

サンプル局部および微量サンプルの濃度測定を可能にする マイクロセンサーの開発

北海道大学大学院工学研究院 環境創生工学専攻 准教授 佐藤久

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html>

サンプルの定量は全ての科学分野において基礎となる技術である。センシング技術開発の歴史は、感度、選択性、迅速性、分解能の改良へのチャレンジである。新しく開発されたマイクロセンサーは、従来の化学センサーと同程度の感度、選択性、応答時間を有するだけでなく、その名が示すとおり、ミクロンレベルの極めて高い空間的解像度を有する。

化 学センサーは特定の物質を特異的に感知し、その量に比例した信号を出力するもので、イオン選択性電極、ガスセンサー、バイオセンサーなどの種類がある。化学センサーは、(1)測定可能な物質の種類が多い、(2)選択性が高い、(3)検出限界値が低い、(4)応答時間が短い、などの特性を持つために汎用性が高く、医療、化学工学、環境計測などの分野において広く利用されている。

化 学反応は触媒や微生物の助けにより進行するため、局所的に生ずる場合が多い。廃水処理や化学的生産プロセスは巨大なタンクを用いて行われるが、実際には反応はタンク内の触媒や微生物集塊(生物膜)といった局所部分において進行している。このことから、反応がまさに進行している生物膜内などの局所的なホットスポットにおける反応メカニズムの解析なくして、タンク全体の反応プロセスの安定化、さらには高効率化は達成されないことは容易に想像され得る。

我 々の研究グループでは、1996年以降、下水処理に用いられる生物膜内の細菌の菌相、空間分布、活性分布を明らかにしてきた¹⁾。図.1は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法により可視化された生物膜断面の細菌の空間分布を示している。赤色はアンモニア酸化細菌(AOB)、緑色は亜硝酸酸化細菌(NOB)の細胞である。この画像から、厚さ約 200 μm の生物膜内の空間分布が明らかとなり、(1)AOB は深さ方向に一様に分布しているのに対し、NOB は主に深部に分布していること、(2)AOB はNOB よりも菌体密度が高いこと、(3)AOB、NOB ともに直径数十 μm の球状のクラスターを形成していること、などが明らかとなった。これにともない、微生物活性も生物膜内で不均一に分布していることが予想される。

F ISH 法はこのように微生物生態に関する様々な情報を与える極めて強力なツールであるが、微生物の活性に関する情報をダイレクトに提供するものでは

ない。それは、FISH 法は rRNA を検出する技術であり、基質濃度などで決定される微生物活性のダイナミックな変化に比べて、rRNA 量の変動には時間がかかるためである。

局 所的なホットスポットにアクセスし、微生物活性を瞬時に解析するためにはどのような手法が有効であろうか？通常、反応速度は反応物質または生成物質の時間的な濃度変化を定量することで明らかにされる。局所に偏在する物質濃度の定量にはマイクロセンサーが有効である。マイクロセンサーは、市販の化学センサーの感応部を数 μm から数百 μm に縮小

図.1 生物膜断面の細菌の空間分布

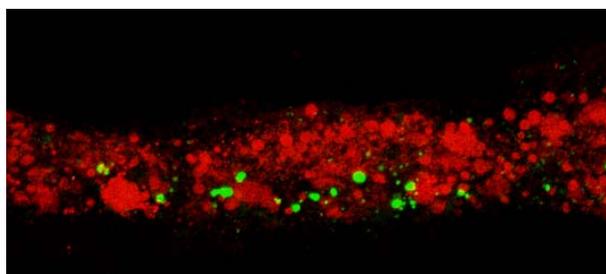
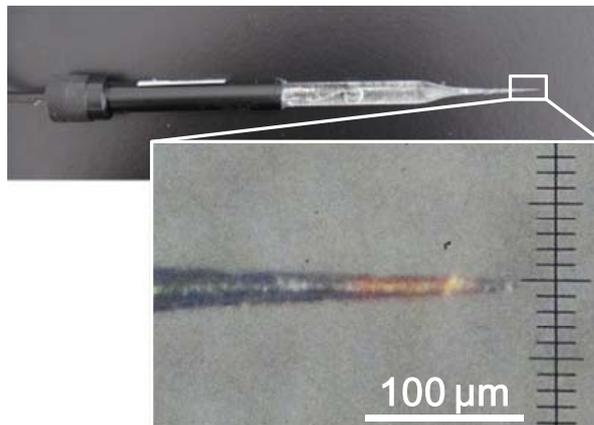


図.2 マイクロセンサーの外観



しただけの分析ツールである(図.2)。このため、サンプルの破壊を最小にとどめて、すなわち、サンプルを生かしたままサンプル局所の物質濃度を定量できる。マイクロセンサーは、その基本的構造および測定原理は化学センサーとなんら変わらず、極めて優れた選択性および応答時間を有する。この特徴から反応速度を求めることが可能となる。さらには、ミクロンオーダーの空間的解像度というアドバンテージを生かせば、局所領域の3次元濃度分布を描くことも可能である。

