

(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2008-187935

(P2008-187935A)

(43) 公開日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 M 1/34 A 4 B O 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2007-23946 (P2007-23946)	(71) 出願人	000005821
(22) 出願日	平成19年2月2日(2007.2.2)		松下電器産業株式会社
			大阪府門真市大字門真1006番地
		(74) 代理人	100097445
			弁理士 岩橋 文雄
		(74) 代理人	100109667
			弁理士 内藤 浩樹
		(74) 代理人	100109151
			弁理士 永野 大介
		(72) 発明者	堀切 茂俊
			愛知県春日井市鷹来町字下仲田4017番
			松下エコシステムズ株式会社内
		(72) 発明者	衣川 昭徳
			愛知県春日井市鷹来町字下仲田4017番
			松下エコシステムズ株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物計数装置および点検用チップ

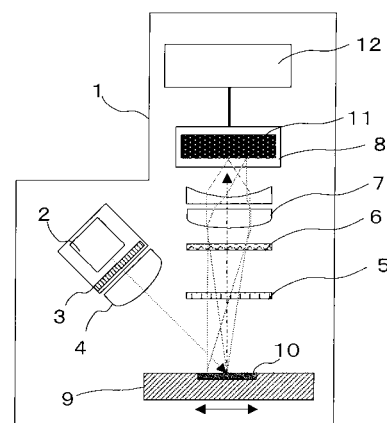
(57) 【要約】

【課題】本発明は、微生物を含有するか含有する可能性のある検体に対し蛍光色素を用いて生菌および死菌を計数する微生物計数装置であり、従来から知られている手法と比較して正確性を向上させた微生物計数装置を提供すること。

【解決手段】微生物を生死菌染色試薬と死菌染色試薬で染色し、発光点の面積と輝度値から、発光点が微生物であるか夾雑物であるかを判定するものであり、迅速性、正確性を高めた微生物計数装置1を提供することができる。

【選択図】 図1

- 1 微生物計数装置
- 2 励起光源
- 3 励起フィルタ
- 4 集光レンズ
- 5 ハイパスフィルタ
- 6 受光フィルタ
- 7 レンズユニット
- 8 受像素子
- 9 検査台
- 10 メンブレンフィルタ
- 11 CCDユニット
- 12 演算手段



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

微生物を捕集する捕集手段を載置する載置手段と、生菌および死菌を染色する生死菌染色試薬と死菌を染色する死菌染色試薬を用いて染色された前記捕集手段上の微生物の蛍光画像を取得する蛍光画像取得手段と、前記蛍光画像取得手段により取得された蛍光画像から発光点を検出する発光点検出手段と、前記発光点検出手段により検出された発光点が生菌、死菌、夾雑物のいずれかであることを判断する蛍光評価手段とを備えた微生物計数装置において、前記蛍光評価手段で発光点の面積および輝度値から生菌または死菌または夾雑物であるかを判断する面積輝度判断手段を備えることを特徴とする微生物計数装置。

【請求項 2】

面積輝度判断手段において、生菌または死菌または夾雑物であるかを判定する値の範囲の上限および下限を定める面積輝度上限値および面積輝度下限値を設けることを特徴とする請求項 1 記載の微生物計数装置。

【請求項 3】

面積輝度判断手段において、判断に用いる輝度の値が、発光点を構成する画素のうちの最大輝度値であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の微生物計数装置。

【請求項 4】

面積輝度判断手段において、発光点の輝度の値によって生菌または死菌とする発光点の面積の値を設定することを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 5】

面積輝度判断手段において生菌または死菌と判断する面積の値を、発光点の輝度値の一次関数によって設定することを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 6】

面積輝度判断手段において、発光点の面積を発光点の画素の最大輝度値で除した値を用いて判断することを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 7】

面積輝度判断手段により発光点の面積を輝度で除した値を求め、画像が焦点深度の範囲内であるかを判断する焦点判断手段を設けることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 8】

画像の演算処理に用いるパラメータを入力する入力手段を備えることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 9】

蛍光画像取得手段が励起光源と分光フィルタと拡大レンズと受像素子を備え、青色励起によって緑色蛍光を発する生死菌染色試薬と、緑色励起によって赤色蛍光を発する死菌染色試薬を用い、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像を取得するようにしたことを特徴とする請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 10】

発光点検出手段が、画像上の発光点の輝度と座標と面積を抽出する発光点抽出手段と、前記発光点抽出手段により抽出された画像上の発光点の座標を補正する座標補正手段と、補正された座標をもとに複数の画像から同一の発光点を照合し、照合された発光点の各画像の輝度値と面積のデータを結合する発光点照合手段を備えることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 11】

発光点抽出手段によって抽出された青色励起光による赤色蛍光画像の輝度を赤色の輝度とし、青色励起光による緑色蛍光画像の輝度を緑色の輝度とし、これらの輝度と、入力手段から入力した青色の輝度に基づいて、発光点ごとに色度を算出する色度算出手段を備えることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の微生物計数装置。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

蛍光評価手段が、発光点ごとに色度を算出する色度算出手段と、発光点の青色励起光による緑色蛍光画像の輝度と緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の輝度に基づいて発光点を生菌群または死菌群に分類する生死判断手段と、生菌群または死菌群に分類された発光点が微生物であるか夾雑物であることを色度で判断する微生物判断手段を備え、発光点が生菌、死菌、夾雑物のいずれかであることを判断するようにしたことを特徴とする請求項 1 乃至 1 1 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 1 3】

生死判断手段において、青色励起光による緑色蛍光画像のチャンネルの輝度値を第一軸、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像のチャンネルの輝度値を第二軸として 2 次元のドットプロットを表示するドットプロット表示手段と、前記ドットプロット表示手段により表示された各プロットを生菌群または死菌群に分類する分類手段を備え、前記分類手段により生菌群または死菌群に分類するようにしたことを特徴とする請求項 1 乃至 1 2 のいずれかに記載の微生物計数装置。

10

【請求項 1 4】

発光点照合手段において、画像ごとの発光点データを R G B のチャンネルに割り当てて 1 枚のカラー画像で出力する結果画像出力手段を設けたことを特徴とする請求項 1 乃至 1 3 のいずれかに記載の微生物計数装置。

【請求項 1 5】

発光点を取得するためのマーカーを表面に固定し、焦点深度の範囲内であることを判断するために用いる点検用チップ。

20

【請求項 1 6】

青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の全てで発光点を取得できる波長をもったマーカーを表面に固定したことを特徴とする点検用チップ。

【請求項 1 7】

座標補正と焦点位置の判定の両方に使用できるマーカーを表面に固定したことを特徴とする請求項 1 5 または 1 6 に記載の点検用チップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

本発明は、例えば、環境試料、食品検体などの微生物の迅速検出に使用される、生菌および死菌を異物などの夾雑物と識別して正確に計数できる微生物計数装置、点検用チップなどに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

従来、蛍光色素を用いて微生物の生菌および死菌を検出し、判別する手法の一例として蛍光性酵素基質であるフルオレセイン系蛍光色素による方法が知られている。フルオレセイン系蛍光色素は、細胞や微生物の細胞膜を透過して取り込まれると、細胞質内のエステラーゼ酵素群により加水分解され、フルオレセイン骨格を有する蛍光物質（フルオレセインなど）に変換されて発光機能が発現する。そこで励起光を照射することで生じる光点を生きている細胞や微生物として判断することができる（例えば、特許文献 1 参照）。

40

【0 0 0 3】

下記、特許文献 1 において、微生物の生死を判断するための蛍光色素として、エステラーゼ活性指標指示薬であるカルセイン誘導体及びヨウ化プロビジウムを用いた方法が提案されている。これは、微生物を上記 2 種類の色素で染色し、緑色および赤色の蛍光強度を測定し、その強度の比較を求めることで、生菌であるか死菌であるかをフローサイトメトリにより判断するというものである。

【0 0 0 4】

また、更に別の手法として、土壌や水環境などの夾雑物が多く存在する試料から、発光

50

物の蛍光スペクトルをもとに、細胞を判別することのできる手法が知られている（例えば、特許文献 2 参照）。

【 0 0 0 5 】

これは、干渉デジタル画像を取得できる顕微蛍光スペクトル測定装置を使用し、CCD 画像上の画素ごとに得られた分光スペクトルを元に、あらかじめ指定したスペクトル波形と同一な波形をもつ画素を抽出し、必要なスペクトルをもつ部分だけが表示された画像を作ることができるというものである。これを利用すると複雑なバックグラウンド自家蛍光をもつ夾雑物が混在するような試料であっても、目的の蛍光発光物を判別、計測できる。

【特許文献 1】特開平 1 1 - 1 4 6 7 9 8 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 2 - 2 9 1 4 9 9 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

しかしながら、上記特許文献 1 のような従来の方法は、2 つの試薬の蛍光強度から生菌および死菌を検出するものであるが、必ずしも全ての細胞を検出できているとはいえない。これはエステラーゼ分解性の色素に共通の課題であるが、微生物の種類によっては酵素の発現量が異なり、全く染色されないものが存在し、またそれ以外にも微生物の置かれている環境や活性状態によって染色されやすさに大きな差があり、正確な生菌の検出ができているとはいえないためである。

【 0 0 0 7 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、高い染色性、標識力を持つ核酸結合性の蛍光性化合物を使用することで、微生物のもつ酵素活性などの不安定要因に影響を受けることなく、安定して高感度な微生物の検出による計数が可能な装置を提供することを目的としている。

【 0 0 0 8 】

また、一般的なフローサイトメータにおいては、当業者に良く知られている事実であるが、微生物を特定するために、蛍光強度ならびに前方散乱光を測定して蛍光強度と粒子の大きさから微生物かどうかを判断している。そのため、装置には蛍光を検出するための検出器の他に、散乱光を検出するための別の検出器を設ける必要が生じ、装置構成が複雑化するという課題がある。

【 0 0 0 9 】

また、発光点の面積を求めるために前方散乱光の強度を求めているが、あくまで面積の代用として用いているに過ぎず、形状によっては面積と散乱光強度との相関性が低下し、正確に計測できないという課題がある。

【 0 0 1 0 】

また、フローサイトメータにおいて複数の染色試薬と複数の励起光源を使用して微生物の検出を行う場合、流路上に複数の励起光源による照射位置が精密に一定間隔おかれている構成と、高い精度で粒子の流速を制御する手段を設け、複数の照射位置を通過するために時間差で出現する同一の粒子由来の発光シグナルを同一の粒子由来のものであるとしてデータを結合する手段と、流速を頻繁にキャリブレーションする工程が必要となる。そのため、このようなフローサイトメータは高価であり、管理方法も複雑多岐になる。そのため、頻繁に使用される手法としては同一の励起光源で励起することが可能な染色試薬を使用し、同時に異なる蛍光を測定するというものである。しかし、このような手法では使用できる染色試薬に制限があるばかりか、染色試薬を最適な励起波長で使用できないため、感度が低下するという課題がある。

【 0 0 1 1 】

また、フローサイトメータの別形態として、同一の照射位置に複数の励起光源を同時に照射し、得られた複雑な合成蛍光スペクトル波形と、蛍光色素の標準スペクトル波形を比較して、蛍光色素ごとのスペクトルを分離し、強度を比較することができるというものがあり、それは当業者に良く知られている。しかし、このような手法では、装置が高価にな

10

20

30

40

50

るうえ、既知の試料のみの評価しか行うことができず、スペクトルの同一性を評価する事が難しい。更に未知試料において自家蛍光の多い場合や、蛍光波長のシフトが見られるような場合には、スペクトル波形の分離が行えず、解析が困難になるという課題がある。

【0012】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、蛍光強度と粒子の大きさを直接同時に取得できる受像素子を使用して装置構成を簡略化することができ、微生物を捕集し、励起光源の色を切り替えることで簡便かつ容易に異なる染色試薬の画像を取得することができ、また最適波長で使用することができるため、小型でコンパクトかつ高精度である微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0013】

また、微生物を発光させ画像取得し、発光点として取得された発光物の種類が微生物であるか夾雑物であるかを判定する場合、画像中の微生物と発光している夾雑物とを精度よく判別し、さらに迅速に結果を得るために少量の情報から行われることが求められている。

【0014】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、画像から発光点を構成する画素の合計値を発光点の面積として求め、更に発光点を構成する画素の輝度値を求め、これらを判定に用いることにより、発光点の面積が微生物よりも大きい夾雑物や、輝度が低い画像のバックグラウンドノイズを除去することができ、精度よく微生物の数を求めることができる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0015】

また、面積および輝度の値から生菌または死菌または夾雑物であることを判断する場合、使用者が範囲の設定を簡便に行えと同時に、高い精度で判定する必要がある。

【0016】

本発明は、このような従来の課題を解決するものであり、判定値の上限値および下限値を定める面積輝度上限値および面積輝度下限値を設けることにより、中心に分布するヒストグラムを形をとるこれらの値を簡便に選択することができるため、簡便で高精度な微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0017】

また、生菌または死菌の輝度情報を簡便に、かつデータ精度を損なうことなく抽出したいという課題がある。

【0018】

本発明は、このような従来の課題を解決するものであり、発光点を構成する画素のうち最大輝度値を使用することにより、生菌および死菌は面積が小さいため、最大輝度値を用いることで、ほぼ菌の輝度の特徴を正確に得ることができ、さらに演算処理で使用するメモリ量を減らすことができるため簡便かつ迅速化できる微生物計数装置を提供することができる。

【0019】

また、発光点が微生物であるか夾雑物であるかを判定するとき、夾雑物の種類によっては発光点の面積が大きい輝度が低いものが存在し、微生物であるか夾雑物であるかを判定するが、これらをあらかじめ除外して演算処理時間を短縮したいという課題がある。

