

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6077106号
(P6077106)

(45) 発行日 平成29年2月8日(2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日(2017.1.20)

| (51) Int. Cl. | | | F I | | |
|----------------|---------------|------------------|---------|--------|---|
| C 1 2 M | 1/34 | (2006.01) | C 1 2 M | 1/34 | B |
| C 1 2 Q | 1/04 | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/04 | |
| G O 1 N | 33/569 | (2006.01) | G O 1 N | 33/569 | A |
| | | | G O 1 N | 33/569 | B |
| | | | G O 1 N | 33/569 | G |

請求項の数 9 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2015-508246 (P2015-508246)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月10日(2014.3.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/056143
 (87) 国際公開番号 W02014/156584
 (87) 国際公開日 平成26年10月2日(2014.10.2)
 審査請求日 平成27年8月26日(2015.8.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-69739 (P2013-69739)
 (32) 優先日 平成25年3月28日(2013.3.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成24年度独立行政法人科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最速展開支援プログラム 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 000005049
 シャープ株式会社
 大阪府堺市堺区匠町1番地
 (73) 特許権者 505127721
 公立大学法人大阪府立大学
 大阪府堺市中区学園町1番1号
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 池水 麦平
 大阪府大阪市阿倍野区長池町2番2号
 シャープ株式会社内
 (72) 発明者 床波 志保
 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学
 法人大阪府立大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物検出用センサー、その製造方法、およびポリマー層

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検出用電極と、前記検出用電極上に配置され、検出対象の微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鋳型を備えたポリマー層とを有する検出部を備え、

前記鋳型への前記微生物の捕捉状態に基づいて前記微生物を検出するセンサーであって、

前記ポリマー層は、検出対象とする微生物の存在下でモノマーを重合して前記微生物を取り込んだ状態の前記ポリマー層を前記検出用電極上に形成する重合工程と、前記ポリマー層に取り込まれた微生物の少なくとも一部を、溶菌酵素及びキレート剤を含む溶液に接触させて破壊する破壊工程と、を有する製造方法により形成される、センサー。

【請求項2】

前記検出部の前記検出用電極を一方の電極とする水晶振動子をさらに備え、

前記水晶振動子の共振周波数の変化から前記ポリマー層の質量の変化を測定して前記微生物の捕捉状態を検出する、請求項1に記載のセンサー。

【請求項3】

前記モノマーが、ピロール、アニリン、チオフェンおよびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項1または2に記載のセンサー。

【請求項4】

前記モノマーが、ピロールまたはその誘導体からなる、請求項3に記載のセンサー。

【請求項5】

10

20

前記検出用電極の前記ポリマー層の形成面が粗面である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のセンサー。

【請求項 6】

前記微生物は、全体または表面の電荷が負電荷過剰の状態にある、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のセンサー。

【請求項 7】

検出用電極と、前記検出用電極上に配置され、微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鋳型を備えたポリマー層とを有する検出部を備えた微生物を検出するセンサーの製造方法であって、

検出対象とする微生物の存在下でモノマーを重合して前記微生物を取り込んだ状態の前記ポリマー層を前記検出用電極上に形成する重合工程と、

前記ポリマー層に取り込まれた微生物の少なくとも一部を、溶菌酵素及びキレート剤を含む溶液に接触させて破壊する破壊工程と、を有する製造方法。

【請求項 8】

前記モノマーが、ピロール、アニリン、チオフェンおよびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】

微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鋳型を備えたポリマー層であって、

前記微生物の存在下でモノマーを重合して前記ポリマー層を形成する重合工程と、

前記ポリマー層に取り込まれた微生物の少なくとも一部を、溶菌酵素及びキレート剤を含む溶液に接触させて破壊する破壊工程と、を有する製造方法により製造される、ポリマー層。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物を検出するためのセンサー、その製造方法、およびポリマー層に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、医療産業、食品産業、農業、畜産、養殖、水処理施設などにおいて、微生物検出への関心が高まっている。食品、医薬品、農薬などに存在する汚染微生物は、微量であるにもかかわらず、人の健康に大きく影響しうる。また、病院、老人介護施設における微生物汚染が社会問題化している。さらに、多様な抗菌商品の流通、需要の高まりに見られるように、一般家庭における衛生管理にも関心が高まっている。たとえば、食品加工工場の場合、出荷される食品の抜き取りでの細菌検査や工場内の環境中の細菌検査を実施しているが、培養法による測定の場合、結果が得られるまでに 24 ~ 48 時間程度要し、出荷するまでの保管コストが高くなる要因となるため、迅速な検出方法が求められている。また、農業分野においても、たとえば水耕栽培の培養液中の細菌数が増加すると発病のリスクが高まる。細菌数を早く把握することで素早く殺菌などの措置が取れるため、迅速な検出方法は有効である。

