

平成27年度 中小企業経営支援等対策費補助金  
(戦略的基盤技術高度化支援事業)

「革新的電気化学検出法を用いた  
高感度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28年5月

担 当 局 東北経済産業局  
補助事業者 株式会社インテリジェント・コスモス研究機構

## 目 次

<b>第1章 研究開発の概要</b> .....	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 .....	2
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 実施体制 .....	3
1.2.2 研究者等氏名 .....	3
1.2.3 協力者及び指導・協力事項 .....	4
1.3 成果概要 .....	5
1.3.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立 .....	5
1.3.2 検査装置の開発 .....	5
1.3.3 事業化に関する研究 .....	5
1.3.3(1) 川下企業との連携 .....	5
1.3.3(2) 事業化に向けての市場調査 .....	6
1.4 当該研究開発の連絡窓口 .....	6
<b>第2章 本 論</b> .....	7
2.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立 .....	7
2.1.1 高感度測定のためのチップ材料選定 .....	7
2.1.2 試薬封入等の技術の確立 .....	7
2.1.3 電極チップの統合設計 .....	8
2.2 検査装置の開発 .....	9
2.2.1 検査装置本体の試作機開発 .....	9
2.2.1(1) 検査装置のハードウェア開発 .....	9
2.2.1(2) 検査装置のソフトウェア開発 .....	10

2.3 事業化に関する研究	11
2.3.1 市場の最新動向	11
2.3.1(1)透析市場	11
2.3.1(2)医薬品検査市場	12
2.3.1(3)再生・移植医療分野	12
2.3.2 事業化に向けての市場調査	12
<b>第3章 全体総括</b>	<b>13</b>
3.1 研究開発成果まとめ	13
3.1.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立	13
3.1.2 検査装置の開発	13
3.2 研究開発後の課題	14
3.2.1 使い捨て電極チップを実現する技術の確立	14
3.2.2 検査装置の開発	14
3.3 事業化展開について	14

## 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感度化、高再現性、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

エンドトキシンは菌体の成分であるため、水中、空気中を問わず不偏的に存在する。さらに耐熱性であるため除去が困難である。したがって、体内へ入れる直前の透析液や医薬品、移植用の細胞などのエンドトキシン管理を行うことは、医療の安全に大変重要である。透析現場では、以前から透析後の体調不良や長期透析合併症の原因が極微量のエンドトキシンであるといわれ、患者の QOL（生活の質）および生存率向上のためにエンドトキシンの厳しい管理が求められている。

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 測定につき 5,000 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。

このような背景から、検査技師のいない医療現場でも” その場で簡単に安価にしかも 1EU/L まで高感度に” エンドトキシンを測定したいという市場のニーズが存在し、本事業では安価な使い捨て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、さらに測定の信頼性を上げるためにシステム全体の高再現性を目指して、小型検査装置の試作開発を行った。

##### ① 使い捨て電極チップを実現する技術の確立

これまでの従来型電極構造では高感度化に限界があることから、エンドトキシンのさらなる高感度測定を目指して、くし型電極の試作と評価を行った。フォトリソグラフィ技術を用いて Au 電極チップを試作し、測定時間 60 分でエンドトキシン濃度 1EU/L を検出することが出来た。しかし、電極材料が Au と高価であるため、それ以外の電極材料（Pd など）を評価し、最適な成膜およびパターンニング方法を選定して、安価なくし型電極チップを実現する技術開発を行った。

## ② 検査装置の開発

エンドトキシン検査装置の開発に先立ち、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。これらの技術を基に、試作した電極チップを評価するため、従来型電極チップに対応した3CH測定回路基板およびくし型電極チップに対応した1CH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に係る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。

## ③ 事業化に関する研究

透析施設2箇所現場の管理者と担当者にヒアリングを行い、エンドトキシン検査に係る測定の現状と現場の具体的なニーズについて情報収集を行った。また、川下企業からエンドトキシン検査装置の仕様について提示があり、透析施設での市場調査の情報と合わせて、今後の事業化に向けた製品仕様と研究開発の方向性を検討した。

### 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

価格の安い適切な電極材料と基板材料の選定を行い、100～10000 EU/Lのレンジでは10分以内、1～10EU/Lのレンジでは60分以内に測定できることを目標とした。

電極チップの構造については、電極チップ上の流路槽に試薬を封入することができる一体構造を検討することとし、そのために試薬固定化法の実証試験を行い、再溶解性と酵素活性を維持できることを目標とした。

