

(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2005-287337

(P2005-287337A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005. 10. 20)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 Q 1/06

G O 1 N 21/64

F I

C 1 2 Q 1/06

G O 1 N 21/64

テーマコード (参考)

2 G O 4 3

4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2004-103794 (P2004-103794)

(22) 出願日 平成16年3月31日 (2004. 3. 31)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(74) 代理人 100097445

弁理士 岩橋 文雄

(74) 代理人 100103355

弁理士 坂口 智康

(74) 代理人 100109667

弁理士 内藤 浩樹

(72) 発明者 牧瀬 智之

愛知県春日井市鷹来町字下仲田4017番

松下エコシステムズ株式会社内

(72) 発明者 寺山 晶法

愛知県春日井市鷹来町字下仲田4017番

松下エコシステムズ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】糸状菌計量方法

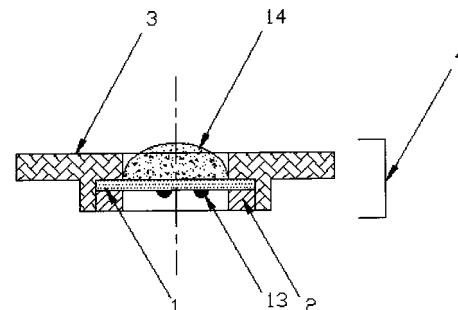
(57) 【要約】

【課題】被験材料中の糸状菌数を計量するのに短時間の培養で糸状菌を計量し、また、正確な糸状菌を計量することができる糸状菌計量方法を提供することを目的としている。

【解決手段】液体培養で培養した糸状菌13、または微多孔膜支持体4の微多孔膜1上で培養した糸状菌13の複数に伸びた菌糸を撮像5した後、形状と面積および発光輝度を画像解析手段10で認識し解析させることにより、糸状菌13を短時間の培養で計量できるという作用を有する。