【0003】

このような状況から、微生物汚染を簡単に検出できる技術の必要性が近年急速に高まっている。また、医療現場においては、感染症の原因の病原菌を速やかに特定する必要があることから、病原菌を迅速かつ高感度で検出できる技術が求められている。微生物の検出・特定方法としては、たとえば、ELISA 法、ウェスタンブロットティング法などの方法が存在する。これらは、たとえば、抗体（一次抗体）と、微生物固有のタンパク質とを抗原-抗体反応させた後、さらに標識した二次抗体を抗体（一次抗体）と反応させ二次抗体の化学発光や ATP の加水分解反応のモニターにより検出を行なう方法である。

【0004】

また、特開 2009 - 58232 号公報（特許文献 1）には、分子鋳型を備えたポリマ

10

20

30

40

50

一の電気化学的性質を利用して、微生物由来のアニオン分子（ATP、アミノ酸など）を検出する方法について記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2009-58232号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上述の方法はいずれも微生物そのものを検出する方法ではない。また、E L I S A法などでは、微生物固有のタンパク質等に対する抗体を作製する必要があり容易ではない。

10

【0007】

本発明は、迅速かつ簡便で、高感度に微生物を検出できる新規な微生物検出用センサー、その製造方法、およびポリマー層を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、検出用電極と、検出用電極上に配置され、検出対象の微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鋳型を備えたポリマー層とを有する検出部を備え、当該鋳型への微生物の捕捉状態に基づいて微生物を検出するセンサーである。上記ポリマー層は、検出対象とする微生物の存在下でモノマーを重合して微生物を取り込んだ状態のポリマー層を検出用電極上に形成する重合工程と、ポリマー層に取り込まれた微生物の少なくとも一部を、溶菌酵素を含む溶液に接触させ破壊する破壊工程と、を有する製造方法により形成される。上記センサーの好ましい形態は、破壊工程に用いる溶液がさらにキレート剤を含む。

20

【0009】

上記センサーの好ましい形態は、検出部の検出用電極を一方の電極とする水晶振動子をさらに備え、水晶振動子の共振周波数の変化からポリマー層の質量の変化を測定して微生物の捕捉状態を検出する。

【0010】

上記センサーにおいて、上記モノマーは、好ましくは、ピロール、アニリン、チオフェンおよびそれらの誘導体からなる群から選択され、さらに好ましくはピロールまたはその誘導体からなる。

30

【0011】

上記センサーにおいて、上記検出用電極の上記ポリマー層の形成面は、好ましくは粗面である。

【0012】

上記センサーにおいて、上記微生物として、全体または表面の電荷が負電荷過剰の状態にある微生物が好ましい。

【0013】

また、本発明は、検出用電極と、検出用電極上に配置され、微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鋳型を備えたポリマー層とを有する検出部を備えた微生物を検出するセンサーの製造方法であって、検出対象とする微生物の存在下でモノマーを重合して微生物を取り込んだ状態のポリマー層を検出用電極上に形成する重合工程と、ポリマー層に取り込まれた微生物の少なくとも一部を、溶菌酵素を含む溶液に接触させ破壊する破壊工程と、を有する製造方法である。

40

【0014】

また、本発明は、微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鋳型を備えたポリマー層であって、微生物の存在下でモノマーを重合してポリマー層を形成する重合工程と、ポリマー層に取り込まれた微生物を、溶菌酵素を含む溶液に接触させ破壊する破壊工程と、を有する製造方法により製造される。