【0020】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、発光点のオブジェクトを構成する画素のうちの最大輝度が大きい物は発光点の面積が大きくまた最大輝度が低いものは面積が小さくなるものを微生物として判定に用いることで、面積が大きく輝度が低い夾雑物を発光点の中からあらかじめ除外することができ、短時間で微生物の生菌または死菌を計数できる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0021】

また、発光点の輝度値ごとに生菌または死菌とする発光点の面積を設定する場合、簡便かつ精度よく設定できるようにする必要がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本発明は、このような従来課題を解決するものであり、面積の値を、輝度値の一次関数とすることで、直線の傾きと切片の2つの値を指定することにより、簡便かつ精度よく生菌または死菌または夾雑物の判断ができる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 2 3 】

また、面積と輝度で生菌または死菌または夾雑物であることを判定する場合、判定する発光点の数が多くなると、2つのデータを持つ必要があるため、処理が遅くなるという課題がある。

【 0 0 2 4 】

本発明は、このような従来課題を解決するものであり、判定に使用する値を、発光点の面積を輝度で除した値とすることで、面積と輝度の値がなくても同じ精度で判定をすることができ、かつメモリ使用量も半分にすることが可能となるため、迅速化できる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 2 5 】

また、微生物は画像上で発光点の面積が非常に小さいため、画像上の見た目や面積の大小では正確に焦点を合わせるのが困難であり、調整作業が複雑化する。そのため、画像を取得した際、画像の焦点位置が適切であるかを正確かつ簡便に判定することが求められている。

【 0 0 2 6 】

本発明は、このような従来課題を解決するものであり、画像の焦点が合っているときには面積が最小で輝度が最大になることを利用し、発光点の面積を輝度値で除した値によって焦点があっているかを判定することにより、微小な発光点の菌でも正確に焦点深度範囲を判定することができる微生物計数装置を提供することができる。

【 0 0 2 7 】

また、特許文献2のような手法の場合、干渉デジタル画像を取得する顕微蛍光スペクトル測定装置が非常に高価であり、また1画面ごとに測定波長範囲を走査しなければならず、たとえばメンブレンフィルタのような過濃縮器具を使用しても、測定時間が非常に長くなってしまふ為、現実的ではない。更に測定を行う間、常に強い励起光を照射し続ける必要があるため、蛍光色素が褪色しやすく、安定した計測を常に行うことが求められる微生物検査用途においては使用が困難である。

【 0 0 2 8 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、RGB情報をもった画像から夾雑物を判別するのに必要な色度情報を取得することで、安価な装置で実現でき、更に測定時間も極めて短くて済むため迅速検査に使用することが可能であり、かつ蛍光色素の褪色も抑えることが可能であるために高精度である微生物計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 2 9 】

また、微生物の発光物の色度情報を得るために、2次元空間での顕微蛍光スペクトルを取得すると、装置構成が複雑化するため、より簡便に取得できる情報から色彩情報を得ることが求められている。

【 0 0 3 0 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、各波長で取得した画像から各波長の輝度値を読み取ることで、データを取得する装置構成は適当な受光フィルタと受像素子のみで実施することができるため、シンプルかつ小型な装置で、精度を向上させることができる微生物計数装置を実現することができる。

【 0 0 3 1 】

また、蛍光染色を用いた微生物の検出方法において、蛍光発光が微生物由来なのか、もしくは微生物以外の夾雑物に非特異的に吸着したものに由来するのか、さらには自家蛍光に由来するものなのか、蛍光発光の由来を高い精度で検出することができる手法が求めら

10

20

30

40

50

れている。

【0032】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、複数の画像から輝度情報を取得して色度を求め、発光物の蛍光発光が微生物に由来するものであるかどうかを評価して、微生物の数を求める際の夾雑物の存在による悪影響を排除し、高い精度で微生物の数を求めることができる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0033】

また、蛍光染色を用いた微生物の検出方法において、蛍光染色による発光を特定するための蛍光スペクトルのような指標を用いて蛍光発光の評価をより簡便に行う手法が求められている。

10

【0034】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、励起波長や蛍光波長のクロストークが少ない蛍光染色試薬を使用して、それぞれの蛍光発光に対して、複数の波長の画像を取得し、輝度値を求めることで、限られた励起光源や分光フィルタ、受像素子などの構成要素から、簡便に微生物と夾雑物とを高い精度で識別して評価できる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0035】

また、微生物の生菌、死菌を検出する方法において、顕微鏡観察によって蛍光色素が発する蛍光の強度を観察する手法では、作業者ごとの熟練性の違いによる微生物認識精度の誤差が大きい。従って、微生物の発光状態を客観的に数値化することで夾雑物を微生物と誤認識することを防止し、精度良く検出する手法が求められている。

20

【0036】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、微生物の発光特性を測定し、色度や色相角などの色彩的特性を示す値にすることで、生菌、死菌の色の違いだけでなく、混入した自家蛍光物質や、色素が非特異的に吸着した粒子などの夾雑物の微妙な色の違いを客観的に判断し、精度良く生菌、死菌、微生物以外の夾雑物を判別して微生物を計数するための装置を提供することを目的としている。

【0037】

また、発光物の色彩的特性をもって、より簡便かつ客観的に微生物を計数できる手法が求められている。

30

【0038】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、色度の数値に対して入力手段によって閾値を設定し比較することで、より客観的に微生物か否かを判断し、微生物の計数を行うことができる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0039】

また、色彩情報を取得する方法において、発光点が非常に小さいものであった場合、RGBなど波長が異なる画像の輝度情報を取得するためにカラーCCDのようなカラー情報が取得できる受像素子を使用すると、受像素子上の色感度をもつ素子が並んで配列されていると、同一画素での色情報とはならないため、1画素のズレが精度に影響してしまうような微小な発光体では、正確に色彩的特性を取得することが困難であるという課題がある。

40

【0040】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、色度を算出するために必要な波長の異なる画像の輝度値を、それぞれの色ごとに取得した画像から座標に基づいて輝度値を抽出することで、正確に同じ位置の色彩情報を取得することができ、微生物のような微小な発光点であっても、精度良く色彩的特性を取得でき、生菌、死菌、または微生物以外の夾雑物であることを判別することができる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【0041】

また、さまざまな複数の蛍光染色試薬を使用して、微生物の様々な状態を評価するとき

50

、色彩的特性が様々であるため、目的の細胞集団ごとに色彩的特性の値を設定して計数することが求められている。

【 0 0 4 2 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、細胞集団が複数あった場合に、それぞれに色彩的特性の値を設定して、判断し、分類することができる微生物計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 4 3 】

また、画像から色彩的特性を求める場合、これまでは、画像データの量が膨大になってしまい、データの演算時間が長くかかってしまうばかりか、分光フィルタの数、撮像枚数が増えることで、更に膨大な時間を要してしまい、迅速性を低下させてしまうことから、より少ないデータで精度の高い微生物の計数方法が求められている。

【 0 0 4 4 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、色彩的特性を得るのに必要な R G B の三原色に対し、青色 (B) にあらかじめ発光強度をもたない蛍光染色試薬を使用することや、また青色の波長域に透過性をもたない分光フィルタによる測定条件下において測定すること、さらに青色の輝度値を取得せず、あらかじめ指定した値を代入して使用することで、赤色 (R) および緑色 (G) のみのデータから画像中の発光点のもつ色彩的特性を表現することを可能にし、これにより計測中のメモリ使用量を減らすことができ、迅速に計数が行える微生物計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 4 5 】

また、微生物を発光点として画像にとらえ、画像から微生物を計数する場合、膨大な画像の画素データを効率的に扱うことが求められている。

【 0 0 4 6 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、画像から発光点を検出し、画像データから背景を除き、発光点のデータだけを抽出する発光点検出手段を設けることで、膨大な画像データを短時間に扱う事ができ、迅速性を高めた微生物計数装置を提供することができる。

【 0 0 4 7 】

また、微生物の生菌、死菌、異物などの夾雑物のいずれかであることを判断する方法において、微生物の種類や環境の違いにより、生菌のような発光色を示す異物と、死菌のような発光色を示す異物が存在する場合、これらの異物は一つの判断基準で処理することは難しく、処理方法のフローによっては精度が低下し、余計な処理が追加されるなど効率性を欠くという課題がある。

【 0 0 4 8 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、生菌か死菌であるかを判断する生死判断手段の後段に微生物判断手段を設け、処理を分割することで、生菌や死菌に由来する蛍光発光からこれらと同じような夾雑物に由来する蛍光発光を判別して除外することで精度を向上させ、処理工程を効率的に実行することができる微生物の計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 4 9 】

また、微生物の生菌、死菌、微生物以外の夾雑物のいずれかであることを簡便かつ漏れがないように効果的に判別することができる手法が求められている。

【 0 0 5 0 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、生死判断手段で発光点の輝度に基づいた 2 次元のドットプロットを表示し、ドットプロット上の各プロットを分類する分類手段として境界線を作成し、境界線によって分けられた領域に基づいて生菌群か死菌群かを判断した後、微生物判断手段によってプロット領域ごとに、色度から微生物か夾雑物であるかを判断することによって、効果的かつ漏れがないように生菌、死菌の判別が行える微生物の計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 5 1 】

また、ドットプロットは、測定する検体によってプロット上で出現する位置が微妙に異なる可能性があり、測定ごとに最適な境界線を設定する必要がある。

【 0 0 5 2 】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、作成された境界線を保存し、保存された境界線の中から最適なものを選択する事や、また選択された境界線をさらに編集して最適な状態に調整することで、ドットプロットをより精度よく分類し、微生物の計数を高い精度で行える装置を提供することを目的としている。

【 0 0 5 3 】

また、微生物の種類や増殖周期によって、プロットが広く分布している場合や、逆にプロットが密集している場合があり、ドットプロット上のプロット集団の境界が見づらくなってしまうという課題がある。

10

【 0 0 5 4 】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、ドットプロットの表示軸を対数と常数から選択して変更できる表示軸選択手段を設けることで、プロットが広がっていた場合には対数表示とし、逆に密集している場合には常数表示とすることで、プロットの各集団の境界が見やすくなり、生菌群か死菌群かを精度よく分類して微生物の計数が行える装置を提供することを目的としている。

【 0 0 5 5 】

また、ドットプロットにおいて、微生物の発光量を正確に表現し、精度よく計数することが求められている。

20

【 0 0 5 6 】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、微生物の発光点の輝度として発光点を形成する画素の輝度の総量である輝度の合計値を用いる事で、微生物の発光状態を正確に表現し、生菌群か死菌群かを精度よく分類して微生物の計数が行える装置を提供することを目的としている。

【 0 0 5 7 】

また、発光点から得られる膨大なデータをできるだけ省略し、演算速度を高速化することが求められている。

【 0 0 5 8 】

本発明は、このような従来の課題を解決するためのものであり、輝度の値を、発光点を形成する画素のうちの最大輝度とし、色度の算出に必要な最大輝度値とドットプロットとの輝度の値を共用することで、ドットプロットで使用する輝度値のデータを省略することができ、よってメモリ使用量を減らせるため、演算処理を高速化して、迅速に計数が行える微生物計数装置を提供することを目的としている。

30

【 0 0 5 9 】

また、複数の分光された画像を取得する場合、分光フィルタの機械的寸法や、波長、固定寸法などの機械的誤差により、各画像がX Y方向にずれることがあり、画像を統合した時に正確に発光点が重ならず、微生物の正確な計数が行えないという課題がある。

【 0 0 6 0 】

本発明はこのような従来の課題を解決するためのものであり、機械的な誤差を補正するために、あらかじめ複数の画像で発光点を取得できるマーカーを表面に固定した座標補正用チップを使用してその画像から補正值を求め、この補正值を用いて画像の座標を補正する座標補正手段を設けることで、正確に微生物の計数を行える微生物計数装置を提供することを目的としている。

40

【 0 0 6 1 】

また、染色された微生物を画像として取得する場合、微生物が媒体中に拡散して浮遊していると、ピントが合いにくく、精度良く輝度を取得することが難しい。更に、複数の画像を取得して、各波長の輝度値を抽出しようとする場合にも、微生物が媒体中に拡散していると、同じ微生物が異なる位置に写ってしまうため、各画像での微生物の一致が難しく、色情報を抽出できなくなるという課題がある。

50

【 0 0 6 2 】

また、微生物を染色する場合、検体スケールが大きい場合や、検体中の微生物濃度が低い場合には、濃縮するための前処理を行う必要がある。例えば、水道水であれば100mLあたりの菌数検査が必要であり、さらにはボトリングされた飲料であれば、ボトル1本の容量（例えば500mLや1.8mL）での検査が必要になる。このような検体に対しても一定の濃度の蛍光染色試薬で染色処理をする必要があるので、蛍光染色試薬は大量に必要となるため環境負荷影響が大きく、また検体に含まれる成分の影響によって染色力が異なる。従って、安定して染色できるように検体成分を分離して観察することが要求されている。

【 0 0 6 3 】

本発明は、このような従来課題を解決するためのものであり、検体中の微生物を表面に捕集する捕集手段を用い、捕集手段を固定できる載置手段を設けることで、発光点ごとに色度を精度良く求めることが容易になり、簡便かつ精度の高い微生物の計数が行える装置を提供することを目的としている。

【 0 0 6 4 】

更には、検体をろ過して捕集する捕集手段を用いた場合、メンブレンフィルタなどの表面に微生物を濃縮し、検体中に溶解している染色阻害成分を除去することができ、安定に細胞内での経時的な発光を観察することができ、また、最小量の蛍光染色試薬を使うことで環境負荷影響を最小限に低下させた微生物計数装置を提供することを目的としている。

