

平成23年度第3次補正予算事業 戦略的基盤技術高度化支援事業

「電気化学検出法による高感度・小型

エンドトキシン検査装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成25年2月

委託者 東北経済産業局

委託先 株式会社インテリジェント・コスモス研究機構

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1.1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1.1.1 研究開発の背景と目的	1
1.1.2 研究概要及び目標	1
1.1.2(1) 研究概要	1
① 使い捨て電極チップを実現する技術の確立	1
② 検査装置の開発	1
③ 事業化に関する研究	2
1.1.2(2) 研究目標	2
① 使い捨て電極チップを実現する技術の確立	2
② 検査装置の開発	2
1.2 研究体制	3
1.2.1 研究組織	3
1.2.2 管理体制	3
1.2.3 研究者等氏名	4
1.2.4 協力者及び指導・協力事項	5
1.3 成果概要	6
1.3.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立	6
1.3.2 検査装置の開発	6
1.3.2(1) 検査装置本体の試作機開発	6
1.3.2(2) 調査研究の実施	6
1.3.3 事業化に関する研究	7
1.3.3(1) 顧客への試作品の評価	7
1.3.3(2) 事業化に向けての市場調査	7
1.4 当該研究開発の連絡窓口	7
第2章 本 論	8
2.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立	8
2.1.1 電極チップの統合設計と電極成膜技術の検討	8
2.1.1(1) 電極チップの設計	8
2.1.1(2) 安価なカーボン材料の検討	8
2.1.1(3) 電極成膜厚さの検討	9
2.1.2 ゼロ補正技術の検討	9
2.1.3 プロトタイプチップの評価	9

2.2	検査装置の開発	10
2.2.1	検査装置本体の試作機開発	10
2.2.1(1)	検査装置のハードウェア開発	10
2.2.1(2)	検査装置のソフトウェア開発	12
2.2.1(3)	検査装置の統合評価結果	12
2.2.2	調査研究の実施	13
2.2.2(1)	既存製品の調査	13
①	全般的な調査	13
②	ベンチマークとしている Endosafe-PTS の調査	13
2.2.2(2)	エンドトキシン検査に係わる最新の研究動向	14
2.2.2(3)	従来市場の調査	14
2.2.2(4)	新しい市場の調査	15
①	生殖医療分野	15
②	移植医療分野	15
③	その他の分野	16
2.3	事業化に関する研究	17
2.3.1	顧客への試作品の評価	17
2.3.2	事業化に向けての市場調査	17
2.3.2(1)	従来市場の調査	17
2.3.2(2)	Endosafe-PTS との比較	17
第3章	全体総括	17
3.1	研究開発成果まとめ	17
3.1.1	使い捨て電極チップを実現する技術の確立	17
3.1.2	検査装置の開発	18
3.2	研究開発後の課題	18
3.2.1	使い捨て電極チップを実現する技術の確立	18
3.2.2	検査装置の開発	18
3.3	事業化について	19
	参考文献	20

第1章 研究開発の概要

1.1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1.1.1 研究開発の背景と目的

エンドトキシンは内毒素とも呼ばれ、人の血中に混入すると炎症性の反応を誘発し、敗血症性のショックにより死亡に至ることもある厄介な物質である。透析や再生・移植医療の現場では、エンドトキシンの測定と管理が非常に重要になっているが、従来品では検査技師でも煩雑な操作が必要であり、装置も高価なため小規模施設では導入に至っていない。本研究開発では、医療の安全性を確保するため、革新的な電気化学検出法を用いた電極チップと検査装置の高再現性、低雑音化、大量・低コスト生産化の課題を高度化目標として、電極チップの設計製造技術を確立し、小型検査装置を開発することを目的とする。

1.1.2 研究概要及び目標

1.1.2(1) 研究概要

現在透析用に市販されているエンドトキシン測定装置には、チャールスリバー社製の Endosafe®-PTS™ が競合品としてあるが、本体が 70 万円前後、カートリッジが 1 回あたり数千円と保険点数 (10 点) に対して非常に高コストであり、低コストの検査装置が期待されている。このような市場の要請に基づいて、本事業では安価な電極チップを実現するための電極構造と電極材料についての研究開発を行い、さらに高再現性とノイズ低減を意図した今回提案の実装技術の実用化を目指して、小型検査装置の試作開発を行った。また、試作した電極チップと検査装置を川下製造企業およびエンドユーザーが評価を行った。

① 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

本研究を開始する以前に、東北大学原子分子材料科学高等研究機構の末永研究室では電気化学反応を用いてエンドトキシンを測定するにあたり、市販の試薬をベースに複数の反応系をリレーする手法を開発し、特許出願を行っている。また、ダイヤモンドライクカーボン塗布ガラス基板を用いてフォトリソグラフィーで電極を構成した電極チップを作製し、このチップを用いて実用化に必要な感度の測定が可能であることを確認している。

本事業においては、これらの成果を踏まえ、電極チップの構造について詳細設計を進めると同時に各種カーボン材料サンプルの電気化学特性の評価を行い、安価な電極チップを実現する技術を確立した。

② 検査装置の開発

本事業では、試作する電極チップに結合できる電気化学測定基板と通信・制御基板などから構成されるエンドトキシン検査装置試作機を開発した。この試作機にパーソナルコンピュータ上のソフトウェアから測定に係わる各種パラメータを転送し、エンドトキシン測定の反応時間、測定限界など電極チップの基本的な

性能および問題点などを評価した。

川下産業に位置する生化学工業株式会社および東北大学稲垣助教（移植医療専門）と山形大学阿部教授（生殖医工学専門）のご協力により、エンドトキシン検査に係わる市場の動向ならびに現場の具体的ニーズについて調査を行った。さらに試作機について使いやすさなどの評価を行い、製品仕様の課題を明確にした。また、既存の競合品であるエンドトキシン検査装置（Endosafe®-PTS™）を購入し、本事業にて開発した試作機との比較評価を実施した。

③ 事業化に関する研究

試作機完成後、事業化に向けて市場調査の結果と照らし合わせて、電気化学検出法によるエンドトキシン検査装置が市場ニーズにどの程度マッチするか評価し、市場提案力のある開発要素について研究を行った。またエンドトキシン検査に係わる最新の技術動向、製品情報などを把握した。

1.1.2(2) 研究目標

① 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

電極チップの構造について詳細設計を進めると同時に各種カーボン材料サンプルの電気化学特性の評価を行い、安価な電極チップを実現する技術を確立することを目標とした。試作電極の性能として感度は 10 EU/L、測定時間は 10 EU/L では 60 分以内、100～10000 EU/L のレンジでは 10 分以内であることを目標とした。

