

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4339375号
(P4339375)

(45) 発行日 平成21年10月7日(2009.10.7)

(24) 登録日 平成21年7月10日(2009.7.10)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/569 (2006.01)

GO 1 N 33/569

B

GO 1 N 27/02 (2006.01)

GO 1 N 27/02

D

GO 1 N 5/02 (2006.01)

GO 1 N 5/02

A

GO 1 N 27/327 (2006.01)

GO 1 N 27/02

Z

GO 1 N 27/416 (2006.01)

GO 1 N 27/30

3 5 5

請求項の数 12 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-134688 (P2007-134688)
 (22) 出願日 平成19年5月21日(2007.5.21)
 (65) 公開番号 特開2008-286763 (P2008-286763A)
 (43) 公開日 平成20年11月27日(2008.11.27)
 審査請求日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(73) 特許権者 591118775
 白鶴酒造株式会社
 兵庫県神戸市東灘区住吉南町4丁目5番5号
 (73) 特許権者 000002369
 セイコーエプソン株式会社
 東京都新宿区西新宿2丁目4番1号
 (74) 代理人 100091292
 弁理士 増田 達哉
 (74) 代理人 100091627
 弁理士 朝比 一夫
 (72) 発明者 福島 均
 長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物センサーおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体中の微生物の存在を検出する微生物センサーであって、
 電極と、抗生物質および重合性基を含む複合機能分子とを有し、前記抗生物質は、前記電極の表面に自己組織化単分子膜を介して固定化されており、
 前記複合機能分子は、前記重合性基に結合した、前記抗生物質とは異なる抗生物質を有していることを特徴とする微生物センサー。

【請求項 2】

前記自己組織化単分子膜は、前記電極の表面に結合し得るスルフィド基、ジスルフィド基またはメルカプト基を含み、当該自己組織化単分子膜において前記電極の表面に結合している請求項 1 に記載の微生物センサー。

【請求項 3】

前記自己組織化単分子膜は、ストレプトアビジンと結合するビオチンを有するものである請求項 1 または 2 に記載の微生物センサー。

【請求項 4】

前記複合機能分子は、前記抗生物質に結合するカルボキシル基、アミド基、エーテル基、エステル基またはチオエステル基を有する請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の微生物センサー。

【請求項 5】

前記重合性基は、アクリル基またはメタクリル基である請求項 1 ないし 4 のいずれかに

記載の微生物センサー。

【請求項 6】

前記複合機能分子は、ストレプトアビジンと結合するビオチンを含むものである請求項 4 または 5 に記載の微生物センサー。

【請求項 7】

前記抗生物質は、抗菌剤または抗ウイルス剤で構成されるものである請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の微生物センサー。

【請求項 8】

前記抗菌剤は、 β -ラクタム系抗生物質で構成されるものである請求項 7 に記載の微生物センサー。

【請求項 9】

前記 β -ラクタム系抗生物質は、ペニシリンで構成されるものである請求項 8 に記載の微生物センサー。

【請求項 10】

前記抗生物質と前記微生物との結合で生じる周波数の変化により前記微生物の存在を検出するものである請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載の微生物センサー。

【請求項 11】

前記抗生物質と前記微生物との結合で生じるインピーダンスの変化により前記微生物の存在を検出するものである請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載の微生物センサー。

【請求項 12】

抗生物質および重合性基を含む複合機能分子を用意する第 1 の工程と、
前記複合機能分子を電極の一方の面側に供給して前記複合機能分子を前記電極表面に固定化する第 2 の工程とを有し、

前記複合機能分子は、さらに、前記抗生物質と反対側の末端にビオチンを有するものであり、

前記第 2 の工程において、前記複合機能分子を固定化する前に、ビオチンを含む自己組織化単分子膜を形成した後、当該自己組織化単分子膜をストレプトアビジンで処理することを特徴とする微生物センサーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物センサーおよびその製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

飲食品、医薬品、化粧品等においては、微生物汚染の有無の判定を目的として微生物の菌種同定及び菌数測定が行われている。

従来、検体中の菌数、例えば、火落ち菌数を定量する方法としては、主に寒天培地に菌含有溶液を散布して数日間培養した後、発現するコロニー数を目視あるいは検出器でカウントする。その結果から逆算することにより求める方法が行われている。

また、菌種を同定する方法としては、主に寒天培地に特定菌がコロニーを形成すると特定の色を発色するような添加物を培地に添加して、その発色により同定する方法等が一般に行われている。

【0003】

しかしながら、従来の寒天培地で培養する方法においては、約 24 ~ 120 時間と長時間の培養を必要とする。また、培地の作製、菌液の調整、菌液の培地への散布、培養条件検討及びコロニーカウント等その実施には熟練を要する。そのため、より迅速かつ簡便な測定法が望まれている。

また、最近では、電気化学反応、遺伝子を利用した検出方法、免疫反応、ATP の発光等を用いる方法が考案されている。

【0004】

しかしながら、電気化学反応、遺伝子を利用した検出方法、免疫反応、ATPの発光等を用いる方法においては、いずれも前培養や操作に熟練を必要とする。また、検出感度の問題や装置の価格等の問題等があり、前述の寒天培地を用いた培養法に置き換わっていない。

このように、菌を簡単にかつ高感度に検出できる測定手法および原理の開発が、酒類のより高い品質管理の点から強く望まれている。

【0005】

一方で、電極表面への微生物の結合で生じる周波数の変化により当該微生物を測定する方法において、電極表面に抗微生物抗体を固定化した水晶振動子を用いる方法が提案されている（例えば、特許文献1参照）。この方法は、測定感度が低く、実用化されるに至っていない。

10

また、測定感度を高める目的で電極表面にプロテインA又はプロテインGを介して抗微生物抗体を固定化した水晶振動子微生物センサーが提案されている（例えば、特許文献2参照）。このセンサーは、複数種の微生物を同時に測定したいという目的に際しては適当ではない。

さらに、試料に存在する目的微生物を特異的に捕捉する物質を結合した基板材を備え、該基板材上に捕捉された目的微生物を光学的に検出する装置からなる微生物の迅速検出装置が提案されている（例えば、特許文献3参照）。この方法も、複数種の微生物を同時に測定したいという目的に際しては適当ではない。

【0006】

20

【特許文献1】特開昭62-64934号

【特許文献2】特開2002-340766号

【特許文献3】特開2005-172680号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、感度よく、複数種の微生物の存在を同時に検出できる微生物センサーおよびその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

30

このような目的は、下記の本発明により達成される。

本発明の微生物センサーは、被検体中の微生物の存在を検出する微生物センサーであって、

電極と、抗生物質および重合性基を含む複合機能分子とを有し、前記抗生物質は、前記電極の表面に自己組織化単分子膜を介して固定化されており、

前記複合機能分子は、前記重合性基に結合した、前記抗生物質とは異なる抗生物質を有していることを特徴とする。

これにより、微生物が抗生物質に結合するので、複数種の微生物を高感度に検出することができる。

【0009】

40

本発明の微生物センサーでは、前記自己組織化単分子膜は、前記電極の表面に結合し得るスルフィド基、ジスルフィド基またはメルカプト基を含み、当該自己組織化単分子膜において前記電極の表面に結合していることが好ましい。

これにより、電極表面に自己組織化単分子膜が効率的に形成するので、抗生物質を自己組織化単分子膜を介して電極表面に容易に固定化することができる。

本発明の微生物センサーでは、前記自己組織化単分子膜は、ストレプトアビジンと結合するピオチンを有するものであることが好ましい。

これにより、抗生物質を自己組織化単分子膜を介して電極表面に効率的に固定化することができる。

【0010】

50

本発明の微生物センサーでは、前記複合機能分子は、前記抗生物質に結合するカルボキシル基、アミド基、エーテル基、エステル基またはチオエステル基を有することが好ましい。

これにより、抗生物質が確実に結合した複合機能分子を得ることができる。

本発明の微生物センサーでは、前記重合性基は、アクリル基またはメタクリル基であることが好ましい。

これにより、重合性基に機能性分子などを結合することができるので、より高感度に微生物の存在を検出することができる。

【0011】

本発明の微生物センサーでは、前記複合機能分子は、ストレプトアビジンと結合するビオチンを含むものであることが好ましい。

10

これにより、ストレプトアビジンに2つの複合機能分子が結合するので、より高感度に微生物の存在を検出することができる。

本発明の微生物センサーでは、前記抗生物質は、抗菌剤または抗ウイルス剤で構成されるものであることが好ましい。

これにより、高感度に細菌またはウイルスの存在を検出することができる。

【0012】

本発明の微生物センサーでは、前記抗菌剤は、 β -ラクタム系抗生物質で構成されるものであることが好ましい。

これにより、抗生物質が細菌と効率的に結合するので、感度よく、複数種の細菌の存在を検出することができる。

20

本発明の微生物センサーでは、前記 β -ラクタム系抗生物質は、ペニシリンで構成されるものであることが好ましい。

これにより、抗生物質が細菌とより効率的に結合するので、より感度よく、複数種の細菌の存在を検出することができる。

【0013】

本発明の微生物センサーでは、前記抗生物質と前記微生物との結合で生じる周波数の変化により前記微生物の存在を検出するものであることが好ましい。

これにより、簡易、迅速かつ高感度に複数種の微生物の存在を検出することができる。

本発明の微生物センサーでは、前記抗生物質と前記微生物との結合で生じるインピーダンスの変化により前記微生物の存在を検出するものであることが好ましい。

30

これにより、簡易、迅速かつ高感度に複数種の微生物の存在を検出することができる。

【0014】

本発明の微生物センサーの製造方法は、抗生物質および重合性基を含む複合機能分子を用意する第1の工程と、

前記複合機能分子を電極の一方の面側に供給して前記複合機能分子を前記電極表面に固定化する第2の工程とを有し、

前記複合機能分子は、さらに、前記抗生物質と反対側の末端にビオチンを有するものであり、

前記第2の工程において、前記複合機能分子を固定化する前に、ビオチンを含む自己組織化単分子膜を形成した後、当該自己組織化単分子膜をストレプトアビジンで処理することを特徴とする。

