

平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「医療移植用微小生体組織・自動車用燃料電池触媒の
全自動品質評価システムの開発」

研究開発成果等報告書

平成22年9月

委託者 東北経済産業局

委託先 財団法人青葉工学振興会

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
1-2 研究開発体制（研究組織、管理体制、研究者氏名、協力者）	2
1-3 成果概要	7
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	9
第2章 本論	10
2-1 医療移植用微小生体組織の全自動品質評価システムの開発	10
2-1-1 微小生体組織品質評価システムの開発	10
2-1-2 微小生体組織品質評価組み込みソフトウェアの開発	13
2-1-3 多検体セルの開発	15
2-1-4 安全性が確保された測定液の開発	16
2-1-5 本システムの有効性検証	17
2-2 自動車用燃料電池触媒の全自動品質評価システムの開発	18
2-2-1 燃料電池触媒品質評価システムの開発	18
2-2-2 燃料電池触媒品質評価組み込みソフトウェアの開発	18
2-2-3 多検体セルの開発	18
2-2-4 本システムの有効性検証	19
第3章 全体総括	20
3-1 研究開発成果	20
3-2 研究開発後の課題・事業展開	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

<研究開発の背景>

バイオテクノロジー・医療分野の不妊治療において、移植に用いる受精卵の選択は形態観察による医師の主観に頼っており正確な評価が難しく、妊娠率が低迷している。そこで、本研究において、受精卵の呼吸量の測定による信頼性の高い品質評価システムを開発することにより、最適な受精卵の選択を可能にし、不妊治療技術の向上を図ることにより、行政の医療費負担低減や少子化解消などに貢献する。また、燃料電池自動車において、固体高分子燃料電池の触媒として使用されている白金触媒のコスト及び資源的問題から移動車両の全てを燃料電池車に置き換えることは、現状では困難である。そこで、高額な白金に代わる新たな触媒の探索が急務となっており、効率的な探索が求められている。非白金触媒の開発において、酸素還元能、過酸化水素生成能の測定が不可欠であるが、従来は、触媒1種類ずつ評価する方法と効率が悪く、本研究において、全自動多検体品質評価システムを開発することにより、複数触媒の高速品質評価を可能とし、燃料電池非白金系触媒の発見に大きく寄与することが予想され、燃料電池車の普及に貢献するものである。

<研究目的及び目標>

本事業において、社会のニーズに応えるため、受精卵の呼吸量の測定による信頼性の高い「微小生体組織全自動品質評価システム」及び効率的な複数触媒探索の高速品質評価を可能とする「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」を開発することを目的に本開発を進めてきた。

①医療移植用微小生体組織の全自動品質評価システムの開発

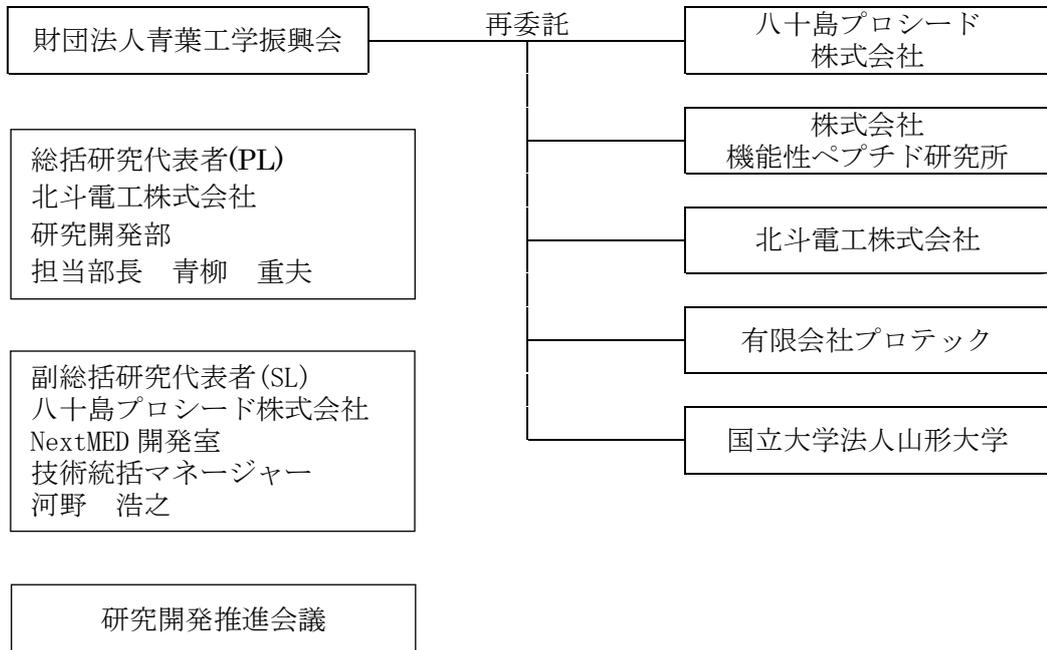
品質評価システム及び組込みソフトウェア、電極埋込型ウェルを実装した多検体セル、安全性が確保された測定液の4要素技術を開発する。次に、開発した4要素技術を統合したシステムを用いて、マウスまたはウシ受精卵の酸素消費量に基づき、6受精卵の呼吸量測定を15分以内で実現できることにより、システムの有効性を検証する。また、ヒトへの臨床応用を前提としたヒト受精卵に特化した測定液の製造と品質評価試験の問題点を抽出する。

②自動車用燃料電池触媒の全自動品質評価システムの開発

品質評価システム及び組込みソフトウェア、電極埋込型ウェルを実装した多検体セルの3要素技術を開発する。このとき、①で開発した要素技術の共有化を図る。次に、開発した3要素技術を統合したシステムを用いて、6種類の白金触媒添加量が異なる電極埋込型ウェルの酸素還元能の測定を1.5時間以内で実現できることにより、システムの有効性を検証する。

