

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：81406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K03845

研究課題名（和文）電界攪拌技術による感染症検査へ適応可能な迅速酵素結合免疫吸着システムの構築

研究課題名（英文）Construction of rapid enzyme linked immunosorbent assay for infectious disease testing using electric field mixing (EFM)

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、はじめに電界攪拌可能なELISA法用の基板を選定した。吸光度のばらつきが少ないガラスプレートを用いることで、電界攪拌を可能とし、抗原抗体反応と発色工程に電界攪拌を導入することにより、抗原抗体反応、酵素基質反応の迅速化することが確認できた。さらに現状の吸光度測定に替わる光質センサを用いた彩度測定によって、微量な液量でも評価可能であることが確認でき、静置法と比較して、彩度が向上し、かつばらつきが小さいことも確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて、電界攪拌が可能な最適な基板を選定し、ELISA法へ電界攪拌技術を導入可能とした。これにより、従来長時間を要する定量検査であるELISA法の迅速化と使用検体量の削減可能性を提案できた。研究開始時には猛威を奮っていたCOVID-19をはじめ、インフルエンザ、風疹等様々な感染症抗体検査へ応用可能な日本発の技術で学術的かつ社会的貢献を実現可能だと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we selected a substrate for the ELISA method that can be stirred by electric field. By using a glass plate with little variation in absorbance, electric field mixing was enabled, and by introducing electric field mixing into the antigen-antibody reaction and color development process, it was confirmed that the antigen-antibody reaction and enzyme-substrate reaction could be accelerated. Furthermore, we confirmed that even a small amount of liquid can be evaluated by measuring saturation using a light quality sensor instead of the current absorbance measurement. It was also confirmed that the saturation was improved and the variation was smaller compared to the static method.

研究分野：機械工学

キーワード：攪拌 電界 電界攪拌 抗原抗体反応 ELISA 酵素基質反応 光質センサ

1. 研究開始当初の背景

2020年初頭から、現在に至るまでも世界的に猛威を振るっている COVID-19(新型コロナウイルス感染症)は、SARS-CoV-2 ウイルスによって引き起こされる感染性の高い呼吸器疾患である。2020年10月5日現在までに、世界で確認された感染者数は約3500万人、死亡者数は約100万人に達している。

COVID-19の主な検査は、現在感染しているかを調べる PCR 検査と抗原検査、過去に感染したかを調べる抗体検査があり、それぞれのステージや症状に応じて適切な検査が行われている。COVID-19は高齢者や既往歴のある方が重症化するリスクが高いと言われている一方で、症状が軽い、または自覚症状がほとんどない場合も多いとされ、日本における実際の感染者数はよくわかっていない。現在、研究者や公衆衛生当局は、ウイルスにさらされた人々を統計学的に解析するような、どれだけの人に免疫があるかを広く調査するための抗体検査の臨床データ取得に着手している。

2. 研究の目的

COVID-19(新型コロナウイルス感染症)は、SARS-CoV-2 ウイルスによって引き起こされる感染性の高い呼吸器疾患である。2023年5月8日に感染症法上5類に移行され、これまでのような厳しい移動制限やイベントの制限、学校や施設の臨時休業などは行われなくなったが、アフターコロナにおいても、感染対策上の必要性に加え、経済的・社会的合理性、持続可能性の観点も考慮し、今後も基本的な感染対策行われて行くと考えられる。COVID-19の主な検査は、現在感染しているかを調べる PCR 検査と抗原検査、過去に感染したかを調べる抗体検査があり、それぞれのステージや症状に応じて適切な検査が行われている。その中で、抗体検査は、既感染者を検出可能であり、集団内における感染症の発生状況調査に適しており、疫学調査の有力なツールとして考えられている。

