

# ■Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

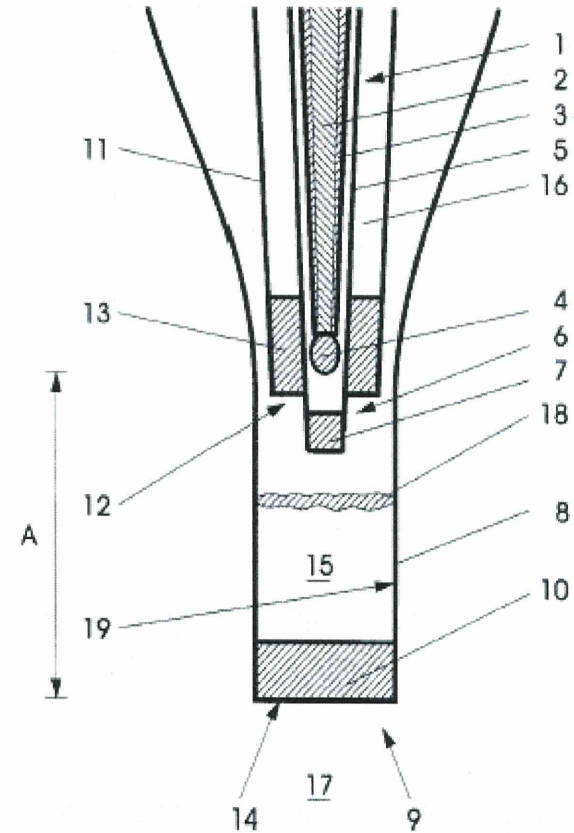
## ■特許調査

### クラーク電極方式によるメタン濃度測定特許あり(既調査済み)

【出願】 68,202 (1996/11/22) 【公開】  
【特許】 6,030,828 (2000/02/29) 【優先権】 1313/95 (1995/11/22)  
【発明の名称】 Microsensor and use of such microsensor  
【出願人/権利者】 UNISENSE APS.  
【発明者】 Damgaard Lars Riis; Revsbech Niels Peter  
【IPC】 C12M003/00  
【筆頭旧USC】 435/287.1  
【筆頭新USC】 435/287.1

【要約】 The invention relates to a microsensor for determining the concentration of a primary substrate by measuring the concentration of a secondary substrate. The microsensor comprises a transducer (1) for measuring the secondary substrate. The transducer (1) is surrounded by a first casing (8), which has an opening (9) with a barrier (10). The first casing (8) surrounds a second casing (11), also with an opening (12) with a barrier (13). In the first casing (8) between the barrier (10) and barrier (13), a reaction space (15) is formed. In the reaction space (15) an environment with catalytic components is contained. By measuring the concentration of the secondary substrate, the presence of the primary substrate can be determined.

【和文抄録】 この発明は、液体、気体、又はマトリクスに含まれる環境物質中の基本物質濃度を測定するためのマイクロセンサに関する。この発明によるマイクロセンサは、環境にある物質の転換又はその転換に伴うコファクターの転換をする触媒物質を含む反応スペース、反応スペースと境界を画する拡散浸透性外部壁、外部壁から離れた位置にあるコファクターの検出器からなる。このマイクロセンサは、微生物生態系、医学、廃水プラントを含む産業プロセスなどにおけるエタノール、メタノール、アンモニア、メタンの濃度測定に有用である。検出器は電気化学検出器、または光学的検出器からなる。実施例を Fig. 1 により説明する。Fig. 1 は、マイクロセンサの先端部分の略図である。マイクロセンサは、測定しようとする最初の物質が転換した第二物質を測定するためのトランジューサー 1 を持つ。トランジューサー 1 は、露出した先端 4 を持つカソード 2 のある Clark 型の酸素電極 1 であり、開口部 9 のあるプラグ 10 を持つ第一外包 8 で囲まれている。カソード 2 は、チューブ 5 に納められ、先端 6 は拡散浸透性プラグ 7 の上方にプラグ 10 の表面から距離 A の所に位置している。第一外包 8 は、開口部 12 のあるプラグ 13 を持つ第二外包 11 を囲んでいる。プラグ 10 とプラグ 13 の間にある第一外包 8 の中に反応スペース 15 が作られている。このスペース 15 は、触媒成分を含む液体を保持している。この例では、触媒成分は、測定しようとする第一物質メタンを酸化するある種の培養細菌である。ある一定の%濃度で含まれている酸素が、スペース 16 から反応スペース 15 へ第二プラグ 13 を経て拡散する。外包 8 の外部 17 にあるメタンはプラグ 10 を経て反応スペースに拡散し、反応ゾーンで酸化される。消費された酸素量からメタン濃度を測定する。



# ■Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

## ■特許調査

### ルミノホア層による酸素濃度依存発色測定による特許あり(既調査済み)

【出願】 10/540,349 (2003/12/23) 【公開】 2006/0099570 (2006/05/11)

【特許】 【優先権】

【発明の名称】 Device and method for non-invasive measurement of the individual metabolic rate of a substantially spherical metabolizing particle

【出願人/権利者】 UNISENSE FERTILITECH APS

【発明者】 Damsgaard Lars K. ; Gunderson Jens K. ; Ottosen Lars Ditley Morck ; Ransing Niels B.

