

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

The development of electric field stirring technology (EST) that allows rapid intraoperative immunohistochemical staining

○ 中村竜太，赤上陽一，久住孝幸（秋田産業技術センター）

南谷佳弘（秋田大学大学院医学系研究科） 南條博（秋田大学医学部附属病院）

Ryuta NAKAMURA, Yoichi AKAGAMI, Takayuki KUSUMI, Akita Industrial Technology Center
Yoshihiro MINAMIYA, Akita University Graduate School of Medicine
Hiroshi NANJO, Akita University Hospital

Abstract: We aim to develop innovative stirring technology (electric field stirring technique (EST)) applied abrasive control technique with AC electric field. This technique allows for stirring without contact by applying AC electric field to droplets. This technique was applied to intraoperative immunohistochemical staining. Under EST showed antigen-antibody reaction time in immunohistochemical staining can be shortened from 90 minutes of conventional method to 10 minutes. In this study, EST examined the mechanism which makes antigen-antibody reaction of an immunohistochemical staining quicker. As a result, we obtained that it has the mechanism which a reaction time of an immunohistochemical staining is shorten because antigens and antibodies improve to increase the frequencies of contact, and further antibodies disperse and becomes easy to react to antigens under E.N.S. compared with conventional method.

Key Words: immunohistochemical staining, Pathology, electric field stirring technique, antigen-antibody reaction, Intraoperative pathological diagnosis

1. 緒言

1.1 がんの個別化治療に向けた術中病理診断（医療ニーズ）

近年，がん治療は進行度や悪性度に応じた最適な個別化治療を行う傾向にあり，その際に用いられる術中病理診断は現状，HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色が主流である．病理医は，この方法を用いて染色した組織中の細胞の核内構造や細胞形態を観察して診断している．しかし HE 染色は，診断には限界があり，2mm 以下とされる微小な転移を見逃す可能性が指摘されている¹⁾．このリンパ節の微小転移を見逃さずに診断するためには免疫組織染色が有効であることが知られている．

本染色法の機序は抗原抗体反応という極めて特異な免疫反応を利用して，発色させることで，組織や細胞内に抗原性を有する物質の局在性（存在場所）を明らかにする²⁾．

この染色方法により，たとえば微小転移の検出確度を高め，術中診断の精度向上が期待される．また，手術中に確定診断が下せるため，従来法では，迅速診断と手術後の確定診断とに差異が生じた場合，再手術が必要であったが，本法に依れば，一回の手術で済み患者の予後の QOL 向上や医療費削減が可能となる．このようなことから，術中の免疫染色が行いたいという医師からのニーズが存在する．

しかし，従来の免疫組織染色法では，スライドガラスに抗体液を滴下し，静置状態にて抗原抗体反応を行うため，抗原抗体反応はブラウン運動が支配的³⁾であり，染色に 2 時間以上を要し，術中病理診断には適用できないという問題があった．

1.2 微小量の液滴攪拌技術の開発（工学シーズ）

ナノテクノロジーの成果の一部を医療技術に応用する動きが加速しており，その中で微小量液滴の攪拌技術が注目されている⁴⁾．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，微小量にすることで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，微小量液滴の攪拌の問題点として，微小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，微小量液滴を用いると，液滴の表面張力が支配的となり，既存の振盪技術では液滴内部の攪拌が不十分になる．

そこで我々は，電界磁制御技術を応用し，微小液滴に電界を与えることで，介在物無しに非接触に攪拌を可能とする革新的な攪拌技術（電界攪拌技術）を開発した．

1.3 医療ニーズと工学シーズのマッチング

我々は，前述した医療ニーズと工学シーズのマッチングを図り，電界攪拌技術を用いて，20 分以内に免疫組織染色を可能とする電界攪拌法⁵⁾を開発し，手術中の迅速免疫染色を可能にした⁶⁾．従来静置法と電界攪拌法の染色プロトコール比較表と実際の免疫染色写真を図 1 に示す．このように 20 分以内で従来法と同等な染色品位を得られた．

本方法の特徴は，まず，非接触の攪拌であるためコンタミネーションによる汚染の心配がないことも特徴として挙げられる⁷⁾．この技術を用いることで，免疫組織染色時間の短縮化とともに抗体濃度の削減も可能となる．この技術を用いることで，免疫組織染色時間の短縮化とともに抗体濃度の削減も可能となる．

