

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6201285号
(P6201285)

(45) 発行日 平成29年9月27日(2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日(2017.9.8)

(51) Int. Cl. F I
 C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 M 1/34 D
 C 1 2 Q 1/06 (2006.01) C 1 2 Q 1/06

請求項の数 7 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2012-185523 (P2012-185523)	(73) 特許権者	000001812 株式会社サタケ 東京都千代田区外神田4丁目7番2号
(22) 出願日	平成24年8月24日(2012.8.24)	(74) 代理人	110001151 あいわ特許業務法人
(65) 公開番号	特開2014-42463 (P2014-42463A)	(72) 発明者	中田 明子 東京都千代田区外神田四丁目7番2号 株 会社サタケ内
(43) 公開日	平成26年3月13日(2014.3.13)	(72) 発明者	伏田 真矢 東京都千代田区外神田四丁目7番2号 株 会社サタケ内
審査請求日	平成27年7月7日(2015.7.7)	(72) 発明者	江藤 聡 東京都千代田区外神田四丁目7番2号 株 会社サタケ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の検査方法及びその装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

船舶から排出されるバラスト水に含まれて生存している微生物の許容個体数を、試料として採取した試料容器内の水中に存在する微生物数によって推定し、前記バラスト水の排水基準を満たすか否かを測定するための微生物の検査装置であって、

光を透過する材質で形成されたバッチ式の試料容器に試料と蛍光染色試薬とを添加して試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合手段と、

該攪拌混合手段により前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を連続的に照射させる光源を備えた励起光源と、

該励起光源からの励起光により蛍光発光された光を検知する受光手段と、

該受光手段により検知した光を電気信号に変換して所定の受光範囲を微生物が通過した時に発生する発光数を検出してカウントし、該発光数から前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する制御手段と、

該制御手段に電氣的に接続されている操作部と、を備え、

該操作部は、測定対象となる微生物のサイズを切り換え可能な設定ボタンを含むことを特徴とする微生物の検査装置。

【請求項2】

前記励起光源は、前記試料容器の被照射面に対して直交した励起光が入射されるように配設する一方、前記受光手段は、その受光面が前記励起光源の励起光と直交した角度で蛍光発光が受光されるように配置されている請求項1記載の微生物の検査装置。

【請求項 3】

前記受光手段と前記試料容器との間には、観察範囲を規制するためのスリットを設けてなる請求項 1 又は 2 記載の微生物の検査装置。

【請求項 4】

前記励起光源と前記試料容器との間には、光源からの拡散光を一面に向かって同じ角度で均一に照射される平行光に変換する平行光変換手段を設けてなる請求項 1 から 3 のいずれかに記載の微生物の検査装置。

【請求項 5】

前記平行光変換手段が、所定厚さの平板に所定径のねじ切孔を穿設して形成したものである請求項 4 記載の微生物の検査装置。

10

【請求項 6】

前記平行光変換手段が、凸レンズで形成したものである請求項 4 記載の微生物の検査装置。

【請求項 7】

船舶から排出されるバラスト水に含まれて生存している微生物の許容個体数を、試料として採取した試料容器内の水中に存在する微生物数によって推定し、前記バラスト水の排水基準を満たすか否かを測定するための微生物の検査方法であって、

測定対象となる微生物のサイズを設定するサイズ設定工程と、

バッチ式の試料容器内で試料に蛍光染色試薬を添加した試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合工程と、

20

前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を連続的に照射する励起工程と、

前記励起光により蛍光発光した微生物の蛍光をカウントする受光工程と、

該受光工程により検出した、所定の受光範囲を微生物が通過した時に発生する発光数から試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する

微生物数推定工程と、を備えたことを特徴とする微生物の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物の検査方法及びその装置に関し、特にバラスト水等に含まれて生存しているプランクトン等の微生物を検出するのに適した微生物の検査方法及びその装置に関する。

30

【背景技術】

【0002】

荷物を積載していない船舶は、当該船舶を安定させるためにバラスト水を搭載して航行し、荷物を積載する海域において前記バラスト水を排出する。

バラスト水は、通常、搭載する海域と異なる海域に排出されるため、該バラスト水に含まれるプランクトンや細菌等の微生物を本来の生息地以外の海域に運び、生態系を破壊する等の問題を引き起こす虞がある。

【0003】

40

このような問題に対処するため、バラスト水の規制に関する国際的なルールが策定され、「船舶のバラスト水および沈殿物の規制および管理のための国際条約（バラスト水管理条約）」が採択されている。

【0004】

上記バラスト水管理条約に関連する「バラスト水サンプリングに関するガイドライン（G2）」は、「バラスト水排出基準（D-2）」において、船舶から排出されるバラスト水に含まれて生存している微生物の許容個体数を、例えば、最小サイズが 50 μm 以上の微生物（以下、「Lサイズ生物」という。）については 10 個 / m^3 以下、最小サイズが 10 μm 以上 50 μm 未満の微生物（以下、「Sサイズ生物」という。）については 10 個 / mL 以下と、前記微生物の最小サイズにより区分して規定している。

