

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7624676号
(P7624676)

(45)発行日 令和7年1月31日(2025.1.31)

(24)登録日 令和7年1月23日(2025.1.23)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04
C 1 2 Q	1/70 (2006.01)	C 1 2 Q	1/70
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00

請求項の数 1 (全14頁)

(21)出願番号	特願2023-578171(P2023-578171)	(73)特許権者	515052682 株式会社バランス・イースト 東京都江東区冬木17番13号
(86)(22)出願日	令和4年12月19日(2022.12.19)	(74)代理人	100145861 弁理士 木村 薫
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/046707	(72)発明者	徳田美幸 東京都調布市深大寺東町7丁目41番地 7
(87)国際公開番号	WO2024/134734	審査官	松田 芳子
(87)国際公開日	令和6年6月27日(2024.6.27)		
審査請求日	令和5年12月21日(2023.12.21)		
早期審査対象出願 前置審査			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試薬、測定方法、および測定装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体に含まれる標的となる微生物である大腸菌を選択的に蛍光させる試薬により前記標的となる微生物である大腸菌の測定を行う測定方法であって、
バクテリオファージφ4と、FDA（フルオレセイン・ジアセテート）および/またはPI（プロピディウムイオダイド）とを混合して結合したものを前記試薬とし、
黒色のフィルタに前記試薬を含浸させ、
前記試薬を含浸させた前記黒色のフィルタに大腸菌を含む検体を含浸させ、
スライドグラスにマーキングされた測定円に前記試薬および前記検体を含浸させた前記黒色のフィルタを設置し、
蛍光処理装置の励起光照射部により所定の波長の励起光を照射する蛍光処理を行い、前記試薬を、前記大腸菌を選択的に感染させて前記大腸菌を蛍光させ、
前記顕微鏡装置の撮影部により、前記励起光を吸収した前記黒色のフィルタを複数撮影し、前記撮影部は、CMOSセンサーを用いて前記撮影するとともに、撮影した画像を補正し、
撮影した画像を解析し、
前記顕微鏡装置の補正部は、前記スライドグラス間の厚みおよび/または形状の相違を修正するよう前記画像を補正するとともに、前記顕微鏡装置において前記スライドグラスを設置するステージの水平方向に対する前記傾きを修正するよう前記画像を補正し、
前記顕微鏡装置の解析部により、前記撮影部が撮影した画像から標的とする微生物である大腸菌を所定の認識パラメータに基づいて認識する一方で、前記大腸菌以外のものは認識

しないように解析して前記大腸菌を測定し、
前記解析部は、前記認識パラメータは、前記標的とする微生物である大腸菌の形状、サイズ、蛍光の強度、および蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つを含むことを特徴とする測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試薬、測定方法、および測定装置に関し、特に、検体に含まれる標的となる微生物を蛍光させる試薬、測定方法、および測定装置に関する。

10

【背景技術】

【0002】

過去より食品の微生物管理は、トータルの品質管理の中でも中心的ファクターとなっている。食品衛生法でも、食品や食材事に一般細菌数と大腸菌数等の微生物数は基準値として定められている。よって各種食品関連事業所では日々、食品や、食材からサンプルを抜き取り、一般細菌数と大腸菌数等の微生物数の検査を行っている。食品の細菌数等を検査する技術は、例えば特許文献1に開示される技術を参照することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特開2014-52976号公報

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

検査の現状は国が定める培養法に頼らざるを得ない状況で48時間の時間と、それに伴い膨大なコストが計上されている。自社検査体制が無い企業は、検査をすべて外部依頼している。しかしながら、これら検査体制は大きな問題を抱えている。それは、検査に要する時間である。食品の大半は、鮮度が重要であるため、製造後はすぐに出荷される。つまり当日の生産品の微生物検査結果は48時間の判定であるにもかかわらず、検査結果が出る前に、出荷され食されてしまうのである。万一、先に出荷された食品の微生物汚染により食中毒が発生したとしても、原因があとから分かるという事である。この問題は、世界的にも共通のテーマとなっている。求められているニーズは、検査結果が出てから安心して出荷出来る事である。近年、培養法以外の簡易判定キットも各種販売はされているものの、2時間以上は、かかる上、簡易であるため精度に問題がある。

30

【0005】

本発明はこのような事情に鑑みてなされたものであり、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる試薬、測定方法、および測定装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記目的を達成するために、本発明の試薬は、検体に含まれる標的となる微生物を蛍光させる試薬であって、前記標的となる微生物を選択的に蛍光させることを特徴とする。