40

これにより、複合機能分子と電極の一方の面側とを接触するだけでセンサーが得られるので、簡易かつ迅速に微生物センサーを得ることができる。

また、これにより、ストレプトアビジンを用いた場合に、該ストレプトアビジンにビオチンを強固に結合することができる。

また、これにより、自己組織化単分子膜上のストレプトアビジンと複合機能分子のビオチンとが強固に結合するので、安定な微生物センサーを得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

50

以下、本発明の微生物センサーおよび微生物センサーの製造方法について、図を用いて詳細に説明する。

< 第 1 実施形態 >

1. 微生物センサー

図 1 は、本実施形態の微生物センサーを測定装置に装着した状態を示す模式図（斜視図）、図 2 は、図 1 に示す微生物センサーを模式的に示す平面図、図 3 は、図 2 に示す微生物センサーの A - A 線断面図、図 4 は、図 3 に示す A - A 線断面図の部分拡大図である。

なお、以下の説明では、図 2 中の紙面手前側を「上」、紙面奥側を「下」と言う。また、図 3 および図 4 中の上側を「上」、下側を「下」と言う。

【 0 0 1 7 】

図 1 に示す測定装置（電子機器）101 は、微生物センサー100 と、微生物センサー100 で得られた電流値（インピーダンス）を解析する処理回路200 を備えた演算装置102 と、微生物センサー100 を装着するコネクタ131 と、処理回路200 とコネクタ131 とを接続する配線132 とを有する。

微生物センサー100 は、図 2 に示すように、基板120 上に、作用電極121、対向電極122 および参照電極123 を備える検出部110 を有している。

【 0 0 1 8 】

これらの各電極121、122、123 は、それぞれ独立して、配線130、コネクタ131 および配線132 を介して、処理回路200 と電気的に接続されている。また、微生物センサー100 は、コネクタ131 において着脱可能となっている。

また、検出部110 以外の基板120 上の範囲は、図 3 に示すように、絶縁膜160 で覆われている。すなわち、基板120 上に絶縁膜160 が設けられ、検出部110 は、絶縁膜160 の一部に設けられた開口部165 から露出している。

【 0 0 1 9 】

このような微生物センサー100 は、図 3 に示すように、基板120 と絶縁膜160 とで画成される試料供給空間150 に、液体試料151 を供給することにより、作用電極121 上に設けられた後述する反応層1 と液体試料151 とが接触する。そして、図 4 に示すように、液体試料151 中の微生物152 と反応層1 とが反応することにより、電流値が変化する。これにより、この電流値と電圧とからインピーダンスの変化に基づいて、液体試料151 中の微生物152 の量を測定することができる。

【 0 0 2 0 】

ここで、液体試料（被検体）151 としては、例えば、血液、尿、汗、リンパ液、髄液、胆汁、唾液等の体液や、これらの体液に各種処理を施した処理済み液、清涼飲料水やお酒などの飲食品、医薬品、化粧品等が挙げられる。

また、液体試料151 中に含まれる微生物152 は、その細胞表面5 で後述する抗生物質41 と反応することにより、抗生物質41 と結合するものである。

このような微生物152 としては、例えば、乳酸菌、火落ち菌、ブドウ球菌のような細菌、インフルエンザウイルス、ノロウイルスなどのようなウイルス、酵母やカビなどのような真菌類などが挙げられる。

【 0 0 2 1 】

基板120 は、微生物センサー100 を構成する各部を支持するとともに、前述した各電極121、122、123 および配線130 を、互いに絶縁するものである。

基板120 の構成材料としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリエチレンナフタレート（PES）、ポリイミド（PI）等の各種樹脂材料、石英ガラスのような各種ガラス材料、アルミナ、ジルコニアのような各種セラミックス材料等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。

【 0 0 2 2 】

作用電極121 の構成材料としては、例えば、金、銀、銅、白金またはこれらを含む合金のような金属材料、ITO（インジウム - 酸化スズ）のような金属酸化物系材料、グラ

10

20

30

40

50

ファイトのような炭素系材料等が挙げられる。これらのうち、金属材料であることが好ましく、金または銀であることがより好ましい。作用電極 1 2 1 の構成材料が金または銀であることにより、後述する自己組織化単分子膜 2 を構成する有機分子 2 1 と接触するだけで自己組織化単分子膜 2 を形成できるので、より簡単に微生物センサー 1 0 0 を製造することができる。

【 0 0 2 3 】

作用電極 1 2 1 の上側には、反応層 1 が設けられている。

図 3 に示すように、反応層 1 の一部は、試料供給空間 1 5 0 に露出している。そして、試料供給空間 1 5 0 に液体試料 1 5 1 を供給することにより、液体試料 1 5 1 を反応層 1 に接触させることができる。

10

対向電極 1 2 2 は、作用電極 1 2 1 との間に電圧を印加する電極である。試料供給空間 1 5 0 に液体試料 1 5 1 を供給した状態で、作用電極 1 2 1 と対向電極 1 2 2 との間に、作用電極 1 2 1 側が高電位となるように電圧を印加すると、微生物 1 5 2 と抗生物質 4 1 との結合により、電流値の変化を確実に捉えることができる。

【 0 0 2 4 】

対向電極 1 2 2 の構成材料としては、前述の作用電極 1 2 1 の構成材料と同様の材料が挙げられる。

また、対向電極 1 2 2 の面積は、作用電極 1 2 1 の 2 倍以上であるのが好ましく、10 倍以上であるのがより好ましい。これにより、より高い精度で電流値を測定することができる。

20

【 0 0 2 5 】

参照電極 1 2 3 は、対向電極 1 2 2 との間に電圧を印加する電極である。試料供給空間 1 5 0 に液体試料 1 5 1 を供給した状態で、参照電極 1 2 3 と対向電極 1 2 2 との間に電圧を印加する。そして、これらの電極間に流れる電流値と、前述の作用電極 1 2 1 と対向電極 1 2 2 との間に流れる電流値とを比較することにより、微生物 1 5 2 と抗生物質 4 1 との反応により生じた電流値を、より高い精度で測定することができる。

参照電極 1 2 3 の構成材料としては、例えば、銀 - 塩化銀、水銀 - 塩化水銀等が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

また、前述の作用電極 1 2 1、対向電極 1 2 2、参照電極 1 2 3、および配線 1 3 0 は、導電性材料粉末の集合体で構成されていてもよい。これにより、これらの電極 1 2 1、1 2 2、1 2 3 および配線 1 3 0 を、各種印刷法を用いて容易に形成することができる。その結果、微生物センサー 1 0 0 の製造工程を大幅に簡素化することができ、微生物センサー 1 0 0 の低コスト化を図ることができる。

30

作用電極 1 2 1、対向電極 1 2 2、参照電極 1 2 3 の平均厚さは、特に限定されないが、10 ~ 500 nm であることが好ましく、50 ~ 300 nm であることがより好ましい。

【 0 0 2 7 】

絶縁膜 1 6 0 は、前述したように、検出部 1 1 0 付近に開口する開口部 1 6 5 を有し、この開口部 1 6 5 により試料供給空間 1 5 0 を形成している。

40

このような絶縁膜 1 6 0 は、絶縁性の材料で構成されている。絶縁膜 1 6 0 の種類は特に限定されず、有機材料や無機材料のいずれも用いることができる。

有機材料としては、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルフェノール、ポリイミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテートなどの高分子化合物が挙げられる。これらは、1 種または 2 種以上組み合わせて用いることができる。

【 0 0 2 8 】

無機材料としては、酸化ケイ素、酸化アルミニウム、酸化タンタル、酸化ジルコニウム、酸化セリウム、酸化亜鉛、酸化コバルトなどの金属酸化物、窒化ケイ素、窒化アルミニウム、窒化ジルコニウム、窒化セリウム、窒化亜鉛、窒化コバルト、窒化チタン、窒化タンタルなどの金属窒化物、チタン酸バリウムストロンチウム、ジルコニウムチタン酸鉛な

50

どの金属複合酸化物が挙げられる。これらは、１種または２種以上組み合わせて用いることができる。

このような絶縁膜１６０の平均厚さは、特に限定されないが、１０～５０００ｎｍ程度であるのが好ましく、５０～１０００ｎｍ程度であるのがより好ましい。絶縁膜１６０の厚さを前記範囲とすることにより、各電極１２１、１２２、１２３同士および配線１３０同士を、確実に絶縁することができる。

【００２９】

さて、本実施形態の微生物センサー１００は、作用電極１２１表面側に微生物１５２が結合することにより微生物１５２の存在の有無を検出するセンサーである。この微生物センサー１００では、作用電極１２１に抗生物質４１が自己組織化単分子膜２を介して固定化され、反応層１を形成している。

10

すなわち、図４に示す反応層１は、作用電極１２１表面に自己組織化単分子膜２が形成されている。この自己組織化単分子膜２（ビオチン２２）上には、ストレプトアビジン３が吸着（結合）している。そして、このストレプトアビジン３に複合機能分子４のビオチン４２が結合している。以下、各部の構成について説明する。