【選択図】図4

14 : 培地



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

培養した糸状菌の複数に伸びた菌糸に励起光を照射し撮像した後、形状と面積および発光輝度を認識し解析する画像解析手段を備えた糸状菌計量方法。

【請求項 2】

糸状菌を液体培地で所要時間培養後に微多孔膜支持体の微多孔膜にろ過することを特徴とした請求項 1 記載の糸状菌計量方法。

【請求項 3】

糸状菌を微多孔膜支持体の微多孔膜上でろ過し微多孔膜上で所要時間培養することを特徴とした請求項 1 記載の糸状菌計量方法。

10

【請求項 4】

糸状菌を液体培地で培養後、細菌および夾雑物が通過し糸状菌が通過しないポアサイズの微多孔膜でろ過することを特徴とした請求項 2 記載の糸状菌計量方法。

【請求項 5】

糸状菌を液体培地で培養後、10～30 μm のポアサイズの微多孔膜を使用することを特徴とした請求項 4 記載の糸状菌計量方法。

【請求項 6】

糸状菌のみを選択的に培養させる固形培地または液体培地を使用することを特徴とした請求項 1 乃至 5 記載の糸状菌計量方法。

【請求項 7】

糸状菌を選択的に培養させる温度として 20～25 で培養することを特徴とした請求項 1 乃至 6 記載の糸状菌計量方法。

20

【請求項 8】

背景消光効果のある溶剤、粉末若しくはそれらに該当する物質を使用することを特徴とした請求項 1 乃至 7 記載の糸状菌計量方法。

【請求項 9】

背景消光効果のある墨汁を使用することを特徴とした請求項 8 記載の糸状菌計量方法。

【請求項 10】

糸状菌を所定時間培養後に一度撮像し、抗菌剤を糸状菌に添加してから再度培養し、菌糸の発育を確認することで抗菌作用の評価が可能な請求項 1 乃至 9 記載の糸状菌計量方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、培養した糸状菌を微多孔膜で捕集し、捕集された糸状菌を光学的に撮像し糸状菌の特徴的な形状を画像解析手段で認識させることにより糸状菌を計量する方法および、糸状菌を微多孔膜で捕集し、微多孔膜上で糸状菌を短時間培養した後糸状菌を光学的に撮像し糸状菌の特徴的な形状を画像解析手段で認識し解析させることにより糸状菌を計量する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来の糸状菌の検査方法は微生物検査方法と同じで被験材料中の菌数を計量するのに、例えば被験材料が液体の場合は寒天平板培地に直接塗抹し、また、被験材料が液体で無い場合は微生物を洗い出した液を寒天平板培地に塗抹して 1 個の菌が 1 個のコロニーを形成することを利用して、寒天平板培地上で微生物を培養し、寒天平板培地上に発現したコロニーを肉眼で観察しながら被験材料中の微生物数を計量する寒天平板法が用いられている。

40

【0003】

また、メンブレンフィルターを使用して、微生物を計量する方法として、（例えば、特許文献 1 および特許文献 2 参照）に記載されているような方法があり、アデノシン三リン酸（以下 ATP）分解酵素を含む溶液をメンブレンフィルターに施した後、乾燥処理をした

50

メンブレンフィルターに被験材料中の微生物をろ過捕集し、必要であれば所要時間培養した後、ATPを抽出するための液体抽出試薬と発光試薬であるルシフェリン・ルシフェラーゼを霧状に噴霧することにより、ルシフェリンとルシフェラーゼがATPと反応して、1分子のルシフェリンの酸化によって1フォトンの発光をし、その発光を高感度CCDカメラで撮り込み微生物を計量している。

【特許文献1】特開平11-137293号公報

【特許文献2】特開平6-237793号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

10

このような従来の糸状菌の検査方法では、一般的な微生物検査方法と同じく寒天平板培地にサンプルを塗抹もしくは混釈するので、被験材料の検査量が1ml程度が限界であり、糸状菌が少なく多量ろ過の検査が必要な被験材料の検査は不可能であり、検査の結果が得られるまでに5～10日の培養時間が必要となり、生鮮食品などの製造あるいは製品出荷の段階で検査結果待ちを要し、時間的経済的に大きなデメリットとなっており、場合によっては検査結果が判る前に出荷せざるおえないという課題があり、被験材料中の糸状菌数を計量するのに要する時間を短時間にすることが要求されている。

【0005】

また、従来の糸状菌抵抗試験は公定法であるJIS Z 2911、GK法等に準拠しており、寒天平板培地を使用している。それにより細菌検査が18～72時間で終了するとしても糸状菌の検査期間が5～10日であるため、製品在庫期間の長期化の要因となり糸状菌の検査時間の短縮が要求されている。また、抗菌剤の評価は、阻止円の発育の有無で評価しており、揮発性の抗菌剤等は、抗菌性能を正確に把握することが困難という課題があり、抗菌剤の性能を正確に計量することが要求されている。

20

【0006】

また、メンブレンフィルターを使用して、所要時間の培養後または培養無しで糸状菌を計量する方法は、培養をする場合は糸状菌を捕集したメンブレンフィルターを平板寒天培地に置いて培養する時に、メンブレンフィルターと平板寒天培地の間にエアが入るなど、メンブレンフィルターと培地が完全に密着していないと培地の栄養分がメンブレンフィルターに捕集した糸状菌まで行き渡りにくく、メンブレンフィルターに捕集した糸状菌の培養性が悪くなり、同じサンプルを培養してもメンブレンフィルターごとに糸状菌の増殖性が一定にならずにコロニーの大きさがばらつくという課題があり、糸状菌の培養性を高めることが要求されている。

30

【0007】

また、培養無しの場合は、被験材料中に糸状菌と同じように発光する蛍光異物等が含まれる被験材料の検査においては、糸状菌と同じように発光する蛍光異物等と微生物の蛍光との明確な差が得られず、正確な糸状菌数の計量ができないという課題があり、正確な糸状菌数を計量することが要求されている。

