

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年10月5日(05.10.2023)



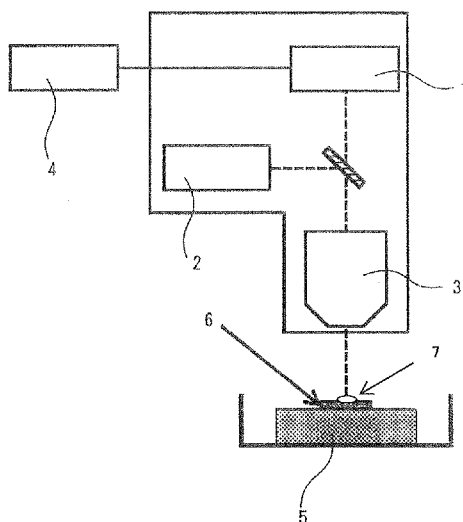
(10) 国際公開番号

WO 2023/190864 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/16 (2006.01) G01N 33/02 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/013171
- (22) 国際出願日: 2023年3月30日(30.03.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-059578 2022年3月31日(31.03.2022) JP
- (71) 出願人: 日本新薬株式会社(NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6018550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 津田 謙太郎 (TSUDA Kentaro); 〒6018550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄
- 門口町14番地 日本新薬株式会社内 Kyoto (JP). 田宮 央登 (TAMIYA Hisato); 〒6018550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 日本新薬株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 西藤 征彦, 外(SAITOH Yukihiko et al.); 〒5300054 大阪府大阪市北区南森町2丁目2番7号 シティ・コーポ南森町802 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW,

(54) Title: METHOD FOR ESTIMATING MICROBIAL GROWTH RATE IN FOOD, METHOD FOR EVALUATING SHELF LIFE OF FOOD, AND SYSTEM FOR ESTIMATING MICROBIAL GROWTH RATE IN FOOD

(54) 発明の名称: 食品における微生物増殖速度の見積り方法、食品の日持ち評価方法、および食品における微生物増殖速度の見積りシステム



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for estimating the rate of microbial growth in a food that enables non-destructive and quick evaluation of the shelf life (for example, best before date), etc. of the food while reducing the cost and labor required for the evaluation. To solve this problem, provided is a method comprising: a step for placing a hydrophilic membrane filter 6 on the surface of a food sample 5 and inoculating a microorganism 7 on the hydrophilic membrane filter 6; a step for imaging the microorganism 7 growing on the hydrophilic membrane filter 6 over time using a microscope; a step for quantifying the area of the microorganism 7 from the images taken over time; and a step for estimating the growth rate of the microorganism 7 on the basis of the quantified data.

MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 評価に伴うコストや労力を減少させつつ、食品の日持ち(賞味期限等)等を非破壊的かつ迅速に評価することが可能な、食品における微生物増殖速度の見積り方法を提供するため、食品試料5の表面に親水性メンブレンフィルター6を載置し、前記親水性メンブレンフィルター6上に微生物7を接種する工程と、前記親水性メンブレンフィルター6上で増殖する微生物7を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程と、前記経時的に撮影された画像から、微生物7の面積を数値化する工程と、前記数値化されたデータに基づいて、微生物7の増殖速度を見積もる工程と、を備えた。

明 細 書

発明の名称：

食品における微生物増殖速度の見積り方法、食品の日持ち評価方法、および食品における微生物増殖速度の見積りシステム

技術分野

[0001] 本発明は、食品の日持ち（賞味期限等）等を迅速に評価することが可能な、食品における微生物増殖速度の見積り方法、食品の日持ち評価方法、および食品における微生物増殖速度の見積りシステムに関するものである。

背景技術

[0002] 例えば、ハムなどの固形状の食品の日持ち（賞味期限等）を評価する手法としては、その食品を試料とし、微生物を接種して所定時間保存し、その試料をすりつぶして希釈したものをシャーレに採り、寒天培地を流し入れ2日程度平板培養し、その微生物が形成したコロニーをカウントすることにより、微生物の増殖速度を測定し、日持ちを評価するといった手法（コロニーカウント法）が、一般的である。

なお、図11は、ハム表面に微生物(酵母)を接種したときの顕微鏡写真であり、(a)は接種0時間目のハム表面を示し、(b)は接種18時間目のハム表面を示す。図示のように、ハム表面を直接顕微鏡観察しても、どれが微生物（酵母）なのか判別が難しい。そのため、一般的に、前記のような手法が採用されている。

[0003] しかしながら、前記の手法では、食品をすりつぶしたものを希釈して試料とし培養する必要があるため、(1)食品をすりつぶす手間や、食品をすりつぶすために各測定時点で新たな固形試料が必要となる、(2)カウントするのに適したコロニー数となるよう（希釈液1gに対し細胞数が30～300個程度になるよう）希釈する必要があるため、そのように希釈倍率を制御するのが難しい、(3)カウントするのに適したコロニー形成やコロニー数となるまで培養するのに時間がかかり、カウントするのにも時間がかかる、等といった問題が

ある。特に、(2)の問題は、どれくらいの桁数の細胞が存在しているのか見当がつかないことから、段階的に希釈した多くの懸濁液を作製して評価することが必要となるため、コストや労力の増大につながり、(3)の問題は、時間や労力などに多大な影響を及ぼす。これらのことから、予てより、その代替法が望まれている。

[0004] そのようななか、食品における微生物計測を迅速に行う手法として、前記のように微生物を接種して保存した後に希釈した試料を、メンブレンフィルターでろ過して微生物を捕捉および固定し、蛍光染料等で着色した後、画像分析装置、レーザー走査装置等により微生物数を計数する手法が各種提案されている（特許文献1，2等参照）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2000-210099号公報

特許文献2：特開2007-20528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1，2に開示されている手法では、微生物を蛍光染料等で染色する必要がある、その分の薬剤コストがかかる。

また、特許文献1，2に開示されている手法を適用して食品の日持ちを評価する場合であっても、食品をすりつぶして希釈する工程は必要なため、この点においては検討の余地がある。換言すると、従来、固形状の食品の日持ちを非破壊的かつ迅速に評価する手法が十分に確立されていなかったことから、そのような手法を検討する余地がある。

[0007] 本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、その評価に伴うコストや労力を減少化させつつ、食品の日持ち（賞味期限等）等を非破壊的かつ迅速に評価することが可能な、食品における微生物増殖速度の見積り方法、食品の日持ち評価方法、および食品における微生物増殖速度の見積りシステム