40

【0007】

本発明によれば、前記標的となる微生物を選択的に蛍光させることにより、微生物を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる。

【0008】

前記標的となる微生物を大腸菌とし、前記検体において前記大腸菌を選択的に蛍光させることにより、検体において大腸菌を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく大腸菌の測定を行うことができる。

【0009】

バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA と所定の蛍光試

50

薬とを結合したものであることが好ましい。

【0010】

バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA と所定の蛍光試薬とを結合したものを、前記検体に含まれる標的となる微生物である大腸菌と選択的に感染させることにより前記大腸菌を蛍光させることが好ましい。

【0011】

前記所定の蛍光試薬は、FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および / またはPI (プロピディウムイオダイド) とすることが好ましい。

【0012】

上記目的を達成するために、本発明の測定方法は、検体に含まれる標的となる微生物を蛍光させる試薬により前記標的となる微生物の測定を行う測定方法であって、前記標的となる微生物を選択的に蛍光させることを特徴とする。

10

【0013】

本発明によれば、前記標的となる微生物を選択的に蛍光させることにより、検体において微生物を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる。

【0014】

前記標的となる微生物を大腸菌とし、前記試薬は、前記検体において前記大腸菌を選択的に蛍光させることにより、検体において大腸菌を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく大腸菌の測定を行うことができる。

20

【0015】

前記試薬は、バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA に所定の蛍光試薬とを結合した試薬であることが好ましい。

【0016】

前記試薬は、バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA と所定の蛍光試薬とを結合した試薬であり、前記試薬を、前記検体に含まれる標的となる微生物である大腸菌と選択的に感染させることにより前記大腸菌を蛍光させることが好ましい。

【0017】

前記所定の蛍光試薬は、FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および / またはPI (プロピディウムイオダイド) とすることが好ましい。

30

【0018】

黒色のフィルタに前記微生物を選択的に蛍光させる試薬を含浸させるとともに、前記試薬を含浸させた前記黒色のフィルタを用いて前記微生物を選択的に蛍光させる処理を行うことにより、黒色の背景に微生物の蛍光を浮き出させるようにすることができ、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる。

【0019】

スライドガラスにマーキングされた測定円の中に前記試薬および前記微生物を含む検体を含浸させた前記黒色のフィルタを設置してカバーガラスで覆いプレパラートを作製することができる。

【0020】

前記測定円は、前記スライドガラスに複数マーキングされ、前記複数マーキングされている前記測定円のそれぞれの中に前記微生物を含む検体を含浸させた前記黒色のフィルタを設置することにより、微生物を含む検体を複数並行して測定することができ、測定の効率を向上させることができる。

40

【0021】

前記プレパラートを設置するステージをXY軸に沿って移動させて前記プレパラートの画像を撮影することができる。

【0022】

CMOSセンサーを用いて前記プレパラートの画像を撮影するとともに、撮影した画像を補正し、撮影した画像を解析することができる。

50

【 0 0 2 3 】

前記プレパラートにおけるスライドガラス間の厚みおよび／または形状の相違が修正されるように撮影した画像を補正することにより、スライドガラス間の厚みおよび／または形状が相違する場合であっても相違が修正されるように補正することができる。

【 0 0 2 4 】

前記ステージの傾きが修正されるように撮影した画像を補正することにより、ステージが傾く場合であっても傾きが修正されるように補正することができる。

【 0 0 2 5 】

撮影された画像から前記標的とする微生物を所定の認識パラメータに基づいて認識し、前記標的とする微生物以外のものは認識しないことにより、標的とする微生物のみを効率よく認識することができる。

10

【 0 0 2 6 】

前記認識パラメータは、前記標的とする微生物の形状、前記標的とする微生物のサイズ、前記標的とする微生物の蛍光の強度、および前記標的とする微生物の蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つを含むことができる。

【 0 0 2 7 】

上記目的を達成するために、本発明の測定装置は、検体に含まれる標的となる微生物を蛍光させる試薬により前記標的となる微生物の測定を行う測定装置であって、前記標的となる微生物を選択的に蛍光させることを特徴とする。

【 0 0 2 8 】

本発明によれば、前記標的となる微生物を選択的に蛍光させることにより、微生物を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる。

20

【 0 0 2 9 】

前記標的となる微生物を大腸菌とし、前記試薬は、前記検体において前記大腸菌を選択的に蛍光させることにより、検体において大腸菌を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく大腸菌の測定を行うことができる。