1.4 目的

本報では，電界攪拌技術の電界印加による微小液滴の挙動観察や攪拌中の液温測定を行い，電界攪拌技術の特徴を明らかにしたこと，また，電界攪拌技術を用いた免疫組織染色方法の抗原抗体反応を迅速化させるメカニズムについて，攪拌による影響と電界印加がタンパク質である抗体に直接及ぼす影響の 2 つの側面から検討したことを報告する．

Protocol of IHC	Conventional stand method	Electric field stirring technology method
Tissue fixation	10 min	2 min
Washing	5 min × 3 times	15 sec
Primary antibody	60 min	5 min
Washing	-	15 sec
Blocking	-	1 min
Washing	5 min × 3 times	15 sec
Secondary antibody	30 min	5 min
Washing	5 min × 3 times	15 sec
DAB color	5 min	2 min
Nuclear staining	1 min	1 min
Dehydration/Clearing/Mounting	2 min	2 min
Total	153 min	19 min

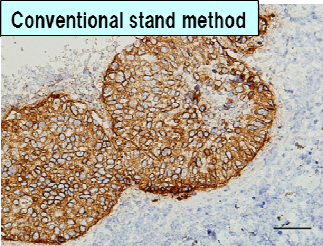
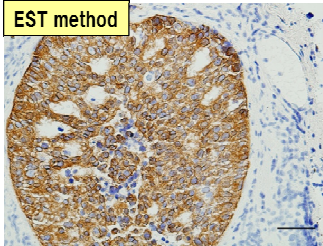
Conventional stand method	EST method
	

Fig. 1 Protocol of immunohistochemical staining

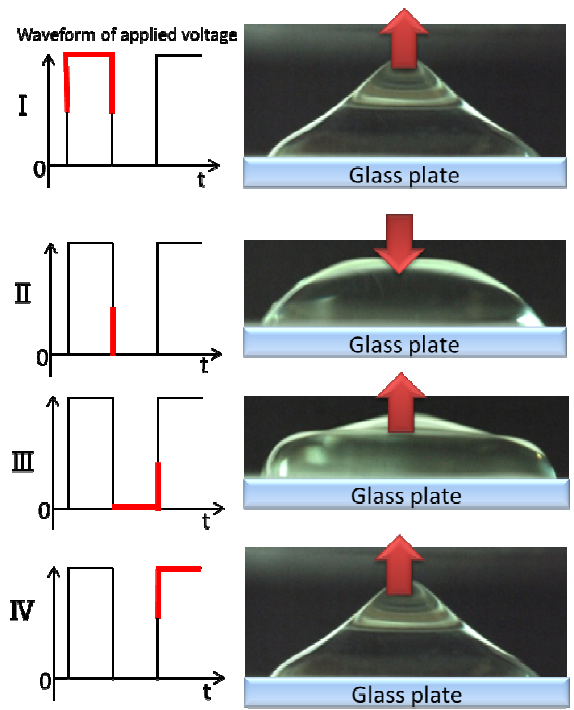


Fig. 2 Image of electric field stirring technique (EST)

2. 電界砥粒制御技術を応用した電界攪拌技術

2.1 電界攪拌技術の挙動観察

筆者らは現在までに、電界砥粒制御技術⁸⁾を開発してきた。この技術は、流体を構成する物質固有の誘電率に着目し、外部より電界を与えることで発生する吸引力を用いて、流体の配置制御を積極的に活用する技術である。この技術を応用したものが電界攪拌技術である。

印加電界波形に対応する攪拌挙動のイメージ図を図2に示す。印加する矩形波の太線部に対応する液滴の状態を右図に示す。電界が印加すると吸引力が液滴に発生し、電極に引っ張られる(I)。次に無電界にすると吸引力は無くなり、液滴は下降(II)。次に降下した液滴はガラス基板に当たり反発力によって、再び上昇する(III)。この上昇中の液滴に再度電界が印加されると、上電極側に吸引される(IV)。このような周期が存在するため、試料液量や液の粘度等ごとに最適な周波数が存在する。この吸引力のオンオフによって液滴が上下に振動し、本作用によって液滴の内容物が、スターラーなどの介在物無しに攪拌できる。

次に、時間経過における微小液滴の振幅変化と微小液滴の挙動写真を図3に示す。電界印加条件を表1に示す。この結果より、微小液滴はほぼ正弦波で振動していることがわかる。また、写真cからガラス基板に当たって液滴が反発していることがわかる。そして、このグラフの周期 T が0.048secであるので、式(1)より周波数を求めると、 f が20.8Hzとなる。ということから与えた周波数と同期して液滴が上下に振動していることがわかる。

$$f = \frac{1}{T} \quad (1)$$

ここで f は周波数 (Hz), T は周期 (sec) である。

Table 1 Experimental conditions for observation test

Electric field	AC voltage kV	3
	Frequency Hz	21
	Wave form	Square
	Electrode gap mm	4.5
Droplet	Solvent	pure water
	Amount of droplet μ L	150
	Diameter of droplet mm	12

