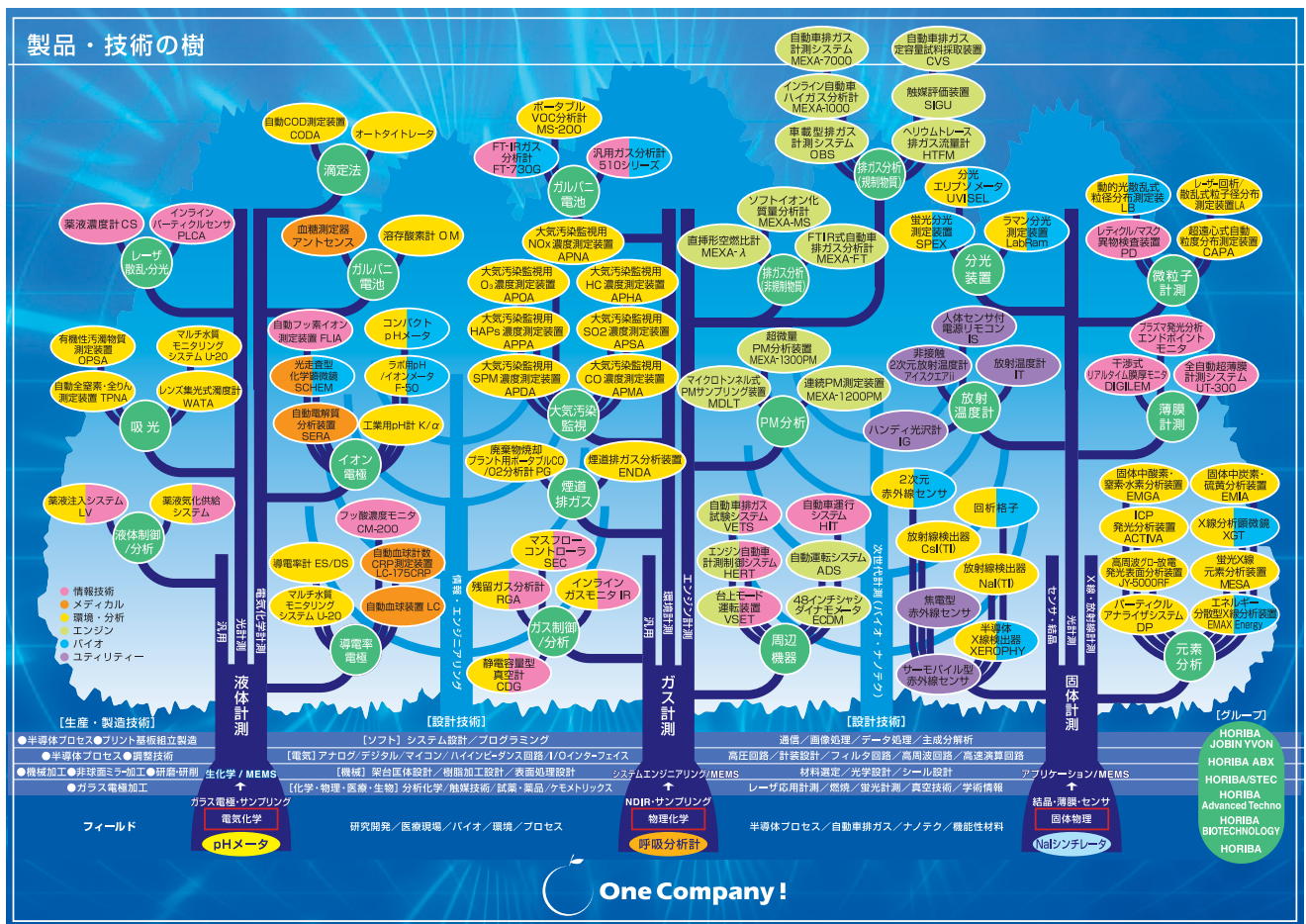


図2 現在HORIBAが保有している技術

現在の医療では温度計、血圧計をはじめとして多くの医療機器が使用され、ドクターの診断をサポートしている。表1に、薬事工業生産動態統計で示されている医療機器全体の分類を示す。この分類は用途別になされたもので分析機器としての分類ではない。この中で分析機器の範疇のものが分類されているのは、X線CTに代表される画像診断システムのカテゴリ、心電計や血圧計に代表される生体現象計測・監視システムのカテゴリ、及び血液や尿などの体液を採取してその成分を分析する医用検体検査機器のカテゴリが主である。

これらの分野が、HORIBAのこれからの製品開発のターゲットになっている。

表1 医療機器の分類

大分類	医療機器名称	代表的な機器
02	画像診断システム	レントゲン撮影装置、X線CT
		超音波画像診断装置、骨密度測定装置
04	画像診断用X線関連装置 及び用具	X線フィルム
		レントゲン装置の周辺機器
06	生体現象計測・監視システム	体温計・血圧計・心電計・脳波計など
		内視鏡、ファイバースコープ
08	医用検体検査装置	生化学自動分析装置・血球計数装置など
10	処置用機器	注射筒・針、カテーテル、採血用器具
12	施設用機器	手術台など
14	生体機能補助・代行機器	人工関節・血管・腎臓・膀胱など
16	治療用・手術用機器	ハイパーサーミア、レーザー治療器など
18	歯科用機器	
20	歯科材料	
22	鋼鉄器具	メス、ピンセットなど
24	眼科用品	コンタクトレンズほか
26	衛生材料・用品	ガーゼ、避妊具ほか
28	家庭用医療機器	マッサージ器、補聴器、電解水生成器

## 医療現場と患者のニーズ・ウォンツ

表1に示したように、一口に医療機器として使われる分析機器(医療用分析機器)と言ってもさまざまな種類があり、これらの機器に求められているものも多岐に渡っている。今我々は、使用される医療施設、及びその関係者のニーズ・ウォンツばかりでなく、その先にいる患者のニーズ・ウォンツも重要であると考えている。一番大切なことは、間接的にでも直接的にでも最終受益者である患者の希望である“できるだけ早く健康的な生活に戻る”に対する医療機器としての貢献度であると考えている。次に、特に注目しているニーズ・ウォンツについて考察してみたい。

## EBM( Evidence-based Medicine )

最近、患者への説明責任( Informed consent )を果たすために、EBM ( Evidence-based Medicine )の重要性が叫ばれている。しかし、これは“臨床的データ”をしっかりと積み重ね、統計的に整理してそれに基づき客観的に判断することを意味しているのであって、EBMが万能であるということではない<sup>[2]</sup>。これは、今までにも実行されてきたことであるが、今問われているのは更に客観的判断を増加させることの重要性が改めて認識されてきていると理解する。この流れの中で、医療用分析機器は、今まで以上に疾患に対して感度と特異性を持った臨床的データを提供することを期待されている。

## 迅速検査の実現

医療用分析機器が発展する過程で、医療施設でのこれらの機器設置は患者のそばに設備されるのでなく、専用の部屋に設置されてきた。例えば、血液、尿などの体液中の各主成分を分析する医用検体検査装置の場合を例にとると、装置の処理能力をアップさせ大型化したものを専用の部屋に設置し、そこに患者検体サンプルを搬送して測定するという検体集約型検査が志向されてきた。昨今、これが、疾病診断に直結した分散型検査、すなわち患者環境(ベッドサイド、診察室など)での検査(POCT:Point of Care Testing)を併用して、医療の効率(費用対効果を含む)を高めていこうという傾向がある。医療効率アップの施策のもう一つが、予防への注力である。疾病の早期発見はその治療確率だけでなく、医療費セーブにつながる。

ところで、読者が病院に行く時を思い出してほしい。ドクターの診察後、診断を確定させていくために採血され血液検査がオーダーされる。しかし、装置にかけてしまえばものの数分で結果は得られるが、装置が病院の別の場所に設置されていたり外注に出されていたりで、血液を運んだり順番待ちなどで時間がかかってしまい、すぐに結果が出てこず、翌日以降に再度診察を受けて結果を聞く場合が往々にしてある。これは患者には面倒であり、早く確定診断してもらえないと不安である。こういった診断に有効な迅速検査を実現することも患者の視点から見れば大きなニーズ・ウォンツである。

最近、外来患者の診療前の至急検査というシステムを取っている病院もある。これは、その日のうちにできるだけ確定診断するために、ドクターによる診療の前に検査を済ませ、検査結果が出た時点で診察を受けてもらおうというものである。医療分析機器としての対応に加えて、こういった病院(使用者)側の工夫も行われている<sup>[3]</sup>。

## 疾患別検査の実現

もう一つのポイントは、病気の種類によって必要な検査項目は決まってきたことである。これらの項目が測定できないと正確な診断を供することができない。病院で行われる検査は、科学技術の発展と共に進化してきた。現存する多くの装置は、分光光度法、電気抵抗法など測定原理別に構成されている。すなわち、生化学、血液、免疫というジャンルごとの分析装置に分かれている。これは疾病診断のための必要なデータを得るのに、いくつも装置が必要であることを意味している。これでは規模の小さな医療施設ではコストの問題から院内に装置を配備することができず、必要な検査が即時にその場でできないケースが出てくる。逆に言えば、病態診断のために必要な項目を選択的に測定できる装置を開発すれば、小さな医療施設でも導入することが可能になると言える。そうすればちょっと調子が悪くなった時に、かかりつけの医院に行けば最低限の検査を受けた上でその日のうちに診断をしてもらえるようになる。

もちろん、小さな医療施設へのこれらの機器導入にはその施設特有のニーズ・ウォンツがある。それは、場所を選ばず設置したい、誰でも操作ができるようにしたいということである。これを満たすために、コンパクト性（できれば可搬性）、簡単操作（特に前処理不要など）なども留意しなければならない点である。今年5月の日本糖尿病学会での初出品を機に、発表した小型電極式血糖測定機器 Antsense（図3）は、まさにこれを意識して開発した機器で、オペレータが持ち運び、患者のそばでも測定でき、患者から採血して何の前処理もなしに測定可能な仕様としている。



図3 小型電極式血糖測定機器 Antsense

## おわりに

患者は病気を治してもらうために病院に行き、診察を受ける。病院ではできるだけ早く患者の病状を診断し、治療方針を出すことが求められている。我々の使命は、この医療施設の目的を実現できる装置をこの患者の視点に立って有用である仕様に仕上げ、医療機関に供給することである。幸いなことに、HORIBAには今までに培ってきた多くの分析技術がある。これらの中には医用分野に応用できるものが多く存在するので、これらを核とした製品展開を考えていく。しかし、現在もちろん将来に渡っても、単に分析計を作るだけでは医療現場のニーズ・ウォンツに合致しない。そうならないために、診断に直結して、しかもその場で結果が出るという最終ユーザである患者の真のニーズ・ウォンツに応える製品に仕上げ、こそ、医療に対して大いに貢献できると考えている。

## 参考文献

- [ 1 ] 平成16年版 厚生労働白書
- [ 2 ] 中井利昭, EBMにとらわれて患者を診ない? , 総合臨牀 52 , 33-35  
( 2003 )
- [ 3 ] 渡辺清明, 緊急検査 総論 緊急検査の概念 , 臨床検査 47 , 9-12( 2003 )



臼井 誠次  
Seiji Usui

医用システム統括部  
統括部長

## お客様のニーズを重視することこそ勝利への戦略

Guy de Lanversin

HORIBA ABXは、20年の長きに渡り血液分析装置の道を歩み続け、この分野では今や有数の企業として名を馳せている。1996年にHORIBAグループの一角となった後、HORIBA ABXは売上高を3倍以上に伸ばした。研究開発と製品範囲の拡充に多額の投資を行い、お客様のニーズに焦点を当て、それを理解し先手を打つ、そしてその後で実質的な支援体制に投資を行うという図式が、お客様との長期的な関係を築き上げるために求められるものである。以下では、これまでの経緯を簡単に振り返り、HORIBA ABXを導いてきた指針及び今後の挑戦への展望を示す。

### HORIBA ABXワールド

HORIBA ABXが1996年にHORIBAグループの一員となった時、売上高は約3,500万ユーロであった。7年後、数字は3倍以上になり、1億2,000万ユーロになろうとしている。

この間に、HORIBA ABXが急速に成長するにあたり重要な投資が行われた。こうした投資は、HORIBA ABX製品のラインナップを一新し拡張するための研究開発を目的としていた。また同時に、生産能力を向上し、販売ネットワークを拡げ、ユーザへのサポート体制を強化することを視野に入れていた。

研究開発への投資により、HORIBA ABXは、過去3年間に渡り5つの血液分析装置を新たに発表し、その製品ラインナップを一新した。同時に臨床生化学開発チームが発足し、その最初の分析装置Pentra 400を2004年初頭に発売するに至った。2003年中頃、お客様に提供する幅広い革新的ソリューションを継続的に拡充するため、HORIBA ABXは、血液凝固を専門とするBiopep社を傘下に加えた。

HORIBA ABXの研究開発は、HORIBAグループ内のさまざまな技術を最大限に利用している。一例として、HORIBAグループの一員で、分光・回折光学で世界の最先端をいくHORIBA Jobin Yvonと共同開発したPentra 400の光学系がある。他にもHORIBAグループ内でのシナジー効果の例として、HORIBAと共同開発したPentra 400 ISEモジュールがある。

HORIBA ABXが成長し、製品売上高が増加した結果、生産能力の向上が必要となった。必要とされた投資がどれだけのものであったかは、数値にして紹介するのがよいであろう。1996年には、HORIBA ABXは1,700台の装置及び1,400トンの関連試薬を生産していたが、2003年には、7,000台の装置及び6,000トンの試薬を上回る生産を行った。

まず最初に、生産能力が増強された。Montpellierの本社(図1)を拡張し、日本でHORIBA(図2)に生産拠点を追加した。1997年には、サンパウロのHORIBA ABXブラジル支社に、3番目の生産拠点が作られた。

1996年には、フランス国内の運営拠点として地方組織を販売ネットワークに組み入れ、国外での販売促進を強化するため、多くの独占販売代理店と手を結んだ。販売代理店がお客支援サービスに投資を十分に行えない国では、子会社を設立した。今日、HORIBA ABXは、欧州、ブラジル、アメリカ、ポーランド、インド、東南アジアに系列会社を持ち、日本ではHORIBAが代表している。HORIBA ABXは、HORIBA ABX製品が販売されている国外140か国における、85の独占販売代理店(図3)と密接に協力して業務を続けている。

その結果、HORIBA ABXは、IVD市場において血液学関連の主要サプライヤとして台頭し、血液用検査装置の年間生産量で世界のトップを走ることになった。HORIBA ABXの分析装置は、診療所、大学病院、民間の検査室等、世界中であらゆるタイプの検査機関のニーズに対応している。社員800名が、お客様に最上のサービスをお約束するべく、現場、あるいは世界を飛び回っている。

## 医療の変化

HORIBA ABXは、極めて競争の激しい中で、わずか20年で世界の5本指に入る血液学関連のサプライヤになった。この成功を大変誇りにしつつも、日常ベースで更に多くのお客様に満足いただくためには、市場の進化から生まれる新たな挑戦と、お客様の環境の変化に向き合わなくてはならないと認識している。

こうした変化の多くは、ほとんどの国で医療費が増加し、現在の困難な経済環境下において、政府がコスト削減の方法を検討していることと関連している。医療費増加の理由は多岐に渡っており、国によって異なっている。しかし、この医療費の増加は多くの場合、重要な世界的傾向である。

ほとんどの西欧諸国では、人口の高齢化により健康障害を持つ人が増加し、年齢に応じた新たな疾病解析が求められている。多くの国では人口が急増し、疾病診断の仕組みや検査への強い要求が出てきている。更に、広い範囲を容易に旅行することができるようになったため、伝染病が国境に関係なく急速に広まっている。また一方で汚染、生活習慣、栄養摂取等、その他の要因が新たな疾病を引き起こしている。



図1 HORIBA ABX Montpellier 本社



図2 HORIBA 本社



図3 世界的な販売代理店ネットワーク



このことは、新たな疾病の発見とますます効果的で迅速な診断を行うことと併せて、検体数の増加に対する費用対効果の良い解決策を提案するために、検査室は生産性と効率性を高める必要があることを示している。

検査の中央集中化は、多くの検査室で採用されているコスト削減策の一つであるが、数が少ない大きな検査センターに限られている。そのため、より高いレベルの検査の自動化と、データ管理は必須である。

同時に、患者の入院期間の短縮や治療の予後への検査の必要性の拡大が、検体検査を、患者により近い所で検査する方向に導いている。こうした傾向においては、さまざまな場所で測定される検査結果の品質を維持するため、使いやすい装置が必要である。

検査を実施するいくつかの施設が一緒に活動するには、異なる場所にある装置を遠隔制御したり、情報交換や患者の記録を管理するための、効率的な電子情報システムが必要となる。

更に、検査は今や、自己測定機器を用いて患者自身の手で行うことができる。より一般的なレベルでは、患者自身の健康及びアフターケアに対する意識が、急速に高まってきている。この点においても、我々のお客様である病院施設は重要な役割を担うと同時に、病気の危険因子が存在し、予防措置の必要な領域で教育的指導力を発揮することとなる。

こうした変化に際し、HORIBA ABXは柔軟かつ積極的な姿勢を保ち、その戦略を軌道に乗せて開発目標に取り組んでいかななくてはならない。

## HORIBA ABXの戦略

この分野において主要な役割を演じ成功を収めるため、HORIBA ABXは、次の2つの原則に基づく戦略を実践した。

第1の原則は、お客様のニーズと関心に応える場合に製品は成功する、というものである。そのため、熱心にお客様の声を聞き、彼らのビジネスにおける制約だけでなく、その環境まで理解しようとしている。そして、お客様の期待に応える画期的な製品を迅速に設計し、多くの便益を提供している。HORIBA ABXの製品ラインナップをご覧ください。Pentra 120 Reticにより、HORIBA ABXは最初の自動網状赤血球計数装置を発表した。チアゾールオレンジを用いた測定法で、試験結果が出るまでの時間を30分から30秒以下に短縮することができた。また、最初の自動塗抹染色標本作製装置(SPS)を設計し、CBC測定とCRP測定を1台の装置で同時に行うための、血液学と免疫化学の統合技術を開発すると共に、問題のある検体を自動的に再試験するHORIBA ABX リフレックス測定法を考案した。本誌において、HORIBA ABXが開発し、現製品のラインナップに組み入れてきた技術や装置のいくつかについて、詳細な論文をご覧ください。あろう。また、今後数年のうちに実用化される製品や技術の詳細をご覧ください。

ただけるであろう。というのも、将来的なお客様のニーズを見越して行動することは我々の仕事だからである。HORIBAグループの一員となることにより、HORIBA ABXは、グループ内の他社の開発による最先端の専門的・革新的な分析技術を楽しむことが可能となるであろう。

第2の原則は、製品そのものだけではお客様の要望に完全に答えることができないこと、そのため、同時に最高品質のサービスを提供する必要がある、というものである。ユーザトレーニング、製品納入、装置メンテナンス、技術サービス及びサポートはもちろん、財務的支援、上級者向けトレーニング、技術ホットライン、学術的サポート、オンライン文書等、お客様にとって重要と思われるさまざまなサービスを提供する。このためHORIBA ABXは、お客様志向のチームすべてを最重視し、その能力と人材の育成に力を入れている。

## おわりに

この度のReadoutは、HORIBA ABXの技術と製品を主に取り扱う。ここで取り上げるHORIBA ABXの技術と製品はお客様に提供する革新的なソリューションの一部に過ぎないが、そうした技術と製品により、HORIBA ABXが体外診断装置市場において主要な役割を演じるようになったのである。

お客様はHORIBA ABXにサービスとサポートを期待し、彼らのビジネスに我々が価値を与えることができれば、我々を選択していただける。言い換えれば、我々の狙いはお客様に好まれるパートナーとなることである。

HORIBA ABXが体外診断装置市場において他社と異なるのは、こうした理由であり、製品だけではなく、お客様との間に築いた信頼関係の質によるものである。HORIBA ABXは、未永い真実のパートナーシップを通してお客様と共に歩むことにより、発展と成長につながり、信頼を高めることを志としている。



Guy de Lanversin

HORIBA ABX S.A.  
Corporate Officer  
Director of Marketing

# 小型電極式血糖測定機器 アントセンス

大森 陽一

小型軽量で持ち運びが容易な電極式血糖測定機器アントセンスは、血液中のブドウ糖濃度を全血のまま1滴で簡単迅速に測定できる。また、患者の病態によって変化しやすい酸素分圧やヘマトクリット値の変動影響を受けにくく、診断現場で安心して使用できる。これらの特長は、ブドウ糖酸化酵素固定化膜に過酸化水素電極を組み合わせた酵素電極法とカートリッジ式の血球分離膜、更にブドウ糖酸化酵素固定化膜や過酸化水素電極のリフレッシュ機構などの創意工夫によって実現できたものである。

## はじめに

HORIBA医用グループは、臨床検査分野において、治療や診断の現場で血液検査の結果を提供するポイント・オブ・ケア・テストング装置(Pentra 60シリーズ、LT-LCシリーズ)の市場展開を図ってきた。そこへ2000年10月にHORIBA医用製品では最小となる小型電極式血糖測定機器アントセンスが三共株式会社からの受託生産で新規ラインナップに加わった。この製品は、血液中のブドウ糖濃度を全血のまま1滴で簡単迅速に測定できるものであり、主として医師・看護師が使用し、これまでに約7000台が出荷されている。今回、従来製品に対する要望を踏まえHORIBAが独自に改良したアントセンスの特長・有用性について紹介する。

## 血液中ブドウ糖濃度(血糖値)測定の要求

糖尿病に代表されるように体内中の血糖コントロールが不十分になると、高血糖状態では血管障害や心疾患などを発症するリスクが高くなり、低血糖状態では意識喪失など重篤な事態になるため、血糖値をいつでも迅速正確にモニタできるようにする必要がある。このような場面で、ポータブルで正確な血糖検査機器の必要性がますます高まっている。従来製品アントセンスは、低血糖・

高血糖に対する処置の加減をフィードバックするために、診断に求められる正確な血糖値をその場で検査する機器として用いられており、その他に糖尿病でなくとも手術や透析中において患者の容態安定を図るために血糖値を随時把握してコントロールするために使われている。

通常は血糖値は体の状況に応じて増減する作用が働き、食後及び空腹時を含め70~140 mg/dLの範囲におおむね収まっている。血糖値を増やす作用として代表的なものにはブドウ糖の貯蔵庫「肝臓」を支配している内臓神経の興奮(ストレス由来)などがあり、減らす作用として代表的なものがインスリンの働きである。すい臓で作られるホルモンの一つであるインスリンが細胞に作用すると血液中のブドウ糖が細胞内に取りこまれ、そのブドウ糖が消費されて生命活動のエネルギー源として活用される仕組みになっている。しかし、遺伝的要因やウイルス感染などが原因ですい臓の機能低下を起こし、インスリン生産量が減少したり、また遺伝的要因などにより標的細胞においてインスリンが十分働かない、あるいはカロリーの過剰摂取や肥満によってインスリン作用が追いつかずブドウ糖が細胞に取り込まれにくくなるといったことが続くと血糖値が常に高い状態となってしまう(糖尿病の発症)。この状態が続くと末梢の血管や神経が冒され、やがて合併症(心臓疾患、脳卒中、失明、腎不全、神経障害など)へと進行し、QOL(Quality Of Life:生活の質)が著しく低下することになる。

世界の糖尿病患者数は1億5000万人にのぼり、日本でも糖尿病が強く疑われる人は740万人、予備軍を含めると1620万人(日本の人口の約12%)と推定されている。現在、日本の医療機関で治療を受けている患者は220万人と推定されており、無自覚なため糖尿病の進行と合併症の進行に気づかない人や、治療を放置している人も多いと考えられる。このことから今後糖尿病に関する検査の必要性が大きく増大していくものと予想される。

## アントセンス 製品概要

### 外観と操作

アントセンス (図1)は、表1に示すように小型軽量で持ち運びが容易で、電源を入れてすぐに使用可能である。カートリッジ方式で、安全かつ簡単に測定できる。操作方法は、注射器で静脈血を採取、血液を試料点着部の血球分離膜に点着し、スタートスイッチを押す、という手順で測定結果がディスプレイに表示される。



図1 アントセンス

\*1: センサ部表面から測定後の反応老廃物を取り込み、同時にセンサ部表面を酵素反応に必要な湿潤状態に保持するための保存液の入った容器。

表1 主な仕様

寸法	幅 20 cm × 奥行 18 cm × 高さ 6.5 cm
質量	800 g (ACアダプタ含まず)
測定範囲	10 ~ 1000 mg / dL
メモリ	100測定分
プリンタ	内蔵式 (用紙のり付き)
外部出力	RS-232C

### 要望の実現

アントセンスは、従来製品の使用経験に基く以下のユーザー要望を実現した。

広い測定範囲を実現。低濃度10 mg/dLから測定可能。特に測定頻度の高い10 mg/dL ~ 250 mg/dLの血糖値の精度を向上。

プリンタの標準搭載により、測定値を手書きで記録する手間が不要。

付箋のように繰り返し貼ってはがせる用紙で、印字後はカルテにそのまま貼るだけ。

外部出力にRS-232Cを標準搭載。オンラインシステムや電子カルテ化に対応可能。

### 測定原理

測定原理は、ブドウ糖酸化酵素固定化膜と過酸化水素電極を組み合わせた酵素電極法に基づいている。また、図2にセンサ構造を示す。

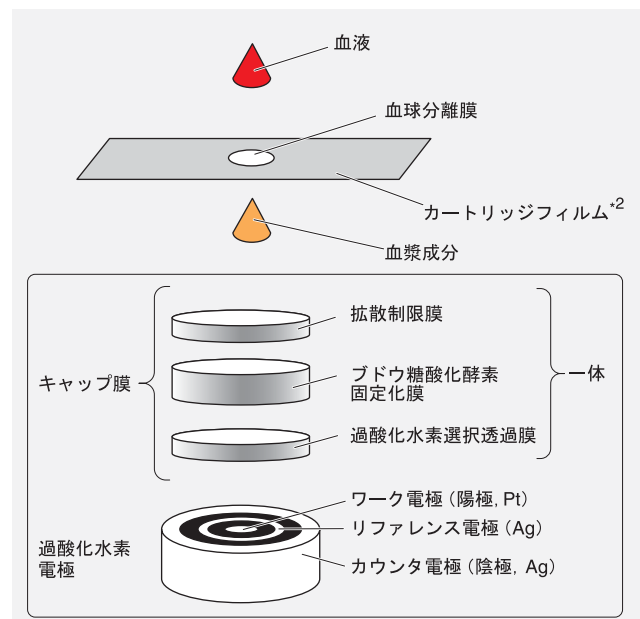


図2 センサ構造

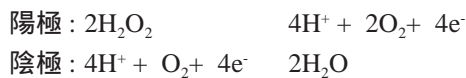
\*2: 血球分離膜を担持するためのポリエチレンフィルム。

血液を点着後、次の(1)~(5)の反応による電流検出を経てブドウ糖濃度が測定される。

- (1) 全血試料は血球分離膜によって血漿成分に分離される。
- (2) 血漿中に含まれるブドウ糖は、ブドウ糖酸化酵素を固定化したキャップ膜を通過する。
- (3) キャップ膜を通過する際に、酵素の触媒作用によってブドウ糖が分解され、グルコン酸と過酸化水素が生じる。



- (4) 過酸化水素は電極表面で分解され、電流として検出される。



- (5) 電流の微分値から試料中のブドウ糖濃度を算出する。

検出される電流(反応電流)は時間の関数で、その微分波形のピーク値はブドウ糖濃度と相関を持つ(図3(a))(b)(c))。

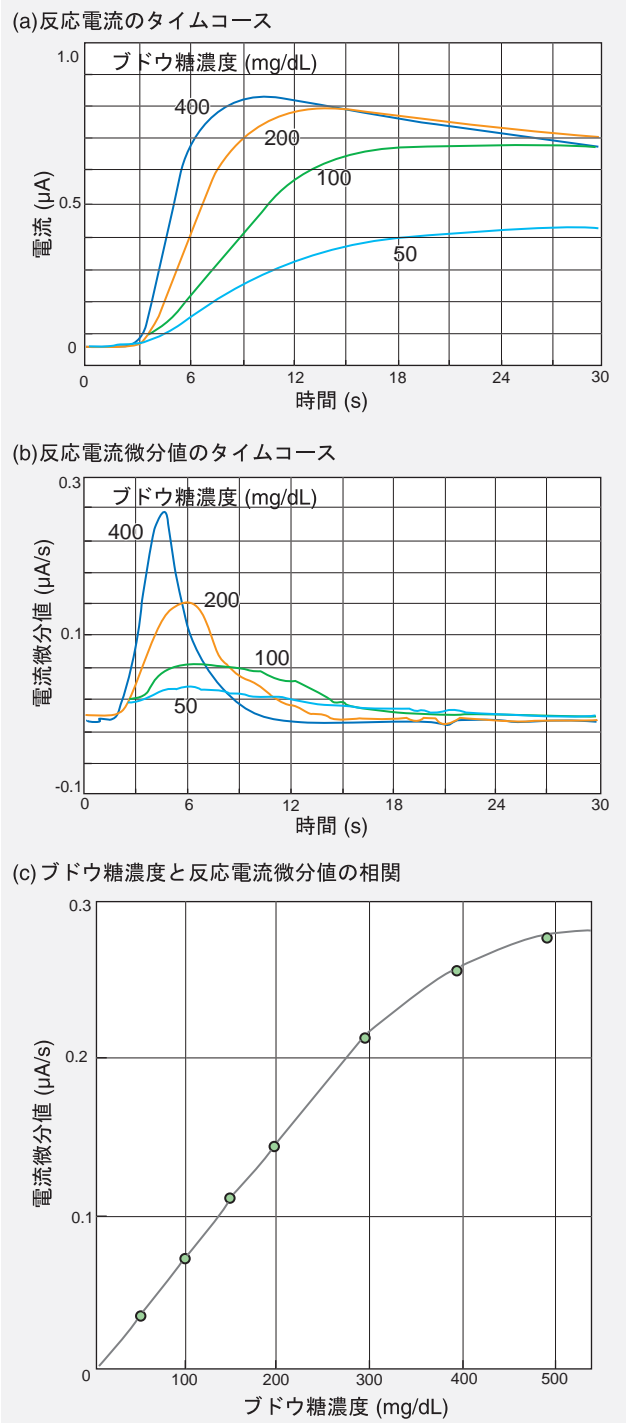


図3 測定原理とデータ

## 膜の構造・機能

### 血球分離膜

血球分離膜は、ポリカーボネートの薄膜に直径数十の孔を一定数設けたもので、血球やタンパク成分の透過を防ぎ血漿成分のみを透過させる。また、透過液量を制限する機能も持つ。この機能膜を採用したことによって試料の前処理を省き直接全血測定が可能となった。センサ部と反応するのは血漿成分であるため、

ヘマトクリット値<sup>3</sup>の影響を押さえることができ、また透過量を制限することでセンサ部の酵素反応に必要な酸素が検体血液以外から(キャップ膜中の溶存酸素など)十分供給できるため、血液中の酸素分圧の変動影響も除去することができた。

\*3: 血液中に占める赤血球の容積の割合。

### キャップ膜

センサ部表面は、拡散制限膜、ブドウ糖酸化酵素固定化膜、過酸化水素選択透過膜で構成され、過酸化水素電極に被せて使用するためキャップ膜と称している。

### 拡散制限膜

拡散制限膜は、ポリビニルアルコール(PVA)によって作られ、試料中のブドウ糖の透過量を制限する。検出感度のオーバーレンジを防ぎ、測定濃度範囲をコントロールしている。

### ブドウ糖酸化酵素固定化膜

ブドウ糖酸化酵素は、その反応特異性により試料中のブドウ糖と選択的に反応する。ブドウ糖酸化酵素固定化膜は、アクリロニトリル膜(PAN膜)にブドウ糖酸化酵素を化学的に結合させたもので、タンパク質である酵素を劣化させることなく長期間使うことを可能にしている。なお、固定化する酵素を換えることで、他の測定項目への応用も可能である。

### 過酸化水素選択透過膜

過酸化水素選択透過膜は、アセチルセルロース膜(AC膜)によって作られ、試料中に含まれる電極反応物質(アスコルビン酸など)の透過を制限してデータの外乱要因を取り除いている。

## 過酸化水素電極

### 構造

図4に過酸化水素電極の構造を示す。ワーク電極(W)<sup>4</sup>に白金、リファレンス電極(R)<sup>5</sup>とカウンタ電極(C)<sup>6</sup>に銀を用い、また反応時の温度影響を補正するためワーク電極内部にサーミスタを内蔵している。

\*4: 酸化還元反応を起こすために電圧を印加する電極。この場合過酸化水素の酸化還元電位を印加している。

\*5: ワーク電極に電位を印加する時の基準となる電極。電流が流れないように回路上に高い抵抗値を持っている。

\*6: ワーク電極に対応して、酸化還元反応が同時に起こる電極であり、ワーク電極とこのカウンタ電極との間で電流が流れる。

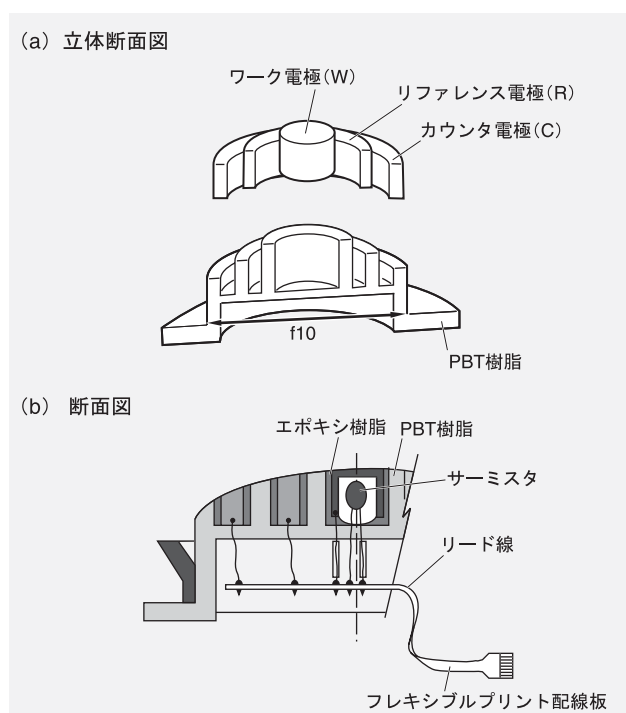


図4 過酸化水素電極

### 電極の制御

図5に電極印加電位の制御パターンを示す。測定直前に電位を反転させて表面の酸化膜を除去(リフレッシュ)し、電極表面をクリアにする。続いて再度反対電位を与え(オーバーシュート)、W-R電極間電位がすばやく過酸化水素の分解電位である0.75Vとなるよう制御する。測定終了後、反応の終了を検知した時点で待機状態となる。

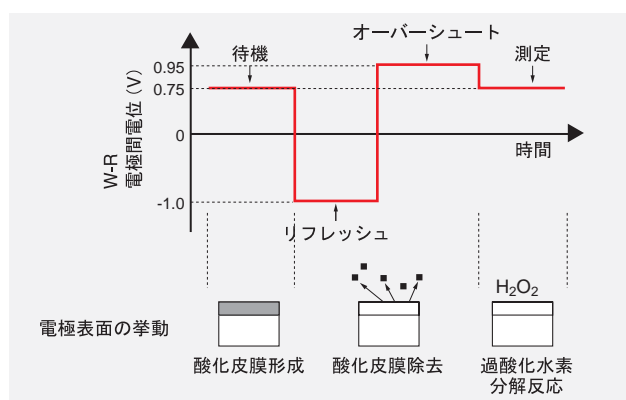


図5 電極印加電位の制御パターン

## アントセンス の特長

### センサ部表面の洗浄機構

アントセンス は、センサ部表面の洗浄機能を高め、測定精度の向上と測定範囲の拡大を行った。

図6に、センサ部表面の洗浄機構の概念図を示す。洗浄機構は、測定終了後にセンサ部表面の反応老廃物をバッファタンクの保存液に取り込み、同時にセンサ部表面を酵素反応に必要な湿潤状態に保持し、更にセンサ部表面に残留している未反応のブドウ糖を消失させるものである。以下に手順を示す。