【0008】

本発明は、このような従来の課題を解決するもので被験材料中の糸状菌数を計量するのに従来に比べ短時間の培養で糸状菌を計量することができ、また、被験材料中の糸状菌を液体培地で培養した後微多孔膜にろ過することにより増殖のばらつきを抑えることにより正確な糸状菌を計量することができ、また、所要時間培養した糸状菌を光学的に撮像し糸状菌の特徴的な形状を画像解析手段で認識し解析させることにより元々のサンプルに存在する糸状菌数を計量することのできる糸状菌計量方法を提供することを目的としている。また、抗菌剤のみの性能を計測できる糸状菌計量方法を提供することを目的としている。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の糸状菌計量方法は上記目的を達成するために、培養した糸状菌の複数に伸びた菌糸を撮像した後、形状と面積および発光輝度を認識し解析する画像解析手段を備えたも

50

のである。

【 0 0 1 0 】

これにより糸状菌の形状または面積および発光輝度を認識させることができる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 1 1 】

また、本発明は糸状菌を液体培地で培養した後微多孔膜でろ過したものである。

【 0 0 1 2 】

これにより糸状菌をムラなく安定して培養することができる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 1 3 】

また、本発明は微多孔膜でろ過し微多孔膜上で所要時間培養するものである。

【 0 0 1 4 】

これにより微多孔膜上で被験材料に存在する糸状菌数を計量することが可能であり、また、検体の大量ろ過が可能である糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 1 5 】

また、本発明は細菌および夾雑物が通過し、糸状菌が通過しないポアサイズの微多孔膜を使用したものである。

【 0 0 1 6 】

これにより、糸状菌以外の細菌または夾雑物を分離することができ、また検体の大量ろ過をすることが可能である糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 1 7 】

また、本発明は 1 0 ~ 3 0 μ m のポアサイズの微多孔膜を使用したものである。

【 0 0 1 8 】

これにより 1 0 μ m 以下の微小な細菌または夾雑物をろ過、分離し効率良く糸状菌のみを捕集することができる。また、ポアサイズが 1 0 ~ 3 0 μ m と大きい為、ろ過性が向上し多量の検体をろ過することができるため、微量な糸状菌量を計測できる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 1 9 】

また、本発明は糸状菌のみを選択的に培養させる液体培地または固形培地を使用したものである。

【 0 0 2 0 】

これにより他の細菌の培養を抑制し、糸状菌のみを特異的に培養させる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 2 1 】

また、本発明は糸状菌の培養温度を 2 0 ~ 2 5 としたものである。

【 0 0 2 2 】

これにより糸状菌を選択的に培養ができ、さらには、糸状菌以外の細菌等を抑制することができる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 2 3 】

また、本発明は背景消光効果のある溶剤、粉末若しくはそれらに該当する物質を使用するものとする。

【 0 0 2 4 】

これにより目的とする糸状菌の発光と背景の発光を区別することができる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 2 5 】

また、本発明は背景消光効果のある墨汁を使用するものとする。

【 0 0 2 6 】

これにより目的とする糸状菌の発光と背景の発光を区別することができる糸状菌計量方法が得られる。

【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

また、本発明は糸状菌を所定時間培養後に一度撮像し、抗菌剤を糸状菌に添加してから再度培養し、菌系の発育を確認できるものとする。

【0028】

これにより抗菌作用の評価ができる糸状菌計量方法が得られる。

【発明の効果】

【0029】

本発明によれば培養時間が短時間ですみ糸状菌を迅速に計量できる効果のある糸状菌計量方法を提供できる。また、糸状菌に対する抗菌剤の抗菌作用評価ができる糸状菌計量方法が提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0030】

本発明の請求項1記載の発明は、培養した糸状菌の複数に伸びた菌糸を撮像した後、形状と面積および発光輝度を画像処理で認識し解析させるというものであり、糸状菌を短時間の培養で計量できるという作用を有する。また、現在主流となっている寒天培養法では糸状菌の検査時間に5～10日を要しており、また、現状では糸状菌の寒天培養法で形成した集落を目視で確認しているが、本発明では短時間の培養で糸状菌の菌糸が伸びた状態を画像解析手段で認識するため、検査時間を短時間にすることが可能で、且つ糸状菌検査期間は製品を在庫として保管しなけりばならず、検査費用について金銭的にも安価と成りうる作用を有する。

