

**1101 蛍光染色法によるリアルタイム菌数計測**

○米虫節夫, 濱田朝康, 福岡 誠, 中池治彦, 松本真義, 澤辺昭義 (近大・農)

**【目的】**細菌類の生菌数測定は通常、平板法によって行われるが、結果が出るまでには数日という長い時間が必要である。顕微鏡下で適当な染色を施すなどにより、短時間に生菌数・死菌数を分別計測することは可能であるが、作業が大変でありほとんど行われていない。今般、測定時間が約10分、前処理を含め数十分で生菌数及び死菌も含めた総菌数を測定可能な製品が発売され、その性能などを評価する機会を得た。

**【方法】**菌数計測に利用した装置は松下精工(株)が開発した「微生物迅速検査装置 バイオプローラ」で、解析プログラムは試行版のものである。

専用濾過チップを用いて、サンプル液及び試薬を濾過し、装置にセットする。対象となる菌は濾過チップの直径9.0mmの濾紙上に捕捉される。生／死菌のDNAと結合して紫外線により蛍光を発する試薬と、死菌のDNAと結合して緑色光により蛍光を発する試薬を用いて、菌を染色する。試薬と反応し紫外線及び緑色光により蛍光を発する発光する点をCCDで画像として取り込み、画像処理で総菌数(生・死菌数)と死菌数を各々カウントし、その差から生菌数を算出する。計測開始後の所要時間は1サンプル当たり約10分である。

*E. coli* IFO3301を無機塙合培地で培養した。生菌数は、衛生試験法に従った混釀平板培養法(普通寒天培地)、及び濁度法(OD610)で計測した。

**【結果と考察】**供試菌の発育曲線を混釀平板培養法、濁度法、バイオプローラ法で作成した。混釀平板培養法とバイオプローラ法の生菌数、濁度法とバイオプローラ法の総菌数とを比較検討し、良好な相関関係を得た。短時間に生菌数と死菌数が得られるので、工程管理における特性値として利用可能である。

**Real-time bacterial counting by a fluorescent dye method**

○ Sadao Komemushi, Tomoyasu Hamada, Makoto Fukuoka, Haruhiko Nakaike, Sadayoshi Matsumoto, Akiyosi Sawabe (Kinki Univ.)

**Key words** 菌数計測、迅速法、蛍光染色、バイオプローラ、生菌数、総菌数

**1103 光微生物を用いたマイクロチップによるハイスループット有機汚染計測**

○阪口利文<sup>1</sup>, 岩永淳平<sup>1</sup>, 別府和彦<sup>1</sup>, 前田英明<sup>2</sup>, 萩野和也<sup>2</sup>, 森田資隆<sup>3</sup>, 民谷栄一<sup>3</sup> (<sup>1</sup>近大・生物環境化学, <sup>2</sup>産総研・マイクロ空間化学ラボ, <sup>3</sup>北陸先端大・材料科学)

**【目的】**現在、汚染水などの環境分析項目の検出には、分光分析、クロマトグラフィーを中心とする種々の分析方法を用いて、各個分析を行うことで検出項目を明らかにする方法がとられている。しかしながらこのような現状では、多項目の検出内容を同時に得ることが困難であり、いわゆるハイスループット分析は不可能であった。そこで本研究では、微細加工技術、及び光微生物を用いた微生物アレイ型マイクロチップを作成し、水質有機汚染に対する微量ハイスループット分析用センサーの開発について報告する。

**【方法、及び結果】**光微生物のアレイ化基板には、3cm四方、厚さ2mmのアクリル板を使用し、直径700μm、深さ100μmの微小ホールをNC工作機で加工した。このホールに発光微生物をアルギン酸ゲルで包埋して固定化し、アレイ化することで微生物アレイチップを作成した。作成したチップに対して、試料水(約50μl)を滴下し、ホールからの発光をケミイメージャーを用いて検出、数値化することで多検体の有機物濃度を測定した。その結果、滴下後、10分以内でホールからの発光が確認され、試料水中の有機物濃度を同時に多検体で検出することができた。有機物濃度では80～800ppmの間で相関関係が確認され、250～500ppmの間で発光強度と有機物濃度間で直線的な関係が示されることから、微生物チップを用いた有機物濃度の迅速かつ同時、多検体検出が達成された。今後、発光遺伝子を導入した組み換え微生物を多種類アレイ化することで、マルチアッセイ型微生物チップセンサーシステムの構築が可能になると考えられた。

**High-through-put measurement of organic pollution by using microchip device immobilized luminous microorganisms**

○ Toshifumi Sakaguchi<sup>1</sup>, Junpei Iwanaga<sup>1</sup>, Kazuhiko Beppu<sup>1</sup>, Hideaki Maeda<sup>2</sup>, Kazuya Ogino<sup>2</sup>, Yasutaka Morita<sup>3</sup>, Eiichi Tamiya<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Environ. Chem., Kinki Univ., <sup>2</sup>Micro-space Chem. Lab., NIAIST, Kyushu, <sup>3</sup>Sch. Materials Sci., JAIST)

