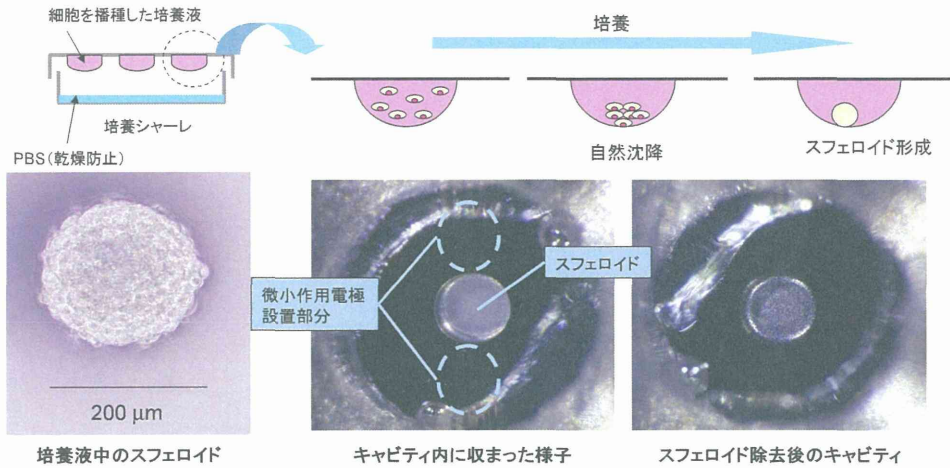


生体を用いたデバイス評価

MCF-7スフェロイド作製 マニピュレーション

ハンギングドロップ法でMCF-7のスフェロイドを作製



- ◆もくろみの直径で、スフェロイド作製が可能。
- ◆200 μ m径のキャビティへ、スフェロイドの操作ができることを確認。

生体を用いたデバイス評価

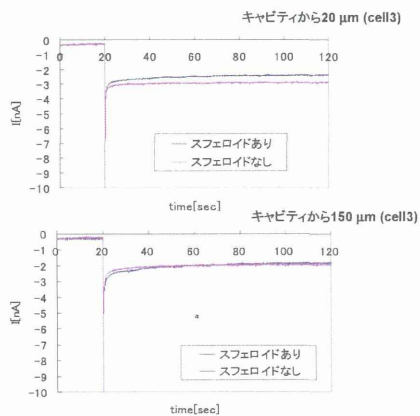
MCF-7スフェロイド 呼吸活性測定 ($I-t$ 測定)

【測定条件】チップ:ME1301-P01-02-05-0812 装置:HSV-100F (Hokuto Denko) 測定液:ERAM-2
測定条件:0 V (20 sec) \rightarrow -0.5V (120 sec), 各電極1端子ずつなぎ変えて測定
測定対象:MCF-7スフェロイド 200 μ m (200 cells, 3days)

cell1			
キャビティからの距離[μ m]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.736	-2.976	-0.240
50	-3.428	-4.095	-0.667
100	-2.355	-2.623	-0.268
150	-2.988	-3.012	-0.024

cell2			
キャビティからの距離[μ m]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.432	-2.722	-0.290
50	-3.102	-3.595	-0.492
100	-2.135	-2.482	-0.347
150	-2.662	-2.463	0.200

cell3			
キャビティからの距離[μ m]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-1.938	-2.338	-0.400
50	-2.369	-2.876	-0.507
100	-1.773	-2.023	-0.249
150	-1.834	-1.941	-0.108



- ◆スフェロイドから遠い電極(150 μ m)と近い電極で、酸素消費量に差がみられた。
 \rightarrow スフェロイドの呼吸活性を検出できていると考えられる
- ◆生体からの電極距離に対する依存性は、十分な評価ができていない(想定と合わない)。
 \rightarrow 酸素濃度勾配の測定は未達。電極間の特性バラツキ低減を実施予定。

(資料 3)

第10回 胚細胞呼吸測定装置研究会
(平成25年度第2回厚生労働省班会議)

日時：平成25年9月8日(日) 7:30～8:10

場所：旭川グランドホテル 6階 リンデンの間

〒070-0036 旭川市6条通9丁目

TEL：0166-24-2111

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 チップ試作品の開発状況

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 閉会の辞

東北大学 八重樫伸生

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

平成 25 年 9 月 8 日（旭川市）

第 10 回胚細胞呼吸測定装置研究会(平成 25 年度第 2 回厚生労働省班会議)

