

平成24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」

研究成果報告書(要約版)

平成 25年 2月

委託者	経済産業省
委託先	公益財団法人あきた企業活性化センター

## 目 次

### 第 1 章 研究開発の概要

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標 . . . . . 1
- 1-2 研究体制 . . . . . 6  
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)
- 1-3 成果概要 . . . . . 13
- 1-4 当該プロジェクト連絡窓口 . . . . . 14

### 第 2 章 本論

- 2-1 試作装置開発 . . . . . 17
- 2-2 迅速洗浄技術の開発 . . . . . 18
- 2-3 免疫染色性の品位高度化 . . . . . 20
- 2-4 診断用抗体開発 . . . . . 22

### 第 3 章 全体総括

- 3-1 全体総括 . . . . . 26
- 3-2 今後の課題 . . . . . 27

## 第 1 章 研究開発の概要

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### (1) 研究の目的

昨今のがん治療では、進行度に応じて切除範囲を決め、最適な低侵襲・低負荷手術を行う傾向にある。その際に用いられる術中病理診断は、個別化の判断根拠として重要であるものの、時間の制約上、現行は診断精度の低いHE染色が唯一であり、その他の手法でも人手と時間を要する。

本事業は新たな攪拌技術を用いて診断精度の高い免疫染色を高速化する自動免疫染色装置を開発し、術中に不可能であった免疫染色診断を可能にすることを目的とする。

#### (2) 研究の概要

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染色が用いられている。しかし、HE染色は小さながん遺残やリンパ節微小転移が見逃されることが多い。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る。

現在、Sysmex社から約30分で遺伝子増幅する技術を用いたOSNA法によるリンパ節転移診断機器が販売されている。しかし、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、信頼性を欠くものとなっている。

また、数社から自動免疫染色装置が既に市販されている。しかし、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適用することはできない。

この問題を解決し、免疫染色を迅速に行うために、新たな攪拌技術を導入した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。

しかし現状では繁忙な医療スタッフが手動の装置操作作業を行う必要があり、実用的な病理診断手法とするにはさらに操作の簡便化を図る必要がある。そこで装置操作の自動化をねらいとして、H24年度は(3)実施内容で示す試作装置等を開発し、これらを知財化するために2件以上の特許出願を行う。

#### (3) 実施内容

##### ①試作装置開発

(株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター、国立大学法人秋田大学)

自動化に向けてラボベースにて洗浄技術を確認する必要がある。そのため攪拌検証装置を1台開発する。その成果を基に洗浄工程と攪拌工程とを連係させた一次プロトタイプを1台作製する。

なお、各装置の設計の実証試験にあたり、部品設計及び確認評価のために機構

設計用 CAD を 2 式、3D 形状設計用 CAD 1 式をリースし、株式会社アクトラスと秋田県産業技術センターに設置し、設計情報の共有化と効率化を図る。

①-1 基本動作確認用攪拌検証装置試作開発

自動化を可能にするコア技術として攪拌技術に洗浄機能を導入する洗浄技術を検討するために攪拌検証装置を 1 台開発する。

(担当:株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター 評価:国立大学法人秋田大学)

①-2 一次プロトタイプの開発

自動化を念頭にラボベースにて洗浄工程と攪拌工程とを連係させた一次プロトタイプを 1 台作製する。

(担当:株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター 評価:国立大学法人秋田大学)

②迅速洗浄技術の開発

(株式会社アクトラス、株式会社セーコン、秋田県産業技術センター、国立大学法人秋田大学、外注先未定)

これまでに試作した迅速抗原抗体装置は洗浄工程毎にスライドガラスを搬出し、医療スタッフが手動にて洗浄作業を行っていたため専従者を要した。この煩雑さを解消するために自動洗浄技術、並びに洗浄液・抗体液滴下技術と排出技術を開発、確立し、新たな知財化のために特許を出願する。

本装置の新たなコア技術となる洗浄技術には攪拌技術を応用する。それにより試料を載せたスライドガラスを移動せずに、許容時間内に本作業を完了させる。作業目標時間は以下の 5 工程を合わせて 2 分以内とする。一次抗体関連の工程では、1) 攪拌 2) 洗浄液滴下 3) 洗浄 4) 洗浄液排出 5) 2 次抗体工程である。現在、洗浄技術は開発進行中であり良好な結果が得られている。一方、洗浄工程の是非については今後検証を深める。

②-1 洗浄液・抗体液の滴下技術と液の排出技術の確立

免疫染色性に影響を与える洗浄液や抗体液の滴下技術とその最適な排出技術を開発するとともに専用容器用金型(はっ水リングプレス型)を開発する。また発色抗体液の見直しを行い工程全体の時間短縮を目指す。

(担当:株式会社セーコン、秋田県産業技術センター 評価:国立大学法人秋田大学)

②-2 自動位置調整

試料の最適な攪拌性を得るためには、スライドガラス上に供与する液滴形状が均一なドーム形状になり、これにより液滴先端と攪拌距離が一定になることが必要である。さらに、用いる抗体液等の粘度によっては、液滴の高さが変化するため、位置決め精度を高めるためには、液滴高さを計測する工程

を開発する。さらに、機能性を有する最適な形状になるように検討を行う。また、攪拌状態の液滴の挙動や反応時間を確認するための画像処理技術の検討も行う。

(担当：株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター 評価：国立大学法人秋田大学)

#### ②-3 攪拌制御装置の高品位化

攪拌性の均一化を図るために攪拌制御装置を開発し良好な攪拌性を得る。

一方、CE マーキングを取得するために電磁波ノイズ並びに電源の発熱抑制対策を完了し、最終年度取得を目標とする。

(担当：株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター (ノイズ評価) 評価：国立大学法人秋田大学)

#### ②-4 操作パネルの改良

既存の医療機器（市販品）の操作パネルを調査するとその優れたデザイン性と容易な操作性を有することが明らかになった。そこで、現行の試作で用いている操作パネルを2系統から1系統にまとめ、優れた操作性が得られるように改良する。これにより、操作者による誤操作の撲滅と操作習熟時間の軽減が図れ、導入障壁の低減が期待できる。

(担当：株式会社アクトラス、秋田県産業技術センター 評価：国立大学法人秋田大学)

#### ③免疫染色性の品位高度化

(株式会社セーコン、秋田県産業技術センター、国立大学法人秋田大学、国立大学法人神戸大学、外注先未定)

高品位な免疫染色性を得るためには、一次・二次抗体の反応時に与える攪拌技術を確立する必要がある。この攪拌性能は、与える場と滴下された液滴頭頂部との距離によって決定される。すなわち液滴の量と形状の均一化が肝要になる。従来の手法では液滴領域を操作者がテンプレートを用いてはっ水性ペンにて、手描きで“円”形状を作成していたが、操作者の筆圧等によってばらつきが生じ、攪拌性及び染色性にもばらつきが生じる原因となっていた。