抗体検査の特徴についてそれぞれ長所短所が存在するが、本研究においては、定量検査である酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)に着目した。一般的な ELISA 工程を図1に示す。ELISAとは抗体を使用した免疫学的測定法の一つであり、抗体が抗原に特異的に結合する抗原抗体反応の原理を用いたものである。反応後に吸光度や化学発光量を測定し、既知濃度の標準物質から検量線を作成することにより、検体中の分析対象物質の定量が可能で、検出感度が高く、かつ多検体の処理が可能である分析手法である。しかしながら、ELISAは抗原抗体反応に時間を要するため、一般的に長時間必要で、迅速な検査には対応できないのが課題である。そこで、本研究では秋田県独自技術である電界攪拌技術を用いてこの ELISA の迅速化を目指す。

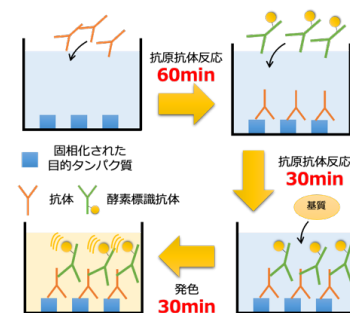


Fig. 1 Enzyme linked immunosorbent assay

3. 研究の方法

3.1 電界攪拌技術を用いた ELISA 法におけるプレートの検討

現状 ELISA において、一般的に用いられている 96 ウェルプレート(主にポリスチレン製)はこのままだと電界攪拌が行えない。そこで、電界攪拌に最適なプレート材の検討を行なった。検討した材料として、従来 96 ウェルプレート(コーニング(株)製)、市販のポリスチレン(以下 PS)プレート(ケニス(株)製)、スライドガラスプレート(松浪硝子工業(株)製)の3種類とした。PS プレート、ガラスプレートはそれぞれ撥水性テープ、撥水性印刷によってドーム型の液滴を形成した。撥水性印刷による液滴の様子を図2に示す。図の液量は 40 μL である。このようなドーム型の液滴形状にすることによって、電界攪拌技術が可能となる。



Fig.2 Image of droplet (40 μL)

電界攪拌技術の挙動を図3に示す。ドーム形状の液滴に電場を印加すると液滴に吸引力が作用し、上電極側に吸引、電場の変化により液滴は上下に運動する。このように、本攪拌技術はスターラー等を用いないコンタミレスな攪拌であり、また液温の上昇が生じないという大きな特徴を有する。この攪拌技術を ELISA 工程の最も時間の要する抗原抗体反



Fig.3 Image of electric field mixing

応工程へ導入する。

96 ウェルプレート (ハーフサイズ底面直径 4mm)、PS プレート、ガラスプレートの 3 種についてバイオ・ラッド社製 ELISA イムノ Explorer キットを用いた ELISA による吸光度評価を行った。ELISA プロトコルを表 1 に示す。液滴を載せる底面積はすべて ϕ 4mm である。ELISA 法は通常 50 から 100 μ L の液量を用いるが、本実験では 20 μ L とした。結果を図 4 に示す。結果として、静置法で比べると、吸光度はガラス=96 ウェルプレート>PS プレートの順となった。ただ、微量の条件下では、96 ウェルにおいて壁面への付着によるばらつきがかなり大きく、今回の条件では、吸光度のばらつきの少ないガラス製プレートが最適であることを確認した。

次に、ガラスプレートにおいて、液滴を載せるガラス面の底面積と吸光度の関係について検討した。結果を図 5 に示す。結果として、底面積が大きくなれば吸光度も大きくなる相関関係があることを確認した。

Table 1 ELISA protocol

	液量 μ L	時間 min
抗原定着	20	5
洗浄	—	
一次抗体反応	20	5
洗浄	—	
二次抗体反応	20	5
洗浄	—	
発色液	20	5
96穴プレートへ移し替え		
反応停止剤	20	-
プレートリーダー測定	波長450nm	