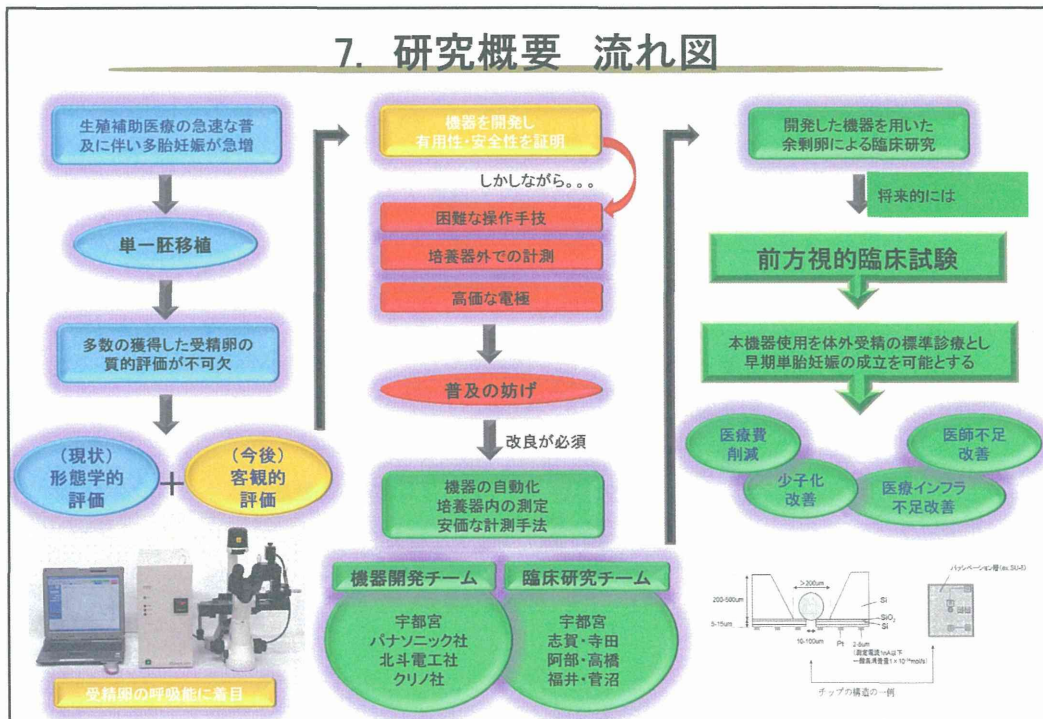
2013 年 9 月 8 日 北日本産科婦人科学会学術講演会(旭川グランドホテル)において、第 10 回胚細胞呼吸測定装置研究会(平成 25 年度第 2 回厚生労働省班会議)が開催されました。当科の宇都宮裕貴准教授より試作品の説明、並びに進行状況の説明があり、それに対し活発な討論がなされていました。今回が 10 回目と言う節目の会議であり、具体的な機器の仕上がり具合も順調に進んでいます。来年度は機器を使用した臨床研究を始める予定であるため、今後さらなる基礎的研究を進めながら将来的な臨床応用に向けたデータを発信していけるよう各大学協力し、成果を上げていきたいと思えます。

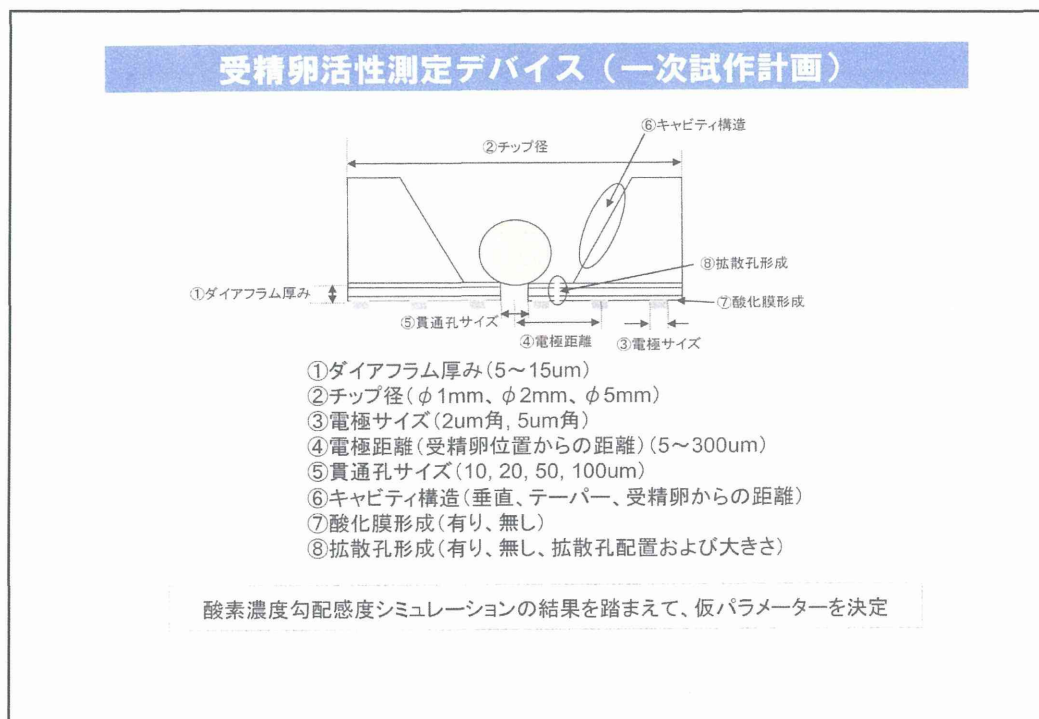
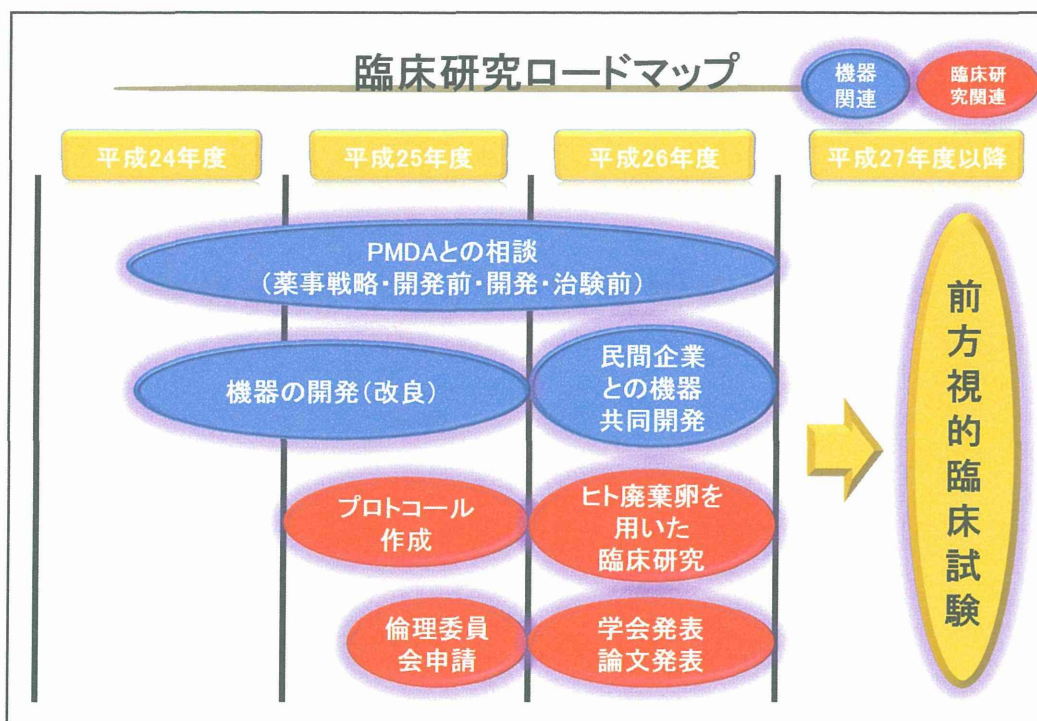


