

# マイクロプレート底面へのスポット形成

## ～MULTIPLEX ELISAへのインクジェット技術の活用～

### MULTIPLEX化への高まる要望

バイオアッセイの分野では、生化学的分析や臨床検査ツールとしてマイクロプレート（ウェルプレート）が頻繁に利用されています。

特に“ELISA”（Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay）※においてマイクロプレートが使用されています。

ELISAは、免疫反応と酵素反応を利用したタンパク質の定量法であり、選択性が高く、高感度な方法として知られています。

一方で、マイクロプレートを用いたイムノアッセイや酵素分析などの分析手法は、煩雑な測定操作、試薬・試料量の多さが課題となっています。

前述のELISAにおいても、1つのウェルに対して1種類の抗原あるいは抗体を検出するため、複数のタンパ

ク質を調べる際には貴重な検体を多く準備する必要があり、試薬・試料量の多さが課題となっています。

このような課題に対し、多くの試みがなされており、その中でも代表的な試みが“MULTIPLEX”です。

MULTIPLEXは、スループットの増加、サンプル使用量の減少、試薬使用量の減少の3点においてメリットがあるといわれています。

前述のELISAにおいてもMULTIPLEXは進められており、“MULTIPLEX ELISA”では1つのウェルに対し、複数種の抗原を独立して配置することで少量の検体から複数のタンパク質解析が可能となります。

#### ※ ELISAとは

抗体を酵素で標識し、抗体を結合する物質を検出する方法。Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay（ELISA）と呼ばれる。また、enzyme immunoassayをそのまま略してEIA法と呼ぶこともある。診断や種々の生物学的な検査にはなくてはならない技法の一つ。

原理は測定対象の抗原と反応する抗体をペルオキシダーゼやガラクトシダーゼなどの酵素を化学的に結合させた抗体で検出するというもの。酵素反応によって発色を呈する基質を加えて、その発色度から目的とする抗原の有無、量を検討する。

（日経バイオ最新用語辞典 第5版 一部引用）

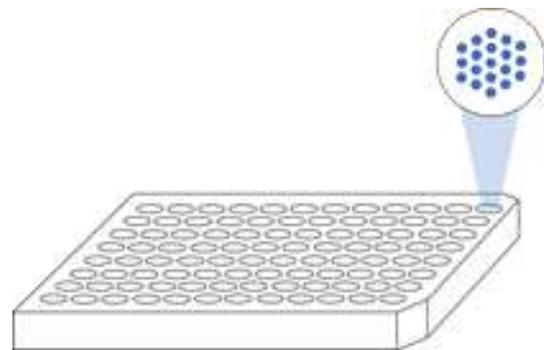


Figure 1. MULTIPLEX ELISAのマイクロプレートイメージ

## MULTIPLEXを実現する様々なスポット形成技術

MULTIPLEXを実現するため、マイクロプレート底面に抗原・抗体のスポットを作製する必要があります。直径6 mm以下のウェル底面（96穴の場合）へ、目的とする抗原または抗体のスポットを複数作製するためには、スポットサイズ1 mm以下が必要です。1 mm程度のスポット径となる液量は約0.5  $\mu$ lに相当します。この0.5  $\mu$ l以下の液量をハンドリング可能な技術は多数あります。

以下の表に代表的なスポット技術と特徴を記します。

ピン方式は、DNAマイクロアレイの作製において、よく使用される方式です。微細なスポットを安定形成できる技術として知られています。一方で、接触

による液および基板の汚染、生産速度の低さが課題です。

非接触で液滴を基板に着滴させ、スポットを形成する技術は多岐にわたります。

代表的な手法がインクジェット方式（ピエゾ、サーマル、電磁バルブ）、ディスペンサー方式（ジェットディスペンサ）です。

これらの方式の中で、生産性の高さ、形成可能なスポットサイズの小ささから、インクジェットのピエゾ方式、サーマル方式がMULTIPLEXを実現する手法として注目されています。このピエゾ方式、サーマル方式は市販のプリンタで主に使われている技術が応用されています。

