(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-192326
(P2017-192326A)
(43)公開日　平成29年10月26日(2017.10.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/06	(2006.01)	C12Q	1/06		4B063
G01N 33/18	(2006.01)	G01N	33/18	F	
G01N 15/06	(2006.01)	G01N	15/06	E	
G01N 15/14	(2006.01)	G01N	15/14	J	
G01N 33/569	(2006.01)	G01N	15/14	P	

審査請求 未請求　請求項の数 6　ＯＬ　（全 9 頁）　最終頁に続く

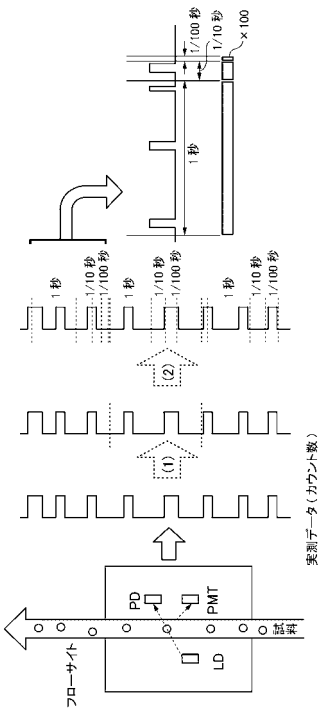
(21)出願番号　特願2016-83778(P2016-83778)
(22)出願日　平成28年4月19日(2016.4.19)

(71)出願人　507214083
メタウォーター株式会社
東京都千代田区神田須田町一丁目２５番地
(71)出願人　516117630
遠藤　卓郎
東京都小金井市貫井北町２丁目１２番１３号
(74)代理人　100144048
弁理士　坂本　智弘
(74)代理人　100204755
弁理士　渡辺　浩司
(74)代理人　100186679
弁理士　矢田　歩
(74)代理人　100189186
弁理士　大石　敏弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】試料中の微粒子の数を推定する方法

(57)【要約】
【課題】微生物を代表とする、試料中の微粒子の数を推定する方法であって、微粒子数の推定にあたり、煩雑な操作を行う必要なく、迅速かつ簡便に実施することができる方法を提供すること。
【解決手段】試料中の微生物の数を推定するための方法であって、試料中に含まれる対象となる微生物の数を、所定の流速で定流計数する工程と、定流計数の結果として得られた測定データを、所定の単位時間を一区分として、所定区分数の区画に区画化する工程と、所定区分数の区画のうち、微生物を検出した区画、及び微生物を検出しなかった区画の、各区画数を計数する工程と、定流計数工程における試料の流速、区画化工程における所定の区分数及び所定の単位時間、並びに区画数計数工程における微生物を検出した区画の区画数から、統計的手法により、試料中の微生物の数を推定する工程と、を有する試料中の微生物の数を推定する方法。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の微粒子の数を推定するための方法であって、
前記試料中に含まれる、対象となる微粒子の数を、所定の流速で定流計数する定流計数工程と、
前記定流計数の結果として得られ、経過時間と検出微粒子数との関係を示す測定データを、所定の単位時間を一区分として、所定区分数の区画に区画化する区画化工程と、
前記所定区分数の区画のうち、前記微粒子を検出した区画、及び前記微粒子を検出しなかった区画の、各区画数を計数する区画数計数工程と、
前記定流計数工程における前記試料の流速、前記区画化工程における所定の区分数及び所定の単位時間、並びに前記区画数計数工程における前記微粒子を検出した前記区画の区画数から、統計的手法により、前記試料中の前記微粒子の数を推定する濃度算出工程と、
を有する試料中の微粒子の数を推定する方法。
【請求項２】
前記区画数計数工程において、前記微粒子を検出しなかった前記区画の区画数が１以上となるように、前記区画化工程において所定の単位時間を決定する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記統計的手法が最確数法である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記区画化工程において、所定の２以上の単位時間により、所定区分数の区画の列を２列以上区画化し、
前記濃度算出工程において、前記定流計数工程における前記試料の流速、前記区画化工程における所定の区分数及び所定の２以上の前記単位時間、並びに前記区画数計数工程における、各単位時間に応じた前記微生物を検出した前記区画の区画数から、最確数法により、前記試料中の微粒子の数を推定する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記微粒子は微生物であり、前記試料に、前記微生物の細胞表面の抗原と結合する蛍光標識抗体を添加し、前記定流計数工程において、抗体を標識する蛍光物質の蛍光を測定することにより、前記試料中の前記微粒子の数を測定する、請求項１から４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
前記定流計数工程において、光散乱測定により、前記試料中の前記微粒子の数を測定する、請求項１から４のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、微生物を代表とする、水中の微粒子の数を、煩雑な処理（微生物の場合の培養等）を行うことなく、迅速かつ簡便に推定することができる、試料中の微粒子の数を推定する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
人体に対して害悪を及ぼす病原性微生物としては、多種多様なものが知られており、これらの病原性微生物の中には、水道水を介して伝播する微生物も知られている。各家庭に広く供給される水道水を介して感染症等が発生することのないよう、飲用に供されうる水道水については、厳しい水質基準が定められている。したがって、上水処理の分野においては、水道水として上水を供給する前の段階で、上水中の病原性微生物の単位体積当たりの数（以下、「濃度」と称する）を確認する必要があり、病原性微生物の濃度が基準値を下回って、初めて、上水の水道水としての供給が可能となる。