【００３０】

自己組織化単分子膜２は、作用電極１２１を保護し、抗生物質４１を作用電極１２１に固定化（固相化）するためのものである。

この自己組織化単分子膜２は、作用電極１２１の上面と結合する結合基を有する有機分子２１で構成されている。

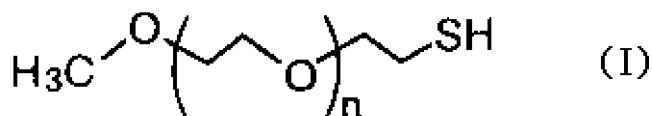
20

この結合基は、本実施形態では、スルフィド基で構成されるものであるが、ジスルフィド基またはメルカプト基などであってもよい。

このような有機分子２１としては、例えば、次のような化合物（Ⅰ）～（Ⅳ）に示す化合物が挙げられる。

【００３１】

【化１】

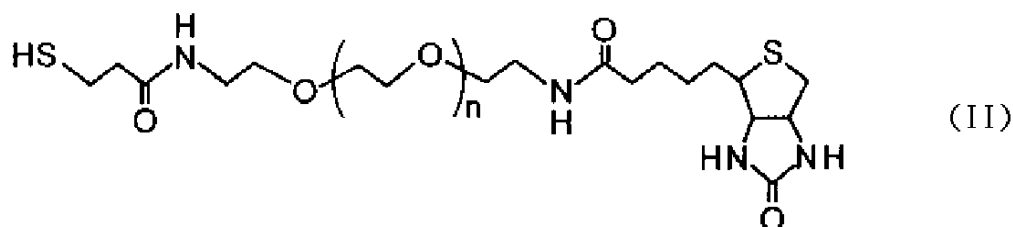


30

（式中、 n は１～１５を示す。）

【００３２】

【化２】

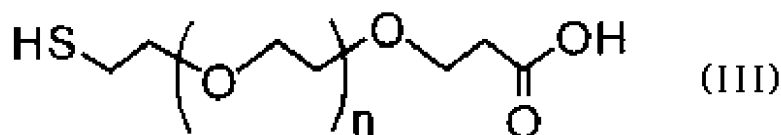


40

（式中、 n は１～１５を示す。）

【００３３】

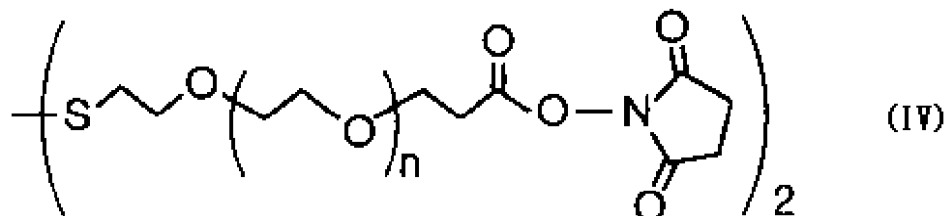
【化 3】



(式中、nは1～15を示す。)

【0034】

【化 4】



(式中、nは1～15を示す。)

【0035】

これらの化合物のうち、有機分子21は化合物(I)および(II)であることが好ましい。

このように分子の一端にメルカプト基を有することにより、メルカプト基が作用電極121と容易に反応し、スルフィド結合(金属-チオール結合)を形成するので、簡単かつ迅速に作用電極121上に有機分子21を結合することができる。

【0036】

また、他端にビオチン22を有することにより、該ビオチン22を後述するストレプトアビジン3で処理すれば、2つのビオチン22がストレプトアビジン3と結合できる。このため、図4に示すように、ストレプトアビジン3に複合機能分子4のビオチン42を2つ結合させることができる。その結果、1つのストレプトアビジン3からビオチン42を介して2つの抗生物質41を結合させることができ、微生物センサー100としての感度を向上させることができる。

【0037】

また、化合物(III)および(VI)は、カルボキシル基またはスクシンイミドなどの活性基を有するので、抗生物質41を有機分子21(自己組織化単分子膜2)に直接結合することができる。

以上のような有機分子21が作用電極122に結合することにより、図4に示すように、自己組織化単分子膜2が形成される。なお、図4中のBは、上記化合物(II)のビオチン22を意味する。

【0038】

自己組織化単分子膜2の上端部に位置するビオチン22には、ストレプトアビジン3が結合(吸着)している。ストレプトアビジン3は、一般に4つのアビジンと結合する。本実施形態では、ストレプトアビジン3は、その下端で自己組織化単分子膜2の2つのビオチン22と、上端で複合機能分子の2つのビオチン42と結合する。

ストレプトアビジン3の上端側には、複合機能分子4が結合している。この複合機能分子4は、抗生物質41とビオチン42とを有している。そして、複合機能分子4は、ストレプトアビジン3に結合することで、微生物152を検出する機能を有する。

【0039】

抗生物質41は、前述したように、液体試料151中の微生物152の細胞表面5と結合する。微生物152が抗生物質41に結合すると、例えば、微生物152の表面電気等

10

20

30

40

50

に基づいて、反応層 1 における荷電量が変化する。これにより、反応層 1 のインピーダンスが変化する。

このような抗生物質 4 1 としては、微生物 1 5 2 の種類によって異なるが、測定対象である微生物 1 5 2 の細胞表面 5 に作用するものであればよい。

【 0 0 4 0 】

微生物 1 5 2 が細菌である場合には、例えば、抗菌剤が用いられる。該抗菌剤としては、例えば、 β -ラクタム系、グリコペプチド系などの抗菌剤が挙げられる。これらのうち、特に β -ラクタム系の抗菌剤が好ましい。

細菌の細胞壁のペプチドグリカン合成においては、トランスペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼが直鎖状ペプチドグリカンに作用し、末端の D - アラニンが離脱するとともにペプチドによる架橋が形成される。このとき、 β -ラクタム系の抗菌剤は、これらの酵素に作用し、架橋形成を阻止する。

【 0 0 4 1 】

すなわち、直鎖状ペプチドグリカンのペプチド末端の D - アラニルアラニンの立体構造と β -ラクタム系の抗菌剤の立体構造とが類似しているため、 β -ラクタム系の抗菌剤はトランスペプチダーゼと結合し、その活性中心をアシル化することによって不活性化する。

したがって、抗生物質 4 1 が β -ラクタム系の抗菌剤であることにより、抗生物質 4 1 が細菌の細胞壁と効率的に結合する。そのため、液体試料 1 5 1 に含まれる細胞壁を有する種々の細菌（微生物 1 5 2）の存在を検出することができる。

【 0 0 4 2 】

β -ラクタム系の抗菌剤としては、例えば、ベンジルペニシリン（ペニシリン G）、フェノキシメチルペニシリン（ペニシリン V）、ペニシリン N、ペニシリン O、メチシリン、クロキサシリン、アンピシリン、アモキシシリン、ピペラシリン、オキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、フェネチシリン、プロピシリン、バカンピシリン、タランピシリン、テモシリン、アパラシリン、ヘタシリン、シクラシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メズロシリン、スルタミシリン、アゾシリン、ビブメシリナムまたはスルベニシリンなどのペニシリン系、セファロジン、セファピリン、セファロリジン、セファゾリン、セファレキシン、セファラジ、セファドロキシル、セフマンドール、セフォニシド、セフォラニド、セファクロル、セフィキシム、セフプロジル、セフトリアキソン、セフトジシム、セホキシチン、セフォタテン、セフメタゾール、セフロキシム、セフチゾキシム、セフォタキシム、セフペラゾン、セフミノクス、セフスロジン、セフォペラゾン、セフチブテン、セフィキシム、セフェタメット、セフェピム、セフピロム、セフェム系、メシリナム、キサラクタム、ノカルジシン、スルファゼシンなどが挙げられる。

【 0 0 4 3 】

これらのうち、ペニシリン系であることが好ましく、フェノキシメチルペニシリン（ペニシリン V）であることがより好ましい。

ペニシリン系の抗菌剤、特にペニシリン V は、前述したトランスペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼの活性をより強く阻害する。そのため、ペニシリン系の抗菌剤は、各種細菌と容易かつ強固に結合することができる。

【 0 0 4 4 】

また、微生物 1 5 2 がウイルスである場合は、例えば、抗ウイルス剤が用いられる。該抗ウイルス剤としては、例えば、ノイラミターゼ阻害剤、オセルタミビル、リン酸オセルタミビル、ザナミビル、アマンタジン、リマンタジンなどが挙げられる。

このような抗生物質 4 1 を含む複合機能分子 4 は、例えば、次に示すような化合物（V）、（VI）が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