【0031】

20

また、本発明の請求項2記載の発明は、糸状菌を液体培地で所要時間培養後に微多孔膜支持体の微多孔膜にろ過し光学的に微生物を撮像するというものであり、糸状菌を所定の大きさまで発育させるという作用を有する。

【0032】

また、本発明の請求項3記載の発明は、糸状菌を微多孔膜支持体の微多孔膜上でろ過し微多孔膜上で所用時間培養するというものであり、微多孔膜上で被験材料に存在する糸状菌数を計量することが可能であり、また、検体の大量ろ過が可能という作用を有する。

【0033】

また、本発明の請求項4記載の発明は、糸状菌を液体培地で培養後、細菌および夾雑物が通過し糸状菌が通過しないポアサイズの微多孔膜でろ過するというものであり、糸状菌以外の細菌または夾雑物を分離することができ、また検体の大量ろ過をすることが可能という作用を有する。

30

【0034】

また、本発明の請求項5記載の発明は、糸状菌を液体培地で培養後、10～30μmのポアサイズの微多孔膜を使用するというものであり、細菌の場合は液体培養において増殖時に個々の細菌が10μm以上に塊まって増殖することはほぼ無く、微多孔膜のポアサイズを10～30に設定することにより、細菌または夾雑物のろ過が可能であるが、糸状菌の場合は1個の糸状菌の菌糸が伸長するため、所定時間培養すると糸状菌が10～30μmより大きくなり微多孔膜で捕集ができるという作用を有する。また、ポアサイズが10～30μmと大きいため多量な検体を効率良くろ過するという作用を有する。

40

【0035】

また、本発明の請求項6記載の発明は、糸状菌のみを選択的に培養させる固形培地または液体培地を使用するというものであり、SCD培地、GP培地等を使用することにより他の細菌の培養を抑制し、糸状菌のみを特異的に培養させるという作用を有する。

【0036】

また、本発明の請求項7記載の発明は、糸状菌を選択的に培養させる温度として20～25℃で培養するというものであり、糸状菌を分離培養ができるという作用を有する。また、細菌と糸状菌の発育温度に差があるため効率良く細菌と糸状菌を分離するという作用を有する。

【0037】

50

また、本発明の請求項 8 記載の発明は、背景消光効果のある溶剤、粉末若しくはそれらに該当する物質を使用するというものであり、目的とする糸状菌の発光と背景の発光を区別することができるという作用を有する。

【0038】

また、本発明の請求項 9 記載の発明は、背景消光効果のある墨汁を使用するというものであり、目的とする糸状菌の発光と背景の発光を区別することができるという作用を有する。

【0039】

また、本発明の請求項 10 記載の発明は、糸状菌を所定時間培養後に一度撮像し、抗菌剤を糸状菌に添加してから再度培養し、菌糸の発育を確認するというものであり、糸状菌 10 に対する抗菌剤の抗菌評価ができるという作用を有する。

【0040】

以下、本発明の実施の形態について図面を参照しながら説明する。

【0041】

(実施の形態 1)

被験材料の糸状菌を選択的に増菌培養させる培地で、好ましくは PDA 培地または GP 培地または SCD 培地で 6 ~ 72 時間、糸状菌増殖に適した温度で好ましくは 20 ~ 25 度培養した後、図 1 に示すように微多孔膜 1 と押さえリング 2 とベース 3 からなる微多孔膜支持体 4 (松下エコシステムズ製ろ過チップ) に被験材料を所要時間培養した培養液をろ過し、糸状菌が捕集されている側に生死細胞もしくは生細胞を発色させる化合物をろ過して、発色受光レンズを有する微生物計測装置 (図示せず) で糸状菌を撮像する。また、糸状菌が捕集されている側に生死細胞もしくは生細胞を蛍光させる化合物をろ過して、励起光を照射する光源と、励起光によって蛍光した光を受光する蛍光受光レンズを有する微生物計測装置 (図示せず) で糸状菌を撮像する。 20

