

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：81406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06105

研究課題名(和文) 次世代医療技術に貢献するスターラーレス電界攪拌技術の開発

研究課題名(英文) Development of stirrerless electric field mixing technology that contributes to next-generation medical technology

研究代表者

中村 竜太 (Nakamura, Ryuta)

秋田県産業技術センター・先進プロセス開発部・主任研究員

研究者番号：00634213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、電界を印加し最適な周波数を与えることによって、液滴を非接触で上下に揺らす3次元的攪拌と2次元的回転攪拌を融合した攪拌技術を実現するための最適容器設計及び電極形状、電界印加方法の検討を行った。  
結果的に、再現性、簡便性、汎用性を考慮し、市販のシャーレ底面へ、撥水シートを乱流のきっかけを与え易い勾玉型にして貼り付け、電界攪拌を行うことによって液滴全体が上下に振動し、さらに回転流れが生じていることをハイスピードカメラの観察によって確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状の3次元的電界攪拌では、比較的高速な攪拌となり、細胞や組織に対して物理的ストレスを与えてしまう懸念があり、また、液滴振動の節の付近で淀みが生じてしまう場合があった。  
今回開発した3次元的攪拌に2次元的回転による流れを融合し、比較的低速で淀みの無い攪拌技術を、術中免疫組織染色や抗がん剤の適応性検査、免疫細胞治療に用いる細胞の培養等々へ様々な分野への応用することで医療費縮減が期待でき、社会貢献可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, in order to realize a non-contact mixing technology that combines mixing that moves droplets up and down and moves that rotates by applying an electric field, we examined the optimum petri dish shape, electrode shape, and electric field application method.

As a result, in consideration of reproducibility, simplicity, and versatility, a water-repellent sheet was attached to the bottom surface of a commercially petri dish in the form of "a magatama" that easily gives a chance of turbulence. It was confirmed by observation with a high-speed camera that the liquid droplet vibrates up and down and a rotational flow is generated by performing electric field mixing using it.

研究分野：機械工学

キーワード：攪拌 電界攪拌 非接触攪拌 医工連携 抗原抗体反応 細胞培養

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡率は年々増加傾向を示している。その中で、近年のがん治療は、手術、抗がん剤、放射線治療に加えて、新たに第4の治療法と呼ばれている免疫療法が注目されている。その中でも免疫チェックポイント阻害薬(以下、免疫CP阻害薬)の出現は、がん治療の革命をもたらした、患者に高いQOLを提供すると期待されている。しかしながら、高額な薬価(医薬品ニボルマブで月額約270万円)のため医療費高騰を招き、医療財政の破たんが危惧されている。

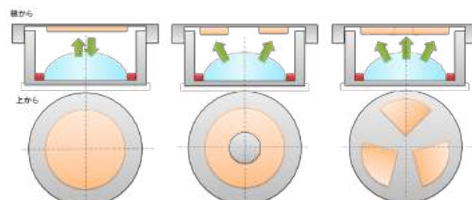
また、微量液滴の攪拌技術が注目されつつある。液滴量を減らすことによって、その液中の被攪拌物質同士の移動距離を短くすることで、効率的な反応が得られ、さらには廃液等の削減が期待できることが知られている。しかし、レイノルズ数を考慮すると、液滴量が少なくなると乱流を生じ難いことが知られている。ナノサイズの攪拌子を用いた微量の液滴や超音波を用いた微量攪拌が開発されているが、それぞれコンタミネーションによる溶液汚染の懸念や液温の上昇によるタンパク質や細胞組織の変性等が懸念されている。

### 2. 研究の目的

秋田県産業技術センターで独自に開発されてきた電界攪拌技術を免疫CP阻害薬の個別適応性判別迅速プロトコルシステム構築や免疫細胞治療に応用しようとした場合、現状の3次元的な電界攪拌では、比較的高速な攪拌となり、細胞や組織に対して物理的ストレスを与えてしまう懸念があり、また、液滴振動の節の付近で淀みが生じてしまう場合がある。そこで、本研究では、現状の電界攪拌技術を進化させ、3次元的攪拌に2次元的回転による流れを融合し、比較的低速で淀みの無い攪拌技術を新たに開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

まずは、「3次元的攪拌+2次元的回転ハイブリッド攪拌」における最適容器設計及び電極形状、電界印加方法等の基本セットアップを検討・開発する。その後様々な電場条件における液滴挙動や攪拌効果等をマクロ的・ミクロ的視点から解析し、電場条件による攪拌挙動のメカニズムを究明する。最後に、次世代医療検査や免疫細胞治療等に適用させるための実験装置の開発を行い、免疫細胞治療へ向けた迅速細胞培養への応用実験を試みる。



