

平成30年6月21日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26249031

研究課題名(和文) 3D造形による蚊を模した交互進行する鋸歯状無痛針の作製と穿刺・血液吸引性能の評価

研究課題名(英文) Development of alternating progressive saw-like painless needle mimicking mosquito by 3D laser lithography and evaluation of its performance of skin puncture and blood sampling

研究代表者

青柳 誠司 (Aoyagi, Seiji)

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30202493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,100,000円

研究成果の概要(和文)：蚊を生体模倣した無痛針を、生体適合ポリマーを材料として開発した。具体的な成果は以下の通り。1) 樋状の2つの半割部品が互いに嵌合し、中央に血液の通り道となる長手状の空洞部分を有する針を提案した。高精度3D造形装置を用いて原型を作製した。2) 原型にメッキを施し金属製の鋳型を作るプロセスを確立した。この鋳型に射出成形を行い、ポリマー製の針を得た。3) 蚊の口針が動物の血管に到達して吸血を行う様子を観察した。4) 有限要素法を用いて、針が皮膚組織に陥入していく様子をシミュレーションした。5) 動物の皮膚に対して、穿刺実験、血液吸引実験を行い、針の性能を評価した。6) 動物実験により痛みの評価を行った。

研究成果の概要(英文)：A painless needle that mimicks a mosquito was developed using a biocompatible polymer. Specific results are as follows: 1) A needle having a gutter-shaped two half parts fitted to each other and having a longitudinal hollow part which serves as a blood passage in the center was proposed. A prototype was made using a high precision 3D laser lithography machine. 2) A process of electroplating a prototype and making a metal mold was established. Injection molding was performed on this mold to obtain a polymer needle. 3) It was observed how the needle of mosquito reaches the blood vessel and sucks blood from it. 4) The motion of the needle to insert into the skin tissue was simulated using the finite element method. 5) Puncture experiment and blood sampling experiment were performed on the animal skin to evaluate the performance of developed needle. 6) Pain was evaluated by animal experiments.

研究分野：ロボット・マイクロシステム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 生体模倣 射出成形 精密部品加工 医療・福祉

1. 研究開始当初の背景

現状の注射針は概ね直径 300 μm (0.3 mm) 以上と比較的太く、皮膚上に約 1 mm 間隔で分布している痛覚神経 (痛点) を避けることが困難である。このため、針を細くすることで痛点を避ける試みが多数行われてきたが、未だ完全な無痛針は実現されていない。一方、人間は蚊に穿刺されても痛みを感じない。申請者は蚊の穿刺行動を詳細に観察し、針の細さ以外に、針の形状、刺し方が痛みの低減に寄与していることを解明した。蚊の口針は複数の針から成り、血液が通る中央の針 (上唇) の側方に存在する 2 本の針 (小顎) の先端に鋸歯状の突起 (ギザギザ) がある。突起を利用して皮膚内で足場を作り、口針を徐々に進めることで、皮膚への侵襲を最小限に留めている (図 1)。

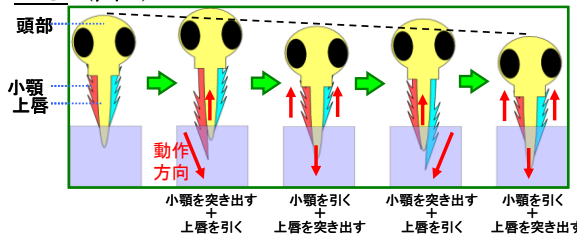


図 1 蚊の穿刺メカニズム

2. 研究の目的

本課題では、申請者が長年行ってきた蚊を生体模倣した無痛針の研究 (蚊の観察、穿刺メカニズムの解明、針の作製) の完成度を高め、これらの成果を総動員して、真に痛みが無い微細針の開発を目指す。従来の申請者の研究では、形状を深さ方向に転写して 2.5 次元の構造物を作製する MEMS 加工に依拠していたので、真に 3 次元の形状を作製するのが難しく、リアルな蚊の針の形状が模擬できなかった。この改善に注力し、将来の量産も見据えたポリマー製の針の開発を目指す。