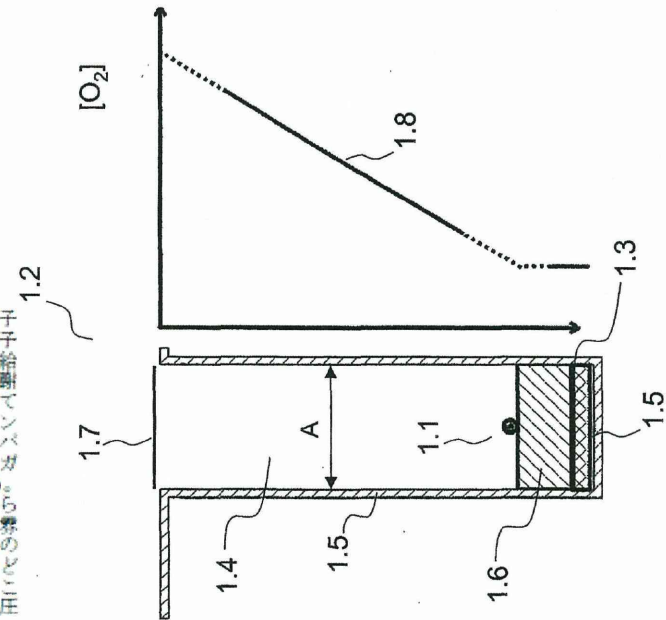
【IPC】 C12Q001/00 ; A61K049/00 ; C12M001/34

【筆頭特許】 435/004.000

【筆頭新特許】 435/004

【要約】 The present invention relates to methods and devices for non-invasive and non-disturbing measurements of metabolizing rates of substantially spherical metabolizing particles, such as an embryo, and to a method and device for controlling oxygen partial pressure at the level of the embryo. Furthermore, the invention relates to a method for regulating supply of metabolites to a substantially spherical metabolizing particle, as well as a method for selecting substantially spherical metabolizing particles of a predetermined quality. The invention is carried out in a device capable of establishing a diffusion gradient of metabolites between the substantially spherical metabolizing particle inside a compartment in the device and the environment outside the compartment. The metabolizing rate is determined based on information of the metabolite diffusion gradient.

【和文抄録】 この発明は、胚など実質的に球状の代謝性粒子の個別代謝速度を非侵襲的に測定し、また代謝性粒子への代謝物供給を調節する装置とそのための装置に関する。この発明の装置は、胚など実質的に球状の代謝性粒子の代謝速度を非侵襲的に測定し、粒子レベルで酸素分圧を制御し、またそのような代謝性粒子への代謝物の供給を調節するためのものである。この装置は、装置内のコンパートメント内部に存在する胚など実質的に球状の代謝性粒子とコンパートメント外部環境の間で代謝産物の拡散勾配を確立することができ、拡散勾配の情報に基づいて代謝速度を決定する。実施例をFig. 1, 4により説明する。胚の呼吸を測定する場合の装置は、縦型筒状コンパートメント1.4の一端が開放し、底部が透明酸素感受性ルミノホア上の気体透過性物質からなる。拡散コンパートメントの底壁1.5は透明材料からなり、拡大した胚を目視検査することができる。底壁を構成する材料はガラスやプラスチックなど気体不透過性材料であり、コンパートメント1.7の開口部を経て酸素のみが供給される。コンパートメント底部のルミノホア層1.3中の酸素分圧は、透明な底壁1.5を通してルミノホア層1.3からの発光を外部発光読み取り機により測定する。バルク媒質/環境1.2、既知または未知の気体組成物からなる雰囲気と平衡状態にある。この装置は、ルミノホア層1.3上の気体透過性物質1.6に配置する単一または複数の胚1.1に適応する。気体透過性物質1.6はシリコン化合物、teflonフッ素重合体、ポリエチレンなどや、ガラス、セラミックスなど化学的に不活性な材料をベースにする透過性または多孔質材料や貴金属である。この発明は、胚が酸素を消費する結果、バルク媒質/環境1.2中に比較してルミノホア層1.3における酸素分圧は低下し、その一方で定常状態での酸素分圧勾配1.8は一定であることを原理にする。



## 4. 打合せ議事録



# 受精卵活性測定デバイス 打合せ

## ■議事録(ポイント抜粋)

### 1. 毒性評価について

チップの材料について、毒性の確認が必要  
基本的に生体に有害な物質が含まれていないかはデバイス社に  
データあり。完成品については外部有識者への評価依頼等検討する。

### 2. チップ組込みプレートでの卵子観察について

実体顕微鏡による上部からの観察で問題なし。

### 3. 培養液の消費量について

20mL以下であればよい。さらに5mL以下であれば問題にならない。

### 4. チップ評価用卵子について

牛の卵子が大きさに人に近い。阿部先生との相談も。

### 5. チップ全体について

電極が非常に小さいため、微小な電極サイズばらつきに注意する  
必要あり。

試作方向性については、現行プレートを改造へ組込み、パナソニック  
内、北斗での電極特性評価に向け進める。北斗との協議・評価に  
ついては2月25日の週で別途調整、設定する。

### 6. 研究報告について

3月3日に部会が開催されるため、それまでに報告できる整理が必要。  
(情報整理は2月末に必要との追加情報がありました)

(資料 6)