液滴形状による染色性のばらつきを抑止し、本免疫染色技術の信頼性を確保するため、理想的な“円”形状の液滴が得られる“はっ水リング”を開発する。これにより操作者が変わっても、液滴液下形状の均一化が図られ、攪拌性のばらつきが抑制され本免疫染色技術の高品位化が得られることを明らかにする。また、本攪拌技術による染色品位の確認のために、予めスライドガラスには、ポジティブ・ネガティブコントロールとなる試料を搭載し、免疫染色が正常に機能していることを明らかにする手法も提案し、はっ水リング付専用スライドガラスとして新たな知財確保のために特許を出願する。

### ③-1 はっ水リングの開発

本装置は安定した高品位な免疫染色技術を確立するため、攪拌性能を均一化する装置を開発する。本性能を支配している要因は、スライドガラスに滴下される液滴量と形状である。従来の試作機でははっ水性ペンにて滴下領域を医療スタッフがスライドガラスに描き作成したが、操作者によるばらつきが生じ易く、滴下後の液滴形状にもばらつきが生じた。そのため、ドーム形状となる液滴頭頂部の距離に差異が生じ、攪拌性能および免疫染色性にもばらつきが生じていた。

そこで、滴下する液滴が均一なドーム形状を形成するための“はっ水リング”を開発する。この“はっ水リング”によって、操作者によるばらつきのない均一な液滴形状を形成し、攪拌の性能向上と安定した免疫染色性を目指す。

液滴用“はっ水リング”の仕様としては以下を想定している。

(1) 取り付け・脱着が容易でスライドガラスに接着残査が無い素材であること。

(2) 液滴の液漏れ無き形状精度または優れた密着性を有すること。

(3) 場の印加に悪影響を与えない素材であること。

また、攪拌技術による染色品位の確認のために、スライドガラスに予めポジティブコントロールとなる試料を搭載する。これを専用スライドガラスとして新たな知財化のために特許を出願する。

(担当：株式会社セーコン、秋田県産業技術センター 国立大学法人秋田大学 評価：国立大学法人神戸大学)

### ④診断用抗体開発

(国立大学法人秋田大学、国立大学法人北海道大学、国立大学法人三重大学、国立大学法人神戸大学)

平成 22 年度の戦略的基盤技術高度化支援事業で開発した手動型迅速免疫染色装置及び攪拌技術を用いた迅速免疫染色技術はおもに秋田大学と北海道大学でその有用性が検討された。しかし、抗体の種類も少なく汎用性の観点から十分とは言えないため、診断用抗体の開発に先立ち、自動免疫染色装置向けの抗体の種類汎用性を展開する。

平成 24 年度は秋田大学、北海道大学、三重大学、神戸大学にて手動型迅速免疫染色装置を用いて抗体の種類をさらに増やして本技術の有用性を確認検討する。また免疫染色の迅速化は抗原抗体反応の迅速化のみではなく、前処置、洗浄、後処置の迅速化も重要である。各評価施設において前処置、洗浄後の処置について最適なプロトコルを作成して抗原抗体反応以外の部分の迅速化についても検討を加える。ここで得られたプロトコルを自動免疫染色装置開発に適用する。

#### ④-1 抗体の種類と汎用性の検討

平成 22 年度の戦略的基盤技術高度化支援事業で開発した手動型迅速免疫

染色装置を用いた攪拌を用いた迅速免疫染色技術は現時点で 4 種類の抗体を用いて検討されたが、病理診断に用いる抗体の種類は多く、さらに多くの抗体で本技術の有用性を検討する必要がある。

本年度は抗体開発に先立ち、まず抗体の種類を 8 種類程度に増やして検討を行う（平成 24 年度の目標：秋田大学 8 種、北海道大学 4 種、三重大学 4 種、神戸大学 4 種）。そして染色結果に施設間で差が無いか検討する。

（担当：国立大学法人秋田大学、国立大学法人北海道大学、国立大学法人三重大学、国立大学法人神戸大学）

#### ④-2 迅速化プロトコルの検討

免疫染色の迅速化は抗原抗体反応の迅速化のみではなく、前処置、洗浄、後処置の迅速化も重要である。各施設で前処置、洗浄、後処置の最適なプロトコルを作成して抗原抗体反応以外の部分の迅速化を検討する。

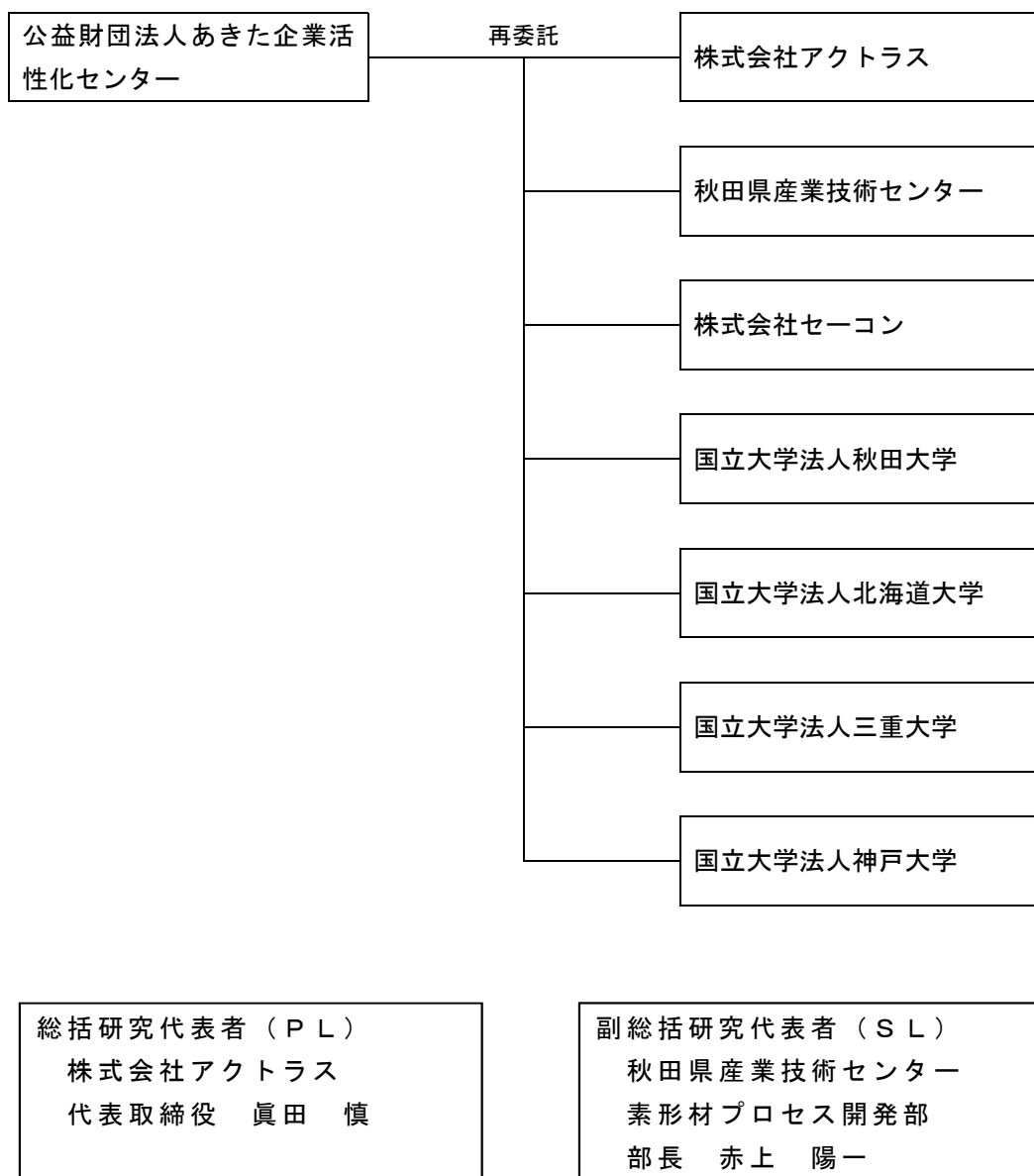
（担当：国立大学法人秋田大学、国立大学法人北海道大学、国立大学法人三重大学、国立大学法人神戸大学）