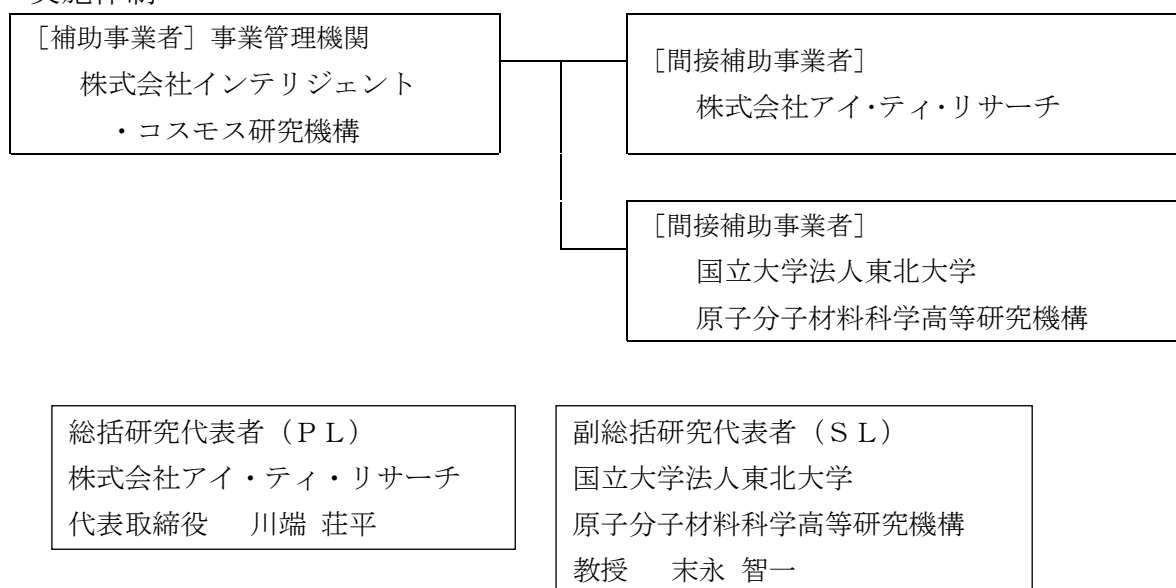
#### ② 検査装置の開発

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の回路技術と低ノイズ技術を確立し、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電極チップを用いて総合的に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 実施体制



### 1.2.2 研究者等氏名

#### (1) 研究員

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
三瓶 益市	ヘルスケア事業部 部長	

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	原子分子材料科学高等研究機構 助教	
井上 久美	原子分子材料科学高等研究機構 講師	

#### (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	
佐藤 さとみ	産学官連携・インキュベーション事業部 管理員	

### 1.2.3 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
稲垣 明子	国立大学法人東北大学 / 生体移植の専門家の立場からの助言、協力
阿部 宏之	国立大学法人山形大学 / 人口受精の専門家の立場からの助言、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

従来の電極構造において高感度化と高再現性を目的に、基板（ガラス、PET）と電極材料（カーボン、Au、Pd）を選定し、最適な成膜およびパターンニング方法（スクリーンプリント、エッチング、スパッタリング）について検討を行った。さらに電極の配置、形状、サイズなど電極デザインによる電極チップの性能の違いを評価した。その結果、従来の電極構造では高感度化に限界があることが分かり、エンドトキシン濃度 1EU/L 検出を目指して、くし型電極を試作し評価することにした。

フォトリソグラフィ技術を用いて、くし型電極チップ（材質：Au）を製作し、測定時間 60 分でエンドトキシン濃度 1EU/L を検出することが出来た。また、このくし型電極成膜加工技術をもとに、Au よりもっと安価な電極材料を模索し、電極と流路槽を一体化した電極チップの開発を行った。電極材料としては Pd が有力であったが、実際に試薬を用いた測定では、高感度測定が出来ないことが判明し、Pd 上に Au 薄膜を蒸着した電極を作製し、評価を行った。この Au 蒸着電極では、0、1、10EU/L をそれぞれ区別することが可能であり、くし型電極の形状を最適化することで、1EU/L の検出が可能であることが示された。

また、電極チップと別の反応容器の中で、酵素と緩衝液を混合し、凍結乾燥法で乾燥した後、エンドトキシンと反応させ、酵素の活性を調べた。その結果、凍結乾燥法で乾燥させても、1ヶ月の保存では酵素の活性に影響がないことが判明した。

