

第4回受精卵活性測定デバイス開発

生体を用いたデバイス評価
(末永研究室 ご協力)

2013年 9月 2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

生体を用いたデバイス評価

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

		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

◆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エータで初期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

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 今回ご報告内容	◆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)

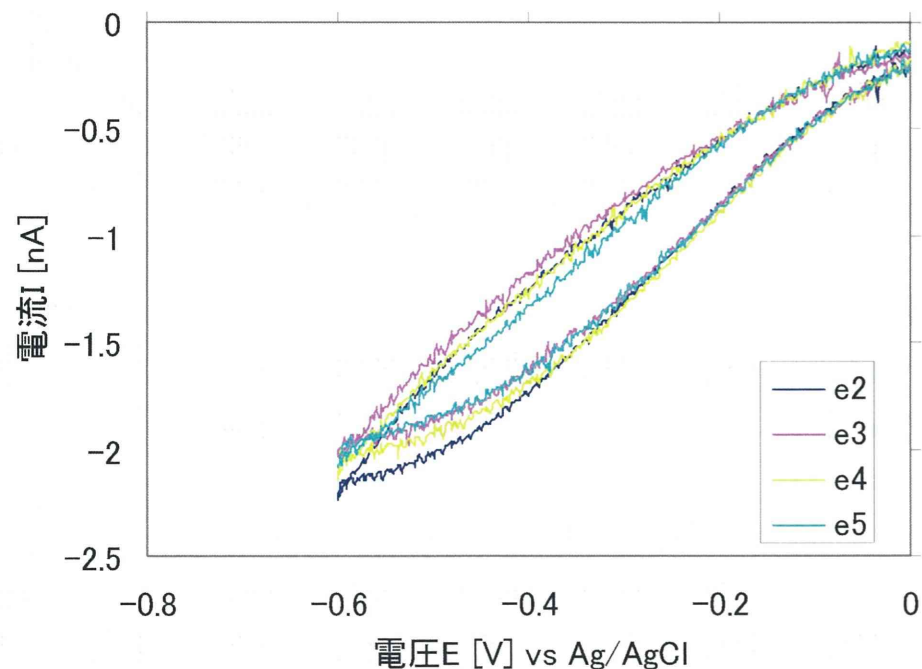
生体を用いたデバイス評価

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

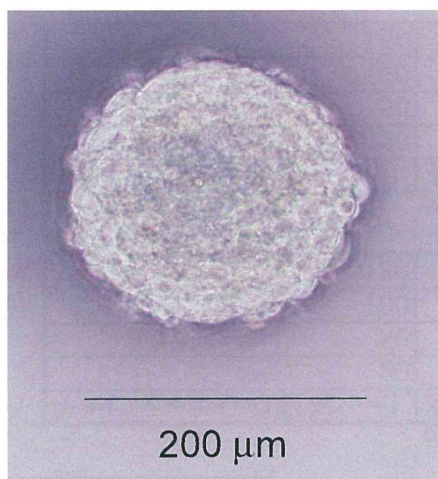
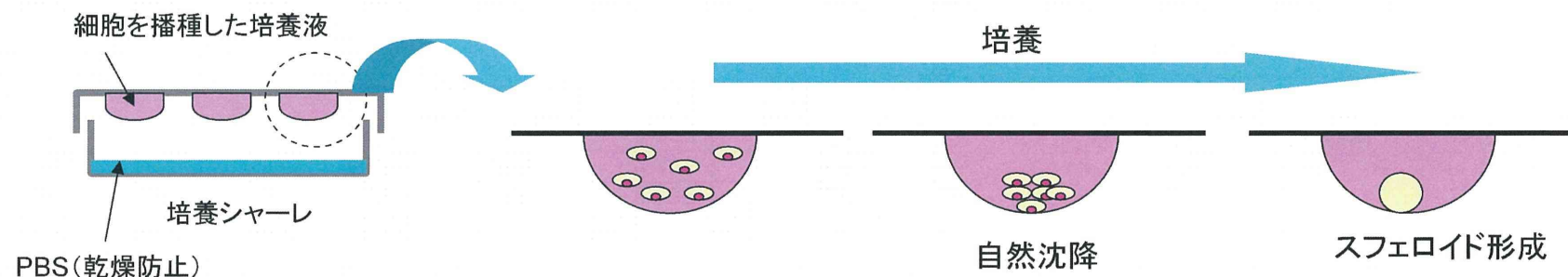