を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究を重ねた。その研究の過程で、本発明者らは、食品の表面に存在する微生物を、先述のような、ろ過して固定や染色等を行うといった処理をせずに直接観察することができれば、その食品の表面で増殖する微生物の増殖速度を見積もることができ、食品の日持ち等を非破壊的に評価することが可能となるのではないかと検討した。

しかしながら、食品の表面に存在する微生物を、固定や染色等を行わずに直接観察することは、食品の光透過性や表面構造の問題から難しい。

そこで、本発明者らは、さらに研究を重ねた結果、食品の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種したところ、親水性メンブレンフィルターが担体（土台）となり、微生物の増殖度合いが観察しやすくなるとともに、前記食品の表面に載置された親水性メンブレンフィルターに接種された微生物の増殖速度が、食品の表面に直接接種された場合と比べて差異がないことを突き止めた。

そして、前記親水性メンブレンフィルターに接種された微生物の顕微鏡画像を経時的に撮影し、顕微鏡画像ごとに微生物が占める面積を数値化し、経時による前記数値の変化の程度（係数）を算出し、これを所定の予測式に代入することによって、食品の表面で増殖する微生物の増殖速度を見積もることができることを見出した。

すなわち、これにより、食品をすりつぶす等の工程を必要とせず、しかも、従来のコロニーカウント法のように、カウントするのに適したコロニー形成やコロニー数となるまで培養しなくとも、迅速に、その食品に許容され得ない所定の微生物数に達するのに要する時間を予測することができるようになる、つまりは非破壊かつ迅速にその食品の日持ち（賞味期限等）等を評価することができるようになる。

[0009] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔9〕を、その要旨とする。

〔１〕 食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種する工程と、
前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程と、
前記経時的に撮影された画像から、微生物の面積を数値化する工程と、
前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もる工程と、
を備えた食品における微生物増殖速度の見積り方法。

〔２〕 前記微生物の面積を数値化する工程を、コンピューターを利用した画像解析により行う、〔１〕に記載の食品における微生物増殖速度の見積り方法。

〔３〕 前記微生物の増殖速度を見積もる工程を、コンピューターを利用した計算により行う、〔１〕または〔２〕に記載の食品における微生物増殖速度の見積り方法。

〔４〕 食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種する工程と、
前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程と、
前記経時的に撮影された画像から、微生物の面積を数値化する工程と、
前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もる工程と、
前記見積もられた増殖速度を用いて、食品に許容され得ない所定の微生物数に達するのに要する時間を予測する工程と、
を備えた食品の日持ち評価方法。

〔５〕 前記微生物の面積を数値化する工程を、コンピューターを利用した画像解析により行う、〔４〕に記載の食品の日持ち評価方法。

〔６〕 前記微生物の増殖速度を見積もる工程を、コンピューターを利用した計算により行う、〔４〕または〔５〕に記載の食品の日持ち評価方法。

〔７〕 顕微鏡を有する撮影装置と、前記撮影装置で経時的に撮影された被検体の画像から被検体上の微生物の面積を数値化することが可能な数値化装

置と、前記面積の経時的変化量から微生物の増殖速度を見積もることが可能な見積装置とを備えたシステムであって、
前記被検体が、食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターが載置され、かつ前記親水性メンブレンフィルター上に微生物が接種されたものである、食品における微生物増殖速度の見積りシステム。

〔８〕 前記数値化装置が、コンピューターを利用した画像解析装置である、〔７〕に記載の食品における微生物増殖速度の見積りシステム。

〔９〕 前記見積装置が、コンピューターを利用した計算装置である、〔７〕または〔８〕に記載の食品における微生物増殖速度の見積りシステム。

発明の効果

〔００１０〕 本発明の微生物増殖速度の見積り方法は、コストや労力を減少化させつつ、食品の日持ち（賞味期限等）等を非破壊的かつ迅速に評価することができる。また、本発明の微生物増殖速度の見積りシステムは、コストや労力を減少化させつつ、食品における微生物の増殖速度を非破壊的かつ迅速に見積もることができる。

図面の簡単な説明

〔００１１〕 〔図１〕食品試料に接種された微生物の動態を測定・評価するためのシステムの一例を示す説明図である。

〔図２〕前記食品試料における微生物の接種状態を示す説明図である。

〔図３〕寒天培地上に親水性メンブレンフィルターを載置して酵母細胞を接種したときの動態を示す顕微鏡写真であり、(a)は接種０時間目、(b)は接種９時間目を示す。

〔図４〕前記寒天培地上に親水性メンブレンフィルターを載置して酵母細胞を接種したときの動態を示す顕微鏡写真を画像処理したものであり、(a)は接種０時間目、(b)は接種９時間目を示す。

〔図５〕実施例１における酵母細胞面積の時間ごとの変化割合を示すグラフ図である。

〔図６〕実施例１における酵母数の時間ごとの変化割合を示す予測式と、従来法

における実測酵母数のプロットを示すグラフ図である。

[図7]実施例2の顕微鏡写真であり、(a)は接種0時間目、(b)は接種12時間目を示す。

[図8]実施例2の顕微鏡写真を画像処理したものであり、(a)は接種0時間目、(b)は接種12時間目を示す。

[図9]実施例2における酵母細胞面積の時間ごとの変化割合を示すグラフ図である。

[図10]実施例2における酵母数の時間ごとの変化割合を示す予測式と、従来法における実測酵母数のプロットを示すグラフ図である。

[図11]食品（ハム）表面に酵母細胞を接種したときの顕微鏡写真であり、(a)は接種0時間目のハム表面を示し、(b)は接種18時間目のハム表面を示す。

発明を実施するための形態

[0012] つぎに、本発明の実施の形態について詳しく説明する。ただし、本発明は、この実施の形態に限られるものではない。

なお、本発明において「X～Y」（X、Yは任意の数字）と表現する場合、特にことわらない限り「X以上Y以下」の意とともに、「好ましくはXより大きい」または「好ましくはYより小さい」の意も包含する。

また、「X以上」（Xは任意の数字）または「Y以下」（Yは任意の数字）と表現した場合、「Xより大きいことが好ましい」または「Y未満であることが好ましい」旨の意図も包含する。

[0013] 本発明の一実施形態である、食品における微生物増殖速度の見積り方法（以下、「本見積り方法」という）は、食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種する工程（工程A）と、前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程（工程B）と、前記経時的に撮影された画像から、微生物の面積を数値化する工程（工程C）と、前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もる工程（工程D）と、を