## 1-2 研究体制

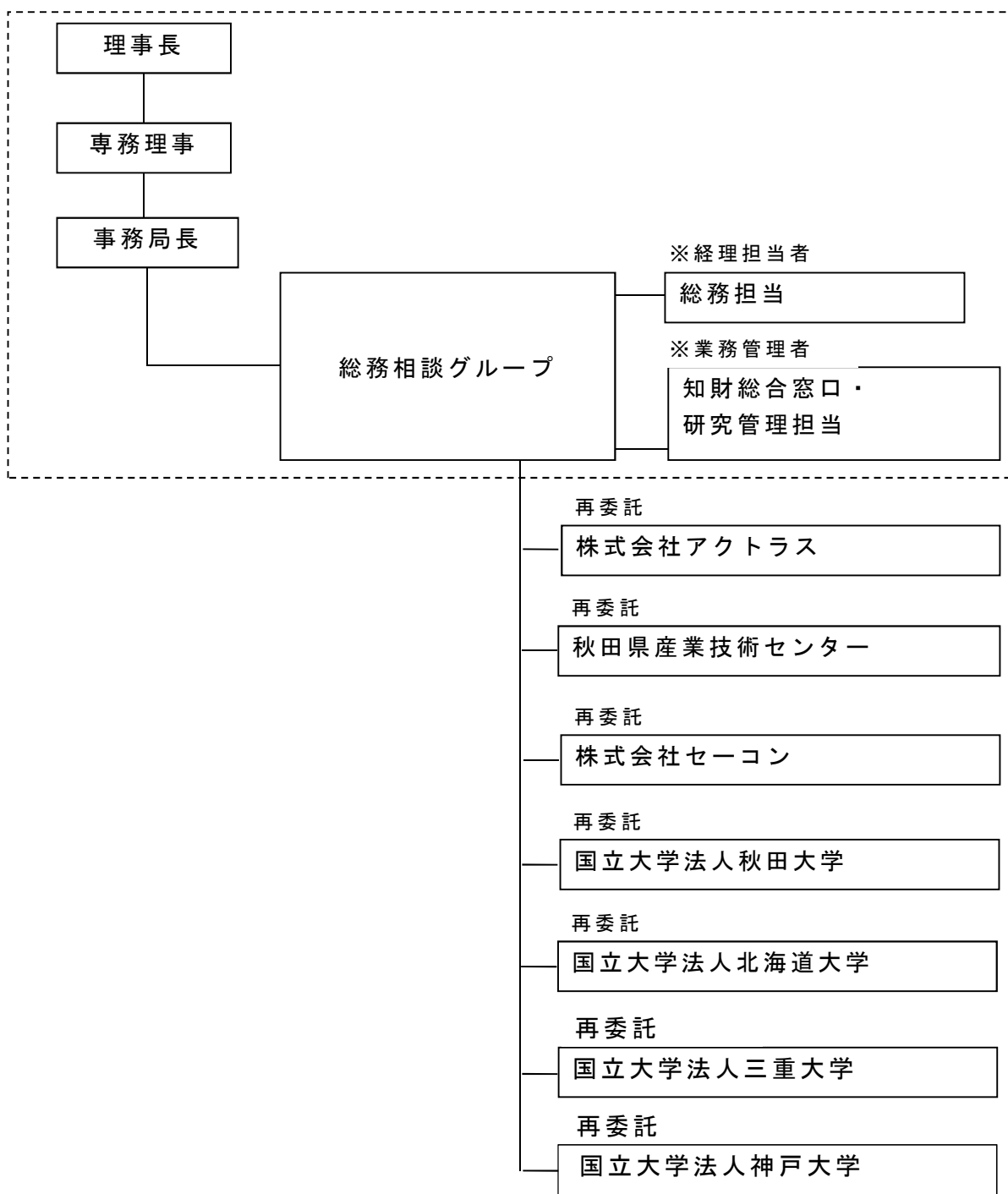
### (1) 研究組織及び管理体制

#### 1) 研究組織 (全体)



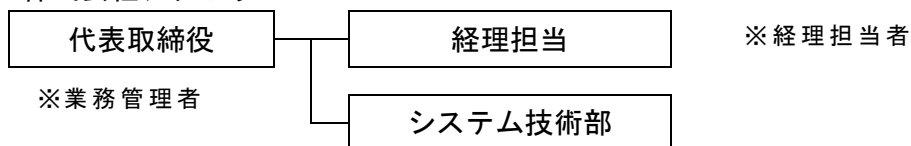
## 2) 管理体制

### ① 事業管理者 [公益財団法人あきた企業活性化センター]

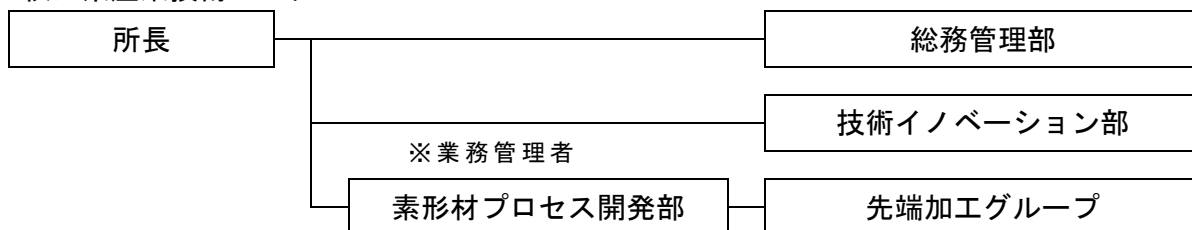


②（再委託先）

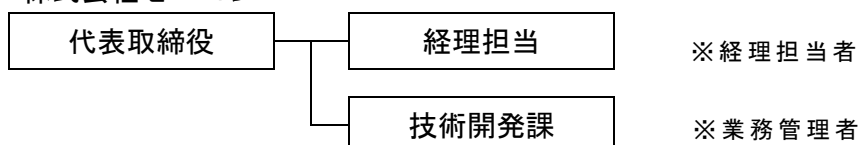
株式会社アクトラス



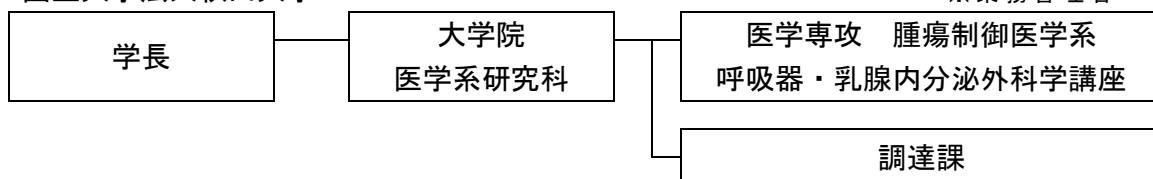
秋田県産業技術センター



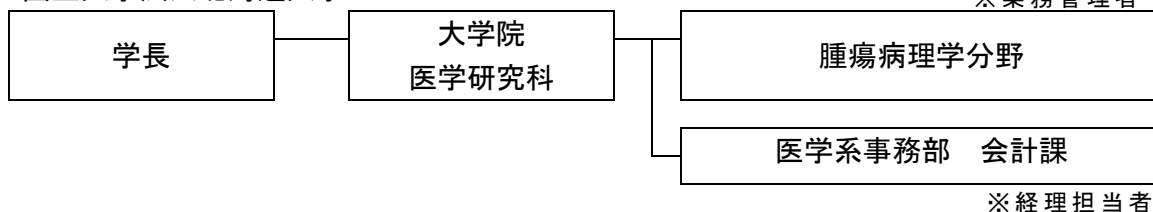
株式会社セーコン



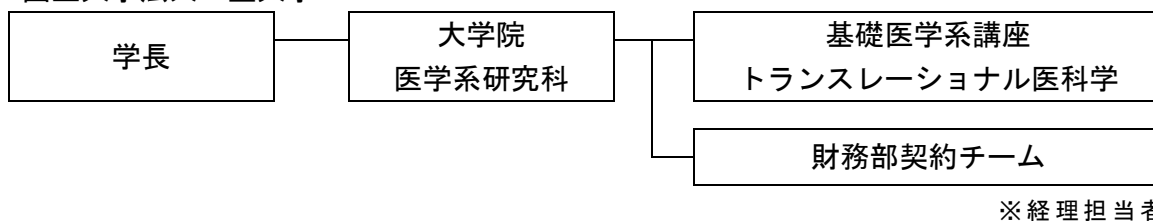
国立大学法人秋田大学



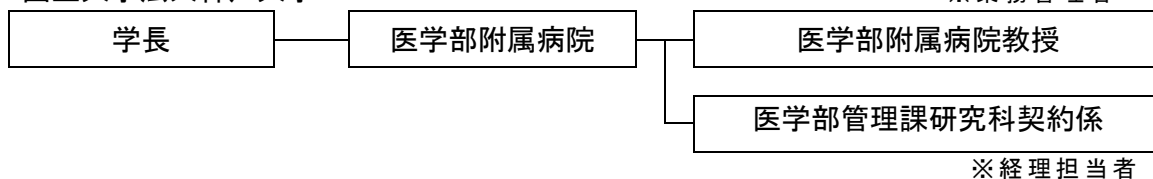
国立大学法人北海道大学



国立大学法人三重大学



国立大学法人神戸大学



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】 公益財団法人あきた企業活性化センター

①管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
プロパー職員	総務相談グループ担当	⑤-2、⑤-3、⑤-4
特別任用職員	総務相談グループスタッフ	⑤-2、⑤-3、⑤-4
臨時職員	管理業務補助員	⑤-2、⑤-3、⑤-4

【再委託先】

株式会社アクトラス

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
眞田 慎	代表取締役	①-1、①-2、 ②-2、②-3、②-4、 ⑤-1
戸巻 道雄	主任技師	①-1、①-2、 ②-2、②-3、②-4
鈴木 正道	技術主任	①-1、①-2、 ②-2、②-3、②-4
高橋 正紀	担当	①-1、①-2、 ②-2、②-3、②-4
松下 拓哉	担当	①-1、①-2、 ②-2、②-3、②-4

秋田県産業技術センター

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