【 0 0 3 0 】

前記試薬は、バクテリオファージ t 4 および／またはバクテリオファージ t 4 DNA に所定の蛍光試薬とを結合した試薬であることが好ましい。

【 0 0 3 1 】

前記試薬は、バクテリオファージ t 4 および／またはバクテリオファージ t 4 DNA と所定の蛍光試薬とを結合した試薬であり、前記試薬を、前記検体に含まれる標的となる微生物である大腸菌と選択的に感染させることにより前記大腸菌を蛍光させることが好ましい。

30

【 0 0 3 2 】

前記所定の蛍光試薬は、FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および／またはPI (プロピディウムイオダイド) とすることが好ましい。

【 0 0 3 3 】

黒色のフィルタに前記微生物を選択的に蛍光させる試薬を含浸させるとともに、前記試薬を含浸させた前記黒色のフィルタを用いて前記微生物を選択的に蛍光させる処理を行うことにより、黒色の背景に微生物の蛍光を浮き出させるようにすることができ、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる。

40

【 0 0 3 4 】

スライドガラスにマーキングされた測定円の中に前記試薬および前記微生物を含む検体を含浸させた前記黒色のフィルタを設置してカバーガラスで覆いプレパラートを作製することができる。

【 0 0 3 5 】

前記測定円は、前記スライドガラスに複数マーキングされ、前記複数マーキングされている前記測定円のそれぞれの中に前記微生物を含む検体を含浸させた前記黒色のフィルタを設置することにより、微生物を含む検体を複数並行して測定することができ、測定の効率を向上させることができる。

50

【 0 0 3 6 】

前記プレパラートを設置するステージを X Y 軸に沿って移動させて前記プレパラートの画像を撮影することができる。

【 0 0 3 7 】

C M O S センサーを用いて前記プレパラートの画像を撮影するとともに、撮影した画像を補正し、撮影した画像を解析することができる。

【 0 0 3 8 】

前記プレパラートにおける前記スライドガラス間の厚みおよび / または形状の相違が修正されるように撮影した画像を補正することにより、スライドガラス間の厚みおよび / または形状が相違する場合にあっても相違が修正されるように補正することができる。

10

【 0 0 3 9 】

前記ステージの傾きが修正されるように撮影した画像を補正することにより、ステージが傾く場合にあっても傾きが修正されるように補正することができる。

【 0 0 4 0 】

撮影された画像から前記標的とする微生物を所定の認識パラメータに基づいて認識し、前記標的とする微生物以外のものは認識しないことにより、標的とする微生物のみを効率よく認識することができる。

【 0 0 4 1 】

前記認識パラメータは、前記標的とする微生物の形状、前記標的とする微生物のサイズ、前記標的とする微生物の蛍光の強度、および前記標的とする微生物の蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つを含むことができる。

20

【 発明の効果 】

【 0 0 4 2 】

本発明によれば、迅速にかつ精度よく微生物の測定を行うことができる試薬、測定方法、および測定装置を提供することを目的とする。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 3 】

【 図 1 】 本発明の実施形態に係る試薬の構成を示す図である。

【 図 2 】 同試薬が大腸菌に取り込まれた状態を示す図である。

【 図 3 】 本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図である。

30

【 図 4 】 本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図 3 に続く図である。

【 図 5 】 本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図 4 に続く図である。

【 図 6 】 本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図 5 に続く図である。

【 図 7 】 本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図 6 に続く図である。

【 図 8 】 本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図 7 に続く図である。

40

【 図 9 】 同測定方法および測定装置に用いられる顕微鏡装置の構成を示す図である。

【 図 1 0 】 同測定方法および測定装置に用いられる顕微鏡装置の構成を示す別の図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 4 】

以下、本発明の実施形態について図面を参照して詳細に説明する。

【 0 0 4 5 】

[試薬の実施形態]

図 1 は、本発明の実施形態に係る試薬の構成を示す図、図 2 は、同試薬が大腸菌に取り込まれた状態を示す図である。

50

【 0 0 4 6 】

本発明の実施形態に係る試薬 1 は、図 1 に示すように、[バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA] 1 A と所定の蛍光試薬 1 B とを予め混合して結合した試薬である。バクテリオファージ T 4 は、大腸菌 1 0 2 に感染するバクテリオファージの種であり、二本鎖 DNA ウイルスに分類される。バクテリオファージ t 4 DNA は、バクテリオファージ T 4 の DNA であり、例えば、バクテリオファージ T 4 から DNA を抽出して得ることができる。