方式名	接触/非接触	スポットサイズ	パターン自由度	スポット生成速度	備考
インクジェット：ピエゾ方式	非接触	○ $\phi$ 30 $\mu$ m～	○	◎ >10 kHz	
インクジェット：サーマル方式	非接触	○ $\phi$ 30 $\mu$ m～	○	◎ >10 kHz	吐出機構として発熱体と液との接触あり
インクジェット：電磁バルブ方式	非接触	× $\phi$ 300 $\mu$ m～	○	△ 数～100 Hz	量が多く、液が飛散しやすい
ジェットディスペンサ	非接触	△ $\phi$ 150 $\mu$ m～	○	○ ～1 kHz	液が飛散しやすい 高粘度液が得意
ピン方式	接触	○ $\phi$ 50 $\mu$ m～	×	×	

Table 1. インクジェット方式、ディスペンサー方式、ピン方式の比較

※ インクジェット：ピエゾ方式

ピエゾ（圧電）素子の変位を用いて小さな液室の中に圧力波を発生させ、圧力波による液振動によって微量な液滴を吐出する技術。

※ インクジェット：サーマル方式

流路にある発熱体による急速加熱によって、流路内に気泡（バブル）を発生させ、その気泡の膨張圧力によって吐出する方式。サーマル方式、バブルジェット方式と呼ばれる。

※ インクジェット：電磁バルブ方式

インクジェットヘッド後方から液を加圧し、電磁弁のmsecオーダーでの開閉によって液を吐出する方式。

## 技術課題 ～インクジェット方式によるマイクロプレートへの印刷～

インクジェットピエゾ方式、サーマル方式を実現する心臓部は“インクジェットヘッド”です。画像プリンタ用を中心に発展してきたインクジェットヘッドは、プリントドエレクトロニクスや3Dプリンタ等の産業分野での応用が近年進められています。特に吐出原理から、使用可能な液種の制限が少ないインクジェットピエゾ方式は産業応用への取り組みが盛んであり、市場で提供されるピエゾ方式のインクジェットヘッドの種類は多く、世界で150種以上（2022年9月時点）のインクジェットヘッドが提供されています。

しかし、ピエゾ方式およびサーマル方式を含め提供されているインクジェットヘッドのほとんどが、マイクロプレート底面への印刷ツールとしては適していません。それはなぜでしょうか？

市販のインクジェットヘッドを用いる場合の課題は主に3つに集約されます。これらの課題により、安定したパターンニング形成は困難でした。

- ① 飛翔距離
- ② 抗原・抗体液への不適合
- ③ デッドボリユームの多さ

### 課題1. 飛翔距離

インクジェット技術は、ノズルから射出された液滴が空中を飛翔し、対象物に付着する技術です。インクジェットヘッドと対象物との一般的な距離は1～3 mmです。距離が離れている場合は、空中を飛翔する液滴が空気抵抗を受けることで直進できず空中を浮遊し、狙った位置に着滴ができません。そのためマイクロプレートの上面から、底面指定位置への

ダイレクト印刷は困難です。正確な着滴を行うためには、インクジェットヘッドをウェル内に入れ、基板底面付近まで接近させて印刷を実施する必要があります。

しかし、市販のインクジェットヘッドは液が吐出するノズル面の幅が5 cm以上あり、マイクロプレート内への挿入は困難です。

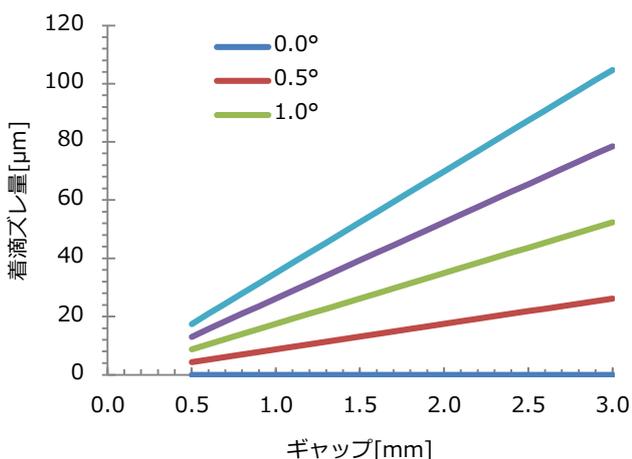


Figure 2. 飛翔距離と着滴位置の関係

ギャップ [mm]	飛翔角度				
	0.0°	0.5°	1.0°	1.5°	2.0°
0.5	0	4	9	13	17
1.0	0	9	17	26	35
2.0	0	17	35	52	70
3.0	0	26	52	79	105

