

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

		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(G-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。

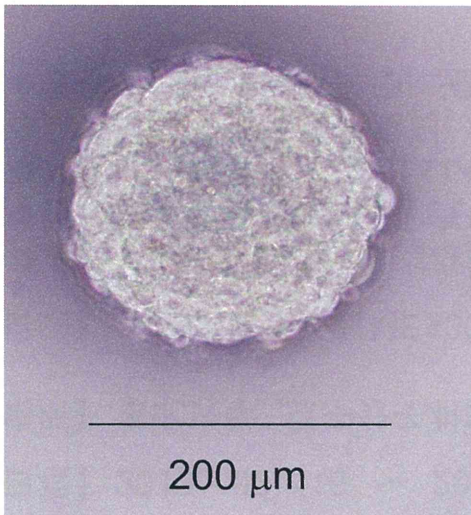
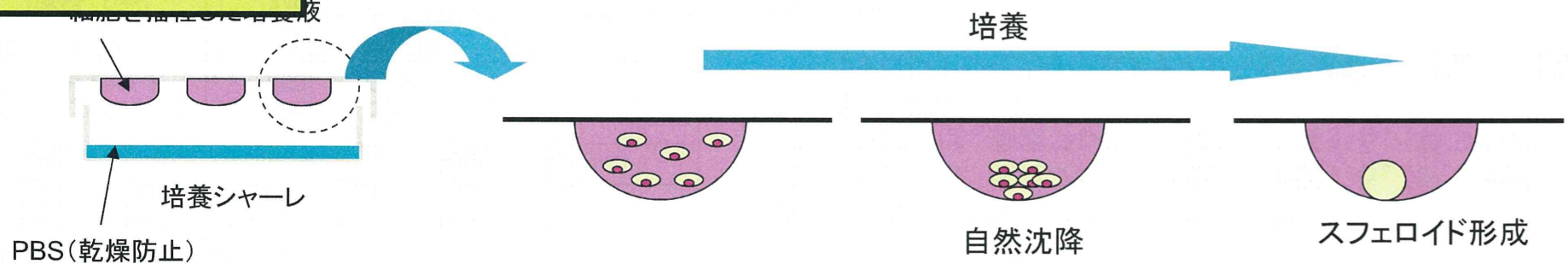
①キャビティ直径 依存性
→ 最適デバイス構造

②作用電極 直径依存性
→ 測定プロトコル

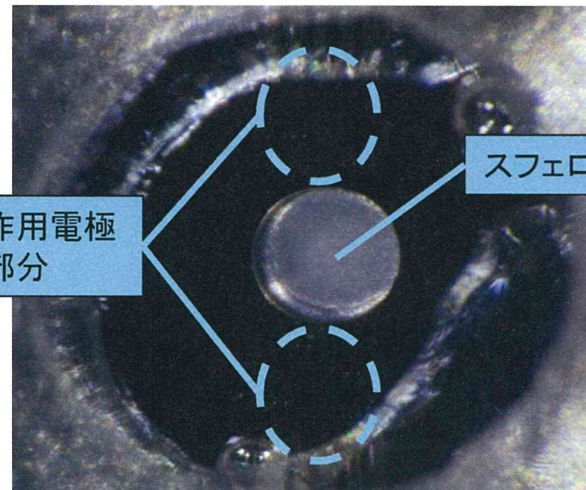
生体を用いたデバイス評価(第1回)

