

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5754520号
(P5754520)

(45) 発行日 平成27年7月29日 (2015. 7. 29)

(24) 登録日 平成27年6月5日 (2015. 6. 5)

(51) Int. Cl.	F 1
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 1/38 (2006. 01)	GO 1 N 1/28 Y

請求項の数 12 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2014-9634 (P2014-9634)	(73) 特許権者	591108178
(22) 出願日	平成26年1月22日 (2014. 1. 22)		秋田県
(65) 公開番号	特開2014-160061 (P2014-160061A)		秋田県秋田市山王4丁目1番1号
(43) 公開日	平成26年9月4日 (2014. 9. 4)	(73) 特許権者	504409543
審査請求日	平成26年1月22日 (2014. 1. 22)		国立大学法人秋田大学
(31) 優先権主張番号	特願2013-9321 (P2013-9321)		秋田県秋田市手形学園町1番1号
(32) 優先日	平成25年1月22日 (2013. 1. 22)	(74) 代理人	100082669
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 福田 賢三
(出願人による申告) 平成25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」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	100095337
早期審査対象出願			弁理士 福田 伸一
		(74) 代理人	100095061
			弁理士 加藤 恭介
		(72) 発明者	赤上 陽一
			秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電界洗浄方法、電界免疫組織染色方法、電界洗浄装置及び、電界免疫組織染色装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原と抗体とを反応させるために基板上に形成した反応場と、
前記反応場を挟むように上下に形成された上側電極と下側電極とを備え、
前記反応場で抗原に1次抗体を含む液滴を添加して抗原と1次抗体とを反応させる1次抗原抗体反応工程と、

前記1次抗原抗体反応工程の後に2次抗体を含む液滴を添加して2次抗体をさらに反応させる2次抗原抗体反応工程と、

前記上側電極と下側電極との間に所定の電界を与えることにより、前記1次抗原抗体反応工程及び前記2次抗原抗体反応工程で、前記反応場に形成されたそれぞれの前記液滴を

10

攪拌する工程と、
前記1次抗原抗体反応工程と2次抗原抗体反応工程との後に、それぞれ未反応抗体を除去する未反応抗体洗浄工程と、

を有し、

前記未反応抗体洗浄工程では、前記反応場の前記液滴を排出し、排出した後に洗浄液を前記反応場に注入し、所定時間後に注入した前記洗浄液を排出して前記反応場の前記未反応抗体を除去するとともに、

前記未反応抗体洗浄工程中は、前記上側電極と下側電極との間に所定の電界を与えて、前記反応場の前記液滴及び前記洗浄液を攪拌することを特徴とする電界洗浄方法。

【請求項2】

20

前記所定の電界は、周波数 0.1 ~ 800 Hz の方形波を発生させ、電界強度をプラス側に 0.4 ~ 2.0 kV/mm とし、オフセット電界強度が 0.15 ~ 1.0 kV/mm であることを特徴とする請求項 1 に記載の電界洗浄方法。

【請求項 3】

前記上側電極は貫通穴を備える板状電極又は環状電極であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の電界洗浄方法。

【請求項 4】

前記未反応抗体洗浄工程は、前記貫通穴から前記反応場へ排出管を挿入して未反応抗体を排出する工程と、前記貫通穴から前記反応場へ注入管を挿入して洗浄液を注入する工程と、

10

をさらに備えることを特徴とする請求項 3 に記載の電界洗浄方法。

【請求項 5】

基板上に耐アセトン性を有し、ポリビニル系、ポリ塩化ビニル系、シリコン系又はフッ素系から 1 つ選ばれる樹脂からなり、電界攪拌の良好な攪拌動作を生む反応場液滴形状並びに領域を確保する領域を形成するはっ水リングやはっ水枠を載置するか、はっ水処理剤塗布にて処理することにより液滴反応場を形成することを特徴とする請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の電界洗浄方法。

【請求項 6】

はっ水リングの内径範囲 5 ~ 25 mm, また、長方形のはっ水枠を採用することによって、滴下する液滴は、5 ~ 1000 μL であることを特徴とする請求項 5 に記載の電界洗浄方法。

20

【請求項 7】

前記 1 次抗原抗体反応工程前に抗原に電界を与えて賦活化させ、反応を加速化させる電界賦活化工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか一項に記載の電界免疫組織染色方法。

【請求項 8】

抗原と抗体とを反応させるために基板上に形成した反応場と、

前記反応場を挟むように上下に形成された上側電極と下側電極とを備え、

前記反応場で抗原に 1 次抗体を含む液滴を添加して抗原と 1 次抗体とを反応させる 1 次抗原抗体反応機構と、

30

前記 1 次抗原抗体反応機構での反応後に 2 次抗体を含む液滴を添加して 2 次抗体をさらに反応させる 2 次抗原抗体反応機構と、

前記上側電極と下側電極との間に所定の電界を与えることにより、前記 1 次抗原抗体反応機構及び前記 2 次抗原抗体反応機構で、前記反応場に形成されたそれぞれの前記液滴を攪拌する機構と、

前記 1 次抗原抗体反応機構での反応後及び 2 次抗原抗体反応機構での反応後に、それぞれ未反応抗体を除去する未反応抗体洗浄機構と、

を有し、
前記未反応抗体洗浄機構では、前記反応場の前記液滴を排出し、排出した後に洗浄液を前記反応場に注入し、所定時間後に注入した前記洗浄液を排出して前記反応場の前記未反応抗体を除去するとともに、

40

前記未反応抗体洗浄機構は、前記上側電極と下側電極との間に所定の電界を与えて、前記反応場の前記液滴及び前記洗浄液を攪拌することを特徴とする電界洗浄装置。

【請求項 9】

前記上側電極は貫通穴を備える板状電極又は環状電極であることを特徴とする請求項 8 に記載の電界洗浄装置。

【請求項 10】

前記未反応抗体洗浄機構は、前記貫通穴から前記反応場へ排出管を挿入して未反応抗体を排出する機構と、前記貫通穴から前記反応場へ注入管を挿入して洗浄液を注入する機構と、

50

をさらに備えることを特徴とする請求項 9 に記載の電界洗浄装置。

【請求項 11】

基板上に耐アセトン性を有し、ポリビニル系、ポリ塩化ビニル系、シリコン系又はフッ素系から 1 つ選ばれる樹脂からなり、電界攪拌の良好な攪拌動作を生む反応場液滴形状並びに領域を確保する領域を形成するはっ水リングやはっ水枠を載置するか、はっ水処理剤塗布にて処理することにより液滴反応場を形成することを特徴とする請求項 8 ~ 10 の何れか一項に記載の電界洗浄装置。

【請求項 12】

前記 1 次抗原抗体反応工程前に抗原に電界を与えて賦活化させ、反応を加速化させる電界賦活化を行う機構をさらに含むことを特徴とする請求項 8 乃至請求項 11 のいずれか一項に記載の電界洗浄装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1 次・2 次抗原抗体反応工程間やその前後の工程に存在する洗浄工程を迅速化、自動化することができる電界洗浄方法、電界洗浄装置、それを用いた電界免疫組織染色方法、電界免疫組織染色装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

本発明者らは、物理的な手段の 1 つである高電圧交流電界によって発生するクーロン力によって液滴が吸引される現象と与える高電圧の極性変化によって生じる液滴の振動現象によって、液滴内に存在する微細物が攪拌する現象と高圧電界を抗体液滴に与えることで、抗体はより分散する現象を示すことから、これらに着目して鋭意検討し、1 mL 以下、特に 50 から数 1000 μ L オーダーの微量の液滴を非接触に攪拌に適用し抗原定着工程、抗原抗体反応工程においても、著しく反応時間を短縮できる非接触攪拌方法として電界攪拌技術の特許文献 1 に提案した。

そして、この電界攪拌技術は、抗原抗体反応を約 10 倍促進する技術であり、従来 2 時間を要していた 1 次・2 次抗原抗体反応を合わせて 10 分程度に完了する技術である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2010 - 119388 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在、術中迅速病理診断は時間の制約上、5 分以内に染色可能な HE 染色（ヘマトキシリン・エオジン染色）が用いられている。しかし、HE 染色では小さながん遺残やリンパ節微小転移が見逃されていることが多い。このがん遺残やリンパ節転移を見逃さずに縮小手術を施行するには免疫染色が必要である。従来の免疫染色には 2 時間以上を要するため、術中病理診断には適さない。術中病理診断に用いるためには 40 分以内に診断を完了する必要があり、現在、Sysmex 社から約 30 分で遺伝子増幅する OSNA 法によるリンパ節転移診断機器が販売されているが、同法による転移診断は形態学的情報が欠如するため、正確な転移診断とは言えず、信頼性を欠いている。また、数社から自動免疫染色装置が市販されているが、これらは大量の免疫染色を自動化するために開発されたもので、最短でも 90 分を要するため術中病理診断には適用できなかった。即ち従来の免疫染色を実施するため、繁忙な医療スタッフが手動の装置操作を行うには限界があった。

この問題を解決するため、本発明の発明者等は、免疫染色を迅速に行うために電界を試料に非接触に与える新たな攪拌技術を開発し、免疫染色技術を開発し、試作機レベルにて診断に要する時間を 136 分から 20 分に短縮する研究成果を上げている。これが前記特許文献 1 に提案した非接触攪拌方法である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

しかしながら、免疫組織診断をより迅速化して広く普及させるためには、診断に関わる試料作製処理技術をより簡便に、しかも高精度に行う必要がある。前記特許文献1に提案した非接触攪拌方法（電界攪拌技術）は、1次・2次抗原抗体反応そのものを高速化できる技術であり、1次・2次抗原抗体反応工程間に存在する洗浄工程によって、電界攪拌装置より試料が搭載されるガラス等で構成されるプレートを一度装置外へ取り出して洗浄を行う必要があるため、この洗浄操作に人手を要してしまい、煩雑な病理現場では問題となっている。したがって、この洗浄工程を迅速化及び自動化する技術が希求されている。

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明は、1次・2次抗原抗体反応工程間やその前後の工程に存在する洗浄工程を迅速化、自動化することができる電界洗浄方法、電界洗浄装置、それを用いた電界免疫組織染色方法、電界免疫組織染色装置を提案することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明は、上記に鑑み提案されたもので、抗原と抗体とを反応させるために基板上に形成した反応場と、前記反応場を挟むように上下に形成された上側電極と下側電極とを備え、前記反応場で抗原に1次抗体を含む液滴を添加して抗原と1次抗体とを反応させる1次抗原抗体反応工程（機構）と、前記1次抗原抗体反応工程（機構）の後に2次抗体を含む液滴を添加して2次抗体をさらに反応させる2次抗原抗体反応工程（機構）と、前記上側電極と下側電極との間に所定の電界を与えることにより前記反応場に形成された液滴を攪拌する工程（機構）と、前記1次抗原抗体反応工程と2次抗原抗体反応工程との後に、それぞれ未反応抗体を除去する未反応抗体洗浄工程（機構）と、を有し、前記攪拌する機構は、前記1次抗原抗体反応機構での抗原と1次抗体との反応、前記2次抗原抗体反応機構での2次抗体のさらなる反応、及び前記未反応抗体洗浄機構での未反応抗体除去においても、前記反応場に形成された液滴を攪拌することを特徴とする電界洗浄方法又は装置に関するものである。

【 0 0 0 8 】

また、本発明は、前記電界洗浄方法又は装置において、前記所定の電界は、周波数0.1～800Hzの方形波を発生させ、電界強度をプラス側に0.4～2.0kV/mmとし、オフセット電界強度が0.15～1.0kV/mmであることを特徴とする電界洗浄方法又は装置をも提案する。

より望ましくは、周波数0.1～300Hzの方形波を発生させ、電界強度をプラス側に0.4～1.5kV/mmとし、オフセット電界強度が0.15～0.7kV/mmである。

【 0 0 0 9 】

さらに、本発明は、前記上側電極は貫通穴を備える板状電極又は環状電極であることを特徴とする電界洗浄方法又は装置をも提案する。

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、前記電界洗浄方法又は装置において、前記未反応抗体洗浄工程（機構）は、前記貫通穴から前記反応場へ排出管を挿入して未反応抗体を排出する工程（機構）と、前記貫通穴から前記反応場へ注入管を挿入して洗浄液を注入する工程（機構）と、をさらに備えることを特徴とする電界洗浄方法又は装置をも提案する。

さらに、基板上に複数の液滴の反応場を形成し、各反応場に対してそれぞれ液滴反応場の溶液を排出する排出管、洗浄液を注入する注入管を挿入可能な貫通穴を板状電極又は環状電極の上方から反応場となる液滴に臨ませるようにしてもよい。

【 0 0 1 1 】

また、本発明は、前記電界洗浄方法又は装置において、基板上に耐アセトン性を有し、ポリビニル系、ポリ塩化ビニル系、シリコーン系又はフッ素系から1つ選ばれる樹脂からなり、電界攪拌の良好な攪拌動作を生む反応場液滴形状並びに領域を確保し、領域を形成するはっ水リングやはっ水枠を載置するか、はっ水処理剤塗布にて処理することにより液

10

20

30

40

50

滴反応場を形成することを特徴とする電界洗浄方法又は装置をも提案する。

はっ水リングの内径範囲5～25mm,また、長方形のはっ水枠を採用することによって、滴下する液滴は、5～1000μLである。

【0012】

さらに、本発明は、前記電界洗浄方法又は装置を用いて、1次抗原抗体反応工程(機構)前に抗原に電界を与えて賦活化させ、反応を加速化させる電界賦活工程(機構)を行うことを特徴とする電界免疫組織染色方法又は装置をも提案するものである。

【0013】

なお、本発明の前記未反応抗体洗浄工程(機構)に関して詳細に説明すると、貫通穴を有する板状電極又は環状電極を上部電極とし、板状電極を下部電極とする電極間において、下部電極上に配置したガラスプレート等の基板上に、液滴を形成させて反応場とし、液滴と上部電極とは非接触状態を維持した状態で、これらの上下電極間に電界を与え、液滴は上部電極方向に振動し、撈拌を生じさせ、与える電界条件は、周波数0.1～800(望ましくは0.1～300)Hzの繰り返し方形波を発生し昇圧させ、電界強度はプラス側に0.4～2.0(望ましくは0.4～1.5)kV/mm、これにオフセット電界強度0.15～1.0(望ましくは0.15～0.7)kV/mmを加えてプラス側に偏らせて与える、電界条件によって液滴は非接触にそして活発に振動し、撈拌現象を生じ、この撈拌現象中に、前記貫通穴を有する板状電極又は環状電極の貫通穴から液滴反応場へ排出管を挿入して溶液を排出する工程(機構)と、貫通穴から液滴反応場へ注入管を挿入して洗浄液を注入する工程(機構)と、を行うことで、液滴に浮遊する未反応物等の非特異反応物質を排出することを特徴とする、となる。

【発明の効果】

【0014】

本発明の電界洗浄方法及び電界洗浄装置は、図1に示すとおりであるが、高電圧交流電界によるクーロン力を1mL以下、特に50～600μLオーダーの微量の液滴に与えることにより、液滴の内部にて撈拌子等を用いずに撈拌することができる電界撈拌技術を、1次・2次抗原抗体反応工程間やその前後の工程に存在する洗浄に利用するものであって、ガラスプレート等の基板上に複数の液滴の反応場を形成しても、それぞれの反応場に対して貫通穴を有する板状電極又は環状電極を臨ませればよく、貫通穴から液滴反応場へ臨ませた排出管と注入管とを的確に液滴の反応場に配置させ、所定の電界撈拌工程完了後に引き続き電界撈拌を与えながら適宜に溶液を排出したり、洗浄液を注入したりすることにより、洗浄工程の迅速化及び自動化を達成することができる方法である。

【0015】

また、ガラスプレート等の基板上に耐アセトン性を有し、ポリビニル系、ポリ塩化ビニル系、シリコン系又はフッ素系から1つ選ばれる樹脂からなり、電界撈拌の良好な撈拌動作を生む反応場液滴形状並びに領域を確保する領域を形成するはっ水リングやはっ水枠を載置するか、はっ水処理剤塗布にて処理することにより液滴反応場を形成することにより、ばらつきの少ない一定量の液滴を滴下可能にすることによって、液滴反応場の高さばらつきが抑制される。すなわち電極間と液滴頭頂部との距離長ばらつきが抑制され、これにより、電界撈拌性のばらつきが抑制される。この電界撈拌を継続しながら、液滴を排水し、さらに新規に注入されたばらつきの少ない一定量の洗浄液を電界撈拌後に電界撈拌中に排出することで、不要な抗体を除去して洗浄不良による非特異発色を抑制し易くし、すぐれた洗浄性を得る極めて簡易な液滴の反応場を形成することができる。

