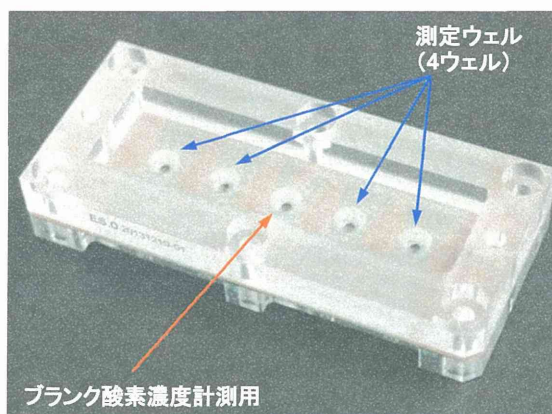


図 1-5. 試作した電極部の SEM(電子顕微鏡像)

チップ型プローブは、上記チップ型電極、培養液を溜めるアクリルプレート、チップ型電極とアクリルプレート間の液シール（培養液の漏防止）から構成される。試作した最終形態であるチップ型プローブの写真を以下に示し、表 1-1 に構成をまとめた。

ウェル側



裏面側

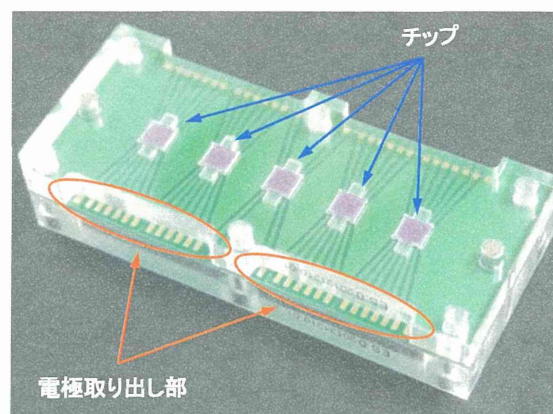


図 1-6. 試作したチップ型プローブ

表 1-1 チップ型プローブの構成

最終形態	構成部品	概要
チップ型 プローブ	チップ型電極	MEMS 技術と半導体製造技術の微細加工技術を使用した Si, SiO ₂ , Pt(白金)で構成される酸素還元電流を測定する電極と絶縁体を構成する
	アクリルプレート	培養液を溜め、受精卵をチップ型電極に静置するための誘導するウェルを構成する
	液シール その他部品	チップ型電極をアクリルプレートのウェルに固定し、駆漏れを防止するためのシール。シリコンを材料として採用する

2.2 変換アダプターの試作

2.1 で試作したチップ型プローブを使って、受精卵の呼吸活性を培養液中の溶存酸素を酸素還元電流測定により推定するために、ピコアンペア [pA] オーダーの微小電流を測定するための、ポテンシostatといわれる装置が必要となる。

本業務では、クリノ株式会社製の CRAS システムと呼ばれるポテンシostatを含む測定装置で測定可能となるよう、同装置と本業務で試作したチップ型プローブを接続する変換アダプターも試作した。

試作した変換アダプターとクリノ株式会社製の CRAS システムとの関係を図 2-1 に示す。

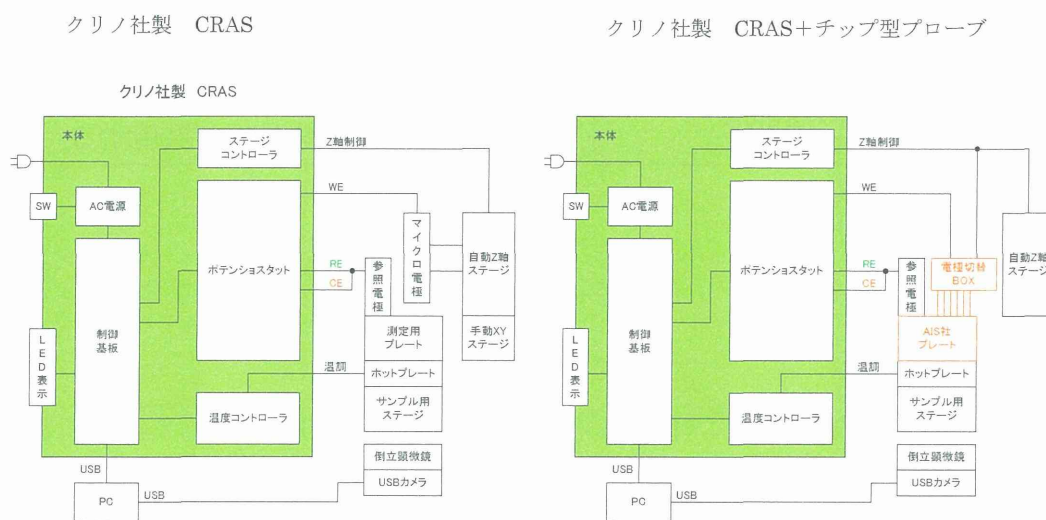


図 2-1. 試作した変換アダプター (赤字表示部)

