

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：81406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820027

研究課題名(和文)コンタミネーションを抑制したスターラーレス微量液滴攪拌技術の開発

研究課題名(英文)Development of stirrer-less micro droplet stirring technology with suppressed contamination

研究代表者

中村 竜太(Nakamura, Ryuta)

秋田県産業技術センター・素形材プロセス開発部・研究員

研究者番号：00634213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：電界による吸引力を用いてnLから μ Lオーダーの液滴を温度上昇無く、かつ非接触(スターラーレス)で簡便に攪拌する電界攪拌技術を開発している。本研究期間内では、基本的な攪拌の挙動観察を行い、本攪拌の特徴を、印加電圧、印加周波数等をパラメータとして評価した。さらに、この攪拌を抗原抗体反応を迅速化させる技術として応用し、今まで出来なかった手術中がんの特性を把握可能な免疫組織染色を可能にした。そして抗原抗体反応の迅速化メカニズムを検討し、攪拌により抗原と抗体との接触頻度が高まること、電界印加で液中の抗体が分散することによって抗原抗体反応が迅速化するという2つのメカニズムについて実験的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We are developing "electric field stirring technology (EST)" to simply stir micro droplet using attractive force by electric field. The technology can stir without temperature rise and without stirrer. In this research period, basic behavior of stirring behavior was observed, and the characteristics of this stirring technique were evaluated using applied voltage, applied frequency, etc. as parameters. Furthermore, this stirring was applied as a technology to accelerate the antigen-antibody reaction, and immunohistochemical staining that enables us to grasp the characteristics of cancer during surgery that was impossible until now. And we obtained that it has the mechanism which a reaction time of an immunohistochemical staining is shorten because antigen and antibody improve to increase the frequencies of contact and antibody disperses under EST compared with conventional method.

研究分野：機械工学

キーワード：攪拌 電界 非接触 免疫組織染色 医工連携 抗原抗体反応 分散

1. 研究開始当初の背景

超精密加工技術の進展を医療技術に応用する動きが加速しており、その中で微量液滴の撈拌技術が注目されている。液滴量を減らすことによって、見かけ上の濃度が向上し、被撈拌物質同士の移動距離が短くなり、反応スループットの向上が期待される。医療検査分野においては、被検者から採取するサンプルも微量で済むようになり、被検者の低侵襲な医療検査も実現可能となる。また、微量にすることによって溶液のランニングコストや廃液の低減が可能となる。

しかし、微量液滴の撈拌の問題点として、微量液滴が乱流を生じ難いことは、レイノルズ数 Re における液滴が接する界面断面積に依存することからも示唆される。また、微量液滴を用いると、液滴の表面張力が支配的となり、既存の撈拌技術では液滴内部の撈拌が不十分であることが課題である。

2. 研究の目的

本研究は、秋田県が独自に開発している電界砥粒制御技術を応用し、微量液滴に電界を与えることで、介在物無しに非接触に撈拌を可能とする革新的な撈拌技術（電界撈拌技術）を開発し、さらにこの撈拌技術を先端的医療検査技術に適応し、医療分野への貢献を目指す。

3. 研究の方法

まずは、様々な撈拌条件に対応できる交流高電場印加液滴挙動観察装置を開発し、この装置を使用して電場を印加した時の液滴挙動をマクロ・ミクロの視点から解析し、微量液滴の電場や印加周波数等による反応挙動を調査する。

次に、本撈拌技術によりなぜ抗原抗体反応が迅速化するかをそのメカニズム解明を行う。得られた知見をもとに、さらに抗原抗体反応等を加速させるような電極の開発を行う。

そして新たな医療技術へ応用できるかを検討する。

4. 研究成果

新たな交流高電場印加液滴挙動観察装置を製作した。本装置の上電極はITO(透明電極膜付)ガラスを用いることによって上部からも液滴挙動が観察できる装置である。従来用いていた簡易的なシステムを大幅に改良し、様々な動作、撈拌環境に対応した装置であり、下電極部分を左右運動や円弧運動を自動制御出来る装置であり、かつ温度コントロールユニットが搭載され、撈拌環境も制御できる装置である。装置写真を図1に示す。