3. 研究の方法

従来の針とは全く異なる、蚊を生体模倣した無痛針を、生体適合ポリマーを材料として開発する。具体的な項目を以下に示す。

1) 樋状の 2 つの半割部品が互いに嵌合し、中央に血液の通り道となる長手状の空洞部分を有する針を作製する (図 2)。高精度 3D 造形装置 (分解能 0.2 μm) を用いて光

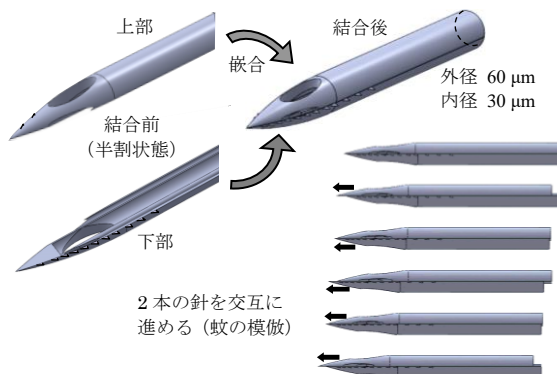


図 2 半割された鋸歯状微細針の結合と駆動

- 硬化型樹脂で半割部品の原型を作製する。
- 2) 前記原型にメッキを施した後に樹脂部分を除去して、金属製の鋳型を作るプロセスを確立する (電鍍プロセス)。この鋳型を用いて 射出成形 を行い、ポリマー製の針を得る。
- 3) 蚊の口針が、実験用動物の毛細血管に到達して 吸血を行う様子を、血管が可視化できるように倒立顕微鏡を用いたシステムを構築して観察する。
- 4) 有限要素法 (FEM) を用いて、針が皮膚組織に陥入していく様子を正確にシミュレーションする。
- 5) 毛管現象と吸水ポリマーによる血液吸引機構を提案し、その性能評価を行う。
- 6) 実験用動物の皮膚に対して、穿刺実験、血液吸引実験 を行い、針の性能を評価する。
- 7) 動物実験により痛みの評価を行った後、人体での評価実験も視野に入れる。

4. 研究成果

1) マイクロ光造形による蚊の口針を 3 次元的に模倣した微細針の作製

半割状マイクロニードルを新たに提案した (図 2)。先鋭化された 1 本の中空マイクロニードルを長手方向に半割にした構造を有している。先端以外の部分は樋形状になっており、内側の溝部分に液体を流すことが可能である。先端側面には蚊の小顎と同様の鋸歯状突起を付与した。この半割針単体では中空構造になっていないため、容易に形状を転写可能であり、射出成形等の大量生産が期待できる。

この半割状態の針を 2 本結合させることで、1 本の中空マイクロニードルとして使用する。側面に開いた穴を通して液体の吸引 / 吐出が可能である。それぞれの針を独立して駆動させることが可能であるため、各針を蚊と同様に交互に進進させることで、穿刺抵抗の低減が期待される。

本研究では、レーザー走査型の 3 次元光造形装置である Photonic Professional GT (独国内 Nanoscribe GmbH 製、日本販売代理店 日本レーザー) を用いた。光源としてフェムト秒レーザーを採用しており、2 光子吸収の原理を援用して紫外線硬化樹脂を硬化させる。硬化範囲は楕円球形状であり、その短軸、長軸の最小値はそれぞれ約 200 nm, 800 nm である。本申請で同装置の GT オプションを導入した。これはサンプルを固定して ガルバノミラーでビームを走査する装置 であり、重量のあるステージを逐次位置決めする必要がないため 高速な造形が実現できる。