センサ部表面をバッファタンク下部のスポンジ状多孔質物質<sup>\*7</sup>に接触させて押圧することで、多孔質物質から保存液をセンサ部表面に滲出させる。同時に、センサ部表面から測定後の反応老廃物をバッファタンク側に拡散させる。

次に、センサ部表面をスポンジ状多孔質物質から離して空気に触れることでセンサ部表面に酸素を供給し、ブドウ糖酸化酵素の酵素反応を促進してセンサ部表面に残留している未反応のブドウ糖を消失させる。

これをもう1度繰り返すことで、高濃度試料の測定後であっても、センサ部表面の洗浄を確実なものにする(特許出願中)。

\*7: 保存液で湿潤状態にあり、かつ滴下しないように保存液を吸着保持する。

### 性能

ブドウ糖水溶液を測定した場合の精度を図7に示す。低濃度域から高濃度域まで変動係数1.5~2.5%の測定精度である。実検体を測定した場合は、図8に示すように定置形ブドウ糖測定装置GA-1160<sup>\*8</sup>と、低濃度域から高濃度域まで良い相関を示している。

アントセンス についても、定置形ブドウ糖測定装置GA-1140を基準機として相関を評価し、良好な結果が報告されている(図9)。

\*8: 検査室で、多数検体を測定するアークレイ社製の定置形ブドウ糖測定装置。測定原理は、アントセンスと同じく固定化酵素電極方式。多くの中央検査室に設置されている。

(a) バッファタンクの外観



(b) 洗浄動作

1. センサの待機状態



2. センサ部表面をスポンジに2度接触させて、効果的に洗浄

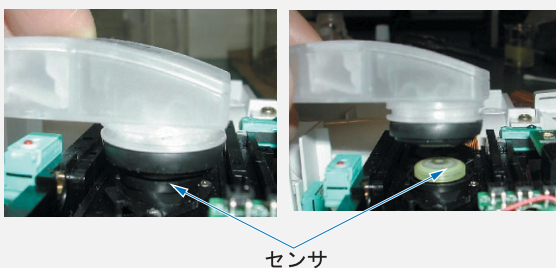


図6 センサ部表面の洗浄

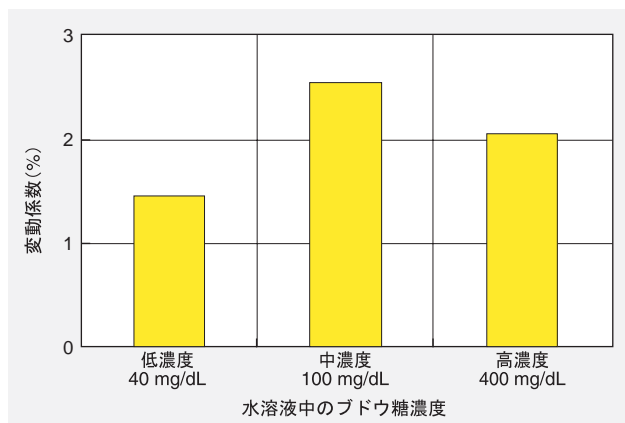


図7 ブドウ糖水溶液の測定精度

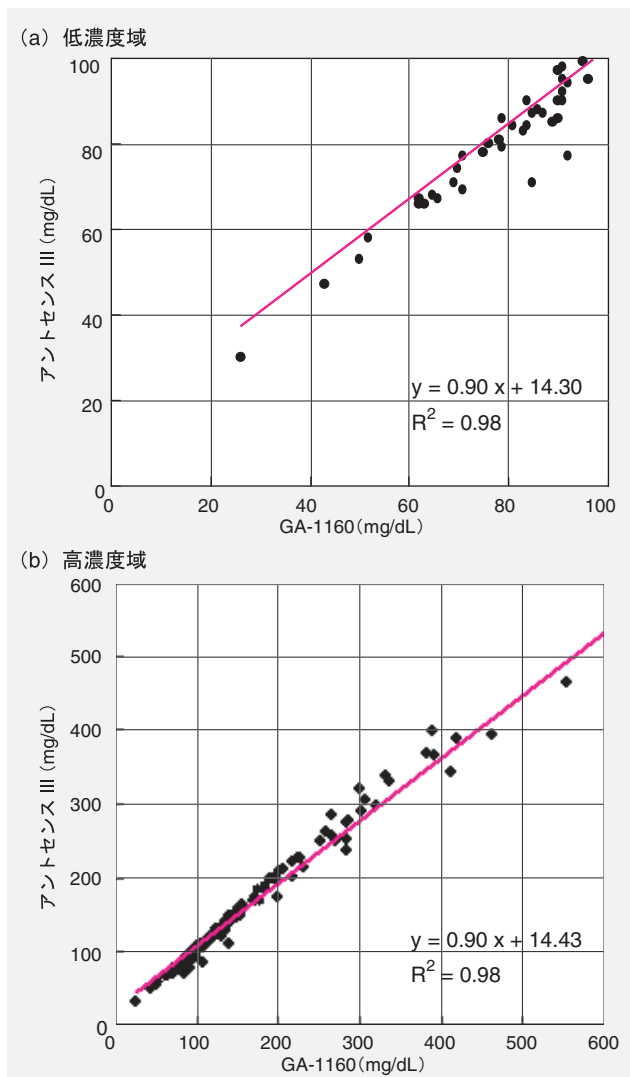


図8 実検体でのブドウ糖測定装置GA-1160との相関

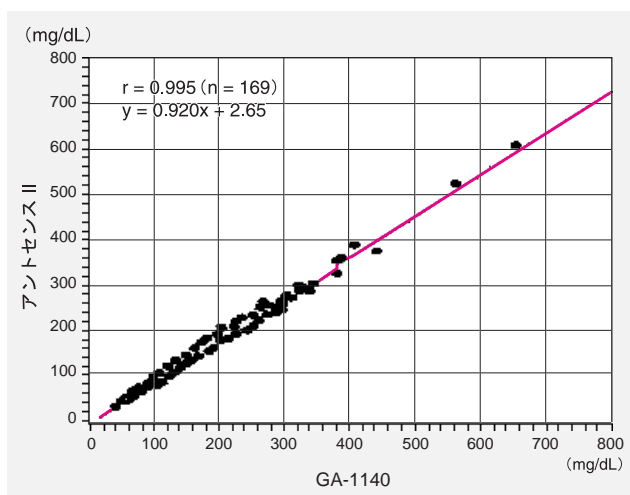


図9 基準機との相関<sup>1)</sup>

## 有用性

病院で実施されるような患者血液の酸素分圧やヘマトクリット値などが病態や治療方法によって変化しやすい状況において、アントセンスは強みを発揮し、過酸化水素電極方式と血球分離膜の適用により、上記の変化に対する影響が少ない。すなわち検査室で血清分離して検査している大型装置と同じ方式を、まさに診断現場で実現しているの安心して使うことができる。

## おわりに

日本では、高齢化と生活習慣病を代表とする罹患率の高まりと共に国庫に対する医療費財政負担が大きくなり、医療現場に大きな変化が求められている。HORIBA 医用グループが携わっている臨床検査の分野においても、コスト削減は避けて通れない環境にある。しかし、近い将来、病院という枠内の診断・治療のコストダウンだけでなく社会的なロスを減らすことも要求されるに違いない。例えば病態によって在宅や職場などでも十分ケアできる体制が構築されると、患者のQOLが向上し、通院による社会的ロスが削減されていくであろう。また緊急を要する現場において採血即検査ができれば、適切な治療が可能となり、患者の治癒を早めることで社会的なロスを削減できるに違いない。今回報告したアントセンスのようなポイント・オブ・ケア・テスティング装置は、これらの臨機応変な検査を実現する鍵となるものであると確信している。

## 参考文献

- [1] 増子 晶子, 阿部 隆三 他, 改良型小型血糖測定装置 (アントセンス) の基礎的検討, 医学と薬学35(4), 921-928(1996)



大森陽一

Yoichi Ohmori

医用システム開発部  
チームリーダー



## 自動血球計数CRP測定装置 LC-178 CRP

長尾 俊治，大上 創一，山尾 泰生

自動血球計数CRP測定装置は、診察室に設置でき、採血管一本の採血から患者の目の前ですぐに、白血球、赤血球、血小板、ヘモグロビン、CRPの測定結果が得られるため、炎症性疾患、感染症の初期診断用装置として非常に高い評価をいただいている。これまでに白血球3分類の測定機能の追加を行っており、更に今回開発したLC-178 CRPは、改良型CRP試薬の採用により、従来機種との簡便さ・迅速さをそのままに、全血におけるCRPの測定範囲を、従来の0.2～10.0 mg/dLから2倍の0.2～20.0 mg/dLまで拡大した。これにより、従来と比べ広範囲の炎症状態が把握できると期待される。

### はじめに

医院や病院において“必要な項目を、必要な時に、必要な場所で、精度よく、短時間で、簡単に検査を行う”体制作りが検討されている。これはPOCT( Point Of Care Testing )と呼ばれ、医師が正しい診断と治療方針の決定を迅速に行うことに欠かせない。また、これにより患者への身体的、経済的負担軽減も達成できると考えられている。このため、低コストでPOCTに対応した検査システムの実現が強く望まれている。

HORIBAとABXは、これらのニーズを受けて、自動血球計数CRP測定装置FL-270 CRPを1998年4月に共同で開発し、製品化した<sup>[1]</sup>。この装置は、全血検体を試料ホルダにセットするだけの簡単な操作で、赤血球、ヘモグロビン、血小板、更に、炎症性疾患、感染症の診断の際に有効な指標となる白血球数(WBC)とC反応性タンパク(C-Reactive Protein: CRP)を、5分足らずという短時間で測定することができる。また、FL-270 CRPの上位機種として、白血球3分類測定機能を付加したLC-170 CRPを2000年3月に、更にこの改良型であるLC-175 CRPを2002年3月に発売し、臨床検査の現場で幅広く使われている。

今回開発したLC-178 CRP(図1)は、改良型CRP試薬の採用により従来機種との簡便さ・迅速さをそのままに、CRPの測定範囲を従来の0.2～10.0 mg/dL<sup>\*1</sup>から2倍の0.2～20.0 mg/dL<sup>\*2</sup>まで拡大した。本稿では、LC-178 CRPの測定原理、性能について報告する。

\*1：血漿・血清検体の場合は0.2～7.0 mg/dL。

\*2：血漿・血清検体の場合は0.2～15.0 mg/dL。



図1 LC-178 CRP

## 測定原理

LC-178 CRPでは、従来機種と同様、血球の計数にはインピーダンス法を、ヘモグロビンの濃度測定にはシアニンメトヘモグロビン法を、CRPの濃度測定にはラテックス免疫比濁法を用いている。

### 白血球 / 赤血球 / 血小板の測定

血液中の血球成分である白血球 (WBC)、赤血球 (RBC)、血小板 (PLT) はインピーダンス法で測定する。血液検体を生理食塩水を主成分とする電気伝導性の高い希釈液 (商品名: ミノトン3D) で適当な濃度に希釈し、測定セル内の2つの電極間に設けたアパーチャを通過させると、血液細胞 (血球) の通過時に電極間の電気抵抗が変化する (図2)。この抵抗変化のパルス数から血球の数を、またパルスの高さから血球の容積 (種類) を検出することができる。

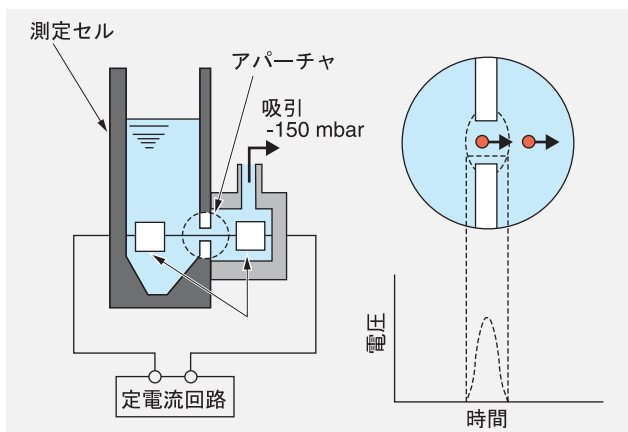


図2 白血球 / 赤血球 / 血小板の測定原理 (インピーダンス法)

### 血球の粒度分布

血球の形状は種類によって必ずしも一定でなく、また測定途中で変形することもある。これらの影響を補正し正確な血球計数を行うため、血球の種類に応じて得られたパルスの高さ (血球容積) のヒストグラム (血球粒度分布) を作成し、最適の血球容積領域で計数する。LC-178 CRPでは、計数条件を次のように設定している。

- WBC : 容積範囲0 ~ 430 fLを256チャンネルに分割、計数領域は約30 ~ 430 fL。
- RBC : 容積範囲0 ~ 300 fLを256チャンネルに分割、計数領域は約25 ~ 300 fL。
- PLT : 容積範囲0 ~ 33 fLを128チャンネルに分割、計数領域は約1 ~ 27 fLの間で最適閾値を自動設定。

### 白血球の3分類 (3-part diff)

白血球は生体の防御機構の要となるもので、白血球の計数はさまざまな感染症の診断に欠かせない。白血球には、好中球 (neutrophil)、好酸球 (eosinophil)、好塩基球 (basophil)、単球 (monocyte)、リンパ球 (lymphocyte) の5種類の細胞がある。なお、一般的に、好中球、好酸球、好塩基球の3種類を併せて、顆粒球 (granulocyte) と総称している。

白血球を細胞種ごとに分画し計数することは、的確な診断・治療に非常に有用な情報をもたらす。LC-178 CRPは、中でも特に重要な、単核球<sup>\*3</sup>、リンパ球、顆粒球の3種を分画計数 (3-part diff) することができる。

図3に、白血球の代表的なヒストグラムと3分類の閾値を示す。

\*3: 単核球は単球とリンパ球の総称であるが、ここでは単球 + 大きなリンパ球の意味で使用。

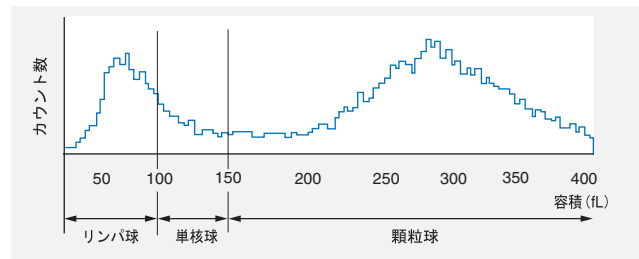


図3 白血球の代表的なヒストグラムと3分類閾値

### 白血球分類の原理と試薬

白血球の分類は、3分類専用の希釈液 (ミノトン3D) と溶血剤 (商品名: ミノライズ3D) を用い、以下の作用により希釈・溶血後に容積が変化する程度が異なることを利用して行う。

希釈液は白血球の細胞膜を保護する。溶血剤は赤血球と血小板を壊した上で、3種類の白血球に収縮作用を及ぼす。リンパ球では、溶血剤によって細胞質内から脱水が起こり、核膜が収縮 (裸核化) する。単核球、顆粒球では裸核化の程度が順に小さくなっていく。

## ヘモグロビン濃度

ヘモグロビン濃度(Hgb)は国際血液学標準化委員会(ICSH)で国際標準法として定められているシアンメトヘモグロビン法で測定する(図4)。

血液に溶血剤(ミノライズ3D)を加えると、赤血球が壊れヘモグロビンが流れ出る。すると、ミノライズ3D中の酸化物質によりヘモグロビンがメトヘモグロビンに変化し、更にミノライズ3D中のシアンとメトヘモグロビンが結合し、シアンメトヘモグロビンを生成する。このシアンメトヘモグロビンは緑色(540 nm)の光をよく吸収するため、この吸光度からHgbの濃度を測定する。

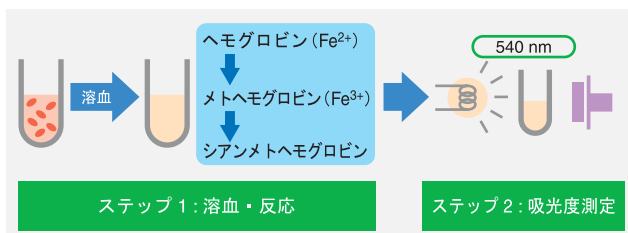


図4 ヘモグロビン濃度の測定原理(シアンメトヘモグロビン法)

## CRPの測定

CRP濃度は、ラテックス免疫比濁法で測定する。血液検体を専用の溶血剤で溶解し、これに抗ヒトCRP抗体感応性のラテックスを加えると血液中のCRP抗原が抗原・抗体反応を起こし、CRP濃度に応じてラテックスが凝集する(図5)。このラテックス凝集による濁度の変化を、850 nmにおける吸光度変化の値として測定する。この値と血球計数で得られるヘマトクリット値(Hct)<sup>4</sup>とから、補正演算式を用いて血漿中のCRP濃度を算出する(以上の手順を組み合わせた測定法は、HORIBAの特許(日本 特許第3249919号、米国 特許 No.6030845、欧州は出願中)で、社団法人発明協会の平成16年度全国発明表彰において日本弁理士会会長賞を受賞した。)

\*4: 血液中に占める赤血球の容積の割合。

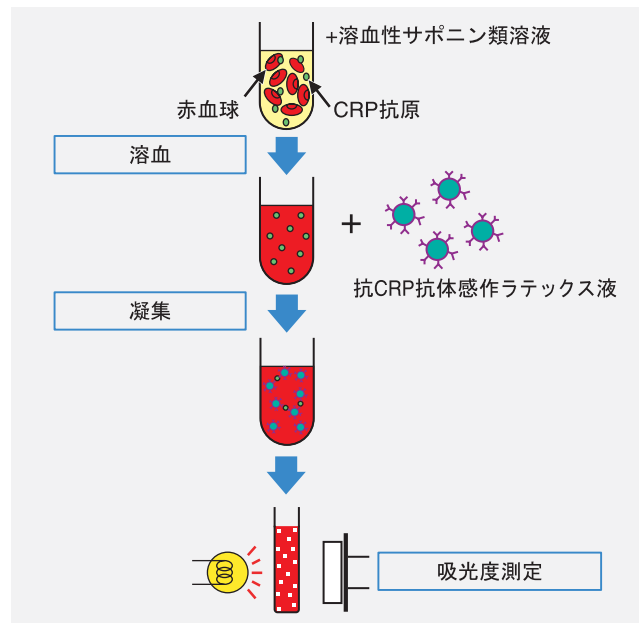


図5 CRP濃度の測定原理

## 測定手法

LC-178 CRPの試料と試薬及び信号のフローを図6に示す。

検査者があらかじめ抗凝固剤が入っている採血管に血液検体を採取し、この採血管を装置本体の試料ホルダにセットすると測定が開始される。

まず、CRP測定用試薬R1(溶血剤:溶血性サポニン類溶液)100  $\mu$ Lと採血管の検体血液 8  $\mu$ Lが、CRP混合 Cellで混合、攪拌される。次に、採血管の検体血液 10  $\mu$ LがWBC Cellに入り、希釈液(ミノトン3D)で1/300に希釈される。その一部が分取されて、RBC Cellで1/20,000まで希釈される。WBC Cellでは溶血剤(ミノライズ3D)を加えてWBCの計数とヘモグロビン(Hgb)の濃度を測定する。また、RBC CellではRBCとPLTが計数される。一方、CRP混合 Cellでは、CRP測定用試薬R2(緩衝液)100  $\mu$ LとCRP測定用試薬R3(凝集剤:抗CRP抗体結合ラテックス液)200  $\mu$ Lが順次混合され、抗原抗体反応によるラテックス凝集によって生じた濁度の変化からCRPの濃度が測定される。

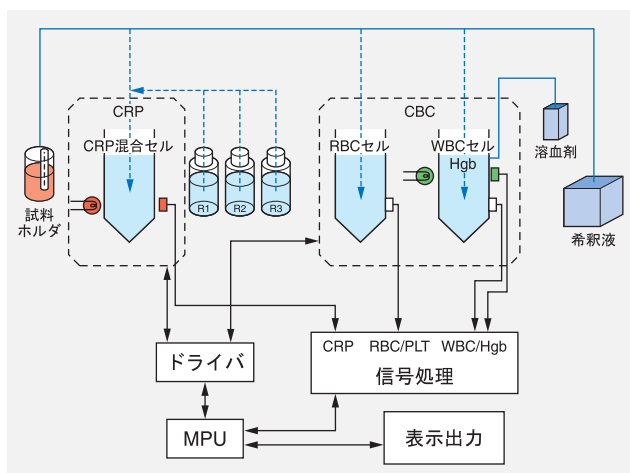


図6 LC-178 CRPの試料と試薬及び信号のフロー(模式図)

表1 LC-178CRPの主な仕様

測定モード	CBCモード(血算項目のみ) CBC+CRPモード(血算項目+CRP項目) QX(CBC)モード(血算項目の精度管理) QX(CRP)モード(CRP項目の精度管理)
測定項目 (演算,表示項目を含む)	WBC(白血球数),LYM#(リンパ球数),MON#(単球数), GRA#(顆粒球数),RBC(赤血球数),Hgb(ヘモグロビン濃度),Hct(ヘマトクリット値),PLT(血小板数), CRP(C反応性蛋白濃度),LYM%(リンパ球比率), MON%(単球比率),GRA%(顆粒球比率), MCV(平均赤血球容積),MCH(平均赤血球ヘモグロビン量),MCHC(平均赤血球ヘモグロビン濃度), RDW(赤血球粒度分布幅),MPV(平均血小板容積), PDW(血小板粒度分布幅),PCT(血小板クリット値), 白血球3分類度分布図,赤血球粒度分布図, 血小板粒度分布図
測定方式	WBC,RBC,Hct,PLT:インピーダンス法 Hgb:シアンメトヘモグロビン法 CRP:ラテックス免疫比濁法
検体量	CBCモード :10 µL CBC+CRPモード :18 µL QX(CBC)モード :10 µL QX(CRP)モード :18 µL
測定時間	CBCモード :約75 s CBC+CRPモード :約270 s QX(CBC)モード :約75 s QX(CBC+CRP)モード :約270 s
電源	AC 100 V 50/60 Hz
消費電力	150 VA以下
寸法	300(W)×400(D)×410(H)mm
質量	本体 約18 kg

## 特長

従来機種を持つ“検体を前処理せずに試料ホルダにセットするだけで、血球計数・白血球3分類・CRP定量測定”の全19項目を、同時にしかも迅速に全自動測定できる”という機能をそのままに、LC-178 CRPには、次のような特徴が追加されている。

### (1) CRP測定範囲の拡大

従来機種では、CRP測定範囲は全血で0.2~10mg/dL、血清・血漿で0.2~7mg/dLであった。LC-178 CRPでは、改良型CRP試薬の採用で高濃度領域の直線性が飛躍的に改善された。その結果、測定範囲は全血で0.2~20mg/dL、血清・血漿で0.2~15mg/dLと従来機種の2倍に拡大された。これにより、従来より広範囲の炎症状態がモニタできるようになると期待される。

### (2) 検体記憶の標準装備

LC-175 CRPより、オプションカードを取り付けることで、最大50検体の測定データ記憶と30検体の精度管理用データ記憶及び精度管理演算が可能となった。LC-178 CRPでは、この機能を標準装備として、今後重要となるデータ管理により柔軟に対応できるようにした。

表1にLC-178 CRPの主な仕様を、図7に測定結果のプリントアウト例を示す。

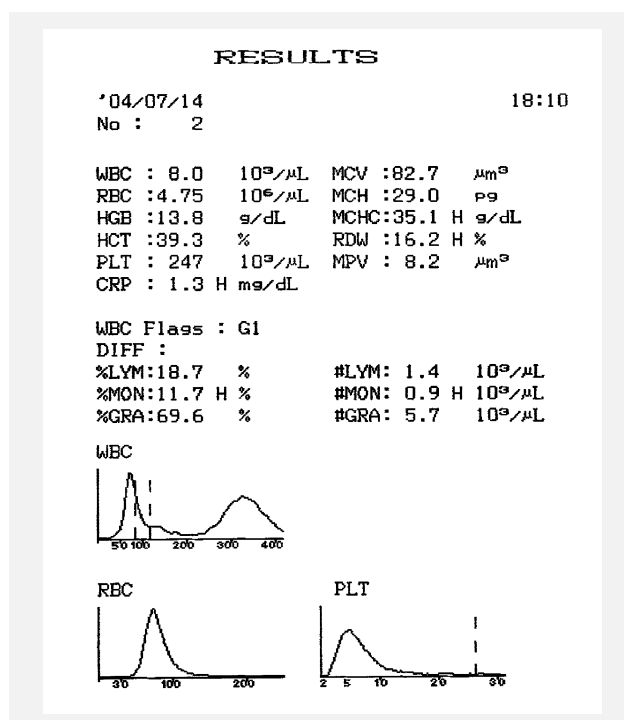


図7 LC-178 CRPのプリントアウト例

## 評価

LC-178 CRPの拡大したCRP測定範囲での相関性を確認するために、全血での従来機種とのCRP濃度値の相関性試験を行った。また、血清・血漿について基準機として汎用生化学自動分析装置とのCRP濃度値の相関性確認試験を行った。

### (1)従来機種(従来型CRP試薬使用)とのCRP濃度値相関性

同一検体を従来機種(LC-175 CRP)とLC-178 CRPで測定し、CRP濃度値の相関を確認した。LC-175 CRPでは従来型CRP試薬を使用しているため、全血検体のCRP測定範囲は0.2~10.0 mg/dLである。従って本試験では、10.0 mg/dL以上の全血検体を測定する際は全血検体を希釈測定し、得られた値に希釈倍率をかけた値を測定値とした。この結果、図8に示すような良好な相関が確認され、LC-178 CRPの拡大したCRP測定範囲で有効な測定値が得られることが確認できた。

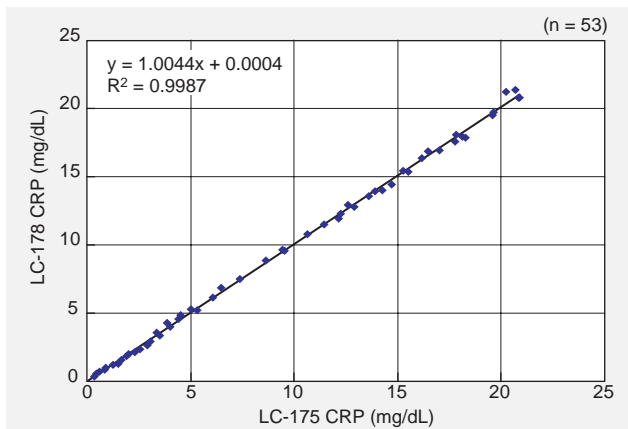


図8 LC-178 CRPとLC-175 CRP(従来機種)とのCRP濃度値の相関(全血)

### (2)基準機とのCRP濃度値相関性

同一の全血、血清及び血漿検体を同じ改良型CRP試薬を使用してLC-178 CRPと日立7170型生化学自動分析装置(基準機)で測定し、CRP濃度値の相関を確認した。この結果、図9、10、11に示すように良好な相関が確認された。

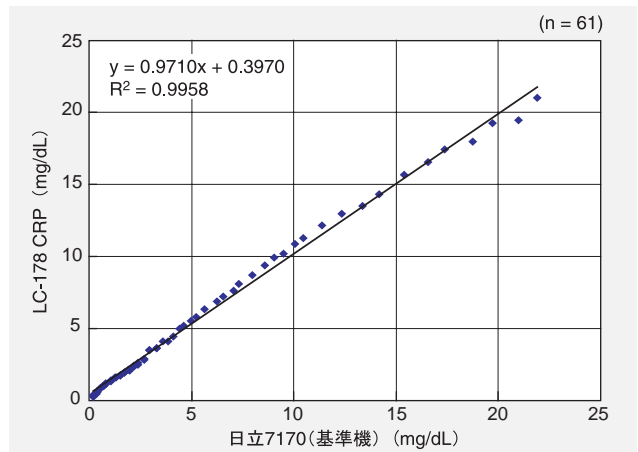


図9 全血でのLC-178 CRPと日立7170(基準機)とのCRP濃度値の相関

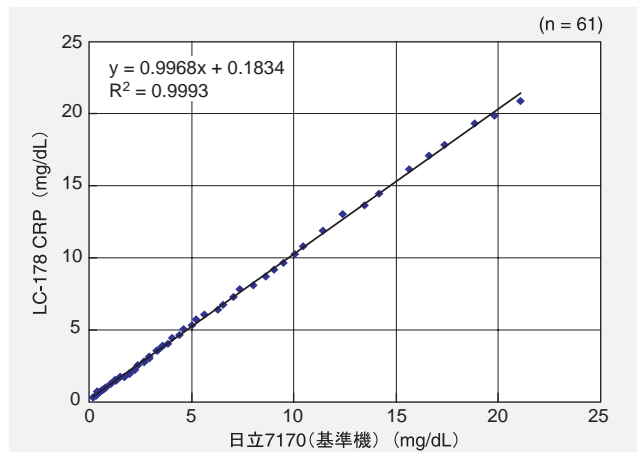


図10 血漿でのLC-178 CRPと日立7170(基準機)とのCRP濃度値の相関

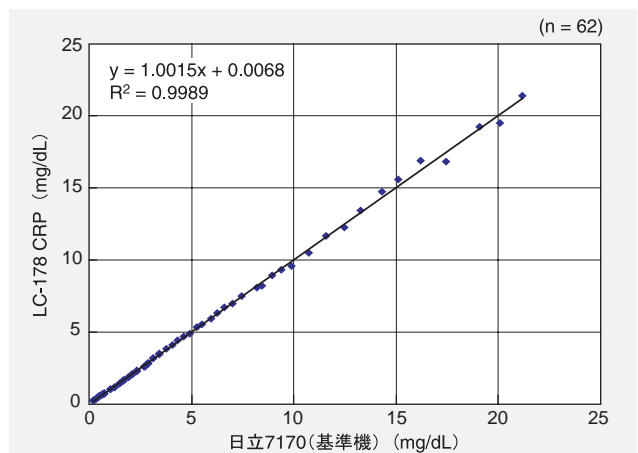


図11 血清でのLC-178 CRPと日立7170(基準機)とのCRP濃度値の相関

## おわりに

LC-178 CRPは、既に医療の現場で幅広くお使いいただいているLC-175 CRPの最大の特長である“検体を前処理せずに試料ホルダにセットするだけで、血球計数・白血球3分類・CRP定量測定的全19項目を、同時にしかも迅速に全自動測定できる”という機能をそのままに、CRPの測定範囲を従来の2倍にまで拡大した。

医療制度の改革が急速に進み、低コストでPOCTに対応した検査システムの実現が強く望まれている今日、HORIBAは“必要な検査を、必要な時に、必要な場所で、精度よく、短時間で、しかも、誰にでも簡単に扱える血液検査システム”としてLCシリーズを更に充実していく所存である。

### 参考文献

- [ 1 ] 山尾 泰生, 奥 成博, Henri Champeix, 自動血球計数CRP測定装置LC-270, Readout No.16, 11-15( 1998 )
- [ 2 ] 山尾 泰生, 白血球分類自動血球計数CRP測定装置LC-170 CRP, Readout No.20, 27-31( 2000 )



長尾 俊治

Shunji Nagao

医用システム開発部  
チームリーダー



大上 創一

Souichi Oue

医用システム開発部



山尾泰生

Yasuo Yamao

科学医用生産部  
マネージャー

# POCTに向けた血球カウンタの開発

宮村 和宏

HORIBAは、インピーダンス法によるパームトップ型の血球カウンタを開発している。ポイントは、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術による、センサ部とサンプリング部のカートリッジ化である。カートリッジをディスポーザブルにすることで、洗浄が不要になり他の試料からの汚染も排除できる。センサ部はシリコンとガラスを貼り合わせた構造で、シリコン側にMEMS技術で、流路、フィルタ、アパーチャ、電極を形成する。パームトップ型装置の性質からセンサ構造は密閉型となるため、電極での電気分解によって気泡が発生することで生じる誤カウントの問題は重要であり、それを流路と電極の位置を変更することで解決し血球カウンタのパームトップ化は大きく前進した。

## はじめに

診察時に即座に検査を行う(POCT: Point of Care Testing)<sup>1</sup> 必要性が高まっている。それに応えるため、医療製品的主力である血球カウンタをパームトップ化すべく開発を行っている。そのためには血球を計数するセンシング部、希釈等を行う前処理部の小型化が必須である。そこでHORIBAの持っているMEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用い、センシング部のチップ化、前処理部のカートリッジ化を行った。現在試作段階を終了し、製品に向けたアプローチを開始している。

\*1: POCTとは、検査の必要性が生じたその時、被検者がいるその場で、あるいは傍らで行う検査であり、速やかに検査結果が得られ、被検者自身に検査が見えるという利点を活かして、迅速かつ適切な診療、介護、健康管理など医療・福祉の質及びQOL (Quality of life) の向上に資するための検査である<sup>1)</sup>。

## 血球カウンタの小型化

現状の血球カウンタのサイズは約W:30 cm, D:40 cm, H:40 cm, 質量は約18 kgである(図1(a))。卓上で用いるには十分に小型で高性能であるが、持ち運ぶには更なる小型化が必要である。特に、前処理を行う系とセンシングを行う系の小型化が必須である。現在の前処理を行う系にはシリンジポンプを複数用いている。このような構成では、小型化は不可能であり、更にセルのような入れ物に希釈液を注入するといったようなオープンな(大気開放された)系が前提となる。このようなオープンな系ではパームトップ化するには不都合である。パームトップ型は装置の性質上逆さまにしたり、落としたりする可能性が非常に高い。このような理由から閉鎖された系(クローズな系)による測定が必要となる。また、パームトップ型は使用する環境として患者の前で即座に簡易的な測定を目指しているため、装置の利便性、測定時間の短縮は必須である。そこで、閉鎖された空間でシリンジポンプを用いることなく前処理とセンシングを行えるように、希釈部分をカートリッジ化し、センサ部分をチップ化した(図1(b))。更に、カートリッジをディスポーザブルにすることで洗浄の不要(測定時間の短縮)、他の試料によるコンタミネーションの排除を可能とした。

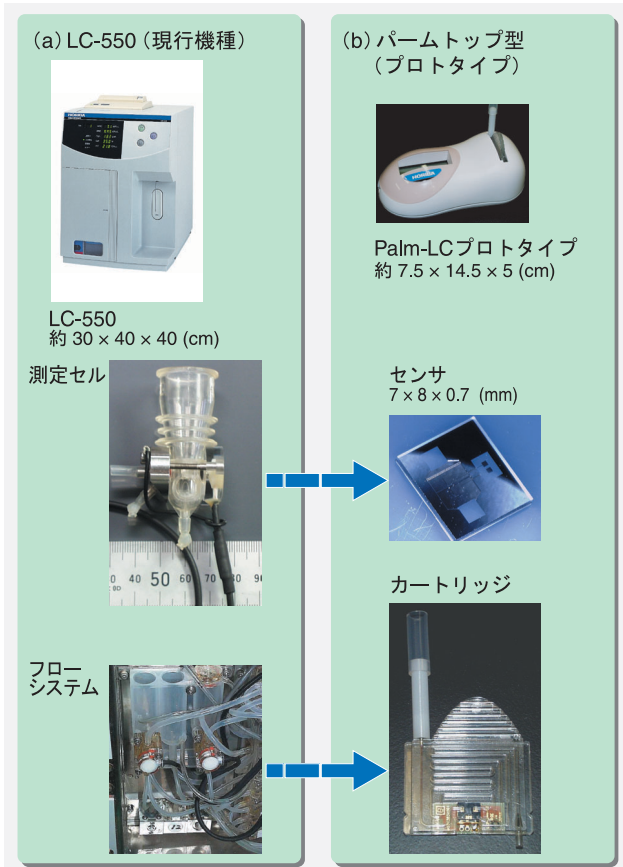


図1 現行機種LC-550とパームトップ型の比較

## MEMS技術を用いたインピーダンス法血球カウンタ

豊橋技術科学大学 石田教授グループとの共同研究

1999年より、豊橋技術科学大学の石田教授グループとHORIBAは血球カウンタに関して共同研究を行い、MEMS技術を用いた世界で初めてのチップ状血球カウンタ(図2)の製作に成功した<sup>[2]</sup>。MEMS技術は、微細なパターンをSi基板に形成することができ、また一度に大量のセンサを製作することが可能である。この血球カウンタで、実際のWBC(白血球)RBC(赤血球)の出力パルスを確認することができた(図3)。次に検出感度と再現性を更に向上させるため、HORIBAで進めている開発内容について述べる。

