

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658138

研究課題名(和文) 超効率バイオアッセイシステム開発のためのインクジェット技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of ink jet technology to develop high throughput bio-assay system

研究代表者

江前 敏晴 (Enomae, Toshiharu)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40203640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：インクジェットプリンタにより培地及び細菌を紙に印刷し、顕微鏡によりコロニー成長を評価することで数時間のうちに最適環境条件を決定できるバイオアッセイシステム開発を目指した。ポリスチレンのトルエン溶液に浸漬し全面疎水化した紙に、培地を形成したい区画にだけトルエンを印刷してポリスチレン樹脂を溶かし出し、親疎水性パターンを作製した。印刷中のゲル化を押さえるため、インクカートリッジの加熱と寒天の硫酸加水分解による粘度調整を行って寒天水溶液を印刷した。その上でバクテリアが24時間成長を続けることも確認した。さらに重合開始剤を含むポリビニルアルコール培地の印刷によってもバイオアッセイシステムを構築できた。

研究成果の概要(英文)：A novel bioassay system using ink jet printing technology and a paper substrate has been developed. Ink jet printing has potential for high-precision metered dispensing of bacteria and nutrients in various conditions. Paper has the potential to be used as a container to accommodate bacteria and nutrients and is easily disposed of by combustion after use. Filter paper was first immersed in a toluene solution of polystyrene and hydrophobized after drying. Toluene was printed on a few sections of the filter paper to make them hydrophilic again. An agar medium with its viscosity adjusted by acid hydrolysis was printed on the hydrophilic sections. Bacteria were manually dispensed onto the medium, and the colonies of the bacteria were observed to grow for at least 24 h before the medium dried. Poly(vinyl alcohol) with polymerization initiator was also successfully applied as a medium. This bioassay system is expected to be applied for a variety of bacterial and yeast spores, and enzymes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：バイオアッセイ インクジェット バクテリア 細胞 寒天培地

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年インクジェットのパイオ応用技術(バイオセンサー1994年、DNAチップ1998年頃から)が進化しつつある。しかし、細胞や酵素のような、生きたソフトマターを吐出する実験システムの構築は完成されたものではない。現状では、生物体のミリオーダーとDNAチップのナノオーダーの間にある胞子や酵素反応領域であるミクロンオーダーでのバイオアッセイ技術が未だ実現していない。このようなハイスループットを実現するような試験システムは、生物学的反応のメカニズム解析やその応用技術を発展させる上で、効率化に寄与するものである。

(2) 一方、センサーやエレクトロニクス機能を持つ紙基板デバイスが昨今、盛んに発表されている。紙が従来の印刷/包装分野から飛躍し、高機能素材としてあらゆる分野へ応用が試みられているが、紙が単に安価であるに留まらず、易廃棄性が高く、リサイクル性の高いカーボンニュートラル材料であることに加え、金属、セラミックス、プラスチック材料にはない多孔質材料が有する液体輸送/保持機能などの活用が背景にある。その応用研究の1つとして、生物学における迅速なバイオアッセイシステムに紙を活用することは1つの手段と言える。

2. 研究の目的

通常の微生物や細胞の培養には、シャーレに寒天培地ゲルを固定し菌を接種する作業は必須であり、数日間コロニー成長を観察する。その場合に問題となるのは、繰り返し安定性である。バクテリア接種は先端がループ状になった白金製の器具を用いて行うがその形状が一定ではなく、接種されるバクテリアの細胞数も一定ではない。さらに1培地1条件で培養を行うのが普通で、種々の条件で比較を行うには多くのシャーレを要する。インクジェットプリンタにより培地及び細菌を紙に印刷し、紙の多孔質構造にそれらを固定できれば迅速な培地作製と接種が小面積で行うことができ、顕微鏡によりコロニー成長を評価すれば数時間のうちにバイオアッセイが終了する。このようなシステム開発のためのいくつかの要素技術を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) まず、インクジェットヘッドの極めて細いノズルから安定して数 μm 径の粒子状の物質を吐出できるかどうかを調べる必要があった。一般的なインクジェット用の顔料インク粒子は数十 nm 径で非常に細かいが、酵母やバクテリアなどの細胞は通常1~10 μm の大きさであり、目詰まりなくノズルを通過するのかどうかの検討を要する。しかし、膜電位(細胞膜の内部と外部とのイオン種の違いにより電位差が生じる)のために、通常細胞