## パナソニック社とのビデオ会議 議事録

2013/2/22 17:30 TRセンター

参加者：宇都宮、藤原、志賀

パナソニックの参加者：久本、杉原

デバイス社：岡、山本、小野、安見

### 1. チップの進捗状況

(山本) 受精卵活性測定デバイスのCV測定を2月27日に予定しており、その前にデバイス社で事前に測定してみた。

測定の内容：CVをそのまま測定するのは難しい。バンド電極理論式でCAの式で得られる定常電流値を算出。理論値と実測値で近い値が得られており電極としての機能に問題なし。CA測定(時間依存性測定)を逢わせて検討中。CVとしては間違いのない曲線。ところどころノイズ。使用前電極汚れ、測定中に反応物の可能性(何らかの還元体が作用しそれが参加される。今後原因検討を進める。

実測定常電流：3.59E-09A

今回の検討からある程度電極として機能していることを確認。27日のCV測定に期待。

(宇都宮)

北斗電工で行われるのは卵を使わない電気的な検討?⇒(岡) はい。

27日の検討はすぐに結果が出ますか⇒(岡) はい。

3月3日に会議をするのでそのときに北斗電工の結果を披露したいので今までの結果のスライドほしい⇒(岡) はい。

(久本)

今回の検討結果はデータとしてとてもきれい

次のステップとしては電極のサイズの検討など。

(藤原)

このチップは培養液に触れて使用する環境。材料は医療材料としての安全を担保されているのか?

(岡)

電極は金とシリコンなので安全と考える。他の細胞の電気的な測定をするデバイスで使用しているが細胞毒性は出ていない。しかしそれは医療機器ではない。理論上は培養液に溶出しない材料のはず。

(藤原)

被覆材は何を使用しているのか?

(岡)

UV 硬化接着剤、原材料の安全性は後日連絡します。

(宇都宮)

3月3日の発表用にスライドください。また3月5日までに報告書を提出したいので3月1日までに進捗状況の文章送ってください。⇒(岡) はい。

(岡) 先日山大での実験を見学した。胚盤胞を対角線上に2点測定して平均化していた。4~8分割卵の検討で良いのか？

(宇都宮) こんかいの検討は余剰卵のみでヒトで戻すことはできない。4~8分割卵を検討して胚盤胞にいくかをみたいので、初期胚でいいのです。

(岡) 最終的には胚盤胞もターゲットなのですか？

(宇都宮) 基本は初期胚でいいです。

## 2. 特許について

(藤原) この段階で特許を提出できる、知財の発生があると思うがどう考えているのか？

(岡) 今の段階では発明用件があるとは思わない。組み合わせでしかない。

(藤原) 組み合わせ特許の可能性はないか？特許のことについて話し合いをもとう。

次回について：3月中旬~下旬で。

# 受精卵活性測定デバイス（CV内部評価）

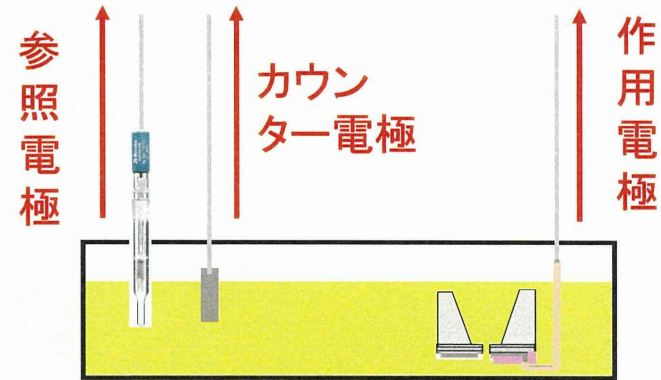
## 【測定法概要】

ポテンショスタット: 北斗電工製 HZ-3000

参照電極: 銀/塩化銀電極

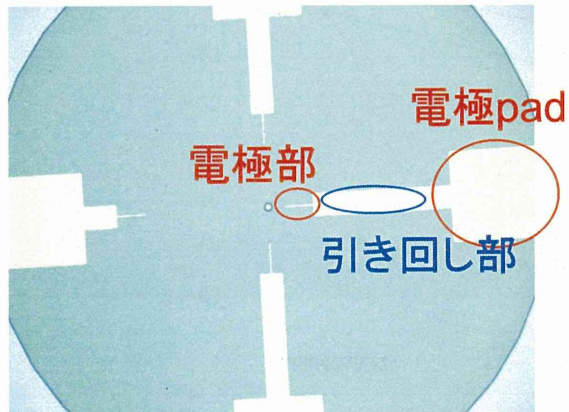
カウンター電極: Pt膜付き板(弊社作製)

