Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Vertical Micro Reactor Stack for the Detection of Biomolecules

Katsuhiro Matsui Non-member (Univ. of Hyogo)
 Syohei Morimoto Non-member (Univ. of Hyogo)
 Toshifumi Asano Non-member (Univ. of Hyogo)
 Yoshiaki Ukita Student Member (Univ. of Hyogo)
 Dai-ichiro Kato Non-member (Univ. of Hyogo)
 Masahiro Takeo Non-member (Univ. of Hyogo)
 Yuichi Utsumi Member (Univ. of Hyogo)
 Seiji Negoro Non-member (Univ. of Hyogo)

Keywords : Microreactor, Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay (ELISA), Synchrotron Radiation, Fluid Filter

Microreactors and micro total analysis system (μ TAS) are recognized as powerful tools for genomics, proteomics, clinical diagnostics, and environmental testing. In this paper, we describe enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using a new microreactor with a vertical fluid flow operation. As shown in Fig. 1., this microreactor is composed of two reaction vessels stacked on the vertical lines through PMMA fluid filters (ϕ 3mm). The fluid filters constructed by deep X-ray lithography possess 2,100 pores (ϕ 40 μ m), and have valve functions, which maintain liquid layer in each reaction vessel. In addition, the liquid can be selectively transferred by air pressure from upper vessel to lower, and *vice versa*.

As a model of ELISA using the microreactor, we planned to detect mouse immunoglobulin (IgG). We bound the goat anti-IgG antibody to the surface of the PMMA filters, and assayed the IgG by ELISA using anti-IgG antibody/ peroxidase conjugate (Fig. 2).

We found that the mouse IgG (100 ng/ml) was quantitatively detected within 45 min of analytical period, which was ca. 1/3 of the period required for the conventional method using micro titer plate (Fig. 3).

Fig. 2. Schematic illustration of the ELISA method on micro fluid filter

Fig. 3. Calibration curve of Mouse IgG

Fig. 1. (a) Outward appearance of the reactor which consist of two reservoirs. (b) Schematic illustration of fluid filter and reservoirs

積層型マイクロリアクターを用いた 酵素免疫測定法による生体物質測定系の開発

非会員 松井 勝弘* 非会員 森本 祥平*
 非会員 浅野 豪文** 学生員 浮田 芳昭**
 非会員 加藤太一郎* 非会員 武尾 正弘*
 正員 内海 裕一** 非会員 根来 誠司*

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Vertical Micro Reactor Stack for the Detection of Biomolecules

Katsuhiko Matsui*, Non-member, Syohei Morimoto*, Non-member, Toshifumi Asano**, Non-member,
 Yoshiaki Ukita**, Student Member, Dai-ichiro Kato*, Non-member, Masahiro Takeo*, Non-member,
 Yuichi Utsumi**, Member, Seiji Negoro*, Non-member

Microreactors and micro total analysis system (μ TAS) are recognized as powerful tools for genomics, proteomics, clinical diagnostics, and environmental testing. In this paper, we describe enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using a new microreactor with a vertical fluid flow operation. This microreactor is composed of two reaction vessels stacked on the vertical lines through PMMA fluid filters (ϕ 3mm). The fluid filters constructed by deep X-ray lithography possess 2,100 pores (ϕ 40 μ m), and have valve functions, which maintain liquid layer in each reaction vessel. In addition, the liquid can be selectively transferred by air pressure from upper vessel to lower, and *vice versa*. As a model of ELISA using the microreactor, we planned to detect mouse immunoglobulin (IgG). We bound the goat anti-IgG antibody to the surface of the PMMA filters, and assayed the IgG by ELISA using anti-IgG antibody/ peroxidase conjugate. We found that the mouse IgG (100 ng/ml) was quantitatively detected within 45 min of analytical period, which was ca. 1/3 of the period required for the conventional method using micro titer plate.