Table 2. ヘッド移動速度 0 m/sにおける着滴ズレ量 [μm] 計算値

## 課題 2. 抗原・抗体液への不適合

約150種あるインクジェットヘッドには、それぞれ吐出に最適な液物性（粘度、表面張力、比重等）が存在します。ヘッドの種類ごとに使用する液種が異なり、最適な液物性が異なります。市販されている多くの産業用インクジェットヘッドは画像印刷用のインクに適合しているため、最適な粘度範囲は5～15 mPa・s程度になっています。粘度が1 mPa・sの水の液物性に近い抗体液、抗原液の

安定吐出は困難です。また、インクジェットヘッドで液を吐出するノズルは直径わずか20～50 μmと微小なため、抗体液・抗原液がノズル先端で乾燥し粘度が急激に増加することで吐出不具合が発生しやすいことも課題です。

インクジェットヘッドへの適合性を高めるためには、液側の改良が必要ですが、これは容易なことではありません。

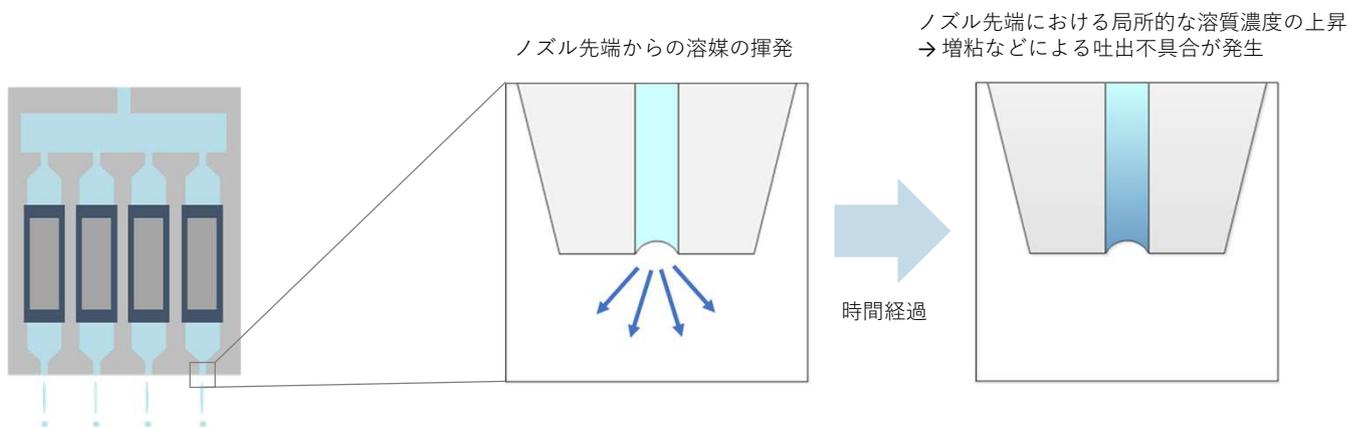


Figure 3. ノズル先端での乾燥による吐出不具合

## 課題 3. デッドボリュームの多さ

市販されているインクジェットヘッドは、内部の容積（インクボリューム）が1～数ccあります。また原理上、各ノズルに泡（気泡）が含まれている場合は安定吐出ができません。気泡を除去するために、気泡が混在している液の排出動作が必要です。

このような導入プロセスによって無駄に廃棄される液（導入必要液量）が1～5 cc程度あります。そのため市販のインクジェットヘッドは稀少な抗体液や抗原液を使う上でデッドボリュームが多いという課題を含んでいます。