【0016】

さらに、前記電界洗浄を電界免疫組織染色に適用することにより、電界による1次・2次抗原抗体反応工程間やその前後の工程に存在する洗浄工程を迅速化、自動化することができる電界洗浄方法を実施することができる。また、凍結切片に対する術中迅速免疫染色診断として、パラフィン切片を用いた免疫染色確定診にも適用可能である。この時、抗体試薬を希釈し用いることができる。さらに、核酸におけるハイブリダイゼーション工程にも適用可能であり、加えて抗原抗体反応においても適用可能である。なお、1次抗原抗体

10

20

30

40

50

反応工程前に抗原に電界を与えて賦活化させ、反応を加速化させる電界賦活化工程を行うことにより、脳腫瘍のような反応性の低い抗原に用いると有効である。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の電界洗浄方法（装置）の概要を模式的に示す斜視図である。

【図2】印加電界波形と液滴内部の攪拌メカニズムとの関係を模式的に示す断面図である。

【図3】本発明における電界洗浄メカニズムを模式的に示す断面図である。

【図4】本発明における電界洗浄において、液滴反応場に1本の注入管、複数本の排出管を臨ませた例を模式的に示す断面図である。

10

【図5】印加電界強度と試料の液量との関係を示し、炭酸カルシウム - 滅菌超純水液滴量と攪拌が生じた電界強度（kV/mm）の関係を示すグラフである。

【図6】印加周波数と試料の液量との関係を示し、炭酸カルシウム - 滅菌超純水液滴量と攪拌が生じた印加周波数の関係を示すグラフである。

【図7】本発明の電界洗浄を用いた迅速免疫染色法を従来のHE染色との比較対照表である。

【図8】実施例の免疫組織染色試験結果を示す顕微鏡写真の複写図である。

【図9】（a）本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色方法（装置）における電界非接触攪拌の反応場の抗体液滴をハイスピードカメラで側面から撮影した顕微鏡写真の複写図と、（b）電界非接触攪拌技術を模式的に示す側面図である。

20

【図10】本発明における電界非接触攪拌法によって生じる液温変化を示すグラフであり、一次抗体希釈液21Hzの場合と一次抗体希釈液91Hzの場合を並べて示している。

【図11】電界賦活化効果による染色割合と印加電界時間との関係を示すグラフである。

【図12】本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色装置における供給機構の一例を示し、供給カセット機構によるダイレクト滴下方式を採用した試薬格納カセット及びそれに収容された試薬用シリンジを示す斜視図である。

【図13】本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色装置における試薬滴下部と電界攪拌部との連絡を模式的に示す側面図である。

【図14】本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色装置における試薬滴下部と電界洗浄部との連絡を模式的に示す側面図である。

30

【図15】本発明における電界PBS洗浄を拡大して示す斜視図である。

【図16】（a）本発明における電界洗浄工程に用いることが可能である環状電界集中型電極を示す斜視図、（b）電界集中型電極を用いた際の反応場の抗体液滴内の挙動を模式的に示す断面図である。

【図17】（a）本発明における環状電極（電界印加オンの状態）を用いた攪拌挙動を示す拡大写真の複写図、（b）電界印加オフの状態を示す複写図である。

【図18】（a）及び（b）本発明における環状集中型電極（電界印加オンの状態）を用いた攪拌挙動を示す拡大写真の複写図、（c）電界印加オフの状態を示す複写図である。

【図19】ゼータ電位測定による分散性評価を示すグラフであり、欄外に電界（矩形波）を印加して機械的な攪拌を実施する装置が示されている。

40

【図20】自動免疫組織染色装置の機構（電界洗浄工程）を示す斜視図である。

【図21】（a）はっ水リングを用いた攪拌挙動を示す顕微鏡写真の複写図、（b）2穴タイプはっ水リングを示す斜視図である。

【図22】（a）従来法で得られる免疫組織染色を示す顕微鏡写真の複写図、（b）本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色方法（実施例1）で得られる免疫組織染色を示す顕微鏡写真の複写図である。

【図23】（a）本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色方法（実施例2）で得られる免疫組織染色を示す顕微鏡写真の複写図、（b）従来法で得られる免疫組織染色を示す顕微鏡写真の複写図である。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 1 8 】

前記特許文献 1 に提案した電界攪拌の技術原理は図 2 に示すとおりであるが、これを、洗浄工程に適用しようとするものが本発明であり、電界を用いた攪拌現象を用いながら電界洗浄を行う方法（装置）であって、図 3 及び図 4 に示すとおりである。より具体的には、洗浄工程に電界洗浄工程を開発・導入し、電界攪拌装置に入った試料が洗浄工程のために装置より出入りする操作を無くし、医療スタッフの負担軽減を図る装置開発を行うものである。

【 0 0 1 9 】

本発明は、高電圧交流電界によるクーロン力を 1 mL 以下、特に μ L オーダーの微量液滴に与えることにより、液滴内部を非接触に攪拌することができる電界攪拌を洗浄に利用するものである。具体的には湿度 $60 \pm 20\%$ の環境下で、印加電界強度の主電圧のとしてプラス側に $0.4 \sim 2.0$ （より望ましくは $0.4 \sim 1.5$ ）kV/mm、これにオフセット電界強度 $0.15 \sim 1.0$ （より望ましくは $0.15 \sim 0.7$ ）kV/mm を加えることで、プラス側に偏った繰り返し方形波を生成し、周波数 $0.1 \sim 800$ （より望ましくは $0.1 \sim 300$ ）Hz の範囲で液滴が活発に振動する周波数を与えることで発生する電界の波に変化をもたせた（= パースト波形を構成させた）高電圧交流電界を 1 mL 以下、特に μ L オーダーの微量液滴に非接触に与えることで発生する電界を用いた攪拌現象を用いながら電界洗浄を行う方法（装置）である。

【 0 0 2 0 】

前記電界攪拌において、印加電界強度（kV/mm）は、プラス側に 2.0 kV/mm より強いと放電する可能性があり、 0.4 kV/mm 未満より低いと攪拌が生じない。

また、オフセット電圧は、 1.0 kV/mm より強いと放電する可能性があり、 0.15 kV/mm より低いと攪拌が生じない。

【 0 0 2 1 】

さらに、攪拌作用に影響を与える電界強度・周波数は液滴量に依存するが、この電界強度と液量、周波数と液量の関係を以下に説明する。

印加電界強度（kV/mm）は、試料の液量により最適化される。

炭酸カルシウム（観察のために粒径 50 nm 濃度 0.04% ）を入れた滅菌超純水の液滴をプラスチック製基板に滴下し、平行平板電極間において電界下の動きを観察したところ、 0.6μ L では 0.75 kV/mm（電極間距離 4 mm）、 $1 \sim 2 \mu$ L では 0.63 kV/mm（電極間距離 4 mm）、 $5 \sim 15 \mu$ L では 0.4 kV/mm（電極間距離 4 mm）、 $100 \sim 1000 \mu$ L では 0.42 kV/mm（電極間距離 7 mm）で液滴内部の炭酸カルシウム粒子が活発に動く様子を確認した。この結果を図 5 のグラフにして示した。

炭酸カルシウム（観察のために粒径 50 nm 濃度 0.04% ）を入れた滅菌超純水 10μ L の液滴をプラスチック製基板に滴下し、電界下の動きを観察したところ、液量 0.6μ L では $380 \sim 420$ Hz、 1μ L では $260 \sim 310$ Hz、 2μ L では $195 \sim 220$ Hz、 5μ L では $125 \sim 140$ Hz、 10μ L では $85 \sim 95$ Hz、 15μ L では $70 \sim 85$ Hz、 100μ L では 30 Hz、 500μ L では $13 \sim 15$ Hz、 1000μ L では 10 Hz で、液滴内部の炭酸カルシウムが活発に動く様子を確認した。この結果を図 6 のグラフにして示した。

【 0 0 2 2 】

本発明の電界洗浄では、ガラスプレート等の基板 1 上に形成した液滴反応場 2 に、貫通穴 3 を有する板状電極又は環状電極 4 を上方から臨ませ、貫通穴 3 から液滴反応場 2 へ排出管 5 を挿入して試薬溶液 6 を排出する工程と、貫通穴 3 から液滴反応場 2 へ注入管 7 を挿入して洗浄液 8 を注入する工程と、を行うと共に、必要に応じて上記工程を繰り返して行うようにしたものである。

【 0 0 2 3 】

既に概略的には説明したが、免疫組織診断をより迅速化して広く普及させるためには、診断に関わる試料作製処理技術をより簡便に、しかも高い精度で行う必要があった。本発

10

20

30

40

50

明は、前記電界攪拌の技術を1次・2次抗原抗体反応自体に限らず、煩雑な病理診断における洗浄工程にも利用しようとするものである。

例えば1次・2次抗原抗体反応を行わせるための前記電界攪拌では、平板状の電極を用いればよいが、この洗浄方法(装置)においては、貫通穴を有する板状電極又は環状電極を用いる。前者の電極は、盤状電極の中央に貫通穴を形成したものであり、貫通穴としては貫通スリット穴を含むものであり、後者の電極は、電極自体を環状(ドーナツ状又はリング状)に成形したものである。

【0024】

この電界洗浄における貫通穴を有する板状電極又は環状電極は、導体であればよく、アルミ又はステンレス等でもよく、ITO(酸化インジウムスズ、透明電極)でもよい。また、その配置は、液滴からの溶液の排出時に液滴の頂部と電極間距離を一定にすることで攪拌性の維持向上を図るようにしてもよい。

10

【0025】

ガラスプレート表面に形成する液滴の反応場は、ガラスプレート表面を凸状に形成したもので、平坦状の表面にはっ水リングやはっ水枠を載置(定着)したものでよい。前者に比べて後者ののはっ水リングやはっ水枠を用いた形成方法の方が極めて容易に作成でき、液滴の容量調整も容易に行うことができるという利点がある。さらに、はっ水機能を付与するはっ水ペンでガラスプレートに円や枠を描画して(=はっ水処理剤塗布にて処理する)液滴を滴下する領域を形成するようにしてもよい。

【0026】

20

前記はっ水リング等は、耐アセトン性を有し、電界印加環境に影響を与えない樹脂から形成されるものである。したがって、ガラスプレート上のはっ水リング等の内側部に滴下された液滴は、良好なドーム形状を形成し、その最大高さ(頂点位置)が一定となるため、液滴の底面の径寸法のばらつきを抑制することができ、液滴の頂点位置と電極との間の距離のばらつきも抑制することができる。

ここで、はっ水リング等は、その材質としての電界印加環境に影響を与えない樹脂の例示として、ポリビニル系、ポリ塩化ビニル系、シリコーン系又はフッ素系から1つ選ばれる樹脂を挙げることができる。また、はっ水リングのリング内側部に滴下された液滴に対してリング幅が0.5~5mm、リング内径が5~25mmであることを挙げることができる。また、長方形のはっ水枠を採用することが可能なため、その滴下する液滴は、5~1000 μ Lとなる。

30

【0027】

また、反応場に臨ませる注入管7及び排出管5の本数及び配置は、特に限定するものではないが、図3に示すようにそれぞれ1本ずつ設けてもよいが、図4に示すように注入管7は中央部に1本設け、排出管5は1本、又は注入管7の周囲に複数本設けることが好ましい。

【0028】

洗浄液としては、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いることができる。このPBSとしては、種々な組成のものがあり、カリウムを含む一例をあげると、NaCl, KCl, NaHPO₄, KH₂PO₄を配合してなるものがあるが、カルシウムやマグネシウムを含む組成もある。

40

【0029】

次に、本発明の電界洗浄を用いた迅速免疫染色法について図7に示す比較対照表を用いて説明する。

本発明の電界免疫組織染色技術の工程は、「5」と「7」が電界攪拌装置を用いて行う処理である。そのため、「6」のPBS洗浄の時に一度、試料が搭載されているスライドガラスを装置の外に出す必要がある。狙いは「5」~「7」まで装置内で完了することである。

なお、工程「5」電界攪拌では上部に配置する電極形状は、平板電極、平板円盤電極、環状電極を採用し、電極形状が環状でも電界攪拌が成し得るかを確認した。これにより電

50

界攪拌並びに洗浄にも同一の電極を用いることができ、装置を簡素化できることが確認された。

工程「6」 電界洗浄技術 電界攪拌印加中(0.4~1.5 kV/mm、0.1~300 Hz、250秒)に、環状電極の貫通穴より排出管をガラスプレート上の液滴に差し込み、溶液をポンプを用いて排出し、洗浄工程を完了する場合、ここで工程「7」の処理に移行してもよい。染色発色品位を高める場合には、貫通穴よりPBS洗浄液を注入管にて注入した後、電界攪拌(0.4~1.5 kV/mm、0.1~300 Hz、30~60秒)し、その後、貫通穴から排出管をガラスプレート上の液滴に差し込み、溶液をポンプを用いて排出し、工程「7」へ移行する。(また、排出管1本、注入管2本を貫通穴から差し込み、排出と注入を同時に行うことによって、洗浄工程の時間を短縮化するようにしてもよい。)上記工程を1~3回行うことで、非特異発色が発生しない免疫染色が得られる。即ち電界洗浄技術を導入することによって、免疫染色技術の迅速化及び自動化が可能になる。

なお、この電界洗浄技術は、免疫組織染色に限らず、核酸におけるハイブリダイゼーション工程にも適用可能であり、加えて抗原抗体反応においても適用可能である。

【0030】

なお、本発明の電界洗浄方法を用いて、自動電界免疫組織染色方法を実施するには、以下に説明する電界賦活性化工程、電界賦活性化機構を実施することが望ましい。特にこの電界賦活性化は脳腫瘍のような反応性の低い抗原に用いると有効である。

この電界賦活性化工程(機構)は、1次・2次抗原抗体反応工程前に抗原に交流高電界を非接触に与えて、元来マイナスの電荷を有する抗原を賦活化(活性化)させ、抗原と抗体との接触頻度を向上させて染色の均一化と迅速化を図る工程(機構)である。

即ち本発明の電界洗浄方法を用いた自動電界免疫組織染色方法(装置)における電界非接触攪拌法による反応場の様子は図9に示すとおりであるが、その免疫染色メカニズムの特徴は、〔1〕攪拌により粒子速度が加速され、抗原と抗体の接触頻度が向上することで免疫染色反応が時短化される。〔2〕電界攪拌による溶液の温度上昇はない(図10に示すように)ということである。そのため、室温で使用する限りタンパク質変性による非特異反応は生じ難い(タンパク質や組織の変性の恐れは無い)。

図2に示すように1次・2次抗原抗体反応工程前に抗原に交流高電界を非接触に与えて、マイナスの電荷を有する抗原を賦活化させる時間は30秒~3分とすることで反応性が10~30%程度向上する。

印加電界強度の主電圧としてプラス側に0.4~2 kV/mm、これにオフセット電界強度0.15~1 kV/mmを加えることで、プラス側に偏った繰り返し方形波を生成し、周波数0.1~800 Hzにて活発に応答する周波数の高電圧交流電界を与える。

【0031】

前述の電界を反応場に与える電極としては、板状電極又は円板電極を用いることができる。前記電界洗浄で用いる環状電極の孔を塞いで板状とした状態で用いてもよい。

電極の厚さは4~10 mm、材質は良導電材料の銅、アルミ合金などが用いられる。

なお、抗原を固定する基板の一例としては、通常の26×76×0.8 mm大のスライドガラスを用い、はっ水フレームとしては、2穴型の内径形状が10~20 mm以下の貫通穴を有し、樹脂部の幅は0.5~3 mm以下、スライドガラスへ張りやすく、幅2~3 mmを推奨する。また厚みは0.15~0.3 mmの2穴タイプはっ水リングを用いる。

【実施例】

【0032】

現状工程(比較例)