\* 27日訪問時は、念のためカウンター電極もお持ちする予定です。

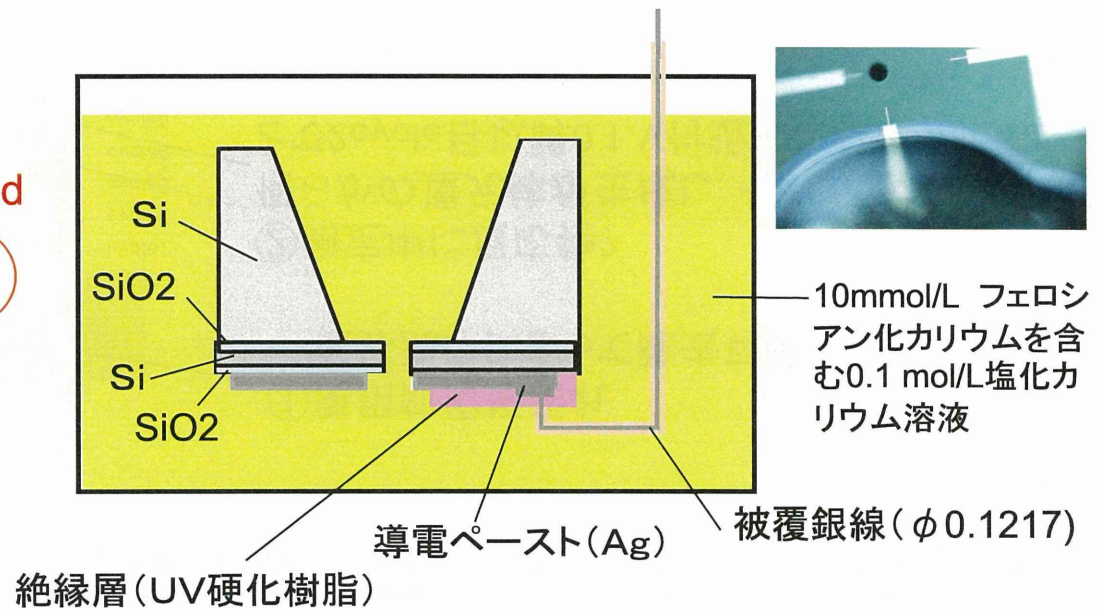


\* 接続はワニロクリップで可

## 【作用極拡大図】



Φ 2mmのチップを使用



絶縁層(UV硬化樹脂)

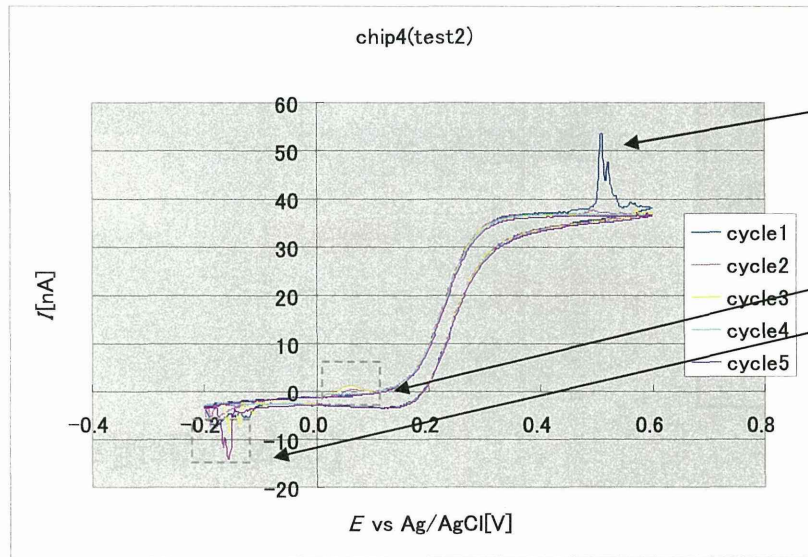
導電ペースト(Ag)

被覆銀線(φ0.1217)

10mmol/L フェロシアン化カリウムを含む0.1 mol/L塩化カリウム溶液



## 受精卵活性測定デバイス(CV内部評価-2)



①使用前電極汚れ  
→電界洗浄によって除去可能

②測定中に反応物?  
何らかの還元体が生成し、それが酸化されること  
で2cycle目以降0.1 V付近にこぶが見える?

①②に関して、原因検討を進める  
可能性:プロセス中の有機物残渣  
(他に考えられる原因はありますか?)

その他検討項目:

- 測定雰囲気の一(ノイズ抑える)
- 電極設置方法(ワニ口での固定具合で応答が変わる)
- 電極面積の規定

# 受精卵活性測定デバイス（電極面積算出）

バンド電極は限界電流値に時間依存性があるため、CA(クロノアンペアメトリー)の式で得られる定常電流値を算出しています。

バンド電極理論式

$$i = 2 \pi \text{LnFDc} / [\ln(4Dt/r^2)] \quad (1)$$

$i$ : 限界電流値 [A]  
 $n$ : 反応電子数  
 $F$ : ファラデー定数  
 $D$ : 拡散係数  
 $t$ : 時間  
 $a$ : 電極半径[cm]  
 $c$ : バルク濃度 [mol/cm<sup>3</sup>]

