

(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2005-102645

(P2005-102645A)

(43) 公開日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 Q 1/22
GO 1 N 15/14
GO 1 N 21/47
GO 1 N 21/78
// GO 1 N 21/64

F I

C 1 2 Q 1/22
 GO 1 N 15/14
 GO 1 N 21/47
 GO 1 N 21/78
 GO 1 N 21/64

テーマコード (参考)

2 G O 4 3
 2 G O 5 4
 2 G O 5 9
 4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2003-343425 (P2003-343425)

(22) 出願日 平成15年10月1日 (2003. 10. 1)

(71) 出願人 390014960

シスメックス株式会社

神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号

(74) 代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72) 発明者 小田 康雅

神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号

シスメックス株式会社内

(72) 発明者 坂田 孝

神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号

シスメックス株式会社内

F ターム (参考) 2G043 AA03 BA16 CA04 DA01 DA02

EA01 EA14 GA25 GB28 KA01

KA05 KA09 NA02

2G054 AA08 BB13 CA20 FB01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の殺菌処理効果測定方法

(57) 【要約】

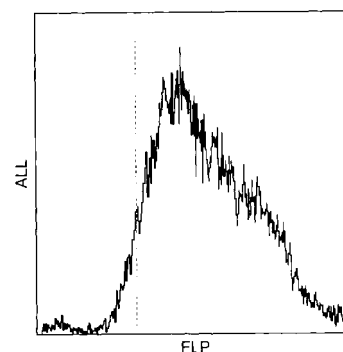
【課題】

本発明は、試料中に含まれる個々の微生物の増殖活性を測定することにより、迅速かつ正確に、微生物の殺菌処理効果を測定する方法を提供するものである。

【解決手段】

本発明の微生物の殺菌処理効果測定方法は、殺菌対象から殺菌処理された試料を採取し、その試料を予め所定時間培養した後、試料中に含まれる個々の微生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定し、前記測定して得られた結果と殺菌処理前の試料を殺菌処理された試料と同様の処理・測定して得られた結果とを比較する工程を備える。

【選択図】 図 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

殺菌対象から殺菌処理された試料を採取し、その試料を予め所定時間培養した後、試料中に含まれる個々の微生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定することを特徴とする微生物の殺菌処理効果測定方法。

【請求項 2】

前記測定して得られた結果と、殺菌処理前の試料を殺菌処理された試料と同様の処理・測定をして得られた結果とを比較する工程をさらに備える請求項 1 に記載の微生物の殺菌処理効果測定方法。

【請求項 3】

個々の微生物の増殖活性が、微生物の大きさ、及び、微生物の核酸含有量の少なくとも 1 つによって表される請求項 1 又は 2 に記載の微生物の殺菌処理効果測定方法。

【請求項 4】

電氣的又は光学的測定が、フローサイトメータによって行われる請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載の微生物の殺菌処理効果測定方法。

【請求項 5】

殺菌対象から第 1 の試料と第 2 の試料とを採取し、第 1 の試料を殺菌処理し、第 1 の試料と第 2 の試料とそれぞれ所定時間培養した後、第 1 と第 2 の試料中に含まれる微生物の増殖活性をそれぞれ電氣的又は光学的に測定することを特徴とする微生物の殺菌処理効果測定方法。

【請求項 6】

所定時間が、微生物の増殖活性が最大に近づく培養時間である請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載に微生物の殺菌処理効果測定方法。

【請求項 7】

所定時間が、微生物の対数期に入る直前である請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載に微生物の殺菌処理効果測定方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、試料中に含まれる個々の微生物の増殖活性を測定することにより、微生物の殺菌処理効果を迅速に測定する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

食品、医薬品、化粧品等の様々な工業製品、工業分野で、微生物の増殖による製品等の品質低下、食中毒事件が問題になっている。このため、微生物の増殖を抑制する目的で、加熱、紫外線照射、放射線照射、オゾン処理、エチレンオキサイドガス処理、電解水、各種薬剤による殺菌・消毒処理法が検討・開発されている。

【0003】

これらの殺菌・消毒処理法の効果を判定するためには、(1)微生物を含む試料について、殺菌・消毒法を施し、(2)処理後の試料を標準寒天培地等の適当な増殖培地と混合した後に、適当な条件（温度、好気性/嫌気性雰囲気、etc）下で 24～48 時間培養した後、(3)微生物が増殖して形成したコロニー数を計数し、生菌数を CFU (colony formation unit) として求め、(4)殺菌未処理の対照試料の生菌数との比較によって殺菌・消毒処理法の効果を判定する。