(A) 一次抗体滴下後 手動電界攪拌装置に試料を投入

(B) 一次抗体を電界攪拌

(C) 装置よりスライドガラスに配置されている試料を搬出

(D) PBS洗浄(技師)

(E) 手動電界攪拌装置にスライドガラスに配置されている試料を搬入後、二次抗

10

20

30

40

50

体を滴下

- (F) 二次抗体を電界攪拌
- (G) 装置より試料取り出し
- (H) P B S 洗淨 (用手法洗淨)

【 0 0 3 3 】

実施例 1 の工程

前記の工程を下記に示す工程に変更し、殆どの工程を自動化し、装置より試料の取り出し投入工程を無くし、作業者の手間を省くと共に良好な染色を得ることを目標とした。

- (A) 一次抗体を滴下後 電界攪拌装置に試料を設置
- (B) 一次抗体を電界攪拌
- (I) P B S 洗淨 (電界洗淨 : 電界攪拌中に抗体液を吸い上げ排出)
- (E) 二次抗体を滴下 電界攪拌に試料を投入
- (F) 二次抗体電界攪拌
- (G) 試料は装置より自動搬出
- (H) P B S 洗淨 (用手法洗淨)

10

このように、実施例 1 の工程 と 現状工程 との相違は、現状工程における (C) 装置よりスライドガラスに配置されている試料を搬出する工程、及び (D) P B S 洗淨 (技師) の工程に代えて (I) P B S 洗淨 (電界洗淨) を自動にて行った点である。

【 0 0 3 4 】

このように、現状工程 (比較例) では、各工程毎に、一度装置外へ取り出して技師が洗淨作業を行う必要があり、人手を要してしまうため、煩雑な病理現場では極めて問題である。これに対して 実施例 1 の工程 では (B) から (G) までを装置内で電界洗淨を実施でき、洗淨工程の迅速化及び自動化を達成できることが確認した。

20

【 0 0 3 5 】

なお、前記工程における詳細な条件については、以下の通りである。

- ・一次抗体滴下後の電界攪拌条件：

はっ水リング 2 0 m m にて形成した液滴反応場に、一次抗体を滴下し、図 1 の電界洗淨装置を用いて 4 k V、オフセット 2 k V、1 ~ 5 0 H z、矩形波、4 分 3 0 秒、の条件で電界攪拌を行った。その後、同条件の電界攪拌中の液滴から排出管を用いて試験溶液を排出した。

30

- ・ P B S 洗淨条件：

P B S 洗淨液 4 0 0 ~ 6 0 0 μ L を注入管を用いて液滴反応場に注入し、電界攪拌 4 k V、オフセット 2 k V、1 ~ 5 0 H z、3 0 秒間後に排出した。電界洗淨時間 回数 については 3 0 秒 \times 1 回でも \times 2 回でも、有為な差異は認められなかった。

- ・二次抗体滴下後の電界攪拌条件：

2 次抗体を滴下し、4 k V、オフセット 2 k V、1 ~ 5 0 H z、矩形波、5 分の条件で電界攪拌を行った。その後、同条件の電界攪拌中の液滴から 2 次抗体液を排出管を用いて試験溶液を排出した。

その結果は、図 8 に示すように 現状工程 と同様の良好な染色性が得られた。

【 0 0 3 6 】

本発明の電界洗淨方法を用いて、自動電界免疫組織染色方法を実施する際の基本プロトコールを表 1 に示す。また、表 2 には、研究背景となった免疫染色プロトコールを示す。

40

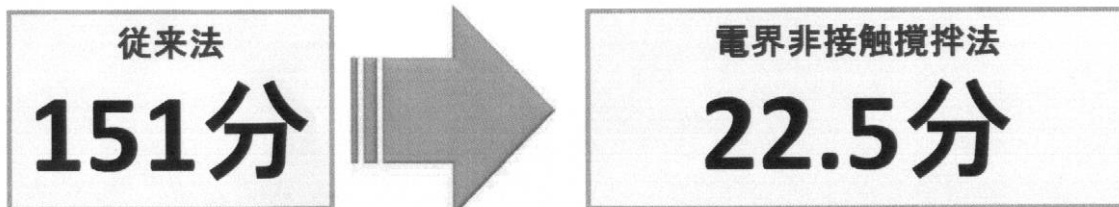
【表1】

プロトコール

染色工程	装置内	自動電界非接触 攪拌法
1. アセトン固定	用手法	2分
2. PBS洗浄	用手法	15秒
3. 電界賦活化	装置投入	30秒～60秒
4. 一次抗体	↓	5～7分
5. 電界PBS洗浄		30～60秒
6. 内因性ペルオキシダーゼ除去		1分
7. 電界PBS洗浄		30～60秒
8. 二次抗体		5分
9. 電界PBS洗浄		1分
10. DAB発色	用手法	2分
11. 洗浄・核染・封入	用手法	1分

10

20



30

【表 2】

免疫染色プロトコール

染色工程	C社	T社	M社	従来法
PBS洗浄	-	10分×3	-	-
アセトン固定	4℃ 10分	適時	10分	4℃ 10分
PBS洗浄	5分×2	10分×3	適時	5分×3
内因性ペルオキシダーゼ除去	10分	10分	5~10分	-
PBS洗浄	5分×2	5分×3	5分×3	-
ブロッキング	60分	60分	20分	-
PBS洗浄	-	-	5分×3	-
一次抗体	4℃ 一晚(480分以上)	60分	室温 60分	60分
PBS洗浄	5分×3	5分×3	5分×3	5分×3
二次抗体	室温 30分	60分	45分	30分
PBS洗浄	5分×3	5分×3	5分×3	5分×3
アビジン-ビオチン複合体液	室温 30分	30分	15分	-
PBS洗浄	5分×3	5分×3	30秒	-
DAB発色	適時	適時	5分	5分
洗浄・核染・封入	12分	適時	3分	1分
合計時間	697分以上	340分以上	223分以上	151分

【0037】

上表1, 2より明らかなように、従来法では、この免疫染色に合計151分を要していたが、本発明の電界洗浄方法を用いた自動電界免疫組織染色方法(装置)では、合計24分でこの免疫染色処理が完了し、迅速化が確認された。

詳しい内訳は、従来法では、それぞれ60分程度、或いはそれ以上の時間を要していた一次抗体(1次抗原抗体反応)、二次抗体(2次抗原抗体反応)のそれぞれの工程が、本発明の電界洗浄方法を用いた自動電界免疫組織染色装置における一次抗体、二次抗体の工程では、それぞれ5分に短縮できた。

また、1次・2次抗原抗体反応後の洗浄工程は、従来法では、それぞれ5分×3であったが、本発明の一次抗体(1次抗原抗体反応)の後の洗浄工程(電界PBS洗浄)では30~60秒であり、二次抗体(2次抗原抗体反応)の後の洗浄工程(電界PBS洗浄)では1分であった。

【0038】

図11に示すように1次・2次抗原抗体反応工程前に抗原に交流高電界を非接触に与えて、マイナスの電荷を有する抗原を賦活化させる時間を30秒~3分にする事で反応性が10~30%程度向上した。

印加電界強度の主電圧としてプラス側に0.4~1.5kV/mm、これにオフセット電界強度0.15~0.7kV/mmを加えることで、プラス側に偏った繰り返し方形波を生成し、周波数0.1~20Hzにて30秒から3分間高電圧交流電界を与える。

なお、ここで用いる電極としては、円板電極や板状電極を用いてもよい。

【0039】

次に、前記表 1 に示すプロトコルを用いて本発明の電界洗浄方法を用いた自動電界免疫組織染色方法における各工程について説明する。

本発明の電界洗浄方法を用いた自動電界免疫組織染色方法において、「4」と「8」が電界非接触攪拌装置を用いて行う1次・2次抗原抗体反応工程である。そのため、従来は「5」のPBS洗浄の時に一度、試料が搭載されているスライドガラスを装置の外に出す必要がある。

それに対し、本発明では、電界洗浄を導入することで、「4」～「9」まで装置内にて実施することができる。「6」はカセットより内因性ペルオキシダーゼ除去液を投入する工程である。

【0040】

図12～15は、本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色装置の一例であるが、本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫染色方法は、このような装置により実施される。

工程「3」の電界賦活化では、1次・2次抗原抗体反応工程前に抗原に交流高電界を30秒～3分非接触に与えて、元来マイナスの電荷を有する抗原を賦活化（活性化）させるが、前述のように板状電極又は円板電極を用いることができる。

工程「4・8」の電界攪拌（1次・2次抗原抗体反応工程）では、上部に配置する電極形状として、中央部に穴3が開いている平板電極4、図16に示す環状電極13を採用し、電極形状が環状でも電界攪拌有効に作用する結果を得た。これは、環状電極によって、反応場に電界が集中する部位と電界が弱い（内径部洗浄ノズル挿入部位）とで液滴の挙動が変わり攪拌振動が生じやすいためと考えられる。これにより、電界攪拌にて実施される1次・2次抗原抗体反応工程及び洗浄工程に同一の電極を用いることができ、装置を簡素化できることが確認された。

上部に配置する電極形状は、電界を集中させる凸部14を中心線に対称状に形成した環状集中型電極13を用いる場合、中央部に貫通穴3が開いている平板電極、に電界を集中させる凸部14をはっ水リング9内にたとえば2か所設けることで、液滴の動きを2か所に分けることができる。この効果により、吸引される液滴の高さが低くなり、より電極間距離を狭くすることが、可能となり、電界強度を高くすることができる。また、電界を集中させる凸部14を2か所以上でもよい。

【0041】

1次・2次抗原抗体反応における抗原と抗体との接触頻度を考慮すると、抗原は、スライドガラスの上に固定化されているため、抗体が抗原により多く接触させるためにも、液滴の高さを下げる必要がある。また、電界の作用によって、抗体液滴は電極面に引きつけられ、電界作用の無い時には、吸引力がなくなり、スライドガラス方向に液滴は落下する。この動作によって、液滴は攪拌作用を生じる。はっ水リングの機能として、内面は防波堤のように抗体液が外周方向に流れを食い止め、内周方向に跳ね返すことでも乱流が生じ、攪拌機能は発生する。即ち図17(a)は電界が抗体液等に印加され、電極4近傍の液滴が吸引されている様子を示し、図17(b)は電界が切られ、吸引されていた抗体液等が落下し、はっ水リング9の壁面に液が衝突することで、電極4の中央部に液等が流れ込んでいく様子を示す。また、液滴の動きを2か所以上に分けることで、抗原の移動距離は半分以下になるため、抗原と抗体の出会う距離が半分になるため攪拌の均一性の面から好ましい。また設けることで、抗原抗体反応時間が短くなる。

【0042】

工程「4・8」の電界攪拌（1次・2次抗原抗体反応工程）では印加中（0.4～1.5 kV/mm、オフセット電界強度0.15～0.30 kV/mmを加える、0.1～300 Hz, 300秒）に270秒経過後に環状電極の貫通穴より排出管をガラスプレート上の液滴に差し込み、電界攪拌中に抗体液をポンプにて排出し、洗浄工程を完了する場合、この工程で洗浄工程が完了する場合には、工程「5・9」のPBS洗浄処理は不要となる。

さらに、抗原の種類によっては染色性が低いものもあるため、その場合には、貫通穴よ

10

20

30

40

50

りPBS洗浄液を注入管にて注入した後、工程「5・7・9」の電界PBS洗浄工程を導入し、非特異発色が発生しない免疫染色が得られる。攪拌（0.4～1.5 kV/mm、オフセット電界強度0.15～0.7 kV/mmを加える、0.1～50 Hz、30秒）し、その後、貫通穴から排出管をガラスプレート上の液滴に差し込み、溶液をポンプにて排出し、工程「10」へ移行し、装置からスライドガラスは排出される。このように免疫染色技術の迅速化及び自動化が可能になる。

【0043】

本発明の電界洗浄を用いた自動電界免疫組織染色方法における、表1中の「5」と「7」が電界攪拌を用いて行う電界PBS洗浄工程である。

なお、工程「5」の電界攪拌（電界PBS洗浄）工程では、上部に配置する電極形状は、図14及び図15に示すように貫通穴3を有する板状電極又は環状電極4であるが、図16（a）に示す電界を集中させる凸部14を形成させた環状集中型電極13を用いてもよい。この電界集中型電極13では、電界を集中させる凸部14をはっ水リング9に沿った形状にたとえば2か所設けることで、液滴の動きを凸部14の数と同数の2か所に分けることができる。この効果により、図16（b）に示すように吸引される液滴の高さが低くなり、より電極間距離を狭くすることが、可能となり、電界強度を高くすることができる。また、電界を集中させる凸部14を2か所以上6か所以下でもよい。凸部数の数をN個とすると $6 > N > 1$ ここで、N=1は環状電極を示す。内径は $10 >$ 、外径は $22 < D < 30$ mm。

【0044】

環状集中型電極の狙いは、1次・2次抗原抗体反応の反応物とPBSとの接触頻度を考慮すると、反応物は、スライドガラスの上に固定化されているため、PBSが反応物により多く接触させるためにも、液滴の高さを下げる必要がある。また、電界の作用によって、液滴は電極面に引きつけられ、電界作用の無い時には、吸引力がなくなり、スライドガラス方向に液滴は落下する。この動作によって、液滴は攪拌作用を生じる。はっ水リングの機能として、内面は防波堤のように抗体液が外周方向に流れを食い止め、内周方向に跳ね返すことで乱流が生じ、攪拌機能は発生する。また、液滴の動きを2か所以上に分けることで、PBSの移動距離は半分以下になるため、反応物とPBSの出会う距離が半分になるため攪拌の均一性の面から好ましい。また設けることで、電界洗浄時間が短くなる。即ち図18（a）は電界が抗体液等に印加され、環状電極13近傍の液滴が吸引されている様子を示し、図18（b）は電界が抗体液等に印加され、凸型電極13に液滴が吸引されている様子を示し、図18（c）電界が切られ、吸引されていた抗体液等が落下し、はっ水リング9の壁面に液が衝突することで、電極13の中央部に液等が流れ込んでいく様子を示す。

【0045】

さらに電極形状として、環状電極を採用すると、電極形状が環状でも電界攪拌が成し得た。これにより電界攪拌並びに洗浄にも同一の電極を用いることができ、装置を簡素化ができることが確認された。またより良い攪拌条件を環状電極に求めると環状電極にも凹凸部を設け電界が集中する箇所を設け電極間ギャップを狭め、電界強度を向上させることが可能となる。

なお、この電界洗浄技術は、免疫組織染色に限らず、核酸におけるハイブリダイゼーション工程にも適用可能であり、加えて抗原抗体反応においても適用可能である。

【0046】

実施例2の工程

前記の工程を下記に示す工程に変更し、殆どの工程を自動化し、試料の取り出し投入工程を無くし、作業者の手間を省くと共に良好な染色を得ることを目標とした。即ち前記図12～15、図20に示す自動電界免疫組織染色装置を用いて処理を行った。

（A'）例えば図21（b）に示すようにスライドガラス上のはっ水リング内にそれぞれ試料と陽性コントロールを固定し、自動電界攪拌装置に設置後、たとえば脳腫瘍の組織のように反応性の低い抗原に対しては電界賦活化を施すと効果的である。

- (C ') 電界 P B S 洗淨 (電界洗淨 : 電界攪拌中に抗体液を吸い上げ排出)
- (D ') 二次抗体を滴下後 電界攪拌 後半より抗体液を排出
- (E ') 電界 P B S 洗淨
- (F ') 試料は装置より自動搬出

このように、実施例 2 の工程 と 現状工程 との相違は、現状工程における (C) 装置よりスライドガラスに配置されている試料を搬出する工程、及び (D) P B S 洗淨 (装置外に取り出し技師が洗淨) の工程に代えて (C ') P B S 洗淨 (電界洗淨) を自動に行った点である。さらに品位向上のために、(A ') 電界賦活化を加えた点である。

【 0 0 4 7 】

このように、現状工程 (比較例) では、各工程毎に、一度装置外へ取り出して技師が洗淨作業を行う必要があり、人手を要してしまうため、煩雑な病理現場では極めて問題である。これに対して 実施例 2 の工程 では (B) から (G) までを装置が自動運転する。装置内に電界攪拌、電界洗淨を実施でき、洗淨工程の迅速化及び自動化を達成できることが確認した。また、図 2 1 (a) に示すようにはっ水リングの内側面に攪拌液がぶつかり跳ね返り、内側に流体が流れることにより、スライドガラスに固定化されている抗原により抗体が接触する頻度が高まる。