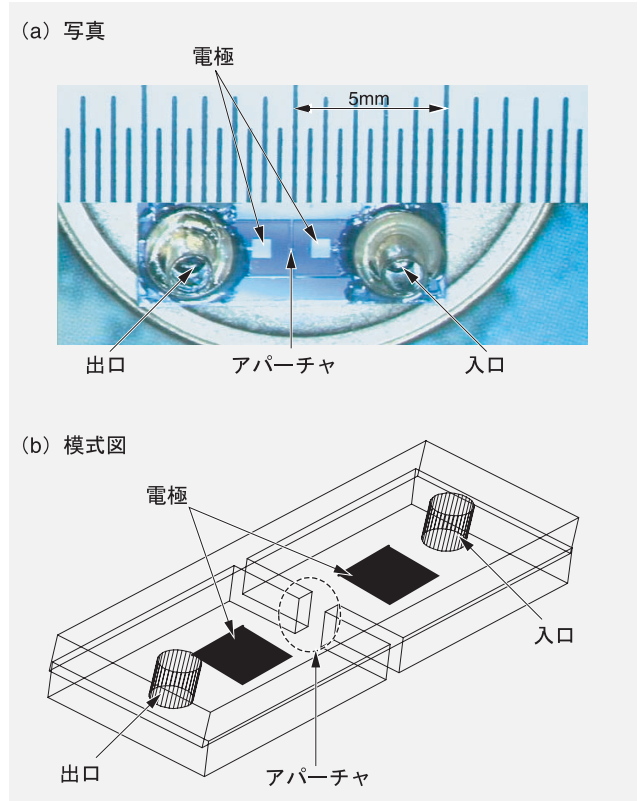


図2 チップ状血球カウンタ

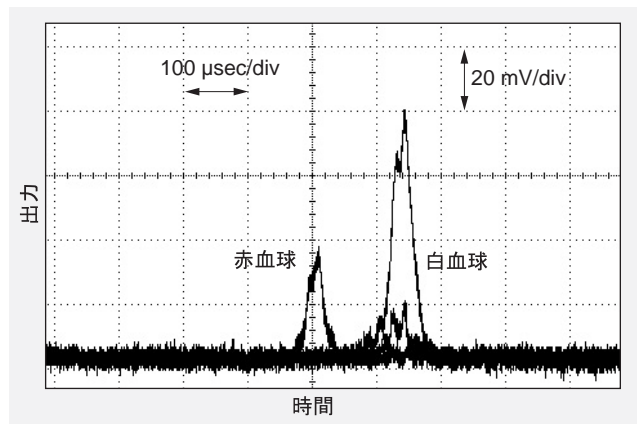


図3 血球の出力パルス



### センサ構造及び送液

この血球カウンタセンサの基本的な構造は、Siとガラスを貼り合せた構造である。Siに微細な溝、アパーチャを形成し、その両サイドに電極のパターニングを行い、最後に液のコンタクト孔を形成したガラスを貼り合わせることによって流路を形成している。試料はガラス面の液コンタクト孔より導入され、Si溝の流路を通り、アパーチャを通過する。この時電極間の抵抗値が変化することでパルス信号が出力される(図4)。そして他端のコンタクト孔より排出される。

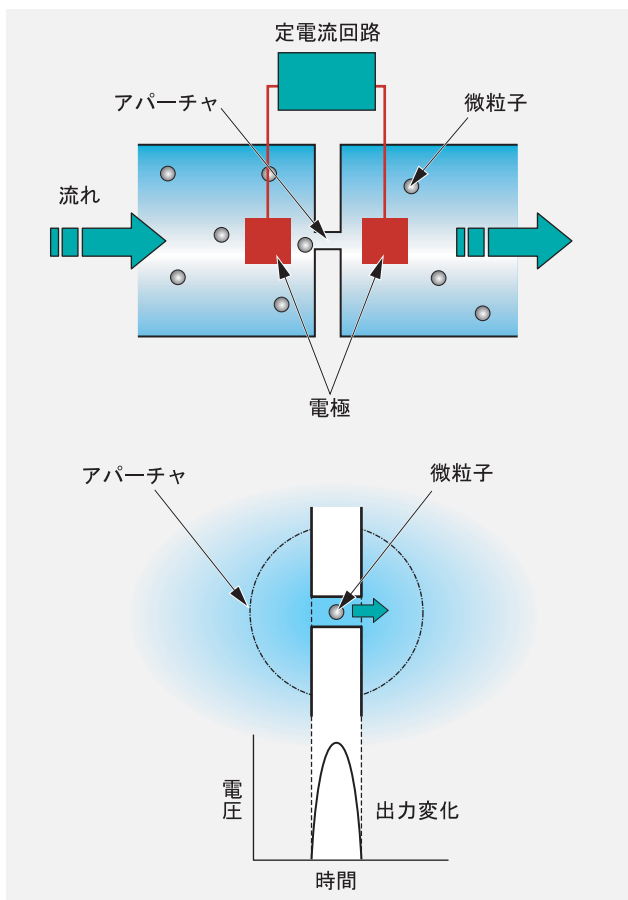


図4 インピーダンス法原理

### センサ改良

センサ構造で問題となるのは次の3点である。

- ・ 電極製作の難しさ
- ・ 埃等によるアパーチャのつまり
- ・ 気泡によるノイズ

これらの問題点とその解決策を表1にまとめ、以下に詳しく説明する。

従来、電極はSiに流路を形成した後その上に形成していた。しかし、流路には約50 μmの段差があるため、フォトリソグラフィを行うことは非常に困難で、加工精度の劣ったものしかできなかった。そこで図5に示すように、電極形成位置をSi側でなくガラス面に変更した。その結果、フラットな面に加工を行うことから加工精度は向上した。しかし、ガラスとSiの接合の際に、より高精度な位置合せを行う必要が生じた。対策として液のコンタクト孔をSi側に変更することで、接合時におけるコンタクト孔との位置合せを不要にし、その上で電極を高精度に位置合せする機構を作ることにより解決した。なお、コンタクト孔の加工方法をサンドブラストからSi異方性エッチングに変更することにより加工精度の向上が図れた。

アパーチャのつまりに対しては、アパーチャを形成する時と同時に、流入側流路に一定間隔に並んだSiの柱列を形成することによってフィルタを作った。このことによって従来埃等によってすぐつまっていたセンサが、場合によっては数時間の流通に耐えうるものとなった。

表1 問題点と解決策

問題点	解決策
電極製作の難しさ	ガラス面への電極形成と高精度位置合わせ機構
アパーチャのつまり	流路形成時にフィルタを同時形成
気泡によるノイズ	流路と電極位置の変更

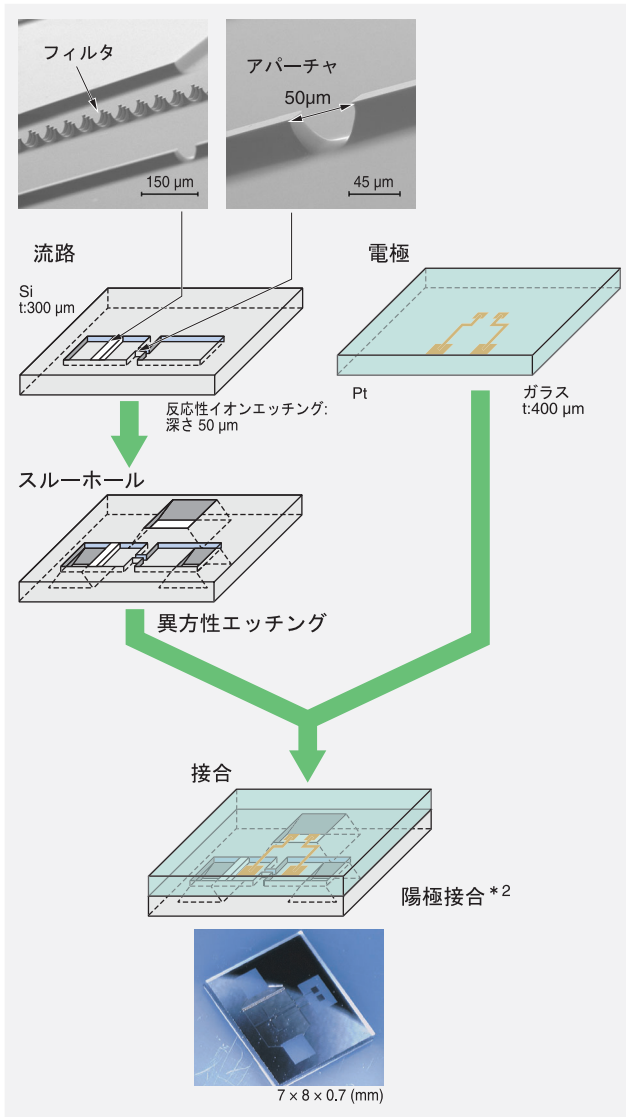


図5 センサ部の概略構成図

\*2: アルカリ金属イオンを含むガラスとSiの間に、アルカリ金属イオンの熱拡散が生じる200~400 程度の温度でSi側を陽極として数十~数kV程度の電圧を印加し、大きな静電引力により界面で化学結合させる方法。

気泡によるノイズは、各種のノイズの中で最も深刻な影響を与えている。気泡がアパーチャを通過すると血球が通過した時と同等のパルスが発生する。大きな気泡が通過した時はアパーチャによって大きな気泡は分断されるため、数千のノイズが発生し、誤カウントされる。気泡の発生場所として2つ考えられる。一つは外部からの流入、もう一つは内部からの発生である。外部からの流入は、センサ流入前に大きな気泡として巻き込まれたものなどがある。これに対しては、気泡を巻き込まない流路形状を考える必要がある。センサ内部から発生する気泡の原因は、電極での電気分解によるものであり、インピーダンス法を用いる限り避け

られない問題である。我々は、この問題に対して従来にはない画期的な方法を考案した。図6(a)に示すように、従来のセンサでは電極はアパーチャに対向して流路の上流と下流に形成されていたが、この構造では上流の電極で発生した気泡が必ずアパーチャを通過してしまう(定置形の血球カウンタはオープン系であるため、電極で発生したほとんどの気泡は浮上して大気に逃げる)。そこで図6(b)のように、アパーチャ部で流路を2つに分け、電極を両方ともアパーチャの下流側に形成した。このことにより電極から発生した気泡はアパーチャを通過することなく流れる。また、電界はアパーチャ付近が最大となるため従来と同じようにアパーチャによってカウントが可能である。この開発によって、血球カウンタのカートリッジ化は大きく前進した。

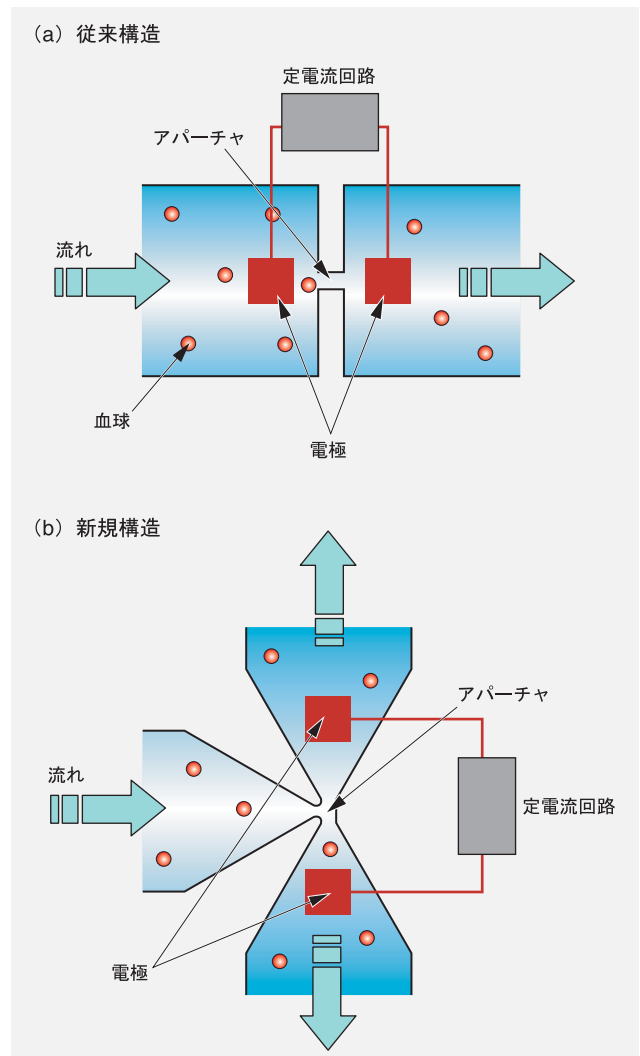


図6 アパーチャと流路と電極の位置関係

## パームトップ血球カウンタ Palm-LC(プロトタイプ)

### 装置構成

パームトップ血球カウンタPalm-LCは、装置本体、カートリッジ、希釈タンクの3つで構成される。カートリッジには、サンプリングを行うガラスキャピラリ、血球を計数するセンサ、測定終了を検知する液面センサが形成されている。装置本体の主要部品は、図7に示すようにカートリッジソケット、バルブ、ポンプ、電子回路、LCDである。なお、現在、新規開発したセンサに合せカートリッジと装置本体の改良を行っている。

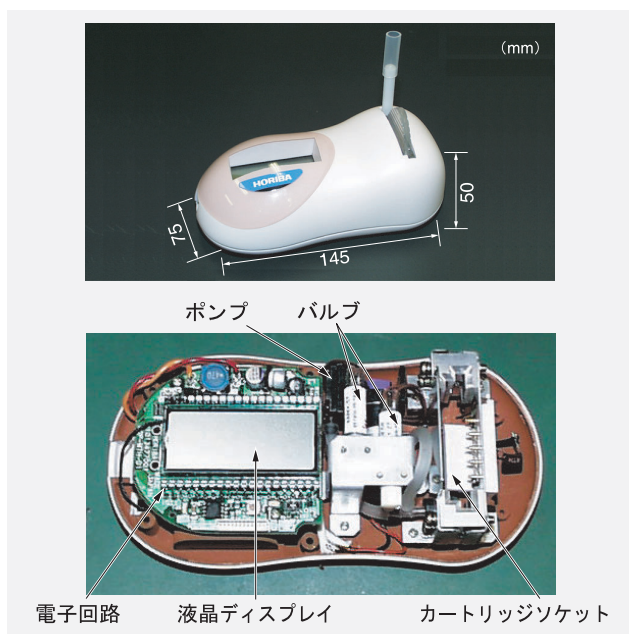


図7 装置本体の内部構造

### 測定シーケンス

図8に示すように指先をランセット等で刺挿して血液を出し、カートリッジ内部のサンプリング用ガラスキャピラリにて採血を行う(ガラスキャピラリによって1 $\mu$ lの血液がサンプリングされる)。その後、希釈タンクを採血部先端に挿入する。次に、タンクが挿入された状態のカートリッジを本体に挿入する。挿入すると同時に電源が入る。1回分の希釈液を封入した希釈タンクに、キャピラリでサンプリングされた血液が加圧により流入し、混合される(約20秒)。混合後、減圧にて試料をセンサに導入し測定を開始する。廃液はカートリッジ内に順次溜められ、液面センサに到達する。液面センサに到達すると測定を終了する(測定時間は約1分)。計算後、測定結果を表示する。

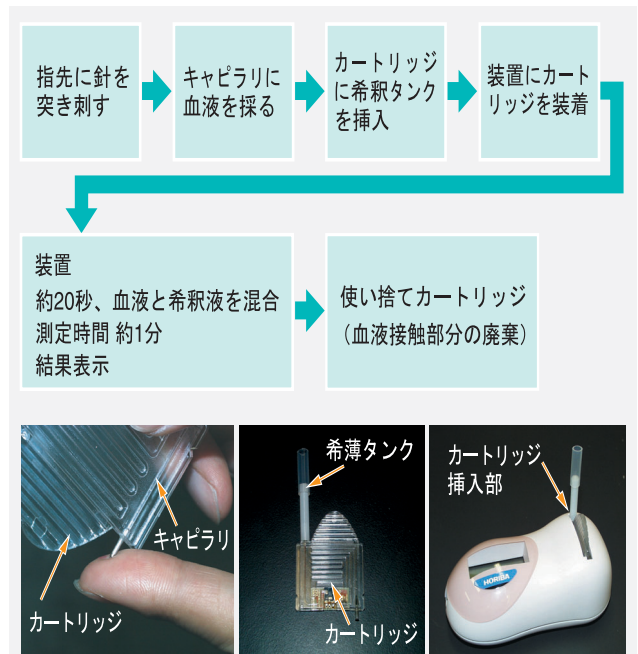


図8 パームトップ血球カウンタPalm-LCの構成と測定シーケンス

### おわりに

HORIBAは、WBCを測定項目にしたパームトップ型血球カウンタの製品化に向け開発を進めている。また、WBC以外に複数成分を測定できる装置の開発も行う予定である。POCTに向けて、MEMS技術への期待度は大きくなっている。今後、血球以外にも $\mu$ -TAS( $\mu$ -Total Analysis System)の開発が続くことは間違いない。その中で、HORIBAは常に世界の先陣を切っていきたいと願っている。

## 参考文献

## [ 1 ] POC推進委員会

<http://www1.sphere.ne.jp/jidouka/Q&A.htm>

## [ 2 ] D. Satake, H. Ebi, N. Oku, K. Matsuda, H. Takao, M.

Ashiki and M. Ishida, A sensor for blood cell counter using MEMS technology, Sensors and Actuators B 83, 77 - 81 ( 2002 )



宮村 和宏

Kazuhiro Miyamura

開発センター

MEMS プロジェクト

( マイクロ化学プロセス技術研究組合に出向中 )

## 白血球分類における, Pentra 120 SPS 塗抹標本作製と用手法の 標本作製との比較



Dr. José María Jou

Hospital Clinic, hematology laboratory, Barcelona

用手法製した塗抹標本と ,Pentra 120 SPSにより作製した塗抹標本について 無作為に選んだ131の健常者検体と患者検体を用いて ,比較評価を行った。調査の結果はリンパ球 ,単球 ,好中球 ,好酸球 ,好塩基球 ,芽球において ,非常に良好な相関性を示した。Pentra 120 SPSは ,全自動分析のため操作が簡単である上 ,塗抹標本の品質が良く ,処理速度も速く安定しており信頼性が高い。

### はじめに

SPSで作製した塗抹標本の白血球分類を 200個算定(参照法)して ,用手法で作製したスライド標本の場合と比較し ,評価を行った。

調査の目的は次の2点である。

SPSスライド(試験装置)と用手法作製スライド(参照法)の白血球分類の分類精度を ,健常者検体と形態学的に異常が認められる検体の両方で ,臨臨床的な範囲において調べる。

検査室向けとしてのSPSの機能性を試験する。

### 材料と方法

血液分析装置評価のためのNCCLS<sup>\*1</sup>勧告に準拠した。

\*1: 医療技術の世界的合意及びその標準化( Global Consensus Standardization for Health Technologies )  
米国臨床検査標準化委員会( National Committee for Clinical Laboratory Standards )の頭文字。NCCLSは今や世界的機関であり ,臨床研究機関の関係者にとどまらず ,広く合意文書を発表している。そのため ,本機関は “ NCCLS ”( <http://www.nccls.org/> )という頭文字で表わされる。

### 検体

無作為に選んだ ,131の健常者検体と患者検体を分析した。

これらの検体を $K_3EDTA$ <sup>\*2</sup>で安定化し ,室温に保ち6時間以内に分析した。すべての検体に対して ,ウェッジ法<sup>\*3</sup>で末梢血液の塗抹標本を準備した。

\*2: 抗凝固剤エチレンジアミン4酢酸3カリウム。

\*3: 引きガラスの先端に血液の小滴をつけ ,それをスライドガラス上に密着 ,均一にならした後 ,引きガラスをスライドガラスに対して約30°の角度を保ちながら ,塗抹を行う。

## 分析装置

Pentra 120 SPS( 図1 )は ,1時間に120試料の血算( CBC )及び白血球5分類( DIFFモード )を行うことができる。また同じ速度でスライドを作ることができる。すべての検体をDIFF+スライドモードで処理した。



図1 Pentra 120 SPS

染色手順はMGG( May Grunwald Giemsa ,メイグリユンワルド・ギムザ )を用いた。染色はすべてHORIBA ABXにより行われた。

## 手順

用手法で作製( 参照法 )した塗抹標本と ,SPSで作製した塗抹標本とを比較評価した。

### 131検体を調査

各検体につき 塗抹標本を4枚作製

- ・ SPSで作製した塗抹標本  
( 第1の評価者の読み取り用 )
- ・ SPSで作製した塗抹標本  
( 第2の評価者の読み取り用 )
- ・ 用手法で作製した塗抹標本  
( 第1の評価者の読み取り用 )
- ・ 用手法で作製した塗抹標本  
( 第2の評価者の読み取り用 )

計: 524枚の塗抹標本

ある患者集団から採取した100枚にのぼる検体を分析した。うち53%には異常がみられ( 赤血球 ,白血球 ,血小板の病状 ) ,47%は正常であった。

## 病理学的調査

### 赤血球:

貧血症 ,赤血球増加症 ,封入体( ジョリー小体 ,好塩基性斑点 ) ,標的赤血球 ,赤血球大小不同症 ,変形赤血球症 ,小赤血球症 ,大赤血球症 ,色素減少症 ,多染性 ,赤芽球

### 白血球:

急性骨髄性白血病( AML ) ,急性リンパ性白血病( ALL ) ,慢性リンパ性白血病( CLL ) ,ワルデンストレーム ,骨髄腫 ,単球増加症 ,好酸球増加症 ,リンパ球増加( 反応性 )

### 血小板:

血小板増加症 ,血小板凝集 ,大血小板症 ,微小巨核球症

調査において ,考慮した形態学的または量的な異常とその検体集団中の割合を 表1に示す。

表1 形態学的または量的な異常

試料異常	診断基準	割合
赤血球異常	・形状 ,色 ,大きさ ,膜の異常 ・封入体	27%
血小板異常	・血小板凝集 ・赤血球不同症 ,大血小板症 ・微小巨核球症	13%
幼若顆粒球の存在	・後骨髄球が1%を越える	29%
その他の細胞の存在	・異型リンパ球・赤芽球 ・芽球	18%

NCCLS文書H20-Aに従い ,2名の測定者がそれぞれ単独で200個の白血球を数えた。各試料に対して ,測定者それぞれが ,SPSで作製した塗抹標本と用手法で作製した塗抹標本を読み取った。5分類のパラメータ結果( リンパ球 ,単球 ,好中球 ,好酸球 ,好塩基球 )及びその他の細胞を用いて比較を行った。

用手法スライド標本における白血球分類の正確さは ,顕微鏡観察に始まりPentra 120 SPS試験法に至るまでの結果を比較することにより判断した。

またキャリーオーバー、すなわちスライド間のクロス汚染を調査する。鶏の血液のスライド標本を、ヒトの血液スライド標本2枚ごとに1枚製作するという方法を採用（鶏の赤血球(RBC)は有核なので、ヒトの血液のスライドを汚染しても検出が容易である）。

染色法を表2に示す。

表2 染色法

自動染色法	用手法染色法 <sup>4</sup>
メイグリュンワルド染色原液 (HORIBA ABX) 4分 実験用緩衝液 (pH7) 2分30秒 ギムザ染色液 (HORIBA ABX) 8分 洗浄液 1分	メイグリュンワルド染色原液 1分 ギムザ染色液 20% (緩衝液pH7) 10分 洗浄

\*4: 用手法染色法は日常業務なので、簡潔な方法となっている。

## 結果

### SPSのトラブルシューティング

2週間で 技術的な問題が1度だけ起こった。スライド1枚が染色ウェル内で割れたが、オートコントロールにすると解決した。

### 相関グラフ

調査結果を、用手法とSPSの相関グラフ(図2~7)に示す。

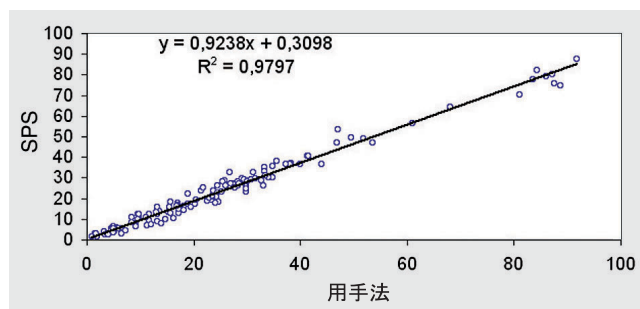


図2 リンパ球の相関

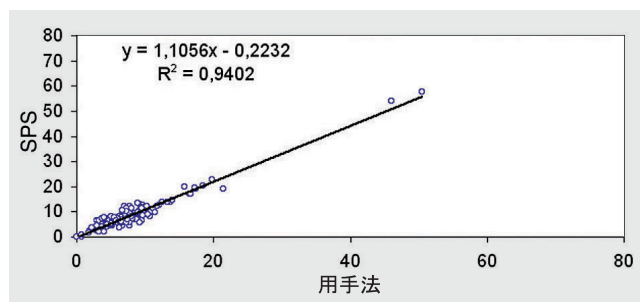


図3 単球の相関

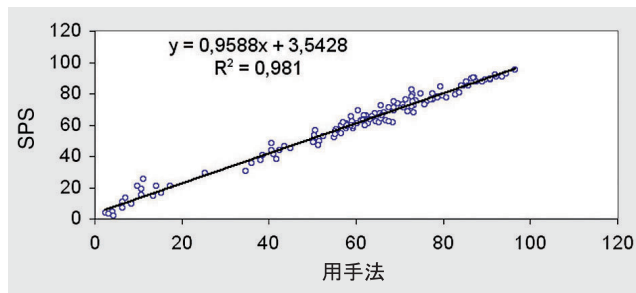


図4 好中球の相関

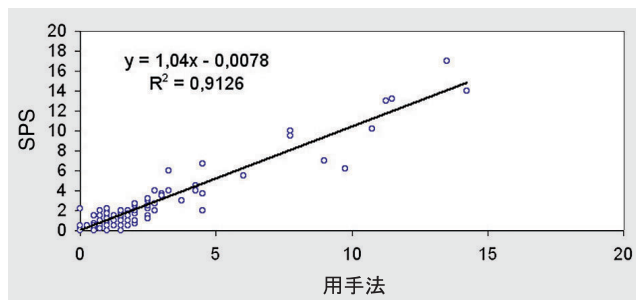


図5 好酸球の相関

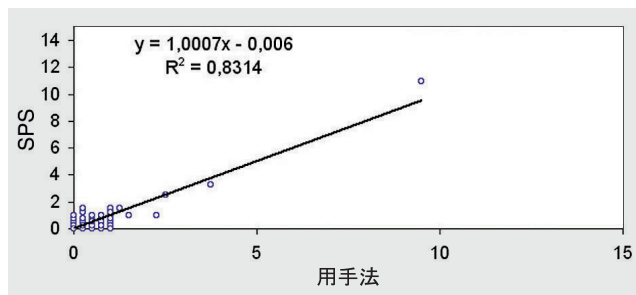


図6 好塩基球の相関

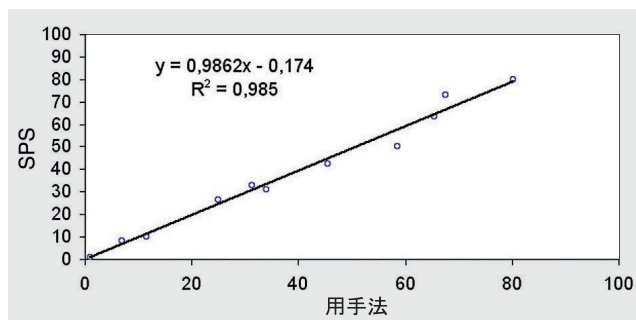


図7 芽球の相関

白血球分類の比較結果は  $R^2$ 係数<sup>5</sup>で表される(表3)。

表3 用手法とSPSの相関

	リンパ球	単球	好中球	好酸球	好塩基球	芽球
$R^2$	0.98	0.94	0.98	0.91	0.83	0.98

n = 131

$$*5: R^2 = 1 - \frac{(Y_i - \hat{Y}_i)^2}{(Y_i - \bar{Y})^2}$$

$\hat{Y}_i$ : 回帰曲線による計算値

$\bar{Y}$ :  $Y_i$ の平均値

## おわりに

### 実用性

- ・ Pentra 120 SPS は ,全自動のため簡単に使用できる。
- ・ 染色試薬の残量不足に対してアラームを与えることができる。
- ・ メンテナンスがすべて自動で行われる。

### キャリーオーバー

キャリーオーバーの結果は 鶏の有核赤血球( NRBC )がヒトの血液検体のどれをも汚染していない場合に 許容できると考えられる。

- ・ NRBCは ,ヒトの検体には全く見られなかった。

### 正確さ

SPSスライドと用手法作製スライドとの相関関係の調査は ,非常に高い係数を示している。細胞分析の割合は , CLL以外は優れた結果を示した。( SPS塗抹標本にみられる好中球の増加は ,白血球が一部壊れたためである。)

### スライドの品質

SPSスライドと用手法作製スライドについて ,全体を比較した写真( 図8 )と顕微鏡による細胞観察の画像を比較したもの( 図9 )から ,以下のことが言える。

- ・ SPS塗抹標本は ,用手法塗抹標本より観察範囲が広い。
- ・ 塗抹標本の縁に細胞凝集は見られなかった。
- ・ MGGの染色品質は大変良い。



図8 SPSスライドと用手法作製スライドの比較写真

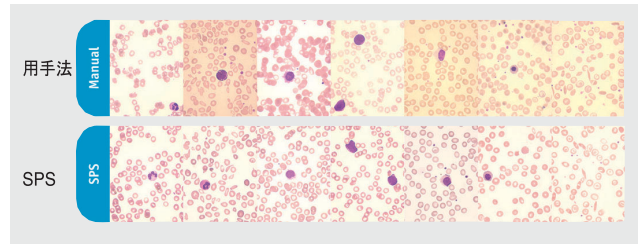


図9 顕微鏡による細胞観察画像でのSPSと用手法の比較

SPSは ,臨床検査室用として ,用手法よりも質的にも量的にも良い結果を提供できる。更に処理速度は速く ,安定しており信頼性が高い。



## ソフトウェア開発 ユーザ本位の設計プロセス

Gwenaelle Collet, Lyonel Junillon, Patrick Iliou

医療用分析装置のユーザが、ますます複雑さを増す環境で能率良く仕事するためには、優れたマンマシンインターフェイスが不可欠である。また、エルゴノミクス(人間工学)に基づく、使い勝手のよいソフトウェアパッケージを作り出すためには、使う人のニーズや作業方法に配慮しなくてはならない。HORIBA ABXは新世代の製品にこれらの原則をうまく取り入れており、HORIBA ABX製品を選択する理由として、その設計とエルゴノミクスをあげられるお客様は多い。

### 機能性と美しさの絶妙なバランス

ソフトウェアインターフェイスの設計は、今や私たちのビジネスにおいて大きな役割を果たすものとなっており、HORIBA ABX製品の成功に直接関与するものとなっている。

設計プロセスでは、マーケティング(仕様の立案、プロジェクトモニタリング)、開発(ソフトウェア開発及びエルゴノミクス)、コミュニケーション部門(ソフトウェア設計)など異なる部署間の緊密な協力関係が必要となる。これらの部署から構成されるチームが作業を開始する前に、メンバーは最終製品やエンドユーザ、そしてプロジェクトの目標について、明確な理解を共有しなくてはならない。その後、製品のエルゴノミクス(人間工学)や機能といった側面と、審美的でグラフィックな面とのバランスを適切にとることに注力することとなる。

こうした多様な要求事項に対する首尾一貫した厳密な取り組みが重要である。私たちのソフトウェアは、HORIBA ABXの企業イメージや価値を伝える上で大きな役割を担っている。更に、お客様が私たちの製品をHORIBA ABXブランドであると認知したり、使いやすく親しみやすい作業空間を通じて機能性を追求するコミュニケーションの媒体でもある。

### 作業環境の分析

エルゴノミクスに基づいたユーザインターフェイスの役割は、道具と操作する人との間のコミュニケーションを確立することである。ユーザがシステムを受け入れるのは、そのシステムが簡便で使いやすく習熟が簡単であるからであり、主にエルゴノミクスによって決定付けられるものである。予想されるユーザのスキルや作業手順などを考慮しなければ、優れたインターフェイスやエルゴノミクスに基づいたソフトウェアを作成することは不可能である。

分析装置のソフトウェアをエルゴノミクスに基づいて設計することは、医療に関する分析がますます複雑さを増すことによって起こる問題を克服するために、今や大きな役割を担っているからである。私たちのソフトウェアではエルゴノミクスが最適化されてきたが、それは、検査室技師が抱える次のような必要性を考慮に入れてのことである。

測定結果を迅速に入手する必要がある。

ユーザは装置の機能を簡便に、また迅速に扱えなくてはならない。

測定できなかった場合には、必要に応じて迅速な通知を受け、その理由を知ることができなければならない(試薬の不足、検体の不足など)。

ユーザはメイン画面にて測定の進捗をモニタできる必要がある。

最低限のソフトウェア操作で測定を完了できなくてはならない。またヘルプメニューはいつでもすぐに利用可能でなくてはならない。

機能や測定データへのアクセスは簡単で確実なものでなくてはならない。ソフトウェアは実行している動作についてユーザが十分な認知を得られるように、確実に導くものでなくてはならない。

医療現場での測定はスペースが限られた作業場所で行われることが多い。ユーザは立ったままで作業を行い、更に衛生状態や安全規制に留意しなくてはならない。

ソフトウェアの簡便性や利便性は、こうした環境に対して最適化される必要がある。

ソフトウェアの使い勝手の良さや見た目の美しさは、ストレスのない作業環境の構築に貢献するものでなくてはならない。

## エルゴノミクスと設計

エルゴノミクスに基づいたソフトウェアが持つ5つの重要な特性について、HORIBA ABXが新しく設計・製造した臨床化学分析装置Pentra 400のインターフェイスを例に、図示して紹介する。

### 情報とソフトウェア機能への迅速なアクセス

測定の進捗をメイン画面にてモニタ可能(図1)。検体、試薬、測定データはリアルタイムで更新。カラーグラフィック表示で、ユーザは装置のカバーを開けずにすばやく判断できる。