【0042】

そして、図 2 に示すように撮像 5 をした画像を輝度測定 6 により発光点の輝度を測定し、基準の輝度値を境に 2 値化 7 をして基準値以上の輝度値がある発光点を輝点化し、形状判断 8 で輝点化された形状の面積と糸状菌特有の分岐点を認識してその発光が糸状菌か否かを判断し、糸状菌と判断した輝点を計量 9 する。これにより画像解析手段 10 を使用して糸状菌の特徴的な形状である菌糸の分裂などを認識し解析させることにより、糸状菌 30 以外の微生物または被験材料中の夾雑物を誤って計量 9 しないようになり、微多孔膜 1 に捕集された糸状菌を精度よく計量 9 することが可能となる。

【0043】

上記構成において、被験材料中における糸状菌の陰陽性判別を行う糸状菌計量方法を提供できる。

【0044】

また、微多孔膜 1 のポアサイズを細菌または夾雑物が通過し、培養された糸状菌が通過しないポアサイズの微多孔膜 1 で好ましくは 10 ~ 30 μm のポアサイズの微多孔膜 1 を使用することにより、図 3 に示すような糸状菌以外の微生物 11 または被験材料中の夾雑物 12 が微多孔膜 1 を通過し微多孔膜上には培養された糸状菌 13 が捕集されるようになり糸状菌以外の微生物 11 または被験材料中の夾雑物 12 の影響を受けずに精度よく糸状菌 13 を計量することができ、また、微多孔膜 1 のポアサイズを大きくすることで被験材料中の夾雑物 12 の影響でろ過が困難であった被験材料のろ過性が容易になり、大量ろ過することが可能となる。 40

【0045】

(実施の形態 2)

実施の形態 1 と同一部分は同一番号を附し詳細な説明は省略する。

【0046】

被験材料を、図 1 に示すように微多孔膜 1 と押さえリング 2 とベース 3 からなる微多孔膜支持体 4 に被験材料をろ過し、図 4 に示すように糸状菌 13 が捕集されている反対側に 50

糸状菌 13 を選択的に増菌培養させる培地 14 で、好ましくは P D A 培地または G P 培地または S C D 培地を付着させ、6 ~ 72 時間、糸状菌増殖に適した温度で好ましくは 20 ~ 25 で培養した後、培地 14 を除去し生死細胞もしくは生細胞を発色もしくは蛍光させる化合物をろ過して、微生物計測装置（図示せず）で糸状菌 13 を撮像 5 する。なお使用する培地 14 は培養中に微多孔膜 1 の糸状菌 13 が捕集されている側に培地 14 が漏れてくるのを防止する為に増粘剤を含有させ培地 14 に粘性を持たせた液体培地を使用することで、培地成分が均等に微多孔膜 1 に密着し、また、微多孔膜 1 の糸状菌 13 を捕集した面に培地 14 が漏れ出すのを防ぎ培養効果を高めることができる。また、10 ~ 30 μ m の微多孔膜 1 は励起光を照射すると糸状菌 13 の発光以上に背景である微多孔膜 1 が反射するため、糸状菌 13 と背景の区別がつかなくなる。そのため、背景消光効果を有する墨汁を微多孔膜 1 にろ過することで反射を抑えることが可能となる。

【0047】

そして、図 3 に示すように撮像 5 した画像を画像解析手段 10 で解析し、糸状菌 13 の特徴的な形状である菌糸の分裂などを認識し解析させることにより、糸状菌 13 以外の微生物コロニーまたは被験材料中の夾雑物 12 を誤って計量 9 しないようになり、微多孔膜 1 に捕集された糸状菌 13 を精度よく計量 9 することが可能となる。