【 0 0 4 8 】

なお、前記工程における詳細な条件については、以下の通りである。

- ・一次抗体滴下後の電界攪拌条件：

はっ水リング内径 2 0 m m にて形成した液滴反応場に、一次抗体を 2 0 0 μ L 滴下し、図 1 5 の電界洗淨装置を用いて 4 k V、オフセット 2 k V、1 ~ 3 0 H z、矩形波、4 分 3 0 秒、の条件で電界攪拌を行った。その後、同条件の電界攪拌中の液滴から排出管を用いて試験溶液を排出した。

- ・ P B S 洗淨条件：

P B S 洗淨液 4 0 0 μ L を注入管を用いて液滴反応場に注入し、電界攪拌 4 k V、オフセット 2 k V、1 ~ 3 0 H z、3 0 秒間後に排出した。電界洗淨時間 回数 については 3 0 秒 \times 1 回で有為な差異は認められなかった。

- ・二次抗体滴下後の電界攪拌条件：

2 次抗体を 2 0 0 μ L 滴下し、4 k V、オフセット 2 k V、1 ~ 3 0 H z、矩形波、5 分の条件で電界攪拌を行った。その後、同条件の電界攪拌中の液滴から 2 次抗体液を排出管を用いて試験溶液を排出した。二次抗体の洗淨は 2 回以上行うことで良好な染色性が得られた。

その結果は、図 2 3 に示すように 現状工程 (比較例) と同様の良好な染色性が得られた。即ち同図 (a) は、従来法で得られた免疫組織染色 (9 0 分) を示し、同図 (b) は、本発明の電界洗淨方法を用いた自動電界免疫組織染色方法で得られた免疫組織染色 (1 0 分) を示すが、前述のように従来法では 1 5 1 分の処理時間に対し、本発明の電界洗淨方法を用いた自動電界免疫組織染色方法では 2 2 . 5 分の短時間で処理できたにもかかわらず、むしろ本発明の方が免疫組織染色は明瞭であった。

【 0 0 4 9 】

図 1 9 には、電界を非接触に抗体液に印加すると、発揮する現象についてゼータ電位を評価することで明らかにした。

即ち機械的な振動を生じるボルテックスミキサーにて抗体液を攪拌することにより分散が進行し、ゼータ電位はマイナス方向へシフトする。

一方、電界印加する周波数によっては、抗体液に攪拌振動が生じにくい状態がある。この場合において、抗体の運動は進行していないように観察されるが、通常の静置方法に比べると上記のような電界を印加した方が、染色性が加速することが明らかになっている。すなわち、電界印加によって抗体液が分散を生じるためと考えられる。この現象を明らかにするために、ゼータ電位を用いて評価した。

【 0 0 5 0 】

実施例 3 の工程

10

20

30

40

50

反応性が高い肺腺癌の組織にて、同様な自動電界免疫組織染色を行った際の条件を表6に示し、その結果を図22（抗原抗体反応が一次・二次計10分）に示した。

【表3】

組織	肺腺癌
抗体	CK (ケラチン)
液量	200 μ L
はっ水リング径	20mm
	DAKO製 組織染色用希釈済み抗体 IRシリーズ

		一次抗体				二次抗体			
時間 (min)	5	電圧 (kV)	4	周波数 (Hz)	5	電圧 (kV)	4	周波数 (Hz)	4
		電界強度 (kV/mm)	0.98	隙間 (mm)	4.1	電界強度 (kV/mm)	0.98	隙間 (mm)	4.1
200 μ L									電界強度 (kV/mm)
									0.98

【符号の説明】

【0051】

- 1 基板（ガラスプレート）
- 2 液滴（反応場）

10

20

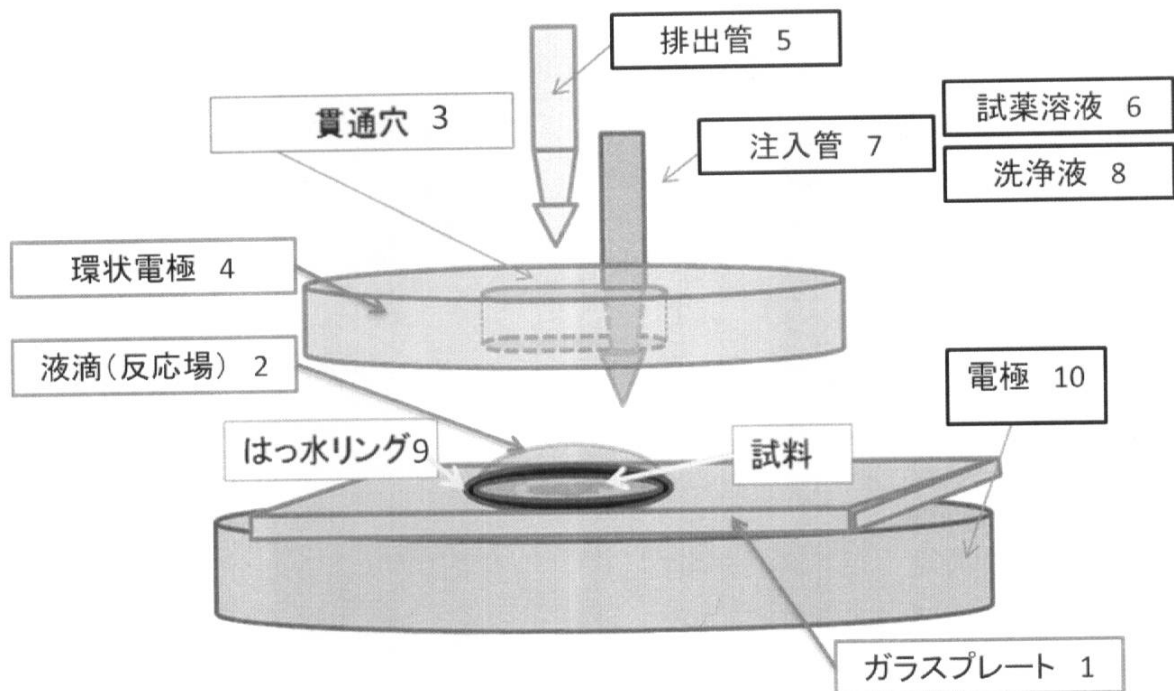
30

40

50

- 3 貫通穴
- 4 環状電極（上部電極）
- 5 排出管
- 6 試薬溶液
- 7 注入管
- 8 洗浄液
- 9 はっ水リング
- 10 下部電極
- 11 試薬用シリンジ
- 12 試薬格納カセット
- 13 電界集中型電極
- 14 洗浄液供給・排出ユニット
- 15 電界攪拌スライドガラス搬送ステージ
- 16 陽性コントロール
- 17 検体試料；抗原
- 18 取り外し用タグ

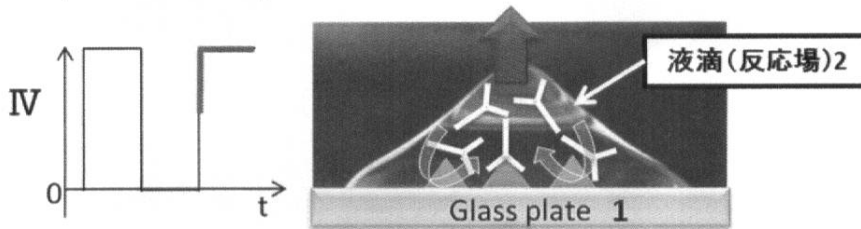
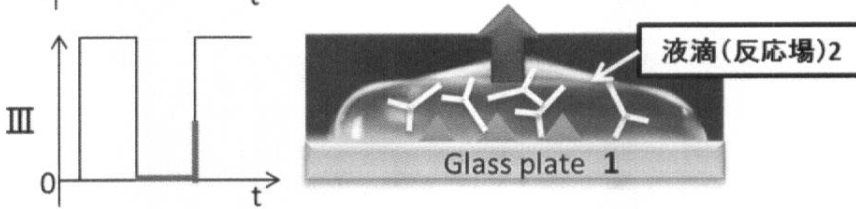
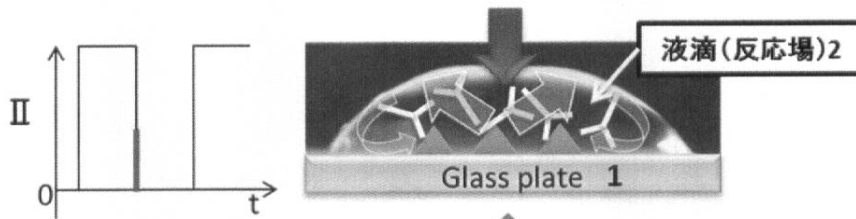
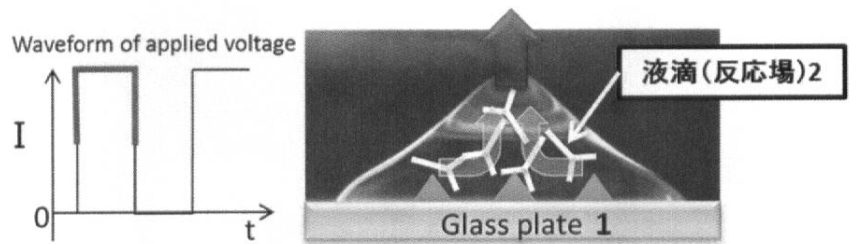
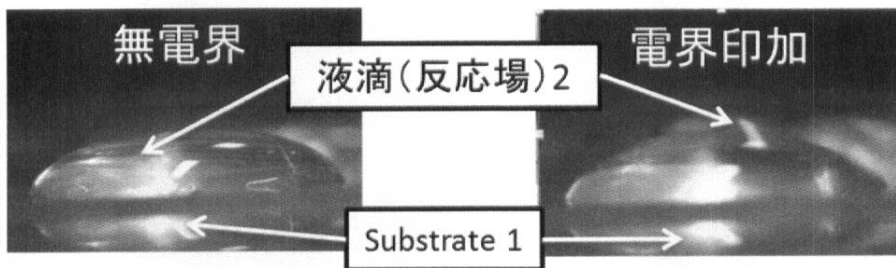
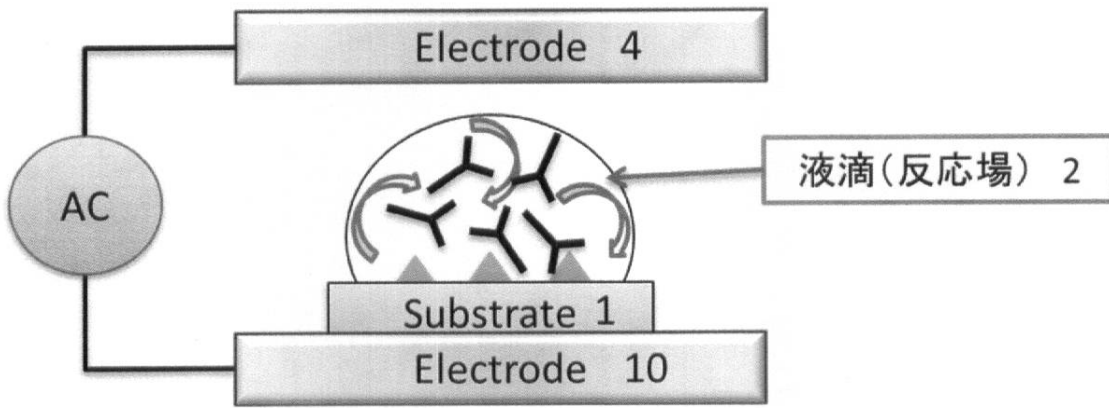
【図1】



電界洗浄構想概要図

【図2】

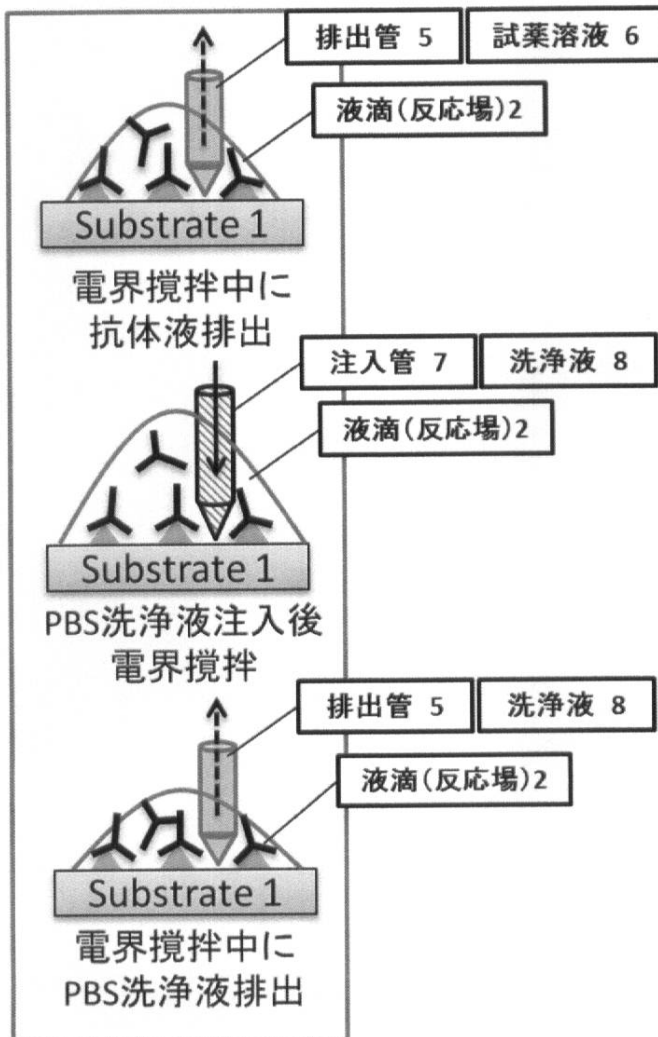
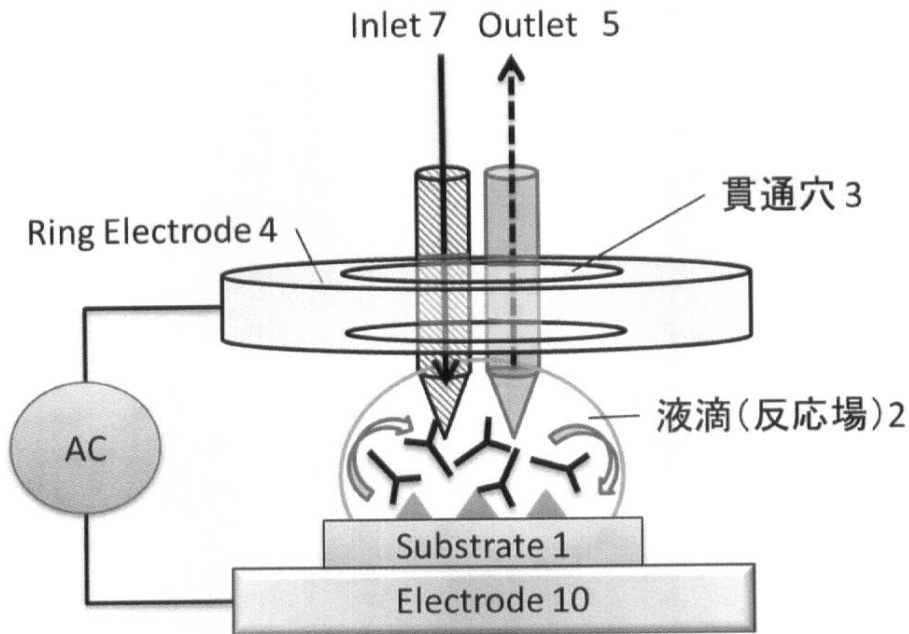
攪拌メカニズム