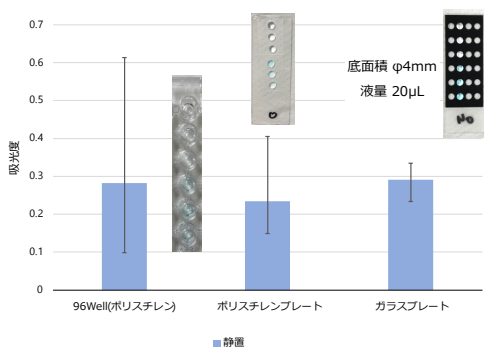


Fig.4 Plate comparison by absorbance evaluation

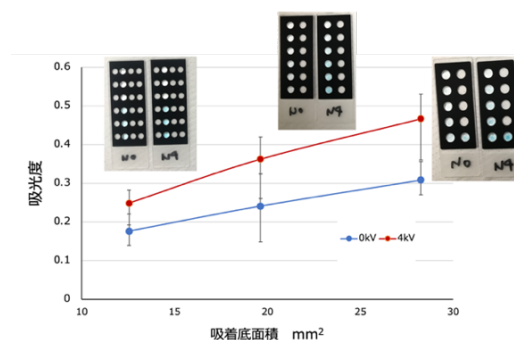


Fig. 5 Relationship between bottom area and absorbance

3.2 電界攪拌技術を用いた ELISA 法

前項で示した図 5 において、一次抗体反応、二次抗体反応の 2 つの工程で電界攪拌を行った。印加周波数は底面積 ϕ 4mm と ϕ 5mm が 50Hz。底面積 ϕ 6mm は 40Hz である。電界攪拌を行うことによって、吸光度は静置と比較して約 1.2 から 1.5 倍向上することを確認した。

次に、電界攪拌における印加周波数について検討した。底面積 ϕ 6mm のガラスを用いた。結果を図 6 に示す。全ての印加周波数において、電界攪拌により吸光度が静置状態と比べて向上していることがわかり、液滴の挙動が一番大きい周波数である 40Hz において約 3.2 倍向上する結果となった。

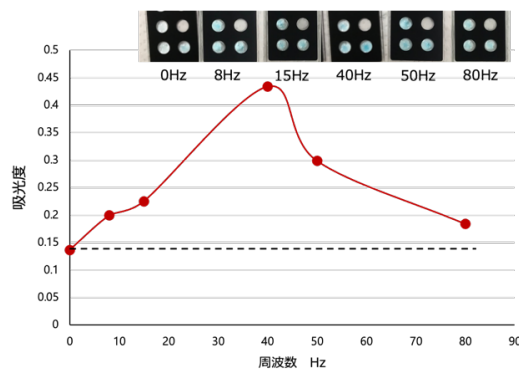


Fig. 6 Relationship between frequency and absorbance

3.3 ELISA 法の発色工程の In-situ 観察

前項では抗原抗体反応工程に電界攪拌技術を導入した。次に、反応の機序が酵素反応である発色工程も電界攪拌技術の導入を検討した。

まず初めに、ELISA 工程中の発色工程の In-situ 観察を行った。電界攪拌用電極として、ITO 透明電極膜付きガラスを用い、上からと横から 2 台のカメラで発色の様子を動画で撮影した。評価用の試薬とは 3.1 項と同様のバイオ・ラッド社製 ELISA イムノ Explorer キットを用いた。

発色反応 5 分後の発色の写真を図 7 に示す。この写真から発色工程中に電界攪拌を行うことによって、液滴において青色発色の均一化を上部カメラによる観察で確認した。

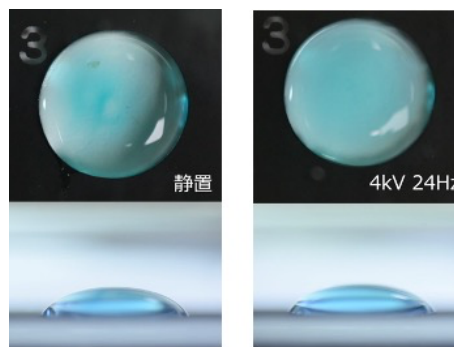


Fig. 7 State of color development after 5 minutes (Left: Static method, Right: EFM method)

3.4 発色工程における電界攪拌技術の導入

発色工程に電界攪拌を導入した迅速 ELISA 実験を行った。検討した 4 種類のプロトコルを表 2 に示す。①は全て静置、②は発色工程のみ電界攪拌、③は抗原抗体反応を電界攪拌、発色は静置、④は全て電界攪拌である。