本変換アダプターと試作したチップ型プローブの接続部を図 2-2 に示す。

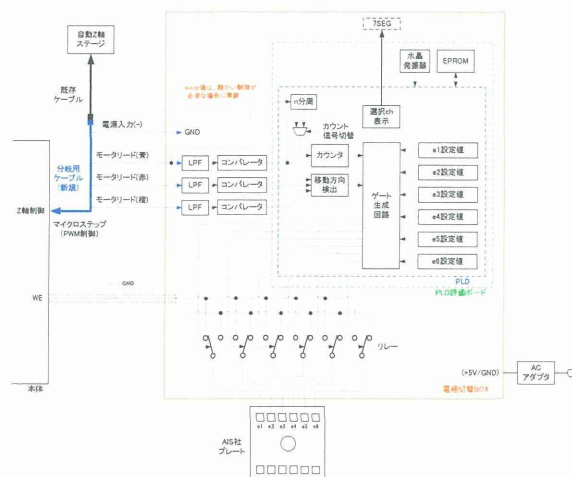


図 2-2. 変換アダプターとチップ型プローブ (図中 AIS プレート) 接続部



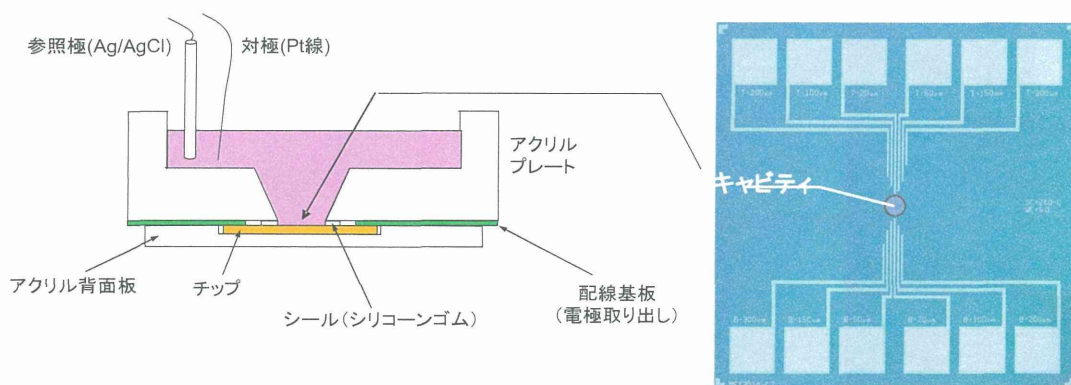
図 2-3. 変換アダプター概観図

3 性能評価

東北大学より指定された要件（1.2 東北大学からの仕様書の抜粋（にて再掲）について、評価検証結果を以降に示す。

3.1 チップ型電極の評価検証結果

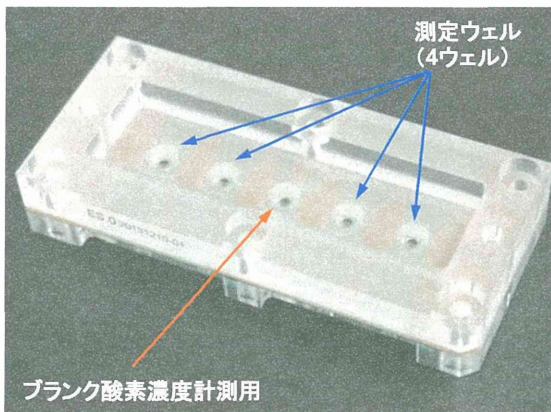
本業務で試作したチップ型電極の断面イメージ及びチップ型電極の上面イメージ（実物）を図 3-1 に再掲する。



チップ型電極および測定液保持プレートの断面イメージ

チップ型電極の上面イメージ

ウェル側



裏面側

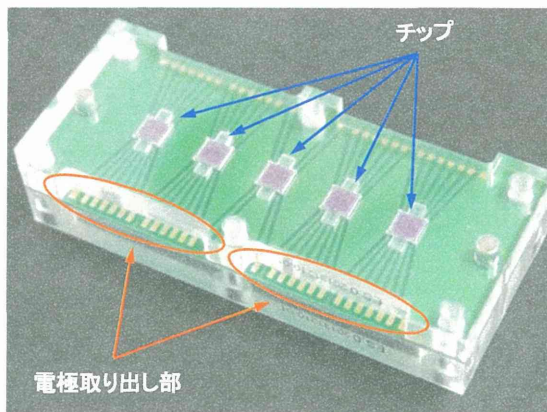
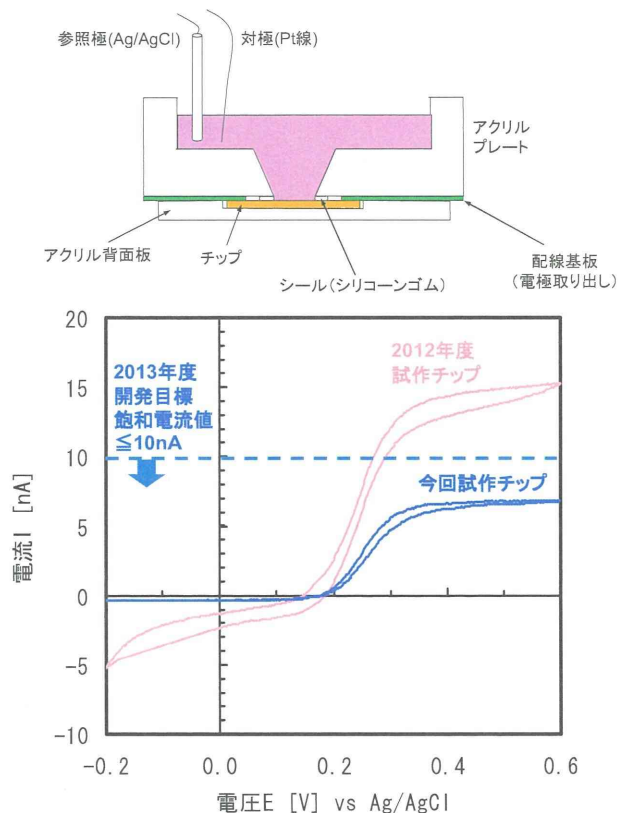


図 3-1. 試作したチップ型プローブ(再掲)

3.1.1 フェロセンメディエータ液中の酸化還元電流評価

本チップ型プローブについて、10mmol/L のフェロセンメディエータ液中で銀塩化銀参照電極を用いて酸化還元電流を CV 測定により検証を行った。以下に結果を示す。



【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)

図 3-2. 10mmol/L フェロセンメディエータ液中の CV 測定

本結果より、10[mmol/L] フェロセンメディエータ液中で、対銀塩化銀参照電極に対する酸化還元電流は 10[nA]以下で、東北大学からの要件である 30[nA]以下を満たしていることを検証できている。