**Key words** micro-chip, luminous bacteria, biosensor, microfabrication, biochip, ecomonitoring

**1102 マイクロ流路を用いたコプラナー PCB センシングデバイスの開発**

○遠藤達郎<sup>1</sup>, 奥山 亮<sup>2</sup>, 松原泰孝<sup>1</sup>, 小林正昭<sup>1</sup>, 森田資隆<sup>1</sup>, 水上春樹<sup>2</sup>, 民谷栄一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北陸先端大・材料科学, <sup>2</sup>エンバイオテック・ラボラトリーズ)

**【目的】**環境汚染問題は、大気汚染から水質汚染、土壤汚染へと広がり、これら化学物質の汚染状況を迅速に把握する方法が望まれている。そこで本研究では、コプラナーポリ塩化ビフェニル(Coplanar polychlorobiphenyl: Co-PCB)を対象としたフロー型センサーの開発を試みた。フロー型センサーでは、微小空間の持つ短い拡散移動距離を生かし、ノイズを低減させて定量を試みるため、Co-PCB抗体を固定化したビーズを、流路中へ添加・整列させた。定量には、対象物質が低分子であることから競合法を採用し、ELISAをチップ上で行った。また、整列させるビーズの個数を変え定量を行ふとともに、微小空間内へ、効率的にビーズの配置を行い、分析時間の短縮と操作性の向上を試みた。

**【方法及び結果】**Si基板上へフォトリソグラフィーにより SU-8による鉄型を作製した。これをPDMS(polydimethylsiloxane)に転写し、深さ100μm、流路幅1000μmで流路中央部のみ深さを20μmのダム構造にしたチップを作製した。次に、直径90μmのポリスチレンビーズにCo-PCBの一種である3,3',4,4'-Tetra chlorobiphenyl(TeCB)に対して特異的な抗体を固定化し、この流路中央部に配置し、ピンセットにて整列させた。ここにガラス平板を貼り合わせ、送液用のチューブを接続して最終的なチップを作製した。HRP標識 TeCB 誘導体および非標識 TeCB 誘導体、各種試薬溶液は、シリジングポンプによって送液し、競合法による非標識 TeCB 誘導体の定量を行った。その結果、本センサーは非標識 TeCB 誘導体を 1.0ppm～0.1ppt の濃度範囲で定量できた。本システムで必要とする試料量は 20μl と少なく、濃縮も容易である。また、測定時間も 30 分程度で可能であった。

**Development of microfluidic coplanar PCB sensing device**

○ Tasturo Endo<sup>1</sup>, Akira Okuyama<sup>2</sup>, Yasutaka Matsubara<sup>1</sup>, Masaaki Kobayashi<sup>1</sup>, Yasutaka Morita<sup>1</sup>, Haruki Mizukami<sup>2</sup>, Eiichi Tamiya<sup>1</sup> (<sup>1</sup>JAIST Sch. Materials Sci., <sup>2</sup>EnbioTec Lab., Co., Ltd.)

**Key words** coplanar polychlorobiphenyl, ELISA, monoclonal antibody, biosensor

**1104 流体制御機能を有するポリマーチップの開発**

○前田 勉, 松原泰孝, 金原 健, 森田資隆, 民谷栄一 (北陸先端大・材料)

**【目的】**近年のμTAS分野の発展により、試料の分離、希釈、反応、検出をわずか数センチ角の面積で行うことができるチップが数多く報告されている。その多くは、チップ上に作製したキャピラリー内に試薬を送液することで反応や検出を行っていることから、微小空間における、試薬の送液技術について様々な手法が報告されている。フロー型でのキャピラリーのような微小空間における液体の挙動は、比表面積が大きいため内部表面の状態に大きく影響を受けるため、内面を種々の方法により修飾すると、様々な液体の挙動を制御することが期待できる。そこで、ポリマー材料が今後バイオチップ等の素材として期待されることから、本研究では、キャピラリー構造を有するポリマーの表面修飾について検討した。

**【方法及び結果】**半導体微細加工技術を利用してフロー型チップを作製した。流体制御は、流路形状や流体制御を行なう部位の流路表面を修飾することで、修飾物質の特性を利用することで行った。特に、表面修飾する物質として、温度応答性ポリマーを利用した。このポリマーは、下限臨界溶液温度(LCST)を有しており、LCST以下ではポリマー鎖が水和し溶解しているが、それ以上では脱水和し凝集を起こす。このため、LCST近傍で親水性面から疎水性面へと急激に変化する特性を示す。この特性を部分的な加熱により発現させ利用することで、送液の制御を行なった。結果、流路形状を変化させることで、特定部位における送液の停止が行えた。さらに、温度応答性ポリマーを流路表面に固定化することで、溶液の停止・送液ができた。

**Surface modification of microfluidics for flow control**

○ Tsutomu Maeda, Yasutaka Matsubara, Takeshi Kinpara, Yasutaka Morita, Eiichi Tamiya (Sch. Materials Sci., JAIST)

**Key words** 半導体微細加工技術、表面修飾、微小流路システム、温度応答性ポリマー、下限臨界溶液温度、流路形状