

II. 分担研究報告書

5. スフェロイドを用いたチップ型電極の測定結果に関する研究

分担研究者 菅沼 亮太（福島県立医科大学講師）

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

スフェロイドを用いたチップ型電極の測定結果に関する研究

研究分担者 菅沼 亮太 福島県立医科大学講師

研究主旨

新しく開発した全自動受精卵呼吸測定装置は、以前にクリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0）に比較し、湿潤環境で容易に操作可能な機器である。今回、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、酸素消費に伴う濃度勾配に着目し新規受精卵呼吸測定装置を用いて測定することを試みた。

本研究ではまず始めにチップ型電極を用いて、フェロセンメディエータ液中で銀塩鹿銀参照電極を用いた酸化還元電流をサイクリック・ボルタンメトリー（CV）測定により検証した。また、MCF-7細胞からスフェロイドを作成し酸素消費量を測定した。さらに、酸素濃度勾配のシュミレーションと酸素消費量を計算式で明らかにした。

まず試作のためにチップ型プローブの作成を行った。キャビティの直径と作用電極の直径を数サイズで検討し最適なサイズを確立した。次にCV測定し、10 nA以下の電流で測定可能なことを確認した。さらに200 μmのスフェロイドを作成し5分以内に測定可能なことを検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離を用いて関係式を明らかにした。

今回の検討より、チップ型電極の設計・施策が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が可能であることが明らかになった。今後はその再現性を確認し、ヒト余剰卵における計測につなげていきたいと考えている。

研究協力者

鈴木 聡 (福島県立医大助手)

A・研究目的

以前にクリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置 (CRAS-1.0) はマニュアルの

マイクロプローブを用いた機器であり、手技習得に長期間のトレーニングを要する。そのため、一般の不妊診療には取り入れが困難で普及の妨げとなっていた。今回新しく開発した全自動受精卵呼吸測定装置は、全自動で小型であり湿潤環境で容易に操作可能な機器である。今回、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、そのサイズや測定時間などを決め、その後酸素消費に伴う濃度勾配に着目し新規受精卵呼吸測定装置を用いて測定することを試みた。

B・研究方法

本研究で用いたチップ型電極の上面および断面イメージを提示する (図1)。

まず始めに、チップ電極の設計・施策を行った。キャビティの直径 (50-400 μm で6種類) と作用電極の直径 (3-10 μm で3種類) を設定し、最適なサイズを確立した。次に従来機器のポテンシオスタットを改造し、測定液中 (ERAM 2) での溶存酸素還元電流を測定した。さらに200 μm のスフェロイドを作成し、5分以内に測定可能か検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離から関係式を検討にした。

C・研究結果

図1に、検討したチップ構造を示す。この容器は受精卵をセッティングし培養器の中に置くだけで呼吸量が測定可能なため操作性は著しく改善する。最終的には、このチップ測定数が4個並んだ形で樹脂プレートに埋め込まれるように作成した。

ターゲットとなる構造 (各部の寸法等) を絞り込むため、キャビティの直径 (50-400 μm で6種類) と作用電極の直径 (3-10 μm で3種類) を設定し測定を行ったところ、キャビティの直径200 μm 、作用電極の直径5 μm で最適な測定結果が得られた (図2)。

次に、北斗電工が開発した従来機器のポテンシオスタットを改造し、開発機器に接続をこころみた。ERAM 2を測定液として溶存酸素還元電流を測定したところほぼ一致した結果が得られ、開発機器による測定が可能であることを確認した (図3)。

さらに、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、そのサイズを約200 μm になるように設定した (図4)。そして、測定条件や測定対象などを決め、キャビティからの距離による酸素消費量を検討し、新規受精卵呼吸測定装置を用いて距離依存的に測定可能なこと (図5)、そして10 nA以下の電流で測定可能なこと (図6) を確認した。

D・考察

今回、新規開発を行ったチップ型電極のサイズ設計や計測方法の検討が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が測定可能であった。引き続き、電流量や開発機器による測定感度差を検討していく。今後はそれらの再現性を確認し、動物卵やヒト余剰卵における計測につなげていきたいと考えている。

E・結論

今回の検討より、チップ型電極の設計・施策が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が可能であることが明らかになった。今後はその再現性を確認し、動物卵やヒト余剰卵における計測で実用化を目指していく。