【0004】

また、滅菌処理が十分であるか否かを判断するための指標として B. subtilis 芽胞などを用い、滅菌処理された芽胞の多角光散乱と滅菌処理されなかった多角光散乱とを比較することにより、滅菌処理の有効性を検出する方法が知られている（例えば、特許文献 1 参照。）。

【0005】

10

20

30

40

50

また、細菌試料を生菌特異的にあるいは死菌特異的に蛍光染色した後に、フローサイトメータあるいは、蛍光顕微鏡で、生菌あるいは死菌を選択的に計数する方法が知られている。

【特許文献 1】特表 2 0 0 2 - 5 4 2 8 3 6 公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

コロニーを計数する方法は、コロニーが形成されるのに長い時間が必要とされるので、殺菌・消毒処理効果の判定に時間がかかる。

【0 0 0 7】

芽胞の多角光散乱を比較する方法では、多角光散乱の差異が必ずしも滅菌率の差異と一致しないという問題がある。

【0 0 0 8】

生菌又は死菌特異性の蛍光色素を用いる方法では、例えば、細胞膜透過性を基に、微生物の生死を判定するために、必ずしも蛍光色素の染色性と微生物の生死が一致しないという問題がある。

【0 0 0 9】

本発明は、このような事情を考慮してなされたもので、試料中に含まれる個々の微生物の増殖活性を測定することにより、迅速かつ正確に、微生物の殺菌処理効果を測定する方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 0】

本発明は、殺菌対象から殺菌処理された試料を採取し、その試料を予め所定時間培養した後、試料中に含まれる個々の微生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定することの特徴とする微生物の殺菌処理効果測定方法を提供する。

【0 0 1 1】

発明者は、殺菌処理後の試料を培養することにより、微生物の増殖活性に変化が生じ、その増殖活性を電氣的又は光学的に測定することにより、生微生物数を効果的に検出・計数することができることを見出した。これにより、その生微生物数から微生物の殺菌処理効果を測定することが可能となり、本発明の完成に至った。例えば、検出される生微生物の数が所定の数値以下であるか否かを調べることにより、殺菌処理の効果が十分であるか否かを測定することができる。

【発明の効果】

【0 0 1 2】

本発明における試料の培養工程にかかる時間は、微生物の増殖活性を変化させるのに必要な時間で足りる。この時間は、微生物がコロニーを形成するまでにかかる時間よりもはるかに短いため、本発明により短時間で殺菌処理効果を測定することが可能となる。

【0 0 1 3】

本発明の方法では、個々の微生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定することにより、生微生物を直接的に計数し、殺菌処理効果を測定できるため、グロスで pH や多角光散乱などの差異から間接的に殺菌処理効果を測定する方法と比較して、信頼性が高い。

【0 0 1 4】

本発明の方法は、試料を培養することにより、生微生物と死微生物との間に、所定の増殖活性について差異が生じることを利用するため、従来の生菌又は死菌特異性の蛍光色素を用いる方法のように、蛍光色素の細胞膜透過性と微生物の生死との間の不一致による誤差が生じず、信頼性が高い。

【発明を実施するための最良の形態】

【0 0 1 5】

本発明の第 1 の実施形態による微生物の殺菌処理効果測定方法は、殺菌対象から殺菌処理された試料を採取し、その試料を予め所定時間培養した後、試料中に含まれる個々の微

10

20

30

40

50

生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定することを特徴とする。

【0016】

まず、殺菌対象から殺菌処理された試料を採取し、その試料を予め所定時間培養する工程について説明する。

【0017】

殺菌処理とは、例えば、化学的・物理的手段により、微生物を死滅させ又は不活性にさせることをいう。具体的には、例えば、(1)試料に紫外線/放射線を照射すること、(2)試料に殺菌効果を有する化学物質を加えること、(3)試料を加熱処理することなどが含まれる。

【0018】

微生物の種類は限定されず、殺菌対象に、1種類又は複数の種類の微生物が含まれていてもよい。微生物とは、その大きさについては、例えば、径又は長さが $0.1\mu\text{m} \sim 500\mu\text{m}$ 程度のものをいう。