使用パラメータ

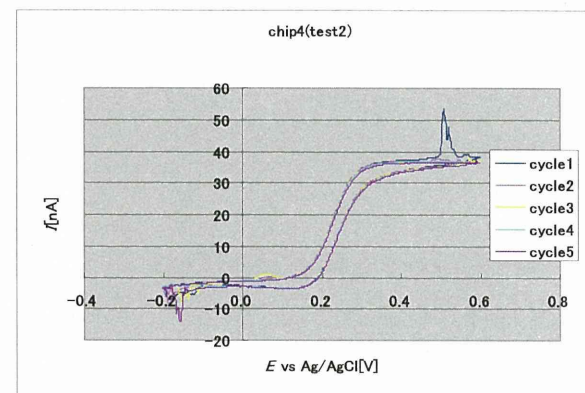
拡散係数	D	7.20E-06 cm <sup>2</sup> /s
半径(電極幅/2)	r	0.000177 cm(電極部) 0.001896 cm(ひきまわし部)
バンド長	L	0.004812 cm(電極部) 0.002487 cm(ひきまわし部)
ファラデー定数	F	9.65E+04 C/mol
バルク濃度	c	1.00E-05 mol/cm <sup>3</sup>

t[sec]	電極部			引きまわし部			和 i[A]
	ln(4Dt/r <sup>2</sup> )	2π LnFDc	i[A]	ln(4Dt/r <sup>2</sup> )	2π LnFDc	i	
10	9.13	2.10E-07	2.30E-08	4.38	1.09E-07	2.48E-08	4.78E-08
20	9.82		2.14E-08	5.08		2.14E-08	4.28E-08
30	10.23		2.05E-08	5.48		1.98E-08	4.03E-08
40	10.52		2.00E-08	5.77		1.88E-08	3.88E-08
50	10.74		1.96E-08	5.99		1.81E-08	3.77E-08
60	10.92		1.92E-08	6.18		1.76E-08	3.68E-08

実測定常電流 3.59E-08 A

- ・理論値と実測値で近い値が得られているため、電極としての機能に問題がないと判断
- ・CA測定(時間依存性測定)を合わせて検討中

\* 初回トライ分の試料は引きまわしの被覆が不十分でした。次回測定分(25日測定)はその部分が改善できています。ご容赦下さい。27日には、できるだけ状態のよいものを揃えてお持ちする予定です。



10 mmol/L K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 0.1 M KCl  
 V = 20 mV/sec

(資料 7)

# 第8回 胚細胞呼吸測定装置研究会

## (第2回 厚生労働省班会議)

日時：平成25年3月3日（日）7:30～10:30

場所：江陽グランドホテル 4階 千歳の間

### プログラム

座長 東北大学 宇都宮裕貴

① 開会の辞

秋田大学 寺田幸弘

② 本研究の進捗状況

東北大学 宇都宮裕貴

③ 各施設における進捗状況

各施設担当者

④ 本研究会の今後の具体的な方向性

東北大学 宇都宮裕貴

⑤ 閉会の辞

山形大学 阿部宏之

共催：東北トランスレーショナルリサーチ拠点形成ネットワーク協議会



## 第 8 回 胚細胞呼吸測定装置研究会議事録

### (第 2 回 厚生労働省班会議)

日時：平成 25 年 3 月 3 日（日）7：30～10：30

場所：江陽グランドホテル 4 階 千歳の間

#### プログラム

##### ① 開会の辞（山大：阿部）

着々と新しい機器の開発も進んできており、平成 25 年度が勝負の年になると考えている。これからも引き続き精力的に取り組んでいただきたい。

##### ② これまでの研究経過（宇都宮）スライドにて説明

##### ③

#### 質問

（佐竹）チップから電極に引きだしているのですが、今後は電極の組み合わせが問題になるかもしれない。

（山大：五十嵐）チップの壁面の傾斜をどうするか？45 度程度にしないと卵をマウントできないだろう。正確にマウントする方法を考えないといけない。時間がかかってしまえば、普及の妨げとなるかもしれない。

（福島：菅沼）穴に完全にマウントしなければならないのか？想定としては重力で単に沈降させるのか？それともその場所にパスツールピペットで置いてくるのか？操作性が簡便である必要がある。

（弘前：福井）今あるインキュベーターにビルトインする形で、出し入れはしないことを想定しているのか？それとも計測時に培養器から出して計測することを想定しているのか？