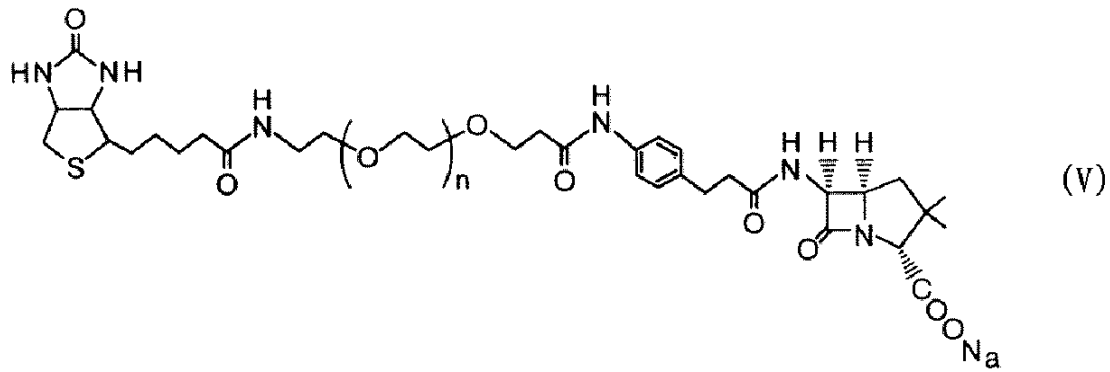
10

20

30

40

【化 5】

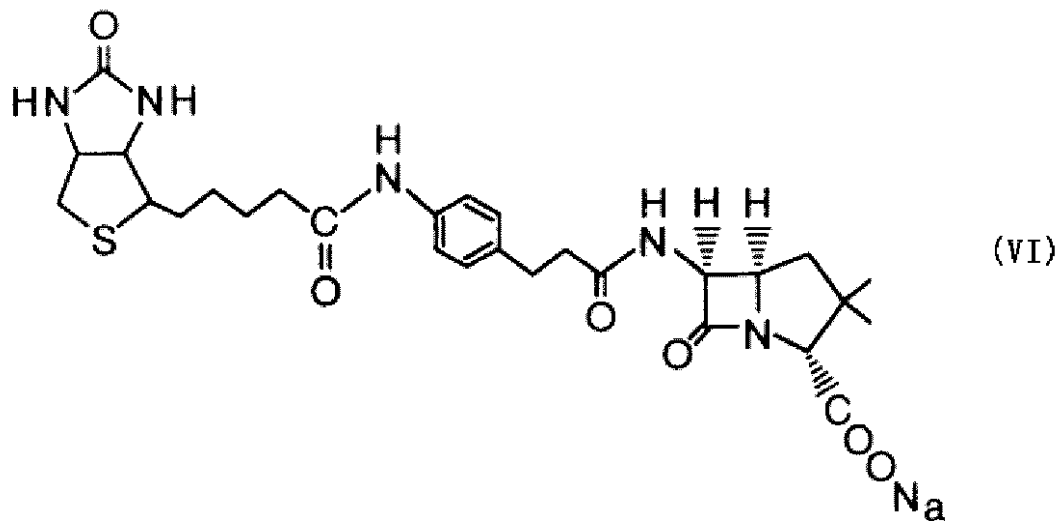


10

(式中、nは1～15を示す。)

【0046】

【化 6】



20

(式中、nは1～15を示す。)

【0047】

これらの複合機能分子4は、その末端に抗生物質（ペニシリン）41がアミド結合で結合しているので、脱水反応により容易に複合機能分子4を得ることができる。

また、抗生物質41の反対側の端部にビオチン42を有するので、当該ビオチン42がストレプトアビジン3に共有結合に匹敵する強さで強固に結合することができる。その結果、ストレプトアビジン3、自己組織化単分子膜2を介して抗生物質41を有する複合機能分子4を作用電極121に確実に固定化することができる。

【0048】

また、図4に示すように、ストレプトアビジン3は2つのビオチン42と結合できるので、ストレプトアビジン3に2つの複合機能分子4を結合することができる。その結果、微生物152に対する検出感度を向上することができる。

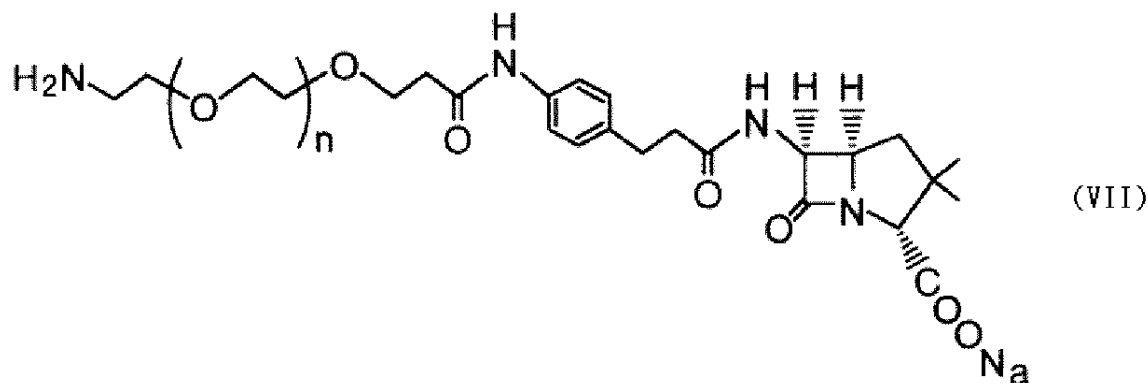
40

特に、化合物(V)は、抗生物質41とビオチン42との間にポリエチレングリコール(PEG)鎖を有する。そのため、抗生物質41が、作用電極121から所定距離離間し、微生物152の検出感度を高めることができる。

複合機能分子4の他の構成例として、例えば、下記に示す化合物(VII)であってもよい。

【0049】

【化 7】



10

(式中、 n は 1 ~ 15 を示す。)

【0050】

化合物 (VII) は、自己組織化単分子膜 2 に前記化合物 (III) または (IV) で表される有機分子 21 を用いた場合に、化合物 (VII) のアミノ基と化合物 (III) のカルボキシル基または化合物 (IV) のスクシンイミドとで容易に反応することができる。そのため、複合機能分子 4 を自己組織化単分子膜 2 を介して作用電極 121 に容易に固定化することができる。

20

なお、複合機能分子 4 中の抗生物質 41 に結合する基としては、アミド基に限らず、カルボキシル基、エーテル基、エステル基またはチオエステル基などであってもよく、結合する抗生物質 41 の種類によって適宜選択される。

【0051】

複合機能分子 4 には、アクリル基、メタクリル基などの重合性基を含んでいてもよい。これにより、重合性基に別途フェロセンなどの機能性物質など種々の化合物を結合することができる。このため、微生物センサー 100 に目的に応じた種々の機能を持たせることができる。

例えば、この重合性基に抗生物質 41 とは異なる抗生物質を結合すれば、抗生物質 41 以外に、複数の抗生物質が結合するので、微生物 152 に対する検出感度が向上する。

30

【0052】

以上説明したように、反応層 1 が図 4 のように構成されることにより、前述した効果を有する。また、抗生物質 41 が、例えば、抗菌剤であるペニシリン V で構成されている場合、ペニシリン V が細菌の細胞壁に結合し、種々の細菌を同時に検出することができる。その結果、微生物センサー 100 の感度が向上する。

また、本実施形態の反応層 1 には、図 4 に示すように、前記化合物 (I) がスルフィド結合で作用電極 121 に結合している。これにより、自己組織化単分子膜 2 において、ピオチン 22 同士の間にも適度の間隔が生じる。したがって、ストレプトアビジン 3 に複合機能分子 4 が 2 つ結合しても、複合機能分子 4 同士の立体障害を防止または低減できる。その結果、各抗生物質 41 が確実に機能し、微生物 152 を補足することができる。

40

なお、反応層 1 には、電子を後述する作用電極 121 に媒介するメディエータ (媒介体) を含むのが好ましい。メディエータを電子移動の媒介とすることにより、反応層 1 から電子を効率よく移動させ、検出部 110 から、より高い感度で電流を取り出すことができる。

【0053】

このメディエータとしては、例えば、フェリシアン化カリウム、フェロセンまたはフェロセン誘導体、ニッケロセンまたはニッケロセン誘導体、ピリジンまたはピリジン誘導体、キノンまたはキノン誘導体 (例えば p-ベンゾキノン、ピロロキノリンキノン等)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) のようなフラビン誘導体、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ酸 (NAD

50

P)のようなニコチンアミド誘導体、フェナジンメトサルファート、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、ヘキサシアノ鉄(III)酸塩、オクタシアノタングステンイオン、ポルフィリン誘導体、フタロシアニン誘導体等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

【0054】

2. 微生物センサーの製造方法

次に、図3に示す微生物センサーの製造方法について説明する。

図5および図6は、それぞれ、図3に示す微生物センサーの製造方法を説明するための図(縦断面図)である。

なお、以下の説明では、図5および図6中の上側を「上」、下側を「下」と言う。

10

本実施形態の微生物センサー100の製造方法は、[1]複合機能分子4を合成する工程と、[2]基板120上に電極121、122、123を形成する工程と、[3]検出部110の領域以外に絶縁膜160を形成する工程と、[4]作用電極121上に反応層1を形成する工程とを有している。以下、これらの各工程について、順次説明する。

【0055】

[1] 複合機能分子合成工程

<1>まず、抗生物質41とビオチン含有化合物とを用意する。

抗生物質41の濃度としては、0.1~10mol/Lであることが好ましく、0.5~5mol/Lであることがより好ましい。

また、ビオチン含有化合物の濃度としては、0.1~10mol/Lであることが好ましく、0.5~5mol/Lであることがより好ましい。

20

抗生物質41およびビオチン含有化合物の濃度が前記範囲であることにより、抗生物質41とビオチン含有化合物とが過不足なく反応するので、複合機能分子4を効率的に得ることができる。