50

【 0 0 0 5 】

現在までに、上記バラスト水を排出する際に上記排出基準を満たしているか否かを確認するための手法として、送水ポンプで汲み上げた海水をフローセルに通水して画像計測するもの（例えば、特許文献 1）、送水ポンプで汲み上げた海水を目開きの異なるフィルタユニットに通水してフィルタ上の微生物を発光させて微生物を計数するもの（例えば、特許文献 2）などの微生物検査装置が知られている。

【 0 0 0 6 】

上記特許文献 1 に記載の微生物検査装置によれば、液体の検体を流しつつ該検体中に存在する生細胞を持つ生物を染色する染色部と、前記染色が施された検体を流しつつ前記生物の濃度を高めるように濃縮する濃縮部と、前記濃縮された検体中の前記生物を含む個体の画像情報を取得する個体計測部と、前記個体計測部より出力された前記個体の画像情報より前記生物の測定を行う制御手段とを備えたことを特徴とするものである。

10

これにより、検体の液体中の生物の染色工程、液体中の生物の濃縮工程、液体中の生物の情報取得の工程等をフロー方式で行えるため、各方式をバッチ方式で行う手法と比べて、ひとつの工程を終えた検体の一部が次の工程に進むまでの待機時間を大幅に短縮、または 0 とすることができ、待機時間での染色の状態の劣化を防ぐ意味で安定した生物の生死の情報を取得することができるといったメリットがある。

【 0 0 0 7 】

しかしながら、上記特許文献 1 記載の微生物検査装置にあつては、送水ポンプで汲み上げた海水を各種工程に順次通水させるものであり、装置が大掛かりとなり、また、製造コスト高となる問題がある。そして、各種工程に順次通水させて待機時間が短縮されるものであるが、測定が完了するには少なくとも数時間かかるといった問題がある。

20

【 0 0 0 8 】

また、上記特許文献 2 に記載の微生物検査装置は、海水を目開きの異なる 3 種のフィルタを直列に配置してなるフィルタユニットに通水する工程と、フィルタに補集され生存している微生物による発色、発光および蛍光のうちいずれかを発生させる工程と、発色、発光および蛍光のうちいずれかを検出して画像解析によってバラスト水または海水中の微生物数を計数する工程とをそなえたことを特徴とするものである。

これにより、段階的なサイズごとの微生物の捕捉を実現でき、その結果、サイズごとの基準で規制された許容残存基準を満たしているかどうかを迅速に測定できるといったメリットがある。

30

【 0 0 0 9 】

しかしながら、特許文献 2 記載の微生物検査装置にあつても、特許文献 1 と同様に送水ポンプで汲み上げた海水を各種工程に順次通水させるものであり、装置が大掛かりとなり、製造コスト高になる問題点があった。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 9 - 8 5 8 9 8

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 7 - 1 3 5 5 8 2

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

本発明は上記問題点にかんがみ、バッチ式の測定セルを利用することにより、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で、しかも高精度に測定することができる微生物の検査方法及びその装置を提供することを技術的課題とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

上記課題を解決するため本発明は、船舶から排出されるバラスト水に含まれて生存している微生物の許容個体数を、試料として採取した試料容器内の水中に存在する微生物数に

50

よって推定し、前記バラスト水の排水基準を満たすか否かを測定するための微生物の検査装置であって、光を透過する材質で形成されたバッチ式の試料容器に試料と蛍光染色試薬とを添加して試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合手段と、該攪拌混合手段により前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を連続的に照射させる光源を備えた励起光源と、該励起光源からの励起光により蛍光発光された光を検知する受光手段と、該受光手段により検知した光を電気信号に変換して所定の受光範囲を微生物が通過した時に発生する発光数を検出してカウントし、該発光数から前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する制御手段と、該制御手段に電気的に接続されている操作部と、を備え、該操作部は、測定対象となる微生物のサイズを切り換え可能な設定ボタンを含む、という技術的手段を講じた。

10

【0013】

また、請求項2記載の発明は、前記励起光源が、前記試料容器の被照射面に対して直交する励起光が照射されるように配置する一方、前記受光手段が、前記励起光源の励起光と直交した角度で蛍光発光を受光する受光面が配置されていることを特徴とする。

【0014】

そして、請求項3記載の発明は、前記受光手段と前記試料容器との間に、観察範囲を規制するためのスリットを設けたことを特徴とする。

【0015】

さらに、請求項4記載の発明は、前記励起光源と前記試料容器との間に、光源からの拡散光を一面に向かって同じ角度で均一に照射される平行光に変換する平行光変換手段を設けたことを特徴とする。

20

【0016】

そして、請求項5記載の発明は、前記平行光変換手段が、所定厚さの平板に所定径のねじ切孔を穿設して形成したものであることを特徴とする。

【0017】

請求項6記載の発明は、前記平行光変換手段が、凸レンズで形成したものであることを特徴とする。

【0018】

請求項7記載の発明は、船舶から排出されるバラスト水に含まれて生存している微生物の許容個体数を、試料として採取した試料容器内の水中に存在する微生物数によって推定し、前記バラスト水の排水基準を満たすか否かを測定するための微生物の検査方法であって、測定対象となる微生物のサイズを設定するサイズ設定工程と、バッチ式の試料容器内で試料に蛍光染色試薬を添加した試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合工程と、前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を連続的に照射する励起工程と、前記励起光により蛍光発光した微生物の蛍光をカウントする受光工程と、該受光工程により検出した、所定の受光範囲を微生物が通過した時に発生する発光数から試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する微生物数推定工程と、を備えたものである。

