

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4213004号
(P4213004)

(45) 発行日 平成21年1月21日(2009.1.21)

(24) 登録日 平成20年11月7日(2008.11.7)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 21/76	(2006.01)	GO 1 N	21/76
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00

A

請求項の数 7 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-339512 (P2003-339512)	(73) 特許権者	501273886
(22) 出願日	平成15年9月30日 (2003.9.30)		独立行政法人国立環境研究所
(65) 公開番号	特開2004-191356 (P2004-191356A)		茨城県つくば市小野川16-2
(43) 公開日	平成16年7月8日 (2004.7.8)	(73) 特許権者	503351744
審査請求日	平成18年8月30日 (2006.8.30)		山田 正人
(31) 優先権主張番号	特願2002-341764 (P2002-341764)		千葉県柏市新柏1-18 新柏住宅5-4
(32) 優先日	平成14年11月26日 (2002.11.26)		07
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(73) 特許権者	503352361
			井上 雄三
			東京都北区浮間2丁目16番11-805
		(73) 特許権者	503352372
			毛利 紫乃
			茨城県つくば市稲荷前24番10号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有害物質検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子損傷性物質によりDNAが損傷を受けたときに発現されるSOS遺伝子と、その下流に配置されたルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子と、そのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含んでなる組換え遺伝子により形質転換された遺伝子損傷性物質検出用微生物を、該微生物が漏出せず、かつ少なくとも試料水、栄養成分及び酸素が透過できるポアサイズと親水性を有する微孔性膜と、該微生物からの発光を透過できる光透過性膜との間に薄膜状に固定化した遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と、

ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子により形質転換された生育阻害物質検出用微生物を、前記微孔性膜と前記光透過性膜との間に薄膜状に固定化した生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、

それぞれ試料水に接触させて、前記各固定化微生物膜の発光状態を測定することにより、試料水中の有害物質を検出することを特徴とする有害物質検出方法。

【請求項2】

前記各固定化微生物膜の発光状態を光検出器で連続的に測定し、前記試料水中の有害物質を連続的にモニタリングする、請求項1に記載の有害物質検出方法。

【請求項3】

前記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び前記生育阻害物質検出用固定化微生物

10

20

膜を、前記試料水に接触させる前に培地中で加温する、請求項 1 又は 2 に記載の有害物質検出方法。

【請求項 4】

前記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び前記生育阻害物質検出用固定化微生物膜を 35 ~ 40 の培地中で 3 ~ 4 時間加温する、請求項 3 に記載の有害物質検出方法。

【請求項 5】

前記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び前記生育阻害物質検出用固定化微生物膜は、凍結保存されたものである、請求項 3 又は 4 に記載の有害物質検出方法。

【請求項 6】

前記遺伝子損傷性物質検出用微生物として、プラスミド pSK1002 由来の umuD_C 遺伝子の下流に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibriofischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用い、

10

前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターに、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一つに記載の有害物質検出方法。

【請求項 7】

前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクター pBR322 のテトラサイクリン耐性遺伝子の O R F 内に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いる、請求項 6 に記載の有害物質検出方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水中の有害物質の検出方法に関し、例えば、上下水道の各処理プロセスの処理水、河川及び湖沼等の環境水、廃棄物埋立最終処分場の浸出水、工業排水等に含まれる有害物質を検出するのに好適な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

環境中には 6 ~ 10 万種もの人為的に合成された化学物質や、トリハロメタン等の消毒副生成物、ダイオキシン等の燃焼副生成物といった非意図的生成物質、更には環境中での変化体等の数多くの化学物質が存在しており、これらの化学物質の中には、急性毒性、発ガン性、変異原性等を有する有害物質が数多くある。

30

【0003】

通常、環境水中における上記のような化学物質の濃度は、ごく微量であると考えられるが、このような環境水を水道原水とする浄水場においては、人体への影響の観点からより高度な水質の連続監視が求められている。

【0004】

また、下水処理場、廃棄物最終処分場、化学薬品を使用する工場等から排出される廃水には様々な化学物質が含まれているが、最終的には河川等の環境中に排出されるため、通常、オゾン処理や生物処理、活性炭処理等により、安全基準値以下にまで化学物質を分解あるいは除去してから放流されている。そのため、廃水処理プロセスが適切に稼働し、水中の有害物質が除去されているかどうかを監視する必要がある。

40

【0005】

従来より、水中の有害物質を監視する手段として、魚類の活動電位又は異常行動を監視する方法や、硝化細菌を利用した急性毒物モニタ等の有害物質検出方法が知られている。

【0006】

また、発ガン性物質の一次選別法として、例えば、umu テストや SOS クロモテスト等の微生物を用いた遺伝子損傷性試験法が知られているが、操作が煩雑である、検出感度が低い、高価な発色試薬が必要である等の問題があり、環境水等に含まれる有害物質を検出する方法としてはあまり実用的であるとは言えなかった。

50

【 0 0 0 7 】

そのため、下記特許文献 1 には、DNA の損傷に対して感受性の SOS 遺伝子の下流に、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子を配置した組換え遺伝子により形質転換された微生物を利用して、遺伝子損傷性物質を検出する方法が開示されている。

【 0 0 0 8 】

また、下記特許文献 2 には、導入口を有する測定槽と、導入口に接続され、導入口に被測定液を導入する導入管と、導入管に接続され、導入管内に第 1 鉄含有溶液を導入する試薬配管と、測定槽内に、導入管から導入口を経て測定槽内に導入される被測定液の流れ方向に沿って設けられた、鉄バクテリアを保持する微生物膜と、微生物膜に接続された電極装置と、を備えたことを特徴とする異常水質検出装置が開示されている。

10

【 0 0 0 9 】

また、下記特許文献 3 には、絶縁材からなる基板と、前記基板の片面上に互いに接触しないように固定された 2 つの導体と、前記 2 つの導体の一方の導体上に固着された微生物菌体を含む薄膜と、を備えた微生物センサが開示されている。