【0056】

<2>次に、抗生物質41とビオチン含有化合物とを反応させて複合機能分子4を合成する。

抗生物質41とビオチン含有化合物とを反応する時間は、0.1~10時間であることが好ましく、0.5~3時間であることがより好ましい。

抗生物質41とビオチン含有化合物とを反応する温度は、0~80℃であることが好ましく、20~60℃であることがより好ましい。

30

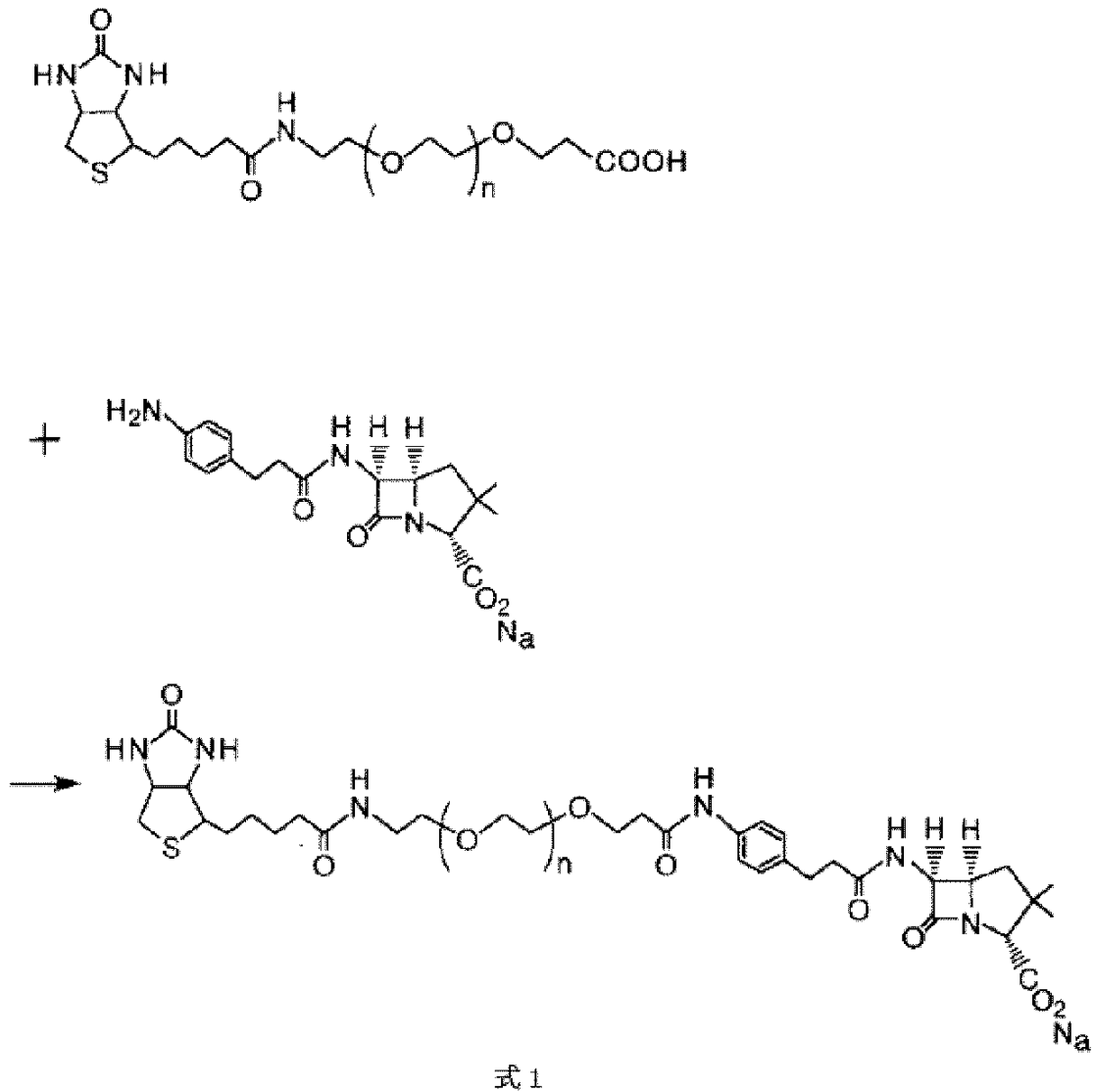
【0057】

抗生物質41とビオチン含有化合物とを反応する時間、温度が前記範囲であることにより、抗生物質41とビオチン含有化合物とが過不足なく反応するので、複合機能分子4を収率よく得ることができる。

本実施形態では、例えば、下記式に示すような反応により、複合機能分子(ビオチン-ペニシリン複合機能分子)4を得ることができる。

【0058】

(式1)



(式中、 n は1～15を示す。)

【0059】

このような複合機能分子4を得ることにより、ストレプトアビジン3と複合機能分子4中のビオチン42とが簡単に結合するので、作用電極121に自己組織化単分子膜2を介して抗生物質41を容易に固定化することができる。

また、抗生物質41が少なくともビオチン42-PEG鎖を介して作用電極121に結合することができるので、抗生物質41は、作用電極121と離間し、より感度よく液体試料151中の微生物152を検出することができる。

本工程の他の構成例として、下記式に示すような反応により、複合機能分子4を得ることもできる。

【0060】

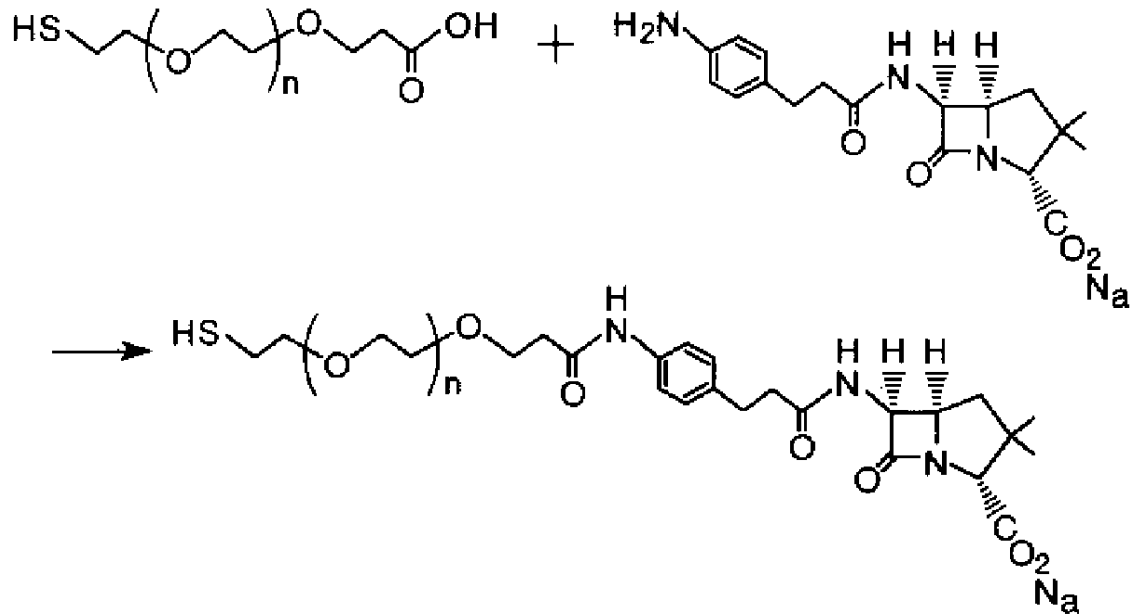
(式2)

10

20

30

40



式2

(式中、 n は1～15を示す。)

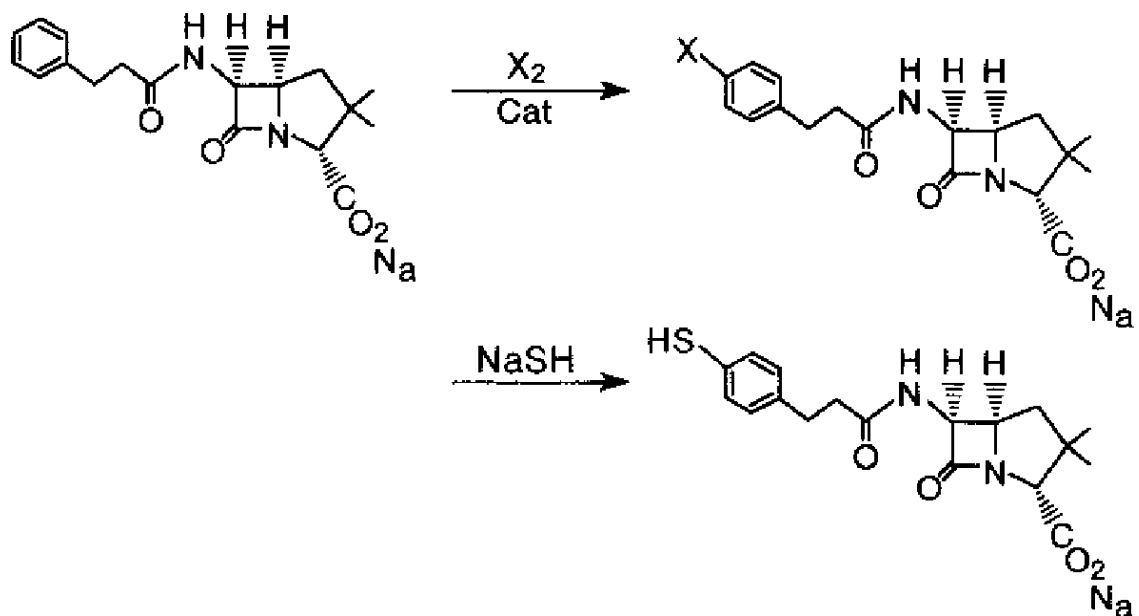
【0061】

このような反応では、ビオチン含有化合物を使用していないので、使用する原料を簡単に得ることができ、結果として、複合機能分子4を容易に得ることができる。

また、本工程の他の構成例として、下記式に示すような反応により、複合機能分子4を得ることもできる。

【0062】

(式3)



式3

(式中、 n は1～15を示す。)