30

【発明の効果】

【0019】

請求項1記載の発明によれば、バッチ式の試料容器に試料と蛍光染色試薬とを添加した後、攪拌混合手段により試料溶液の攪拌・混合を行い、次いで、前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を連続的に入射させ、さらに、受光手段により微生物の蛍光発光を受光するため、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することが可能となる。また、受光範囲を微生物が通過した時に発生する蛍光パルスをカウントするため、高精度で微生物を検出することが可能となる。そして、本発明の装置はバッチ式であるため装置を小型化することが可能となり、製造コストも安価となる。また、操作部に、測定対象となる微生物のサイズを切り換え可能な設定ボタンを含むようにしたことによって、種々の細部の微生物に対して測定を行うことが可能となる。

40

【0020】

50

また、請求項 2 記載の発明によれば、前記励起光源を、前記試料容器の被照射面に対して直交した励起光が入射されるように配設する一方、前記受光手段は、その受光面が前記励起光源の励起光と直交した角度で蛍光発光が受光されるように配置されているため、励起光源からの励起光が直接受光手段の受光面に入射することがなく、また、蛍光発光の厚み部分が薄くなる（例えば、図 2 のように、発光部分の幅が従来 20 mm ~ 30 mm であったものが、幅 M (3 mm) のように狭くなり、厚み部分が薄くなる。）ため、バックグラウンドと微生物の蛍光発光との光量の差異が極めて明確になり、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものとなる。

【0021】

請求項 3 記載の発明によれば、前記受光手段と前記試料容器との間に、観察範囲を規制するためのスリットを設けてあるから、ノイズとなるバックグラウンドの蛍光発光の面積が狭まるため、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものとなる。

10

【0022】

請求項 4 記載の発明によれば、前記励起光源と前記試料容器との間に、光源からの拡散光を一面に向かって同じ角度で均一に照射される平行光に変換する平行光変換手段を設けてあるから、励起光源からの励起光の広がりを抑えて、平行光で試料容器の被照射面に照射されるため、バックグラウンドの蛍光発光の厚み部分が薄くなり、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものである。

20

【0023】

請求項 5 記載の発明によれば、前記平行光変換手段が、所定厚さの平板に所定径のねじ切孔を穿設して形成したものであるから、安価な材料によって励起光源からの励起光がねじ切孔によって角度が矯正され、ねじ切孔から照射された光の指向角を狭くすることができる。このため、バックグラウンドの蛍光発光の厚み部分が薄くなるため、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものである。

【0024】

請求項 6 記載の発明によれば、前記平行光変換手段が、凸レンズで形成したものであるから、安価な材料によって励起光源からの励起光の指向角を狭くすることができる。このため、バックグラウンドの蛍光発光の厚み部分が薄くなり、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものとなる。

30

【0025】

請求項 7 記載の発明によれば、試料溶液中の微生物量を測定するための微生物の検査方法であって、測定対象となる微生物のサイズを設定するサイズ設定工程と、バッチ式の試料容器内で試料に蛍光染色試薬を添加した試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合工程と、前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を連続的に照射する励起工程と、前記励起光により蛍光発光した微生物の蛍光をカウントする受光工程と、該受光工程により検出した発光数から試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する微生物数推定工程と、を備えたものであるから、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することができる。また、受光範囲を微生物が通過した時に発生する蛍光パルスをカウントするため、高精度で微生物を検出することが可能となる。さらに、蛍光発光の厚み部分が薄くなるため、バックグラウンドと微生物の蛍光発光との光量差が極めて明確となり、微生物の蛍光発光の検出精度を向上することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】本発明の一実施形態に係る微生物の検査装置の全体を示す斜視図である。

【図 2】本発明の一実施形態に係る測定部の概略平断面図である。

50

【図 3】本発明の一実施形態に係る微生物の検査装置の全体構成を示すブロック図である。

【図 4】本発明の一実施形態に係る微生物の検査装置の測定フローを示すフロー図である。

【図 5】平行光変換手段の一実施形態を示す概略断面図である。

【図 6】スリットの有無により観察面が狭まることを示す作用図である。

【図 7】微生物の個体数と光電子増倍管 (PMT) の受光カウントとの相関関係を示すグラフである。

【図 8】微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

10

【0027】

本発明を実施するための形態を図面を参照しながら説明する。図 1 は本発明の一実施形態に係る微生物の検査装置の全体を示す斜視図であり、図 2 は本発明の一実施形態に係る測定部の概略平面断面図であり、図 3 は本発明の一実施形態に係る微生物の検査装置の全体構成を示すブロック図である。

【0028】

図 1 及び図 2 に示すように本発明の検査装置 1 は、CPU 基板などの制御機構を内蔵して測定結果等の情報処理作業や統計処理作業などを行う本体部 2 と、該本体部 2 に並設した操作ボタン等の配置構成からなる操作部 3 と、前記測定結果等を表示するために液晶パネル等で形成された表示部 4 と、光を透過する透明な材質 (例えば、ガラスや石英やアクリル樹脂等) で形成されたバッチ式の試料容器 5 を収容し、試料溶液 S 中の微生物数を光学的に計数する測定部 6 とを主要部として構成されている。符号 7 は試料容器 4 内に収容された試料溶液 S を攪拌するための回転子であり、該回転子 7 は前記試料容器 5 内に試料溶液 S 及び発光試薬とともに収容し、前記試料容器 5 を測定部 6 に収容したときに、該測定部 5 内に内蔵されたマグネティックスター 27 により回転駆動される構成となっている。これにより、試料容器 5 内の試料と発光試薬とからなる試料溶液 S を所定温度で攪拌混合しながら試料溶液 S 中の微生物数を計数することができ、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、パラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することが可能となる。