【 0 0 6 5 】

また、画像の補正値を求める座標補正用チップと、焦点深度の範囲内であるかを判定するための点検用チップは個別に存在すると、点検作業を2度実施する必要性が生じるため、検査工数がかかってしまうという課題がある。

【 0 0 6 6 】

本発明は、このような従来課題を解決するものであり、座標補正と焦点位置の点検を両方実施することができるマーカーを表面に固定した点検用チップとすることで、点検用チップを微生物計数装置の載置手段に載置し、処理を実行することで、同じ操作で簡便に行うことができる検査装置、検査方法を提供することができる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 6 7 】

本発明の微生物計数装置は、上記目的を達成するために、微生物を捕集する捕集手段を載置する載置手段と、生菌および死菌を染色する生死菌染色試薬と死菌を染色する死菌染色試薬を用いて染色された前記捕集手段上の微生物の蛍光画像を取得する蛍光画像取得手段と、前記蛍光画像取得手段により取得された蛍光画像から発光点を検出する発光点検出手段と、前記発光点検出手段により検出された発光点が生菌、死菌、夾雑物のいずれかであることを判断する蛍光評価手段とを備えた微生物計数装置において、前記蛍光評価手段で発光点の面積および輝度値から生菌または死菌または夾雑物であるかを判断する面積輝度判断手段を備えることを特徴としたものであり、蛍光染色試薬による発光点の蛍光発光が、微生物由来であるか、微生物以外の夾雑物由来であるかを迅速に判断し、発光点の中から生菌を高い精度で検出し、計数することができる微生物計数装置が得られる。

【 0 0 6 8 】

また、請求項2に記載の微生物計数装置は、請求項1に記載の微生物計数装置において、面積輝度判断手段において、生菌または死菌または夾雑物であるかを判定する値の範囲の上限および下限を定める面積輝度上限値および面積輝度下限値を設けることを特徴としたものであり、微生物として設定するパラメータの範囲を明確かつ効率的に選択し、上限値および下限値により範囲を限定することが容易となるため、簡便で精度の高い微生物計数装置が得られる。

【 0 0 6 9 】

また、請求項3に記載の微生物計数装置は、請求項1または2に記載の微生物計数装置において、面積輝度判断手段において、判断に用いる輝度の値が、発光点を構成する画素

10

20

30

40

50

のうちの最大輝度値であることを特徴としたものであり、微生物の発光を示す輝度の値を精度よく得ることができ、また演算処理のメモリ量を減らすことができるため、迅速かつ精度の高い微生物計数装置が得られる。

【0070】

また、請求項4に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至3のいずれかに記載の微生物計数装置において、面積輝度判断手段において、発光点の輝度の値によって生菌または死菌とする発光点の面積の値を設定することを特徴としたものであり、微生物は種類や増殖期などの状態によって発光輝度が変化し、また画像上の面積も変化するが、輝度が高いものは面積が大きく、輝度が低いものは面積が小さいことを利用し、輝度が低いものは、面積が小さいものを微生物とし、反対に輝度が高いものは、面積が大きいものを微生物とするように、輝度の値によって面積の値を設定することにより、微生物と判定する精度を高め、様々な状態に対しても堅牢性の高い微生物計数装置が得られる。

10

【0071】

また、請求項5に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至4のいずれかに記載の微生物計数装置において、面積輝度判断手段において生菌または死菌と判断する面積の値を、発光点の輝度値の一次関数によって設定することを特徴としたものであり、輝度が高いものは面積が大きいものを微生物とし、輝度が低いものは面積が小さいものを微生物とするように設定するとき、その上限値および下限値を一次関数で設定すれば、必要な入力値は傾きと切片のみとすることができるため、簡単に範囲を指定でき、更に微調整が可能であるため高精度な微生物計数装置が得られる。

20

【0072】

また、請求項6に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至3のいずれかに記載の微生物計数装置において、面積輝度判断手段において、発光点の面積を発光点の画素の最大輝度値で除した値を用いて判断することを特徴としたものであり、菌数が多くデータ量が多い場合には、演算処理で使用するメモリ量が多くなるため処理時間が長くなるが、面積と輝度という二つのデータを、面積を輝度で除した値の一つとすることでメモリ使用量を減らすことができるため、演算処理時間を短縮でき、また精度も高い状態を維持することができるため、迅速かつ高精度な微生物計数装置が得られる。

【0073】

また、請求項7に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至6のいずれかに記載の微生物計数装置において、面積輝度判断手段により発光点の面積を輝度で除した値を求め、画像が焦点深度の範囲内であるかを判断する焦点判断手段を設けることを特徴としたものであり、微生物のような発光点の面積が非常に小さくなるものの場合、光学系の焦点位置がわかりにくく、取得した画像の焦点位置が焦点深度の範囲内であったかどうか判断しづらいが、面積を輝度で除した値を用いることにより、画像の焦点位置がっているかどうかを確認することができ、焦点のずれによる画質の悪化、計数精度の低下を防ぐことができる微生物計数装置が得られる。

30

【0074】

また、請求項8に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至7のいずれかに記載の微生物計数装置において、画像の演算処理に用いるパラメータを入力する入力手段を備えることを特徴としたものであり、演算処理に使用する膨大な数のパラメータの入力を簡便かつ効率的に行う事ができ、実用性の高い微生物計数装置が得られる。

40

【0075】

また、請求項9に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至8のいずれかに記載の微生物計数装置において、蛍光画像取得手段が励起光源と分光フィルタと拡大レンズと受像素子を備え、青色励起によって緑色蛍光を発する生死菌染色試薬と、緑色励起によって赤色蛍光を発する死菌染色試薬を用い、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像を取得するようにしたことを特徴としたものであり、青色励起光による緑色蛍光画像を取得することで、紫外光励起などに対して自家蛍光を低減して測定ができるため、自家蛍光によるバックグラウンド輝

50

度が減少し、S Nを向上させることができる。また2種類の染色試薬の輝度の取得と色度の取得に使用する励起光源と分光フィルタの組み合わせを最小限に抑える事ができるため、装置構成を簡略化することができ、小型で低コストな微生物計数装置が実現できる。

【0076】

また、請求項10に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至9のいずれかに記載の微生物計数装置において、発光点検出手段が、画像上の発光点の輝度と座標と面積を抽出する発光点抽出手段と、前記発光点抽出手段により抽出された画像上の発光点の座標を補正する座標補正手段と、補正された座標をもとに複数の画像から同一の発光点を照合し、照合された発光点の各画像の輝度値と面積のデータを結合する発光点照合手段を備えることを特徴としたものであり、画像ごとに発光点を検出して、座標を補正したのち発光点のデータを照合し結合することで、精度よくかつバックグラウンドなどのデータを持たない最小限のデータを扱う事ができるため、メモリ使用量を減らすことによる演算速度の高速化を図ることができる、迅速性の高い微生物計数装置が得られる。

10

【0077】

また、請求項11に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至10のいずれかに記載の微生物計数装置において、発光点抽出手段によって抽出された青色励起光による赤色蛍光画像の輝度を赤色の輝度とし、青色励起光による緑色蛍光画像の輝度を緑色の輝度とし、これらの輝度と、入力手段から入力した青色の輝度に基づいて、発光点ごとに色度を算出する色度算出手段を備えることを特徴としたものであり、青色の輝度を毎回取得せずに、あらかじめ標準的な試料を使用して求められた値をパラメータとして使用することで、計測に使用する画像の種類を減らし、データ量を軽減しても色度によるデータの判断精度を落とすことなく測定できるため、迅速かつ精度の高い微生物計数装置を提供することができる。

20

【0078】

また、請求項12に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至11のいずれかに記載の微生物計数装置において、蛍光評価手段が、発光点ごとに色度を算出する色度算出手段と、発光点の青色励起光による緑色蛍光画像の輝度と緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の輝度に基づいて発光点を生菌群または死菌群に分類する生死判断手段と、生菌群または死菌群に分類された発光点が微生物であるか夾雑物であることを色度で判断する微生物判断手段を備え、発光点が生菌、死菌、夾雑物のいずれかであることを判断するようにしたことを特徴としたものであり、発光物を生菌に近い色の集団と死菌に近い色の集団に分類し、それによって分類された発光物に対して微生物か夾雑物であることを判断することで、色彩的特性を効果的に扱うことができ、判別工程を効率化し、判別精度を高めた微生物計数装置を実現することができる。

30

【0079】

また、請求項13に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至12のいずれかに記載の微生物計数装置において、生死判断手段において、青色励起光による緑色蛍光画像のチャンネルの輝度値を第一軸、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像のチャンネルの輝度値を第二軸として2次元のドットプロットを表示するドットプロット表示手段と、前記ドットプロット表示手段により表示された各プロットを生菌群または死菌群に分類する分類手段を備え、前記分類手段により生菌群または死菌群に分類するようにしたことを特徴としたものであり、生菌と死菌では2つの染色試薬による発光強度が異なるが、この特徴をドットプロット上で生菌と死菌を個別に集団化して表示することで、分類手段によってこれらを簡便に分類することができる。これにより画像中の発光点の分布状態を、ドットプロット上の集団の位置と密度から、客観的に判断し、計数すべきものを的確に選択することができるため、精度が高い微生物計数装置を実現する事ができる。

40

【0080】

また、請求項14に記載の微生物計数装置は、請求項1乃至13のいずれかに記載の微生物計数装置において、発光点照合手段において、画像ごとの発光点データをRGBのチャンネルに割り当てて1枚のカラー画像で出力する結果画像出力手段を設けたことを特徴と

50

したものであり、取得した発光画像を色彩情報に基づいてカラー表示することにより、顕微鏡による確認作業において、発光画像と顕微鏡の像を比較することが容易になるため、発光物の確認作業の正確性を向上させることができる。また熟練者でなくとも発光物の中から微生物を探し出すことが容易になり、検査時間を短縮するとともに測定精度管理の正確性を向上させた微生物検査システムのための微生物計数装置を提供することができる。

【0081】

また、請求項15記載の点検用チップは、発光点を取得するためのマーカを表面に固定し、焦点深度の範囲内であるかを判断するために用いることを特徴としたものであり、焦点位置が適切かどうかをあらかじめ判定することができ、測定精度の管理を容易に行うことができる微生物計数装置が得られる。

10

【0082】

また、請求項16記載の点検用チップは、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の全てで発光点を取得できる波長をもったマーカを表面に固定したことを特徴としたものであり、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の3種類の画像の機械的なズレ幅を算出するために、3種類の画像全てで蛍光像を取得できるマーカを用いて画像を取得し、画像ごとのマーカの位置関係を比較し、XY方向の座標の差を求める事で、これらの画像のズレ幅を容易に算出する事ができる画像補正方法を実現するための点検用チップを提供することができる。

20

【0083】

また、請求項17記載の点検用チップは、請求項15または16記載の点検用チップにおいて、座標補正と焦点位置の判定の両方に使用できるマーカを表面に固定したことを特徴としたものであり、画像補正と焦点位置の確認を別々に実施するのではなく、同時に実施できるため装置の点検作業が一回で済み、点検時間、点検工数を減らせるだけでなく、点検漏れも防止できるようになって迅速かつ正確な微生物検査を行うための点検用チップを提供することができる。

【発明の効果】

【0084】

本発明の微生物計数装置によれば、微生物判断手段によって、蛍光染色試薬の蛍光発光が、微生物由来であるか、微生物以外の夾雑物由来であるかを判別することができる。

30

【0085】

また、微生物有無を迅速に検査できる検査システムを構築し、食品や化成品、水などの製造、物流システムを効率化することができる。

【0086】

また、蛍光染色試薬の蛍光発光を精度良く評価することにより、より確実に微生物だけを検出することができる。

【0087】

また、微生物の検査の熟練者でなくとも、発光画像から微生物有無の判断を容易に行うことができる。

40

【0088】

また、発光画像の確認を容易に行うことができるため、迅速な微生物検査システムの精度を向上し、検査時間を短縮することで、効率化を図ることができる。

【0089】

また、視覚的に微生物の存在を示すことで、微生物衛生管理に対する作業者の意識を向上させることにつながり、衛生管理システムの品質を向上させることができる。

【0090】

また、微生物だけを検出することにより、検査結果の確実性が向上し、微生物汚染の少ない食品や化成品、水などの製品を提供することができる。

【0091】

また、微生物だけを検出することにより、より確実に微生物の発酵工程を管理すること

50

ができ、品質の安定した製品を提供することができる。

【0092】

また、微生物だけを検出することにより、廃水や土壌などの汚染処理の工程管理が迅速に行えるようになり、効率化された処理技術が実現できる。

【0093】

また、微生物の計測のために色度、色相角、彩度、明度などの色彩的特性を使用することで、蛍光発光を高い判別精度で評価することができる。

【0094】

また、色彩的特性を示す値に対して閾値を設けることで、判断の客観性を高めることができる。

【0095】

また、色彩的特性を示す値に対して閾値を設けることで、微生物か否かの判別を微生物判断手段により自動化することができる。

【0096】

また、さまざまな状態や、種類、また環境状態が異なる微生物集団に対して、それぞれ最適な閾値を設定することによって、複雑なマイクロフローを形成した試料から生菌、死菌をそれぞれ集団ごとに検出することができる。

【0097】

また、生菌または死菌であることを判断する工程を行う生死判断手段と、微生物と微生物以外の夾雑物であることを判断する微生物判断手段をそれぞれ別に設けることで、生菌か死菌か夾雑物かの判別を効率化することができる。

【0098】

また、生菌、死菌それぞれの蛍光発光に対して、最適な色彩特性値を設定することで、夾雑物を微生物と誤って計測しない精度を高め、より確実に微生物だけを検出することができる。