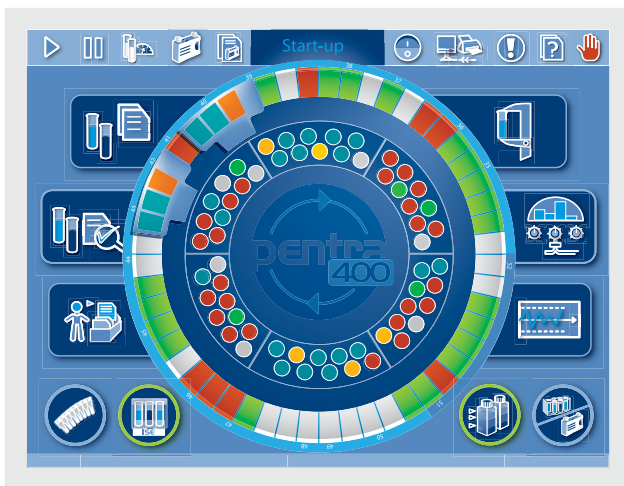


図1 Pentra 400 メイン画面

タッチスクリーンで、ソフトウェアの各機能へワンタッチでアクセス。簡単に選択できるようにアイコンの大きさを最適化している(図2)。

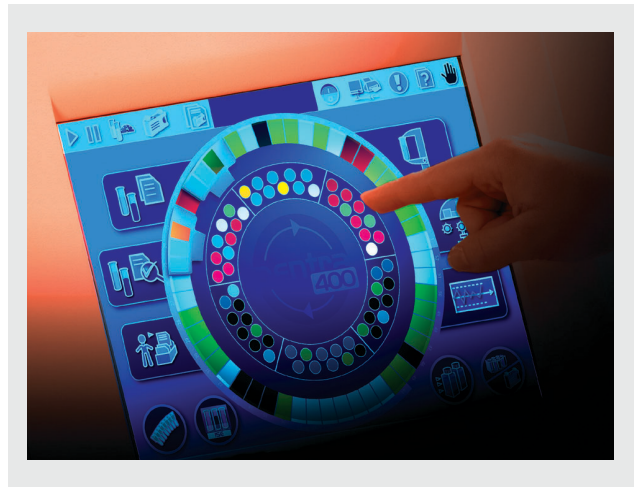


図2 タッチスクリーン

試薬量、警告アラーム、校正データなどの報告及びフローコントロール画面により、すばやく判断できる。臨床化学のルーチン測定に関連する機能性、特にコマンド入力や試薬管理などへすばやくアクセスできる。

### 簡単なデータアクセス

ソフトウェア内からはWindows®のOS機能へアクセスしない。また、アプリケーションは複数のウィンドウを表示させないよう、またタッチスクリーン・インターフェイスを用いては移動できないウィンドウは表示させないように、慎重に制限されている。操作完了までのすべての作業は、新たなウィンドウを開くことなく、ソフトウェア内から実行できるようになっている。

他言語への翻訳の必要量を制限し、また省スペースのため、すべての機能に対するアクセスは、可能な限りテキストではなくアイコンによって行う。アイコンはHORIBA ABXで特別に考案され、関連機能を明確に示すような十分に解りやすいものとなっている。

更にメニューのたどり方をわかりやすくするため、標準的な配置に基づいてデータとボタンを表示し、各機能へアクセスしやすくした。

頻繁に使用する機能“戻る”、“確定”、“追加”などのボタンは常に画面の最下段に表示している(図3)。

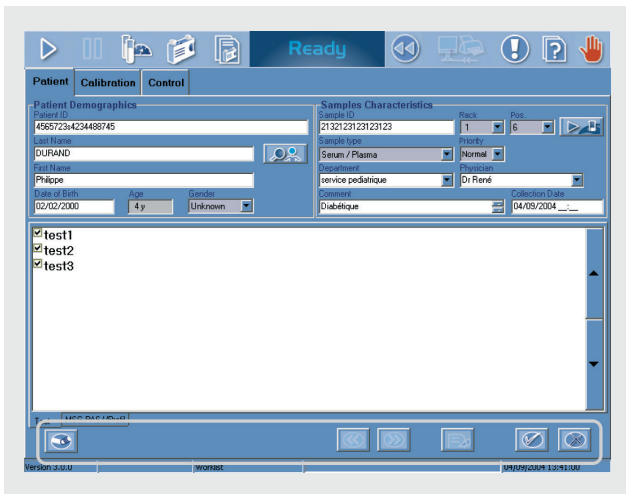


図3 患者の要求事項を入力する画面

タブは画面上部にて選択できる(図4)。

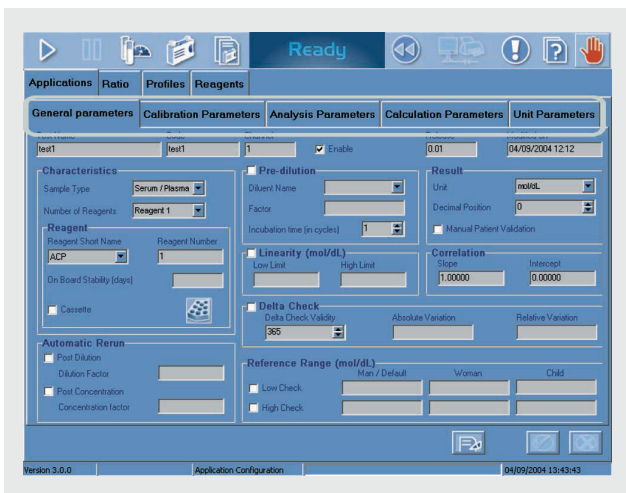


図4 システム構成画面

データ選別インターフェイスの位置はリストデータ表の下にある(図5)。

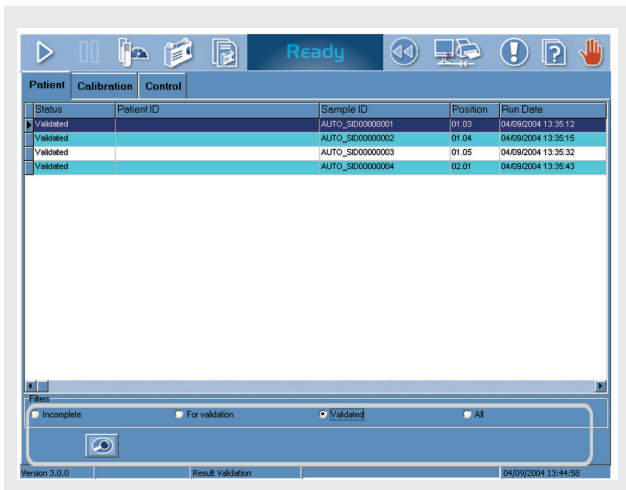


図5 患者及び測定器のバリデーション画面

手順変更などの機能を正しく実行するには、グラフィック表示されたメッセージに従って操作を行えばよい(図6)。

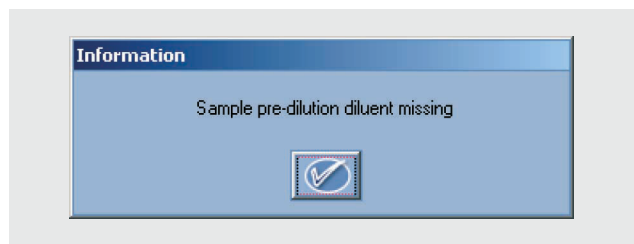


図6 ユーザガイド“メッセージボックス”

リストモード(図5)と詳細モード(図7)は、すべてのソフトウェアウィンドウからのモニタリング及び迅速なデータ入力が可能である。

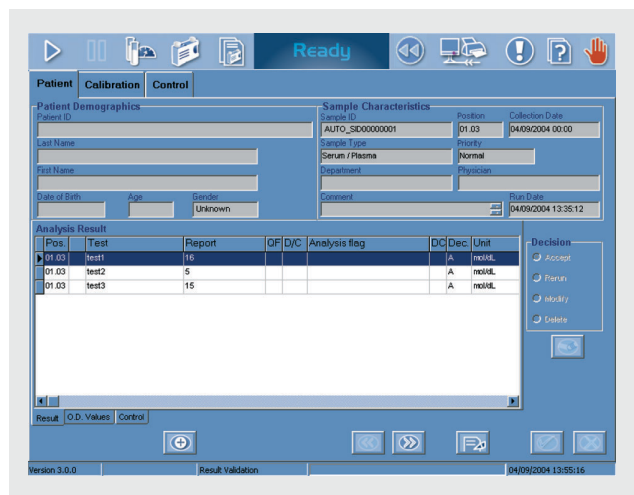


図7 バリデーション画面:患者測定結果

アプリケーション全般を通じ、一定したカラーコードシステムを使用している(測定器、試薬、検体管理を色分け)(図8)。

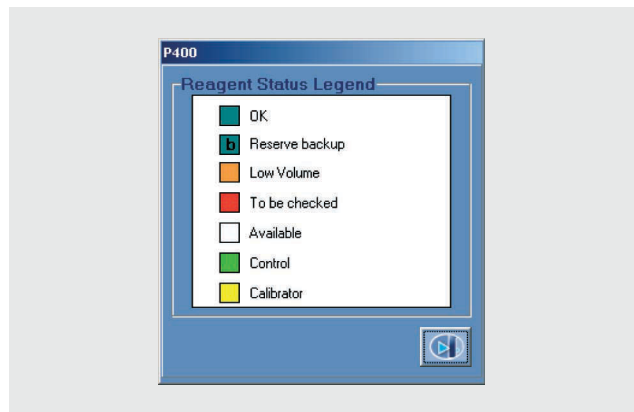


図8 試薬の状態:カラーコードを使用した例

## 安心なデータアクセス

測定データは注意深く管理・確認しなくてはならない。検査室技師は結果を出すために広範な仕事を行っている。そのため、装置はデータの精度を落とさずに、迅速かつ効率的に使えるものでなければならない。

データを保護するため、本装置には“ビュー”と“編集”という2つのモードが設けられている。初期設定では、すべてのアプリケーションウィンドウはビューモードで開き、そのままでは表示データを変更できない。これは、各データフィールドの背景がグレーで表示されていることで識別可能である。ユーザがデータを変更したい場合には、ツールバーに設けてあるボタンをクリックして編集モードにアクセスする必要がある。一旦編集モードにアクセスすれば、データフィールドの背景色がグレーから白に変わり、データが変更可能であることが判る表示となる。図3は編集モードのウィンドウである。一部は読み取り専用のデータフィールドであるが、その他は編集モードのデータフィールドとなっている。

ユーザがデータをスムーズに入力できるよう、各データフィールドにはデータ入力時及び入力データを別フィールドへ移動したい場合に、データを確認するためのキャラクタアナライザが設けてある。キャラクタアナライザはタイプミス(例えば生年月日フィールドに数字以外の文字が入力されていたり、印字不可能な記号が入力されているなど)を防ぎ、各フィールド間に境界を設けている。

本装置では、やり直しのきかない動作に対し、その実行前に確認を要求するダイアログボックスを自動的に表示する。

すべてのデータ(特に患者ID番号や検体ID番号など)は、そのままの形で、どの言語でも表示される。可能な限り、見出しはデータフィールドから離して表示される。これは、外国語バージョンで特別な表示が必要な場合に、追加の画面スペースを用意できるというメリットがある。

## 簡便性

HORIBA ABX ソフトウェアに早く習熟することで、本装置の省時間メリットをユーザは最大限に活用することができる。ソフトウェアはエルゴノミクスを駆使して、オペレータが早く習熟できる設計とした。

常時表示されるアクションボタンを配したコントロールバーを用いて、ユーザはメイン画面に戻らず迅速に、頻繁に用いる機能にアクセスすることができる。レポートリストタスクにて、現在進行中の操作や既に完了した操作、過去に遭遇した問題についての情報をいつでも閲覧することができる。

本装置のユーザは、状況に応じたヘルプモジュールを介してユーザガイドを閲覧することができる。このヘルプモジュールはアプリケーション画面すべてからアクセス可能である。また、ヘルプモジュールはすべての言語で閲覧でき、HTMLフォーマットで、ナビゲーションやデータ検索が可能なハイパーテキストリンク対応となっている。

## 使い勝手の良さ / 美しいデザイン

マンマシンインターフェイスの外観及びそれが生み出す印象は、ユーザがソフトウェアの品質を判断する際に主要な役割を果たす。

インターフェイスのデザインは、ユーザに飲ばれるものでなくてはならない。これは、便利さが同程度であればユーザはほぼ間違いなく、入念に考え抜かれたデザインを採用している方が簡単だと思うだろうということである。私たちはこの考え方を尊重したい。美観的な品質は、今日のソフトウェアパッケージで欠くことのできない部分といえるところまでその重要性を高めている。Apple®社( Macintosh™ )が開発したオペレーティングシステムはこのトレンドを示す最も良い例である。

アイコンがどのように読み取られるかについてのルールに、特に注意が向けられた背景には、上記に述べた事情がある。各個別のデザインは、ユーザがアイコンの意味を直感的に理解できるよう入念に考案されている。

ソフトウェア内ではシンボルやデザインが標準化され、装置を使用してのトレーニングを容易なものとしている。異なる状況に対しても、同じ機能には同じシン

ボルを一貫して使用することで、さまざまなユーザが自分でトレーニングを行えるようになっている。

原則として、アイコンや画面背景の色は前向きでゆったりできるような雰囲気を作り出すようなものを選んでいる。ピクトグラムを丸く囲むことも、心地よい環境という一貫した印象を強化するものである。

最新の Microsoft® のOS、Windows XP Embeddedは、私たちのグラフィクスポリシーを実行する上で主要な役割を果たしており、ソフトウェアパッケージを特徴付けるのにも大きく貢献している。

## 評価と改良

現場でユーザを観察することは、ソフトウェアパッケージのエルゴノミクスについて重要なひらめきを得る源といえる。フランスMontpellierにあるLapeyronie病院の生化学検査部で、測定法や試薬だけではなく分析装置の制御を行うソフトウェアなど、Pentra 400のすべての側面が評価された。この施設は、Pentra 400の試験機関としてだけではなく、私たちのインターフェイスを開発する上で主要な役割を果たした。

Cristol教授:

「我々メンバーはPentra 400に感銘を受けた。

Pentra 400は非常にコンパクトな分析装置で、双方向ソフトウェアや画面により大変快適に使用できた。分析の進捗をリアルタイムで見ることができ、検体や試薬の状況を直接画面で確認することができる。装置カバーを持ち上げなくとも進捗を確認することができることは、すばらしい機能である。」

Dupuy博士:

「Pentra 400は据え付けがとても簡単で、朝に据え付けを始めて午後になるまでには使える状態となっていた。Pentra 400のソフトウェアは操作が非常に簡単である。分析装置を使用したメンバー5名全員が最小限の時間で操作を覚えることができた。」

Lapeyronie病院との協力関係により、私たちはソフトウェアのエルゴノミクスを最適化し、ユーザのニーズを満たすことができた。

## 機能の実現

HORIBA ABX ソフトウェアのエルゴノミクスを改良研究することにより、私たちのほとんどの製品で共通のインターフェイスの使用が可能になった。Pentra 400ソフトウェアにおけるグラフィックの手法は、今やPentra 80やPentra XL 80のソフトウェア、またPentra DX 120のバリデーションステーションで用いられている。同一のエルゴノミクス価値や共通のマンマシンインターフェイスを私たちの製品群すべてにわたって一貫して展開することで、HORIBA ABXのブランド力や、イノベーションへの信望をより高めることができる。

私たちの自動分析装置すべてに使用される機能は、類似のアイコンで、装置により異なる色で表示されている(図9)。

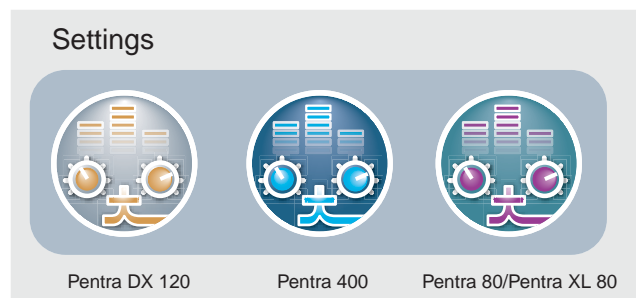


図9 自動分析装置に用いられている設定アイコン

血球計数装置、特にPentra XL 80では装置の操作に対するリアルタイムモニタリング機能が導入された。“状況表示”コマンドを用いると円グラフ上に測定結果の詳細が表示される。また、装置内のラックについて処理中または処理後の状態がリアルタイムに示される。

異なる種類の分析装置は、多くのソフトウェアの相違点によって区別される。血球計数装置では画面右下にツールバーを設けているが、Pentra 400には設けられていない。各ソフトウェアインターフェイスには個別の色が割り当てられており、標準とするグラフィックの手法に沿って展開している。これらには次のようなものがある。

丸いアイコン、グラデーションパレットを使用する。同じ機能には同じシンボルを使用する。画面レイアウトは、共通の色パレットと同様に標準とする。

再検や鏡検といった特定の血液学上必要な検査をより効率的に進めるため、特別なインターフェイスが作成された。Pentra XL80 の“ラック表示”機能では、処理中または処理後の状態が異なるさまざまなラックをグラフィックで表示する(図10)。ユーザは画面上に表示された採血管のキャップをクリックするだけで、その採血管に入っている検体の情報にアクセスすることができる。採血管キャップの色はその検体上で行われた測定モードで決定される。

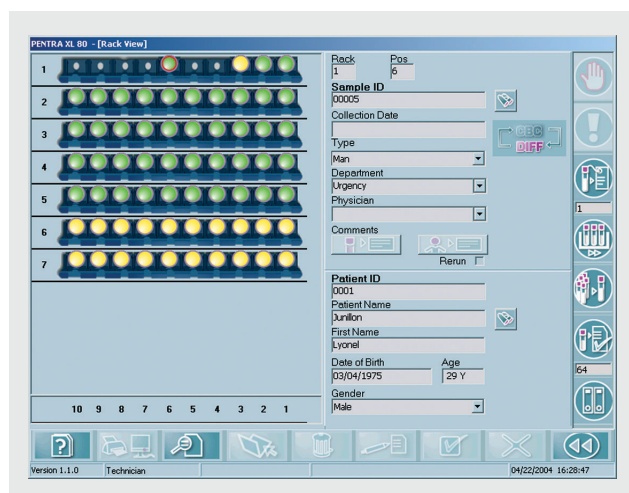


図10 状況表示:ラック

し、その活動範囲を確固たるものとし、更に簡便性と効率性というお客様のニーズを考慮に入れた次なるイノベーションをすべてのユーザに提供する、という企業の使命を推進するものである。

\*1: 生物学の国際展示会/会議(フランス Paris)。

\*2: メディカ/国際医療技術専門見本市/会議(ドイツ Dusseldorf)。

## おわりに

広い層の多様なお客様からフィードバックを得ることは、極めて意味深く勇気付けられることである。HORIBA ABXのブランドイメージ、そしてブランド認知度は、ソフトウェアインターフェイス及びそれが提供するユーザフレンドリーな作業空間によって強化されてきた。

JIB<sup>1</sup>やMEDICA<sup>2</sup>などの展示会でHORIBA ABX製品を見た技術者たちの情熱もまた、より一層正確にお客様のニーズに応えたいという飽くなき探求の中で、HORIBA ABXの推進力の源となってきたものである。

こうしたフィードバックを受けて、HORIBA ABX社ソフトウェアが持つ機能美やエルゴノミクスは、コスト削減や効率向上といった形で具体的な成果を生んだ。ソフトウェアを習熟しやすいものにしたため、ドキュメント作成やトレーニングの分野で省コストを実現できた。状況に応じたヘルプモジュールの構築もまた、コールセンターの作業負荷をより軽減する結果となった。これらすべてが、HORIBA ABXの専門能力を促進



Gwenaelle Collet

HORIBA ABX S.A.  
R&D/Software Department



Lyonel Junillon

HORIBA ABX S.A.  
R&D/Software Department



Patrick Iliou

HORIBA ABX S.A.  
Marketing Department

# Feature Article

特集論文

## Pentra DX 120

- 新技術による血液の全検査プラットフォーム -

Pascal Berthet

Pentra DX120は、血液検査における完全なワークフロー管理を実現するために、HORIBA ABX が多忙な検査室に提供する非常に価値のあるツールである。主な特徴としてはDouble DIFF Matrix技術により同時に45項目を測定し、血液病理学に有用な情報を提供する。また、自動塗抹標本作製モジュール SPS Evolution、検体及びその結果管理を提供するデータステーションExpert Validation Stationも組み込んでいる。

### はじめに

技術革新により、HORIBA ABXは、予防診断及び血液学的スクリーニングに特化した血球計数装置Pentra DX 120 (図1)を開発した。Pentra DX 120は、血球計数装置に求められる臨床検査機能を検査室に提供するために開発された。1測定あたり45項目を測定、血算、白血球分類だけでなく、幼若細胞も測定でき、血液疾患、スクリーニングに有用な情報を提供できるようになった。検査の効率化のために、自動再検機能、項目選択測定、120検体/時の高速処理及びデータ管理システムの機能が搭載されている。また本装置ではSPS Evolution(自動塗抹標本作製モジュール)を追加することにより、血算から染色までの操作を自動で行うことができる。

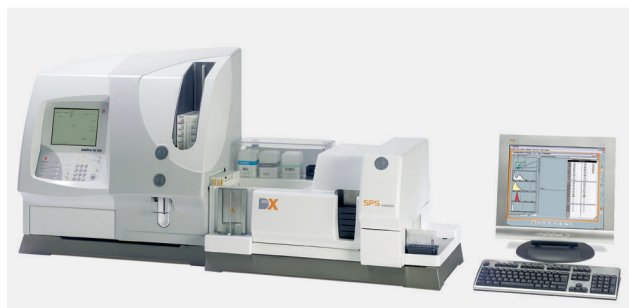


図1 血球分類 / 自動塗抹標本作製装置 Pentra DX 120

### 白血球系幼若細胞分類 Double DIFF Matrix

白血球系の幼若細胞群、幼若顆粒球(IMG)、幼若単球(IMM)及び幼若リンパ球(IML)の識別を可能にするため、Pentra DX120には、フローサイトメトリ<sup>1)</sup>と細胞染色法<sup>2)</sup>を組み合わせた新技術のDouble DIFF Matrix<sup>3)</sup>が組み込まれている(図2)。この方法によって各幼若細胞の比率、絶対数が得られ、またその結果は、塗抹標本でみられる形態と極めて容易に関係付けることができる。更にPentra DX 120は、異形リンパ球(ALY)の測定も同時に行う。

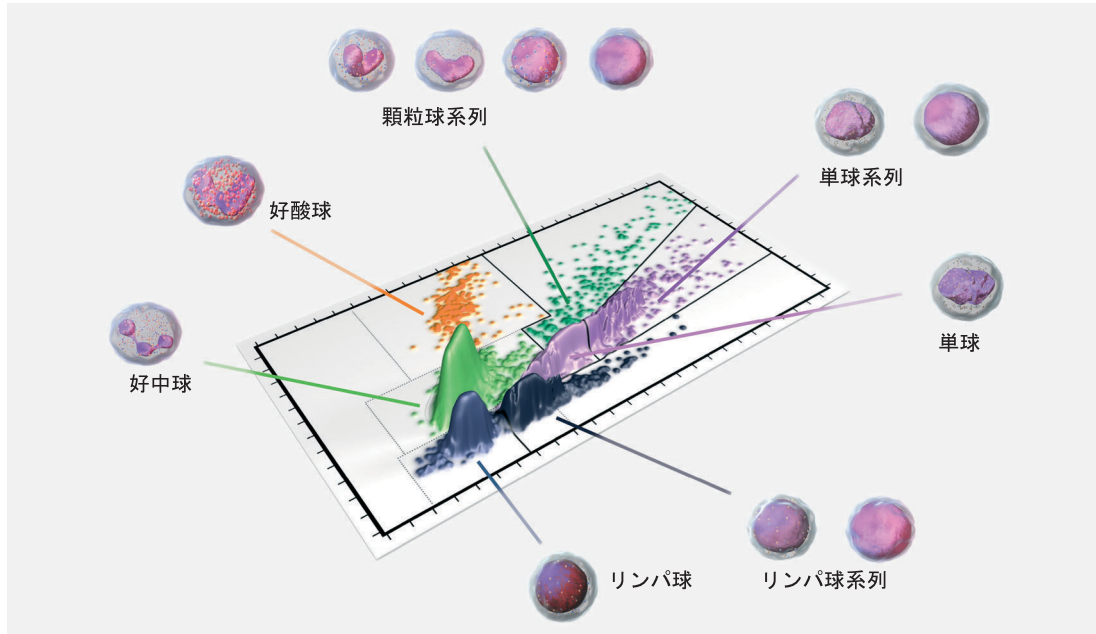


図2 Double Matrixによる幼若白血球全分類

このような白血球系幼若細胞群の測定結果は、診断に有用な情報となり、また、これらの項目は急性白血病症例の分類を補足する情報ともなる。

\*1：フローサイトメトリ

染色処理された検体は、Double Hydrodynamic Flow Cytometer( HORIBA ABX特許取得 )で測定部に移送され、白色光による吸光度やアルゴンイオンレーザー励起による蛍光を測定(図3)することによって、細胞の大きさや特性が測定される。

\*2：細胞染色法

検体をおある温度でインキュベートしながら、細胞をクロラゾールブラックで染色する。クロラゾールブラックは特に白血球細胞質、顆粒及び核を染色する。

\*3：Double DIFF Matrix

Pentra DX 120ではHORIBA ABXが開発した細胞染色法白血球分類を採用している。クロラゾールブラックEで染色された白血球は、その染色特性と容積に基づいてマトリックスにプロットされる。Pentra DX 120では、このマトリックスを拡張し、マトリックスの外に存在する顆粒球、単球、リンパ球などの大きな幼若細胞を更に分類、血液学的病理の詳細な診断を行う力強いツールとなっている。

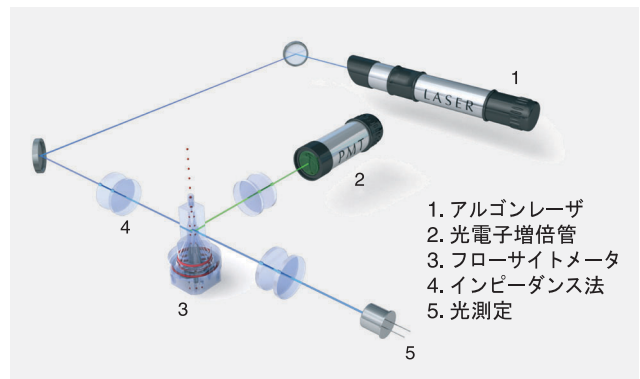


図3 フローサイトメトリの光学系

## 赤血球系幼若細胞の分類

Pentra DX 120では赤芽球( ERB )、赤血球( RBC )及び網赤血球の測定が可能である。これは我々の特許であるDHSS( Double Hydrodynamic Sequential System )<sup>4</sup>技術及び蛍光法を用いて行われる。赤芽球は網赤血球測定と同じ手法で測定される。赤芽球は、HORIBA ABX 蛍光試薬により核に含まれているRNAをチアゾールオレンジで染色する。

\*4：DHSS

Double Hydrodynamic Sequential System( DHSS )は、正確な白血球分類、網赤血球測定を可能にした。



測定はアルゴンイオンレーザー励起による蛍光法により行う。両軸に蛍光強度、大きさをとった分布図をもとに赤芽球、血小板及び白血球(WBC)を分離する。赤芽球のカウントに含まれる白血球は自動補正される(図4)。赤芽球は貧血及び悪性新生物の診断で特に有益なツールであり、小児科でも有用である。

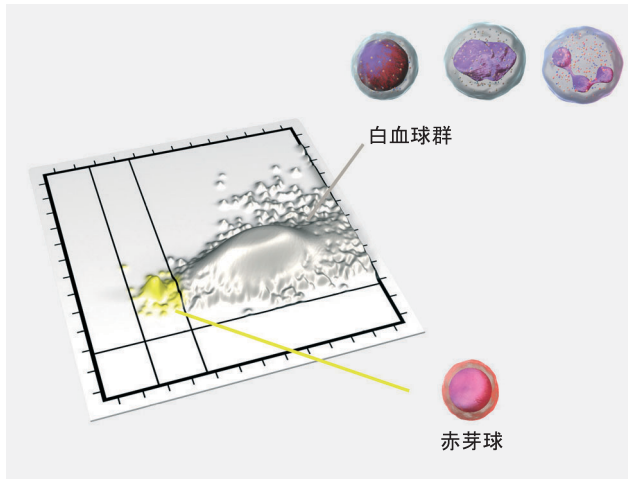


図4 蛍光法に基づく赤芽球測定

貧血のモニタリング、骨髄再生の観察に有用なパラメータとしては、網赤血球数がある。網赤血球数に加え、症例の詳細な知見を得るためには、Heilmeyer分類に従って、RNA含量(RET<sub>H</sub>、RET<sub>M</sub>およびRET<sub>L</sub>)に基づき、網赤血球の成熟度を分類する必要がある。この場合も、HORIBA ABX 蛍光試薬を使用し、細胞内に存在するRNA量に比例した蛍光強度から、網赤血球に関する10項目の測定値とともに網赤血球の3種の成熟度に分類する(図5)。

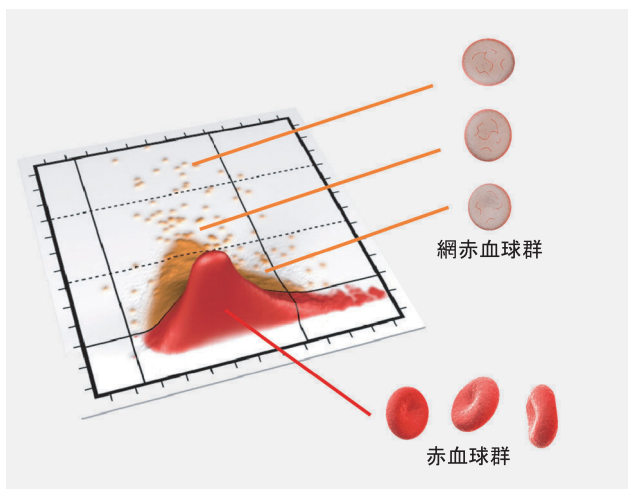


図5 Heilmeyerに従った網赤血球成熟度の分類

## 自動塗抹標本作製装置

検査及び診断時間の短縮だけでなく、SPS Evolution(塗抹標本作製装置)の接続により、Pentra DX 120のユーティリティを更に向上することができる。SPS Evolutionを使用すると、1時間あたり120標本を自動的に作製でき、標本作製の効率化が図れる。また、バーコードにより検体の同定を行い、患者データが各標本にプリントされる。

SPS Evolutionではウェッジ手法により標本を作製し、最適化された標本作製パラメータ(引き速度、ウェッジ角度、血液待機時間)により、常に良質の塗抹標本作製を行う。更に、検査室で要求標本検体のタイプに応じた作製パラメータの設定ができる。標本は選択した染色プロトコルで自動的に染色される。標本は染色の有無を選択でき、必要に応じてあらかじめ作製された標本を染色することもできる。

また、オペレータと血液との直接の接触をなくしたため、安全性にも配慮した設計となっている。

## 自動バリデーション

Pentra DX 120はデータステーションExpert Validation Stationとも接続できる。我々はこのExpert Validation Stationをシステム情報、検体管理、拡張コミュニケーションオプションを提供するために特別に開発した。Expert Validation Stationの血液検査プロトコルにより、検討の必要な検体をリアルタイムで同定できる。次にIntelligent Reflex Testing(項目選択測定)により、異常検体の相補検査(網赤血球または赤芽球など)が自動的に行われ、検査室の臨床プロトコルによって管理される。

本システムは完全にプログラムで制御でき、結果が定義された基準外であれば特定の患者プロフィールに従ってアラームを出し、自動確認する。更に、特徴としては手動入力(DIFF結果、コメントなど)があり、搭載された細胞学アトラスにより参照情報も得ることができる。

## おわりに

### 血液検査のワークフローへの統合方法

DHSS技術によるDouble DIFF Matrix ,自動塗抹標本作製装置及びデータステーション等のPentra DX 120の革新的な技術により 病理学的検体の検出を容易にすると同時にオペレーション機能の向上が図られた。Pentra DX 120は 血液検査のワークフローを実現するための有益なツールであるといえる。

## 別表

参照法と項目

参照法	CBC	DIFF	RET	ERB
インピーダンス法	√	√	√	√
フローサイメトリ		√	√	√
蛍光法			√	√
細胞染色法		√		√
DHSS		√	√	√

CBC : 全血算

DIFF : 血球分類

RET : 網赤血球

ERB : 赤芽球

### Pascal Berthet



HORIBA ABX S.A.  
Marketing Department  
Product Manager

## 血液細胞生物学・光学・関連技術

Philippe Nérin, Didier Lefèvre

本稿では光と細胞との相互作用についての基礎を紹介し、ますます複雑化する血液分析に、弾性散乱及び蛍光発光がどのように用いられるかを説明する。光学構成の仕様、特にビーム整形を取上げる。最後に、細胞の光学反応とそのマトリクス表示についての実験データを紹介する。これは、HORIBA ABXの新世代を担う血液分析装置のために新しい展望を切り開くものである。

### はじめに

人間の血液細胞は図1に示すように、次の3種類に大別される。血小板、赤血球及び白血球である。白血球は更に顆粒細胞質(顆粒球)とそれ以外(単球及びリンパ球)に分けられる。また顆粒球は、メチレンブルーエオシン塩(methylene blue eosinate)などのような、一般的な生体染色液への反応の仕方で更に分類される。顆粒球の分類は好酸球(細胞顆粒を赤色に染色)、好中球(細胞顆粒を薄く染色)、及び好塩基球(細胞顆粒を紫色に染色)である。この他にも一般に発生する異常白血球には多くの種類がある。また稀に見る種類の白血球もあるが、これについてはここでは言及しない。

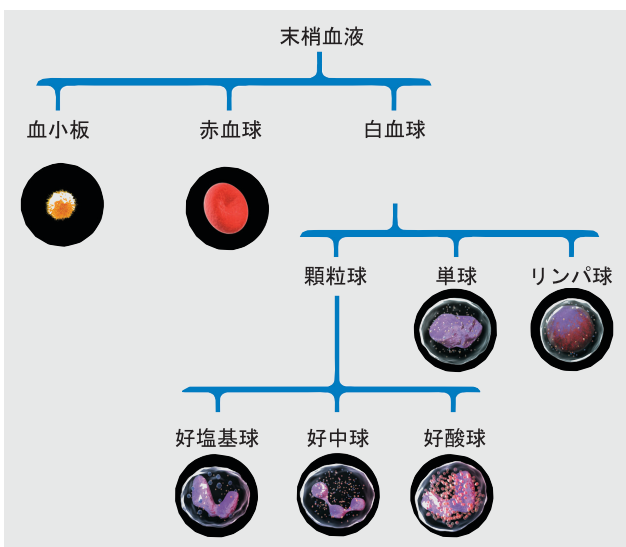


図1 末梢血液細胞の種類

### 光と物質の相互作用

光と物質との相互作用を説明するための概略図を図2に示す。一般的に生体細胞に対して光子は、散乱または吸収という2つの基本的な作用を起こす。散乱には弾性散乱と非弾性散乱とがあるが、後者の場合、散乱光は新たな光周波数を持つ。物質による光の吸収ではその他の現象、例えば、音響信号や血球温度の変化なども発生する<sup>[1]</sup>。光子が吸収されるため、細胞診断において光ルミネッセンスは広く用いられてきた物理プロセスである<sup>[2][4]</sup>。細胞のフォトルミネッセンスは蛍光プローブ<sup>[5]</sup>の組み込みによって内在的(自己蛍光<sup>[6]</sup>)となる場合と外来的となる場合がある。ルミネッセンス現象は他のエネルギー源(電気励起、あるいは熱励起など)を含む、より一般的な一連の物理プロセスである。これらすべての物理プロセスは細胞特性を知るために用いられてきたが、本稿では弾性散乱と蛍光に焦点を当てる。これらは十分な成果を上げており、商業技術を統合的に発展させてきている。