50

【発明の効果】

【0015】

本発明のセンサーによると、迅速かつ簡便で、高感度に微生物を検出することが可能である。また、本発明のセンサーの製造方法によると、迅速かつ簡便で、高感度に微生物を検出することができるセンサーが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】本発明にかかるセンサーのポリマー層の好ましい作製工程を模式的に示し、(a)は重合工程前、(b)重合工程後、(c)は破壊工程後の断面図である。

【図2】本発明のセンサーにおいて、鑄型へ標的微生物が捕捉される様子の概略を示す模式図であり、(a)は標的微生物である場合、(b)は標的微生物でない場合を示す図である。

【図3】本発明にかかるQCMセンサーの概略構成を示す模式図である。

【図4】緑膿菌の電子顕微鏡写真である。

【図5】実施例1における重合工程後のポリピロール層表面の電子顕微鏡写真である。

【図6】実施例1の破壊工程後に滅菌水で洗浄した後のポリピロール層表面の電子顕微鏡写真である。

【図7】参考例1の破壊工程後に滅菌水で洗浄した後のポリピロール層表面の電子顕微鏡写真である。

【図8】実施例1のセンサーを用いた微生物検出時における水晶振動子の共振周波数変化を示すグラフである。

【図9】参考例1のセンサーを用いた微生物検出時における水晶振動子の共振周波数変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明のセンサーは、検出用電極と、検出用電極上に配置され、微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鑄型を備えたポリマー層とを有する検出部を備え、鑄型への微生物の捕捉状態に基づいて微生物を検出するものである。

【0018】

本発明のセンサーのポリマー層は、検出対象とする微生物(以下、「標的微生物」ともいう)の存在下でモノマーを重合して微生物を取り込んだ状態のポリマー層を検出用電極上に形成する重合工程と、ポリマー層に取り込まれた微生物の少なくとも一部を、溶菌酵素を含む溶液に接触させ破壊する破壊工程とを有する製造方法により形成される。

【0019】

以下、図面を参照しながら、本発明の好ましい実施形態を説明する。

[センサーにおけるポリマー層の作製]

図1は、本発明にかかるセンサーのポリマー層の好ましい作製工程を模式的に示す断面図である。図1では、モノマーとしてピロールを用いる場合の実施形態を示す。まず、図1(a)に示すように、検出用電極11に接触する環境下に、微生物13およびピロールを含む溶液12を準備する。溶液12中に含まれるポリマー層を構成するモノマーの濃度としては1mM~100Mとすることができ、微生物13の濃度は1~1×10¹⁰cfu/mLとすることができる。

【0020】

重合工程(St1)では、検出用電極11を陽極とし、対電極(不図示)を陰極とする電気分解を行い、ピロールの酸化的重合反応により、検出用電極11上にポリピロール(図1(b)中「PPy」は、ポリピロールの略である)からなるポリマー層14を形成する。形成されたポリマー層14には、微生物13が取り込まれる。ピロールは、重合工程で検出用電極11に電子を放出するためにそれ自体は陽電荷を有し、この陽電荷を補償するために、全体または表面の電荷が負電荷過剰の状態にある微生物13がポリマー層14中に取り込まれると考えられる。

10

20

30

40

50

【0021】

次に、破壊工程（St2）において、図1（c）に示すように、ポリマー層14に取り込まれた微生物13を破壊する破壊工程を行なう。破壊工程は、リゾチームなどの溶菌酵素を含む溶液に微生物13を接触させて行なうことができる。かかる破壊工程により、微生物13が破壊され、微生物13がポリマー層14から放出される。破壊工程で用いられる溶液には、さらにキレート剤が含まれることが好ましい。破壊工程で用いられるキレート剤としては、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、EGTA、NTA、DTPA、HEDTA等が挙げられる。また、破壊工程で用いられる溶菌酵素としては、リゾチーム、N-アセチルムラミターゼ、アクロモバクターエンドペプチダーゼ等が挙げられる。