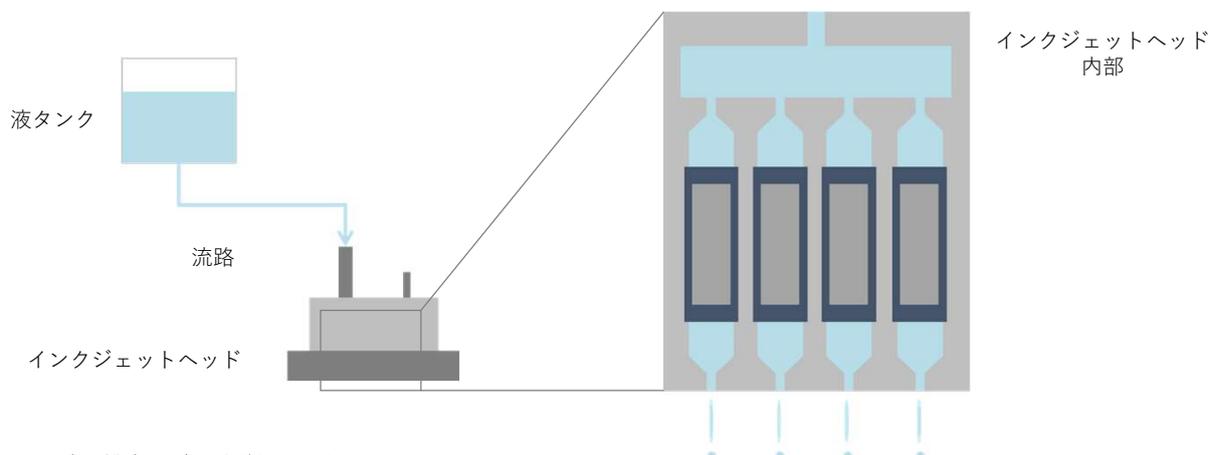


Figure 4. 液の排出とデッドボリューム

## 技術課題への対策

前章で説明した課題を解決し、ライフサイエンス分野において活用可能なインクジェットヘッドを実現すべく当社が独自開発したヘッドが“GlassJet®”です。GlassJetは、気泡をかみにくい単純な流路構造、耐液性の高い接液部材（ガラスとテフロン）を実現し、低粘度・高表面張力のバイオマテリアル溶液に特化したピエゾ式インクジェットヘッドです。

また、GlassJetは先端が尖った細管状の形状であり、マイクロプレート底面のような微細部位へ近接させてのスポッティングに適した構造となっています。

### ライフサイエンス専用“GlassJet”ヘッド

- マイクロプレート内に入れる超小型形状  
[先端サイズφ2 mm以下]
- ライフサイエンス用液（抗体液、抗原液など）のような低粘度、高表面張力液を吐出可能
- ノズル詰まりしにくい大径ノズル、大滴吐出  
[最大1 nl]
- デッドボリュームを極小化 [30 μl]
- 少量でも取り扱い可能な液吸い上げ機能  
[100 μlの液から実験可能]



Figure 5. GlassJetヘッド

### 対策1. 超小型インクジェットヘッド

GlassJetの先端は小さく、先端のサイズはφ2 mm×10 mmです。

この小ささを活かし、マイクロプレート内へ挿入することで、ウェル底面への直接印刷が可能となります。

ウェル底面とインクジェットヘッドとの距離を任意に設定可能なため、高精度なスポットパターンニングが可能です。また、高精度な位置制御が可能のため、マテリアル同士のコンタミを防ぐことや高密度のスポット形成が可能となります。

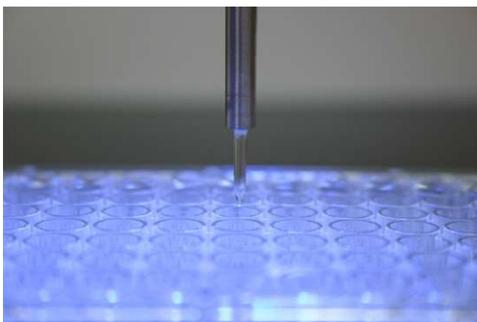


Figure 6. マイクロプレート内に挿入可能なGlassJetヘッド

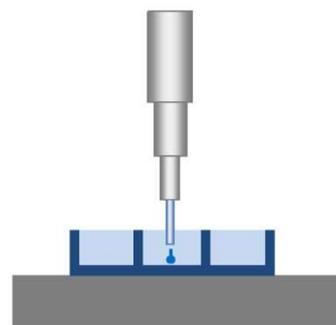


Figure 7. マイクロプレート内への注入イメージ

## 対策 2. トレハロース水溶液の吐出

GlassJetはライフサイエンス分野で用いられる液専用  
に開発されたインクジェットヘッドです。そのため、  
水同等の低粘度液、高表面張力の液を吐出しやすい  
性能を実現しています。

