

平成29年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「表面プラズモン共鳴励起蛍光測定による
微細流路型バクテリア検出装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 関東経済産業局

補助事業者 公益財団法人さいたま市産業創造財団

目次

第1章 研究開発の概要	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制	11
1-3 成果概要	13
1-4 当該研究開発の連絡窓口	14
第2章 本論	15
(開発サブテーマごとに記載)	
【1】 バクテリア検出用センサチップの開発	15
【1-1】 V溝形状の最適化の進捗状況	
【1-2】 ハンドリング性の向上	
【2】 V溝チップ用の検査キットの確立	17
【3】 検出装置の開発	17
【3-1】 受光ユニットの最適化の進捗状況	
【3-2】 光源ユニットの最適化	
【3-3】 装置全体の小型軽量化	
【4】 信号処理ソフトウェアの開発	19
【4-1】 蛍光信号処理システム開発の進捗状況	
【4-2】 ユーザーインターフェースの開発	
第3章 全体総括	20
3-1 研究開発成果	20
3-2 研究開発後の課題・事業化展開	20

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究開発の概要及び背景、当該分野における研究開発動向

生活用水、特に飲料水中のバクテリアは、飲用後短時間で、腹痛、下痢、吐き気、等の症状を引き起こし、重度の場合には死に至ることも少なくない。安全な飲料水を確保するためには、バクテリア検査は必須である。世界各国、特に発展途上国では、人口増加や気象変動による水不足や、従前からの劣悪な上水供給環境の改善に対する要望が強く、そのニーズを満たすために水ビジネスが大きく展開されており、国内の水関連企業もそのシェアを伸ばすために、多くの投資を行ってきている。水ビジネスの重点は安全な水供給のための浄水システム及びそのマネジメントに置かれているが、浄化された水が安全であることを担保するための、センシング技術も重要であることが強く認識されている。

いつでも・どこでも安全安心な水が飲める環境のために・・・



我々の川下製造業者である、水関連システムメーカー、水関連の測定器メーカー、さらにはその川下業者である、水検査会社からは、極短時間に、取水場や浄水場の「その場」で、誰でも簡単にバクテリア検査ができる検出装置が強く望まれている。

川下業者からの要望をまとめると以下のようなになる。

- ・高機能：水質基準を満たす程度の高感度なバクテリア検出。
- ・小型化：現場に持ち運んでその場検出が可能。
- ・安全性の確保：その場ですぐに検出結果が得られる解析技術とユーティリティー
- ・低コスト化：従来のバクテリア検査の半額以下の検査方法。

つまり **安く、早く、簡単に、現場で、従来技術と同程度の感度のバクテリア検出を行いたい。**

川下製造業者の抱える課題及び要請

(十二) 測定計測に係る技術に関する事項

1 測定計測に係る技術において達成すべき高度化目標

(3) 川下分野横断的な共通の事項

① 川下製造業者等の共通の課題及びニーズ

ウ. 小型化

研究開発の背景及びこれまでの取り組み

これまでに産業技術総合研究所では、表面プラズモン共鳴励起蛍光増強を用いた、高感度で小型化が可能で、取扱いが容易なバイオセンサ「V溝バイオセンサ技術」(2013年 Nature Communications 掲載)を開発した。

V溝バイオセンサ技術とは：

V字型の断面を持つ流路によって構成されたバイオセンサ。その流路内面に表面プラズモン共鳴を励起可能な構造を付与し、流路自身に表面プラズモン共鳴増強蛍光を発生させる機能を付与することによって成されたバイオセンサである。

生体物質の高感度検出には、古くから蛍光標識が用いられている。これは、対象物質に対して蛍光色素を付着させ、励起光を照射して蛍光強度を観測することで対象物質の量を測定するものである。V溝バイオセンサもこの手法をベースとしているが、従来技術よりもより高い感度での検出が可能となっている。

V溝バイオセンサの特徴はその検出装置を非常に小さく構築できる点である。システム全体の構成図を図2に示す。図3は産業技術総合研究所が市販の蛍光検出装置をベースに試作した最初のV溝バイオセンサ試作機とそのセンサチップである。