【０００３】
ところで、水中の微生物の濃度を特定しようとする場合、試料となる水を所定の倍率で希釈し、希釈後の試料から当該微生物を培養することにより、培養前の試料中における微生物の細胞数を推定して希釈前の試料における当該微生物の濃度を推定している。しかしながら、この方法では、培養のための時間もかかる上、試料中の微生物を培養する工程を必須の工程として要求するため、人工培養が難しい微生物の濃度を推定することは極めて困難であった。
【０００４】
そのような問題を解決するため、例えば、特許文献１には、組成物中のレジオネラ属菌を迅速に測定する方法であって、（ａ）レジオネラ属菌を培養するための栄養素と、非レジオネラ属微生物の増殖を選択的に阻害する少なくとも１種の物質を含む吸収培地を準備し、（ｂ）上記試料と吸収培地とを所定時間接触させ、（ｃ）上記吸収培地を約６時間から約４８時間、約３０℃から約４５℃の範囲の温度でインキュベートし、（ｄ）吸収培地上のレジオネラ属菌の増殖を検出物質で検出し、（ｅ）上記試料中の生存可能なレジオネラ属菌を定量する方法が開示されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】特表２００８－５３２５５１号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
しかしながら、特許文献１に記載の方法においても、微生物の培養の工程を必須の工程として有しているため、培養のために相応の時間を要することは変わりない。特に、特許文献１に記載の方法においては、非レジオネラ属微生物の増殖を選択的に阻害する物質を吸収培地に添加するため、場合によっては、当該吸収培地を用事調製しなければならず、レジオネラ属菌の定量に多くの手間と労力を要しうるものであった。したがって、本発明は以上の課題に鑑みてなされたものであり、微生物を代表とする、試料中の微粒子の数を推定する方法であって、微粒子数の推定にあたり、煩雑な操作を行う必要なく、迅速かつ簡便に実施することができる方法を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明の発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意研究を行った。その結果、試料中に含まれる微粒子の数を、例えば、フローサイトメトリー等の計数手段により所定の流速で測定し、経過時間と検出微粒子数との関係を示す測定データを、所定の単位時間を一区分として、所定の区分数だけ区画化し、微粒子を検出した区画、及び微粒子を検出しなかった区画の、各区画数を計数して、上記流速、所定の区分数、所定の単位時間、及び微粒子を検出した区画の区画数から、統計的手法により試料中の微粒子の数を推定することにより、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。具体的には、本発明は以下のものを提供する。
【０００８】
（１）　本発明の第１の態様は、試料中の微粒子の数を推定するための方法であって、前記試料中に含まれる、対象となる微粒子の数を、所定の流速で定流計数する定流計数工程と、前記定流計数の結果として得られ、経過時間と検出微粒子数との関係を示す測定データを、所定の単位時間を一区分として、所定区分数の区画に区画化する区画化工程と、前記所定区分数の区画のうち、前記微粒子を検出した区画、及び前記微粒子を検出しなかった区画の、各区画数を計数する区画数計数工程と、前記定流計数工程における前記試料の流速、前記区画化工程における所定の区分数及び所定の単位時間、並びに前記区画数計数工程における前記微粒子を検出した前記区画の区画数から、統計的手法により、前記試料中の前記微粒子の数を推定する濃度算出工程と、を有する試料中の微粒子の数を推定す