発色工程の時間と吸光度の関係を図 8 に示す。この図から発色工程でも電界攪拌を行うことにより、発色工程の迅速化と高い発色（吸光度）を得ることが確認できる。また、全て静置で行うプロトコル①と全て電界攪拌を行うプロトコル④を比較すると、吸光度は最大約 2.6 倍に向上することがわかった。発色工程の機序である酵素反応に対しても、電界攪拌により反応が活性化されているのではないかと考えられる。

Table 2 ELISA protocol

	液量 μL	時間 min	①	②	③	④
抗原定着	40	5				
洗浄	—					
一次抗体反応 100ng/mL	40	5	静置	静置	電界	電界
洗浄	—					
二次抗体反応	40	5	静置	静置	電界	電界
洗浄	—					
TMB	40	5	静置	電界	静置	電界
96穴プレートへ移し替え						
プレートリーダー測定 (波長655nm)						

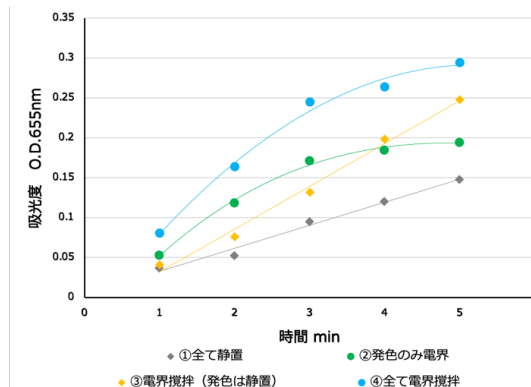


Fig. 8 Relationship between frequency and absorbance

3.5 クイック光質センサを用いた色調評価

ELISA 法には多くの検出法があり、酵素の反応物が水溶性である場合、一般的に、比色定量、蛍光、化学発光がよく利用されている。発色反応した液を分光光度計等の専用機器によって吸光度等が測定され、数値化される。この検出方法においては、測定に関して、ある程度の液量や、それぞれの色に合わせた検出フィルターも必要となる課題がある。

それら従来の吸光度測定に替わる方法として、今回株式会社小滝電機製作所で独自に開発したクイック光質センサを用い、吸光度ではなく色調によって評価する方法を今回新たに提案する。

クイック光質センサによる測定原理を図 9 に示す。LED 照明からの拡散光をレンズによってコリメート光とし、スライドガラスを通し、発色した検体液の色調をセンサによって検出する。

開発した装置を用いて、従来の吸光度測定方法との比較評価を行った。本実験では、クイック光質センサにより RGB の 3 成分を計測し、その測定結果から彩度 S を算出し、それを用いて評価した。

96 ウェルを用いた吸光度測定とスライドガラスを用いた色調測定における相関係数を図 10 に示す。液量が小さくなれば、吸光度測定 (X 軸) において、吸光度のダイナミックレンジが小さくなるが、光質センサを用いた彩度評価 (Y 軸) においては、15 μL になっても彩度のダイナミックレンジは変化しない。この結果から、微量でも計測可能であることが本方法のメリットであることを確認した。

次に、従来の静置方法による ELISA 法と電界攪拌技術を導入した ELISA 法の比較を行った。液量は 15 μL である。ELISA 後の発色写真及び抗体濃度と彩度で評