【特許文献 1】特許第 3 2 7 7 4 2 6 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 0 - 3 2 1 2 3 3 号公報

【特許文献 3】特開平 8 - 2 2 6 9 1 0 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【 0 0 1 0 】

しかしながら、魚類の活動電位又は異常行動を監視する方法や、硝化細菌を利用した急性毒物モニタ等の有害物質検出方法では、急性毒性物質の検出や連続的なモニタリングには有効であるが、発ガン性、変異原性等を有する有害物質（本発明では、このような有害物質を遺伝子損傷性物質という。）の蓄積による発ガン性、遺伝毒性、慢性毒性まで評価することができなかった。

【 0 0 1 1 】

また、umu テストや SOS クロモテスト等は、操作が煩雑である、検出感度が低い、高価な発色試薬が必要であるなどの問題があり、環境水等に含まれる有害物質を検出する方法としてはあまり実用的であるとは言えなかった。

30

【 0 0 1 2 】

一方、特許文献 1 が開示された方法によれば、上記の方法に比べて、比較的簡便、かつ迅速に遺伝子損傷性物質を検出することができるが、試験操作において微生物の培養や分注、希釈等を行う必要があるため、下水処理場等からの処理水放流地点や有害物質混入地点等の現場での遺伝子損傷性物質の検出や連続的なモニタリングに適していなかった。

【 0 0 1 3 】

また、前記形質転換された微生物は遺伝子損傷性物質が存在する場合に発光するが、微生物に対して生育阻害作用を示し、発光反応を阻害するような有害物質、例えば呼吸阻害物質等（本発明では、このような有害物質を生育阻害物質という。）が共存すると該微生物の代謝が低下して発光しない場合もあるため、試料水の異常を見逃してしまう恐れもあった。

40

【 0 0 1 4 】

従って、本発明の目的は、水中に含まれる遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を正確、迅速かつ簡便に検出することができ、更には、連続的なモニタリングも可能な有害物質検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 5 】

上記目的を達成するため、本発明の有害物質検出方法は、遺伝子損傷性物質により DNA が損傷を受けたときに発現される SOS 遺伝子と、その下流に配置されたルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子と、そのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現

50

する遺伝子とを含んでなる組換え遺伝子により形質転換された遺伝子損傷性物質検出用微生物を、該微生物が漏出せず、かつ少なくとも試料水、栄養成分及び酸素が透過できるポアサイズと親水性を有する微孔性膜と、該微生物からの発光を透過できる光透過性膜との間に薄膜状に固定化した遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子と、そのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子により形質転換された生育阻害物質検出用微生物を、前記微孔性膜と前記光透過性膜との間に薄膜状に固定化した生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、それぞれ試料水に接触させて、前記各固定化微生物膜の発光状態を測定することにより、試料水中の有害物質を検出することを特徴とする。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の有害物質検出方法によれば、遺伝子損傷性物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜と、生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、それぞれ試料水に接触させて、各固定化微生物膜の微生物の発光状態を測定することにより、前記遺伝子損傷性物質検出用微生物は、試料水中の遺伝子損傷性物質によって微生物のDNAが損傷を受けると、SOS応答と共にルシフェラーゼ及びその基質が合成されて発光し、前記生育阻害物質検出用微生物は、試料水中の生育阻害物質によって、その代謝活性が低下すると、ルシフェラーゼ活性が低下して発光が弱くなる（あるいは消光する）。すなわち、試料水中に有害物質が含まれず正常な場合は、生育阻害物質検出用微生物のみが発光し、遺伝子損傷性物質が混入したときは、遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物の両方が発光し、生育阻害物質が混入したときは、遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物の両方が消光するため、試料水中に含まれる遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を正確、迅速かつ簡便に検出することができる。

20

【 0 0 1 7 】

本発明においては、前記各固定化微生物膜の発光状態を光検出器で連続的に測定し、試料水中の有害物質を連続的にモニタリングすることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

これによれば、河川や湖沼等の環境水や工場廃水等における有害物質を連続的にモニタリングできるので、より高度な水質管理を行うことができる。

【 0 0 1 9 】

また、前記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び前記生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、前記試料水に接触させる前に培地中で加温することが好ましい。

30

【 0 0 2 0 】

これによれば、前記各固定化微生物膜内の微生物の活性を速やかに上昇させることができるので、保存等により活性の低下した固定化微生物膜の復元を効率よく行うことができ、固定化微生物膜を交換した際などに、安定した出力を短時間で得ることができ、迅速に試料水中の有害物質を検出することができる。

【 0 0 2 1 】

更に、前記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び前記生育阻害物質検出用固定化微生物膜を35～40の培地中で3～4時間加温することが好ましい。

40

【 0 0 2 2 】

これによれば、保存などにより活性が低下した前記各固定化微生物膜内の微生物を効率よく活性化することができる。

【 0 0 2 3 】

更にまた、前記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び前記生育阻害物質検出用固定化微生物膜は、凍結保存されたものであることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

これによれば、凍結保存によって極度に低下した前記各固定化微生物膜内の微生物の活性を速やかに上昇させることができる。

【 0 0 2 5 】

50

更にまた、前記遺伝子損傷性物質検出用微生物として、プラスミドpSK1002由来のumuD, C遺伝子の下流に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用い、前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターに、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いることが好ましい。

【0026】

更にまた、前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターpBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子のORF内に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いることが