20

【0029】

図 1 に示す検査装置 1 の寸法は、幅が 300 mm、奥行が 300 mm、高さが 100 mm、重量は約 2 ~ 4 kg の範囲に形成されており、手持ちトランク (図示せず) 等に収容して、どこにでも持ち運び可能であり、船舶内での測定や、屋外での測定が可能である。

30

そして、光を透過する透明な材質で形成されたバッチ式の試料容器 5 は、底面が 50 mm x 50 mm、高さが 60 mm の角柱状に形成され、水位が 40 mm のときの内容量が 100 ml (ミリリットル) に設定されている。試料容器 5 はこのような角柱状に限定されることはなく、内容量を 100 ml (ミリリットル) 程度確保することができれば、円柱状であっても、立方体であってもよい。

【0030】

前記測定部 6 は、図 1、図 2 及び図 3 に示すように、試料容器 5 を収容して保持する試料容器収容部 9 と、前記試料容器 5 に向けて励起光を照射する光源部 13 と、該光源部 13 から照射された励起光により発光試薬に染色されて試料容器 5 内で漂っている微生物を観察するための受光部 19 とを備えている。そして、受光部 19 からは、試料溶液 S 中の微生物数を計数し、測定結果等の情報処理作業や統計処理作業などを行う CPU 基板 23 に電氣的に連絡されている。

40

【0031】

前記試料容器収容部 9 は、前記試料容器 5 の少なくとも二面を取り囲む保持プレート 8a, 8b により形成され、前記光源部 13 からの光の照射を遮断しないように前記試料容器 5 を収容保持するものである。

そして、図 2 に示すように、試料容器 5 の被照射面 G に対して法線 AP による励起光が

50

入射されるよう光源部 13 が配置される。前記光源部 13 は、前記試料容器収容部 9 近傍に配置された LED 光源 10 と、該 LED 光源 10 の前面に配置され、拡散光を平行光に変換する平行光変換手段 11 (LED は光源からランダム方向に拡散して照射される光であるため、一面に向かって同じ角度で均一に光線が当たる平行光に変換するもの)と、スリット状の平行光からなる励起光を試料容器 5 に照射する励起光用バンドパスフィルタ 12 とを備えている。

【0032】

図 5 は平行光変換手段 11 の一実施形態を示す概略断面図である。図 5 (a) に示す例は、平行光変換手段 11 として所定厚さの平板 31 に所定径のねじ切孔 32 を穿設して形成したものであり、光路長に合わせて平板 31 の厚さ L とねじ切孔の孔径とが適宜設定されている。これにより、LED 光源 10 から照射される入射角度の散乱光は、ねじ切孔 32 を通過する際には平行光に変換されるものとなる。図 5 (a) に示す例では、と L との最適条件を SN 比の試験により決定しており、例えば、M3 (ネジ孔の外径) × 0.5 (ピッチ) とすれば、が 9.5°、L が 15 mm のときが最適であった。

10

【0033】

図 5 (b) に示す平行光変換手段 11 は、LED 光源 10 の前面に凸レンズ 33 を設けたものであり、LED 光源 10 から照射された散乱光は、凸レンズ 33 内を通過して外部に出射する際には平行光に変換されるものとなる。

【0034】

なお、本実施形態の光源部 13 は、光源として LED 光源 10 を用いたが、微生物に含まれる蛍光物質を励起させることができれば、LED 光源 10 に限らず、平行光の照射が可能な平行光 LED 光源やレーザ光源や電球を採用することもできる。言うまでもないが、平行光の照射が可能な平行光 LED やレーザ光源を採用するときは、前述の平行光変換手段 11 は不要となる。

20

【0035】

そして、図 2 に示すように、前記受光部 19 は、光源部 13 からの法線 AP による励起光と直交した角度を持って受光面 F が配置されるように設けられる。また、受光部 19 は前記 LED 光源 10 から試料容器 5 に向けて励起光が照射される平行光に対し、これと直交する光軸で蛍光が受光されるように配置構成した光電子増倍管 (PMT) 14 と、該光電子増倍管 (PMT) 14 の前面に配置した蛍光用バンドパスフィルタ 15 と、該蛍光用バンドパスフィルタ 15 の前面に配置した集光用レンズ 16 と、該集光用レンズ 16 の前面に配置したスリット 17 と、該スリット 17 と前記試料容器 5 との間隙に設置され、微生物に含まれる蛍光物質を励起させ、これにより発光した蛍光を集光し結像させるためのリレーレンズ 18 と、を備えたものである。