【0019】

試料を予め所定時間培養するとは、試料を予め所定時間、試料に含まれる微生物の生育にとって好適な環境に置くことをいう。

【0020】

微生物の生育にとって好適な環境は、測定対象とする試料、微生物によって異なり、実施の形態は特に限定されるものではない。例えば、測定対象とする微生物が細菌の場合は、液体培地の使用が好適である。具体的には、例えば、一般細菌を増殖させるためには、普通ブイヨン培地、ハートインヒュージョンブイヨン培地、トリプトソイブイヨン培地などが好適に使用される。

【0021】

測定試料が液体の場合は、そのまま測定試料と液体培地を混合するだけでよい。また、測定試料が固形、半固形の場合、試料と生理食塩水、ペプトン水等適当な希釈液とを混合してストマッカー等を用いてホモジナイズした後に、試料と液体培地を混合することが好ましい。

【0022】

ホモジナイズ後の試料に最小径 $100\mu\text{m}$ 以上の微生物以外の粒子が存在する場合は、測定の精度が低化するため、染色液とのメッシュを用いてろ過することが好ましい。メッシュの大きさは、 $100\mu\text{m}$ 程度であることが好ましい。ろ過は、培養開始前、好ましくはフローサイトメータでの測定前に実施することが好適である。ホモジナイズする際に、希釈液の代わりに培養に使用する液体培地を用いれば、工程が簡略化できる。

【0023】

培養は、微生物の種類によって増殖培養可能な温度域が存在するが、増殖至適温度で培養することが好適である。例えば、低温菌では 27°C 前後、中温菌では 37°C 前後、高温菌では 55°C 前後が好適である。例えば、食中毒を引き起こす病原菌あるいは、腐敗・変敗菌の多くは、中温菌であり、 37°C 前後で活発に増殖する。

【0024】

これらの条件以外にも、特殊な菌では、塩、pH、酸素濃度等、増殖条件として種々の条件が要求される場合がある。試験対象となる微生物の増殖条件は詳細に検討されており、種々の文献、教科書が容易に入手可能である。

【0025】

所定時間とは、微生物の増殖活性を変化させるのに必要な時間をいう。「変化させる」とは、例えば、生微生物と死微生物との間で電氣的又は光学的手段により区別できる程度の差異を生じさせることをいう。微生物の増殖活性が最大に近づく培養時間が好適であり、培養時間としては、対数期に入る直前、誘導期の末期まで培養することが好ましい。

【0026】

例えば、大腸菌では、 37°C 前後で、1時間～2時間前後培養することが好ましい。

【0027】

10

20

30

40

50

次に、試料中に含まれる微生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定する工程について説明する。

【0028】

微生物の増殖活性とは、試料を培養することにより変化し、光学的又は電氣的に測定される微生物の特性をいい、より詳しくは、例えば、フローサイトメータのような粒子検出計数装置により検出される微生物の特性をいう。具体的には、例えば、微生物の大きさ、長さ、体積、及び、微生物の細胞内含有物、例えば、核酸含有量などがある。

【0029】

「微生物の増殖活性を電氣的又は光学的に測定する」とは、例えば、微生物の増殖活性に基づいて、電氣的又は光学的な手段を用いて、生微生物と死微生物とを区別して微生物を個別に検出して計数することをいう。これにより、試料中の生微生物の数から殺菌処理効果を測定することができる。

【0030】

電氣的又は光学的測定は、例えば、フローサイトメータを用いて行うことができる。フローサイトメータは個々の微粒子からの電氣的又は光学的信号を得ることができる。フローサイトメータとしては、例えば、光学式フローサイトメータ、電気抵抗式フローサイトメータなどを用いることができる。フローサイトメータは、約1～500ミクロン程度の微粒子を計測できるものが好ましい。

【0031】

光学式フローサイトメータとしては、シスメックス株式会社より発売されているBAC TANA、ベックマン・クーラー社より発売されているEPICSシリーズ、ベクトン・ディッキンソン社より発売されているFACSシリーズを用いることができる。

【0032】

電気抵抗式フローサイトメータは、クーラー原理として良く知られる測定原理を用いた粒子計測装置で有り、例えば、シスメックス株式会社より販売されているSD-2000、CDA-500などの装置が好適に使用できる。