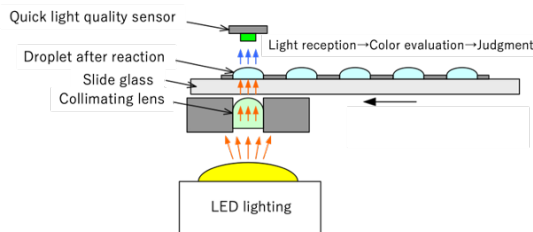


Fig. 9 Relationship between frequency and absorbance

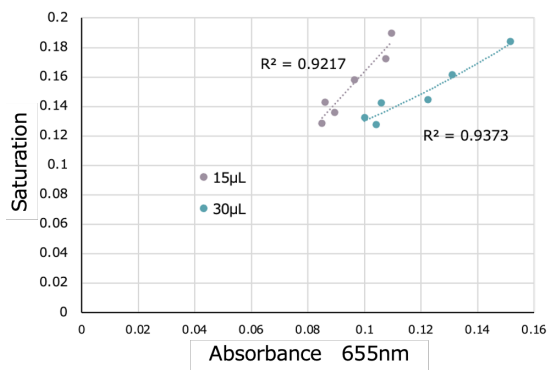


Fig. 10 Correlation coefficient in absorbance and color tune measurement

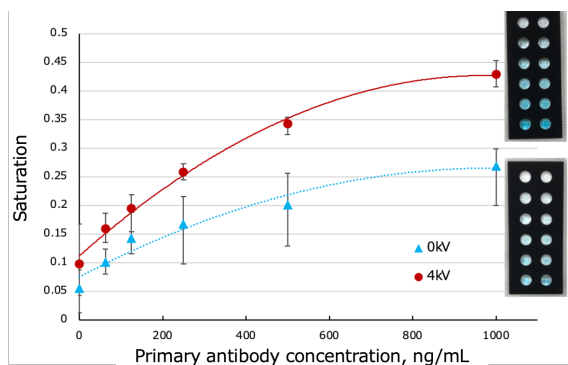


Fig. 11 Relationship between frequency and absorbance

価した結果を図 11 に示す。この結果から電界攪拌により彩度が約 1.4 倍向上することが確認でき、また、それぞれでばらつきを評価した結果、電界攪拌を用いた ELISA では、静置法に比較してばらつきが小さいことも確認できた。

4. 研究成果

3.1 項と 3.2 項の結果から、電界攪拌可能な ELISA 用のプレート材 3 種類を比較し、吸光度のばらつきの少ないガラスプレートが最適であることを確認し、液滴を滴下するそのプレートの底面積が大きくなれば吸光度も大きくなる相関関係があることがわかった。さらに、電界攪拌により吸光度が静置状態と比べて向上することを確認し、液滴の挙動が一番大きい印加周波数において約 3.2 倍する結果となった。

3.3 項、3.4 項の結果として、ELISA における発色工程の In-situ 観察および 4 種の ELISA プロトコール検討から、発色工程に電界攪拌を適用することにより、発色反応の偏在が均一化すること、さらに酵素基質反応の迅速化という 2 つの効果が期待できるということが確認できた。

上記の発色反応の偏在が均一化する効果を活かし、現状の吸光度測定に替わる新たな試みとして、3.5 項において光質センサを用いた色測定による評価を行った。結果として、微量な液量でも評価可能であることが確認できた。電界攪拌 ELISA 法により、静置法と比較して、彩度が約 1.4 倍向上し、かつばらつきが小さいことも確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 中村 竜太、大久保 義真、久住 孝幸	4. 巻 48
2. 論文標題 微小液滴攪拌を可能とする電界攪拌技術の開発とその応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 公益社団法人日本化学会 コロイドおよび界面化学部会 C & I Commun	6. 最初と最後の頁 5-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.57534/cicommun.48.1_2	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 電界攪拌技術による感染症検査へ適応可能な迅速酵素免疫測定法の開発
3. 学会等名 2022年度精密工学会秋季大会
4. 発表年 2022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自動迅速免疫染色法の開発（第二報） ヒト培養細胞における自動洗浄系の検討
3. 学会等名 2021年度精密工学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 竜太、大久保 義真、久住 孝幸
2. 発表標題 電界攪拌技術による感染症検査へ適応可能な迅速酵素免疫測定法の開発（第2報）-発色（酵素反応）工程における電界攪拌技術の導入-
3. 学会等名 2023年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村竜太他 79名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 532
3. 書名 攪拌技術とスケールアップ、シミュレーションの活用	

〔産業財産権〕

〔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	大久保 義真 (Okubo Yoshinobu) (30826532)	秋田県産業技術センター・先進プロセス開発部・研究員 (81406)	
研究 分担者	赤上 陽一 (Akagami Yoichi) (00373217)	秋田県産業技術センター・企画事業部・専門員 (81406)	削除済

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------