3.1.2 乳がん細胞スフェロイドを用いた酸素消費量測定の検証

本チップ型プローブについて、乳がん細胞のスフェロイドを用いて、細胞の酸素消費量の測定検証を行った結果を以下に示す。

3.1.2.1 スフェロイドの作成

乳がん細胞を直径が人受精胚と同等の直径 200[um]になるようスフェロイドを図 3-3 に示す手順で作成した。

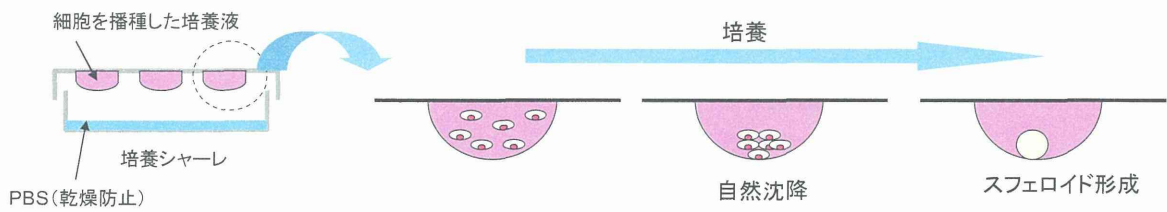


図 3-3. スフェロイドの作成手順

作成されたスフェロイドを図 3-4 に示す。



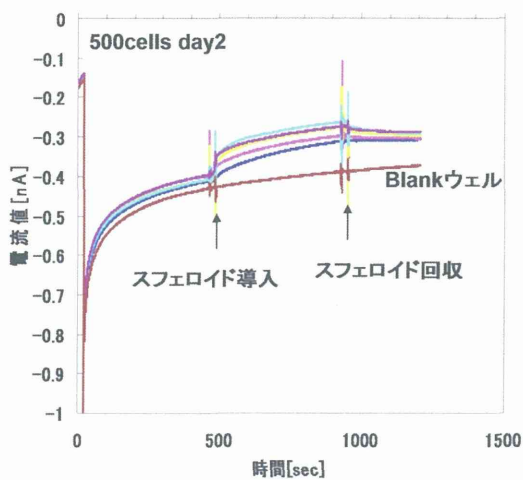
培養液中のスフェロイド

図 3-4. 作成されたスフェロイド

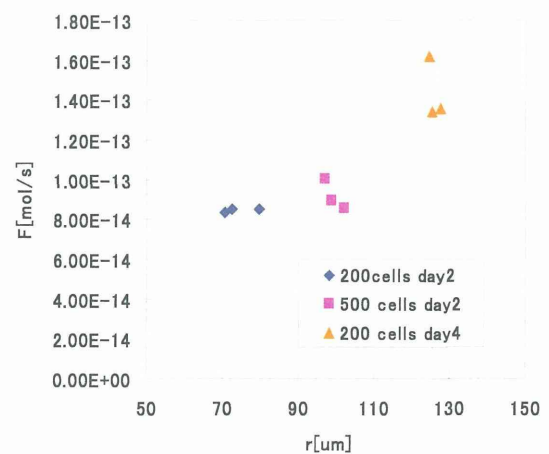
3. 1. 2. 2 酸素消費量の測定検証

スフェロイド(細胞塊)
酸素消費量測定

評価チップ : ME1301-P02-03 C11 Proto.1
測定方法 : 6電極同時ステップ印加(-0.5V印加)
測定液 : ERAM-2



(1) スフェロイド導入/回収と酸素還元電流変化



(2) 酸素消費量とスフェロイド径の相関

図 3-5. スフェロイドによる酸素還元電流測定 1

キャビティエッジからの距離	d	
	20um	20um
	50um	50um
	100um	100um
	150um	150um
	200um	200um
	300um	300um

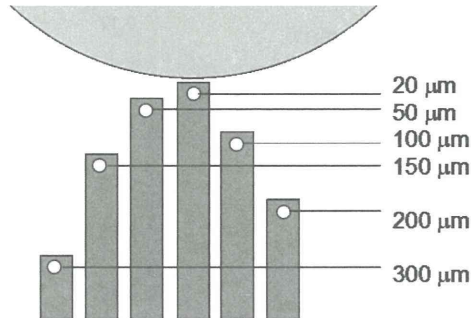


図 3-6. 陥没穴外周淵からの電極距離

図 3-5 左図はスフェロイドをチップ型プローブに投入する前後で、ポテンシostatにより測定される電流値=酸素還元電流値が変化すること、スフェロイドからの距離が離れるほど（WE1 が最もスフェロイドに近く、WE2,3 と距離は離れる）酸素還元電流が少なくなり、スフェロイドにより酸素濃度勾配が生じていることを測定できている。図 3-5 右図はスフェロイドの直径と酸素消費量（後述）と相関があることを示している。

次に、図 3-7 右図で、電極がスフェロイドに近いほど（WE1=20[um]…WE6=300[um]）溶存酸素濃度（図中 C*）が低い(受精卵の呼吸により溶存酸素濃度が低くなっている)相関が示せている。

測定結果(代表例)

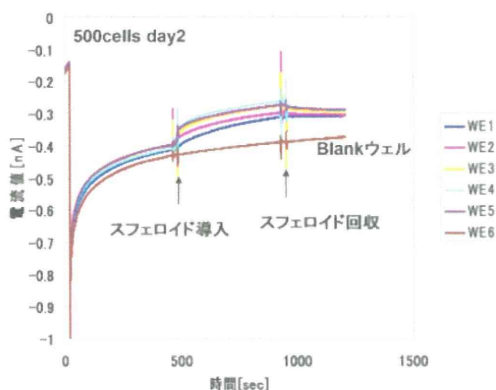


Fig. 3 測定結果(WE6はblankウェルに接続)

【測定条件】チップ: P02-03 Prot.1 C11-e12345
装置 HA1010mM8 (Hokuto Denko)
測定液 ERAM-2
走査範囲 0 V ~ -0.5 V

