

平成22年度予備費事業 戦略的基盤技術高度化支援事業
「電界攪拌技術を適用した革新的迅速抗原抗体反応技術ならびに検出装置の開発」

成果報告書

平成 24年 3月

委託者 東北経済産業局
委託先 財団法人あきた企業活性化センター

目 次

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
1-2	研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	4
1-3	成果概要	8
1-4	当該プロジェクト連絡窓口	11

第 2 章 研究開発及び成果

2-1	電界攪拌による迅速反応処理装置の開発	12
2-1-1	低環境負荷型検体基板の開発	12
2-1-2	電界攪拌装置の開発および評価	16
2-2	電界攪拌装置用電界制御部の開発	19
2-2-1	信号発生部、電圧増幅部の回路一体化	19
2-2-2	低周波高電圧の制御方法の確立	21

第 3 章 全体総括

3-1	全体総括	23
3-2	今後の課題	23

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

バイオテクノロジーや医療現場の検査工程で多用されている抗原抗体反応は、外部から体に侵入した物質である抗原とこれに対抗するために体が作り出す物質である抗体との反応で、特異的な性質を有する。したがって、本反応を用いて多種多様な検査手法が編み出されている。しかし、処理時間に長時間を要すること、試料コストが高いことによって、バイオテクノロジーの研究面や病院検査部門に大きな負担が掛かるという問題を有している。本研究では抗原抗体反応の迅速化とともに試料の取扱量の微量化を可能にする攪拌技術ならびに装置開発を行うものである。

本研究では上記の解決方法として電界非接触攪拌技術(電界攪拌)を適用し、迅速かつ高品位な抗原抗体反応処理技術ならびに試薬の超微量化技術を開発する。そのために、以下の研究開発項目を実施する。

① 電界攪拌による迅速反応処理装置の開発

(株式会社アクトラス、株式会社セーコン、秋田エプソン株式会社、秋田県産業技術センター、国立大学法人秋田大学)

電界攪拌技術を適用し良好な非接触に攪拌を行う技術を確認し、抗原抗体反応を短時間に高精度かつ高効率に進行させる免疫組織染色技術を実現する電界攪拌装置を開発する。

サブテーマ①-1 低環境負荷型検体基板の開発

(株式会社アクトラス、株式会社セーコン、秋田県産業技術センター、国立大学法人秋田大学)

被検体液の微量化によって、用いる容器との間に生じる表面張力が影響し、良好な攪拌特性が得られ難いという問題の解決のため、試料との接触面積を少なくするべく、 $\phi 2\text{mm}$ の突起をスライドガラス大のプラスチック成形基板に配置した専用基板を開発する。

この際、プラスチックは撥水性を示すため基板表面に抗原が定着し難いことから、なじませるために表面改質処理すなわち親水化処理を行い、試料と接触する表面性状をプラズマ加工にて制御することで、突起表面は抗原定着のために最適な粗さを有する表面積を得、攪拌力に耐えかつ洗浄に耐える固着力を確保させる。この表面粗さ条件についての最適値について、秋田県産業技術センターが検討を行う。基板の突起表面の表面状態の評価に用いる装置は、秋田県産業技術センター内に所有するAFM(原子間力顕微鏡)を使用する。さらに $\phi 2\text{mm}$ の突起を多数配置したときのプラスチック成形基板を用いた場合の反応性のばらつきについても評価を加え多点評価キットへの可能性について開発を深化させる。基板表面に微細加工を施す専用基板の開発は秋田県産業技術センターの基本設計のもと株式会社セーコンが行う。実験および評価については、株式会社アクトラス、秋田県産業技術センターと国立大学法人秋田大学が行い、最適化された評価条件を株式会社アクトラスが装置開発への適用を行う。上記評価用試料の作製を行うために用いる密閉式自動固定包埋装置を株式会社アクトラスに導入し、試料のスライドガラスへの装着歩留まりを手動で行う場合の70%から90%に向上させる。

以上により、最終的には2 μL 程度の微量な試料にて抗原抗体反応が有効に作用可能な、プラスチック基板を開発し、電界攪拌によって反応時間を60から5分に短縮可能とすることを目標とする。

サブテーマ①-2 電界攪拌装置の開発および評価

(株式会社アクトラス、秋田エプソン株式会社、秋田県産業技術センター、国立大学法人秋田大学)

①-1の低環境負荷型検体基板の開発をうけて、この専用基板を搭載し高い操作性を実現させる電界攪拌装置(搬送部)と、②の電界攪拌装置用電界制御部の開発で成果として得られる電界供給装置に対しセンサおよび電極の微細調整を可能とする機構を新たに組み合わせた電界攪拌装置(制御部)の2つから構成される電界攪拌装置の開発と評価を実施する。

電界攪拌装置の開発は、秋田県産業技術センターの基本技術の応用により秋田県産業技術総合研究センターと株式会社アクトラスが行う。また試料基板搬送部について、株式会社アクトラスが基

本仕様を作成し、秋田エプソン株式会社が開発を行う。装置完成後、攪拌挙動の確認実験は株式会社アクトラス、秋田県産業技術センターがハイスピードカメラを株式会社アクトラスに導入して行う。抗原抗体反応については秋田県産業技術センターと国立大学法人秋田大学が免疫染色条件の確立ならびに病理的な評価を行う。

電界攪拌装置は、使用分野により求められる機能が異なるため以下の手順で開発を進める。はじめに、実験用電界攪拌装置を作製し電界攪拌による迅速反応処理技術のための各種条件出しや評価を行う。複数点の検体評価が一度に行えるよう、10枚のスライドガラス基板をアレイ状に配置し、各々の基板にセンサ取付けと電極装着を可能とし、そのZ軸方向の微調整が可能な実験用電界攪拌装置(制御部)を開発する。また、実験装置の取り扱いならびに安定した操作性を得るため実験用電界攪拌装置(搬送部)を開発し、株式会社アクトラスが組み込み完成させ良好な操作性を得る。これにより、評価結果である彩度のばらつきを現状の40%から30%へ抑えることを目標とする。

次にこの実験用の評価で得られた最適条件にしたがって、医療向けとバイオ向けに特化した電界攪拌装置を開発し、それぞれの分野で求められる機能を確立し評価を行う。

医療向けとして、術中診断において要求される高速化に対応した自動制御の機能を有し、かつ安定した攪拌作用でさらにばらつきを20%まで抑えた医療向け電界攪拌装置(制御部)と自動制御による高い操作性を有する医療向け電界攪拌装置(搬送部)とを株式会社アクトラスが組み込み完成させる。

バイオ向けとして、多岐にわたる検体評価に対応するべく操作の自由度が求められるため試料基板の配置や電極位置にフレキシビリティを持たせ、さらに使用環境が省スペースを求められるため一回の試料搭載枚数をスライドガラス6枚までとし、手動操作とすることで小型化を図ったバイオ向け電界攪拌装置(制御部)と良好なハンドリング操作性を有したバイオ向け電界攪拌装置(搬送部)とを株式会社アクトラスが組み込み完成させる。

合わせて、以下の機能を有し制御部と搬送部からなる電界攪拌装置を実験用、医療向け、バイオ向けの計3台作製する。

開発装置名称	特徴	達成すべき条件・目標
実験用電界攪拌装置	電界攪拌による迅速反応処理のための各種条件出しや評価を行うことができる実験用装置。	<ul style="list-style-type: none"> ・彩度のばらつきを現状の40%から30%へ抑えられること。 ・滴下用ウェル20点の試料基板を同時に10枚評価が行えること。 ・各基板の電極のZ軸方向の微調整(分解能0.1mm)が個別に可能なこと。 ・環境条件(温度、湿度、気圧)の評価も可能であること。
医療向け電界攪拌装置	実験用電界攪拌装置の評価で得られた最適条件に基づき高速化を図った医療向け装置。	<ul style="list-style-type: none"> ・迅速に評価を行うため試料基板の配置や電極位置の自動操作が可能なこと。 ・医療向けとして高精度が要求されるため、彩度のばらつきをさらに20%まで抑えること。
バイオ向け電界攪拌装置	操作の自由度を持たせ簡略化を図り、小型化に特化したバイオ向け装置。	<ul style="list-style-type: none"> ・手動操作とすることで簡略化し小型化(実験用の体積比50%)を実現すること。 ・基板配置や電極位置について0.5mm単位で可変できること。 ・一回の試料基板枚数を6枚まで搭載可能なこと。 ・彩度のばらつきを現状の40%から30%へ抑えられること。