30

【0036】

前記光電子増倍管 (PMT) 14 と試料容器 5 との間隙のスリット 17 は、観察面をスリット状に狭めるものである。すなわち、図 6 に示すように、(a) スリットなしの状態では、受光面 F が円で形成されるバックグラウンドを監視するのに対し、(b) スリットありの状態では、受光面 F が斜線を除いた縦長スリットで形成されるバックグラウンドを監視することになる。したがって、受光面 F の受光面積が (b) のように狭まる結果、ノイズとなるバックグラウンドの蛍光発光の面積も狭まるため、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するのである。

40

【0037】

なお、受光部 19 は、受光センサとして光電子増倍管 (PMT) 14 を用いた例を示したが、これに限定されることはなく、シリコンフォトダイオード (SiPD) や、アヴァランシェフォトダイオード (APD) など、光電子増倍管 (PMT) と同様に微生物に含まれる蛍光物質の発光を検知することができる各種の光検出器を採用することができる。

【0038】

さらに、図 3 を参照して、本実施形態の検査装置 1 の電氣的な制御構成を説明する。本

50

体部 2 を形成する筐体 20 内中央には、AC 電源 21 や二次電池 22 から電源の供給を受けて、前記光電子増倍管 (PMT) 14 により光から電気に変換された出力信号を解析したり、任意の輝度範囲以上にあるか否かを判定したり、任意の輝度の信号をパルスカウントしたり、前記 LED 光源 10 のオン・オフ制御などを行う CPU 基板 23 が配置されている。前記 AC 電源 21 と前記 CPU 基板 23 との間には、AC/DC 変換器 24 を介在させてある。

【0039】

前記 CPU 基板 23 には、前記光電子増倍管 (PMT) 14、前記 LED 光源 10、読み出し書き込み用記憶部となる RAM 25 及び読み出し専用記憶部となる ROM 26 がそれぞれ電氣的に接続される。また、図 1 に示す操作部 3 の電源ボタン 3a、測定開始ボタン 3b、外部出力ボタン 3c 及び設定ボタン 3d が電氣的に接続されている。そして、前記電源ボタン 3a の押下によりオン・オフの切換制御が行われ、前記測定開始ボタン 3b の押下により測定が開始され、外部出力ボタン 3c の押下により外部のプリンタやパソコンへデータの転送が行われ、設定ボタン 3d の押下により、測定の種類の切換 (L サイズ微生物の測定か S サイズ微生物の測定かの切換) や、判定基準の設定の変更や、しきい値の設定の変更や、測定時間の設定の変更を行うことができる構成となっている。

10

【0040】

そのほか、前記 CPU 基板 23 には、前記回転子 7 を磁力により回転させるマグネティックスターラ 27、液晶パネル等で形成された表示部 4、CPU 基板 23 など制御機器の冷却用ファン 28、及び RS-232C など外部出力端子 29 を接続してある。

20

【0041】

図 4 は測定フローを示すフロー図であり、図 1 乃至図 4 を参照して上記構成における作用を説明する。

【0042】

まず、作業者はピペット等を使用し、温度 20 程度のバラスト水から 100ml (ミリリットル) を試料として採取し、試料容器 5 に投入する (図 4 のステップ 1)。次に、試料容器 5 内に蛍光染色試薬を添加する (図 4 のステップ 2)。この蛍光染色試薬は一般的に知られているカルセイン AM (Calcein-AM, ドイツ国 Promocell GMBH 社製) や、FDA などを使用することができる。カルセイン AM は、植物性プランクトンに対して染色しやすい傾向がある一方、FDA は、動物性プランクトンに対して染色しやすい傾向があり、このため、染色試薬による染色を、カルセイン AM と FDA とを混合した試薬により染色を行うと、試薬の染色時間を短くして、染色に要する時間を従来の半分にすることが可能となる。そして、作業者は試料容器 5 に回転子 7 を投入後、検査装置 1 の測定部 6 に收容し、測定部 6 の蓋 30 を被着することで測定準備が完了する。ここで、電源ボタン 3a を押下すれば、該測定部 6 内に内蔵されたマグネティックスターラ 27 の駆動により回転子 7 が回転し、試料溶液 5 が攪拌されることになる (図 4 のステップ 3)。

30

【0043】

次に、作業者は操作部の測定開始ボタン 3b の押下により、所定時間後 LED 光源 10 が点灯し、励起光用バンドパスフィルタ 12 を透過した光が試料容器 5 に照射されることになる。このとき、例えば、波長特性として 450nm ~ 490nm の波長の光が照射され、試料容器 5 内の検体 (微生物) が蛍光発光することになる (図 4 のステップ 4)。そして、この蛍光が蛍光用バンドパスフィルタ 15 を透過して光電子増倍管 (PMT) 14 により検知されることになる (図 4 のステップ 5)。

40

【0044】

光電子増倍管 (PMT) 14 は、光電効果の利用により光エネルギーが電気エネルギーに変換されるとともに、電流増幅機能が付加され、高感度に蛍光発光を検知することができる。検知した電気信号は CPU 基板 23 に送られ、一定しきい値以上の受光波形がカウントされることになる (図 4 のステップ 6)。