キーワード：マイクロリアクター，酵素免疫測定法，放射光，

Keywords : Microreactor, Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay (ELISA), Synchrotron Radiation, Fluid Filter

1. はじめに

2003 年にヒトゲノム配列の解読が完了した⁽¹⁾。得られたゲノム情報を病気の原因解明・治療・予防法の確立などに役立てるためには、個々の遺伝子産物の機能解明、発現機構に関して、膨大な解析（ポストゲノム解析）が必要である。そのためには、多数の遺伝子やタンパク質の機能を、定量的かつ迅速に評価する手法の確立が重要な課題とな

る。

近年、マイクロマシン技術を用いたマイクロリアクターや、 μ TAS (Micro Total Analysis System の略)と呼ばれるシステムの研究が注目されている⁽²⁾⁽³⁾。これらは数 cm 角程度のガラスやプラスチック等の基板上に、数十から数百 μ m 程度の流体流路を作製し、小型化されたポンプ、バルブ、センサなどを組み合わせた化学分析システムである。各要素をマイクロマシン技術によりダウンサイジングし、基板上に集積化することにより、材料原資の低減、使用試薬量の低減が可能となる。また、比界面積（反応空間内における体積辺りの反応表面積）の上昇、分子拡散距離の微小化による拡散律速の反応速度上昇などの効果が期待できる。一方、上記の微小化に伴う利点を活かして、DNA チップやプロテインチップと呼ばれるアレイ状の反応デバイスに関する研

* 兵庫県立大学大学院 工学研究科物質系工学専攻
〒671-2201 兵庫県姫路市書写2167

Graduate School of Engineering, Univ. of Hyogo,
2167 Shosya, Himeji, Hyogo 671-2201

** 兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所
〒678-1205 兵庫県赤穂郡上郡光都 3-1-2
Laboratory of Advanced Science. and Technology for Industry,
Univ. of Hyogo
3-1-2 Koto, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1205

究も盛んに行われている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

我々は、既存の水平型マイクロリアクターやマイクロアレイとは異なった概念のシステム、すなわち、垂直方向に多段の単位化学反応操作が可能な積層型マイクロリアクターの開発を行っている⁽⁶⁾⁽⁷⁾。本リアクターは、各反応槽が、放射光微細加工により作製されたマイクロ流体フィルターで区切られた構造であり、以下の特徴を有する。i) 1~数ミリメートルの各リアクター内に、高アスペクト比の微細貫通孔が1000個以上集積された空間が構築されるため、同微細空間を反応場とすることで、拡散律速反応速度の上昇が期待できる。ii) 反応液が流体フィルターを通過する際のミキシング効果により、複数成分の迅速混合が可能である。iii) 各素子を、平面上に並べて高集積化することで、多検体・多項目分析に対応しやすい。iv) システム全体の流路長が短く、低圧で送液制御が可能であることから、装置全体を小型化しやすい。

今回、酵素免疫測定法（ELISA 法）を原理とした生体関連物質測定系として、マウス免疫グロブリンを対象物質とし、積層型マイクロリアクターへの適用について検討したので、その結果を報告する。

2. 積層型マイクロリアクターの概念と概要

〈2・1〉 積層型マイクロリアクターの概念 本研究で用いた積層型マイクロリアクターの概念図を図1に示す。試作したリアクター本体はアクリル樹脂製であり、直径は約2.4 cmで反応部の直径は3 mmである。リアクターは2層に積層されており、仕切りの役目と反応槽の役目を兼ねるPMMA製の流体フィルターで各槽を仕切っている。今回評価した酵素免疫測定法にて物質を検出する際には、上槽から試薬、サンプルを注入し、流体フィルター部位で溶液を保持させ、フィルターに結合されている抗体とサンプル中の抗原を反応させる。その後、上槽部から空圧により反応溶液を排出した後、フィルターの洗浄工程を経て、発色

図1 (a)二槽構成積層型マイクロリアクターの外観 (b)流体フィルターと反応層の模式図

Fig. 1. (a) Outward appearance of the reactor which consist of two reservoirs. (b) Schematic illustration of fluid filter and reservoirs

基質を加えフィルター上に保持させた後、反応終了後の発色基質を圧力により下槽に送液する。下槽には光ファイバー分光光度計 USB2000 (Ocean Optics inc. : USA) を設置し、吸光度や蛍光強度等を測定する。このような縦方向に構築した単一反応槽を今後更に微小化し、横方向から検出することで、システム全体を立体的に配置出来るため、多検体分析や多項目分析への応用が期待できる。また、本リアクターは、各ユニットで単位反応をアレンジすることが可能である。従って、精製・分離などの機能を有するユニットの挿入もでき、より複雑な工程を含む化学合成や、生化学反応プロセスへの応用も可能である。