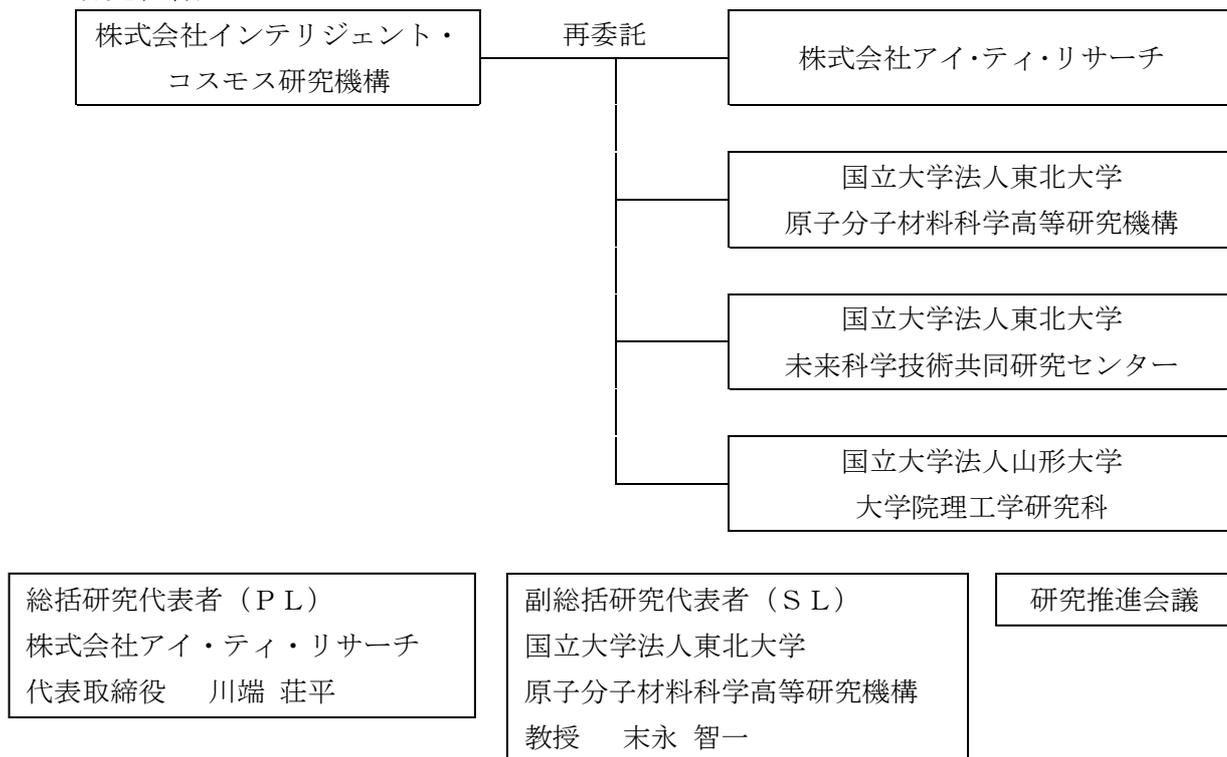
② 検査装置の開発

エンドトキシンを電気化学的に感度良く検出することを目的に、微小電流測定のために基板の実装技術を確立し、その他の要素技術を組み合わせてエンドトキシン検査装置試作機を開発する。試作機は、評価を実施する現場に簡単に持ち運び出来るよう小型、軽量にまとめることを目標とした。