10

【0027】

これらによれば、遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物を簡単に作成することができる。

【発明の効果】

【0028】

以上説明したように本発明によれば、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と、生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、それぞれ試料水に接触させて、各固定化微生物膜の微生物の発光状態を測定することにより、試料水中の有害物質を正確、迅速かつ簡便に検出することができる。また、前記各固定化微生物膜を、試料水に接触させる前に培地中で加温することにより、前記各固定化微生物膜内の微生物の活性を速やかに上昇させることができる。その結果、凍結保存等により活性の低下した前記固定化微生物膜の復元を効率よく行うことができ、固定化微生物膜を交換した際などに安定した出力を短時間で得ることができるので、より迅速に試料水中の有害物質を検出することができる。

20

【0029】

更に、上記各固定化微生物膜の発光状態を光検出器で連続的に測定することにより、試料水中の有害物質の連続的なモニタリングが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本発明で用いられる遺伝子損傷性物質検出用微生物は、DNAの損傷に対して感受性のSOS遺伝子の下流に、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子を配置した組換え遺伝子により形質転換されているので、遺伝子損傷性物質により該微生物のDNAが損傷を受けると、SOS遺伝子の発現と同時にルシフェラーゼ活性を有する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子も発現される。その結果、ルシフェラーゼ活性の基質が菌体内で連続的に供給される条件が達成され、ルシフェラーゼによる連続的な発光反応が起こるので、この発光を測定することにより、遺伝子損傷性物質、例えば、4-ニトロキノリン-N-オキサイド、2-アミノアントラセン、ベンゾ(a)ピレン、1-ニトロピレン、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド等を検出、測定することができる。

30

40

【0031】

すなわち、本発明で用いられる遺伝子損傷性物質検出用微生物においては、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子をDNAの損傷に依存して発現させるための発現制御手段としてSOS遺伝子を利用するものである。従って、SOS遺伝子はDNA損傷時に発現されるものであればよく、SOSボックスと称する制御部分を含有するものであればよい。なお、本発明においてDNA損傷時に発現されるSOS遺伝子とは、前記SOSボックスと称される制御部分を含有するものを意味し、SOSボックス自体でもよく、またこれを含有する任意のDNA断片であってもよい。

【0032】

50

S O S 遺伝子としては、umu遺伝子、例えばumuD遺伝子及びumuC遺伝子、並びにsfiA遺伝子等が例示できるがこれらに限定されない。例えば、umuD、umuC遺伝子は、Pro. Natl. Acad. Sci. USA Vol.82, 4336-4340 (1985)に記載されており、その記載に基いて容易に入手することができる。本発明においては、umuD遺伝子並びにumuC遺伝子の一部とlacZ遺伝子との融合遺伝子を、プラスミドベクターpBR322に導入したプラスミドpSK1002由来のS O S 遺伝子が好ましく用いられる。プラスミドpSK1002は、H. Shinagawaら、Gene, 23, 167 (1983)に記載されており、その記載に基いて容易に入手することができる。

【 0 0 3 3 】

一方、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子としては、S O S 遺伝子の制御下でその両遺伝子群が発現されるものであればよく、特に限定されないが、例えば、海洋細菌の生物発光遺伝子群を用いることができる。上記性質を有する生物発光遺伝子群を持つ海洋細菌としては、ビブリオ (*Vibrio*) 群のビブリオ (*Vibrio*) 属では、ビブリオ・ハーベイ (*V. harveyi*)、ビブリオ・フィシェリ (*V. fischeri*)、ビブリオ・スプレンドイドゥス (*V. splendidus*)、ビブリオ・コレラ (*V. cholerae*) 等が挙げられる。また、フォトバクテリウム (*Photobacterium*) 属では、フォトバクテリウム・ホスホリウム (*P. phosphoreum*)、フォトバクテリウム・レイノクナシ (*P. leiognathi*) 等が挙げられる。本発明においては、ビブリオ・フィシェリ (*V. fischeri*) 由来の生物発光遺伝子群 (luxA,B,C,D,E) が好ましく用いられる。このビブリオ・フィシェリ (*V. fischeri*) 由来の生物発光遺伝子群は、リポーター遺伝子として使い易くするために、生物発光遺伝子群のオペレーター領域を取り除き、構造遺伝子部分 (ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子群及びその基質であるアルデヒドの生産を触媒する酵素である脂肪酸リダクターゼ活性を発現する遺伝子群) だけを含む種々のカセットベクター、例えば、pUCD320, pUCD613, pUCD614, pUCD618, pUCD620, pUCD623, pUCD1111等が報告されている。これらのカセットベクターについては、Clarence I. Kadoら、Plant Molecular Biology Reporter, 5, 225 (1987)に記載されており、これらのベクターから生物発光遺伝子群の構造遺伝子部分を容易に入手することができる。

【 0 0 3 4 】

なお、本発明において、ルシフェラーゼ活性の基質とは長鎖アルデヒド等を意味し、これらの生産を触媒する酵素とは、N A D (P) H - F M N 還元酵素、脂肪酸リダクターゼ等を意味する。なお、上記ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素の遺伝子は同一の起源のものを用いてもよく、異なる起源のこれらの遺伝子を連結して用いてもよい。

【 0 0 3 5 】

S O S 遺伝子と、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含んでなる組換え遺伝子は、S O S 遺伝子のS O S ボックスを少なくとも含有するDNA断片の該S O S ボックスより下流に、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子群を連結することにより作製することができる。この連結は、DNAリガーゼを用いて常法に従って行うことができる。また、この組換え遺伝子を宿主微生物に導入するためには、上記組換え遺伝子はベクター中に存在する必要があるが、例えば、プラスミドベクターとして、pBR系プラスミド、pUC系プラスミド等を利用することができる。

【 0 0 3 6 】

宿主微生物としては、該微生物のDNAが遺伝子損傷性物質により損傷された際にS O S 遺伝子が発現させることができる微生物、すなわちS O S 機能を有する微生物であれば特に制限されないが、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。本発明においては、TA1535株、TA1538株等のサルモネラ菌が好ましく用いられる。