#### 1.3.2 検査装置の開発

従来型電極チップに結合できる 3CH の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のプロトタイプを開発した。さらに、くし型電極チップを新たに開発することに伴い、くし型電極を測定するデュアルポテンショスタット回路基板を新規に製作してくし型電極チップに対応した 1CH 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アプリケーション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データを取得して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。

#### 1.3.3 事業化に関する研究

##### 1.3.3(1) 川下企業との連携

川下企業からエンドトキシン検査装置の仕様について提示があり、透析施設での市場調査の情報と合わせて、今後の事業化に向けた製品仕様と研究開発の方向性を検討した。



### 1.3.3(2) 事業化に向けての市場調査

透析施設 2 箇所で、現場の管理者と担当者にヒアリングを行い、エンドトキシン検査に係る測定の現状と現場の具体的なニーズについて情報収集を行った。またエンドトキシン検査に係わる最新の技術動向、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 高感度測定のためのチップ材料の選定

検出感度 1 EU/L、検出時間 60 分を達成するため、これまでの開発で採用してきた「カーボン電極」及び「スクリーン印刷」以外の技術の検討を行った。その結果、先ずフォトリソグラフィおよびスパッタ技術を用いて作製した Au 微小くし型電極により 60 分で 1 EU/L の検出に成功した。

Au は高価なため、Au より安価な材料である Pd を用いてガラス基板上に Pd 微小くし型電極を作製し評価を行った。評価結果から Pd 電極では、試薬を注入して測定すると高感度測定ができないことが判明したため、Pd 上に Au 薄膜を蒸着して新たな電極を作製した。Au 薄膜の厚さを変えて試験を行い、安定的な蒸着が可能であり、測定する上でもより Au 電極に近似した性能が得られる条件を導き出した。くし型電極の形状についても各部のサイズを変えて試験を行い、高感度化・高精度化のための最適な形状を選定した。

この Au 薄膜を蒸着させた微小くし型電極を用いてエンドトキシンの検出を行った。0、1、10EU/L のエンドトキシン溶液と 1mM LGR-pAP を含むエンドスペース溶液を等量で混合し、37°C で 1 時間反応を行った。各溶液を電極上に滴下して測定を行った。コレクタ極には -0.15V、ジェネレータ極には -0.15V を 10 秒、0.4V を 10 秒印加した。その結果、0、1、10EU/L をそれぞれ区別することが可能であることが判明し、くし型電極の形状を最適化することで、濃度別の反応を検出することが可能であることが示された。そのため、今後の製品化に向けた研究開発は Au 蒸着電極で行うことにした。

#### 2.1.2 試薬封入等の技術の確立

試薬封入の課題解決策の一つとして、電極チップと別の反応容器の中で、酵素と緩衝液を混合し、凍結乾燥法と減圧乾燥法の二種類の 방법으로乾燥した後、エンドトキシンと反応させ、酵素の活性を調べた。その結果凍結乾燥法と減圧乾燥法、両方とも酵素の活性には影響がないという結果が得られた。そこで、凍結乾燥法を用いて試薬の保存試験をデザインし、試験を実施した。市販のエンドスペースを 1mM LGR-pAP を含む緩衝液で溶解後、試験管に分注して凍結乾燥を行い、経過時間毎に 0、10、1000EU/L のエンドトキシン溶液を用いて保存試験を行うことにした。試験は、エンドトキシン溶液で溶解後、37°C で 1 時間反応させ、グラッシ-カーボン電極を用いたサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定と 0.0V→0.3V のクロノアンペロメトリー測定 (n=5)、そして参考までに実施する同溶液の比色試験から構成される。電気化学計測には参照極として Ag/AgCl 電極、対極として白

金電極を用いた。現在まで1ヶ月の保存試験を行い、開始日と1ヶ月後の検出数値に違いは見られないことから、くし型電極上に凍結乾燥させた試薬が使用可能であることが判明した。現在も継続して試験を行っており、3、6ヶ月、1年の保存試験を行うとともに、流路槽付き電極チップに試薬を封入し、凍結乾燥試験を行う予定である。

### 2.1.3 電極チップの統合設計

これまでに開発を行った電極チップのデザインに対して再検討、再設計を行い、新たな電極チップの開発を行った。その結果、従来型3電極（作用電極、参照電極、対電極）をよりコンパクトに集積し、全ての電極をPdとした電極チップの開発に成功した。電極チップの小型化に伴い、測定に要求される試料量を減少させることができ、製造コストのかなりの部分を占める試薬コストを抑制して目標原価に収めることができる。