【0022】

溶菌酵素を含む溶液を破壊工程で用いることにより、ポリマー層14に取り込まれた微生物13を破壊することができ、破壊された微生物13がポリマー層14から放出され鑄型15が形成される。溶液に含まれるキレート剤は溶菌酵素による溶菌作用の発現をより容易にするものと考えられ、したがってキレート剤を含むことにより微生物13の破壊の程度を大きくすることができ、破壊にともなって微生物13がポリマー層14から放出されることを容易にするものと解される。溶菌酵素とキレート剤を用いることで、容易に破壊工程の効率を向上することができ、後述するように、キレート剤を用いないものに比べ、センサーの検出感度を向上することができる。破壊工程で用いられる溶液中の溶菌酵素の濃度は1～1000mg/mLであることが好ましい。キレート剤を添加する場合には、溶液中のキレート剤の濃度は10～1000μg/mLであることが好ましい。溶菌工程において、溶菌酵素を含む溶液をポリマー層14に取り込まれた微生物13に接触させる時間は、12～48時間であることが好ましい。なお、破壊工程においては、上記のように溶液と微生物とを接触させる処理とともに、加温処理、超音波処理等を組み合わせて行ってもよい。

【0023】

ポリマー層14中の微生物13が存在した領域は、微生物13の立体構造に相補的な三次元構造を有する鑄型15となる。このように形成された鑄型15を備えたポリマー層14と、検出用電極11との積層体が、本発明のセンサーにおける検出部17を構成する。検出部17におけるポリマー層14の厚さは、たとえば0.1～10μmとすることができる。

【0024】

検出対象の微生物13としては、全体または表面の電荷が負電荷過剰の状態にある微生物であれば特に限定されることはなく、大腸菌のEscherichia属、緑膿菌などのPseudomonas属、Acinetobacter calocoaceticusなどのAcinetobacter属を始め、Serratia属、Klebsiella属、Enterobacter属、Citrobacter属、Burkholderia属、Sphingomonadase属、Chromobacterium属、Salmonella属、Vibrio属、Legionella属、Campylobacter属、Yersinia属、Proteus属、Neisseria属、Staphylococcus属、Streptococcus属、Enterococcus属、Clostridium属、Corynebacterium属、Listeria属、Bacillus属、Mycobacterium属、Chlamydia属、Rickettsia属、Haemophilus属の細菌が例示される。また、ウイルスとしては、A型肝炎ウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、ノロウイルスが、真菌としてはカンジダが、原虫としてはクリプトスポリジウムが例示される。微生物の全体または表面の電荷は、pHなどの溶液12の水質により変化する。たとえば、微生物の表面にはカルボキシル基、アミノ基、リン酸基などの種々の官能基があるが、それらの官能基を含む表面はpHが高くなると負に帯電する。そのため、鑄型を形成する際や測定する際に、負電荷過剰の状態にするために、たとえば、溶液12をアルカリ性にするなどしても良い。

【0025】

図1においては、モノマーとしてピロールを用い、ポリマー層としてポリピロール層を形成する場合について説明したが、ポリマー層の原料となるモノマーとしてはピロールに限定されることはなく、他には、アニリン、チオフェン、それらの誘導体等が例示される。

10

20

30

40

50

【0026】

検出用電極11の材料は特に限定されることはなく、金電極、金とクロムとの多層電極、金とチタンとの多層電極、銀電極、銀とクロムとの多層電極、銀とチタンとの多層電極、鉛電極、白金電極、カーボン電極等が例示される。検出用電極11のポリマー層14が形成される面には、粗面化処理が施されていることが好ましい。検出用電極11のポリマー層14が形成される面が粗面であることにより、ポリマー層14との密着性が向上し、また電極の表面積が拡大するという効果がある。たとえば、検出用電極11として金電極を用いた場合、金電極表面にプラズマエッチングを施し、その後金ナノ粒子を固定することにより粗面化処理する粗面化工程を行なうことができる。検出用電極表面11の表面粗さは、中心線平均粗さで、たとえば0.4~50 μm とすることができる。

10

【0027】

[鑄型への標的微生物の捕捉]

図2は、鑄型へ標的微生物が捕捉される様子の概略を示す模式図である。図2(a)は試料溶液中の微生物13aが標的微生物である場合を示し、図2(b)は試料溶液中の微生物13bが標的微生物でない場合を示す。図2(a)、(b)に示すように、まず、ポリマー層14と検出用電極11からなる検出部17に接触する環境下に、試料溶液を準備する。負に帯電している微生物が、正に帯電したPPy膜との静電相互作用などにより、検出部17の方向に移動すると、鑄型15の三次元構造と相補的な立体構造の微生物13aは鑄型15内に捕捉されるが(図2(a))、鑄型15と相補的でない微生物13bは鑄型15内に捕捉されない(図2(b))。なお、微生物の移動は、微生物の能動的な移動であっても良いし、電気泳動、誘電泳動や水流などによって動かしたり、あるいは単に沈殿したり、拡散したりするものであっても良い。また、微生物以外の、たとえば、泥、鉄さびといった濁質が水に含まれていた場合であっても、それらも鑄型15と三次元的形状、荷電状態等が異なり相補的でないため、捕捉されない。そのため、標的微生物と他の濁質の識別が可能である。