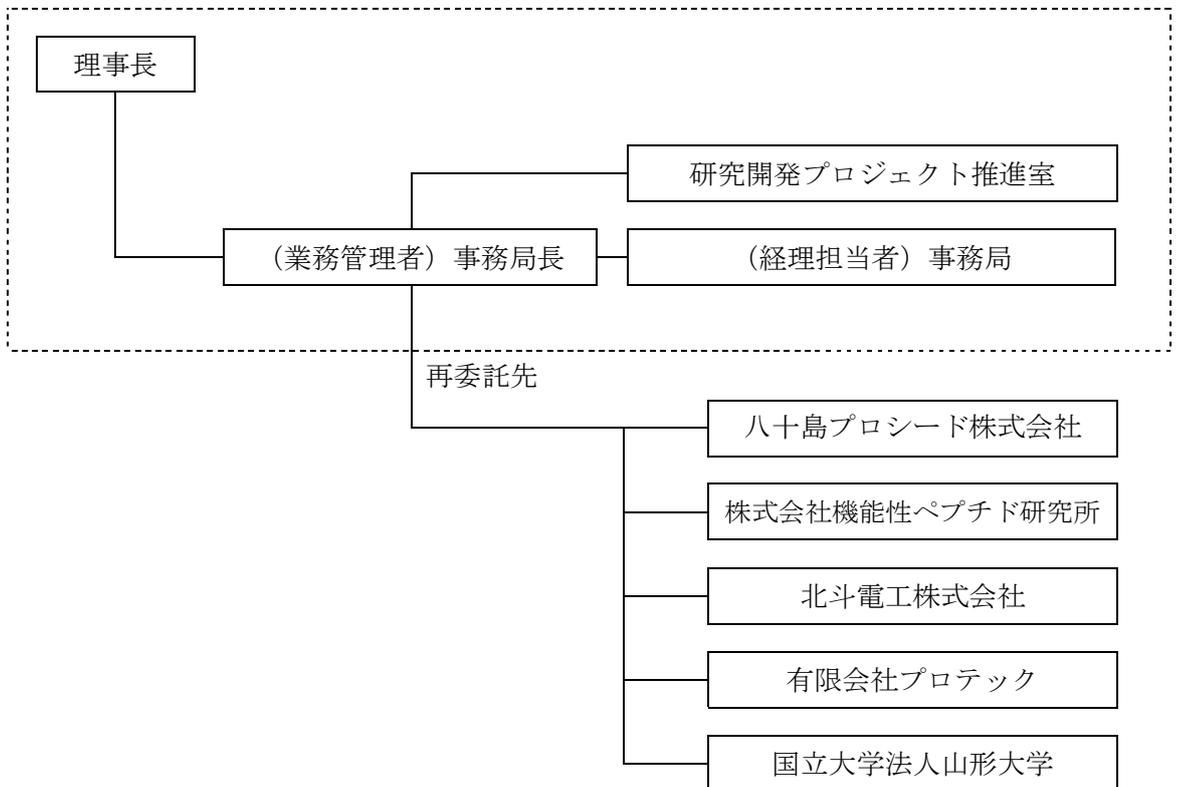
1-2 研究開発体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

(1) 研究組織



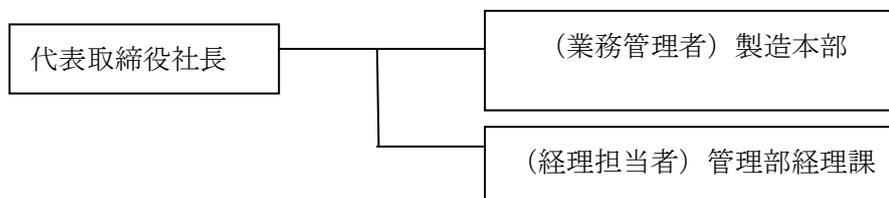
(2) 管理体制

① 事業管理者 [財団法人青葉工学振興会]

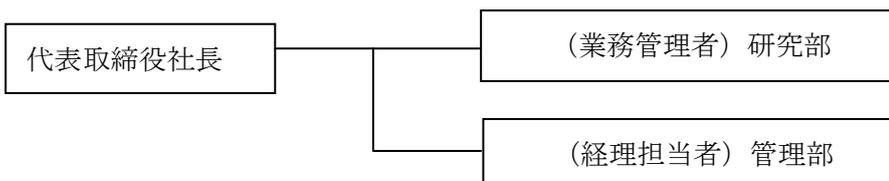


② (再委託先)

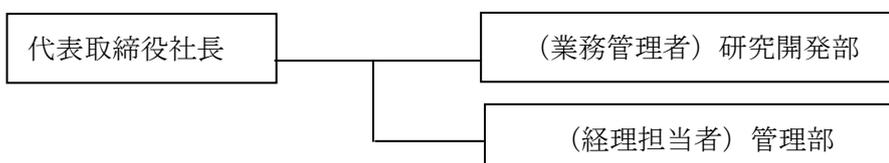
- ・八十島プロシード株式会社



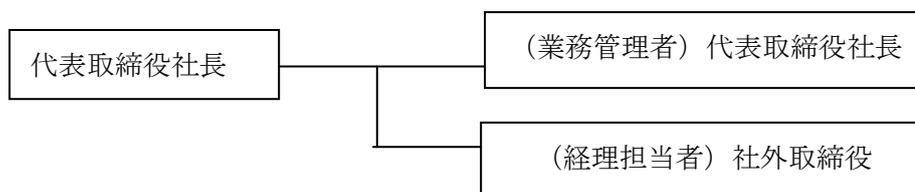
- ・株式会社 機能性ペプチド研究所



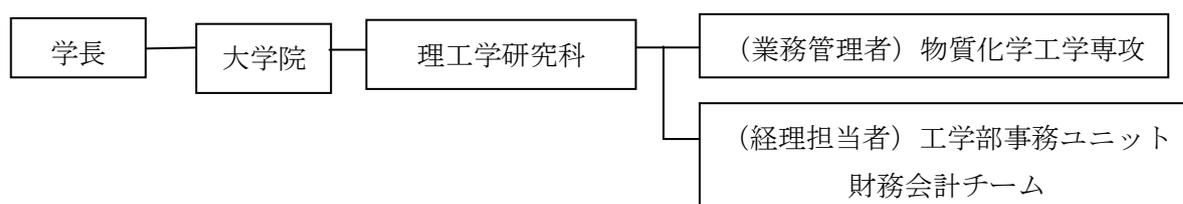
- ・北斗電工株式会社



- ・有限会社プロテック



- ・国立大学法人山形大学大学院理工学研究科



(3) 研究員及び管理員 (役職・実施内容別担当)

【事業管理者】財団法人青葉工学振興会

① 研究員

氏名	所属・役職
末永 智一	財団法人青葉工学振興会研究員 (東北大学環境科学研究科 教授)
珠玖 仁	財団法人青葉工学振興会研究員 (東北大学環境科学研究科 准教授)

② 管理員

氏名	所属・役職
霜山 忠男	事務局 局長
米谷いし子	事務局 経理主任
堀 譲	事務局 契約主任

【再委託先】*研究員のみ

八十島プロシード株式会社

氏名	所属・役職
河野 浩之	NextMED 開発室 技術統括マネージャー
柏崎 寿宣	仙台工場 責任技術者
遠藤 友浩	仙台工場 研究員
角田 豊洋	仙台工場 研究員

株式会社機能性ペプチド研究所

氏名	役職・所属
星 宏良	研究所 取締役所長
山下 祥子	研究部 主任
星 翼	研究部 研究員

北斗電工株式会社

氏名	役職・所属
青柳 重夫	研究開発部 担当部長
福泉 敦尚	研究開発部 技師長
飯沼 一敬	研究開発部 技師長
小林 幸太	研究開発部開発グループ 主任
西森 豊	技術部設計課 主任
内海 陽介	研究開発部開発グループ 研究員
志澤 桃子	研究開発部開発グループ 研究員