備えている。

[0014] また、本発明の一実施形態である食品の日持ち評価方法（以下、「本評価方法」という）は、食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種する工程（工程A）と、前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程（工程B）と、前記経時的に撮影された画像から、微生物の面積を数値化する工程（工程C）と、前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もる工程（工程D）と、前記見積もられた増殖速度を用いて、食品に許容され得ない所定の微生物数に達するのに要する時間を予測する工程（工程E）と、を備えている。

[0015] ここで、前記の「食品試料」とは、親水性メンブレンフィルターが載置可能なもの（液状を呈する試料以外のもの）であれば特に限定されるものではなく、例えば、食品そのものから採取した、固形状、ゲル状、クリーム状といった態様を示す試料の他、食品の成分を反映させた寒天培地等の固形状の培地（試料）や、液体状の食品（飲料等）を寒天等で固めた固形状の培地（試料）も含む趣旨である。

また、前記の「経時的に撮影」とは、所定時間経過毎に撮影を行うことを示すが、その所定時間は一定である必要はない。さらに、前記の「経時的に撮影」は、断続的な撮影のみならず、連続的な撮影を含む趣旨である。

[0016] 以下、前記各工程（工程A～E）について詳しく説明する。

[0017] <<微生物増殖速度の見積り方法>>

〔工程A〕

工程Aでは、食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種することが行われる。

前記食品試料が、食品からそのまま採取した試料等であるため、食品をすりつぶして希釈等する必要がなく、コストや労力の削減の点で優れているといった利点を有している。

前記食品試料の大きさは、顕微鏡観察に支障が生じなければ、特に限定さ

れるものではない。

また、前記食品試料の水分活性 (A_w) は、食品試料が有する栄養素等（微生物の増殖源）を水とともに親水性メンブレンフィルター上に移行させることが十分に行われることができる観点から、通常、 $0.60 \sim 1.00$ であり、好ましくは $0.80 \sim 1.00$ 、より好ましくは $0.90 \sim 1.00$ である。

[0018] 工程 A で用いる親水性メンブレンフィルターとしては、例えば、ポリテトラフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエーテルスルホン等の樹脂製メンブレンフィルターを適宜親水化処理したもの等を使用することができる。前記親水性メンブレンフィルターは、市販品を用いてもよく、市販品としては、例えば、Merck社製のオムニポアメンブレンフィルター JHWP01300 等が好ましく用いられる。

前記親水性メンブレンフィルターの孔径は、接種する微生物は通さないが食品試料が有する栄養素等（微生物の増殖源）は通すものであることが好ましく、対象とする微生物の種類にもよるが、 $0.1 \sim 10.0 \mu m$ であるものが好ましく、 $0.2 \sim 0.7 \mu m$ であるものがより好ましい。

また、前記親水性メンブレンフィルターの大きさは、顕微鏡観察に支障が生じない程度であれば、特に限定されるものではない。

一方、その厚みは、通常、 $10 \sim 150 \mu m$ であり、 $50 \sim 100 \mu m$ の厚みであるものが好ましい。前記親水性メンブレンフィルターの厚みが前記範囲内であると、食品試料が有する栄養素等（微生物の増殖源）を、水分をとおして親水性メンブレンフィルター上により効率よく移行させることができる。

[0019] また、工程 A において、前記親水性メンブレンフィルター上に接種される微生物としては、対象となる食品の品質低下に影響を与える微生物や、発酵食品等の微生物利用食品に通常用いられる微生物が用いられる。このような微生物としては、例えば、酵母、乳酸菌、芽胞菌、大腸菌等の食品腐敗菌や、パン発酵に用いられる酵母、ヨーグルトのスターター（種菌）として使用

される乳酸菌、納豆菌等の有用微生物等が挙げられる。これらは単独でもしくは二種以上併せて用いられる。

本見積り方法によって、食品腐敗菌の増殖速度を予測することにより、その対象となる食品の日持ちを評価したり、その菌の増殖を抑える条件等を決定したりすることができる。また、本見積り方法によって、有用微生物の増殖速度を予測し、微生物の増殖が適正になされる条件等を決定することができる。例えば、有用微生物が酵母である場合には、その対象となる食品の発酵速度を算出することができる。

そして、前記微生物の接種は、例えば、水や水溶液によって、 $50 \sim 2000$ 個/ μL の細胞数（好ましくは $100 \sim 1000$ 個/ μL 、より好ましくは $200 \sim 500$ 個/ μL ）となるよう希釈されたものを、前記親水性メンブレンフィルター上に $0.25 \sim 8 \mu\text{L}$ （好ましくは $0.5 \sim 4 \mu\text{L}$ 、より好ましくは $1 \sim 2 \mu\text{L}$ ）滴下することにより行うことができる。

なお、前記水溶液としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ペプトン加生理食塩水等が挙げられる。

[0020] [工程 B]

工程 B では、前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影することが行われる。

ここで、本見積り方法および本評価方法において、食品試料表面の親水性メンブレンフィルター上に接種された微生物の動態を測定・評価するためのシステムの一例を図 1 に示す。図 1 において、1 はカメラ、2 は光源、3 は対物レンズ、4 はパーソナルコンピューター、5 は食品試料、6 は親水性メンブレンフィルター、7 は微生物を示す。また、図 2 は、前記食品試料表面の親水性メンブレンフィルター上に接種された微生物の状態を模式的に示したものであり、図 2 において、5 は食品試料、6 は親水性メンブレンフィルター、7 は微生物を示す。

[0021] 前記カメラ 1、光源 2、対物レンズ 3 は、顕微鏡写真を撮影するための顕微鏡構成を示すものであり、特に限定されるものではないが、その一例とし

て、下記に示す顕微鏡構成が挙げられる。

＜顕微鏡構成＞

カメラ：ヒートシンク付GigEカメラ DMK33GX249e、The Imaging Source
社製

光源：LEDスポット照明 SLSI-22W、シグマ光機社製

対物レンズ：長作動対物レンズ PAL-20、シグマ光機社製

[0022] 前記微生物の撮影は、特に限定されるものではないが、通常、雰囲気温度
4～45℃の条件下で行われ、食品および微生物の種類や目的に応じて任意
に設定することができる。

[0023] 前記顕微鏡写真の撮影方法は、特に限定されるものではないが、微生物の
接種直後の状態を撮影するとともに、経時的に撮影し、当該食品試料および
微生物を用いたときの従来のコロニーカウント法にかかる時間の1/2以下
の時間内（好ましくは1/3以下の時間内）に、撮影終了するよう行われる
ことが好ましい。