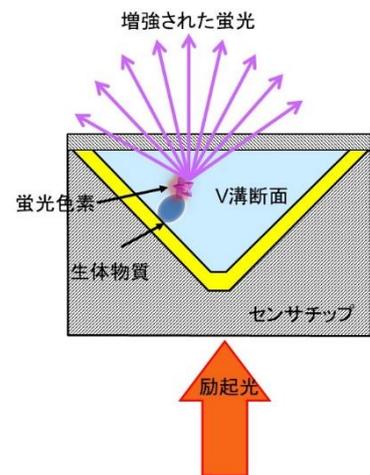


図1 V溝バイオセンサチップの溝の断面図と測定原理。

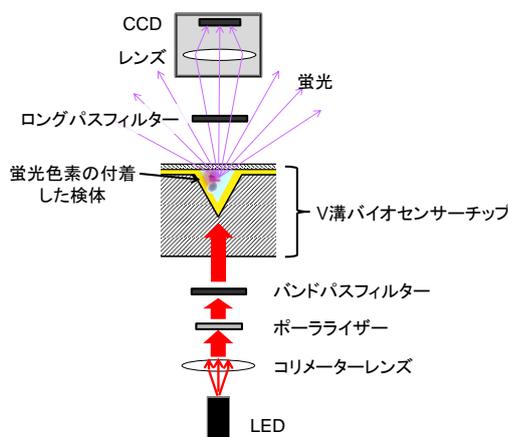


図2 システム全体の構成図

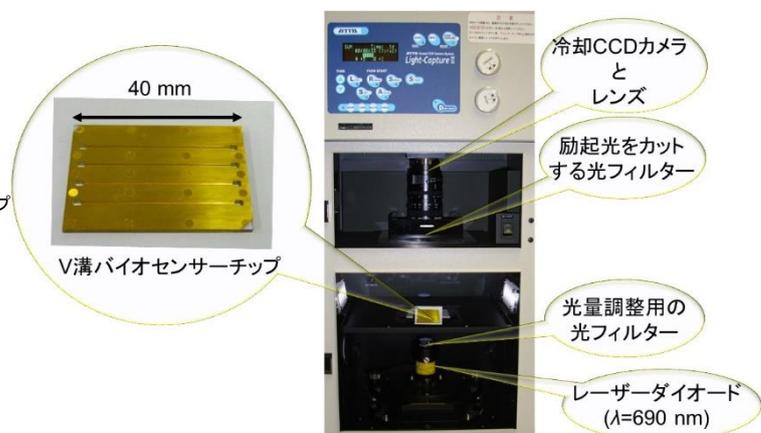


図3 V溝バイオセンサ最初の試作機

その後、産業技術総合研究所がさらに同装置を小型化することを検討し、株式会社シバサキが作製した試作機が図4である。既に片手で持てる程度の大きさは実現している。

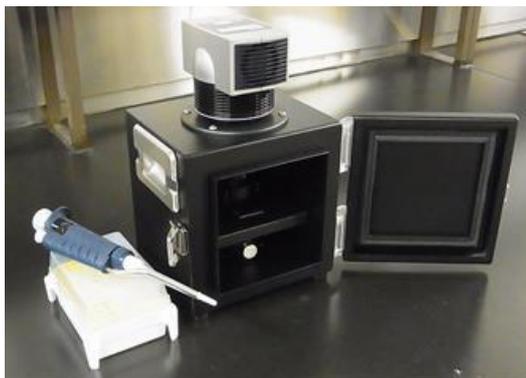


図4 シバサキ社が作製したV溝バイオセンサ

本研究開発に先立ち、V溝バイオセンサで大腸菌の検出試験を試みた。結果を図5に示す。ここでの大腸菌量は1つの溝中に 10^5 cfu(約 10^5 個)とした。大腸菌はHoechst34580という染色液で蛍光染色を行った。

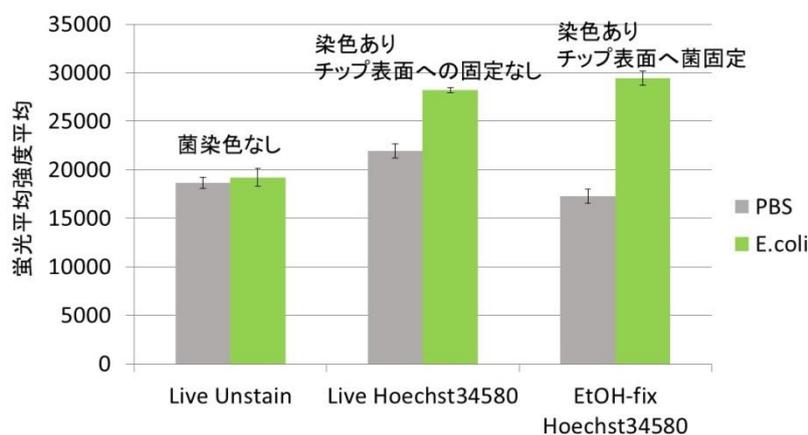


図5 大腸菌検出に関する事前検討。グレーは大腸菌を含まない液の信号(レファレンス)、グリーンは、大腸菌を含む水からの信号。(左) 大腸菌を染色せずに測定した場合。(中央) 大腸菌は染色したが、チップ表面への固定化処理は行わなかった場合。(右) 大腸菌を染色処理した後、菌をチップの検出面に固定化処理した場合。

図5より、V溝バイオセンサにてバクテリア(ここでは大腸菌)の検出が可能であることが分かる。また、染色したバクテリアをチップ表面に固定化するとより高い信号が得られることも分かった。但し、この事前検討で検出に用いたバクテリア濃度は目標値よりも著しく高い。これは検出系及び検出プロトコル(検出手順)がバクテリア検出用として最適化されていないためである。

V溝バイオセンサによるインフルエンザウイルス検出では、照射光のビームスポット内に 10^3 個程度ウイルスが存在すれば検出が可能である、というデータを得ている。バクテリアはウイルスの1000倍程度以上の体積を持つことから、本開発によって、センサチップ及び検出プロトコルをバクテリア検出用に最適化すれば、十分目標の検出感度は達成できると考えている。

以上に示したような、V溝バイオセンサのバクテリア検出に向けた最適化も含めた、本研究開発で解決すべき課題を以下にまとめる。また、それぞれの課題解決のための研究開発手段を「③研究開発の具体的な内容と実施スケジュール」欄で説明する。

【技術的課題1】 バクテリア検出用センサチップ

センサチップ開発での技術的課題としては、まず、川下業者から要望されている検出感度を実現するための V溝流路部の形状の最適化が挙げられる。また、検査員が使用する際、検体を簡単に導入できる 送液部分の開発も必要である。また、流路部に配置する蓋が検出や送液を阻害しないようにすることも課題である。

【技術的課題2】 V溝チップ用の検査キット

検査キットとして、装置に付属の試薬類を用意する必要がある。この試薬類は、検出感度及びシステムの使いやすさの両方に大きな影響を与える重要な開発要素である。ラボ内で実施する検査では、複数の試薬を検出時に調合して使用することが通常であるが、これでは、水管理現場でのその場検出には不向きである。よって、必要な試薬がすべて調合されたオールインワンの検査キットを開発することが技術的な課題である。

【技術的課題3】 検出装置

開発する装置は、必要な検出性能を持ちながら、より安く、より小さく・軽く、より使いやすいことが求められる。この要望を実現する仕様を満たす、受光ユニット及び光源ユニット、チップ取り付け部、制御部、電源部の開発を行う。また、装置全体を小型化するため、装置の内部レイアウトの最適化を図り、さらには 軽量化を実現することなども開発課題である。ユーザーインターフェースを向上させるため、外部端末との簡易なデータ通信機構を確立することも課題として挙げられる。