有限会社プロテック

氏名	役職・所属
小宮山 友信	取締役社長

山形大学

氏名	役職・所属
阿部 宏之	山形大学大学院理工学研究科 教授

(4) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

【事業管理者】

財団法人青葉工学振興会

(経理担当者) 事務局 経理主任

米谷いし子

(業務管理者) 事務局 局長

霜山 忠男

【再委託先】

八十島プロシード株式会社

(経理担当者) 管理部経理課 次長

加谷 全啓

(業務管理者) NextMED 開発室 技術統括マネージャー

河野 浩之

株式会社機能性ペプチド研究所

(経理担当者) 管理部 部長

武田 邦彦

(業務管理者) 研究所 取締役所長

星 宏良

北斗電工株式会社

(経理担当者) 管理部 部長

岩本 富夫

(業務管理者) 研究開発部 担当部長

青柳 重夫

有限会社プロテック

(経理担当者) 社外取締役

岡本 幸典

(業務管理者) 取締役社長

小宮山友信

山形大学

(経理担当者) 工学部事務ユニット財務会計チーム チームリーダー 小野 秀勝

(業務管理者) 大学院理工学研究科 教授

阿部 宏之

(5) 他からの指導・協力者名及び指導・協力事項

①研究開発推進会議 委員

氏名	所属・役職	備考
霜山 忠男	財団法人青葉工学振興会 事務局長	
河野 浩之	八十島プロシード株式会社 NextMED 開発室 技術統括マネージャー	SL
柏崎 寿宣	八十島プロシード株式会社仙台工場 責任技術者	
星 宏良	株式会社機能性ペプチド研究所 取締役所長	
青柳 重夫	北斗電工株式会社研究開発部 担当部長	PL
小宮山 友信	有限会社プロテック 取締役社長	
末永 智一	東北大学大学院環境科学研究科 教授	
珠玖 仁	東北大学大学院環境科学研究科 准教授	
阿部 宏之	山形大学大学院理工学研究科 教授	
佐藤 威	株式会社細胞 科学研究所 代表取締役社長	
八木一三	独立行政法人 産業技術総合研究所 固体高分子形燃料電池先端基盤研究センター 触媒研究チーム・チームリーダー	アドバイザー アドバイザー
後藤昌史	東北大学国際高等研究教育機構 国際高等融合領域研究所及び東北大学移植再建内視鏡外科 准教授	アドバイザー

②研究開発推進会議 委員

アドバイザー・氏名	主な指導・協力事項
佐藤 威 八木一三 後藤昌史	安全性が確保された測定液の開発についての指導・助言 触媒品質評価システムの開発についての指導・助言 微小生体組織品質評価システムの開発についての指導・助言

1-3 成果概要

本事業において、社会ニーズに応えるため、受精卵の呼吸量の測定による信頼性の高い「微小生体組織全自動品質評価システム」及び効率的な複数触媒探索の高速品質評価を可能とする「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」を開発することを目的に本開発を進めてきた。

「微小生体組織全自動品質評価システム」の開発において、①10 pA レベルの微小電流を測定できるハードウェア、②微小電流測定部の制御・微小電流収集、双方向通信、CH切替器制御、画像化及び解析できるソフトウェア、③寸法公差数 μm 、表面性状 Ra 1.0 μm 以下の白金電極が埋込まれたウェル及び電極埋込型ウェルを6個実装した多検体セル、④ヒト受精卵に特化した成分組成の測定液、以上の4要素技術を構築できた。開発した4要素技術を統合したシステムを用いて、ウシの6受精卵の呼吸量測定を15分以内に実現できた。

「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」において、①10 pA レベルの微小電流を測定できかつ酸素還元能を測定するための電位を印加できるハードウェア、②微小電流測定部の制御・微小電流収集、双方向通信、CH切替器制御、画像化、サイクリックボルタンメトリー及び解析できるソフトウェア、③寸法公差数 μm 、表面性状 Ra 1.0 μm 以下の白金電極が埋込まれたウェル及び電極埋込型ウェルを6個実装した多検体セル、以上の3要素技術を構築できた。開発した3要素技術を統合したシステムを用いて、6種類の触媒添加量が異なる電極埋込型ウェルの酸素還元能の測定を1.5時間以内で実現できた。

以上のことから、本事業において開発した「微小生体組織全自動品質評価システム」及び「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」の目標をほぼ達成するとともに、両システムを共通とした「特願 2010-208817：ウェルユニット及び電気化学的分析方法」の特許出願を行った。

① 医療移植用微小生体組織の全自動品質評価システムの開発

①-1 微小生体組織品質評価システムの開発

アナログ基板、USB インターフェース、AD、DA、CPU デバイスを搭載した CPU 基板、CH切替器を設計・製作し、10 pA レベルの微小電流を測定できる微小生体組織品質評価システムを実現するハードウェアを開発することができた。

①-2 微小生体組織品質評価組込みソフトウェアの開発

品質評価システムを実現できる組込みソフトウェアを開発し、ウシ受精卵の呼吸量測定及び触媒の酸素還元能測定により、微小電流測定部の制御・微小電流収集、双方向通信、CH切替器制御、画像化及び解析することができることを確認した。また、構築した解析アルゴリズムによりウシ受精卵の呼吸量の解析ができた。

①-3 多検体セルの開発

設計・製作したウェルの寸法公差が数 μm の精度および円錐部の表面性状を Ra 1.0 μm 以下を確認するとともに、ウェルへの白金電極の埋込技術を確立することができた。また、

埋め込まれた白金電極の電気化学的性能を確認することができた。さらに、電極埋込型ウェルを6個実装した多検体セルの製作技術を確立することができた。

①-4 安全性が確保された測定液の開発

今回開発した電極埋込型ウェルに特化した測定液は、通電性に影響せず、連続測定しても安定した測定値が得られることを確認できた。また、ヒト受精卵に特化した測定液の成分組成を決定できた。また、今回開発した測定液は汎用性があることを明らかにすることができた。

①-5 本システム有効性検証

今回開発した品質評価システム、組込みソフトウェア、電極埋込型ウェルを実装した多検体セル、安全性が確保された測定液の4要素技術を統合した全自動品質評価システムを用いて、6個のウシ体外受精卵の呼吸量測定を行った。その結果、6個の体外ウシ受精卵の呼吸量測定を15分以内で実現できた。よって、今回開発した本システムによる微小生体組織品質評価の有効性を確認できた。また、ヒトへの臨床応用を前提としたヒト受精卵に特化した測定液の製造と品質評価試験の問題点を抽出・確認した。