受精卵呼吸量測定デバイス 開発進捗

平成25年9月8日
宇都宮 裕貴

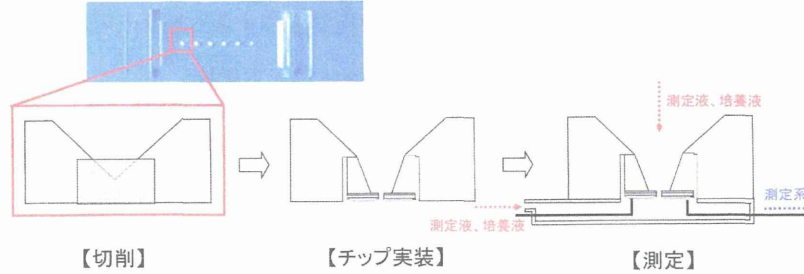
7. 研究概要 流れ図





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に切削加工して、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ンメトリー(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	他構造試作/検討
CV評価		弊社内部検討	北斗電工様測定
樹脂プレート試作		試作/実装検討	

受精卵活性測定デバイス（CV内部評価）

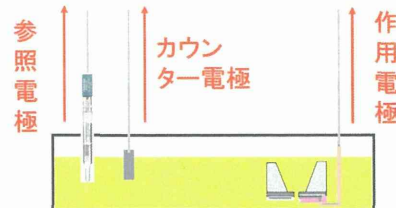
【測定法概要】

ポテンシostat: 北斗電工製 HZ-3000

参照電極: 銀/塩化銀電極

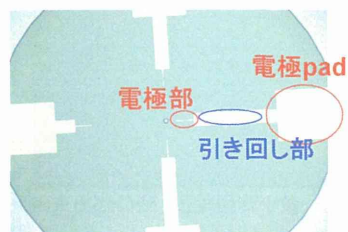
カウンター電極: Pt膜付き板(弊社作製)

* 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。

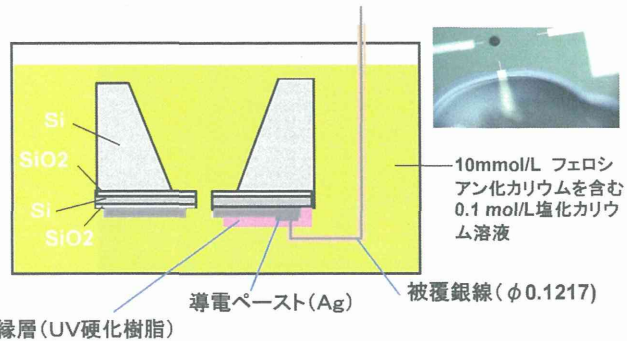


* 接続はワニ口クリップで可

【作用極拡大図】

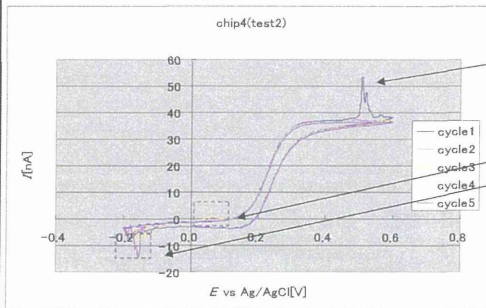


Φ2mmのチップを使用



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?)