膜表面は負に帯電しており、細胞同士には反発力が働く。そのため細胞同士の凝集は起こりにくくなっていることを考えれば印刷適性のある分散液であるとの見方もできる。その反面分散液全体の粘度が上がる可能性もある。そこで、これらのことを検討するために、表面に負の荷電をもったラテックス粒子を細胞のモデルとして用い吐出試験を行った。試験用インクジェットプリンタを使い、約1 μm 径の中空粒子からなるポリスチレンアクリルラテックスを0.001%固形分となるように蒸留水で希釈して専用のインカートリッジに詰め、写真画質インクジェット紙上に吐出(としゅつ)した。約10 μL のインクジェット微小液滴に含まれる粒子数を計測し、接種分注器としての個体数安定性がどの程度かを推測することにした。粒子数は電子顕微鏡(SEM)写真で撮影し、目視でカウントした。

(2) 紙をシャーレと同様の使い方で、培地の基板あるいは容器として利用できないかどうか検討した。培地となる寒天は大量の水を保持するゲルであるため紙の上に直接保持すると吸水のために寒天の特性が変化し、紙の強度も低下する。また培地はバクテリアの増殖を安定して促進させるために種々の栄養成分を添加するが、紙から何らかの成分が溶出して培地に滲出すると水溶性成分の組成が変化するため、溶出成分が極めて少ない紙でなければならない。この点を考慮し、ろ紙を選択した。また印刷と紙を組み合わせる使用目的はろ紙上で培地をパターンニングし、栄養条件やpHが異なった複数の小区画を作り出すことにある。寒天は、熱水に溶解し溶液状となるが、約60 $^{\circ}\text{C}$ 以下になるとゲル化して、いわゆる寒天状になる。したがって印刷時には溶液状でろ紙に印刷されたときにゲルに変わるような印刷を行わなければならない。吸水性の高いままでは溶液寒天はろ紙に浸みこんでしまい培地にならないため、ろ紙の疎水化を検討した。しかし、全面を疎水化するとプラスチックのように溶液寒天が表面を流れてしまいパターンニングができない。そこで、ろ紙上に寒天培地を形成したい区画は親水性に、それ以外の領域を強く疎水化することを試みた。培地形成用区画内は親水性と言っても元のろ紙表面ほど親水性ではなく、適度な疎水性を有する親水性である方が培地の固定のためには望ましい。最初に浸漬法によって全面を強く疎水化してから、培地を形成したい区画だけ樹脂を溶かし出す方法を試みた。3.0%のポリスチレンのトルエン溶液にろ紙を2時間浸漬したあと、乾燥させて全面を疎水化した。次に一部の区画だけを親水化するために、トルエンをインクジェットプリンタのカートリッジに詰め、10 mm ×7 mm の矩形領域を印刷した。一種のエッチングである。ポリスチレンを溶解しながら周囲に移動、分散させ、疎水面内にいくつか

の親水性区画を作った。親水性区画の位置がわかるように、青色染料 (Blue 35) を 0.015% 濃度でトルエンに溶解しておき可視化した。

(3) 次に寒天培地をろ紙の親水性区画にのみ載せる作業を行った。寒天 30 g とその他栄養分を水 1 L に溶解して寒天培地を調製し、粘度調整のため 2 倍及び 3 倍に水で希釈した後、インクカートリッジに詰めた。寒天 30 g / 水 1 L の濃度では 10 秒程度 (ゲル化時間) でゲル化が始まる。2 倍及び 3 倍希釈の寒天培地はゲル化時間がそれぞれ 30 秒及び 300 秒であり希釈によりゲル化時間を制御することが可能であった。いずれの希釈率の寒天でも細菌の培養は可能であったが、印刷前にカートリッジが冷えてくるとカートリッジ内でゲル化が始まるため、シート状ヒーターでカートリッジを覆い 60 °C に保持したまま、親水性区画に適量の寒天を印刷した。60°C 以上を保つことにより、寒天を溶液状に保つことができるがそれでも粘度が高すぎることもあるため、硫酸を使って寒天の粘度制御を行った。寒天の主成分はアガロースという多糖であり、アガロースは 2 種類のガラクトースという単糖が交互に結合している。多糖は酸性下で容易に加水分解し、重合度 (単糖の結合数) が低下する。それに伴い、水溶液の粘度も低下するのでインクジェット印刷に適した粘度となるように加水分解を行った。実験では、手作業で分注した寒天培地の上に、同じく手作業でオレンジ色の細菌を接種し、細菌の成長の様子を観察した。この細菌は室内に浮遊するものを採取し、単離したもの (菌種未定) である。