【 0 0 4 7 】

すなわち、試薬 1 は、図 2 に示す検体 1 0 0 に含まれる標的となる微生物 1 0 1 を蛍光させる試薬 1 であって、標的となる微生物 1 0 1 を選択的に蛍光させることができる。本実施形態にあつては、標的となる微生物 1 0 1 を大腸菌 1 0 2 とし、検体 1 0 0 において大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させることができる。

10

【 0 0 4 8 】

つまり、試薬 1 は、上記したように、[バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA] 1 A と所定の蛍光試薬 1 B とを予め混合して結合した試薬であり、試薬 1 を、検体 1 0 0 に含まれる標的となる微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 と選択的に感染させて大腸菌 1 0 2 に取り込むことにより大腸菌 1 0 2 を蛍光させることができる。本実施形態にあつては、所定の蛍光試薬 1 B は、DNA 蛍光試薬であり、FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および / または PI (プロピディウムイオダイド) とすることができる。FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および / または PI (プロピディウムイオダイド) は、大腸菌 1 0 2 の培養をすることなく用いることができ、例えば予め大腸菌 1 0 2 の培養が必要な AO (アクリルオレンジ) に対し顕著な効果を有する。

20

【 0 0 4 9 】

このように、試薬 1 は、標的となる微生物 1 0 1 を選択的に蛍光させることにより、微生物 1 0 1 を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく微生物 1 0 1 の測定を行うことができる。

【 0 0 5 0 】

また、標的となる微生物 1 0 1 を大腸菌 1 0 2 とし、検体 1 0 0 において大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させることにより、検体 1 0 0 において大腸菌 1 0 2 を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく大腸菌 1 0 2 の測定を行うことができる。

30

【 0 0 5 1 】

[測定方法および測定装置の実施形態]

図 3 乃至図 8 は、本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置に用いられるプレパラートの作製方法を示す図、図 9 および図 1 0 は、同測定方法および測定装置に用いられる顕微鏡装置の構成を示す図である。

【 0 0 5 2 】

本発明の実施形態に係る測定方法および測定装置 2 0 0 には、上記した試薬 1 が用いられる。すなわち、本測定方法および測定装置 2 0 0 は、検体 1 0 0 に含まれる標的となる微生物 1 0 1 を蛍光させる試薬 1 により標的となる微生物 1 0 1 の測定を行う測定方法および測定装置 2 0 0 であつて、標的となる微生物 1 0 1 を選択的に蛍光させることができる。測定装置 2 0 0 は、後述する蛍光処理装置 6 0 および顕微鏡装置 7 0 を有している。

40

【 0 0 5 3 】

本測定方法および測定装置 2 0 0 においては、標的となる微生物 1 0 1 を大腸菌 1 0 2 とし、試薬 1 は、検体において大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させることができる。

【 0 0 5 4 】

試薬 1 は、図 1 に示すように、[バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 DNA] 1 A に所定の蛍光試薬 1 B とを予め混合して結合した試薬である。バクテリオファージ T 4 は、大腸菌 1 0 2 に感染するバクテリオファージの種であり、二本鎖 DNA ウイルスに分類される。バクテリオファージ t 4 DNA は、バクテリオファージ T 4 の DNA であり、例えば、バクテリオファージ T 4 から DNA を抽出して得ることができる。

50

【 0 0 5 5 】

すなわち、試薬 1 は、図 2 に示す検体 1 0 0 に含まれる標的となる微生物 1 0 1 を蛍光させる試薬 1 であって、標的となる微生物 1 0 1 を選択的に蛍光させることができる。本実施形態にあっては、標的となる微生物 1 0 1 を大腸菌 1 0 2 とし、検体 1 0 0 において大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させることができる。

【 0 0 5 6 】

つまり、試薬 1 は、上記したように、[バクテリオファージ t 4 および/またはバクテリオファージ t 4 DNA] 1 A と所定の蛍光試薬 1 B とを予め混合して結合した試薬であり、試薬 1 を、検体 1 0 0 に含まれる標的となる微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 と選択的に感染させて大腸菌 1 0 2 に取り込むことにより大腸菌 1 0 2 を蛍光させることができる。本実施形態にあっては、所定の蛍光試薬 1 B は、DNA 蛍光試薬であり、FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および/または PI (プロピディウムイオダイド) とすることができる。FDA (フルオレセイン・ジアセテート) および/または PI (プロピディウムイオダイド) は、大腸菌 1 0 2 の培養をすることなく用いることができ、例えば予め大腸菌 1 0 2 の培養が必要な AO (アクリルオレンジ) に対し顕著な効果を有する。