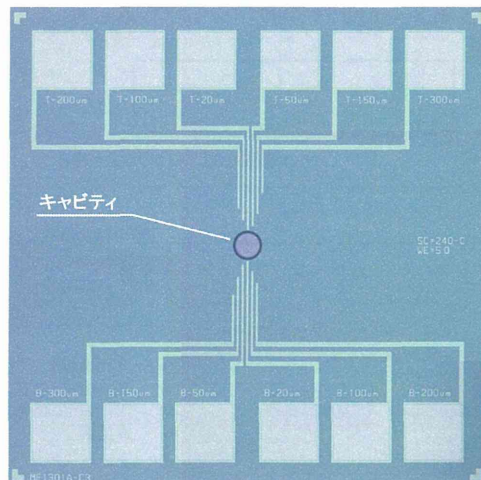
その他検討項目:

- 測定雰囲気(統一(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

2次試作チップ 形状出来映え

一次試作結果
チップ出来映え

TEG/パターン : ME1301A-C3チップ
評価サンプル : ME1301-P01-sl.03
評価工程 : ダイシング前(キャビティ工程後) 光学顕微鏡評価



作用電極配線
(Pt, SiO₂被覆)

測定電極部
(SiO₂開口)
※φ=5μm設計



もくろみのチップ加工形状が得られていることを確認

2次試作チップ 形状出来映え

一次試作結果
チップ出来映え

TEGパターン : ME1301
評価工程 : キャビティ工程後
観察方法 : SEM観察(チルト角=約45°)

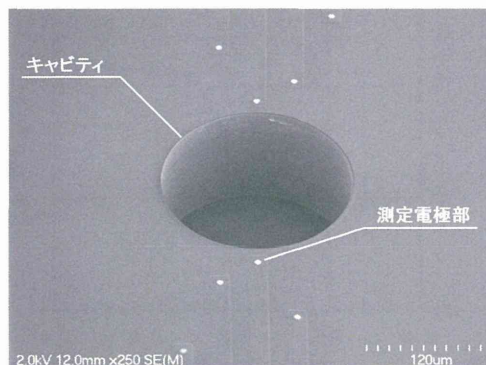


Fig.4 TEGチップ出来映え例(SEM観察)



Fig.5 測定電極部 出来映え

もくろみのチップ加工形状が得られていることを確認

2次試作チップ 電気化学計測

電気化学評価
チップ形状

TEGパターン : ME1301B-D3チップ

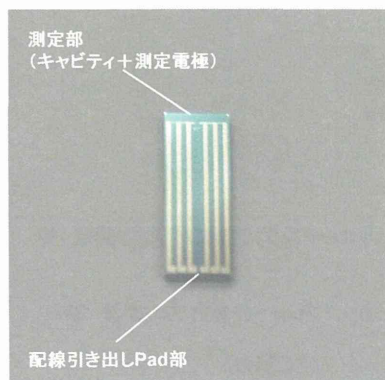


Fig.6 電気化学測定チップ
(チップサイズ:4mm×16mm)

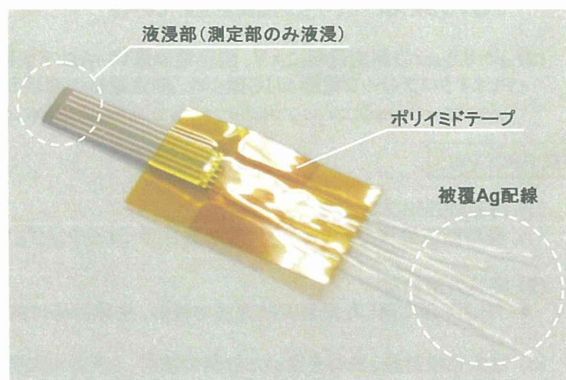


Fig.7 電気化学測定チップ 配線イメージ

電気化学評価用TEGを、手作業にて配線引き出しを実施。
液浸部と配線引き出し部を分離し、電気化学評価を行う。

2次試作チップ 電気化学計測

試作チップ CV測定結果

【測定条件等】 共通測定液=10mmol/Lフェロシアン化カリウムを含む、0.1mol/L 塩化カリウム溶液
 (2012年度試作チップ、Ptマイクロプローブ電極) 測定系=HV-405@北斗電工、北斗電工製R-6参照極、Pt薄膜対極
 (2013年度試作チップME1301B-D3) 測定系=HV-4000@パナソニックAIS、弊社所有参照極(対極と共用)