② 電界攪拌装置用電界制御部の開発

(株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター)

秋田県産業技術センターの技術シーズである電界攪拌技術を用い、低周波、高電圧を発生させる電界印加部の小型化を株式会社アクトラスが行い、電界供給装置として最終的に①の装置へ導入する。

サブテーマ②-1 信号発生部、電圧増幅部の回路一体化

(株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター)

電界攪拌による迅速反応処理装置の開発のために、試料寸法に合わせて、用いる試薬量が変化する。このため良好な攪拌性能が得られる電界印加条件を求めるために、はじめに電界制御装置(高電圧アンプ、デジタルオシロスコープ、マルチファンクション)を株式会社アクトラスに設備導入し、電界攪拌に適用する各試料の適用量における印加条件を明らかにする。

従来の高電圧電源は、絶縁性や冷却などの安全性問題やノイズ対策などのため、スペースを必要とし大型なものとなり、攪拌装置への導入が困難となる。この解決策として株式会社アクトラスが持つ、積層圧電アクチュエータ制御用の高電圧・高出力電源開発の技術を応用し、新規に組込みソフトウェアを実装した専用の CPU 回路でカスタム化を図る。

本開発は、高電圧制御部を低周波信号発生回路と同じ基板上に形成するデジタル・アナログ混在回路の技術が必要となるため、スペクトラムアナライザーとロジックアナライザーを株式会社アクトラスに導入して、株式会社アクトラスが回路実験および開発を進める。また総合評価については秋田県産業技術センターが行う。

電界供給装置は、出力電圧のばらつきの幅を抑える必要がある。そこで導入する基準高圧電源装置の出力電圧と比較してばらつきが 4 ± 0.2 kV(10%以内)の性能を有する安定した出力電圧を制御可能な回路を確立することを目標とする。

サブテーマ②-2 低周波高電圧の制御方法の確立

(株式会社アクトラス、秋田県産業技術総合研究センター)

本研究では周波数をスイープさせて試料液挙動を観察するため、出力電圧ならびに周波数制御をコントロールする必要がある。しかし、既存の回路方式では制御が複雑になり実現性が乏しい。そこで、組込ソフトウェアを導入して、低周波信号の波形生成、最適な印加周波数の制御を行うことにより、回路を簡略化するとともに使用部品点数を低減させて最小限のハード構成により小型化、軽量化を図る電界供給装置を開発する。

本開発については、振動を抑えた環境と塵埃によるコンタミを防止するために、株式会社アクトラスに除振台とクリーンブースを導入し、その中にロジックアナライザー、スペクトラムアナライザーからなる装置を設置して株式会社アクトラスが行う。

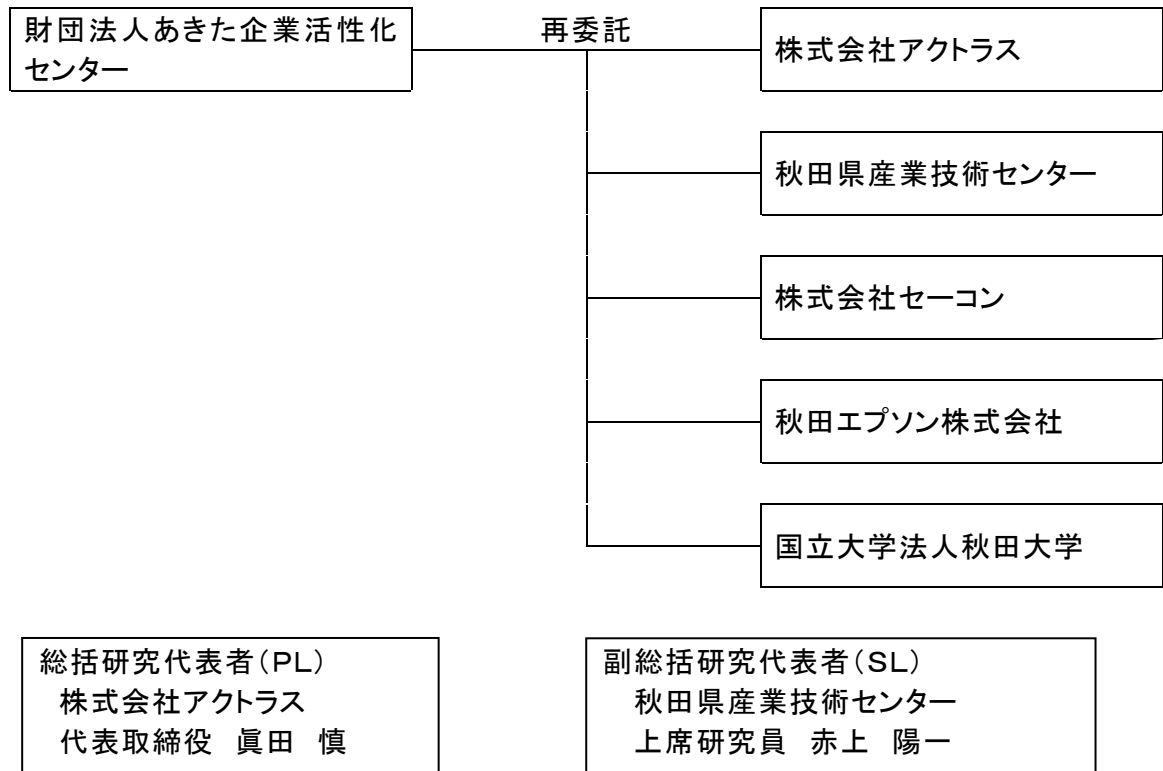
また基礎実験として、試料の大きさに合わせた最適な液量に対して最も良好な攪拌現象が生じるための印加周波数の条件を得るために、株式会社アクトラスが電界制御装置(高電圧アンプ、デジタルオシロスコープ、マルチファンクション)により、ナノ粒子を攪拌状態の液滴に滴下してハイスピードカメラを用いて観察する方法にて印加条件を究明する。

基本評価は、ハイスピードカメラ、電界制御装置(高電圧アンプ、デジタルオシロスコープ、マルチファンクション)からなる評価装置と比較検証のため基準高電圧電源装置を導入して、株式会社アクトラスが行い、また多点実験ならびに総合評価は秋田県産業技術センターが行う。最終的には、繰り返し矩形波を基本波形とし、周波数 0.5~200Hz の範囲で動的に切り換え可能にすることを目標とする。