半割状マイクロニードル (長さ 1 mm) の 3D-CAD を基に、ナノスクライブ装置を用いて実際に針形状を作製した (図 3)。材料はナノスクライブ専用のレジストである IP-Dip を用いた。

作製した半割針を 2 本組合せた中空マイクロニードルについて、その穿刺試験を実施し

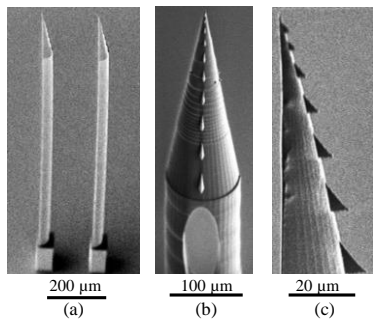


図3 作製した半割状マイクロニードルのSEM像

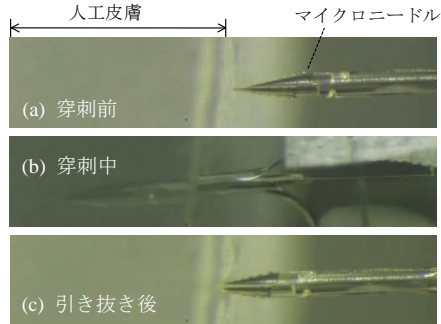


図4 交互振動による2本針の人工皮膚への穿刺

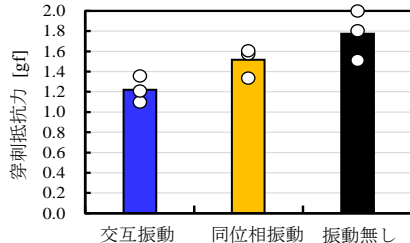


図5 穿刺抵抗力(○は測定値, 棒は平均値を表す)

た. 穿刺対象にはPDMS製の人工皮膚(ヤング率0.4 MPa)を用いた. 穿刺動作としては, 図2に示す協調振動モードの他に, 2本の針を同相

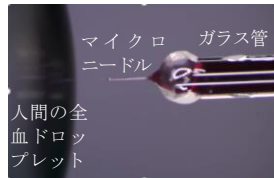


図6 採血実験の様子

で振動させる振動モード, 振動を与えずに前進させるモードの3種類を採用した. 穿刺結果の一例として, 交互振動させながら穿刺した際のマイクロニードルの様子を図4に示す. また, マイクロニードルが表面から0.8 mmの深さまで穿刺された時点での, 人工皮膚にかかる穿刺抵抗を図5に示す. これより, 蚊と同様に2本の針を協調振動させながら穿刺した場合に, 最も穿刺抵抗力が小さくなる.

最後に, 半割針を組み合わせた中空マイクロニードルを人間の血液の液滴に挿入し, 血液を吸引する実験を行った. 結果を図6に示す. 吸引速度は0.2 μL/sであった. 最新の糖尿病の血糖値検査に必要な血液量は0.3 μLであるため, 2 s以内にこの量を採取でき, 医療現場への応用が期待できる.