【技術的課題4】 信号処理ソフトウェア

ソフトウェア開発では、受光ユニット及び光源ユニットの 制御機能の開発、データ解析システムの開発、測定結果表示用システムの開発などが課題である。これらは、いずれも開発する装置の仕様や、取得データとの関連性を考慮しながら開発する必要がある。また、ユーザーの使いやすさを実現することも重要な課題である。

社会的・経済的背景

日本における水中バクテリアの分析市場としては水道、入浴施設水、遊泳施設水、排水、河川水、環境水などがあり、その市場規模は日本国内で数10億円規模であると推定される。世界規模では、水ビジネス市場はこれから爆発的に拡大することが見込まれており、2025年には世界で80兆円を超えると予想されている。そのうちの約40兆円が運営・管理費と推定されており（経済産業省試算）、水質管理のニーズはますます大きくなるものと考えられる。

近年、世界的な水需要の高まりから下水のリサイクルなどの再生水需要も増加するとみられ、これに伴い簡易迅速な水質モニタリング技術の国際的なニーズも高まっている。現在、再生水システムの国際標準化の検討（ISO/TC282）なども進められており、これらの規格にバクテリアの測定が品質測定方法として組み込まれると、本法の社会的価値・経済的価値はさらに大きくなるものと予想される。

技術的背景

一般的にはバクテリア検査では、今でも古典的な培養法が使われている。この検査方法においては、特に新しい進展はない。

従来技術：培養法

水質検査において最も一般的なバクテリア検出手法は培養法。

特徴：正確、長年のノウハウがある。

欠点1：時間が掛かる。

寒天培地を使い培養1日。その後の簡易検査1～3日。

欠点2：コストが掛かる。

熟練者が長時間かけて作業。人的コストが著しく高い。

欠点3：ラボ内でしか実施ができない。

空気中の細菌などが混じってしまうため、クリーンな作業環境が必要。現場に持って行っの作業は不可能。

最近では、フローサイトメーターが、水質検査を迅速に行う技術として、活用され始めている。フローサイトメーターは、検査対象水が流れている領域にレーザー光を照射し、散乱光や蛍光を測定する。予め蛍光色素にて特異的に細菌を染色することによって細菌のみを光らせて検出することができる。実際にスイスではこの技術を使った細菌評価が2013年正式に採用されている。しかし、フローサイトメーターは精密且つ大型な装置であり、持ち運びは到底できない。装置価格も1千万円～数千万円と高価である。また結果の解析には習熟を要する。このような装置の性格上、フローサイトメーターによって今回の川下企業の要望である「小型、安価、誰でも使える」といった要件を満たすことは困難である。

従来技術：フローサイトメーター

近年、高速かつ正確な水質検査技術として使用され始めている。

特徴：正確、検査時間が短い。

欠点1：装置が高価

1,000万円以上。

欠点2：持ち運べない

装置が大型でかつ精密機器なので、持ち運んで試験することは不可能。

V溝バイオセンサは、そのポテンシャルから、細菌の検出精度が高まり、短時間・低コストでいつでもどこでも誰でも水質検査を行えるような装置となることが十分に期待でき、その結果、従来技術よりも格段に適用範囲が広く、高い利便性を備えた水質管理手法が提供可能となる。

特許権について

特許出願番号： 特願 2011-157242、

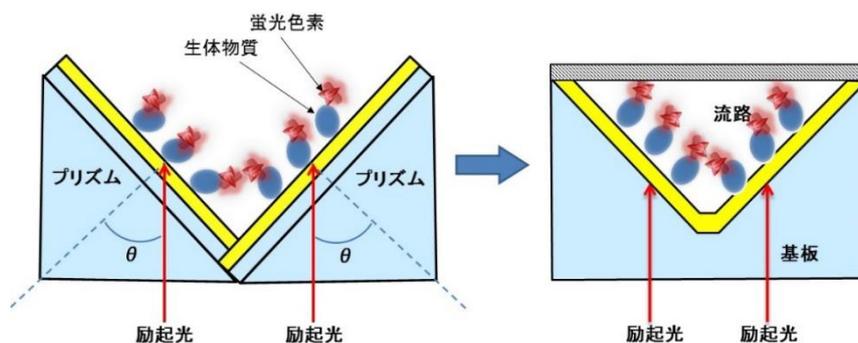
発明の名称： 目的物質検出チップ、目的物質検出装置及び目的物質検出方法

出願人／権利者： 国立研究開発法人産業技術総合研究所

ライセンス： 株式会社シバサキに特許の使用権をライセンス済み。

発明の概要： 本発明はV溝バイオセンサそのものの特徴を権利範囲としたものである。

通常のバイオチップの流路の断面は長方形をしている。一方、本発明では、この断面をV字型にしたことが特徴である。このようにすると、図に示したようにチップそのものが真下からの光照射に対してプリズムとして働く。よって、V溝内面に表面プラズモン共鳴励起層を形成すれば、流路内面がそのまま蛍光増強面になるという仕組みとなっている。一般的なマイクロ流路を持ったバイオチップ同様に本チップに検体を流せば、格段に向上した検出感度が得られることになる。



V溝バイオセンサの動作原理図(左)とセンサチップの断面模式図

類似特許と抵触の可能性：

類似特許出願として、特願 2009-290488「バイオチップ及び生体物質検出装置」(不登録確定)が挙げられる。この発明では、三角形のデコボコした基板に表面プラズモン共鳴励起機構を形成して、この基板の裏面より光を照射してバイオ物質を検出する、と言うものである。一方、我々の発明は、基板表面がデコボコしているのではなく、検体を流す流路そのものが表面プラズモン共鳴励起機構として働くものであり、はるかに機能性が高い。