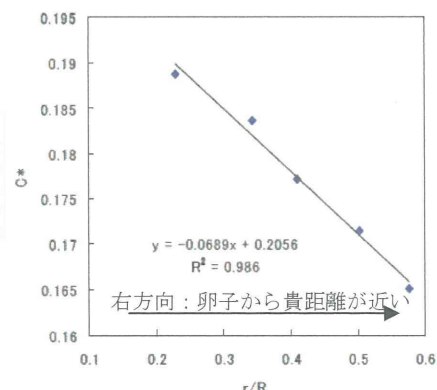


Fig. 4 溶存酸素濃度プロット

◆電極距離依存的に酸素濃度勾配を検出できた(第2回測定と同様の結果)

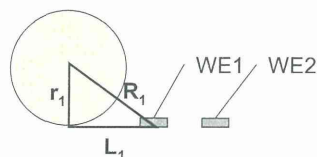
図 3-7. スフェロイドによる酸素還元電流測定 2

3.1.3 酸素濃度勾配のシミュレーションと酸素消費計算式

理論シミュレーションから酸素濃度勾配と酸素消費計算式を算出し、前項のスフェロイドを用いた酸素消費量算出に用い、理論値相当の酸素消費量が算出できていることを確認した。図 3-8 に算出した溶存酸素濃度 $C(R)$ と受精卵中心からの距離 R の関係式を示す。

- 【バルクの溶存酸素濃度】 $C_0 = 0.209 \mu\text{mol/L}$
- 【各電極近傍の溶存酸素濃度】 $C^* = C_0(\Delta l / l_{BG})$
- 【電極とスフェロイドの中心の距離】 $R = (L^2 + r^2)^{0.5}$
- 【スフェロイドからの距離に対する酸素濃度】

$$C(R) = (r/R) \cdot (C^* - C_0) - C_0$$



酸素濃度プロファイルがスフェロイドを中心とした半球面拡散であるとする

【スフェロイドの呼吸活性】

$$F = 2\pi rD(C^* - C_0)$$

(酸素の拡散係数 $D = 2.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$)

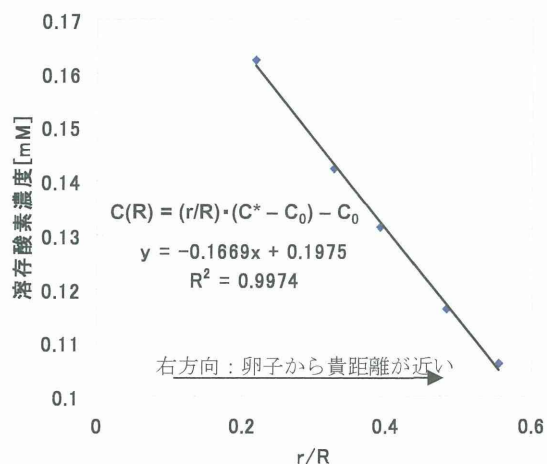


Fig.9 $C(R)$ vs (r/R) のプロット

◆右図のスフェロイドの呼吸活性は $F = 2.0 \times 10^{-13} \text{ mol/sec}$ (181.6 μm MCF-7spheroid)
 (200 μm のスフェロイドの呼吸活性 $2.0 \times 10^{-13} \text{ mol/sec}$ (Y. Zhou et al. / Anal.Biochem. 439 (2013) 187-193))

図 3-8. 酸素濃度勾配、酸素消費計算検討

3.1.4 測定時間に関する検証

前項のスフェロイドを用いた検証で、測定時間（東北大学の要件では 5 分以内）の検討と検証を行った。

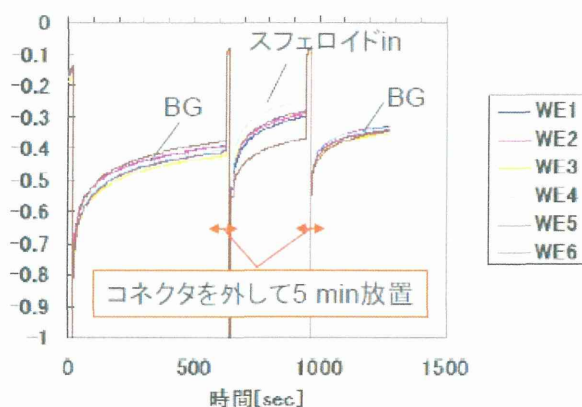


図 3-9. 5 分間の酸素還元電流の推移

図 3-9 で、スフェロイド投入直後から酸素還元電流の変化が読み取れており、定常状態（10分以上）を待たず、酸素還元電流の変化時定数を含む波形プロファイルから5分以内の測定が可能であることが示唆された。

4 試作検討結果

1) チップ型電極の設計・試作	業務成果	
<p>「各評価」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マニュアルのマイクロプローブの手技を廃止すること ・電極には生体適合材料を使用すること ・チップ電極は受精卵に悪影響を与えないこと ・操作性に優れ、5分以内に測定可能にすること ・測定数に合わせて数個(6個程度)並んだ形のものを試作すること <p>「総合評価」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マニュアル操作をなくし、一度に5分以内で測定できる設計になっていること ・受精卵に対し有害な事象が生じないこと ・耐久性に優れ、高価でないこと 	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p>	<p>マイクロプローブ廃止</p> <p>シリコン、シリコン、アクリル、白金のみで構成、いずれも生体適合材</p> <p>5分以内測定可能</p> <p>5個並んだものを試作</p> <p>量産効果を見込める半導体プロセスにより実現</p>
2) チップ型プローブの検証評価	業務成果	
<p>「各評価」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・従来機器のポテンシostatを改造し、チップ型電極による測定を可能にすること ・測定アルゴリズムの評価をすること ・従来機器のソフトを改造し、チップ型電極による酸素消費計算を可能にすること ・酸素濃度勾配のシミュレーションをし、酸素消費計算式を開発すること <p>「総合評価」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・チップ型電極による測定が可能なポテンシostatであること ・酸素消費量の計算を可能にし、計算式を確立すること 	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p>	<p>変換アダプターを試作</p> <p>報告書本文に記載</p> <p>従来機器のEXCEL出力にて計算可能</p> <p>報告書本文に記載</p> <p>変換アダプターを使用して実現</p> <p>計算式確立</p>
3) チップ型プローブの電気化学的検証	業務成果	
<p>「各評価」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・測定電流を銀塩化銀参照電極に対し、10mmol/Lフェロセン液中で30nA以下 ・測定回数を重ねても、再現性のある結果が得られること <p>「総合評価」</p> <ul style="list-style-type: none"> ・測定電流が30nA以下で測定可能であること ・再現性のある結果が得られること 	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p>	<p>10nA以下実現</p> <p>報告書本文に記載</p> <p>10nA以下実現</p> <p>報告書本文に記載</p>