【 0 0 3 7 】

発現ベクターにより宿主微生物を形質転換する方法は、例えば細菌の形質転換に用いら

10

20

30

40

50

れる常法に従って該組換え遺伝子を含む発現ベクターを宿主微生物に導入すればよい。

【0038】

次に、本発明で用いられる生育阻害物質検出用微生物について説明する。本発明で用いられる生育阻害物質検出用微生物は、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子により形質転換されているので、通常の状態ではルシフェラーゼによる連続的な発光反応が起こっている。従って、生育阻害物質によって、該微生物の代謝活性が低下すると、ルシフェラーゼによる発光反応が低下するので、この発光状態を測定することにより、生育阻害物質、例えば、シアン化カリウム、フェノール、2, 4 - ジクロロフェノール、塩化水銀等を検出、測定することができる。

10

【0039】

すなわち、本発明で用いられる生育阻害物質検出用微生物においては、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子は、これらの遺伝子が常時発現するような発現制御手段の下に配置されている。このような発現制御手段としては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の微生物内でタンパク質を発現させるために用いられる種々の発現ベクターを用いることができ、例えば、プラスミドベクターとして、pBR系プラスミド、pUC系プラスミド等を利用することができる。本発明においては、プラスミドベクターpBR322が好ましく用いられる。プラスミドベクターpBR322は、例えばタカラバイオ株式会社、東洋紡株式会社等から入手することができる。

20

【0040】

また、上記ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子は、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物で説明したものと同様のものが用いられる。

【0041】

ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子は、常法に従って上記のような発現ベクターのクローニングサイトに、上記ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺

30

【0042】

このようにして作製された組換え発現ベクターは、常法に従って、宿主微生物に導入すればよい。なお、宿主微生物としては、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物で説明したものと同様のものが用いられ、TA1535株、TA1538株等のサルモネラ菌が好ましく用いられる。

【0043】

本発明の有害物質検出方法においては、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物は、これらの微生物が漏出せず、かつ少なくとも試料水中の溶解化学物質、栄養成分及び酸素が透過できるポアサイズと親水性を有する微孔性膜と、該微生物からの発光を透過できる光透過性膜との間に薄膜状に固定化して、固定化微生物膜として用いられる。

40

【0044】

図1には、固定化微生物膜の一例が示されている。この固定化微生物膜5は、微孔性膜2と光透過性膜3がドーナツ状の両面テープ4によって張り合わされたものであり、その中心部には、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物又は生育阻害物質検出用微生物1が薄膜状に固定化されている。

【0045】

上記微孔性膜としては、ポアサイズ0.2~0.4 μmのセルロース、ニトロセルロー

50

ス、ポリカーボネート等の材質からなる膜を用いることができ、その厚さは、通常、厚さ10 μ m程度のものが用いられる。

【0046】

また、上記光透過性膜としては、ポリエチレン、塩化ビニル等の材質からなり、厚さが30~100 μ mである透明又はそれに近い膜が用いられる。

【0047】

このような固定化微生物膜は、例えば以下のようにして作製することができる。すなわち、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物又は生育阻害物質検出用微生物を常法に従って培養し、得られた培養液を遠心して上澄み液を除去した後、1%アルギン酸ナトリウム水溶液を適量加えて懸濁し、菌体懸濁液を得る。

【0048】

微孔性膜2の中心部に、上記菌体懸濁液を滴下して、余剰のアルギン酸ナトリウム水溶液を吸引除去した後、更に塩化カルシウム水溶液(30g/L)を適量滴下して、余剰の塩化カルシウム水溶液を吸引除去し、菌体を固定化した面を内側にして、ドーナツ状の両面テープ4を介して光透過性膜3と張り合わせる。

【0049】

そして、最後に塩化カルシウム水溶液(30g/L)に浸漬し、アルギン酸ナトリウムを完全にゲル化させて菌体を固定化することにより、固定化微生物膜を作製することができる。

【0050】

このようにして作製した遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜は、使用するときまで、保存液(TGA培地85%、グリセロール15%)に浸漬し、-20で凍結保存すればよい。

【0051】

次に、本発明の有害物質検出方法について説明する。

本発明の有害物質検出方法は、上記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、試料水に接触させて、各固定化微生物膜の発光状態を測定することにより、試料水中の有害物質を検出するものであり、これらの固定化微生物膜を試料水に接触させる方法は特に制限されない。

【0052】

本発明においては、上記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、試料水に接触させる前に培地中で加温することが好ましく、特に上記のように凍結保存した固定化微生物膜を解凍して使用する際に培地中で加温することが好ましい。

【0053】

前記培地としては、例えば、TGA培地(バクトトリプトン1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.2%、アンピシリンナトリウム20 μ g/mL)等を用いることができる。

【0054】

また、上記各固定化微生物膜を加温する条件は、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度の範囲であればよく、例えば、サルモネラ菌、大腸菌、酵母の場合、20~40、好ましくは35~40で、1~6時間、好ましくは3~4時間加温すればよい。温度が低過ぎると微生物を十分に活性化することができず、高過ぎると逆に微生物の活性を損ないやすい。

【0055】

上記のようにして活性化した各固定化微生物膜を試料水に接触させる方法は特に制限されず、例えば、試料水に、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜を一定時間浸漬した後、これらの固定化微生物膜を取り出し、その発光状態を測定(バッチ方式)してもよく、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜と光検出器を利用したバイオセンサ(連続フロー系)を用

10

20

30

40

50

いてもよい。

【0056】

固定化微生物膜の発光状態を検出、測定する方法としては、例えば、光電子倍增管、高感度CCDカメラ、インスタントフィルム等が挙げられる。

【0057】

なお、固定化微生物膜と試料水を接触させる際には、固定化微生物膜の微生物の活性を維持すると共に、該微生物が消費する酸素量が律速になり発光量が低下するのを防ぐために、試料水中に栄養成分及び酸素を供給することが好ましい。上記栄養成分としては、例えば、TGA培地等を用いることができる。栄養成分の添加量は、通常、試料水中に、上記培地が10(v/v)%以上となるように添加すればよく、酸素の供給は、攪拌、エアポンプ等の適当な手段により試料水中に空気を送り込めばよい。