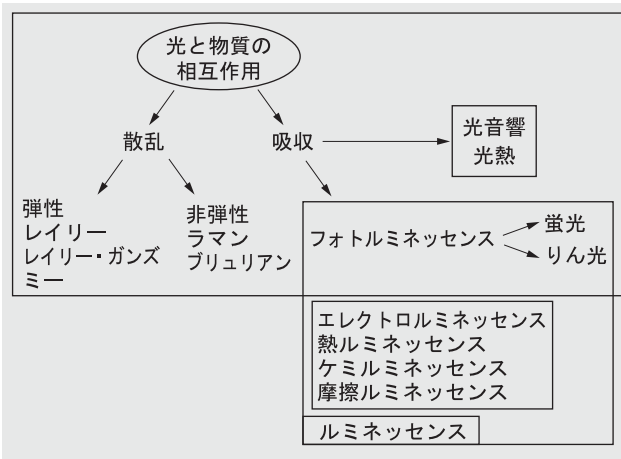


図2 光と物質の相互作用を含むプロセス概略図

## 細胞生物学における分析ツールとしての弾性散乱

微視レベルでは、血球はその膜や核の複雑な構造によって不規則な形状を有している。このような構造と光との相互作用を数学的に表現するには、その複雑性からいくつかの近似や仮定が必要となる。基本的な実験観察(主に赤血球)を強調するため、レイリー・ガンズ(Rayleigh-Gans)近似<sup>[7]</sup>において膜厚を無視し、散乱プロセスを均質な球体の散乱として扱うことを基本仮定とする。この理論では位相物体に作用する平面波がわずかに乱れると仮定しているため、界面の内外で電界が乱れる可能性がある<sup>[8]</sup>。入射平面波で三面体XYZの原点Oに置かれた細胞を捕えてみる(図3)。偏光は垂直方向( $E_v$ )と水平方向( $E_h$ )の電界の振動成分として表される。

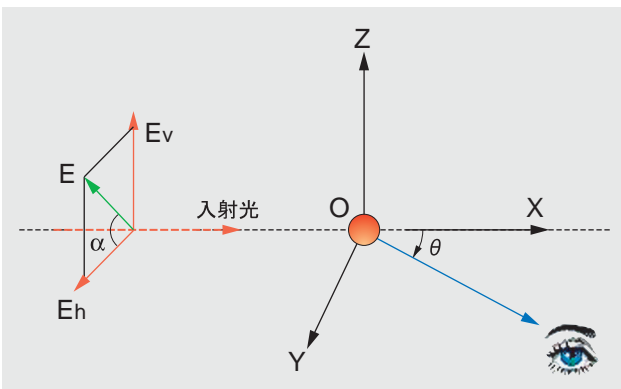


図3 光と赤血球の相互作用 光学パラメータの指定

我々の近似では、散乱パターンはX軸について対称となっている。結果として散乱現象は、観測方向を示すXY面内の単一変数 $\theta$ によって記述される。

入射光が直線的に偏光する時、振動面をX軸を含む面と定義し、電界をEとする。図3に示す通り、振動面とXOY面との間の角度は $\alpha$ とする。

入射波の偏光が異なる状態には、以下のようなものがある。

直線偏光: 入射波は2つの要素に分けられる。

$$E_y = E \cos \alpha \text{ 及び } E_z = E \sin \alpha$$

楕円偏光:  $E_y$ と $E_z$ 要素間に位相シフト $\phi$ がある。

$E_y = E_z$  及び  $\phi = \pm \pi/2$  の時、偏光は円偏光となる。

非偏光:  $E_y = E_z$  で 2つの要素間に位相関係が成り立たず、散乱強度パターンは付加的なものとなる。

上述の分析により、偏光のどのような状態も2種類の直交する直線偏光波の解析に還元できることがわかる。図3に示す視野方向に沿って散乱光の偏光率を予想するため、偏光プリズムを用いて水平・垂直軸に沿った強度を計測する。それぞれの強度を $I_h$ 及び $I_v$ とする。偏光率は下記のように表される。

$$\rho = \frac{I_v}{I_h}$$

同種の球体については、 $I_h$ 及び $I_v$ の強度(W/sr)は次式で得ることができる<sup>[8]</sup>。

$$I_v = \frac{V^2 \cdot \pi^2}{\lambda^4} \cdot (n^2 - 1)^2 \left[ \frac{\sin u - u \cos u}{\frac{1}{3}u^3} \right]^2 E_v$$

$$I_h = \frac{V^2 \cdot \pi^2}{\lambda^4} \cdot (n^2 - 1)^2 \left[ \frac{\sin u - u \cos u}{\frac{1}{3}u^3} \right]^2 \cos^2 \theta E_h$$

ここで、

$$u = \frac{4\pi \cdot R \cdot \sin(\theta/2)}{\lambda}$$

$E_v$ と $E_h$ はそれぞれ垂直と水平の偏光に対応する入射光の強度を表している。他のパラメータは次のように定義される。

$V = 4\pi R^3/3$  は細胞の容積を表し、 $n$  は周囲の媒質との比屈折率を、 $\lambda$ は入射光の波長を表している。

図4はパラメータ $\theta$ に対する角度スペクトルのプロットを表している。この曲線は $\lambda = 488 \text{ nm}$   $n = 1.03$ の条件下で3種類の直径を持つ球体に対して描いたものである。局所的な最小値は、関数 $\tan u = u$ のゼロ点に関連した逆位相干渉の影響を示している<sup>[8]</sup>。これらの曲線から、光散乱計測は非常に感度が良いということがいえる。直径における $2 \mu\text{m}$ の変化によって散乱光の強度パターンに著しい変化が発生するからである。 $1 \mu\text{m}$ 程度の直径の変化が散乱光信号では5倍の変化となる。

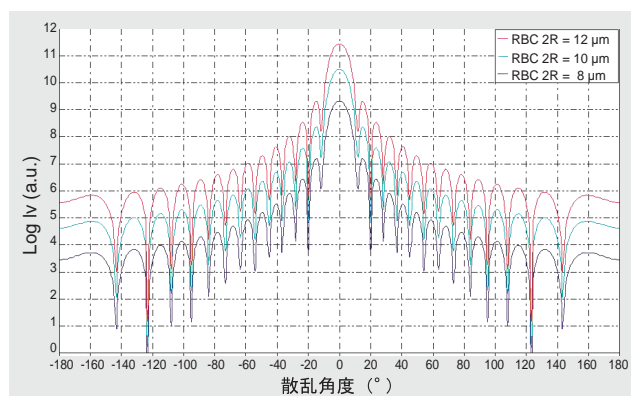


図4 3種類の球体の角度スペクトル  
上から $12 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $8 \mu\text{m}$ の曲線を示す。

このような基本的な考察が、細胞の診断において広範囲に用いられてきた。例えば赤血球では、容積分布とヘモグロビン量を決定するため、実験データに基本的な数学モデルを適用している<sup>[9][10]</sup>。赤血球では、膨張の影響を考慮に入れて補正を行わなくてはならない<sup>[11]</sup>。

偏光率は例えば顆粒球<sup>[12]</sup>や異常な母集団の検出<sup>[13]</sup>など、細胞の母集団を差別化する目的で用いることも可能である。偏光分離した散乱実験のその他のアプリケーションには、変形体の検出<sup>[14]</sup>が挙げられる。

これまで前方散乱は側方散乱より良く理解されてきた。そこで、側方散乱でより多くの知見<sup>[15]</sup>を得るために、側方散乱の最新モデルを開発した。先駆的な研究によって、側方散乱が核部分及び核の丸みに対して1次的な関係を有していることが、実験を通じて明らかになっている。多くの粒子を内部に持つ細胞も、顆粒球と同様に、側方散乱による信号を発生させる。

## 蛍光による識別

蛍光検出に基づく分析技術は、高感度で選択性があり、更に空間的・時間的分解能にも優れていることから、非常によく知られている。蛍光測定の実理は分子による光の吸収と再放射に基づくものである。ある分子が光子の吸収によって励起されると、入射光子のエネルギーよりも低いエネルギーを持つ新しい光子を放出することで基底状態に戻ることができる。励起状態から脱するには他の方法もある。内部変換(すなわち、蛍光発光なしに直接基底状態に戻る)や系間交差(蛍光が発生する機会が多い)及び分子内の電荷移動と構造変化である。蛍光は物理化学、生化学、生物学系の調査研究に用いることができる。本稿では挿入色素(intercalant dye)特にチアゾールオレンジ(TO)(図5)について言及することにする。

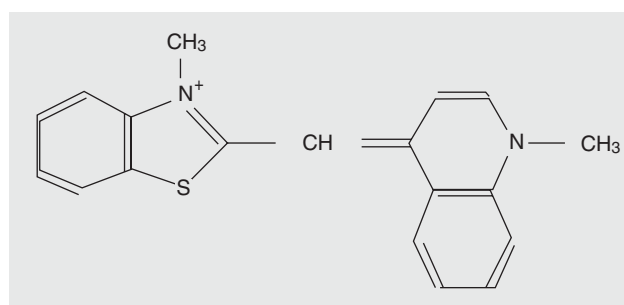


図5 血球の光学識別に用いられるチアゾールオレンジ分子

TOは2種類の芳香族環系が結合して共役系を構成する、非対称のシアニンである。この色素の水溶液中での蛍光強度は無視できる程度であるが、核酸と結合した時には極めて強い蛍光を出す。芳香族間の化学結合周りの回転が停止して、無輻射の基底への遷移が排除されるために、蛍光強度の増加が起こると考えられる。直線2色性やNMR(核磁気共鳴)測定<sup>[16]</sup>によって示されるように、この結合は相互的に作用すると考えられる。TOから核酸への混成が起こると量子収率が増大し、DNA信号やRNA信号を高感度に検出することが可能となる。細胞生物学では、TOの挿入特性を用いて幼若赤血球の識別や赤血球内変形体の検出<sup>[17][18]</sup>など、多くのアプリケーションがある。

## 測定原理と光学配置

HORIBA ABX血液分析装置は、自動化されたフローサイトメータである。標準のサイトメータでは血液試料の準備を手動で行う必要があるのに対し、希釈、溶解試薬の添加、試料温度管理などの作業がすべてHORIBA ABXの分析計にて自動で行われる。HORIBA ABXにおける最近の開発による測定原理をいくつか紹介する。図6に動作原理の概略を示す。血球は液流により光学部へと導かれ、そこでレーザービームと相互作用する。

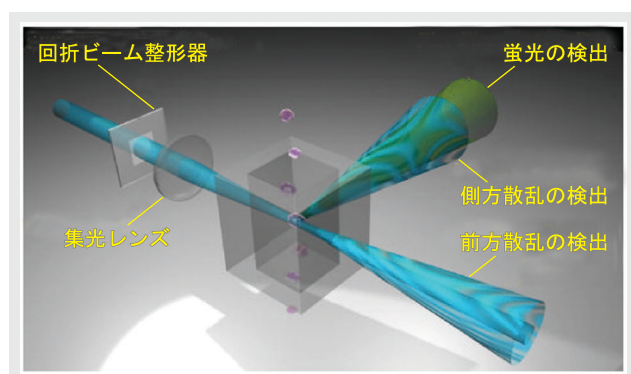


図6 細胞の光学反応を決定する動作原理

検出部の主要部分は図6に示しているが、下記のもので構成されている。

- 光源
- ビーム整形器
- 集光レンズ
- 散乱光を電気信号に変換する光学検出器
- 光学フィルタ
- 細胞が1つずつレーザービームを通過するための液流集束器

細胞の水力学的な集束化の原理は、他のところでも見出すことができる<sup>[19]</sup>。測定は、流れる血球が集光されたレーザービームで照射される点で行う。散乱角度の高低や蛍光などのパラメータ検出により、次に記載するように、数多くの血球タイプに分類することができる。

## 光源

DPSS (Diode Pumped Solid State: ダイオード励起固体) レーザは、生物医学計測の分野で注目を浴びている。アルゴンやクリプトンイオンレーザなどのガスレーザ技術に比べ、DPSSレーザには下記のような卓越した優位性がある。

- 小型
- 小消費電力
- 高信頼性
- 少ない光ノイズ
- 動作の静寂性
- 波長の選択性

DPSSレーザの動作原理は、非線形光学プロセスの高調波発生に基づいている。図7に示すように、DPSSレーザ技術では一般的に2つの部分、ポンプ部と第2高調波発生部に分かれる。ポンプ部で、特定波長のメインビームが発生する。ポンプ部の波長は、波長セクタ (Bragg Grating) と温度管理されたチャンバによって通常安定化される。波長の安定はレーザ動作の際に満たさなくてはならない位相整合条件として重要なものである。増幅素子は、光学増幅を起こすもので、半導体技術に基づいている。メインビームは第2高調波発生部を交差して非線形の相互作用を起こし、これにより入射波の周波数が2倍となる。この光学変換により、我々の目的に必要な488 nm という波長を発生させる。これは細胞内核酸の染色に用いる血液学特有の色素の波長に一致するものである。

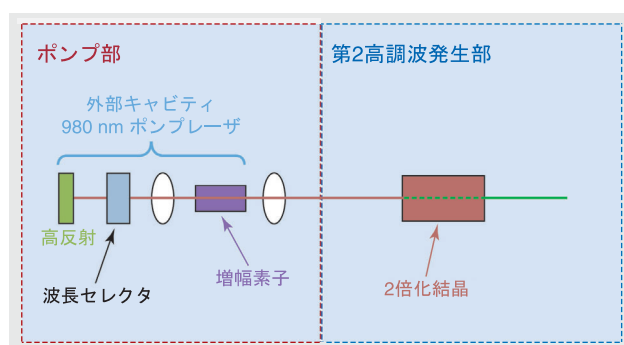


図7 DPSSレーザ原理(照射: 488 nm)

### ビーム整形器

ビーム整形は、光学的放射ビームから光を再配分するプロセスである。多くの標準的な光学設計は、球面レンズとシリンドリカルレンズの組み合わせで構成されている。そのため測定点における光強度分布は、図8に示す通り楕円形及びガウス形となる。結果として、ビーム中央から血球の流れが外れていれば、入射光の強度に大きな変化が生まれることになる。更に、たとえ流れが完全に中央に集束されていたとしても、流れの中の細胞位置について水力学的な変動をなくすことは困難である。図8(a)に示すように、この変動は散乱光の振幅及び検出信号に影響する。この光学的影響により測定誤差が発生し、測定再現精度が悪くなる。従来、フローサイトメータを用いた時の光の変動を抑えるため、集束ビームの幅が広げられ、また細胞がレーザービームの中央近くを交差するような流れに設定されている。この方法の難点は、光の大半が光学系内で消失してしまい、全体的な効率性が低いことである。

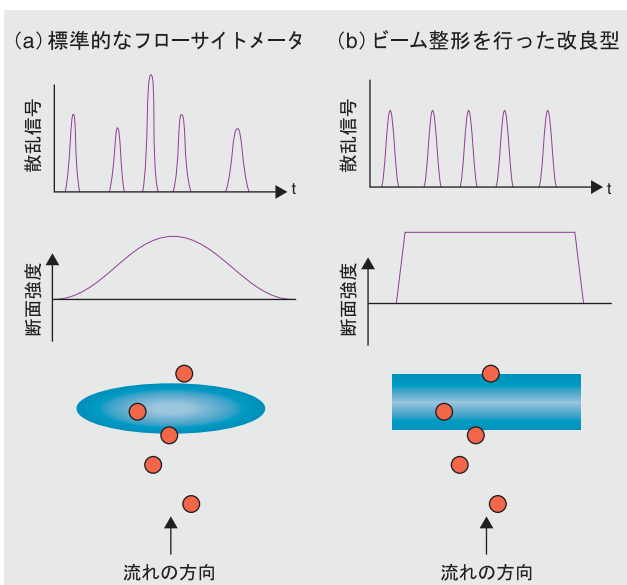


図8 フローサイトメータにおける散乱反応の比較

このような難点は次のようなビーム整形“円形断面” “長方形断面”及び“ガウス形強度プロファイル” “頂上平坦形強度プロファイル”の2つの変換を行うことで回避できる。このような変換を行う光学表面を合成することは、フーリエ光学理論を用いることで解決できる逆問題である<sup>[20]</sup>。解析的に計算でき、計算された非球面の表面で所要の変換が行われることを示すことができる<sup>[21]</sup>。

$$z(x, y) = \frac{\beta_x}{k(n-1)} f(\xi_x) + \frac{\beta_y}{k(n-1)} f(\xi_y)$$

次のように記号を定義している。

$$\beta_x = \frac{2\sqrt{2\pi} \alpha_x w}{\lambda f} \quad \beta_y = \frac{2\sqrt{2\pi} \alpha_y w}{\lambda f}$$

$$\xi_x = \frac{x\sqrt{2}}{w} \quad \xi_y = \frac{y\sqrt{2}}{w}$$

$$f(\xi) = \xi \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{Erf}(\xi) + \frac{1}{2} \exp[-\xi^2] - \frac{1}{2}$$

この式では、 $w$  は放射レーザーのビームウエストを表す。一般に  $k = 2\pi/\lambda$  で  $n$  は屈折率、 $f$  は結像レンズの焦点距離とする。パラメータを図9に示す。

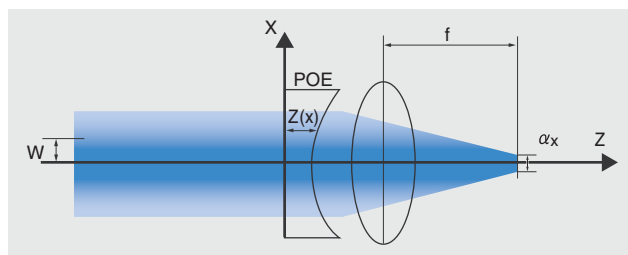


図9 X-Z面の位相光学素子(POE:Phase Optical Element)の定義 (Y-Z面では光学ウィンドウのサイズは $\alpha_y$ で表す)

我々の仮定が十分に正しいものであるかどうかを評価するため、Zemaxソフトウェアを用いて光学的シミュレーションを行った。このシミュレーションを実施するにあたり、データをこのソフトウェアと互換性のあるフォーマットに変換する必要があった。例えば光学面は多項式を用いてモデル化される。

光学面は下記のように展開される。

$$z(x, y) = z_x(x) + z_y(y)$$

これを多項式で示すと下記の形式となる。

$$z_x(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + \dots + a_{10}x^{10}$$

$$z_y(y) = b_0 + b_1y + b_2y^2 + \dots + b_{10}y^{10}$$

Matlabを用いて最小二乗近似した非球面データを表1に報告する。

表1 非球面データ

パラメータ:  $\alpha_x = 30 \mu\text{m}$ ,  $\alpha_y = 100 \mu\text{m}$ ,  $w = 700 \mu\text{m}$ ,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ,  $f = 30 \text{ mm}$

ここに示す係数は、瞳孔径を3 mmとして規格化されている。

$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_4$	$a_5$	$a_6$	$a_7$	$a_8$	$a_9$	$a_{10}$
0.0000	0.0000	0.0115	-0.0000	-0.0222	0.0000	0.0347	-0.0000	-0.0288	0.0000	0.0095
$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	$b_5$	$b_6$	$b_7$	$b_8$	$b_9$	$b_{10}$
0.0000	0.0000	0.0043	-0.0000	-0.0083	0.0000	0.0130	-0.0000	-0.0108	0.0000	0.0036

図10に、解析的な式と多項式近似を用いて計算した  $z(x)$  と  $z(y)$  のプロファイルを示す。図10により異なるプロット間で有意な差異がみられなかったため、補間は正しいと言える。

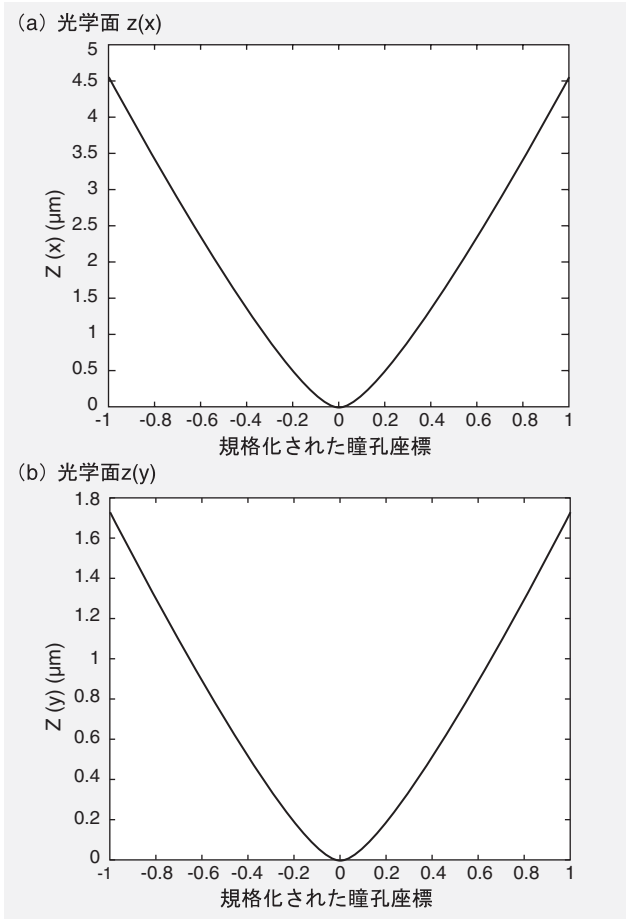


図10 光学面 $z(x)$ と $z(y)$ の解析的及び多項式プロットの比較

補間が検証されたため、合成光学素子を通したガウスビームの伝播をシミュレートした。このシミュレーションは Zemaxソフトウェアで利用可能な“Physical Optics Propagation”パッケージを用いて実施した。

図11に示した結果は、POEが測定ウィンドウ内の光の均一性を増加させることを表している。生物細胞への結合光はPOEを用いることでより良いものとなるが、これは流れの断面に対する損失率(破線で示す部分)が改善されるためである。

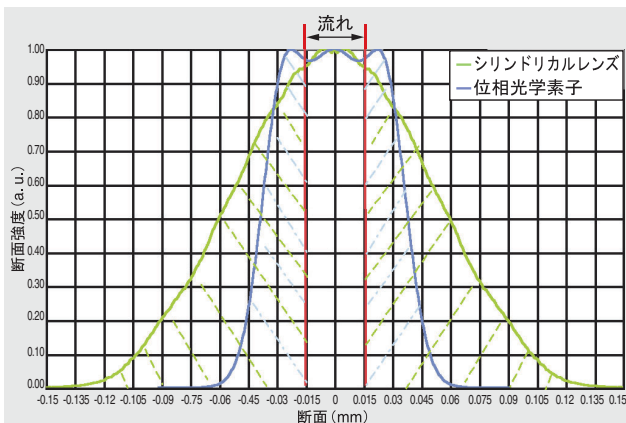


図11 シリンドリカルレンズ(緑色線)と計算された位相光学素子(青色線)を用いたビーム整形の比較

この他に、POEプロファイルは数ナノメートル内の誤差で正確であることを示すシミュレーションがいくつかある。プロファイルの精度がこの許容範囲外である場合、光学測定ウィンドウ内に大きな強度変動がみられる。このレベルの精度を得るには、ナノ計測の分解能を得る加工技術が要求される。我々は電子ビームマイクロリソグラフィを用いてビーム整形素子を製造してきたが、これは加工技術の中でも精度が高いものである。実際は、この加工プロファイルは最初 $2\pi$ の範囲に折りたたまれているので、次にいくつかの離散レベルにデジタル化される<sup>[22]</sup>。回折素子はDOE(Diffractive Optical Element)として知られるが、これはアナログプロファイルがうまく離散化されることを示している。設計値からのずれによる不正確さは、回折グレーティングの場合と同様にゴーストイメージを発生することに注意を要する。

今回ビーム整形に用いたトポグラフィ(3Dイメージ)は、位相シフト顕微干涉計を用いて計測された(図12)。図はDOEの不連続な構造を示すため、素子の半分を表している。

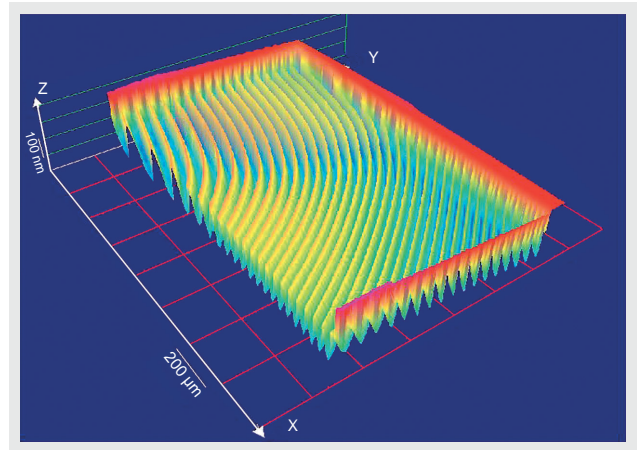


図12 位相光学素子  
30 × 100  $\mu\text{m}^2$ の長方形測定ウィンドウ内に、レーザービームをビーム整形する。

## 試料準備とデータ取り

細胞をサイトメータで観察する前に、“分析可能な”成分溶液を得るために最低限の準備が必要である。HORIBA ABX特許のFR0102489では核細胞を計数し分離する方法が記載されている。これは、インピーダンスにより細胞の容積を計測し、前方散乱光によりサイズ計測を行い、直交散乱光により構造を計測し、蛍光発光法により核酸量を計測する方法である。

この手法は全血あるいは他の生物学的液体を分取し、一定量の特別な単一試薬と混合するもので、次に示す内容をおよそ同時に行うことができる。



すべての赤血球を、核細胞のみ残して溶解残った核細胞(主に白血球を含む)の固定細胞内の核酸を、細胞浸透を促進する抗生物質と色素自身の両方を用いて染色。色素はDNAやRNAなどすべての核酸と結合する非対称シアニンを用いる

保温が完了すると(数秒で完了)細胞溶液は輸送されフロー・トランスデューサに注入されて、細胞1つずつを基本として次のような測定が行われる。インピーダンスによる容積測定(RES)、前方散乱光及び直交散乱光(FSC & SSC)特定色素の波長による蛍光(FL1)などである。

各パラメータ検出器で得られた信号は次に増幅され、フィルタリングされてピーク検出器回路へ送られ、12ビットあるいは16ビットのADコンバータによって数値信号へ変換される。結果の情報を統合し関連付けることで、細胞固有の特性に基づいて固体群に分けることができる。

ソフトウェアアルゴリズムにより、各細胞に対して同時に得られる4次元データの処理ができ、全く同じパラメータの組み合わせについても、手動で行うよりも正確で精度の高い成分分離が可能である。人間の脳では4次元像を形成することは不可能だが、ソフトウェアには可能である。細胞の分離についてより良く理解するため、一般的なヒト血液試料にさまざまなパラメータを用いて得られた2Dの描画プロットを以下に簡単に紹介する。

### 赤血球及び網赤血球の光学

赤血球は適切な低張性溶剤にさらされ、ヘモグロビンが流出して血球の形状が両凹形から球形へと変化する(図13)。この赤血球は本質的に、非常に薄い膜で覆われた、内部が空洞の球形である。

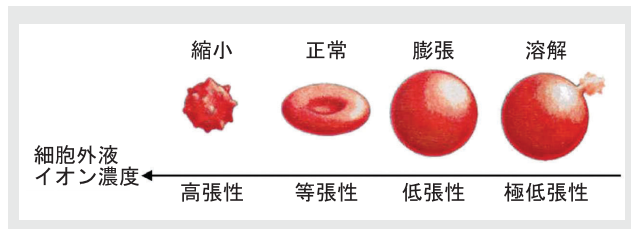


図13 赤血球が異なる細胞外液イオン濃度に対して示す反応

網赤血球の赤血球との主な違いは、核の痕跡がまだ細胞内で浮遊していることである。これらのRNA粒子は、血液への出現から2~3日でリボヌクレアーゼによって完全に消化される。このように、網赤血球の相対的な細胞年齢はそのRNA含有量を測定することで見積もることができる。赤血球が120日間生存することを考えると、毎日、骨髄は赤血球の約1%(1日あたり約200 × 10<sup>9</sup>個)

の新しい赤血球を生産しなくてはならないことになる。分析前にチアゾールオレンジ蛍光プローブを用いて、これらの痕跡は細胞内で染色される<sup>[23]</sup>。

図14は蛍光に対する前方散乱光を示している。左側には赤血球に対応する大きな固体群がある。R2の長方形内には明白な蛍光、すなわち網赤血球の成分が含まれている。白血球は赤血球と比較して非常に高い蛍光反応を持つため、右側の飽和チャンネルに限定して現れている。

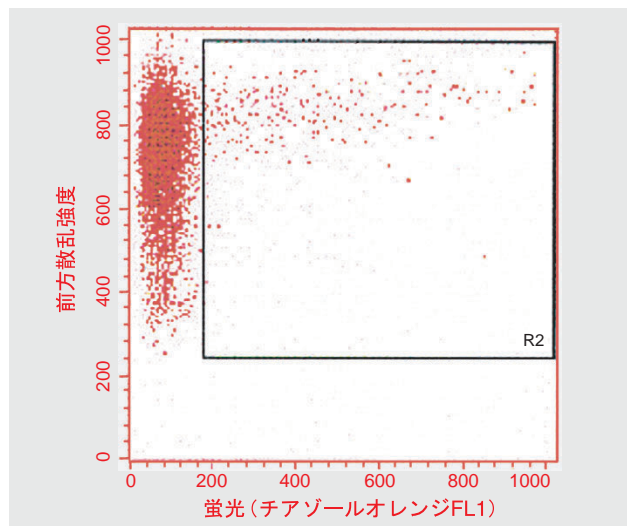


図14 赤血球と網赤血球の分類(前方散乱光/蛍光)

網赤血球の平均細胞年齢を決定するため、IRF(Immature Reticulocyte Fraction: 幼若網赤血球片)指数が設けられた<sup>[24]</sup>。網赤血球の蛍光軸はまず3つに等分され、2つのより高い部分の合計を総数で割った。こうして得られた相対指数は、多くの種類の装置間で比較可能であると考えられる。図15はPentra120 RETにて得られた代表的なマトリクスを、X軸にインピーダンス(容積)を、Y軸に蛍光量をプロットして示している。

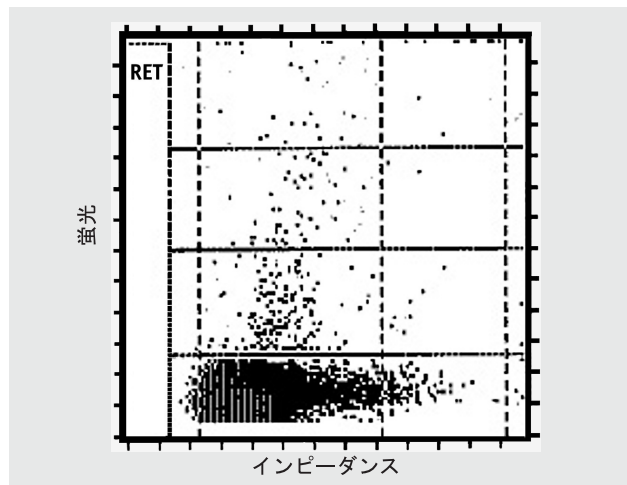


図15 容積インピーダンス測定と蛍光測定を用いた赤血球と網赤血球の分類

### 白血球の光学

図16を参照し、マトリクスを構成する2つの要素として、前方散乱(FSC)と側方散乱(SSC)の情報を使うことで、成分をその光学サイズと外観構造に従って分類することが可能である。このように、リンパ球はその微小さ(5 μm 径まで)や中身の均質さ(顆粒がなく、核と細胞質の比率が1に近い)から、各軸の下方部分に位置する(図16 ボックスL)。単球などの大きな細胞は、マトリクスの右側に見られるが(図16 ボックスM)、その透明性及び細胞質のない性質から、低い構造反応となっている。好中球や好酸球など、内部に複雑な構成や核小葉を持つ多形核細胞は、構造軸(縦軸)に対してより強い反応を示す(図16のボックスN及びE)。血小板や赤血球膜ゴーストのように、小さく、分離できない成分は、マトリクス上で左下隅にバックグラウンドノイズとして現れる(図16のボックスBN)。

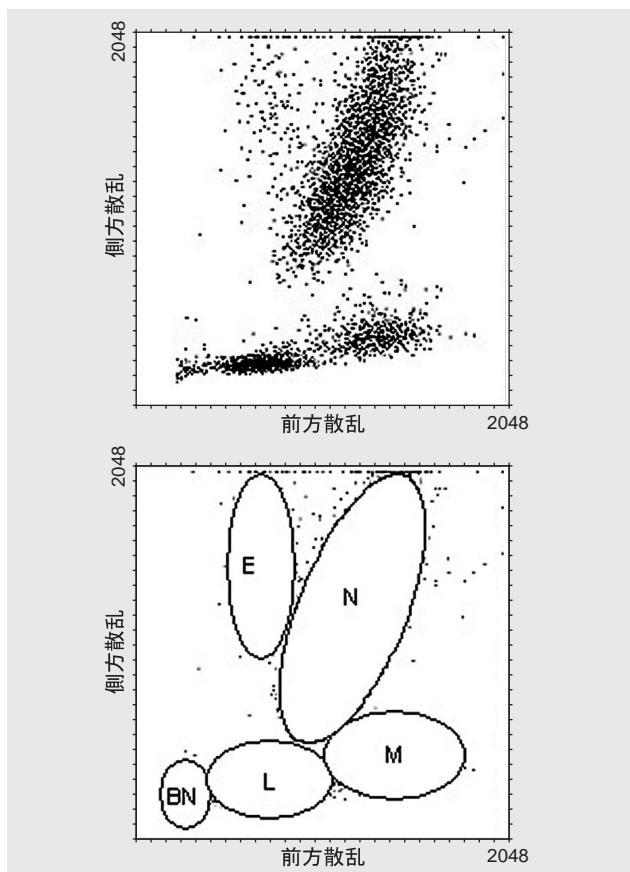


図16 白血球の光学反応(側方散乱光/前方散乱光)  
BN:バックグラウンドノイズ L:リンパ球 M:単球,  
N:好中球 E:好酸球

### 前方散乱対インピーダンスマトリクス

細胞特定におけるもう一つの重要な鍵は容積である。各細胞容積の正確な計測はインピーダンス検出を用いて行うことができる<sup>[25]</sup>。また細胞が球形で滑らかであればすぐに、前方散乱光によって特に容積について信頼のおける数値を出すことが可能である。この2つの軸でマトリクスを作成して、2種類のサイズ計測で反応の不一致となる形状や表面変形などの異形から細胞の分離を明確に行うことができる(図17)。この手法を用いて、少なくとも好酸球(図17、ボックスE)などの細胞を、その顆粒の数の多さによって容易に識別することができる。顆粒は、自然な容積よりも高い角度で光を散乱させる、不均一な表面性状を生成するといわれている。同様に、芽球は光のサイズにおいて、インピーダンス計測より微弱な反応(図17、ボックスBL)を示す。

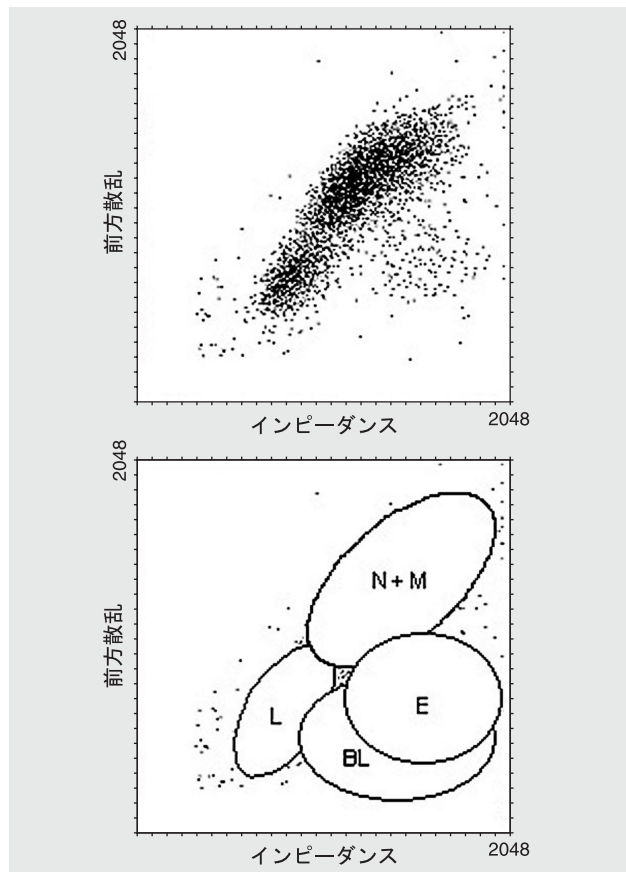


図17 光学及びインピーダンスによる白血球分類  
(前方散乱光/インピーダンス)

