

(Ⅲ) 分相法ポーラスガラスーバイオメディカル材料としての応用ー

株式会社 奥村坩堝製造所 研究室 主任 池端 潤一
代表取締役社長 多田 嘉宏

連絡先：okumurarutubo@okumurarutubo.co.jp

株式会社 ミカサナノテクノ 代表取締役社長 長澤 浩 (理学博士)

連絡先：http://www.mikasa.co.jp/nano/index.html

機能性材料としての、分相法ポーラスガラスは細孔の制御性や制御範囲、細孔構造等の特徴を生かして、他の分離基材と異なり、独特の特性を発揮できる。

1934年に基本特許が出願され十分なアプリケーションを見つけれないまま1960年代以降、長い低迷期にあった分相法ポーラスガラスに関し、1979年にあった大きな技術突破(イノベーション)について、前回総括してみたが、今回は、このポーラスガラス特性が、キラーアプリとして、大いに発揮された領域、バイオ素材としての、

- (1)核酸合成担体素材
- (2)プローブ・オン・キャリア型DNAチップ
- (3)バイオコントロール素材として、バクテリア直接顕微法素材について、報告する。

1、バイオテクノロジー

現代技術の進展は、時におおいに人を驚かせる。

筆者が少年であったとき、鉄腕アトムで未来として語られたものが、現実にも目の前にあり、あるいはそれを超える技術進歩を見せつけられたとき、あたかも人類は何でもできる「神」の領域に足を踏み入れたような錯覚すら覚える。

しかしながら時に現実を見せつけられ、実はいまだに未開時代と同じレベルの技術しかない事実に驚愕する。特に目前に瀕死の身内がおり、何の手立てもなく死にゆく状況を見たとき、医療・バイオはどこまでの進展があり、どこまでの可能性があるのか、自分たちの子孫はどのような生命活動が送れるようになるのかを考えることがある。

古代より人の命を救う医療は洋の東西を問わず大いに検討されて来ており、古代ローマで用いられてい

た外科道具は、今の外科道具と変わらず当時の知識を総動員したものであったと考えてもおかしくない。薬に関しても漢方をはじめ経験則から得られたにしても、現在でもその薬効が認められているモノも数多い。しかしながら近代医療は、薬の生理化学的機構の解明が証明される事により飛躍的に進歩した。その一例が石炭酸による消毒であり、染料由来の抗菌剤や駆梅剤のサンバルサン、アスピリンなど必ずしも100%の証明でなくとも科学的エビデンスのハッキリした薬や治療法の発展により、祈禱師・呪い師の段階からの離陸が出来、その一つの到達点がペニシリンを始めとする抗生物質にあると考えられる。(サルバルサンは、1910年前後にドイツ人のパウル・エーリヒと日本人の秦佐八郎により発明された合成物質による世界最初の化学療法剤です。結核菌の北里柴三郎、アドレナリンの高峰譲吉、アメリカではアメリカ人エイベルの発明になるエピネフリンというが、この領域での日本人の活躍には目を見張るものがある。)

しかしながら現実はどうだろう。抗生物質により我々人類は病気に打ち勝ったと思われた現代だったが、現実には残念ながらわずか130種類程度しかいない病原菌にすら逆襲され、いまや耐性菌に囲まれる始末となっている。抗生物質が効かない患者においては、我々の打てる手段はナイチンゲールの時代とさほど変わらない現実がある。

我々はずっと生物の本質にまで遡る必要がある。これが1990年に始まり2003年に一応の結果を得られた「ヒトゲノムプロジェクト」の本質と違って間違いは無いだろう。

ようやく1953年にワトソンとクリックによって確認された生命活動を遺伝子の働きに求める点を医療にまで用いようとする考え方が本質的に出てきたものといえる。

その結果として、医療においてこれまで主役であった薬剤である低分子薬の限界が叫ばれたとき、新しい薬剤の可能性は抗体・核酸等の例えば、遺伝子に直接作用する高分子薬にあると考えられる。

つまり近代医療の発展は近年、抗体・核酸などメソポアに対応する高分子素材の重要性が増してきており、この領域での分子を精密に扱える素材として多孔質ガラスはバイオメディカル分野で注目を集める材料となってきた。