Y Antibody ▲ Antigen

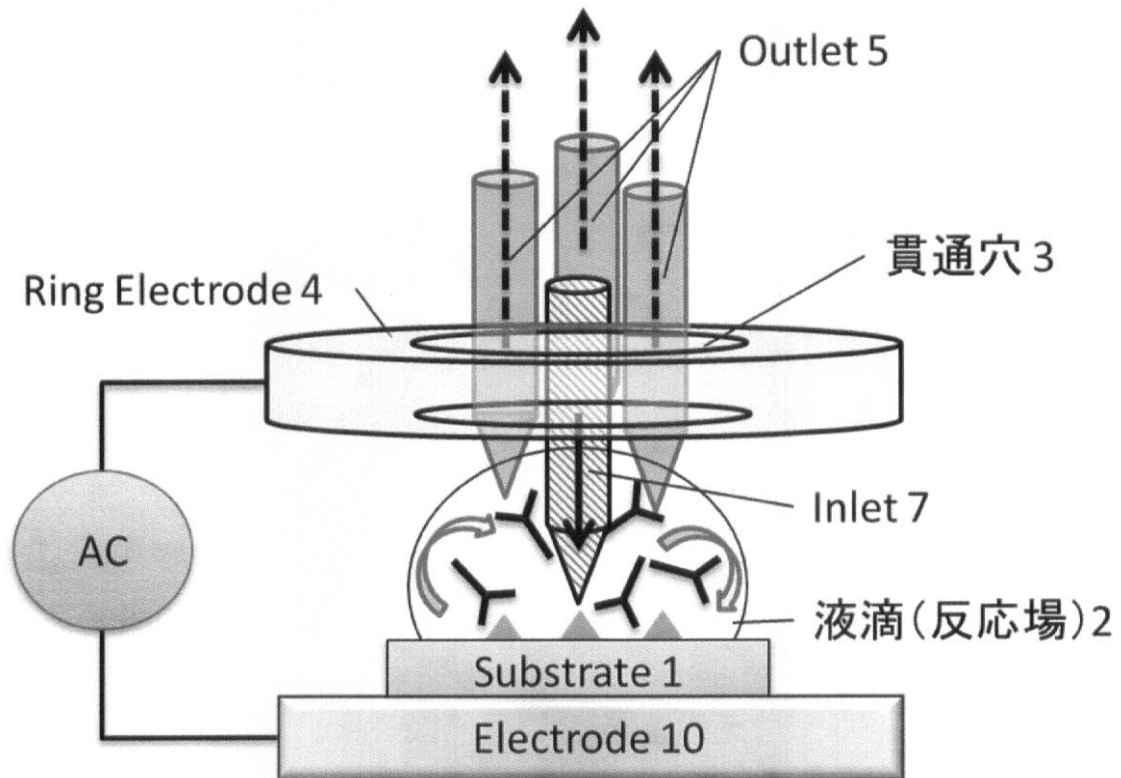
【図3】

攪拌・洗浄メカニズムの概要図



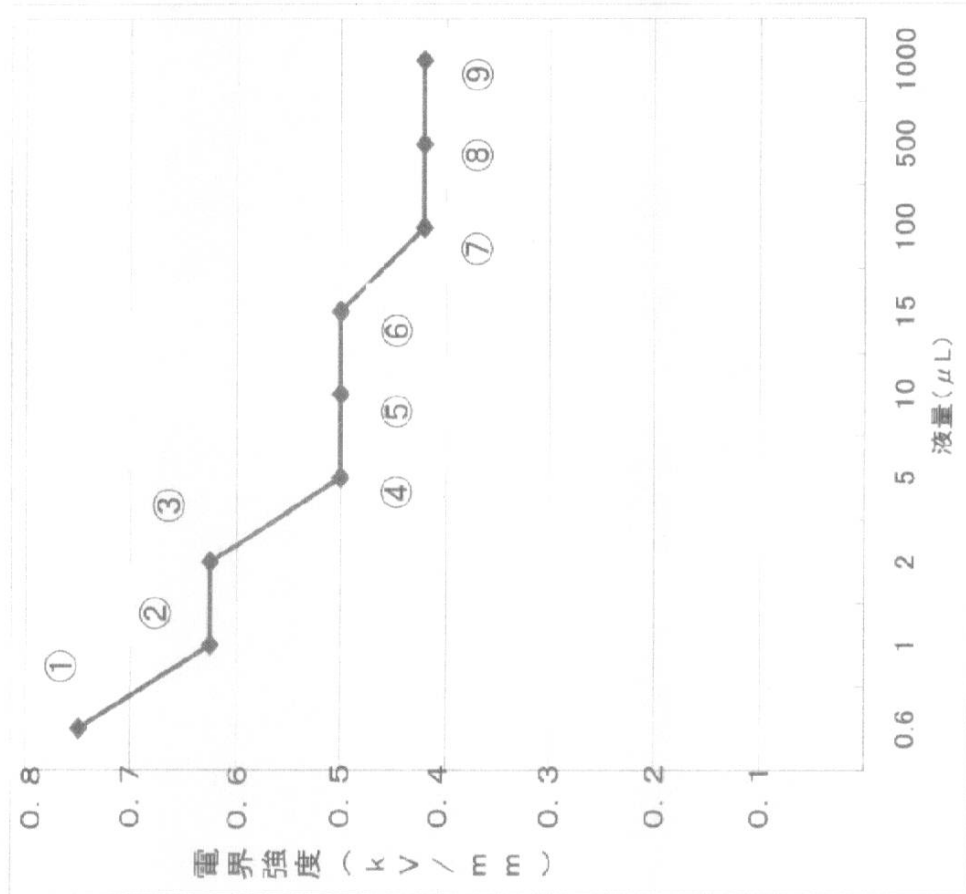
【図4】

複数注入排出管の例



【 図 5 】

0.05%炭酸Ca-滅菌超純水 攪拌が生じた液滴量と印加電圧の関係

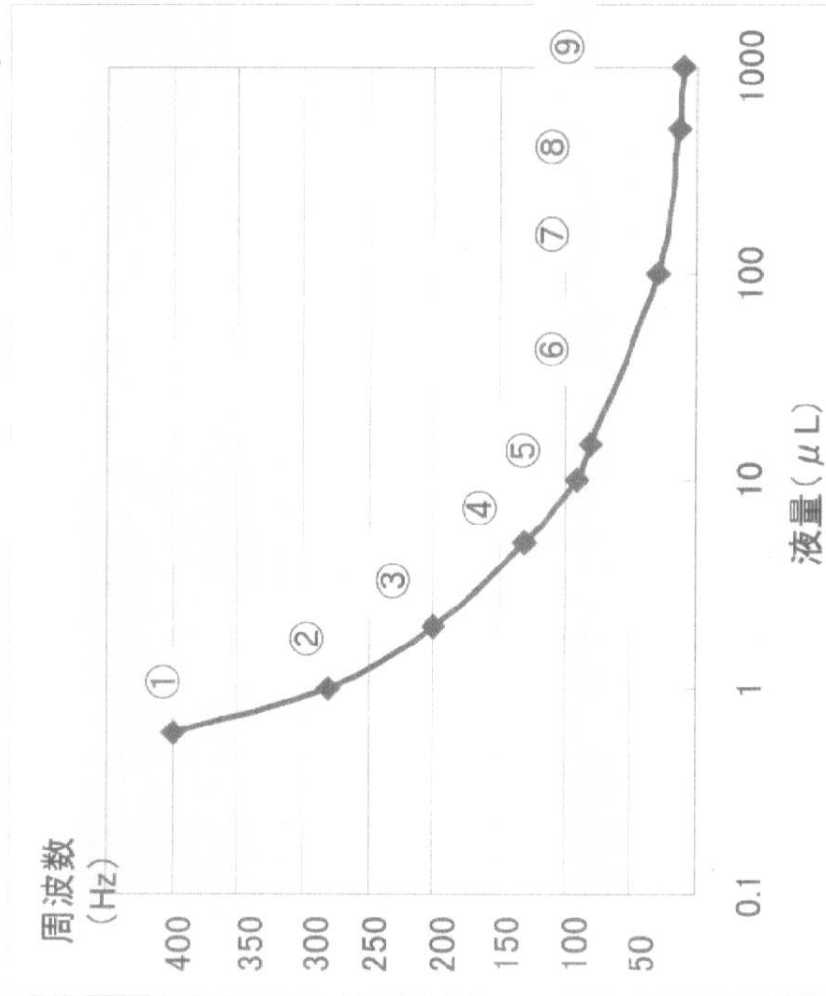


①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
0.75	0.63	0.63	0.5	0.5	0.5	0.42	0.42	0.42
0.6	1.0	2.0	5.0	10	15	100	500	1000
液量 (μL)								
電界強度 (kV/mm)								

【図6】

0.05%炭酸Ca-滅菌超純水 攪拌が生じた液滴量と印加周波数の関係

液量と攪拌が生じた周波数



	液量 (μL)	周波数 (Hz)
①	0.6	400
②	1.0	280
③	2.0	200
④	5.0	130
⑤	10	90
⑥	15	80
⑦	100	30
⑧	500	14
⑨	1000	10

【図7】

＜HE 染色＞ ＜迅速免疫染色法＞

ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE)	工程時間	免疫組織染色 (IHC)	工程時間
①水洗	15秒	①PBS洗浄	15秒
②ヘマトキシリン	1分	②内因性PO除去	15秒
③水洗	15秒	③PBS洗浄	30秒
④エオシン	1分	④ブロッキング	5分
⑤エタノール洗浄	15秒×4槽	⑤＜一次抗体＞	電界 5分
⑥キシレン洗浄	15秒×4槽	⑥＜PBS洗浄＞	30秒
⑦封入	30秒	⑦＜二次抗体＞	電界 5分
合計時間	5分	⑧PBS洗浄	30秒
		⑨DAB発色・洗浄	2分
	電界攪拌工程	⑩核染・封入	1分
		合計時間	20分

【 図 8 】
染色実験結果

① 現状の電界攪拌ならびに用手法洗浄工程

- 1次抗体 平板電極5min
- 用手法洗浄
- 2次抗体 平板電極5min
- 用手法洗浄



② リング電極による電界攪拌ならびに電界洗浄工程

- 1次抗体 リング電極5min
- 電界洗浄30sec × 1回
- 2次抗体 リング電極5min
- 用手法洗浄



③ リング電極による電界攪拌ならびに電界洗浄2回工程

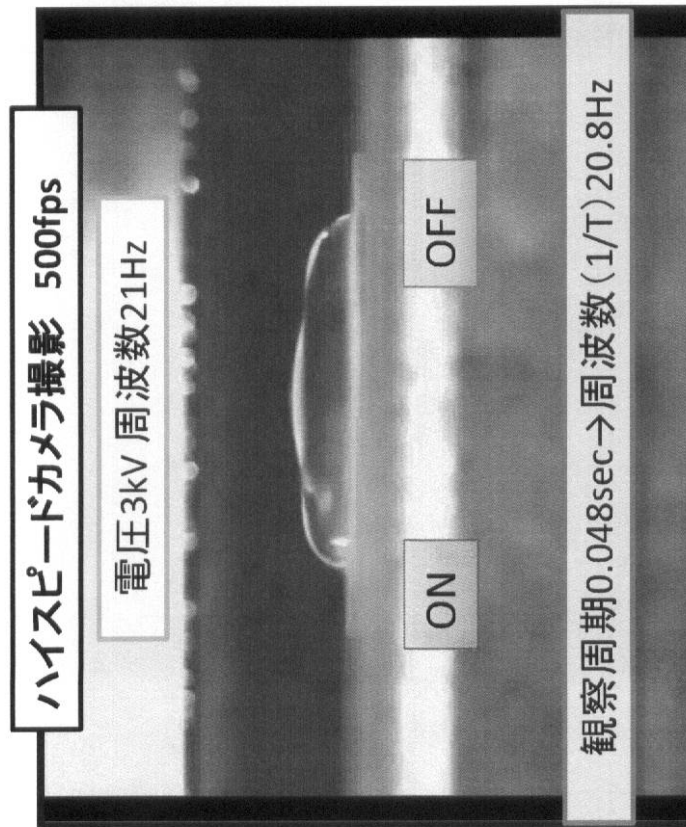
- 1次抗体 リング電極5min
- 電界洗浄30sec × 2回
- 2次抗体 リング電極5min
- 用手法洗浄



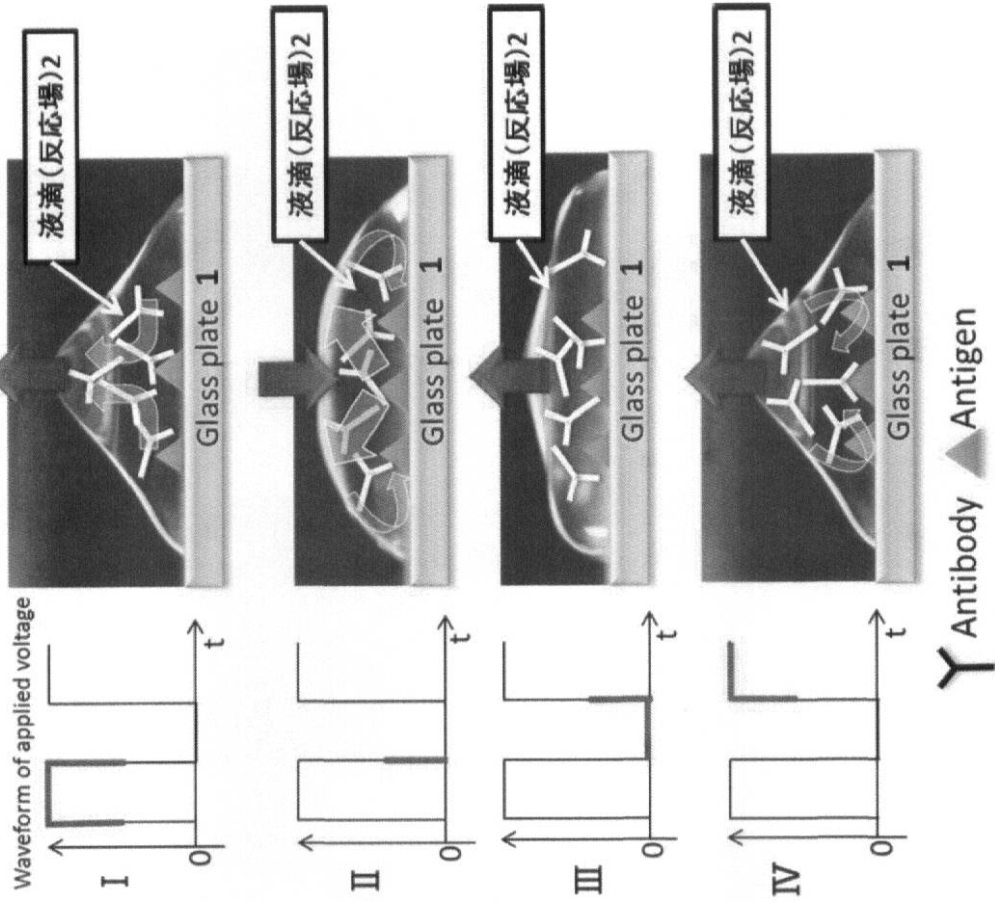
これより現状の電界攪拌ならびに用手法洗浄とリング電極による電界攪拌ならびに電界洗浄による染色性は同等である。

【 図 9 】

(a)



