

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3732180号
(P3732180)

(45) 発行日 平成18年1月5日(2006.1.5)

(24) 登録日 平成17年10月21日(2005.10.21)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34 B
G O 1 N 21/77 (2006.01)	C 1 2 M	1/34 D
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N	21/77 D
G O 1 N 33/483 (2006.01)	G O 1 N	21/78 Z
請求項の数 14 (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-542042 (P2002-542042)	(73) 特許権者	503169873
(86) (22) 出願日	平成13年11月8日 (2001.11.8)		バイオゲム オプティカル リミティッド
(65) 公表番号	特表2004-513628 (P2004-513628A)		イスラエル, テルアビブ 68012, カ
(43) 公表日	平成16年5月13日 (2004.5.13)		ウフマン ストリート 2, テキスタイル
(86) 国際出願番号	PCT/IL2001/001040		センター, ピー. オー. ボックス 50
(87) 国際公開番号	W02002/038724		207
(87) 国際公開日	平成14年5月16日 (2002.5.16)	(74) 代理人	100094145
審査請求日	平成15年6月13日 (2003.6.13)		弁理士 小野 由己男
(31) 優先権主張番号	139593	(74) 代理人	100106367
(32) 優先日	平成12年11月9日 (2000.11.9)		弁理士 稲積 朋子
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)	(72) 発明者	ショウ, エリッヒ
			イスラエル, アシュケロン 78190,
			マークズ ナフティ, ピー. オー. ボッ
			クス 9002
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 生菌検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 液体ゾルゲルプリカーサ内に組み入れられた1つまたは複数の標識を含む液体組成物を準備するステップと、

b) 前記液体組成物を、薄い均一層として透明なスライドにコーティングするステップと、

c) 分析すべき液体試料をフィルタに通し、該フィルタを得られたゾルゲルコーティングスライドに密着させることにより、前記液体試料から微生物を分離するステップと、

d) 前記フィルタおよび前記ゾルゲルコーティングスライドを、微生物による1つまたは複数の標識の取込みを促進するのに適した時間および温度にて、同時にインキュベートするステップと、

e) 微生物が取込んだ標識から検出可能なシグナルを発生させるために、前記ゾルゲルコーティングスライドを外部エネルギーで照射するステップと、

f) 前記微生物が発する前記検出可能なシグナルの画像を取得し、前記画像をコンピュータシステムで分析して、前記微生物の同定および計数を行うステップと、を含む生菌を検出および計数する方法。

【請求項 2】

微生物が細菌である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

エネルギーがUV光である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

微生物が、水、乳、食品、唾液、尿、咽喉培養試験、創傷、痰、胃内容物または糞便から分離されたものである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 5】

標識が、3 - カルボキシウンベリフェリル β - D - ガラクトピラノシド、4 - クロロメチル - 6 , 8 - ジフルオロウンベリフェリル β - D - ガラクトピラノシド、4 - メチルウンベリフェリル β - D - ガラクトピラノシド、フルオレセインジ β - D - ガラクトピラノシド、6 , 8 - ジフルオロ - 4 - メチルウンベリフェリル β - D - グルクロニドリチウム塩、2 - ドデシルレゾルフィン、E 1 f - 9 7、フルオレセインジ - β - グルクロニド、5 - (ペンタフルオロベンゾイルアミノ) フルオレセインジ - β - D - グルクロニド、および β - トリフルオロメチルウンベリフェリル β - D - グルクロニドからなる群から選択される請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 6】

標識が、それ自体に抗生物質を付着または結合させて、抗生物質を含有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7】

抗生物質が、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、ポリミキシン、ナリジクス酸、ノボピオシン、トリメトプリム、リファンピシン、ペニシリンからなる群から選択される請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

20

標識が、リポソーム；フィルム；多分子層、網状、層状、葉状、螺旋状、管状および線維状の形状物；溶媒和したロッド；溶媒和したコイル；又はこれらの組み合わせとして提供される請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 9】

ピリジンまたは K_2SO_4 を含む請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

計数される微生物の数が 10^3 ml^{-1} 未満である請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 11】

ゾルゲルコーティングスライドおよびフィルタを、30分~6時間にわたり35~44で同時にインキュベートする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 12】

標準フレームグラバと、アレイ状 CCD カメラと、光学システムと、機械的 x y テーブルと、自動焦点システムと、蛍光灯発生源とを含む細菌計数システムを利用する請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