2、核酸合成担体素材

2.1 核酸の可能性と合成の必要性

医療分野において1998年に発見されたRNAi発見の功績より、2006年に、アンドリュー・ファイアーとクレイグ・メローはノーベル生理学・医学賞を受賞した。このRNAiの発見により、RNAなどの核酸が医薬品に利用できる可能性が示された。この技術は、我々人類が直接核酸の発現作用をコントロールできる殆ど唯一の手段であり、私は特にウイルス疾患を根本から対策が打てる手段になりうるものではないかと考えている。

エイズやインフルエンザがそうであるように、人類は基本的にウイルス疾患への直接手段を持っていない。抗ウイルス薬と云うものも、タミフルなどの分子標的薬のように、二次感染をブロックするか免疫を作用するのであり、ウイルスそのものを攻撃する作用は核酸を用いる方法が最も有利であると考えられる。

また、近年実用化されてきた高分子薬として一歩リードした感の有る抗体医薬は、細胞培養等により作られることもあり、生物製剤として副作用管理であるとか品質管理面でハードルが高く、且つ細胞培養等のコストが高く極めて高価な薬となっている。

一方、核酸医薬は核酸類が完全化学合成できるため、アメリカFDAが分類を生物製剤ではなく化学合成品としていることで分かるように医薬品としてのハードルは抗体と比べて低く、コストと供給力の両面

で有利であり近い将来大きなマーケットを占めると考えている。

2.2 合成用担体

生体ではヌクレオチド、アミノ酸、単糖といった分子が結合した生体高分子がさまざまな機能を果たしている。したがって、バイオメディカル分野ではこれら分子を精密に化学合成することが必要となっており、その手法として固定化された担体上で分子を組み立て作成する、固相合成法が主力の一つとなっている。これら生体高分子は、その分子の大きさが概ねメソポア領域に属しており、メソポア領域の多孔体が合成に適している。多孔質ガラスは、これらバイオ分子の合成時に固相担体として用いられる。

特に核酸合成の主流は現在この固相合成法であり、担体として主にハイクロスリンクポリスチレン (PS) と言われる樹脂多孔体や CPG と呼ばれる従来型多孔質ガラス担体が用いられている。現状での核酸合成の主なマーケットは DNA 増幅用の各種プライマー用であり、長くても 20 塩基長程度で 1 回の合成量も大きなものではない。このような核酸合成を行う場合、ハイクロスリンクポリスチレンと CPG に大きな合成精度の差異はなく重量あたりの合成量が高く、かつ量産性が確立されたハイクロスリンクポリスチレンが市場で優位を占めている。

しかしながらわれわれの高度に制御された多孔質ガラス担体は PS に比べ核酸合成の精度と歩留まりが高いことが示されている。これはわれわれが開発した多孔質ガラス担体は細孔の径と形状が厳密にコントロールされており、反応場が均一であるためと考えられる。実際、同じ細孔径の多孔質ガラス担体と PS を用いて従来法で 120 塩基という長鎖の核酸合成を行ったところ、われわれの多孔質ガラス担体では約 10 倍の収量が得られた (図 3・4)。