赤上 陽一	素形材プロセス開発部 ・部長	①-1、①-2、 ②-2、②-3、②-4、 ③-1
久住 孝幸	素形材プロセス開発部先端加工グループ ・主任研究員	①-1、①-2、
佐藤 安弘	素形材プロセス開発部先端加工グループ ・嘱託研究員	②-3、②-4
加賀谷昌美	素形材プロセス開発部先端加工グループ ・嘱託研究員	①-1、①-2、 ②-1、②-2、③-1
中村 竜太	素形材プロセス開発部先端加工グループ・研究員	②-1、②-2、③-1

株式会社セーコン

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
小松 国夫	部長	②-1、③-1

国立大学法人秋田大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
南谷 佳弘	大学院医学系研究科 医学専攻 腫瘍制御医学系 呼吸器・乳腺内分泌外科学講座・准教授	①-1、①-2、 ②-1、②-2、②-3、②-4、 ③-1、 ④-1、④-2
齊藤 元	医学部附属病院 第二外科・講師	①-1、①-2、 ②-1、②-2、②-3、②-4、 ③-1、④-1、 ④-2
今井 一博	医学部附属病院 第二外科・医員	①-1、①-2、 ②-1、②-2、②-3、②-4、 ③-1、 ④-1、④-2

国立大学法人北海道大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
田中 伸哉	大学院医学研究科 病理学講座 腫瘍病理学分野・ 教授	④-1、④-2
谷野 美智枝	大学院医学研究科 病理学講座 腫瘍病理学分 野・助教	④-1、④-2
明坂 詩織	大学院医学研究科 病理学講座 腫瘍病理学分 野・技術補助員	④-1、④-2

国立大学法人三重大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
西村 訓弘	医学系研究科トランスレーショナル医科学 ・教授	④-1、④-2
矢野 竹男	大学院地域イノベーション学研究科・教授	④-1、④-2
白石 泰三	医学系研究科腫瘍病理学・教授	④-1、④-2
丸山 篤芳	医学部附属病院中央検査部・臨床検査技師医学系 研究科トランスレーショナル医科学 ・博士課程学生	④-1、④-2
小倉 智秀	医学系研究科トランスレーショナル医科学 ・博士課程学生	④-1、④-2
金山 和樹	医学系研究科腫瘍病理学・博士課程学生	④-1、④-2
武山 純也	研究補助員	④-1、④-2