(X は、臭素、塩素、ヨウ素などのハロゲン、 cat は塩化鉄、臭化鉄、ヨウ化銅などの触媒を示す。)

【 0 0 6 3 】

このような反応により、抗生物質 4 1 であるペニシリン V にメルカプト基が直接結合しているので、複合機能分子 4 をより一層簡単に得ることができる。

【 0 0 6 4 】

[2] 電極形成工程

< 1 > まず、基板 1 2 0 を用意する。

そして、図 5 (a) に示すように、基板 1 2 0 上に金属膜 (金属層) 9 を形成する。

これは、例えば、プラズマ C V D、熱 C V D、レーザー C V D のような化学蒸着法 (C V D)、真空蒸着、スパッタリング (低温スパッタリング)、イオンプレーティング等の乾式メッキ法、電解メッキ、浸漬メッキ、無電解メッキ等の湿式メッキ法、溶射法、ゾル・ゲル法、MOD 法、金属箔の接合等により形成することができる。

10

【 0 0 6 5 】

< 2 > この金属膜 9 上に、フォトリソグラフィ法により、作用電極 1 2 1、対向電極 1 2 2、参照電極 1 2 3 および配線 1 3 0 の形状に対応する形状のレジスト層を形成する。このレジスト層をマスクとして用いて、金属膜 9 の不要部分を除去する。

この金属膜 9 の除去には、例えば、プラズマエッチング、リアクティブイオンエッチング、ビームエッチング、光アシストエッチング等の物理的エッチング法、ウェットエッチング等の化学的エッチング法等のうちの 1 種または 2 種以上を組み合わせる用いることができる。

【 0 0 6 6 】

20

< 3 > その後、レジスト層を除去することにより、図 5 (b) に示すように、基板 1 2 0 上に、作用電極 1 2 1、対向電極 1 2 2、参照電極 1 2 3 および配線 1 3 0 (図示せず) が得られる。

なお、これらの作用電極 1 2 1、対向電極 1 2 2、参照電極 1 2 3 および配線 1 3 0 (図示せず) は、それぞれ、例えば、導電性粒子を含有するコロイド液 (分散液)、導電性ポリマーを含有する液体 (溶液または分散液) 等の液状材料を基板 1 2 0 上に供給して被膜を形成した後、必要に応じて、この被膜に対して後処理 (例えば加熱、赤外線照射、超音波の付与等) を施すことにより形成することもできる。

【 0 0 6 7 】

前記液状材料を基板 1 2 0 上に供給する方法としては、例えば、ディッピング法、スピンコート法、キャスト法、マイクログラビアコート法、グラビアコート法、パーコート法、ロールコート法、ワイヤーバーコート法、ディップコート法、スプレーコート法、スクリーン印刷法、フレキソ印刷法、オフセット印刷法、インクジェット法、マイクロコンタクトプリンティング法等が挙げられ、これらのうちの 1 種または 2 種以上を組み合わせる用いることができる。

30

これらの中でも、特に、インクジェット法 (液滴吐出法) を用いるのが好ましい。インクジェット法 (液滴吐出法) によれば、作用電極 1 2 1、対向電極 1 2 2、参照電極 1 2 3 および配線 1 3 0 を、容易かつ寸法精度よく形成することができる。

【 0 0 6 8 】

[3] 絶縁膜形成工程

40

< 1 > 図 5 (e) に示すように、検出部 1 1 0 の領域に対応した開口部 1 6 5 を有する絶縁膜 1 6 0 を形成する。

まず、所定の絶縁性材料を含む液状材料を調製する。そして、この液状材料を、前記工程 [2] で各電極 1 2 1、1 2 2、1 2 3 および配線 1 3 0 が形成された基板 1 2 0 上に供給する。これにより、図 5 (c) に示すような絶縁膜 1 6 0 を得る。

【 0 0 6 9 】

絶縁膜 1 6 0 を無機材料で構成する場合、絶縁膜 1 6 0 は、例えば、熱酸化法、C V D 法、S O G 法により形成することができる。また、原材料にポリシラザンを用いることにより、絶縁膜 1 6 0 として、シリカ膜、窒化珪素膜を湿式プロセスで成膜することが可能となる。

50

絶縁膜 160 を有機材料で構成する場合、絶縁膜 160 は、有機材料またはその前駆体を含む液体材料を、基板 120 上を覆うように塗布した後、必要に応じて、この塗膜に対して後処理（例えば加熱、赤外線の照射、超音波の付与等）を施すことにより形成することができる。有機材料またはその前駆体を含む液体材料を、基板 120 上へ塗布する方法としては、スピンコート法やディップコート法のような塗布法、インクジェット法やスクリーン法などの印刷法等を用いることができる。

なお、本工程において調製する液状材料には、前述の絶縁性材料の他に、必要に応じて、バインダ等の添加剤を添加することができる。

【0070】

< 2 > 次に、図 5 (d) に示すように、検出部 110 を形成すべき領域にマスク 170 を設置して、絶縁膜 160 に向けて光を照射する。これにより、絶縁膜 160 をパターンニングする。これにより、図 5 (e) に示すような絶縁膜 160 を得る。

なお、絶縁膜 160 に向けて光を照射した後、必要に応じて、絶縁膜 160 を洗浄液等で洗浄してもよい。これにより、マスク 170 の遮光部に対応する領域に存在する絶縁膜 160 を効率よく除去することができる。

【0071】

[4] 反応層形成工程

図 5 (f) に示すように、作用電極 121 上に反応層 1 を形成する。

本工程は、[4 - 1] 作用電極 121 表面にピオチン 22 を含む自己組織化単分子膜 2 を形成する工程と、[4 - 2] 自己組織化単分子膜 2 をストレプトアビジン 3 で処理する工程と、[4 - 3] 複合機能分子 4 をストレプトアビジン 3 に接触して複合機能分子 4 をストレプトアビジン 3 に固定化する工程とを有する。

【0072】

以下、各工程について説明する。

[4 - 1] 自己組織化単分子膜形成工程

本工程では、図 4 に示すような反応層 1 の場合を例に、その形成方法を拡大図を用いて説明する。

図 6 は、作用電極 121 に反応層 1 の一部を構成する自己組織化単分子膜 2 を形成する方法を模式的に示す図である。

【0073】

まず、有機分子 21、例えば、前記化合物 (I) および (I I) を混合した液状材料を調製し、これを作用電極 121 上に供給する。

この場合、化合物 (I) と化合物 (I I) とは、9 . 5 : 0 . 5 ~ 5 . 5 : 4 . 5 の比で用いることが好ましい。このような比で化合物 (I) を用いることにより、化合物 (I I) と化合物 (I) とが作用電極 121 表面に結合したとき、化合物 (I) で表される化合物の方が作用電極 121 上に多く結合する。このため、後述するストレプトアビジン 3 処理により、ストレプトアビジン 3 に 2 つの複合機能分子 4 が結合しても立体障害を生じること防止または低減することができる。その結果、複合機能分子 4 をストレプトアビジン 3 を介して自己組織化単分子膜 2 に効率的に結合することができる。

なお、液状材料中には、必要に応じて、架橋剤などを添加してもよい。

化合物 (I I) の濃度 (使用量) は、0 . 1 ~ 10 m o l / L となるように設定する。

【0074】

化合物 (I I) の作用電極 121 表面への供給方法は、前記 [2] < 3 > の液状材料を基板 120 上に供給する方法と同様の方法で行うことができる。

そして、化合物 (I I) を含有する液状材料を作用電極 121 表面へ供給した後、一定時間放置し、洗浄、乾燥することにより、図 6 (a) に示すように、ピオチン 22 を含む自己組織化単分子膜 2 を形成することができる。

【0075】

[4 - 2] ストレプトアビジン処理工程

ストレプトアビジン 3 溶液を調製し、これを用いて [4 - 1] の工程で得られた自己組

10

20

30

40

50

織化単分子膜 2 を処理する。すなわち、自己組織化単分子膜 2 のビオチン 2 2 にストレプトアビジン 3 を吸着させる。

ストレプトアビジン 3 溶液は、ストレプトアビジン 3 を緩衝液に溶解して調製する。この緩衝液としては、例えば、T r i s 緩衝液、H e p e s 緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液などが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

ストレプトアビジン 3 溶液中のストレプトアビジン 3 の濃度は、 $0.05 \sim 10 \text{ mg/ml}$ であることが好ましく、 $0.1 \sim 5 \text{ mg/ml}$ であることがより好ましい。

ストレプトアビジン 3 溶液の自己組織化単分子膜 2 への供給方法は、前記 [2] < 3 > の液状材料を基板 1 2 0 上に供給する方法と同様の方法で行うことができる。

10

そして、ストレプトアビジン 3 溶液を自己組織化単分子膜 2 へ供給した後、一定時間放置し、洗浄、乾燥することにより、図 6 の (b) に示すように、自己組織化単分子膜 2 が処理され、自己組織化単分子膜 2 のビオチン 2 2 にストレプトアビジン 3 が吸着する。

このように自己組織化単分子膜 2 をストレプトアビジン 3 で処理することにより、自己組織化単分子膜 2 のビオチン 2 2 とストレプトアビジン 3 が共有結合に匹敵する強さで結合する。そのため、ストレプトアビジン 3 の一端に自己組織化単分子膜 2 のビオチン 2 2 を強固に結合することができる。

【 0 0 7 7 】

また、自己組織化単分子膜 2 をストレプトアビジン 3 で処理することにより、ストレプトアビジン 3 は、4 つのビオチンと結合することができるので、ストレプトアビジン 3 の上端に複合機能分子 4 のビオチン 4 2 を 2 つ結合することができる。