核酸合成用多孔質ガラスの特性

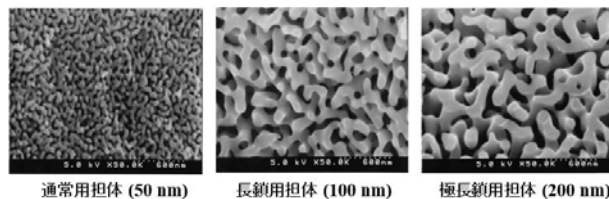


図-1 各種多孔質ガラスの SEM 写真

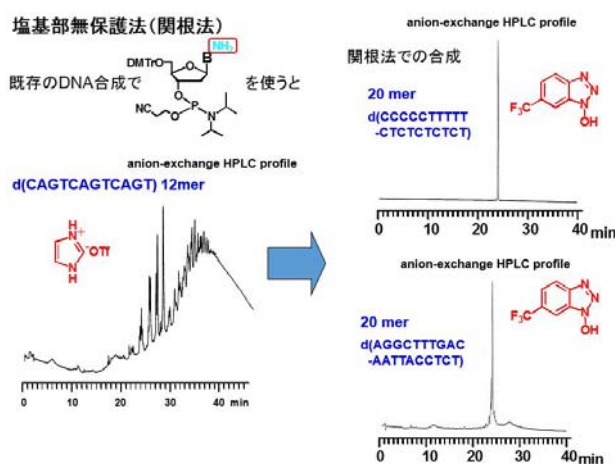


図-2 塩基部無保護法核酸合成における担体効果 (左: 従来担体、右: PG)

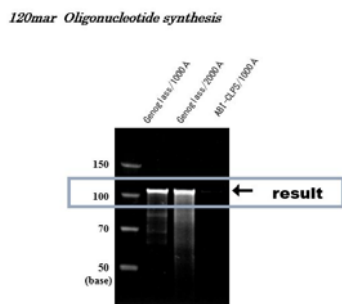


図-3 長鎖 DNA 合成効果

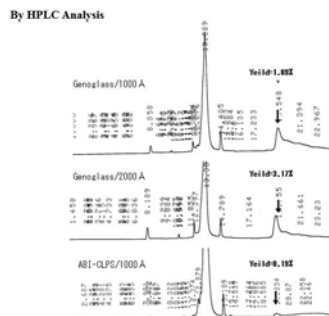


図-4 収率比較

細孔径がさらに大きい多孔質ガラス担体ではより多くの収量が得られただけでなく、副産物も少なかった。このように、われわれが開発した多孔質ガラス担体は、PS より合成効率が高くすぐれた特性を有することが実証された。

RNAi (RNA interference の略、日本語で RNA 干渉ともいう) により、医薬品として特に注目されている RNA 合成においては、DNA 合成と比べより立体障害の発生が起り易く、合成効率の差は大きくなることも報告されており、例えば 40 塩基程度の RNA 合成において従来法では歩留まりが 3% 以下であったものが 15% 程度に上昇したとの報告もある。

ただし、多孔質ガラス担体のグラムあたりロード量に関して、いくつか認識しておくべき点がある。それは PS 担体と多孔質ガラス担体の比重の違いである。すなわち PS は概ね真比重 0.9 程度であるのに対し、多孔質ガラス担体は真比重 2.1 である。したがって、同じ気孔率でも重量あたりの表面積 (ロード量) は 43% になる。そのため見かけ上重量あたりの合成量は多孔質ガラス担体にくらべ PS が高くなる。しかしながら、実際の合成シーンを考えたとき合成カラムに入る量は「体積」なので、もし PS と多孔質ガラス担体と同じ細孔構造で同じ表面積あたりのロード構造なら、実際に得られる製品はカップリング効率だけの差になる。つまり、同じ合成システムを用いた場合、実際に得られる核酸の量は多孔質ガラス担体の方が有利であるケースが多いのに、重量あたりの収量で計算すると誤る事になる。

ただし、多孔質ガラス担体の大きな利点は大量合成にある。それは、今後核酸医薬の本格化が行われた場合、PS には根本的な欠点があると考えられているからである。その欠点とは大量合成時の樹脂の膨張・収縮である。核酸合成は、カラムに充填した担体上に連続して各種合成薬品を流し反応を行う。この際、必要な反応のため異なる溶媒を切りかえながら流す。溶媒が替わることで樹脂担体は膨張と収縮を繰り返す、その体積は 30% 近く膨張する場合がある。現状のプライマー合成程度の少量の合成で、合成カラムが小さいときは問題にならないが、大量合成時には担体の膨張・収縮が起こればカラム通液に支障が起るとともに、合成収率の大幅な下落が発生することが予想される。一方、多孔質ガラス担体はほとんど膨張・収縮しないためこの欠点をもたず、さらに合成効率が低いという利点をもつことから今後の大量合成時の主力担体として期待されている。