他にも関連特許調査を行ったが、類似のものは見つからなかった。表面プラズモン共鳴現象を用いたセンサ自身は、1970年代には既にその検出原理が確立されており、この技術そのものに関して、他の知財に抵触する可能性は著しく低い。

1-1-2 研究開発の高度化目標及び技術的目標値

高度化目標

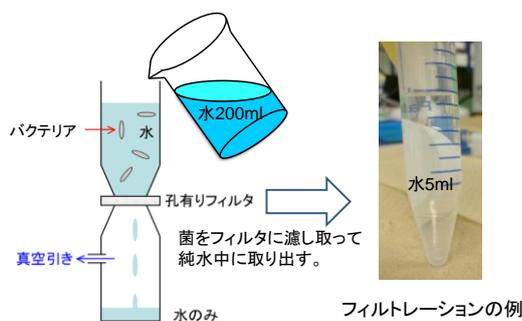
(十二) 測定計測に係る技術に関する事項 ウ. 評価(分析・解析)の効率性向上、

本研究開発において掲げる「具体的な高度化目標」:

開発の最終目的を簡単に言い表すと、安く、早く、簡単に、現場でバクテリア検出が可能な装置の開発である。具体的な開発目標値(高度化目標)は、以下の通りである。

測定感度(高感度化目標値): 一般細菌 10^3 個/ml 以下の検出感度。誤差 $\pm 25\%$ 以内。

この目標値は、水質基準に関する省令で規定する水質基準である一般細菌に対する基準に準拠している。この水質基準を満たすには、検体水 100ml 中に 10^4 個程度の一般細菌の存在を検出できる性能が求められる。100ml の検体水はフィルトレーション(濾過)によって容易に 10 倍程度の濃度に濃縮することが可能であることから、 10^4 個/10ml つまり、 10^3 個/ml 以下の検出感度があれば、環境基準を満たす検出が実施可能である。



装置サイズ(ポータブル化目標値): 150(W)×100(D)×100(H) mm 以下、重さ 3kg 以下。

この目標値は、検査員が装置を現場に持っていき、測定することを想定して設定した。装置の操作は外部端末からの制御とする方向で開発を進めるが、外部端末はスマートフォンやタブレット端末とする予定であり、これらは携行性には影響を与えない。

測定手順(その場検出化目標値): スリーステップ検出を実現する。

この目標値は、熟練の必要なく、装置操作ができることを想定して設定した。検査員は、検体水を特定検査用試薬に混ぜ(ステップ1)、センサチップに注入し(ステップ2)、装置の計測ボタンを押す(ステップ3)、だけで測定を実施できるように、測定プロトコル開発を行う。

検査時間(その場検出化目標値): 1 測定 20 分以内。

この目標値は、検査員が現場での測定時に苦痛なく待つことができる時間を想定して設定した。20分以内、菌の試薬による染色に10～19分、検出装置による検出は1分以内を実現する。

簡単操作（その場検出化目標値）：ボタン1つの通常操作。数値化による結果表示。

現場で検査員が行う装置操作は測定ボタンを押すのみ、の簡単操作化を実現する。また、検量線を内蔵し、検査結果は数値（菌数〇〇個/ml表示）で分かりやすく表示する。

検査コスト（低コスト化目標値）：1検査当たり消耗品1,000円以下。装置75万円以下。

従来のバクテリア検査コストは大凡3,000～5,000円/検体である。目標値では大凡この半額を目指すことから、1検査当たりの消耗品価格を1,000円以下とすることを目標とする。装置価格は検査装置として導入されやすい価格帯である75万円/台を目標とする。

これらの最終目標値を達成するための各サブテーマの目標値は以下の通りである。

【1】バクテリア検出用センサチップの開発

【1-1】V溝形状の最適化

バクテリア濃度 10^3 個/mlの時に、バックグラウンド信号に対して、20%以上高いシグナルが得られる、プラズモン励起構造、チップ材料、V溝形状を確立。測定時間1分以内を実現する。

【1-2】ハンドリング性の向上

- ・マイクロピペットで容易に検査水を注入できる簡単操作性。
- ・検査水注入時に液漏れしない構造。
- ・センサチップ装着はワンタッチ。

【2】V溝チップ用の検査キットの確立

検査キットに付属の試薬として、検体水を規定量混ぜるだけで、蛍光標識が完了する検査用試薬を確立する。染色時間19分以内を実現する。

【3】検出装置の開発

【3-1】受光ユニットの最適化

- ・高価な冷却型カメラから非冷却のイメージセンサまたはフォトダイオードへ置換え低コスト化。
- ・受光ユニットのサイズは40(W)x40(D)x40(H)mm以下。
- ・測定精度±25%以内の安定性を実現。

【3-2】光源ユニットの最適化

- ・光源素子の選定、コリメート光学系の検討、漏れ光防止機能を盛り込み、課題【1-1】と連携して高いシグナルが得られる光源とする。
- ・光源ユニットのサイズは50(W)x50(D)x50(H)mm以下。
- ・課題【3-1】と連携して、測定精度±25%以内の安定性を実現。

【3-3】装置全体の小型軽量化

- ・装置サイズ150(W)x100(D)x100(H)mm以下、重さ3kg以下。
- ・解析および表示機能を分離することによる、小型軽量化、低コスト化。

【4】信号処理ソフトウェアの開発

【4-1】蛍光信号処理システムの開発

- ・装置本体との通信機能を実装。
- ・各種ユニットの制御機能、データ解析システム、測定結果表示用のシステムを実装。
- ・システムは外部ソフトウェアに切り出し、モバイル端末等での制御としてシステム構築。
- ・各種ユニットの制御情報をソフトウェアで読み書き可能なデータ・フォーマットとして定義し、測定条件を均一化して、データ管理するシステムを構築。
- ・信号強度演算システム及び内蔵検量線により検出データを菌数に変換して表示。