2) マイクロモールディング(電鍍)とマイクロインジェクション(射出成形)による生分解プラスチックニードルの作製

鋳型の作製: 3次元光造形は, 作製時間が長いという問題点がある. そこで, この樹脂

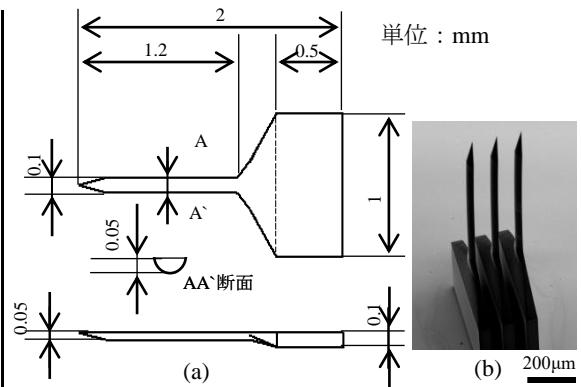


図7 マイクロニードルの母型 (a) 設計図, (b) SEM像

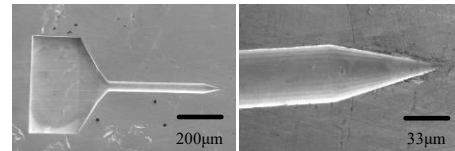


図8 作製したNi製マイクロニードル鋳型のSEM像

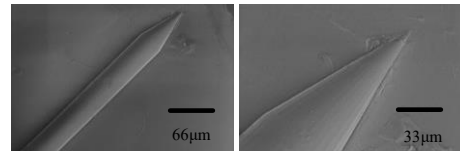


図9 射出成形によるポリ乳酸製マイクロニードル

製マイクロニードルの形状を射出成形法により転写することを試みた. この手法を適用するためには, まず母型であるマイクロニードルから鋳型を作製する必要がある. 本節では電鍍法による鋳型の作製について述べる.

母型として用いたマイクロニードルの設計図を図7(a)に示す. 針の長さは1.2 mmであり, 先端部以外の断面は半径が0.05 mmの半円形状である. ここでは予備実験として, 前節で作製したマイクロニードルとは異なり, 血液吸引用の溝は形成していない. 3次元光造形法により作製したマイクロニードルのSEM像を図7(b)に示す.

母型に対してメッキを行い, 厚さ300 μmのNi製鋳型を作製した. そのSEM像を図8(a)に示す. 鋳型の表面に細かな凹凸が確認されたため, 超精密研磨フィルムを用いて研磨した. 研磨後のSEM像を図8(b)に示す. 3D光造形にて作製したナノスクライブ針が綺麗に転写されることが確認された.

射出成形: ポリ乳酸は生分解性および生体適合性が確認されている樹脂であり, マイクロニードル材料として適している. 射出成形において針の幅が100 μmより細くなると樹脂が針の先端まで充填しにくくなる. これを解決するために樹脂温度や鋳型の温度を高く設定すると, 今度はバリ(成形加工時に発生する不要な部分)が発生する. 本研究ではこれらの問題の解決策としてヒートアンドクール法を適用した. 金型を高温に設定して樹脂の流動性を確保して射出成形を行なった後, 鋳型へ圧力を印加した状態を保ちながら金型を急速冷却する手法である. 樹脂の流動性の確保, バリの抑制, 成形物の強度保持, を同時に達成することが期待できる.

電鍍法により作製した Ni 鋳型を用いて成形したマイクロニードルの SEM 像を図 9 に示す。樹脂が針の先端まで充填されていることが確認された。

3) 蚊の口針が、実験用動物の血管に到達して吸血を行う様子の観察

動物の皮膚は不透明である。皮膚が比較的透けているヌードマウスの最も血管が見やすい耳においても、皮膚表面からの観察では皮膚内部での針の動きが捉えにくい。本研究では、麻酔を施したヌードマウスの皮膚に対し、蚊が穿刺・吸血を行う様子を、倒立顕微鏡を用いて皮膚の裏側から血管が明瞭に見える状態で観察できるシステムを構築した。関西大学化学生命工学部動物実験委員会により承認を得た（承認番号：1606）。

以下観察結果を示す。生物（人間、動物）の皮膚は前記した等質な人工皮膚と異なり、硬い角質層の下に、表皮、真皮があり、それらが極めて柔らかい皮下組織の上に乗っている多層構造をしている。このため、針を刺すと角質層を貫けず皮膚が大きく撓み（窪み）、「暖簾に腕押し」のようになかなか針が刺さらない。血管も針に押されて変形し、なかなか血管壁に針を刺し入れることができない。それに対して、蚊の穿刺全般にわたって、口針の周囲の皮膚組織が全く変形しないことが観察できた（図 10）。このことは、表皮に存在する痛覚神経に応力を伝えないことに繋がり、宿主（人間）に痛みを感じさせないことに貢献している。

