

(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2010-29104

(P2010-29104A)

(43) 公開日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	2 G 0 6 0
G O 1 N 27/447 (2006.01)	G O 1 N 27/26 3 O 1 A	4 B 0 2 9
G O 1 N 27/02 (2006.01)	G O 1 N 27/02 D	4 B 0 6 3
G O 1 N 27/06 (2006.01)	G O 1 N 27/06 Z	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 D	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2008-194425 (P2008-194425)	(71) 出願人	000156581
(22) 出願日	平成20年7月29日 (2008.7.29)		日鉄環境エンジニアリング株式会社
			東京都千代田区東神田一丁目9番8号
		(71) 出願人	504145342
			国立大学法人九州大学
			福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
		(74) 代理人	100103621
			弁理士 林 靖
		(72) 発明者	末廣 純也
			福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
			国立大学法人九州大学内
		(72) 発明者	有馬 恵子
			東京都千代田区東神田一丁目9番8号 日
			鉄環境エンジニアリング株式会社内

最終頁に続く

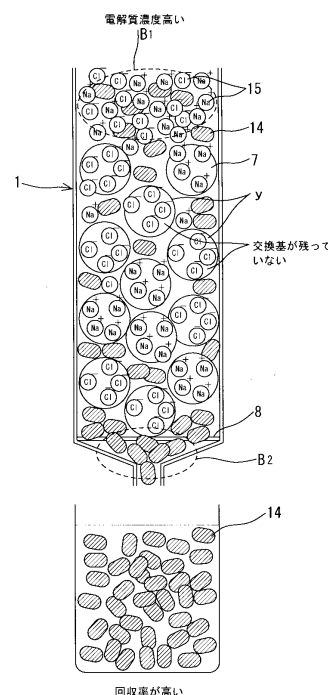
(54) 【発明の名称】 菌数測定のための前処理方法及び菌数測定前処理装置

(57) 【要約】

【課題】本発明は、このような課題を解決するためのものであり、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせることで菌数を測定するときに、検液中の細菌を希釈せずに導電率だけを下げても高精度で測定することができる菌数測定のための前処理方法、及びそのための菌数測定前処理装置を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明の菌数測定のための前処理方法と菌数測定前処理装置は、検液のインピーダンス変化から菌数測定を行うときに該検液を予め調製するものであって、菌株を溶液に懸濁し、この懸濁液の導電率に応じてイオン化傾向が大きく菌より結合能力が強い電解質を添加して一旦 $250\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の導電率の懸濁液とし、この懸濁液を電解質に対するイオン選択性の高いイオン交換樹脂でイオン交換して導電率を $10\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下に下げ、処理後の懸濁液を検液にすることを主な特徴とする。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検液のインピーダンス変化から菌数測定を行うときに該検液を予め調製する菌数測定のための前処理方法であって、測定対象の菌株を溶液に懸濁し、この懸濁液の導電率に応じて所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質を添加して一旦 $250 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の導電率の懸濁液とし、この懸濁液を、前記官能基を備え前記電解質に対するイオン選択性を有するイオン交換樹脂でイオン交換して導電率を $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下に下げ、処理後の懸濁液を検液にすることを特徴とする菌数測定のための前処理方法。

【請求項 2】

ポーラス型強酸性陽イオン交換樹脂とポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂の混合したイオン交換樹脂を使ってイオン交換処理することを特徴とする請求項 1 記載の菌数測定のための前処理方法。

【請求項 3】

前記電解質として塩化ナトリウムを添加することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の菌数測定のための前処理方法。

【請求項 4】

前記電解質を添加して懸濁液の導電率を $500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上にすると共に、 50h^{-1} 以上で 80h^{-1} 以下の空間速度でイオン交換することを特徴とする請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載された菌数測定のための前処理方法。

【請求項 5】

測定対象の菌株を懸濁した懸濁液に所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質を添加する電解質添加部と、前記官能基を備えて前記電解質に対するイオン選択性を有し添加後の懸濁液の導電率を $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下の懸濁液に低下させるイオン交換樹脂が充填されたカラムと、添加前の懸濁液の導電率及び添加後の懸濁液の導電率、さらにイオン交換後の導電率を検出する 1 台以上の導電率計とを備えたことを特徴とする菌数測定前処理装置。

【請求項 6】

前記カラムには、前記イオン交換樹脂の代表粒径よりも小さくかつ菌を通過させるフィルタが設けられ、該フィルタが前記イオン交換樹脂を支持していることを特徴とする請求項 5 記載の菌数測定前処理装置。

【請求項 7】

前記フィルタが親水性ポリビニリデンフロライドメンブレンフィルタであることを特徴とする請求項 6 記載の菌数測定前処理装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、検液中の細菌等を希釈せずに導電率だけを下げて測定する菌数測定のための前処理方法、及びこの前処理を行う菌数測定前処理装置に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、菌数を定量する方法として、コロニーカウント法がもっとも一般的に利用されている。この方法は、検液を培地上に滴下し、細菌等の増殖に伴って形成されるコロニーの数から菌数を定量するものである。なお、ここで細菌等というのは細菌のほかに、細胞などを含めたものであって、以下細菌等とも単に細菌、菌ともいうこともある。

【0003】

しかし、このコロニーカウント法は、コロニーが形成されるまでに 1 日以上の日単位の時間を必要とする。また、サンプリング、培地への植えつけ、コロニー数 (CFU) のカウントなど、定量するためには専門知識が必要となるものであった。

【0004】

そこで、本発明者の一人は、他の研究者らとともに誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせて菌数を測定するDEPIM (Dielectrophoretic Impedance Measurement Method) を提案した (例えば特許文献1参照)。このDEPIMは、電界中で分極した誘電体粒子に交番する電気力を作用させ、これによって起こる誘電泳動現象を利用して細菌等を集め、この濃縮時における電極間のインピーダンスの変化から菌数を定量的に推定するものである。