【4-2】ユーザーインターフェースの開発

検査時にワンタッチでバクテリア検出が実施できる、使いやすいインター



フェースを実装する。

- ピクトグラムやアイコンによる視覚的な表現を採用してシステム構築。
- 複数言語を切り替えて表示可能とする。

1-1-3 当初の目的及び目標に対しての実施結果

上記記載の当初の目的および目標に対する実施結果をサブテーマごとに記載する。

【1】 バクテリア検出用センサチップの開発

【1-1】 V溝形状の最適化

最終試作品として、シクロオレフィンポリマー（COP）の射出成形で台形プリズムチップを製作。センサチップ表面にSiO₂保護層を形成することで、実環境試料中の夾雑物によるチップ表面へのダメージを防止、チップ安定化に成功。実環境試料で菌濃度1×10³個/mlを露光時間2秒で検出。最終評価として培養法との比較試験を実施、相関を確認。

【1-2】 ハンドリング性の向上

ベースとなるチップと壁材となるチップを圧入して組み合わせることで、容易にチップを準備できる構造となった。蛍光染色液の塗布量を最適化することでカバーガラスを置いたときに気泡が入らずに安定した測定が可能なることを確認できた。

センサチップ装着はワンタッチを実現した。

【2】 V溝チップ用の検査キットの確立

• 検体水滴下→乾燥固定→蛍光試薬滴下→観察のプロトコルで、実環境試料1×10³個/mlの検出を達成。

- 全行程を19分以内で達成

【3】 検出装置の開発

【3-1】 受光ユニットの最適化

バクテリアの個数を数えられた方が利用価値は上がることが分かった。そのため、イメージセンサでの装置化に向けた取り組みを進めた。受光ユニットのサイズは、目標サイズをクリアした。取得した蛍光画像の菌数を目視でカウントした場合と同程度の画像処理によるカウント処理が可能な画像を得ることだできた。

【3-2】 光源ユニットの最適化

小型の光源を実現し、目標サイズをクリアした。

装置内の迷光対策として、チップのゲート部分からの散乱光を防ぐことで安定した測定が可能となった。

【3-3】 装置全体の小型軽量化

装置サイズは131(W)×151(D)×193(H)であり、目標サイズをほぼクリアした。重さは3.0kg以下であり、目標をクリアした。基板にUSBハブ機能を搭載し、汎用USBケーブル1本にて接続可能な外部インターフェースを開発した。これにより、小型軽量化、低コスト化を実現した。

【4】 信号処理ソフトウェアの開発

【4-1】 蛍光信号処理システムの開発

• 装置本体との通信機能を実装した。
• 各種ユニットの制御機能、データ解析システム、測定結果表示用のシステムを実装した。

• システムは外部ソフトウェアに切り出し、モバイル端末等での制御としてシステム構築できた。

- 実装した画像処理機能にて、目視カウントと同等の検出精度を達成。

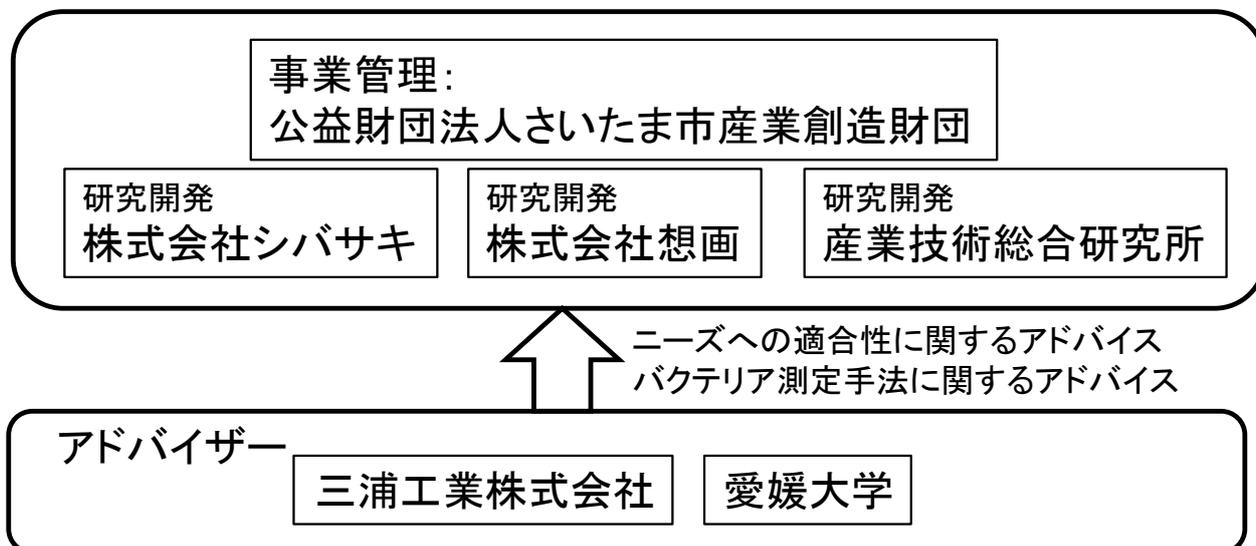
【4-2】 ユーザーインターフェースの開発

- 実装した画像処理機能にて、目視カウントと同等の検出精度を達成。
- 多言語対応を実装済。



1-2 研究体制

1-2-1 実施体制



1-2-2 研究者等氏名

(1) 研究開発

株式会社シバサキ

氏名	所属・役職	備考
柴崎 敏廣	代表取締役社長	総括研究代表者(PL)
今井 正	技術開発グループ マネージャー	
工藤 岳史	技術開発グループ	
坂井 徳浩	技術開発グループ	
阿部 佳織	技術開発グループ	
河本 聡	技術開発グループ	
高橋 優嘉	技術開発グループ	
原 浩一	エンジニアリンググループ サブマネージャー	
岩田 紀幸	エンジニアリンググループ	
笠原 真行	経営企画室 マネージャー	
千嶋 薫	経営企画室	