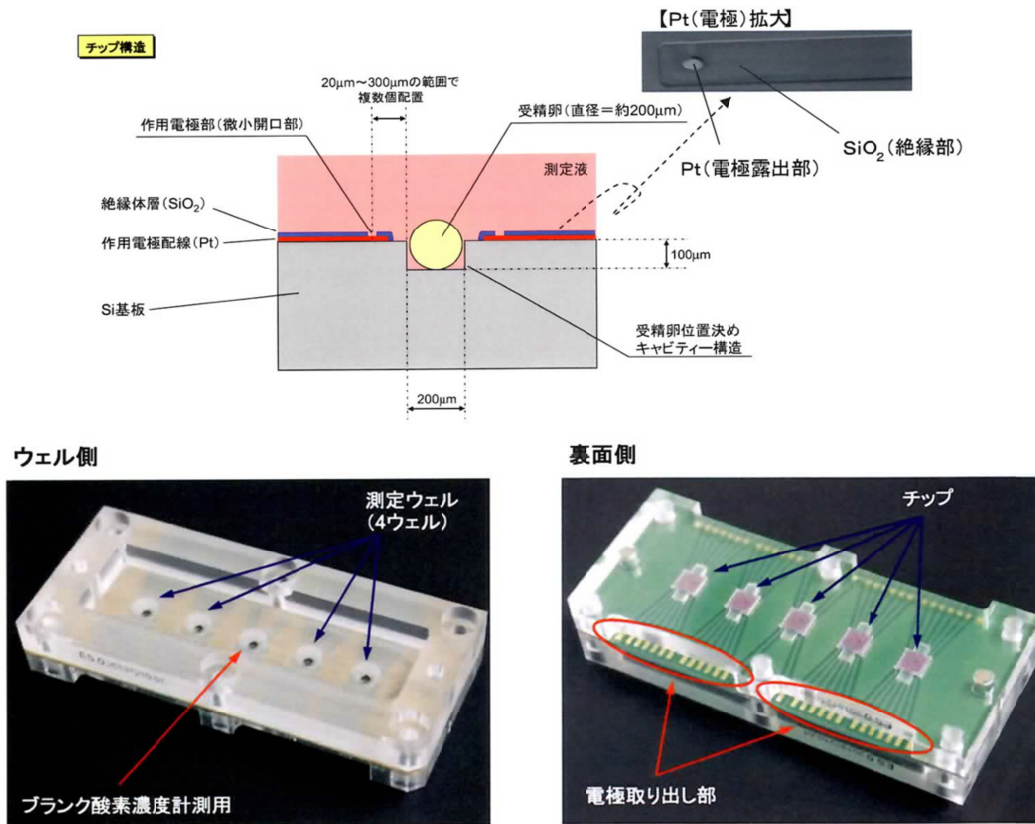
G・研究発表

特記事項なし

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

(図1) チップ型電極の写真およびそのイメージ



(図2) キャビティ直径と作用電極直径の検討

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

		作用電極 直径 [um]		
		10	5	3
キャビティ ○形 直径 [um]	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