る方法である。
【０００９】
（２）　本発明の第２の態様は、（１）に記載の方法であって、前記区画数計数工程において、前記微粒子を検出しなかった前記区画の区画数が１以上となるように、前記区画化工程において所定の単位時間を決定することを特徴とするものである。
【００１０】
（３）　本発明の第３の態様は、（１）又は（２）に記載の方法であって、前記統計的手法が最確数法であることを特徴とするものである。
【００１１】
（４）　本発明の第４の態様は、（３）に記載の方法であって、前記区画化工程において、所定の２以上の単位時間により、所定区分数の区画の列を２列以上区画化し、前記濃度算出工程において、前記定流計数工程における前記試料の流速、前記区画化工程における所定の区分数及び所定の２以上の前記単位時間、並びに前記区画数計数工程における、各単位時間に応じた前記微粒子を検出した前記区画の区画数から、最確数法により、前記試料中の微粒子の数を推定することを特徴とするものである。
【００１２】
（５）　本発明の第５の態様は、（１）から（４）のいずれかに記載の方法であって、前記微粒子は微生物であり、前記試料に、前記微生物の細胞表面の抗原と結合する蛍光標識抗体を添加し、前記定流計数工程において、抗体を標識する蛍光物質の蛍光を測定することにより、前記試料中の前記微粒子の数を測定することを特徴とするものである。
【００１３】
（６）　本発明の第６の態様は、（１）から（４）のいずれかに記載の方法であって、前記定流計数工程において、光散乱測定により、前記試料中の前記微粒子の数を測定することを特徴とするものである。
【発明の効果】
【００１４】
本発明の方法は、フローサイトメトリー等により、一定の速度で流れる試料から、微生物等に代表される微粒子の数を測定する。こうした定流計数は、１粒子単位（微生物の場合は１細胞単位）で微粒子の存在を検出することが可能であるので、微生物の場合の培養等、煩雑な操作を行うことなく、試料中に含まれる微粒子の数を計数することが可能であり、培養ができない微生物又は微粒子等においても1細胞または１個の単位で数を測定することが可能である。さらに、本発明においては、定流計数工程における流速、区画化工程における所定の区分数及び所定の単位時間、区画数計数工程における微粒子を検出した区画の区画数から、統計的手法を用いて微粒子の数を推定するので、多量に及ぶ試料について微粒子の数を測定しなくても、統計的に信頼性の高い微粒子数を推定することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】本発明の方法の概要を説明するための図面である。
【発明を実施するための形態】
【００１６】
図１は、本発明の方法の概要を説明するための図面である。以下、本発明を実施するための形態について、図面を参照して詳細に説明する。
【００１７】
＜試料中の微粒子の数を推定する方法＞
本発明の方法は、試料中の微粒子の数を推定するための方法であって、定流計数工程と、区画化工程と、区画数計数工程と、濃度算出工程と、を有する。以下、各工程について詳細に説明する。
【００１８】
［定流計数工程］

本発明の方法における第１の工程である、定流計数工程は、対象となる試料中に含まれる、対象となる微粒子の数を、フローサイトメトリーや微粒子カウンタ等の計数手段により所定の流速で定流計数する工程である。ここで、本発明の方法を適用する対象となる試料については、原水や、上水、下水、工業用水、工業用排水等、特に限定されるものではないが、本発明の方法は、原水や上水における試料中の微生物の数を推定するために用いられることが好ましい。

【００１９】

また、本発明の方法の適用の対象となる微粒子としては、病原性又は非病原性の各種微生物のほか、ポリスチレンラテックス（ＰＳＬ）、金属ビーズ、（人工の）ガラスビーズ、血液試料中の血球等を挙げることができる。これらの中でも、特に、病原性の微生物の数の推定のために本発明を適用することが好ましい。