- ◆酸素還元電流 -2nA程度であり、電極サイズから想定される値が得られた。
- ◆還元側で定常電流は得られていない点については、今後原因調査を行う予定。
(末永先生コメント: 生体酸素消費の概算をすることは可能と思われる)

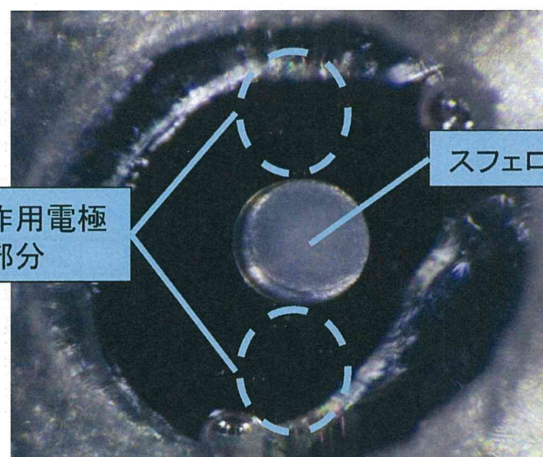
生体を用いたデバイス評価

MCF-7スフェロイド作製
マニピュレーション

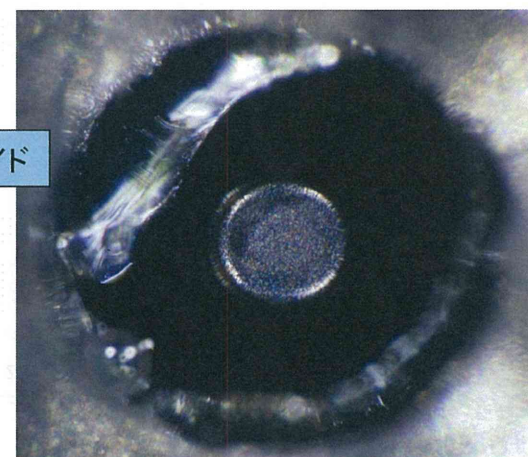
ハンギングドロップ法でMCF-7のスフェロイドを作製



培養液中のスフェロイド



キャビティ内に収まった様子



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

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) → -0.5V (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[um]	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

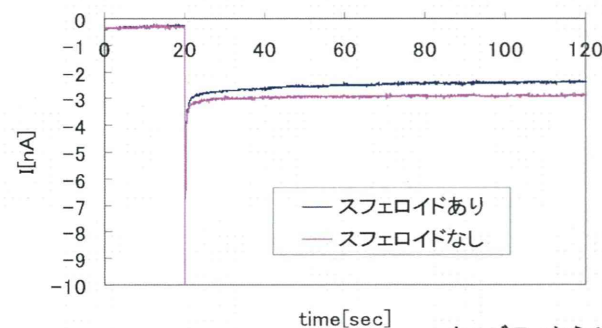
cell2

キャビティからの距離[um]	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

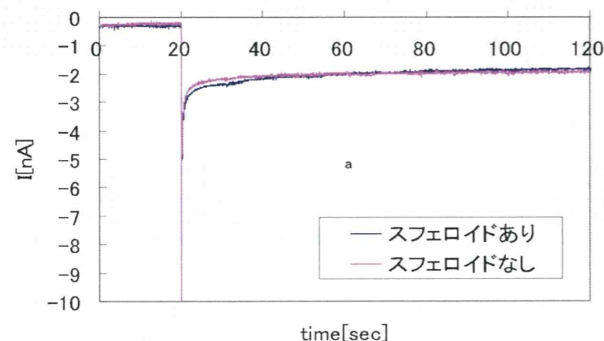
cell3

キャビティからの距離[um]	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

キャビティから20 μm (cell3)



キャビティから150 μm (cell3)



- ◆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。

(資料 9)

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ひます。



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(旭川)

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