また、通常のプリンター用インクジェットヘッドで  
は取り扱えない高濃度、高粘度液にも対応しており、  
糖が高濃度で溶解した水溶液（糖濃度30%等）の安定  
吐出も可能です。

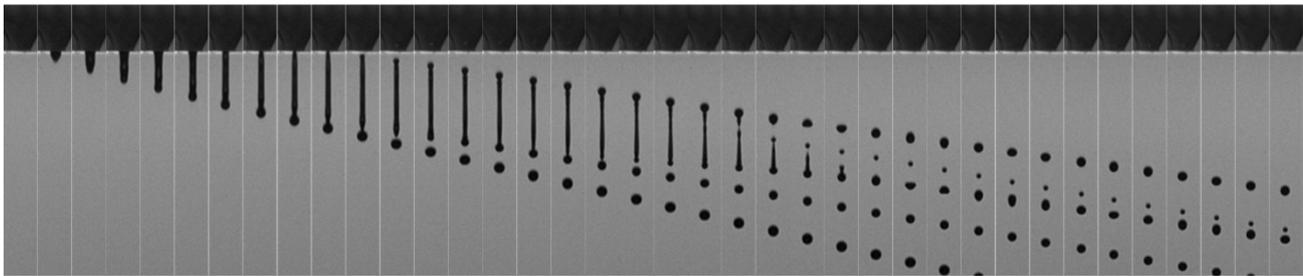


Figure 8. トレハロース水溶液（糖濃度30%）の吐出過程

※ 吐出量約0.8 nl条件における10 μsecごとの吐出過程を示す

1 mm

## 課題 3. 吸い上げ機能による少量の液利用

GlassJetはノズルから液の吸い上げによる導入が可能  
です。  
そのため、液量が100 μl程度しかない場合でもインク  
ジェット滴下が可能です。

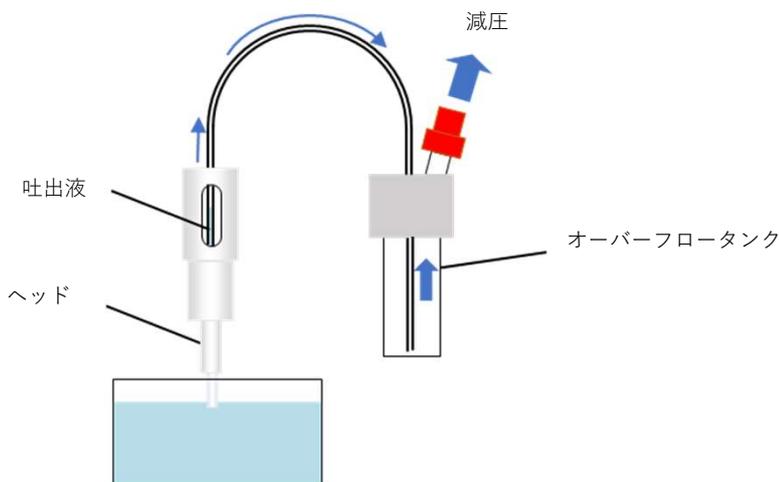


Figure 9. ノズルからの吸い上げ充填の概略図

## 応用例：MULTIPLEX ELISA ～マイクロプレート底面への試薬パターンニング～

GlassJetを用いたマイクロプレート底面へのマテリアル溶液のパターンニング例を紹介します。

MULTIPLEX ELISAを想定し、マイクロプレート（平底）底面に200 μmの青色試薬スポットを配置しました。

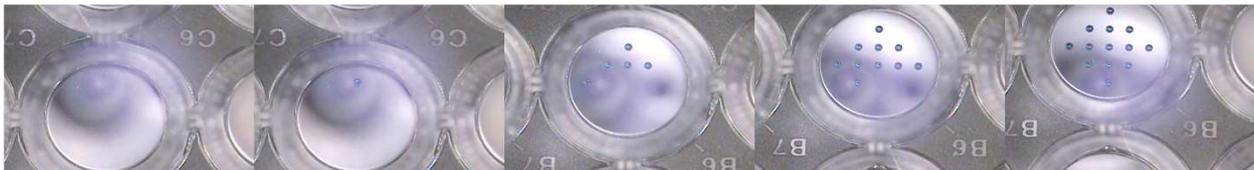


Figure 10. マイクロプレート底面へのスポットニングの様子

項目名	内容
使用装置	LaboJet-600 Bio
使用インクジェットヘッド	IJHS-1000
使用液	試薬液（青色染色）
スポット径（液滴量）	約200μm（約1nl）
基板	マイクロプレート96穴（平底）
滴下手順	下図参照