MCF-7スフェロイド作製
マニピュレーション

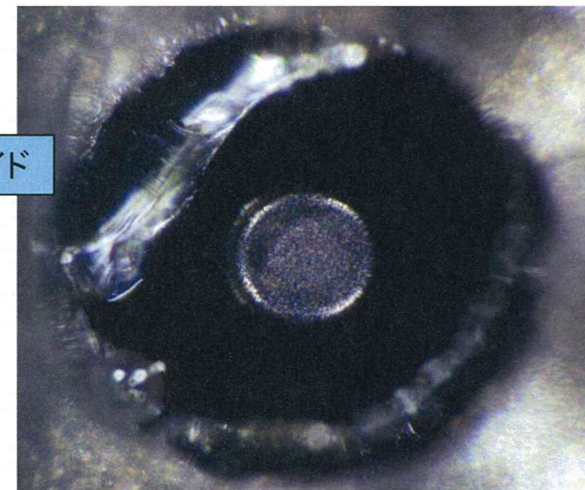
ハンギングドロップ法でMCF-7の スフェロイドを作製



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。

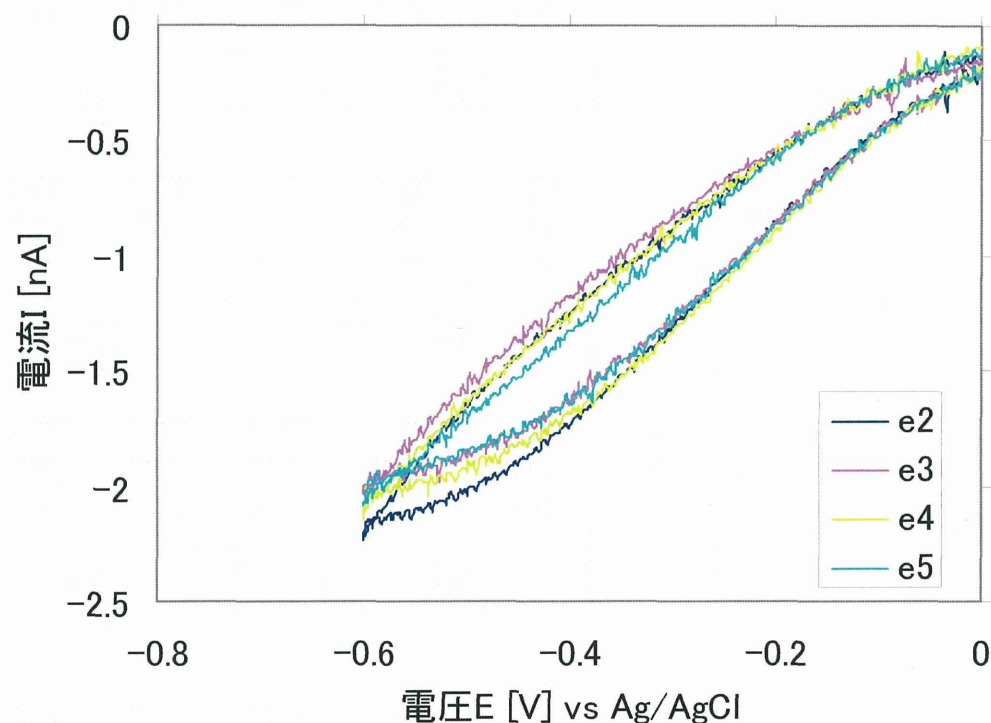
生体を用いたデバイス評価(第1回)

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) → -0.5V (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

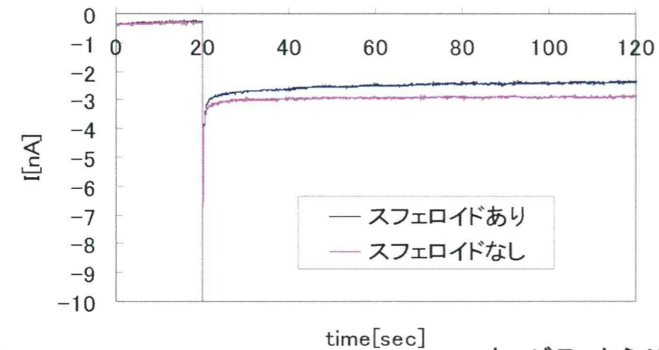
cell2

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

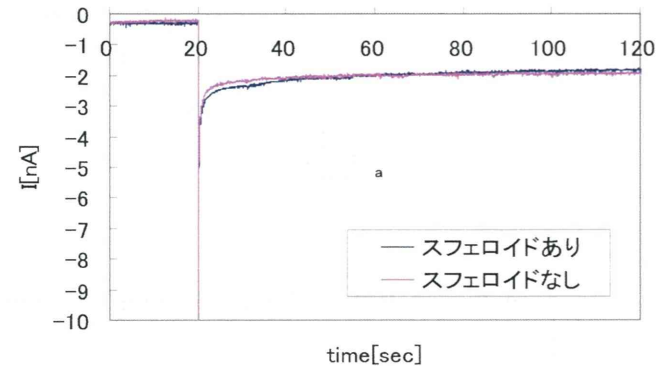
cell3

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

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。

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 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)

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
PMD A 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				
プロトコール作 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 10)

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ピード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