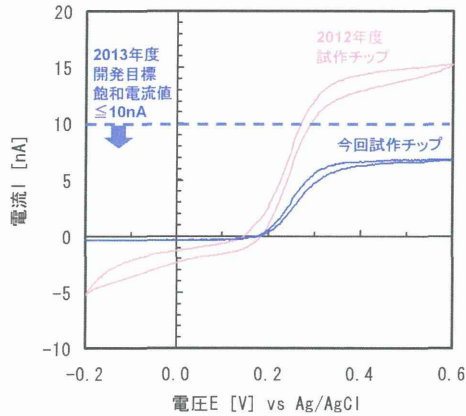


Fig.8 試作チップCV測定結果

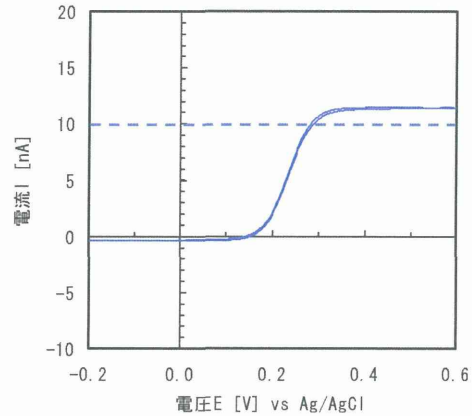


Fig.9 【参考】Ptマイクロプローブ電極CV測定結果

- ◆ 薄膜MEMS一貫プロセス適用により、今回試作チップでは飽和電流値10nA以下の測定電極形成に目処。
- ◆ CV波形のヒステリシス形状については、測定系の影響も含め調査中。

前回までのまとめと検討内容

まとめ

- (1) 2013年度に新規に設計したTEGにより、もくろみのチップ形状が得られていることを確認。
このTEGを用いて、チップ開発を進めていく。
- (2) $\phi=5.0\mu\text{m}$ の測定電極により、飽和電流値10nA以下を確認。※
Ptマイクロプローブ電極よりも微小な、測定電極の実現が可能。
※測定液=10mmol/Lフェロシアン化カリウムを含む、0.1mol/L 塩化カリウム溶液

今後の検討予定

- (1) 薄膜MEMSプロセス条件の検討
受精卵位置決めキャビティ形成工法(ドライエッチング、ウエットエッチング)、加工バラツキ評価 等
- (2) 実装方法検討
TEG評価に適した簡易実装方法の検討、生体評価に向けたチッププレート作製方法の検討 等
- (3) 電気化学計測、生体を用いた計測の検討 (※東北大学 末永研究室ご協力)
CV波形ヒステリシス要因調査、溶存酸素濃度シミュレーション、
スフェロイド等を用いた生体酸素消費量の計測実験 等
- (4) 本TEGを用いた、最適チップ構造(最適設計パラメータ)の検討
受精卵位置決め構造、測定電極配置、実装性を考慮したチップ形状 等

生体を用いたデバイス評価(第1回)

実験計画

【日程】 2013/07/16 ~ 2013/07/19 (4日間)

【場所】 東北大学 原子分子材料科学高等研究機構(兼 環境科学研究科、工学部 化学・バイオ工学科) 末永研究室

【目的】 一次試作チップ(ME1301)を使った、生体(スフェロイド)の酸素消費量評価におけるノウハウの蓄積/課題抽出

- ◆測定プレート(Proto.1) 課題抽出
- ◆生体評価に至るまでの電気化学測定プロトコル ノウハウ蓄積
- ◆スフェロイド培養、マニピュレーション ノウハウ蓄積
- ◆溶存酸素の還元電流実測、スフェロイドによる酸素消費量に対する感度の把握
- ◆生体の酸素消費量評価に適したデバイス構造 ノウハウ蓄積、溶存酸素濃度分布シミュレーション協力要請

【評価サンプル】

受精卵位置決めキャビティサイズと作用電極サイズ設計マトリックス

キャビティ ○形 直径 [um]	作用電極 直径 [um]	10	5	3
		400	○	
300		○	○	
240		○	○Typ.	○
200		○	○	
100			○	
50			○	

※キャビティパターン端からの作用電極距離(C-W距離)
20 / 50 / 100 / 150 / 200um
上下対称測定

- ◆測定プレート(Proto.1) 実装品 3台
- ①については、測定プレート2個分 実装する。(計6チップ)
- ②については、測定プレート1個分 実装する。(計3チップ)
- 測定プレート実装後、フェロシアン化カリウムメディアータで初期CV評価 @門真

- ◆予備品
- 6種類のチップについて、各2個ずつFFC実装する。

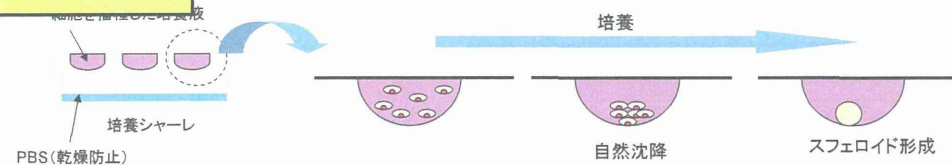
①キャビティ直径 依存性
→ 最適デバイス構造

②作用電極 直径依存性
→ 測定プロトコル

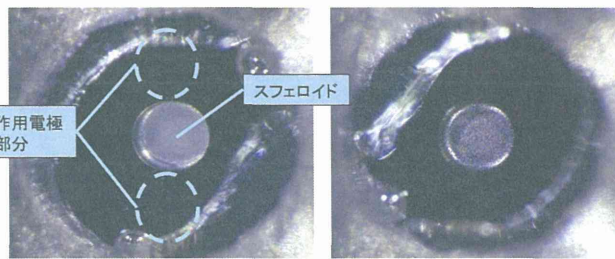
生体を用いたデバイス評価(第1回)