【0045】

さらに、CPU 基板 23 では、受光波形カウント値から前記試料容器 5 内の水 100ml

50

1 (ミリリットル)中に存在する微生物数を推定して、排水基準を満たすか否かを表示部4に表示されるのである(図4のステップ)。

【0046】

以下、本発明の実施例について説明する。まず、上記実施形態の微生物の検査装置の検査精度の確認試験を行った。

【実施例1】

【0047】

微生物の個体数と光電子増倍管(PMT)の受光カウントとの相関関係を調査した。S型シオミズツボワムシ(最小サイズ約100 μ m=Lサイズ生物)を複数の試料容器5(100mL容量)にそれぞれ5個体、10個体、50個体、100個体、1000個体と個体別に収容し、それぞれを蛍光染色試薬FDA(濃度0.01[ミリmol/リットル])で染色した。その結果、収容した微生物の個体数に応じて、波形のカウント数が増加してきており、5個体、10個体、50個体及び100個体の5サンプルについては直線的に応答した(図7(a)、図7(b)参照)。このため、得られた波形のカウント数からバラスト水100mL中に存在する微生物の個体数が推定できる。

10

【実施例2】

【0048】

微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を行った(図8(a)~(d)参照)。熱により殺滅処理(60、30分の加熱)したS型シオミズツボワムシ(最小サイズ約100 μ m=Lサイズ生物)を、蛍光染色試薬FDA(濃度0.01[ミリmol/リットル])で染色する。殺滅処理1時間後、殺滅処理20時間後、殺滅処理5日後の3サンプルを作成してそれぞれ測定した。その結果、殺滅処理したものはいずれも一定のしきい値以上の波形が発見されず、殺滅処理せずに微生物が存在するサンプルと殺滅処理して微生物が存在しないサンプルとの判別が可能である。

20

【0049】

以上のように本実施形態によれば、バッチ式の試料容器5に試料と蛍光染色試薬とを添加した後、攪拌混合手段7により試料溶液の攪拌・混合を行い、次いで、前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を入射させ、さらに、受光手段により微生物の蛍光発光を受光するため、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することが可能となる。そして、本実施形態の装置はバッチ式であるため装置を小型化することが可能となり、製造コストが安価となる。

30

また、受光手段14が、励起光と直交した角度を持って受光面Fを配置したものであるため、励起光源10からの励起光が直接受光手段14の受光面Fに入射することがなく、バックグラウンドと微生物の蛍光発光との光量の差異が極めて明確になり、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するという極めて顕著な作用・効果を奏する。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明は、バラスト水を排出する際に排出基準を満たしているか否かを確認するための微生物の検査装置に適用することができる。

40

【符号の説明】

【0051】

- 1 検査装置
- 2 本体部
- 3 操作部
- 4 表示部
- 5 試料容器
- 6 測定部
- 7 回転子
- 8 保持プレート

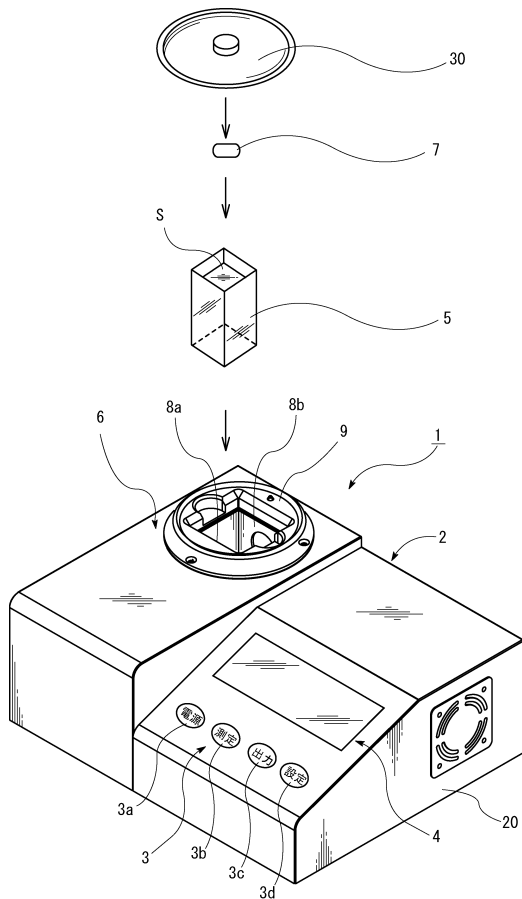
50

- 9 試料容器収容部
- 10 LED光源
- 11 平行光変換手段
- 12 励起光用バンドパスフィルタ
- 13 光源部
- 14 光電子増倍管 (PMT)
- 15 蛍光用バンドパスフィルタ
- 16 集光用レンズ
- 17 スリット
- 18 リレーレンズ
- 19 受光部
- 20 筐体
- 21 AC電源
- 22 二次電池
- 23 CPU基板
- 24 AC/D C変換器
- 25 RAM
- 26 ROM
- 27 マグネティックスターラ
- 28 ファン
- 29 外部出力端子
- 30 蓋
- 31 平板
- 32 ねじ切孔
- 33 シリンドリカルレンズ