5 試作品納品物

1. 本報告書ファイルに試作チップ（クリアファイル中）
2. クリノ社製 CRAS システム用変換アダプター

6 打合せ記録

6.1 2013年12月10日 報告資料

2013/12/10

受精卵活性測定
デバイス

受精卵活性測定デバイス 開発進捗

2013年12月10日

パナソニック株式会社
オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社
技術本部 エコマテリアル開発センター
バイオデバイスグループ

パナソニック(株) AIS社 技術本部 エコマテリアル開発センター バイオデバイスグループ

Panasonic
1

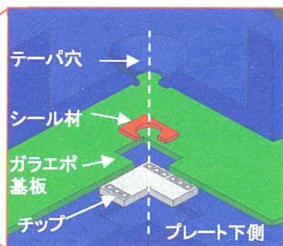
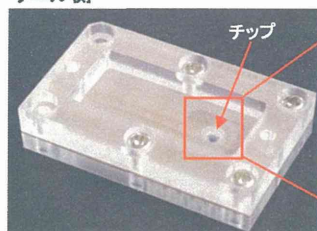
受精卵活性測定
デバイス

測定プレート設計開発進捗

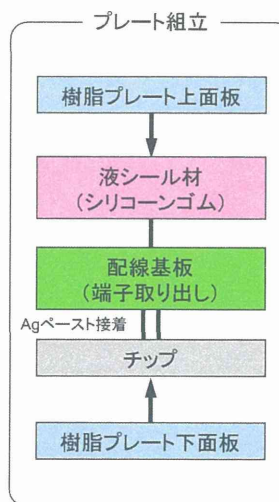
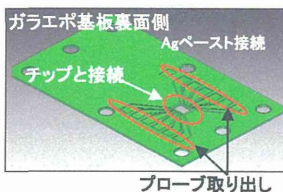
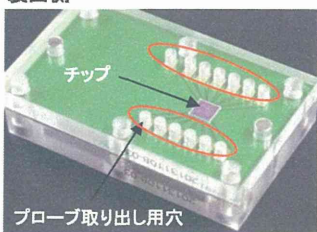
2013/12/10

測定プレート構造 (Proto.2)

ウエル側



裏面側



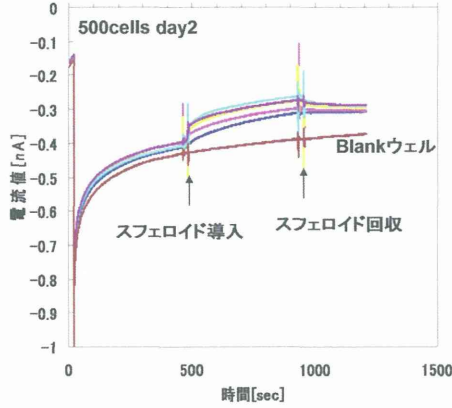
Proto.1と比べ、組立容易性を向上させたProto.2へ切り替え。
ES0は、Proto.2の4ウェル構造のプレートを設計/試作中。

パナソニック(株) AIS社 技術本部 エコマテリアル開発センター バイオデバイスグループ

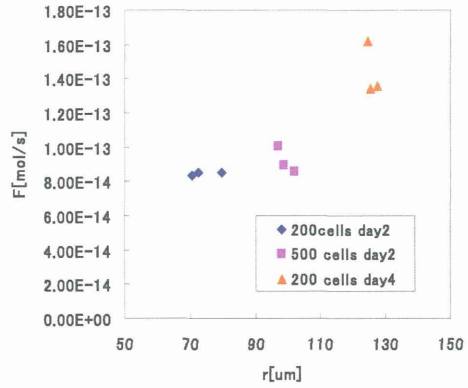
Panasonic
2

スフェロイド(細胞塊)
酸素消費量測定

評価チップ : ME1301-P02-03 C11 Proto.1
測定方法 : 6電極同時ステップ印加(-0.5V印加)
測定液 : ERAM-2



(1) スフェロイド導入/回収と酸素還元電流変化



(2) 酸素消費量とスフェロイド径の相関

◆酸素還元電流の外乱要因を低減し、スフェロイド近傍での溶存酸素濃度勾配の検出に成功。
◆スフェロイド近傍での溶存酸素濃度勾配から酸素消費量を算出、スフェロイド径と相関があることを確認。
(マイクロプローブ方式と同様の傾向を示す)

Panasonic

パナソニック(株) AIS社 技術本部 エコマテリアル開発センター バイオデバイスグループ

3

測定結果(代表例)

【測定条件】チップ P02-03 Prot.1 C11-e12345
装置: HA1010mM8 (Hokuto Denko)
測定液: ERAM-2
走査範囲: 0 V ~ -0.5 V

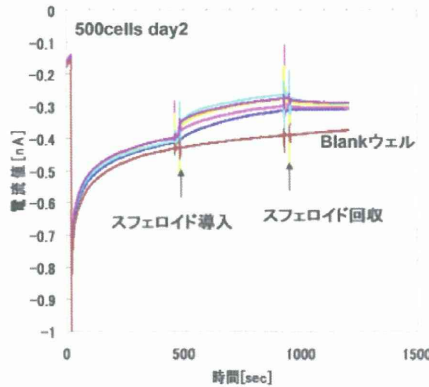


Fig. 3 測定結果(WE6はBlankウェルに接続)