20

【0028】

[標的微生物の検出]

微生物13aが鑄型15内に捕捉されると、ポリマー層14および検出用電極11からなる積層体に、たとえば、質量変化、導電特性変化、電気容量変化、光反射率変化、温度変化等が生じる。本発明のセンサーにおいては、このような変化を検出して、微生物の鑄型15への捕捉状態を検出する。そして、捕捉状態に基づいて標的微生物の検出が可能となる。このような検出により、標的微生物の迅速かつ高感度の検出が達成され得る。質量変化の検出方法の具体例として、水晶振動子の共振周波数の変化を検出する検出方法が挙げられる。以下、本発明のセンサーの好ましい一例である、水晶振動子マイクロバランス(QCM)センサーについて説明する。

30

【0029】

(QCMセンサー)

図3は、QCMセンサーの概略構成を示す模式図である。QCMセンサー33は、溶液を保持するセル27と、セル27の底部に配置された水晶振動子32と、発振回路22と、周波数カウンタを有するコントローラ21とを備える。水晶振動子32は、図1に示した工程により作製された検出部17と、水晶片24と、対電極(第2対電極)23とが順に積層されてなる。QCMセンサー33は、さらに、試料溶液31内に浸漬される対電極(第1対電極)16と、参照電極30とを備え、検出部17の検出用電極11と対電極16の間に直流電源を接続することができる。

40

【0030】

まず、セル27内に試料溶液31を添加する。そして、発振回路22により検出用電極11と対電極23との間に交流電圧を印加し、水晶片24を振動させる。ポリマー層14の鑄型15に微生物が捕捉されると、検出部17の質量に変化が生じ、水晶片24の共振周波数が変化する。コントローラ21内の周波数カウンタは、発振回路22からの信号を受けて、共振周波数値を測定する。共振周波数値の変化から微生物の捕捉状態が検出され

50

る。

【0031】

図3に示すQCMセンサー33を用いて、検出用電極11表面の粗面化処理、および図1に示した工程にしたがって、検出用電極11上にポリマー層を形成することができる。これらの場合は、検出用電極11、水晶片24、対電極23がこの順で積層された水晶振動子をセル27の底部に配置し、検出用電極11と対電極16との間に直流電源を接続して行なう。QCMセンサー33を用いたポリマー層の形成においては、ポリマー層形成時に併せて水晶振動子の共振周波数変化をモニターすることにより、ポリマー層の形成の進行状況を確認することができる。検出対象の微生物が複数種類存在する場合には、それぞれの本発明にかかる鑄型を個々に形成して、それらを組合せることにより、或いは単一の鑄型の中に複数の微生物に対応した鑄型が同時に形成されることにより、同時に複数種類の微生物を検出することも可能である。

10

【0032】

本発明のセンサーによると、たとえば、数分～数10分で細菌を検出することも可能であり、培養法と比較してはるかに迅速に検出することができる。また、蛍光染色に必要な染色試薬や、ATPで菌数を測定するのに必要なATP抽出試薬などを使用せずに検出することができるため、浄水器、ウォーターサーバーあるいは自動製氷装置などの機器への組み込みや自動化が容易である。また、水質検査、食品検査での細菌検査ツールとして、浄水場や、飲料品・食品工場での利用が可能である。更に具体的には、貯水タンクや配管経路などの装置内の細菌を自動的に検知し、ユーザーに報知したり、自動的に殺菌・洗浄などの対策をしたりすることができる。また、浄水場での上水の配管ラインに装置として組み込んで配水される水の細菌を検知することも可能である。