【0033】

微生物の増殖活性として微生物の核酸含有量を測定する場合、蛍光染色した核酸から発せられる蛍光の強度に基づいて、微生物の核酸含有量を測定することができる。

【0034】

例えば、(a)試料中の微生物を核酸特異性の蛍光色素で染色し、(b)得られた試料を光学式フローサイトメータに導入し、染色された個々の微生物に光を照射し、(c)個々の微生物から発せられる、微生物の核酸含有量を表す蛍光の強度に基づいて微生物を光学式フローサイトメータにより個別に検出して計数する工程により測定することができる。また、核酸特異性の蛍光色素で染色する代わりに、蛍光標識核酸プローブで標識してもよい。

【0035】

核酸特異性の蛍光色素には、微生物中の核酸(RNA、DNA)を特異的に染色するとともに、光を吸収し、蛍光を発するものが用いられる。ここで、「核酸を特異的に染色する」とは、主に核酸を染色することをいい、本発明の目的を逸脱しない範囲で、例えば、培養中に増加あるいは活性化する微生物中のタンパク質、酵素など、核酸以外のものを染色する場合を除外するものではない。従って、「核酸特異性の蛍光色素」には、本発明の目的を逸脱しない範囲で、例えば、微生物中のタンパク質、酵素など、核酸以外のものを染色する蛍光色素も含まれる。このような蛍光色素には、例えば、特開平9-104683、特開2001-258590に記載の色素を用いることができる。この色素を用いると、1分以内に微生物の核酸を染色することができ、好適である。

【0036】

微生物の核酸の染色は基本的に核酸特異性の蛍光色素と緩衝剤を含む水溶液である染色液を用いて行われる。染色を行う前に試料を希釈液で希釈する。その希釈液には、微生物の細胞膜を損傷させ、色素が細胞内に入りやすくするため、又は、微粒子の分散を改善す

10

20

30

40

50

るための薬剤、例えば、界面活性剤を加えることが好ましい。また、蛍光色素の安定性が悪い場合には、色素をエチレングリコール等の溶液で保存し、使用時に希釈液と混合して使用することが好適である。

【0037】

核酸が染色された微生物は、フローサイトメータからのレーザ等の光を吸収し、染色された核酸の量を表す強度の蛍光を発し、フローサイトメータは、蛍光を検出し、蛍光の強度を測定する。この蛍光の強度の違いに基づいて、生微生物と死微生物を区別して計数することができ、生微生物の数より、殺菌処理効果を測定することができる。

【0038】

微生物の増殖活性として微生物の大きさを測定する場合、微生物から発せられる散乱光強度に基づいて、微生物の大きさを測定することができる。 10

【0039】

例えば、(a) 試料を光学式フローサイトメータに導入し、個々の微生物に光を照射し、(b) 個々の微生物により散乱された、微生物の大きさを表す散乱光の強度に基づいて微生物を光学式フローサイトメータにより個別に検出して計数する工程により測定することができる。

【0040】

微生物に光を照射すると、微生物で光が散乱し、光学式フローサイトメータは、微生物の大きさを表す散乱光を検出し、散乱光の強度を測定する。測定された微生物の大きさの違いに基づいて、生微生物と死微生物を区別して計数することができ、生微生物の数より、殺菌処理効果を測定することができる。なお、「散乱光」には、前方散乱光、側方散乱光及び後方散乱光などが含まれる。 20

【0041】

増殖により、長さの変化する微生物、例えば、酵母、納豆菌などでは、散乱光の強度の代わりに、散乱光のパルス幅を用いてもよい。散乱光のパルス幅は、散乱光を検出している時間から測定することができる。測定された微生物のパルス幅の違いに基づいて、生微生物と死微生物を区別して計数することができ、生微生物の数より、殺菌処理効果を測定することができる。

【0042】

微生物の増殖活性として微生物の大きさ(体積)を測定する場合、微生物の存在により変化する電極間電気抵抗値に基づいて、微生物の大きさ(体積)を測定することができる。 30

【0043】

例えば、(a) 試料を、オリフィスと、オリフィスを介して電解液によって電氣的に接続された一対の電極とを備える電気抵抗式フローサイトメータに導入し、(b) 電解液中の個々の微生物がオリフィスを通過する際の、微生物の体積を表す電極間電気抵抗値に基づいて微生物を電気抵抗式フローサイトメータにより個別に検出して計数する工程により測定することができる。