## おわりに

本稿では細胞と光波との間の主な相互作用について紹介した。弾性散乱と蛍光に着目し、主な血液細胞群を識別し計数を行うためにどのようにこの物理プロセスが用いられるかを指摘した。ビーム整形がフローサイトメトリアプリケーションにおいていかに重要な働きをしているかを示し、回折光学に基づいた実際的な成果を紹介した。赤血球と白血球の光学反応を実験的な見地から紹介し、考察を試みた。網赤血球をその他の赤血球から分類し、計数する方法を示した。最後に、白血球を複数のパラメータを用いたアプローチで分離する方法について言及し、HORIBA ABX血液分析装置の次世代に用いられるコンセプトとマトリクス表示を紹介した。

注記：本文中、各社保有の登録商標名をそのまま使わせていただいた場合があります。

## 参考文献

- [1] T. Kitamori, T. Sawada, *Laser Photoacoustic and Photothermal Spectroscopies as Novel Characterization Methods for Microparticles*, *Polymer International* 30, 451-453 (1993)
- [2] W. Hubl, L. Tlustos, A. Erath, S. Andert, P. M. Bayer, Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labeled monoclonal antibodies, *Cytometry* 26, 69-74 (1996)
- [3] Janet K. A. Nicholson, Marjorie Hubbard, Bonnie M. Jones, Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry, *Cytometry* 26, 6-21 (1996)
- [4] Young Ran Kim, Ronny van't Oever, Marilou Landayan, James Bearden, Automated red blood cell differential analysis on a multi-angle light scatter/fluorescence hematology analyzer, *Cytometry Part B* 56, 43-54 (2003)
- [5] B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and applications*, Wiley-VCH (2002)
- [6] D. Barnes, S. Aggarwal, S. Thomsen, M. Fitzmaurice, R. Richards-Kortum, A characterisation of the fluorescent properties of circulating eosinophils, *Photochemistry and Photobiology* 58, 297-303(1993)
- [7] R.A. Meyer, Light scattering from red blood cell ghosts: sensitivity of angular dependent structure to membrane thickness and refractive index, *Applied Optics* 16, 2036-2038 (1977)
- [8] A. Kastler, La diffusion de la lumiere par les milieux troubles, Influence de la grosseur des particules, Hermann, Paris, 21 (1952)
- [9] M. L. Polanyi, Volume and Index Measurement of blood cells with a recording diffractometer, *The Review of Scientific Instruments* 30, 626-632 (1959)
- [10] D.H. Tycko, M. H. Metz, E.A. Eptein and Grinbaum, Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration, *Applied Optics* 24, 1355-1365 (1985)
- [11] Y. M. Petrenko, Y. A. Vladimirov, Change in the size of erythrocytes on swelling in hypo-osmotic media, *Biophysics* 32, 485-492 (1987)
- [12] B.G. de Grooth, L.W.M.M. Terstappen, G.J. Puppels, and J. Greve, Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry, *Cytometry* 8, 539-544 (1987)
- [13] A.N. Korolevich, A. Ya Khairullina, Polarization characteristics of light scattering by erythrocytes under normal and pathological state, *SPIE Vol. 2370 Laser Applications in Life Science*, 375-378 (1994)

- [14] B. Kramer and col., Relative frequency of malaria pigment-carrying monocytes of nonimmune and semi-immune patients from flow cytometric depolarized side scatter, *Cytometry* 45, 133-140 (2001)
- [15] M. Benson and col., The application of perpendicular and forward light scatter to assess nuclear and cellular morphology, *Cytometry* 5, 515-522 (1984)
- [16] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, The interactions between the fluorescent dye Thiazole Orange and DNA, *Biopolymers* 46, 39-51 (1998)
- [17] L. G. Lee, and col., Detection of reticulocytes, RNA or DNA, Patent US 4,883,867
- [18] *Cytometry* 7, 508 (1986)
- [19] Howard M. Shapiro, *Practical Flow cytometry*, ARL, second edition (1988)
- [20] B. Kress, P. Meyrueis, *Digital Diffractive Optics*, Wiley editor (2001)
- [21] P. Nerin, Synthèse d'un élément d'optique diffractive pour la transformation d'un faisceau gaussien, ABX private communication, novembre 2003.
- [22] *Laser beam shaping*, edited by F.M. Dickey and S.C. Holwade (2000)
- [23] O. D. Laerum, R. Bjerknes, *Flow cytometry in hematology*, Academic Press, 95-109 (1992)
- [24] B.H. Davis and col., Immature Reticulocyte Fraction (IRF): By any name, a useful parameter of erythropoietic activity. *Laboratory Hematology*. 2:2-8 1996 ISLH
- [25] V. Kachel, *Electrical Resistance Pulse Sizing: Coulter sizing*, *Flow Cytometry and Sorting*, second edition, 45-80 (1990)



**Philippe Nérin, PhD**

HORIBA ABX S.A.  
R&D Optical Department



**Didier Lefèvre**

HORIBA ABX S.A.  
R&D Department

## BIOPEPのコア技術とノウハウ

Norbert Benattar

BIOPEPは 2003年8月にHORIBA ABXグループに加わった。主に止血に使用される最先端のペプチド関連技術が専門で、Pentra 400にはこの技術が応用されている。BIOPEPはまた最新の研究設備を持ち、グループ内にその高度先端試薬の専門知識と革新的な診断技術の開発能力をもたらししている。

### はじめに

BIOPEPは、止血分野に関する試薬の研究及び開発を専門に行っている企業であり、医学研究、分析並びに大量に検体を処理する大型臨床検査室向けに、ペプチドを基礎とした診断薬の開発と製造を行い、市場に出している。こうした市場で、BIOPEPは酵素を利用した比色試験を行う特殊な専門技術企業として認められている。2003年8月にBIOPEPはHORIBA ABXの100%関連子会社となることにより、HORIBAグループの一員となり、革新的なアプリケーションを共同して開発している。

### 止血、優れた専門技術

止血は凝固メカニズムに関するサイエンスであり、血管損傷からの出血を止める働きをコントロールする。止血異常は出血または血栓症（閉塞血管）などを引き起こし、その結果、心筋梗塞、肺塞栓、脳梗塞あるいは静脈炎の原因となっている。先進工業国では心臓血管疾患が死亡の主原因であることを考えねばならない。BIOPEPは、止血分野において、正確で安定性が高く使用しやすい試験キットを提供することで、臨床検査室の作業改善に貢献することを目指している。また、大量の検体を処理する大型臨床検査室や研究的臨床検査室のために、持っているR & D資源を使って、新しく特殊な高性能作業ツールを開発することができる。

### トロンビン/プロトロンビンシステム

トロンビン/プロトロンビンシステムは血液の流動性を調節する。このシステムでは数種類のメカニズムが関係しており、この主なものの一つは、フィブリンの形成及び凝集による血漿粘度の増大である。これは、機能障害が生じた場合、血栓形成を引き起こす。フィブリンはトロンビン（凝固において主要な働きをする酵素）によるフィブリノゲンの切断の結果として生成する。トロンビンは他の一連の凝固因子の活性化によって生じたXa因子によるプロトロンビンの活性化によって生じる。

図1に凝固カスケードとBIOPEPの活動分野を示す。血液凝固は、一方で凝血することによって出血からヒトを保護し、もう一方では血漿流動性を維持して血管の閉塞を予防するというバランスメカニズムから成り立っている。

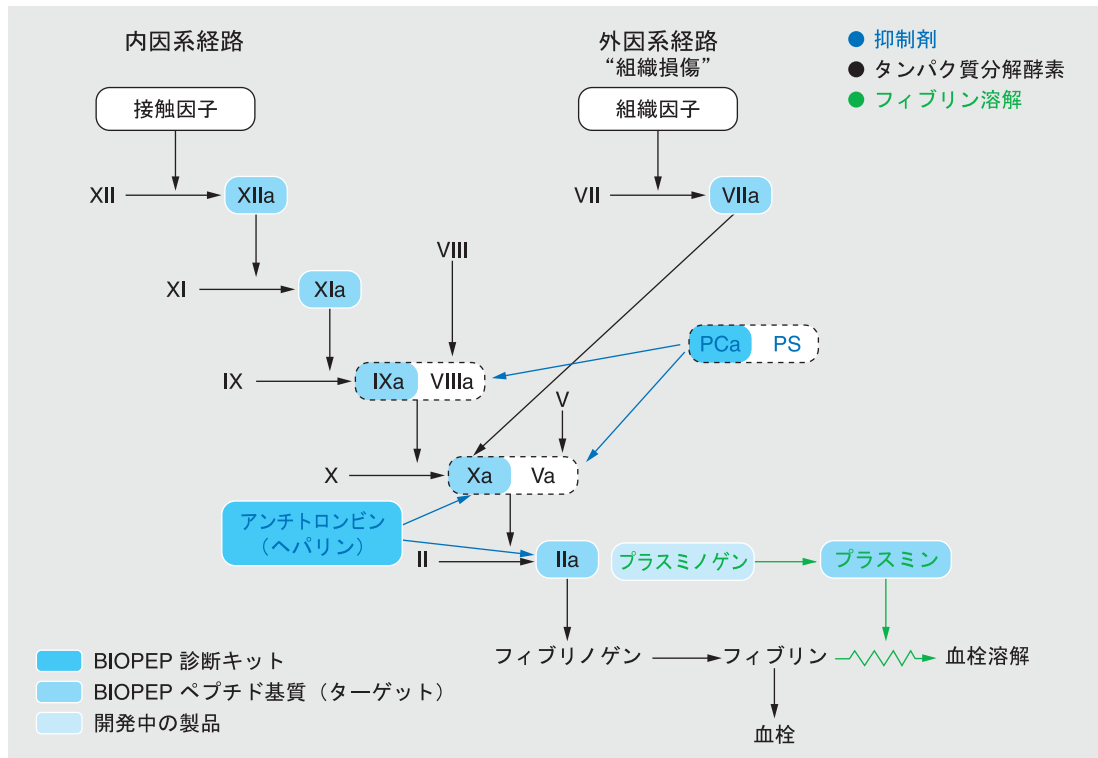


図1 凝固カスケードとBIOPEP活動分野の概略図

：凝固因子名  
 aは活性化状態を示す。  
 PCa:活性化プロテインC  
 PS:プロテインS(プロテインCの補酵素)

## BIOPEP

### ペプチド関連の専門技術

診断に用いるには、タンパク質分解酵素の作用により着色及び蛍光生成物を放出するように(図2)、ペプチド基質をC-末端側で修飾する必要がある。

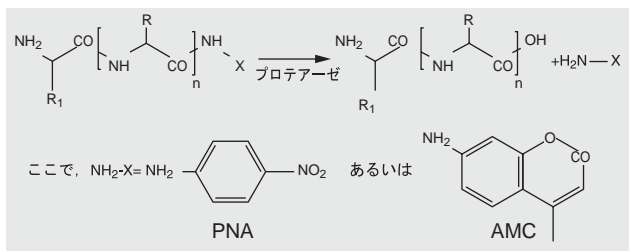


図2 タンパク質分解酵素による着色及び蛍光生成物の放出

BIOPEPが製造している2種類の製品(発色基質及び蛍光基質)が、今日主に使用されている。発色基質については、酵素の加水分解活性によりp-ニトロアニリン(PNA)の放出が誘発される。このPNAは405 nmの分光測光法により定量できる。AMCペプチドに対する同様の活性では7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)が放出される。この物質は蛍光により定量できる。更に、別の研究対象として電位発生基質の開発を行っており、この基質により全血での新しい検出法が提供できる。

## BIOPEPが焦点をあてた4つの開発法

止血及び血栓症に関連のある病理学的分析を行う新しい診断キットのデザイン及び生産。現在入手可能なものよりも更に高性能で有効な診断キットの土台となる新しいペプチドのデザイン及び生産。こうしたペプチドは、測定対象の生体内分子を完全に認識し、その結果は良質な診断検査や薬剤の開発において重要な役割を果たすための“生物学的な鍵”となる。大小に関わらずすべての臨床検査室で生じる作業量に適合するようにBIOPEP試薬の姿形を設計。全血の直接検査を発展させる上で必要のあるツール及び技術の開発。

## 今日のBIOPEP製品

### 診断キット(CE認証)

Chromopep<sup>\*1</sup>キットにより、止血に関する種々のパラメータを判定するためのさまざまな試薬が提供される(ヘパリン、プロテインC、アンチトロンビン、プラスミノゲンなど)。

こうしたそれぞれの試薬は、直線性、安定性、正確性及び実用の点で改良されている(表1)。

表1 Chromopepヘパリンの例

キット	他社	BIOPEP
直線性	0~1 IU/mL	0~2 IU/mL
安定性	1ヶ月	3ヶ月
正確性	4%	2%

\*1: 発色基質関連のBIOPEP商品名。

### 凍結製品(CE認証)

主要なメーカーはすべて市場に凍結乾燥製品を出しているが、BIOPEPは極めて新しい製品概念をお客様に提示している。この凍結血漿は、5分で使用できる状態にあり、凍結乾燥段階とその不都合を取り除いている。その結果、復元の際のエラーだけでなく品質のどのような変化も回避できる。-40~-80℃で保管された血漿は、保管期限が3年で、解凍後8時間まで使用可能であり、健康なドナーから得た新鮮な血漿に匹敵する品質レベルである。

### 研究製品

BIOPEPは、タンパク質、酵素、ペプチド及び発色基質で、100を超える参考文献を出している。

標準製品に加えて、特別な研究室の要求に応じて、ペプチド、発色基質、タンパク質、及び酵素の特別注文に応じた合成に、BIOPEP独自の専門技術と生産設備を使用している。もちろん、European Pharmacopoeias (E.P)及びNorth American Pharmacopoeias (U.S.P)の要求事項に厳密に準拠している。

## BIOPEPの設備

BIOPEPは現在、1,600 m<sup>2</sup>のスペースを持つ実験室で、最新の技術プラットフォームを構築している。事業は主に3つのセンターから編成されている。

### 化学実験室

化学実験室には、ペプチドの合成に必要なすべての資材が備えられている。

ペプチドの合成では、最終生成物を得るために極めて多くの連続的段階(化学結合、蒸発、精製)が必要である。1 mgから10 gの量を作るために使用される多くの合成技術がある。最終的に、ペプチドの生成には約20日間にわたる12のサイクルが必要である。

### 生化学実験室

BIOPEPは近年、新しい診断キットを開発するための生化学検査室を設け、この分野での拡大を狙っている。この検査室は、酵素活性を正確に同定し、測定するために必要な設備(分光測定法、HPLC、電気泳動法など)を備えている。こうしたツールは、今もなお凝固時間の測定(時間測定法)によって判定している他の検査法に代わって、光度測定の原理を応用することを目的としており、更に、全血に対する直接的な革新的技術の開発を継続すること、また特別な“ポイント・オブ・ケア”市場の必要性を満たす検査法を作り出すためのものである。

---

## 製品及び品質管理

診断キットは、酵素及び基質あるいは血漿を内封したいくつかの容器から成り立っている。これらすべての構成要素は、極めて厳密な品質及び製造の要求基準に基づいて生産されており、製造過程の各段階で厳密な検査を行っている。今日、生産された各バッチは数百のキットに使用されているが、既存の施設を使って4倍の生産量に増やすことができるであろう。工程の最後で、BIOPEPはさまざまなお客様向けにキットを梱包、出荷している。バッチ及びキットのトレーサビリティは完全である。

---

## おわりに

従って、BIOPEPは、診断を扱う主な会社が必要としている専門技術を備えている極めて稀な会社の1つである。高い競争力により、BIOPEPは、利用できる資産をすべて活用し、高い付加価値のある高品質で独創的な製品をお客様に提供している。

BIOPEPとHORIBA ABXの大きな相乗効果(特に以下が上げられる)により、成長は約束されている。

国際的な販売ネットワークの大きさだけでなく、  
グループの技能、技術及び資産  
全血試料を対象とした直接的な技術または方法を  
開発するための共同能力  
自動分析器をすべての臨床検査室で使用できる  
ようにし、また診断学分野で更に前進するための  
新しい機器を開発するHORIBA ABXの技術



Norbert Benattar

BIOPEP S.A.  
Marketing & Sales Director



### 超音波による骨強度の定量測定

長岡 洋樹，須崎 琢而，大谷 隆彦，真野 功，堀井 薫

近年、急速な高齢化の進展に伴い骨粗鬆症が重大な社会問題となっている。骨粗鬆症による骨折は、寝たきり状態の直接的原因となり、老人医療費高騰の一因となっている。骨粗鬆症は発症後の治療が困難なため、早期発見と症状の進行抑制が治療の要点とされている。このような社会的背景に基づいて、骨粗鬆症の初期病態を高感度に検出するための骨密度並びに骨強度の超音波による定量測定技術と骨粗鬆症診断システムの開発を目的とした研究成果の概要を紹介する。

#### はじめに

日本は現在、人口の高齢化が急速に進行している世界一の長寿国である。国内の老年人口(65歳以上)は1950年代より一貫して増加傾向にあり、総人口比は2001年時点で約18%(2500万人)、2005年には20%(3100万人)、2010年から2015年には25%を超える見込みである<sup>[1]</sup>。

このような社会の高齢化に伴い、アルツハイマー病や骨粗鬆症患者の増加が社会問題となっている。特に骨粗鬆症による骨折は、脳卒中と共に高齢者の寝たきり状態の直接的原因となり、老人医療費高騰の一因となっている。骨粗鬆症は発症後の治療が困難なため、早期発見と症状の進行抑制が治療の要点とされている。このような社会状況を背景に、骨粗鬆症の早期発見と早期治療と共に若年世代からの予防が要求されている。現在、骨粗鬆症の診断は骨密度を測定することにより骨質の変化を推定して行われている。骨密度の測定には放射線法と超音波法の2通りがあり、測定値の再現性、信頼性が高いことから放射線による骨塩定量測定法が広く用いられている。

本報告では従来の測定法とその問題点について述べると共に、骨粗鬆症の初期病態を高感度に検出するための超音波による新しい骨強度定量計測技術と骨粗鬆症診断システムの開発に関する研究成果の概要を紹介する。

#### 骨粗鬆症の病態

骨粗鬆症は、「低骨量と骨組織の微細構造の劣化により特徴づけられ、骨の脆弱性が亢進し、骨折を起こしやすい状態にある全身的な骨疾患」と定義され<sup>[2]</sup>、その特徴は、以下の通りである。

- 骨塩量の減少
- 骨微細構造の崩壊
- 骨脆弱性の増大
- 易骨折性の増大

骨粗鬆症は骨量が低下する原因によって、他の疾患と無関係に発症する原発性骨粗鬆症と、他の疾患が原因で発症する続発性骨粗鬆症に分類される。近年、高齢化に伴って深刻化しているのは原発性骨粗鬆症であり、主にタイプ(閉経後)骨粗鬆症とタイプ(老人性)骨粗鬆症に分類される。

タイプ(閉経後)骨粗鬆症は、骨吸収を抑えるエストロゲンの欠乏により、骨の代謝回転が亢進(high turnover)して骨吸収が骨形成を上回る結果、骨量が減少する病態で、閉経後の女性に見られる。胸椎・腰椎などの海綿骨に骨萎縮(骨量の吸収)を生じるタイプ(閉経後)骨粗鬆症は、老化による腎・腸機能の低下に伴う活性型ビタミンDの産生低下や、骨の代謝回転の低下(low turnover)により、骨形成の低下が骨吸収の低下よりも進行する病態で、胸椎・腰椎だけでなく、手足の長管骨を構成する皮質骨(cortical bone)にも骨萎縮を生じる。

骨の代謝回転は全身の至るところで行われるが、代謝回転の進行は骨の表面積に比例することから、骨萎縮が最初に始まるのは多孔性網目構造で表面積の広い海綿骨(cancellous bone)である。従って、海綿骨の豊富な部位、例えば大腿骨頭部、踵骨、前腕骨(橈骨・尺骨)の遠位部分などの海綿骨の減少が骨粗鬆症の診断によく用いられる。図1に大腿骨頭部の断面写真を示す。

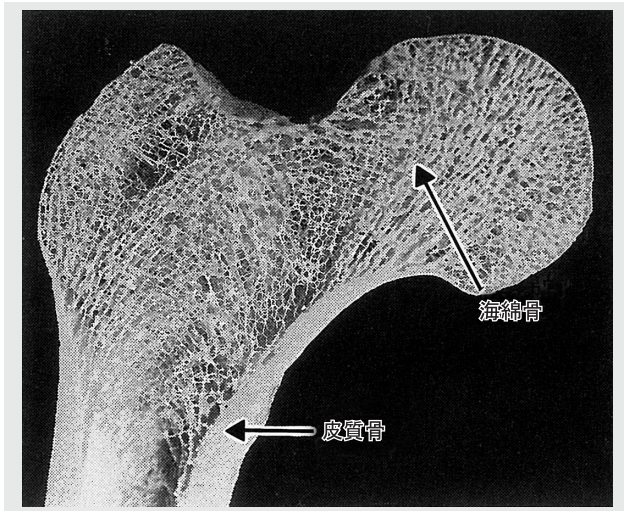


図1 ヒトの大腿骨頭部断面写真<sup>[3]</sup>

## 従来の測定法とその問題点

骨粗鬆症は加齢に伴って骨が脆弱化する病態であることから、その診断には骨折のリスクを非侵襲で測定することが理想である。しかし、現状ではこのような測定法は実現していないため、骨の強度と密接に関係する骨密度または骨塩量を測定して診断を行っている。測定法としては、主として放射線法と超音波法がある。放射線法は、生体組織での放射線の透過・吸収を定量測定できることから、骨粗鬆症の臨床において中心的役割を果たしている。放射線法の代表的な測定法は次の2種類である。

### 2重エネルギーX線吸収法 (Dual energy X-ray Absorption, DXA)

2種の異なるエネルギーのX線を用いて、その吸収割合から骨塩量(面積密度)を測定する。全身骨の測定が可能であり、再現性が非常に良いことから広く診断に利用されている。

### 定量X線CT (Quantitative Computed Tomography, QCT)

骨密度の2次元分布を定量測定できるため、皮質骨と海綿骨を分離して測定することができる。局所測定のため、再検時の位置再現性が問題となることがある。

これら放射線測定の問題点として、以下の項目が挙げられる。

- ・ 測定量が骨塩(主としてリン酸カルシウム)量であるため、力学的骨強度には必ずしも対応しない。
- ・ 放射線被爆への対応として、専門技術者と施設が必要。
- ・ 装置(施設)が大型・高価。
- ・ 上記専門技術者と施設の問題より集団検診によるスクリーニング検査に不適。

一方、超音波法の代表的な測定法は次の2種類である。

### 超音波伝播速度(Sound Of Speed, SOS)

海綿骨部位を透過する超音波の伝搬速度を測定する。一般に踵骨の海綿骨部位で測定される。図2に示すように超音波の伝搬距離  $\chi$  [m] と伝搬時間  $t$  [s] を計測し、伝搬速度  $c$  を、

$$c = \frac{\chi}{t} \text{ [m/s]} \quad (1)$$

によって求める。この時体積弾性定数  $K$  は、

$$K = \rho c^2 \text{ [N/m}^2\text{]} \quad (2)$$

として与えられる。ここで  $\rho$  は海綿骨部位の骨質と骨髄を合わせた体積密度である。 $K$  は骨の弾性すなわち固さを表す。

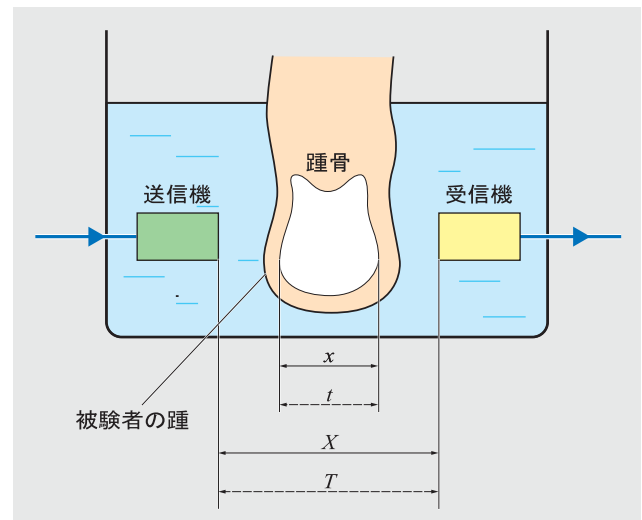


図2 SOSとBUAの測定系

### 超音波減衰定数 (Broadband Ultrasound Attenuation, BUA)

水中で超音波送受波器を対向させ、超音波の周波数を0.1 MHzから2 MHzの範囲で変化させた時の受波超音波の振幅  $P_0$  を測定する。次に踵骨部を送受波器間に挿入して踵骨透過超音波の振幅  $P$  を測定する(図3(a))。各周波数における振幅  $P_0$  と  $P$  の比によって、海綿骨内の減衰量 Attenuation [dB] が得られる。

$$Attenuation = 20 \log_{10} \frac{P}{P_0} \text{ [dB]} \quad (3)$$

この減衰量を周波数0.1 MHzから2 MHzの範囲で図示すると図3(b)のように周波数に対して直線的に増加し、その傾きが骨量に依存する。傾きは骨量が多いほど急になり、この傾きをBUA[dB/MHz]と呼ぶ<sup>[4]</sup>。BUAは一般に広帯域パルス波を送波し、透過波をスペクトル解析することで測定される。

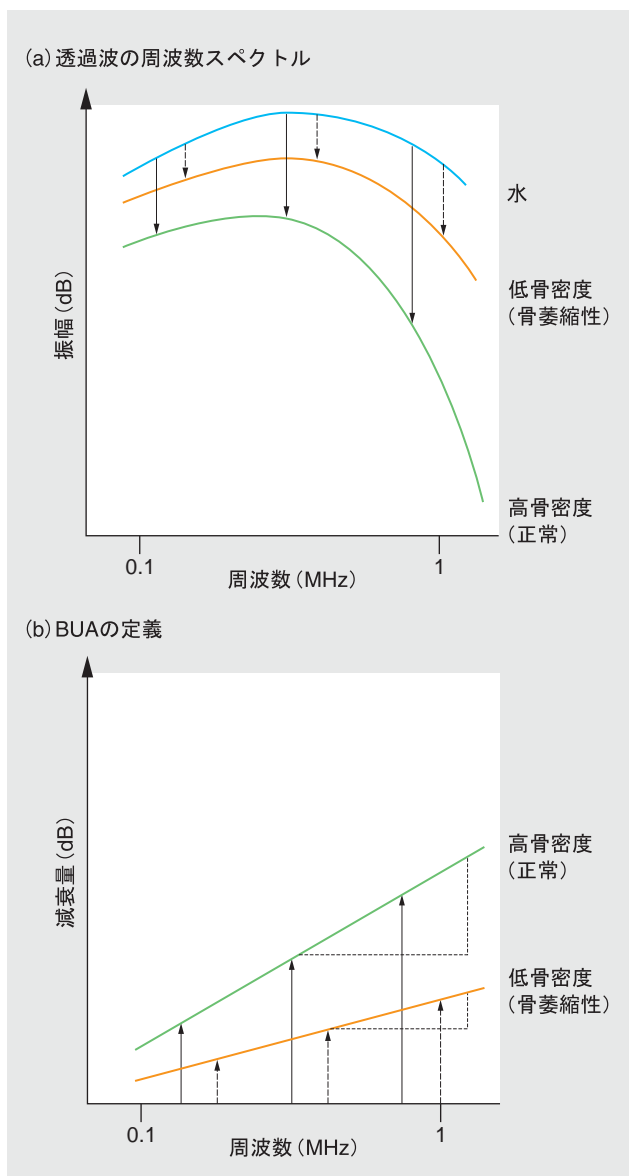


図3 海綿骨透過超音波の周波数特性とBUAの定義

超音波法は弾性振動を利用するため、以下のような特徴があり、骨の評価手法として原理的には多くの可能性を有している。

- 骨の弾性的性質(力学的強度)が評価できる。
- 被爆の危険性がない。
- 装置が小型・軽量(放射線測定と比較して)安価。
- 被爆の危険性がなく、小型・軽量、安価であるため、スクリーニング検査に適切。

しかし、現状はその信頼性が十分でないことから、臨床分野での評価基準は放射線法に依存している。

### 海綿骨内の超音波伝搬特性

物質の弾性振動(超音波)の音速と減衰、及びそれらの周波数特性は物質の基礎的定数であり、この定数を用いて物質の内部構造や性質を評価する手法は物性研究において重要な解析手法の一つである。

生体組織においても、軟組織は比較的均質と見なせるため、SOSとBUAを用いて組織の状態を定量的に評価することは非常に有効な方法である。他方、骨粗鬆症の診断によく用いられる海綿骨部位は多孔性網目構造の骨質部とその内部を満たす骨髄で構成された混合媒体である。このような多孔性媒質内の超音波伝搬現象についてはまだ十分に解明されていない。

近年、海綿骨内では速度の異なる2種類の縦波(高速波、低速波)が同時に伝搬するという特異現象が報告され<sup>[5][9]</sup>、各国の研究者によってこの現象が研究されている<sup>[10][14]</sup>。高速波は主に海綿骨の骨質部分に依存して伝搬し、低速波は骨髄部分に依存して伝搬する音波である。高速波、低速波を利用した骨の測定方法は“骨の超音波診断方法及び骨の診断装置(特許第2863886号)”として権利化されている。

図4に超音波パルスの水中伝搬波形を、図5にウシの大腿骨下端部から切り出した海綿骨試料(厚さ10mm)を透過した超音波パルスを示す。骨密度の違いにより、高速波と低速波の時間間隔及び振幅が変化することがわかる。これら2種類の音波を考慮すると、現在のSOSとBUAを用いた海綿骨部位の骨量または骨質の評価法には次のような問題点があることがわかる。

- 音速で骨量または骨質を評価するためには、高速波成分の音速を用いるべきであるが、従来法では高速波と低速波の2波を分離せずに音速を計測しているため、SOS値は高速波の伝搬速度(約2200~2700 m/s)よりかなり低い値(約1500 m/s)になっている。

- ・ 海綿骨を透過する超音波の振幅は、媒質の吸収減衰量だけでなく、海綿骨と他の媒質との境界面における透過係数にも依存する。また、減衰量と透過係数は高速波と低速波では全く異なる特性を持っている。現在のBUAではこれらの現象が考慮されていない。

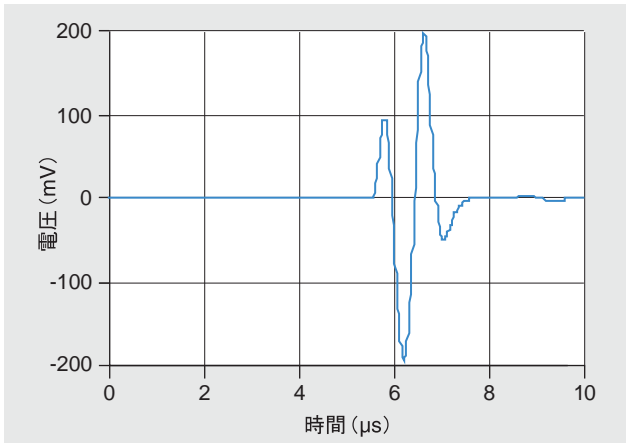


図4 中心周波数1 MHzの超音波パルスの水中伝搬波形<sup>[9]</sup>

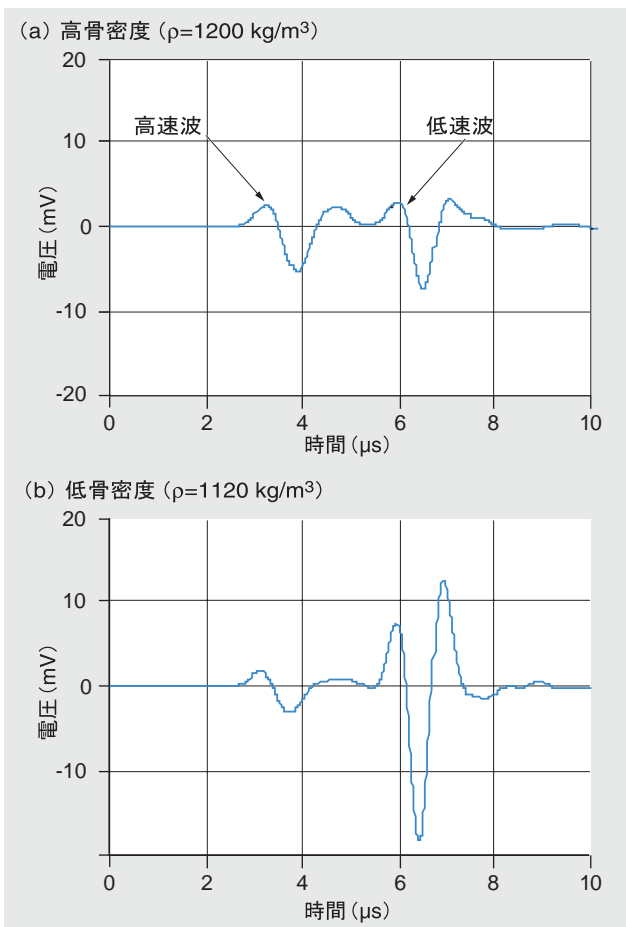


図5 海綿骨透過音波の波形<sup>[9]</sup>

骨密度(骨塩密度)の異なるさまざまな海綿骨試料の高速波と低速波の振幅及び音速の実測値と、X線QCT装置で計測した骨量体積比との関係を図6に示す。

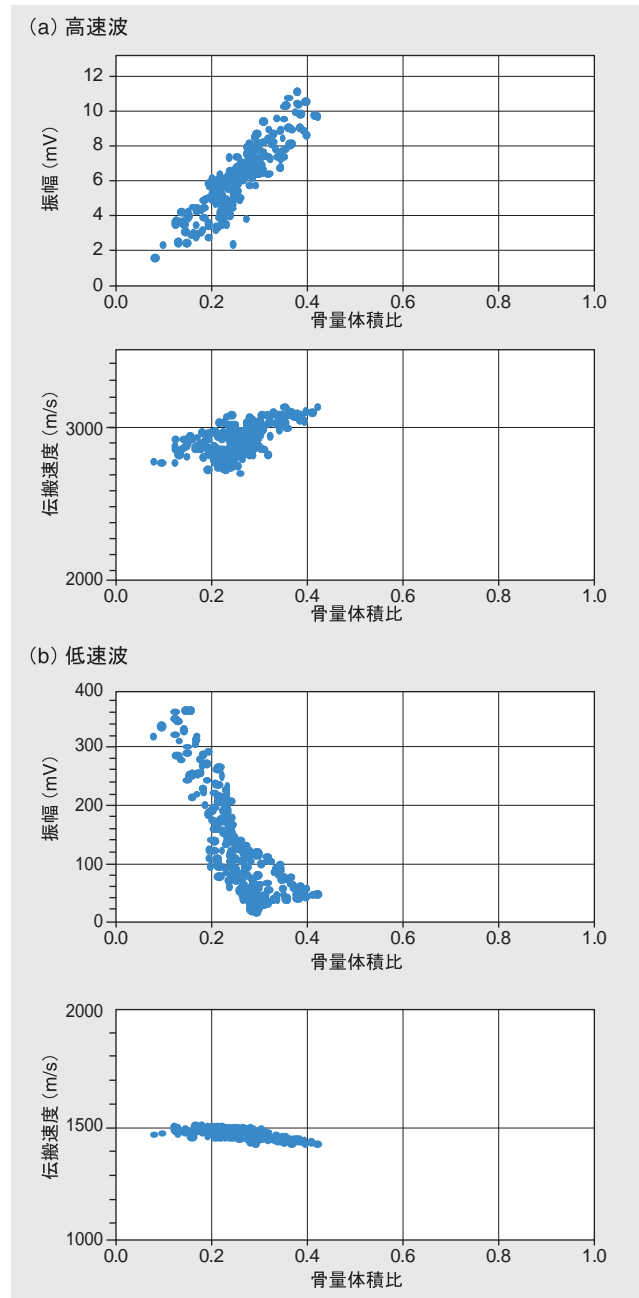


図6 高速波と低速波の振幅及び伝搬速度と骨量体積比の関係<sup>[9]</sup>

高速波の振幅は骨量の増加に伴って比例的に増加しており、これは現在のBUAと逆の現象である。すなわち、現在の超音波法では“骨量が多いほど減衰(BUA)は大”と考えられているが、図6(a)では“高速波成分では骨量が多いほど振幅が増加(減衰は小)”となる。他方、低速波の振幅は骨量の増加に伴って減少しており、BUAと同様の傾向を示す。低速波は主として骨髄を伝搬する音波であることから、BUAは本質的に骨髄量を評価していると考えられる。