10

【 0 0 5 7 】

本測定方法および測定装置 2 0 0 においては、所定のプレパラート 1 0 を用いて大腸菌 1 0 2 の測定を行うことができる。プレパラート 1 0 の作製方法は次のように説明される。

【 0 0 5 8 】

すなわち、まず図 3 に示すように、黒色のフィルタ 2 0 を用意する。

20

次いで、図 4 に示すように、黒色のフィルタ 2 0 に大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させる試薬 1 を含侵させるとともに、試薬 1 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 を用いて大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させる処理を行うことを可能とする。

【 0 0 5 9 】

より詳しくは、図 4 に示すように、黒色のフィルタ 2 0 に大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させる試薬 1 を含侵させるとともに、図 5 に示すように、試薬 1 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 に大腸菌 1 0 2 を含む検体 1 0 0 を含侵させて大腸菌 1 0 2 を選択的に蛍光させる処理を行うことを可能とする。

【 0 0 6 0 】

続いて、スライドガラス 3 0 を用意し、図 6 に示すように、スライドガラス 3 0 に測定円 4 0 をマーキングする。

30

【 0 0 6 1 】

次に、図 7 に示すように、マーキングされた測定円 4 0 の中に試薬 1 および大腸菌 1 0 2 を含む検体 1 0 0 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 を設置して、続いて、図 8 に示すように、カバーガラス 5 0 で覆いプレパラート 1 0 を作製する。

【 0 0 6 2 】

測定円 4 0 は、スライドガラス 3 0 に複数マーキングされ、複数マーキングされている測定円 4 0 のそれぞれの中に大腸菌 1 0 2 を含む検体 1 0 0 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 を設置する。

【 0 0 6 3 】

また、本測定方法および測定装置 2 0 0 においては、このように作製されたプレパラート 1 0 を用いて、図 9 および図 1 0 に示すように、蛍光処理装置 6 0 により蛍光処理を行い、顕微鏡装置 7 0 により画像の撮影や補正、解析を行うことができる。顕微鏡装置 7 0 は蛍光顕微鏡装置である。

40

【 0 0 6 4 】

すなわち、蛍光処理装置 6 0 は、励起光照射部 6 1 および波長測定部 6 2 を有している。励起光照射部 6 1 は、プレパラート 1 0 (より詳しくは、試薬 1 および大腸菌 1 0 2 を含侵させた複数の黒色のフィルタ 2 0) に所定の波長の励起光を照射することができる。波長測定部 6 2 は、励起光を吸収したプレパラート 1 0 (より詳しくは、試薬 1 および大腸菌 1 0 2 を含侵させた複数の黒色のフィルタ 2 0) からの蛍光の波長を測定することが

50

できる。

【 0 0 6 5 】

顕微鏡装置 7 0 は、X Y 軸に沿って移動するステージ 7 1 を有している。すなわち、顕微鏡装置 7 0 において、プレパラート 1 0 を設置するステージ 7 1 を X Y 軸に沿って移動させて励起光を吸収したプレパラート 1 0 (より詳しくは、試薬 1 および大腸菌 1 0 2 を含浸させた複数の黒色のフィルタ 2 0) の画像を複数撮影することができる。

【 0 0 6 6 】

より詳しくは、顕微鏡装置 7 0 は、更に記憶部 7 2、撮影部 7 3、補正部 7 5、および解析部 7 4 を有している。

【 0 0 6 7 】

記憶部 7 2 は、標準的な認識パラメータとして標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的な形状、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的なサイズ、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的な蛍光の強度、および標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的な蛍光の濃淡のデータを記憶することができる。

【 0 0 6 8 】

また、撮影部 7 3 は、C M O S センサーを用いてプレパラート 1 0 の画像を複数の黒色フィルタ 2 0 のそれぞれにおいて複数撮影するとともに、補正部 7 5 は、撮影部 7 3 が撮影した画像を補正し、解析部 7 4 は、撮影部 7 3 が撮影した画像を定性的および/または定量的に解析することができる。

【 0 0 6 9 】

ここで、補正部 7 5 は、プレパラート 1 0 におけるスライドガラス 3 0 間の厚みおよび/または形状の相違が修正されるように撮影部 7 3 が撮影した画像を補正することができる。