(I) 平板電極 (II) リング電極 (III) 三極分割電極  
図1 製作した3種類のシャーレ型プレート

### 4. 研究成果

#### 1. 専用シャーレ型プレートの作成と電界攪拌条件の検討

今回製作した3種類のシャーレ型プレートの概要図を図1に示す。下図のように平板電極、リング電極、三極分割電極となる銅プレートをそれぞれの蓋にインサートしたフタ3種類と液滴をドーム型にするための台座付きシャーレを製作した。実際の成形品を図2に示す。

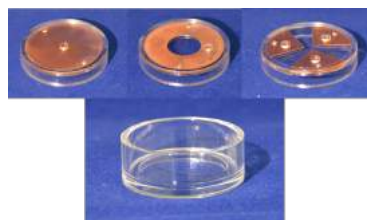


図2 成形品

製作した3種類のシャーレ型プレートを用いて、電界攪拌を行った。平板電極の攪拌の様子を図3に示す。今回成型したシャーレのサイズでは液量は1.5mLから2mL程度までが適量である。また、1.5mLでは矩形波の方が液の動きは大きかったが、2mLではSin波の方が液の動きが大きかった。平板電極とリング電極を比較すると、電極と電界により液に吸引力が働く場所の距離が近い平板において、液の動きは若干大きかった。さらに激しく攪拌させるためには、電極間距離を小さくする必要がある。次に、三極分割電極シャーレの電界攪拌を行った。この電極の場合の電界攪拌のセットアップ図を図4に示す。この電極の場合は、高電圧アンプの後に高電圧リレーを配置し、それぞれの3極別々に電圧を印加した。このリレーはPCで制御可能な装置である。また、シャーレ部の写真を図5に示す。液量は1.5mLであり、±4kV 5hz 1sec 切り替え、±4kV 5hz 2sec 切り替え、±4kV 6hz 3sec 切り替え、±4kV 12hz 0.5sec 切り替えの各条件においても、液表面が回転するような動きが観察できた。



図3 攪拌の例

(液量2mL sin波 電圧±4kV 周波数11Hz)



図4 三極分割電極シャーレの電界攪拌のセットアップ



図5 シャーレ部

## 2. フローサイトメーターによる抗原抗体反応の測定

電界を印加し非接触で液滴を攪拌することによって、細胞内抗原と抗体タンパク質の反応に電界攪拌がいかに関与しているか定性・定量的に示すために、フローサイトメーターを用いて、抗原抗体反応が、静置方法に比較して迅速化しているのか検証実験を行った。

### 2.1 測定方法

フローサイトメーターは、ベックマン・コールター（株）製 CytoFLEX 3 レーザー12 カラーを用いた。細胞は、凍結乾燥ヒトリンパ球のコントロール細胞（ベックマン・コールター（株）CYTO-TROL）であり、FITC 蛍光 CD3 抗体（ベックマン・コールター（株）CYTO-STAT）を静置方法と電界攪拌方法にて抗原抗体反応させて、反応後の蛍光強度を測定し比較した。抗原抗体反応の評価は液量、抗体量と攪拌時間について検討した。イベント数は 10000 とした。

表 1 測定条件

Amount of liquid $\mu\text{L}$	Cell fluid	100
	Antibody fluid	10
Time min		5
Diameter of droplet mm		12
Applied voltage kV		1, 2, 3, 4
Frequency Hz		19
Distance between the electrodes mm		4.8

### 2.2 電界攪拌と静置における抗原抗体反応時間について

電界攪拌と静置時間に関する検討を行った。実験条件は表 1 に示し、静置ならびに攪拌時間を 2、5、10、20 分と変化させた。測定結果を図 6 に示す。この結果から静置ならびに電界攪拌それぞれ、20 と 5 分、10 と 2 分において蛍光強度がほぼ同様であることがわかる。この結果から抗原抗体反応が 4~5 倍速くなることがフローサイトメーターを用いて検証出来た。