10

【0058】

例えば、バッチ方式で有害物質を検出する場合は、試料水に、TGA培地等の培地成分を添加し、これに遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜を浸漬して、35~40で所定時間(通常、3~6時間)静置又は緩やかに攪拌した後、これらの固定化微生物膜を取り出し、発光状態を測定すればよい。

【0059】

また、連続フロー系で有害物質を検出する場合は、例えば、図2に示すような遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサを備えた有害物質モニタリング装置を用いることができる。

20

【0060】

この有害物質モニタリング装置10は、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と該固定化微生物膜の発光状態を測定するための光検出器とからなる遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ11と、生育阻害物質検出用固定化微生物膜と該固定化微生物膜の発光状態を測定するための光検出器とからなる生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12と、これらのバイオセンサに試料水を供給するための手段(送液ポンプ14)と、前記固定化微生物膜に酸素を供給するための手段(エアポンプ15)と、前記発光検出型バイオセンサからの出力を増幅する手段(アンプ16)と、その出力データを表示する手段(コンピュータ17)とから構成されている。なお、アンプ16は、後述する光検出器30の電源も兼ねている。

30

【0061】

そして、前記バイオセンサ11、12は、外界からの光を遮断すると共に、固定化微生物膜の微生物の活性を維持するために、所定の温度(通常、20~30)に調整された恒温器13の中に設置されている。また、図示しない手段により固定化微生物膜の微生物の活性を維持するための栄養成分を試料水中に連続的に添加できるようになっている。

【0062】

そして、図3には、前記遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ11の断面の模式図が示されている。なお、バイオセンサ11と12は、固定化微生物膜が異なるだけで基本的な構造は同じであるので、以下の説明においては、バイオセンサ11について説明する。

40

【0063】

遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ11は、フローセル上部11aとフローセル下部11bとからなるフローセル内に、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜5aと光検出器30とを有している。

【0064】

前記固定化微生物膜5aは、微孔性膜側を上にして固定化微生物膜支持用ガラス板22上に載置され、これらは2個のリング23によって挟み込まれた状態で、該固定化微生物膜5aの微孔性膜が試料水の流路に面するように、フローセル下部11b内に収納されている。そして、前記フローセル上部11aを前記フローセル下部11bに装着することにより、2個のリング23によって前記固定化微生物膜5a及び固定化微生物膜支持用

50

ガラス板 2 2 がフローセル内に固定されるようになっている。

【 0 0 6 5 】

また、前記フローセル上部 1 1 a の前記フローセル下部 1 1 b と接する側の面には、底面に貫通孔 2 1 a、2 1 b を有する凹部 2 1 c が形成されており、前記フローセル上部 1 1 a を前記フローセル下部 1 1 b に装着した際に、前記凹部 2 1 c の開口部が前記固定化微生物膜 5 a によって塞がれてシールされ、試料水の流路 (2 1 a、2 1 c、2 1 b) が形成されるようになっている。

【 0 0 6 6 】

一方、フローセル内の固定化微生物膜支持用ガラス板 2 2 側には光検出器 3 0 が設置されており、前記固定化微生物膜 5 a の光透過性膜及び前記固定化微生物膜支持用ガラス板 2 2 越しに前記固定化微生物膜 5 a の発光量を検出し、電圧値等として出力できるようになっている。なお、前記光検出器としては、例えば、光電子増倍管、高感度 C C D カメラ等を用いることができる。

10

【 0 0 6 7 】

この有害物質モニタリング装置 1 0 によれば、図示しない手段により固定化微生物膜の微生物の活性を維持するための栄養成分が添加された試料水は、エアポンプ 1 5 により空気を送り込まれながら、送液ポンプ 1 4 によって各バイオセンサ 1 1、1 2 に送液され、各バイオセンサ内の固定化微生物膜と接触した後、排出される。そして、各バイオセンサの発光状態は光検出器 3 0 によって電圧値等として出力され、コンピュータ 1 7 に表示されるので、連続フロー系での有害物質の検出が可能となる。

20

【実施例】

【 0 0 6 8 】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【 0 0 6 9 】

実施例 1 遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物の作製

(1) 遺伝子損傷性物質検出用微生物

上記特許文献 1 (特許第 3 2 7 7 4 2 6 号) に記載された方法により、遺伝子損傷性物質検出用微生物を作製した。

【 0 0 7 0 】

すなわち、S O S 遺伝子として、大腸菌 (CSH26 「 Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972 」 : F- ara del (lac-pro) thi) に導入されたプラスミド pSK1002 の umuD, C 遺伝子を利用した。

30

【 0 0 7 1 】

また、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子としては、大腸菌 (HB101 : hsd20 (rB -, mB -), recA 13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44) に導入されたプラスミド pUCD620 (Clarence I. Kadoら、Plant Molecular Biology Reporter, 5, 225 (1987)) の発光遺伝子群を利用した。

【 0 0 7 2 】

導入する微生物として、サルモネラ菌 (TA1535 「 Ames, B. N., J. McCann, E. Yamasaki, Mutation Res., 31, 347, 1975 」 : hisG46, gal, chl, bio, uvrB, rfa-, SJ 10002 : r-, m+) を利用した。