20

【0033】

上述のセンサーにおけるポリマー層は、センサーの構成要素以外にも、微生物の立体構造に相補的な三次元構造の鑄型を有することを利用した微生物捕捉装置、微生物形状認識装置、微生物追跡装置、また、多孔質体であることを利用した触媒担体などに用いることも可能である。

【実施例】

【0034】

以下、本発明を実施例によって説明する。以下の実施例は、本発明を例示するものであって、本発明を制限するものではない。

30

【0035】

以下の実施例1、参考例1において、ポリマー層の作製は電気化学測定システム(Model 842 B、ALS社製)を用いて行ない、参照電極にはAg/AgCl(飽和KCl)、対電極(第一対電極)にはPt棒(直径1mm、長さ4cm、(株)ニラコ製)を用いた。下記において、電位はこの参照電極の電位に対する値を記載している。また、両面に金電極(検出用電極と第2対電極)が設けられた水晶振動子(電極面積0.196cm²、基本振動周波数9MHz、ATカット、角型、(株)セイコー・イーザーアンドジー製)を用いた。

40

【0036】

実施例1、参考例1では検出対象の微生物として、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*、ゼータ電位: -33.87mV)を用いた。図4は緑膿菌の電子顕微鏡写真を示す。

【0037】

<センサーの作製>

[実施例1]

(金電極の粗面化工程)

金電極の表面に、ポリピロール層との密着性向上のため以下の手順にしたがい水晶振動子積層体の金電極表面の粗面化処理を行なった。

1. プラズマエッチング装置(SEDE/meiwa fosis)により、金電極(商品名: QA-A9M-AU、(株)セイコー・イーザーアンドジー製)表面に30秒間

50

エッチングを行なった。

2. 水晶振動子を、図3に示すようなQCMセンサー33のセル(ウェル型セル、商品名:QA-CL4、(株)セイコー・イーザーアンドジー製)27の底部に設置した。その後、30nmのクエン酸保護金ナノ粒子(0.0574wt%)を含んだ溶液500 μ Lをセル27に添加し、室温で24時間放置した。

3. 金電極を純水で洗浄後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム溶液(0.1M)9mL、塩化金(III)酸四塩化物(0.01M)250 μ L、NaOH(0.1M)50 μ L、アスコルビン酸(0.1M)50 μ Lを混合して調製した溶液(Auナノ粒子成長溶液)500 μ Lをセル27に添加し、室温で24時間静置した。

4. セル27内の溶液を除去し、金電極を超純水で洗浄した。

10

【0038】

(微生物の鑄型を備えたポリピロール層の作製)

以下の手順に従って金電極上にポリピロール層を作製した。

5. 1×10^9 cfu/mLの緑膿菌を含む0.1Mのピロール水溶液を調製して修飾溶液とした。

6. 上記で粗面化処理を施した金電極が配置されているQCMセンサー33のセル27内に、修飾溶液を添加し、修飾溶液内に第1対電極および参照電極を差し込んだ。

7. 修飾溶液中において定電位電解(+0.975V、90秒間)することで金電極上にポリピロールを析出させ、ポリピロール層を作製し(重合工程)、その後滅菌水でポリピロール層を洗浄した。重合工程においては、水晶振動子の共振周波数のモニターも行なった。重合工程後のポリピロール層について、走査型顕微鏡(SEM)により表面観察を行なった。ポリピロール層の厚みは約0.6 μ mであった。

20

8. EDTA溶液(400 μ g/mL、pH:8.07、Trisバッファー)を作製し、このEDTA溶液にリゾチームを加えて溶解することでリゾチーム溶液(20mg/mL)を調製した。また、非イオン界面活性剤(商品名:Triton)を含むTriton溶液(20wt%、pH8.03、Trisバッファー)も併せて調製した。

9. 作製したリゾチーム溶液250 μ Lをセル27内に添加して室温で1日間静置し、さらにTriton溶液を250 μ L滴下して室温で1日間静置することで、ポリピロール層に取り込まれた微生物の溶菌処理を行った(破壊工程)。

10. セル27内の溶液を除去し、滅菌水でポリピロール層を洗浄した後、走査型電子顕微鏡(SEM)により表面観察を行った。

30

【0039】

[参考例1]

上記した実施例1の「8.」において、EDTAを含まないリゾチーム溶液(20mg/mL)を調製し、「9.」において、このリゾチーム溶液を用いた点以外は、実施例1と同様にポリピロール層を作製した。