1-2 研究体制

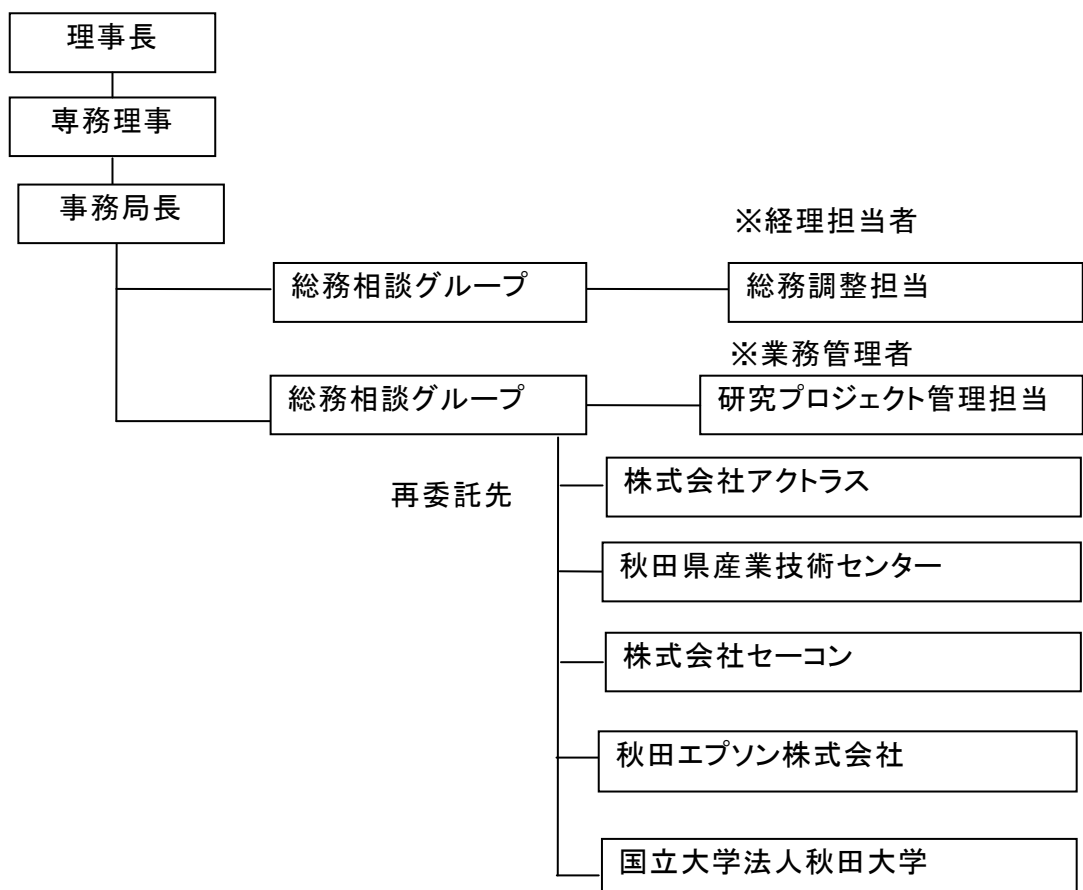
(1) 研究組織及び管理体制

1) 研究組織(全体)



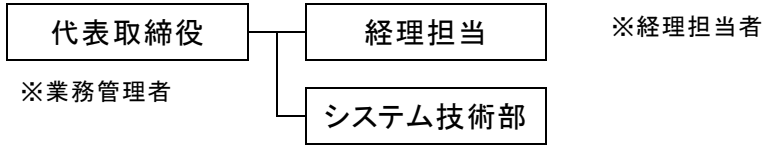
2) 管理体制

① 管理法人[財団法人あきた企業活性化センター]

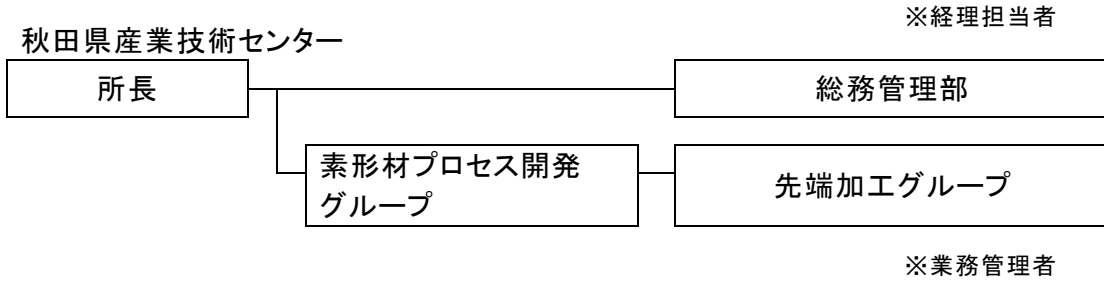


②(再委託先)

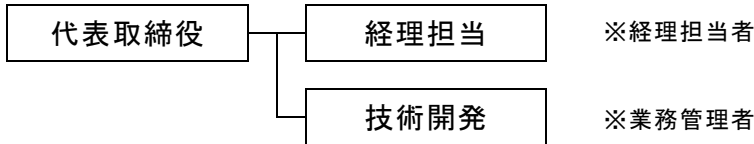
株式会社アクトラス



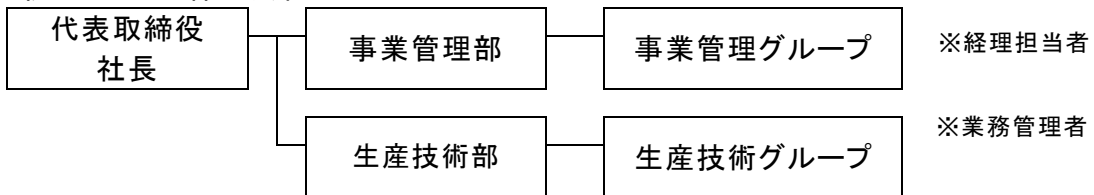
秋田県産業技術センター



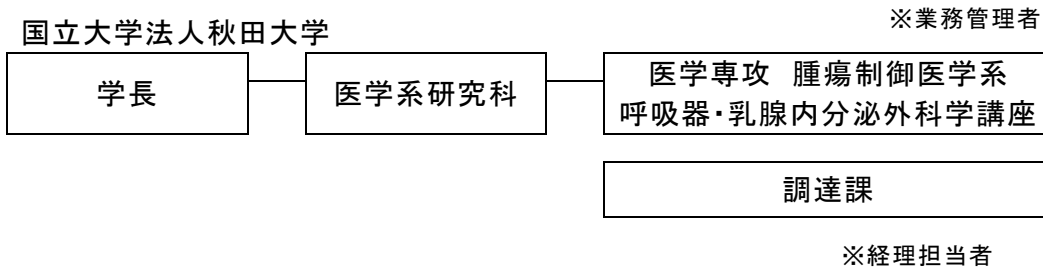
株式会社セーコン



秋田エプソン株式会社



国立大学法人秋田大学



2) 研究員及び管理員(役職・実施内容別担当)

【事業管理者】財団法人あきた企業活性化センター

②管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
松橋 亨	総務相談グループサブリーダー	③-2、③-3、③-4
千蒲 能	総務相談グループ主査	③-2、③-3、③-4
特別任用職員	総務相談グループスタッフ	③-2、③-3、③-4

【再委託先(研究員)】

株式会社アクトラス

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
眞田 慎	代表取締役	①-1、①-2、②-1、②-2、③-1
戸巻 道雄	主任技師	①-1、①-2、②-1、②-2
今野 寛	技術主任	①-1、①-2、②-1、②-2

秋田県産業技術センター

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
赤上 陽一	素形材プロセス開発部 先端加工グループ 上席研究員	①-1、①-2、②-1、②-2
久住 孝幸	素形材プロセス開発部 先端加工グループ 主任研究員	①-1、①-2、②-1、②-2
佐藤 安弘	素形材プロセス開発部 先端加工グループ 研究員	①-1、①-2、②-1、②-2
加賀谷昌美	素形材プロセス開発部 先端加工グループ 研究員	①-1、①-2、②-1、②-2

株式会社セーコン

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
小松 国夫	技術開発 部長	①-1

秋田エプソン株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
平田 潤	生産技術部 生産技術グループ 課長	①-2
下山 耕平	生産技術部 生産技術グループ	①-2

国立大学法人秋田大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
南谷 佳弘	大学院医学系研究科 医学専攻 腫瘍制御 医学系 呼吸器・乳腺内分泌外科学講座・ 准教授	①-1、①-2
戸田 洋	大学院医学系研究科 医学専攻 腫瘍制御 医学系 呼吸器・乳腺内分泌外科学講座	①-1、①-2
南條 博	医学部付属病院 病理部副部長 准教授	①-1、①-2

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

【事業管理者】

財団法人あきた企業活性化センター

(経理担当者)総務相談グループ 総務調整担当 サブリーダー 大西 勝

(業務管理者)総務相談グループ 研究プロジェクト管理担当 サブリーダー 松橋 亨

【再委託先】

株式会社アクトラス

(経理担当者)経理担当 山口 美奈子

(業務管理者)代表取締役 眞田 慎

秋田県産業技術センター

(経理担当者)総務管理部主査 町本 智美

(業務管理者)上席研究員 赤上 陽一

株式会社セーコン

(経理担当者)経理担当 川村 和子

(業務管理者)代表取締役 今 東久雄

秋田エプソン株式会社

(経理担当者)事業管理部 事業管理グループ 課長 土田 建夫

(業務管理者)代表取締役社長 丸山 実男

国立大学法人秋田大学

(経理担当者)医学系研究科・医学部 調達課 主査 岡部 勉

(業務管理者)大学院医学系研究科長 本橋 豊

(4) 他からの指導・協力者名及び指導・協力事項

研究推進会議 委員

氏名	所属・役職	備考
眞田 慎	株式会社アクトラス 代表取締役	PL 委
赤上 陽一	秋田県産業技術センター 上席研究員	SL
小松 国夫	株式会社セーコン 部長	委
下山 耕平	秋田エプソン株式会社	委
南谷 佳弘	国立大学法人秋田大学 准教授	
戸田 洋	国立大学法人秋田大学	
南條 博	国立大学法人秋田大学 准教授	
平田 潤	秋田エプソン株式会社 課長	委
戸巻 道雄	株式会社アクトラス 主任技師	委
今野 寛	株式会社アクトラス 技術主任	委
久住 孝幸	秋田県産業技術センター 主任研究員	
佐藤 安弘	秋田県産業技術センター 嘱託研究員	
加賀谷昌美	秋田県産業技術センター 嘱託研究員	
首藤 文榮	国立大学法人岩手大学 客員教授	アドバイザー
大橋 正彦	株式会社島津製作所 東北支店 支店長	アドバイザー