40

【 0 0 7 3 】

(i) S O S 遺伝子の調製

プラスミド pSK1002 を含む大腸菌 (CSH26) を、アンピシリンを含む L B 培地 (Bacto トリプトン 1 %、Bacto 酵母エキス 0 . 5 %、N a C l 1 %) で培養し、アルカリ抽出法 「 Birnboim, H. C., Doly, J., Nucl. Acids Res., 11, 1513, 1979 」 によって、pSK1002 を大量に調製した。このプラスミド pSK1002 を SalI 及び SmaI で切断し、umuD, C 遺伝子を含む約 7 . 5 k b の SalI - SmaI D N A 断片を得、この D N A 断片を、T 4 D N A リガーゼにより連結し、常法に従い大腸菌 (DH5) を形質転換した。

50

【 0 0 7 4 】

得られた形質転換体からアルカリ抽出法によりプラスミドを単離し、このプラスミドを MluI で切断後、T4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端化した。

【 0 0 7 5 】

一方、umuC に対して終止コドンとして働き、かつ BamHI サイトを持つ配列番号 1 に示す DNA リンカーを化学合成した。

【 0 0 7 6 】

そして、上記 DNA リンカーと、前記 MluI DNA 断片を T4 DNA リガーゼにより連結し、常法に従い大腸菌 (DH5) を形質転換した。得られた形質転換体からアルカリ抽出法によりプラスミドを抽出し、このプラスミドを BamHI 及び SalI で切断して、umuD_C 遺伝子を含む約 7.4 kb の BamHI - SalI DNA 断片を得た。

10

【 0 0 7 7 】

(i i) 発光遺伝子群の調製

プラスミド pUCD620 を含む大腸菌 (HB101) を、アンピシリンを含む LB 培地で培養後、アルカリ抽出法によって pUCD620 を大量に調製した。プラスミド pUCD620 を BamHI 及び SalI で切断し、発光遺伝子群を含む約 7.5 kb の BamHI - SalI DNA 断片を得た。

【 0 0 7 8 】

(i i i) SOS 遺伝子と発光遺伝子群との連結及び発光ベクターのクローニング

上記発光遺伝子群を含む BamHI - SalI DNA 断片 (約 7.5 kb) と、前記 umuD_C 遺伝子を含む BamHI - SalI DNA 断片 (約 7.4 kb) を T4 DNA リガーゼにより連結し、発光ベクター (pTL210) を構築した。

20

【 0 0 7 9 】

大腸菌 (SJ10002) を LB 培地で一夜培養し、LB 培地に、1/100 容量の前記培養液を加え、600 nm における濁度 (OD₆₀₀) が約 0.4 になるまで培養した。

【 0 0 8 0 】

この培養液 5 ml を遠心分離し、沈澱画分を 5 ml の 30 mM CaCl₂ 水溶液に懸濁し、45 分間水中に放置した後、再度遠心分離を行い、菌体を 0.4 ml の 30 mM CaCl₂ 水溶液に懸濁し、大腸菌 (SJ10002) のコンピテントセルを調製した。

【 0 0 8 1 】

大腸菌 (SJ10002) のコンピテントセル 100 μl に、前記発光ベクター (pTL210) 約 200 ng を加え、30 分間水中に放置した。42 °C で 2 分間処理した後、室温にて 5 分間放置した。LB 培地 1 ml を加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。この液をアンピシリン 50 μg/ml を含む LB プレートに播種して得られた SJ10002 の形質転換体から、前記発光ベクター (pTL210) をアルカリ抽出法で調製した。

30

【 0 0 8 2 】

(i v) 形質転換体の調製

サルモネラ菌 (TA1535) を LB 培地で一夜培養し、LB 培地に、1/100 容量の前記培養液を加え、OD₆₀₀ が約 0.4 になるまで培養した。この培養液 5 ml を遠心分離し、沈澱画分を 5 ml の 10 mM CaCl₂、10 mM MnCl₂、10 mM MgCl₂ 水溶液に懸濁し、45 分間水中に放置した後、再度遠心分離を行い、菌体を 0.4 ml の 10 mM CaCl₂、10 mM MnCl₂、10 mM MgCl₂ 水溶液に懸濁し、サルモネラ菌 (TA1535) のコンピテントセルを調製した。

40

【 0 0 8 3 】

そして、前記と同様の方法で、サルモネラ菌 (TA1535) に前記発光ベクター (pTL210) を導入し、形質転換体 (遺伝子損傷性物質検出用微生物) を得た。

【 0 0 8 4 】

(2) 生育阻害物質検出用微生物

プラスミド pBR322 (株式会社ニッポンジーン製) を、BamHI 及び SalI (いずれの切断部位もテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 内にある) で切断し、アンピシリン耐性遺伝子を含む約 4.1 kb の DNA 断片を得た。

50

【 0 0 8 5 】

このDNA断片と、上記(1)(ii)で調製した発光遺伝子群を含む約7.5 kbのBamHI - SalI DNA断片とをT4 DNAリガーゼにより連結し、発光ベクター(pTL210ctI)を構築した。

【 0 0 8 6 】

この発光ベクター(pTL210ctI)を上記(1)と同様の方法で大腸菌(SJ10002)に導入して形質転換体を得、この形質転換体からアルカリ抽出法によって、発光ベクター(pTL210ctI)を調製した。

【 0 0 8 7 】

そして、上記(1)と同様の方法で、サルモネラ菌(TA1535)に発光ベクター(pTL210ctI)を導入し、形質転換体(生育阻害物質検出用微生物)を得た。

10

【 0 0 8 8 】

(3) 固定化微生物膜の作製

- 80 で凍結保存した上記(1)で得られた遺伝子損傷性物質検出用微生物を解凍し、TGA培地に1/1000容量植菌し、30 で一晚、旋回振とう培養を行い、この培養液を新しいTGA培地に1/50容量植菌して、さらに30 で1.5時間、旋回振とう培養を行い、濁度(OD₆₀₀)を測定し、OD₆₀₀ = 0.1になるようにTGA培地で希釈して、固定化微生物膜作成用培養液を調製した。