【0044】

オリフィスとは、微細な貫通孔であり、例えば、直径が $30\mu\text{m}$ ~ $200\mu\text{m}$ 程度のものをを用いることができ、直径が約 $100\mu\text{m}$ のものが好ましい。 40

【0045】

一対の電極がオリフィスを介して電解液によって電氣的に接続され、電解液中の微粒子がオリフィスを通過する際に生じる電極間電気抵抗値の変化を電気パルスとして検出し、そのパルス高さから微粒子の体積を正確に計測できる。また、体積の違いによって、微生物と微生物以外の粒子を区別して計数することができる。

【0046】

測定された微生物の体積の違いに基づいて、生微生物と死微生物を区別して計数することができ、生微生物の数より、殺菌処理効果を測定することができる。

【0047】

本発明の方法は、殺菌処理前の試料と殺菌処理された試料とに対して同様の処理・測定を行って得られた両者の結果を比較する工程をさらに備えていてもよい。

【0048】

殺菌処理を施した試料と施していない試料について得られた結果を比較することにより、殺菌処理後も生存している微生物の数量について、相対値を得ることができ、より正確に殺菌処理効果を測定することができる。

【0049】

すなわち、相対値を得ることにより、殺菌対象に含まれる微生物数に左右されずに正確に殺菌処理効果を測定することができる。また、殺菌処理後の生微生物数の絶対値により殺菌処理効果を測定した場合には、培養時間の変動により、測定結果に一定のばらつきが生じるが、生微生物数の相対値により殺菌処理効果を測定した場合は、比較する2つの試料中の生微生物数が概ね同じ割合で増加するため、培養時間の変動による測定結果のばらつきが小さい。

【0050】

次に本発明の第2の実施形態について説明する。

本発明の第2の実施形態による微生物の殺菌処理効果測定方法は、殺菌対象から第1の試料と第2の試料とを採取し、第1の試料を殺菌処理し、第1の試料と第2の試料とそれぞれ所定時間培養した後、第1と第2の試料中に含まれる微生物の増殖活性をそれぞれ電気的又は光学的に測定することの特徴とする。

【0051】

少なくとも第1の試料について殺菌処理を施せばよく、第2試料については、殺菌処理を施しても施さなくてもよい。すなわち、第2の試料には、殺菌処理を施さず、第1の試料に施した殺菌処理の効果を測定してもよく、また、第2の試料に、第1試料に施したものと異なる殺菌処理を施し、2つの殺菌処理の効果を比較してもよい。

第1及び第2の実施形態の共通する部分についての説明は、第1の実施形態についての説明が、第2の実施形態についても適用される。

【0052】

なお、本発明は、試料の培養により、増殖活性が明確に変化しない場合にも適用できる。この場合、生微生物と死微生物を区別して検出して計数することができないが、第1及び第2の試料に含まれる生微生物を培養により十分に増殖させると、実質的に死微生物の数を無視することができる。

【0053】

この結果、培養後の微生物数の比は、培養前の生微生物数の比を反映しているといえ、培養後の微生物数を比較することにより、殺菌処理効果を測定することができる。

【0054】

その理由は、培養前の生微生物数が少ないほど、培養後の微生物数が少なくなるため、殺菌処理効果が高い程、培養後の微生物数が少なくなるためである。例えば、微生物が対数増殖期に入り、第1の試料に含まれる生微生物数と第2の試料に含まれる生微生物との間の差異が明確となる時間培養することが望ましい。

【0055】

この発明において、フローサイトメータを使用する場合には、試料中の細菌濃度として $10^2/\text{mL} \sim 10^3/\text{mL}$ 以上が好適であり、測定試料中の初期細菌濃度が低い場合。例えば、 $10^0/\text{mL}$ の初期濃度の大腸菌を $10^3/\text{mL}$ 以上の濃度まで増殖するには、約4-5時間の培養時間が必要である。

【実施例1】

【0056】

本発明の実施例を以下に示す。本発明の実施形態は以下の実施例に限定されるものではない。

【0057】

測定用試料の調製

10

20

30

40

50

大腸菌をハートインヒュージョンブイヨン培地に於て一昼夜培養した試料を生理食塩水で希釈し、初期濃度 10^5 /mL の試料を調製した。この試料を $45-80^\circ\text{C}$ で 10 分間加熱することにより殺菌処理を施した。殺菌処理後の試料 1 mL とハートインヒュージョンブイヨン培地 9 mL を混合し、 37°C で 2 時間培養した。