Table 3. 試験条件

ウェルへの  
注入を  
動画で見る



▶クリック

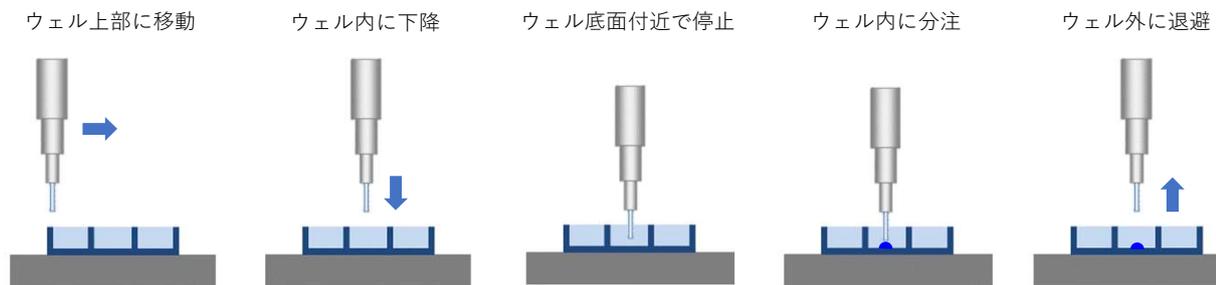


Figure 11. マイクロプレート底面へのスポットニング工程概略図

## Appendix：インクジェット分注装置“LaboJet®-Bio”

“LaboJet®-Bio”はライフサイエンス研究開発分野向けに弊社が開発した、バイオマテリアル溶液の微量ハンドリングに特化したピエゾインクジェット方式の定量分注システムです。

これまで紹介した用途を含め、各種分注アプリケーションに対応しています。

装置特徴	1. バイオチップ・センサーの試作を卓上で実現
	2. 最大4種類(オプション)のマテリアルを非接触で高精度パターンニング
	3. 吸い上げ、洗浄機能により最大96種類の液種を操作
	4. ナノリットル単位で自在に塗布量を多段階デジタル制御
	5. Made in Japanの信頼性と安心のサポート体制
用途例	・各種バイオチップ、センサーデバイス作製
	・ハイスループットスクリーニング、コンビナトリアル化学
	・ラテラルフローアッセイ
	・マイクロウェル、Micro-TAS、など微細孔への液注入
	・DNA、タンパク、抗体、酵素、試薬の分注・パターンニング



## Company Profile

社名	株式会社マイクロジェット
URL	www.microjet.co.jp
設立	1997年9月1日
代表取締役	山口 修一
本社	長野県塩尻市大門五番町79-2
東京支社	東京都国分寺市南町3-11-17 尾崎ビル2階
事業内容	<ul style="list-style-type: none"> <li>• インクジェット産業応用の研究開発支援</li> <li>• バイオ、エレクトロニクス、3Dプリンタ分野の研究開発用機器の開発、インクジェット受託試験、試作、工法開発の受託</li> <li>• 技術コンサルティング</li> <li>• 技術セミナーの開催</li> <li>• 技術専門書籍の企画・販売</li> </ul>
事業沿革	<p>ライフサイエンス分野</p> <p>2009年 自社製バイオ用ピエゾインクジェットヘッド GlassJet販売開始</p> <p>2010年 バイオ研究開発用インクジェット装置 BioPrinter販売開始</p> <p>2014年 世界初バイオチップ製造用インクジェット装置 NanoJet販売開始</p> <p>2016年 インクジェット式1細胞分離装置 SingleCellPrinter販売開始</p> <p>2017年 デisposableピエゾインクジェット PipeJet販売開始</p>
受賞歴	<p>2015年 「nanotech大賞2015 日刊工業新聞社賞」受賞：nanotech展主催</p> <p>2016年 「はばたく中小企業300社」受賞：経済産業省主催</p> <p>2017年 2017年度「蔵前ベンチャー賞」受賞：一般社団法人蔵前工業会主催</p>