〈2・2〉 PMMA(poly methyl methacrylate) 製流体フィルター 将来的に、リアクターの反応槽直径を1 mm以下（現在は3 mm）に想定しているため、リアクターの作成にはマイクロ3次元加工技術を用いた。これは、X線を活用したマイクロ微細立方体デバイスの製造技術であるLIGAプロセスに高エネルギー放射光を用いたリソグラフィー技術を適用したものである。

本研究ではリアクター（反応槽）と高機能フィルターの作製を行うために、1 mm以上の深い縦方向加工が必要となる。それを可能にするのは10 KeV以上の高エネルギー放射光を用い、各単位機能槽の形状や寸法に適合したマイクロ3次元加工技術の最適化を行う必要がある。我々は、ポリイミドを支持体とし、UVフォトリソ法でX線マスクを作製した後、厚さ200 μm のPMMA板の上に設置し、上部から放射光を照射し、その後現像を行い、PMMA製流体フィルターを作製した。放射光は、兵庫県立大学・放射光施設 (NewSUBARU) のLIGA用ビームラインBL2, 11⁽⁸⁾⁽⁹⁾を使用した。完成した流体フィルターは、厚さ200 μm 、直径3 mmのPMMA製フィルターに直径40 μm の微細穴が約2,100個貫通している（図2）。放射光による加工の特徴として、よりアスペクト比の大きいフィルターの作製が可能であり、ミリオーダーの厚みを有するフィルターの加工ができることも確認している。

3. 測定原理

〈3・1〉 酵素免疫測定法（ELISA 法）の原理 酵素免

図2 PMMA製流体フィルターのSEM写真
Fig. 2. The SEM image of the micro fluid filter

図3 酵素免疫測定法 (ELISA 法) の原理
(a) サンドイッチ法の模式図, (b) 検量線形状
Fig. 3. Schematic illustration of ELISA Method

疫測定法は、ELISA 法 (Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay の略)とも呼ばれ、血中の抗体などを測定し、病気を診断する臨床検査分野⁽¹⁰⁾や、食品分野における食中毒菌の検出⁽¹¹⁾、また環境検査における環境汚染物質の検出などに広く用いられている。酵素免疫測定法は、酵素で標識された抗体 (または抗原) と、対応する抗原 (または抗体) との間で起こる抗原抗体反応を利用したものである。元来、抗原抗体反応とは、体の中に異物 (抗原) が進入した際に、体内に存在するリンパ球が、これを排除するために抗原と特異的に結合する抗体を産生し、無毒化する生体防御機構の一つである。抗原と抗体は 1 対 1 の関係で特異的に結合するので酵素免疫測定法ではこの反応を利用して目的物質を検出する。図 3 に酵素免疫測定法の概要を示す。通常、蛋白質などの分子量の大きい物質を測定する場合、反応固相表面に固定化された抗体に抗原 (被検物質) が結合し、さらに酵素標識 2 次抗体が結合しサンドイッチ状の複合体を形成させた後、抗原の結合量を標識抗体の酵素活性 (発色量) で定量する方法であり、通常、サンドイッチ ELISA 法と呼ばれる。

4. 実験方法

〈4・1〉 積層型マイクロリアクター及び PMMA 製抗体固定化処理流体フィルター準備方法 積層型マイクロリアクターは 2 槽から構成されている。リアクター本体はアクリル樹脂で作製されており、上槽と下槽の間には PDMS 製の緩衝材で挟まれた PMMA 製流体フィルターを設置するという構成になっている (図 1)。前処理として、サンプル、2

図4 流体フィルターを用いた酵素免疫測定法概要
Fig. 4. Schematic illustration of the ELISA method on micro fluid filter