以上のようなすぐれた特性から、多孔質ガラスは核酸合成以外にもさまざまなバイオ分子の化学合成用担体として期待されている。すでに多孔質ガラスにさまざまな官能基を導入する技術は確立しており、たとえば各種のペプチド・タンパク等のさまざまな分子の合成用担体として利用することが可能である。今後、さまざまな生体由来分子を合成するニーズが高まると考えられることから、多孔質ガラスの合成用担体としての利用は増加するものと思われる。

3 プローブオンキャリア型 DNA チップ

3.1 遺伝子型測定の必要性

従来、医薬品開発は多数の候補から各段階を経て薬効を検討し、副作用を検討して一つの薬が完成する。数百の候補の中から 1 点が最終的には薬となっており、製薬メーカーは数千人の研究者を抱えて、リード化合物を検討して振るい落とし薬に仕上げていく。一人の研究者が、年間 1 件のリード化合物を提案したとして 1000 人の研究者では 1000 件の候補があり、一人の成功が残りの研究員の人件費をまかない且つ利益を生む構造となっていた。

ところが抗がん剤であるイレッサ訴訟、あるいは抗ウイルス剤であるソリブジン問題など、薬の副作用問題は医療事故の中で大きな問題となっており、副作用検討のため、現在の薬の成功率は 1/30000 程度ま

で下がったと聞いている。

残念ながら、100%効く薬も 100%安全な薬も存在しない。アスピリンですら 70%程度の人にしか効かない。特に抗がん剤は、残念ながら100%安全な薬は無く、もし全ての抗がん剤に100%の副作用が無いことを要求したら使える薬はなくなるだろう。例えばイリノテカン、10%の人は余命 5 ヶ月の人が完治すると言われている。しかし、残りの 90%の人は、苦しむだけで治らず、その中でも 9%程度の人は副作用で亡くなると言われている。

世の中にはすぐ二日酔いになる人もおり、お酒が全く飲めない人もいる。これらの人にとって

「百薬の長」の酒は、急性アルコールで毒そのものである。これらは個人が持っている体質、つまり遺伝によることが判っている。

したがって、予めその人の遺伝情報を測定して処方を決めればよいことになる。これをファーマコジェノミクス (Pharmacogenomics、PGx) と云い、イリノテカンの場合、アメリカの FDA は、投与前の遺伝情報の検査を行うことを要求している。

3.2 プローブオンキャリア型 DNA チップ

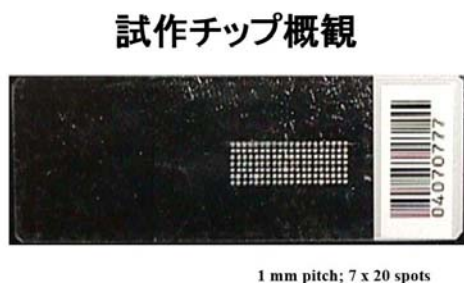


図-6 試作チップ

る。しかし、高度な技術と設備が必要である、官能基付加のコストが高い、合成プローブの精度が低いなど様々な問題を抱えている。また、上記の製法はいずれも Oxford Gene Technology 社が保有する、サザンパテントと言われる基本特許に抵触するため、たとえば Affymetrix 社が 170 億円以上の特許料を支払ったような問題も発生する。

我々は多孔質ガラスの利点をいかし固相合成した核酸を担体のまま基板に固定化すれば、固相合成した核酸鎖を切断・遊離することなくプローブとして利用できると考えた。具体的には、高度に細孔径の均一化を計った微小多孔質ガラスを合成用の固相担体として用いて核酸プローブを合成し、これを担体ごとスライドガラス等に高密度に配列固定する方法である (図 5・6)。この方法は固定化用官能基を導入する必要がなく、簡便で設計の自由度が高い DNA チップの作成が可能となるだけでなく、従来の特許にも抵

