J164016

電界攪拌による抗原抗体反応の迅速化

加賀谷 昌美 赤上 陽一

Rapid antigen-antibody reaction using electric field noncontact stirring technology

Masami KAGAYA , Yoichi AKAGAMI

Akita Industrial Technology Center
4-11, Sanuki, Araya-machi, Akita, 010-1623 Japan

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is necessary to be expected as a method for detection of previous disease to become a next generation safety and healthy society. We have developed a technology of μL -order droplet stirring method, so called electric field non-contact stirring technology (E.N.S.). It became possible to be shorten processing time within 30 minutes using E.N.S. for antigen-antibody reaction.

Key Words : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, electric field non-contact stirring technology, antigen-antibody reaction

1. 緒言

迅速で高精度に罹患状態の判定が可能となれば、個々人の予防医療に役立つものと期待される。現行の酵素免疫測定法（ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay）では、96 穴プレートを用いて 50~100 μL の試薬量で、①抗原定着工程 ②ブロッキング工程 ③抗原抗体反応工程 ④発色工程の各工程に 30 分間~1 時間を要し、全工程を完了するには 4 時間程度を要する。本技術を臨床現場に積極的に適用するためには、抗原抗体反応時間の短縮化が必要である。私たちは、 μL オーダーの攪拌技術を開発し、本技術を抗原抗体反応へ導入することを検討している。

2. 電界攪拌技術について

電界攪拌技術の基礎となる電界砥粒制御技術は、電極間を溶液で満たし、電界を与えることによって発生する誘電率の差に着目し、工具刃先の仕上げ加工の研磨時に積極的に活用されている⁽¹⁾。本技術を微量液滴の攪拌に適用すると、図 1 に示すように、4kV を与えると良好な攪拌挙動が得られた⁽²⁾。液滴の挙動を図 1 に示す。

Fig.1 Stirring behaviors of liquid drop by various electric fields

3. 実験方法

3.1 実験準備

3.1.1 電界攪拌基板の作製

良好な電界攪拌技術の効果を得るためには、試料液滴形状がドーム形状を呈する必要があるため、図 2 に示す試料滴下部を $\phi 2\text{mm}$ とし、基板面より 1mm の高さを持たせた台座形状にした。用いた材質はポリスチレンとし、射出成形にて作製した。基板の概要図を図 2 に示す。

3.1.2 抗体定着性評価実験

種々の分子量の抗体が定着可能な基板を得るために、図 2 の $\phi 2\text{mm}$ の台座表面性状の調製を行った。加工条件は、固定砥粒にて荷重 100g, 200rpm 加工時間 10 秒間にて行った。試薬は Bethyl 社製の Human IgM quantification kit を用いた。評価工程を表 1 に示す。実験準備工程は、補足抗体定着工程と抗原抗体反応を用いた検出工程の二部門で構成されている。

⁽¹⁾ 正員、秋田県産業技術センター（〒010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-11）

E-mail: akagami@rdc.pref.akita.jp

Fig.2 Prototype substrate using injection molding process

3.2 電界攪拌導入実験

電界攪拌技術は表1に示す検出工程の⑤試料調合ならびに⑦の検出工程に導入する。ここで用いる電界攪拌装置の概要図を図3に示す。上部からの観察が可能のように、上電極には I.T.O. 透明電極を用いた。実験に用いた電界条件は 4kV, 170Hz 一定とした。

Fig.3 Setup for Electric field noncontact stirring method

Table.1 ELISA process

捕捉抗体定着工程	Reagent	conventional (min)	Rapid (min)
① Capture ntibody	1 μ g/mL	60	60
② Washing		5 $\times$ 2	5 $\times$ 2
② Blocking	1%egg albmin	30	30
④ Washing		5 $\times$ 2	5 $\times$ 2
[time]		110	110
検出工程			
⑤ Synthesis	1-1000ng/mL	60	E.N.S 5
⑥ Washing		5	1
⑦ Detection	1 μ g/mL	60	E.N.S 5
⑧ Washing		5	1
⑨ Color	3mM	30	5
[Processing time]		160	17

4. 実験結果

用いた基板の抗体定着性評価結果を図4に示す。表面粗さ Ra 0.1 μ m の射出成形基板では、捕捉抗体は定着可能であるが、ブロッキング剤の定着性は低かった。そのため、固定砥粒を用いて基板台座部に追

加工を行うと、ブロッキング剤の定着性が向上した。表面粗さは Ra 0.5 μ m であった。

Fig.4 Capture antibody fixing results

電界攪拌を抗原抗体反応に導入した結果を図5に示す。攪拌時間5分ならびに静置法60分では濃度勾配に合った彩度が得られた。一方、電界攪拌1分では彩度が低いため、反応が未完了であると考えられた。これより、電界攪拌によって抗原抗体反応が約10倍加速し60分を5分に短時間化できることを確認した。

Fig.5 Rapid Detection results

5. 結 言

得られた射出成形基板を用いて、その滴下台座面を Ra 0.5 μ m に加工し、電界攪拌技術を抗原抗体反応工程に適用することによって、従来2時間以上を要していた酵素免疫測定法の検出工程を30分以内に可能なことを明らかにした。

6. 文 献

- (1) 赤上 粒子分散型誘電流体を用いた加工法, 特許 359521 号.
- (2) 赤上, 加賀谷 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 119388 号