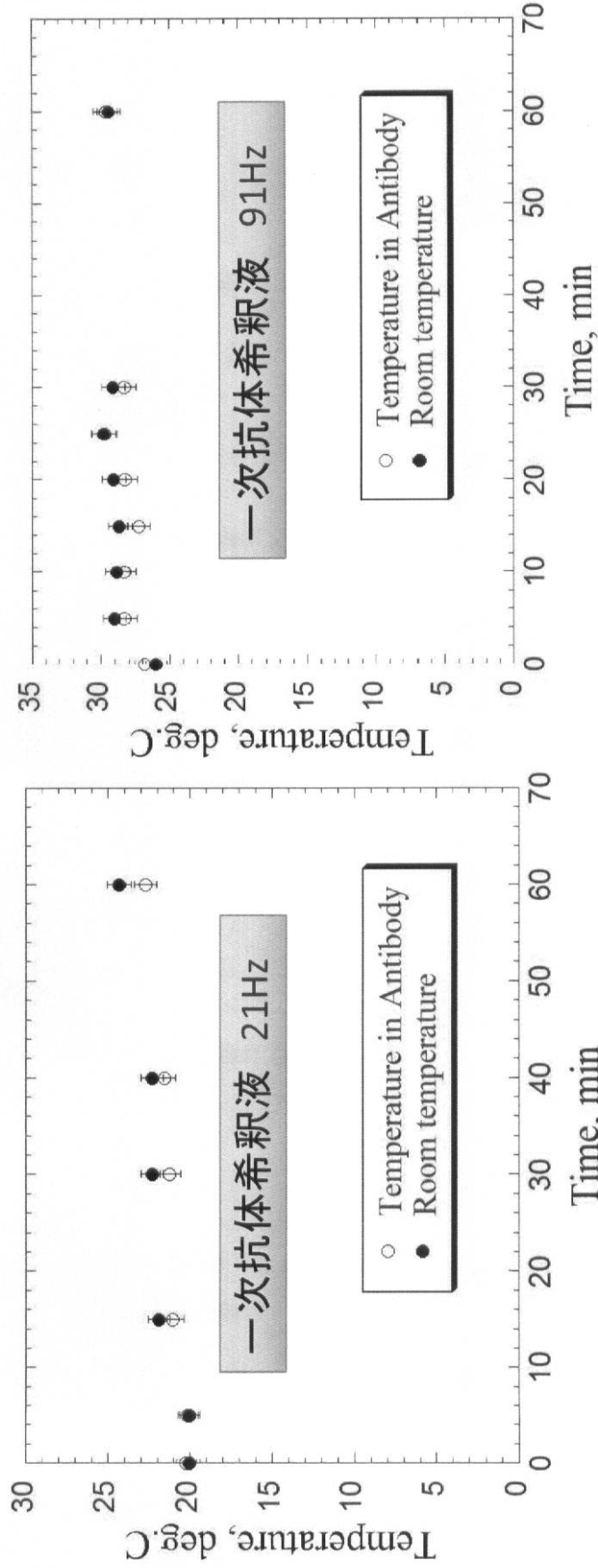
(b)



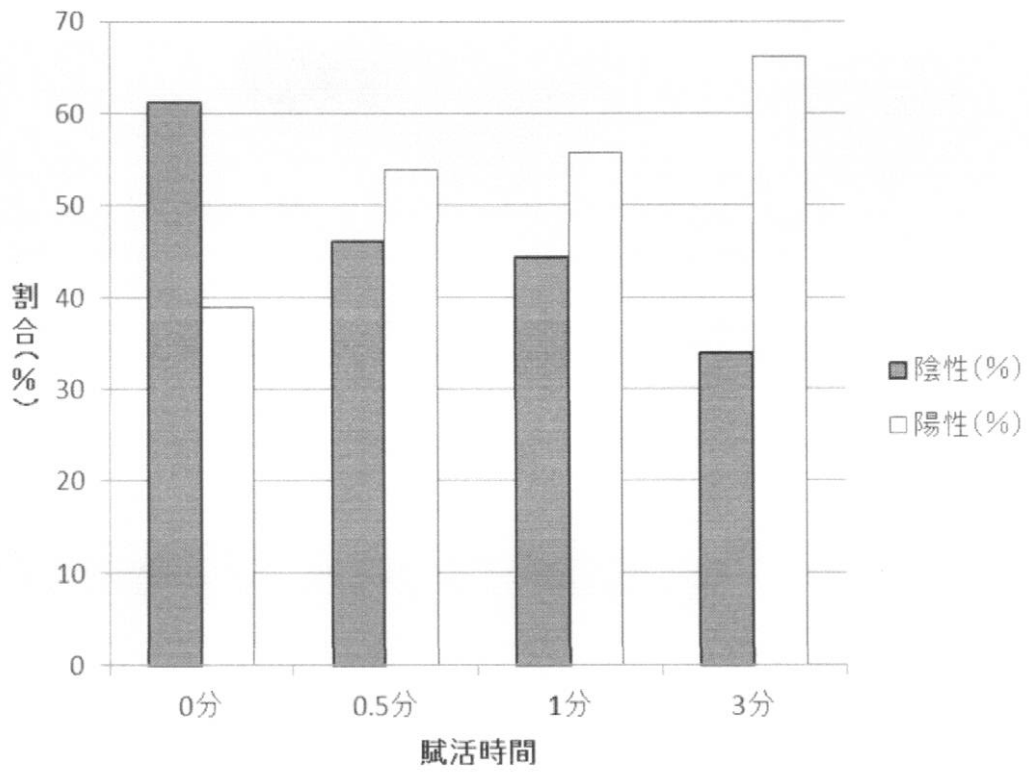
【 図 10 】

攪拌条件

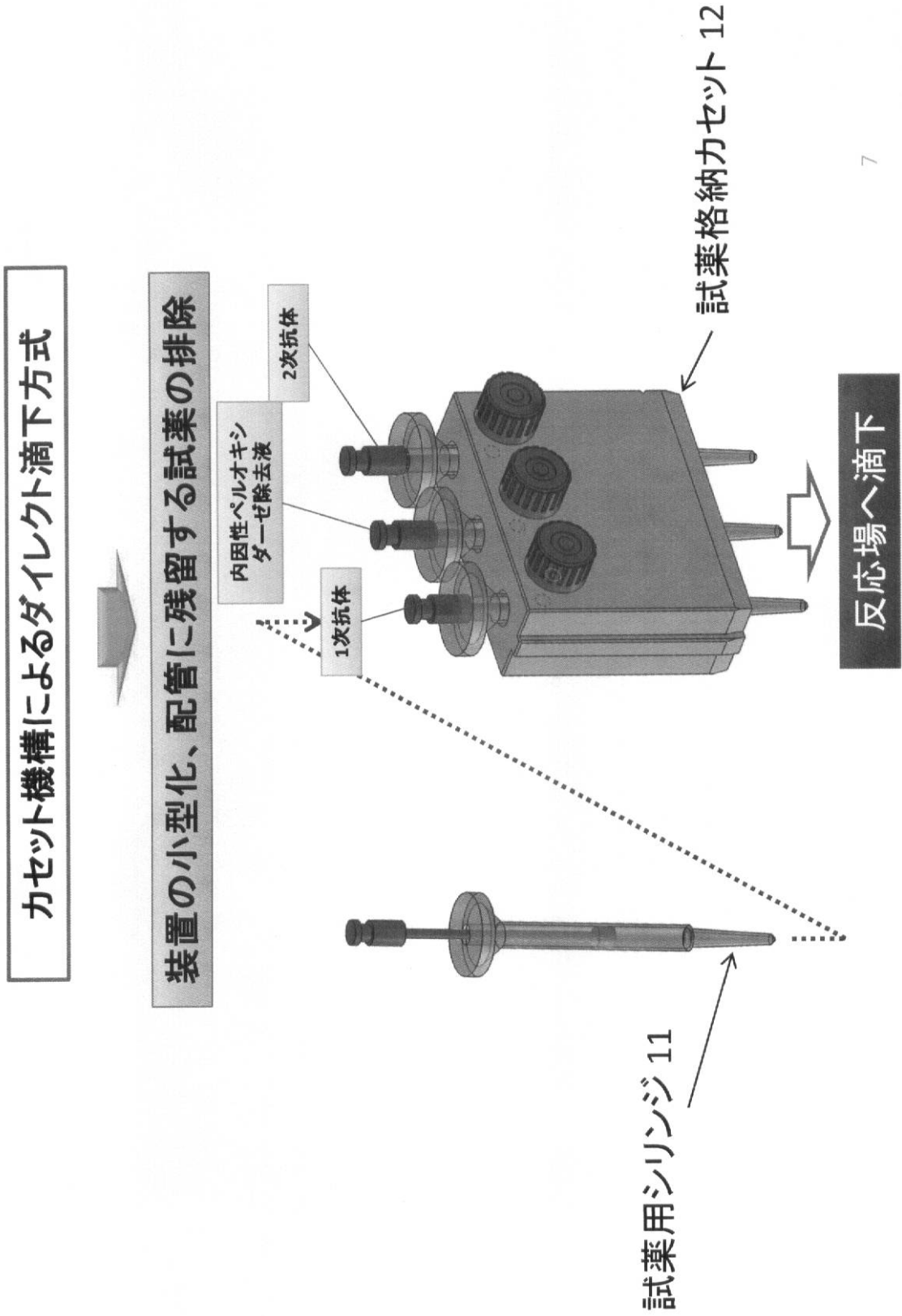
抗体液量(μL)	150
一次抗体周波数(Hz)	21 91
電極間距離(mm)	5.4
電圧(kV _{p-p})	3