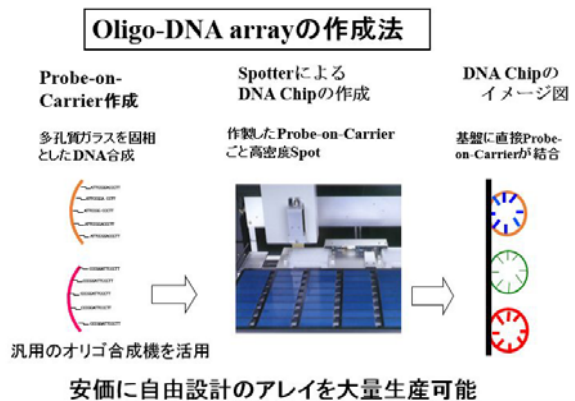


図-5 POC型DNAチップ作成概念

遺伝型測定には各種の方法が提案されている。

その中で大型装置を必要とせず迅速な分析が出来る方法として、一枚の基板に多種の相補型遺伝子を貼り付けることにより測定を行う DNA チップ/マイクロアレイ法は、大きな可能性を持つ手法である。

DNA チップ/マイクロアレイの製法としては Affymetrix 社等の光リソグラフィ法 11) Agilent Technology 社の Ink-jet 技術を利用した in situ 合成法 12) 合成したオリゴヌクレオチドに官能基を付加後スライドガラス等にカップリング固定する方法 13) が実用化されている。

触しないユニークなものであり、すでに米国特許、日本特許等で基本的な構造特許を取得している 7) 10) 14) 15)。

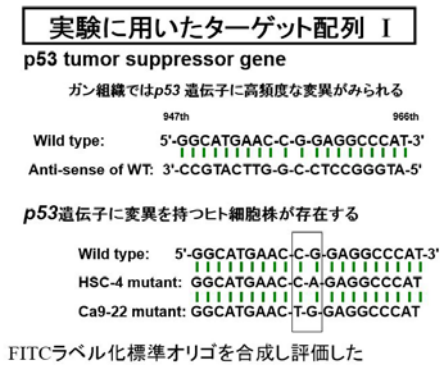


図-7 モデル評価対象

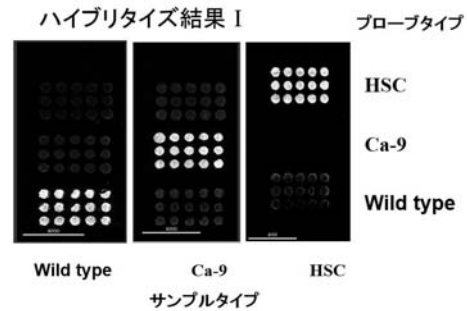


図-8 評価結果
 (明瞭に認識されている)

我々は、野生型と2種類の変異型センス配列をもつプローブオンキャリア(担体)を合成・固定して作成したプローブオンキャリア型 DNA チップで遺伝子変異解析が可能か否かを検証する実験を行った。DNA チップに野生型と変異型、計3種の蛍光標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを滴下して反応させ、洗浄後に残存した蛍光を観察したところ、各プローブオンキャリアは完全にマッチした蛍光標識オリゴヌクレオチドと強く結合し、わずか1塩基でも異なる場合には蛍光はほとんど観察されなかった(図6)。同様に細胞由来試料を用いた評価も行ったところ、p53 遺伝子に変異をもつ細胞株から調製した試料は対応するプローブオンキャリアにもっとも強く結合した。

プローブオンキャリア型 DNA チップは、その製法や品質管理が容易であることなどから、従来法に比べて1/50以下のコストでDNAチップの作成可能と試算され、数千種の遺伝子を判定可能なチップが1,000円程度で供給可能となる。また、先に述べたように、多孔質ガラスは核酸合成効率がきわめて高く、長鎖プローブの合成も容易であるため、遺伝子型と発現量を同時に解析するなど、さまざまな利用法が可能となる。さらに、プローブオンキャリアは非常に安定で、合成したプローブを前もってストックしたライブラリを準備すればDNAチップの用時調製も可能である。たとえば新型インフルエンザの流行時などに社会的要請にこたえて、必要なDNAチップを供給することが可能となる。このようにプローブオンキャリア法は臨床診断用のDNAチップ作製法として有望な方法であり、これまでにない信頼性と設計の自由度、格段の低価格化を可能にする次世代型DNAチップである。

United States Patent
 Nagasawa et al. (10) Patent No.: US 6,897,021 B2
 (45) Date of Patent: May 24, 2005

(54) REACTIVE PROBE CHIP, COMPOSITE SUBSTRATE AND METHOD FOR FABRICATION OF THE SAME

(75) Inventors: Hiroshi Nagasawa, Osaka (JP); Akira Fukunaga, Kanagawa-ken (JP); Masayoshi Hirose, Kanagawa-ken (JP)

(73) Assignee: Ehara Corporation, Tokyo (JP)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 204 days.