【0005】

DEPIMの誘電泳動現象の説明をすると、細菌に作用する誘電泳動力 F_{DEP} は複素数表現で理論的に $F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m \cdot a^3 \cdot Re[K] \nabla E^2$ で与えられる。この複素誘電率 K は $K = (\epsilon_i^* - \epsilon_m^*) / (\epsilon_i^* + 2\epsilon_m^*)$ と表され、懸濁液の複素誘電率 ϵ_m^* は $\epsilon_m^* = \epsilon_m - j \cdot \sigma / \omega$ である。

10

【0006】

ここに、 ϵ_m ：懸濁液の誘電率、 ϵ_m^* ：懸濁液の複素誘電率、 ϵ_i^* ：細菌の複素誘電率、 σ ：懸濁液の導電率、 ω ：電界の角周波数、 a ：球形近似したときの細菌の半径、 $Re[K]$ ：細菌と懸濁液の複素誘電率に依存するパラメータ、 E ：電界強度である。

【0007】

この関係から分かるように、誘電泳動力 F_{DEP} はパラメータ $Re[K]$ に比例し、懸濁液の導電率 σ の関数になる。そして、電界の周波数 f (なお $f = 2\pi\omega$) をパラメータにすると、誘電泳動力 F_{DEP} はおおむね周波数 $10kHz \sim 1MHz$ の範囲で正の誘電泳動力が働き、それ以外では負の誘電泳動力が働く。導電率 σ が大きくなるほど、 $Re[K]$ は大きくなり、正の誘電泳動力が作用する範囲も拡大する傾向がある。

20

【0008】

従って、DEPIMで菌数を検出するためには、まずこれを誘電泳動力で電極に凝集 (濃縮) させることが必要である。誘電泳動力が十分に作用しないような雰囲気下では電極に凝集する菌数が減少するため、測定感度が低くなる。そして、懸濁液の複素誘電率 ϵ_m^* が、懸濁液の誘電率 ϵ_m と懸濁液の導電率 σ 、角周波数 ω の関数であることから、細菌が異なればその導電率が誘電泳動力 F_{DEP} の差になって現われる。また、試料を懸濁する溶液が異なればその溶液の導電率が F_{DEP} に影響する。

【0009】

このため、従来、検液を収容したセル内に陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂を設け、測定を行う前に検液内の電解質濃度を下げ、測定時のバックグラウンドの電解質濃度を低下させて感度を上げる微生物数測定装置が提案されている (特許文献2参照)。検液は測定開始前にイオン交換樹脂によって電気伝導率 (導電率) が下げられ、その電解質濃度の濃い、うすいにかかわらずバックグラウンドの電解質の電気伝導率を小さくし、高精度の自動測定をするものである。

30

【0010】

さらに、誘電泳動で食物試料の微生物を濃縮する方法と、この誘電泳動に先立ってその導電率を低下させる技術も従来開示されている (特許文献3)。

【0011】

【特許文献1】特開2003-223号公報

40

【特許文献2】特開平11-127846号公報

【特許文献3】特表平11-501210号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

以上説明したように、DEPIMによる菌数測定装置では、電極間に印加した電界の作用で細菌等はその誘電的な性質によって最も電場が強かつ不均一な部分に誘電泳動される。電極間に浮遊していた細菌等は直ちにそのギャップの強電界部分へ泳動され、ギャップから離れたところに浮遊していた細菌等は距離に応じて所定時間経過した後にギャップの強電界部分へ到達する。一定時間後にギャップ近傍の所定領域に集まった細菌等の数は

50

試料の菌数に比例するし、この所定領域の時間変化に伴う菌数の変化も試料の菌数を示すことになる。

【0013】

図8はDEPIMによる菌数測定装置の構成図である。電極100a, 100b間に電源部101から10kHz~1MHz程度の交番電流(波形はパルス状のものまで含む)を流すと、検液に浮遊している細菌に誘電泳動力が作用し、それぞれ電極100a, 100bのエッジ近傍などの強電界部分103に誘電泳動され、パールチェーンが形成されて架橋される。ギャップの所定領域において、所定時間経過後の菌の濃縮程度、あるいは濃縮の変化率は試料の初期状態の菌数に依存する。濃縮程度と濃縮の変化率は検液の導電率の変化、すなわち電極100a, 100b間のインピーダンス変化、その変化の絶対量、あるいは変化率を測定部102によって測定することで計測することができる。

10

【0014】

従って、このDEPIMによる菌数測定装置の測定精度を高めるためには、誘電泳動前の検液の菌数が多いこと、またその導電率が低いことが重要である。すなわち菌数は当然当初の菌数に依存するし、DEPIMでは濃縮を行う誘電泳動力の強弱にも依存し、この誘電泳動力は導電率が低い方ほど大きくなる。

【0015】

培地の検液のような場合は導電率が高いため、そのままでは誘電泳動が難しい。そこで、特許文献2、3の菌数測定装置においては、電解質をイオン交換樹脂によってイオン交換し、導電率を低下させて、測定を行っている。

20

【0016】

しかし、これら従来のイオン交換による方法では、イオン交換樹脂で電解質をイオン交換するとき、この電解質だけでなく、測定対象である細菌も捕捉することが起こる。これにより検液中の細菌そのものの絶対量を減少させてしまう。とくに強酸、塩基性イオン交換樹脂を使う場合には、細菌の回収率が悪化する。また、測定結果に誤差も混入し易い。

【0017】

例えば導電率が低下したとしても、うすい濃度で測定するのでは測定感度は上がらない。空間速度(SV)などでイオン交換樹脂の吸着能をコントロールすることも考えられるが、基本的に電解質の除去と細菌を残存させるという矛盾した関係を解決しなければ、改善にも限界がある。

30

【0018】

このようにDEPIMで菌数を測定するのは、検液の導電率が高くても、イオン交換樹脂を使ってこれを低くしても、高精度の測定を行うのは難しかった。細菌等を除くことなく導電率だけを下げする方法や装置に期待が集まっている。また、誰でも同じように簡単に、迅速な測定ができる装置が望まれる。