ソフトウェアを組み込んだ検査装置およびプロトタイプチップを用いて統合的な検査装置の性能評価を行い、再現性（相対標準偏差）については、20%以内を目標とした。

1.2 研究体制

1.2.1 研究組織

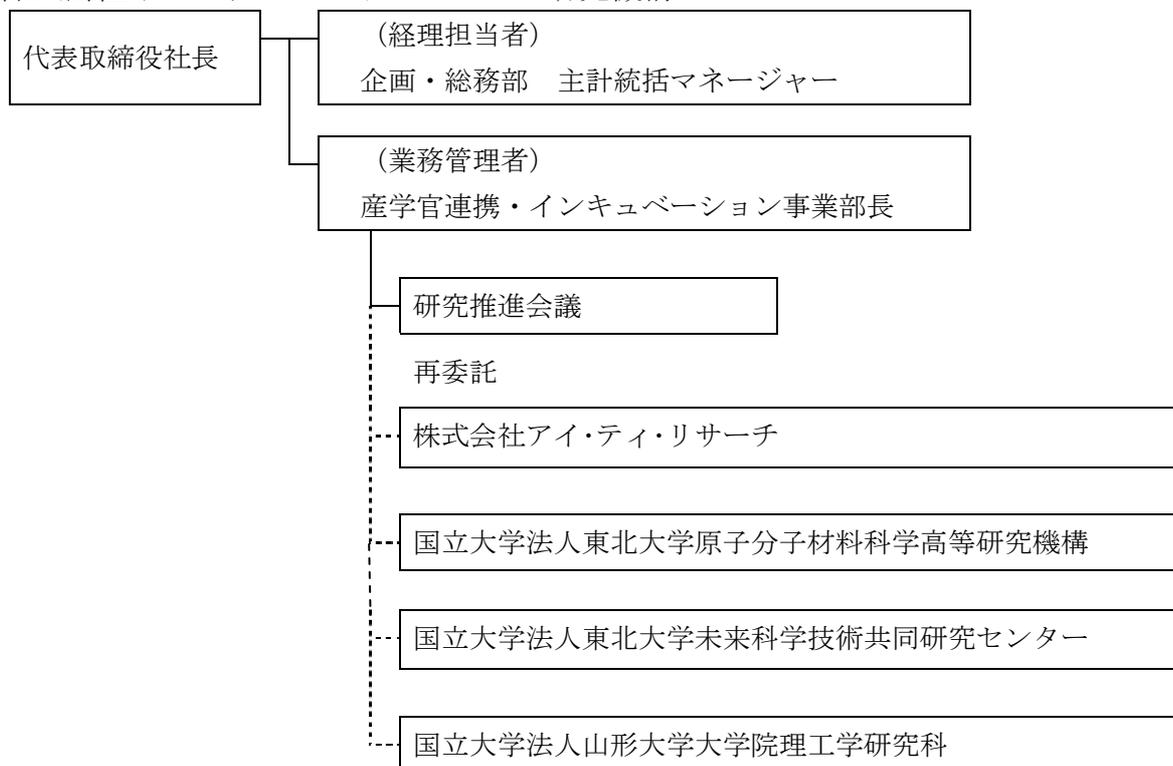


1.2.2 管理体制

管理体制は以下の通りである。

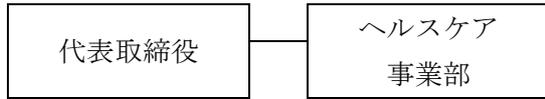
(1) 事業管理者

株式会社インテリジェント・コスモス研究機構

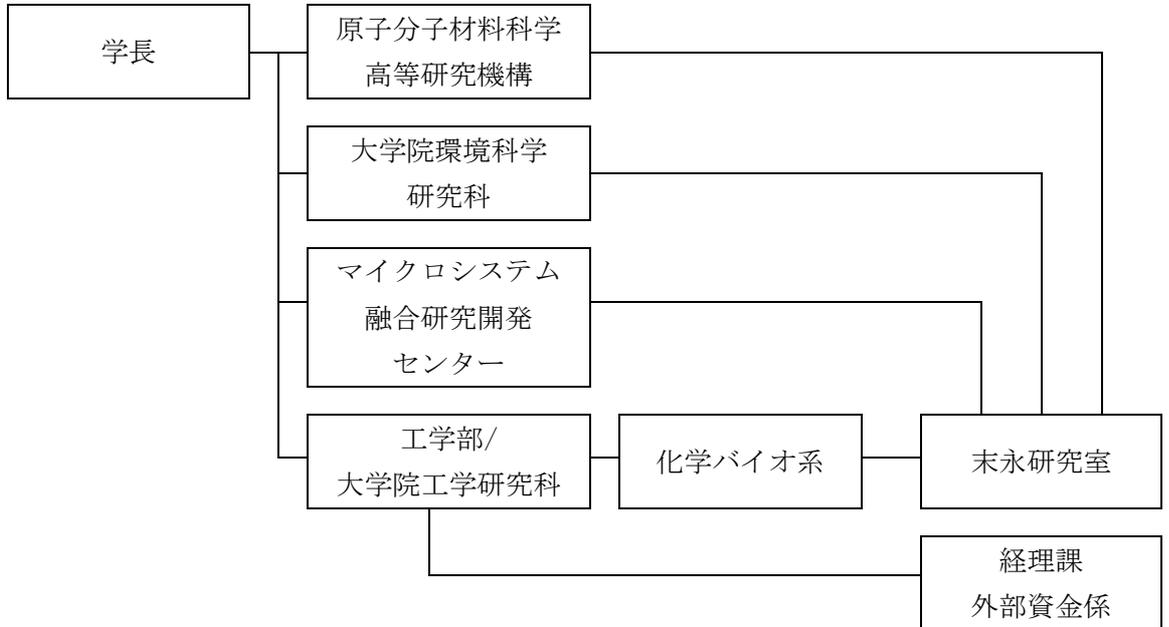


(2)再委託先

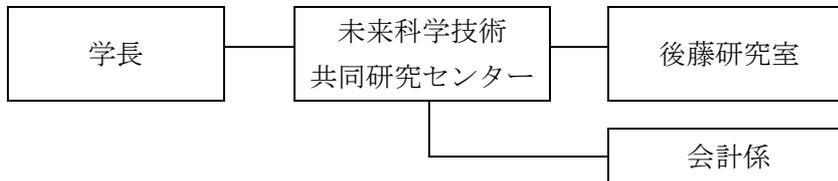
株式会社アイ・ティ・リサーチ



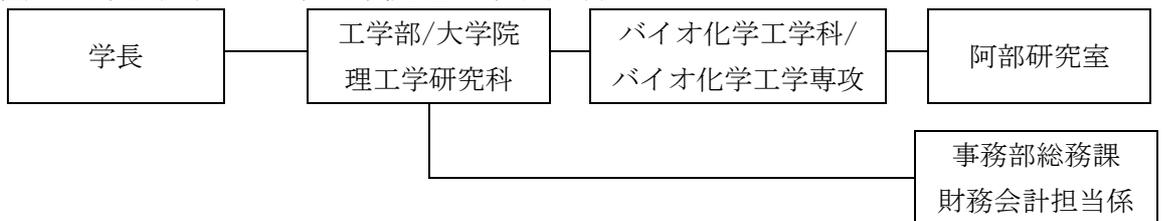
国立大学法人東北大学原子分子材料科学高等研究機構



国立大学法人東北大学未来科学技術共同研究センター



国立大学法人山形大学大学院理工学研究科



1.2.3 研究者等氏名

(1)研究員 (再委託先)

株式会社アイ・ティ・リサーチ

氏名	所属・役職	備考
川端 荘平	代表取締役	PL
鈴木 明宏	ヘルスケア事業部 事業部長	

三瓶 益市	ヘルスケア事業部 部長	
高野 真一郎	ヘルスケア事業部	

国立大学法人東北大学原子分子材料科学高等研究機構

氏名	所属・役職	備考
末永 智一	原子分子材料科学高等研究機構 教授	SL
伊野 浩介	大学院環境科学研究科 助教	
井上 久美	マイクロシステム融合研究開発センター 研究支援者	

国立大学法人東北大学未来科学技術共同研究センター

氏名	所属・役職	備考
稲垣 明子	未来科学技術共同研究センター 助教	

国立大学法人山形大学大学院理工学研究科

氏名	所属・役職	備考
阿部 宏之	バイオ化学工学専攻 教授	

(2)管理員（事業管理機関）

株式会社インテリジェント・コスモス研究機構

氏名	所属・役職	備考
鈴木 秀夫	産学官連携・インキュベーション事業部 プロジェクト・マネージャー	
小野 恵美子	産学官連携・インキュベーション事業部 管理員	

1.2.4 協力者及び指導・協力事項

アドバイザー 氏名	所属 / 主な指導・協力事項
小田 俊男	生化学工業(株) / 川下産業からの助言、試作機の評価
水村 光	生化学工業(株) / 川下産業からの助言、試作機の評価
西村 祐行	大日本印刷(株) / 印刷技術に関する助言、協力
新井 浩次	大日本印刷(株) / 印刷技術に関する助言、協力

1.3 成果概要

1.3.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

電極チップの構造について詳細設計を進めると同時に各種カーボン材料サンプルの電気化学特性の評価を行い、安価な電極チップを実現する技術を確立した。電極部の印刷にはスクリーン印刷を採用し、安価なカーボンインクで電気化学計測可能なチップの試作に成功した。またポンプを使わない安価な装置にするために、チップに流路を作製し、毛細管現象により途中に封入された凍結乾燥試薬と混合しながら試薬が検出部に到達するような設計とした。また、ゼロ補正技の検討を行い、量産工程への導入が可能な方法として、チップの組立てをクリーンルーム内で行い、そのままクリーンルーム内でパッケージングする方法を採用することとした。これらの技術を用いたプロトタイプチップを作製し、エンドトキシン検出性能を評価したところ、検出時間 60 分および 10 分でそれぞれ 5 EU/L、100EU/L 以上の検出感度を達成し、目標値を上回る成果を得ることができた。

1.3.2 検査装置の開発

1.3.2(1) 検査装置本体の試作機開発

電気化学計測方式が、ディファレンシャルパルスボルタンメトリ (DPV) 法からポテンシャルステップ・クロノアンペロメトリ (PSCA)法に変更になり、それに伴い PSCA 法に最適な仕様になるようエンドトキシン検査装置試作機全体の設計を見直して、エンドトキシン検査用の 1CH 試作機を完成させた。