(21) Appl. No.: 09/826,778
 (22) Filed: Mar. 30, 2001
 (65) Prior Publication Data: US 2001/009072 A1 Nov. 8, 2001
 (30) Foreign Application Priority Data: Mar. 30, 2000 (JP) 2000-094829; Sep. 27, 2000 (JP) 2000-294862; Sep. 27, 2000 (JP) 2000-294863

(57) ABSTRACT
 A reaction probe chip which is prepared by loading a reactive probe on fine pieces of carrier such as particles, tile-like plates and then arraying and immobilizing the reactive probe-loaded carrier on a base material. The carrier fine pieces such as particles, tile-like plates and the like are porous or have a reactive surface, and the base material is preferably a thin inorganic plate or a thin organic plate is disclosed.

図-9 US パテント

4. バイオコントロール

4.1 2050 年問題

2050 年は人類にとって大きな節目の年となる。

この時に地球上では3つの大きな不足が生じると言われている。

1 つ目は石油である。但し、これはアメリカにおけるシェールガスの開発により若干延命が図られるかもしれないが、その可採埋蔵量から見ると 2050 年ごろには石油枯渇の可能性はある。

2 つ目は食料である。人口と食糧生産能が破綻に瀕する時期となる。

そして人類にとって最大の問題、第 3 の危機は抜本的な水の不足である。有る意味食糧の危機は水不足から招来する。

そして水不足は、2013 年の現時点でも世界の多くの地域で発生している。今ここにある危機でもある。

4.2 水利用の問題点

地球上に有る水のうち我々が利用可能な真水は 0.8% しかない。(97% は海水、淡水のうち 70% は南極氷など利用不可能) 水の無い大地は我々にとって利用が出来ないし、水不足で滅びた文明都市は数知れない。

水不足を解消する手法として各種水源を利用しており、清浄な水源はほぼ使い尽くされている。水の問題は例えばヨーロッパにおいてライン川は水源から海に注がれるまで、繰り返し 10 回以上利用されている計算だと聞いたことがある。イギリスでお茶の風習が定着したのは、ロンドンにおいて優良な水が無くテムズ川のややもすれば汚水に近い川水を飲料水として利用する必要から生まれたものであるとも聞いている。

アジアにおいて中国の水不足は良く知られているが、シンガポールにおいては、それを解消する手段として汚水を浄化して、最終的には飲料水にまでして利用している (ニューウォーターと言うらしい)

日本においては優れた水源が多いのであまり気にする人は多くないが、実際には日本においても水の不足は起こりうることである。

水の汚れは、1 泥等の濁り、2 有害物 (例えば砒素) も重要だが、飲料水として利用する場合は細菌のコントロールは特に重要になる。

4.3 バイオコントロール

飲料水や食品あるいは環境において、有害微生物の存在は直接我々の健康を脅かす。そのため、微生物検査により安全が担保されなければならない。

しかしながら実際に微生物の存在を観察、同定することはなかなか難しい。現在、実際に行われている微生物検査は公定法としてコロニー法が中心であり、この方法は以下の矛盾点を含んでいる。

1、増えない細菌は存在しない・・・と言う矛盾。

実際に培養可能な菌は環境中に存在する菌のうち限られた種類になるので、通常の培地では増殖しない菌が多数である。コロニーを作らない菌は存在しない、と言う前提で検査が行われていると言わざるを得ない。

2、巨大な増え方である

培地で増殖する菌は、たとえば人一人が一日で東京ドーム一杯になるようなスケールで増殖することが期待されている。この条件に合わない菌はたとえ増殖しても存在しない事になる。

3、出荷後の検査結果になる。

食品を製造することを考えると、公定法では 7 日間の培養が必要である。半公定法のマイクロコロニー法でも 24 時間乃至 48 時間の培養が必要である。検査時間を入れても、検査後安全性が確認されたものを