(4) 実際に細菌をインクジェット印刷するとき、細いノズルから押し出されるときに作用するせん断力のために細菌が死滅する場合があるため、試験用インクジェットプリンタを用いて大腸菌を印刷し、繁殖の程度を調べた。大腸菌は、その他の微生物が成長を阻害されるような物質 (抗生物質) が存在しても、よく繁殖するように性質を変えることができ、遺伝子組み換えによりこのような特殊な大腸菌を作り出すことができる。遺伝子組み換え大腸菌だけが繁殖できるように抗生物質を添加した寒天培地を厚さ約 5 mm のシート状に成型した。この培地をプリンタのステージ上に置き、インクカートリッジに遺伝子組み換え大腸菌 (*E. coli*) の水分散液を入れて、10 mm 間隔でドットを印刷した。

4. 研究成果

(1) ラテックス粒子の印刷では、目詰まりや凝集もなくインクジェットプリンタのノズルから吐出させることができた。図 1 は、5 滴で形成した 1 ドットの写真である。粒子は凝集もなくよく分散して定着していることが

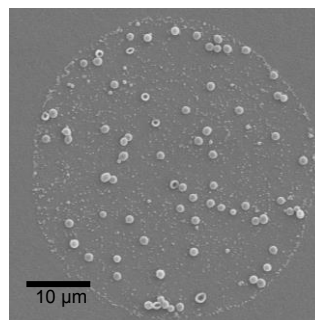


図 1 5 滴吐出からなるポリスチレンラテックス粒子の 1 ドット

わかる。水の中でよく分散する性質があれば、印刷後もよく分散した状態で分布することになると考えられるので、細胞でも水分散液中で凝集しない限り、培地上での凝集もノズルの目詰まりもないものと予測される。紙上に形成された 1 ドット内の粒子数を計測したところ、連続吐出でも間欠吐出でも安定して約 15 粒子/液滴 (粒子数の絶対値はラテックスの濃度による) を供給できる分注器としてインクジェットプリンタを使用できることが示された。

(2) 図 2 はポリスチレンで全面疎水化したろ紙上に青色のトルエンを使って印刷して親水化区画を作り、水を滴下して親水性を確認しているところの写真である。青く染色された区画の色濃度が低い場合はトルエンの印刷回数 (吐出量) が少なくポリスチレンの溶出が不十分のため水滴は丸くなり、青色濃度が高すぎると水滴は丸い形状を作らず紙内に吸収されてしまい、親水化していることが確認できた。合計の吐出量により親水化の程度に違いが見られたが、それ以外の印刷条件として、合計の吐出量が同じでも、1 区画を 1 走査で印刷するとムラが大きくなり (中断左)、数回の走査に分けて重ね印刷するとムラが小さくなった。またプリンタの 3 つ (16 のうち) のノズルを使って時間をかけながら、2 回の重ね印刷を行った時が均一で青色部にのじみが少ない親水性区画となった。少なめの量を何回かに分けて印刷し、乾燥工程を間に入れることによりエッジの明瞭な親/疎水性のパターンを紙上に形成できることがわかった。