アドバイザー 氏名	主な指導・協力事項
首藤 文榮	バイオ分野の見地から評価して頂く。
大橋 正彦	診断装置のエンドユーザーの立場から評価やノウハウについて専門的な助言を頂く。

1-3 成果概要

本研究開発の目標を達成させるために、以下の4つの研究開発項目について実施した。

サブテーマ①-1: 低環境負荷型検体基板の開発

目標値としては、お米の半分程度の2 μ L程度という微量な試料に迅速に抗原抗体反応を作用する ϕ 2mmの突起面に凹0.3mmを付けたプラスチック製基板の基本設計を秋田県産業技術センターが行い、株式会社セーコンがプラスチック射出成形品として開発に成功した。本形状寸法はスライドガラス大である。この狙いは、検体が免疫を十分に備えているか否かを健康診断にて検査することを想定して開発を進めた。このため、検体からより少ない供与される試料量と廃棄に当たっては、環境にやさしい医療廃棄物として取扱い易いように微量化を目指した。電界攪拌によって、反応時間は、現在の静置60分から目標の5分に短縮可能なことを確認できた。さらに得られる発色性は、医学的に判断していただいたところ、濃度勾配にしたがって発色彩度が向上することから、十分、医療現場にて使用可能であるとの見解を頂いた。

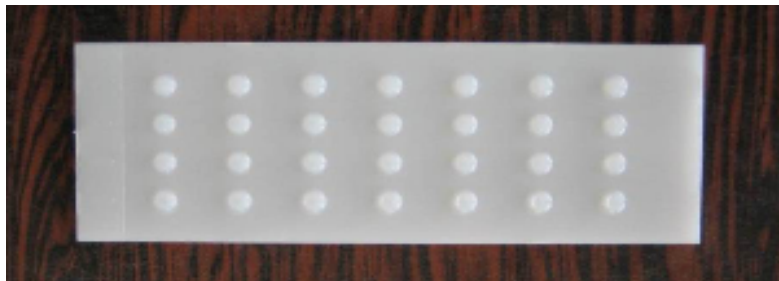


図 1 低環境負荷型検体基板

サブテーマ①-2: 電界攪拌装置の開発および評価

各種条件にて迅速な反応処理技術を検討評価するためには、一度に10枚のスライドガラス基板をアレイ状に配置可能とし、Z軸方向の電極間距離を微調整可能な実験用電界攪拌装置を株式会社アクトラスと秋田エプソン株式会社が開発した。その評価結果として抗原抗体反応の彩度のばらつきを現状の40%から30%以下へ抑えることを目標とした。得られた結果は、24.8%であった。本装置のデータを基に医療向け並びにバイオ向け攪拌装置として小型化並びにローコスト化を図る。バイオ向けは6枚のスライドガラス基板一度に処理可能とし、装置コスト圧縮のために、手動操作を基本とした。本研究では、実験用(図2)、医療用(図3)、バイオ用(図4)の攪拌装置を開発した。

本装置の評価はバイオ向けの評価は秋田県産業技術センターが、医学的な見地は国立大学法人秋田大学で行い、良好な評価結果を得た。



図2 実験用電界攪拌装置



図3 医療向け電界攪拌装置

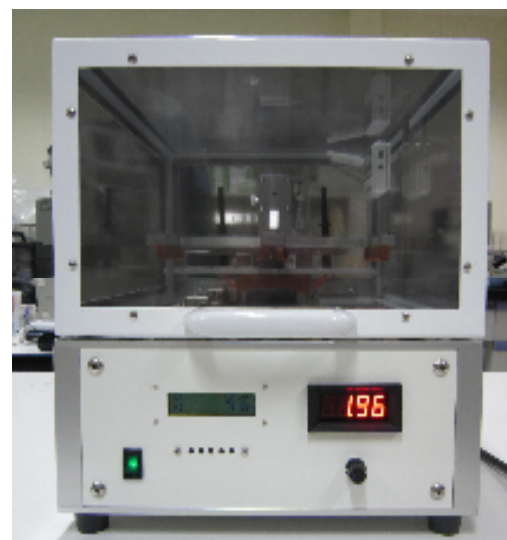


図4 バイオ向け電界攪拌装置

サブテーマ②-1: 信号発生部、電圧増幅部の回路一体化

良好で迅速な反応処理技術を得るためには、電界供給装置の出力電圧のばらつきを抑える必要がある。ここで導入した基準高圧電源装置の出力電圧値と開発した小型電界制御装置との出力電圧を比較し、出力電圧のばらつきを 4 ± 0.2 kV(10%以内)に抑制させる性能を持たせるために、制御回路を開発した。これにより安定した出力電圧が供給できることを確認できた。

サブテーマ②-2: 低周波高電圧の制御方法の確立

医療向け並びにバイオ向け電界攪拌装置に搭載可能で、各種液滴量に対応して優れた迅速反応処理技術を確立するために、印加電界として繰り返し矩形波を基本波形とする。適用可能な印加周波数 0.5~200Hz の範囲に対応しスライドガラスに載せる水滴量も $2 \mu\text{L}$ から $600 \mu\text{L}$ であるため、与える周波数も 0.5Hz~170Hz とレンジが広い。この周波数レンジを動的に切り換え可能な小型電界制御装置を開発することに成功した。

1-4 当該プロジェクト連絡窓口

財団法人あきた企業活性化センター(最寄駅:東日本旅客鉄道秋田新幹線秋田駅)

〒010-8572 秋田県秋田市山王三丁目1番1号

TEL:018(860)5624 FAX:018(863)2390

総務相談グループ 研究プロジェクト管理担当 サブリーダー 松橋 亨

第2章 研究開発及び成果

2-1 電界攪拌による迅速反応処理装置の開発

2-1-1 サブテーマ①-1低環境負荷型検体基板の開発

2-1-1(1)低環境負荷型基板の開発

本攪拌技術の用途開発のためには、反応時間の短縮化、多項目同時検査、また検査のコスト削減のために試薬等の微量化が求められる。被攪拌試料となる液滴に電界を与えて攪拌現象を生じさせるためには、その試料形状を図 1-1 に示すようなドーム形状になることが求められる。このように液滴がドーム形状を呈することで、その頂点には電界が集中し、液滴全体に吸引力が生じ易くなるためである。ここで用いる電界は矩形波の交流電界のため、その電界強度を変化させることによって液滴に吸引力が作用し、振動することが可能となる。

一方、微量液滴の攪拌は、超音波振動を用いることも知られているが、液滴が発熱し、その影響によって内容物に変化が生じる等の問題点が存在している。本技術を用いて、十分な攪拌作用を導き出すためには、先述したようにドーム形状を呈させる必要がある。基礎検討として、 $\phi 2\text{mm}$ 高さ 1mm の突起部をプラスチック製基板上に形成させた。基板の形状寸法はスライドガラス大とし、適用する液量が微量なことより、用いる試料も少なく、試験後に廃棄するにも、環境負荷が少なくなることが期待され、低環境負荷型基板をと秋田県産業技術センターが発案し、株式会社セーコンが設計し、マイクロプラスチック成形技術を適用して、試作品の開発を行った。射出成形品は図 1-2 に示す。