##### ④ 各施設における進捗状況

（弘前：福井）以前と変わりなし。

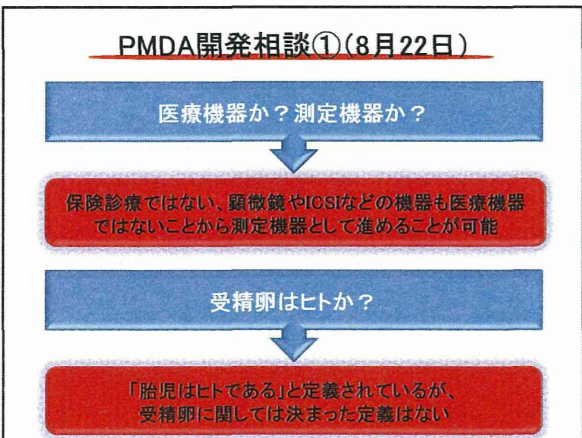
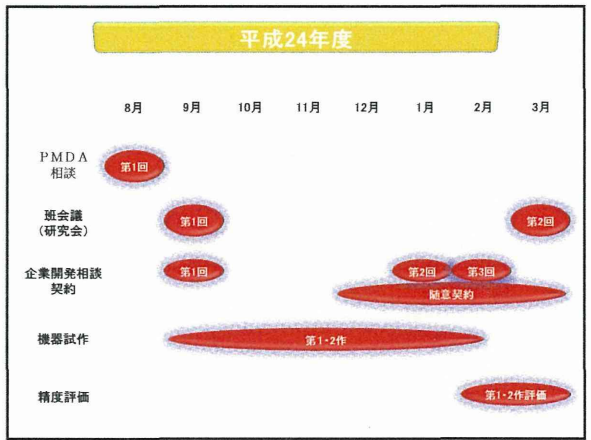
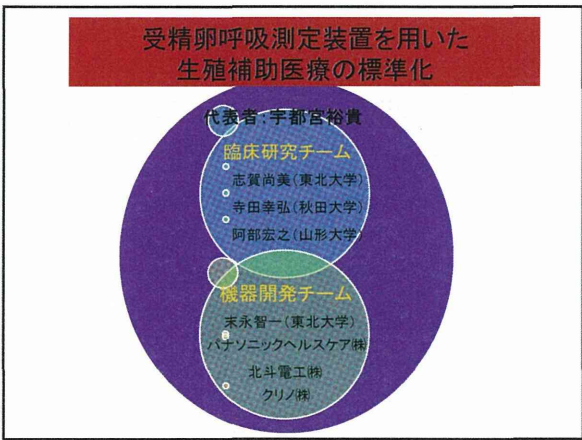
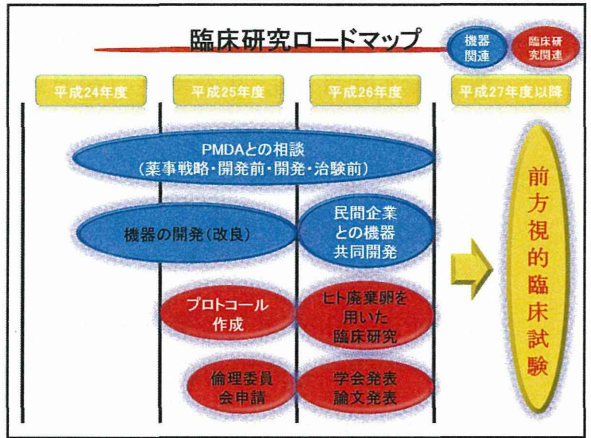
（秋田：熊谷）日本卵子学会に演題を出した（ヒトの凍結受精卵を用いた研究。high grade は凍結融解を繰り返しても呼吸量に変化なし。Low grade は凍結融解を繰り返す内に呼吸量が低下する。現在 5 例の妊娠継続例あり。）⇒ヒトでの研究は倫理的なことがクリアできていないのでは、と質問有り⇒（宇都宮）今回測定したものは余剰卵であり、ヒトに戻したりすることはしていないようである。

（山大：五十嵐）マウス卵で何回かやってみたがマウントするところが煩雑で片手間にできない。もう少し装置に改善の余地有りと思う。

- ⑤ 本研究会の今後の具体的な方向性（宇都宮）スライドにて説明  
班会議 3 回目：6/9 の予定（後日連絡します）、4 回目 9 月、5 回目 H26/1 月予定
- ⑥ 閉会の辞（宇都宮）  
（山大：阿部）この研究の平成 25 年の目標は余剰卵を使った呼吸測定までだったか？  
（宇都宮）平成 25 年は新規機器を開発して、倫理申請をするところまでを予定している。同時に各施設で余剰卵をストックしておいてもらい、倫理的承認を得た後に直ちに研究が開始できる状況にしておきたい。

受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に橋渡しするための安全性および有用性に関する研究

平成25年3月3日  
研究代表者 宇都宮 裕貴



- 受精卵活性測定デバイス 打合せ及び議事録
- 打合せ項目
- 日時: 平成24年9月6日 13:00~16:00
1. 自己紹介
  2. 研究計画説明(宇都宮)
  3. デバイス開発試案(パナソニックデバイス部門)
  4. 開発プラン

受精卵活性測定デバイス 打合せ及び議事録

打合せ項目

2013年1月24日 13:00~14:30

1. チップ試作

進捗報告

評価方針、スケジュール

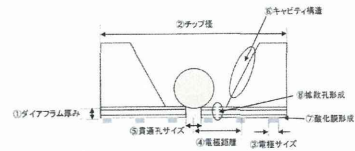
ディスカッション

2. EmbryoScope (Unisense社製) タイムラプス法への見解

3. Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

4. 打合せ議事録

受精卵活性測定デバイス (一次試作計画)

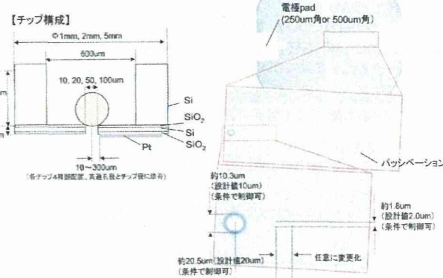


- ① ダイアフラム厚み (5~15um)
- ② チップ径 (φ1mm, φ2mm, φ5mm)
- ③ 電極サイズ (2um角, 5um角)
- ④ 電極距離 (受精卵位置からの距離) (5~300um)
- ⑤ 貫通孔サイズ (10, 20, 50, 100um)
- ⑥ キャビティ構造 (垂直、テーパ、受精卵からの距離)
- ⑦ 炭化膜形成 (有り、無し)
- ⑧ 拡散孔形成 (有り、無し、拡散孔配置および大きさ)

酸素速度勾配感度シミュレーションの結果を踏まえて、仮パラメーターを決定

受精卵活性測定デバイス (一次試作現状)