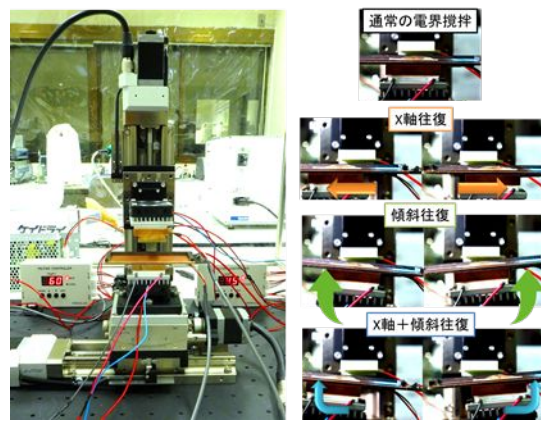


図1 装置写真

本装置を用いて電界印加による微量液滴の基本的な挙動観察、溶液内部の挙動観察を行い、印加電圧や印加周波数をパラメータとして、定量的に電界撈拌技術の特徴を明らかにした。具体的には、動力計を用いて、電界印加により発生する力を測定し、解析した。また、電界印加によって液滴が最大の振幅を示す共振周波数について、液量と液滴底面の直径の観点から検討した。さらに、本撈拌が液温度に及ぼす影響を調査した。その結果として、電界強度は吸引力の大きさと比例関係にある。一方、印加周波数を変化させても、吸引力に与える影響は低いことを明らかにした。印加電圧と吸引力の関係を図2に示し、印加周波数と吸引力の関係を図3に示す。また、液滴が共振する周波数については、液滴重量が軽い微量液滴ほど、共振周波数が高くなり、液滴が上下する振動特性に優れていることを明らかにした。印加周波数と共振周波数の関係を図4に示す。従来、微量液滴では乱流を生じさせ難いということであったが、この結果より、電界撈拌技術においては液滴重量が軽い少量の液滴ほど、共振周波数は高くなり、液滴が上下する振動特性・撈拌性に優れていることを明らかにした。また温度特性については、液滴温度の上昇は小さく、室温で使用する限りタンパク質や組織の変性の恐れは極めて低いということがわかった。蛍光式光ファイバー温度計で測定した電界撈拌中の液温を図5に示す。