② 自動車用燃料電池触媒の全自動品質評価システムの開発

②-1 燃料電池触媒品質評価システムの開発

アナログ基板、USB インターフェース、AD、DA、CPU デバイスを搭載した CPU 基板、CH 切替器を設計・製作し、10 pA レベルの微小電流を測定できかつ酸素還元能を測定するための電位を印加できる燃料電池触媒品質評価システムを実現するハードウェアを開発することができた。

②-2 燃料電池触媒品質評価組込みソフトウェアの開発

燃料電池触媒品質評価システムを実現できる組込みソフトウェアを開発し、微小電流測定部の制御・微小電流収集、双方向通信、CH 切替器制御、画像化、サイクリックボルタンメトリー及び燃料電池触媒の解析結果の表示を確認することができた。

②-3 多検体セルの開発

設計・製作したウェルの寸法公差が数 μm の精度および円錐部の表面性状を $\text{Ra } 1.0 \mu\text{m}$ 以下を確認できるとともに、ウェルへの白金電極の埋込技術を確立することができた。さらに、電極埋込型ウェルを6個実装した多検体セルの製作技術を確立することができた。

②-4 本システムの有効性検証

今回開発した品質評価システム、組込みソフトウェア、電極埋込型ウェルを実装した多検体セルの3要素技術を統合した全自動評価システムにおいて、6種類の触媒添加量が異なる電極埋込型ウェルの酸素還元能測定を1.5時間以内で実現できた。また、本システムを用いて、Pt-Co/CB の酸素還元能が、Pt/CB より大きいことを確認することができた。

③ 研究全体の統括、プロジェクトの管理運営（財団法人青葉工学振興会）

本研究を円滑に推進するため、「八十島サポイン研究開発推進委員会」の適切な運営等により、各研究開発項目の総括的な課題抽出とその検討及び研究成果の評価等を行った。

また、青葉工学振興会は事業の進捗について、新たに設置した「研究開発プロジェクト推進室」のもと適正な管理を行なった。

1-4 当該プロジェクト連絡窓口

- ・財団法人青葉工学振興会 研究開発プロジェクト推進室：霜山忠男
- ・〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6番6号 東北大学工学部内
- ・TEL 022(795)3862 FAX 022(795)3579

第2章 本論

2-1 医療移植用微小生体組織の全自動品質評価システムの開発

2-1-1 微小生体組織品質評価システムの開発（北斗電工㈱、(財)青葉工学振興会）

品質評価システムを実現するハードウェアを開発した。今回開発した品質評価システムの主な仕様を表 2-1、接続ブロック図を図 2-1、システムを写真 2-1 に示す。

表 2-1 品質評価システムの主な仕様

装置定格	<ul style="list-style-type: none"> ・ 浴電圧 (CE-WE) : ±3 V ・ 制御電圧 (RE-WE) : ± 5 V ・ 最大電流 (電極クリーニング時) : ± 10 mA
表示器	<ul style="list-style-type: none"> ・ モード : 測定モード表示 LED ・ 警告 : 警告表示 LED : (CE, POT, CURR, OVER)
制御設定	<ul style="list-style-type: none"> ・ 設定範囲 : 0 ~ ±5.000 V ・ 最小設定単位 : 1 mV
測定モード	<ul style="list-style-type: none"> ・ CLEAR : クリア ・ E. METER : エレクトロメータ ・ P. STAT : ポテンシヨスタット
エレクトロメータ	<ul style="list-style-type: none"> ・ 入力インピーダンス : 10 Ω 以上 ・ バイアス暗電流 : 1 pA 以下 ・ 電位検出精度 : ±0.05 % FS 以内
電流レンジ	<ul style="list-style-type: none"> ・ 本測定レンジ : 100 nA, 10 nA, 1 nA, 100 pA, 10 pA
制御応答	<ul style="list-style-type: none"> ・ 100 μs 以内
フィルター	<ul style="list-style-type: none"> ・ ローパスフィルター 10 Hz
制御設定精度	<ul style="list-style-type: none"> ・ ±0.1 % %FS 以内