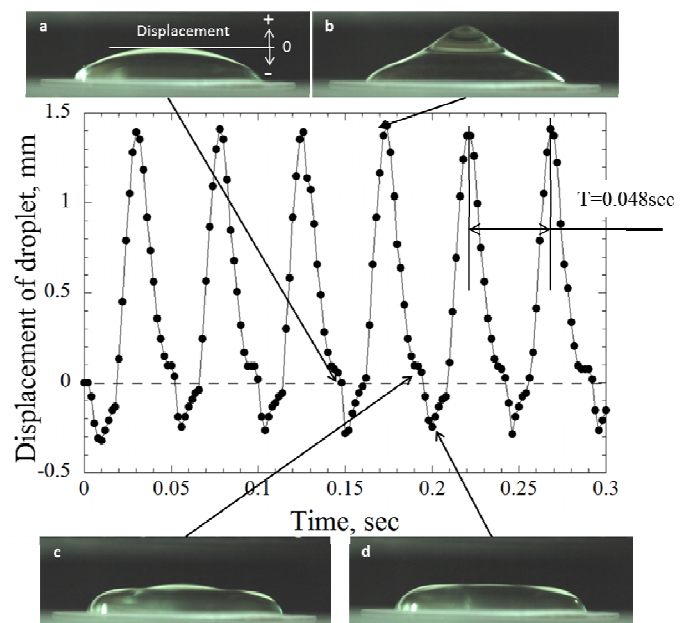


Fig. 3 Displacement and image of droplet

2.2 電界攪拌中の発熱特性

既報⁷⁾にて電界攪拌中の試料液温を非接触の放射温度計により測定し，液温の上昇は無く，室温で使用する限りタンパク質や組織の変性の恐れは全く無いということの特徴として挙げていたが，より正確な液温測定を行おうと高電圧環境下でも精度の高い液温測定が可能である蛍光式光ファイバー温度計（安立計器(株)製FL-2000）を用いて電界攪拌中の液中にプローブを挿入して液温を測定した。

電界攪拌中の温度測定条件を表2に示す。そして，1時間温度測定した結果を図4に示す。電界攪拌技術を起因とする温度上昇が無いことを再確認することができる。

Table 2 Experimental conditions for temperature measurement

Electric field	AC voltage kV	4
	Frequency Hz	12
	Wave form	Square
	Electrode gap mm	7.2
Droplet	Solvent	pure water
	Amount of droplet μL	600
	Diameter of droplet mm	20

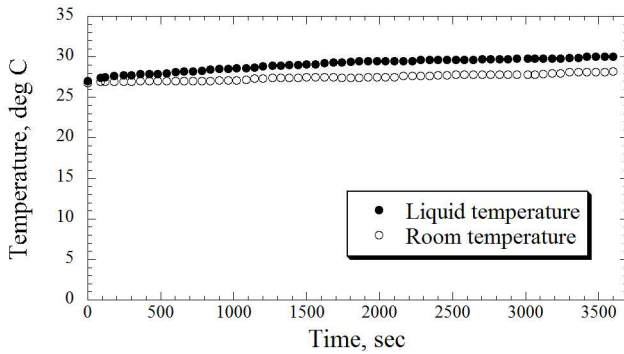


Fig. 4 Temperature rise test under EST

3. 電界攪拌法による免疫染色（抗原抗体反応）の迅速メカニズム

電界攪拌技術を用いた免疫組織染色方法の抗原抗体反応を迅速化させるメカニズムについて，攪拌による影響と電界印加がタンパク質である抗体に及ぼす影響の2つの側面から検討した。

3.1 攪拌による影響（タンパク質を用いた電界非接触攪拌中の内部挙動観察と抗体移動速度）

実際に免疫組織染色に使用するような分子量の抗原タンパク質を用いて，電界攪拌中の抗体移動速度を算出した。用いた観察実験装置の概要図を図5に示す。蛍光標識された抗体たんぱく質（Abcam社製 Anti-pan Cytokeratin 抗体 [C-11] (FITC)：分子量 57kDa）を用い，蛍光顕微鏡内（照射波長 493nm）で観察を行った。液滴の挙動を上方向から内部観察を可能にするために上下の電極はITO製の透明電極を用いた。本装置を用いて粒子挙動観察を行い，記録した動画から単位時間当たりの移動量を計測して抗体の移動速度として算出した。観察条件は表3に示す。実際観察した画像を図6に示す。この図で緑色の部分が抗体の存在している領域である。内側の線は開始領域であり，外側の線は20sec後の領域を示している。この図のように電界を印加すると，無電界に比べ抗体の移動速度が大きくなっているのがわかる。