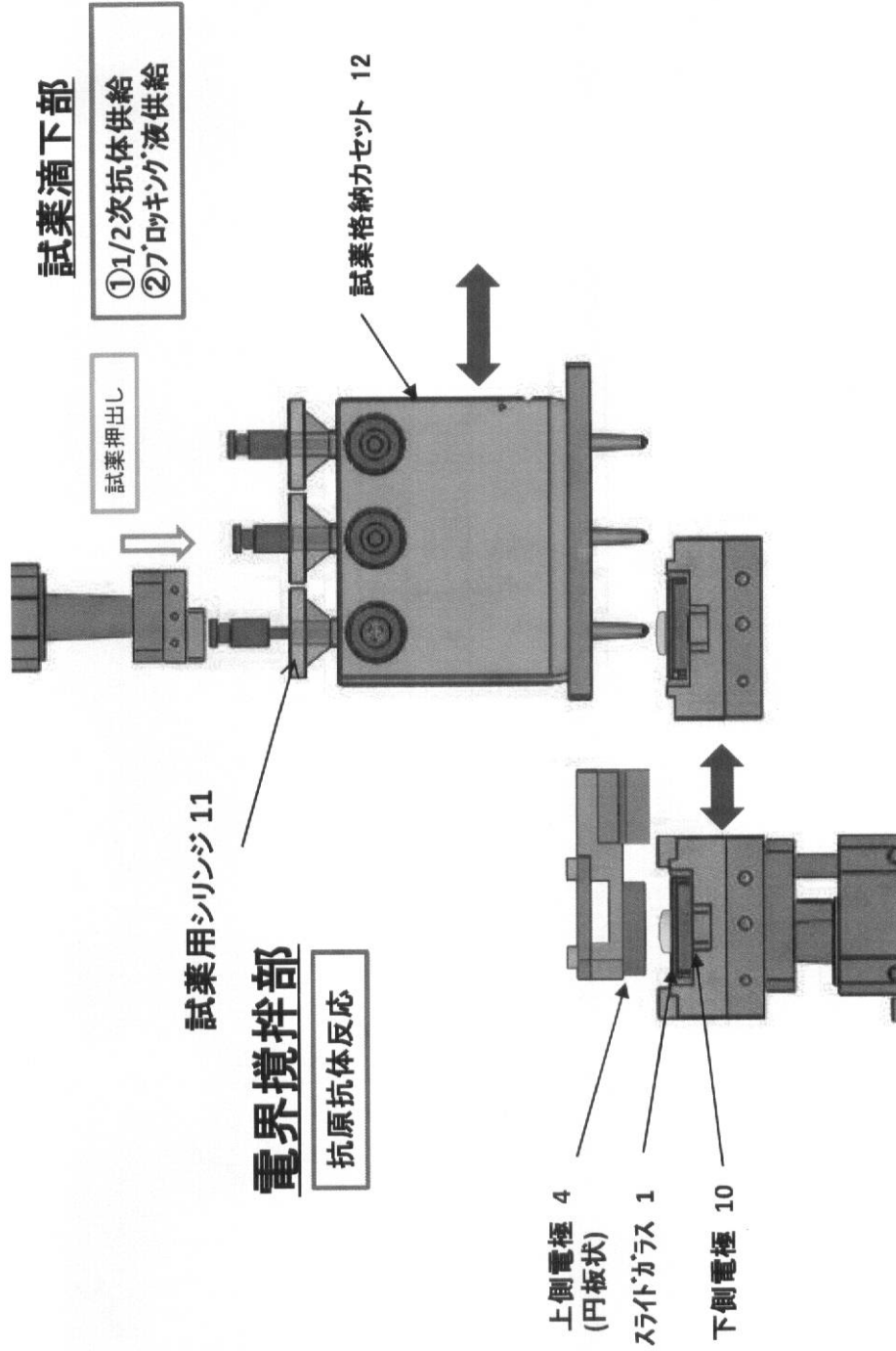
【図 11】



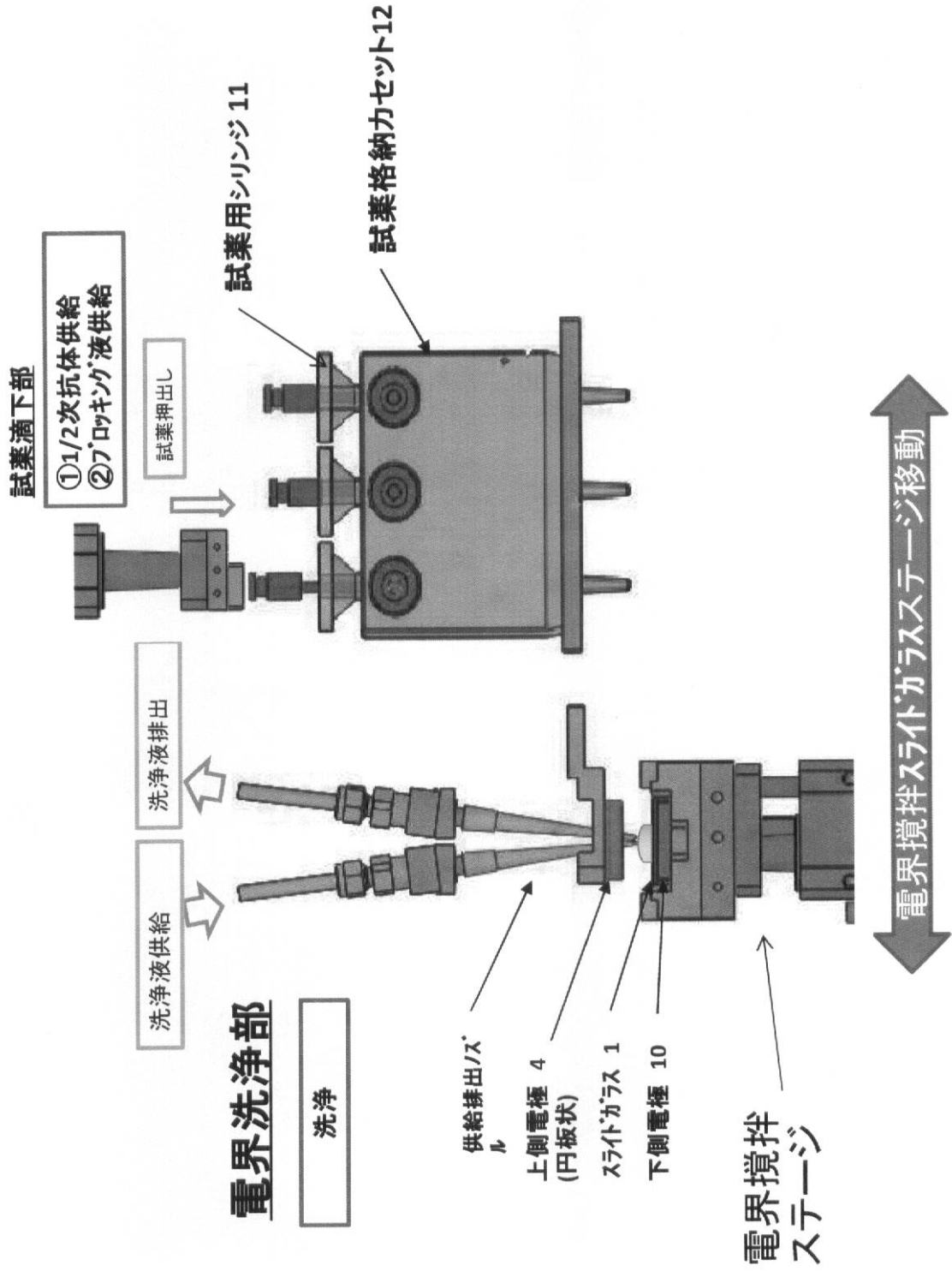
【 図 1 2 】



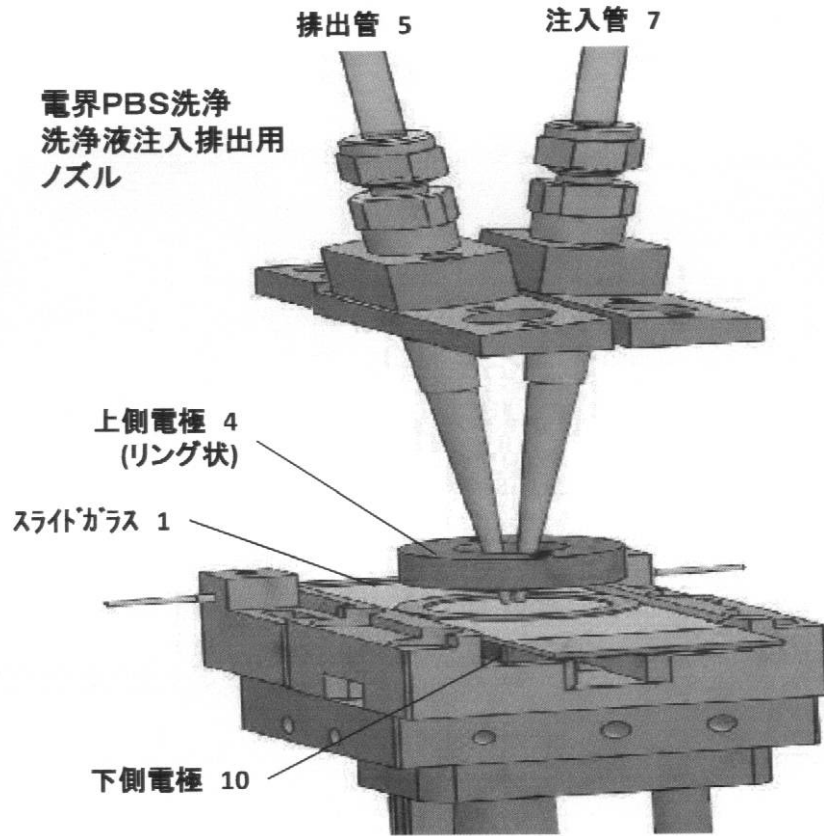
【 図 1 3 】



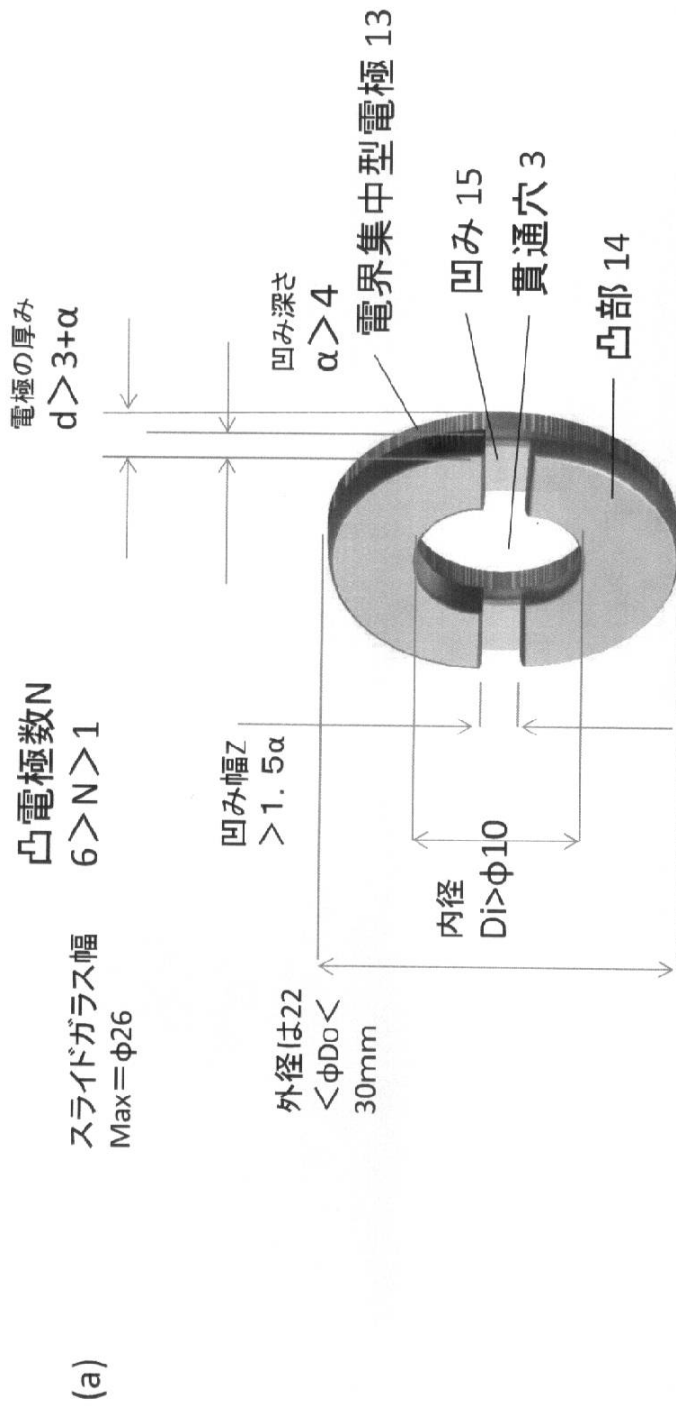
【 図 1 4 】



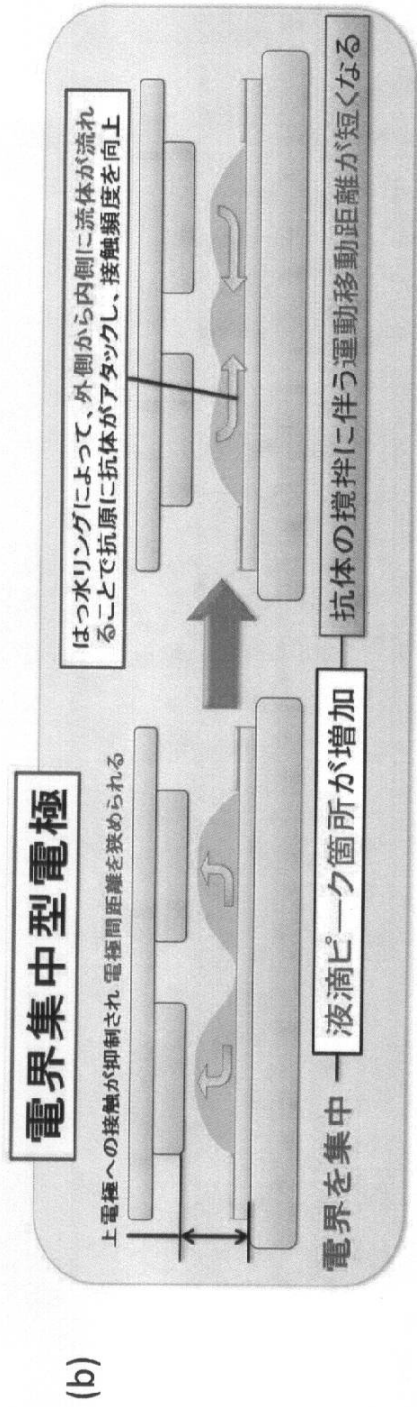
【図15】



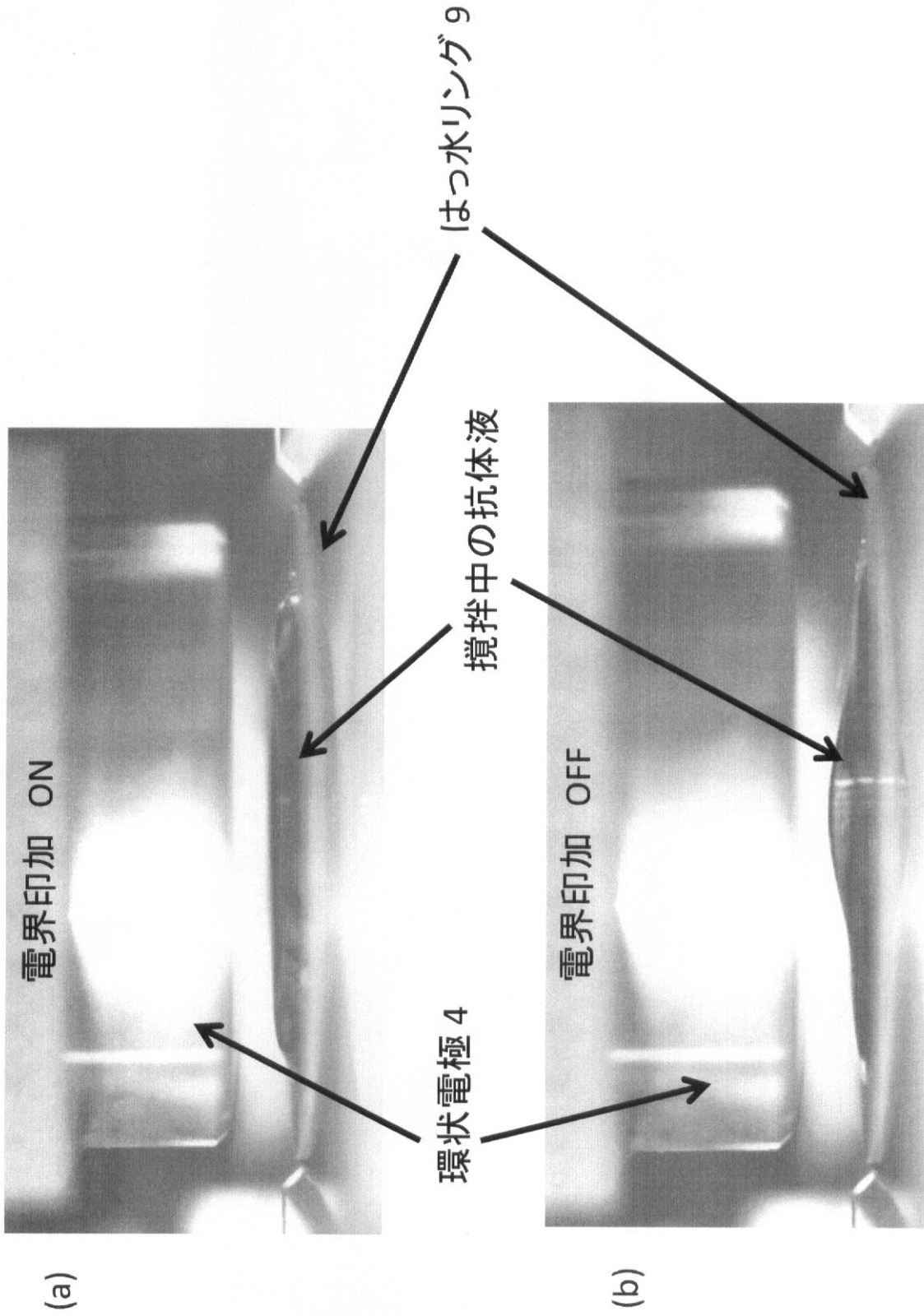
【 図 16 】



注) 既存のスライドガラスを用いない場合には被搅拌液滴の外周部 $> X + 4\text{mm}$

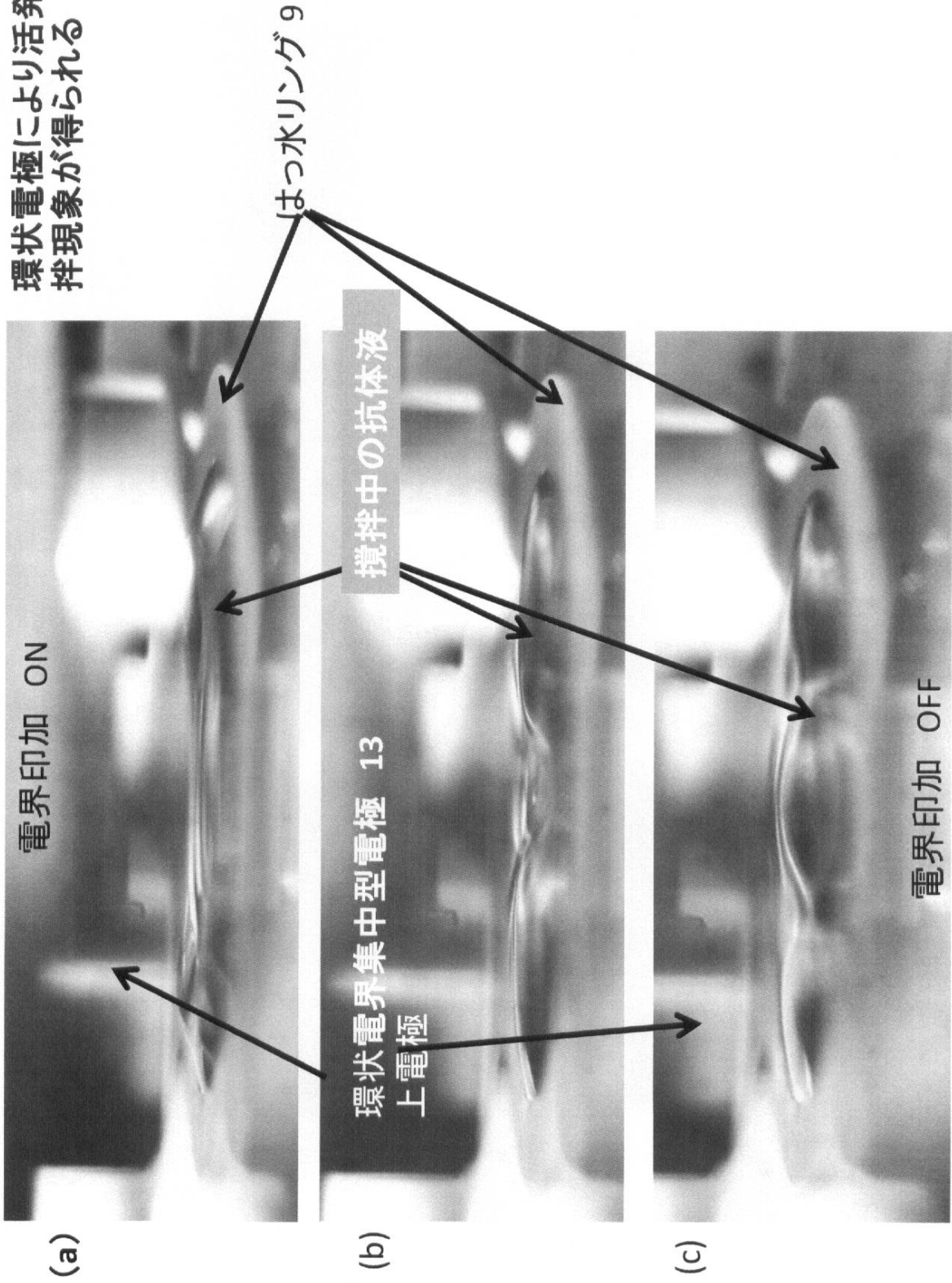


【図17】

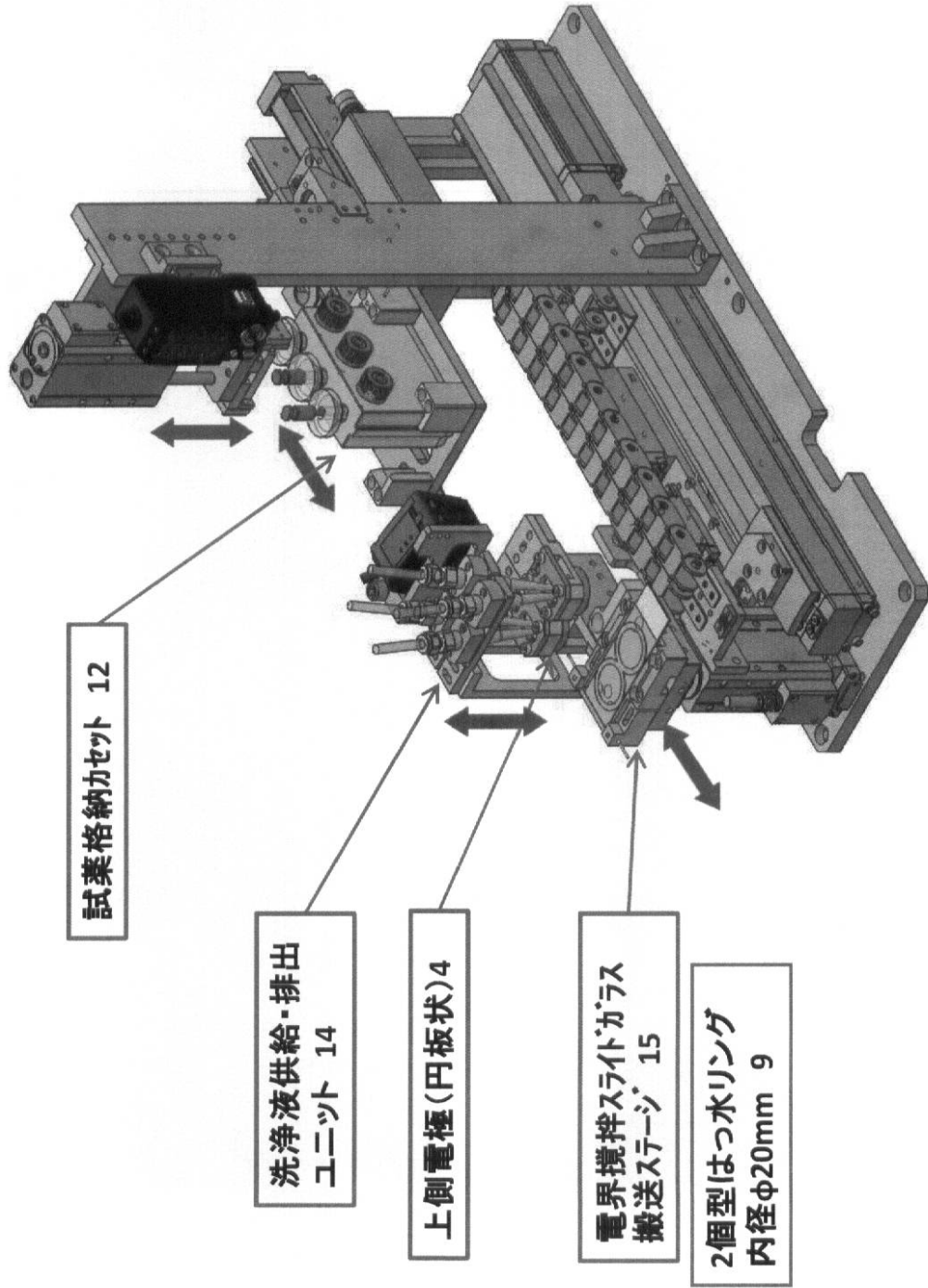


【 図 18 】

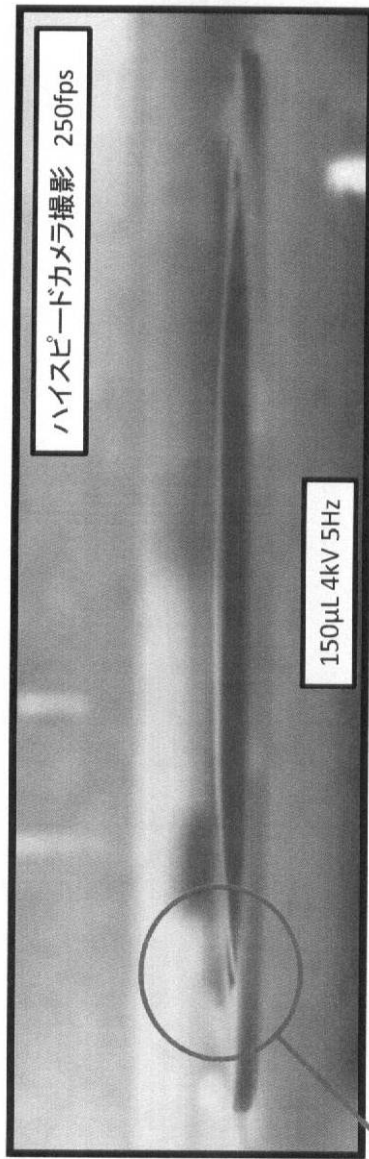
環状電極により活発な攪拌現象が得られる



【図20】



【 図 2 1 】

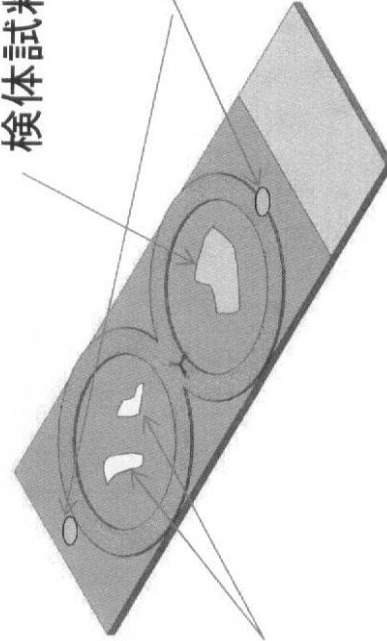


(a)

リングの厚みが重要

検体試料：抗原 17

取り外し用タグ 18

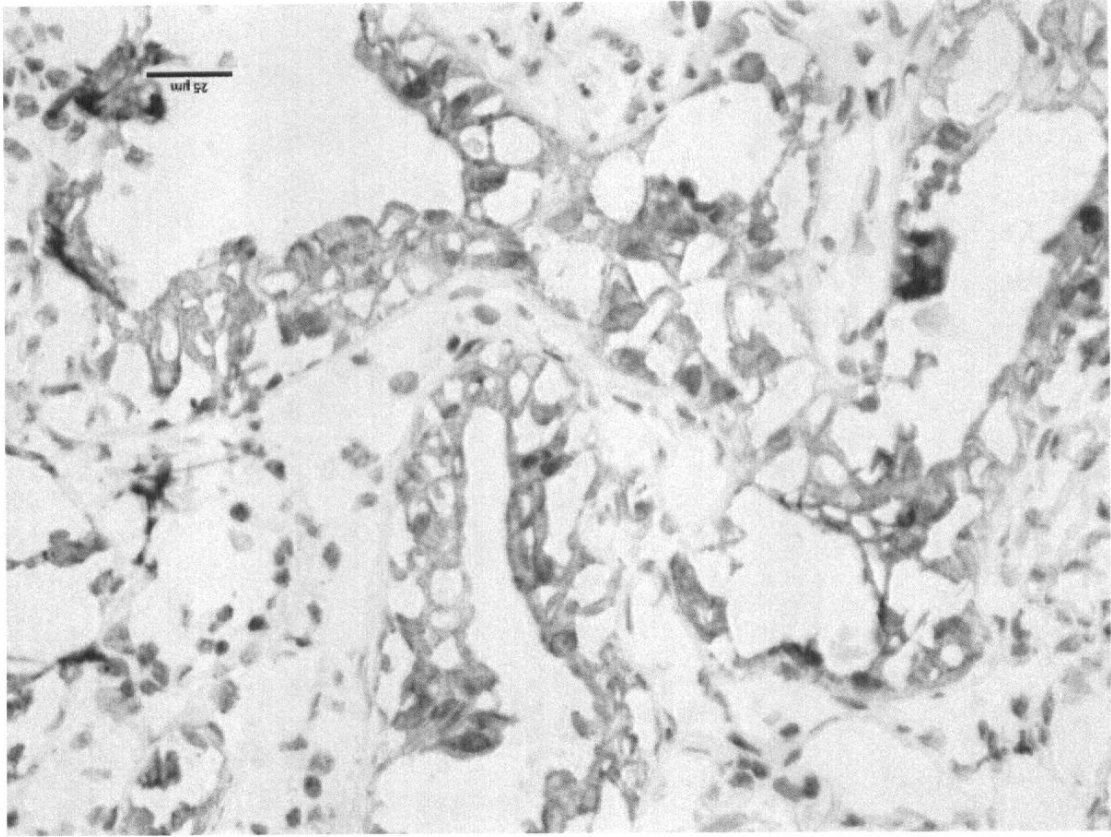


(b)

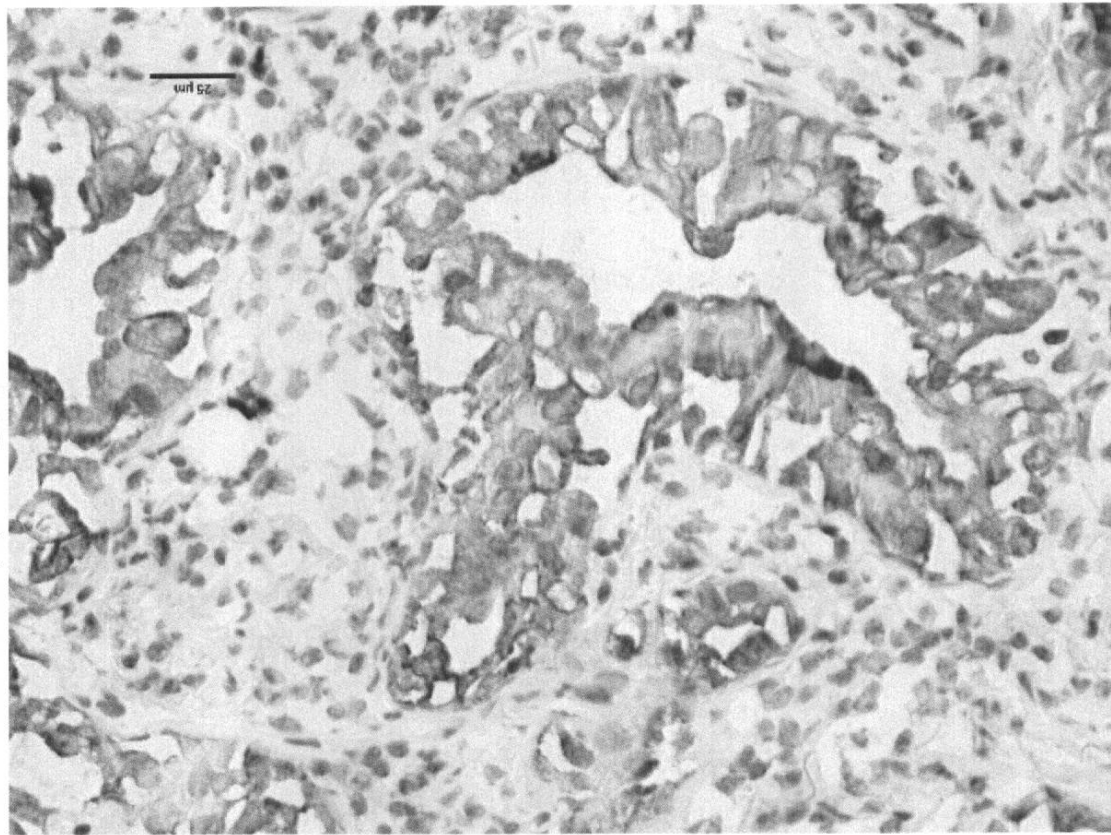
陽性コントロール 16

【 図 2 2 】

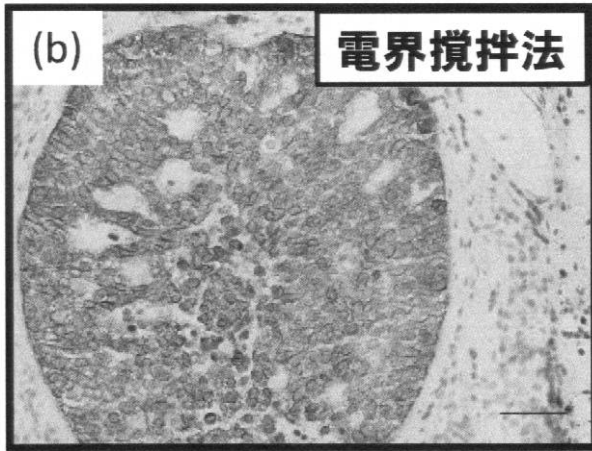
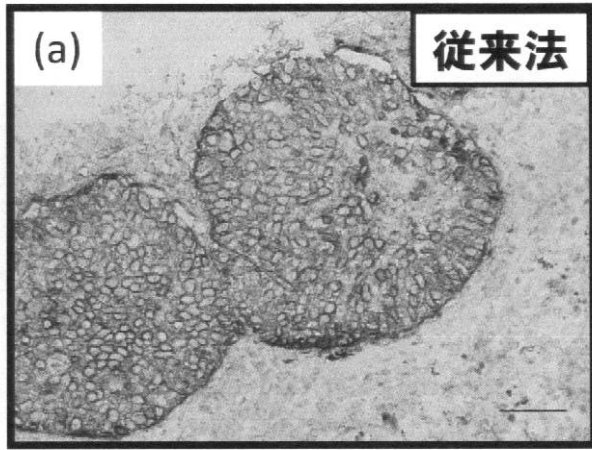
(b) 無電界



(a) 電界



【 図 2 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 加賀谷 昌美
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内
- (72)発明者 中村 竜太
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内
- (72)発明者 池田 洋
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内
- (72)発明者 南谷 佳弘
秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学法人秋田大学本道キャンパス内
- (72)発明者 南條 博
秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学法人秋田大学本道キャンパス内

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開2010-119388(JP,A)
特開平07-263437(JP,A)
加賀谷昌美, 産学官連携イノベーション顕在化事業 医工連携による医療機器開発, 秋田県産業技術センター業務年報, 2012年, Vol.2012, pp.69-70

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|------|-------|
| G01N | 33/48 |
| G01N | 1/38 |
| G01N | 33/53 |

专利名称(译)	电场清洗方法，电场免疫组织染色方法，电场清洗装置，电场免疫组织染色装置		