20

すなわち、図 4 に示すように、ストレプトアビジン 3 は、その下端で 2 つのビオチン 2 2 と、上端で 2 つのビオチン 4 2 と結合するので、1 つのストレプトアビジン 3 を介して複合機能分子 4 を 2 つ結合することができる。その結果、微生物 1 5 2 の検出感度を一層向上することができる。

【 0 0 7 8 】

[4 - 3] 複合機能分子固定化工程

前記第 1 の工程で得られた複合機能分子 4 を前記 [4 - 2] でストレプトアビジン 3 処理された自己組織化単分子膜 2 (作用電極 1 2 1 の一方の面側) に供給する。

複合機能分子 4 の供給方法は、前記 [2] < 3 > の液状材料を基板 1 2 0 上に供給する方法と同様の方法で行うことができる。

30

【 0 0 7 9 】

供給する複合機能分子 4 の濃度は、 $0.1 \sim 10 \text{ mol/L}$ であることが好ましく、 $0.5 \sim 8 \text{ mol/L}$ であることがより好ましい。

そして、一定時間放置した後、洗浄、乾燥する。

これにより、図 4 に示すように、作用電極 1 2 1 に自己組織化単分子膜 2、ストレプトアビジン 3 を介して抗生物質 4 1 が固定化される。

【 0 0 8 0 】

本工程の他の構成例として、第 1 の工程の式 2 で得られた複合機能分子 4 を、作用電極 1 2 1 表面に直接供給して該複合機能分子 4 を作用電極 1 2 1 上に固定化することもできる。この場合、複合機能分子 4 が S H 基を有するので、複合機能分子 4 を作用電極 1 2 1 上に直接結合することができ、簡単かつ迅速に抗生物質 4 1 を作用電極 1 2 1 に固定化することができる。

40

【 0 0 8 1 】

また、本工程の他の構成例として、第 1 の工程の式 3 で得られた複合機能分子 4 を、作用電極 1 2 1 表面に直接供給して該複合機能分子 4 を作用電極 1 2 1 上に固定化することもできる。この場合、該複合機能分子 4 のペニシリン V は、ペニシリン V (抗生物質 4 1) のベンゼン環の 4 位に結合した硫黄原子を介して作用電極 1 2 1 上に固定化される。そのため、ペニシリン V が作用電極 1 2 1 表面に配向性よく固定化され、高感度に微生物 1 5 2 の存在を検出することができる。

50

以上の工程により、図４に示す微生物センサー１００を得ることができる。この微生物センサー１００は、医療分野、食品分野、医薬分野、化粧品分野など微生物１５２を検出し得る種々の分野で用いることができる。

【００８２】

３．微生物センサーの動作方法

次に、図１に示す微生物センサー１００の動作方法について説明する。

まず、図４に示すように、本発明の微生物センサー１００の試料供給空間１５０に微生物１５２を含む液体試料１５１を供給する。

試料供給空間１５０に液体試料１５１を供給すると、反応層１と液体試料１５１とが接触する。反応層１と液体試料１５１とが接触すると、反応層１の最表面に存在する抗生物質４１が液体試料１５１中に含まれる微生物１５２の細胞壁のペプチドグリカン生合成に
10
関与する酵素に作用する。そして、抗生物質４１は、ペプチドグリカンの架橋形成を阻止する。すなわち、抗生物質４１は、細胞壁（細胞表面５）と反応し、結合する。

【００８３】

このとき、作用電極１２１と対向電極１２２との間に、作用電極１２１側が高電位となるように電圧を印加しておく、抗生物質４１と微生物１５２との結合により、電流値が変化し、その変化を処理回路２００が検出する。そして、処理回路２００は当該検出結果に基づいて所定の処理を行い、インピーダンスを算出する。

以上のような動作により、抗生物質４１に微生物１５２が結合した場合と結合していない場合とで電流値が変化するので、インピーダンスも変化し、液体試料１５１中の微生物
20
１５２の量を検出することができる。

【００８４】

液体試料１５１中の微生物１５２の濃度を測定する場合は、予め濃度既知の微生物１５２含有液体試料１５１を段階的に複数調製する。そして、本発明の微生物センサー１００を用いて、各濃度の液体試料１５１中の微生物１５２を測定する。測定により得られた各液体試料１５１中の微生物１５２のインピーダンスを縦軸に、微生物１５２の濃度を横軸として検量線を作成する。次に、微生物１５２の濃度未知の液体試料１５１を前述したように微生物センサー１００に供給し、該液体試料１５１中の微生物１５２を測定する。そして、測定により得られたインピーダンスと前記検量線とから液体試料１５１中に存在する微生物１５２の濃度を定量することができる。
30

以上のような方法により、微生物１５２の存在を検出することができ、微生物１５２の濃度を定量することもできる。

【００８５】

< 第２実施形態 >

図７は、図１に示す微生物センサーの第２実施形態を模式的に示す平面図、図８は、図７に示す微生物センサーのＢ－Ｂ線断面図である。

なお、以下の説明では、図７中の紙面手前側を「上」、紙面奥側を「下」と言う。また、図８中の上側を「上」、下側を「下」と言う。

以下、第２実施形態の微生物センサーおよびその製造方法について説明するが、それぞれ、前記第１実施形態の微生物センサーおよびその製造方法との相違点を中心に説明し、
40
同様の事項については、その説明を省略する。

【００８６】

１．微生物センサー

図７に示す微生物センサー１００は、図７、図８に示すように、基板１２０上に設けられた水晶振動子１８０と、水晶振動子１８０を保護する外枠１９０とを有している。この水晶振動子１８０は、水晶で構成された圧電体層１８１と、該圧電体層１８１の両側の面に設けられた一対の電極１８２、１８３とで構成されている。各電極１８２、１８３は、配線１３０、１３２を介して処理回路２００と電氣的に接続されている。

【００８７】

なお、処理回路２００は、発振回路として機能し、周波数をカウントする機能を有する
50

。

また、水晶振動子 180 は、図 8 に示すように、外枠 190 で覆われている。外枠 190 は、開口部 191 を有しており、該開口部 191 において電極 182 が露出している。この電極 182 の露出部分の表面に反応層 1 が形成され、検出部 110 を構成している。

水晶振動子 180 は、周波数 3 ~ 30 MHz のものであることが好ましく、9 ~ 27 MHz のものであることがより好ましい。

【0088】

2. 微生物センサーの製造方法

本実施形態の微生物センサーの製造方法は、まず、図 5 (a)、(b) に示す第 1 実施形態の [2] 電極形成工程と同様の方法により、基板 120 の所定の位置に電極 183 と配線 130 とを形成する。

10

次に、電極 183 上に水晶板 (圧電体層 181) を設置し、第 1 実施形態の [2] 電極形成工程と同様の方法により、該水晶板上に電極 182 を形成する。これにより、水晶振動子 180 を得ることができる。

次に、水晶振動子 180、配線 130 を保護するように、外枠 190 を覆う。

そして、開口部 191 に露出する電極 182 に第 1 実施形態と同様の方法により、反応層 1 を形成する。これにより、図 7、図 8 に示す微生物センサー 100 を得ることができる。

【0089】

3. 微生物センサーの動作方法

20

このような微生物センサー 100 は、図 7、図 8 に示すように、基板 120 と外枠 190 とで画成される試料供給空間 150 に、液体試料 151 を供給することにより、電極 181 上に設けられた反応層 1 と液体試料 151 とが接触する。

反応層 1 と液体試料 151 とが接触すると、反応層 1 の最表面に存在する抗生物質 41 が液体試料 151 中に含まれる微生物 152 の細胞壁のペプチドグリカン生合成に与する酵素に作用する。そして、抗生物質 41 は、ペプチドグリカンの架橋形成を阻止する。すなわち、抗生物質 41 は、細胞壁と反応し、結合する。

【0090】

このとき、電極 182、183 との間に電圧を印加しておくこと、微生物 152 と抗生物質 41 との結合により、水晶振動子 180 が発振する振動周波数が変化し、その変化を処理回路 200 が検出する。そして、処理回路 200 は、その検出結果に基づいて所定の処理を行い、周波数を算出する。

30

このように、微生物 152 が抗生物質 41 に結合することによる重量変化を振動周波数の変化に基づいて、液体試料 151 中の微生物 152 の存在を検出することができる。

以上のように、液体試料 151 中の微生物 152 を測定するのに、水晶振動子 180 を用いることにより、前述した自己組織化単分子膜形成工程などの工程を不要とし、簡単かつ迅速に微生物センサー 100 を得ることができる。

【0091】

以上、本発明の微生物センサーについて、図示の各実施形態に基づいて説明したが、本発明はこれらに限定されるものではない。微生物センサーを構成する各部は、同様の機能を発揮し得る任意の構成のものと置換することができる。また、任意の構成物が付加されていてもよい。