MCF-7スフェロイド作製 マニピュレーション

ハンギングドロップ法でMCF-7のスフェロイドを作製



培養液中のスフェロイド



キャビティ内に取まった様子

スフェロイド除去後のキャビティ

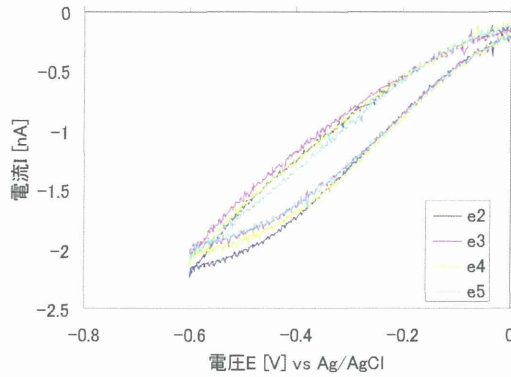
- ◆もくろみの直径で、スフェロイド作製が可能。
- ◆200μm径のキャビティへ、スフェロイドの操作ができることを確認。

生体を用いたデバイス評価(第1回)

測定液による 酸素還元電流測定

測定液中 (ERAM-2) での溶存酸素還元電流測定

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0616
装置: HSV-100F (Hokuto Denko) 測定液: ERAM-2 走査範囲: 0 V → -0.5 V → 0 V



- ◆酸素還元電流 -2nA程度であり、電極サイズから想定される値が得られた。
- ◆還元側で定常電流は得られていない点については、今後原因調査を行う予定。
(末永先生コメント: 生体酸素消費の概算をすることは可能と思われる)

生体を用いたデバイス評価(第1回)

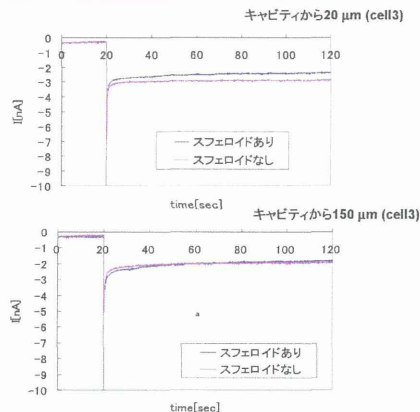
MCF-7スフェロイド 呼吸活性測定 (I-t 測定)

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0812 装置: HSV-100F (Hokuto Denko) 測定液: ERAM-2
測定条件: 0 V (20 sec) → -0.5 V (120 sec) 各電極1端子ずつなぎ変えて測定
測定対象: MCF-7スフェロイド 200 μm (200 cells, 3days)

cell1			
キャピティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.736	-2.976	-0.240
50	-3.428	-4.095	-0.667
100	-2.355	-2.623	-0.268
150	-2.988	-3.012	-0.024

cell2			
キャピティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.432	-2.722	-0.290
50	-3.102	-3.595	-0.492
100	-2.135	-2.482	-0.347
150	-2.662	-2.463	0.200

cell3			
キャピティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-1.938	-2.338	-0.400
50	-2.369	-2.876	-0.507
100	-1.773	-2.023	-0.249
150	-1.834	-1.941	-0.108



- ◆スフェロイドから遠い電極(150μm)と近い電極で、酸素消費量に差がみられた。
→ スフェロイドの呼吸活性を検出できていると考えられる
- ◆生体からの電極距離に対する依存性は、十分な評価ができていない(想定と合わない)。
→ 酸素濃度勾配の測定は未達。電極間の特性バラツキ低減を実施予定。

生体を用いたデバイス評価(第1回)

実験結果 概要

※青字・・・東北大学 末永研究室ご協力

取り組み内容	進捗状況(できたこと)	今後の取り組み内容
①チップ構造設計／プロセス開発 ・一次試作 ME1301-P01 ・溶存酸素濃度分布Sim.	◆P01条件Fix。評価サンプル確保 ◆ME1301構造 拡散Sim.実施 還元電流値、2D-Sim.情報入手	◇二次試作ME1301-P02進行
②プレート実装 ・Proto.1 構造決定 ・生体評価用Proto.1試作	◆Proto.1 完成 3プレート組立 →東北大(末永研)でのテストへ	◇Proto.1測定プレート改善 (プレート専用設計化、液シール構造改善、実装容易性向上 等)
③電気化学測定プロトコル開発 ・東北大(末永研)での評価	◆低濃度メディエータCV、CA測定 ◆溶存酸素還元電流測定 ◆メディエータ選択での課題抽出	◇メディエータ改善(低濃度FMA) →微小電流測定系 必要 ◇電気化学測定による電極汚染、劣化抑制
④生体での酸素消費量評価 ・スフェロイドを用いた評価 (1st try)	◆スフェロイド操作確認 ◆スフェロイド有無による酸素還元電流差を確認	◇第2回実験 計画検討 (第1回実験では、生体からの距離と酸素還元電流のデータ不十分)

