

微生物培養におけるフォトレジストフィルムを用いた手法の提案 Proposal of a Method Using Photoresist Film in Microbial Culture

○吉田翔¹, 川根光樹², 岩淵範之³, 内木場文男⁴, 金子美泉⁴

*Kakeru Yoshida¹, Koki Kawane², Noriyuki Iwabuchi³, Fumio Uchikoba⁴, Minami Kaneko⁴

Abstract: Cultivation represents a critical step in the realm of microbiological research. The primary function of this apparatus is to facilitate the isolation and propagation of microorganisms. Typically, during the research phase, cultivation is performed manually. Consequently, instances of variations in cultivation results have been observed. However, research focusing on the mechanism behind why these variations occur has not been conducted. The present study focuses on the load imposed on the culture medium during smear preparation. The present study proposes a cultivation method that utilizes photoresist film as a means to achieve smear preparation under no-load conditions. The present study corroborates the hypothesis that the proposed methodology can be utilized to fill microbial-sized powder into photoresist films with 50 μm patterns.

1. 緒言

微生物はその存在を確認されてから現在に至るまで様々な場面で私たちの暮らしに恩恵を与えており、薬剤の開発など幅広い分野で活用されている。このような研究に微生物を用いるには大量のサンプルが必要になる。しかし、微生物を自然界で採取する場合は混在しており、必要な微生物のみを大量に得ることは難しい。そこで培養操作により単離および増殖させ、目的のサンプルを用意することが必要になる。従来の微生物培養分野では、主に生育温度や培地の pH などの環境要因に焦点を当てた研究が進められてきた^[1]。しかし、現段階で培養が可能な微生物の種類は、この世界に存在する微生物のうちの 0.1%に満たない^[2]とされており、いままでに検討されてこなかった要因が培養結果に影響を与えている可能性が十分考えられる。

こういった現状の中で、我々は微生物の培養において、作業者によって得られる微生物が異なる、出現するコロニー数が異なるといった差が生じる事例を確認した。培養には複数の工程があり、その内の1つが塗抹である。生成した寒天培地に対して、スプレッダーと呼ばれる棒状の器具を用いて滴下した菌液を培地全体へ塗抹する。これらの操作は手作業で行うことが一般的で、作業者によって速度や軌道、かける圧力などが異なっており定量化されていない。すでに市販されている培養デバイスは個人差を無くし効率的な培養で大量生産が可能であるが、塗抹時の要素が培養結果に与える影響を明らかにするために用いるには適さない。

そこでこれまでに我々はスプレッダーの速度、軌道、培地にかかる荷重を任意で変更可能なそれぞれのデバ

イスを開発し、実験を行ってきた。その中で特に圧力が影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究では負荷の有無が与える影響を明らかにするために、塗抹時の負荷を軽減する手法としてフォトレジストフィルムに微小な孔をあけ、培地へ菌液の転写を行う手法を提案する。本稿では提案手法の実現性を確認するため、培養孔を形成したレジストフィルムの作製と微生物の同等の大きさの粒子を持つ墨汁での塗抹実験を行ったので報告する。

2. フォトマスクの設計および充填実験

これまでは菌液に掛かる負荷について検討し、培養結果に与える影響を確認してきた。しかし、無負荷状態での塗抹についての検討は行ってこなかった。負荷をかけない簡単な方法として、菌液を培地へ滴下のみする方法が挙げられる。しかし、滴下のみの場合は一か所に菌が溜まり、栄養素が偏ることで微生物が増殖できない可能性が高い。また、単離が行えず培養結果として好ましくない。

そこで半導体素子作製技術にも利用されるフォトレジストフィルムを用いて、あらかじめ培地に接する菌液量を制御する手法を提案する。提案する培養方法を Figure 1 に示す。レジストフィルムに対して微小な孔をあける手法として、露光装置による光の照射により微小なマスクパターンをフィルム上に転写する。炭酸ナトリウム水溶液 ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{aq}$) で現像処理をすることで微細な孔パターンを形成したフィルムを作製する。次に作製したフィルム上に滴下した菌液を均一に塗布することで、微生物を孔に格納する。最後に生成した寒

1 : 日大理工・院 (前) 2 : 日大理工・学部・精機 3 : 日大生物資源科学部・教員 4 : 日大理工・教員・精機

天培地に対してフィルムを接地させ、菌液を培地表面に移動させることで負荷をできるだけ少なくしかつ単離を実現する。本稿では菌液を充填するフィルムの作製と菌液を模した墨汁の充填を行い評価する。