40

また、本発明の微生物センサーは、前記各実施形態を組み合わせたものであってもよい。

以下、本発明の微生物センサーの具体的実施例を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例】

【0092】

〔実施例 1〕

1. 微生物センサーの製造

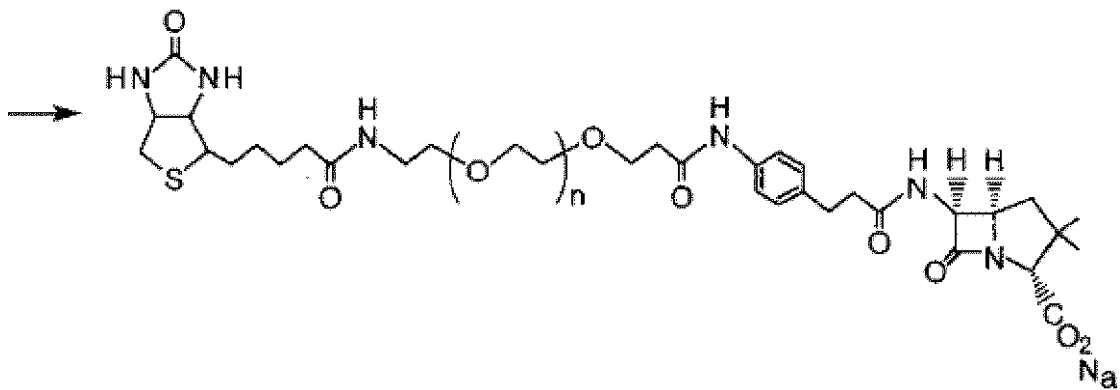
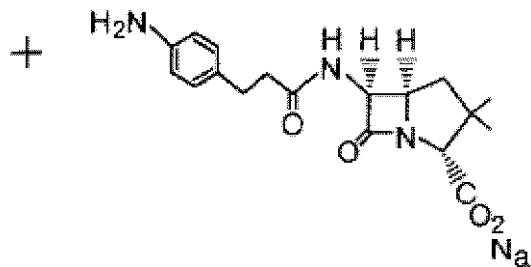
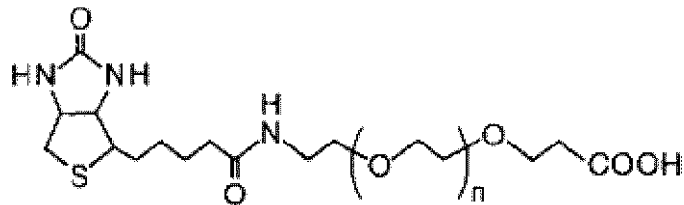
50

< 1 > まず、ペニシリン V のベンゼン環の 4 位にアミノ基が導入された化合物と B i o t i n P E G a c i d (P o l y p u r e 社製 ; 3 7 1 4 1 - 1 1 9 5) とをそれぞれ 1 m m o l 用意する。

これらの化合物と、D C C (ジシクロヘキシルカルボジイミド) および無水 D M F の混合液 2 0 m L とを容器に入れた。そして、下記式に示すように、攪拌しながら 5 0 で 1 0 時間反応した。その後、沈殿物をろ過し、D M F で洗浄した後、真空乾燥した。これにより、ビオチン - ペニシリン複合機能分子を得た。

【 0 0 9 3 】

(式 4)



式 4

(式中、n は 1 1 を示す。)

【 0 0 9 4 】

< 2 > 次に、樹脂製基板を用意した。そして、この樹脂製基板に金を真空蒸着法により形成した。次に、フォトリソグラフィー法により、作用電極、対向電極、参照電極および配線の形状に対応する形状のレジスト層を形成した。このレジスト層をマスクとして、プラズマエッチング法により、金膜の不要部分を除去した。そして、このレジスト層を除去することにより作用電極、対向電極、参照電極および配線を得た。

【 0 0 9 5 】

< 3 > 次に、厚さ 4 0 0 n m の二酸化ケイ素を積層し、絶縁膜を形成した。これに、検出部を形成すべき領域にマスクを設置して、絶縁膜に向けて光を照射した。これにより、絶

10

20

30

40

50

【化 8】



【化 9】



30

〔 实施例 2 〕

40

2. 評価

50

出については、インピーダンスの変化により評価した。

その結果、いずれの微生物センサーにおいても、インピーダンス値がブランク試料のインピーダンス値から20%程度変化し、抗菌剤に各細菌が結合していることが分かった。

したがって、本発明の微生物センサーは、微生物を簡便かつ迅速に、しかも高感度で検出することができるので、関連産業に寄与するところ大である。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】本発明の微生物センサーの第1実施形態を示す斜視図である。

【図2】図1に示す微生物センサーを模式的に示す平面図である。

【図3】図2に示す微生物センサーのA-A線断面図である

10

【図4】図3に示すA-A線断面図の部分拡大図である。

【図5】図2に示す微生物センサーの製造方法を説明するための図（縦断面図）である。

【図6】図2に示す微生物センサーの製造方法を説明するための図（縦断面図）である。

【図7】本発明の微生物センサーの第2実施形態を模式的に示す平面図である。

【図8】図7に示す微生物センサーのB-B線断面図である。

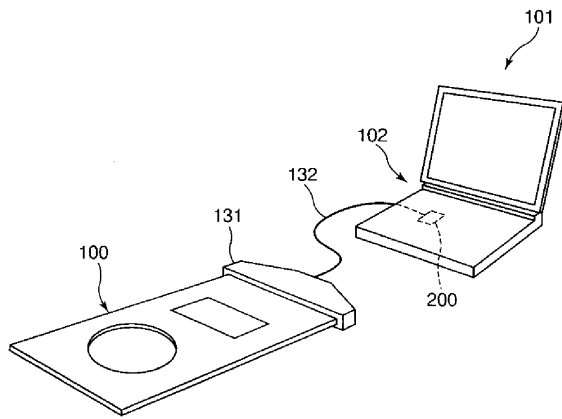
【符号の説明】

【0102】

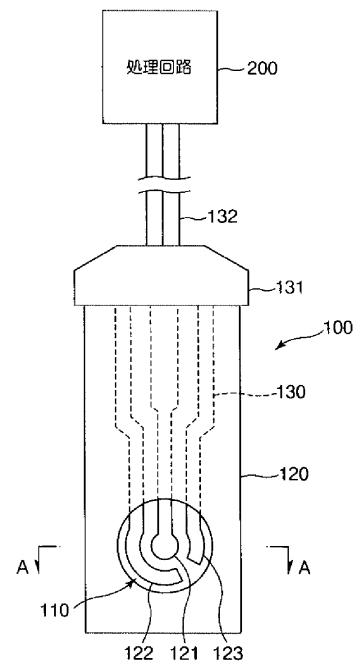
1 ... 反応層 2 ... 自己組織化単分子膜 21 ... 有機分子 22 ... ビオチン 3
 ... ストレプトアビジン 4 ... 複合機能分子 41 ... 抗生物質 42 ... ビオチン
 5 ... 細胞表面 9 ... 金属膜 100 ... 微生物センサー 101 ... 測定装置 10
 2 ... 演算装置 110 ... 検出部 120 ... 基板 121 ... 作用電極 122 ...
 対向電極 123 ... 参照電極 130 ... 配線 131 ... コネクタ 132 ... 配線
 150 ... 試料供給空間 151 ... 液体試料 152 ... 微生物 160 ... 絶縁膜
 165 ... 開口部 170 ... マスク 180 ... 水晶振動子 181 ... 圧電体層
 182 ... 電極 183 ... 電極 190 ... 外枠 191 ... 開口部 200 ... 処理
 回路

20

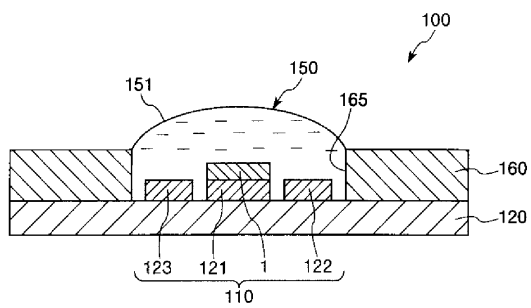
【図 1】



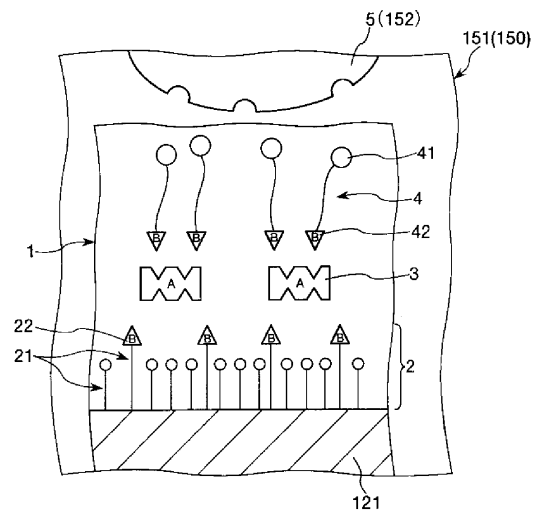
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
G 0 1 N 33/547 (2006.01)		G 0 1 N 27/46 3 3 6 G
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/547
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/53 U
C 1 2 M 1/34 (2006.01)		G 0 1 N 33/543 5 2 5 W
		G 0 1 N 33/543 5 9 3
		C 1 2 M 1/34 B

(72)発明者 西村 顕
兵庫県神戸市東灘区住吉南町4丁目5番5号 白鶴酒造株式会社内

(72)発明者 伴 光博
兵庫県神戸市東灘区住吉南町4丁目5番5号 白鶴酒造株式会社内

(72)発明者 山崎 旭
兵庫県神戸市東灘区住吉南町4丁目5番5号 白鶴酒造株式会社内

(72)発明者 浅井 拓也
兵庫県神戸市東灘区住吉南町4丁目5番5号 白鶴酒造株式会社内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開2000-065708(JP,A)
特開2005-084028(JP,A)
特開平06-226090(JP,A)
特開平11-165066(JP,A)
特開2002-181371(JP,A)
Langmuir, 2005年, Vol.21, No.24, 10907-10911

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 5 7 9
C 1 2 M 1 / 3 4