【0019】

そこで本発明は、このような課題を解決するためのものであり、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、検液中の細菌を希釈せずに導電率だけを下げた高精度で測定することができる菌数測定のための前処理方法、及びそのための菌数測定前処理装置を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明の菌数測定のための前処理方法は、検液のインピーダンス変化から菌数測定を行うときに該検液を予め調製する菌数測定のための前処理方法であって、測定対象の菌株を溶液に懸濁し、この懸濁液の導電率に応じて所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質を添加して一旦 $250\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の導電率の懸濁液とし、この懸濁液を、前記官能基を備え電解質に対するイオン選択性を有するイオン交換樹脂でイオン交換して導電率を $10\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下に下げ、処理後の懸濁液を検液にすることを主な特徴とする。

【0021】

また、本発明の菌数測定前処理装置は、測定対象の菌株を懸濁した懸濁液に所定の官能

50

基との反応活性が菌より高い電解質を添加する電解質添加部と、前記官能基を備えて電解質に対するイオン選択性を有し添加後の懸濁液の導電率を $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下の懸濁液に低下させるイオン交換樹脂が充填されたカラムと、添加前の懸濁液の導電率及び添加後の懸濁液の導電率、さらにイオン交換後の送電率を検出する1台以上の導電率計とを備えたことを主な特徴とする。

【発明の効果】

【0022】

本発明の菌数測定のための前処理方法と菌数測定前処理装置によれば、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、検液中の細菌等を希釈せずに菌数は保持したまま導電率だけを下げ、簡単かつ迅速、高精度に菌数測定をすることができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明の第1の形態は、検液のインピーダンス変化から菌数測定を行うときに該検液を予め調製する菌数測定のための前処理方法であって、測定対象の菌株を溶液に懸濁し、この懸濁液の導電率に応じて所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質を添加して一旦 $250\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の導電率の懸濁液とし、この懸濁液の導電率に応じて所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質を添加して一旦 $250\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の導電率の懸濁液とし、この懸濁液を、前記官能基を備え電解質に対するイオン選択性を有するイオン交換樹脂でイオン交換して導電率を $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下に下げ、処理後の懸濁液を検液にすることを特徴とする菌数測定のための前処理方法である。

20

【0024】

この構成によって、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、検液中の細菌等を希釈せずに菌数は保持したまま導電率だけを下げ、簡単かつ迅速、高精度に菌数測定をすることができる。

【0025】

本発明の第2の形態は、第1の形態に従属する形態であって、ポーラス型強酸性陽イオン交換樹脂とポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂の混合したイオン交換樹脂を使ってイオン交換処理することを特徴とする菌数測定のための前処理方法である。

【0026】

この構成によって、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、確実に導電率だけを下げ、高精度に菌数測定をすることができる。

30

【0027】

本発明の第3の形態は、第1または第2の形態に従属する形態であって、前電解質として塩化ナトリウムを添加することを特徴とする菌数測定のための前処理方法である。

【0028】

この構成によって、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、高い菌数回収率で菌数測定をすることができる。

【0029】

本発明の第4の形態は、第1乃至3の何れか1の形態に従属する形態であって、電解質を添加して懸濁液の導電率を $500\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上にすると共に、 $50\ \text{h}^{-1}$ 以上で $80\ \text{h}^{-1}$ 以下の空間速度でイオン交換することを特徴とする菌数測定のための前処理方法である。

40

【0030】

この構成によって、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、高い菌数回収率で菌数測定をすることができる。

【0031】

本発明の第5の形態は、測定対象の菌株を懸濁した懸濁液に所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質を添加する電解質添加部と、前記官能基を備えて電解質に対するイオン選択性を有し添加後の懸濁液の導電率を $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下の懸濁液に低下させるイオ

50

ン交換樹脂が充填されたカラムと、添加前の懸濁液の導電率及び添加後の懸濁液の導電率、さらにイオン交換後の導電率を検出する１台以上の導電率計とを備えたことを特徴とする菌数測定前処理装置である。

【００３２】

この構成によって、誘電泳動とインピーダンス測定を組み合わせる菌数を測定するときに、検液中の細菌等を希釈せずに菌数は保持したまま導電率だけを下げて、簡単かつ迅速、高精度に菌数測定をすることができる。

【００３３】

本発明の第６の形態は、第５の形態に従属する形態であって、カラムには、イオン交換樹脂の代表粒径よりも小さくかつ菌を通過させるフィルタが設けられ、該フィルタがイオン交換樹脂を支持していることを特徴とする菌数測定前処理装置である。

10

【００３４】

この構成によって、イオン交換樹脂をカラム内に保持すると共に、菌はすべてカラムから流出させることができる。

【００３５】

本発明の第７の形態は、第６の形態に従属する形態であって、フィルタが親水性ポリビニリデンフロライドメンブレンフィルタであることを特徴とする菌数測定前処理装置である。

【００３６】

この構成によって、フィルタで菌数をあまり減少させることなく、簡単かつ迅速、高精度に菌数測定をすることができる。

20

【００３７】

（実施の形態１）

本発明の実施の形態１における菌数測定のための前処理方法、そのための菌数測定前処理装置について説明する。図１は本発明の実施の形態１における菌数測定前処理装置の構成図、図２は本発明の実施の形態１における菌数測定の前処理を行わずカラムでイオン交換したときの説明図、図３は本発明の実施の形態１における菌数測定の前処理を行わずカラムでイオン交換したときの説明図である。

【００３８】

図４は本発明の実施の形態１における菌数測定のための前処理方法を行うときの添加物質で比較した導電率と細菌の回収率の関係を示す図、図５は本発明の実施の形態１における菌数測定のための前処理方法を行うときの空間速度で比較した導電率と細菌の回収率の関係を示す図、図６は本発明の実施の形態１における菌数測定のための前処理方法のイオン交換処理の有効性を示す説明図、図７は本発明の実施の形態１における菌数測定のための前処理方法の工程を説明する工程図である。

30

【００３９】

DEPIMによる菌数測定は既に図８で説明したような菌数測定装置で行われる。これらの詳細な説明は図８の説明に譲る。DEPIMによる菌数測定は、電極に交番電流を流し、検液中で浮遊している細菌等に誘電泳動力を作用させ、電極１００a、１００bのエッジ近傍などの強電界部分１０３に誘電泳動し、この変化に伴う電極間１００a、１００bのインピーダンス変化を測定する。中でも電極１００a、１００b間のコンダクタンスの変化率あるいは絶対量の変化を測定することで計測するのが高精度な測定を行うのが好適である。