【0099】

また、日常管理が簡便な衛生検査システムを構築することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0100】

本発明の請求項1記載の発明は、微生物を捕集する捕集手段を載置する載置手段と、生菌および死菌を染色する生死菌染色試薬と死菌を染色する死菌染色試薬を用いて染色された前記捕集手段上の微生物の蛍光画像を取得する蛍光画像取得手段と、前記蛍光画像取得手段により取得された蛍光画像から発光点を検出する発光点検出手段と、前記発光点検出手段により検出された発光点が生菌、死菌、夾雑物のいずれかであることを判断する蛍光評価手段とを備えた微生物計数装置において、前記蛍光評価手段で発光点の面積および輝度値から生菌または死菌または夾雑物であるかを判断する面積輝度判断手段を備えることを特徴としたものであり、面積と輝度の関係から微生物の特徴と外れる夾雑物由来の発光点を判別することができる。これは波長などの色彩的特性など別の特徴パラメータによる判別手段とは独立して実行することができるため、組み合わせて使用することで蛍光染色試薬による発光点の蛍光発光が微生物由来であるか微生物以外の夾雑物由来であるかを判断するためのアルゴリズムを効率化し、演算速度を速めることができるだけでなく、発光点の中から生菌を検出する精度を高めることができるという作用を有する。

【0101】

また、請求項2記載の発明は、請求項1記載の発明において、面積輝度判断手段において、生菌または死菌または夾雑物であるかを判定する値の範囲の上限および下限を定める面積輝度上限値および面積輝度下限値を設けることを特徴としたものであり、微生物として設定するパラメータの範囲を明確かつ効率的に選択し、上限値および下限値により範囲を限定することが容易となるため、操作を簡便にすることができ、また精度を高めることができるという作用を有する。

【0102】

10

20

30

40

50

また、請求項 3 記載の発明は、請求項 1 または 2 に記載の発明において、面積輝度判断手段において、判断に用いる輝度の値が、発光点を構成する画素のうちの最大輝度値であることを特徴としたものであり、微生物の発光を示す輝度の値を精度よく得ることができ、また演算処理のメモリ量を減らすことができるため、精度を高めつつ、演算処理を高速化することができるという作用を有する。

【0103】

また、請求項 4 記載の発明は、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の発明において、面積輝度判断手段において、発光点の輝度の値によって生菌または死菌とする発光点の面積の値を設定することを特徴としたものであり、微生物は種類や増殖期などの状態によって発光輝度が変化し、また画像上の面積も変化するが、輝度が高いものは面積が大きく、輝度が低いものは面積が小さいことを利用し、輝度が低いものは、面積が小さいものを微生物とし、反対に輝度が高いものは、面積が大きいものを微生物とするように、輝度の値によって面積の値を設定することにより、微生物と判定する精度を高め、様々な状態に対しても堅牢性を高めることができるという作用を有する。

10

【0104】

また、請求項 5 記載の発明は、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の発明において、面積輝度判断手段において生菌または死菌と判断する面積の値を、発光点の輝度値の一次関数によって設定することを特徴としたものであり、輝度が高いものは面積が大きいものを微生物とし、輝度が低いものは面積が小さいものを微生物とするように設定するとき、その上限値および下限値を一次関数で設定することで、必要な入力値は傾きと切片のみとすることができるようになり、精度を高めつつ設定操作を簡便化することができるという作用を有する。

20

【0105】

また、請求項 6 記載の発明は、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の発明において、面積輝度判断手段において、発光点の面積を発光点の画素の最大輝度値で除した値を用いて判断することを特徴としたものであり、菌数が多くデータ量が多い場合には、演算処理で使用するメモリ量を低減し、演算処理時間を短縮するため、迅速に検査結果が得られるという作用を有する。

【0106】

また、請求項 7 記載の発明は、請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の発明において、面積輝度判断手段により発光点の面積を輝度で除した値を求め、画像が焦点深度の範囲内であるかを判断する焦点判断手段を設けることを特徴としたものであり、微生物のような発光点の面積が非常に小さくなるものであっても、面積を輝度で除した値を用いることにより、画像の焦点位置が適切かどうかを容易に確認することができ、焦点位置による計数誤差を低減することができるため、計数結果の確度を高めることができるという作用を有する。

30

【0107】

また、請求項 8 記載の発明は、請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の発明において、画像の演算処理に用いるパラメータを入力する入力手段を備えることを特徴とする微生物計数装置であり、演算処理に使用する膨大な数のパラメータの入力を簡便に行えるため、一度に大量のデータを処理する事が可能となり、迅速化できるという作用を有する。

40

【0108】

また、請求項 9 記載の発明は、請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の発明において、蛍光画像取得手段が励起光源と分光フィルタと拡大レンズと受像素子を備え、青色励起によって緑色蛍光を発する生死菌染色試薬と、緑色励起によって赤色蛍光を発する死菌染色試薬を用い、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像を取得するようにしたことを特徴とする微生物計数装置であり、自家蛍光を低減して測定できるため、S/Nが向上し、また 2 種類の染色試薬の輝度の取得と色度の取得に使用する励起光源と分光フィルタの組み合わせを最小限に抑える事ができるため、装置構成を簡略化し、小型化できるという作用を有する。

50

【 0 1 0 9 】

また、請求項 1 0 記載の発明は、請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の発明において、発光点検出手段が、画像上の発光点の輝度と座標と面積を抽出する発光点抽出手段と、前記発光点抽出手段により抽出された画像上の発光点の座標を補正する座標補正手段と、補正された座標をもとに複数の画像から同一の発光点を照合し、照合された発光点の各画像の輝度値と面積のデータを結合する発光点照合手段を備えることを特徴とする微生物計数装置であり、画像ごとに発光点を検出して、座標を補正したのち発光点のデータを照合し結合することで、バックグラウンドなどのデータを含まない最小限のデータを扱う事ができるため、演算処理を行う演算手段のメモリ使用量を減らすことによる演算速度の高速化を図ることができ、微生物計数を迅速化できるという作用を有する。

10

【 0 1 1 0 】

また、請求項 1 1 記載の発明は、請求項 1 乃至 1 0 のいずれかに記載の発明において、発光点抽出手段によって抽出された青色励起光による赤色蛍光画像の輝度を赤色の輝度とし、青色励起光による緑色蛍光画像の輝度を緑色の輝度とし、これらの輝度と、入力手段から入力した青色の輝度に基づいて、発光点ごとに色度を算出する色度算出手段を備えることを特徴とする微生物計数装置であり、青色の輝度の計測を省略するようにしたので、装置構成や、計測画像を省略できるため、装置の小型化と迅速化ができるという作用を有する。

【 0 1 1 1 】

また、請求項 1 2 記載の発明は、請求項 1 乃至 1 1 のいずれかに記載の発明において、蛍光評価手段が、発光点ごとに色度を算出する色度算出手段と、発光点の青色励起光による緑色蛍光画像の輝度と緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の輝度に基づいて発光点を生菌群または死菌群に分類する生死判断手段と、生菌群または死菌群に分類された発光点が微生物であるか夾雑物であることを色度で判断する微生物判断手段を備え、発光点が生菌、死菌、夾雑物のいずれかであることを判断するようにしたことを特徴とする微生物計数装置であり、生菌、死菌ごとに最適な条件でその計数を行うため、計数の精度を高めることができるという作用を有する。

20

【 0 1 1 2 】

また、請求項 1 3 記載の発明は、請求項 1 乃至 1 2 のいずれかに記載の発明において、生死判断手段において、青色励起光による緑色蛍光画像のチャンネルの輝度値を第一軸、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像のチャンネルの輝度値を第二軸として 2 次元のドットプロットを表示するドットプロット表示手段と、前記ドットプロット表示手段により表示された各プロットを生菌群または死菌群に分類する分類手段を備え、前記分類手段により生菌群または死菌群に分類するようにしたことを特徴とする微生物計数装置であり、ドットプロット上の位置と集団の密度から、発光状態を客観的に捉えることができ、検体ごとに菌の種類や、状態が異なる場合にも、生菌および死菌を計数する精度を高める事ができるという作用を有する。

30

【 0 1 1 3 】

また、請求項 1 4 記載の発明は、請求項 1 乃至 1 3 のいずれかに記載の発明において、発光点照合手段において、画像ごとの発光点データを R G B のチャンネルに割り当てて 1 枚のカラー画像で出力する結果画像出力手段を設けたことを特徴とする微生物計数装置であり、取得した発光画像を色彩情報に基づいてカラー表示することにより、発光点の種類ごとに色分け処理をすることなく、画像中の生菌、死菌を確認する事ができ、よって計数の迅速性を高めることができるという作用を有する。

40

【 0 1 1 4 】

また、請求項 1 5 記載の発明は、発光点を取得するためのマーカーを表面に固定し、焦点深度の範囲内であるかを判断するために用いることを特徴としたものであり、点検用チップを用いて画像を取得し、焦点判断手段によって装置の焦点位置が適切かどうかをあらかじめ簡便に判定することができ、測定精度の管理頻度を上げて品質管理の精度を高めることができるという作用を有する。

50

【 0 1 1 5 】

また、請求項 1 6 記載の発明は、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の全てで発光点を取得できる波長をもったマーカーを表面に固定したことを特徴とする点検用チップであり、青色励起光による緑色蛍光画像と、青色励起光による赤色蛍光画像と、緑色励起光または黄色励起光による赤色蛍光画像の 3 種類の画像に含まれる X Y 方向の機械的なズレを補正するための座標補正值を、マーカーの位置関係から容易に算出する事ができる。すなわち、装置に座標補正のための点検用チップを載置するだけで、画像の取得からマーカーの位置の算出、補正值の算出までの一連の動作を自動で処理させることも可能となり、画像補正の簡便性を向上させることができるという作用を有する。また、機械的な誤差を高度な加工技術で管理することなく、装置固有の特性値として補正することで精密画像測定が可能となるため、簡便で低コストに微生物計数ができるという作用を有する。

10

【 0 1 1 6 】

また、請求項 1 7 記載の発明は、請求項 8 または 1 6 記載の発明において、座標補正と焦点位置の判定の両方に使用できるマーカーを表面に固定したことを特徴としたものであり、座標補正と焦点位置の確認を別々に実施するのではなく、一度の点検操作で 2 つの検査項目を同時に完了することができるため、品質管理方法を簡便化することができるという作用を有する。

【 0 1 1 7 】

(実施の形態 1)

20

まず、微生物を含む試料を測定するために、スライドグラスや、培養ディッシュ、マルチウェルプレート、またはろ過膜や、測定に適した形状を持つセルの観察面表面の表側、もしくは裏側の一方に微生物を固定する。固定は、ポリ - L - リジンのような試薬や、ゼラチンなどの粘着性、付着性をもった高分子材料を表面に薄く塗布し、微生物を含んだ試料を滴下し、表面に吸着させる。またメンブレンフィルタのようなろ過膜の場合、上方から液体試料を吸引してろ過し、メンブレンフィルタ表面に微生物を平面状に捕捉し、固定する。本発明において、最も好適に実施するものとしては、このようなろ過膜を使用することで、以下の染色や洗浄などの操作が簡便かつ微生物を流失することなく扱うことができるのでよい。また、メンブレンフィルタは、薄く、小さいため、そのままでは取り扱いが容易でない。そのため、専用の支持台、吸引口付きのホルダーを使用したり、もしくは膜に支持体を取り付けるか、一体化させたデバイスとすることで容易に膜を取り扱うことができる。

30

【 0 1 1 8 】

また本発明において微生物を含有するか含有する可能性のある検体は液状検体であるが、検査対象が飲料水などの液状サンプルの場合は、それ自体が液状検体となる。検査対象が野菜や肉をはじめとする食材などの固体サンプルの場合は、それをホモジナイズして液状検体としたり、その表面から綿棒などを用いて細胞および微生物を採取し、これを生理食塩水や燐酸緩衝液などに遊離させて液状検体としたりする。また、まな板などの調理器具などが検査対象となる場合、その表面から綿棒などを用いて微生物を採取し、これを生理食塩水などに遊離させて液状検体とする。こうした液状検体をメンブレンフィルタで吸引および加圧濾過、また場合によっては超音波を利用して加振ろ過することでメンブレンフィルタ上に細胞および微生物を捕捉することができる。

40

【 0 1 1 9 】

また、微生物の捕集は、メンブレンフィルタ表面以外にも、プレパレート表面や、可視光の透過性が高く、平面性の高いプレートの表面や、プレートとプレートの間隙、もしくは粘着性を持ったシート状、ディスク状のチップデバイス表面、平板培地表面、もしくはシャーレやディッシュ、マルチウェルプレートなどの表面、電極材料や吸着材料の表面などで行う。このとき、微生物の固定は、遠心力や、静電気力、誘電泳動力、疎水力などの物理吸着力以外にも、ゼラチンなどの接着成分によるものや、抗原・抗体反応、リガンド・レセプターの反応などの生物学的な結合力を用いることができる。

50

【 0 1 2 0 】

また、微生物への蛍光染色試薬の浸透性を調整するために、必要に応じて、適当な濃度の 2 価金属錯体や、1 価カチオン、カチオン性界面活性剤を混合した水溶液などを液体試料に混合させるか、もしくは捕集手段の上方から細胞および微生物に接触させた後、ろ過するか、または下方から細胞および微生物に接触させてもよい。これにより、細胞および微生物の蛍光染色試薬に対する細胞膜透過性を一定に保たせることができる。

【 0 1 2 1 】

また、蛍光染色試薬を混合する液体試料に粘性をもたせることで、微生物試料に試薬を接触させた後、微生物細胞の表面を覆うように試薬を付着させることができ、顕微画像上でのサイズが大きくなり、蛍光強度を増加させることができる。これにより、低倍率で広い範囲を高速に走査する場合にも、十分に強い輝度で、かつ大きな面積で微生物の発光像を取得することができる。