次抗体の非特異的吸着を防ぐために流路に相当する部分をリアクター、PDMS (Polydimethylsiloxane) 製緩衝材共に、2% BSA 溶液 (0.1M NaCl 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解) に浸し、4℃で一晩浸漬しておいた。また、放射光を用いて作製した流体フィルターは、0.5 mg/ml (0.1 M NaCl 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解) の抗マウス IgG (Anti-Mouse IgG (Goat) : MBL 社製) に 4℃で一晩浸漬し、抗体を物理吸着によりフィルターの各微細工内壁および上下表面に固定化した (図 4)。リアクターと流体フィルターの前処理終了後、抗体固定化処理を行った流体フィルターをリアクターにセットし、洗浄液 [0.05 % Tween20 / 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)] にて流路を洗浄した。

〈4・2〉 ELISA 測定系反応操作 実際の測定操作を以下に示す。〈4・1〉節で示した手順どおり、リアクターと抗体感作済みフィルターをセットした後、空気圧により流路を乾燥させた。サンプル 50 μl を加え、37 °C 1 時間静置した。反応終了後、サンプル溶液を空気圧により下槽から排出し、その後、洗浄液 2.5 ml を加え、流路を洗浄した。酵素標識 2 次抗体 50 μl を加え、37 °C、1 時間静置した後、溶液を排出し、洗浄液 2.5ml で流路を洗浄した。基質溶液 [0.0006 % 過酸化水素水を含む、333 nM TMBZ (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 溶液 / 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.0)] を 70 μl 加え、室温暗所 20 分静置した後、1N-硫酸を 30 μl 加え、発色反応を停止させた後、溶液を下槽へ空気圧で移送し、450 nm の吸光度を光ファイバー吸光度計にて測定した。

〈4・3〉 ELISA 測定系検証実験 PMMA 製流体フィルターを使用したマイクロリアクターにて ELISA 測定系が行えるかについて検証した。PMMA 製流体フィルターに 1 次抗体を固定化した場合と、固定化しない場合の各々の条件に対し、サンプル (マウス IgG 25 ng / ml) を加えた場合、加えない場合の条件を設定し、計 4 条件でアッセイを行った (図 5)。仮に、1 次抗体がフィルター上に感作されていれば、1 次抗体を感作処理したフィルターで、サンプルを加えた場合にのみ、サンプル結合に依存した発色が期待できる。

〈4・4〉 反応固相表面とサンプル間の反応時間測定実験

抗マウス IgG 抗体固定化済み流体フィルターをセットし、流路洗浄済みのリアクターに、マウス IgG 抗体を添加した。37 °C に設定した恒温槽にリアクターを入れた。0 分から 2 時間の間で反応時間条件を変化させた後、洗浄工程を経て、酵素標識抗マウス IgG 抗体を 37 °C 1 時間反応させた。この後、発色反応を行い分光光度計にて酵素活性の定量を行った。

〈4・5〉 サンプルと酵素標識 2 次抗体間の反応時間測定実験

抗体固定化フィルターをセットしたリアクターに、50 ng/ml のマウス IgG を 50 μ l 添加し 37 °C 1 時間反応させた。洗浄工程を経て、酵素標識抗マウス IgG 抗体との反応時間を、0 分から 2 時間の間で変化させ、反応させた。さらに、発色反応を行い、分光光度計にて酵素活性の定量を行った。

〈4・6〉 検量線検討実験 抗体固定化フィルターをセットしたリアクターを 4 台準備した。マウス IgG を 0, 25, 50, 100 ng/mL に調製し、50 μ l ずつ添加し 37 °C 1 時間反応させた。反応終了後、溶液を上槽から空気圧により下槽の排出口から排出し、洗浄液を上槽から 5 mL 流し込み、下槽の排出口から排出することによりリアクターを洗浄した。上槽から空気を入れ溶液を完全に排出した後、抗マウス IgG や IgG 溶液 50 μ l を加え、フィルターが溶液に満たされるまで送液し、保持した。37 °C 1 時間静置した後、溶液を排出し、洗浄液 5 mL 流し込み、下槽の排出口から排出することによりリアクターを洗浄した。発色基質 70 μ l を加え、室温暗所 20 分静置した後、反応停止液 30 μ l を加え、反応を停止後、空気圧により反応液を下槽に送液し、光ファイバー分光光度計にて 450 nm の吸光度を測定した。