試作機は、10pA までの微小電流を安定して測定することができ、電気化学計測のための基板の実装技術を確立した。電極チップは、37℃で反応させることが望ましいため、試作機内部に小型の恒温槽を設けた。発熱も吸熱もできるペルチエ素子を用いており、温度上昇して安定するまでに 5 分とかからない。恒温槽を設けたため、電流消費量が多くなったが、8,000mAh の高容量バッテリーを搭載することにより、バッテリードライブを 4 時間継続できることを確認している。

プロトタイプチップを用いた統合的な検査装置の性能評価では、再現性 (相対標準偏差) 20%以内を達成する見込みを得た。

1.3.2(2) 調査研究の実施

川下産業に位置する生化学工業株式会社および東北大学稲垣助教 (移植医療専門) と山形大学阿部教授 (生殖医工学専門) のご協力により、エンドトキシン検査に係わる市場の動向ならびに現場の具体的なニーズについて調査を行った。さらに試作機について使いやすさなどの評価を行い、製品仕様の課題を明確にした。

また、既存の競合品であるエンドトキシン検査装置 (Endosafe®-PTS™) を購入し、本事業にて開発した試作機との性能面、コストなどの比較評価を実施した。

1.3.3 事業化に関する研究

1.3.3(1) 顧客への試作品の評価

生化学工業株式会社に、検査装置試作機について性能面と使いやすさなどの操作性の評価を行っていただき、今後の製品仕様の課題を明確にした。

1.3.3(2) 事業化に向けての市場調査

透析施設と医薬品製造会社という従来の市場においてそれぞれ市場調査を行い、現場のニーズを集約した。またエンドトキシン検査に係わる最新の技術動向、研究情報を把握し、事業化に向けて今後の戦略的な開発の方向性などについて検討した。

1.4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社インテリジェント・コスモス研究機構

産学官連携・インキュベーション事業部 鈴木秀夫

TEL 022-279-8811 (代) FAX 022-279-8880

〒989-3204 宮城県仙台市青葉区南吉成六丁目 6 番地の 3

第2章 本論

本章では、本事業で行った開発の内容および結果について述べる。なお、本章で評価に用いたエンドトキシンは全て米国薬局方標準エンドトキシンを添付のプロトコルどおりに調製したものである。

2.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

2.1.1 電極チップの統合設計と電極成膜技術の検討

安価な電極チップを実現するための電極構造と電極材料についての研究開発を行った。本項では電極チップの設計、安価なカーボン材料の検討および電極成膜厚さの検討について、それぞれ開発の詳細と結果を述べる。これらの検討の結果、当初の目標値を上回る成果を達成した。すなわち、プロトタイプチップを用いて検出時間 60 分および 10 分でそれぞれ 5 EU/L、100EU/L 以上の検出感度を達成した。なお、目標値に対する達成度の評価の詳細については 2.1.3 で述べる。

2.1.1(1) 電極チップの設計

電極チップの設計は株式会社アイ・ティ・リサーチで行った。流路、検出部、電極などから構成される電極チップについて製造プロセスを考慮して構造設計、詳細設計を行った。また、サンプル滴下部へサンプルを添加すると毛細管現象により途中で封入された凍結乾燥試薬と混合しながら試薬が検出部に到達するような、ポンプを使わない方式を東北大学原子分子材料科学高等研究機にて検討し、設計に組み込んだ。プロトタイプチップは3層構造になっており、下から電極層、流路層、親水性フィルム製のカバー層である。電極層はスクリーンプリントで4種類のインクをポリプロピレン (PP) 製の基板の上に順に印刷して作製した。最初に Ag インクでリード部下層を印刷し、次にカーボンインクでリード部上層および作用極、対極部分を印刷した。さらに参照極部分を Ag/AgCl インクで印刷した。電極部分の印刷は最終的な各電極の設計値よりも広い面積になるように印刷し、最後にレジストインクで絶縁層を印刷し、レジストインクを載せない部分として電極の面積を規定した。次に、両面接着シートからサンプル滴下部、流路部、検出部、空気抜きになる部分をくりぬいて、電極層の上に位置調整をしながら貼り付けた。その上から親水性フィルムを貼り付けてカバー層とした。

2.1.1(2) 安価なカーボン材料の検討

電気化学計測に適したカーボン材料の選定においては、安価なパターンニング技術として、スクリーンプリント印刷を採用することを前提に検討を行った。アドバイザーである大日本印刷株式会社より、電気化学計測用電極の印刷に実績があるカーボンインクを候補として挙げてもらい、末永研究室で電気化学測定を行って可否を検討した。次に末永研究室で試作した電極チップの電気化学特性の評価を行い、カーボン材料を決定した。

電気化学特性評価として、まず、バックグラウンドノイズの有無確認を行った。

試作電極チップ上にエンドトキシン計測で使用する緩衝液を滴下して、チップ上の作用極電位を参照極電位に対して $0.0\text{V} \rightarrow -0.8\text{V} \rightarrow +1.2\text{V} \rightarrow 0.0\text{V}$ となるように 0.1 V/s の速さで 2 サイクル走査した。試作したチップのカーボン材料で、 $\pm 0.8\text{ V}$ (vs. チップ上の参照極) の範囲で、バックグラウンドノイズなく計測が可能であることが確認できた。次に、電極で検出対象分子を検出できることの確認を行った。試作電極チップの上に 0.5 mM Boc-Leu-Gly-Arg-*p*-nitroaniline (LGR-pNA) と 0.5 mM pNA を含む 0.1 M KCl 添加 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH7.8) を滴下し、微分パルスボルタンメトリー (DPV) 法による測定を行った。6 枚のチップについて DPV 法による測定を行い、異なるチップを使用した場合の再現性も同時に評価をした。

2.1.1(3) 電極成膜厚さの検討

成膜厚さは導電性やバックグラウンドノイズに影響するので、末永研究室で実験データを基に適切な成膜厚さを決定した。また同時に、株式会社アイ・ティ・リサーチで印刷技術を活用した電極チップへのカーボン塗布方法について検討した。適切な成膜厚さの検討について、外注試作した電極チップは適切な導電性をもち、低いバックグラウンドノイズであったことから、この試作品と同じ成膜厚さとすることに決定した。印刷技術を活用した電極チップへのカーボン塗布方法について、アドバイザーである大日本印刷株式会社との検討の結果、スクリーンプリント印刷で行うことに決定した。