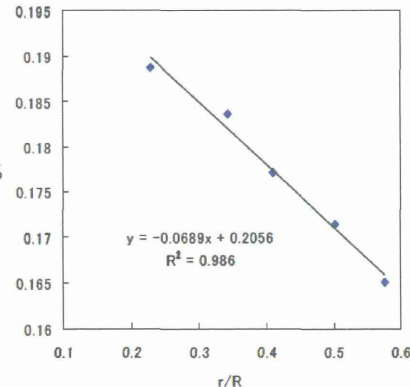


Fig. 4 溶存酸素濃度プロット

◆電極距離依存的に酸素濃度勾配を検出できた(第2回測定と同様の結果)

Panasonic

パナソニック(株) AIS社 技術本部 エコマテリアル開発センター バイオデバイスグループ

4

まとめ／今後の計画

まとめ

- (1) 専用設計のProto.2測定プレート(1ウェルタイプ)を完成。組立工程の安定化を確認。
4ウェルタイプのES0測定プレート設計中。2013年12月中に完成予定。
- (2) 東北大学 工学部 末永研究室のご協力により、生体(スフェロイド)での酸素消費量算出に成功。
Ptマイクロプローブ方式で報告されている「スフェロイド径と酸素消費量の関係」と同様の傾向を確認。

今後の検討予定

- (1) チップ設計／薄膜MEMSプロセス技術開発
 - ・生体近傍での溶存酸素濃度分布の二次元分布を考慮した、チップ設計の改善
 - ・測定バラツキ、電極特性バラツキを低減するチップ設計、および薄膜MEMSプロセス技術改善
- (2) プレート設計／組立工法開発
 - ・動物受精卵での実験に対応可能な、「ES0測定プレート」の設計および試作
- (3) 電気化学測定プロトコル開発
 - ・複数の生体(スフェロイド)での酸素消費量比較
 - ・測定バラツキを低減する測定条件の開発

受精卵活性測定デバイス 開発進捗

- (1) 測定プレート設計/開発進捗
- (2) 生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況
- (3) まとめ・今後の検討予定

2013年 12月 24日

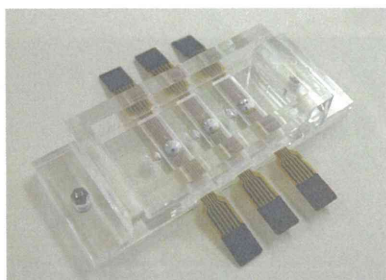
パナソニック株式会社
オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社
技術本部 エコマテリアル開発センター
バイオデバイスグループ

測定プレート設計/開発進捗

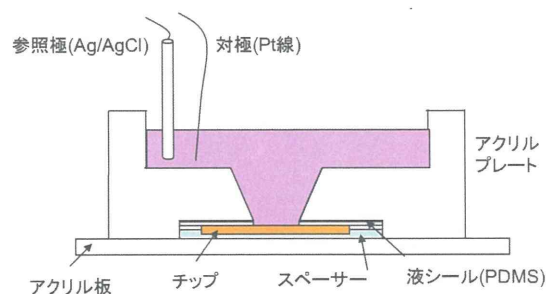
従来プレート構造(Proto.1)

※2013/07/04 報告資料抜粋

使用TEGチップ : ME1301 4×4mmチップ
プレート実装方法 : アクリルプレート(クリノ社提供)に追加加工(ザクリ処理)、ウェル下部を開口したものを使用。
: PDMSをシート化し、プレート-電極間をシール。
裏面からPDMS膜・スライドガラスで押さえつけ液漏れ処理。



(1) チップ組込型 測定プレート
(チップサイズ: 4mm×4mm)



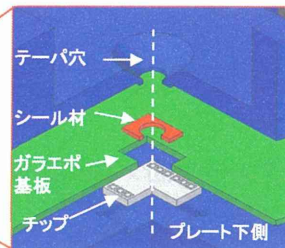
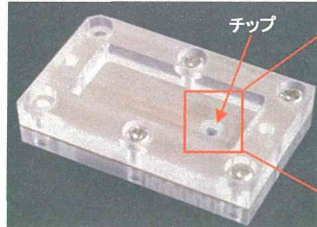
(2) チップ組込型測定プレート 断面イメージ

- ◆電極取り出し ...フレキシブル基板(FFC)とチップ上電極パッドをAgペーストで接着。12電極を取り出し。
 - ◆液だめ構造 ...シート化したPDMS(ポリジメチルシロキサン:シリコーンゴム)で、プレート/チップ間を液シールする。チップ全体を裏面からアクリル板で押さえつけ、固定。
- 生体での呼吸活性評価が可能な、1st Prototype構造を完成。東北大学 工学部(末永研究室)にて評価予定。

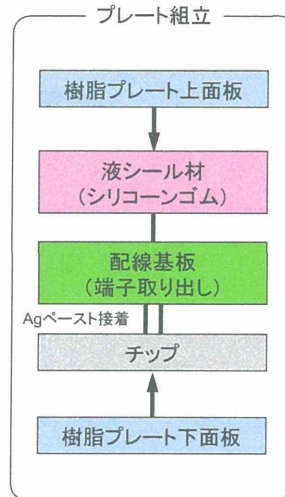
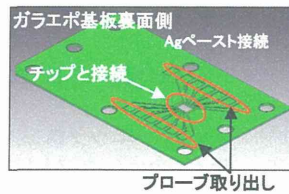
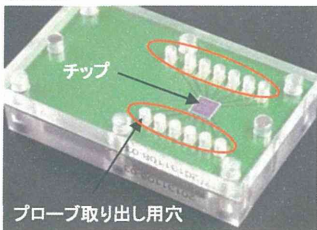
測定プレート設計／開発進捗

測定プレート構造 (Proto.2)