国立大学法人神戸大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
伊藤 智雄	医学部附属病院病理診断科・医学研究科病理診断学分野 ・病理診断科教授 病理部長	③-1、④-1、④-2
酒井 康裕	医学部附属病院病理診断科・講師	③-1、④-1、④-2
松岡 絵美衣	医学部附属病院病理部・技師	③-1、④-1、④-2
今川 奈央子	医学部附属病院病理部・技師	③-1、④-1、④-2

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

(事業管理機関)

公益財団法人あきた企業活性化センター

(経理担当者) 総務相談グループ 総務担当 サブリーダー 大西 勝

(業務管理者) 総務相談グループ 知財総合窓口・研究管理担当

サブリーダー 松橋 亨

(再委託先)

株式会社アクトラス

(経理担当者) 経理担当

山口 美奈子

(業務管理者) 代表取締役

眞田 慎

秋田県産業技術センター

(経理担当者) 総務管理部主査

中山 健

(業務管理者) 素形材プロセス開発部 部長

赤上 陽一

株式会社セーコン

(経理担当者) 経理担当

川村 和子

(業務管理者) 代表取締役

鈴木 浩子

国立大学法人秋田大学

(経理担当者) 医学系研究科・医学部調達課 総括主査

庄司 稔

(業務管理者) 大学院医学系研究科長

澤田 賢一

国立大学法人北海道大学

(経理担当者) 医学系事務部 会計課主任(外部資金担当)

押田 亜希

(業務管理者) 大学院医学研究科長

玉木 長良

国立大学法人三重大学

(経理担当者) 医学系研究科・医学部財務部契約チーム係長

石川 祐子

(業務管理者) 大学院医学系研究科長

登 勉

国立大学法人神戸大学

(経理担当者) 医学部管理課研究科契約係長

中 宏樹

(業務管理者) 医学部附属病院病理診断科 教授

伊藤 智雄

(4) その他

①アドバイザー

氏名	所属・役職	主な指導・協力事項
大橋 正彦	株式会社島津製作所 東北支店・支店長	装置の評価やノウハウについて専門的な助言をいただく
竹上 嗣郎	国立大学法人東北大学 未来科学技術共同研究センター・副 センター長 教授	医療ビジネスの専門的な立場から 迅速免疫染色について助言をいた だく
南條 博	国立大学法人秋田大学 医学部附属病院 病理部・教授	医学の専門的な立場から迅速免疫 染色の評価やノウハウについて助 言をいただく
後藤 明輝	国立大学法人秋田大学 大学院医学系研究科器官病態学講 座・教授	医学の専門的な立場から迅速免疫 染色の評価やノウハウについて助 言をいただく
若山 俊輔	国立大学法人秋田大学 産学連携推 進機構 知的財産部門 知的財産デ ィレクター・講師	医療関連の知的財産の専門的な立 場から助言をいただく
黒瀬 顕	国立大学法人弘前大学 大学院医学研究科 病理診断学講 座・教授	医学の専門的な立場から迅速免疫 染色の評価やノウハウについて助 言をいただく
中谷 行雄	国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 先進医療科学 専攻 病態医科学分野 呼吸器病 理学 ・教授	医学の専門的な立場から迅速免疫 染色の評価やノウハウについて助 言をいただく
菅井 有	学校法人岩手医科大学 分子診断病理学分野 病理学講 座・教授	医学の専門的な立場から迅速免疫 染色の評価やノウハウについて助 言をいただく
遠藤 希之	一般財団法人仙台厚生病院 病理診断・臨床検査科・診断部長	医学の専門的な立場から迅速免疫 染色の評価やノウハウについて助 言をいただく
吉田 博	ニプロ株式会社 総合研究所・取締役	装置の評価やノウハウについて専 門的な助言をいただく
太刀川英昭	サクラファインテックジャパン株 式会社開発本部・本部長代理	装置の評価やノウハウについて専 門的な助言をいただく

### 1-3 成果概要

本研究の4つの研究開発項目について、以下の結果を得た。

#### サブテーマ①試作装置開発

自動化技術構築のために基本動作確認用攪拌検証装置の試作開発を行い、その各々の基本動作を確認できた。またこの検証装置を用いて迅速免疫組織染色を行い、良好な染色性が得られた。自動化を念頭にラボベースにて洗浄工程と攪拌工程とを連携させた一次プロトタイプを開発した。秋田大学から研究員を派遣し、それを用いて迅速免疫組織染色を行ったところ良好な染色性が確認できた。

#### サブテーマ②洗浄技術の開発

自動化に伴う新たなコア技術として攪拌技術を応用した洗浄技術を開発した。その洗浄工程は作業目標時間である2分を達成できた。また、本洗浄技術に関して平成25年1月22日付けにて特許出願を行った。また、洗浄液や抗体液を攪拌性に富んだ最適な形状にするためのはっ水リングを提案、金型を(株)セーコンが開発した。

加えて、予め液滴先端との距離の位置決めを高精度に決定するため、レーザー変位計を用いた測定工程を開発した。これにより液滴量毎に電極の位置を自動調整し、最適な攪拌挙動が得られるようになった。そして、その攪拌状態や反応時間確認のための、画像処理技術をアクトラスが開発した。

秋田大学から研究員を秋田県産業技術センターに派遣し、免疫組織染色を行った結果、良好な染色性が得られた。操作者による誤操作の撲滅と操作習熟時間の軽減、導入障壁の低減のため、2系統の操作パネルを1系統にまとめ、優れた操作性が得られるように改良した。

#### サブテーマ③ 免疫染色性の品位高度化の検討

滴下する液滴が均一なドーム形状を形成するために“はっ水リング”を開発した。取り付け・脱着が容易でスライドガラスに接着残査が無い素材であること、液滴の液漏れ無き形状精度または優れた密着性を有すること、印加する場に悪影響を与えない素材であること、耐薬品性があること、この4つの仕様を満たしているものとしてフッ素系のテープ（日東電工、ニトフロンテープ）が良好であることを確認できた。この“はっ水リング”によって操作者によるばらつきが抑制され、均一な液滴形状が形成することを確認した。

また、攪拌技術による染色品位の確認のために、攪拌されると発色するポジティブコントロール、攪拌されても非発色性を維持するネガティブコントロールをセンサー部材とし、これらのセンサー部材をはっ水リング内に取り付ける検討を行い、その可能性を確認できた。そして、本はっ水リングとセンサー部材に関して平成25年1月22日付けにて特許出願を行った。また、ポリアクリルアミドゲルを用いて切片と同時に薄切可能なコントロールを作ることができた。

リング形状の他に正方形、長方形の矩形形状等の各種形状のフレーム体でも可能であるかどうかについては、平成25年度の課題として今後検討する。



#### ④ 診断用抗体開発

本攪拌技術を応用した免疫組織染色の汎用性を各大学で検証した。

秋田大学では7種類の組織を計8種類の抗体を用いて本攪拌技術を応用した免疫組織染色を施行した。その結果抗体の種類に関わらず本攪拌技術を応用した免疫組織染色が有用であることが明らかになった。

北海道大学では脳腫瘍術中迅速検体において30分以内に8種の抗体を使用した免疫染色が可能であった。その染色性は永久標本での染色と同様であり、診断の補助的手法として有用な可能性があり、今後症例数及び抗体数を増やし検討する必要がある。