このように、本見積り方法および本評価方法は、従来法に対して短時間の
観察で微生物の増殖速度を見積もることができる。

また、前記経時的な撮影は、先に述べたように、断続的な撮影であっても
、連続的な撮影であってもよいが、断続的な撮影を行うのであれば、見積も
り精度と作業量とのバランスの点から3時間毎に撮影することが好ましく、
1時間毎に撮影することがより好ましい。

[0024] [工程C]

工程Cでは、前記経時的に撮影された複数の画像について、画像ごとに微
生物の面積を数値化することが行われる。このような工程は、通常、パーソ
ナルコンピューター等のコンピューターを利用した画像解析により行われる
。

すなわち、図4(a)，(b)に示すように、前記経時的に撮影された画像にお
いて、当該微生物が占める部分を画像処理ソフトウェアで塗り潰し、塗り潰
された部分（各図において白塗く塗りつぶされた部分）の面積をソフトウェ

アにより画素数（ピクセルの総数）として算出することにより、前記画像から微生物の面積を数値化することができる。

このような数値化は、微生物の個体差（各細胞の生育状態差）を排除することができる点から、前記メンブレンフィルター上の異なる複数の箇所において、増殖する微生物を経時的に撮影し、各箇所の微生物の面積を数値化し、その合計ないし平均をとることが好ましい。前記複数の箇所としては、2箇所であってもよいが、より精度に優れる点から3箇所以上であることが好ましい。

また、画像上の微生物が占める部分を画像処理ソフトウェアで塗り潰す処理は、目視で細胞を判別して手動で行ってもよいが、効率化を図る点から機械学習（サポートベクターマシンやディープラーニング）させたプログラムを用いて自動的に行ってもよい。

さらに、工程Bおよび工程Cを、これらを自動的に行うように設定された微生物検出システムにより並行して行ってもよい。

[0025] [工程D]

工程Dでは、前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もることが行われる。

すなわち、前記数値化されたデータを対比することにより、微生物の同一細胞を起点とした、時間 t （最初の撮影時から最後の撮影時までの時間）における細胞画像面積の変化がわかるため、経時的に得られた複数のデータを下記の式（1）に代入し、近似させることにより、係数 k を求めることができる。ここで、式（1）は、微生物の増殖曲線（接種直後の微生物が対数的に増殖する）に基づくものである。式（1）において、 e は自然対数の底（ネイピア数）である（下記の式（2）において同じ）。また、図5は、式（1）をグラフ化したものであり、前記複数のデータを代入し、近似させた結果、係数 k の値が0.4553と求められたものを示す。

[0026]

[数1]

$$\frac{S_t}{S_0} = e^{kt} \quad \cdot \cdot \cdot \quad (1)$$

S_t : 時間 t の細胞画像面積

S_0 : 初発の細胞画像面積

k : 係数

t : 時間

[0027] 続いて、前記で算出した係数 k の値を、下記の式 (2) に代入することにより、時間 t における細胞数 N_t の予測式を得ることができる。図 6 は、得られた予測式を片対数グラフで示すとともに、従来法（コロニーカウント法）で得られた実測値をグラフに重ねて示したものである。

[0028] [数2]

$$N_t = N_0 e^{kt} \quad \cdot \cdot \cdot \quad (2)$$

N_t : 時間 t の細胞数

N_0 : 初発の細胞数

k : 係数

t : 時間

[0029] 工程 D における前記係数 k や予測式の導出等は、効率化の点からパーソナルコンピュータ等のコンピュータを利用した計算により行うことが好ましい。

[0030] 前記各工程（工程 A～D）を備えた本見積り方法は、図 6 に示すように、予測式上に実測値（従来法で得られた値）があることからわかり、従来法と同程度の信頼性に優れるものである。

また、本見積り方法は、先に述べたように、微生物の観察時間（接種から撮影終了までの時間）を、従来法であるコロニーカウント法にかかる時間の $1/2$ 以下にすることができ、さらに、雰囲気温度等を工夫することにより $1/3$ 以下にすることができる。

[0031] <<食品の日持ち評価方法>>

本評価方法は、本見積り方法の工程A～Dに、さらに工程Eを加えたものである。

〔工程E〕

工程Eでは、前記見積もられた増殖速度を用いて、食品に許容され得ない所定の微生物数に達するのに要する時間を予測することが行われる。

通常、食品に許容され得ない微生物の細胞数（食品腐敗菌数）は100000個／gを基準とすることが多い。このため、前記導出された予測式を、縦軸を対数で示した図6の直線グラフに表示し直し、例えば100000個／gに達するのに要する時間を算出する（図6のグラフでは18時間程度を示している）ことにより、食品の日持ち期間を予測することができる。

なお、前記食品に許容され得ない微生物数は、目的に応じて適宜自由に設定することができる。

また、前記のように予測式を別のグラフに表示し直して食品の日持ち期間を予測するのではなく、コンピュータープログラムを利用して、導出された予測式から自動的に、食品の日持ち期間を予測するようにしてもよい。

[0032] 前記各工程（工程A～E）を備えた本評価方法は、本見積り方法を利用しており、前記のとおり予測式上に実測値（従来法により測定された値）があることから、従来法と同程度の信頼性に優れるものである（図6参照）。

また、本評価方法は、本見積り方法を利用するものであるため、従来法であるコロニーカウント法から食品の日持ちを評価するのにかかる時間の1／2以下の時間で行うことができ、さらに条件等を工夫することにより1／3以下の時間で行うことができる、という利点を有する。

[0033] <<食品における微生物増殖速度の見積りシステム>>

食品における微生物増殖速度の見積りシステム（以下「本見積りシステム」とすることがある）は、本見積り方法を利用するものであればよく、特に限定されるものではない。

しかし、顕微鏡を有する撮影装置と、前記撮影装置で経時的に撮影された

被検体の画像から被検体上の微生物の面積を数値化することが可能な数値化装置と、前記面積の経時的変化量から微生物の増殖速度を見積もることが可能な見積装置とを備え、前記被検体が、食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターが載置され、かつ前記親水性メンブレンフィルター上に微生物が接種されたものであると、短時間で効率よく食品における微生物増殖速度を見積ることができる点で好ましい。

[0034] 前記撮影装置としては、前記工程Bが実行可能な装置であれば特に限定するものではなく、例えば、前記本見積り方法で説明したシステム（カメラ、光源、対物レンズ、パーソナルコンピューターを備えたシステム）を用いることができる。