10

【 0 1 2 2 】

なお、2 価金属錯体としては、エチレンジアミン四酢酸などを 0 . 5 から 1 0 0 m M 程度の濃度範囲にて使用する。

【 0 1 2 3 】

なお、1 価カチオンとしては、カリウム塩、ナトリウム塩などを 0 . 0 5 から 5 % の濃度範囲にて使用することができる。

【 0 1 2 4 】

なお、カチオン性界面活性剤としては、T w e e n 2 0 や T w e e n 6 0 、 T w e e n 8 0 、 T r i t o n X - 1 0 0 などの細胞に対して侵襲性が低いものが使用でき、これらを 0 . 0 1 から 1 % 程度の濃度範囲にて使用する。

20

【 0 1 2 5 】

なお、粘性を持たせる成分として、D (-) - マンニトールや D (-) - ソルビトールやグリセリンなどの多価アルコール類を 1 0 から 7 0 % の濃度範囲で使用し、あるいはシリコンオイルなどを使用することができる。

【 0 1 2 6 】

次に染色手段として、乾燥防止成分を混合し、生死菌染色試薬または死菌染色試薬のいずれか、または両方を一定濃度含む染色試薬を固定表面に一定量滴下する。

【 0 1 2 7 】

蛍光色素は、核酸結合性の構造をもつが好ましく、生死菌染色試薬として使用するものは、紫外励起で青色蛍光を発するものであれば、例えば 1 , 4 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール、青色励起で緑色蛍光または黄緑色蛍光、黄色蛍光を発するものであれば、例えばアクリジンオレンジ、オキサゾールイエロー、チアゾールオレンジや、S Y T O 9 、 S Y T O 1 3 、 S Y T O 1 6 、 S Y T O 2 1 、 S Y T O 2 4 、 S Y B R Green I 、 S Y B R Green II 、 S Y B R Gold などのポリメチン架橋非対称シアニン色素系化合物が使用できる。また、用途によってはグラム陽性菌を染色し、グラム陰性菌は染色されないヨウ化ヘキシジウムなどの生死菌染色試薬を使用することも有効である。

30

【 0 1 2 8 】

また、死菌染色試薬としては、青色励起により緑色蛍光を発するものであれば、例えばアクリジン 2 量体、チアゾールオレンジ 2 量体、オキサゾールイエロー 2 量体などのモノメチン架橋非対称シアニン色素 2 量体や、S Y T O X Green 、 T O - P R O - 1 などのモノメチン架橋非対称シアニン色素系化合物、緑色励起または黄色励起により赤色蛍光を発するものであれば、例えばヨウ化プロビジウム、臭化ヘキシジウム、臭化エチジウム、L D S - 7 5 1 、 S Y T O X Orange などのポリメチン架橋非対称シアニン色素などが使用できる。

40

【 0 1 2 9 】

これらの蛍光色素は、緑色蛍光や黄緑色蛍光、黄色蛍光、オレンジ色蛍光、赤色蛍光などをもつものであれば、青色の領域に蛍光強度を持たないため、色彩的特性を取得する場

50

合にも青色の受光手段を省略して微生物の計数を行うことができる。

【0130】

なお、これらの蛍光色素は、細胞および微生物を含む試料に対して、あらかじめ0.1から100 μM となるようを混合して細胞および微生物に作用させるか、もしくは、時間を置かずまたは適当な時間間隔を開けて所定の濃度で細胞および微生物に作用させることとする。

【0131】

なお、メンブレンフィルタ上に捕捉した細胞および微生物の表面が、測定中に乾燥し、発光強度が変化することを防ぐための手段として、染色試薬には10から60% w/vのグリセロールや、10から90% v/vのD(-)-マンニトールやD(-)-ソルビトールなどの多価アルコール類のいずれかを1種類以上混合させておく。

10

【0132】

なお、ポリビニルアルコールを10から80%程度の適当な濃度にて試料に混合するか、もしくは後から液状のポリビニルアルコールでフィルタ表面を覆い、乾燥固化させることで、蛍光発光を比較的安定に保存することができる。

【0133】

また、蛍光染色試薬に、染色過程操作を阻害しない一定の粘性を与えることで、発光物の表面に試薬を付着させる事ができる。発光物の表面に試薬を付着させることによって、レンズ効果によって発光点を増強する事ができ、低倍率の画像であっても、検出するのに十分な輝度と面積を得る事ができる。

20

【0134】

なお、粘性を与える物としては、乾燥防止剤として使用するグリセロールや、D(-)-マンニトールやD(-)-ソルビトールなどの多価アルコール類が適している。

【0135】

捕集手段として適しているメンブレンフィルタとしては、例えば、孔径が0.2 μm ~ 1 μm のポリカーボネート製など公知のものを用いることができる。メンブレンフィルタは、そのままではろ過作業などの取り扱いが困難なため、台を設けるか、メンブレンフィルタに直接枠を取り付けたものが適している。

【0136】

このような捕集手段を装置に固定するために、装置には載置手段を設ける。これは、捕集手段の向きを定め、捕集手段が測定中に振動によって外れないようにするためのものである。また、捕集手段は、光軸方向に対して垂直に固定するようにする。また、メンブレンフィルタ表面の平面性を高めるために、メンブレンフィルタの裏側より、平面性の高いステージを押し当てることで、常に一定の平面性が得られるようにする。

30

【0137】

このような捕集手段表面の画像を取得するための蛍光画像取得手段には、蛍光色素に対して特定の波長を照射するための励起光源、分光フィルタを使用する。分光フィルタは、例えば、励起光を分光する励起フィルタ、励起光の成分を除去する為のハイパスフィルタ、試料から発せられる蛍光から特定の波長成分を取り出すための受光フィルタなどで構成される。蛍光画像の取得は、例えば、蛍光色素に対して特定の波長を照射するための励起光源、励起光を分光する励起フィルタ、励起光を直径3mm程度に集光する為の集光レンズ、励起光の成分を除去する為のハイパスフィルタ、試料から発せられる蛍光から特定の波長成分を取り出すための受光フィルタ、それを拡大する為のレンズユニット(拡大レンズ)、蛍光像を画像の電気信号に変換するためのCCDやCMOSなどの受像素子により行う。

40

【0138】

蛍光染色試薬として使用する蛍光色素の主な発光波長であるが、例えば、青色励起の場合には、波長が470nmから510nm付近の波長成分を含む励起光を照射した場合、波長が510nmから540nm付近の蛍光を発する。緑色励起の場合には、波長が510nmから550nm付近の波長成分を含む励起光を照射した場合、波長が560nmか

50

ら 6 2 0 n m 付近の蛍光を発する。黄色励起の場合には、波長が 5 4 0 n m から 5 8 0 n m 付近の波長成分を含む励起光を照射した場合、波長が 5 9 0 n m から 6 3 0 n m 付近の蛍光を発する。

【 0 1 3 9 】

そのため、検出手段である励起光源として、発光ダイオードを使用する場合、青色のものでは、好ましくは 4 8 0 n m 付近の波長を発することができるもの、緑色のものでは、好ましくは 5 3 0 n m 付近の波長を発することができるもの、黄色のものでは、好ましくは 5 6 0 n m 付近の波長を発することができるものを使用する。

【 0 1 4 0 】

なお、発光ダイオードを使用する場合、励起光の成分が広帯域に渡る場合が多く、蛍光画像のバックグラウンドの増加の要因となりうるため、適切な分光フィルタを使用して、特定の波長成分を切り出して使用する。

10

【 0 1 4 1 】

また、励起光源としてレーザーを用いる場合には、青色のものでは、好ましくは 4 7 5 n m 付近の波長を発することができるもの、緑色のものでは、好ましくは 5 3 5 n m 付近の波長を発することができるものを使用する。

【 0 1 4 2 】

また、励起光源としてハロゲンランプや水銀ランプを使用する場合には、染色試薬の励起波長に合わせて最適な分光フィルタを使用するのがよい。また、0 . 1 から 1 0 n m の波長分解能を有する反射型や透過型の回折格子により、最適な角度を与え、任意の波長を含む励起光を取り出すことができる。

20

【 0 1 4 3 】

集光レンズは、蛍光染色された細胞および微生物が展開されているメンブレンフィルタに対し、照射範囲が、例えば直径が 3 m m 程度の一定面積となるよう励起光を照射することができるものがよい。さらに光を散乱させるための拡散板などを一次側に組み合わせることでより均一な励起光を照射することもできる。

【 0 1 4 4 】

サンプルに照射された励起光により発生した蛍光は、ハイパスフィルタを通過することで、色彩的特性は損なわれず、効果的に励起光由来の光成分がカットされる。

【 0 1 4 5 】

当該蛍光はレンズユニットを通し、受像素子としての赤色 (R)、緑色 (G)、青色 (B) の 3 原色を取得できる R G B 3 種類の蛍光フィルタを含む 3 C C D などの電荷結合素子ユニットを用いて露光時間 0 . 1 秒から 1 0 秒程度の露光時間で R G B 3 色からなる画像撮影することにより取得される。なお、受像素子として単板カラー C C D を用いてもよい。

30

【 0 1 4 6 】

取得する色の輝度情報は、蛍光染色試薬である蛍光色素の蛍光波長範囲であれば、使用可能である。例えばシアニン色素である S Y B R Green の場合、極大蛍光波長は 5 2 1 n m であるが、蛍光スペクトルは 6 2 0 n m 付近まで広がっており、生死菌染色試薬として使用した場合、5 3 0 n m 付近の緑色 (G) を画像 (a)、6 1 0 n m 付近の赤色 (R) を画像 (b) として取得することができ、(a)、(b) を使用して微生物と夾雑物との判別が行える。

40

【 0 1 4 7 】

また、単板モノクロ C C D や C M O S を使用した場合、適切な受光フィルタを切り替えて使用することで、必要な波長の輝度情報を含む画像を取得することができる。このとき、別の利点として、同一の C C D を使用することで、異なる C C D による感度特性の差の影響は全く受けずに測定を行うことが可能となり、感度補正を行う工程を省略することができる。

【 0 1 4 8 】

これらの操作により取得された複数の蛍光画像は、演算手段であるマイコンや外部端末

50

上のプログラムによって処理される。

【0149】

演算手段には、画像からドット欠けなどの輝点を除去するための輝点除去手段を設ける。また、画像から発光点を抽出するための発光点抽出手段、抽出した発光点の座標を補正する座標補正手段、複数の画像から同一の発光点を照合し、照合されたデータを結合（統合）する発光点照合手段からなる発光点検出手段を設ける。さらに、結合されたデータを出力する出力手段があり、色度を算出する色度算出手段と、染色試薬の輝度より微生物の生死を判別する生死判断手段と、そして色彩的特性を表す変数によって発光点が微生物もしくは夾雑物であることを判別する微生物判断手段からなる蛍光評価手段を設ける。また、測定した画像の有効面積を算出する有効エリア算出手段を設け、そしてそれらの演算処理に使用する変数を入力する入力手段を設ける。

10

【0150】

これらの演算手段に備えられた手段は、プログラムのグラフィックユーザーインターフェース上に、ボタンやチェックボックスで選択したり、またプルダウンメニューと呼ばれる多項目の表示、選択手段によって容易に選択し、使用することができる。

【0151】

まず、輝点除去手段であるが、これはCCDなどの受像素子に見られる画素ピクセルの感度ムラや、感度消失した部分によるドット欠けと呼ばれる現象を有する輝点を除去するための手段である。ドット欠けの輝点が画像上に現れると、微生物の発光点と間違える恐れがあるが、または微生物の発光点を取得できない原因となり、誤差の要因となりうる。そのためこのような輝点は除去する必要があるが、輝点除去用の画像として、光源を照射しない暗視野画像を、露光時間をサンプル測定と同程度かもしくは長めに設定して取得し、輝点のみが写っている画像を得る。そして発光点を写した各画像から輝点画像を減算したり、周辺画素と比較して埋めてしまうことにより、輝点のみを削除することが可能となる。そのようにして輝点を除去した画像を以下において使用する。

20

【0152】

発光点抽出手段で、画像中に含まれる発光点のうち、設定された面積、輝度の範囲に該当するものを抽出する。例えば、面積を2から15、輝度を15から255とすると、面積が16以上であるような大きい夾雑物はあらかじめカウントから除外することができ、また輝度が14以下のバックグラウンドノイズ（暗ノイズ）を除去することができる。この閾値は、レンズの倍率や、励起光源の強度、露光時間などにより最適な値が変化するため、微生物を最適に抽出できる値は、あらかじめ検証して確認することが必要である。

30

【0153】

微生物と判定する精度を高めるために、面積輝度判断手段を用いる。微生物は画像上では非常に面積が小さい発光点として検出されるが、種類や培養状態によっては発光輝度が高く、面積が大きいものがある。微生物細胞の大きさは種類や栄養状態などによって若干異なるが、細胞が大きいものは発光輝度が高く、細胞が小さい種類の微生物は発光輝度が低く得られる。また、レンズなどの光学系の倍率にもよるが、微生物1個の大きさが使用する受像素子の1画素相当の面積よりも小さい場合、画像上の微生物由来の発光点の大きさは、実際の微生物の大きさではなく、発光強度が強いために受像素子上で隣接する画素が輝度を持った結果として面積が大きくなる。そのため、微生物由来の発光点の画像上の面積と輝度は一定の相関を持つようになる。一方、夾雑物などの発光物に比べると、微生物は試薬が細胞内に濃縮されるため、面積の割には発光輝度が高い。逆に、夾雑物などは表面に付着して発光するが、この場合、面積に対する発光輝度が割合低いものが多い。この輝度と面積の関係を調べると、微生物として特徴的な傾きをもった一次相関の関係にあることがわかる。面積輝度判断手段は、これを利用し、輝度が低いものは面積が小さいもの、輝度が高いものは面積が大きいものを発光点の中から微生物の生菌または死菌として判定するものである。発光点の持つ面積と輝度値の情報と、輝度値ごとの面積の上限値および下限値を比較し、範囲内であれば微生物と判定する。この上限値および下限値は、輝度の一次関数とし、設定方法としては傾きと切片を指定することで使用する。