株式会社想画

氏名	所属・役職	備考
田中 統蔵	代表取締役	
秋山 健一	IT事業部	
相馬 秀樹	IT事業部	
平野 博昭	IT事業部	

国立研究開発法人産業技術総合研究所

氏名	所属・役職	備考
藤巻 真	電子光技術研究部門 研究グループ長	(SL)
島 隆之	電子光技術研究部門 主任研究員	
芦葉 裕樹	電子光技術研究部門 研究員	
安浦 雅人	電子光技術研究部門 研究員	
田口 由利子	電子光技術研究部門 派遣職員	

(2) 事業管理

公益財団法人さいたま市産業創造財団

氏名	所属・役職	備考
佐々木 哲也	支援・金融課 課長	事業管理者
寺村 泰昭	総務課 課長	経理担当者
古河 宏一	コーディネータ	
高田 寛二	コーディネータ	
平松 寿典	支援・金融課 主査	
伊藤 隆司	支援・金融課 職員	

(3) アドバイザー

氏名	所属・役職	備考
高井 政貴	三浦工業株式会社 アクア技術統括部 統括部長	
川嶋 文人	国立大学法人愛媛大学 農学部・環境産業科学研究室 准教授	

1-3 成果概要

各サブテーマごとの達成率は、全て 100%となり、目標通り研究開発を進捗することが出来た。その結果、川下企業の要望にあった、取水現場に持ち運び可能で、簡単操作で、迅速にバクテリアの検出を実現する、低コストなバクテリア検出装置を実現することが出来た。

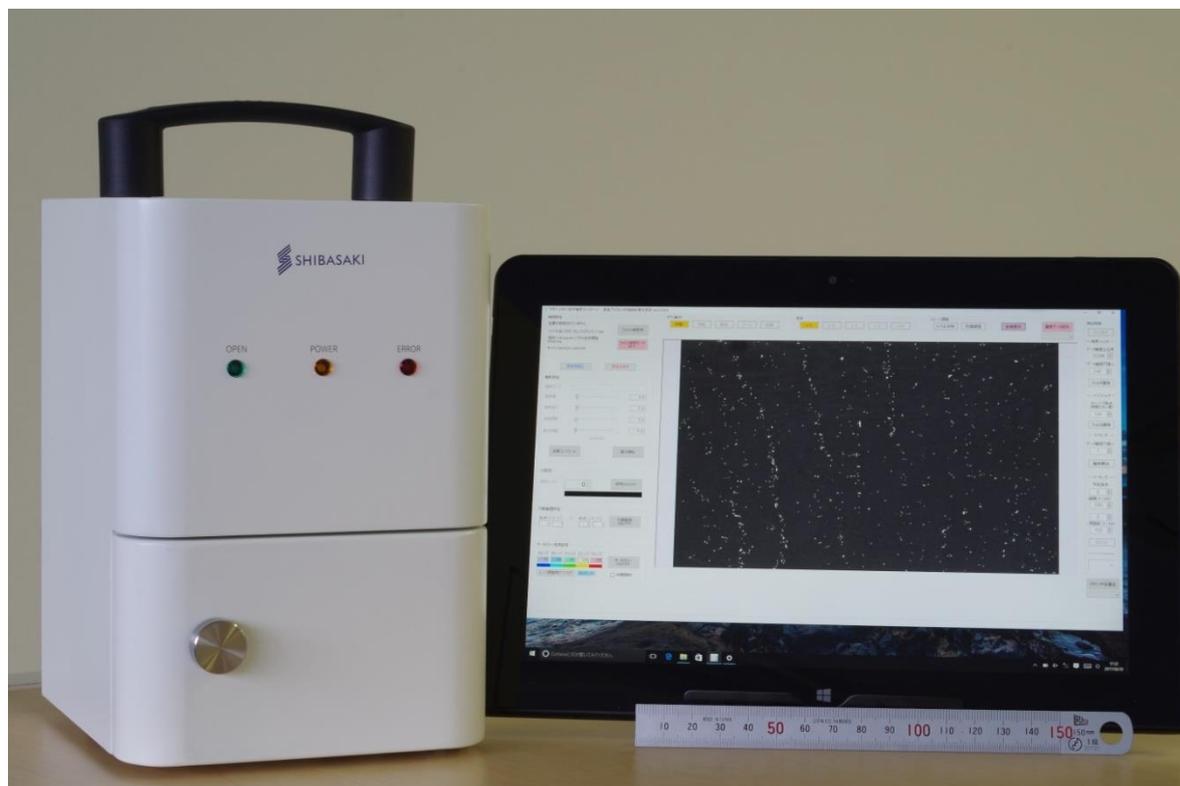


図 開発した装置およびソフトウェア(上)、チップ(下)

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社シバサキ 代表取締役社長 柴崎 敏廣

電話：0494-62-2211 FAX：0494-62-4488

E-mail：shibasaki.toshihiro@alfacto.com

第2章 本論

開発サブテーマごとに、各年度で実施した内容および結果を記載する。

【1】 バクテリア検出用センサチップの開発

【1-1】 V溝形状の最適化、【1-2】 ハンドリング性の向上

・平成27年度

初年度の成果として、設計に必要なチップ構成要素(チップ材料、V溝構造、持ち手部分の構造)を確定し、試作チップを完成させた。〔【1-1】〕センサチップ装着に関し、改良を行ったことにより、簡単なチップ操作を実現できた。〔【1-2】〕大腸菌を用いた検出試験で、菌の有無を識別することができた。