40

【００４０】

ここで、懸濁液にイオン交換を施した場合と、イオン交換しなかった場合（懸濁液をそのまま測定した場合）、さらに滅菌水で測定した場合の３つの場合に分けてDEPIMによるコンダクタンスの測定を行った結果を図６に示す。図６はイオン交換処理の有効性を示す説明図である。

【００４１】

実験方法を説明すると、カットキャベツの洗浄液から分離した菌株を滅菌水道水に懸濁

50

して 10^5 CFU/mlとなるように調製しておき（この実験の場合導電率 $300\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ）、イオン交換を施す場合はこれをイオン交換し、DEPIMでコンダクタンスの測定を行った。イオン交換しなかった場合はこの 10^5 CFU/mlで $4\ \mu\text{S}/\text{cm}$ の懸濁液をそのまま測定し、滅菌水の場合は電極間に滅菌水を導いてDEPIMの測定をした。なお、菌株を懸濁するとき、一定の菌数、例えば 10^5 CFU/mlとなるように調製することで、その後の処理が安定したものになり、延いては測定結果の精度を上げることができる。測定精度を上げる大きな要因の1つである。

【0042】

図6によれば、イオン交換をした場合は懸濁液の導電率が下がり、DEPIMによるコンダクタンス変化の測定が見事に検出できているが、イオン交換しなかった場合はコンダクタンス変化が非常に不安定で意味のある変化を示してない。滅菌水の場合はほとんど無応答である。従って、導電率を低下させることの重要性が分かる。

10

【0043】

さて、DEPIMにおいてこのような重要な役割をになうイオン交換処理であるが、本発明者らは、懸濁液に所定の前処理を行うか否かで更に効果に顕著で甚大な差を生じるとの知見を得た。すなわち前処理を行うことで細菌の回収率が大きく変わるのである。

【0044】

詳細は後述するが、この前処理は、イオン交換処理のため本来低下させたいはずの導電率を、電解質を添加することにより、低下させるのではなく一旦逆に増加させるものである。そして、イオン交換樹脂とこの電解質の反応により余剰の交換基（官能基）による細菌の捕捉を封じ、その回収率を上げるものである。以下実施の形態1の前処理方法を実施するための菌数測定前処理装置の説明を行う。

20

【0045】

菌数測定前処理装置の重要な構成は、図1に示すように、サンプル容器2のサンプル液（細菌の懸濁液）に電解質を添加する電解質添加部3であり、また、この電解質が添加された懸濁液をイオン交換するためのカラム1である。さらに導電率計4、5は電解質添加部3とカラム1を最適に機能させるために必要な構成である。

【0046】

電解質添加部3は菌株を懸濁した懸濁液に塩化ナトリウム（NaCl）等の電解質を添加するものである。この電解質は懸濁液中で解離してイオン化する。これにより懸濁液の導電率をブランクの導電率から $250\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の所定の導電率に引き上げる。電解質としては塩化ナトリウムのほか、イオン化傾向が強く、菌のゼータ電位による電気力よりもイオン交換樹脂との反応活性（結合力）が高い物質が選ばれる。そして、導電率が $250\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の所定値に引き上げられるのは、この状態でカラム1のイオン交換樹脂がイオン交換能を最大に発揮できる環境になるからである。この結果、最適なイオン交換によって導電率は目的の $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下に低下することが可能になる。このとき、電解質の作用により、液中の細菌14がイオン交換樹脂に吸着されることはほとんど起らない。

30

【0047】

さて、前処理に当たっては、菌株を滅菌水道水あるいは緩衝液等の溶液に懸濁する。この液をサンプル容器2に収容し、攪拌装置6で攪拌する。このサンプル液（懸濁液）としては、懸濁するとき例えば 10^5 CFU/mlなど所定濃度の液にする。

40

【0048】

攪拌により十分攪拌され、均一な濃度になったら、導電率計5によって電解質を添加する前の導電率を測定する。この原懸濁液の導電率が基準とされて電解質添加部3から電解質が添加される。電解質は $250\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上で所定の導電率になるように徐々に添加される。この添加の仕方は、導電率計4で導電率を測定しながら、測定した導電率をフィードバックし、所定値になるまで添加する。コントローラ16によってシステム制御を行い、被制御対象となる部位を制御し、添加量を制御するのがよい。ただ、人の操作で行うこともできる。場合によっては、原懸濁液の導電率を基に、予め取得しておいた添加量の

50

対応テーブルから加えるべき添加量を求め、電解質添加部 3 からこの量を添加することもできる。これもコントローラ 16 によって制御する。

【0049】

電解質が添加された懸濁液は、図示されない定量ポンプなどでサンプルライン 9 を経てカラム 1 に送水され、カラム 1 内に通水される。カラム 1 にはイオン交換樹脂 7 が充填されており、電解質を添加された懸濁液はここでイオン交換される。この送水量、空間速度などは、カラム 1 の下流の導電率計 5 で測定した導電率を基にコントローラ 16 で制御する。なお、人の操作で行うこともできる。人が操作する場合、導電率計 4, 5, 12 を 1 台あるいは 2 台にして、共用することができる。

【0050】

続いて、カラム 1 の構造について説明する。本体の下部には、このイオン交換樹脂 7 の代表粒径（粒径分布があるときの中央値）よりサイズが小さく、測定対象の細菌より大きな目のメッシュが形成されたフィルタ 8 が設けられている。この代表粒径は粒径分布の中央値である。メッシュは細孔、網の目、多孔質等の間隙などで、少なくとも一定の大きさ以下の微粒子を通過させる機能と、イオン交換樹脂 7 を流出させずにカラム 1 内に保持する機能を有する。この意味で、従来のフィルタとは機能がまったく異なるものである。電解質を低減された懸濁液は、その後検液として、DEPIM による測定のため菌数測定装置の電極 100a, 100b（図 8 参照）間に送られる。