40

50

(数式 1)

{ (下限値の切片) + (下限値の傾き) × 輝度値 } 面積 { (上限値の切片) + (上限値の傾き) × 輝度値 }

【0154】

また、面積輝度判断手段では、面積を輝度値で除した値を使用しても同様に精度よく夾雑物の中から微生物を判定することができる。さらに、この面積を輝度値で除した値は、焦点位置が合うほど小さくなる。焦点判断手段では、微生物固有の数値をあらかじめ調べて比較することで、取得した画像の焦点位置が合っていたのかを計数後に数値で判断することができる。

【0155】

また、焦点判断手段により、微生物の計数前にあらかじめ発光の小さい蛍光性の粒子の画像から焦点位置が合っていて装置が正常に計数できる状態であるかを判定することができる。

【0156】

これらの処理は、汎用的な画像処理ソフトウェアである Image Pro Plus (商標) などを利用して実行できる。また、同様の処理を組み込んだプログラムを使用することもできる。

【0157】

次に発光点照合手段によって、抽出された発光点の数値データと、異なる輝度情報を含む同位置の発光点の数値データとが、座標をもとに比較、照合され、結合される。

【0158】

このとき、異なる輝度情報を含む画像とは、異なる受光フィルタで取得された画像のことを指すが、画像間では受光フィルタの特性や、機械的誤差に起因する座標ズレがわずかに生じる為、そのまま画像のピクセル座標を照合した場合、一致しないことがある。そこで、一方の座標に画像ズレを補正する座標補正値を補って照合させる座標補正手段を設けるのだが、特に機械的誤差については温湿度などの使用環境の影響により、使用することによって座標ズレの値が変化してしまう場合がある。そのため、座標補正値を測定毎に更新して使用することで、測定ごとに最適な値を使用することが有効である。

【0159】

座標を補正するための補正値は、あらかじめ取得した位置補正用画像から補正値を読み取ることにより取得する。位置補正用画像は、取得する全ての波長域において写りこむ蛍光体を使用して撮像する。取得する波長が緑色と赤色であれば、長波長側の赤色の蛍光粒子が使用でき、同程度の発光強度が得られるように励起光源の強度と露光時間を調節して撮影を行う。また、補正値を自動で算出させるような処理の場合には、蛍光体の個数が多くなると演算する数も多くなり、時間がかかってしまうため、蛍光体の個数が画面あたり 5 から 50 個の範囲内であれば、1 から数分程度と比較的短時間で補正値を求めることができる。蛍光体の個数がこのような個数になるように、蛍光粒子の懸濁液を一定量メンブレンフィルタにろ過することにより、位置補正用画像を取得するための座標補正用の点検用チップを作製する。また、これを校正用チップとして長期的に繰返し使用したい場合には、蛍光粒子を高分子などで固定するか、金属蒸着することによって金属薄膜で覆ってしまうことにより固定しておくこと。これにより蛍光粒子は繰返し使用しても外れずに位置が一定になる。また、校正用チップとしては、その他にも、蛍光性の樹脂をマスキングして微小パターンやスポットを形成させるなどしたものも有効である。

【0160】

このようにして作製された校正用チップは、装置に設置されて実際の計測と同じようにして画像を撮像する。これにより、モーターの位置制御誤差やバックラッシュなどの機械的誤差、フィルタやレンズの製造誤差、装置を組み上げる際の製造誤差に由来する光軸のズレなどで発生する画像の座標ズレを再現した画像を取得し、その補正値を求めて実際の計測で使用することで、位置精度が高められる。

【0161】

10

20

30

40

50

また、この座標補正用の点検用チップに使用する蛍光粒子を微生物と近い大きさのものとすることで、焦点位置が合っているかどうかを判断するための点検用チップとしても使用できる。焦点位置を合わせるための画像で検出できる発光特性を持つものが使用できるが、これは座標補正用のものを使用することがよい。プログラムの構成を、座標補正值の算出と続けて焦点位置の判断を実行できるようにすることで、座標補正操作と同じタイミングで装置の焦点位置の検査も行うことができるようになり、検査作業を一元化することができる。

【0162】

画像中に見られる微生物の発光点を示すオブジェクトの面積は、拡大レンズ系の合計が200から300倍程度のときは、受像素子上で1から20ピクセル程度になる。これは微生物の細胞1個の直径が0.6から5 μ m程度であるときに撮像された値である。一方、微生物細胞が2から複数個繋がっていた場合、発光点のオブジェクトの面積は大きくなり、20ピクセルを越えるものも見られる。このような大きな発光点のオブジェクトは、共焦点光学系などの特殊な光学系を使用しない限りは、殆どの場合一つのオブジェクトとして検出され、二つのオブジェクトを分離して検出することが難しい。このとき問題となるのは、二つのオブジェクトが異なる発光特性をもつ場合に、各画像を比較して発光点を照合して輝度を結合したときに、同一のオブジェクトとして検出される、隣り合った微生物の発光輝度を誤って結合してしまうと、本来の微生物の発光特性とは全く異なる不正確なデータが形成されてしまうという恐れがあることである。そのような事例を防止するためには、発光点の座標をオブジェクトの最大輝度値を示す座標とし、画像間の発光点を照合するときは、その座標から非常に近傍に限定された誤差範囲エリア内にあるもう一方の画像の座標をもつ発光点とのみ結合されるようにすることが必要である。

【0163】

同一の発光点のオブジェクトとして抽出されているものであっても、照合した場合に一致しないことがありうる。そのとき結合する輝度データが存在しなくなってしまうことを防止するために、照合するもう一方の画像に一致する発光点が検出されなかった場合に、もう一方の画像中の同じ座標のピクセルの輝度値を抽出し、この値を結合させることが有効である。これにより、発光点が一方の画像でしか抽出されなかった場合でも、輝度情報を欠如させることなく、精度よく照合データを作成することができることになる。

【0164】

また、最終菌数の検出精度にも関連するが、生菌と死菌が繋がって存在している場合、上記のような工程を持たせなければ、オブジェクトを死菌として検出してしまう可能性があるが、上記のような工程より生菌と死菌が繋がったものとして検出することができるようになり、培養法などとの相関性が向上することに繋がる。

【0165】

照合されて結合されたデータは、出力手段によりデータファイルとして出力される。この時点でデータファイルとして保存することで、この後の工程を一度にまとめて処理することも可能となるため、演算プログラムの構成が効率化される。この工程は、各撮像位置ごとに実施され、全ての撮像位置を走査したのちに、各撮像位置の出力ファイルを読み込んで、全領域の照合データの作成に使用される。

【0166】

発光点の輝度情報をもつデータファイルに対して、生死判断手段によって発光点が生菌群であるか、もしくは死菌群であるかいずれかに分類される。このとき、発光点が生菌群、もしくは死菌群であることを示すパラメータをデータに付加することで、以降の微生物が夾雑物かを判断する処理が簡略化され、演算処理プログラムを効率化することができる。尚、パラメータとは生菌群であれば1、死菌群であれば2であるというように、発光点のデータに数値を付加することにより行うこととする。

【0167】

生菌群であるか死菌群であるかを判断する為には、以下のようにグラフを使用することが望ましい。まず、発光点のデータのうち、生死菌染色試薬の輝度値と、死菌染色試薬の

輝度値から、ドットプロットを作成するドットプロット表示手段を設ける。これは、横軸に生菌染色試薬の輝度値、縦軸に死菌染色試薬の輝度値をとり、検出された発光点毎にプロットしていくもので、2次元ヒストグラムとも呼ばれる手法であり、2種類の試薬によってどのような2つの発光強度のバランスをもった微生物の集団がどのくらい存在するのかを可視化するのに有効な手法である。尚、ドットプロットの表示は、画像処理を行うプログラムのグラフィックユーザーインターフェース上に行うことが良く、発光点のデータファイルを読み出した場合に表示させるようにするとよい。輝度値として使用する値は、オブジェクトの最大輝度値や、平均輝度値、合計輝度値を使用することができ、プロットの表示軸は、表示軸選択手段によって常数、対数を選択して適切なものを使用できる。蛍光強度は強いものと弱いものとで10倍以上、場合によれば100倍以上の輝度の差があることが多く、全体を表示するためには対数軸で表示するほうがよい。しかしながら、プロットは近接している場合が多く、ある一部分を拡大して見たい場合や、近接したプロットを境界線で分ける場合には、常数軸で表示しているほうがよい場合がある。そこで、表示軸選択手段を設けて表示軸を対数と常数で切り替えることができるようにすることで、いずれの場合にも必要に応じて使用することができる。

10

20

30

40

50

【0168】

次に、表示されたドットプロット上のプロットを集団ごとに分類する分類手段を設ける。分類手段は、プロットを分類するための境界線を作成する境界線作成手段と、境界線によって分けられた生菌領域、死菌領域から、発光点がどちらの領域であるかを判断し、生菌群か死菌群であるかを判断する領域判断手段を備える。境界線は、1本ないし複数本の直線や曲線、多角線などをカーソルなどで自由に作成することができるものとし、プロットを見ながら、プロットの集団を分類しやすいように作製する。なお、境界線の作製工程は、簡単に行えるようにグリッドなどを使用したり、輪郭やプロットにトラップさせるような機能を持たせると容易であり、かつ正確に行うことができる。

【0169】

また、多角線を境界線とする場合には、線が交差しないように、一方の方向のみに作製可能とすると確実である。

【0170】

作製した境界線は、取り消すことや、境界線保存手段によって保存することができるようにし、境界線選択手段によって繰り返し使用することができるようにする。また、選択した境界線の頂点を一部変更したり、頂点を追加するなど、編集する事ができる境界線編集手段を設けることで、検体ごとに更に適切な分類結果を得る事ができるようになる。

【0171】

次に、作製した境界線をもとに、境界線に相当する閾値を算出する。算出された閾値に対して、グラフの上、左側にあるものが死菌群、反対が生菌群として分類し、パラメータを与えて処理する。

【0172】

発光点が生菌群か死菌群のいずれかに判断された後、微生物判断手段によって夾雑物由来の発光点を分離除外する場合は、以下の処理を行う。微生物と夾雑物の判別は、入力手段によって指定された色度の閾値と、算出された発光点の色度を比較する事によってなされる。

【0173】

色度は、RGBの輝度値より色度算出手段によって演算されて得られる。色彩的特長を示す表色系としては、Lab表色系や、LCh表色系、XYZ表色系などの表色系が使用される。ここではXYZ表色系に基づいた色度を用いる。取得される輝度はRGBの色空間のものであるため、このRGBそれぞれの輝度値から、XYZ表色系への変換が数式2によって行われる。

(数式2)

$$X = 0.3933 \times R / 255 + 0.3651 \times G / 255 + 0.1903 \times B / 255$$

$$Y = 0.2123 \times R / 255 + 0.7010 \times G / 255 + 0.0858 \times B / 255$$

$$Z = 0.0182 \times R / 255 + 0.1117 \times G / 255 + 0.9570 \times B / 255$$

$$x = X / (X + Y + Z)$$

$$y = Y / (X + Y + Z)$$
【0174】

式中の R、G、B はそれぞれ赤色蛍光輝度値、緑色蛍光輝度値、青色蛍光輝度値であることを示す。これにより細胞および微生物または夾雑物かの判断に必要な値として、最終的に x、y の値が算出される。

【0175】

発光点毎に算出された色度の値であるが、発光点にはそれぞれ生菌群であるか死菌群であるかを判別するためのパラメータが与えられており、生菌群であった場合には、生菌群に対して設定された色度閾値と比較し、死菌群であった場合には、死菌群に対して設定された色度閾値と比較して、それぞれの場合において夾雑物に由来する発光点が除外される。夾雑物が除外され、生菌、死菌として判断されたものは、積算され、カウントされる。

10

【0176】

ポジションごとのカウント値は、その都度表示させることが良く、これにより計測途中であっても最終結果の目安を得ることができるようになり、カウント値が多い場合などであっても、直ちに衛生管理工程の改善や、迅速な出荷停止判断に移れるため、作業の効率化につなげられる。

【0177】

また、取得した画像、演算して合成したカラー画像もカウント結果の表示に合わせて表示させることが良く、これにより、カウント値が正しく求められる画像であるかを使用者が判断することができる。

20

【0178】

カラー画像の発光点は、取得した白黒画像の強度をもとに色彩情報に近い色で表示されることで、画像確認を容易に行えるようになる。また、カラー画像に加え、それぞれの波長を示す白黒画像も選択して表示できるよう、プログラム上のボタンなどを配しておくことがよい。

【0179】

次に、このカウント値をもとに、実際に使用した検体に含まれる単位量あたり（例えば、1 mL や 1 g など）の菌数の総数を算出する。そのためには、測定した画像のうち、画像処理して使用した有効エリア面積を有効エリア算出手段にて求める。測定に使用した有効エリアは、画像の補正值を変数とした関数で求められる。尚、有効エリア面積は、補正值が決まっていれば先に求める事もできる。