また音速は、高速波では骨量の増加と共に増加し、低速波ではほとんど変化しない。

## 骨構造を考慮した骨の定量測定

前章で述べたように、高速波と低速波の振幅及び音速と骨量の間には明確な因果関係が存在する。従って、高速波と低速波の振幅及び音速から、骨塩量や弾性定数を求めることが可能である。

骨粗鬆症による骨量の変化は海綿骨部位で顕著に現れ、皮質骨部位での変化は無視できるとされている。

従って、超音波伝搬経路の海綿骨以外の媒質(水、軟組織、皮質骨)の音響パラメータ(音速、減衰定数、音響インピーダンスまたは透過係数)は定数として扱うことができる。これらの定数を実験によりあらかじめ決定しておけば、高速波と低速波の音速及び減衰定数から *in vivo*(生体内)で骨量の定量計測が可能である。

従来の超音波法は、放射線法で測定される骨塩量と相関の高いISOS及びBUAのみを用いて骨量を相対的に評価してきた。そのため、骨の弾性的性質を評価可能であるという超音波法の長所が生かされておらず、放射線法と比較して計測値の信頼性に欠ける点が臨床的側面から指摘されている。また、医用超音波の研究者からも従来法の問題点に対する指摘と検討が行われている<sup>[15]</sup>。

我々はこのような問題に対処し、超音波の長所を生かした新たな骨量測定法を開発中である。現在、臨床試験用装置でデータを収集中である。図7に、そのイメージ図を示す。



図7 臨床試験用装置イメージ図

## おわりに

骨粗鬆症は大腿骨や脊椎の骨折を引き起こし、高齢者の寝たきり状態の大きな原因となる。近年、骨粗鬆症の初期病態を高感度に検出可能な測定法が望まれている。

我々が開発中の測定法は超音波による骨量の定量測定が可能であり、更に海綿骨部位の弾性的性質を測定できることから、骨の弾性的性質を考慮した新たな骨粗鬆症の診断・治療が可能になると期待している。今後、臨床評価を重ねて早期に製品化し、人々のQuality of Lifeに貢献したい。

参考文献

- [ 1 ] 厚生統計要覧(厚生労働省統計表データベースシステム)第1編,第1章,第1-4表(2004)
- [ 2 ] Consensus Development of Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, The American Journal of Medicine, 94, 646-650(1993)
- [ 3 ] 松本俊夫, 中村利孝, 骨粗鬆症 分子メカニズムから病態・診断・治療まで, 13, 羊土社(1995)
- [ 4 ] C. M. Langton, S. B. Palmer and R. W. Porter, The measurement of broadband ultrasonic attenuation in cancellous bone, Engineering in Medicine, 13, 89-91, MEP Ltd.(1984)
- [ 5 ] A. Hosokawa and T. Otani, Ultrasonic wave propagation in bovine cancellous bone, Journal of the Acoustical Society of America, 101, 558-562(1997)
- [ 6 ] A. Hosokawa, T. Otani, T. Suzaki, Y. Kubo and S. Takai, Influence of Trabecular Structure on Ultrasonic Wave Propagation in Bovine Cancellous Bone, Japanese Journal of Applied Physics, 36, Pt. 1, 3233-3237(1997)
- [ 7 ] A. Hosokawa and T. Otani, Acoustical anisotropy in bovine cancellous bone, Journal of the Acoustical Society of America, 103, Pt. 1, 2718-2722(1998)
- [ 8 ] 大谷隆彦, 骨粗鬆症の進行と超音波の応答, Osteoporosis Japan, 11, 311-316(2003)
- [ 9 ] 大谷隆彦, 超音波による生体内海綿骨の骨量評価, US2003-95, 信学技報(2004)
- [ 10 ] T. J. Haire and C. M. Langton, Biot Theory: A Review of Its Application to Ultrasound Propagation Through Cancellous Bone, Bone, 24, 291-295, Elsevier Science Inc.(1999)
- [ 11 ] E. R. Hughes, T. G. Leighton, G. W. Petley and P. R. White, Ultrasonic propagation in cancellous bone: A new stratified model, Ultrasound in Medicine and Biology, 25, 811-821, Elsevier Science Inc.(1999)
- [ 12 ] T. Otani, R. Takatsu and S. Tanaka, Modelization of acoustic path of cancellous bone and quantitative estimation of bone density, Proceedings of Ultrasonics World Congress 2003, 1165-1168, ISBN 2-9521105-0-6, Societe Francaise d 'Acoustique(2003)
- [ 13 ] L. Cardoso, A. Meunier and C. Oddou, Theoretical and experimental ultrasonic characterization of anisotropic properties in cancellous bone, Proceedings of Ultrasonics World Congress 2003, 1169-1172, ISBN 2-9521105-0-6, Societe Francaise d 'Acoustique(2003)
- [ 14 ] R. Barkmann, W. Timm, R. Scheffczyk, E-M. Lochmuller and C-C. Gluer, Fast wave propagation in the epiphysis of human finger phalanges-associations between ultrasound variables and structure of trabecular bone, Proceedings of Ultrasonics World Congress 2003, 1173-1176, ISBN 2-9521105-0-6, Societe Francaise d 'Acoustique(2003)
- [ 15 ] P. H. F. Nicholson, Quantitative ultrasound of bone: Myth and reality, Proceedings of Ultrasonics World Congress 2003, 883-889, ISBN 2-9521105-0-6, Societe Francaise d 'Acoustique(2003)



長岡洋樹  
Hiroki Nagaoka  
医用システム開発部



須崎琢而  
Takuji Suzaki  
開発センター  
バイオ関連プロジェクト  
マネージャー  
理学博士



大谷隆彦  
Takahiko Otani, DSc.  
同志社大学  
工学部  
教授



真野 功  
Isao Mano  
応用電機株式会社  
技術本部  
メディカルプロジェクト



堀井 薫  
Kaoru Horii  
応用電機株式会社  
技術本部  
メディカルプロジェクト

# Guest Forum

## 代謝異常による種々の体内形成結石の分析技術の高度化に向けて

三好 憲雄 , 中田 靖 , 沼田 朋子 , 田中 悟

病理解剖時に発見・採取した胆嚢内結石に対し慎重に面出し・研磨(16 mm × 13 mm)を行い,ラマン分光顕微鏡(LabRam, HR-800)を使用して,中央の窪みを中心とした8 mm × 6 mmの広範囲な領域と窪みを中心に2 mm × 2 mm矩形に絞った領域のラマン分光スペクトルを測定した。また同領域に対しX線分析顕微鏡(XGT-5000)で元素マッピングを行った。その結果,腎臓結石とは異なり,中心はリン酸カルシウムではなく,リン酸系成分が亜鉛と結合した核であった。中心核の外縁に小さな年輪状の形成が見られ,その周囲にはカルシウムをベースにしたシュウ酸カルシウム成分や未知成分のカルシウム塩が観測できた。更に,その外側は大きな年輪状で,リン酸系成分が主体となって形成していることが考えられた。

### はじめに

従来から代謝異常による種々の体内形成結石の臨床検査技術として,赤外線吸収スペクトル分析技術はあるが,限界がある。例えば,赤外線吸収スペクトルでは結石全体の各成分の平均比率は明らかになるが,各成分の空間的位置関係,特に結石の核となる成分の特定ができない。この生体内形成特有の不均一性,特にその核となる成分の特定は,結石形成の仕組みを明らかにするだけでなく,今後の再発防止に結びつく食事療法や投与薬の選定にも貢献する。今回この結石の微小領域における核成分の画像観測が,ラマン分光顕微鏡とX線分析顕微鏡によるスペクトル計測とマッピング計測により初めて可能になったので報告する。本稿が臨床検査技術の高度化に向けての一助となれば幸いである。

### 分析材料と分析方法

#### 分析材料

病理解剖時に発見・採取した胆嚢内結石を慎重に面出し・研磨(16 mm × 13 mm)を行い,光学顕微鏡像による観測,ラマン分光顕微鏡とX線分析顕微鏡によるスペクトル計測とマッピング計測に使用した。

#### ラマン分光計測方法

ラマン分光顕微鏡(LabRam, HR-800)を使用して,上記の胆嚢結石のスペクトル計測とマッピング計測を行った。検出器は近赤外域測定用InGaAs検出器を,システム・プログラムはLabRam-LacSpe4.10を使用した。また励起光源としてはNd-YAGレーザの1064 nm光を使用した。測定条件として,1本のスペクトル計測時間は5秒で,積算回数は1回,グレーティング刻線数は150本で,中心波数が $1199.86\text{ cm}^{-1}$ であった。そのピンホールの直径サイズは420  $\mu\text{m}$ であった。また,マッピングの条件は100  $\mu\text{m}$ ステップで,計測範囲は8 mm × 6 mm(X-Y軸で $81 \times 61 = 4941$ ポイント)あるいは2 mm × 2 mm(拡大時:X-Y軸で $21 \times 21 = 441$ ポイント)の領域であった。

サンプル中央の窪みの内部は凹凸が激しいため、焦点深度を深くするために低倍率の対物レンズ(焦点距離40 mm)を用いた。胆嚢結石中央の窪みを計測する時の焦点位置は、窪みの底に設定した。そのため、窪み周辺部のラマン散乱の集光率は中央部よりかなり弱くなっているため、周辺の他の構成成分との関連性を知るためのマッピング像では、窪み中央部のゲインに対して約2.5倍上げて表示した。

### X線分析方法

胆嚢結石の核となる所がもろく、面出しを行うと中心部がはがれ落ちてしまい窪みができた。その窪みはラマン分光顕微鏡では、凹凸があるために前項で述べたように正確な計測ができずにいた。比較的凹凸影響を受けにくいX線分析顕微鏡(XGT-5000)を併用して、上記の窪み(直径が1.7 mmのほぼ円形)を中心とした胆嚢結石のマッピング計測を行った。RhターゲットのX線管を使用し、その管電流は50 kV、管電流は1 mAであった。測定条件としては、X線の照射スポット直径が10  $\mu\text{m}$ のXGT(X線ガイドチューブ)を使用して、上記の窪みを中心にして5 mm  $\times$  5 mm矩形の領域をマッピングした。

## 分析結果

### 光学顕微鏡像

胆嚢結石を研磨した面(16 mm  $\times$  13 mm)の光学顕微鏡の写真を図1に示す。褐色のリング状の帯の内側の窪みは、直径が1.7 mmのほぼ円形をしているが、更にその窪みの中心部は0.8 mm  $\times$  0.2 mmの大きさの楕円形で盛り上がっている部分も観測された。従って、窪みはリング状で、面出しのための研磨で脆くも面出し面から剥がれ落ちた部分である。

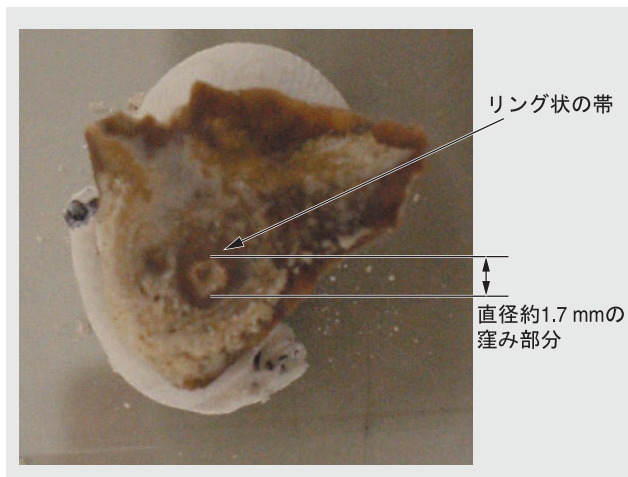


図1 胆嚢結石研磨面の光学顕微鏡写真

### ラマン分光計測

窪みを中心として8 mm  $\times$  6 mmの広範囲のラマン分光スペクトルで933.16 - 940.54  $\text{cm}^{-1}$ のピーク値をマッピングした像を図2に提示する。この2重のリング状部は、まさに体内結石形成の共通の特長を示す。ピークの波数位置から、リン酸成分の帯に対応していることが考えられた。

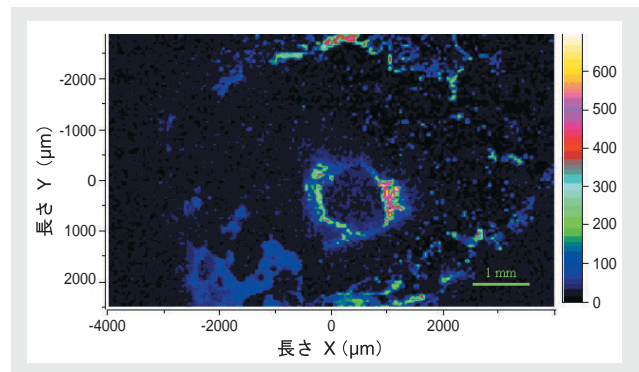


図2 胆嚢結石研磨面の広範囲ラマン分光マッピング像

マッピング像での窪みを中心に、2 mm矩形に絞ってマッピング測定して得られた全スペクトル441本の重ね書きを図3に示す。最も強いピークは960.97-984.33  $\text{cm}^{-1}$ の領域Rで、リン酸系成分と考えられる。また、1466.89-1505.42  $\text{cm}^{-1}$ の領域Gで表されるものは、シュウ酸系成分と考えられた。更に507.00-529.74  $\text{cm}^{-1}$ の領域Bで現されるものは、現在のところ成分の特定には至っていない。

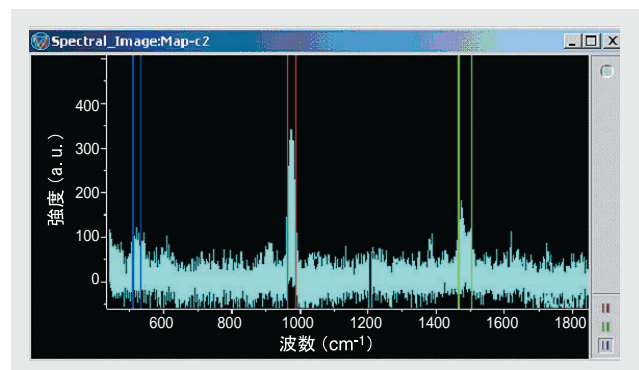


図3 胆嚢結石の窪み部マッピング測定的全スペクトル重ね書き  
窪み部を中心に2 mm矩形の領域を測定した。赤線、緑線、青線で囲まれた領域は、それぞれ領域R(960.97-984.33  $\text{cm}^{-1}$ )、領域G(1466.89-1505.42  $\text{cm}^{-1}$ )、領域B(507.00-529.74  $\text{cm}^{-1}$ )である。



図3のスペクトルピークに対応するピーク強度を、それぞれRは赤色、Gが緑色、Bが青色と色を変えて1つのマッピング像に合成したものが、図4になる。窪み周辺部の緑色と青色の部分はラマン散乱強度が弱く影になる部分が多いため、ゲインを赤色のゲインに対して2.5倍上げて表示をしてある。このカラーイメージ像からは、年輪の中心部となる核の部分には、かなりの強度でリン酸系成分が集積し、その周囲にはシュウ酸や他の成分が分布していることが考えられる。

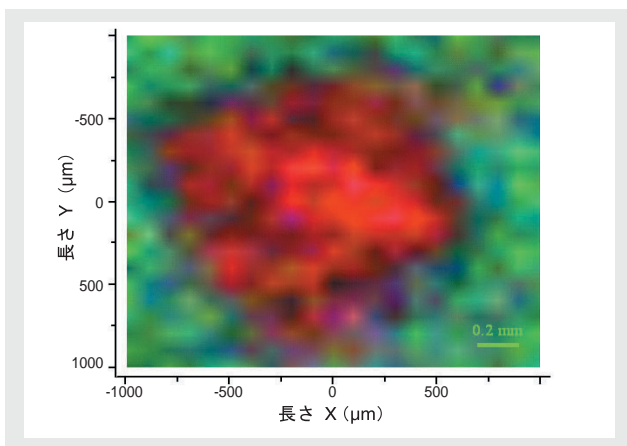


図4 ラマン分光マッピングによる胆嚢結石窪み部のカラーイメージ (RGB合成像)

赤 (R) 緑 (G) 青 (B) は図3で指定した領域に対応している。

### X線分析

ラマン分光計測における窪みで陰になる部分のラマン散乱光の減弱化をカバーするために、X線分析顕微鏡 (XGT) の元素マッピングを行い、その像を図5 (a)、(b)、(c) に示す。図5 (a) のリン (P) 成分の画像では、ラマン分光マッピング像 (図2を90°時計の左回りに移動したものに図5 (a) は相当すると思われる) に比較して、リング状の外側の帯が強く太く出ている点で若干の差異が認められるものの、中心部のリン成分の分布が明瞭に観測されており、この領域がリン酸系成分であるというラマン分光計測の結果を裏付ける。図5 (b) の亜鉛 (Zn) 成分像からは、中心部のリン成分分布とよく対応して小さいリング状の部分と窪み部に亜鉛成分が含まれていることがわかった。また、窪み以外の周囲にはほとんどカルシウム (Ca) がベースに分布していることが、図5 (c) から伺い知ることができる。中心部の亜鉛成分分布は、ちょうどリン酸系成分の領域と一致しているように思われた。従って、腎臓結石のように、中心にはリン酸カルシウムではなくて、むしろリン酸と亜鉛との結合をきっかけで核を形成していると考えられる。

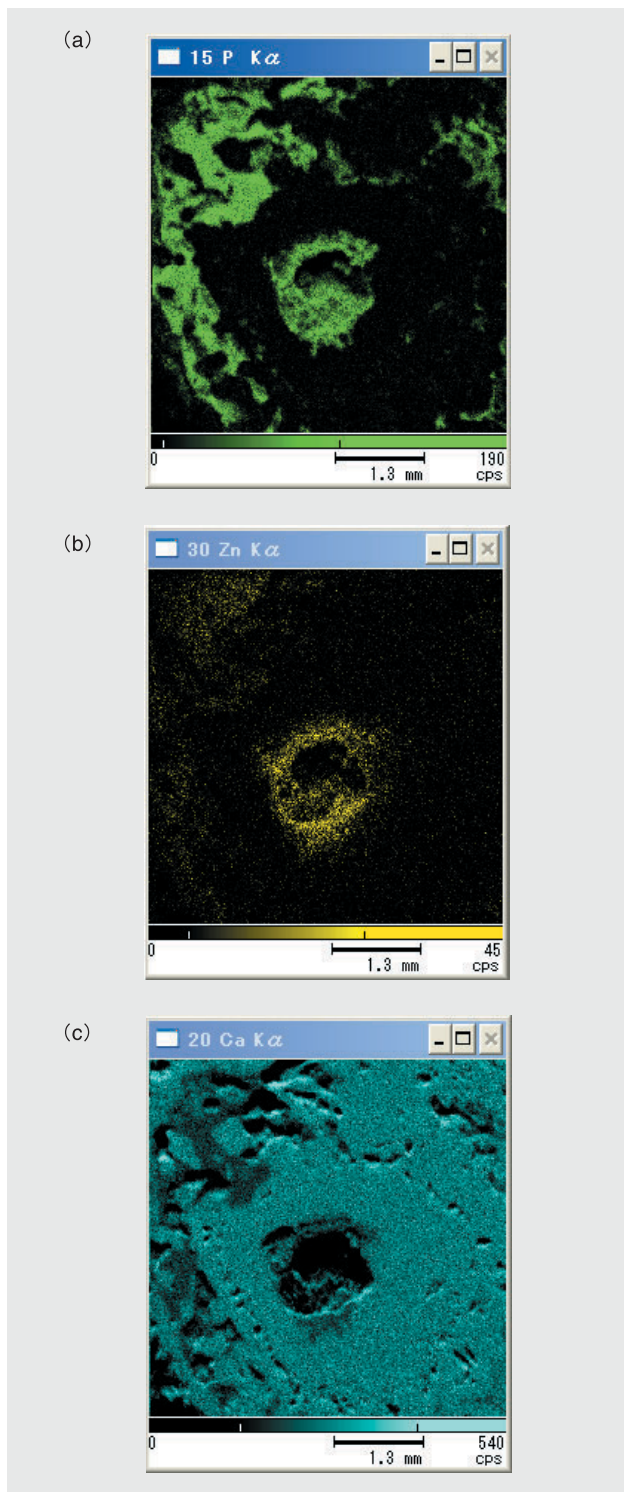


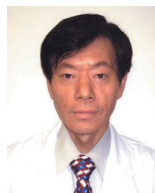
図5 X線分析顕微鏡 (XGT) による胆嚢結石の元素マッピング (a) リン (P) (b) 亜鉛 (Zn) (c) カルシウム (Ca)

## おわりに

この胆嚢結石の場合は、結石の中心核にはリン酸系成分が亜鉛と結合して核を形成し、小さな年輪を形成している。その核の周囲にはカルシウムをベースにしたシュウ酸カルシウム成分や未知の成分とカルシウム塩形成の観測ができた。また2番目の大きな年輪形成には、リン酸系成分を主体に形成していることが考えられた。しかし、これら核形成や年輪形成に関与する成分が体内の代謝異常系のどこから来るかは、明らかにされたわけではない。これまでの臨床検査技術である赤外吸収スペクトル分析からは到底予測できない、高度で臨床に貴重な分析情報を得ることができたことは、今後、体内結石専用の安価で、簡易でしかも高度な臨床検査機器を開発することに期待が持てる。そのためには、まず種々の結石に対するラマン分光スペクトルのライブラリをスタンダードの計測も含めて構築することの方が先決のように思われる。

### 参考文献

- [1] H. Ishida, R. Kamoto, S. Uchida, A. Ishitani, Y. Osaki, K. Iriyama, E. Tsukie, K. Shibata, F. Ishihara, and H. Kameda, Raman Microprobe and Fourier Transform-Infrared Microsampling Studies of the Microstructure of Gallstones, *Appl. Spectros.*, 41, 407( 1987 )



三好 憲雄

Norio Miyoshi, PhD, Dr. Med. Sci.

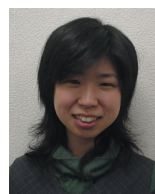
福井大学  
医学部 病因病態医学講座 腫瘍病理学  
医学博士，農学博士



中田 靖

Yasushi Nakata

分析センター  
テクニカルプラザ  
博士（理学）



沼田 朋子

Tomoko Numata

分析センター  
テクニカルプラザ



田中 悟

Satoru Tanaka

分析センター  
テクニカルプラザ

# Selected Article

一般論文

## 唾液緩衝能測定装置 チェックバフ™

野村 聡

HORIBAは、個人差のある唾液の緩衝能をハンディ型pHメータを利用して簡便に計測できる装置を開発した。個人の酸緩衝能を評価するために、東京医科歯科大学と協力し、むし歯外来を訪れた患者116名の唾液に、酸溶液を少量ずつ滴下して混合した時のpH変化を測定し酸緩衝能曲線を得た。HORIBAは、この緩衝能評価実験を簡素化して、歯科医の診察室で簡便に使用できるように、一定量の酸滴下時のpH値で唾液緩衝能を測定する装置「チェックバフ™」を世界に先駆けて実用化した。チェックバフは、患者から採取した唾液をハンディ型pHメータのセンサ上にのせ、初期pH値を測定。その後、酸溶液を唾液に滴下して混合し、混和後の最終pH値を読み取り、唾液酸緩衝能を評価するものである。

### はじめに

HORIBAは、歯科医向けの唾液緩衝能測定装置チェックバフ™を世界に先駆けて実用化した。近年、歯科医の役割が「発症したむし歯を治療すること」から「むし歯の発生を未然に防ぎ、一生歯を健全に維持させること」にシフトしつつある。また「仮に発症して治療する場合でも、できる限り自然な状態を維持すること」も重要視されている。このような新たな発想での歯科治療を実践するためには、むし歯発生の原因に立脚した測定を行い、その測定結果に応じた適切な予防処置を行うことが重要である。その測定内容として、唾液の性状や口の中に存在するむし歯原因菌の数を調べる方法が広まりつつある。チェックバフは、むし歯の発症を防ぐために必要な測定の中でも非常に重要な唾液緩衝能を、一般開業歯科医の診察室において簡便でかつ迅速に測定できるものである。本稿では、歯科治療の現状と其中でのチェックバフの役割、チェックバフの測定原理と構成、使用方法などについて述べる。

### 歯科における唾液緩衝能測定の意義

むし歯は、口の中に存在するむし歯原因菌が飲食のたびに供給される炭水化物を摂取して酸を産生し、その酸が歯を溶解させることにより引き起こされる。一方で、我々の唾液には、産生された酸の力を弱める緩衝能が備わっており、この緩衝能が我々の歯をむし歯の発生から守っている。ところが緩衝能は個人差や年齢差があり、その大小がむし歯発生に寄与するファクタの一つとなる。このため、歯科医院における唾液の緩衝能評価は、患者のむし歯発生の可能性を予測する上での重要な参考情報となり、歯科医院において患者をむし歯にさせないための予防処置を想定する一助となり得る。仮にむし歯にかかってしまった患者に対しても、治療期間中や治療後において再発防止策を検討する上での一助となりうる。

## 唾液緩衝能の測定法と臨床評価例

緩衝能は、一定の試料に対し一定量の酸又はアルカリを加えた時にpHの値がどのように変化するかを測定することで、定量的に評価を行うことができる。むし歯発生の視点では、唾液の酸に対する緩衝能を測定するので、一定量の唾液に一定量の酸を滴下した時にpHの値がどのように変動するかを測定すればよい。

このような測定は、研究室レベルでは半世紀以上前からpH色素やpHメータを用いた測定例が報告され、その重要性が認識されてきた。しかし、これらの測定例はあくまで比較的少量の唾液を採取して、実験器具や計測機器が整った環境で化学実験のスキルを有する研究者が行うことを前提としたものであり、歯科医の診察室での測定を想定したものではなかった。そこで、HORIBAは、東京医科歯科大学の協力のもと、ハンディ型pHメータを用いて、患者の唾液緩衝能をその場で測る方法を検討し、下記の実験を行った。

この実験では、東京医科歯科大学歯学部附属病院むし歯外来を訪れた患者116名の唾液に、酸溶液を少量ずつ滴下して混合し、その時のpH値を測定し、酸の滴下量に対するpHの変動を示す酸緩衝能曲線を求めた(図1)。用いたハンディ型pHメータは、センサ上で唾液と酸溶液を混合しながら測定ができる形状になっているので、一定量の唾液をセンサ上にのせて測定した後、酸溶液を10  $\mu$ l滴下・混合してpHを測定する操作を容易に繰り返すことができる。得られた酸緩衝能曲線から、患者によってより少ない酸の滴下で変曲点を示す場合と、より多い酸の滴下でも変曲点を示さない場合に分かれることが確認され、個人の緩衝能に応じた酸緩衝能曲線を得られることが確認できた。

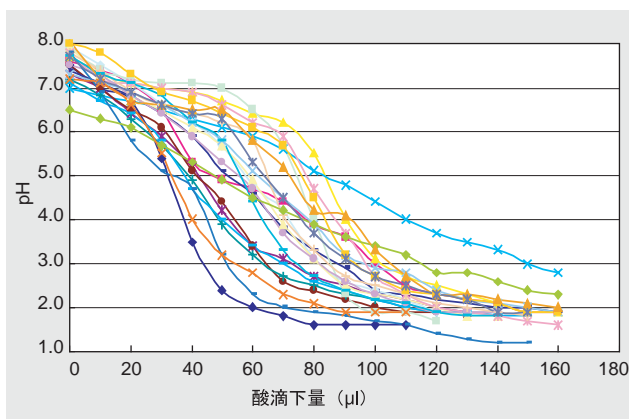


図1 酸溶液を滴下、混合した時の唾液pHの変動  
東京医科歯科大学 田上順次教授 ご提供

## チェックバフの開発コンセプトと構成

チェックバフは前項で述べた緩衝能評価実験を、より簡便に歯科医のチェアサイドで実現できるように開発した測定装置である。まず、測定方法自体を上述の酸緩衝能曲線を得る方法から更に簡素化し、一定量の酸滴下時のpH値を測定し、その時のpH値の大小で唾液緩衝能の大小を定量的に評価することとした。種々の検討の結果、一定量の唾液を採取して一定量の酸を滴下、混合し、その時の値が5.8以上を示す場合には緩衝能が高い、4.8以上5.8未満の場合には緩衝能は中程度、4.8未満の場合には緩衝能が低いと判定するようにした。開発に際しては煩雑な化学実験要素をできるだけ排除し、簡便な操作でできる限り正確な測定ができることに重点を置いた。また、装置並びに付属品のデザインや、取り扱い説明資料におけるデザインは、歯科において「測る」ということが、できる限り患者にとって身近に感じられるように配慮した。また、患者向けの説明資料には、「唾液緩衝能」という専門用語を「唾液の力」と表現するなど、歯科における計測の普及に寄与する配慮を徹底した。

装置の構成は、pHの測定にはハンディ型pHメータを改良したのを用い、一定量の唾液採取や一定量の酸液の滴下のためには次に述べる付属品をセットとして付属させている。まず、唾液の採取には、化学実験的な要素を排除するためにスポイト感覚で使える簡易ピペットを開発し、使いきりのピペットチップを付属させた。酸溶液の滴下には、酸溶液を1回の評価に必要な分量をボトルに充填し検査ごとに酸滴下量の調整が不要となるようにした。この酸溶液には、「むし歯は、歯に対して酸の負荷がかかって生じるもの」といったイメージを想像できるように、「酸負荷液」という名称をつけた。この他にも、歯学的な見地から必要とされている唾液分泌を促す味のないガムと、唾液の分泌量を平行して計量できるメスシリンダを付属させた(図2)。



図2 チェックバフの構成

## チェックバフによる検査の手順

チェックバフによる唾液緩衝能測定の手順を述べる。まず、患者に唾液採取用ガムを5分間噛ませて唾液を採取する。唾液を付属のメスシリンダに吐き出させ、5分間にどれだけの唾液が溜まったかを計量する。唾液量の測定は、緩衝能評価とは別にむし歯予防のための検査で広く行われているもので、チェックバフでも唾液を採取する過程で共通で実施できるようにした。次に、付属の唾液採取用ピペットを用いてサンプル唾液をハンディ型pHメータのセンサ上にのせ、初期pH値を測定し記録する(図3(a))。この、初期pHを測定することも、チェックバフの特徴と言える。というのも、初期pHを示した上で、後述の酸混合後のpH値を示すこと(図3(b)(c))、測定内容や唾液の役割をより患者に説明しやすくなるからである。その後、酸負荷液を開封しセンサ上の唾液に滴下して混合する。30秒混和後の最終pH値を読み取り、この値にて各患者の唾液酸緩衝能(3段階:強い、普通、弱い)を評価する。別売の振とう器を用いる場合は、あらかじめ装置本体を振とう器に載せた状態で上記の操作を行う。

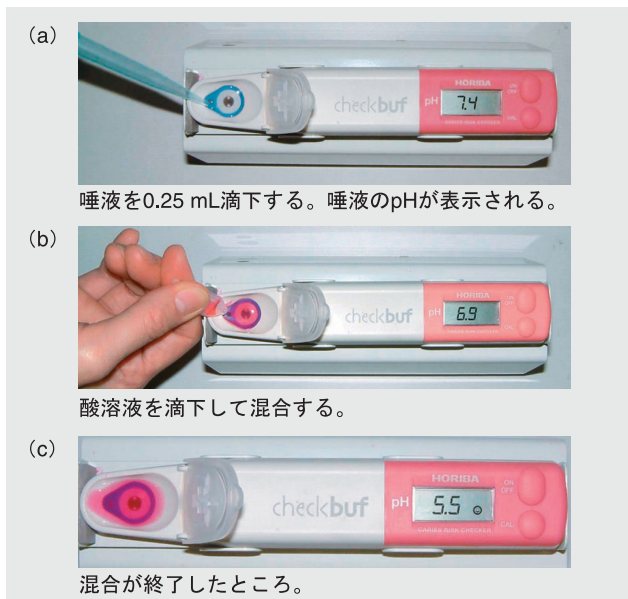


図3 チェックバフによる唾液緩衝能の評価方法

## チェックバフと既存法との比較

これまで歯科医における唾液緩衝能評価は、酸溶液を染みこませたpH試験紙(以下、緩衝能ストリップス)が用いられてきたが、緩衝能ストリップスでは、呈色の境界領域では緩衝能の判定に使用者が迷う他、唾液の性状や滴下の仕方によって呈色が異なるなど、使用者を悩ませ、かつ、正確な評価を妨げる要因があった。チェックバフでは、pHメータの改良と付属品の工夫により、これらの

問題をクリアし簡便ながらもデジタル表示で正確な評価を実現した。また、チェックバフは、緩衝能ストリップスよりも検査コストを大幅に抑えられるように、徹底的に低コスト化を図っている。なお、チェックバフは、唾液緩衝能の判定結果が、緩衝能ストリップスでの判定結果と同じになるように酸負荷液を調製しており、表1に示すように、両者の間に良好な一致が見られることも確認されている。このため、既に緩衝能ストリップスを用いた評価を導入していた歯科医院でも、容易にチェックバフへ置き換えることが可能である。

表1 緩衝能ストリップスとチェックバフの相関

緩衝能ストリップス 呈色	緩衝能ストリップス 緩衝能判定	チェックバフ 検査値	チェックバフ 緩衝能判定
青	強い	6.5	強い
青	強い	6.4	強い
青	強い	6.4	強い
青	強い	6.4	強い
青	強い	6.4	強い
青	強い	6.1	強い
青	強い	5.9	強い
青	強い	5.9	強い
青	強い	5.9	強い
青	強い	5.8	強い
青	強い	5.8	強い
青	強い	5.8	強い
青	強い	5.8	強い
青	強い	5.7	普通
緑	普通	5.9	強い
緑	普通	5.7	普通
緑	普通	5.7	普通
緑	普通	5.7	普通
緑	普通	5.4	普通
緑	普通	5.2	普通
緑	普通	4.9	普通
緑	普通	5.1	普通
緑	普通	5.0	普通
緑	普通	4.9	普通
緑	普通	4.7	弱い
緑	普通	4.5	弱い
黄	弱い	4.8	普通
黄	弱い	4.7	弱い

## チェックバフの今後の展望


以上述べてきたように、既に緩衝能ストリップスを用いた評価を導入していた歯科医院でも容易にチェックバフへ置き換えることが可能である。また、これまで唾液の測定を実施していなかった歯科医院でも、チェックバフを導入することで、歯科医院としての予防に対するポリシーを確立すると共に、来院患者に予防の重要性を認識させようという事例もある。