フレームグラバを、速度 30 フレーム / 秒、フレームサイズ $640 \times 480 \text{ pixel}$ で用いる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の方法を用いて微生物を同定および計数するために、少なくとも 1 つの標識を含む均一多孔質物質を使用する方法。

40

【発明の詳細な説明】

(技術分野)

本発明は、多孔質ゾルゲルガラス内に取込まれた有機または無機物質を用いて、低濃度の生菌を迅速に検出および計数するための方法および組成物に関する。

(発明の背景)

微生物検出の研究では、安価で、迅速に、かつ高い信頼性および感度で検出できる検出装置を開発することが主な目的である。現在、微生物の検出には標準的な実験室検査を利用することができる。この検査の大半は、特定の微生物を一定時間増殖させる寒天培地を利用するものであり、通常、その培養には 24 ~ 48 時間必要であり、培養して微生物を増

50

殖させると、その存在を同定および定量化することができるようになっている。

【0001】

こうした既存試験の場合、結果を得るために長い時間を要することが最大の問題である。例えば、水源が細菌で汚染されていることがわかった場合、その水源およびシステムを運転停止して、より価格の高い、別の水供給源を利用しなければならない。運転停止期間をより短くするには、微生物を迅速に検出しなければならない。医療分野では、抗生物質の投与を行うには必ず、細菌の同定および抗生物質感受性試験が必要であり、その試験結果を得るまでに72～96時間かかる。この時間を短縮できれば、悪化を食い止め、患者を早く回復させることができる。食品および飲料業界では、原料および加工品を細菌汚染について日常的に検査している。試験結果を得るまでの培養時間が長いため、工程処理を迅速に行えず、品物の製造にも供給にも遅れが生じてしまう。培養時間を短縮できれば、インフラ基盤および労働力の節約を図ることができる。

10

【0002】

この数年、細菌を1時間半～11時間で同定および計数するための方法がいくつか開発された。しかし、比較的単純な方法では大量の細菌(1ml試料当たり 10^4 以上)が必要であり、少量の細菌でも検出できる方法となると、今のところ高価で、大規模システムとしての利用が難しい。

米国特許第5,811,251号に、CCDシステムに基づいて生菌数を計数するシステムが開示されている。しかし、このシステムは、細菌の種類を区別することができないため、細菌の総数しか得られない。米国特許第5,972,641号および同第5,518,894号には、細菌数を決定するために統計学的方法を用いる迅速な腸内細菌検出システムが開示されている。この方法の場合、細菌数が少ないと、結果を得るまでに11時間かかる。他の特許(米国特許第5,891,394号、同第5,858,697号、同第5,763,203号、同第5,751,839号および同第5,663,057号)には、蛍光およびレーザ発生源を用いる微生物検出方法が開示されている。これらの方法の欠点は、高価なレーザ発生源を使用すること、および、平滑ではないフィルタから微生物を直接検出するため、分析時に問題が起こることである。また、これらのシステムは携帯式ではなく、比較的価格も高い。

20

【0003】

イムノアッセイ方法も、特定種類の微生物検出に用いられている(Lee他著、App. Environ. Microbiol. Vol. 56, 1541～1546頁)。イムノアッセイ方法では、蛍光染料または放射性染料で標識化した特異抗体標識を用いて微生物を検出する。しかし、イムノアッセイ方法は、対象微生物ごとに抗体を生成しなければならないため、時間および費用がかかるという点で制約がある。

30

「ゾルゲル」は、金属酸化物を基に室温で製造される無機ガラスを指す用語である。その具体的処理には、セラミック材料のゾル(溶液)が加水分解、縮合および重合を経てゲル相に転換するステップが含まれる。このゾルゲル調製に一般に使用される出発原料は、有機無機ハイブリッドシリカまたは金属酸化物である。近年、ゾルゲル法は有機シランに適用されて、「室温ガラス」が形成されるようになった。ゾルゲル型材料は、数十オングストローム～数十ナノメートルの孔を含むため、その質量に対する面積比は、例えば1グラム当たり数百平方メートルという大きさとなっている。このゾルゲル材料は、UV波長に対しても透過性であり、粉末、モノリシックブロック、薄いシート、ファイバなどのさまざまな形状に容易に調製することができる。

40

【0004】

さまざまな有機分子を基質培地内に取込むためにゾルゲル法による材料を使用することが、当技術分野においてこれまでに記載されている(Avnir他著、「Supramolecular Architecture in two and three dimensions」、Bein T. 編集、American Chemical Society Symposium Series XXX、1992年)。この技法を用いると、比較的影響を受け易い有機分子の構造を損なうことなく、有機分子を室温にてゾル