30

【0180】

画像の縦の長さを P、横の長さを Q、縦方向の座標補正值を、横方向の座標補正值をとすると、1 画面あたりの有効エリア画素数 M は数式 3 のように表される。

(数式 3)

$$M = (P -) \times (Q -)$$

【0181】

また、有効エリア面積は、レンズ系の倍率などから、画素あたりの面積を求め、画素あたりの面積を s とするとし、測定視野数を N として、1 画面あたりの有効エリア面積 S と全有効面積は数式 4 のように表される。

40

(数式 4)

$$S = M \times s$$

$$\text{全有効面積} : S \times N$$

【0182】

得られた面積に対して、微生物の捕集手段の固定部分の表面積（例えば、メンブレンフィルタの全面積）の値を割り返す。これにより得られた数値を、カウント菌数に掛け合わせることで、最終的な、微生物の生菌または死菌の総数を算出し、菌数を求めることができる。

50

【0183】

以上のようにして発光物の検出を行った後、迅速検査の場合には、検出された発光物が微生物であるかどうか顕微鏡などを用いて判断し、結果の妥当性を評価することが必要である。そのため、測定に使用したメンブレンフィルタなどを蛍光顕微鏡で観察する。

【0184】

顕微鏡を使用して、メンブレンフィルタ表面から発光画像の発光物と同じものを観察するためには、まず顕微鏡で観察する際のメンブレンフィルタの向きと、微生物計数装置で測定した画像の向きとが同じ方向になるように揃えることが重要である。向きが異なると、顕微鏡像に見られる発光物の集団と、取得した発光画像との配置が異なって見えてしまうため、同一の視野や同一の発光物を特定するのが困難になる。そこで、メンブレンフィルタに樹脂などの枠を設け、その枠に目印をつけ、同様に顕微鏡のステージにも目印をつけてそれらを合わせることで、顕微鏡の像と、微生物計数装置の像を揃えることができるようにするのがよい。

【0185】

尚、この目印は3箇所以上、中心から非対称に設けると、一致する向きは一つしかなく必ず同じ位置に合わせられるようになり、僅かな載置角度の誤差も防止できる。

【0186】

さらに、この目印を凸部とし、顕微鏡にステージにこれに対応する凹部を設け、凸部と凹部がかみ合うようにはめるようにすれば、精密な調整が、簡便に、効率的に実施できる。

【0187】

また、メンブレンフィルタ表面のうち計測領域の全領域を、100倍程度の高倍率の対物レンズで観察する場合、メンブレンフィルタの枠がメンブレンフィルタ表面よりも高いと、高倍率の対物レンズは焦点深度が浅いため、レンズと枠が接触してしまい、枠付近のメンブレンフィルタ表面は、焦点があわないために観察することが困難になる。また、メンブレンフィルタの面積が直径1cm程度と小さければ、ほぼ中心部分でしか焦点が合わなくなってしまう、発光物の判断が困難である。そこで、メンブレンフィルタの面積をやや大きくし、メンブレンフィルタの枠とレンズが接触することなく観察が行えるように、枠から一定の距離を隔てた範囲において検体をろ過できるように、また枠から一定の距離の範囲内では検体をろ過できないように、メンブレンフィルタの上方もしくは下方から中心部に穴を設けたフィルムを重ね合わせるようにすれば、メンブレンフィルタの中心部分において検体をろ過できるようになり、よって、全ての発光物が高倍率の対物レンズで観察でき、判断することができるようになる。

【0188】

また、同様の目的で、メンブレンフィルタを固定する枠と台座の寸法をあらかじめ調整し、メンブレンフィルタ下方の台座の孔径を、メンブレンフィルタ上方の枠のフィルタ押さえ部分よりも小さくすることで、ろ過部分をメンブレンフィルタの中心部分に限定させることができるようになる。

【0189】

顕微鏡で観察される複数の発光物から、微生物として判断した発光点を容易に確認できるように、微生物として検出している発光点の色を表示する表示手段を微生物計数装置に設ける。表示手段は、プログラム上で小さなウィンドウ枠内に背景を暗黒色で、その中に微生物細胞とするオブジェクトを微生物の色彩特性で表示する。この表示色は、微生物として判断する時の色彩的特性の閾値の値をリンクさせておくことで、パラメータを変更した場合でも、表示色を自動で変更することができる。

【0190】

以上の手法を用いて、試料中や細胞培養液に含まれていた微生物の生死を判別し夾雑物と分離して、計数することができるのである。

【0191】

図1は、本発明を好適に実施するための微生物計数装置の一態様を示す概念図である。

この微生物計数装置 1 は、蛍光画像取得手段として励起光源 2、励起フィルタ 3、集光レンズ 4、ハイパスフィルタ 5、受光フィルタ 6、レンズユニット 7、受像素子 8 を含む。励起光源 2 から発せられた励起光から目的の波長を取り出すために励起フィルタ 3 で分光する。分光された励起光は集光レンズ 4 を経て検査台 9 にセットされた微生物を捕集する捕集手段としてのメンブレンフィルタ 10 (別途の操作によりメンブレンフィルタ上に核酸結合性の蛍光色素で染色された微生物を捕捉してあるもの) 上に集光される。励起光源 2 から発せられた励起光は、集光レンズ 4 によって集光されるが、その際、集光レンズ 4 によって励起光は直径 3 mm 程度の微小な一定面積に集光されるようにするのがよい。励起光により発する蛍光は、励起光成分を除去するためにハイパスフィルタ 5 を経て、さらに蛍光から特定の波長成分を取り出すための受光フィルタ 6 を経て、レンズユニット 7 により拡大され、受像素子 8 である CCD ユニット 11 に到達し、電気信号化される。これにより得られた信号は画像化され、演算手段 12 によって画像処理される。

10

【 0 1 9 2 】

図 2 は、演算手段 12 における演算工程フローを示した図である。輝点除去手段 13、発光点抽出手段 14、座標補正手段 15、発光点照合手段 16、出力手段 17、蛍光評価手段 18、そして有効エリア算出手段 19 から構成されている。

【 0 1 9 3 】

まず座標補正用画像を読み込んで座標補正值を算出する。次に閾値などの変数を入力し、輝点除去手段 13 によって輝点を除去した画像を作成する。続いて、発光点抽出手段 14 により画像中の発光点を特定し、数値データを抽出する。画像によっては座標補正手段 15 により座標を補正する。異なる輝度情報を含む発光点のデータは、発光点照合手段 16 によって照合し、結合される。これにより集合された数値データは、出力手段 17 によってデータファイルに出力され、保存される。データファイルに対して、色度算出手段 20 によって、発光点ごとに色度を算出する。そして生死判断手段 21 によって発光点が生菌群であるか死菌群であるかを判別し、発光点毎に生菌群もしくは死菌群のフラグを立てる。微生物判断手段 22 により、検出したフラグについて、生菌群と死菌群のそれぞれに対して設定した微生物であるか夾雑物であるかを判断するための閾値と照合して微生物であるか夾雑物であるかを判別する。さらに、判定精度を上げるため、発光点の面積と輝度値の値から微生物であるか夾雑物であるかを判定するための面積輝度判断手段 23 により、面積が大きく輝度が低い夾雑物を微生物のカウントから除外して、最終的に菌数を算出し、出力する。これらの処理は画像処理をプログラミングされたマイコン等で実行でき、外部接続した端末などによって操作されるソフトウェアと通信して行うこともできる。

20

30

【 0 1 9 4 】

図 3 (a) は、微生物判断手段における判断の一例を示す表である。具体的には、E . c o l i を含む水検体をメンブレンフィルタにろ過し、生死菌染色試薬としての蛍光色素である S Y T O 9 と、死菌染色試薬としての蛍光色素であるヨウ化プロビジウムを用いて染色したものを、単板モノクロ CCD と、青色励起光照射における G 輝度画像と R 輝度画像を取得したデータの一例を示す表である。このとき、B 輝度画像は、励起光の波長と重なるために取得できないので、入力手段から数値を代入して使用している。この変数は、最適な値に調整することができる。

40

【 0 1 9 5 】

図 3 (b) に示される動作は、R G B の輝度から、X Y Z 表色系の (x , y) の値への変換を示す。この工程はまず、R G B の輝度を測定する手段によって取得された R G B それぞれの輝度値から、リニア R G B への変換、ガンマ補正がなされる。これにさらに視覚的特性を重み付けし、微生物または夾雑物かの判断に必要な値として、最終的に x , y の値が求められる。このとき、例えば光学フィルタによって青色 (B) をカットし、緑色 (G) および赤色 (R) のみを取得されるような条件の場合には、青色の感度は得られないものとして、B の輝度値については、あらかじめ実験によって最適化された固定値をかわりに使用することや、または R または G の輝度値による関数を設定して使用することもできる。これにより得られた色度の値に対して閾値と比較することで、微生物であるか夾雑

50

物であるかを判別する。なお、このときの閾値は実験により決定する。

【0196】

図4は、色度の表示手段を示す。微生物の色度は、あらかじめプログラム上で閾値を設定しておいて判断に使用するが、このとき微生物と判断される色彩が表示される。プログラムのグラフィックユーザーインターフェースとなるメインウィンドウ24に含まれるか、もしくは別ウィンドウにて、表示ウィンドウ25、色彩表示オブジェクト26、背景27が配置される。図4では、これらがメインウィンドウ24に含まれる場合を示す。色彩表示オブジェクト26は、楕円形、円形などの閉曲線や矩形などであり、微生物と判断する色彩特性のパラメータとリンクして表示色が変更される。背景色は、顕微鏡画像と比較しやすいよう、暗黒色になっている。

10

【0197】

図5は、点検用チップの上面図および断面図およびメンブレンフィルタ表面の拡大図を示す。点検用チップ28は、例えば平面性の高いメンブレンフィルタ29表面に蛍光粒子32を固定したものが使用できる。点検用チップには、微生物などの試料の計数に使用するための捕集手段と同じ形状のものを使用するとよい。これにより、載置手段の形状が複雑化せず、共有させることができる。メンブレンフィルタ29表面には、金属膜などで覆い、フィルタろ材の自家蛍光を低減化する処理を施しておくことで、低い背景になる画像を取得できてよい。このメンブレンフィルタ29表面に、蛍光粒子32を固定するのだが、この蛍光粒子32は、取得する画像全てで発光がみられるものを使用する。波長としては、青色励起光で緑色蛍光および赤色蛍光を発し、さらに加えて緑色励起光で赤色蛍光を発するものがよく、例えば、広帯域の可視光に吸収域と蛍光を持つものがよい。。これら全てを発するものであれば、取得する全ての画像に対応しており、それぞれの波長で取得された画像上にある同じ粒子の発光点の座標を重ね合わせることで座標補正值の算出を行い、座標補正手段を実行することができる。

20

【実施例】

【0198】

(実施例1)

図1に示す微生物計数装置を用いて、E. coliを含む菌液と、水道水(塩素除去済み)の中の菌数を測定した。まず、これらの液体試料を、孔径が $0.45\mu\text{m}$ 、直径 9mm の黒色メンブレンフィルタに表面を金属蒸着したものの上方からピペットにて滴下し、吸引ろ過した。メンブレンフィルタは、そのままでは表面に触れてしまう恐れがあり、扱いにくいため、周囲を樹脂枠で覆い、一体化させたものを使用した(図5を参照のこと)。吸引ろ過圧は、吸引の程度が弱すぎるとろ過できず、吸引の程度が高すぎると微生物へのダメージとなってしまうばかりか、メンブレンフィルタが破損することがあるため、 100 から 400Torr 付近のポンプ圧に設定して行った。メンブレンフィルタ上に液体試料をろ過するとき、計数のしやすさや、精度の点から、微生物などの発光物はできるだけ均一に分散させる必要がある。そのため、メンブレンフィルタのろ過性能を均一にするために、メンブレンフィルタ下方の吸引口にろ紙などを挟み、吸引圧を拡散して、吸引圧がフィルタ全体に均一にかかるようにして行った。また、それとは別に、メンブレンフィルタのポアの通過抵抗を減少させるため、液体試料をろ過する前に、少量の界面活性剤希釈液(Tween 20 0.1%)をろ過した。液体試料は、E. coli菌液の場合は 0.1mL 、水道水の場合は 20mL ろ過した。

30

40

【0199】

続いてメンブレンフィルタ上に捕集された微生物に対して、蛍光染色を行った。染色試薬は、生死菌染色試薬であるSYTO 24と、死菌染色試薬であるSYTOX Orange(いずれも商品名)を使用した。これらの染色試薬は、空気中で光を吸収して分解しやすいため、ジメチルスルホキシドにて $500\mu\text{M}$ に調整し、少量ずつマイクロチューブに分注してストック液とし、保管した。保管は、マイクロチューブ内に窒素を封入し、マイナス 20 のフリーザーにて暗所保管した。必要本数を解凍し、それぞれの試薬 $10\mu\text{L}$ に対して希釈液を全量が 1mL になるように加え、混合した。この希釈液は、試薬の溶

50

解性、保存性、細胞への浸透性、乾燥防止性に優れ、低自家蛍光性である必要があるが、このような条件を満たすものとして、D - ソルビトールを蒸留水で 50 % 程度に希釈し Tris - HCl と少量の界面活性剤 (Tween 20) を混合したものを使用した。

【 0 2 0 0 】

終濃度 5 μ M に調整した試薬は、1 種類ずつ微生物が捕集されたメンブレンフィルタ上方から滴下し、常温にて数分間染色し、余剰の試薬は吸引ろ過にて除去した。染色順序は限定されず、生死菌染色試薬、死菌染色試薬いずれから行っても同様に染色することができる。