また、全ての電極をPdとすることで、これまで想定していたAg/AgCl参照極を使う場合と比較して、工程数の削減によるコスト抑制が可能になり、かつAg/AgClの漏出による検出への影響を防止できる。試作したPd電極チップの評価をLAL試薬とエンドトキシンの反応によって生成されるパラアミノフェノール溶液を試料として行った。その結果、全てPd電極でも測定が可能であることが確認された。一方、本方式では、エンドトキシン検出感度が5EU/Lとほぼ限界であるため、検出感度1EU/Lを達成するためにくし型電極の開発に方針変更をした。前年度では、Auくし型電極を試作して60分で1EU/Lを達成したことから、今年度はAuより安価な材料としてPdを用いてくし型電極を試作し評価した。その結果Pdだけでは高感度測定できないことが判明し、Pd上にAu蒸着した電極を用いることにした。

本事業で試作したくし型電極チップは、くし型電極、一部が反応槽を形成する流路、上カバーの三層で構成されている。電極には、PdにAu蒸着した材料を用いた。反応時に37℃で1時間保温すると溶液が蒸発すると指摘されており、注入口・流路のサイズは蒸発をできるだけ抑制することが求められる。現状は溶液の注入口は直径2mm、注入口と反対側にある空気抜きは直径1.5mmである。完全に蒸発を抑えるには、溶液を注入後、注入口と空気抜きをテープで塞ぐなどの対策が必要である。また、流路に使用するPETの形状によって電極幅を決定しており、液量を減らすことは、使用する試薬の削減につながり、原価を下げることに貢献する。

このようなくし型電極チップを用いて、本事業で目標としていた検出感度1EU/L、検出時間60分、相対標準偏差20%以内をほぼクリアしたが、さらに流路内に試薬を封入して凍結乾燥させ、検査装置と組み合わせて検証を行う必要がある。

## 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

前回事業で試作した 1CH 検査装置試作機の成果を基に、従来型 3CH 電極チップに連結できる高密度実装された 3CH 計測回路基板を製作し、また試験管や市販アンプルを 3 本同時に加温できる恒温槽を組み込んだ検査装置試作機を開発した。

本事業で研究を進めていく過程で、従来の電極構造では高感度化に限界があることが分かり、エンドトキシン濃度 1EU/L 検出を目指して、くし型電極を試作し評価することにした。このため、くし型電極を測定するためのデュアルポテンシオスタット回路基板を新たに製作した。また、反応容器と電極チップが別々では、操作しづらいというアドバイザーの指摘もあり、流路（一部反応槽）と電極が一体構造のくし型電極チップを開発することになり、恒温槽の構造そのものを見直し、新規に検査装置を開発した。

#### ①電気化学測定回路

前回事業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電気化学測定回路の開発を進めた。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るなどの実装を行った。このような実装方法を用いて、3CH シングルポテンシオスタット回路基板と 1CH デュアルポテンシオスタット回路基板を製作し、評価した結果いずれも 10pA までの微小電流を測定できることが実証された。

#### 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。1 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をこれまでの実験から選定して、簡易恒温槽を試作した。

#### 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

くし型電極チップのリード部に合わせて 4 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電極チップリード部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、通信制御に至るまで一連の処理をこの 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、補正計算式を導い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接続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、ポテンシャルステップクロノアンペアメトリ (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。くし型電極に対しては、E0、E1、E2 を任意に設定できる。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 の切換がパラメータ 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。

## 2.3 事業化に関する研究

### 2.3.1 市場の最新動向

エンドトキシン検査装置の想定される主な市場およびユーザーは、次の通りである。

- (1)人工透析を行っている医療機関
- (2)注射、点滴用の医薬品メーカー
- (3)再生医療、移植治療、生殖医療などを行う医療機関

これらのユーザーに係る LAL 試薬の市場は国内では 16 億円（透析市場だけで 10 億円）であるが、新興国を含めた海外市場は 500 億円と言われている。国内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。また、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。

#### 2.3.1(1)透析市場

最も市場が大きいのは、透析液中のエンドトキシン濃度管理である。現状の小規模透析現場では、月に 1 回程度定期的にサンプルを採取して検査機関に送付し、測定を行っている。それ故透析患者は、エンドトキシンが混入した透析液で透析を行うリスクを常に抱えている。本検査装置は、価格が安くまた誰でも簡便に扱えるので、各医療機関が必要台数備えて必要なときにいつでもエンドトキシン検査を行うことが可能になる。