【0048】

上記構成において、被験材料中に存在した元々の糸状菌 13 の菌数を計量 9 することができる糸状菌計量方法を提供できる。

【産業上の利用可能性】

【0049】

培養した被験材料を微多孔膜にろ過するか、もしくは被験材料を微多孔膜にろ過した後に培養することにより被験材料中に糸状菌が存在したかどうか、もしくは被験材料中に存在する糸状菌数を従来よりも短時間で計量することができ、食品分野、医薬品分野、化成分野における糸状菌の出荷検査において適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図 1】本発明の実施の形態 1 と 2 の微多孔膜支持体を示す全体断面図

【図 2】本発明の実施の形態 1 の画像解析手段を示すフローチャート

【図 3】本発明の実施の形態 1 と 2 の微多孔膜上を撮像した模式図

【図 4】本発明の実施の形態 2 の微多孔膜支持体を示す全体断面図

【符号の説明】

【0051】

- 1 微多孔膜
- 2 押さえリング
- 3 ベース
- 4 微多孔膜支持体
- 5 撮像
- 6 輝度測定
- 7 2 値化
- 8 形状判断
- 9 計量
- 10 画像解析手段
- 11 糸状菌以外の微生物
- 12 夾雑物
- 13 糸状菌
- 14 培地

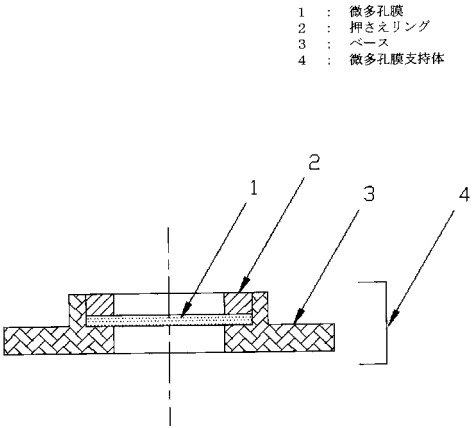
10

20

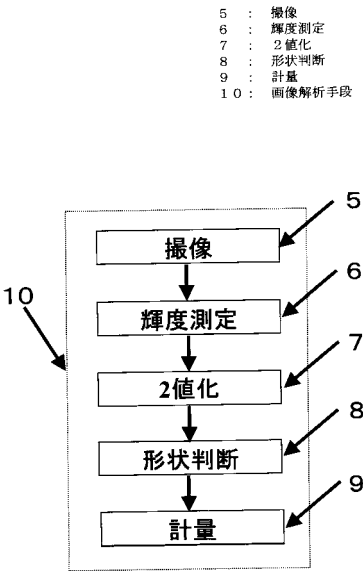
30

40

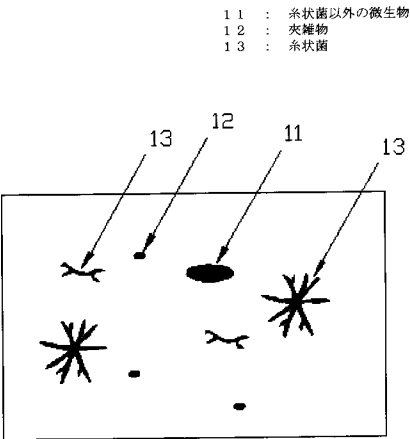
【 図 1 】



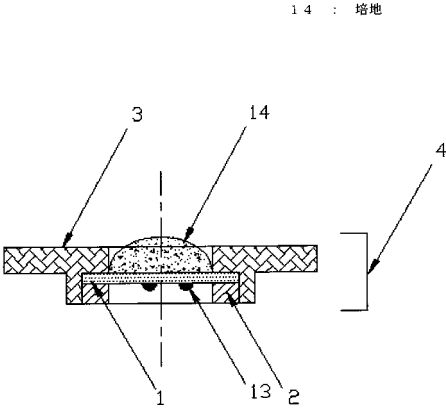
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 島北 寛仁

愛知県春日井市鷹来町字下仲田 4 0 1 7 番 松下エコシステムズ株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA17 CA05 DA02 EA01 FA01 GA08 GB21 LA03 NA05

4B063 QA01 QQ07 QR51 QR68 QR69 QS12 QS24 QS39 QX01