【 0 0 7 0 】

すなわち、補正部 7 5 は、標準とするスライドガラス 3 0 の厚みおよび/または形状に対する撮影対象となるスライドガラス 3 0 の厚みおよび/または形状の相違が修正されるように撮影部 7 3 が撮影した画像を補正することができる。

【 0 0 7 1 】

また、補正部 7 5 は、ステージ 7 1 の傾きが修正されるように撮影部 7 3 が撮影した画像を補正することができる。すなわち、補正部 7 5 は、ステージ 7 1 の所定の方向より詳しくは水平方向に対する傾きが修正されるように撮影部 7 3 が撮影した画像を補正することができる。なお、撮影部 7 3 は、プレパラート 1 0 との距離を複数変更することにより、画像を拡大または縮小しながら撮影することもできる。すなわち、スライドガラス 3 0 の厚みや形状の個体差、およびスライドガラス 3 0 を設置するステージ 7 1 の傾きを測定毎に、検体 1 0 0 の表面を撮影部 7 3 にて 3 測点以上の距離で測定して、スライドガラス 3 0 の個体差 (厚みや歪み) や傾きを撮影部 7 3 のズームや補正部 7 5 で補正しながら撮影することができる機能を有している。

【 0 0 7 2 】

更に、解析部 7 4 は、撮影部 7 3 により撮影された画像から標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 を所定の認識パラメータに基づいて認識し、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 以外のものは認識しないように解析することができる。

【 0 0 7 3 】

認識パラメータは、例えば、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の形状、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 のサイズ、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の蛍光の強度、および標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つを含むことができる。

【 0 0 7 4 】

すなわち、解析部 7 4 は、記憶部 7 2 に記憶された標準的な認識パラメータとして標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的な形状、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的なサイズ、標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的な蛍光の強度、および標的とする微生物 1 0 1 である大腸菌 1 0 2 の標準的な蛍光の濃淡のデ

10

20

30

40

50

ータを読み出すとともに、これら読み出したデータと撮影部 73 により撮影された画像（より詳しくは補正部 75 により補正された画像）とを比較して、撮影された画像（より詳しくは補正された画像）が、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な形状、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的なサイズ、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な蛍光の強度、および標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つと所定の範囲で合致するか否かを解析することができる。

【0075】

撮影された画像（より詳しくは補正された画像）が、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な形状、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的なサイズ、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な蛍光の強度、および標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つと所定の範囲で合致した場合、解析部 74 は、撮影された画像（より詳しくは補正された画像）の微生物 101 が標的とする微生物 101 である大腸菌 102 であるとみなすことができる。

10

【0076】

本発明者は、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な形状、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的なサイズ、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な蛍光の強度、および標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の標準的な蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つと所定の範囲で合致した場合に撮影された画像（より詳しくは補正された画像）の微生物 101 が標的とする微生物 101 である大腸菌 102 とみなすことができることを明らかにしている。

20

【0077】

すなわち、検体 100 には、大腸菌 102 等の微生物 101 の他に、食品残さや、汚れ、その他の異物が混入されていることがあり、上記のような蛍光染色を行っても、微生物 101 と非微生物との判定が難しい場合があるが、上記のような 3 つ以上の認識パラメータによって認識することによって大腸菌 102 等の微生物 101 のみを測定し、微生物 101 以外は測定しないこととすることが可能となる。

【0078】

なお、撮影部 73 が撮影した画像において、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の形状、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 のサイズ、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の蛍光の強度、および標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の蛍光の濃淡は、プレパラート 10 におけるスライドガラス 30 間の厚みおよび / または形状の相違やステージ 71 の傾きによりピントがずれて画像がぼやけてしまう等影響を受けることとなるが、上記したように、補正部 75 は、プレパラート 10 におけるスライドガラス 30 間の厚みおよび / または形状の相違が修正されるように撮影部 73 が撮影した画像を補正することができるとともに、ステージ 71 の傾きが修正されるように撮影部 73 が撮影した画像を補正することができるため、このような影響を適宜補正して正確な画像処理を行うことができる。

30

【0079】

以上説明したように、本発明の測定方法および測定装置 200 によれば、標的となる微生物 101 を選択的に蛍光させることにより、検体 100 において微生物 101 を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく微生物 101 の測定を行うことができる。

40

【0080】

また、標的となる微生物 101 を大腸菌 102 とし、試薬 1 は、検体 100 において大腸菌 102 を選択的に蛍光させることにより、検体 100 において大腸菌 102 を選択して測定することができる等、迅速にかつ精度よく大腸菌 102 の測定を行うことができる。