神戸大学では4種類の組織を11種類の抗体を用いて免疫組織染色を施行した。その結果、凍結標本での染色性は良好だった。しかし、固定など標本作製による条件により染色性に影響が出ると予想されるため、今後は病理診断で最も需要のあるパラフィン切片での検討を我々は進めていく予定である。

三重大学では4種類の組織を計7種類の抗体を用いて免疫組織染色を施行した。いずれの抗体も病的に十分な発色性が得られており、本技術の有用性が明らかになった。また、本攪拌による免疫染色は、パラフィン切片を用いる場合でも、従来法と比べて時間の短縮が期待できると結論できた。今後は、本攪拌時の液滴内の反応性を詳細検討する予定である。

また、秋田大学にて提案した複数の染色プロトコルを用いて染色性の検討を行い、その中で最も結果がよかったプロトコルで北海道大学、神戸大学、三重大学で免疫組織染色を行ったところ、同等の結果を得た。

#### 1-4 当該プロジェクト連絡窓口

公益財団法人あきた企業活性化センター(最寄駅:東日本旅客鉄道秋田新幹線秋田駅)

〒010-8572 秋田県秋田市山王三丁目1番1号

TEL : 018(860)5614 FAX : 018-863-2390

総務総合相談グループ 知財総合窓口・研究管理担当 松橋 亨

E-mail: toru-matsuhashi@bic-akita.or.jp

## 第2章 本論

## 2-1 試作装置開発

### 2-1-1 プロジェクト全体に対する位置付け

自動化に向けてラボベースにて、洗浄技術を確認する必要がある。そのため新たな攪拌検証装置を1台開発する。

### 2-1-2 目的と目標

自動化を可能にするコア技術として、攪拌技術に洗浄機能を導入する洗浄技術を確認する。このため自動化を念頭にラボベースにて洗浄工程と攪拌工程とを連携させた一次プロトタイプを製作する。

### 2-1-3 研究開発及び成果

自動化技術構築のために基本動作確認用攪拌検証装置の試作開発を行い、その各々の基本動作を確認できた。またこの検証装置を用いて迅速免疫組織染色を行い、良好な染色性が得られた。自動化を念頭にラボベースにて洗浄工程と攪拌工程とを連携させた一次プロトタイプを開発した。秋田大学から研究員、齊藤元、今井一博を派遣し、それを用いて迅速免疫組織染色を行い、良好な染色性が確認できた。

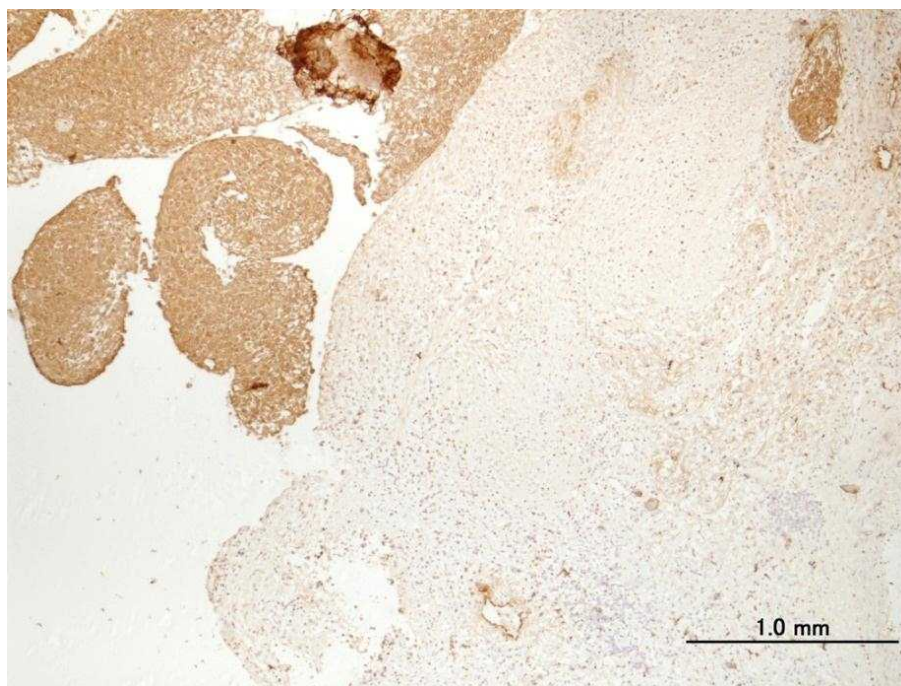


図1 一次プロトタイプを用いた染色結果

## 2-2 迅速洗浄技術の開発

### 2-2-1 プロジェクト全体に対する位置付け

従来の迅速抗原抗体装置において、洗浄工程は医療スタッフが手動にて洗浄作業を行っていたため専従者を要していた。この煩雑さを解消するために自動洗浄技術、並びに洗浄液・抗体液滴下技術と排出技術を開発し、染色性評価実験を行い洗浄技術を確立する。

### 2-2-2 目的と目標

自動化を実現するために必要不可欠なコア技術として、新たな洗浄技術の開発が挙げられる。本研究では基盤技術である本攪拌技術を応用して開発する。求められる要求事項としては、試料を載せたスライドガラスを移動せずに、許容時間内に本洗浄作業を完了することである。

作業目標時間は以下の5工程を合わせて2分以内である。工程は、1)攪拌 2)洗浄液滴下 3)洗浄 4)洗浄液排出 5)二次抗体工程である。また今年度の目標として、新たな知見を開発し特許を出願することである。

また、最適な攪拌性を導き出すためには、“はっ水リング”を開発することによって、供与する液滴形状が各々のスライドガラス毎にばらつきを抑制され、液滴先端部の距離を決定することが可能となる。この“はっ水リング”は、専用容器用金型(撥水リングプレス型)を用いて開発する。これによって液滴量の滴下精度が向上し、並びに位置調整の自動調整が可能になり、最適な攪拌動作が得られることを目指す。また、これらの攪拌状態の液滴の挙動や反応の時間の確認には画像処理を用いて行う。

また、攪拌制御装置の高品位化を目標とし、攪拌性の均一化を図るために攪拌制御装置が発生する場の均一化を図り、良好な攪拌性を得る。一方、CEマーキングを取得するために電磁波ノイズ並びに電源の発熱抑制対策を完了し、最終年度取得を目標とする。

さらに誤操作の撲滅と操作習熟時間の軽減のために、現行の試作機で用いられている2系統の操作パネルを1系統にまとめ、優れた操作性が得られるように改良する。

### 2-2-3 研究開発及び成果

自動化に伴う新たなコア技術として本攪拌技術を応用した洗浄技術を開発した。その洗浄工程は作業目標時間である2分を達成できた。また、本洗浄技術に関して平成25年1月22日付けにて特許出願を行った。