【0051】

細菌の大きさは 0.2 μm より通常は小さく、0.4 μm 以上のメッシュを備えておれば、細菌はほとんどの場合通過可能である。このため、おおむね 0.45 μm 以上の目のフィルタ 8 を設けておけば、通常の大サイズの細菌等はすべて通過させることができ、汎用性の高いカラム 1 となる。なお、細菌等の種類やイオン交換樹脂 7 の大きさによってメッシュが異なったカラム 1 を用意し、目的に応じて使い分けするのもよい。

【0052】

そして、このフィルタ 8 の材質には、細菌を通過させるという観点で、材質的に好適な材料があるのは注目される。すなわち、菌回収率からみて、懸濁液中のたんぱく質等の吸着がきわめて低い親水性ポリビニリデンフロライド（PVDF）メンブレンフィルタ（以下、親水性 PVDF メンブレンフィルタという）をフィルタ 8 として採用するのがきわめて有力である。これにより、フィルタ 8 で菌数をあまり減少させることがなくて済む。

【0053】

菌回収率からみたときの材料の適否を検討するために実験を行った。Durapore（登録商標）メンブレンフィルタ（実施例 1；日本ミリポア株式会社）をカラム 1 のフィルタに採用し、1000 CFU/ml の懸濁液を 1000 ml 通液させた。このときの菌回収率は 90% であった。これに対し、たんぱく質等の吸着がかなり低いと言われているセルロース混合エステル MF-MILLIPORE（登録商標）メンブレンフィルタ（比較例 1；日本ミリポア株式会社）を使って、同一条件で測定した。しかし、このときの菌回収率は 17% であった。この差は親水性 PVDF メンブレンフィルタが突出して好適な材料であることを示している。セルロース混合エステルのほかにもニトロセルロース、ナイロンなどもあるが、親水性 PVDF メンブレンフィルタが好適である。

【0054】

【表 1】

	フィルタ	菌回収率
実施例 1	Durapore(登録商標)メンブレンフィルタ	90%
比較例 1	MF-MILLIPORE(登録商標)メンブレンフィルタ	17%

【0055】

次に、菌数測定前処理装置の付帯的な設備の説明をすると、実施の形態 1 の菌数測定前処理装置には、洗浄ライン 11 が設けられており、1 回の測定ごとに滅菌水槽 10 から滅

10

20

30

40

50

菌水が送水され、サンプルライン 9 とカラム 1 を洗浄する。洗浄後には図示しない送風機で空気を送り、通水路を乾燥させる。

【0056】

さらに、菌数測定前処理装置にはイオン交換樹脂洗浄ライン 13 も設けられている。イオン交換樹脂 7 のイオン交換能、その反応活性が低下したときは、このイオン交換樹脂洗浄ライン 13 から再生液がカラム 1 に供給されて再生される。再生液は導電率を導電率計 12 で計測され、廃棄する液の導電率が $0 \mu\text{S}/\text{cm}$ になったら再生終了となる。洗浄ライン 11、イオン交換樹脂洗浄ライン 13 も上記コントローラ 16 によって所定のシーケンス、所定の流量、かつ所定の導電率の変移（導電率を所定値に増加してから所定値以下に低減する）を実現するように制御される。

10

【0057】

そこで、実施の形態 1 の前処理が実現できる原理について説明する。説明を容易にするため、最初に前処理しない場合の説明を行う。図 2 は菌株を溶液に懸濁しただけで前処理を行わずカラムでイオン交換したときの説明図、図 3 は菌株を溶液に懸濁した液を前処理してカラムでイオン交換するときの説明図である。

【0058】

図 2 に示すように、カラム 1 内にはイオン交換樹脂 7 が充填されている。イオン交換樹脂 7 としては、両性イオン交換樹脂や強塩基性陰イオン交換樹脂の混合品などが好適であり、電解質 15 の陽イオンと陰イオンを各官能基との間でイオン交換する。図 2 においては、電解質 15 は塩化ナトリウム (NaCl) であって、陽イオンは Na^+ 、陰イオンは Cl^- である。

20

【0059】

カラム 1 に前処理をしていない懸濁液が流入したときは、電解質 15 の絶対量が少なく、イメージ的に図 2 の A1 で示すような状態になる。イオン交換樹脂 7 はこの電解質 15 の陽イオンと陰イオンとイオン交換するが、このイオン交換に関与できなかった官能基を有するイオン交換樹脂 7 の粒子 x は正に帯電しているため、界面が負に帯電している細菌 14 を電氣的に吸引し、吸着してしまう。これによりイオン交換が進むにつれて細菌 14 の菌数は減少し、A2 で示すような僅かな細菌 14 を含む液が菌数測定装置に供給されることになる。

【0060】

これに対し、図 3 に示すように前処理を行った懸濁液が流入した場合は、前処理しなかった場合と比較して電解質 15 が多量になり、図 3 の B1 で示すような電解質リッチの状態になる。イオン交換樹脂 7 は、細菌と共に、所定の官能基との反応活性が菌より高い電解質 15 が高濃度に存在する雰囲気であるため、この電解質 15 がイオン選択的にイオン交換され、細菌 14 のイオン交換樹脂 7 に対する吸着が激減する。イオン交換樹脂 7 の粒子 y は細菌 14 が吸着する前に電解質 15 との反応を終え、これにより未反応の官能基がなくなり、細菌 14 が吸着する余地がなくなる。これにより菌数は減少することなく、B2 で示すように多くの細菌 14 が菌数測定装置に供給される。

30

【0061】

イオン交換樹脂 7 としては、上述したように両性イオン交換樹脂や強酸性陽イオン交換樹脂／強塩基性陰イオン交換樹脂の混合品などが候補として考えられる。このため両者を実際に比較した。強酸性陽イオン交換樹脂／強塩基性陰イオン交換樹脂の混合品としては、ポーラス型強酸性陽イオン交換樹脂／ポーラス型強塩基性陰イオン交換樹脂の混合品であるイオン交換水精製用 MR151（実施例 2（日本錬水株式会社製））を使った。両性イオン交換樹脂としては、官能基が架橋ポリスチレン母体に固定された両性イオン交換樹脂 AMP01（比較例 2（三菱化学株式会社製））を使った。また、イオン交換処理する前の懸濁液の導電率を共に $250 \mu\text{S}/\text{cm}$ とした。