5. 実験結果及び考察

〈5・1〉 ELISA 測定系検証実験 PMMA 製流体フィルターを用いた ELISA 測定結果を図 5 に示す。1 次抗体を固定化した条件で、マウス IgG を加えなかった場合(a)、マウス IgG を加えた場合(b)の吸光度 (A_{450}) の値を比較すると、(b)は(a)と比較して明瞭なシグナル差を生じており、酵素標識 2 次抗体がマウス IgG を介して結合したことを示している。また、1 次抗体を固定化しない条件で、マウス IgG を加えなかった場合(c)、マウス IgG を加えた場合 (d) 共に、(b)と比較して明瞭なシグナル差を生ずることは無かった。これは、(b)におけるシグナルが、反応固相に結合した抗マウス IgG 抗体を固定化したことに起因することを意味する。抗マウス IgG 抗体を表面に固定化しない場合(d)では、(b)のようなシグナルを生じないことより、(b)のシグナルが、マウス IgG が反応固相表面に非特異的に結合し、更に酵素標識抗マウス IgG 抗体が結合した複合体由来でないということを示唆する。以上の結果より、1) PMMA 製流体フィルター上には抗マウス IgG 抗体が固定化されていること、2) 本マイクロリアクターを用いた ELISA 測定系により、マウス IgG の測定が可能であることが分かった。また、非特異的吸着を抑えるためのブロッキング処理条件の検討によ

図 5 ELISA 測定系検証実験原理及び結果

Fig. 5. Result of the inspection of ELISA method on fluid filter

り、バックグラウンドの低減は可能であると考えている。

〈5・2〉 フィルター表面固定化抗体と、サンプル（マウス IgG）との反応時間検討結果 マウス IgG を添加する際、マウス IgG との反応時間を 0, 5, 15, 60 分と変化させ、37 °C で反応させた。反応時間が 15 分の場合と 60 分の場合とで吸光度の値がほぼ同一となった (図 6)。これは、フィルター表面に固定化された抗体と、サンプル(マウス IgG)との反応が平衡状態に達したことを示唆するものである。96 穴マイクロタイタープレートを用いた測定系では、通常 1 時間程度の反応時間を必要とする。これは、上述で説明した反応槽の微小化による反応時間の短縮効果の結果であると考えることが出来る。以上の結果より、固相抗体とサンプルとの反応時間は 15 分までで平衡状態となり、既存の方法より反応時間が 60 分から 15 分へと 4 分の 1 に短縮されることが示唆された。今後サンプル溶液を、フィルターを介して上下にミキシングを行うなどして固相表面の抗体とサンプルの接触する確率を増やすことにより、更なる反応時

図6 1次抗体と被検物質との反応時間検討結果
Fig. 6. Time course of antigen-antibody reaction of mouse IgG with anti-mouse IgG fixed on fluid filter (the first reaction)

図7 被検物質と酵素標識2次抗体との反応時間検討結果
Fig. 7. Time course of antigen-antibody reaction of enzyme-labeled anti-mouse IgG with mouse IgG fixed on fluid filter (the second reaction)

間の短縮化を行うことは十分に期待できる。

〈5・3〉 サンプル（マウス IgG）と酵素標識 2 次抗体との反応時間検討結果 マウス IgG 50 μ l を添加し、反応終了後、洗浄を行い、酵素標識抗マウス IgG との反応時間を 15, 30, 60, 120 分と変化させた。その結果、反応時間が 30 分ではほぼ飽和状態となることが分かった（図 7）。この結果も〈5・2〉節の検討結果と同様に、サンプルと酵素標識 2 次抗体との反応が平衡に達したことを示唆するものである。また同様に 96 穴マイクロタイタープレートを用いた測定系では通常 1 時間程度の反応時間を必要とすることより、反応時間の短縮化は、サンプルと酵素標識 2 次抗体との反応においても反応槽の微小化による反応時間の短縮効果であると考えられる。酵素標識 2 次抗体の濃度を上げれば更に反応時間が短縮化されることも考えられるが、ELISA 測定系では酵素標識 2 次抗体の濃度を上げると、固相表面への非特異的な吸着が起これ、ノイズが増えるという問題を生ずる可能性があるため、更に酵素標識 2 次抗体の濃度を上げて大幅な反応時間の短縮化を行うのは困難であると考えられる。しかし、流体フィルターの上下で、溶液をミキシングすることにより、サンプルとの接触効率が高まるため、反応時間の短縮化が期待できる。