【0058】

次に、一定時間培養後の上記試料 50 μL に希釈液 340 μL を添加して攪拌した後、染色液 10 μL を添加し、 40°C で 20 秒間インキュベートすることにより、核酸特異性の蛍光色素での染色を行い、測定用試料を調製した。

【0059】

試薬は以下の組成のものを使用した。

10

(希釈液)

クエン酸二水塩 21.6 g/L

ミリスチルトリメチルアンモニウムブロマイド 1 g/L

精製水 1.0 L

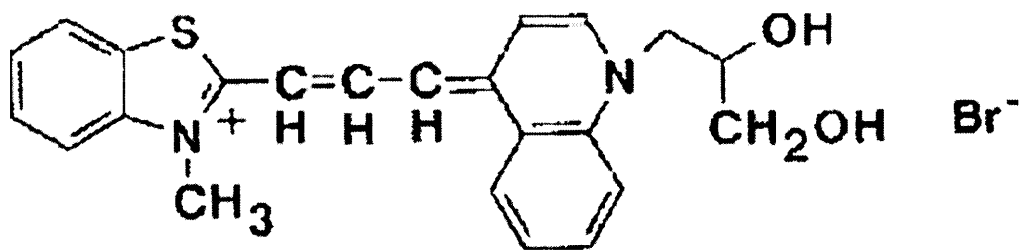
NaOH で pH 2.5 に調製した

(染色液)

下記の構造を有する色素 50 mg

【0060】

【化1】



20

エチレングリコール 1.0 L

【0061】

測定方法

633 nm の赤色半導体レーザを光源とするフローサイトメータを用いて、調製した試料について赤色蛍光 (650 nm 以上) 強度及び前方散乱光強度を測定した。

【0062】

図1、2は、殺菌処理を施していない試料について測定した蛍光強度のヒストグラムである。図1は、培養前のものであり、図2は培養後のものである。

【0063】

図3、4は、 55°C で 10 分間加熱することによる殺菌処理を施した試料について測定した蛍光強度のヒストグラムである。図3は、培養前のものであり、図4は培養後のものである。

【0064】

図1～図4において、横軸は蛍光強度 (FLP)、縦軸は各強度の蛍光を発した微生物の度数 (ALL)、縦方向の破線はディスクリレベルを示す。

【0065】

図1、2を比較すると、培養前 (図1) には、大部分の微生物が発した蛍光の強度はディスクリレベルより小さかったのに対し、培養後 (図2) には、大部分がディスクリレベル以上になっていることが分かる。これは、培養により生微生物中の核酸量が増加したためである。

【0066】

図3、4を比較すると、培養前 (図3)、培養後 (図4) とともに、大部分の微生物が発した蛍光の強度はディスクリレベルより小さいことが分かる。これは、殺菌処理により、

40

50

大部分の微生物が死滅し、生微生物の数が非常に少なくなったためである。

【0067】

殺菌処理の有無により、培養後の測定において、ディスクリレベル以上の強度の蛍光を発した微生物数が異なっており、殺菌処理の効果を反映していると言える。

【0068】

図4のヒストグラムのディスクリレベル以上の微生物数は、 $2.5 \times 10^3 / \text{mL}$ であり、図2のヒストグラムのディスクリレベル以上の微生物数は、 $4.63 \times 10^6 / \text{mL}$ であった。両者を除することにより、殺菌処理による微生物の抑制率が求まる。

抑制率 = 抑制試料測定値 / 対照試料測定値

$$= 2.50 \times 10^3 / 4.63 \times 10^6 = 5.40 \times 10^{-4}$$

10

となる。

【0069】

図5～図8は、前方散乱光強度 (FSCP) に対する度数 (ALL) を示すヒストグラムであり、図1～図4についての測定で用いた試料と同じ試料を用いて測定された。