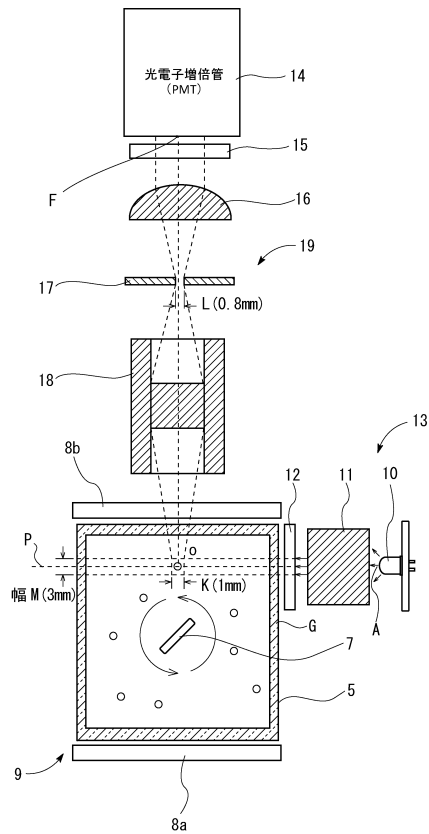
10

20

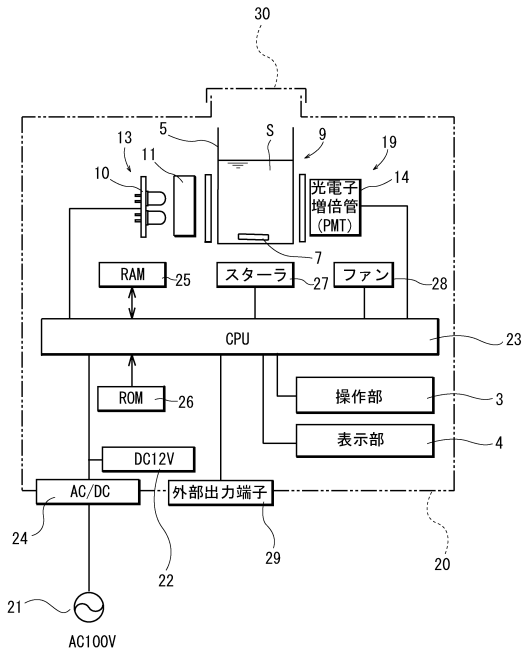
【図1】



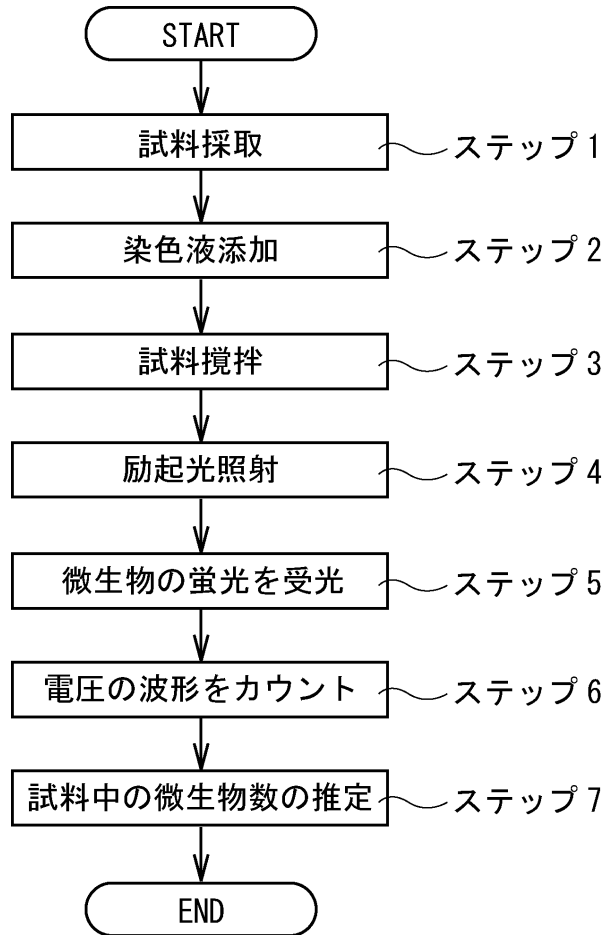
【図2】



【図3】

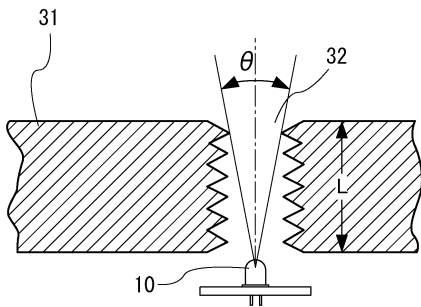


【図4】

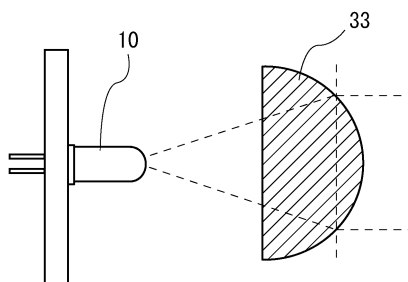


【図5】

(a)

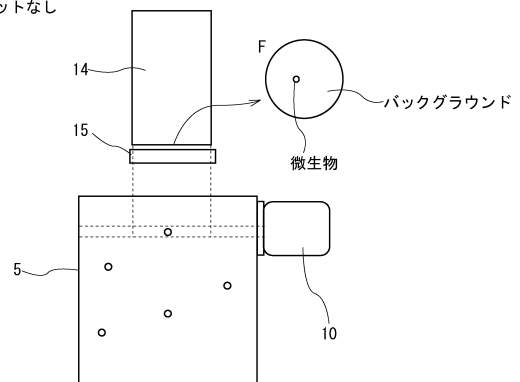


(b)