40

【0062】

イオン交換処理後に両者の導電率を測定すると、両性イオン交換樹脂では $97 \mu\text{S}/\text{cm}$ にしかなかったが、ポーラス型強酸性陽イオン交換樹脂／ポーラス型強塩基性陰イ

50

オン交換樹脂の混合品の場合は、導電率計の精度によるが $0 \mu\text{S}/\text{cm}$ にすることができた。

【0063】

【表2】

	イオン交換樹脂	導電率 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
実施例2	イオン交換水精製用MR151	97 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
比較例2	両性イオン交換樹脂AMP01	0 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)

【0064】

この結果からみて、DEPIMで菌数測定するときには、両性イオン交換樹脂より、強酸性陽イオン交換樹脂／強塩基性陰イオン交換樹脂混合品がよく、できればポーラス型のものを採用するのがよいことが分かる。

【0065】

次に、電解質15について説明する。電解質15はイオン化傾向が大きく、菌のゼータ電位による電気力よりも結合力が強い物質でなければならない。加えて、例えば同じ細菌14であっても、生菌だけ、死菌だけ、両者が混じったものではDEPIMによる測定結果は異なった結果になる。従って添加する電解質15が細菌14に影響を与えない物質でなければならない。この候補としては、例えば塩化ナトリウム (NaCl) とリン二水素カルシウム (KH_2PO_4) などがある。

【0066】

しかし、これらの候補はいずれも導電率をコントロールできる可能性はあるが、電解質の種類で細菌の回収率に大きな差が生じる。図4は添加物質の種類別の導電率と細菌の回収率の関係を示すものである。この実験の条件は次のとおりである。カットキャベツの洗浄液から分離した菌株を滅菌水道水に懸濁し、 $105\text{CFU}/\text{ml}$ となるようにした。この液の導電率は $4 \mu\text{S}/\text{cm}$ であった。これに添加電解質として塩化ナトリウム、リン二水素カルシウムを $250 \mu\text{S}/\text{cm}$ 、 $500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 、 $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$ になるように調製して、イオン交換を行った。

【0067】

これによれば、図4に示すように添加物質が塩化ナトリウムの場合、ブランク（添加電解質なし；比較例3）の状態では54.5%の回収率であるが、これに塩化ナトリウムを $250 \mu\text{S}/\text{cm}$ （実施例3）になるように添加した場合69.7%の回収率を示し、それ以上添加すると $500 \mu\text{S}/\text{cm}$ （実施例4）で66.7%、 $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$ （実施例5）で75.6%と安定して70%近傍の回収率を得ることができた。

【0068】

これに対して、添加物質がリン二水素カルシウムの場合、ブランク（比較例4）の状態では19.0%の回収率であるが、これにリン二水素カルシウムを $250 \mu\text{S}/\text{cm}$ （比較例5）になるように添加した場合、塩化ナトリウムとは逆に7.3%の回収率にまで低下し、それ以上添加すると $500 \mu\text{S}/\text{cm}$ （比較例6）で9.8%、 $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$ （比較例7）で6.8%と10%以下の回収率にしかならなかった。

【0069】

10

20

30

40

【表 3】

	電解質 (導電率 $\mu\text{S}/\text{cm}$)	回収率
比較例3	ブランク	54.5%
実施例3	NaCl ($250\mu\text{S}/\text{cm}$)	69.7%
実施例4	NaCl ($500\mu\text{S}/\text{cm}$)	66.7%
実施例5	NaCl ($1000\mu\text{S}/\text{cm}$)	76.6%
比較例4	ブランク	19.0%
比較例5	KH ₂ PO ₄ ($250\mu\text{S}/\text{cm}$)	7.3%
比較例6	KH ₂ PO ₄ ($500\mu\text{S}/\text{cm}$)	9.8%
比較例7	KH ₂ PO ₄ ($1000\mu\text{S}/\text{cm}$)	6.8%

10

【0070】

従って、菌数測定のための前処理方法を最適に行うには、電解質として選択されるべき好適な物質があることが分かる。そして、実験結果によれば、少なくとも塩化ナトリウムを使用すれば菌回収率を70%程度にまで上げることができ、導電率を $250\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上にしたときは、菌回収率は安定して70%程度を維持できることが分かる。

【0071】

続いて、イオン交換をどのような条件で行うのが適当かについて説明する。実施の形態1のようにカラムを用いてイオン交換する場合、単位時間あたりにイオン交換樹脂7を通過する懸濁液の速度を表す線速度(LV)よりも、空間速度(SV)の方が重要になる。空間速度(SV)はイオン交換樹脂に接触している時間の逆数を表す。空間速度(SV)の制御をコントローラ16によって行うときには計時手段(図1には図示しない)で時間をカウントして所定値になるように制御する。空間速度(SV)の小さい方がイオン交換能を上げるが、これが小さすぎると時間がかかり迅速な菌回収ができなくなる。逆にこれが大きすぎると、イオン交換能が低下する欠点をもつが、短時間で菌回収が行える。

20

【0072】

また、このとき流入する懸濁液の導電率が低いと、イオン交換樹脂7が電解質15でなく細菌14を捕捉するようになり、細菌の回収率を低下させる。しかし、高すぎる導電率はイオン交換後のDEPIMによる誘電泳動力を小さくし、細菌を凝集させることが効果的に行えなくなる。従って、空間速度(SV)を所定範囲にコントロールしつつ、懸濁液の導電率を所定の範囲でコントロールしなければならない。

30

【0073】

図5は空間速度で比較した導電率と細菌の回収率の関係を示している。図5もカットキャベツの洗浄液から分離した菌株を滅菌水道水に懸濁し、 $10^5\text{CFU}/\text{ml}$ となるようにしたものである。導電率は $4\mu\text{S}/\text{cm}$ であり、これを空間速度(SV)を 50h^{-1} 、 80h^{-1} として、ブランク(添加電解質なし)、 $100\mu\text{S}/\text{cm}$ 、 $500\mu\text{S}/\text{cm}$ 、 $1000\mu\text{S}/\text{cm}$ になるように塩化ナトリウムを加えて調製し、イオン交換したものである。