【0040】

<ポリピロール層のSEMによる表面観察>

図5は、実施例1における重合工程後のポリピロール層表面の電子顕微鏡写真を示す。図5(b)は、図5(a)の一部を拡大して示した電子顕微鏡写真である。図5において、ポリピロール層の表面に緑膿菌が取り込まれた様子が観察された。

40

【0041】

図6(a)、(b)は、実施例1の破壊工程後に滅菌水で洗浄した後のポリピロール層表面の電子顕微鏡写真であり、図6(b)は、図6(a)の一部を拡大して示した電子顕微鏡写真である。図7(a)、(b)は、参考例1の破壊工程後に滅菌水で洗浄した後のポリピロール層表面の電子顕微鏡写真であり、図7(b)は、図7(a)の一部を拡大して示した電子顕微鏡写真である。図6においては、図7と比較して、取り込まれた緑膿菌がほとんど存在せず、ポリピロール層において緑膿菌鑄型が形成されていることがわかる。なお、図7(a)、(b)においても、ポリピロール層の表面の一部に緑膿菌が存在するものの、同時に鑄型が形成されていることがわかる。

50

【0042】

< 微生物の検出 >

(検出実験)

上述のようにして作製した、ポリピロール層が表面に形成された水晶振動子をセルの底部に備えたQCMセンサーを用いて微生物の検出を行なった。セル内に微生物を含む試料溶液を添加した。そして、水晶振動子の共振周波数をモニタリングした。

【0043】

(結果)

図8は、実施例1のセンサーにおける水晶振動子の共振周波数変化を示すグラフである。図8に示す結果から、実施例1のセンサーにおいては、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) を含む試料溶液を添加した場合に、アシネトバクター (*Acinetobacter calcoaceticus*) を含む試料またはブランクと比較して、共振周波数が大きく減少することが分かった。共振周波数の減少は水晶振動子表面の質量の増加を意味しており、緑膿菌がポリピロール層の鑄型に取り込まれることで水晶振動子表面の質量が増加したものと考えられる。したがって、実施例1のセンサーでは緑膿菌を検出できることが分かる。

10

【0044】

図9は、参考例1のセンサーにおける水晶振動子の共振周波数変化を示すグラフである。図9に示す結果から、参考例1のセンサーにおいては、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) を含む試料溶液を添加しても共振周波数の減少が見られなかった。しかしながら、図7(a)、(b)から、ポリピロール層の表面に鑄型が形成されていることがわかるので、ここで用いた検出方法よりも高感度の検出方法を採用した場合には、参考例1のセンサーによっても緑膿菌を検出できるものと解される。

20

【0045】

本発明に係るセンサーを用いれば、例えば、食品加工工場においては迅速かつ容易に微生物を検出することができるため、不良品率の低減や保管コストの低減に役立つだけでなく、所望の微生物の鑄型を形成して検出することによって、微生物の混入経路の把握や対策の立案を容易に行うことができるようになる。

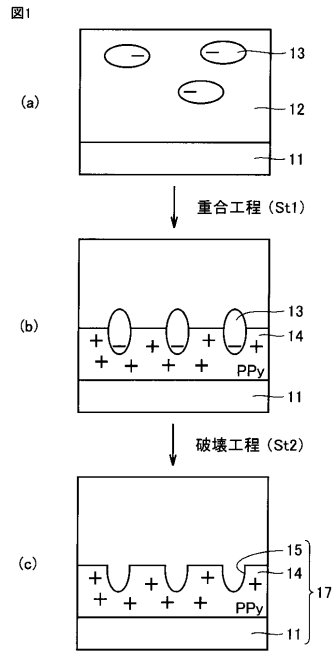
【符号の説明】

【0046】

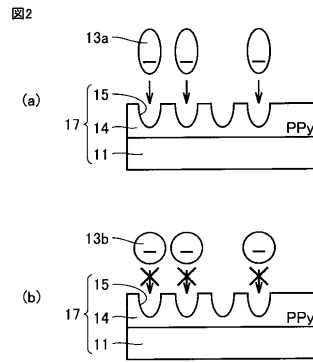
11 検出用電極、12 溶液、13 微生物、14 ポリマー層、15 鑄型、16 対電極(第1対電極)、17 検出部、21 コントローラ、22 発振回路、23 対電極(第2対電極)、24 水晶片、27 セル、30 参照電極、31 試料溶液、32 水晶振動子、33 QCMセンサー。