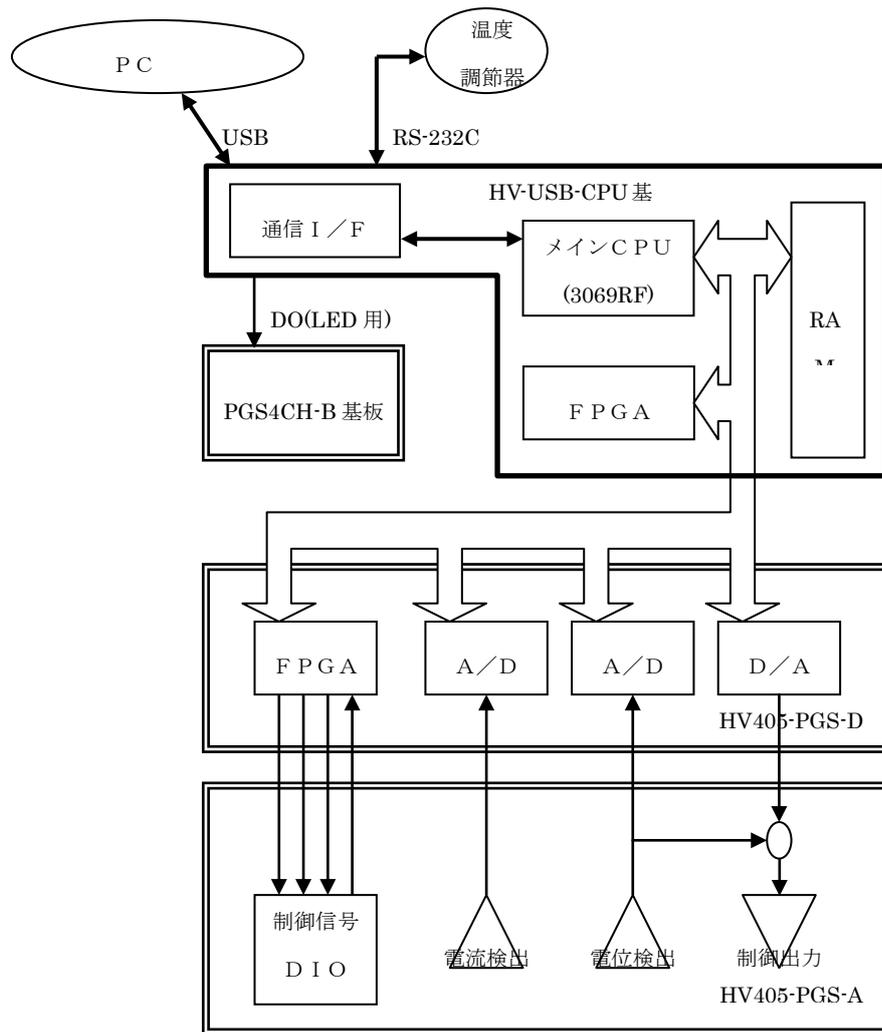


図 2-1 接続ブロック図

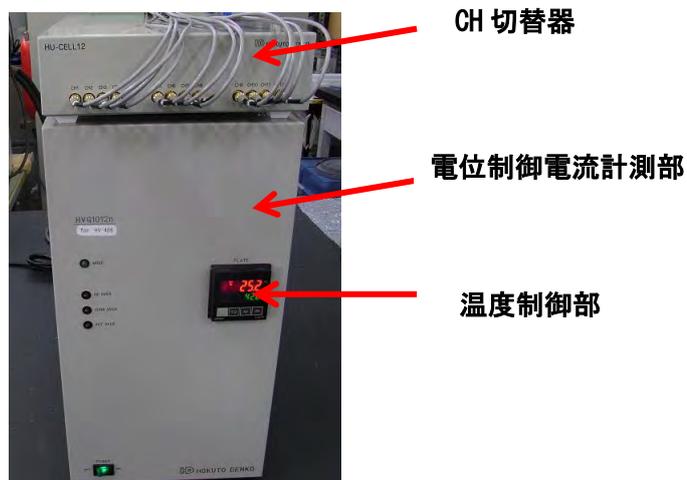


写真 2-1 品質評価システム

2-1-1-1 アナログ基板の設計・製作・動作検証

10 pA レベルの微小電流を測定できるアナログ基板の設計・製作を行った。電位測定部は、機器仕様の電位測定範囲の精度 $\pm 0.05\% \text{ F.S}$ 以内 で電位を測定できることを確認できた。また、電流検出部は、機器仕様の電流検出精度内で電流を測定できることを確認できた。

2-1-1-2 USB インターフェース、AD、DA、CPU デバイスを搭載した CPU 基板の設計・製作 ・動作検証

10 pA レベルの微小電流を測定できる CPU 基板の設計・製作を行った。今回設計・製作した CPU 基板を組み込んだ品質評価システムにより検証試験を行った。機器仕様の電流検出精度内で電流を測定できることを確認できた。

2-1-1-3 デジタル基板の設計・製作・動作検証

10 pA レベルの微小電流を測定できるデジタル基板の設計・製作を行った。今回設計・製作したデジタル基板を組み込んだ品質評価システムにより検証試験を行った。機器仕様の電流検出精度内で、電流を測定できることを確認できた。

2-1-1-4 品質評価システムの検証試験

アナログ基板、CPU 基板、デジタル基板を組み込んだ評価システムの検証試験結果、機器仕様の電位測定範囲の精度 $\pm 0.05\% \text{ F.S}$ 以内 に電位を測定できることと、機器仕様の電流検出精度内で、10 pA レベルの微小電流を測定できることを確認できた。

2-1-1-5 CH 切替器の設計・製作・動作検証

図 2-2(a)に示すように、受精卵または燃料電池触媒等の試料が入ったウェルに 1CH ごとに電位を印加して、電流を測定する方式を順次 6 回繰り返す方式では、測定終了までに 72 分要することが明らかとなった。この方式では、「6 受精卵の呼吸量測定及び解析を 15 分以内で実現」の目標をクリアできない。そこで、図 2-2(b)に示すように、6CH 同時に電位を印加して、アナログマルチプレクサーにより 100ms 間隔で各 CH の電流を測定する方式に変更することにより、15 分の測定時間を達成できた。

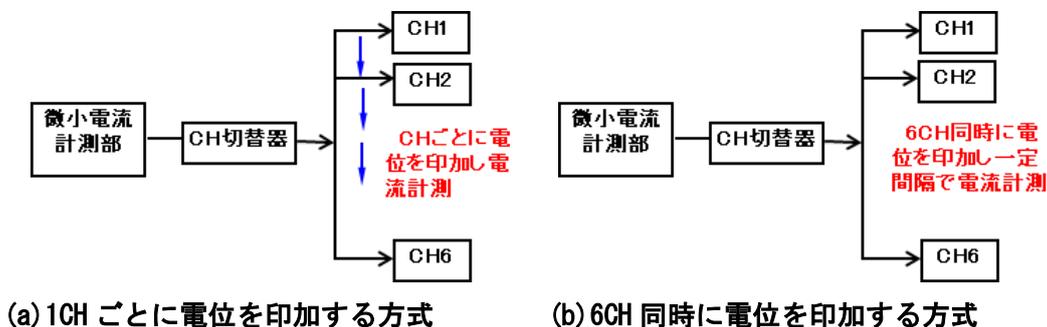


図 2-2 CH 切替器の動作方式

2-1-1- まとめ

アナログ基板、USB インターフェース、AD、DA、CPU デバイスを搭載した CPU 基板、CH 切替器を設計・製作し、10 pA レベルの微小電流を測定できる微小生体組織品質評価システムを実現するハードウェアを開発することができた。

2-1-2 微小生体組織品質評価組込みソフトウェアの開発（(有)プロテック、北斗電工㈱、(財)青葉工学振興会）

2-1-2-1 微小電流収集ソフトの設計・製作・動作検証

今回設計・製作した微小電流収集ソフトは、測定した微小電流のデータの収集を目的とした。その主な仕様及び機能を表 2-2、表 2-3 に示す。

表 2-2 アナログインターフェース (I2C) コマンド・ステータス・レジスタの仕様

Bit(s)	機能名	RW	機能詳細
15..13	reserved		must be zero
12	DRDY	R	データレディステータス, DATA[7..0]が有効な受信データである時 1 となる. IICRXD レジスタの読み出し動作により 0 にクリアされる. Read-Only bit.
11	INT	R	I2C IRQ ステータス. I2C-IC の INT#信号の論理反転した状態を読み取ることができる. よって IRQ のセット/クリア条件は, I2C-IC の INT#信号条件に従う. Read-Only bit.
10	IEDRDY	RW	DRDY による割り込みを許可する.
9	IEINT	RW	INT による割り込みを許可する.
8	IEDONE	RW	DONE による割り込みを許可する.
7	DONE	R	UNRDY が 1 から 0 に変化した(送信または受信完了)時, 1 にセットされる. 本レジスタの読み出しで 0 にクリアされる.

表 2-3 アナログインターフェース (I2C) 制御・読み出しレジスタ仕様

Bit(s)	機能名	RW	機能詳細
15	SAEN	RW	Secondary Address Enable. 0 の時プライマリアドレス, 1 の時セカンダリアドレスを指定(\$ 参照).
14	Reserved		ゼロ (0)
13	DORD	W	本ビットに 1 を書き込むと, SA[2..0]で指定された I2C デバイスからデータ読み出し動作を開始する.
12	DRDY	R	データレディステータス, DATA[7..0]が有効な受信データである時 1 となる. 本レジスタの読み出し動作により 0 にクリアされる.