出荷するのでは、生産後 7 日程度経ったものしか出荷できない。当然生鮮食品は腐っている。

つまり、今の我々は「7 日前に食べた**は O-157 に汚染されていましたよ。」という話になる。

4、菌の種類がわからない

コロニー法の場合コロニーの形状から菌種は特定できるが、迅速な汚染検査法である ATP 法では生命活動付随の ATP の存在を確認する方法である。

菌汚染か検査対象物、例えば肉類から出た体液中の ATP かは判らない。

汚染の有無を調べることはできるが細菌汚染はわからない。

これらの問題点から、近年、微生物（細菌）の迅速検査法(RMM: Rapid Microbiological Method)が提唱されている。

代表的な RMM には以下の二つが挙げられており、以下の特徴を持つ。

1、マイクロコロニー法

- ①生菌数検査を現行法の 7 日から 2 日以内(最短約 6 時間)に短縮
- ②現行法と同様に増殖する細菌だけを検出する

2、直検法 (蛍光活性染色法)

このうち直検法 (蛍光活性染色法)は最も可能性の高い手法であり、以下の方法で行われる。

- 1.サンプリング「ニュークリポア」と言われるポリカーボネートに 0.2 ミクロンの穴を開けた一種のメンブレンフィルターにサンプルをトラップ
- 2.これを、各種染色剤で染色
- 3.蛍光顕微鏡で観察・測定

この手法の利点は、以下の通り

- 1、この方法では遺伝子レベルで染め分けられるため、特定遺伝子を染色することにより菌種が特定できる。
- 2、増殖をさせずに測定するので、増殖しない菌を測定可能になる。
- 3、最短 30 分で検査結果が得られる。

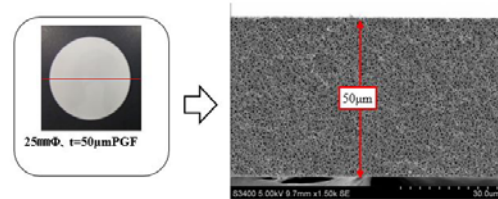
現状の菌の計測は、今後この直検法が一つの標準になる可能性は高い。(既に日本薬局方に登載済み) 但し、この直検法にも、

- ・菌をトラップする「ニュークリポア」自体の扱いにくさ、
 - ・若干とはいえ自家蛍光を持つこと、
 - ・滅菌の難しさ
- などの問題点がある。

そこで我々は、細孔径 0.2 ミクロンのポーラスガラスを用いて微生物を高効率にトラップすることができるフィルター状の多孔質ガラスを開発した。

この多孔質ガラスフィルターは充分に素材を吟味することで、紫外線励起に対し無蛍光の多孔性フィル

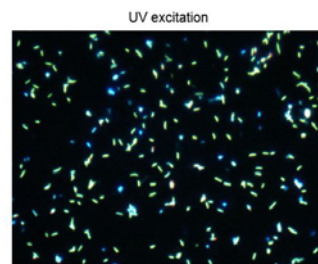
Porous Glass Membrane filter (PGF)



No fluorescence

図-10 直接顕微鏡用 PG フィルター

Bacterial cells in natural mineral water



Bacterial cells were stained with DAPI (1 µg/mL)
filtration: 40mL

図-11 細菌像 (蛍光染色)

ターが作成でき、これと、遺伝子染色等さまざまな微生物を蛍光観察する方法が確立しているため、これを利用して微生物を1個ずつ観察するなど、高感度に検出できるシステムが構築できる。

5 未来に向けて

本稿では、主に多孔質ガラスのバイオメディカル材料として、主に細孔径効果を用いるものを取り上げたが細孔径以外にも、非特異吸着性や細孔構造特異性などの特性から、本稿で論じた用途以外にもさまざまな利用が考えられる。たとえば、微生物や酵素の固定化用担体としてバイオリアクターとしての利用も検討されている。細孔径をかえることで流速を変化できるため、各反応の律速段階にあわせてバイオリアクターを設計できる。