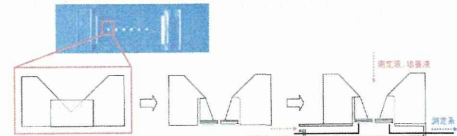
【電極構造 (光学顕微鏡)】



ほぼ近い通りの形状を有したチップが完成  
北斗電工様での試作評価に向け、実装検中、他の形状に関しては並行して作製

受精卵活性測定デバイス (試作測定評価)

従来の樹脂プレートを切削加工して、試作チップを実装、評価



10mmol/L フェロシアン化カリウムを含む0.1 mol/L塩化カリウム溶液中で、サイクリックボルタムトリー (CV) を比較し、電気化学的性能を確認予定。

項目/日程	1月	2月	3月
チップ試作	1次試作	2次試作	最終試作検封
CV評価		動作確認	北斗電工様受取
樹脂プレート試作		試作実装検封	

(Fertil Steril 2012;98:849-57)

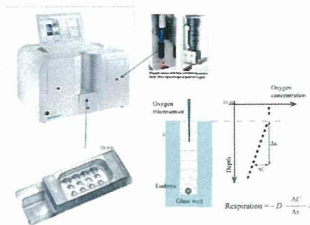
Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal timeranges for selecting viable human embryos

Alberto Tejera, Ph.D., Javier Herrero, Ph.D.,  
Thamara Viloria, Ph.D., Josep Lluís Romero, M.D.,  
Pilar Gamiz, Ph.D., and Marcos Meseguer, Ph.D.

Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia,  
Valencia, Spain

世界での開発状況

Spain & Denmark 合同チーム



(Embryoscope, version C; Unisense Fertilitech)



Name: Unisense FertilTech A/S

Address: Tueager I, DK-8200 Aarhus N, Denmark

Device name:

EmbryoScope™ Assisted 11 884.6120 85 MQG (Version D)  
IVF Incubator reproduction accessories

**EmbryoScopem - (Version D):**

Indication for Use: To provide an environment with **controlled temperature, CO2 (and other gases)** for the development of embryos.

This model has an integrated inverted **microscope and imaging system for embryo viewing.**

Device use is limited to five days (120 hr) covering the time from post-fertilization to day 5 of development.

### EmbryoScope™ Time-lapse Embryo Monitoring System



#### Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

##### ■特許調査

(ガラス電極様の電気化学による酸素濃度測定に関する技術調査)

PCT出願公開なしを要約後、USPで特許調査

特許No.	登録件数	特許項目	特許形式
S001	42,691	全文	embryo
S002	1,188,433	全文	nanilite
S003	115,472	全文	oxygen
S004	546,711	全文	concentration
S005	383,157	全文	evolution
S006	411,348	全文	evaluation
S007	189,748	全文	oval
S008	68,456	全文	nest
S009	2,445	論理式	(2011)42017(2003)4500(2400)420144(2005)42006

2013年1月時点での出願情報なし、但し、

クラーク電極方式によるメタン濃度測定特許あり(既調査済み)

ルミノホア層による酸素濃度依存発光測定による特許あり(既調査済み)

関連キーワードによるUSP網羅調査 2,445件中にも該当開示情報なし

試作チップに関連するUNISENSE社知財の存在確認できず。

#### 受精卵活性測定デバイス 打合せ

##### ■議事録(ポイント抜粋)

1. 毒性評価について  
チップの材料について、毒性の確認が必要  
基本的に生体に有害な物質が含まれていないかはデバイス社にデータあり。完成品については外部有識者への評価依頼等検討する。
2. チップ組み込みプレートでの卵子観察について  
実体顕微鏡による上部からの観察で問題なし。
3. 培養液の消費量について  
20mL以下であればよい。さらに5mL以下であれば問題にならない。
4. チップ評価用卵子について  
牛の卵子が大きすぎに人に近い。阿部先生との相談も。
5. チップ全体について  
電極が非常に小さいため、微小な電極サイズばらつきに注意する必要がある。  
試作方向性については、現行プレートを改造へ組み込み、パナソニック内、北斗での電極特性評価に向け進める。北斗との協議・評価については2月25日の週で別途調整、設定する。

#### 測定デバイスの評価

日時: 2013年2月27日 北斗電工打合せ

場所: 北斗電工厚木工場

関係: 青柳、内海、福泉、小林、  
佐竹、山本(実験総括)、小野、久本(記録)

#### 内容

相互質疑の後、実験による電気化学反応測定  
(Cyclic Voltammetry)にて電極評価実施

#### 受精卵活性測定デバイス (CV内部評価)

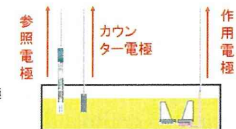
##### 【測定法概要】

ポテンショスタット: 北斗電工製 HZ-3000

参照電極: 銀/塩化銀電極

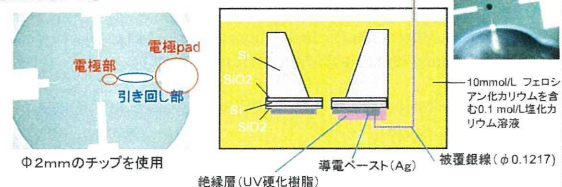
カウンター電極: Pt膜付き板(弊社作製)