2.1.2 ゼロ補正技術の検討

エンドトキシンは環境中に普遍的に存在するため、測定チップへのエンドトキシン混入によるバックグラウンド上昇を防止するためのゼロ補正技術を検討する必要がある。本事業以前に末永研による実験で、酸素プラズマアッシングによる方法が、ダイヤモンドライクカーボン塗布ガラス基板で作製したデバイスのゼロ補正技術として有効であることが確認されていた。しかし、本事業で検討を行った安価な電極チップは酸素プラズマアッシングに耐えられないため、実用化には酸素プラズマアッシング以外のゼロ補正技術を検討する必要があることが判明した。検討の結果、エンドトキシン除去方法として、超純水による洗浄が有効であることが分かった。しかし、量産工程において、チップを組上げた後に超純水洗浄を行ってパッケージングするためには、チップサイズに特化した洗浄、乾燥のための設備を導入する必要がある。そこで、チップの組立てをクリーンルーム内で行い、そのままクリーンルーム内でパッケージングする方法で試作検討した。パッケージされたチップについて末永研で確認を行ったところ、試験に供したチップ全てに関して、エンドトキシンの混入が疑われるケースはなかった。

2.1.3 プロトタイプチップの評価

試作したプロトタイプチップで目標とする感度のエンドトキシン検出ができるかどうか確認を行った。エンドトキシンの電気化学検出法は、当初 pNA の DPV

による検出で行うことを予定していたが、本事業の途中から *p*-aminophenol (pAP)をポテンシャルステップクロノアンペロメトリー (PSCA) 法で検出する方法に変更した。

我々は pAP が PSCA 法で検出可能であることに着目し、LGR-pAP を合成基質に用いる方法を検討した。PSCA 法は、非常に簡単な制御および読出しプログラムでシグナルを得ることができる。すなわち、電極の電位をある時刻に 1 回ステップさせて、ステップ後一定時間経過後の電流応答を取得するだけでシグナルを得ることができる。従って、DPV 法で必要だった多段階の精密な電位ステップやピークの同定等が一切不要であり、安価な素子および簡単なプログラムで安定した計測を行うことができる。グラッシーカーボン電極を用いた試験で、pAP 検出方式では 100EU/L を 10 分以内に検出でき、かつ、0.5EU/L を 60 分以内に測定することができることが分かったので、pAP 検出方式でプロトタイプチップの評価を行った。その方法は、LAL 試薬 (ES-24S) に 1.0 mM LGR-pAP を添加し、各種濃度のエンドトキシンサンプルと 1:1 で混合して 60 分または 10 分反応した後、プロトタイプ電極チップに反応液を導入して、後述する試作検査装置を用いて測定を行った。測定プログラムは -0.20 V を 10 秒間印加後、印加電位を +0.35 V にステップして 3 秒間、AD 変換器からの出力を 256 データ/s の速度で取得するように作成した (詳細は 2.2.1(2)で述べる)。取得した A/D 値は、予め設定したパラメータを用いて電流値へと変換し、ステップ後 1 秒目から 3 秒目までの 2 秒間の間のシグナルを平均した値を出力した。その結果、反応時間 60 分および 10 分でそれぞれ 5 EU/L および 100 EU/L のエンドトキシン検出に成功した。これは、当初の感度目標の 10 EU/L および検出時間目標の「10 EU/L では 60 分以内、100~10000 EU/L のレンジでは 10 分以内」を上回る成果である。

以上のように本開発では検討の結果、エンドトキシンの電気化学測定に PSCA 法による pAP 検出方式を採用した。本方式は安価な素子および簡単なプログラムで安定した計測を行うことができ、実用化に適した方法である。

2.2 検査装置の開発

2.2.1 検査装置本体の試作機開発

2.2.1(1) 検査装置のハードウェア開発

ポテンシャルステップ・クロノアンペロメトリー (PSCA) 法において、測定感度を向上させて低濃度のエンドトキシンを検出する上で重要なことは 1nA 以下の微小電流をローノイズで検出することであり、測定回路と回路素子および基板の実装技術が大きなポイントである。そのために検査装置の試作機を製作する前に、エンドトキシン測定基板の第 1 次試作を行い、測定回路と実装技術を確立することにした。

pAP (溶媒: エンドスペシー ES-24 付属バッファ) を用いた PSCA 法で第 1 次試作機の評価を行い、電流応答性、リニアリティとも良好であることを確認した。この成果を基に、次に検査装置の試作機開発に取り組んだ。検査装置の開発に当

たっては、測定回路と実装技術、恒温槽、バッテリーを含めた電源系、電極チップ用コネクタなど各々要素技術ごとに研究開発を進め、さらに並行して設計仕様書を作成し、さまざまな切り口からデザインレビューできるようにした。研究開発が完了した各要素技術を設計的に統合して、できるだけ小型で軽量の試作機の開発を目指した。

①電気化学測定回路と実装技術

第1次試作機で確認できたエンドトキシン測定回路と実装技術の研究成果を用いて検査装置試作機の開発を進めた。電極チップコネクタから高絶縁型リードリレーさらに負荷抵抗から計測アンプまで空中配線で回路を構成した。負荷抵抗はテフロン端子を用いて浮かせた。このような実装を行うことにより、信号線からのリーク電流を抑えて高感度化を実現することが可能となった。

②恒温槽と温度コントロール

恒温槽は軽量化を目的にアルミ製とし、発熱体は電流の向きにより発熱も冷却も可能なペルチェ素子を用いた。抵抗発熱体であるヒーターは低価格であるが、市販では小型のサイズがなく、温度を下げるには自然放熱またはファンによる強制放熱しか方法はない。簡易恒温槽を試作して、5分以内に室温（15～25℃）から37℃に昇温できるペルチェ素子の容量、加温時の所要電流などを実験により求めた。

③バッテリー電源系

バッテリーだけでドライブできる時間を4時間と設定した。この間電流消費量が多いデバイス特に恒温槽のペルチェ素子へ電流供給できる高容量バッテリーを選定した。またこの一つのバッテリーから、電気化学測定基板、CPUコントロール基板、温度コントロール基板、リレー制御など様々なデバイスに電源を供給しなければならないため、DC/DCコンバータを用いてそれぞれのデバイスに合った電圧、電流を作り出した。なお、DC/DCコンバータは各々のグラウンドをセパレートして相互干渉しないよう絶縁型を採用した。

本バッテリーは、AC100Vで充電可能なバッテリーであり、バッテリーが空の状態からフル充電に至る時間は約5時間である。またAC100Vが近くにあるときは、充電しながらの測定も可能である。

④電極チップ用コネクタ

当初は基板に板バネを半田付けしたサンドイッチ状のコネクタを検討したが、電極チップを挿入した時の接触抵抗の均一性が得られないと判断して、電極チップに適合する3極のコネクタを新たに開発することにした。コネクタの接触子はりん青銅を用い、接触面を長期に亘って安定化させる目的で金メッキを施した。電極チップのリード線材質や膜厚が変わったとしても接触子と基板のクリアランスを調整することにより対応できるようにした。