また、洗浄液や抗体液を攪拌性に富んだ最適な形状にするためのはっ水リングを提案、金型をセーコンが開発した。

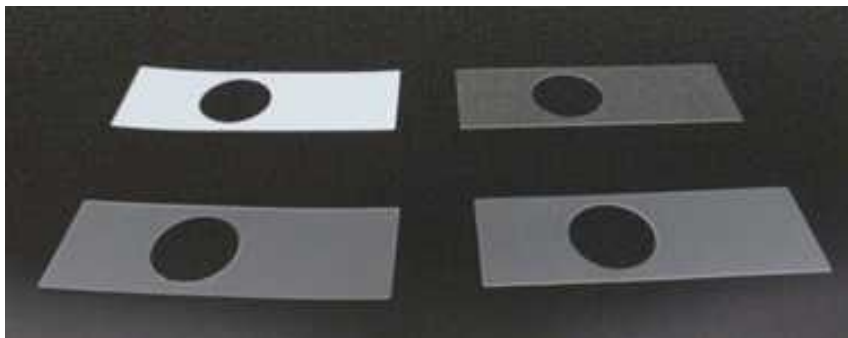


図2 撥水リング

また、予め液滴先端との距離と位置決めを高精度に決定するため、レーザー変位計を用いた測定工程を開発した。これにより液滴量毎に自動調整し、最適な攪拌挙動が得られるようになった。そして、その攪拌状態や反応時間確認のための、画像処理技術をアクトラスが開発した。

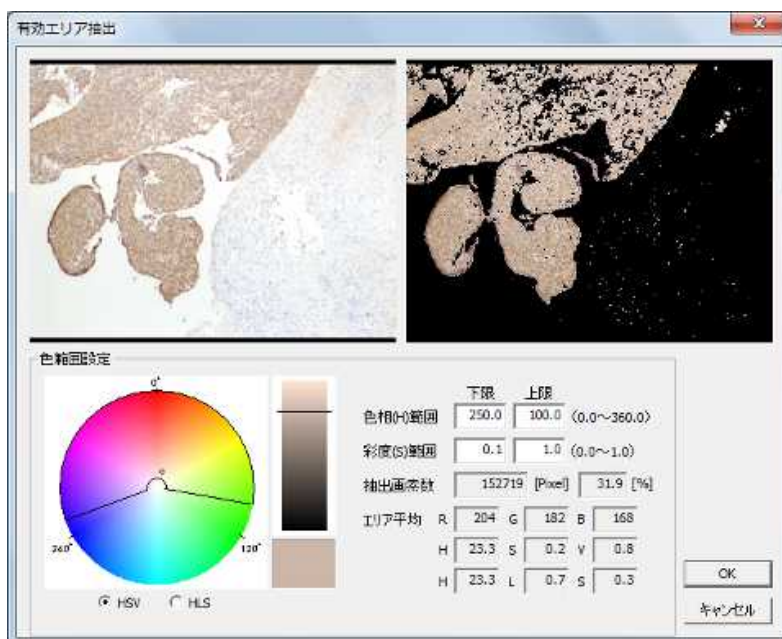


図3 画像処理による測定

さらに、秋田大学から研究員、齊藤元、今井一博を派遣し、免疫組織染色を行った結果、装置動作の有用性の検証を行った。

そして、操作者による誤操作の撲滅と操作習熟時間の軽減、導入障壁の低減のため、2系統の操作パネルを1系統にまとめ、優れた操作性が得られるように改良した。

## 2-3 免疫染色性の品位高度化の検討

### 2-3-1 研究の位置付け

高品位な迅速免疫染色性は本攪拌技術の性能に依存する。その性能は滴下された液滴頭頂部との距離に大きく影響を受ける。すなわち各試料毎の液滴形状が均一になることが肝要である。従来手法では液滴領域を「はっ水性ペン」にて作成していた。しかし、操作者によっては、「はっ水性ペン」による「円」形状にばらつきが生じ、攪拌性にもばらつきが生じて、染色性に影響が生じていた。そこで、理想的な液滴形状が得られる「はっ水リング」を開発し、攪拌性のばらつきを抑制することを目指すとともに免疫染色性の高品位化を目指す。また、本攪拌技術による染色品位の確認のために、スライドガラスに予めポジティブコントロールが得られる試料を搭載する。

### 2-3-2 目的と目標

本装置の性能を支配している要因は、スライドガラスに滴下される液滴量とその形状である。従来試作機では、「はっ水性ペン」にて滴下領域を医療スタッフがスライドガラスに描き作成したが、操作者によるばらつきが生じ易く、滴下後の液滴形状にもばらつきが生じていた。すなわち、ドーム形状となる液滴頭頂部との距離に差異が生じていたため攪拌性能にばらつきが生じ、免疫染色性にもばらつきが生じた。そこで、滴下する液滴が均一なドーム形状を形成するために「はっ水リング」を提案した。この「はっ水リング」によって操作者によるばらつきが抑制され、均一な液滴形状が形成できる。すなわち攪拌の性能が安定し、発色機能が発現しやすくなり免疫染色技術の品質向上を目指す。

また、攪拌技術による染色品位の確認のために、スライドガラスに予めポジティブコントロールが得られる試料を搭載する。これを専用スライドガラスとして新たな知財化のために特許の出願を目標とする。

### 2-3-3 研究開発及び成果

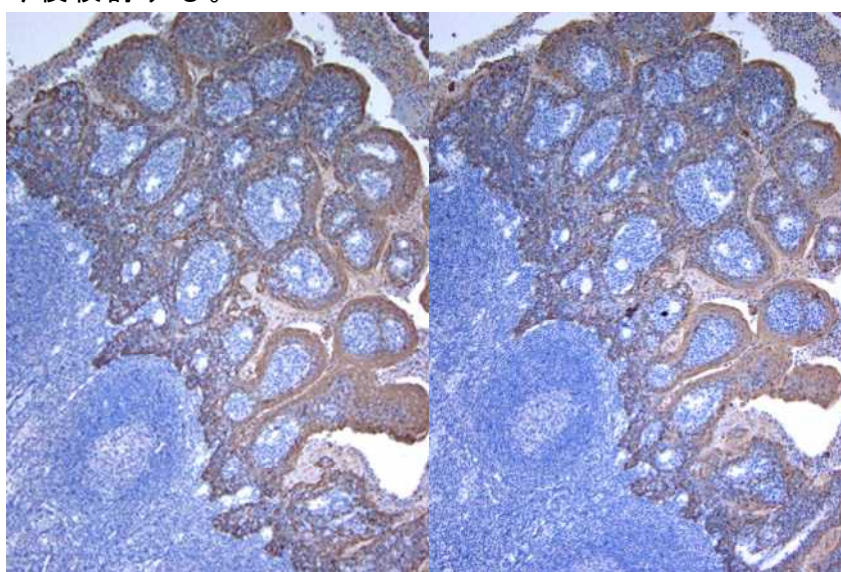
滴下する液滴が均一なドーム形状を形成するために「はっ水リング」を開発した。取り付け・脱着が容易でスライドガラスに接着残査が無い素材であること、液滴の液漏れ無き形状精度または優れた密着性を有すること、印加する場に悪影響を与えない素材であること、耐薬品性があること、この4つの仕様を満たしているものが良好であることを確認できた。この「はっ水リング」によって操作者によるばらつきが抑制され、均一な液滴形状が形成することを確認した。