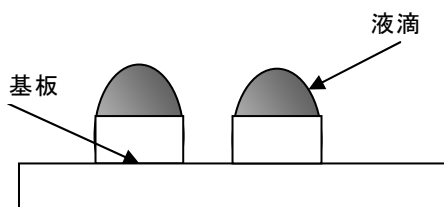


図 1-1 低環境負荷型基板における液滴形状

図 1-2 ポリスチレン製基板 株式会社 セーコン製

2-1-1(2)低環境負荷型基板 抗原定着面の設計指針

良好な検出結果を得るためには、本基板の抗原定着面に抗原を良好に定着させること、かつ電界攪拌時や洗浄時に抗原が脱離しないことが求められる。そこで、最適な基板形状と定着面を得るための設計指針を確立すべく以下の検討を実施した。(1)定着面へのプラズマ照射による表面改質実験(2)定着面への固定砥粒加工による定着面の表面積増大による改質実験(3)抗原定着面の形状として液滴がドーム形状を呈し易い定着面の検討 以上 3 項目について検討を行った。なお抗原定着性は発色基質である ABTS を用い、彩度を指標として評価した。試薬条件を表 1 に示す。反応条件は表 2 に示す。検出結果は、国立大学法人 秋田大学医学部が評価する。

表 1 試薬条件

	試料名	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	分子量 (kDa)
1 抗原	Bonvie Serum Albumin	1000	66
2 一次抗体	抗 BSA 抗体	1	150
3 ブロッキング	egg albumin	1	34
4 二次抗体	抗 IgG 抗体	1	150
5 発色剤	ABTS	3mM	
6 発色基質	H ₂ O ₂	0.3%	

表 2 抗原抗体反応条件




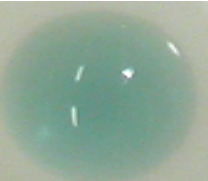
【準備工程】	(分)
① 抗原定着	60
② 洗浄	10
③ ブロッキング	30
④ 洗浄	10
計	110
【解析工程】	
① 一次抗体反応	30
② 洗浄	5×4
③ 二次抗体反応	30
④ 洗浄	5×4
計	100

2-1-1(3) 基板評価実験ならびに結果

良好でばらつきの少ない発色性が得られる基板を得るために、表面張力を活かし、液滴の漏出によるクロスコンタミの防止を避けるための抗原定着面の形状検討を行った。理想的な電界攪拌を与えるための試料液滴の形状はドーム形状であることから、抗原定着面を凹面形状に形成させた。株式会社セーコンにて創成した金型を用いて射出成形した基板の測定は秋田県産業技術センターにて行った。これより、希求した凹面形状が出来上がっていることを確認した。また、通常のフラット面よりも表面積が増加することを確認した。開発した基板の形状と抗原定着性を評価した結果を表 3 に示す。

図 1-3 に検出結果をまとめたグラフを示す。定着面の深さを R0.3mm に凹面化することで、抗原定着率は 16.7% 向上することを得た。定着面の面積は増大することが影響の一つと考えられるが、さらに、電界攪拌が生じやすいことも影響したと考えられる。その効果の一因として、彩度ばらつきも 7.8% に抑えられるという良好な結果が得られた。これより、ばらつきがもっとも抑制される基板は、0.3mm 凹面形状であった。

表 3 抗原定着面形状の検討結果

凹部 (mm)	0	0.1	0.2	0.3
発色性				

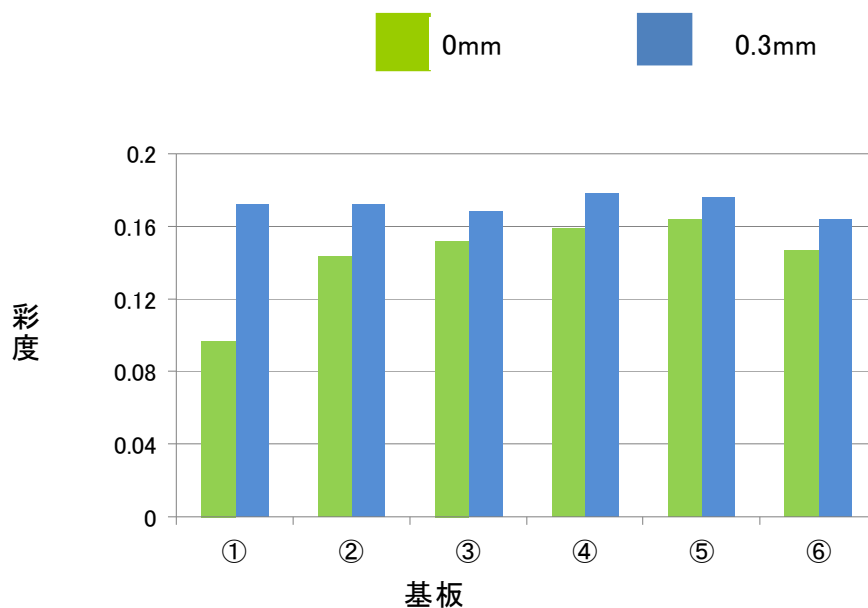


図 1-3 抗原定着面形状の検討結果

2-1-1(4) 低環境負荷型基板

低環境負荷型基板の基板表面に凹面形状 R0.3mm の基板を用いることで良好な発色性が得られることを見出した。従来品と本開発基板における抗原定着性比較実験の結果を図 1-4 に示す。現行品 ELISA プレートの検出結果を図 1-5 に、開発した基板の検出結果を図 1-6 に示す。

ヒト IgM の検出実験の結果、1-1000ng/mL の範囲で 96 穴ウェル (Nunc 社製) と同程度の濃度勾配が開発基板において得られることを確認し、秋田大学医学部南谷先生より、これは医学的にも良好な結果であるとの見解をいただいた。

抗体濃度 (ng/mL)	0	1	10	100	1000
従来品 96 穴 プレート					
開発品 低環境負荷型 基板					

図 1-4 基板による抗原定着性比較実験結果

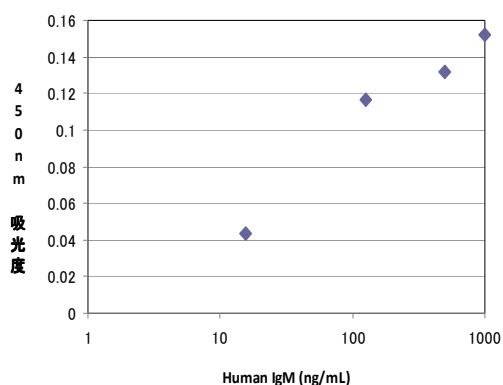


図 1-5 従来品 96 穴プレート 検出結果

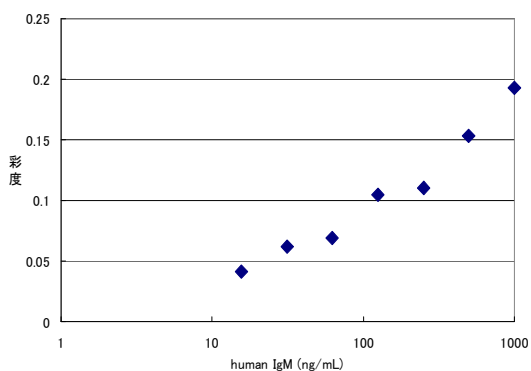


図 1-6 低環境負荷型抗原定着基板 検出結果

2-1-1(5) 電界攪拌条件の検討

開発した低環境負荷型基板を用いて電界攪拌の条件検討を行った。攪拌性能の評価には、磁性ナノ粒子(多摩川精機製)を用いて可視化した。電界印加前の液滴状態を図 1-7 に、電界印加直後を図 1-8 に電界印加 8 秒後を図 1-9 に示す。これより電界攪拌時液滴が活発に動いている様子を見てとれる。これより液量 2 μ L、印加周波数 170Hz にて 10 秒間以内にて均一な攪拌が可能であることが見出された。目標は 1 分であったが、より短時間に均一攪拌の可能性が得られ、他の用途への期待が生まれる。

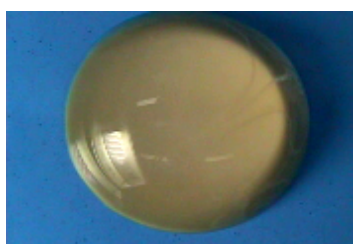


図 1-7 電界印加前



図 1-8 電界印加 直後

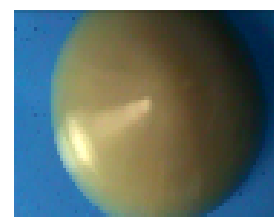


図 1-9 電界印加 8 秒後

次に、通常の免疫組織染色に使用されているスライドガラス基板を用いた評価実験を実施した。

液滴直径 20mm の領域における電界攪拌条件を探った。攪拌が生じる液量と印加周波数との関係についての実験結果を表 4 に示す。これより、医療向け電界攪拌装置における適用条件が得られた。