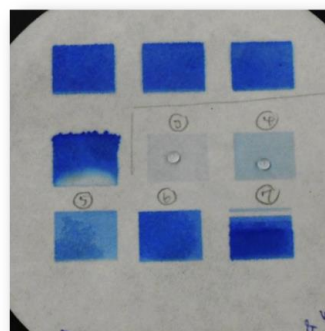


図 2 親疎水性パターンニング後の水滴によるはっ水性確認

(3) 手作業で分注した寒天培地の上に、同じく手作業でバクテリアを接種したときのバクテリアの成長の様子を図3に示す。図の0(時間)はこのバクテリアを接種した直後で、その後時間とともにコロニーが成長していることがわかる。24~36時間経過段階で寒天が乾燥し、繁殖が止まっていることがわかる。寒天培地の乾燥は、アガロースの酸加水分解により重合度が下がることによる水保持性の低下が原因と考えられる。しかし、本システムでは寒天培地が2日間は湿潤状態を保っているという考え方もでき、紙培地で接種から成長量評価までの一連の作業を数時間で終わらせるシステムを目指しているため、十分長い湿潤時間が得られたとも言える。

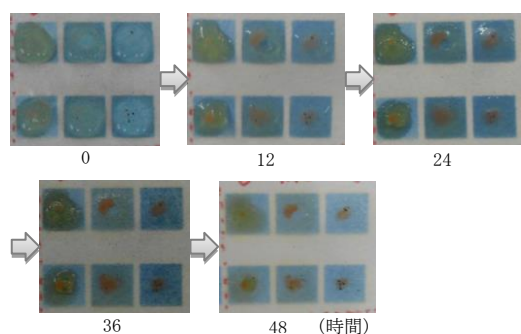


図3 ろ紙の親水性区画上寒天培地に接種したバクテリアの成長

(4) 大腸菌の印刷直後は、ドット位置を視認できなかったが、約30時間の培養後に各ドットは約1.1mm径のコロニーに成長した。細菌のインクジェット分注は生存率が低いことが問題視されることもあるが、この実験では50個のドットはすべて同様にコロニーが成長しており、十分に増殖していた。したがって、本システムではインクジェットヘッドのノズル内を通過する際に大腸菌の死滅することは考慮しなくてもよいと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10件)

- ① 江前敏晴、ペーパーエレクトロニクスの現状と課題、日本木材学会誌、査読有、60巻4号、2014、印刷中
- ② Tithimanan Srimongkon, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Toshiharu Enomae, Development of a bacterial culture system using a paper platform to accommodate media and an ink-jet printing to dispense bacteria, Am. J. Biochem. Biotechnol., 査読有, 10, 2014, 81-87, 10.3844/ajbbbsp.2014.81.87
- ③ 江前敏晴、ティティマナン スリモンコン、印刷と紙を使ったバオアッセイ、日本印刷学会誌、査読無、Vol. 51、2014、23-28、

<http://dx.doi.org/10.11370/isj.53.88>

- ④ 前島健人, 江前敏晴, 磯貝明, 鈴木孝治, チッテリオ ダニエル、印刷ペーパーエレクトロニクス：紙とインクジェットプリンターで作るマイクロ流体ヘルスケアチップ、機能紙研究会誌、査読無、No. 51、2013、35-44、<http://dx.doi.org/10.11332/kinoushi.51.35>
- ⑤ 江前敏晴、製紙及び印刷分野におけるグリーンマテリアルの展開、日本接着学会誌、査読無、Vol. 49, No. 4、2013、141-146

[学会発表] (計 17件)

- ① 江前敏晴、ティティマナン スリモンコン、タンチラ プンヤピパット、エフィ オクタビア、シュ インチャオ、望月有希子、生物材料グリーンプロセッシング研究について、第52回機能紙研究発表・講演会、2013年10月24日、あわぎんホール (徳島市)
- ② Tithimanan Srimongkon, Toshiharu Enomae, Application of ink jet printing to paper-based bacterial culture system, The 4th Asian Symposium on Printing Technology, 2013年09月27日、ホーチミンシティ技術教育大学 (ベトナム)
- ③ Toshiharu Enomae, Research of paper devices and eco-friendly materials in University of Tsukuba, The 4th Asian Symposium on Printing Technology, 2013年09月27日、ホーチミンシティ技術教育大学 (ベトナム)
- ④ 江前敏晴、紙と印刷を利用したグリーンテクノロジーの新しい展開、化学工学会第45回秋季大会、2013年09月17日、岡山大学 (岡山市)
- ⑤ Tithimanan Srimongkon, Toshiharu Enomae, Bacterial culture system using paper substrate and ink jet printing, 筑波大学/生物材料グリーンプロセッシング研究グループ第1回シンポジウム「パルプ・紙・印刷・バイオマテリアルの明日を開く」、2013年09月12日、筑波大学 (つくば市)
- ⑥ Tithimanan Srimongkon, Toshiharu Enomae, Development