【００２０】

本発明においては、好ましくは、フローサイトメトリーによる定流計数を行うため、測定に供する試料の最終的な体積は、少なくとも１ｍＬ以上であることが一般的であり、１ｍＬ以上２０ｍＬ以下であることが好ましい。なお、この場合において、測定に供する試料は、従来公知の方法により濃縮されていてもよく、その場合における、測定に供する試料の体積は、濃縮後の体積を示すものとする。

【００２１】

（フローサイトメトリー）

なお、本発明において好適に使用されるフローサイトメトリーとは、微細な粒子を流体中に分散させた状態で、流体を一定の流速で微小量ずつ流し、流体中に含まれる個々の粒子を光学的に検出する手法であり、一般には、流体を流通させる流路と、流路を挟んで一方側に設けられる発光部（ＬＤ）と、他方側に設けられる受光部（ＰＤ）及び検出器（ＰＭＴ）とを有するフローサイトメーターを用いて実施される。

【００２２】

そして、フローサイトメーターの備える発光部と受光部は、流路上の１点を通過する直線上に設けられており、当該流路上の１点を微生物等の微粒子が通過した場合、受光部において光が遮断されるとともに、光散乱測定や蛍光測定により、発光部から発せられる光と同一波長又はより長波長の光が検出器に到達して検出される。これにより、フローサイトメーターは流体中の粒子の存在を検出する。

【００２３】

本発明の方法に使用可能なフローサイトメーターは、特に限定されるものではなく、一般的なフローサイトメーターを制限なく使用することができるが、具体的に、Ｂａｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ社製のＣｙＡｎ　ＡＤＰを挙げることもできる。

【００２４】

（試料の前処理）

本発明において、定流計数工程に供される試料は、事前に前処理がなされていてもよいし、前処理が一切なされていなくてもよい。そのような前処理としては、試料原液の濃縮工程や分離工程、精製工程等が挙げられる。さらに、例えば、微粒子として微生物を検出する場合、免疫蛍光抗体法や蛍光染色法により微生物を検出する際に行われる、蛍光標識抗体や蛍光試薬による染色を挙げることができる。蛍光標識抗体としては、例えば、測定の対象とする微生物の細胞表面に特異的に存在する抗原に特異的に結合する抗体等を挙げることができる。また、蛍光試薬としては、細胞表面又は細胞内の特定の化学物質に特異的に結合する化学物質等を挙げることができる。さらに、微生物の蛍光標識には、ＦＩＳＨ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｉｎ　Ｓｉｔｕ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）に代表される核酸ハイブリダイゼーション法をも採用することができ、この場合、蛍光物質や放射性物質で標識した核酸の切片を使用して微生物を標識することもできる。ここで、微生物に対して免疫蛍光抗体法、蛍光染色法、又は核酸ハイブリダイゼーション法を行う場合には、必要に応じて微生物を固定し、界面活性剤処理等を行ってもよい。上述の前処理に使用できる蛍光標識抗体や蛍光試薬としては、特に限定されるものではないが、例えば、

クリプトスポリジウムやジアルジアを検出することを目的とする場合には、ＡＲＫ試薬、Ｒ－ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ（ＰＥ）標識抗体、ＦＩＴＣ標識抗体、Ｃｙ３標識抗体のほか、核酸を染色可能な蛍光色素として、ＰＩ、ＳＹＴＯ９、ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ等を挙げることができる。

【００２５】

（流速）

本発明において、例えば、フローサイトメトリーにより試料中に含まれる微粒子の数を定流計数する場合、フローサイトメーターの流路を流れる試料の流速は、特に限定されるものではないが、１μＬ／ｓｅｃ以上３０μＬ／ｓｅｃ以下であることが好ましく、１０μＬ／ｓｅｃ以上２０μＬ／ｓｅｃ以下であることがより好ましい。流路を流れる試料の流速を上記のとおりに設定することにより、微粒子数の測定の精度及び確度を一定水準以上に維持しつつ、定流計数工程の効率を向上させることができる。

【００２６】

［区画化工程］

本発明の方法における第２の工程である区画化工程においては、定流計数の結果として得られ、経過時間と検出微粒子数との関係を示す測定データを、所定の単位時間を一区分として、所定区分数の区画に区画化する。この際、所定区分数の区画は、所定区分数の連続する区画としてもよい。