ウェル側



裏面側

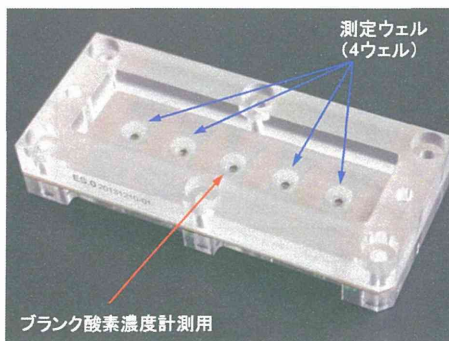


Proto.1と比べ、組立容易性を向上させたProto.2へ切り替え。
生体での測定機能評価は、本プレートで実施。

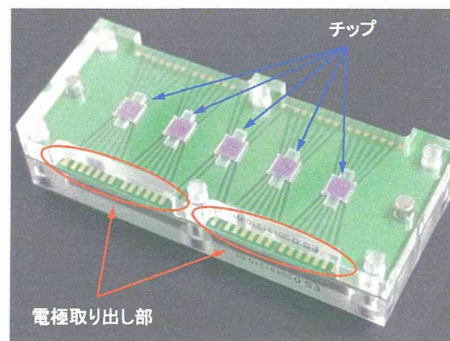
測定プレート設計／開発進捗

測定プレート構造 (ES0)

ウェル側



裏面側



Proto.2同等部材および同一の組立工法を適用し、4つの測定ウェルを持つ”ES0”測定プレートを完成。
未永研究室のご協力により、生体(スフェロイド)での機能評価でProto.2同等性能が得られることを確認済み。

生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

生体(スフェロイド)評価概要
※末永研究室ご協力(第3回)

全サンプル数	良否判定	実験項目	実験後解析
東北大学 末永研究室 第3回実験 持込サンプル n=31 (チップ数)	良品 n=19	スフェロイド 酸素消費量評価 n=7	バラッキ原因 調査中
		チップ開発 電気化学実験用 n=12	
	不良 n=12		電極導通不良 ※組立工程改善済み

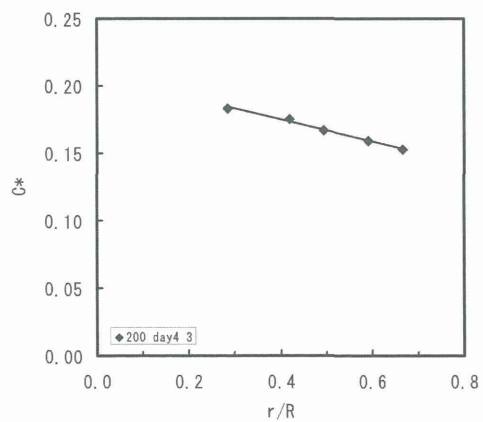
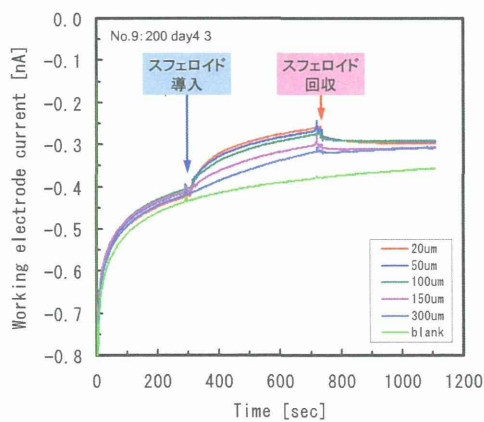
今回の実験では、組立工程の条件最適化(Agペースト塗布条件)が間に合わず、導通不良発生。→改善済み
組立良品の中から、n=7で生体(スフェロイド)の酸素消費量測定を実施。

生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

スフェロイド(細胞塊)
酸素消費量測定

測定方法 : 片側5電極同時ステップ電位印加 (-0.50V)
測定液 : ERAM-2
サンプル : No.9

C* = 溶存酸素濃度 [mM]
r/R = スフェロイド半径r/各電極までの距離R



(1) スフェロイド導入/回収と酸素還元電流変化

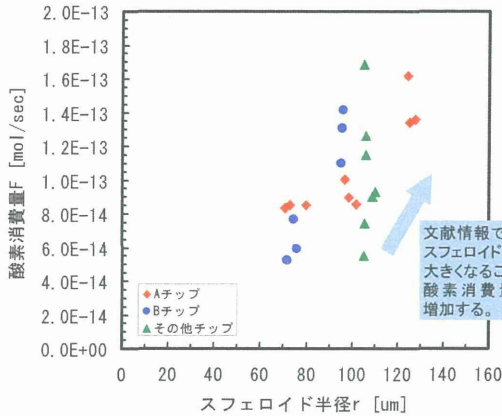
(2) スフェロイド近傍での溶存酸素濃度勾配

微小電極でモニターされる酸素還元電流の変化から、スフェロイド近傍での溶存酸素濃度勾配の検出に成功。

生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

スフェロイド酸素消費量 評価結果 (スフェロイドサイズ依存性)