【0070】

図5、6は、殺菌処理を施していない試料について測定した結果を示す。図5は、培養前のものであり、図6は培養後のものである。

【0071】

図7、8は、55 で10分間加熱することによる殺菌処理を施した試料について測定した結果を示す。図7は、培養前のものであり、図8は培養後のものである。

20

従って、図5～図8は、それぞれ、図1～図4に対応する。

【0072】

図5～図8は、図1～図4と同じ傾向を示し、前方散乱光を用いても、殺菌処理の効果を測定することができることを示す。つまり、殺菌処理を施していない試料 (図5, 6) では、培養により生微生物の大きさが大きくなったため、前方散乱光強度が強くなる。一方、殺菌処理を施した試料 (図7, 8) では、殺菌処理により大部分の微生物が死滅し、生微生物の数が非常に少なくなったため、培養しても前方散乱光強度に変化が生じていない。

【0073】

有効性の検証

30

本発明の方法の有効性を検証するために、同一の条件で殺菌処理を施した試料について、従来の方法と本発明の方法を用いて抑制率を求め、両者を比較した。

【0074】

従来の方法として、以下の手順で、微生物の抑制率を求めた。

まず、実施例1と同一の条件で大腸菌を含む試料を調製し、その試料について実施例1と同一の条件で加熱による殺菌処理を行った。殺菌処理後の試料1mLを約20mLの寒天培地と混釈したのち、35 で48時間培養し、コロニー数をカウントした。

【0075】

殺菌処理を施さなかった試料についても同様の方法でコロニー数をカウントした。殺菌処理を施した試料についての測定値を、殺菌処理を施さなかった試料についての測定値で除することにより、微生物の抑制率を求めた。

40

【0076】

殺菌処理のための加熱処理の温度を45 から5 刻みで80 まで変化させ、それぞれの温度における抑制率を従来の方法と本発明の方法を用いて求めた。その結果を表1に示した。

【0077】

図9は、表1に示された、従来の方法により求められた抑制率と、本発明の方法により求められた抑制率との関係を示すグラフである。このグラフは、両者がよく相関していることを示し、それゆえに、本発明の方法の有効性を示している。

【0078】

50

また、本発明による測定値の列を見ると、加熱処理温度が高いもの、すなわち、殺菌処理効果が高いものほど、測定値が小さくなっており、80 で加熱処理を施したものについては、微生物が検出されなかった。この結果は、生微生物数の絶対値を測定することによって、相対値を求めなくても、本発明の方法により、殺菌処理効果を測定することができることを示している。

【0079】

【表1】

加熱処理温度	測定値 (個/mL)		抑制率	
	従来の方法	本発明の方法	従来の方法	本発明の方法
加熱処理無し	4.40E+5	4.63E+6	—	—
45℃	3.40E+5	4.92E+6	7.73E-1	1.06E+0
50℃	1.40E+5	2.65E+5	3.18E-1	5.73E-2
55℃	4.50E+2	2.50E+3	1.02E-3	5.40E-4
60℃	3.60E+2	2.33E+3	8.18E-4	5.03E-4
65℃	2.40E+2	3.30E+2	5.45E-4	7.13E-5
70℃	4.00E+0	5.00E+2	9.09E-6	1.08E-4
75℃	2.00E+0	3.30E+2	4.55E-6	7.13E-5
80℃	0.00E+0	0.00E+0	0.00E+0	0.00E+0

10

20

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】殺菌処理を施していない試料について、培養前に測定した蛍光強度のヒストグラムである。

【図2】殺菌処理を施していない試料について、培養後に測定した蛍光強度のヒストグラムである。

【図3】殺菌処理を施した試料について、培養前に測定した蛍光強度のヒストグラムである。

30

【図4】殺菌処理を施した試料について、培養後に測定した蛍光強度のヒストグラムである。

【図5】殺菌処理を施していない試料について、培養前に測定した前方散乱光強度のヒストグラムである。

【図6】殺菌処理を施していない試料について、培養後に測定した前方散乱光強度のヒストグラムである。

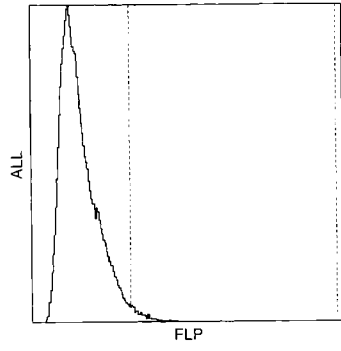
【図7】殺菌処理を施した試料について、培養前に測定した前方散乱光強度のヒストグラムである。