【００２７】

ここで、区画化の際の一区分となる所定の単位時間としては、特に限定されるものではないが、例えば、所定の単位時間にフローサイトメーターの流路を流れた試料の体積が、所定の単位体積となるように設定することが好ましい。具体的には、フローサイトメーターの流路を流れる試料の流速が、１００μＬ／ｓｅｃである場合、単位時間を１．０秒とすることにより、１００μＬの試料中に対象となる微粒子が含まれるか否かを判定することができ、単位時間を1.0×10^{-1}秒とすることにより、１０μＬの試料中に対象となる微粒子が含まれるか否かを判定することができ、単位時間を1.0×10^{-2}秒とすることにより、１μＬの試料中に対象となる微粒子が含まれるか否かを判定することができる。

【００２８】

所定の単位時間により区画化する区画の区分数としては、特に限定されないが、例えば、５区画以上であることが好ましく、１０区画以上であることがより好ましい。区分数を増加させることにより、濃度算出工程において、統計的により正確な微粒子の数を推定することが可能となる。

【００２９】

本発明の区画化工程において、所定の単位時間を設定するにあたっては、当該単位時間により区画化した、所定の区分数の区画（例えば、５区画）のうち、微粒子を検出しなかった区画の区画数が１以上となるように所定の単位時間を決定することが好ましい。特に、１のみの単位時間を設定して測定データを区画化する場合、微粒子を検出しなかった区画の区画数が０である場合には、試料中の微粒子の数に対する微粒子を検出した区画の区画数が飽和してしまうこととなるため、試料中の微粒子の数を正確に算出できない可能性がある。微粒子を検出しなかった区画の区画数が１以上であるように単位時間を設定することにより、１のみの単位時間を設定して測定データを区画化する場合においても、より正確な微粒子の数を算出することができる。

【００３０】

［区画数計数工程］

本発明の方法における第３の工程である区画数計数工程においては、所定区分数の区画のうち、微粒子を検出した区画、及び微粒子を検出しなかった区画の、各区画数を計数する。なお、本発明においては、各区画における微粒子の検出数に該当するシグナル数を計数する必要はなく、各区画に任意の数のシグナルが存在するか否かを判定することにより、後述する濃度算出工程において微粒子数を統計的に推定することができる。このような

手法を採用することにより、特に、１区画に複数のシグナルが存在する場合であって、各シグナルのピークが重複している場合においても、シグナルが存在するか否かを判定することにより計数データを取得するので、計数データの正確性を損なうことなく、計数データを取得することができる。

【００３１】

［濃度算出工程］

本発明の方法における第４の工程である濃度算出工程においては、定流計数工程における試料の流速、区画化工程における所定の区分数及び所定の単位時間、並びに区画数計数工程における微粒子を検出した区画の区画数から、例えば、被検試料水の総量並びに粒子を検出した試料水の総量を求め、統計的手法により、試料中の微粒子の数を推定する。このような手法を採用して微粒子数を推定することにより、求められる微粒子数を所定以上の確からしさを示す数値による数値範囲として取得でき、統計的に意味のある微粒子の数を推定することができる。

【００３２】

ここで、微粒子の数を推定する際に使用する統計的手法としては、特に限定されるものではないが、最確数法（例えば、Ｊ．Ｍｉｌｋ Ｆｏｏｄ Ｔｅｃｈｎｏｌ．Ｖｏｌ．３８，Ｎｏ．９，Ｐａｇｅｓ ５４０－５４５，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ，１９７５）を用いることが好ましい。

【００３３】

最確数法は、一般には、所定の試料について、所定の希釈系列を準備して希釈試料中の微生物を培養し、各希釈倍率の希釈試料所定数あたりの培養陽性試料数から、希釈前の試料の微生物濃度を統計的に推定する方法である。本発明においては、所定の流速で定流計数した試料の測定データを所定の単位時間で区分し、微粒子が検出されるかを判定する操作が、試料中、所定の単位体積あたりに微生物（微粒子）が含まれるか否かを検討する操作に該当するので、微生物を検出する場合における培養等の、煩雑な操作を行うことなく従来の最確数法を適用することができる。