50

ゲル基質内に取込むことができる。また、取込まれた分子は、本来の物理学的および化学的性質をほとんどすべて保持しているため、ゾルゲル内の多孔構造を用いて、その分子を外部反応物に利用することができる。

【0005】

米国特許第6,022,748号には、表面に分析物を選択的に結合させ、それに対応する色の変化を利用して分析物を直接検出する方法が開示されている。この検出は、ゾルゲル法を用いて金属酸化物ガラス内に包囲された固定化生体高分子材料内で行われる。この方法の欠点は、ゾルゲル内で目に見える色の変化を起こすことができるのは細菌が多い場合のみであるため、大量の細菌しか検出または計数できないということである。さらに、この方法では、微生物の生死とは無関係に、ゾルゲル表面に対するその微生物の結合を基

10

【0006】

Armonら(J. of Biotechnology 51, 279~285頁)は、特殊化合物にドーブしたゾルゲル上に大腸菌を塗り、大量の大腸菌を検出する方法を開示している。その化合物は、細菌内に取込まれると、特定波長にて細菌を光らせるものである。しかし、これは、所与試料に含まれる細菌を計数するには適した方法ではない。また、この方法では、微生物が少量の場合、これを検出することができない。

このように、当技術分野はこれまでのところ、微生物濃度が低くても信頼できるカウント数を得られる程度に十分に感度が高く、迅速な微生物計数方法を提供できていない。

【0007】

20

そこで、本発明の1つの目的は、生菌を検出するための迅速かつ感度の高い方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、少ない試料内に見られる微生物の計数に有用な方法および組成物を提供することである。

本発明の他の目的および利点は、以下の記載により明らかになるであろう。

(発明の概要)

驚くべきことに、多孔質ゾルゲルガラス内に取込んだ有機または無機物質(以下、便宜上「標識」とする)を用いると、濃度が 10^3 ml^{-1} 未満の生菌を2時間で検出および計数できることがわかった。これが本発明の1つの目的である。

【0008】

30

本発明は、多孔質ゾルゲルガラス内に組み入れられた有機または無機物質(標識)を用いて、生菌を検出および計数する方法および組成物に関する。この微生物は、その標識を代謝させて、検出可能な放射線または蛍光を発するものである。したがって、ゾルゲルガラス上で、生菌を迅速に視覚化することができる。ゾルゲル表面は極めて平滑で透明であるため、高解像度の顕微鏡走査用にはほぼ均一な焦点が得られる。

本発明の一好適実施形態によれば、a)液体ゾルゲルプリカーサ内に組み入れられた1つまたは複数の標識を含む液体組成物を準備するステップと、b)その液体ゾルゲルプリカーサ組成物を、薄い均一層としてガラススライドなどの透明スライドにコーティングするステップと、c)分析対象である試料をフィルタに通し、そのフィルタをゾルゲルコーティングスライドに密着させることにより、その液体試料から微生物を分離するステップと、d)フィルタとゾルゲルコーティングスライドとを、35~44℃で30分~6時間など、微生物による標識(1つまたは複数)の取込み促進に適した時間および温度にて、同時にインキュベートするステップと、e)微生物が取込んだ標識から検出可能なシグナルを発生させるために、前記ゾルゲルコーティングスライドを外部エネルギーで照射するステップと、f)微生物が発した検出可能シグナルの画像を取得し、その画像をコンピュータシステムで分析して、その微生物の同定および計数を行うステップとが実行される。

40

【0009】

本発明はさらに、有機または無機物質(標識)を含有する液体ゾルゲル混合物を調製する方法に関する。この標識は、同定対照である微生物により代謝されるものである。

本発明により検出できる腸内細菌類は実際のところ、大腸菌、エンテロバクター属菌、ク

50

レブジエラ属菌およびサイトロバクター属菌を含む広範囲にわたる細菌群である。腸内細菌類を、蛍光発色性または色素産生性物質である3-カルボキシウンベリフェリルβ-D-ガラクトピラノシド(CUG)または4-クロロメチル-6,8-ジフルオロウンベリフェリルβ-D-ガラクトピラノシド(CMDi FUG)を用いて、酵素β-ガラクトシダーゼ(E.C.3.2.1.23)の活動を検出することにより、同定する。