【図8】殺菌処理を施した試料について、培養後に測定した前方散乱光強度のヒストグラムである。

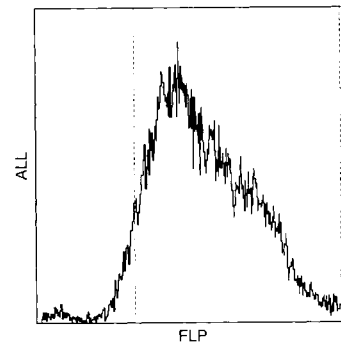
40

【図9】従来の方法による抑制率と、本発明の方法による抑制率との関係を示すグラフである。

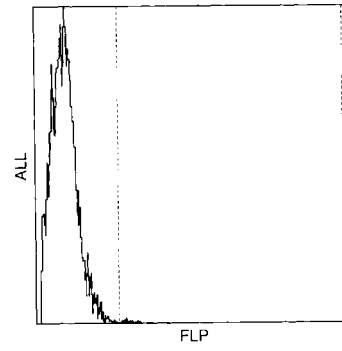
【図 1】



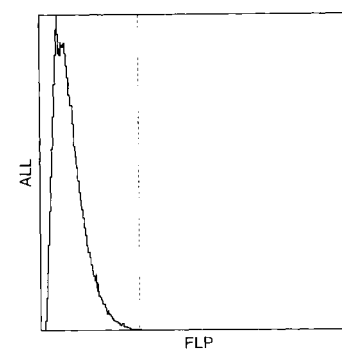
【図 2】



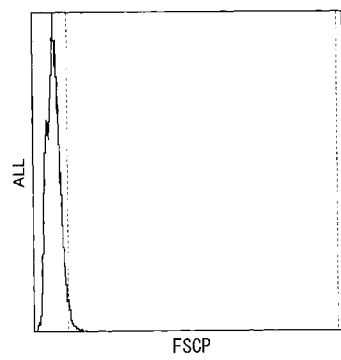
【図 3】



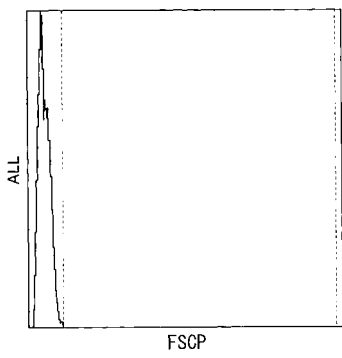
【図 4】



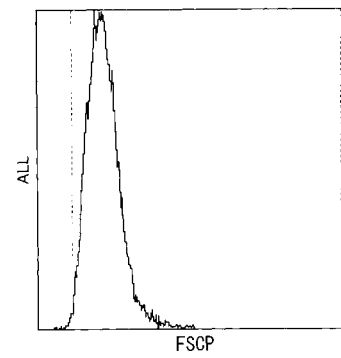
【図 5】



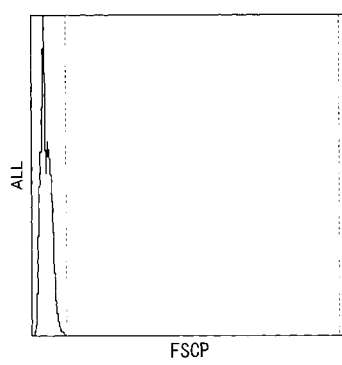
【図 7】



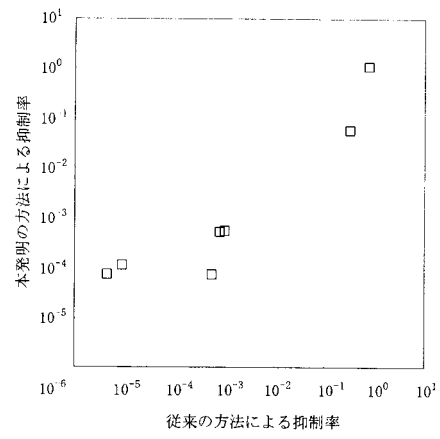
【図 6】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G059 AA05 BB04 BB14 CC16 DD01 EE02 EE07 FF05 GG01 HH02
HH06 MM02
4B063 QA01 QA05 QA20 QQ05 QQ42 QQ52 QR66 QR69 QS36 QS39
QX02