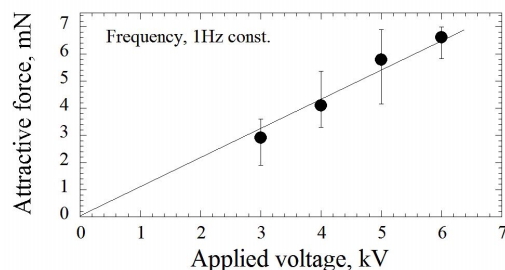


図2 印加電圧と吸引力の関係

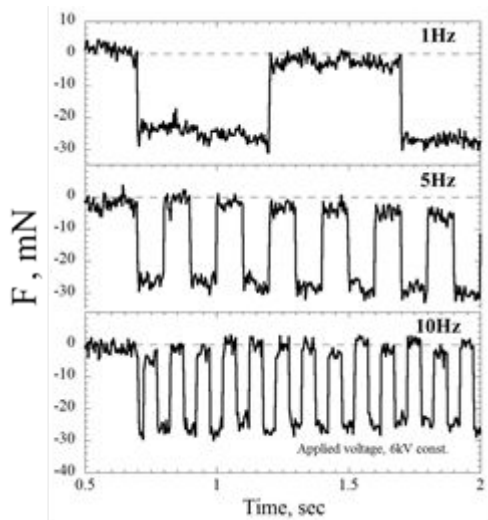


図3 印加周波数と吸引力の関係

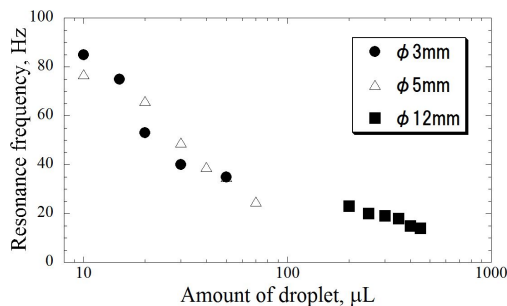


図4 印加周波数と共振周波数の関係

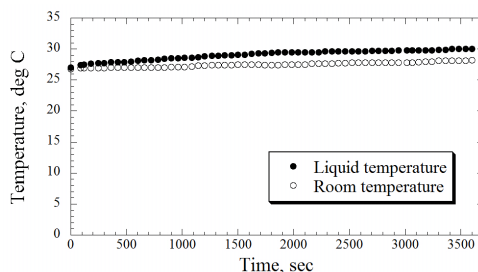


図5 電界攪拌中の液温

本攪拌技術を医療技術へ適用し、手術中に迅速免疫染色を可能にしている。本電界攪拌法による免疫組織染色の迅速メカニズムの解明を行った。抗体模擬粒子や実際の蛍光たんぱく質抗体を用いて挙動観察実験を行い、攪拌により抗原と抗体との接触頻度が高まることを明らかにした。印加電圧と蛍光たんぱく質抗体の移動速度の関係を図6に示す。さらに、電界印加がタンパク質である抗体に直接及ぼす影響について調査し、電界印加後のゼータ電位の変化より、電界印加で液中の抗体が分散することによって抗原抗体反応が迅速化し、染色品位が向上することを実験的に明らかにすることが出来た。印加電圧とゼータ電位との関係を図7に示す

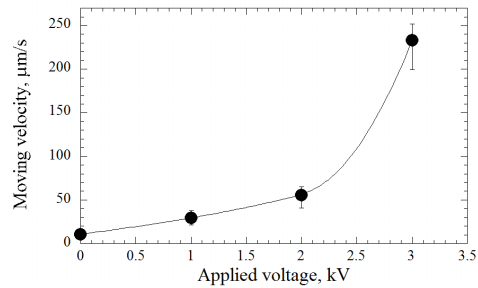


図6 印加電圧と蛍光抗体の移動速度の関係

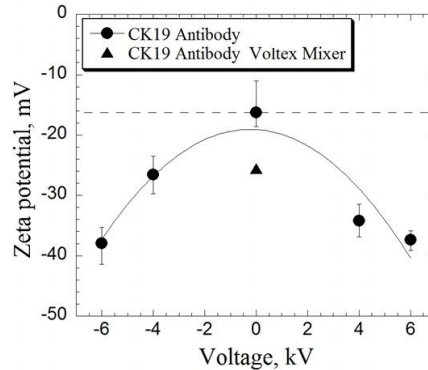


図7 印加電圧とゼータ電位との関係

抗原抗体反応が更なる迅速化のための電界集中型電極の検討を行った。電極を多極化し電界を集中させることで、液滴ピーク箇所が増加し、それに伴って抗体の攪拌に伴う運動移動距離が短くなると考えられる。さらに、液滴の領域は電界凸部の数だけ独立し、分けられることから、上電極への液の接触が抑制されるので、電極間距離は狭められ、電界強度も高められる。結果として、攪拌効率が良くなり免疫染色の品位は向上した。電界集中電極による攪拌の様子を図8に示す。

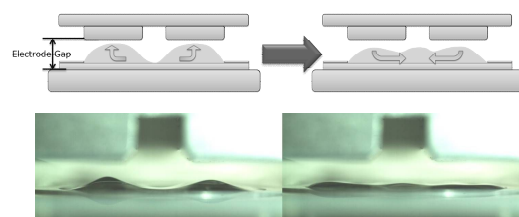


図8 電界集中電極による攪拌の様子

大きな組織に対応するべく攪拌領域の拡大に向けた電界集中型電極形状を検討した。攪拌領域を拡大すると、従来の平行電極では攪拌は困難となる。そこで今回作成した平板を含む7種類の電界集中電極を用いて、ナノビーズの攪拌度合いを評価した。スライドガラス全面に対するナノビーズの拡散領域割合を数値化したグラフを図9に示す。結果として、電界を4か所に集中させる凸部を有する電極で攪拌効率が良いことがわかった。