【0010】

本発明によれば、蛍光発色性または色素産生性物質である4-メチルウンベリフェリルβ-D-ガラクトピラノシド(MUG)、フルオレセインジβ-D-ガラクトピラノシド(FDG)、6,8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリルβ-D-グルクロニド、リチウム塩(DiFMUGGlcU)、2-ドデシルレゾルフィン、E1f-97、フルオレセインジ-β-グルクロニド(FDGIcU)、5-(ペンタフルオロベンゾイルアミノ)フルオレセインジ-β-D-グルクロニド(PFB-FDGIcU)およびβ-トリフルオロメチルウンベリフェリルβ-D-グルクロニドを用いて、大腸菌特異酵素であるβ-グルクロニダーゼ(GUSまたはEC3.2.1.31)の活動を検出することにより、大腸菌を同定する。

10

【0011】

本発明の別の好適実施形態によれば、細菌の抗生物質耐性を確認するために、抗生物質材料をゾルゲル混合物内に組み入れる。特異抗生物質が含まれていても細菌が蛍光を発すれば、それは、その細菌が抗生物質に対して耐性であることを示していると理解されたい。特異抗生物質が含まれているために蛍光を発する細菌数が一部減少した場合には、一部耐性であることを示すことになる。クロラムフェニコール、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、ポリミキシン、ナリジクス酸、ノボピオシン、トリメトプリム、リファンピシン、ペニシリンといった抗生物質がゾルゲル混合物内に添加される。

20

【0012】

本発明によれば、リポソーム；フィルム；多分子層、網状、層状、葉状、螺旋状、管状および線維状の形状物；溶媒和したロッド；溶媒和したコイル；およびこれらの組み合わせとして、標識を提供することができる。本発明によれば、ゾルゲル内にピルビン酸塩または K_2SO_4 を組み入れることにより、損傷を受けた、または変形した微生物を検出することも可能である。ピルビン酸塩または K_2SO_4 を用いて、塩素化され損傷を受けた腸内細菌類を蘇生または回復させられることが、当技術分野において知られている(「enumeration and differentiation of chlorine-stressed total coliform bacteria」、Robert A. Duncanson著、博士論文、University of Rhode Island、1993年)。

30

【0013】

本発明によれば、細菌吸収を促進するために、ゾルゲル溶液に10~100ppmの濃度でポリリシンまたは同様の物質を添加することができる。

以上のみならず、本発明の他の特徴および利点は、好適実施形態に関する以下の例示的かつ非制限的实施例から、より明白になるであろう。

(好適実施形態の詳細な説明)

40

一好適実施形態によれば、本発明による細菌計数システムは、図1に示す構成要素を含む。すなわち、全体を(1)として示した、コンピュータに連結されている標準フレームグラバ、処理および制御ソフトウェア、およびモータおよび照明制御装置と、フレーム速度が30fpsであり、フレームサイズが640×480である、標準アレイ状CCDカメラ(2)と、400および/または1000倍の倍率であり、自動焦点システムを備えた落射蛍光または蛍光顕微鏡(3)と、光源(4)と、ビームスプリッタ(5)と、機械的xyテーブル(6)と、テーブル(6)上に配置されたフィルタ(7)とを含む。

【0014】

本発明の別の好適実施形態では、標準CCDシステムではなく、512pixel×512pixelのフレームサイズで、135フレーム/秒の速度に相当する、ラインサイズ

50

が 512 pixel で、ライン速度が 70 kHz であるライン式 CCD カメラと、特注信号同期化ハードウェアと、特注デジタル/アナログ信号処理ハードウェアとを含む CCD ライン手法を用いる。

便宜上、また本明細書内にて開示および請求している本発明の内容を理解し易くするために、以下で用いる略語を次のように定義する。

C F U : コロニーの形成単位

M U G : 4 - メチルウンベリフェリル β - D - ガラクトピラノシド

F D G : フルオレセインジ β - D - ガラクトピラノシド

C U G : 3 - カルボキシウンベリフェリル β - D - ガラクトピラノシド

(実施例 1)

ゾルゲルコーティングを施したガラススライドの準備

標準顕微鏡用スライドを石鹼水の中で 30 分間静かにゆすって洗浄した後、水道水ですすぎ、3 回蒸留した蒸留水でさらにすすぐ。次にこのスライドを培養器内にて (36 $^{\circ}$ で) 一晚乾燥させる。こうして洗浄した顕微鏡用スライドを使用するまで柔らかい紙で包んでおく。