また、前記数値化装置としては、前記工程Cが実行可能な装置であれば特に限定するものではないが、汎用性に優れる点でパーソナルコンピューター等のコンピューターを利用した画像解析装置であることが好ましい。

そして、前記見積装置としては、前記工程Dが実行可能な装置であれば特に限定するものではないが、汎用性に優れる点でパーソナルコンピューター等のコンピューターを利用した計算装置であることが好ましい。

[0035] 本見積りシステムは、微生物が食品腐敗菌の場合では、対象となる食品における食品腐敗菌の増殖速度を見積もることで、前記食品の日持ちを評価することができる。また、その増殖速度を見積もることで、その菌の増殖を抑える条件等を決定するのに利用することができる。

一方、微生物が有用微生物の場合では、対象となる食品における有用微生物の増殖速度を見積もることで、微生物の増殖が適正になされる条件等を決定するのに利用することができる。例えば、有用微生物が酵母である場合には、対象となる食品の発酵速度を見積もることができる。

[0036] このように、本見積り方法、本評価方法、および本見積りシステムは、その評価等に伴うコストや労力を減少させつつ、食品の日持ちを非破壊的かつ迅速に評価することが可能である。

すなわち、従来の方法では少なくとも数日かかっていた作業を、数時間に

短縮することが可能である。

さらに、本見積り方法、本評価方法、および本見積りシステムにより、食品の日持ち（賞味期限等）等に関するデータを従来よりも迅速かつ効率的に収集することができるため、パーソナルコンピューター等のコンピューターや機械学習アルゴリズム（ニューラルネットワーク等）を利用し、その蓄積したデータに基づいて、最適条件（日持ち等を良くするために過不足ない食品添加物の量的条件、食品添加物の種類、酸度、塩度、水分量等の調整条件等）を効率よく探索したり、算出したりできる。

本見積り方法、本評価方法、および本見積りシステムは、これらの利点を利用したビジネス（例えば、最適条件の情報提供やそれに付随する物資の供給やサービスの提供等）に有効に活用することができる。

実施例

[0037] つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。ただし、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

[0038] [実施例 1]

まず、食品試料として寒天培地(ポテトデキストロース寒天培地、日水製薬社製)を準備し、その表面に、親水性のメンブレンフィルター(オムニポアメンブレンフィルター JHWP01300、Merck社製)を載置した。つぎに、酵母(*Pichia anomala*)を500個/2 μ Lとなるようにリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、前記メンブレンフィルター上に2 μ Lを滴下することにより接種した(図1参照)。

そして、室温(25℃)での、前記メンブレンフィルター上で増殖する酵母を、以下に示す構成の顕微鏡を用いて、経時的に撮影した(図1および図2参照。倍率:20倍)。

<顕微鏡構成>

カメラ: ヒートシンク付GigEカメラ DMK33GX249e、The Imaging Source 社製

光源: LEDスポット照明 SLSI-22W、シグマ光機社製

対物レンズ：長作動対物レンズ PAL-20、シグマ光機社製

[0039] ここで、前記撮影により得られた画像の一例を図3に示す。図3において、(a)は接種直後（0時間目）の酵母 Y_0 を示し、(b)は接種から9時間後（9時間目）の(a)で示した酵母 Y_0 を由来として増殖した酵母 Y_t を示す。

[0040] つぎに、前記経時的に撮影された複数の画像から、酵母が占める面積の変化の度合いを画像処理ソフトウェアにより算出し、時間 t における細胞数 N_t の予測を行った。

詳しくは、ImageJ（オープンソース）により、時間ごと（0時間目、3時間目、4時間目、5時間目、6時間目）の同一細胞に由来する酵母の画像面積を塗り潰した後、その塗り潰された酵母画像面積を画素数（ピクセルの総数）として数値化した。前記塗り潰しを行った画像の一例を図4に示す。図4(a)の符号 Y_0P は、図3(a)の酵母 Y_0 の画像面積を塗り潰したものを示し、図4(b)の符号 Y_tP は、図3(b)の酵母 Y_t の画像面積を塗り潰したものを示す。

前記数値化した結果を下記の表1に示す。なお、下記の酵母画像面積（細胞画像面積）は、互いに異なる3箇所（3場面）について、それぞれ数値化したものの合計を示している。

[0041] [表1]

時間 t	0	3	4	5	6
細胞画像面積* S	405	1191	2440	4344	6743
* 3場面の合計値（画素）					

[0042] その後、前記のように算出した細胞画像面積を、前記の式（1）に代入し、近似させることにより、係数 k を求めた結果、係数 k の値は0.4553であった。

[0043] 続けて、前記の係数 k の値を、前記の式（2）に代入し、時間 t における細胞数 N_t の予測式を得た。

[0044] 図6は、前記予測式を片対数グラフで示すとともに、従来法（コロニーカ

ウント法)における実測微生物数(酵母数)を重ねて示したものである。図6から、実測微生物数(酵母数)のプロットは、概ね前記予測式のグラフ上にあることがわかる。したがって、前記予測式は、従来法と同程度に信頼性の高いものであることがわかる。

そして、図6に示されるように、前記予測式から、食品に許容され得ない微生物数(このケースでは100000個/g)に達するのに要する時間(このグラフでは18時間程度)を見積もることが可能である。

また、前記予測式は、先に述べたとおり、従来法であるコロニーカウント法よりも短時間で導出することができるため、本発明の食品の日持ち評価は従来法に比べて短時間で行うことができる。

[0045] [実施例2]

食品試料としてロースハム(朝のフレッシュロースハム、伊藤ハム社製)を用いた以外は、実施例1と同様にしてメンブレンフィルター上で増殖する酵母を経時的に撮影した。

[0046] 前記撮影により得られた画像の一例を図7に示す。図7において、(a)は接種直後(0時間目)の酵母 Z_0 を示し、(b)は接種から12時間後(12時間目)の(a)で示した酵母 Z_0 を由来として増殖した酵母 Z_t を示す。

[0047] つぎに、前記経時的に撮影された複数の画像から、酵母が占める面積の変化の度合いを、画像処理ソフトウェアにより算出し、時間 t における細胞数 N_t の予測を行った。

詳しくは、ImageJ(オープンソース)により、時間ごと(0時間目、5時間目、6時間目、7時間目、8時間目)の同一細胞に由来する酵母の画像面積を塗り潰した後、その塗り潰された酵母画像面積を画素数(ピクセルの総数)として数値化した。前記塗り潰しを行った画像の一例を図8に示す。図8(a)の符号 Z_0P は、図7(a)の酵母 Z_0 の画像面積を塗り潰したものを示し、図8(b)の符号 Z_tP は、図7(b)の酵母 Z_t の画像面積を塗り潰したものを示す。