Table 3 Experimental conditions for observations

Electric field	AC voltage kV	0, 1, 2, 3
	Frequency Hz	19
	Wave form	Square
	Electrode gap mm	5.5
Droplet	Solvent	Pure water
	Amount of droplet μL	150
	Diameter of droplet mm	12

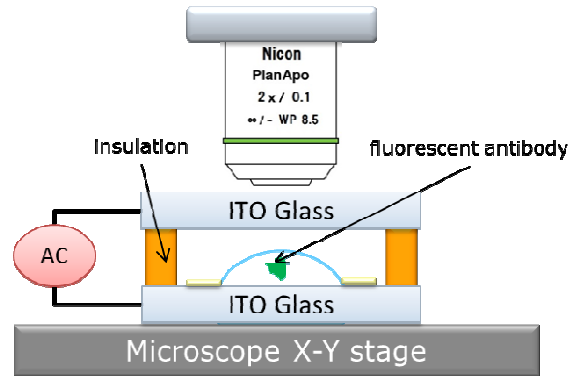


Fig. 5 Set-up for observation experimental of EST

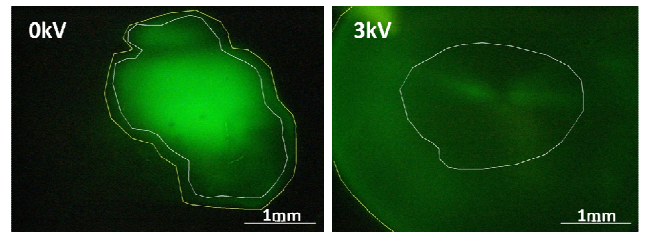


Fig. 6 Image of droplet different behaviors under 0kV and 3kV

印加電圧と抗体移動速度の関係を図7に示す。印加電圧に対して，粒子速度は対数的に上昇することを明らかにした。無電界時の抗体移動速度と3kV時の抗体移動速度を比較すると，約22倍となっていることがわかる。免疫組織染色を行う際に実際に用いる抗体たんぱく質を用いた場合，電界印加による攪拌により抗体移動速度が大きくなることが明らかになった。これより，攪拌により，抗原と抗体の接触頻度が向上することで免疫組織染色反応が加速するというメカニズムが存在するものと考えられる。

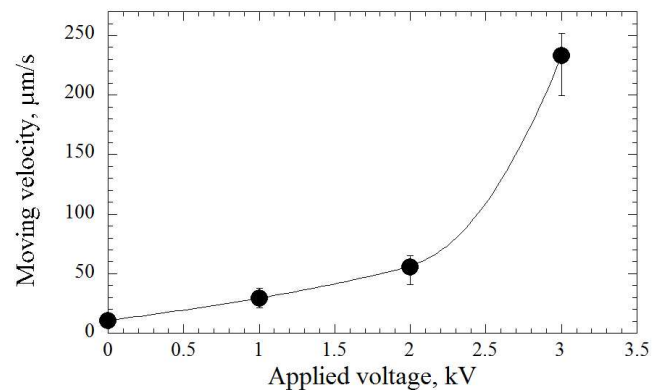


Fig. 7 Relationship between moving velocity and applied voltage

3.2 電界印加が抗体に及ぼす影響をゼータ電位測定により評価

電界攪拌法は電界印加により液滴が振動する技術であるが、液滴の振動だけでなく、電界を印加することで抗体に影響を与えているのではないかと考え、ゼータ電位の評価を行った。実験条件を表4に示す。このような条件で電界を印加した直後にマルバーン社製ゼータサイザーナノZを用いて測定を行った。印加電圧とゼータ電位との関係を図8に示す。黒三角形(▲)は市販のボルテックスミキサーを用いて機械的な液滴振動による攪拌のみの結果である。一方、黒丸(●)は電界印加時の結果を示しているが、ボルテックスミキサーによる攪拌後のゼータ電位に比べて、さらにゼータ電位がマイナス方向にシフトしていることがわかる。すなわち、電界印加によって、機械的な液滴振動法より本件は優れた分散性の向上が見られ、安定化した状態となっているものと考えられる。