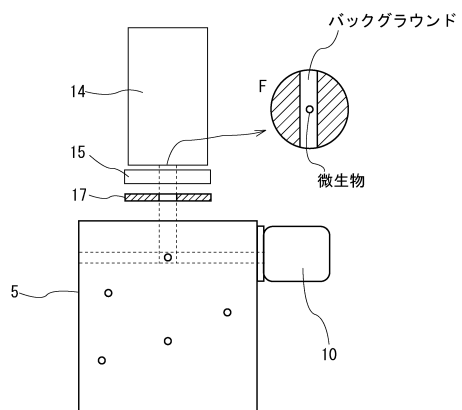


【図6】

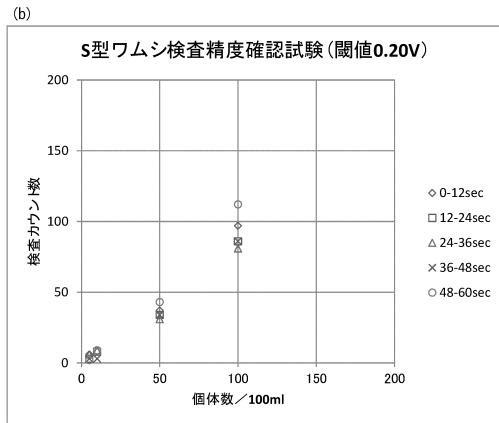
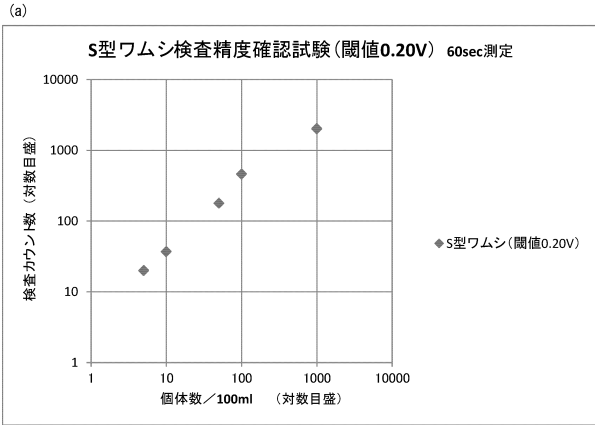
(a) スリットなし



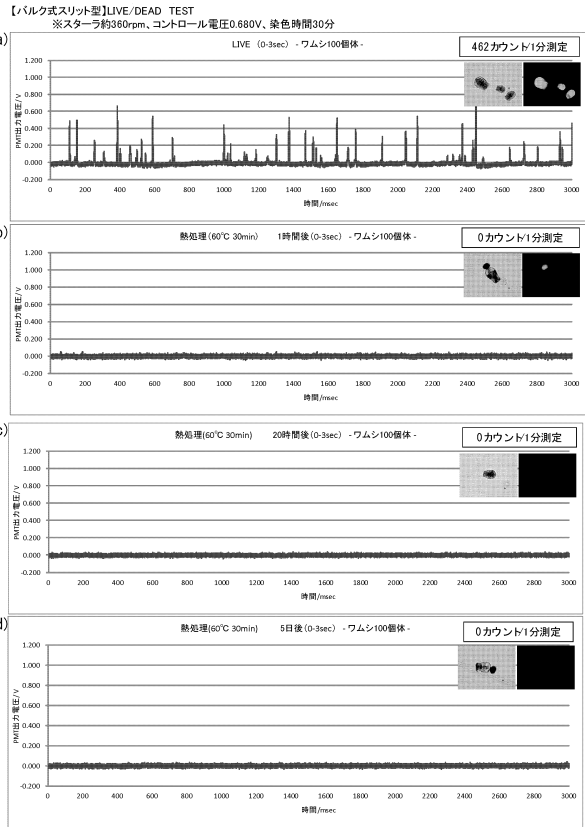
(b) スリットあり



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

- (72)発明者 松田 真典
東京都千代田区外神田四丁目7番2号 株式会社サタケ内
- (72)発明者 保坂 幸男
東京都千代田区外神田四丁目7番2号 株式会社サタケ内

審査官 田ノ上 拓自

- (56)参考文献 特開平10-099096(JP,A)
特開2006-300632(JP,A)
特開2010-112809(JP,A)
特開2010-181205(JP,A)
特開2010-249575(JP,A)
特開2011-153945(JP,A)
特開2011-013167(JP,A)
米国特許出願公開第2011/0042582(US,A1)
特開2006-227117(JP,A)
特開平04-281441(JP,A)
特開2006-042655(JP,A)
特開2006-340686(JP,A)
特表2011-507524(JP,A)
特開2011-036188(JP,A)
特開2009-201421(JP,A)
特開2008-029271(JP,A)
特開2008-005840(JP,A)
国際公開第2005/098022(WO,A1)
国際公開第2002/034091(WO,A1)
特開2004-305173(JP,A)
特開2004-061438(JP,A)
特開平03-272697(JP,A)
特開平03-043069(JP,A)
特開2009-219455(JP,A)
Applied and Environmental Microbiology, 2004年, Vol.70, No.8, p.4486-4490

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-1/42
C12Q 1/00-1/70
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
日経テレコン