【0074】

これによれば、空間速度(SV) = 50h^{-1} の場合、ブランクの状態では23.1%の回収率を示し、これに塩化ナトリウムを $100\mu\text{S}/\text{cm}$ になるように添加した場合78.0%の回収率を示し、 $500\mu\text{S}/\text{cm}$ で97.8%、 $1000\mu\text{S}/\text{cm}$ で97.8%と安定した高回収率になることが分かった。

40

【0075】

これに対して、空間速度(SV) = 80h^{-1} の場合、ブランクの状態では27.5%の回収率であるが、これに塩化ナトリウムを $100\mu\text{S}/\text{cm}$ になるように添加した場合55.8%の回収率を示し、 $500\mu\text{S}/\text{cm}$ で66.7%、 $1000\mu\text{S}/\text{cm}$ で68.3%との回収率になった。

【0076】

以上の結果から、懸濁液の前処理を行うためには、空間速度(SV)を $50\text{h}^{-1} \sim 8$

50

0 h^{-1} 、導電率を $500\text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上にすればよく、このときイオン交換能を向上させ、かつ迅速処理にすることができ、菌回収率も 67% 付近から 98% 近くにすることができる。中でも 50 h^{-1} にするのが好適で、同時に導電率を $500\text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上にすれば菌回収率を 97.8% 程度にすることができる。なお、上述したように 50 h^{-1} より小さな空間速度（SV）では測定時間がかかりすぎ、 80 h^{-1} より大きい空間速度（SV）ではイオン交換する能力が低くなる。

【0077】

このように実施の形態1における菌数測定前処理装置によれば、電解質とカラムを使い、導電率と空間速度（SV）をコントロールすることで、DEPIMによる菌数測定時に誰でも簡単にかつ短時間に、細菌を高回収率で含有する検液を調製することができる。

10

【0078】

以上菌数測定前処理装置の説明をしたが、最後に菌数測定のための前処理方法を処理工程に沿って説明する。図7は本発明の実施の形態1における菌数測定のための前処理方法の工程を説明する工程図である。

【0079】

まず、菌株を滅菌水道水あるいは緩衝液等の溶液に懸濁し（第1工程）、この液をサンプル容器2に収容して、攪拌装置6で攪拌する。攪拌され、均一な濃度になった懸濁液の導電率を測定する（第2工程）。次に、得られた導電率を基準にして電解質添加部3から電解質を $250\text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上で所定の導電率になるまで添加する（第3工程）。

【0080】

電解質が添加されて所定値になった懸濁液を所定流量でカラム1に送水し（第4工程）、カラム1内でイオン交換する（第5工程）。イオン交換された懸濁液の導電率を測定して（第6工程）、 $10\text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下に下げるようにサンプルライン9の流量を制御しながら、検液を電極に供給する。

20

【0081】

1回の検液の供給が終わると、洗浄ライン11から滅菌水を送水して洗浄し、洗浄後には空気を送ってサンプルライン9を乾燥させる（第7工程）。また、イオン交換樹脂7のイオン交換能が低下したときは、このイオン交換樹脂洗浄ライン13から再生液をカラム1に供給して再生する（第8工程）。導電率が $0\text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ もしくはこの近傍値になったら再生終了となる。

30

【0082】

以上説明したように、実施の形態1における菌数測定のための前処理方法と菌数測定前処理装置によれば、DEPIMによって菌数を測定するときに、電解質を添加する前処理を行うことによって、懸濁液中の細菌を希釈せずに菌数は保持したまま導電率だけを選択的に下げて、高精度に菌数測定することができる。

【産業上の利用可能性】

【0083】

本発明は、DEPIMによって菌数を測定する菌数測定装置の前処理を行う菌数測定前処理装置に適用できる。

【図面の簡単な説明】

40

【0084】

【図1】本発明の実施の形態1における菌数測定前処理装置の構成図

【図2】本発明の実施の形態1における菌数測定の前処理を行わずカラムでイオン交換したときの説明図

【図3】本発明の実施の形態1における菌数測定の前処理を行わずカラムでイオン交換したときの説明図

【図4】本発明の実施の形態1における菌数測定のための前処理方法を行うときの添加物質で比較した導電率と細菌の回収率の関係を示す図

【図5】本発明の実施の形態1における菌数測定のための前処理方法を行うときの空間速度で比較した導電率と細菌の回収率の関係を示す図

50

【図 6】 本発明の実施の形態 1 における菌数測定のための前処理方法のイオン交換処理の有効性を示す説明図

【図 7】 本発明の実施の形態 1 における菌数測定のための前処理方法の工程を説明する工程図

【図 8】 DEPI-M による菌数測定装置の構成図

【符号の説明】

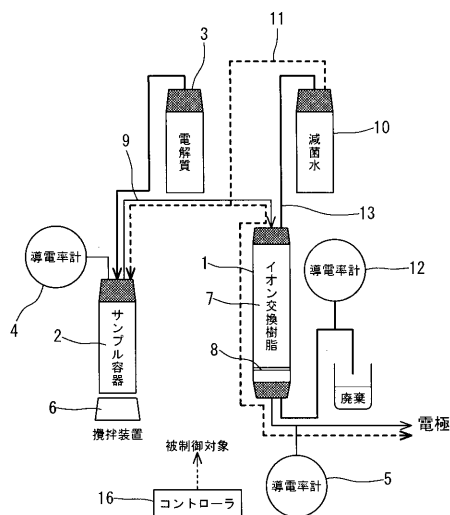
【0085】

- 1 カラム
- 2 サンプル容器
- 3 電解質添加部
- 4, 5, 12 導電率計
- 6 攪拌装置
- 7 イオン交換樹脂
- 8 フィルタ
- 9 サンプルライン
- 10 滅菌水槽
- 11 洗浄ライン
- 13 イオン交換樹脂洗浄ライン
- 14 細菌
- 15 電解質
- 16 コントローラ
- 100a, 100b 電極
- 101 電源部
- 103 強電界部分
- 102 測定部