特に、ポーラスガラスは感熱滅菌が容易であったり過酸化水素などによる滅菌も可能などの特徴があるばかりではなく、生体親和性が高いなど特にバイオ材料としての優位性は高いものと考えられる。

尚、今回は私の手がけたポーラスガラスにおいて未来材料としての応用である

- 1、PG 法シングルウォールカーボンナノチューブ合成
- 2、ケミカルセンサー

についての話と、第一回のセシウム吸着剤の話のその後、ガラス固化の話を書きたい。

Acknowledgement

本稿後半は以前、長澤と北陸先端科学技術大学院大学 塚原 俊文教授との共著原稿を基にしている。

核酸合成は、東京工業大学・生命理工学部・関根 光雄教授との共同研究成果である。

プローブ・オン・キャリアは、北陸先端科学技術大学院大学 塚原 俊文教授との共同研究成果であり、JST：ミレニアムプロジェクト採択テーマとして助成された成果である。

また、この直検法 RMM は、大阪大学薬学部・那須 正夫教授との共同研究成果である。

各位に厚く謝する。

[文 献]

- 1) H.P. Hood, M.E. Nordberg: USP 216744 (1938) .
- 2) 江口清久：ポーラスガラスの利用、日本金属学会会報, 23 (12) , 989 (1984) .
- 3) 江口清久：多孔質ガラスの作り方、使い方、表面, 25 (3) , 184 (1987) .
- 4) H. Tanaka, T. Yazawa, K. Eguchi, H.Nagasawa, N. Matuda, T. Einishi: Journal of Non-Crystalline Solids, 65, 301 (1984) .
- 5) H. Nagasawa, Y. Matumoto, N. Oi, S.Yokoyama, T. Yazawa, H. Tanaka, K.Eguchi: Analytical science, 7 (Suppl) , 181(1991) .
- 6) 長澤浩, 古屋弘幸, 松本米蔵, 梅原一宏, 大井尚文：多孔質ガラスを用いた HPLC 用ラインフィルターの

Number of bacteria in mineral water on market

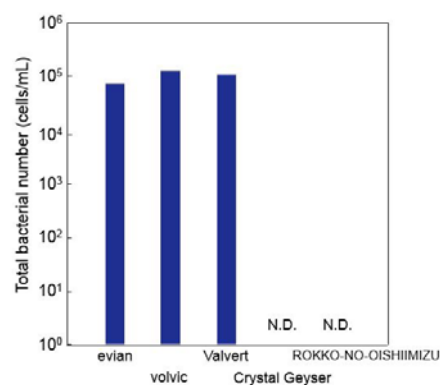


図-1 2 直接顕微法による各種ミネラルウォーター中の細菌量（無害菌）

- 開発—PG—ガードフィルターの特性,分離科学関連研究懇談会連合発表会講演要旨集, 119 (1993) .
- 7) T. Tsukahara, H. Nagasawa: Sci. Techno. Adv. Materials, 5, 359 (2004) .
 - 8) Y. Aoki, S. Suzuki, S. Okubo, H. Kataura, H. Nagasawa, Y. Achiba: Chemistry Letters, 34 (4) , 562 (2005) .
 - 9) T. Yamaguchi, T. Amamiya, T. Ohmori, Y. Morikawa, T. Kusumi, H. Nagasawa: Macromol. Symp., 160, 131 (2000) .
 - 10) T. Tsukahara, H. Nagasawa, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, H. Suzuki: Malaysia—Japan International Symposium on Advanced Technology 2007, Nov. 13-15; Kuala Lumpur, Malaysia.
 - 11) G. H. Mc G a l l , A. D. B a r o n e , M. Diggelmann, S.P.A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo: J. Am. Chem. Soc., 119, 5081 (1997) .
 - 12) E. LeProust, H. Zhang, P. Yu, X. Zhou, X. Gao: Nucl. Acids Res., 29, 2171 (2001) .
 - 13) T. Okamoto, T. Suzuki, N. Yamamoto: Nat. Biotechnol., 18, 438 (2000) .
 - 14) USP6,897,021 Reactive probe chip, composite substrate and method for fabrication of the same
 - 15) 特許 4110221 : 反応検出チップ及びその作製方法.