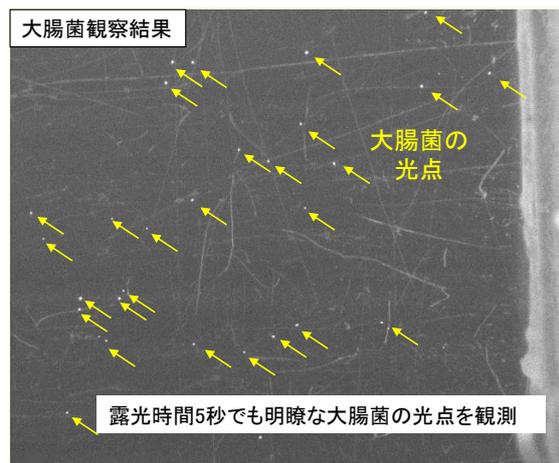
平成27年度開発チップ

・平成28年度

初年度開発したV溝チップでは注入できる検体量が少なく、またカメラ撮影時、ピントが合う領域が狭いことが課題となった。平成28度はこの課題をクリアーするため、チップ形状を見直し、台形プリズム式チップを新たに検討した。その結果、大腸菌濃度 10^3 cfu/ml の検出を露光時間5秒で観察可能なチップ形状を設計することができた。〔【1-1】〕



平成28年度形状検討チップ



形状検討チップでの大腸菌観察画像

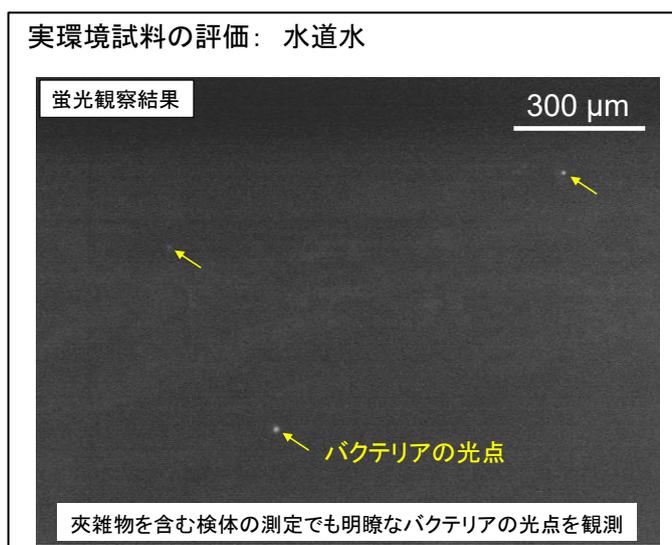
・平成29年度

最終試作品として、シクロオレフィンポリマー(COP)の射出成形で台形プリズムチップを作製し、表面をSiO₂で保護することにより実環境試料中の夾雑物による影響を防止し、チップの安定化に成功した。その結果、実環境試料で菌濃度 1×10^3 個/ml を露光時間 2 秒で検出することが可能となった。また、最終評価として培養法と比較試験を実施し、相関を有することを確認することができた。〔1-1〕

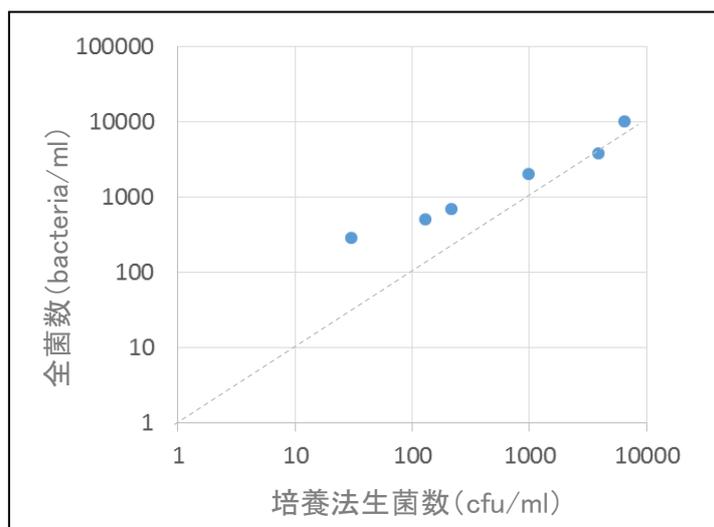
ベースとなるチップと壁材となるチップを圧入して組み合わせることで、容易にチップを準備できる構造となった。〔1-2〕



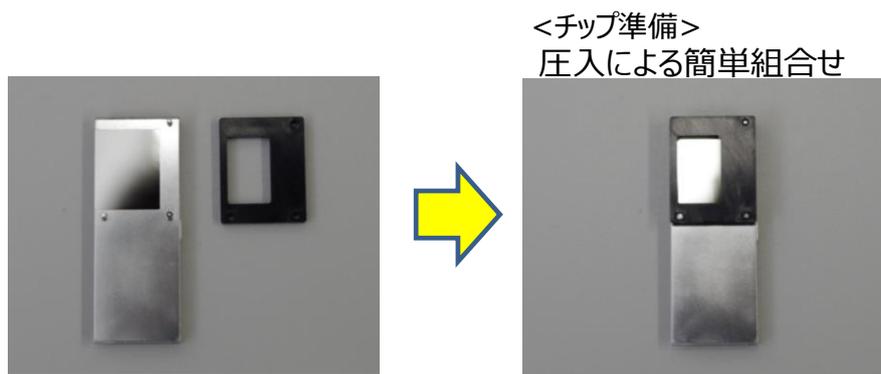
平成 29 年度射出成形チップ



試作チップでの細菌検出画像



培養法と全菌数計測の比較結果



チップの準備手順

【2】V溝チップ用の検査キットの確立

・平成27年度

蛍光試薬の選定を行い、開発したV溝形状のチップに適した試薬濃度、染色時間、検出手順の検討を行い、目標の検出時間を実現することができた。

・平成28年度、平成29年度

形状変更後のチップ形状に適した検出行程の検討を行い、検体水滴下→乾燥固定→蛍光試薬滴下→観察のプロトコルで、実環境試料 1×10^3 個/ml の検出を達成できた。また全行程を19分以内で達成できた。