表 4 攪拌が生じる周波数検討結果

液量 (μ L)	周波数 (Hz)
400	32
500	34
600	38

2-1-1(6) 電界攪拌を用いた抗原抗体反応の迅速化

低環境負荷型基板を用いて、抗原抗体反応における静置法と電界攪拌法との発色性の比較実験を行なった。検出結果を表 5 に示す。電界攪拌による抗原抗体反応の迅速効果を図 1-10 に示す。これより、抗原抗体反応時間は 60 分から 5 分間に短縮可能であることが明らかにすることができた。

表 5 抗原抗体反応迅速化実験結果

反応抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.25	0.5	1
電界			
静置			

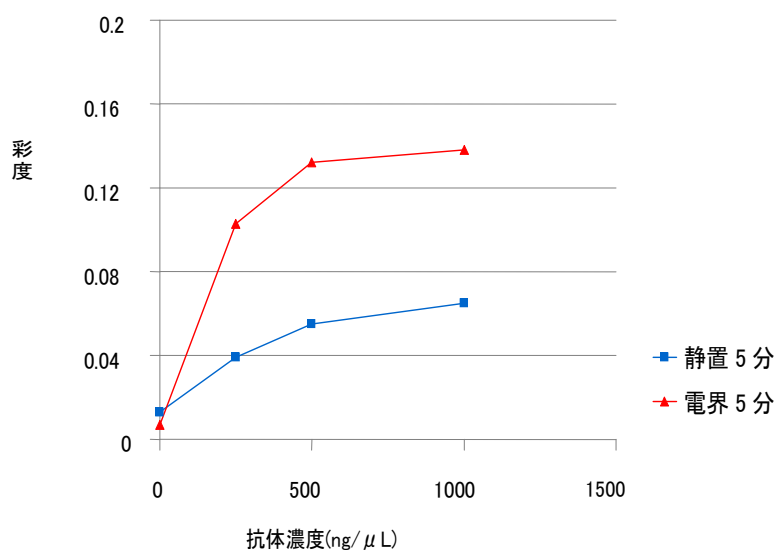


図 1-10 抗体濃度と彩度について

2-1-2 サブテーマ①-2 電界攪拌装置の開発および評価

2-1-2(1) 実験用電界攪拌装置の基本設計指針と評価

本装置は、電界攪拌による迅速反応処理のための各種条件出しや評価を行う装置である。図 2-1 に示す。

外形寸法: W600 mm × D900 mm × H1300 mm



図 2-1 実験用電界攪拌装置(全体)

2-1-2(2) 実験用攪拌装置を用いた彩度ばらつき評価

実験用攪拌装置を用いて10枚のスライドガラスを用いて、抗原抗体反応による染色性のばらつきを評価した。迅速染色評価結果を図2-2に示す。彩度のばらつきはアクトラス製社製色解析ソフト Color analyzer を用いて評価した。従来、40 から24.8%が可能となり、良好な染色性が得られることを確認できた。

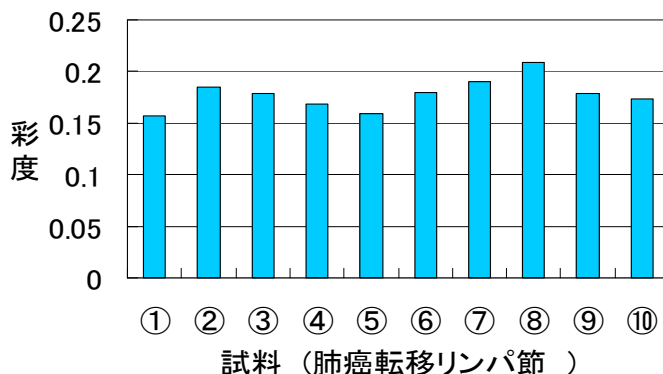


図2-2 10枚迅速染色結果

2-1-2(3) 医療向け電界攪拌装置について

I) 医療向け電界攪拌装置

本装置は、実験用電界攪拌装置で得られた最適条件に基づき染色性の高速化ならびに高度化を図った装置である。図2-3に装置外観図を示す。

外形寸法(カバー閉時):幅40cm 奥行63cm 高さ52cm



図2-3 医療向け電界攪拌装置

II) 医療向け電界攪拌装置(制御部)

医療向け電界攪拌装置の制御部は、実験用電界攪拌装置の評価で得られた攪拌条件が得られた電界を発生可能な装置を図2-4(a)、(b)に示すように搭載した。

外形寸法:W280mm×D145mm×H100mm

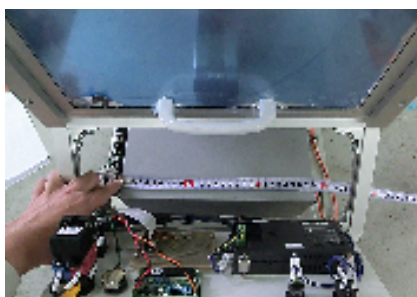


図2-4(a) 制御部搭載の様子(正面)

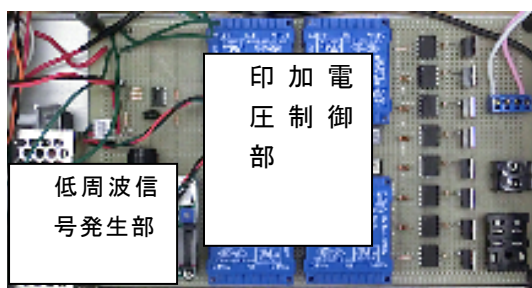


図2-4(b) 低周波信号発生部および印加電圧制御部

2-1-2(4) 電界攪拌条件の検討

医療向け電界攪拌装置を用いて、良好な攪拌特性が得られる条件を究明した。試料液量によっては印加条件が異なるため、抗体液を添加する領域を一定(直径 12mm、直径 20 mm)にして秋田県産業技術センターにて電界条件を求めた。表 6 に示す条件にて免疫組織染色が最適であることを確認できた。

表 6 電界攪拌条件

領域直径 (mm)	12		20	
	一次抗体反応	二次抗体反応	一次抗体反応	二次抗体反応
極間距離 (mm)	6		6.8	
電圧 (kV)	4		4	
波数 (Hz)	18	16	38	18

2-1-2(5) 電界攪拌を用いた免疫組織染色法の病理的な検討

免疫組織染色は抗体の種類を変えることにより、標識できる対象を無数に変えることが可能である半面、抗体の種類によって免疫組織染色の条件が異なる。電界攪拌を用いた免疫組織染色の病理的な汎用性を検討するために、病理診断で多用されている抗体を用いて免疫組織染色を行った。実験の結果、免疫組織染色により茶色に発色した箇所が、がん化している箇所である。秋田大学医学部南條先生より、病理的に十分な発色性が得られているとコメントいただいた。すなわち、電界攪拌を導入した免疫組織染色は、従来の組織染色方法(静置法)と遜色なく、20分以内に得られることが明らかになった。また得られた結果は、特定の抗体のみで可能な特殊なものではなく、日常的な病理診断に用いられている 10 種の抗体で同等の結果が得られた。すなわち本技術は病理的に極めて汎用性が高い技術と結論付けられた。

2-1-2(6) バイオ向け電界攪拌装置

バイオ向け電界攪拌装置は操作の自由度を持たせ、小型化に特化した装置とした。バイオ向け装置では駆動部の移動をすべて手動にて行う。図 2-5 に装置外観図を示す。

外形寸法(カバー閉時):

幅 32cm 奥行 40cm 高さ 34cm

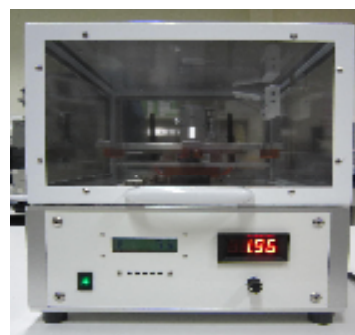


図 2-5 バイオ向け電界攪拌装置

2-1-2(7) マウス検体を用いた免疫組織染色における電界攪拌装置の評価

パラフィン包埋切片は貴重な試料のため、評価実験のサンプルには通常マウスを用いる。ここではパラフィン切片に適用する条件下における染色性について検討を行った。パラフィン包埋切片の作成には株式会社アクトラスに導入した密閉式固定包埋装置を用いた。マウスのパラフィン切片を用いて染色可能性についての評価実験を行い、図 2-6 に示した。これはマウスの組織を用いた代表的な結