また血管が蚊の口針を避けないことが確認できた（図 11）。口針の近くの血管が、口針に引き寄せられている様子も観察できた。上唇の吸引機能を利用して、血管を引き寄せたものと予想される。このことにより血管が口針を避けることも防止出来ているのかもしれない。観察回数を増やし、これらの仮定が正しいかどうかを今後検証していきたい。

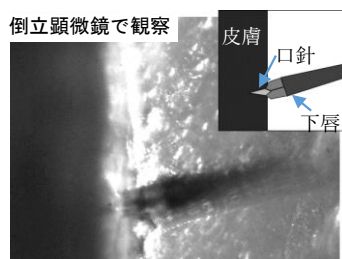


図 10 動物皮膚表面（角質層）への蚊の口針の穿刺。皮膚が全く窪まない。

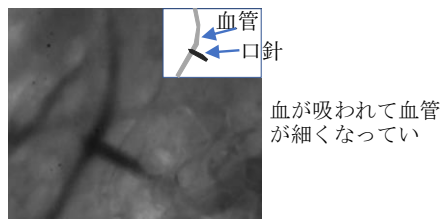


図 11 動物の細静脈への蚊の口針の穿刺。血管が口針で固定され、押されることなく動かない。

4) 非線形有限要素法解析による蚊の上唇と小顎の協調振動の効果の確認

本研究では上唇と小顎 2 本の合計 3 本の口針モデルを用いた解析を実施し、上唇のみを用いた場合と比較することで、3 本針の協調振動（交互振動）による応力閉じ込めと、穿刺力低減の効果を検討した。

解析モデル: 蚊の上唇と小顎の先端を SEM により観察した結果を参考にし、解析対象の 3D CAD モデルを作成した。針は剛体として定義し、穿刺対象は実際の皮膚を想定した粘弾性体として定義した。

陽解法有限要素解析: 解析には、陽解法有限要素法解析ソフトウェアである LS-DYNA を用いた。解析手法として穿刺対象を流体的に扱える ALE (Arbitrary Lagrangian and Eulerian Method) 法を用いた。

解析により得られた針の穿刺時のフォンミーゼス応力の分布を図 12 に示す。この結果より複数の微細針を交互に振動させながら少しずつ針全体を進めることで、応力が微小な空間に限定され（閉じ込められ）、周囲に応力が伝播しないことがわかる。これは周囲の痛覚神経を刺激しないことに繋がる。

3 本針を協調振動（交互振動）させた場合と 1 本針を振動させた場合のそれぞれの針にかかる荷重を図 13 に示す。交互振動しながら穿刺した場合の針にかかる荷重は、1 本針を振動させながら穿刺した場合の針（上唇）にかかる荷重よりも小さくなる（上唇どうしを比較すると 3 本針の場合は 1 本針の場合と比較して最大約 44% 小さくなる）。