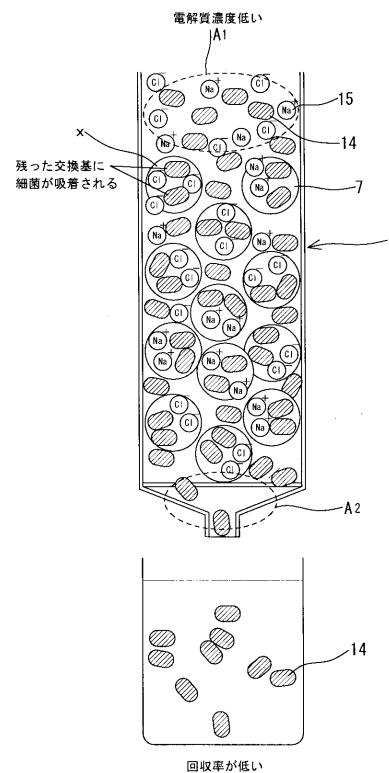
10

20

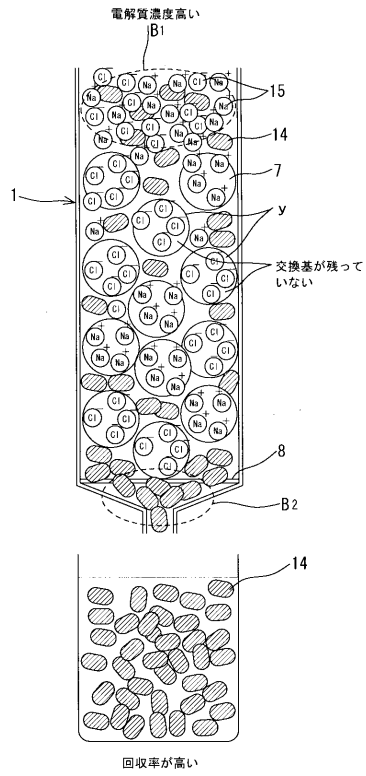
【図 1】



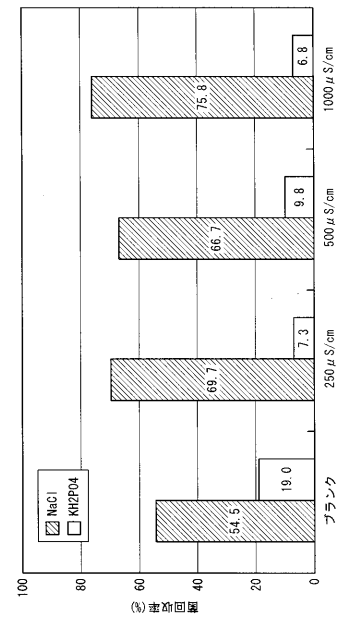
【図 2】



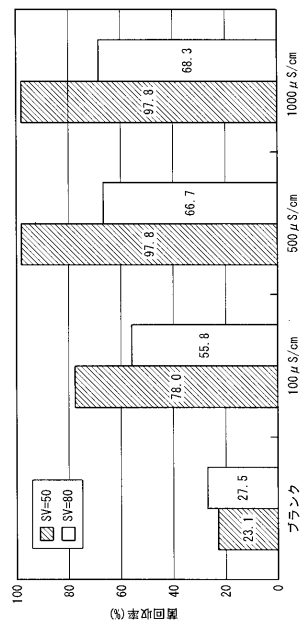
【図 3】



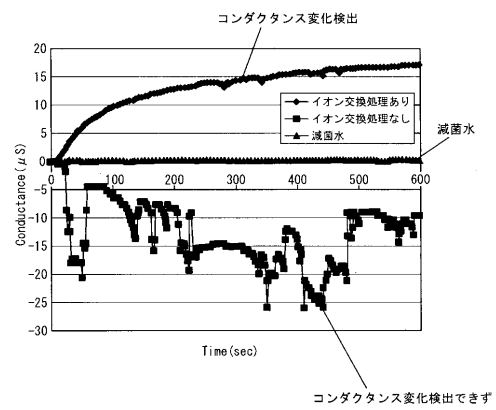
【図 4】



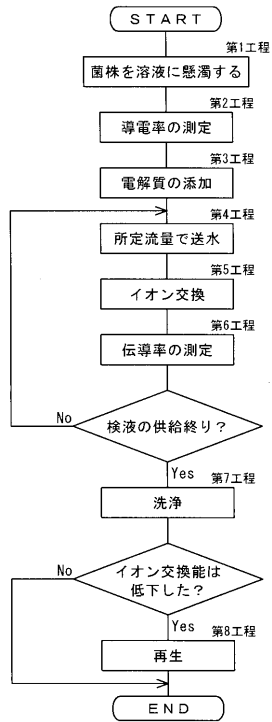
【図 5】



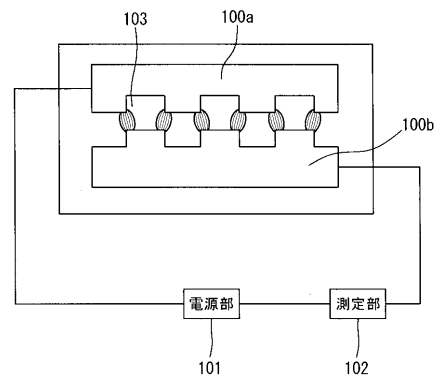
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(72)発明者 岡本 光一

東京都千代田区東神田一丁目9番8号 日鉄環境エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 安田 善一

福岡県北九州市八幡西区築地町2番1号 株式会社クロサキ内

(72)発明者 荒井 伸一郎

千葉県市川市市川二丁目2番10アメニティ市川203号

Fターム(参考) 2G060 AA06 AD06 AF08 AG05

4B029 AA07 BB01 CC01 FA09

4B063 QA01 QA18 QQ05 QS17 QX04