【 0015 】

ゾルゲル薄膜調製用の基準出発溶液を、純ピリジン 0.9 ml + C U G 溶液 (100 mM) 0.2 ml + H₂O 0.1 ml とし、これを 1 分間攪拌した (小型磁石による) 。基質が完全に溶解しなかった場合、混合物の上方相のみを使用した。この溶液 0.8 ml を、メチルトリメトキシシラン (F l u k a 製 M T M S) 0.4 ml と混合した。この溶液全体を、さらに 2 分間磁気攪拌器でよく混合した。反応を開始させるために、H C l 0.1 M の 30 μ l をこの溶液に添加して、5 分間磁気攪拌器で混合した。

【 0016 】

次に、この溶液 40 μ l を、極細ピペットを用いてスライドに載せ、スピンコーティングによりガラス全体に均一に延ばした。こうしてコーティングを施したガラスを暗所で 24 時間、乾燥条件下にて室温で乾燥させた。この最初の乾燥を終了した後、得られたゾルゲルコーティングスライドをアルミ箔で包囲し、冷所で保存した。

(実施例 2)

4' - 6 - ジアミノ - 2 - フェニルインドール 0.1 ml を 0.016 mg / ml の濃度で用いて、実施例 1 を繰返したところ、実施例 1 と同様の結果が得られた。

【 0017 】

(実施例 3)

大腸菌の同定および計数

大腸菌の培養菌を、24 時間 36 $^{\circ}$ にて培養液内で増殖させた。細菌数 10^8 / ml の見積り濃度で細菌を植付けた溶液を無菌蒸留水で調製した。見積り濃度を細菌数 10^9 / 100 ml、細菌数 10^8 / 100 ml、細菌数 10^7 / 100 ml、細菌数 10^6 / 100 ml、細菌数 10^5 / 100 ml とする一連の溶液を調製した (各溶液につき 350 ml) 。

【 0018 】

水試料内で並行してメンブレンフィルタ法による試験を行い、すべての細菌濃度を確認した。この試験は、溶液を無菌プラスチック瓶内にて無菌蒸留水で正確に 1 : 10^8 まで希釈して行った。

所与試料内の細菌をカウントするため、その水試料をまず M i l l i p o r e 製フィルタ (0.47 μ m、13 mm) を通して濾過した。次に、M i l l i p o r e 製フィルタを逆さまにしてゾルゲル表面上に配置した。フィルタとゾルゲルとを完全に接触させるために、微量の無菌水 (10 μ l) をフィルタ上に載せ、圧力 (最大 0.5 kg / cm²) をかけた。

【 0019 】

次に、24 時間 36 $^{\circ}$ にて、湿気のある容器 (フィルタが渴いてゾルゲルから離れてしまわないように、湿らせたワットマン (W a t t m a n) パッドを入れた大型ペトリ皿から

10

20

30

40

50

なる)内でゾルゲルと共に細菌をインキュベートした。ミリポア製フィルタを廃棄し、スライドを、10～15分間44.5にて乾燥させた。

細菌を計数するため、LP420フィルタを使用した400倍顕微鏡システム(落射蛍光照明システムおよび50w水銀ランプを備えたZeiss製AxioLab)でゾルゲルスライドを観察した。自然蛍光を発する藻類があると、計数結果に誤差が生じる可能性があるため、この藻を排除するため、特定光波長を用いた(例えば、LP420フィルタ)。

【0020】

ゾルゲルコーティングスライド上の5箇所を無作為に選んで、蛍光スポット写真を撮影した。図2は、ゾルゲル表面上の大腸菌を写した400倍写真である。次に、画像処理ソフトウェア(Media Cubernetics製Image-Pro Plus)を用いて、蛍光スポット数をカウントした。分析から得られたカウント数を表1に示す。

【0021】

【表1】

試験番号	初期腸内細菌数 (CFU/1ml)	写真番号	カウントされた 蛍光スポット数 (単位)	見積り細菌数 (CFU/1ml)	平均細菌数 (CFU/1ml)
1	10^6	1	550	980,000	1,014,000
		2	500	890,000	
		3	600	1,070,000	
		4	575	1,020,000	
		5	625	1,110,000	
2	10^5	1	57	83,000	96,800
		2	56	99,000	
		3	50	89,000	
		4	58	103,000	
		5	62	110,000	
3	10^4	1	5	8,900	9,600
		2	6	10,700	
		3	8	14,200	
		4	5	8,900	
		5	3	5,300	