国内の血液透析患者数は、2010 年で 30 万人であり、毎年 1 万人ずつ増えているものの、生活習慣病患者のケアが充実してきたこともあり、直近では頭打ちになっている。また世界の血液透析患者数は、2010 年では 209.5 万人と推定されている。2000 年には、国内の患者数は、20.6 万人、世界全体では 106.5 万人（日本腎臓学会「CKD 診療ガイド」東京医学社 2009）であったことから、この 10 年間における透析患者数の推移は、国内の 45%増加に対して、世界全体では 97%増加しており、世界における（特に米国における）エンドトキシン検査装置の需要が拡大していると推定される。

近年、国内でもオンライン HDF 透析用の装置を導入する透析施設が増加している。オンライン HDF 透析は、ダイアライザーの前で水または透析液を用いて血液を希釈して透析を行う方式で、従来の血液透析に比べ患者の身体的負担が少なく、老廃物の除去が優れているという特徴がある。この方式では、血液を相当希釈するので、透析液の清浄度を測定するレベルも低くなり、2014 年 3 月に（公）日本臨床工学技師会から発行されたガイドラインでは、透析用水、透析液のエンドトキシン活性度は、1EU/L 未満に抑えることが推奨されている。この 1EU/L という数値は、本事業における高感度化の目標値であり、市場ニーズからも数値目標として妥当であることが確認された。

### 2.3.1(2) 医薬品検査市場

注射・点滴液などの液状医薬品の製造時に行う検査は、出荷時の最終検査と製造工程の途中で行う工程管理用の検査がある。最終検査におけるエンドトキシン試験法は、日本薬局方が認可している測定法に限ると規定されている。しかし、製造工程で適宜行われる工程管理には日本薬局方の規定がなく、医薬品メーカー各社の品質管理方針に準拠した試験方法で良いとされており、簡便にエンドトキシン測定ができる検査装置のニーズがある。

### 2.3.1(3) 再生・移植医療分野

iPS 細胞由来の臓器細胞を培養して医療を行う再生医療が急速に普及しつつある。再生医療の先行事例として先ず加齢黄斑変性症が挙げられる。国内では2~3万人、米国では300万人の患者数と言われている。また、心臓疾患の患者数は国内では276万人でそのうち約10%の30万人が重度心臓疾患で再生医療を必要としている。さらに最近では、脳梗塞や骨髄損傷の患者にも再生医療を行う臨床試験がすでにスタートしている。脳梗塞の患者数は国内で約140万人である。細胞培養の前後でエンドトキシン測定を行う必要があることから、エンドトキシン検査装置の需要は今後増大すると考えられる。

膵臓移植医療において、臓器そのものの移植は患者の負担が大きいため、近年は膵臓から膵島のみを抽出し、培養した後で肝臓内の血管に注入するという膵島移植の手法を採用している。米国食品医薬品局（FDA）の推奨に基づき、エンドトキシン検査は、米国の膵島移植におけるルールとなっているため、日本もそれに準じて移植直前の培養上清を対象としてエンドトキシン検査を行っている。このように細胞移植など免疫抑制剤を服用する医療では、エンドトキシン検査が必須であり、自己の細胞を使用する再生医療でも、コンタミによる感染防止のためにエンドトキシン検査が必要である。

### 2.3.2 事業化に向けての市場調査

透析施設2箇所で現場の管理者と担当者にヒアリングを行い、エンドトキシン測定の現状とセンサニーズについて調査を行った。

#### (1) エンドトキシン測定の現状

エンドトキシン測定頻度は、K病院では、透析装置52台とRO装置を含めて、平均して10件/月、T病院では、透析装置12台とRO装置を加えて25件/月であった。いずれの病院でも、個々の透析装置の入口/出口にエンドトキシン補足フィルタを設置している。K病院では、このフィルタによりエンドトキシンフリーを担保しているという考え方と実績から、以前の月1回が年1回へとエンドトキシン測定頻度が大幅に減少した。