今回設計・製作した微小電流収集ソフトの各 CH ごとの時間経過に伴うデータ収集の検証

試験結を行い、6CH 同時に電流データを収集できることを確認できた。

2-1-2-2 双方向通信ソフトの設計・製作・動作検証

今回設計・製作した双方向通信ソフトにおいて、パソコン (PC) とポテンショスタット HV-406 (PS) 間を USB ケーブルにてコマンド送信<—>ステータス受信の双方向通信の検証試験を行った。表 2-4 に示すように、PC と PS 間の送信・受信が正常に動作することを確認した。

表 2-4 パソコン (PC) とポテンショスタット HV-406 (PS) 間の送信・受信の検証結果

コマンド	判定	ステータス	判定
リセットコマンド	○	測定データ	○
電位設定コマンド	○	データ送信完了ステータス	○
測定開始・停止コマンド	○	コマンド実行完了ステータス	○
動作モード設定コマンド	○	コマンド不成功完了ステータス	○
電流レンジ設定コマンド	○		
サンプリング速度設定コマンド	○		
時間設定コマンド	○		

2-1-2-3 CH 切替器制御ソフトの設計・製作・動作検証

今回設計・製作したチャンネル切替器制御ソフトは 1 サンプリングで 1CH~12CH 全チャンネルを切替え、電流値の測定をおこなうことを目的とした。検証試験を行った結果、1 チャンネル 80 msec 以内にサンプリングを完了し、次チャンネルへ切替りサンプリングする動作を全 1 2 チャンネルについて正常かつ設計時間以内にサンプリングを完了することを確認した。

2-1-2-4 画像化ソフトの設計・製作・動作検証

今回設計製作したポテンショスタット HV-406 (PS) より受信したデータを画像化データに変換しオートスケールでリアルタイムに表示することを目的とする。図 2-3 に受信データ画像化処理画面を示す。

2-1-2-5 解析ソフトの設計・製作・動作検証

受信データをファイル単位でオフラインにより解析可能な解析ソフトを設計・製作した。解析ソフト画面により設定解析機能を有することを確認できた。

2-1-2-6 解析アルゴリズムの構築

以下に示す解析アルゴリズムを構築し、「2-1-2-5」で記した解析ソフトに組み込んだ。構築した解析アルゴリズムにより、ウシ受精卵の呼吸量が測定できた。

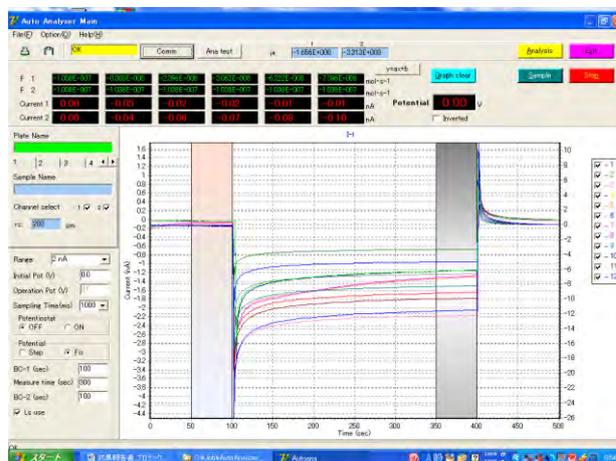


図 2-3 受信データ画像化処理表示画面

2-1-2-7 まとめ

品質評価システムを実現できる組込みソフトウェアを開発し、ウシ受精卵の呼吸量測定及び触媒の酸素還元能測定により、微小電流測定部の制御・微小電流収集、双方向通信、CH切替器制御、画像化及び解析することができることを確認した。

2-1-3 電極埋込型ウェルを実装した多検体セルの開発（八十島プロシード㈱）

2-1-3-1 微細加工技術をベースとしたウェルの開発

- ①構造材料として、ポリメタクリル酸メチル樹脂（PMMA）選定した。
- ②切削油等を使用しない切削加工条件を確立した。
- ③円錐部の表面粗さをRa 1.0 μm 以下とすることができた。

2-1-3-2 電極埋込型ウェルの開発

①**電極埋込型ウェルの設計・製作**：電極埋込型ウェルの上部の形状は逆円錐形で、逆円錐部分へ白金電極を埋込む構造の電極埋込型ウェルを設計した。また、電極埋込型ウェルの製作に必要な自動電極埋込型ウェル製作システムを開発した。

②**電極埋込型ウェルの検証**：自動電極埋込型ウェル製作システムにより電極埋込型ウェル製作した。ウェルに埋め込まれた白金電極は、円錐部頭頂部から所定の位置に配置していることを画像測定器により確認できた。

③**電極埋込型ウェルの電気化学的検証**：電極埋込型ウェルに埋め込まれた直径10 μm 白金電極の電気化学的性能を確認するため、フェロシアン化カリウムを含む塩化カリウム溶液中で、ウェルに埋め込まれた白金電極と従来の受精卵呼吸量測定に用いている微小電極でサイクリックボルタンメトリーを実施した。従来用いられている微小電極とウェルに埋め込まれた白金電極は同程度の定常電流が得られた。よって、ウェルに埋め込まれた白金電極が、微小電極として機能していることを確認できた。

2-1-3-3 多検体セルの開発

電極埋込型ウェルを実装した多検体セルは100 mm幅に設計を行った。また、多検体セルの槽部分に測定液を加えるため、液漏れしない構造とした。写真2-2に示す電極埋込型ウェル6個を実装した多検体セルを開発できた。



写真2-2 多検体セル外観図

2-1-3-4 まとめ

設計・製作したウェルの寸法公差が数 μm の精度および円錐部の表面性状をRa 1.0 μm 以下を確認するとともに、ウェルへの白金電極の埋込技術を確認することができた。また、埋め込まれた白金電極の電気化学的性能を確認することができた。さらに、電極埋込型ウェルを6個実装した多検体セルの製作技術を確認することができた。

2-1-4 安全性が確保された測定液の開発（㈱機能性ペプチド研究所、山形大学、八十島プロシード㈱）

2-1-4-1 ヒト受精卵に特化した測定液の開発

新たに開発する電極埋込型ウェルに対応し、測定時の通電性に影響せず安定かつ正確な測定値が得られる測定液を開発する。また、ヒト受精卵の呼吸量測定液として使用するために、動物生体由来成分等を排除した安全な成分のみで構成される完全合成測定液を開発する。

(1) ヒト受精卵呼吸量測定液の開発

ヒト受精卵呼吸量測定液には安全性の観点から、ウシ血清アルブミンに替わる安全性の高い成分として高分子ポリマーを添加した完全合成測定液を開発した。ポリビニルアルコール(PVA)を添加した HERM-1 と、ポリエチレングリコール(PEG)を添加した HERM-2 の2種類の完全合成測定液を新たに開発し、ヒト受精卵呼吸量測定液として使用の可否を検討した。