\* 27日訪問時は、念のためカウンター電極もお持ちする予定です。



\* 接続はワニ口クリップで可

##### 【作用極拡大図】



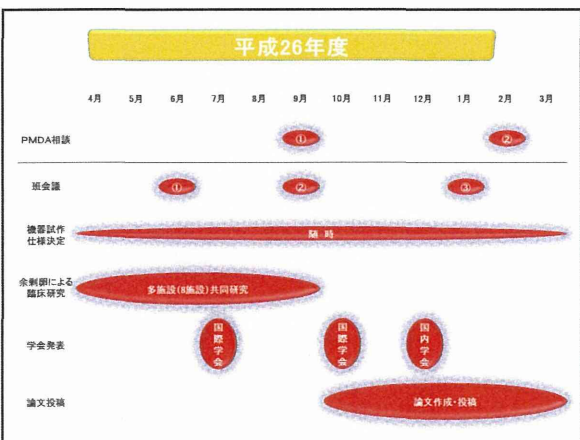
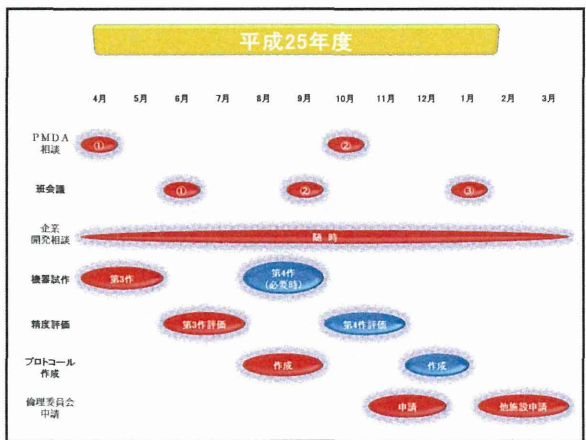
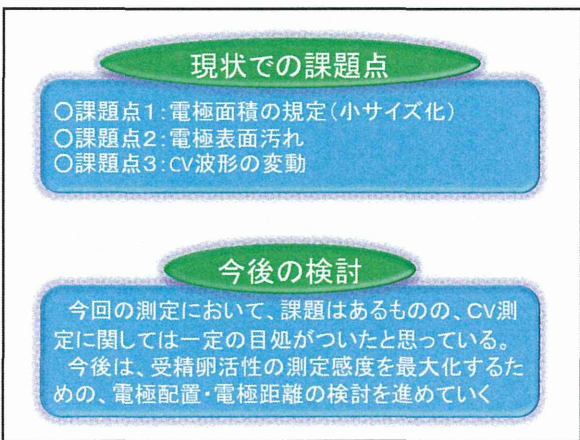
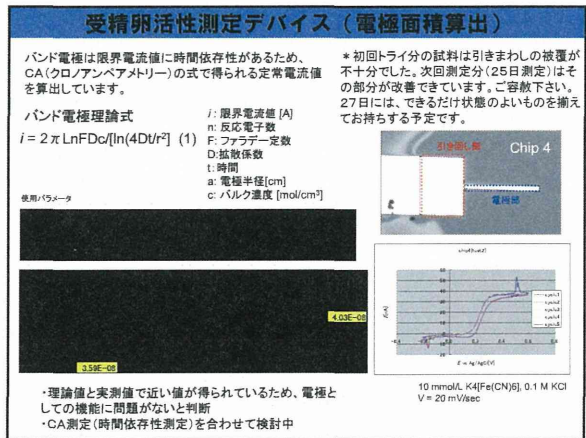
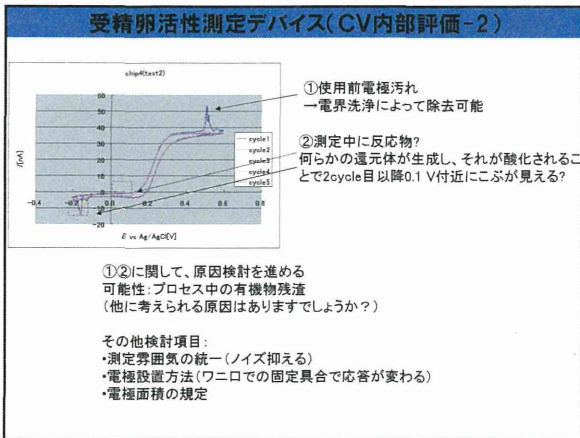
Φ2mmのチップを使用

絶縁層(UV硬化樹脂)

導電ペースト(Ag)

被覆銀線(φ0.1217)

10mmol/L フェロシアン化カリウムを含む0.1 mol/L塩化カリウム溶液



(資料 8)

## CRAS-1.0 の概要

細胞呼吸活性測定装置 CRAS-1.0 は、電気化学計測技術を応用した精密計測システムです。本システムは、ポテンショスタット・倒立顕微鏡・呼吸測定ソフト内蔵 PC により構成されています。マイクロプローブを走査することで、サンプルの近傍と沖合の溶存酸素の濃度勾配を電気化学的に計測し、球面拡散理論式から呼吸量を算出します。本測定で使用する測定プレートには 6 個の逆円錐形ウェルが施されており、連続した測定を行うことができます。

本装置では、マイクロプローブをサンプル脇に配置することで、非侵襲的に測定できます。本測定は、胚の生存性や発生能に影響は有りません。