またチェックバフで採用したハンディ型pHメータについては、これまでもHORIBAにおいて身近な液体のpHを測定できることをセールスポイントとしてきたが、むし歯予防の観点から身近な液体測定を、学校教育の現場などに活用することも可能である。図4に、理科や保健教育を兼ねたチェックバフの実験例を挙げる。

## おわりに


チェックバフは、診察室の患者の目の前で唾液緩衝能評価を実施でき、かつ、結果をその場で見せられることから、患者に“測ること”に対する興味をわかせる、むし歯予防への動機づけを行うことが可能である。このような装置は、冒頭で述べた歯科医の役割がシフトしてきた今日では、非常に重要なツールになるものと考えられる。また、歯科医の診察室のみならず、理科や保健教育を兼ねた活用など、チェックバフのむし歯予防への貢献がますます期待されるものと思われる。

**1** センサにスポーツ飲料を載せてpHを測定




pH3.6で酸性を示します。

**2** そこに、水道水を、ほぼ同じだけ追加します。



ところが、pH 3.6でほとんど変わりません。

**3** 今度は、**1**と同じようにスポーツ飲料をセンサに載せた後、唾液を同じ量だけ追加します。



どうでしょう。唾液が入ったスポーツ飲料のpHはなんと、5.5 pHまで戻りました。

唾液には、このように酸性から中性の方に戻す力\*があります。  
\* “唾液の質”と説明される場合もあります。

液体	固形物
スポイトなどでセンサに載せます。(約1cc) 例) 飲料水・醤油・ジュース等々	スポイトなどでセンサに載せます。 例) 梅干・レモン・りんご・刺身等々 (水分が必要です)
フレッシュミルク 6.8 pH	梅干 2.3 pH

梅干の様な非常に酸性の強いものを見て唾液が自然に出てくるのは、一刻も早く口の中のpHを中性に戻そうと本能的な、反応かもしれませんね！

※本実験の後には、センサを十分に水で洗浄してください。。

図4 チェックバフを使った唾液の実験例



野村 聡

Satoshi Nomura

開発センター  
MEMS プロジェクト  
マネージャー  
博士(工学)

# Selected Article

一般論文

## ホリバ・バイオテクノロジーの研究開発 ライフサイエンス関連分野における先端計測技術の動向

奥村 弘一

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー(HBT)は、HORIBAの技術と大学発の研究成果に加え、NEDO等のナショナルプロジェクトへの参加による成果として、環境中の微量化学物質に対する高感度検出・計測技術開発に必要な測定装置開発の基盤技術を確立してきた。今後、この技術はライフサイエンス分野への展開が期待でき、特にタンパク質の機能を網羅的に解析するプロテオーム解析への適用を目指したバイオセンサ技術開発が期待できる。

### はじめに

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー(HBT)は、先端バイオテクノロジーを駆使した残留農薬やダイオキシンなどの計測技術の開発を目指して、2000年6月に設立された。本稿では、HBTの設立背景及び現在までの研究開発の経緯を紹介する。また、近年進展の著しいライフサイエンス関連分野における、先端計測技術の動向及び今後の研究開発の方向性などを紹介する。

### 研究開発の経緯

HBTは、HORIBAが開発した技術シーズの事業化を目指して2000年6月に設立された。神戸大学遺伝子実験センターの大川秀郎教授(当時、現福山大学教授)の研究成果とHORIBAの分析機器に関する技術力の融合による新規技術開発を目指した。大川教授の特定対象物質と選択的に反応する抗体を利用した超微量物質の検出に関する研究成果とHORIBAの有する半導体センサを使った計測機器の製品化技術、HBTは両者のシーズと基盤技術を最大限に活用し、会社設立以来、他に類をみない農業・環境分野へ適用可能な製品化を行っている。

HBTの技術力及びその社会性が高く評価され、HBTは設立当初からさまざまな省庁及び関連団体のナショナルプロジェクトに参画している。創立間もなく通商産業省(当時)が推進する研究開発プロジェクト“エコモニタリングプロジェクト”に参加し、“生物の持つ機能を利用した環境中化学物質の高感度検出・計測技術の開発”に着手した。この成果として、環境中の微量化学物質に対する高感度検出・計測技術開発に必要な新規バイオセンサ及び測定装置開発の基盤技術を確立した。更に、本年度はプロジェクトの最終年度にあたり、これまでに得られた研究成果を発展させ、免疫化学測定法を応用した環境負荷化学物質検出用キットの開発を行っている。2002年には、本社社屋をHORIBAから移転し、研究・生産棟を設置し本格的に事業を開始した。また、近畿経済産業局が推進する新規ナショナルプロジェクト“環境負荷化学物質の迅速・簡便・廉価な測定システムの開発”に参加し、食品中の残留農薬を分析するためのシステム開発を目的に各種設備機器の充実を図り、研究開発環境を整備した。2004年3月にプロジェクトを終了し、2004年9月に最終評価が実施され、事業化に向けた研究成果が非常に高く評価された。この成果は、本年9月に東京ビッグサイトで発表・展示した。

2003年には、独立行政法人NEDO技術開発機構より基盤技術研究促進事業（民間基盤技術研究支援制度）として、エコモニタリングプロジェクトの成果を基に「遺伝子発現評価の高感度即時検出型標準化に向けたセンサの開発」を受託した。このプロジェクトは、現在注目されているライフサイエンス分野において必要とされる遺伝子発現評価のための高感度検出・計測機器開発を目的としている。

2004年5月には新たに新研究棟（図1）を開設し、遺伝子・タンパク質関連の先端分析機器の研究開発に必要な分析機器を整備・充実させた。特に、NEDO基盤技術開発事業の開発を集中的に実施するために専用の研究室を設置した。この研究室には、定量PCR装置（図2a）や生体分子間相互作用解析装置（図2b）等のライフサイエンス研究に必要な基盤分析機器を設置した。

以上の成果の一部は、2004年9月に開催されたバイオ関係の展示会BioJapan2004で展示された。

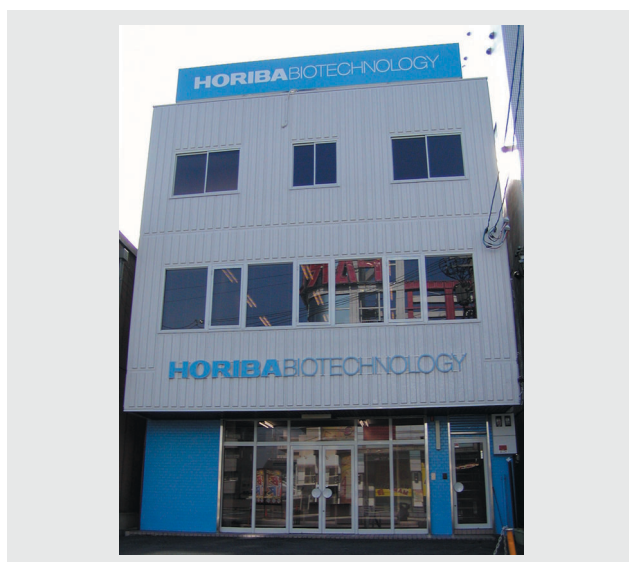


図1 新研究棟

a) 定量PCR装置



b) 生体分子間相互作用解析装置



図2 定量PCR装置と生体分子間相互作用解析装置

## ライフサイエンス分野関連の研究動向と計測機器

1990年代後半より、ヒト、酵母、イネ等の種々の生物で全DNA情報が急速に解析され、2003年4月にはヒトの全DNAの解読を目指したヒトゲノムプロジェクトに終了宣言が出され、ヒトの全遺伝子の塩基配列情報が報告された。DNAは、細胞の核に存在するデオキシリボ核酸という物質であり、すべての生物はこのDNAの配列情報をもとに生体内の生命活動を営んでいる。この意味で、DNAは生命の設計図とも称されている。

しかし、生体内における生命活動の実際の担い手は、タンパク質であり、この機能を正確に理解することが生命を理解するために重要となっている。例えば、酵素はこのタンパク質の一種であり、生体内の種々の反応を触媒する。すべてのタンパク質は、DNA遺伝子情報を鋳型に、その翻訳産物として生成される。ヒトの全遺伝子配列から、タンパク質はヒトの場合約3万程度と推定されており、そのうち60%はすでにある程度の機能が推定されている。しかし、残り40%のタンパク質を含めて正確



な機能や生成された各々のタンパク質の相互作用はまだ未解明である。

ゲノム解析後、遺伝子の翻訳産物であるタンパク質の全機能を解明する研究がポストゲノム研究として世界的に注目され、日本でもタンパク3000をはじめとした国家プロジェクトにおいて精力的に研究が行われている。ポストゲノム研究において、1つの生物組織や細胞に発現しているタンパク質全体(プロテーム: proteomeと称されている)の動態と個々のタンパク質の相互作用を観察し、タンパク質の機能を網羅的に解析するプロテオーム解析が重要となっている。このようなタンパク質全体を対象とする研究は、プロテオミクス( proteomics )と称されるが、その研究戦略と必要とされる分析技術の概略を表1に示す。

表1 プロテオミクスの研究戦略

研究	分析法
発現解析	プロテオーム (質量分析、2次元電気泳動、HPLC) トランスクリプトーム( DNAチップ解析)
立体構造解析	NMR X線解析 電子顕微鏡
相互作用解析	酵母two-hybrid法 表面プラズモン法 プロテインチップ法
遺伝子変異生物	遺伝子欠損個体 ランダム遺伝子変異個体 SNP解析

実験医学増刊「探索から機能解析へ向かうプロテオミクス時代のタンパク質研究」編集:宮崎香,岡田雅人,羊土社刊より<sup>[1]</sup>

表1に示すようにプロテオーム解析における基盤技術の一つは、タンパク質に対する質量分析法である。質量分析法のタンパク質解析に対する重要性は、田中耕一氏のノーベル化学賞受賞にも反映されている。質量分析計の性能向上及びそのアプリケーションの技術開発が現在も精力的に行われている。

質量分析計を使用した解析法としては、MALDI-TOF/MS( matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 )やESI-MS/MS( electrospray ionization-tandem mass spectrometry: エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法 )などから得られた分析結果とタンパク質・核酸配列データベースで検索して発現タンパク質を同定する解析方法が主流となっている。また、質量分析法と並んで重要なプロテオーム解析法が分離技術であり、これには2次元電気泳動法と高速液体クロマトグラフィ( HPLC )が使用されている。

2次元電気泳動法は、タンパク質を等電点と分子量の差に基づいてゲル1枚の上に2000~10000個のスポットに分離する。図3に大腸菌での電気泳動像を示す。



図3 大腸菌菌体調製試料の2次元電気泳動像

HPLC法では、タンパク質試料からペプチドを調製・分離後、質量分析及び解析を行う。HPLC装置は質量分析計とオンラインで連結することができるので、試料の分離からデータ解析までプロセスの自動化が可能である。発現タンパク質の大規模解析結果から、多くのタンパク質は生体内で単独ではなく、他のタンパク質と複合体を形成して存在していることが明らかになってきた。しかも、タンパク質複合体はお互いにより高次のネットワークを構成していることも示された。

これらの解析においてタンパク質の相互作用を解析する方法としては、酵母の発現系を使用した分子生物学的方法と並んで表面プラズモン法、QCM法やプロテインチップの使用等のバイオセンサを活用した方法が使用されている。特に、表面プラズモンセンサとLC-MS/MSの組み合わせのようなセンサと分離技術の併用による大規模解析が期待されている。

現在精力的に行われているポストゲノム解析から得られる成果は、画期的な創薬や治療法開発につながるものが期待されている。

## HBTにおける先端分析機器の研究開発

現在、HBTは農業・環境分野における先端計測機器を目指し研究開発を行い、残留農薬分析システムの販売を端緒に、事業を展開している。HBTは、小分子量の物質を対象とした抗体開発及びこれに関連した遺伝子操作技術に高い技術力を有している。研究開発から得られた計測技術は、農業・環境分野との高い共通性のあるライフサ

イェンス分野への計測機器開発への展開も期待される。前項記載のようにプロテオーム解析におけるタンパク質の機能解明の鍵は、タンパク質相互作用の解析法にある。この相互作用解析において、バイオセンサの果たす役割は極めて重要である。HBTは、HORIBAの高い半導体技術を基に生体分子の相互作用を解析するためのバイオセンサ開発を行っている。HORIBA保有の半導体であるケミカルCCD(図4)は、日本発の独創的なチップであると評価されており、デバイス上の電荷変化を計測できる独自のバイオセンサを開発できる可能性が大きい。特に、DNA相互作用を計測するための電荷変化計測型装置の開発に向けて、研究開発の経緯に記載したように昨年度NEDO技術開発機構より研究受託し、現在精力的に研究開発を行っている。CCDセンサは、半導体センサであるため多素子化が容易であり、上記の網羅的なタンパク質相互作用解析の様な生体分子間相互作用解析に最適と考えられる。

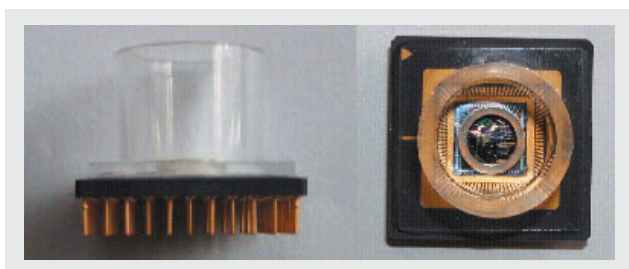


図4 ケミカルCCDデバイス

## おわりに

ヒトゲノムプロジェクトの速やかな解析完了には、DNAシーケンサの高性能化とバイオインフォマティクスの発展がキーとなった。また、プロテオーム解析には質量分析計の技術革新がある。欧米やアジアを含めて展開されているライフサイエンス研究分野においては、基礎研究と創薬等の開発の距離が極めて近く、独創的な先端分析機器の開発は技術面ばかりでなく市場性の面からも極めて重要と言える。

HBTの研究開発は、農業・環境分野への計測機器開発を行うと同時に、その技術を更にライフサイエンス分野に対する計測機器も視野においたものに展開していくことになる。

## 参考文献

- [1] 宮崎 香, 概論 新しい時代のタンパク質研究, 実験医学 20(増刊) (2002)



奥村 弘一

Koichi Okumura

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー  
バイオシステム開発部  
部長  
工学博士

# HORIBAの発明が 「日本弁理士会会長賞」を受賞!



左から  
山尾泰生  
代表取締役社長  
堀場 厚  
奥 成博



賞状



メダル



受賞パネル

2004年5月26日、東京ホテルオークラにおいて全国発明表彰式が開催され、堀場製作所の発明が表彰されました。本年は、社団法人発明協会創立100周年にあたる年でもあり、天皇皇后両陛下のご臨席を仰ぎ、また小泉首相も出席される中、「創立100周年記念式典」並びに「全国発明表彰式」が盛大に挙行されました。今回初めて、堀場製作所の発明「全血を用いた血漿成分の免疫測定法」が「日本弁理士会会長賞」を、そして堀場製作所に「発明実施功労賞」が贈られ、100周年記念の日本を代表する発明の表彰式において、HORIBAの歴史に残る快挙となりました。HORIBAグループ関係各位にお礼申し上げます。

## 全国発明表彰

全国発明表彰は、1919年に第1回帝国発明表彰としての開催に始まり、文部科学省、経済産業省、特許庁、日本経済団体連合会、日本商工会議所、日本弁理士会、朝日新聞社の後援により、発明を完成した人、実施に尽力した人、発明の指導・奨励・育成に貢献した人を顕彰することにより、発明の奨励・育成を図り、わが国の科学技術の向上と産業の振興に寄与することを目的に、毎年開催されています。この発明表彰は、皇室の発明奨励に対する特別な思召により毎年御下賜金を拝受し、特に功績顕著な発明者に恩賜発明賞が贈呈されています。

### 日本弁理士会会長賞

山尾 泰生

(株)堀場製作所

生産センター 科学医用生産部 医用製品チーム  
マネージャー

奥 成博

(株)堀場製作所

医用システム統括部 医用システム開発部  
部長

“全血を用いた血漿成分の免疫測定法”

本発明実施製品:自動血球計数CRP測定装置

(LC-175 CRP, LC-170 CRP, FL-270 CRP, LT-120)

特許番号:特許第3249919号



自動血球計数CRP測定装置  
LC-175CRP

### 発明実施功労賞

堀場 厚

(株)堀場製作所

代表取締役社長

## 発明の意義

この発明は、医院・診療所などの医療現場においてすばやくそして簡単に的確な炎症診断ができることを目的に開発されたものであり、直接全血を試料として用いることを可能とした免疫測定方法です。

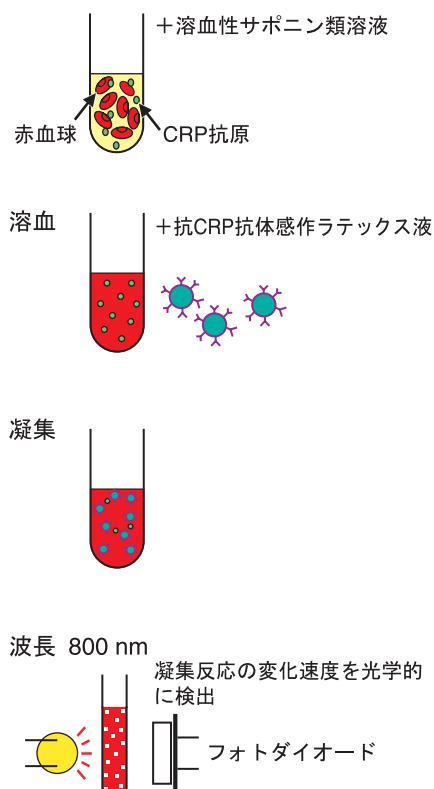
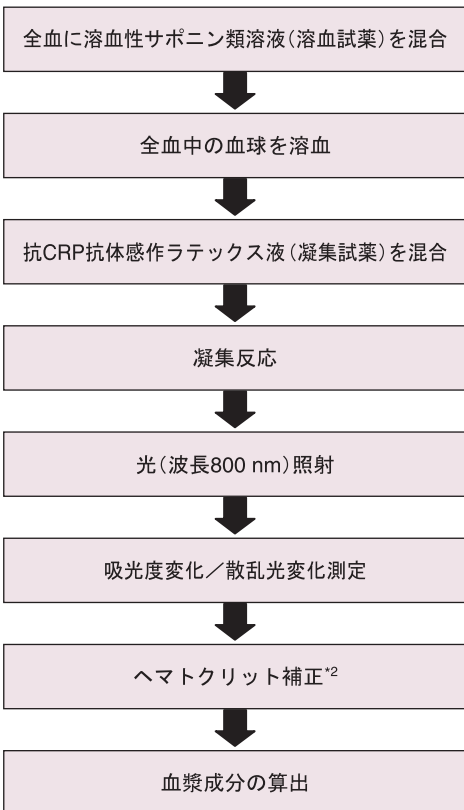
従来、免疫血清検査など臨床検査においては、検体の溶血<sup>\*1</sup>をできるだけ避けることが検査手法上の常識とされてきました。しかしこの既成概念にとらわれず、この発明は、免疫反応に影響しない方法によって血球を故意にまた強制的に溶血させた試料を用いることで、遠心分離機などを使う血液の前処理を不要とし、各種のラテックス免疫比濁法試薬と組み合わせて、簡単にしかも短時間で精度のよいデータを得ることができます。

\*1: 赤血球が壊れること

例えばこの発明の実施製品では、感染症の診断に重要なC-反応性蛋白(CRP)と血球計数測定(白血球・赤血球・ヘモグロビンなど全18項目)を、従来は2~3mLの採血量が必要であったのに対し、たった18μLの血液で、また従来測定に30分以上かかっていたものを260秒で測定できます。これは、LC-175CRP及び検査試薬のプロイムテストCRPとして商品化しており、現在日本では約3,800台、海外では約800台が稼働しています。臨床検査は、診断学上現代医学になくはならないものであり、血液検査はその代表的な検査の一つです。白血球は急性の炎症に対して増加が認められており、医院や診療所でのプライマリー検査として高い意義を持っています。一方、免疫血清検査のC-反応性蛋白は急性炎症において極端に増加するため、組織破壊・急性炎症・感染症の診断に効果を発揮します。そして血液検査と免疫血清検査を組み合わせることで、細菌性感染症とウィルス性感染症の診断に有効な指標となります。

この発明により、ドクターは検査後直ちに確定診断を行い治療を開始することができます。確定診断がすばやく行えるため、抗生物質投与やレントゲン検査の機会減少、入院判断など適切な医療処理が可能となり、再来院の減少など医療費抑制と経済的負担の軽減を図ることができます。また微量検体にしたことで、特に小児など患者の身体的な負担も軽減されました。

発明の内容



\*2: 全血試料中の血漿成分の中に測定したい物質が存在し、赤血球中にその物質が存在しない場合、正確に血漿中の目的成分の濃度を求めるには、試料のヘマトクリット値を求めて補正することが必要となる。

## 発明者の喜びの声

この発明を通じて、CRPという測定項目に出会えたこと、そしてHORIBA ABXと共同開発できたことは大きな喜びです。また製品にはたくさんの方々の「思い」がこもっており、その代表としてこの賞を頂いたと思っております。この受賞が、HORIBAグループ医用事業のますますの発展につながり、また若いHORIBAグループの技術者の励みになれば、より一層の喜びとなります。



山尾 泰生

この発明は新製品市場調査で、白血球数とCRP濃度が初期の感染症診断に非常に有効との情報を得て、その同時測定を目指し開発する中で生まれました。この装置は日本だけではなく海外でも、特に小児科、緊急検査に有効な装置として受け入れられ医療の発展に役立っており、開発者として嬉しく思っています。



奥 成博

## 粒径分布測定装置

【登録番号】 特許第 3393817 号

【発明者】 東川 喜昭，伊串 達夫，  
伊東 俊哉，境 行男

### 分野・目的

本発明は、分散している粒子群にレーザー光を照射することによって生じる回折/散乱光を検出し、その散乱光等の強度分布に基づいて粒子群の粒径分布を測定する粒径分布測定装置に関する。この粒径分布測定装置は、セメントや窯業などのほとんどの鉱工業分野、セラミックスを中心とする新素材分野などにおいて、原材料の研究開発及び品質管理などに用いられる。

従来、新素材分野、特にセラミックスや高分子分野においては、サブミクロン領域の粒子を測定するため、単一の装置で比較的大きな粒子からサブミクロン領域の粒子まで測定することができる装置が用いられていた。

しかし、従来の粒径分布測定装置は、セルとリングディテクタとの間に集光レンズを設けていたこと、このような集光レンズの配置に伴い、フォトセンサの配置空間を広くとらざるを得なかったことなどから、大がかりなものとなっていた。

そこで、本発明は、広範囲にわたる粒子の粒径分布測定の要請に応えつつ、装置構成の小型化及びコンパクト化を図るものである。

### 概要

本発明は、次の特徴を有するものである。すなわち、セル内に分散した粒子群にレーザー光源からレーザー光を照射した時に生じる回折/散乱光のうち、散乱角が小さな散乱光の光強度を前方のリングディテクタによって検出し、散乱角が大きな散乱光の光強度を複数のフォトセンサによって検出し、それらのリングディテクタ及びフォトセンサからの散乱光強度信号に基づいて粒子群における粒径分布を測定するようにした装置において、レーザー光源とセルとの間に集光レンズを設け、この集光レンズによって前記リングディテクタ上に焦点を結ぶように収斂するレーザー光を前記セル内の分散した粒子群に照射するようにしたことを特徴とするものである。

### 効果

このように、本発明は、レーザー光源とセルとの間に集光レンズを設け、この集光レンズによってリングディテクタ上に焦点を結ぶように収斂するレーザー光をセル内の分散した粒子群に照射するようにしているので、従来のようにセルとリングディテクタとの間に集光レンズを設けなくても、粒子径の比較的大きな粒子によって生ずる小さな散乱角の散乱光を散乱角ごとにリングディテクタ上に集光することができる。

このため、レーザー光源からリングディテクタまでの光路長を、従来のものより短くすることができる。

そして、従来のようにセルとリングディテクタとの間に集光レンズを設けていないので、散乱光の光路が十分に確保され、散乱角に相当する任意の位置にフォトセンサを配置することが可能となり、大幅に光学系の設計の自由度を高めることができる。

従って、広範囲にわたる粒子の粒径分布測定の要請に応えつつ、装置構成を小型かつコンパクトに構成することができる。

その結果、スペースを問わず、小さな研究室や手狭な生産ラインにも装置導入が容易になり、新素材開発及び粉粒体製品・それを原料とする製品の品質向上に更に貢献することが期待される。

## 実施形態

セルの一方の側(後方側)に、平行なレーザー光を発するレーザー光源が設けられる。そして、そのレーザー光源とセルとの間には集光レンズが設けられ、この集光レンズによりレーザー光源からの光が適宜収斂された光となって、セル内の試料液に照射される。

セルの他の側(前方側)にはリングディテクタが設けられ、このリングディテクタは、セルを通過した光が焦点を結ぶ位置に配置されている。このリングディテクタは、集光レンズの光軸を中心として互いに半径の異なるリング状または半リング状の受光面を持つ素子を複数個同心円状に配列したもので構成されている。

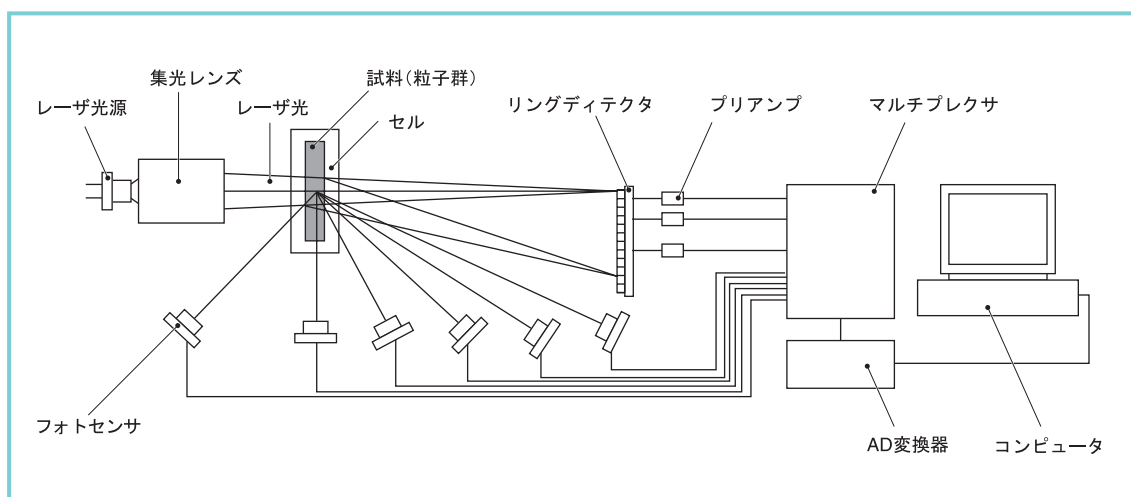
また、セルの近傍には、セル内の粒子によって回折または散乱した光のうち比較的大きな角度で散乱/回折した光を、散乱角ごとに個別に検出する広角散乱光用光検出器群としての複数のフォトセンサが設けられている。この複数のフォトセンサは、それぞれの配置角度に応じて、セル内の粒子による所定角度以上の散乱光を検出する。すなわち、前方に設けたフォトセンサで前記リングディテクタで受光できない前方散乱光を、側方に設けたフォトセンサで、散乱角90度付近の側方散乱光を、後方に設けたフォトセンサで後方散乱光をそれぞれ検出する。

そして、リングディテクタ及び各フォトセンサは、プリアンプを経てマルチプレクサと接続され、更にAD変換器及びコンピュータに接続されている。

リングディテクタの各素子及び各フォトセンサで検出した光強度は、アナログ電気信号に変換され、プリアンプを経てマルチプレクサに所定の順序で順次取り込まれ、AD変換器で順次デジタル信号に変換された後、更にコンピュータに入力される。

コンピュータにおいては、粒径分布を求めるためのプログラムが格納されており、リングディテクタ及びフォトセンサによってそれぞれ得られた散乱角ごとの光強度データを、フラウンホーファ回折理論やミー散乱理論に基づいて処理し、演算結果などをディスプレイやプリンタ等へ出力する。

このように本発明の粒径分布測定装置は、小型かつコンパクトな構成でありながら、粒径の比較的大きなものから粒径の微小なものまで広い範囲にわたって粒径分布を一挙に求めることができる。





# 社外発表リスト

## 口頭発表

2004年1月～6月

標題	発表者名	発表機関 開催場所	発表日
Improvement of Modal Mass Analysis with Analyzer Hardware Optimization and Mathematically Enhanced Response Time	浅野一朗 / 中村博司 / 宮井 優 / 足立正之 / 細井賢三*	SAE World Congress [ Cabo Center, Detroit, Michigan ]	3/10
Resting and Stimulated Saliva Buffer Test using Handy-type pH Meter	北迫勇一* / 杜塚美千代* / 池田正臣* / R. M. Foxton* / 野村 聡 田上順次*	The IADR/AADR/CADR 82nd General Session [ Hawaii Convention Center ]	3/11
Detection of Acid Diffusion Through Bovine Dentine After Adhesive Application	平石典子* / 北迫勇一* / 二階堂 徹* / 田上順次* / 野村 聡 * 東京医科歯科大学	The IADR/AADR/CADR 82nd General Session [ Hawaii Convention Center ]	3/12
POCTに役立つ小型電極式血糖測定装置の紹介	村松 哲	日本臨床検査自動化学会第18回春季セミナー [ 広島国際会議場 ]	4/3
不活性ガス融解炉を用いた鉄鋼中硫黄のICP直接分析法の検討	内原 博 / 池田昌彦 / 中原武利*	* 大阪府立大学大学院 第65回分析化学討論会 [ 琉球大学 ]	5/16
ガス炭炭におけるCO <sub>2</sub> 測定精度を向上させた分析システム	藤原雅彦 / 水谷 浩	日本熱処理技術協会第58回講演大会 [ 東京工業大学 ]	5/25
Development of a new UVF Analyzer with O <sub>3</sub> Injection for Measurement of SO <sub>x</sub> and TRS in Vehicle Emission	中村博司 / 浅野一朗 / 大橋秀樹 / 足立正之	SAE Fuels & Lubricants Meeting [ Centre de Congress Pierre Baudis, Toulouse ]	6/8
Application of ZrO <sub>2</sub> -type Nox Sensor for On-board Measurements of Engine Emissions	木原信隆 / 日下竹史	24th CIMAC World Congress on Combustion Engine Technology [ Kyoto International Conference Hall ]	6/10
超小型親指サイズ電子顕微鏡でMEMSの発展に貢献～MEMSで造る, MEMSを測る～	粟田正吾	日経BP MEMSソリューション2004 [ 東京コンファレンスセンター ]	6/25
Development of a photon correlation spectroscopy instrument to measure exactsize distribution of single nanoparticles	山口哲司	Particles 2004 [ Rosen Centre Hotel, Orlando ]	3/9
Charaterization of nanoparticle suspensions by dynamic light scattering	山口哲司	Particles 2004 [ Rosen Centre Hotel, Orlando ]	3/7
Development of a new UVF Analyzer with O <sub>3</sub> Injection for Measurement of SO <sub>x</sub> and TRS in Vehicle Emission	中村博司 / 浅野一朗 / 大橋秀樹 / 足立正之	SAE Fuels & Lubricants Meeting [ Centre de Congress Pierre Baudis, Toulouse ]	6/8
Application of ZrO <sub>2</sub> -type Nox Sensor for On-board Measurements of Engine Emissions	木原信隆 / 日下竹史	24th CIMAC World Congress on Combustion Engine Technology [ Kyoto International Conference Hall ]	6/10
超小型親指サイズ電子顕微鏡でMEMSの発展に貢献～MEMSで造る, MEMSを測る～	粟田正吾	日経BP MEMSソリューション2004 [ 東京コンファレンスセンター ]	6/25
Development of a photon correlation spectroscopy instrument to measure exactsize distribution of single nanoparticles	山口哲司	Particles 2004 [ Rosen Centre Hotel, Orlando ]	3/9
Charaterization of nanoparticle suspensions by dynamic light scattering	山口哲司	Particles 2004 [ Rosen Centre Hotel, Orlando ]	3/7
pH Meter to Comply with FDA 21 CFR Part11	小林剛士	PITTCON 2004 [ McCormick Place, Chicago ]	3/8

標題

発表者名

社外発表者 所属

発表手段

Development of a new UVF Analyzer with O<sub>3</sub> Injection for Measurement of SO<sub>x</sub> and TRS in Vehicle Emission

中村博司 / 浅野一朗 / 大橋秀樹 / 足立正之

SAE 2004-01-1959

Improvement of Modal Mass Analysis with Analyzer Hardware Optimization and Mathematically Enhanced Response Time

浅野一朗 / 中村博司 / 宮井 優 / 足立正之 / 細井賢三 \*

\* 財団法人日本自動車研究所

SAE 2004-01-0970

Application of ZrO<sub>2</sub>-type Nox Sensor for On-board Measurements of Engine Emissions

木原信隆 / 日下竹史

24th CIMAC World Congress on Combustion Engine Technology Paper No.169

省エネ運転管理システムの開発  
- 実態調査からのアプローチ -

石倉理有 / 橋本明浩

「日本物流学会誌」2004年第12号, P.41-P.48

半導体関係産業向け事業継続ガイドライン

増見達生\*1/黄野吉博\*2/徳田光雄\*3/永井良典/井深成仁\*4/木戸茂之\*5

\*1 レーザーテック株式会社 \*2 SEMI ジャパン \*3 株式会社日立ハイテク  
\*4 東京エレクトロン株式会社 \*5 有限会社エスディエス

「半導体関係産業向け事業継続ガイドライン」

エンジン排気計測技術の国際動向とわが国の技術水準

中村成男

「自動車技術」2004年1月号, P.93-P.98

動的光散乱式粒子径分布測定装置「LB-550」

篠崎陽子

「コンパーテック」2004年5月号, P.84-P.86

関西の「ものづくり産業」のさらなる活性化のために 2. ものづくりクラスター協議会の研究活動(1) センサ技術実用化研究会環境分科会

松田耕一郎 / 玉置 純\*

\* 立命館大学

「経済産業公報近畿版新春特集号」No.15427, 平成16年1月5日, P.36

Tour manager

西川智子 / 足立正之

「Testing technology international」2004, February, P.62-P.63

Direct solid sampling conductive heating vaporisation system for the determination of sulfur in steel without chemical treatment by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES)

内原 博 / 池田昌彦 / 中原武利\*

\* 大阪府立大学大学院

「Journal of Analytical Atomic Spectrometry」2004, No.19, P.654-P.655

Characteristics of High-Resolution Hemoglobin Measurement Microchip Integrated with Signal Processing Circuit

野田俊彦\* / 高尾英邦\* / 足木光昭\* / 衣斐寛之 / 澤田和明\* / 石田 誠\*

\* 豊橋技術科学大学

「Japanese Journal of Applied Physics」2004, Vol.43, No.4B, P.2392-P.2396

The Pilot-less Laboratory System

河邨 浩

「AutoTechnology」2004, April, Vol.No.4, P.54-P.57



---

---

**Readout HORIBA Technical Reports November 2004 No.29**

発行日 2004年11月30日  
発行人 石田 耕三  
発行元 株式会社 堀場製作所  
〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2番地  
[http://global.horiba.com/support/tech\\_info/index.html](http://global.horiba.com/support/tech_info/index.html)

＜Readout編集委員会＞

委員長 石田 耕三  
副委員長 青海 隆  
編集局 吉良 昭道 三上 慶子  
お問い合わせ先 株式会社 堀場製作所 知的財産部  
Tel:075-313-8121 Fax:075-321-5648  
e-mail:readout@horiba.co.jp

**HORIBA**  
Explore the future