2.2.1(2) 検査装置のソフトウェア開発

①ファームウェア開発

CPUは、消費電流が少ないCPUを採用し、エンドトキシン測定基板の電圧、時間コントロールからデータ読み込み、データ処理、メモリへの格納、通信制御に関する一連の処理をこのCPU1個で行っている。

試作機が完成した後、測定回路からAD変換器のオフセットを含めた読み取りデータを取り、補正テーブルを作成してファームウェアに組み込んでいる。したがって、測定した生データ（電流値）は、精度の高い補正されたデータとして検査装置に取り付けたマイクロSDカードに記録される。このマイクロSDカードをパーソナルコンピュータに移してデータ渡しを行い、市販のソフトウェアを用いてデータ解析を行うことが可能である。

②ソフトウェア開発

検査装置試作機には、研究開発の過程で試行錯誤できるようにいくつかのパラメータを備えている。パーソナルコンピュータの画面からパラメータを設定し、パラメータの転送はUSBケーブルを検査装置に接続して行う。パラメータ設定用ソフトウェアの開発言語は、ビジュアルベーシックVB2010を使用した。

パラメータ1は、PSCA法の測定スキームの時間、電圧を任意に設定するパラメータである。パラメータ2は、温度コントロール基板に送信する設定温度とPI制御定数である。温度コントロール基板のCPUで、温度センシングとPI制御の温度コントロールを行う。測定回路は非常にインピーダンスが高く、電源ハム（関東50Hz/関西60Hz）が乗るため、ファームウェアによるノッチフィルタ処理を行ってノイズを除去している。その50Hz/60Hzの切替がパラメータ3である。検量線の基本式は決まっており、電極チップのロット毎に測定データを解析して検量線の係数を決定できるようにした。パラメータ4は、その検量線の係数である。

2.2.1(3) 検査装置の統合評価結果

ソフトウェアを組み込んだ検査装置とプロトタイプチップを組み合わせて用いた統合的な検査装置の性能評価を行った。LAL試薬（ES-24S）に1.0mM LGR-pAPを添加し、各種濃度のエンドトキシンサンプルと1:1で混合して60分または10分反応した後、プロトタイプ電極チップに反応液を導入して、ソフトウェアを組み込んだ試作検査装置を用いて測定を行った。

まず、AD変換器から出力されるデータの妥当性を検証するために、エンドトキシン濃度算出に用いる出力値である電位ステップ後1秒目から3秒目までの2秒間のAD変換器からの出力を、SDカードに保存して取り出し、解析を行った。得られた時間-電流曲線はポテンシャルステップクロノアンペロメトリー法に

特有の曲線を描き、装置及びチップが正常に作動していることが確認できた。また、ドリフトは1 nA 以内、スパイク状のノイズは最も大きいものでも5 nA 程度であり、試作した装置はノイズが少なく高感度測定が可能であることが分かった。さらに出力値はエンドトキシン濃度が高いほど大きな値を示し、エンドトキシン定量が可能であることが分かった。

次に、検査装置本体の開発において目標としていた再現性(相対標準偏差)20%以内が達成されているかどうかを検証した。60 分間反応時(高感度)は5 EU/L の場合の相対標準偏差が38.7%となり、目標の20%を超えたが、その他の濃度では目標の20%以下であった。また、10 分反応時(高速・広領域)は100 EU/L の場合の相対標準偏差が52.2%となり、目標の20%を大幅に超えたが、その他の濃度では目標の20%をわずかに超えたものの、ほぼ目標に近い値となった。この結果は3 回の試行から求めた値であるため、試験回数の増加により値が改善することが見込まれる。さらに本事業以前の基礎研究開発の結果より、目標値を超えてしまった原因は、検査装置の再現性の問題ではなく、エンドトキシンの不安定な性質に起因していると考えられる。エンドトキシンは同じエンドトキシンの同じ濃度の溶液でも形成ミセルの大きさ等によって活性が全く異なることが知られている。このような影響を最大限排除するために、エンドトキシン検査ではサンプル溶液を充分ボルテックスで攪拌してから測定に供することが決められている。

2.2.2 調査研究の実施

2.2.2(1) 既存製品の調査

① 全般的な調査

現在の主流の方法である LAL 法は、第十四改正日本薬局方第二追補7 にゲル化法、比濁法および比色法が掲載されている。ゲル化法は、エンドトキシンと LAL 試薬を1 時間反応させた反応管を180 度転倒し、ゲル化していれば陽性、ゲル化していなければ陰性と判断する手法である。定性法であるが、非常にシンプルな試験法であり、正式な試験法として多くの医薬品承認基準に用いられている。比濁法はゲル化の濁りを340nm の検出波長を使用して測定し、設定された閾値に達するまでの時間で定量評価する手法である。比色法は coagulogen の代わりに合成基質を用いて、一定時間反応後、加水分解によって遊離する *p*-ニトロアニリンによる発色を405 nm の吸光度として測定する。発色法は合成基質のコストが高いが、たんぱく質を含む生物製剤など濁りのある製品などで比濁法に比べて製品による反応干渉を受けにくい特長がある。

② ベンチマークとしている Endosafe-PTS の調査

Endosafe-PTS は Charles River 社製のポータブルタイプのエンドトキシン試験システムである。2006 年に FDA 認可を受け、2010 年5 月までに世界で2000 台の売り上げがあった[1]。日本における輸入・販売元は和光純薬工業株式会社で

あり、和光純薬のホームページにカタログ等が掲載されている。2013.2 現在掲載されているカタログでは、計測装置である Endosafe®-PTS™リーダーが 1 台 76 万円（希望納入価格）、使い捨て測定チップである PTS™カートリッジが 10 枚入り一箱 53,500 円である。

特長としては、わずか 15 分という短時間で測定結果が得られること、カートリッジにはライセート試薬、合成発色基質およびエンドトキシン標準品（スパイクラインのみ）など必要な試薬が全て封入されていること、3 種類の測定レンジ(10 ~1.0、5~0.05、1~0.01EU/ml)のカートリッジが用意されていること、カートリッジのロット毎に検量線情報を提供し、保存検量線でサンプルを定量すること、少量サンプルで測定可能(25 μ L \times 4 レーン=100 μ L)であること、FDA 認可済みで米国向け最終製品試験にも使用可能であること、持ち運びに便利なコンパクトボディ(バッテリー内蔵)であることが挙げられている。

測定原理はエンドトキシン検出法のひとつであるカイネティック-比色法に基づいている。すなわち、サンプル中のエンドトキシン濃度を発色強度で測定し、各サンプルの発色強度がしきい値に達するまでの時間を計測する。カイネティック法はシグナルを常時モニタリングする必要があるが、しきい値を超えたところで結果がでるため、特に高濃度サンプルの場合には計測が短時間で終了する特長をもつ。