30

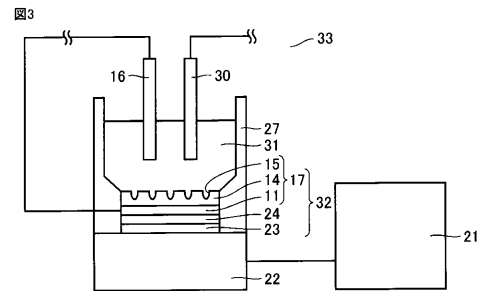
【 図 1 】



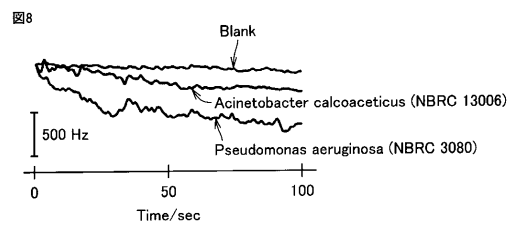
【 図 2 】



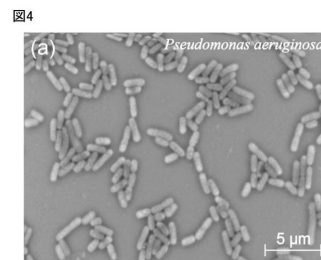
【 図 3 】



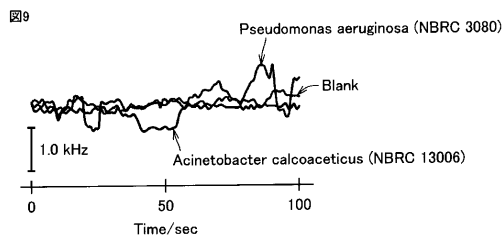
【 図 8 】



【 図 4 】

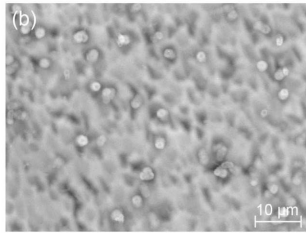
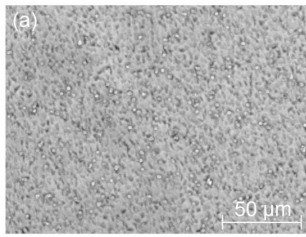


【 図 9 】



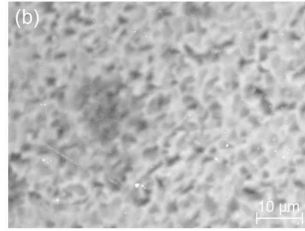
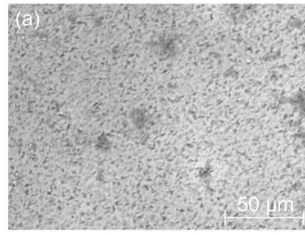
【 図 5 】

図5



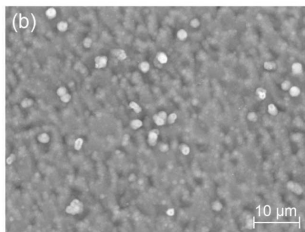
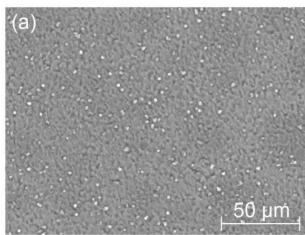
【 図 6 】

図6



【 図 7 】

図7



フロントページの続き

- (72)発明者 椎木 弘
大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人大阪府立大学内
- (72)発明者 長岡 勉
大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人大阪府立大学内

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 国際公開第2012/121229(WO, A1)
床波志保, et al., 分子鑄型技術を利用する細菌センサの開発, 電気化学会第79回大会講演要旨集, 2012年, p.19, 2A04
床波志保, et al., 分子鑄型技術を利用する細菌センサの開発, Chemical Sensors, 2012年, Vol.28, Supplement A, p.70-72

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10
C12Q 1/00 - 1/70
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)
PubMed