前記数値化した結果を下記の表2に示す。なお、下記の酵母画像面積(細胞画像面積)は、互いに異なる3箇所(3場面)について、それぞれ数値化

したものの合計を示している。

[0048] [表2]

時間 t	0	5	6	7	8
細胞画像面積* S	329	1212	1987	3516	4734

* 3場面の合計値 (画素)

[0049] その後、前記のように算出した細胞画像面積を、前記の式 (1) に代入し、近似させることにより、係数 k を求めた結果、係数 k の値は 0.3174 であった。

なお、図 9 は、近似させた式 (1) をグラフ化したものである。

[0050] 続けて、前記の係数 k の値を、前記の式 (2) に代入し、時間 t における細胞数 Nt の予測式を得た。

[0051] 図 10 は、前記予測式を片対数グラフで示すとともに、従来法 (コロニーカウント法) における実測微生物数 (酵母数) を重ねて示したものである。図 10 から、実測微生物数 (酵母数) のプロットは、概ね前記予測式のグラフ上にあることがわかる。したがって、前記予測式は、従来法と同程度に信頼性の高いものであることがわかる。

そして、図 10 に示されるように、前記予測式から、食品に許容され得ない微生物数 (このケースでは 100000 個/g) に達するのに要する時間 (このグラフでは 28 時間程度) を見積もることが可能である。

[0052] 前記実施例においては、本発明における具体的な形態について示したが、前記実施例は単なる例示にすぎず、限定的に解釈されるものではない。当業者に明らかな様々な変形は、本発明の範囲内であることが企図されている。

産業上の利用可能性

[0053] 本見積り方法、本評価方法、および本見積りシステムにより、その評価等に伴うコストや労力を減少させつつ、食品の日持ちを非破壊的かつ迅速に評価することが可能である。すなわち、従来の方法では少なくとも数日かか

っていた作業を、数時間に短縮することが可能である。さらに、本見積り方法、本評価方法、および本見積りシステムにより、食品の日持ち（賞味期限等）等に関するデータを従来よりも効率的に収集することができるため、パーソナルコンピューター等のコンピューターやインターネットを利用し、その蓄積したビッグデータに基づいて、最適条件（例えば、日持ち等を良くするために過不足ない食品添加物の量的条件や食品添加物の種類、酸度、塩度、水分量等の調整条件等）を効率よく探索できるようになる。

そのため、本見積り方法、本評価方法、および本見積りシステムは、これらの利点を利用したビジネス（例えば、最適条件の情報提供やそれに付随する物資の供給やサービスの提供等）に有効に活用することができる。

符号の説明

- [0054] 1：カメラ
 2：光源
 3：対物レンズ
 4：パーソナルコンピューター
 5：食品試料
 6：親水性メンブレンフィルター
 7：微生物

請求の範囲

- [請求項1] 食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種する工程と、
前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程と、
前記経時的に撮影された画像から、微生物の面積を数値化する工程と、
、
前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もる工程と、
を備えた食品における微生物増殖速度の見積り方法。
- [請求項2] 前記微生物の面積を数値化する工程を、コンピューターを利用した画像解析により行う、請求項1記載の食品における微生物増殖速度の見積り方法。
- [請求項3] 前記微生物の増殖速度を見積もる工程を、コンピューターを利用した計算により行う、請求項1または2記載の食品における微生物増殖速度の見積り方法。
- [請求項4] 食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターを載置し、前記親水性メンブレンフィルター上に微生物を接種する工程と、
前記親水性メンブレンフィルター上で増殖する微生物を、顕微鏡を用いて経時的に撮影する工程と、
前記経時的に撮影された画像から、微生物の面積を数値化する工程と、
、
前記数値化されたデータに基づいて、微生物の増殖速度を見積もる工程と、
前記見積もられた増殖速度を用いて、食品に許容され得ない所定の微生物数に達するのに要する時間を予測する工程と、
を備えた食品の日持ち評価方法。
- [請求項5] 前記微生物の面積を数値化する工程を、コンピューターを利用した

画像解析により行う、請求項 4 記載の食品の日持ち評価方法。

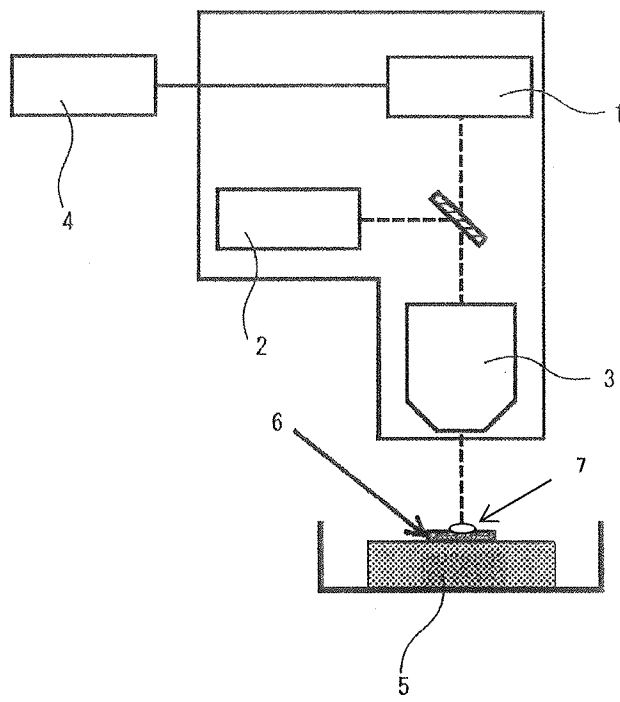
[請求項6] 前記微生物の増殖速度を見積もる工程を、コンピューターを利用した計算により行う、請求項 4 または 5 記載の食品の日持ち評価方法。

[請求項7] 顕微鏡を有する撮影装置と、前記撮影装置で経時的に撮影された被検体の画像から被検体上の微生物の面積を数値化することが可能な数値化装置と、前記面積の経時的变化量から微生物の増殖速度を見積もることが可能な見積装置とを備えたシステムであって、前記被検体が、食品試料の表面に親水性メンブレンフィルターが載置され、かつ前記親水性メンブレンフィルター上に微生物が接種されたものである、食品における微生物増殖速度の見積りシステム。