- of bacterial culture system using paper device for containing media and inkjet printer for dispensing bacteria, 第80回紙パルプ研究発表会, 2013年6月25日, 東京大学(東京都)
- ⑦ Tithimanan Srimongkon, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Toshiharu Enomae, Application of inkjet technology to bacterial culture system by using paper devices, 第63回日本木材学会大会 2013年03月29日, 岩手大学(岩手県)
- ⑧ 前島健人, 磯貝明, 江前敏晴, インクジェット印刷技術を用いた紙基板健康診断チップの開発, 第63回日本木材学会大会, 2013年03月29日, 岩手大学(岩手県)
- ⑨ Toshiharu Enomae, Tithimanan Srimongkon, Tunchira Bunyaphiphat, Kento Maejima, Novel paper-based applications built on fundamental paper technology in Japan, 2012 International Symposium ON RESOURCE EFFICIENCY IN PULP AND PAPER TECHNOLOGY, 2012年11月20日, Bandung (Indonesia)
- ⑩ Toshiharu Enomae, Tithimanan Srimongkon, Kento Maejima, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Paper-based tools with fluidic channels patterned by ink jet printing, The 4th International Symposium of IWoRS, 2012年11月07日, Makassar (INDONESIA)
- ⑪ スリモンコン ティティマナン, 江前敏晴, 石田卓也, 五十嵐圭日子, エマルション粒子及びバクテリアのインクジェットパターンニング, 平成24年度繊維学会秋季研究発表会, 2012年09月25日, 福井大学(福井県)
- ⑫ Tithimanan Srimongkon, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Toshiharu Enomae, Ink-jet printing technology for stable arrangement of bacterial cells, The 3rd Asian Symposium on Printing Technology, 2012年09月21日, Bangkok (Thailand)
- ⑬ Kento Maejima, Toshiharu Enomae, Akira Isogai, Koji Suzuki, Daniel Citterio, All Inkjet Printed “Lab-on-Paper” with Electrodes and Microchannels, DIGITALFABRICATION 2012, IS&T, 2012年09月13日, Quebec (Canada)
- ⑭ Tithimanan Srimongkon, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Toshiharu Enomae, Ink jet printing with emulsified particulates and bacterial cells aiming at electrochemical sensing device made of paper, 2012 International Conference on Flexible and Printed Electronics, 2012年09月07日, 東京大学(東京都)
- ⑮ 前島健人, 江前敏晴, 磯貝明, 鈴木孝治, チッテリオ ダニエル, 印刷エレクトロニクス技術によるペーパーキャピラリーセンサーの開発, 日本化学会第92春季年会, 2012年3月25日, 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県)
- ⑯ 前島健人, 江前敏晴, 磯貝明, 鈴木孝治, チッテリオ ダニエル, ろ紙を基板とした健康診断電極チップの全工程インクジェット印刷による作製, 第50回機能紙研究発表講演会, 2011年10月27日, 高知県立県民文化ホール(高知県)
- ⑰ Kento Maejima, Toshiharu Enomae, Akira Isogai, Koji Suzuki, Daniel Citterio, All-inkjet-printed fabrication method for “paperfluidic” colorimetric & electrochemical sensing devices, The 2011 Asian Symposium on Printing Technology (2011ASPT), 2011年9月19日, 東京ビッグサイト(東京都)

[図書] (計 1件)

- ① 江前敏晴, 株式会社テクノシステム、分散・塗布・乾燥の基礎と応用 第1編基礎編 第4章欠陥 第2節乾燥欠陥 7. 偏析、2014、600(5)

[その他]

ホームページ等

<http://www.enomae.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江前 敏晴 (Enomae, Toshiharu)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40203640

(2) 研究分担者

五十嵐 圭日子 (Igarashi, Kiyohiko)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80345181