〈5・4〉 検量線検討実験 マウス IgG 濃度が 0~100 ng/ml の間で良好な検量線を引くことが出来た（図 8）。更に高濃度側、低濃度側共に、どの程度の濃度範囲まで測定できるか今後検討する必要があるが、96 穴マイクロタイタープレートを用いた HRP を標識酵素、TMBZ を発色基質として使用する ELISA 法によるマウス IgG の測定レンジが数百 ng/ml から数 ng/ml 程度であることより、図 8 に示す検量線の形状から推察すると、感度面では従来法（96 穴マイクロタイタープレートを用いた ELISA 法）と同等であると考えられる。

6. まとめ

本研究では、垂直方向に流路を形成した積層型マイクロリアクターを用いて、酵素免疫測定法（ELISA 法）を原理

図8 マウス IgG 検量線結果
Fig. 8. Calibration curve of Mouse IgG

とした抗原検出の検討を行った。本研究にて得られた知見を以下にまとめる。

- (1) 放射光を用いて微細加工を行った PMMA 製フィルターに抗体を固定化し、酵素免疫測定法によって抗原検出が可能であることを確認した。
 - (2) PMMA 製フィルターを用いた酵素免疫測定法にて抗原を測定することにより従来法と比較して総反応時間が 120 分から 45 分に短縮することが出来た。
 - (3) マウス IgG を測定する系では、従来法と比較して感度面でほぼ同等の性能を有することを確認した。
- 以上の検討結果から、本マイクロリアクターを用いて、臨床検査・環境分析分野等への幅広い応用が可能となることが期待される。

（平成 18 年 5 月 26 日受付）

文 献

- (1) J. Grimwood and J. Schmutz : "Six is Seventh", *Nature*, Vol.425, No.23 Oct, pp.775-776 (2003)
- (2) M. A. Buns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D.

- Heldsinger, C. H. Mastrangelo, and D. T. Burke : "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device", *Science*, Vol.282, pp.484-487 (1998)
- (3) T. Vilkner, D. Janasek, and A. Manz : "Micro Total Analysis Systems. Recent Developments", *Analytical Chemistry*, Vol.76, pp.3373-3386 (2004)
- (4) T. R. Golub : "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring", *Science*, Vol.286, No.5439, pp.531-537 (1999)
- (5) K. R. Kozak, M. W. Amneus, S. M. Pusey, F. Su, and M. N. Luong : "Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange Protein Chips: Potential use in diagnosis and prognosis", *Proc. of the National Academy of Sciences*, Vol.100, pp.12343-12348 (2003)
- (6) T. Asano, Y. Ukita, Y. Utsumi, K. Matsui, M. Takeo, and S. Negoro : "Vertical Micro Reactor Stack for Integrated Chemical Reaction System", *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, Vol.3, pp.190-194 (2005)
- (7) Y. Utsumi, T. Asano, Y. Ukita, K. Matsui, M. Takeo, and S. Negoro : "A New Micro-Chemical Reactor Using Fluid Filters for Vertical Fluid Flow Operation", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.44, No.7B, pp.5707-5710 (2005)
- (8) Y. Utsumi, T. Kishimoto, T. Hattori, and H. Hara : "Large-Area X-ray Lithography System for LIGA Process Operating in Wide Energy Range of Synchrotron Radiation", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.44, No.7B, pp.5500-5504 (2005)
- (9) Y. Utsumi and T. Kishimoto : "Large area and wide dimension range x-ray lithography for lithography, galvanofarming, and abforming process using energy variable synchrotron radiation", *Journal of Vacuum Science and Technology*, B 23 (6), pp.2903-2909 (2005)
- (10) H. Suzuki, K. Fukushima, M. Matsuo, N. Hashimoto, and N. Yoshihara : "Detection of HIV-1 in plasma samples using microplate hybridization after RT-PCR", *Rinsho Byori*, 1996 Dec, Vol.44 No.12, pp.1169-1174 (1996)
- (11) V. V. Padhye, T. Zhao, and M. P. Doyle : "Production and characterization of monoclonal antibodies to Verotoxins 1 and 2 from *Escherichia coli* of serotype O 157: H7", *Journal of Medical Microbiology*, Nov, Vol.30, No.3, pp.219-226 (1989)