【3】検出装置の開発

【3-1】受光ユニットの最適化、【3-2】光源ユニットの最適化、【3-3】装置全体の小型軽量化

・平成27年度

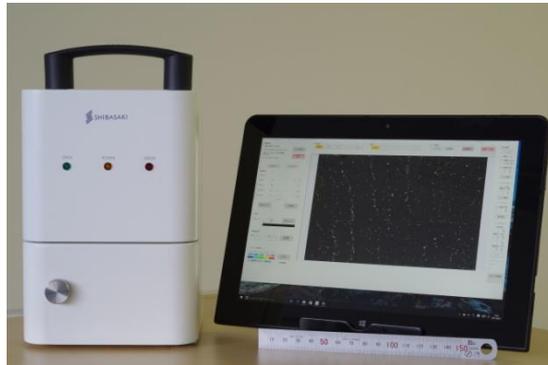
使用する蛍光試薬の特性に適した励起波長のLEDを選定した。【3-2】また、蛍光試薬のピーク蛍光波長付近で高感度な特性を持つ冷却CCDカメラを選定した。【3-1】上記LED光源及び冷却CCDカメラの制御を可能にする基板を作製し、これらを搭載した第一試作機を完成させた。第一試作装置のサイズ110(W)×185(D)×268(H)、重量3.1kgであり、ハンドキャリー可能な大きさを実現した。【3-3】



平成27年度試作機

・平成28年度

光源ユニットに関しては、チップ形状の変更もあり表面プラズモン共鳴の効果がより向上するよう光量アップおよびコリメート性が向上出来るレーザーダイオードを選定し光源を開発した。〔【3-2】〕この結果、受光ユニットに関しては、昨年度使用した高感度な冷却カメラをよりも安価で小型のカメラに置き換えることが出来た。〔【3-1】〕これらのユニットを組み込んだ第二試作機を開発した。サイズとしては、初年度の試作機から一回り小型化出来た。〔【3-3】〕



平成28年度試作機

・平成29年度

受光ユニットのサイズを維持した状態で、取得した蛍光画像の菌数を目視でカウントした場合と同程度の画像処理によるカウントが可能な画像を得ることができた。〔【3-1】、【3-3】〕

装置内の迷光対策として、チップのゲート部分からの散乱光を防ぐことで安定した測定が可能となった。〔【3-2】〕

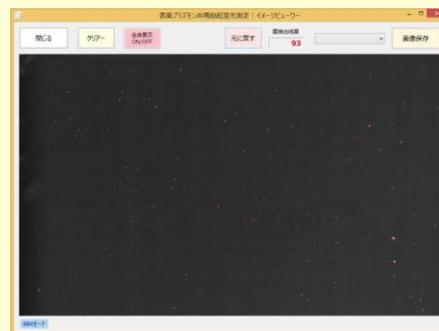
小型軽量化に関しては、汎用USBケーブル1本にて接続可能な外部インターフェースを開発した。この結果、装置サイズは131(W)×151(D)×193(H)であり、目標サイズをほぼクリアした。重さは3.0kg以下であり、目標をクリアした。〔【3-3】〕

<目視と画像処理カウントの測定例>

目視での菌の計測:96個



画像処理での菌の自動計測:93個



検出画像の目視カウントと画像処理での菌の自動計測の結果比較



平成 29 年度試作機と PC との接続状態

【4】信号処理ソフトウェアの開発

【4-1】蛍光信号処理システムの開発、【4-2】ユーザーインターフェースの開発

・平成 27 年度

装置と制御装置（PC）間の通信仕様を作成した。選定された LED 光源および冷却式カメラを制御するソフトウェアを開発した。（【4-1】）

研究過程の試験を効率化するため、研究専用の作業効率向上機能を策定した。（【4-2】）

・平成 28 年度

信号処理ソフトウェアの開発に関しては、通信仕様を作成し、装置の発光、受光デバイスの制御ソフトウェアを開発した。使用するカメラで撮影した画像に見られるノイズの除去処理を実装した。（【4-1】）

・平成 29 年度

実環境試料で得られた画像を用いて、菌数の計測を行う画像処理機能の最終調整を行った。その結果、実装した画像処理機能にて、目視カウントと同等の検出精度を達成した。（【4-1】）また、簡易版インターフェースの開発、多言語対応を行うことでエンドユーザー向けのソフトを開発した。

（【4-2】）



開発したソフト画像

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

◇特許出願 1件

・細菌検出装置 特願 2017-113993

◇論文/外部発表等

2016年度

The 16th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2016)

Detection of Escherichia Coli Using a V-trench Biosensor

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan

Yusuke Takahara, Hiroki Ashiba, Masato Yasuura, and Makoto Fujimaki

◇展示会出展

2016年度

JASIS (Japan Analytical and Scientific Instruments Show) 2016

V溝バイオセンサー

2017年度

InterOpto 2017 (2017年10月4日から6日)

表面プラズモン共鳴を用いたバクテリア検出装置

InterAqua2018 (2018年2月14日から16日)

表面プラズモン共鳴を用いたバクテリア検出装置

3-2 研究開発後の課題・事業化展開

本研究開発の成果であるバクテリア検出装置およびセンサチップセットを川下企業の商品化計画に従いカスタム対応し、事業展開していく。

ソフトウェアは㈱想画からライセンス契約により㈱シバサキが供給を受ける。装置およびチップセットは㈱シバサキが製造し、ソフトウェアをパッケージングして、川下企業へ販売していく予定。将来的には、成長著しいアジア地域もターゲットとする。

2019年には、販売を開始し、2020年には装置：200台の販売台数を見込み、売上げとして、1億円を目標とする。