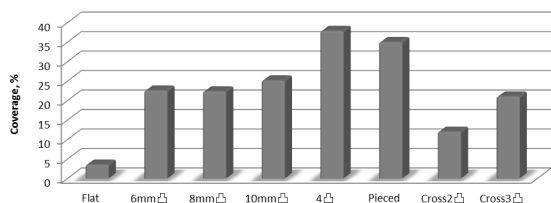


図9 ナノビーズの被覆率

電界攪拌技術のさらなる展開として In situ ハイブリダイゼーション (ISH) の迅速化へ応用するため検討を行った。従来方法では、通常 7 時間から 18 時間を要する検体遺伝子と既知のプロブ DNA が結合するハイブリダイゼーション工程に電界攪拌技術を応用し 3 時間に短縮する技術を開発した。ここで今回開発したハイブリダイゼーション工程にて、長時間に渡る電界攪拌において試薬の蒸散という課題が顕在化した。そこでこの課題を解決する蒸散抑制剤の選定やその粘度の最適化に関する検討を行った。蒸散量とカバー剤として選定した流動パラフィンの粘度の関係を図 10 に示す。この結果から、低粘度である程、蒸散量が抑制されることを明らかにした。また、粘度が異なる流動パラフィンでカバーした液滴に電界攪拌を行い挙動観察から、液滴の上下する振幅を解析した。解析結果を図 11 に示す。図に示されるように、流動パラフィンの粘度が低いほど振幅が大きいことがわかった。これらの検討により、低粘度の流動パラフィンを用いることで高速ハイブリダイゼーションを可能とする蒸散抑制技術を開発した。

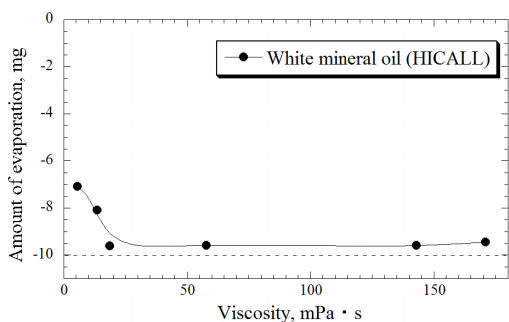


図 10 蒸散量と流動パラフィンの粘度の関係

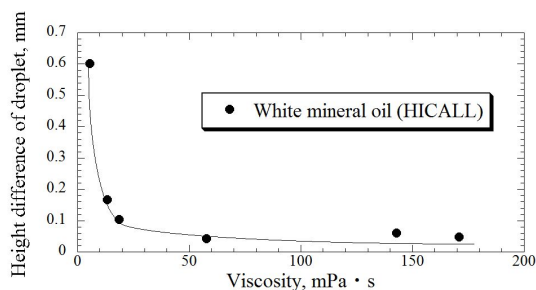


図 11 流動パラフィン粘度と液滴振幅の関係

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

中村 竜太, 加賀谷 昌美, 赤上 陽一, 池田 洋, 久住 孝幸, 佐藤 安弘, 南谷 佳弘, 南條 博, 電界砥粒制御技術を応用した電界非接触微粒子攪拌技術の開発, 精密工学会誌, Vol. 80, No. 9 (2014) pp. 862-866. 査読有

Shirasawa Hiromitsu, Kumagai Jin, Sato Emiko, Kabashima Katsuya, Kumazawa Yukiyo, Sato Wataru, Miura Hiroshi, Nakamura Ryuta, Nanjo Hiroshi, Minamiya Yoshihiro, Akagami Yoichi & Terada Yukihiko, Novel method for immunofluorescence staining of mammalian eggs using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets, Scientific Reports Sci. Rep. 5, 15371; doi: 10.1038/srep15371 (2015). 査読有

Yoshitaro Saito, Kazuhiro Imai, Ryuta Nakamura, Hiroshi Nanjo, Kaori Terata, Hayato Konno, Yoichi Akagami & Yoshihiro Minamiya, Novel method for rapid in-situ hybridization of HER2 using non-contact alternating-current electric-field mixing, Scientific Reports 6, Article number: 30034

doi: 10.1038/srep30034 (2016) 査読有

[学会発表](計 15 件)