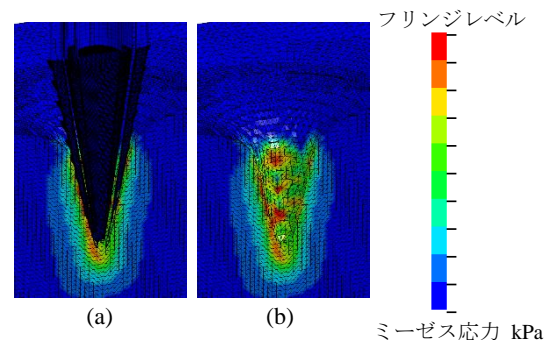


図 12 三本針穿刺時の応力分布（解析結果）、(a) 針を表示した状態、(b) 針が非表示の状態

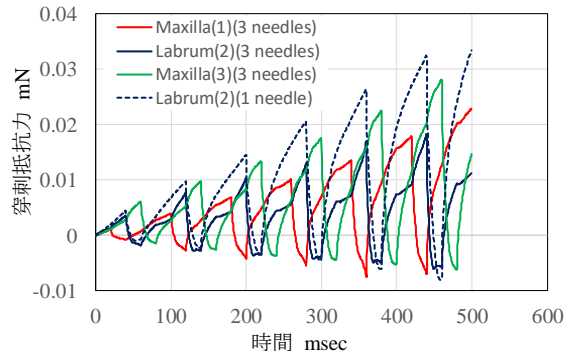


図 13 三本針を協調振動させた場合と一本針を振動させた場合に針にかかる荷重（解析結果）

5) 毛管現象と吸水ポリマーによる血液吸引機構 (MEMS ポンプ) の提案と性能評価

中空針の細径化は、液体の吸引・吐出速度の低下を招く。マイクロニードル内の流体の流れをハーゲン・ポアズユ流れと仮定すると、流速 u は管内径 r の二乗に比例して減少する。流速を増加させるためには、管に印加する圧力を増加させればよい。しかし、現在広く使用されている吸引機構であるシリンジでは印加できる圧力差は1気圧が上限であり流速に上限がある。そこで圧力差以外の原理である、毛管力、電気浸透流、高吸水性ポリマーによる水分吸収の3つの原理を用いた多段ポンプを提案した (図 14)。また、電気浸透流 (EO) ポンプを用いて生理食塩水を吸引することに成功した (図 15)。

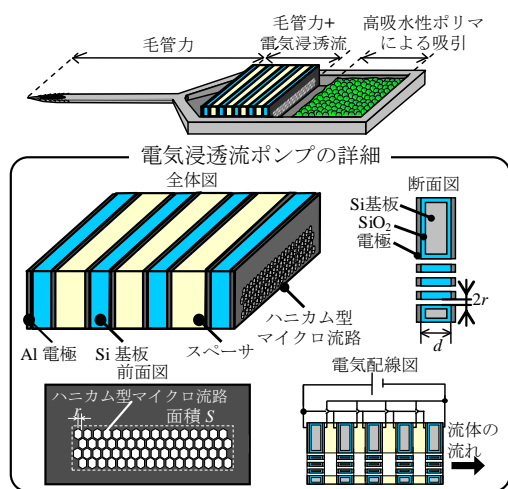


図 14 提案する吸引機構の概略図

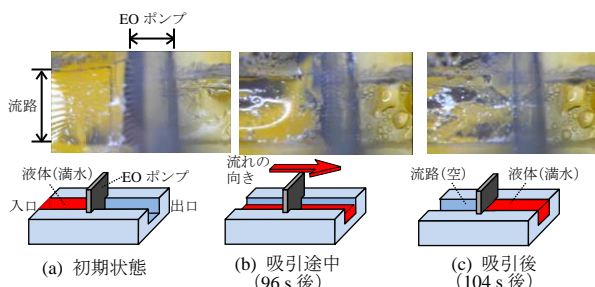


図 15 イオン水吸引実験の結果の写真と模式図

6) 実験用動物の皮膚を対象としたマイクロニードルの穿刺実験、血液吸引実験

針と座屈・皮膚の撓み防止治具を一体化した穿刺デバイスを、前記した高精度光造形装置 (ナノスクライブ社製) を用いて作製した。針は、採血を可能とするため、外径 $100 \mu\text{m}$ 、内径 $50 \mu\text{m}$ の中空針とした。針の長さは 1.5 mm 、先端の開き角度は 30 度である。

麻酔を施したヌードマウスの皮膚の内部を裏側から観察することで、血管およびそれにアクセスするマイクロニードルを鮮明に捉えることを可能とした。

現在観察装置をセットアップし、予備実験を開始している。その中で、針が座屈することなくヌードマウスの皮膚を穿刺し、血液を吸引する様子が観察できた (図 16)。血液の