【0081】

更に黒色のフィルタ 20 に大腸菌 102 を選択的に蛍光させる試薬 1 を含侵させるとともに、試薬 1 を含侵させた黒色のフィルタ 20 を用いて大腸菌 102 を選択的に蛍光させる

50

処理を行うことにより、黒色の背景に大腸菌 102 の蛍光を浮き出させるようにすることができ、迅速にかつ精度よく大腸菌 102 の測定を行うことができる。

【0082】

更にまた、測定円 40 は、スライドガラス 30 に複数マーキングされ、複数マーキングされている測定円 40 のそれぞれの中に大腸菌 102 を含む検体 100 を含侵させた黒色のフィルタ 20 を設置することにより、大腸菌 102 を含む検体 100 を複数並行して測定することができ、測定の効率を向上させることができる。

【0083】

また更に、補正部 75 は、プレパラート 10 におけるスライドガラス 30 間の厚みおよび/または形状の相違が修正されるように撮影部 73 が撮影した画像を補正することにより、スライドガラス 30 間の厚みおよび/または形状が相違する場合にあっても相違が修正されるように補正することができる。

10

【0084】

また、補正部 75 は、ステージ 71 の傾きが修正されるように撮影部 73 が撮影した画像を補正することにより、ステージ 71 が傾く場合にあっても傾きが修正されるように補正することができる。

【0085】

更に、補正部 75 は、撮影部 73 により撮影された画像から標的とする微生物 101 を所定の認識パラメータに基づいて認識し、標的とする微生物 101 以外のものは認識しないことにより、標的とする微生物 101 のみを効率よく認識することができる。

20

【0086】

なお、本発明は上述した実施形態に限定されることなく種々の変形実施、応用実施が可能であることは勿論である。

【0087】

すなわち、上述した実施形態にあつては、微生物 101 を大腸菌 102 とすることとしているが、大腸菌 102 以外の微生物 101 に適宜対応可能である。

【0088】

つまり、上述した実施形態にあつては、黒色のフィルタ 20 に大腸菌 102 を選択的に蛍光させる試薬 1 を含侵させるとともに、試薬 1 を含侵させた黒色のフィルタ 20 を用いて大腸菌 102 を選択的に蛍光させる処理を行うこととしているが、黒色のフィルタ 20 に大腸菌 102 以外の微生物 101 を選択的に蛍光させる試薬 1 を含侵させるとともに、試薬 1 を含侵させた黒色のフィルタ 20 を用いて大腸菌 102 以外の微生物 101 を選択的に蛍光させる処理を行うこととしても所要の効果を奏することができる。

30

【0089】

また、上述した実施形態にあつては、スライドガラス 30 にマーキングされた測定円 40 の中に試薬 1 および大腸菌 102 を含む検体 100 を含侵させた黒色のフィルタ 20 を設置してカバーガラス 50 で覆いプレパラート 10 を作製することとしているが、スライドガラス 30 にマーキングされた測定円 40 の中に試薬 1 および大腸菌 102 以外の微生物 101 を含む検体 100 を含侵させた黒色のフィルタ 20 を設置してカバーガラス 50 で覆いプレパラート 10 を作製することとしても所要の効果を奏することができる。

40

【0090】

更に、上述した実施形態にあつては、撮影部 73 により撮影された画像から標的とする微生物 101 である大腸菌 102 を所定の認識パラメータに基づいて認識し、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 以外のものは認識しないこととし、認識パラメータは、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の形状、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 のサイズ、標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の蛍光の強度、および標的とする微生物 101 である大腸菌 102 の蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つを含むこととしているが、標的とする微生物 101 を大腸菌 102 以外の微生物 101 としても所要の効果を奏することができる。

【0091】

50

つまり、単に、撮影部 7 3 により撮影された画像から標的とする微生物 1 0 1 を所定の認識パラメータに基づいて認識し、標的とする微生物 1 0 1 以外のものは認識しないこととし、認識パラメータは、標的とする微生物 1 0 1 の形状、標的とする微生物 1 0 1 のサイズ、標的とする微生物 1 0 1 の蛍光の強度、および標的とする微生物 1 0 1 の蛍光の濃淡の少なくともいずれか三つを含むこととしても所要の効果を奏することができる。