【００３４】

なお、最確数法においては、所定の数学的計算により求められた最確数表が用意され、前述の希釈倍率や培養陽性試料数から、この最確数表を参照することにより微生物数を推定するが、本発明はこのような方法に限定されず、上述の流速、所定の区分数、所定の単位時間、及び微粒子を検出した区画の区画数から、数学的・統計的手法により計算を行って微粒子数を推定してもよく、コンピュータシミュレーション等により統計的に微粒子数を推定してもよい。

【００３５】

本発明においては、前述の区画化工程において、所定の２以上の単位時間により、所定区分数の区画の列を２列以上区画化し、濃度算出工程において、試料の流速、区画化工程における所定の区分数及び上記の所定の２以上の単位時間、並びに区画数計数工程における、各単位時間に応じた微粒子を検出した区画の区画数から、最確数法により、試料中の微粒子の数を推定することが好ましい。所定区分数の区画の列を２列以上区画化することにより、より信頼度の高い推定を行うことができる。また、最確数法を利用すれば、区画が少なくても一定精度の推測が可能であるため、時間や費用に応じた適切な推定を行うことができる。

【００３６】

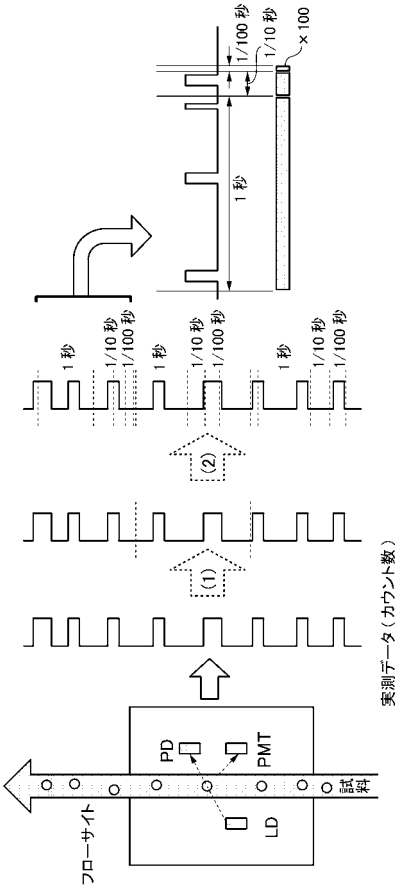
ここで、図１を参照して、上述の工程を詳細に説明すれば、例えば、１００μＬ／ｓｅｃの流速でフローサイトメトリーを行った場合、まず、第１に単位時間を２秒として測定データを区画化し、各区画を単位時間を１秒、1.0×10^{-1}秒、1.0×10^{-2}秒としてそれぞれ区画化する。単位時間を１秒とした３区分の各区画のうち、微粒子を検出した区画の数を記録し、単位時間を1.0×10^{-1}秒とした３区分の各区画のうち、微粒子を検出した区画の数を記録し、単位時間を1.0×10^{-2}秒とした３区分の各区画のうち、微粒子を検出した区画の数を記録する。そして、流速、所定の単位時間及び所定

の区分数、並びに微粒子を検出した区画の数から、最確数法により、試料中の微粒子の数を推定する。

【００３７】

以上の方法によれば、微生物を検出する場合における試料中の微生物の培養等の煩雑な操作を行うことなく、統計的に精度及び確度の高い微粒子数を推定することができる。なお、本発明は、試料中の微生物を培養する工程を必要としないので、そもそも培養が不可能な微粒子はもちろん、クリプトスポリジウムやジアルジアのように、人工培養が難しい原虫類の濃度の測定にも好適に適用することができる。また、レジオネラのように培養に長時間を要する原虫類の濃度の迅速な測定にも好適である。

【図１】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/536	*(2006.01)*	G01N	33/569	B	
		G01N	33/536	D	

(72)発明者　金　京柱
東京都千代田区神田須田町一丁目２５番地　メタウォーター株式会社内
(72)発明者　山口　太秀
東京都千代田区神田須田町一丁目２５番地　メタウォーター株式会社内
(72)発明者　遠藤　卓郎
東京都小金井市貫井北町２丁目１２番１３号

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QQ05 QQ06 QQ18 QQ42 QR52 QR56 QR66 QS03 QS33
QS34 QS36 QS39 QX01