果である。パラフィン切片を用いて検討した結果、従来法と同様の結果が得られた。しかし試した抗体(抗アクチン抗体)の種類が少ないため、今後抗体の種類を増やして検討していく予定である。

また、さらに最適な電界攪拌条件と抗体濃度を詳細に検討する必要がある、今後の補完研究として継続していく予定である。

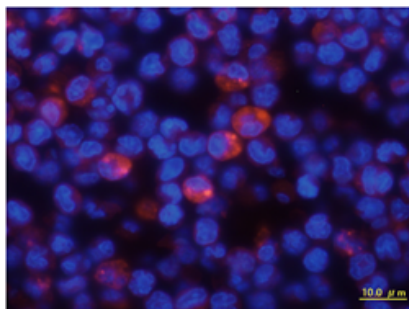


図 2-6 電界攪拌を用いたマウス組織の免疫組織染色
好中球のアクチンが赤色に染まっている。

2-2 電界攪拌装置用電界制御部の開発

2-2-1 サブテーマ②-1 信号発生部、電圧増幅部の回路一体化

2-2-1(1) 信号発生部、電圧増幅部の回路一体化

従来の高電圧電源は、絶縁性や冷却などの安全性問題やノイズ対策などのため、スペースを必要とし大型なものとなり、攪拌装置への導入が困難となる。この解決策として株式会社アクトラスが持つ、積層圧電アクチュエータ制御用の高電圧・高出力電源開発の技術を応用し、新規に組込みソフトウェアを実装した専用の CPU 回路でカスタム化を図った。

第一フェーズとして、現在までの研究で得られている 2kV、50Hz までの電界を発生させる従来型の電源供給装置の小型化、一体化を行った。開発した電界供給装置の出力結果を図 3-1(a)、(b)、(c) に示す。(Agilent 製 高電圧プローブ N2771B にて測定)

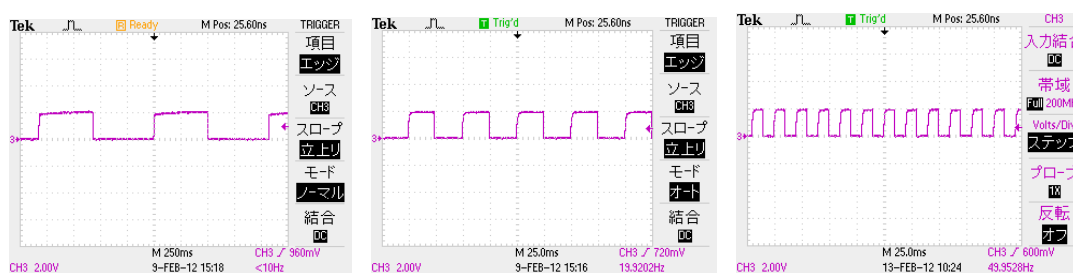


図 3-1(a) 2kV、1Hz

図 3-1(b) 2kV、20Hz

図 3-1(c) 2kV、50Hz

2-2-1(2) 高電圧化設計指針

高電圧動作の範囲を 4kV にて検討した。秋田県産業技術センターが提案した液晶ディスプレイ用の高電圧トランスを用いることで、既存の高電圧アンプと同等の機能を有する小型電界制御装置を開発できた。また基本電圧、基本周波数発生部をマイクロコンピュータ制御とすることで、信号発生部の大幅な小型化に成功した。試作開発は、株式会社アクトラスが以下のように行った。

高電圧制御部を低周波信号発生回路と同じ基板上に形成するデジタル・アナログ混在回路の技術が必要となるため、図 3-2 に示すスペクトラムアナライザーと図 3-3 に示すロジックアナライザーを株式会社アクトラスに導入し評価しながら開発を進めた。装置の総合評価は秋田県産業技術センターが行った。



図 3-2 スペクトラムアナライザー (Agilent 製)



図 3-3 ロジックアナライザー (Tektronix 製)



図 3-4 基準高圧電源装置 (Trek 製 615-3-S)

電界供給装置の出力電圧のばらつき幅を抑える必要がある。そこで導入した図 3-4 基準高圧電源装置 (Trek 製 615-3-S) の出力電圧と比較してばらつきが 4 ± 0.2 kV (10%以内) の目標とした。

2-2-1 (3) 電界供給装置の出力結果

開発した電界供給装置の出力結果を図 3-5(a),(b),(c)に示す。

(Agilent 製 高電圧プローブ N2771B にて測定)

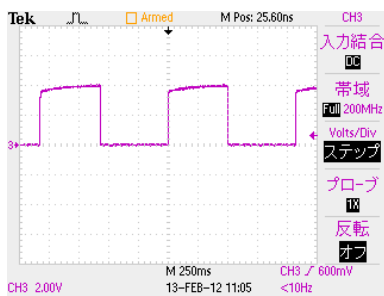


図 3-5(a) 4kV、1Hz

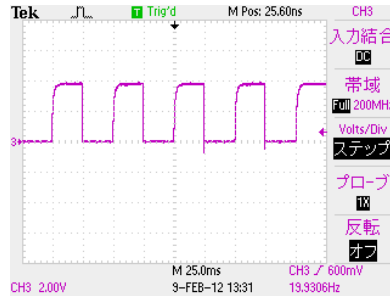


図 3-5(b) 4kV、20Hz

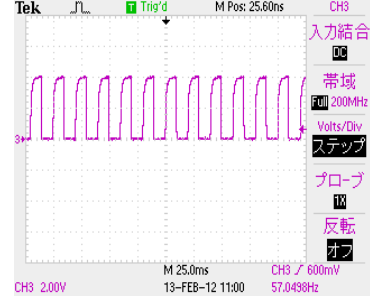


図 3-5(c) 4kV、50Hz

得られた出力性能を、基準高圧電源装置と比較し評価を実施した。出力電圧のばらつきを図 3-6 に示す。

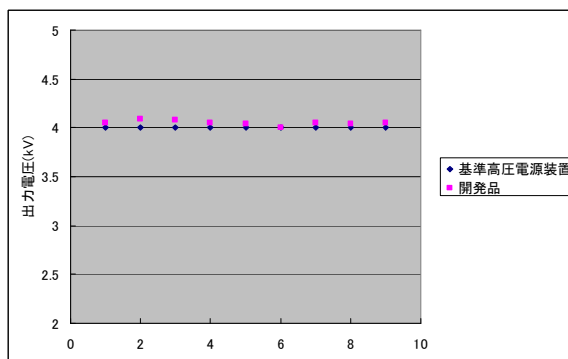


図 3-6 基準高圧電源装置と開発した装置との比較

この結果より、基準高圧電源装置の出力電圧と比較してばらつきが 4 ± 0.2 kV(10%以内)の性能が得られることを確認できた。

2-2-2 サブテーマ②-2 低周波高電圧の制御方法の確立

2-2-2(1) 低周波高電圧の制御方法の確立

本研究では小型電界供給装置を開発する。周波数はスイープさせながら出力電圧ならびに周波数をコントロールする必要がある。そこで、組込ソフトウェアを導入して、低周波信号の波形生成、最適な印加周波数の制御を行うことにより、回路を簡略化する。本開発は、振動を抑えた環境と塵埃によるコンタミを防止するために、図 4-1 のように、株式会社アクトラスに除振台とクリーンブースやロジックアナライザ、スペクトラムアナライザを設置して行った。

基礎実験は、試料の大きさに合わせた最適な液量に対して良好な攪拌現象が生じるための印加周波数条件を得るために、図 4-2 に示すように、株式会社アクトラスにてハイスピードカメラを用いて液の挙動観察実験を行い、電界印加の条件を得た。与える電界は、株式会社アクトラスに導入した図 4-3 に示す電界制御装置(高電圧アンプ、デジタルオシロスコープ、マルチファンクション)を用いた。