2.2.2(2) エンドトキシン検査に係わる最新の研究動向

本格的な高齢化社会に突入し、環境、健康、安全問題が顕在化する現在社会において、医療の安全・安心を担保するエンドトキシン検査の重要性が徐々に認識されるようになっており、新しい検出法に関する報告もいくつか出てきている。

滋賀医科大学では、レーザー光散乱粒子計測法と LAL 反応を組み合わせたエンドトキシン散乱光法 (ESP 法) を用いた高感度検出法に関する研究を行っている。この手法は LAL 反応を利用した比濁法と同様の原理を利用しているが、従来の比濁法は濁度を静置状態で測定するのに対し、EPS 法は攪拌を行いレーザー光の分散状態により LAL 反応によって生じるコアギュリン分子の成長を測定する。この手法により、LAL 反応が進行し濁度が上昇するまで待つ必要がなく、測定時間の短縮が可能となっている。

2.2.2(3) 従来市場の調査

現在、日本でのリムルステストの市場は大半を和光純薬と生化学工業が占めており、その割合は約半々である。ロンザも組換え Factor C を用いた蛍光法の試薬 PyroGene の市場を持っている。国内市場は 50 億円程度、先進諸国の市場は約 500 億円程度である。

最も大きな市場は医薬品の製造管理および最終検査向けである。海外では最終

検査のみを承認試験法で行い、中間工程管理は簡易な代替試験法で行うところも多いが、日本では中間工程管理でも承認試験法で行う場合がほとんどである。この違いは国民性によるものと考えられる。次に大きな市場で、今後も拡大が予想されるのが透析液の管理向けである。糖尿病腎症の患者の増加などにより、人工透析患者は毎年1万2千人ずつ増えているといわれている。このような状況において、透析液の水質管理の重要性への認識が高まり、2010年に透析液水質確保加算として保険点数10点が加算されるなど、エンドトキシン検査へのインセンティブが高まっている。

2.2.2(4) 新しい市場の調査

① 生殖医療分野

生殖医療分野におけるエンドトキシンの影響と小型エンドトキシン検査装置の評価法について述べる。

エンドトキシンの混入は、医療や酪農の分野で深刻な問題になっている。ヒトの場合、多くは透析患者への影響が問題視されているが、近年、エンドトキシンが不妊の原因になることが報告されており、生殖分野でも注目されてきている。産婦人科では、これまで検査を行っていなかったエンドトキシン検査を実施し始め、エンドトキシン検査の需要が増加している。これは、女性・男性共に、子宮内や精液中のエンドトキシン濃度が一定値以上であると不妊に繋がることが明らかになっているためである。そのため、生殖医療分野でのエンドトキシン検査は本邦の少子化の問題等を考えると非常に重要である。

エンドトキシン濃度と妊娠との関係をみた報告では、女性の場合、1EU/L未満の場合、妊娠継続率は73%であったが、2EU/Lで妊娠継続率33%、3EU/Lでは全ての患者において妊娠が成立しなかったとある(詠田ら、J. Mamm. Ova Res. Vol 20、51-54、2003)。また、男性の不妊治療患者の一部の精液中のエンドトキシン濃度が非常に高く、精子の運動能の低下や精子の細胞死が引き起こされていることが明らかになっている(Hum Reprod. 2011 Vol 26、2799-2806、2011)。

以上の事から、生殖医療分野では1EU/Lのエンドトキシン濃度を測定可能である検査装置が求められると考えられる。

② 移植医療分野

薬事法では医療用デバイスや注射液等、血液に触れる全ての物を対象にエンドトキシンの基準値が定められているが、再生医療や移植医療を対象とした規定は現在のところ存在しない。エンドトキシンの管理は各施設に委ねられており、唯一膝移植でのみ、膝・膝移植研究会主導で移植溶液上清中のエンドトキシン濃度の基準が決められている。再生・移植医療においても患者の安全の担保とQOL向上のためにエンドトキシンの管理は重要であり、そのために必要なのが小型エンドトキシン測定装置である。

移植・再生医療におけるエンドトキシン測定装置には迅速な測定、簡便な操作、コンパクトサイズ、低価格が求められる。移植・再生医療では、組織や細胞を調

製後、患者の体内に入れるまでの短時間にエンドトキシンを正確に測定する必要がある。細胞調製後直ちに患者に移植を行うことが移植成績の向上に直結することから、30分以内で測定が完了することが求められる。また、移植医療は夜間や休日に実施されることが多いため、専門の分析技術者を必要とせず、簡便な操作で測定可能であることも重要なポイントとなる。さらに移植細胞を調製する細胞調製室(Cell Processing Center : CPC)はスペースが限られているため、装置はコンパクトサイズが適している。現在市販の小型測定装置 (FDA 承認) は本体価格 70 万円、カートリッジが 5000 円/回と高価である。再生・移植医療においては、多くの治療が先進医療制度を活用しており保険未収載であるため、エンドトキシン測定費用が施設の持ち出しとなる場合がほとんどである。したがって、従来品よりも安価な製品を構築することは、他製品との差別化において極めて重要である。低価格で従来品以上の性能を兼ね備えた測定装置には、市場における優位性が大いに見込まれる。

現在市販されている簡易型エンドトキシン測定装置は日本薬局方の承認は受けていないため、医療現場では医師の責任下で検査を行う必要がある。日本薬局方承認の小型エンドトキシン測定装置が販売されれば、現場の技術員や看護師による対応が可能となる。また、透析水のエンドトキシン管理等、保険加算対象となる検査を対象にする場合には、日本薬局方に準拠した方法で試験を実施することが求められる。日本薬局方によるエンドトキシン測定は、検量線作成方法等が厳格に定まっており、電極チップを使用する小型測定装置での対応は容易でないことが想定される。しかし、日本薬局方承認の小型エンドトキシン測定装置が実現すれば、既存の小型測定装置よりも、さらに市場価値の高いものになることは確実である。

今後、再生・移植医療が新たな治療方法として発展し、一般医療として定着するためには、エンドトキシンの管理を厳重に行うことで安全性を担保し、そのための評価基準がいち早く構築されることが望まれる。その中で、小型エンドトキシン測定装置の果たす役割は非常に大きいものになると考えられる。

③ その他の分野

これまでになくタイプの計測装置が市場に出れば、これまでになかった分野での利用が期待できる。Endosafe-PTS では、持ち運びができる装置であるという特長から、NASA の宇宙事業にも利用されている[2]。

2.3 事業化に関する研究

2.3.1 顧客への試作品の評価

川下産業に位置する生化学工業株式会社は、エンドトキシン測定試薬などを中心とした試薬・診断薬の製造・販売を行っており、試作機の性能である測定時間、感度、使いやすさ、外形サイズなどを評価していただいた。今後の事業化に向けた開発の方向性についての知見が得られた。