中村 竜太, 電界砥粒制御技術が拓く新たな医療機器産業への展開, 型技術者会議 2014 (東京都大田区) (招待講演) H26.6.18

中村 竜太, 秋田発! 電界非接触攪拌技術が拓く新たな医療機器産業への展開, 第 5 回医工融合技術を生かした医療機器の創製に関する研究会 (金沢工業大学) (招待講演) H26.9.2

中村 竜太, 加賀谷 昌美, 赤上 陽一, 池田 洋, 久住 孝幸, 南谷 佳弘, 南條 博, 電界砥粒制御技術を応用した電界非接触微粒子攪拌技術の開発, 2014 年度砥粒加工学会 (岩手大学) H26.9.13

中村 竜太, 加賀谷 昌美, 赤上 陽一, 池田 洋, 久住 孝幸, 南谷 佳弘, 南條 博, 電界砥粒制御技術を応用した電界非接触微粒子攪拌装置の開発, 2014 年度精密工学会秋季大会 (鳥取大学) H26.9.16

中村 竜太, 加賀谷 昌美, 赤上 陽一, 久住 孝幸, 池田 洋, 佐藤 安弘, 南谷 佳宏, 小松 国夫, 電界非接触攪拌技術を応用した酵素免疫測定法の迅速化技術に関する研究 ~ 電界非接触攪拌用基板の開発

とその表面性状について～，トライボロジー会議 2014 秋 盛岡（岩手県盛岡市）H26.11.5

中村竜太，加賀谷昌美，赤上陽一，池田洋，久住孝幸，南谷佳弘，南條博，電界砥粒制御技術を応用した微粒子における電界非接触攪拌技術に関する研究，第10回 生産加工・工作機械部門講演会（徳島大学）H26.11.15

中村竜太，加賀谷昌美，赤上陽一，久住孝幸，池田洋，南谷佳弘，小松国夫，電界非接触攪拌技術を用いた酵素免疫測定法の迅速化技術の開発（第二報）～電界非接触攪拌用基板の開発とその表面性状について～，2015年度精密工学会春季大会（東洋大学）H26.3.19

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，南谷佳弘，加賀谷昌美，南條博，電界非接触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（第3報）～タンパク質の分子量の違いにおける抗体移動速度について～，2015年度精密工学会秋季大会（東北大学）H27.9.4

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，南谷佳弘，南條博，電界非接触攪拌技術を用いた抗原抗体反応の迅速化とそのメカニズムに関する研究，日本機械学会 2015年度年次大会（北海道大学）H27.9.15

赤上陽一，久住孝幸，中村竜太，電界砥粒制御技術を用いた表面創成技術～研磨用技術から医工連携へ～ 理研シンポジウム，第18回「トライボコーティングの現状と将来」-Green tribo-coating 技術及び医工連携への取り組み- H28.2.26（招待講演）

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，南谷佳弘，南條博，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（第4報）～迅速免疫組織染色技術の温度依存性について～，2016年度精密工学会春季大会（東京理科大学）H28.3.15

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，南谷佳弘，南條博，術中迅速免疫組織染色を可能にする電界攪拌技術の開発，LIFE2016（東北大学）H28.9.4

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，南谷佳弘，南條博，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5報）～電界集中電極による攪拌の高効率化～，2016年度精密工学会秋季大会学術講演会（茨城大学）H28.9.6

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，南谷佳弘，南條博，電界砥粒制御技術を応用した電界攪拌技術の開発（第2報）～攪拌の高効率化のための電極形状の検討～，第11回 生産加工・工作機械部門講演会（名古屋大学）H28.10.22

中村竜太，赤上陽一，久住孝幸，齋藤芳太郎，南谷佳弘，南條博電界攪拌技術を迅速 In situ ハイブリダイゼーションへ

応用するための試薬蒸散抑制に関する研究，2016年度精密工学会春季大会（慶応義塾大学）H29.3.14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 竜太（NAKAMURA RYUTA）

秋田県産業技術センター 素形材プロ

セス開発部 研究員

研究者番号：00634213