②作用電極直径依存性
→ 測定プロトコル

①キャビティ直径依存性
→ 最適デバイス構造

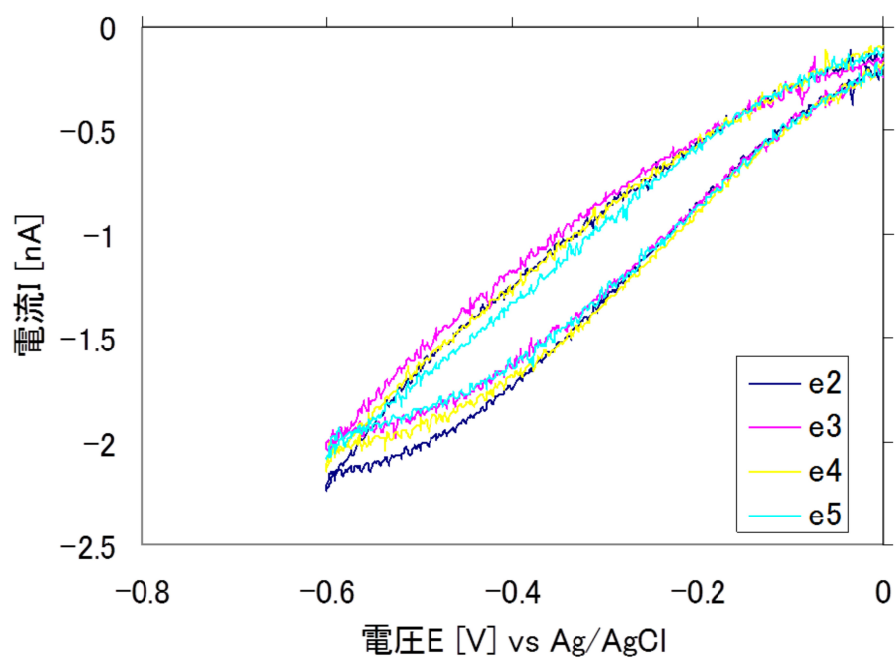
(図3) 測定液中での溶存酸素還元電流測定

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0616

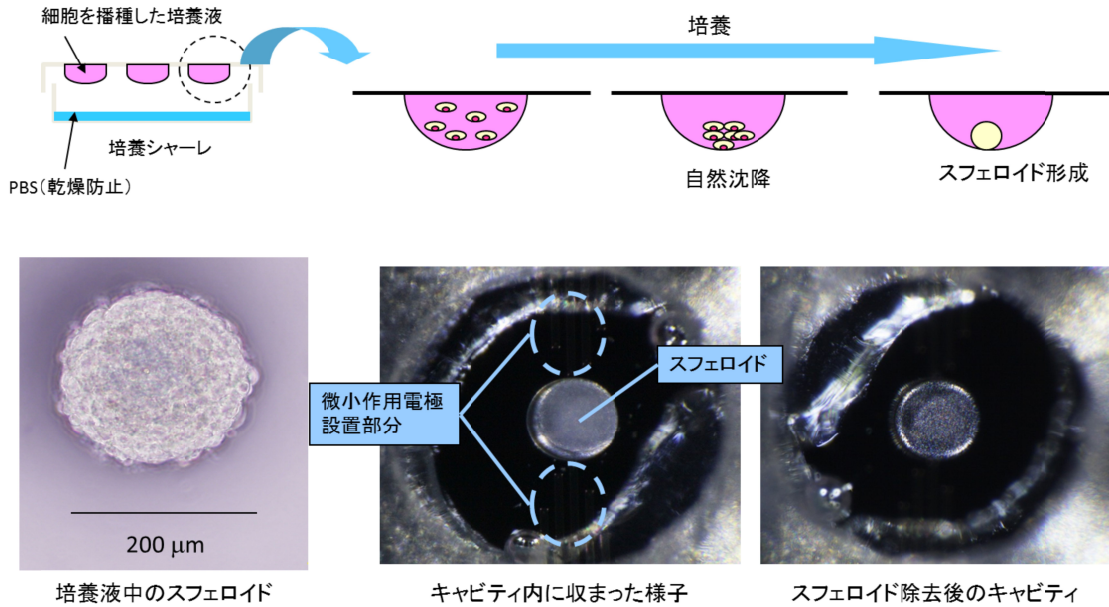
装置: HSV-100F (Hokuto Denko)

測定液: ERAM-2

走査範囲: 0 V → -0.5 V → 0 V



(図4) MCF-7を用いたスフェロイド作成



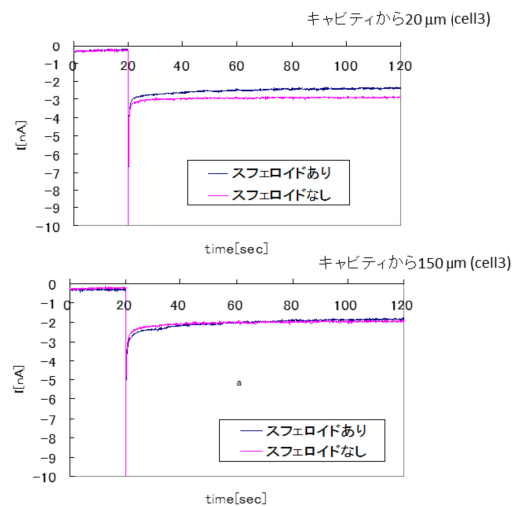
(図5) MCF-7スフェロイドを用いた呼吸活性測定

【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: 0V (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 μm (200 cells, 3days)

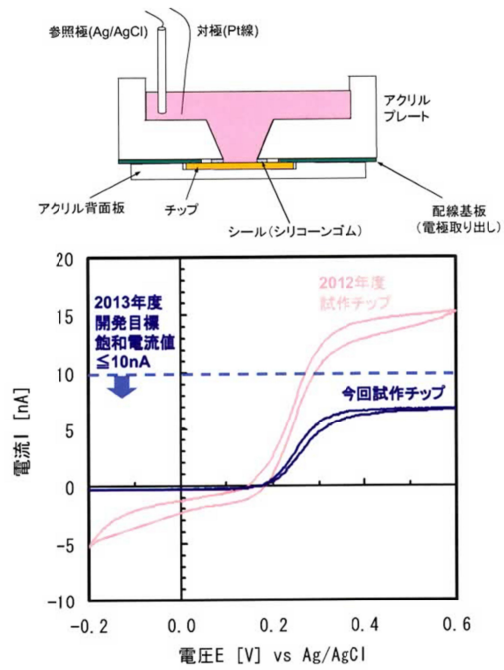
cell1			
キャビティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.736	-2.976	-0.240
50	-3.428	-4.095	-0.667
100	-2.355	-2.623	-0.268
150	-2.988	-3.012	-0.024

cell2			
キャビティからの距離[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			
キャビティからの距離[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



(図6) 新規受精卵呼吸測定装置を用いたCV測定



【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)