また、攪拌技術による染色品位の確認のために、攪拌されると発色するポジティブコントロール、攪拌されても非発色性を維持

するネガティブコントロールをセンサー部材とし、これらのセンサー部材をはっ水リング内に取り付ける検討を行い、その可能性を確認できた。そして、本はっ水リングとセンサー部材に関して平成 25 年 1 月 22 日付けにて特許出願を行った。

また、ポリアクリルアミドゲルを用いて切片と同時に薄切可能なコントロールを作ることができた。さらに平成 25 年度に本件の開発は継続する。

そして、リング形状の他、ロット毎に同じ形状であって、滴下される液滴に対して均一な攪拌性が確保される限り、正方形、長方形の矩形状等の各種形状のフレーム体でも可能であるかどうかは今後検討する。



はっ水ペン

はっ水リング

図 4 撥水ペンとはっ水リングを用いて染色した組織比較

## 2-4 診断用抗体開発

### 2-4-1 研究の位置付け

免疫染色の抗体の種類と汎用性の検討を実施し、得られた結果を各部門にフィードバックすることで、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に寄与する。

### 2-4-2 目的と目標

平成 22 年度の戦略的基盤技術高度化支援事業で開発した手動型迅速免疫染色装置及び攪拌技術を用いた迅速免疫染色技術はおもに秋田大学と北海道大学でその有用性が検討された。しかし、抗体の種類も少なく汎用性の観点から十分とは言えないため、診断用抗体の開発に先立ち、自動免疫染色装置向けの抗体の種類を汎用性を展開する。

また、免疫染色の迅速化は抗原抗体反応の迅速化のみではなく、前処置、洗浄、後処置の迅速化も重要である。各施設で前処置、洗浄、後処置の最適なプロトコールを作成して抗原抗体反応以外の部分の迅速化を検討する

### 2-4-3 研究開発及び成果

本攪拌技術を応用した免疫組織染色の汎用性を各大学で検証した。

秋田大学では 7 種類の組織を計 8 種類の抗体を用いて本攪拌技術を応用した免疫組織染色を施行した。その結果抗体の種類に関わらず本攪拌技術を応用した免疫組織染色が有用であることが明らかになった。

北海道大学では脳腫瘍術中迅速検体において 30 分以内に 8 種の抗体を使用した免疫染色が可能であった。その染色性は永久標本での染色と同様であり、診断の補助的手法として有用な可能性があり、今後症例数及び抗体数を増やし検討する必要がある。

神戸大学では 4 種類の組織を 11 種類の抗体を用いて免疫組織染色を施行した。その結果、凍結標本での染色性は良好だった。しかし、固定など標本作製による条件により染色性に影響が出ると予想されるため、今後は病理診断で最も需要のあるパラフィン切片での検討を我々は進めていく予定である。

三重大学では 4 種類の組織を計 7 種類の抗体を用いて免疫組織染色を施行した。いずれの抗体も病的に十分な発色性が得られており、本技術の有用性が明らかになった。また、攪拌による免疫染色は、パラフィン切片を用いる場合でも、従来法と比べて時間の短縮が期待できると結論できた。今後は、攪拌時の液滴内の



反応性を詳細検討する予定である。

また、秋田大学にて提案した複数の染色プロトコルを用いて染色性を検討した。その結果最も結果がよかったプロトコルで北海道大学、神戸大学、三重大学で免疫組織染色を行い、同等の結果を得た。

## 第3章 全体総括

## 第3章 全体総括

### 3-1 全体総括

本研究では、新型免疫組織染色装置の開発を目指し、①試作装置開発、②洗浄技術の開発、③免疫染色性の品位高度化の検討、④診断用抗体開発の4つのテーマに取り組んだ。その結果、以下の成果が得られた。

#### ①試作装置開発

自動化技術構築のために基本動作確認用攪拌検証装置の試作開発を行い、その各々の基本動作を確認できた。さらに洗浄工程と攪拌工程とを連携させた一次プロトタイプを開発し、それを用いて迅速免疫組織染色を行ったところ、良好な染色性が確認できた。

#### ②洗浄技術の開発

自動化のための新たなコア技術として、攪拌技術を応用した洗浄技術を開発し、その洗浄工程は作業目標時間である2分を達成できた。本洗浄技術に関して特許出願を行った。

また、液滴形状の最適化及び均一化のためのはっ水リングを提案し金型の開発を行い、加えて、位置決めを行うための測定工程を開発した。それらにより、安定した良好な攪拌挙動が得られるようになった。並行して、攪拌状態や反応時間確認のための画像処理技術を開発した。

また、従来機では2系統であった操作パネルを1系統にまとめ、優れた操作性が得られるように改良した。

#### ③免疫染色性の品位高度化の検討

免疫染色性のばらつき抑制技術の開発は極めて重要な課題である。そこで、抗体及び洗浄液の液滴形状の最適化及び均一化を図る必要がある。そこで、操作者によるばらつきを無くすために、はっ水リングを開発した。本迅速免疫組織染色に必要な条件を満たす素材及び形状の検討を行い、その結果を反映させて開発したはっ水リングを用いることで、均一な液滴が形成されることを確認した。

攪拌工程のポジティブコントロール、ネガティブコントロールをはっ水リング内に取り付ける検討を行い、その可能性を確認できた。また、切片と同時に薄切可能なポジティブコントロール、ネガティブコントロールを作ることができた。本はっ水リングとポジティブ・ネガティブコントロールに関する特許出願を行った。尚、次年度もポジティブコントロール、ネガティブコントロール試料種については検討を深める。

#### ④ 診断用抗体開発

本攪拌技術を応用した免疫組織染色の汎用性を4大学で検証した。

その結果、抗体および組織の種類にかかわらず本攪拌技術を応用した免疫染色が有

効であることが明らかとなった。また、パラフィン切片についても染色時間短縮の可能性を見出した。

プロトコルの検討を行い、得られた最適なプロトコルを用いて各施設で同様に染色を行ったところ、同等の結果を得た。プロトコルを統一することによって、施設間でのばらつきのない染色が行えるという知見が得られた。

### 3-2 今後の進め方

今後は、装置の小型化を検討し、現場ニーズを捉えるためのモデルタイプの開発を行う。並行して、はっ水リングの形状に関して、リング形状の他に正方形、長方形の矩形状等の各種形状の可能性について検討する。ポジティブコントロール、ネガティブコントロールは種類を増す等の検討を深める。

また、染色時間の短縮と試薬の少量化を目指し、染色試料をより薄く切削するための工具と装置の開発を行う。

さらに、本装置を用いたパラフィン切片での染色について検討を進めていくことと、症例数と抗体数を増やして検討することが課題である。