顕微鏡で観察する面積がわかっているため、各スライドでカウントされた蛍光スポット数から、もとの溶液内に含まれていた細菌の初期量を正確に見積もることができる。

(実施例4)

Image-Pro Plusにより蛍光スポット数を計数するためのアルゴリズムの説明

ここで説明するアルゴリズムは、ゾルゲル画像に見られる細菌を検出および計数するために用いる1例である。このアルゴリズムの目的は、期待サイズの明るいスポットを検出することである。高周波数ノイズを削減するために、低域フィルタを用いた。画像分割を行い、黒い背景上に細菌の白い斑点が浮かび上がる2値画像を導き出した。この分割は、所定の一定閾値を用いて、その閾値を単純に適用することで行った。

【0022】

この分析には、

A) 2値画像ラベリング処理を行い、細菌として認められる候補である斑点オブジェクトのリストを作成するステップと、

B) 斑点リストの各要素について、幾何学的特徴(面積、対照度など)を算出するステップと、

10

20

30

40

50

C) サイズおよび対照度が期待値範囲外であった候補を除外するステップと、
D) 幾何学的ふるいにかけた後に残った候補を計数するステップと、
が含まれる。

【0023】

上記アルゴリズムのスク립ト例を図3に示す。これは、以下のステージを含むプロセスを図示したものである。

ステージ1：高周波数ノイズを削減するために低域フィルタを使用する。

ステージ2：画像分割により、黒い背景上に細菌の白い斑点を浮かび上がらせた2値画像を作成する。この分割は、所定の一定閾値を用いて、その閾値を単純に適用することで行う。必要であれば、自動および/または動的閾値設定法による計算を用いることができる

10

。ステージ3：2値画像ラベリング処理を行い、細菌として認められる候補である斑点オブジェクトのリストを作成する。

ステージ4：斑点リストの各要素について、幾何学的特徴（面積、対照度など）を算出する。

ステージ5：サイズおよび対照度が期待値範囲外であった候補を除外する。

ステージ6：幾何学的ふるいにかけた後に残った候補を計数する。

【0024】

以上、例示を目的として、本発明の特定実施形態について説明してきたが、当業者であれば、本発明の趣旨および請求の範囲を逸脱することなく、さまざまな修正、変形および変更を加えて本発明を実施できることを理解されたい。

20

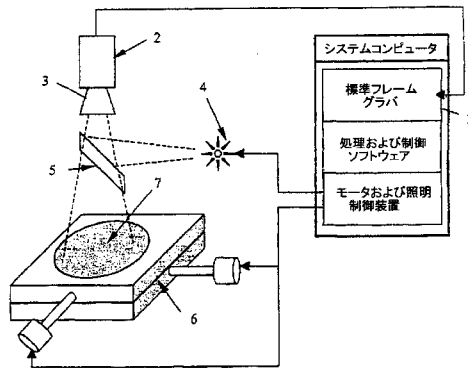
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一好適実施形態による、微生物を同定および計数するシステムを示す図である。

【図2】 ゼルゲル表面に見られる大腸菌を示す、400倍蛍光写真である。

【図3】 本発明の一好適実施形態によるプロセスを示すフローチャートである。

【図 1】



【図 2】

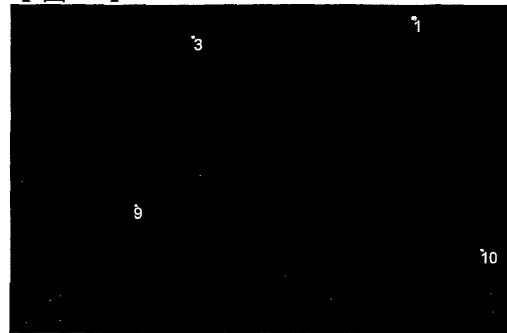
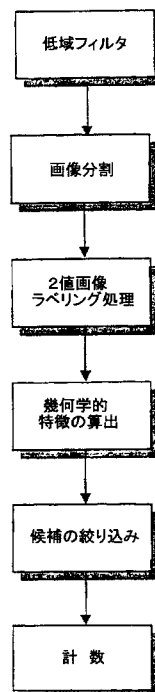


Fig. 2

【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/483 C

(72)発明者 ロビン,ジャン クロード
フランス,アンギアン-レ-パイン エフ-95800,ブルーバード ドゥ ラック,28

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特表平11-500223(JP,A)
特開平06-122521(JP,A)
特表平11-505405(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12Q 1/00-70
G01N 33/50-98
C12N 1/00-7/08
C07K 1/00-16/46
PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)