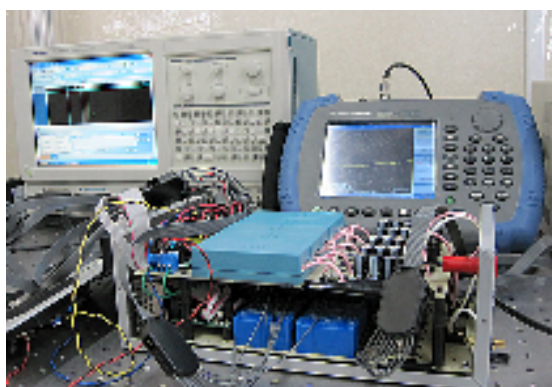


図 4-1 基礎回路実験風景

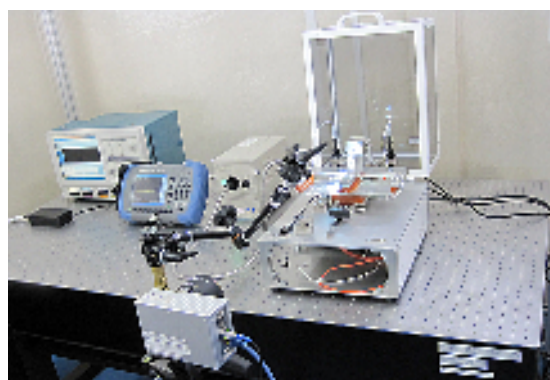


図 4-2 ハイスピードカメラによる攪拌挙動の観察

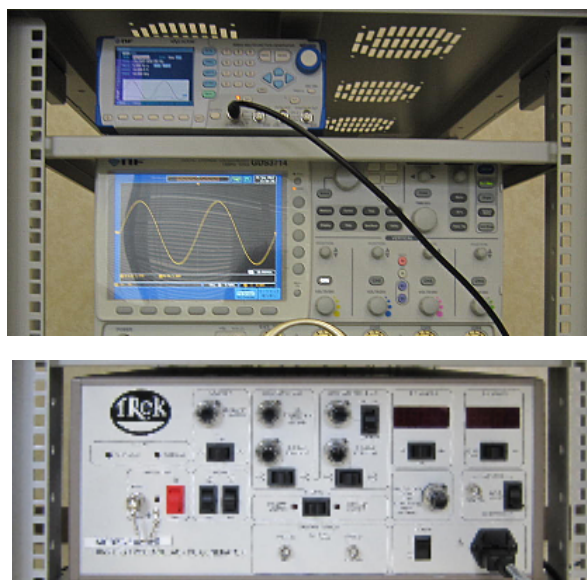


図 4-3 電界制御装置(高電圧アンプ、デジタルオシロスコープ、マルチファンクション)

2-2-2(2) 制御方法の設計指針

本制御方法は、予め高電圧を発生させたのちにスイッチングを行い、方形波を生成する方式を採用した。

2-2-2(3) ノイズ評価結果

試作した電源回路について、放射電界強度測定を実施した。その結果、30~50MHz 帯と 300MHz 帯以上の箇所に不要輻射が見られた。前者は電源回路への入力(AC100V)ラインからのノイズと見られた。また後者の高い帯域は、内部の信号発生器における高調波スプリアスと制御回路の CPU クロックまたはスイッチングパルスの非高調波スプリアスと考えられる。

この結果から、これらの対策としてフィルタリング、シールドの強化、また部品配置・配線パターンの見直しを行い、CISPR Pub.22 Class A を満たす改善が得られた。

2-2-2(4) 性能評価結果

電源の性能目標値として繰り返し矩形波を基本波形とし、周波数 0.5~200Hz の範囲で可変可能な結果が得られた。出力結果は図 4-4、図 4-5 に示す。課題として、周波数を上げていくと立ち上がり応答時間の低下が顕著になるが、攪拌挙動は、しきい値電圧に相当する電圧レベルの ON 時間を十分に確保すれば、十分な攪拌が得られることを確認した。

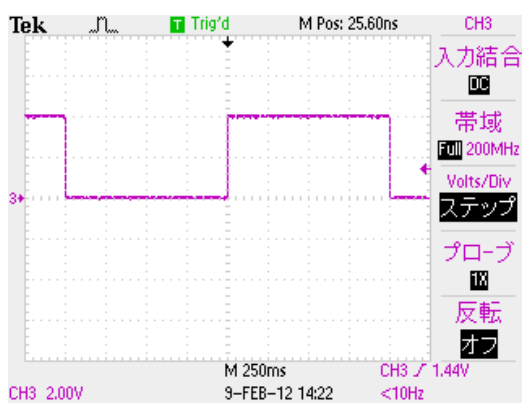


図 4-4 4kV、0.5Hz

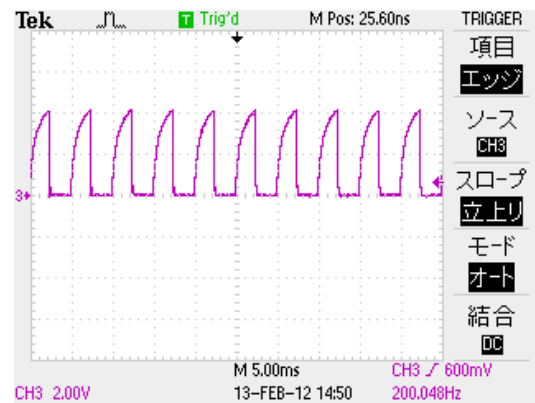


図 4-5 4kV、200Hz

開発した電界制御装置を用いて、電界攪拌条件の検討を行った。印加電界条件を表 7 に示す。攪拌性の評価には、磁性ナノ粒子(多摩川精機 製)を用いた。電界印加前の液滴を図 4-6 に示す。電界攪拌中の挙動を図 4-7 に、さらに 10 秒後の挙動を図 4-8 に示す。

液量 2 μ L、印加周波数 170Hz において、10 秒間で均一な攪拌が可能であることが見出した。

表 7 低環境負荷型基板 電界印加条件

基板	ポリスチレン製基板
液量 (μ L)	2
印加周波数 (Hz)	170
電極間距離 (mm)	6
印加電圧 (kV)	4

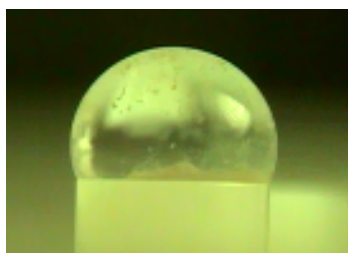


図 4-6 静止時



図 4-7 電界攪拌 7 秒後

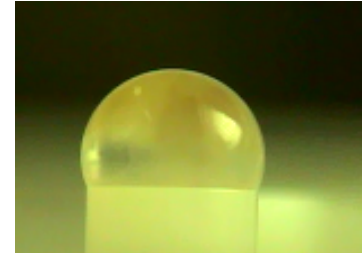


図 4-8 電界攪拌 10 秒後

第3章 全体総括

3-1 全体総括

本研究は、電界非接触攪拌技術(電界攪拌)を適用し、迅速かつ高品位な抗原抗体反応処理技術ならびに試薬の超微量化技術が得られる基板の開発、並びに実用化を目指し、医療向け・バイオ向けの攪拌装置をそれぞれ開発することに成功した。

(1) 2 μ L 程度の微量な試料に抗原抗体反応が有効に作用する電界攪拌専用のプラスチック基板を開発することができた。

(2) 本電界攪拌技術によって抗原抗体反応時間を 60 から 5 分に短縮可能になることを得た。これによって、免疫組織染色を 20 分以内に行えることから、いわゆる術中診断に本染色法が導入可能となり、微小がんの見落としの低下、ならびにがんの性状把握が可能となり、手術法の選択が可能となる。すなわち、がんが原発性なのかそれとも転移性なのかでは、手術法が変わる。これによって、術後の患者の QOL が、がらりと変わる。また、今まで、術後に明らかにされた細胞診断結果と従来の術中の迅速診断に差異があると 2 度目の手術が必要となっている。本技術の導入によって、このようなことが無くなり、医療費の縮減や医学の負担、さらに患者の負担も軽減されるもので、画期的であると秋田大学医学部病理部 南條先生よりコメントをいただいた。

(3) 医療向け・バイオ向け攪拌装置用電界制御装置を開発することができた。これによって実用化への可能性が大いに近づいた。

(4) 実用化に向けて、詳細な検討が必要な箇所が存在することから、今後も補完研究を加えて、本技術の確度を高めたいと考える。

3-2 今後の進め方

今後は、装置の更なる効率化、小型化、染色前処理を含む作業工程の自動化を目指して、実用化に向けた補完研究を行う。また、本技術が病理の分野で、デファクトスタンダードを勝ち得るように、多くの医療機関に貸し出して、評価して頂く企画を進める。