公开(公告)号	JP5754520B2	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	JP2014009634	申请日	2014-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	秋田县 国立大学法人秋田大学		
申请(专利权)人(译)	秋田县 国立大学法人秋田大学		
当前申请(专利权)人(译)	秋田县 国立大学法人秋田大学		
[标]发明人	赤上陽一 加賀谷昌美 中村竜太 池田洋 南谷佳弘 南條博		
发明人	赤上 陽一 加賀谷 昌美 中村 竜太 池田 洋 南谷 佳弘 南條 博		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N1/38		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N1/28.Y G01N1/38		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB14 2G045/BB24 2G052/AA33 2G052/FA09 2G052/FC09		
代理人(译)	福田贤三 福田进一 加藤恭介		
优先权	2013009321 2013-01-22 JP		
其他公开文献	JP2014160061A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供电场清洁方法，电场清洁装置，使用其的电场免疫组织染色方法，我们提出了一种电场免疫组织染色体。本发明的一种场清洗方法被放置在下部电极10，形成于该玻璃板1下降2的反应场中，板形电极或环电极4具有通孔从上侧3面是，0.4~2.0千伏/毫米到正侧由于所施加的电场强度，这在偏移磁场强度0.15~1.0千伏/加入毫米，初级电压通过在频率0.1~800赫兹的范围内进一步施加交流电压，产生偏向正侧的重复方波，有同时使用，由于产生的电场搅拌器现象提供了一种方法用于现场清洗，从排出管的贯通孔板状电极或环电极4的3到液滴反应场2排出溶液6 5通过从插入注入管7插入到注入清洗液8中的试剂的步骤中的通孔3到液滴反应场2，通过进行非悬挂在液滴并排出特定的反应物质。点域1

(21) 出願番号	特願2014-9634 (P2014-9634)	(73) 特許権者	591108178
(22) 出願日	平成26年1月22日 (2014. 1. 22)		秋田県
(65) 公開番号	特開2014-160061 (P2014-160061A)		秋田県秋田市山王4丁目1番1号
(43) 公開日	平成26年9月4日 (2014. 9. 4)	(73) 特許権者	504409543
審査請求日	平成26年1月22日 (2014. 1. 22)		国立大学法人秋田大学
(31) 優先権主張番号	特願2013-9321 (P2013-9321)		秋田県秋田市手形学園町1番1号
(32) 優先日	平成25年1月22日 (2013. 1. 22)	(74) 代理人	100082669
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 福田 賢三
		(74) 代理人	100095337
(出願人による申告) 平成25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			弁理士 福田 伸一
新型免疫組織染色装置の開発; 委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	100095061
			弁理士 加藤 泰介
		(72) 発明者	赤上 陽一
早期審査対象出願			秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内
			最終頁に続く