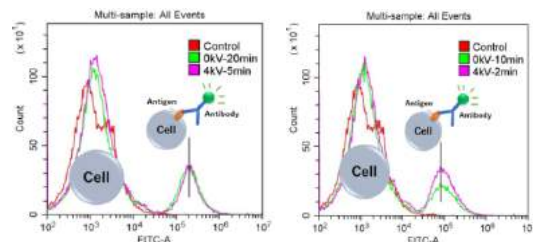


図 6 測定結果（静置と電界攪拌の比較）

### 2.3 フローサイトメーターを用いた液の微量化について

液の微量化のメリットは、被攪拌物質の量が同じであれば、液全体の微量化によって液中濃度は高くなり、被攪拌物質同士の移動距離も短くなり優れた反応スループットが期待できる。しかし、既存の振盪技術では液滴内部の攪拌が困難という課題が存在する。これに対し、本電界攪拌技術は、液滴重量が軽い少量の液滴ほど、基板と液滴との接触面積が小さくなり、表面張力の影響が少なくなることから、液滴の上下振動特性が優れていることを明らかにしている。そこで、フローサイトメーターを用いた液の微量化についての検証を行った。まず、抗体液を  $1\mu\text{L}$  に固定し、細胞液量をそれぞれ  $100\mu\text{L}$ （液滴底面の直径 12 mm）、 $10\mu\text{L}$ （液滴底面の直径 4 mm）とした時の静置状態での蛍光強度を測定した。測定結果を図 7 に示す。この結果から液の微量化により、抗原抗体反応の向上が得られることがわかる。

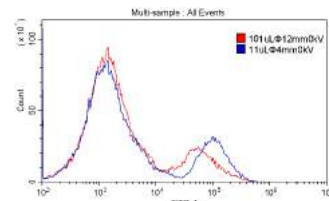


図 7 液の微量化についての測定結果

表 2 測定条件

Amount of liquid $\mu\text{L}$	Cell fluid	10
	Antibody fluid	0.5
Time min		2, 5, 7, 20, 30, 40
Diameter of droplet mm		5
Applied voltage kV		4
Frequency Hz		70
Distance between the electrodes mm		5

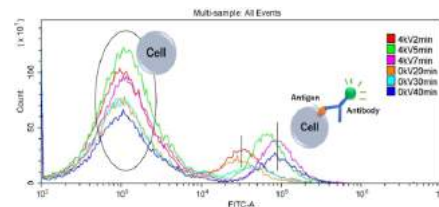


図 8 液の微量化についての測定結果

電界攪拌を用いた液の微量化に関する実験条件を表 2 に示す。細胞液を  $100\mu\text{L}$  から  $1/10$  の  $10\mu\text{L}$ 、抗体液を  $10\mu\text{L}$  の  $1/20$  の  $0.5\mu\text{L}$  とした。図 8 に測定結果を示す。この結果から静置時間 40 分と電界攪拌時間 7 分および静置時間 10 分と電界攪拌時間 2 分で蛍光強度がほぼ同様であることがわかる。ゆえに、抗原抗体反応時間が 6~10 倍迅速化されていることがわかる。液量の微量化によって見かけの濃度が高くなり、併せて電界攪拌を用いることにより抗原抗体反応の迅速化についてフローサイトメーターを用いて検証出来た。

## 3. 電界攪拌技術を培養細胞に導入

細胞培養はシャーレを恒温、恒  $\text{CO}_2$  濃度のインキュベーションチャンバー内にて設置する必要があり、その中で電界攪拌可能な比較的コンパクトなセットアップを構築し、電界攪拌が行える条件検討を行なった。また、この実験からは再現性、簡便性、汎用性を考慮し、市販のシャーレを選定している。ヒト子宮頸がん由来の培養細胞である HeLa 細胞の培養系を構築し、電界攪拌技術を生きた細胞に導入する実験を行った。生きたヒト培養細胞に対して、48 時間以上

電界攪拌を行い、その後の細胞の様子を観察し、死細胞の割合の増減を調べた。死細胞に関してはトリパンブルーと呼ばれる死細胞を特異的に染色することが可能な染色液を用いた染色を行った。この染色により、電界攪拌依存的な死細胞率の増加があるか否かの検討を行った。結果として、48時間以上電界攪拌を行っても、培養細胞が大きな影響を受ける可能性は低いということを見出した。

また、細胞培養の工程へ導入する前に、電界攪拌技術をヒト培養細胞の免疫染色系に導入した。結果として、ヒト培養細胞の染色においても、電界攪拌技術を用いることによって染色時間を短縮することが可能であることを確認した。図9では、ヒト細胞の核に存在するDNAと結合する試薬と電界攪拌技術を組み合わせることにより、電界攪拌を反応系に施すことで、DNAを短時間でも高効率に染色することが可能であることを示している。図10において明るさの定量を行うと、電界攪拌の効果により同じ時間の染色であっても、2倍程度明るく染色することが可能であることが示唆された。