(2) 各種受精卵呼吸量測定液におけるウシ体外受精卵の操作性の差異

ウシ血清アルブミン(BSA)などタンパク質の含まない低分子成分のみの測定液(ERAM-2: BSA-)では、受精卵がピペット内部に吸着して回収できないことが明らかになった。しかし、BSA添加してある市販のウシ受精卵呼吸量測定液(ERAM-2)、今回ヒト受精卵呼吸量測定液としてBSAの代わりに高分子ポリマーのPVAを添加したHERM-1やPEGを添加したHERM-2では、ピペット内部への受精卵の吸着を防止できることを確認した。

(3) 試作したヒト受精卵呼吸量測定液によるウシ体外受精卵の呼吸量測定試験

従来のウシ受精卵呼吸量測定液であるERAM-2と開発した測定液HERM-1を用いて同一胚におけるウシ体外受精卵の呼吸量を比較した。また、ERAM-2とHERM-2でも同様の実験を行った。受精卵の呼吸量は、発生が進むにつれて増加することを確認した。各発生ステージごとの受精卵呼吸量を見ると、HERM-1、HERM-2で測定した呼吸量とERAM-2で測定した呼吸量ではほぼ同等の値を示した。これらの結果より、開発した測定液HERM-1、HERM-2において正確に受精卵呼吸量測定が可能であることを確認した。

2-1-4-2 まとめ

今回開発した電極埋込型ウェルに特化した測定液は、通電性に影響せず、連続測定しても安定した測定値が得られることを確認できた。また、ヒト受精卵に特化した測定液の成分組成を決定できた。

2-1-5 本システム有効性検証 ((財)青葉工学振興会、山形大学、八十島プロシード㈱、㈱機能性ペプチド研究所、北斗電工㈱、(有)プロテック)

2-1-5-1 微小生体組織品質評価の有効性検証

(1) ヒト乳ガン細胞スフェロイド(MCF-7)の呼吸量測定

従来の微小電極による ΔC は $19.4 \mu\text{mol/L}$ 、埋込型電極ウェルによるMCF-7の ΔC は $18.1 \mu\text{mol/L}$ 、とほぼ一致した。よって、ヒト乳ガン細胞スフェロイド(MCF-7)において、従来の微小電極とウェルに埋め込まれた白金電極により得られた呼吸量の値がほぼ一致した。よって、本システムにより微小生体組織のスフェロイドの呼吸量を測定できることを確認できた。

(2) 全自動品質評価システムによるウシ体外受精卵の呼吸量測定

電極埋込型ウェルを実装した多検体セル(写真 2-2)へ6個のウシ体外受精卵を導入し、電位固定方式全自動品質評価システム($-0.5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) (写真 2-1)により、6個のウシ体外受精卵(胚盤胞)の呼吸量を同時測定した。6個のウシ体外受精卵の全自動品質評価システム及び従来の微小電極の測定結果はほぼ一致した。また、6個のウシ体外受精卵の測定時間は900秒(15分)で終了し、目標をほぼ達成できた。

2-1-5-2 受精卵の測定液の製造と品質評価試験の問題点抽出

今回、開発したヒト受精卵呼吸量測定液についてウシ体外受精卵、マウス胚を用いて測定した結果、正確に呼吸量の測定が可能であることを確認できた。また、測定後の受精卵の生存性や発生能に問題なく、ヒト受精卵呼吸量測定液として十分利用可能であると期待される。今回、開発した測定液を実際にヒト受精卵用として製品化するためには、下記に示す課題を解決する必要がある。

- ① 今回の開発品は研究用試薬としての製造基準で製造したものである。ヒト受精卵を試料対象として臨床現場で使用可能な測定液の製造には、GMP準拠した製造施設での測定液の製造が必須条件。よって、今回開発した測定液をGMPに対応した製造設備を有する施設で製造を行なうためにアウトソーシング先の企業を調査する。
- ② 測定液の製品化に向けて、各種物性評価試験・生物活性試験等の評価試験法を確立する。
- ③ 安全性に優れた受精卵呼吸量測定液の製品化に向けて品質管理評価システムの確立のための調査研究を行う。

2-1-5-3 まとめ

今回開発した品質評価システム、組込みソフトウェア、電極埋込型ウェルを実装した多検体セル、安全性が確保された測定液の4要素技術を統合した全自動品質評価システムを用いて、6個のウシ体外受精卵の呼吸量測定を行った結果、6個のウシ体外受精卵の呼吸量測定を15分以内で実現できた。よって、今回開発した本システムによる微小生体組織品質評価の有効性を確認できた。また、ヒトへの臨床応用を前提としたヒト受精卵に特化した測定液の製造と品質評価試験の問題点を抽出・確認した。

2-2 自動車用燃料電池触媒の全自動品質評価システムの開発

2-2-1 燃料電池触媒品質評価システムの開発((財)青葉工学振興会、北斗電工㈱、(有)プロテック)

燃料電池触媒品質評価システムを実現するハードウェアを開発した。

2-2-1-1 アナログ基板の設計・製作・動作検証 「2-1-1-1」と共有

2-2-1-2 USB インターフェース、AD、DA、CPU デバイスを搭載した CPU 基板の設計・製作・動作検証 「2-1-1-2」と共有

2-2-1-3 デジタル基板の設計・製作・動作検証 「2-1-1-3」と共有

2-2-1-4 品質評価システムの検証試験 「2-1-1-4」と共有

2-2-1-5 CH 切替器の設計・製作・動作検証 「2-1-1-5」と共有

2-2-1-6 まとめ

アナログ基板、USB インターフェース、AD、DA、CPU デバイスを搭載した CPU 基板、CH 切替器を設計・製作し、10 pA レベルの微小電流を測定できかつ酸素還元能を測定するための電位を印加できる燃料電池触媒品質評価システムを実現するハードウェアを開発することができた。

2-2-2 燃料電池触媒品質評価組込みソフトウェアの開発 ((有)プロテック、北斗電工㈱、(財)青葉工学振興会)

燃料電池触媒品質評価システムを実現する組込みソフトウェアを開発した。

2-2-2-1 微小電流収集ソフトの設計・製作・動作検証 「2-1-2-1」と共有

2-2-2-2 双方向通信ソフトの設計・製作・動作検証 「2-1-2-2」と共有

2-2-2-3 CH 切替器制御ソフトの設計・製作・動作検証 「2-1-2-3」と共有

2-2-2-4 画像化ソフトの設計・製作・動作検証 「2-1-2-4」と共有

2-2-2-5 サイクリックボルタンメトリーソフトの設計・製作・動作検証

指定された2箇所の設定電位間をサイクリックに線形走査するサイクリックボルタンメトリーのソフト及び燃料電池触媒活性を解析するために必要な水素脱離電気量、触媒の表面積及び比表面積を自動で表示するソフトを設計・製作し、設定パラメータ及び解析結果を表示できることを確認した。