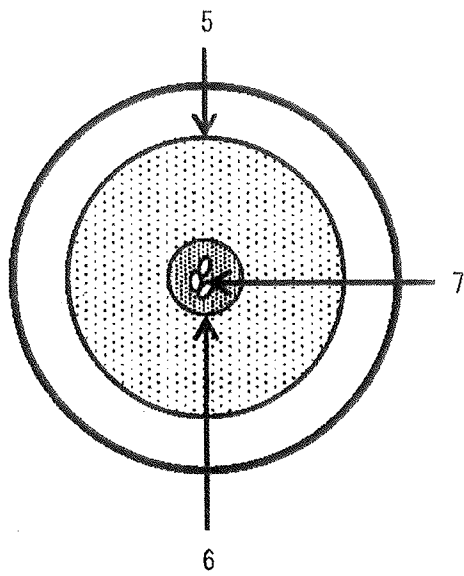
[請求項8] 前記数値化装置が、コンピューターを利用した画像解析装置である、請求項 7 記載の食品における微生物増殖速度の見積りシステム。

[請求項9] 前記見積装置が、コンピューターを利用した計算装置である、請求項 7 または 8 記載の食品における微生物増殖速度の見積りシステム。

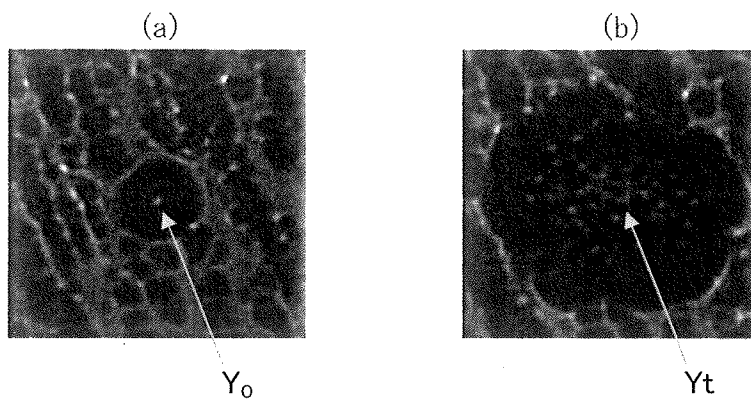
[図1]



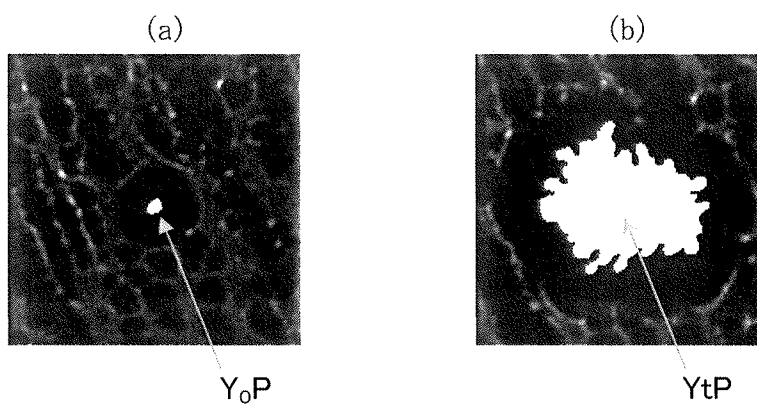
[図2]



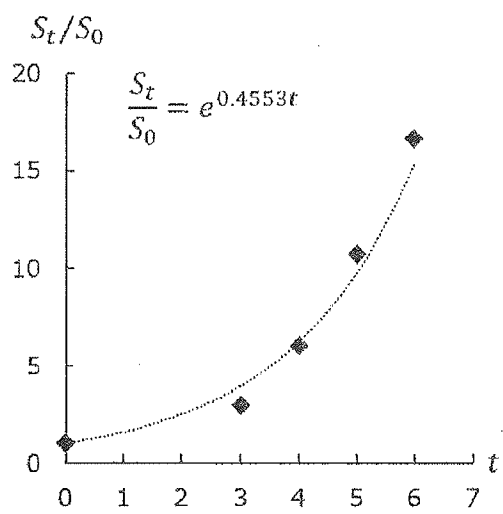
[図3]



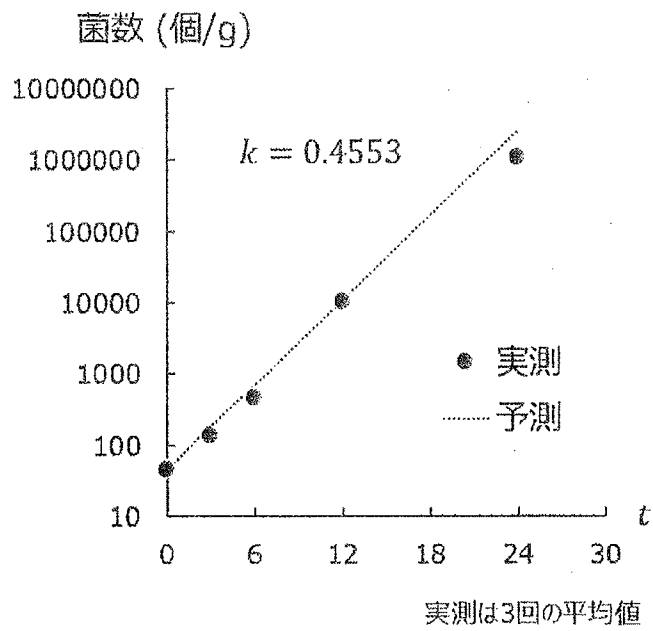
[図4]



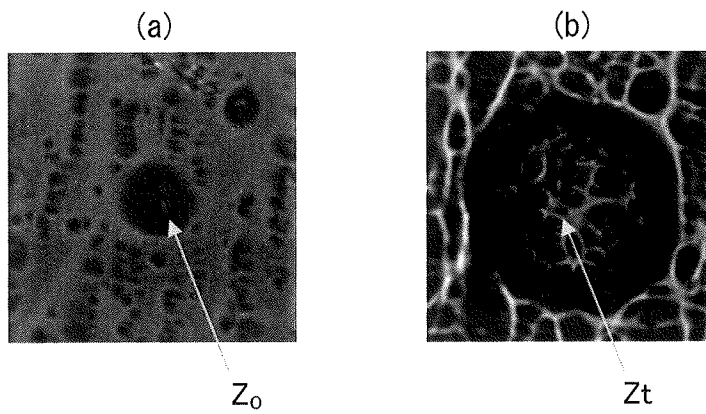
[図5]