2.3.2 事業化に向けての市場調査

2.3.2(1) 従来市場の調査

透析施設と医薬品の製造管理および最終検査という従来市場において市場調査を行い、エンドトキシン検査装置に対するニーズを集約した。

- a. 1 検体あたり@1,500 のランニングコストをその 50%くらいにしたいという要望が強い。イニシャルコストもさることながら、測定頻度が高いためランニングコストをより重視している。
- b. 既存のエンドトキシン検査装置では、2 時間で 10EU/L が測定限界であり、1 時間程度で 1EU/L 検出できる検査装置の要望は根強いものがある。日本透析医学会の超純水透析液の水質基準は 1EU/L であるが、既存の装置では測定できないため、エンドトキシン補足フィルタを備えていることで水質基準を担保しているのが現状である。
- c. 操作が簡単であり誰でも使えること。ただし誰が測定しても同じような数値が出る装置でなければならない。

2.3.2(2) Endosafe-PTS との比較

ベンチマークとしている Endosafe-PTS と本事業で開発した検査装置試作機の現時点における比較について述べる。測定感度については、Endosafe-PTS の限界は 10EU/L であるが、試作機は 5EU/L の測定が可能でありさらに高感度測定が期待できる。100EU/L までの測定時間については、Endosafe-PTS と同一レベルの 10 分まで短縮することができた。したがって、感度と測定時間については、試作機の段階でも性能的に大きな違いがないところまできている。価格面では有利な状況にある。Endosafe-PTS の装置価格が 1 台 76 万円に対して、検査装置は量産すれば 1 台 30 万円程度で販売可能であることが、試作機を基にした量産価格の試算で確認されている。さらに 1 検体 5,000 円のランニングコストに対し、プロトタイプチップは試薬塗布量など今後の研究開発の推移と試薬の量産価格にもよるが、500~1,000 円の販売価格で市場に出せる見通しがあり、装置価格、ランニングコストともに Endosafe-PTS に対して優位性があると考えられる。

第3章 全体総括

3.1 研究開発成果まとめ

3.1.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

電極チップの構造について詳細設計を進めると同時に各種カーボン材料サン

プルの電気化学特性の評価を行い、スクリーン印刷を用いて安価な電極チップを実現する技術を確立した。また、量産工程への導入が可能な方法として、チップの組立てをクリーンルーム内で行い、そのままクリーンルーム内でパッケージングする方法を採用することとした。これらの技術を用いたプロトタイプチップを作製し、エンドトキシン検出性能を評価したところ、検出時間 60 分および 10 分でそれぞれ 5 EU/L、100EU/L 以上の検出感度を達成し、今年度の数値目標を達成することができた。

3.1.2 検査装置の開発

微小電流を安定して測定することができる電気化学測定回路と基板の実装技術を確立することができた。また、恒温槽、大容量バッテリー、電極チップ用コネクタなどエンドトキシン検査装置が必要とするさまざまな要素技術の研究開発を行い、これらを統合設計して検査装置試作機を完成させることができた。プロトタイプチップを用いた総合的な検査装置の性能評価では、再現性（相対標準偏差）20%以内を達成できる見通しを得ている。

3.2 研究開発後の課題

3.2.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

<課題 1> 試薬を塗布した電極チップで安定して測定できること。

ユーザーの利便性を考えると、チップにサンプル溶液を滴下してスタートボタンを押すだけで自動的にエンドトキシン計測が開始されることが望まれる。そのためには、試薬が入った試験管等に一旦、一定容量のサンプルを入れて溶解させた後にチップに導入する方式ではなく、電極チップ内に予め試薬がすべて塗布されていて、サンプルを滴下するとサンプルが試薬を溶かしながら反応する方式とする必要がある。

<課題 2> サンプル測定に加えてゼロ測定、リファレンス測定可能な 3CH 電極チップを開発する。

ゼロ測定は、基質を加えず試薬だけを塗布した電極チャンネルとして、バックグラウンドノイズだけを検出する。サンプル測定値からゼロ測定値を減算することにより、シグナルからバックグラウンドノイズを除去することを目的とする。リファレンス測定では、濃度が既知の標準エンドトキシンを予めチップに添加しておき、そのチップの添加回収率を算出する。添加回収率が、50%～200%の範囲であれば、信頼性高くエンドトキシン検査が行われたと判断できる。

3.2.2 検査装置の開発

<課題 1> 3CH 電極チップに対応した検査装置試作機の開発を行う。

3CH 電極チップに対応するためには、3CH の入出力を持つハードウェアを開発するだけでなく、ソフトウェアを整備してバックグラウンドノイズや添加回収率の評価ができるようにする必要がある。

<課題 2> 操作性を考慮したファームウェアの開発を行う。

Endosafe-PTS の試用で挙げた Endosafe-PTS の利点や問題点 (2.2.2(1)□参照) を参考にしながら、市場競争力のある製品とするためにユーザビリティの研究開発を行い、その上で検査装置のファームウェア開発を行う。

3.3 事業化について

米国食品医薬品局 (FDA) には、エンドトキシン公定法は LAL 試薬を用いて photometric method (光学的な測定法、ゲル化法、比色法など) によるという規定があり、電気化学測定法ではよほど関連データが良くなければ認可を取ることには大変と考えられた。しかし最近発行された文書によれば、真度、感度、精度、選択性、自動化およびデータ自動整理への適合性の点でまたはそれ以外の特別な状況で利点があれば、公定法と同等以上の結果が得られることを条件に代替方法及び手順を用いても良いと FDA の見解に変化が見られる。

一方日本薬局方では、検査装置内に保存された検量線は認められていない。LAL 試薬のロット毎にデータをとって検量線の信頼性確認試験を行わなければならないと規定しており、Endosafe -PTS と同じ考え方で、チップのロット毎に検査装置内の保存検量線に対して補正を加えるだけでは日本薬局方の認可を取るのには難しそうである。

事業化に当たっては、柔軟な対応に変化してきた FDA の認可を取ることが先決ではないかと考える。医薬品製造におけるエンドトキシン検査は、最終試験と工程管理で行わなければならないが、海外における最終製品試験では FDA の認可がとれている試薬と試験方法で行うことが必須である。また国内では、移植医療は FDA のガイダンスに準拠してエンドトキシン検査を行っており、FDA の認可があれば販売しやすいとみられる。

国内市場より先進国と新興国を合わせた海外市場の方がはるかに大きく、生化学工業 (株) の米国子会社である Associates Cape Cod 社のルートを活用して FDA 承認取得を規制当局へ働きかけ、グローバル販売も視野に入れた活動を行っていくことが重要と考えられる。

参考文献

- [1] 土谷正和： だってエンドトキシンなんだもん、 Charles River Japan ホームページ 2010.5.25
- [2] 日経バイオテク Online 2006.7.20