【 0 0 8 9 】

この固定化微生物膜作成用培養液1 mL(菌体数約 2.5×10^7 個)を用いて常法に従って遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜を作製した。なお、微孔性膜として、商品名「メンブレンフィルター・セルロース混合エステル」(ミリポア社製)、光透過性膜として、商品名「LDPEローデンポリ」(大倉工業株式会社製)を用いた。

20

【 0 0 9 0 】

また、上記(2)で得られた生育阻害物質検出用微生物を用いた以外は上記と同様にして生育阻害物質検出用固定化微生物膜を作製した。

【 0 0 9 1 】

なお、作製したこれらの固定化微生物膜は、使用するときまで保存液(TGA培地85%、グリセロール15%)に浸漬し、-20 で凍結保存した。

【 0 0 9 2 】

(4) バッチ式での有害物質検出

上記(3)で作製して凍結保存していた遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜、及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜を解凍してTGA培地に浸漬した。このTGA培地に、遺伝子損傷性物質又は生育阻害物質を添加して、30 で一定時間穏やかに攪拌を行い、各固定化微生物膜の発光状態を高感度CCDカメラ(商品名「ルミノイメージアナライザLAS-1000」、富士フィルム社製)で撮影した。

30

【 0 0 9 3 】

具体的には、遺伝子損傷性物質として、4-ニトロキノリン-N-オキサイド(4NQO)を0.3 mg/Lとなるように添加し、30 で6時間穏やかに攪拌を行った後、固定化微生物の発光状態を撮影した。

40

【 0 0 9 4 】

また、生育阻害物質として、シアン化カリウムをシアン化物イオン(CN)濃度で30 mg/Lになるように添加した後、30 で3時間穏やかに攪拌を行った後、固定化微生物の発光状態を撮影した。なお、対照として、いずれの有害物質も添加せずに同様の実験を行った。これらの結果を図4に示す。

【 0 0 9 5 】

図4から、無暴露(有害物質無添加)の場合、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜は発光せず、生育阻害物質検出用固定化微生物膜は発光していることが分かる。一方、4NQOを添加した場合、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜も発光し、両方の固定化微生物膜が発光していることが分かる。また、シアン化カリウムを添加した場合、生育阻

50

害物質検出用固定化微生物膜の発光が低下していることが分かる。

【0096】

この結果から、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と生育阻害物質検出用固定化微生物膜の発光状態を測定することにより、試料水中に含まれる遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を正確、迅速かつ簡便に検出することができることが分かる。

【0097】

実施例2

上記(3)で作製して凍結保存していた遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜を解凍してTGA培地の入った容器に浸漬し、37℃で3時間静置した後、遺伝子損傷性物質である4-ニトロキノリン-N-オキサイド(4NQO)を0.3mg/Lの濃度になるように添加し、30℃に設定した恒温器内で穏やかに攪拌し、一定時間ごとに固定化微生物膜の発光を、高感度CCDカメラ(商品名「ルミノイメージアナライザLAS-1000」、富士フィルム社製)で撮影し、画像処理ソフトを用いて発光強度を数値化した(試験区)。また、対照区として、解凍直後の遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜を、同様に4NQOを添加したTGA培地に浸漬して、30℃に設定した恒温器内で穏やかに攪拌し、発光強度を測定した。それらの結果を図5に示す。

10

【0098】

図5から、試験区においては、4NQOに暴露してから遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜が発光、すなわち4NQOが検出されるまでの時間が約2時間となり、対照区に比べて約1/4に短縮されていることが分かる。また、最大発光強度で比較すると、試験区では対照区の約5倍になっており、より正確に遺伝子損傷性物質を検出できることが分かる。

20

【0099】

実施例3 連続フロー系での有害物質検出

(1) 遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサを用いた試料水中の遺伝子損傷性物質の検出

遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜を用い、図3に示す構造を有する発光検出型バイオセンサ(遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ)を用いて、遺伝子損傷性物質(4NQO)の検出を行った。具体的には、バイオセンサの試料水流路に、4NQOを0.1mg/Lとなるように添加した試料水(10%TGA培地)を120分間連続的に流した後、10%TGA培地に置換し、センサ出力をモニタリングした。その結果を図6に示す。

30

【0100】

図6から、測定開始から約180分後以降(4NQO暴露した後、約60分後)から、発光反応が起こり、センサ出力が上昇していることが分かる。すなわち、遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサにより、遺伝子損傷性物質を検出でき、かつ連続的なモニタリングが可能であることが分かる。

【0101】

(2) 生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサを用いた試料水中の生育阻害物質の検出

40

図3に示す構造を有する生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサ(生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ)を用いて、生育阻害物質(シアン化カリウム)の検出を行った。具体的には、バイオセンサの試料水流路に、シアン化カリウムをシアン化物イオン(CN⁻)濃度で10mg/Lになるように添加した試料水(10%TGA培地)を15分間連続的に流した後、10%TGA培地に置換し、センサ出力をモニタリングした。また、シアン化物イオン(CN⁻)濃度を3mg/L、1mg/Lに変えて、同様にセンサ出力をモニタリングした。その結果を図7に示す。

【0102】

図7から、シアン化カリウムを添加することにより、添加濃度依存的に発光が低下し、センサ出力が低下していることが分かる。すなわち、生育阻害物質検出用発光検出型バイ

50

オセンサにより、生育阻害物質を検出でき、かつ連続的なモニタリングが可能であることが分かる。

【0103】

これらの結果から、図2に示すような遺伝子損傷性物質検出用微生物を利用した発光検出型バイオセンサと、生育阻害物質検出用微生物を利用した発光検出型バイオセンサを並列で用いた有害物質モニタリング装置により、各発光検出型バイオセンサの発光の有無をモニタリングすることによって、試料水中に含まれる有害物質の連続的なモニタリングが可能であることが分かる。