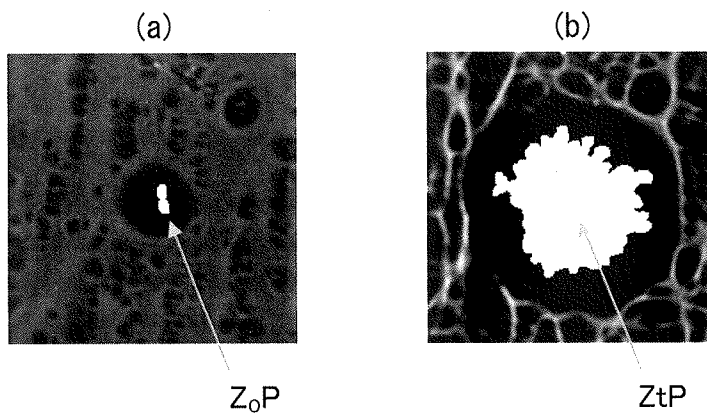
[図6]



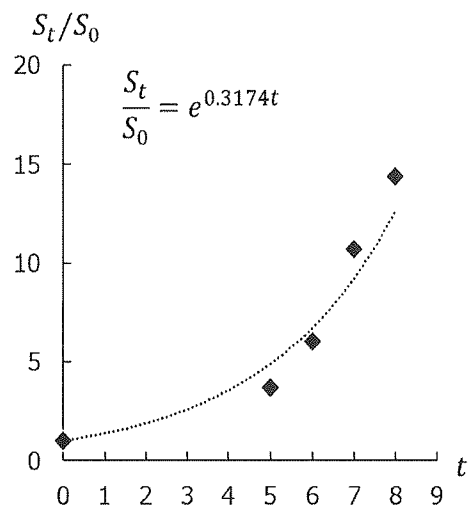
[図7]



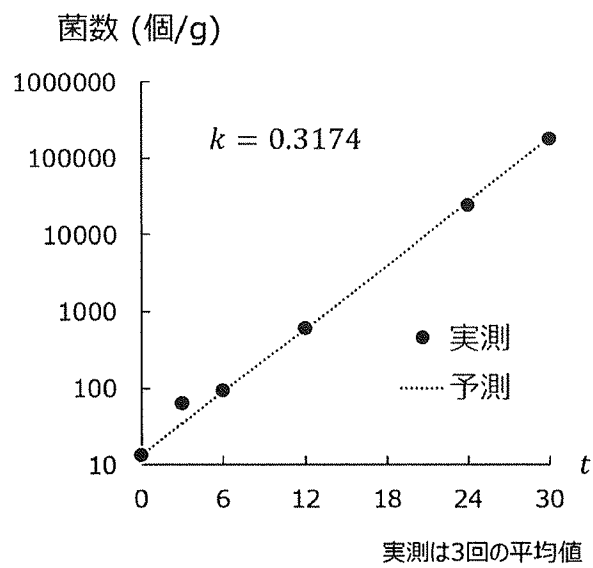
[図8]



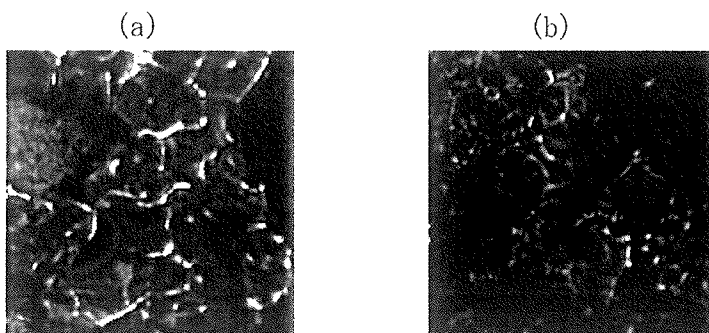
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/013171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/16(2006.01)n; C12Q 1/06(2006.01)i; G01N 33/02(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i

FI: C12Q1/06; C12M1/34 D; G01N33/02; C12N1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/16; C12Q1/06; G01N33/02; C12M1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023

Registered utility model specifications of Japan 1996-2023

Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2018-42502 A (TSUCHIYA KK) 22 March 2018 (2018-03-22) claims, paragraphs [0015]-[0029], [0030]-[0033] (Family: none)	1-9
A	JP 2004-344087 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 09 December 2004 (2004-12-09) claims, paragraphs [0008], [0033]-[0040], examples (Family: none)	1-9
A	JP 2010-246442 A (PANASONIC CORP) 04 November 2010 (2010-11-04) claims, paragraphs [0005]-[0008], examples (Family: none)	1-9
A	JP 2007-195454 A (KAO CORP) 09 August 2007 (2007-08-09) claims, paragraphs [0014]-[0017], examples (Family: none)	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2023

Date of mailing of the international search report

13 June 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/013171

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RODRIGUES, U. M. & KROLL, R. G. Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. Journal of Applied Bacteriology. 1988, 64(1), pp. 65-78 column "abstract"	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/16(2006.01)n; C12Q 1/06(2006.01)i; G01N 33/02(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i FI: C12Q1/06; C12M1/34 D; G01N33/02; C12N1/16										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N1/16; C12Q1/06; G01N33/02; C12M1/34										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2023年	日本国実用新案登録公報	1996-2023年	日本国登録実用新案公報	1994-2023年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2023年									
日本国実用新案登録公報	1996-2023年									
日本国登録実用新案公報	1994-2023年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
A	JP 2018-42502 A (株式会社榎屋) 22.03.2018 (2018-03-22) 特許請求の範囲、[0015]～[0029]、[0030]～[0033] (ファミリーなし)	1-9								
A	JP 2004-344087 A (松下電器産業株式会社) 09.12.2004 (2004-12-09) 特許請求の範囲、[0008]、[0033]～[0040]、実施例 (ファミリーなし)	1-9								
A	JP 2010-246442 A (パナソニック株式会社) 04.11.2010 (2010-11-04) 特許請求の範囲、[0005]～[0008]、実施例 (ファミリーなし)	1-9								
A	JP 2007-195454 A (花王株式会社) 09.08.2007 (2007-08-09) 特許請求の範囲、[0014]～[0017]、実施例 (ファミリーなし)	1-9								
A	RODRIGUES, U.M. & KROLL, R.G., Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique, Journal of Applied Bacteriology, 1988, 64 (1), p. 65-78 要約欄	1-9								
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 18.05.2023		国際調査報告の発送日 13.06.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 大久保 元浩 4B 8828 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								