今回ご報告内容

平成25年度

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
PMDA 相談							①			②		
班会議			①			②					③	
企業 開発相談	随時(月1回のテレビ会議など)											
機器試作	試作品②			試作品③			試作品④					
精度評価		第2作評価			第3作評価			第4作評価				
プロトコル作成										作成		
倫理委員会申請											申請	

平成26年度

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
PMDA相談						①					②	
班会議			①			②				③		
機器試作 仕様決定	随時											
余剰卵による 臨床研究	多施設共同研究											
学会発表				国際学会			国際学会			国内学会		
論文投稿	論文作成・投稿											

(資料 4)

募集要領（企画競争）

1. 業務名

「全自動受精卵呼吸測定装置の開発」業務

2. 業務の目的・趣旨

近年、生殖医療の需要は著しく増加しているが、多胎妊娠による母体合併症や低出生体重児の増加が大きな社会問題となり、日本産科婦人科学会は生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解をまとめ、原則として単一受精卵（胚）のみを移植することが提唱された。そして今後、着床能の高い優良な受精卵を選別することが非常に重要になると考えられている。従来、受精卵の形態学的評価のみで品質評価を行ってきたが、主観性が強く観察者間での結果に差が生じる可能性が高い。そのため、客観的で再現性のある高精度の評価方法が切望されている。従来の主観的な形態学的評価に受精卵呼吸測定装置を用いた客観的な機能評価を加えることにより、優良卵の選別が可能になると考え、昨年度クリノ社が全自動受精卵呼吸測定装置の試作を行った。試作機器は湿潤環境において全自動で測定が可能となり、今後の一般診療への普及を見据えた有望な試作品となった。しかしながら、反復使用による測定精度の低下や最適な培養環境の確立など、未だ多くの課題を抱えており、直ちに臨床研究に用いることはできない。そこで今回、この試作品を改良し、より高精度で操作性の向上した安価な装置の開発を行う。

3. 業務の内容

クリノ株式会社が開発した受精卵呼吸活性測定装置 CRAS-1.0（以下「従来機器」という。）は、不妊治療において受精卵の呼吸活性を非侵襲的かつ定量的に測定し母体に戻す受精卵を選択するために使用する機器である。従来機器は、呼吸活性を測定する方法として針式のマイクロプローブを受精卵の近傍に近付けて上下動の走査で測定する手動方法を採用している。非常に高感度で侵襲もないが、正確な呼吸量測定には手技の習得に時間を要する。そのため、従来機器の有用性が証明できたとしても標準診療に取り入れるためにはハードルが高く、普及の妨げになることが予想される。そのため、昨年度に初心者でも再現性の高い正確な結果が得られ、測定者による差異解消や測定のスPEEDアップを図るために、測定時に受精卵を測定ウェルにセットした後、全自動で測定出来るようにすることを目標に試作品の開発を行った。試作機器は湿潤環境において全自動で測定が可能となり、今後の一般診療への普及を見据えた有望な試作品となった。しかしながら、反復使用による測定精度の低下や最適な培養環境の確立など、未だ多くの課題を抱えており、直ちに臨床研究に用いることはできない。そこで今回、この試作品を改良し、より高精度で操作性の向上した安価な装置の開発を行う。

具体的には、下記の要件を満たすことが必要となる。

- ① 受精卵検査に伴い用いられる微弱電流が、昨年度試作機器と同等かそれ以下であること。
- ② 受精卵の呼吸測定感度が、昨年度試作機器と同様かそれ以上であること。
- ③ 昨年度試作機器と比較して価格が低廉であり、且つ耐久性に勝ること。
- ④ 昨年度試作機器と比較して、受精卵測定時の初期設定が簡便かつセットが容易で

あり、操作性に優れ、初心者でも高い再現性を得ることが可能で、全自動化を実現することにより検査時間の短縮を図るものであること。

(1) 業務報告等

- ① 業務終了後、全自動受精卵呼吸活性測定装置の開発品、電気化学計測データ及び開発報告書を提出し、本学担当者の確認を受けるものとする。
- ② 報告書の内容については本学担当者から照会があった場合は説明を行うこと。
- ③ 業務の全部、又は一部が仕様書に基づいて行われず若しくは仕様書等に定める製造が行なわれていないと委託者が判断した場合は、受託者に対し再調査、又は修正等必要な措置を要求することがある。なお、その場合に要する経費は、本契約に含まれるものとする。