測定方法 : 片側5電極同時ステップ電位印加 (-0.50V)
 測定液 : ERAM-2
 演算式 : 半球面拡散 適用



測定日	No.	Chip ID.	凡例	スフェロイド		酸素消費量 [mol/sec]
				識別名	半径 [um]	
13/11/01	1	G11-B	Aチップ	200 day2.3	79.7	8.49E-14
13/11/01	2	G11-B	Aチップ	200 day2.4	72.6	8.49E-14
13/11/01	3	G11-B	Aチップ	200 day2.5	70.5	8.35E-14
13/11/01	4	G11-B	Aチップ	500 day2.1	101.8	8.55E-14
13/11/01	5	G11-B	Aチップ	500 day2.2	98.7	8.97E-14
13/11/01	6	G11-B	Aチップ	500 day2.3	96.9	1.00E-13
13/11/01	7	G11-B	Aチップ	200 day4.1	124.4	1.62E-13
13/11/01	8	G11-B	Aチップ	200 day4.2	127.4	1.36E-13
13/11/01	9	G11-B	Aチップ	200 day4.3	125.2	1.34E-13
13/11/07	10	B04-T	Bチップ	500 day2.1	96.0	1.42E-13
13/11/07	11	B04-T	Bチップ	500 day2.2	95.5	1.30E-13
13/11/07	12	B04-T	Bチップ	500 day2.3	95.4	1.10E-13
13/11/07	13	B04-T	Bチップ	200 day2.2	75.7	5.91E-14
13/11/07	14	B04-T	Bチップ	200 day2.3	74.3	7.68E-14
13/11/07	15	B04-T	Bチップ	200 day2.4	71.3	5.25E-14
13/10/30	16	G04-T	その他チップ	500 day2.2	110.0	9.28E-14
13/10/30	17	B04-B	その他チップ	500 day2.3	108.9	8.99E-14
13/10/30	18	D04-B	その他チップ	500 day2.4	105.1	1.68E-13
13/10/30	19	D04-T	その他チップ	500 day2.5	106.2	1.26E-13
13/10/31	20	J04-B	その他チップ	200 day3.8	106.0	1.15E-13
13/10/31	21	J04-T	その他チップ	200 day3.9	105.4	7.45E-14
13/10/31	22	I04-T	その他チップ	200 day3.10	105.2	5.51E-14

(1) スフェロイド酸素消費量とスフェロイド径

(2) 参考: 測定データ

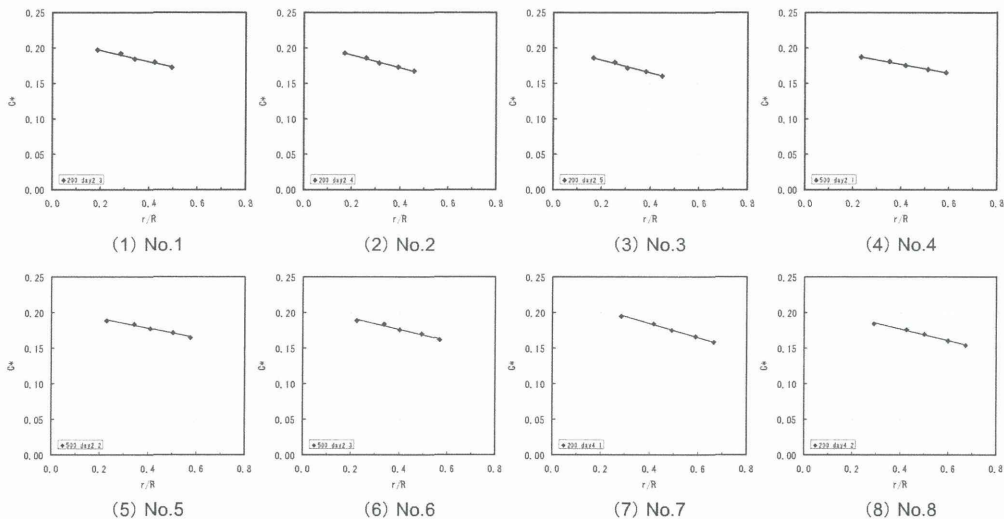
スフェロイド径と酸素消費量の間に傾向は見られるが、チップ間/測定間でのバラツキが大きい。チップ改善/測定プロトコル改善によってバラツキを低減できる方法について継続検討する。

生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

参考: 酸素濃度勾配解析データ

測定方法 : 片側5電極同時ステップ電位印加 (-0.50V)
 測定液 : ERAM-2

C* = 溶存酸素濃度 [mM]
 r/R = スフェロイド半径r/各電極までの距離R



(1) No.1

(2) No.2

(3) No.3

(4) No.4

(5) No.5

(6) No.6

(7) No.7

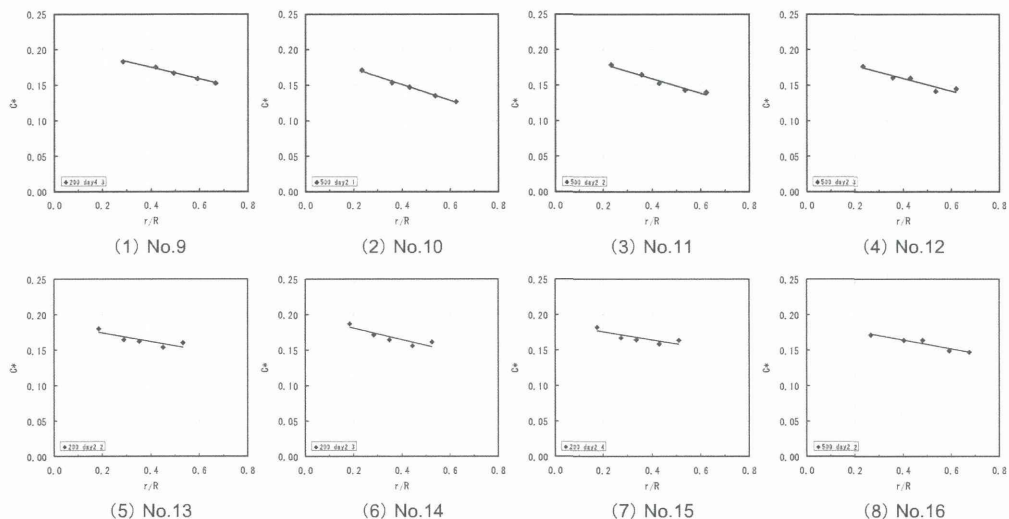
(8) No.8

生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

参考: 酸素濃度勾配解析データ

測定方法 : 片側5電極同時ステップ電位印加 (-0.50V)
測定液 : ERAM-2

C* = 溶存酸素濃度 [mM]
r/R = スフェロイド半径r/各電極までの距離R



生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

参考: 酸素濃度勾配解析データ

測定方法 : 片側5電極同時ステップ電位印加 (-0.50V)
測定液 : ERAM-2

C* = 溶存酸素濃度 [mM]
r/R = スフェロイド半径r/各電極までの距離R