2-2-2-6 まとめ

燃料電池触媒品質評価システムを実現できる組込みソフトウェアを開発し、微小電流測定部の制御・微小電流収集、双方向通信、CH 切替器制御、画像化、サイクリックボルタンメトリー及び燃料電池触媒の解析結果の表示を確認することができた。

2-2-3 多検体セルの開発（八十島プロシード㈱）

2-2-3-1 微細加工技術をベースとしたウエルの開発 「2-1-3-1」と共有

2-2-3-2 電極埋込型ウエルの開発 「2-1-3-2」と共有

2-2-3-3 多検体セルの開発 「2-1-3-3」と共有

2-2-3-4 まとめ

設計・製作したウエルの寸法公差が数 μm の精度および円錐部の表面性状を $\text{Ra } 1.0 \mu\text{m}$ 以下を確認できるとともに、ウエルへの白金電極の埋込技術を確立することができた。さらに、電極埋込型ウエルを6個実装した多検体セルの製作技術を確立することができた。

2-2-4 本システムの有効性検証（(財)青葉工学振興会、八十島プロシード㈱、北斗電工㈱、(有)プロテック）

2-2-4-1 燃料電池触媒品質評価の有効性検証

(1) Nafion、Nafion-CB、Nafion-Pt/CBの酸化還元能の比較

自動車用固体高分子形燃料電池において、触媒層の有効面積を大きく（触媒利用率を高く）することを目的に、カーボンブラック(CB)が白金触媒の担体として広く用いられている。また、Nafionは、燃料電池の固体高分子膜として用いられている。Pt/CBはカーボンブラックに白金を担持した触媒。電極にNafionを滴下した条件1、電極にCB、Nafionを滴下した条件2(Nafion-CB)、電極にPt/CB、Nafionを滴下した条件3(Nafion-Pt/CB)で、本システムを用いた酸素還元能の比較を行った。条件1、2は白金触媒がないため、酸素還元は起きないと予想される。リニアスweepボルタンメトリーを行った結果、Nafion-Pt/CBの条件のみ酸素還元電流が観測されたことから、本システムの有効性を確認できた。

(2) 触媒添加量が異なる電極埋込型ウエルの酸素還元能の比較

CH1からCH6の電極埋込型ウエルへ6種類の添加量が異なるPt/CBを添加した。Pt/CB添加量が異なる電極埋込型ウエルに対して、順次、リニアスweepボルタンメトリーを行った。埋込型電極ウエルへ添加されたPt/CBが多くなるに伴い酸素還元電流も大きくなることを確認できた。よって、本システムにより、添加したPt/CBに対応した酸素還元能の変化が観測されたことから、本システムの有効性を確認できた。

本システムの触媒品質評価を行うためには、サイクリックボルタンメトリーとリニアスweepボルタンメトリーを行う。1CHあたりの測定時間は、サイクリックボルタンメトリーでは6分（電極安定時間：2分、サイクリックボルタンメトリー：4分）、リニアスweepボルタンメトリーでは8分（電極安定時間：2分、リニアスweepボルタンメトリーでは6分）要する。よって、6CHの測定時間は、84分で、目標の1.5時間以内を実現できた。

(3) 白金触媒と白金コバルト合金触媒の酸素還元能の比較

Pt/CB、Pt-Co/CB を添加した電極埋込型ウェルに対して、順次、リニアスweepボルタンメトリーを行った。Pt-Co/CB は Pt/CB より、酸素還元電流が大きかった。よって、本システムより、Pt-Co/CB の酸素還元能が、Pt/CB より大きいことを確認できた。

2-2-4-2 まとめ

今回開発した品質評価システム、組込みソフトウェア、電極埋込型ウェルを実装した多検体セルの3要素技術を統合した本システムにおいて、6種類の触媒添加量が異なる電極埋込型ウェルの酸素還元能測定を1.5時間以内で実現できた。また、本システムを用いて、Pt-Co/CB の酸素還元能が、Pt/CB より大きいことを確認することができた。非白金系触媒を入手し、引き続き、本システムの検証を行う予定である。

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

3-1-1 医療移植用微小生体組織の全自動品質評価システムの開発

本事業では、受精卵の呼吸量の測定による信頼性の高い「微小生体組織全自動品質評価システム」を開発することを目的として、

- ① 微小生体組織品質評価システムの開発
- ② 微小生体組織品質評価組込みソフトウェアの開発
- ③ 多検体セルの開発
- ④ 安全性が確保された測定液の開発

を行った。その結果、開発した4要素技術を統合したシステムを用いて、ウシ体外受精卵の酸素消費量に基づき、目標の6受精卵の呼吸量測定を15分以内で実現できた。

3-1-2 自動車用燃料電池触媒の全自動品質評価システムの開発

本事業では、複数触媒の高速品質評価を可能とする「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」を開発することを目的として、

- ① 燃料電池触媒品質評価システムの開発
- ② 燃料電池触媒品質評価組込みソフトウェアの開発
- ③ 多検体セルの開発

を行った。その結果、開発した3要素技術を統合したシステムを用いて、触媒添加量が異なる電極埋込型ウェルの酸素還元能の測定を1.5時間以内で実現できた。

以上のことから、本事業で開発した製品は、「医療移植用微小生体組織・自動車用燃料電池触媒の全自動品質評価システムの開発」の所期の目標をほぼ達成するとともに、両システム共通の成果として「特願 2010-208817：ウェルユニット及び電気化学的分析方法」の特許出願を行った。

3-2 研究開発後の課題・事業展開

「微小生体組織全自動品質評価システム」の製品化に向けては、関係企業、研究機関と協力して、①ウシ、ブタ、マウス、ヒトの受精卵品質評価結果の再現性に関わる本システムのハード及びソフトウェアの改良、②多検体セルの白金電極部断面積の変動幅の縮小、等の課題の抽出及び解決を図る。また、並行して、①測定液の製造にあたって、GMPに対応した製造設備を有するアウトソーシング先企業、②評価試験法の確立、③品質管理システムの確立等の測定液の製品化に向けて、引き続き調査を行う。以上の補完研究及び調査を行い、「微小生体組織全自動品質評価システム」の医療機器としての製品化及び事業化の実現を図る。

また、「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」の製品化に向けても、関係企業、研究機関と協力して、①非白金触媒を入手し、本システムによる再現性を含めた品質評価、②多検体セルの有機溶媒耐性化等の課題の抽出及び解決を図る。以上の補完研究により、「自動車用燃料電池触媒全自動品質評価システム」の製品化及び事業化の実現を図る。

今後は、引き続き本研究開発の課題解決に取り組みながら、関係企業及び研究機関との情報交換やアドバイスを得るとともに、マーケット開拓及び今回開発した電極埋込型ウェルの他用途への利用拡大の調査・検証を進め、事業化展開に取り組む所存である。