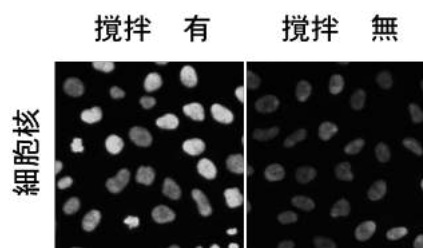


図9 細胞核

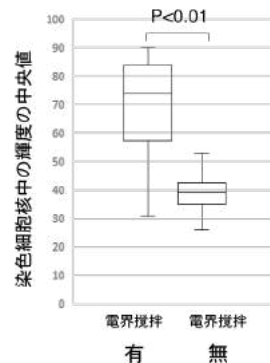


図10 染色細胞核中の輝度

#### 4. 市販シャーレ+撥水テープによる液滴底面形状制御による電界攪拌条件の検討

底面形状を変化させた時の流体の流れの様子を図11に示す。流体は純水を用いており、攪拌の様子が見えるよう粒子を滴下した。液量は1.5mL、電界条件は電圧8kV、印加周波数60Hzである。現状では、流体の底面は円形で電界攪拌を行ってきた。この場合、印加周波数の調整により比較的低速の攪拌が得られるが図中の電界印加40秒後のように複数箇所で渦流れが発生し、液滴全体の回転は出来ない。同様にティアドロップ型に底面を変化させても円底面同様に複数箇所で渦流れが発生し、液滴全体の回転は出来なかった。そこで底面を乱流のきっかけを与え易い勾玉型にして電界攪拌を行うと、図のように液滴全体が回転するような流れを観察できた。

次に、ハイスピードカメラを用いてこの勾玉型底面における電界攪拌の様子を観察した。観察結果を図12に示す。横から観察すると、液滴は上下に振動していることがわかる。また、上から任意の1つの粒子の軌跡を観察すると、液滴全体に回転流れが生じていることが確認できた。