吸血量は $2.8 \mu\text{L}$ であった。今後は複数針の交互振動により、動物皮膚の穿刺と血液吸引を行い、蚊の動作 (複数針の交互振動) の効果を確認したい。

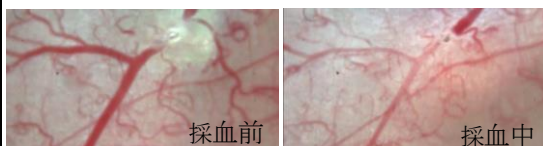


図 16 動物皮膚からのマイクロニードルによる採血

7) 動物実験による痛みの評価

本研究では、以下のような痛みの評価方法を提案した。1) フォンフライフィラメント (樹脂製の細い棒) でラット足底に刺激を与え、生じた反応を、0 点: 反応なし, 1 点: 足をずらす, 2 点: 足を上げる, 3 点: 足を舐める, としてスコア化する。これよりフィラメントの番手と反射行動とを対応づける (行動学的解析)。2) 脊髄後角表層細胞から *in vivo* 細胞外記録を行い、フォンフライフィラメント刺激により誘起される発火頻度を解析する。これよりフィラメントの番手と発火頻度とを対応づける (電気生理学的解析)。3) 開発した無痛針と、コントロール (比較対象) としての市販針を麻酔下ラットの足底に穿刺する。この際誘起される脊髄後角表層細胞の発火から 1), 2) の結果を用いて、針穿刺の痛みが反射を生じさせないほど小さい、足をずらしたり足を上げたりする程度の痛みである、足を舐めるほど痛い、等の評価を行う。

結果として、フィラメントの番手が上がるほど反射行動のスコア、発火頻度が向上し、両者に相関があることを確認できた。これより針の痛みの程度を、動物実験により定量的に評価する端緒が開けたものと考えられる。

開発した針の動物実験による痛みの評価が今後良好であれば、連携研究者の群馬大学高澤医師の協力も得て、臨床試験に進む予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) [M.Suzuki, T.takahashi, S.Aoyagi](#): 3D laser Lithographic fabrication of hollow microneedle mimicking mosquito and its characterization, *Int. J. Nanotechnology*, 査読有, Vol.15, No.1, 2018, 157-173.
- (2) [Y.Hara, M.Yamada, C.Tatsukawa, T.Takahashi, M.Suzuki, S.Aoyagi](#): Laser fabrication of jagged shaped stainless microneedle imitating mosquito's maxilla, *Int. J. Automation Technology*, 査読有, Vol.10, No.6, 2016, 958-964.
- (3) [Y.Hara, M.Yamada, C.Tatsukawa, T.Takahashi, M.Suzuki, S.Aoyagi](#): Fabrication of stainless microneedle with laser cut sharp tip and its characterization of penetration and blood sampling performance, *Int. J. Automation Technology*,