(2) 成果の帰属及び取扱いに関する体制

この契約書に基づき得られた成果物にかかる権利は、原則、東北大学と開発企業に帰属するものとし、その取扱いについて十分に留意するものとする。

(3) 特許権等の使用

業務の実施に際し、第三者の所有する工業所有権及び技術情報等を使用するときは、あらかじめ本学担当者の承認を得るものとし、その使用に関して一切の責任を負うものとする。

(4) 業務を遂行する上で疑義が生じた場合は本学担当者と協議して定めるものとする。

4. 本件に参加する者に必要な資格及び要件等

- (1) 国立大学法人東北大学契約事務取扱細則第6条の規定に該当しない者であること。
- (2) 国立大学法人東北大学から取引停止の措置を受けている期間中の者でないこと。
- (3) 暴力団員による不当な行為の防止等に関する法律（平成三年法律第七十七号）に規定する暴力団員、暴力団又は暴力団員が経営に実質的に関与している組織等の者、不正の利益を図る目的又は第三者に損害を加える目的をもって暴力団又は暴力団員を利用するなどした者、暴力団の維持、運営に協力している者、及び暴力団又は暴力団員と社会的に非難されるべき関係を有している者でないこと。

5. 提案書の提出方法等

(1) 提案書の提出場所

仙台市青葉区片平二丁目1-1 東北大学財務部調達室調達第一係

TEL 022-217-4869

FAX 022-217-4912

(2) 提案書の提出方法

提出方法は、5部を郵送又は持参すること

- ・郵送：簡易書留、宅配便等で送付すること
- ・持参：受付時間は平日9：00から17：00
- ・その他：提案書は日本語で作成し、提案書に関する照会先を明記すること。

(3) 提出書類

- ①本募集要領及び審査基準に記載されている項目を基に想定される事柄を整理した具体的な企画提案書
- ②本業務を行う上での実施体制に関する資料
- ③本業務を行う上での詳細な見積書（概算見積書）及び工程表

(4) 提案書の提出期限等

提出期限：平成 25 年 9 月 6 日 17:00 必着

提出先：上記(1)に示す場所

(5) その他

提案書等の作成費用については選定結果に拘らず提案者の負担とする。

また、提出された提案書等については返却しない。

6. 説明会の開催について

説明会への参加を必須とする

日時：平成 25 年 8 月 29 日 (木) 16:00～

場所：東北大学医学部 3 号館 3 階 産婦人科医局

〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 2-1

TEL：022-717-7254

7. 業務の規模及び採択数

業務の規模：9,000,000 円 (税込限度額)

採 択 数：1 件

8. 選定方法等

選定方法：別紙審査基準のとおり

結果通知：提案者全員に選定結果を通知する。

9. 契約締結

契約書(案)は別添のとおりである。仕様書については採択者と提案書を基に作成・調整するものとする。

なお、契約金額については提案書の内容を勘案して決定するので採択者が提示する金額と必ず一致するものではない。また、金額及びその他契約条件等が合致しない時には契約締結を行わない場合がある。

10. スケジュール

○提案書の締切：平成 25 年 9 月 9 日

○審 査：平成 25 年 9 月中旬頃

○採択者の決定：平成 25 年 9 月中旬頃

○契 約 締 結：平成 25 年 9 月下旬頃

○業 務 期 間：平成 25 年 10 月 1 日～平成 25 年 12 月 27 日 (予定)

11. その他

業務実施に当たっては、契約書、仕様書を遵守すること。

審査基準（企画競争）

I. 選定方法

提案書に基づき、東北大学医学系研究科に設置された「全自動受精卵呼吸測定装置の開発」審査委員会において審査を行い、評価が最も高かった者を契約予定者として採択する。

なお審査期間中、必要に応じて提案の詳細に関する追加資料の提出または面接を求めることがある。

II. 選定基準

【必須条件】 …… 企画提案書は次の各号に適していることを必須の条件とする。

- ①提案内容が募集要領に記載してある目的、趣旨に合致してあること。
- ②業務が具体的かつ適切な方法により計画されていること。
- ③業務を遂行するのに必要な能力、知識、ノウハウを有していることが明確に分かること。
- ④概算見積書の内容が合理的かつ明確であり、妥当な積算がなされていること。

【審査項目】 ……以下の各項目を4段階で評価する。

1. 安全性

受精卵検査に伴い用いられる微弱電流が、昨年度試作機器と同等かそれ以下であること。

2. 有効性

受精卵の呼吸測定感度が、昨年度試作機器と同等かそれ以上であること。

3. 経済性

昨年度試作機器と比較して価格が低廉であり、且つ耐久性に勝ること。

3. 操作時間

昨年度試作機器と比較して、受精卵測定時の初期設定が簡便かつセットが容易であり、操作性に優れ、初心者でも高い再現性を得ることが可能で、全自動化を実現することにより検査時間の短縮を図るものであること。

5. 概算見積額の内容、妥当性

ただし、提案を確認できないもの、具体性に欠け意味を成さないと判断されたものについては不可とし、一項目でも不可があったものは不採用とする。

【評価基準表】100点満点

審査項目	点 数	評 価 基 準			
		優	良	可	不可
1		30	15	6	不合格
2		40	20	8	不合格
3		20	10	4	不合格
4		10	5	2	不合格