新しい透析装置に切替えたK病院では、サンプルの採取は透析装置のサンプル専用採取口で行っている。一方、T病院では、旧式の透析装置を使用しているせ

いか、透析装置の配管の一部から容器でサンプルを採取することを行っており、高感度で高精度なエンドトキシン測定には対応できていない印象を受けた。

## (2) センサーズについて

エンドトキシン測定に関する透析施設の要望事項を下記に示す。

- ① 多数のサンプルから濃縮する方法でも良いので、エンドトキシン濃度 1EU/L を測定できることが望ましい。
- ② 測定時間は短ければ短いほど良い。  
(現状は、1EU/L を 90 分～2 時間で測定している。)
- ③ コストが安ければ、いくらでも測定したい。  
(現状のランニングコストは、1,200～1,500 円/1 測定)
- ④ マルチ測定できる機器が望ましい。
- ⑤ 透析装置内部にエンドトキシンをモニターできる機能があればメリットがある。

まだ市場調査の件数が少ないという懸念はあるものの、今回の市場調査から、事業化に向けてこれまで本事業で提案してきた検査装置の基本仕様は、ほぼ妥当であることが確認できた。

## 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

従来型の電極構造では高感度化に限界があることが分かり、さらなる高感度化を目指してくし型電極の開発と詳細設計を進めた。フォトリソグラフィ技術を用いて、くし型電極チップ(材質: Au)を製作し、測定時間 60 分でエンドトキシン濃度 1EU/L を検出することが出来た。また、このくし型電極成膜加工技術をもとに、Au よりもっと安価な電極材料を模索し、電極と流路を一体化した電極チップの開発を行った。電極材料としては Pd が有力であったが、実際に試薬を用いた測定では、高感度測定が出来ないことが判明し、Pd 上に Au 薄膜を蒸着した電極を作製し、評価を行った。この Au 蒸着電極では、0、1、10EU/L をそれぞれ区別することが可能であり、くし型電極の形状を最適化することで、1EU/L の検出が可能であることが示された。また、電極チップの製品化を見据えて、凍結乾燥法で緩衝液混入後の酵素を乾燥させ、保存試験を行った。現在まで保存 1 か月では酵素特性が劣化しないなどの知見が得られた。

#### 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回路技術と基板の実装技術を用いて、くし型電極に対応したデュアルポテンショスタット回路基板を開発した。ま



た、恒温槽、高容量バッテリー、電極チップ用コネクタなどの要素技術を組み合わせ、くし型電極チップに対応した1CHエンドトキシン検査装置試作機を完成させることができた。プロトタイプ電極チップを用いた総合的な検査装置の性能評価では、エンドトキシンが高濃度で再現性（相対標準偏差）20%以内を達成できる見通しである。

## 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 エンドトキシン低濃度測定の信頼性を高める。

エンドトキシンが低濃度の測定領域で、1EU/Lと1EU/L未満の区別ができるように、信頼性高く安定して測定できる必要がある。

課題2 試薬を塗布した電極チップで安定して測定できる。

ユーザーの利便性を考えると、電極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測定が開始されることが望まれる。そのためには、電極チップ内に凍結乾燥された試薬が塗布されていて、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を実証する。

### 3.2.2 検査装置の開発

課題1 製品化に対応した検査装置の開発を行う。

電極チップを接続するコネクタは市販品を使用するまた電極チップが適切に接続されたかどうかを判別する回路を追加するなどさらに測定の信頼性を高めるため検査装置の性能・機能を向上させる必要がある。

課題2 操作性を考慮したファームウェアの開発を行う。

競合品である Endosafe-PTS の利点や問題点を参考にしながら、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 事業化展開について

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相関データが良くなければ認可を取ること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。

日本薬局方では、これまで検査装置内に保存された検量線は認められていなかった。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、電極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無理だろうと思われていた。しかしながら、日本

薬局方でも保存検量線を認める方向で動いているという情報もあり、今後の動向が注目される。

注射・点滴液など液状医薬品向けのエンドトキシン検査装置は、これまで日本薬局方の規定がなく、医薬品メーカー各社の品質管理方針に準拠した試験方法で良いとされている工程管理に限定されてきたが、今後は最終検査を視野に入れることも可能となり、マーケットは非常に大きいものとなる。

このような市場動向の変化からみて、事業化に当たっては、マーケットとして大きい国内透析市場の優先順位が高いのは自然の流れであるが、国内の医薬品の検査市場もターゲットに入れるべきと考える。次に海外市場を視野に入れて、柔軟な対応に変化してきたFDAの認可を取得するという段階的事業化戦略が望ましい。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。

透析市場および医薬品市場とも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、川下企業の海外子会社または海外代理店を通して、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である。