【配列表フリーテキスト】

【0104】

配列番号1：umu Cに対して終始コドンとして働き、かつBamHI サイトを持つDNAリナー

【産業上の利用可能性】

【0105】

本発明によれば、例えば、上下水道の各処理プロセスの処理水、河川及び湖沼等の環境水、廃棄物埋立最終処分場の浸出水、工業排水等に含まれる有害物質を検出するのに好適な方法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】本発明における固定化微生物膜の一例を示す概略構成図である。

【図2】遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサを備えた有害物質モニタリング装置の概略構成図である。

【図3】遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサの断面模式図である。

【図4】バッチ式で有害物質（4NQO、シアン化カリウム）の検出を行った結果を示す図である。

【図5】バッチ式で遺伝子損傷性物質（4NQO）を検出する際に、凍結保存した遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜をTGA培地中で加温してから用いた結果を示す図である。

【図6】遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサを用いて遺伝子損傷性物質（4NQO）の検出を行った結果を示す図である。

【図7】生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサを用いて生育阻害物質（シアン化カリウム）の検出を行った結果を示す図である。

【符号の説明】

【0107】

- 1．微生物
- 2．微孔性膜
- 3．光透過性膜
- 4．両面テープ
- 5．固定化微生物膜
- 5a．遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜
- 10．有害物質モニタリング装置
- 11．遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ
- 11a．フローセル上部
- 11b．フローセル下部
- 12．生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ
- 13．恒温器
- 14．送液ポンプ
- 15．エアポンプ
- 16．アンプ兼光検出器の電源

10

20

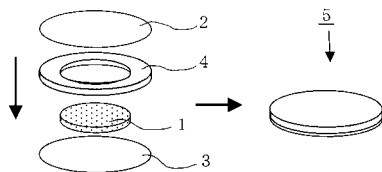
30

40

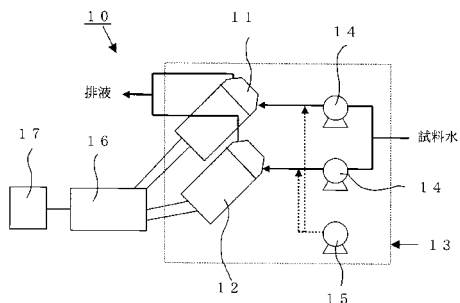
50

- 17 . コンピュータ
- 22 . 固定化微生物膜支持用ガラス板
- 23 . オリング
- 30 . 光検出器

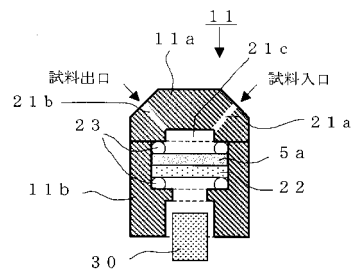
【図1】



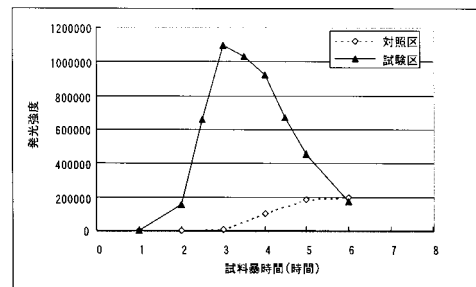
【図2】



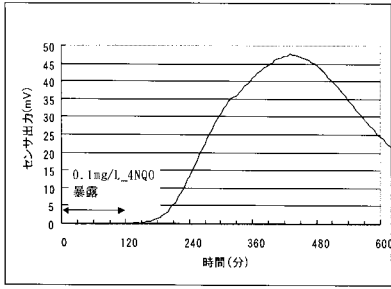
【図3】



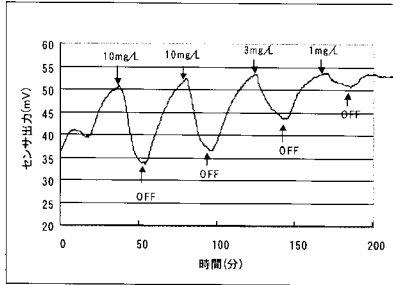
【図5】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 4 】

有害物質の検出	3時間暴露 (生育阻害物質の検出)		6時間暴露 (遺伝子損傷性物質の検出)	
	無暴露	30mg/L_ CN	無暴露	0.3mg/L_ 4NQO
遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜				
生育阻害物質検出用固定化微生物膜				

【 配列表 】

0004213004000001.app

フロントページの続き

- (73)特許権者 000003609
株式会社豊田中央研究所
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4番地の1
- (73)特許権者 507214083
メタウォーター株式会社
東京都港区虎ノ門四丁目3番1号
- (74)代理人 100086689
弁理士 松井 茂
- (72)発明者 山田 正人
千葉県柏市新柏1-18 新柏住宅5-407
- (72)発明者 井上 雄三
東京都北区浮間2丁目16番11-805
- (72)発明者 毛利 紫乃
茨城県つくば市稲荷前24番10号
- (72)発明者 平井 正名
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4番地の1 株式会社豊田中央研究所内
- (72)発明者 今枝 孝夫
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4番地の1 株式会社豊田中央研究所内
- (72)発明者 田口 和之
神奈川県川崎市川崎区田辺新田1番1号 富士電機株式会社内
- (72)発明者 田中 良春
神奈川県川崎市川崎区田辺新田1番1号 富士電機株式会社内

審査官 遠藤 孝徳

- (56)参考文献 特許第3277426(JP, B2)
特開2001-231598(JP, A)
特公平4-12118(JP, B2)
特開平8-226910(JP, A)
Soomi LEE et al., A novel microbial sensor for the determination of toxic compounds utilizing recombinant DNA and bioluminescence, Chemistry Express, 日本, 1991年, Vol. 6, No. 6, 415-418

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 21/75 - 21/83
G01N 33/18
C12Q 1/02
C12N 15/09
JSTPlus(JDreamII)