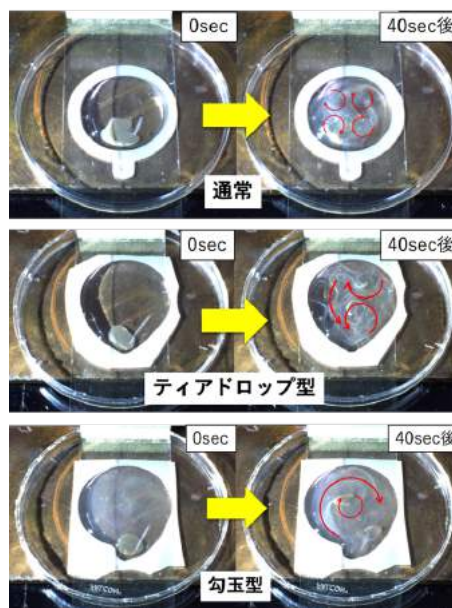


図11 底面形状を変化させた時の流体流れ

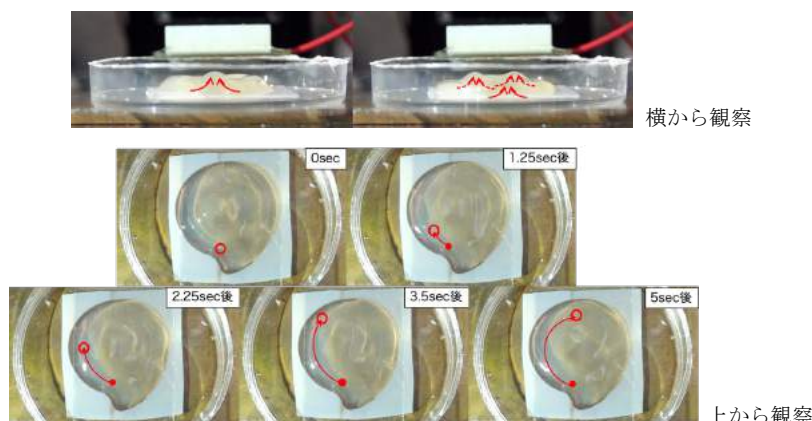


図12 ハイスピードカメラ観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 中村竜太、久住孝幸、大久保義真、南條 博、南谷佳弘、赤上陽一	4. 巻 85
2. 論文標題 電界攪拌技術を用いた抗原抗体反応の迅速メカニズムの解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 精密工学会誌	6. 最初と最後の頁 208-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2493/jjspe.85.208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 星野 育, 今井 一博, 中村 竜太, 斎藤 芳太郎, 藤嶋 悟志, 栗原 伸泰, 若松 由貴, 斎藤 元, 寺田 かおり, 佐藤 雄亮, 本山 悟, 南條 博, 赤上 陽一, 南谷 佳弘	4. 巻 84
2. 論文標題 電界非接触攪拌技術を応用した迅速免疫組織化学染色装置における液滴蒸散予防の工夫	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 精密工学会誌	6. 最初と最後の頁 383-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2493/jjspe.84.383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 mai K., Takashima S., Fujishima S., Matsuo T., Watanabe S., Nanjo H., Akagami Y., Nakamura R., Terata K., Wakita A., Sato Y., Motoyama S., Minamiya Y.	4. 巻 87
2. 論文標題 Development of a Novel One-Step Automated Rapid in situ Hybridization for Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangement Using Non-Contact Alternating-Current Electric-Field Mixing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 45-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000505631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 電界攪拌技術を用いた酵素免疫測定法の迅速化技術の開発（第三報）～電界攪拌用マイクロプレートの開発と分子標的薬検出用迅速ELISAについて～
2. 発表標題 中村竜太, 大久保義真, 久住孝幸, 赤上陽一, 林秀洋, 小松国夫, 南條博, 南谷佳弘
3. 学会等名 2018年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 電界攪拌技術を用いた酵素免疫測定法の迅速化技術の開発（第四報）～マイクロウェルプレート間における電界攪拌均一化のための最適電界印加方法の検討～
2. 発表標題 中村竜太、大久保義真、久住孝幸、南條博、南谷佳弘、赤上陽一
3. 学会等名 2019年度精密工学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発（第一報）～電界攪拌のヒト培養細胞における検討～
2. 発表標題 大久保義真、中村竜太、久住孝幸、赤上陽一
3. 学会等名 2019年度精密工学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村竜太、久住孝幸、南條博、南谷佳弘、赤上陽一
2. 発表標題 電界攪拌技術(EST)を用いた抗原抗体反応の迅速メカニズムの解明（第6報）～フローサイトメーターを用いた抗原抗体反応の定性的評価～
3. 学会等名 2017年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤上功治、中村竜太、南條博、南谷佳弘
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた迅速プロトコールを決定するための諸条件の検討（第1報 印加周波数が及ぼす液滴挙動への影響検討
3. 学会等名 2017年度精密工学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村竜太、大久保義真、久住孝幸、赤上陽一
2. 発表標題 変動電界を用いた微小液滴向け移動攪拌技術の開発（第1報）
3. 学会等名 2019年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真、中村竜太、久住孝幸、赤上陽一
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた電気穿孔法の開発（第二報）-電界攪拌技術のヒト培養細胞実験系における応用-
3. 学会等名 2019年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村竜太、大久保義真、南條博、南谷佳弘、久住孝幸、赤上陽一
2. 発表標題 術中迅速免疫組織染色を実現させる電界攪拌技術の開発
3. 学会等名 2019年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林秀洋、中村竜太、星野育、南條博、南谷佳弘、赤上陽一
2. 発表標題 電界攪拌技術をEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 法を用いた臨床検査へ応用するための装置および試薬キットの開発
3. 学会等名 2019年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩淵拓也, 中村竜太, 赤上陽一
2. 発表標題 Society 5.0: 健康長寿延伸のためのヘルステックモデル
3. 学会等名 2019年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真, 中村竜太, 久住孝幸, 赤上陽一
2. 発表標題 電界攪拌技術を用いた新規電気穿孔法の開発(第一報) ~ 電界攪拌技術のヒト培養細胞系における検討 ~
3. 学会等名 2019年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保義真, 中村竜太, 久住孝幸, 赤上陽一
2. 発表標題 電界攪拌技術を適用した新たな迅速酵素反応系の開発(第一報) - ヒト培養細胞系における抗原抗体反応の迅速化の検討 -
3. 学会等名 2020年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 電界攪拌を利用した透析・浸透方法、及び透析・浸透装置	発明者 秋田県、秋田大学、セルスペクト	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-015579	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 液滴移動装置及び液滴の移動方法	発明者 赤上陽一、中村竜太	権利者 秋田県
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-198243	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 反応デバイス、電界攪拌装置、及び検出方法	発明者 赤上陽一、中村竜太、南谷佳弘、南條博、林秀洋	権利者 秋田県、国立大学法人秋田大学、セルスペク
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-026697	出願年 2018年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤上 陽一  (Akagami Yoichi)  (00373217)	秋田県産業技術センター・その他部局等・所長    (81406)	