本 研究室ではこれまでに11種類(O_2 、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、pH、ORP、 H_2S 、 H_2 、 CH_4 、 ClO^- 、 HPO_4^{2-})のマイクロセンサーの開発に成功した。これらマイクロセンサーを用いて、環境中の様々な微生物集塊内の、様々な物質の濃度分布を明らかにしてきた。図3.1に、下水処理に用いられる直径約 $800\mu m$ の微生物集塊(活性汚泥フロック)内部のDO、 NH_4^+ 、 NO_3^- 濃度分布を示す。DOはフロック表面の濃度境界槽内($-200\mu m \sim 0\mu m$ の部分)およびフロック内で減少し、好氣的なフロック内では NH_4^+ が消費され、 NO_3^- が生成されていることが明らかとなった。この結果から、個々の活性汚泥フロック内で硝化反応が生じていることを明らかにした²⁾。図3.2に、河口干潮域の干潟表面のDO濃度分布を示した。光合成が活発な干潟では照射する光強度に比例してDO濃度が増大した。光強度が最大の条件($1250\text{ mmol photons/m}^2/\text{s}$ 、夏の晴れた日に相当)には深さ僅か $200\mu m$ の部分のDO濃度が直上の水中の2.5倍にも達することを明らかにした。また、干潟表面において、光合成は光照射のOn-Offに1秒以内で応答していることを明らかにした(図3.3)。

現 在は環境工学以外の研究分野にもマイクロセンサーを応用している。例えば、マウスの腸内環境の*in situ* pH測定、骨形成場に形成される微小アルカリ領域の*in situ* pH測定など、生命科学系の研究を行っている。マイクロ(ナノ)レベルのセンシング技術はあらゆる分野に応用可能な最先端技術であり、マイクロセンサーの重要性は今後一層高まるものと期待される。

参考文献

1) Okabe S., Satoh H., and Watanabe Y. (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(7), 3182-3191.
 2) Satoh H., Nakamura Y., Ono H., and Okabe S. (2003) Effect of oxygen concentration on nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*, **83**(5), 604-607.

図.3 マイクロセンサーを用いて測定した生物膜内濃度分布

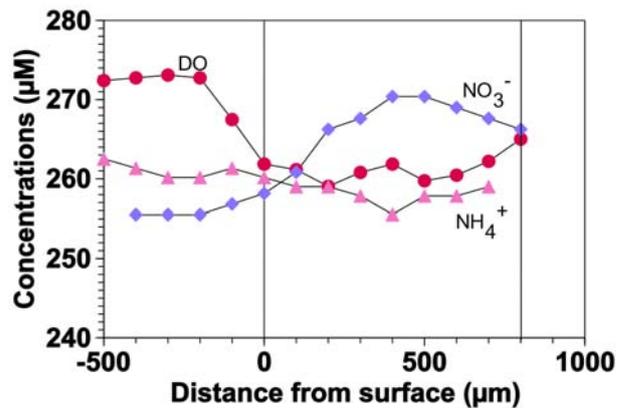


図 3.1

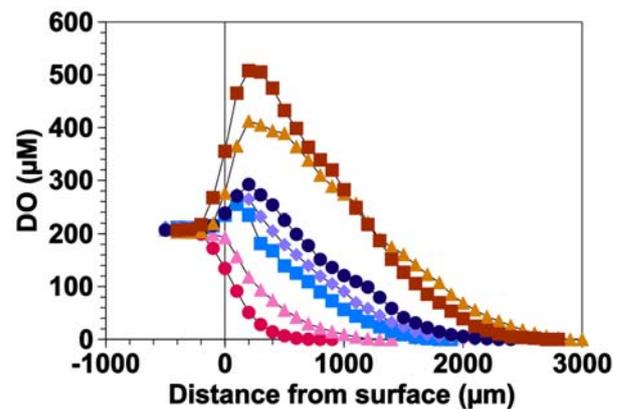


図 3.2

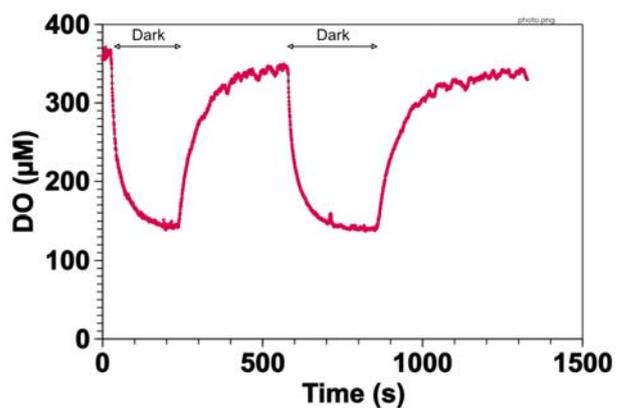


図 3.3

3) Nakamura Y., Satoh H., Okabe S., and Watanabe Y. (2004) Photosynthesis in sediments determined at high spatial resolution by the use of microelectrodes. *Water Research*, **38**(9), 2440-2448.