【 0 0 9 2 】

更にまた、上述した実施形態にあっては、複数マーキングされている測定円 4 0 のそれぞれの中に大腸菌 1 0 2 を含む検体 1 0 0 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 を設置することとしているが、大腸菌 1 0 2 を含む検体 1 0 0 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 と大腸菌 1 0 2 以外の微生物 1 0 1 を含む検体 1 0 0 を含侵させた黒色のフィルタ 2 0 をそれぞれ別々の測定円 4 0 の中に設置し二種以上の微生物 1 0 1 を同時測定することとしてもよい（例えば、一般細菌数と大腸菌数を同時に測定する）。

10

【符号の説明】

【 0 0 9 3 】

1：試薬

1 A：バクテリオファージ t 4 および / またはバクテリオファージ t 4 D N A

1 B：蛍光試薬

1 0：プレパラート

2 0：フィルタ

3 0：スライドグラス

4 0：測定円

5 0：カバーガラス

6 0：蛍光処理装置

6 1：励起光照射部

6 2：波長測定部

7 0：顕微鏡装置

7 1：ステージ

7 2：記憶部

7 3：撮影部

7 4：解析部

7 5：補正部

1 0 0：検体

1 0 1：微生物

1 0 2：大腸菌

2 0 0：測定装置

20

30

40

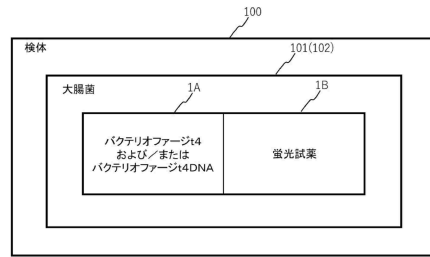
50

【図面】

【図 1】

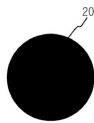


【図 2】

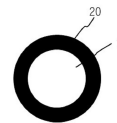


10

【図 3】

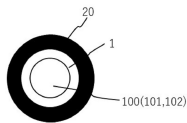


【図 4】

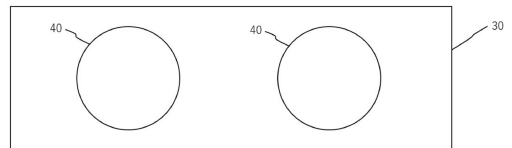


20

【図 5】



【図 6】

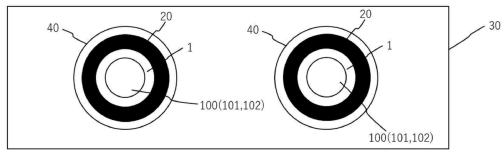


30

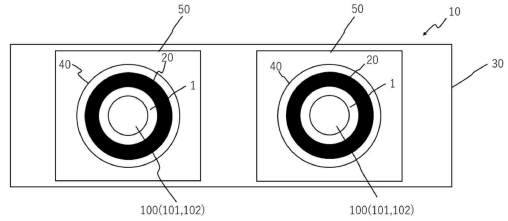
40

50

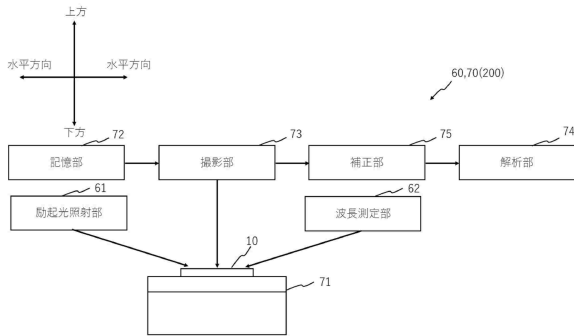
【図7】



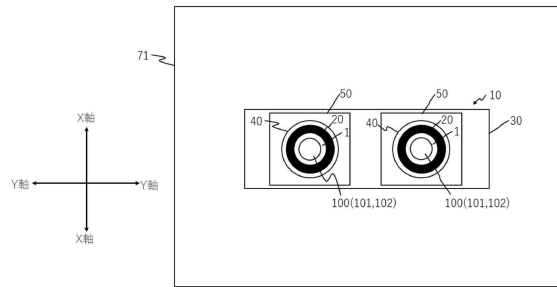
【図8】



【図9】



【図10】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2004-283003(JP,A)
特開2004-267099(JP,A)
特開2003-169695(JP,A)
国際公開第2022/163845(WO,A1)
中国特許出願公開第110261608(CN,A)
特開2007-097582(JP,A)
中国特許出願公開第102802797(CN,A)
Biochem. Eng. J., 2006年, vol.29, p.119-124
J. Health Sci., 2006年, vol.52, no.6, p.666-671
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)