- 査読有, Vol.10, No.6, 2016, 950-957.
- (4) M.Suzuki, T.Sawa, Takahashi, S.Aoyagi: Fabrication of Microneedle Mimicking Mosquito Proboscis Using Nanoscale 3D Laser Lithography System, Int. J. Automation Technology, 査読有, Vol.9, No.6, 2015, 655-661.
- [学会発表] (計 126 件)
- (1) S.Aoyagi, M.Yamada, S.Yamamoto, T.Takahashi, M.Suzuki, R.Hosomi, K.Fukunaga, D.Uta, T.Takazawa: A Device Integrating Microneedle and Jig of Preventing Needle Buckling/Skin Deformation Inspired by Mosquito-3D Fabrication and Experiment of Skin Puncture/Blood Sampling, Int. Conf. IEEE MEMS2018, 2018.
- (2) 山本峻己, 高橋智一, 鈴木昌人, 青柳誠司, 長嶋利夫, 功刀厚志: 非線形有限要素法解析によるマイクロニードルの穿刺抵抗力の評価, 日本機械学会第 30 回計算力学講演会, 2017, OS03-1 239.
- (3) M.Suzuki, T.Takahashi, S.Aoyagi: Passive Pump Based on Capillary Force Generated by Gaps Between Microbeads for Blood Collection Via Microneedle, Int. Conf. Transducers2017, 2017.
- (4) 佐藤潤哉, 大石真久, 高橋智一, 鈴木昌人, 青柳誠司, 松本真一, 鈴木康一郎, 植田浩之, 芳賀善九, 都博之: 蚊を模倣した 2 本の樋状パーツを組み合わせたポリ乳酸マイクロニードルの成形加工, 2016 年度精密工学会秋季大会, 2016.
- (5) 寺田善彦, 鈴木昌人, 高橋智一, 青柳誠司: 3D 光造形装置による 3 次元分岐流路の作製と毛管力を利用した血液の吸引, 2016 年度精密工学会春季大会, 2016.
- (6) 元彪, 佐藤潤哉, 鈴木昌人, 高橋智一, 青柳誠司, 松本真一, 鈴木康一郎, 植田浩之, 芳賀善九, 都博之: メッキ技術を用いたマイクロニードル成形用の鋳型の開発, 2016 年度精密工学会春季大会, 2016.
- (7) M.Suzuki, T.Sawa, T.Takahashi, S.Aoyagi: Ultrafine Three-Dimensional (3D) Laser Lithographic Fabrication of Microneedle and Its Application to Painless Insertion and Blood Sampling Inspired by Mosquito, Int. Conf. IROS2015, 2015.
- (8) M.Suzuki, T.Sawa, Y.Terada, T.Takahashi, S.Aoyagi: Fabrication of Microneedles Precisely Imitating Mosquito's Proboscis by Nanoscale Tree Dimensional Laser Lithography and Its Characterization, Int. Conf. Transducers 2015, 2015.
- (9) M.Suzuki, Y.Terada, T.Takahashi, S.Aoyagi: High Power Miniature Pump for Microneedle Based On Three-Stage Suction Using Capillary Flow, Electro-Osmotic

Flow, and Super Absorbent Polymer, Int. Conf. Micro TAS2014, 2014.

[図書] (計 1 件)

- (1) 青柳誠司, マイクロニードルの製造と応用展開, 第2章マイクロニードル製造技術と穿刺評価, シーエムシー出版, 2016, 41-52.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- (1) 名称: 穿刺針、及び穿刺ユニット
発明者: 青柳誠司、鈴木昌人、芳賀善九、都博之
権利者: 同上
番号: 特願 2015-120510
出願年月日: 2015 年 6 月 15 日
国内外の別: 国内
- (2) 名称: 針穿刺の座屈防止構造及びこれを備える穿刺器具
発明者: 青柳誠司、杉山進
権利者: 同上
番号: 国際出願番号 PCT/JP2014/079741
出願年月日: 2014 年 11 月 10 日
国内外の別: 国外

[その他]

(1) 報道 (計 5 件)

- ① TBS テレビ「ワザビト」ー注射の未来を変えるー出演, 2017
- ② NHK 総合「ファールもびっくり! ぞくぞく発見 夢のムシ技術」出演, 2016

(2) ホームページ等

- ① <http://www2.ipcku.kansai-u.ac.jp/~t100051/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青柳 誠司 (AOYAGI, Seiji)
関西大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 30202493

(2) 研究分担者

新宮原 正三 (SHINGUBARA, Shoso)
関西大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 10231367

長嶋 利夫 (NAGASHIMA, Toshio)
上智大学・理工学部・教授
研究者番号: 10338436

高橋 智一 (TAKAHASHI, Tomokazu)
関西大学・システム理工学部・准教授
研究者番号: 20581648

鈴木 昌人 (SUZUKI, Masato)
関西大学・システム理工学部・准教授
研究者番号: 70467786