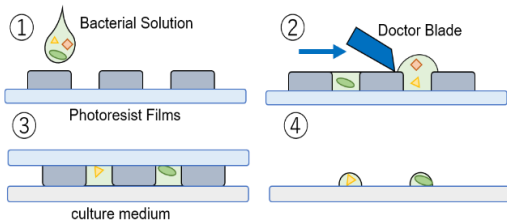


Figure 1. Cultivation process using a photoresist film

フォトレジストフィルムを露光するにあたり、フォトマスクの設計を行った。50 μm~100 μm, 横60 μmで縦の長さを10 μmずつ大きさを変更した長方形を配置する。また、それぞれ50,70,100 μmの円, 四角形, 三角形を3 mmの間隔で配置し, 角の有無によって生じる微生物の流入しやすさを確認するために用いる。

本実験では膜厚35 μmのレジストフィルムを使用する。露光量は 160 mJ/cm² とし, 現像は 1.0wt% Na₂CO₃aq の現像液で行う。その後, 水を用いてリンスを2回行う。乾燥後, 培養孔を形成したレジストフィルムに対して試料液を滴下する。試料液にはまずは菌液ではなく, 取り扱いが簡単な濃度を下げた墨汁を用いる。墨汁を原液で使用すると観察が困難なため, 濃度を10⁻⁵倍にして用いる。また, 滴下後の塗抹工程はせずに乾燥を行う。乾燥後に孔に対して墨汁の粒子が流入したかどうか光学顕微鏡を用いて観察を行う。

3. 実験結果と考察

Figure 2 に現像したレジストフィルムとそれぞれの孔の様子を示す。孔および長方形はそれぞれ最小径, 最小幅が50 μm のパターンを観察した。

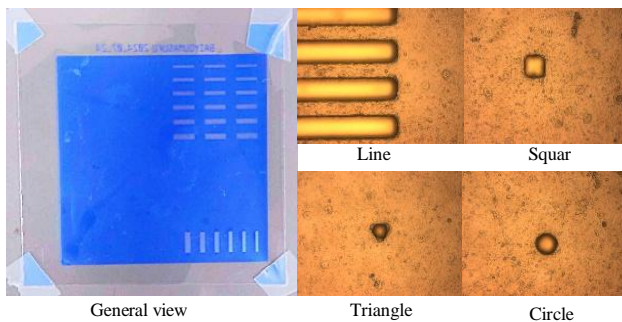


Figure 2. Patterned resist film

次に培養孔を形成したレジストフィルムに墨汁の滴下のみ行った結果を Figure 3 に示す。円や四角形などの微小な孔に対しては光学顕微鏡で確認することがで

きなかった。一方で長方形パターンに対しては充填された様子が確認された。今回使用した墨汁の粒子は Figure 4 に示すような大きさで, (B)の墨汁の粒子は300 nm程度だとわかる。また, (A)の白い10 μmほどの塊は墨汁に含まれる糊の成分と粉体の混ざった状態と考えられる。今回使用した墨汁の成分はすべて50 μm以下であることから, 長方形に現れた点は墨汁が流入したものと推測される。

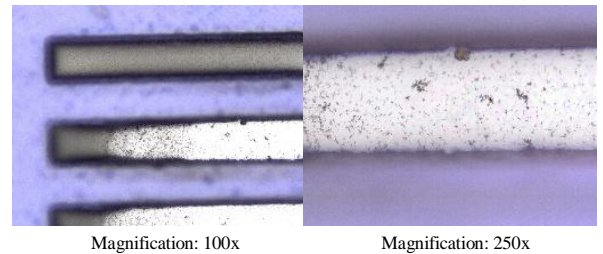


Figure 3. Observation after pouring

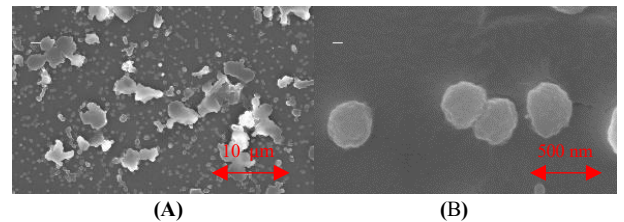


Figure 4. Particles of ink

しかし, 流入の仕方には偏りがあり滴下のみでは粒子が分散せず, 実際の菌液を用いるとコロニー形成がうまくいかないことが予測される。このことから充填を目的に液体をレジストフィルム全体へ広げる必要があるが, 一般的な塗抹動作に比べて負荷の軽減が見込める。また, 菌液濃度についても検討する必要がある。

4. 結言

本実験ではレジストフィルムを用いた転写を実現するために, 墨汁を用いた試作実験を行った。その結果, 設計した長方形の孔に充填された様子が確認できた。しかし, 円や四角などの微小な孔に対しては直接観察することはできなかった。今後はこれらの孔に対して充填されたか確認するために SEM を用いた観察を行う。

5. 参考文献

- [1]坂本光央: 微生物の分離・培養及び分類, 日本乳酸菌学会誌, 34, 1, 3-8, 2023
- [2] 青井謙輝: 培養できない微生物とは? どうしたら培養できるのか? -培養方法の革新-, 環境バイオテクノロジー学会誌, 16, 1, 59, 2016.