松井 勝 弘

(非会員) 1970 年生。1994 年京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科卒業。1996 年 3 月神戸大学大学院自然科学研究科博士前期課程生物学専攻修了。同年シスメックス(株)(旧名: 東亜医用電子(株))入社。現在, 社会人博士課程学生として兵庫県立大学大学院物質系工学専攻博士後期課程に在籍中。

森 本 祥 平

(非会員) 1984 年生。2006 年 3 月姫路工業大学工学部応用化学科卒業。現在, 大阪大学大学院生命先端工学専攻博士前期課程に在籍中。

浅 野 豪 文

(非会員) 1981 年生。2006 年 3 月兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻博士前期課程修了。現在, 総合研究大学院大学物理化学研究科構造分子科学専攻博士後期課程に在籍中。

浮 田 芳 昭

(学生員) 1982 年生。2006 年 3 月兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻博士前期課程修了。現在, 兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻博士後期課程に在学中。

加 藤 太 一 郎

技術の開発と酵素の有する高い立体選択性の解明を研究テーマに研究・教育に従事。

(非会員) 1977 年生。2000 年 3 月慶應義塾大学理学部化学科卒業。2002 年 3 月慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻前期博士課程, 2005 年 3 月同大学院後期博士課程修了。博士(理学)。2005 年 4 月日本学術振興会特別研究員(京都大学化学研究所), 同年 10 月兵庫県立大学大学院工学研究科物質系工学専攻助手。生体触媒・酵素を用いた有用物質の生産技術の開発と酵素の有する高い立体選択性の解明を研究テーマに研究・教育に従事。

武 尾 正 弘

環境汚染物質の微生物分解機構の解明と環境浄化及び分析技術の開発を研究テーマに研究・教育に従事。

(非会員) 1963 年生。1986 年 3 月大阪大学工学部環境工学科卒業。1988 年 3 月大阪大学大学院工学研究科博士前期課程環境工学専攻修了。1988 年 4 月日清食品(株)。1991 年 7 月姫路工業大学工学部助手, 2000 年 10 月同講師を経て, 2004 年 4 月兵庫県立大学大学院工学研究科物質系工学専攻助教授。工学博士(大阪大学)。2000 年 9 月~2001 年 8 月ドイツ・シュツツガルツ大学客員研究員。環境汚染物質の微生物分解機構の解明と環境浄化及び分析技術の開発を研究テーマに研究・教育に従事。

内 海 裕 一

精密工学会ベストオーガナイザー賞等を受賞。

(正員) 1984 年名古屋大学大学院工学研究科修士課程修了。同年, 日本電信電話公社入社。物性科学基礎研究所主任研究員を経て, 2000 年 3 月より兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所 助教授。現在, 流体デバイスを中心とするナノ・マイクロシステム研究に従事。博士(工学)。日米機械学会共催・材料プロセス国際会議 2002 (M&P2002)ベストポスター賞, 2003 年精密工学会ベストオーガナイザー賞等を受賞。

根 来 誠 司

「ナイロンオリゴマー分解系酵素とその遺伝子構造に関する研究」で, 日本生物工学会斉藤賞受賞。

(非会員) 1953 年生。1982 年 3 月大阪大学大学院工学研究科醗酵工学専攻博士後期課程修了。大阪大学工学部 助手, 助教授, 大阪大学先導的研究オープンセンター 助教授を経て 1998 年 10 月姫路工業大学工学部教授, 2004 年 4 月兵庫県立大学大学院工学研究科教授。工学博士(大阪大学)。非天然アミド化合物の微生物分解, 酵素の構造・機能相関に関する研究に従事。1991 年 11 月「ナイロンオリゴマー分解系酵素とその遺伝子構造に関する研究」で, 日本生物工学会斉藤賞受賞。