Table 4 Experimental conditions for observations

Electric field	AC voltage kV	0, ±4, ±6
	Frequency Hz	10
	Wave form	Square
	Electrode gap mm	6~7
	Applied time min	10
Droplet	Solvent	Pure water
	Amount of droplet μL	600
	Diameter of droplet mm	20
	antibody	CK19
	dilution rate of antibody ×	1000

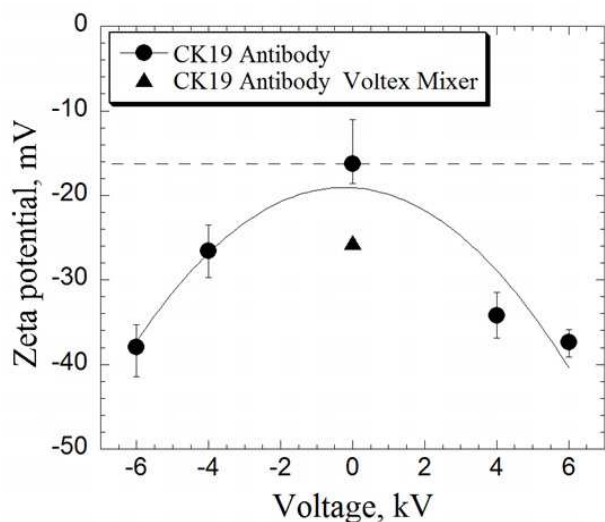


Fig.8 Relationship between zeta potential and applied voltage

4. 結言

今回、電界攪拌技術の電界印加による微小液滴の挙動観察や攪拌中の液温測定を行い、電界攪拌技術の特徴を明らかにし、さらに電界攪拌技術を用いた免疫組織染色方法の抗原抗体反応を迅速化させるメカニズムについて、攪拌による影響と電界印加がタンパク質である抗体に及ぼす影響の2つの側面から検討した結果、以下のような結果を得た。

1. 微小液滴はほぼ正弦波で振動し、与えた周波数と同期して液滴が上下に振動していることを確認した。
2. 高電圧環境下でも高精度な温度が可能である蛍光式光ファイバー温度計を用いて、電界攪拌技術を起因とする温度上昇が無いことを確認した。
3. 攪拌効果により、抗原と抗体の接触頻度が向上する。
4. 機械的な液滴振動による攪拌よりも、電界印加による攪拌方法はより分散性を加速し、安定化した状態となる。

謝辞

本研究の一部は、経済産業省 平成 24-26 年度課題解決型医療機器等開発事業「自動化による術中高速組織診断のための新型免疫組織染色装置の開発」、また、日本学術振興会の科学研究費補助金(若手研究(B) 26820027)のご支援によるものであり、ここに感謝の意を表す。

参考文献

- (1) 佐藤信昭, 神林智寿子, 金子耕司, 白田敦子, 山口哲司, 乳癌のセンチネルリンパ節微小転移の意義, 日外科系連会誌 37, 4 (2012) 742- 746.
- (2) 名倉 宏, 長村義之, 堤 寛編, 改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法, 学際企画 (2002)
- (3) Takuma Sagawa, Takachika Azuma and Yuji C. Sasaki, Dynamical regulations of protein-ligand bindings at single molecular level, Biochemical and Biophysical Research Communications 355 (2007) 770-775, available online 15 February 2007
- (4) Chong, W. H., Chin, L. K., Tan, R. L. S., Wang, H., Liu, A. Q. and Chen, H., Stirring in Suspension: Nanometer-Sized Magnetic Stir Bars, Angewandte Chemie, Vol.125, Issue 33(2013) 8732-8735.
- (5) 赤上陽一, 加賀谷昌美, 非接触攪拌方法、非接触攪拌装置、それを用いた核酸ハイブリダイゼーション反応方法反応装置、試料中の核酸を検出する方法、試料中の抗体を検出する方法、及び検出装置 特許第 5681912
- (6) Hiroshi Toda, Yoshihiro Minamiya, Masami Kagaya, Hiroshi Nanjo, Yoichi Akagami, Hajime Saito, Manabu Ito, Hayato Konno, Satoru Motoyama and Junichi Ogawa, A Novel Immunohistochemical Staining Method Allows Ultrarapid Detection of Lymph Node Micrometastases While Conserving Antibody, Acta Histochem Cytochem.2011 Jun 29 ; 44(3):133-139
- (7) 中村竜太, 加賀谷昌美, 赤上陽一, 池田洋, 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メカニズムの解明, 2013 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集 (2013) 543-544.
- (8) 赤上陽一, 機能性流体を用いた電界砥粒研磨技術, 砥粒加工学会誌 48, 11 (2004) 18.