【 0 2 0 1 】

染色したのち、余剰試薬を吸引によってできる限り除去した後、メンブレンフィルタを微生物計数装置に設置し、計測を行った。

10

【 0 2 0 2 】

微生物計数装置は、図 1 に記載されたものであるが、今回、青色発光ダイオード (約 470 nm) と、緑色発光ダイオード (約 530 nm) を使用し、受光フィルタとして緑色は 530 から 550 nm に透過性をもつものと、赤色は 590 から 610 nm に透過性を持つものを使用した。なお、光源には、光束を撮像範囲に照射しやすいよう集光レンズを設けている。

【 0 2 0 3 】

また、メンブレンフィルタの設置ステージには着脱可能な機構を設け、さらにステージ部材を平面性が高いものとし、これをメンブレンフィルタの裏側から押し当てることで、フィルタの平面性を高め、かつ画像取得のためのピントがフィルタ上に合う高さに固定できるようにし、ピント調節を不要とした。メンブレンフィルタを固定したステージは、モーター駆動の XY ステージにより移動可能であり、プログラムによってあらかじめ指定した位置への移動を連続的に行うことができるものとした。

20

【 0 2 0 4 】

メンブレンフィルタ表面の蛍光画像の取得は、メンブレンフィルタの上方に設置された赤外カットフィルタを施した単板モノクロ CCD カメラと、拡大レンズ系にて行った。画像を取得する際には、励起光となる LED が点灯して照射され、受光フィルタを切り替えて目的の波長の画像を取得できるものとし、これらのカメラ、光源、フィルタ、およびステージは、動作をプログラムされたマイコンを使用して制御されるものとした。

30

【 0 2 0 5 】

画像の取得は、同一の位置で (a) 青色励起、緑色蛍光、(b) 青色励起、赤色蛍光、(c) 緑色励起、赤色蛍光、の 3 種類の画像を、露光時間が 0 . 1 から 10 秒程度で連続的に取得し、ステージによって次の撮像領域に移動し、同様に画像を取得するものとした。また、測定の前には、発光ダイオードを点灯させずに画像を取得し、ドット欠けのみを含む画像を取得しておいた。

【 0 2 0 6 】

尚、焦点位置はレンズ高さによってあらかじめ調整するが、焦点位置の確認には捕集手段のメンブレンフィルタ表面に蛍光粒子を固定した点検用チップを作製し、この画像を取得して判断した。

40

【 0 2 0 7 】

図 6 は点検用チップの高さと取得した画像のオブジェクト面積を最大輝度値で除した値とのグラフと焦点深度範囲の判定方法を示す。グラフは、点検用チップとレンズとの焦点距離を変えながら各位置での画像を取得し、画像中の発光点の面積と最大輝度値から面積を最大輝度値で除した値を求め、高さごとにプロットしたものである。蛍光粒子として、青色励起光で緑色蛍光と赤色蛍光をもち、緑色励起光で赤色蛍光をもつ赤色蛍光粒子 (最大吸収波長が 540 nm、吸収域が 500 から 570 nm、最大蛍光波長が 610 nm、蛍光域が 550 から 660 nm) のものを使用した。焦点深度範囲を判定するための画像は、光学系の色収差が補正されたものであれば 3 種類の画像全てで取得する必要はない。通常、波長が短いほうが焦点深度の範囲が狭いため、複数の波長を観察する場合にはもっ

50

とも波長の短い組み合わせを選択すれば使用する全ての波長で焦点深度範囲に入るといえる。この場合、青色励起光で緑色蛍光の画像を使用した。このとき、焦点位置に近いほど値が低下した曲線が得られるため、値が小さいほど焦点位置に近いことを示す。取得した画像から有効な焦点深度の範囲を設定し、そのときの焦点深度範囲の判定上限値を示す線 33 として使用することで、焦点深度の範囲であるかの判定を行うことができる。これらは、プログラムソフトに焦点判断手段として組み込み、点検用チップの画像の取得と連動して実行されるようにするものとした。

【0208】

画像を全て取得した後、演算手段によりドット欠けの除去、発光点の抽出、照合が行われ、発光点ごとに輝度値および面積を求めたデータを作成した。

10

【0209】

図7はE.coliと水道水中の微粒子の最大輝度値と面積のグラフおよび面積輝度判断手段による分類方法を示す。得られた輝度値を横軸に、面積を縦軸にとり、プロットした。E.coliを示すプロット34は傾き0.05の一次相関を示したが、水道水中の微粒子を示すプロット35は傾き0.65の相関であり、大きく異なった。これに対し、面積輝度上限値を示す一次直線36と、面積輝度下限値を示す一次直線37を設け、この範囲内に入るものを微生物と判定することとしたが、このとき、面積輝度上限値の切片は5、傾き0.04とし、面積輝度下限値の切片は-2、傾き0.04に設定した。

【0210】

図8の(a)はE.coliと水道水中にみられる発光点について、生死菌染色試薬であるSYTO24の蛍光波長である青励起による緑蛍光の輝度と、死菌染色試薬であるSYTOX Orangeの蛍光波長である緑色励起による赤蛍光の輝度を2軸におき、ドットプロットを作成したものである。

20

【0211】

このとき、任意に設定できる境界線として、cが $y = 100$ 、dが $x = y$ のような直線を設定し、cより小さく、かつdより小さい領域を生菌群、それ以外の領域を死菌群として指定し、該当する領域の発光点に対してフラグを立て、発光点の分類を行った。

【0212】

次に、生菌群として分類された発光点データの集団を、XYZ表色系における色度データのうち、xとyの値をグラフ上にプロットした(図8の(b))。このとき、E.coli生菌が $x < 0.37$ 、 $y > 0.54$ の領域に分布していたのに対し、水道水中の発光物はxが0.3から0.6、yが0.3から0.6と幅広い領域に分布していることが確認された。このとき、閾値は、E.coliの値を参考に設定し、xは $e = 0.37$ 、yは $f = 0.54$ として、 $x < e$ 、 $y > f$ の領域に分類された集団を微生物として判別し、水道水中に含まれる夾雑物と区別した。その結果、検出された発光点のうち夾雑物に由来する発光点の大半を分離することができ、水道水では図8の(a)のとおり生死判断手段によって100個の発光点から生菌群として32個の発光点が抽出されたが、さらに図8の(b)によってそのうちの8個が微生物の生菌であると判別することができた。

30

【0213】

この閾値は一例であるが、染色に使用する蛍光色素の種類や、濃度、希釈する溶液の極性などによっても閾値は変わることから、使用が想定される環境に最も適した値をあらかじめ設定しておくことが好ましい。

40

【0214】

なお、最終菌数の妥当性については、培養困難である菌も存在する為、適切な培養方法、培地の種類を複数組み合わせ使用し、評価することが望ましい。

【0215】

(実施例2)

図9はE.coliについての、生死判断手段における生菌と死菌を判別するための閾値の設定方法の設定結果である(境界線として多角線を用いた例)。照合されて結合された発光点の輝度情報のうち、第1と第2の染色試薬の輝度をx軸とy軸にとり、データを

50

対応させたドットプロット表示手段 38 と、さらにこのドットプロット上において、カーソル 39 を操作して、プロットを分類するための閾値を設定するための多角線の始点 40、頂点 a 41、頂点 b 42、終点 43 を設定した。設定された多角線 44 は、プログラム上で演算され、閾値が求められた。判別を行い、計数した結果、生菌群 120 個、死菌群 80 個として簡便に測定することができた。

【0216】

(実施例 3)

図 10 は E. coli についての、生死判断手段における生菌と死菌を判別するための閾値の設定方法の設定結果である(境界線として多角形を用いた例)。表示したドットプロット表示手段 38 に対して、カーソル 39 を操作して、選択したい領域の多角形の始点 45 と、頂点 a 46 から頂点 b 47 と頂点 c 48 を経て頂点 d 49 を連続的に設定し、頂点の最後は、始点と一致させて多角形を設定した。設定された多角形 50 に対して、閾値が自動的に算出され、領域をチェックボックスで死菌として指定したところ、死菌数は 78 個として検出できた。

10

【0217】

(実施例 4)

図 11 は E. coli についての、生死判断手段における生菌と死菌を判別するための閾値の設定方法の設定結果である(境界線として楕円形を用いた例)。表示したドットプロット表示手段 38 に対して、カーソル 39 を操作して、選択したい領域の楕円形の中心 51 と、長軸 52 または短軸 53 と、長軸の長さ 54 と、長軸の角度 55 を設定した。楕円形 a 56 と楕円形 b 57 を、それぞれ死菌、損傷菌として設定したところ、死菌数が 72 個、損傷菌が 9 個であると検出された。

20

【0218】

この集団ごとに楕円の中心座標と長軸の長さや角度の数値を抽出することで、これらを微生物の集団の特性を示す特徴パラメータとして集団を定義できる。それぞれの値は、様々な菌種や、様々な活性状態のものを示すものであり、値を比較することによって、例えば同じ死菌であっても、損傷度合いや、微生物の損傷のしやすさなどを比較することが可能となる。図 11 の場合、楕円の長軸の傾きが大きく、死菌染色試薬で強く染色された楕円形 a 56 で囲まれた領域の方が、死菌の損傷度が高いものであると推定することができた。

30

【0219】

(実施例 5)

図 12 は E. coli についての、生死判断手段における生菌と死菌を判別するための閾値の設定方法の設定結果(領域指定による分類方法の例)である。図 12 (a) は E. coli の 2 蛍光の輝度ドットプロット表示手段 38 において A、F、K、P を指定した場合の選択される領域を示す図であり、図 12 (b) はドットプロット表示手段 38 の領域と番号を示す図である。表示したドットプロット表示手段 38 に対して、あらかじめ縦横を N = 5、M = 5、合計 25 領域に分割し、輝度がそれぞれ 50 ずつになるようあらかじめ各領域に番地を設け、それぞれに番号(A ~ Y)を定めた。次に、プロット結果から、死菌領域を A、F、K、P として設定して、領域内の死菌数を算出したところ、97 個が検出された。

40

【産業上の利用可能性】

【0220】

本発明は、細胞および微生物を含んだ検体から蛍光染色を用いて微生物の生菌および死菌を検出して計数するための装置であって、従来から知られている装置と比較してより正確性を持たせた計数を行うことができる微生物計数装置、点検用チップを提供することができ、医療用、食品工場用、家庭用、業務用、産業用などの微生物計数、微生物計数による環境管理などの用途にも適用できる。

【図面の簡単な説明】

【0221】

50

【図 1】本発明の実施の形態 1 の微生物計数装置を示す概念図

【図 2】同、演算手段による演算工程フローを示す図

【図 3】同、色度の演算を示す図（（a）E．coli の輝度と色度の演算結果を示す図、（b）色度の演算工程フローを示す図）

【図 4】同、色度の表示手段を示す図

【図 5】本発明の実施の形態 1 の点検用チップの上面図および断面図およびメンブレンフィルタ表面の拡大図を示す図

【図 6】本発明の実施例 1 の点検用チップの高さと取得した画像のオブジェクト面積を最大輝度値で除した値のグラフおよび焦点深度範囲の判定方法を示す図

【図 7】本発明の実施例 1 の E．coli と水道水中の微粒子の最大輝度値と面積のグラフおよび面積輝度判断手段による分類方法を示す図

【図 8】本発明の実施例 1 の分類及び判断方を示す図（（a）本発明の実施例 1 の E．coli と水道水中の発光物の輝度のドットプロット及び生死判断手段による分類方法を示す図、（b）同、生菌群の色度図と微生物判断手段による判断方法を示す図）

【図 9】本発明の実施例 2 の生死判断手段におけるドットプロット表示手段と多角線による境界線作成手段を示す図

【図 10】本発明の実施例 3 の生死判断手段におけるドットプロット表示手段と多角形による境界線作成手段を示す図

【図 11】本発明の実施例 4 の生死判断手段におけるドットプロット表示手段と楕円形による境界線作成手段を示す図

【図 12】本発明の実施例 5 の生死判断手段におけるドットプロット表示手段と領域指定による分類方法を示す図（（a）同 E．coli の 2 蛍光の輝度ドットプロット表示手段において A、F、K、P を指定した場合の選択される領域を示す図、（b）同ドットプロット表示手段の領域と番号を示す図）

【符号の説明】

【0222】

- 1 微生物計数装置
- 2 励起光源
- 3 励起フィルタ
- 4 集光レンズ
- 5 ハイパスフィルタ
- 6 受光フィルタ
- 7 レンズユニット
- 8 受像素子
- 9 検査台
- 10 メンブレンフィルタ
- 11 CCDユニット
- 12 演算手段
- 13 輝点除去手段
- 14 発光点抽出手段
- 15 座標補正手段
- 16 発光点照合手段
- 17 出力手段
- 18 蛍光評価手段
- 19 有効エリア算出手段
- 20 色度算出手段
- 21 生死判断手段
- 22 微生物判断手段
- 23 面積輝度判断手段
- 24 メインウィンドウ

10

20

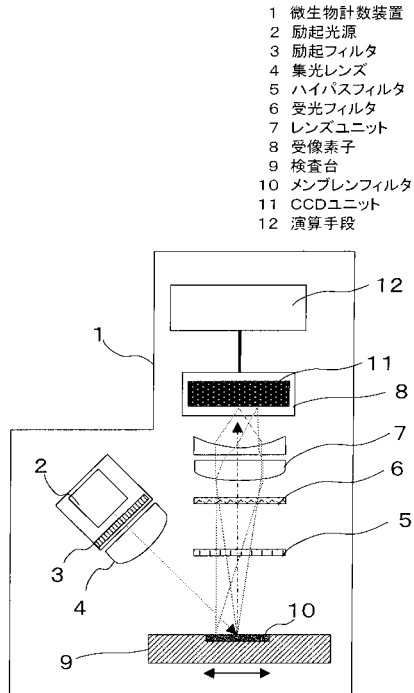
30

40

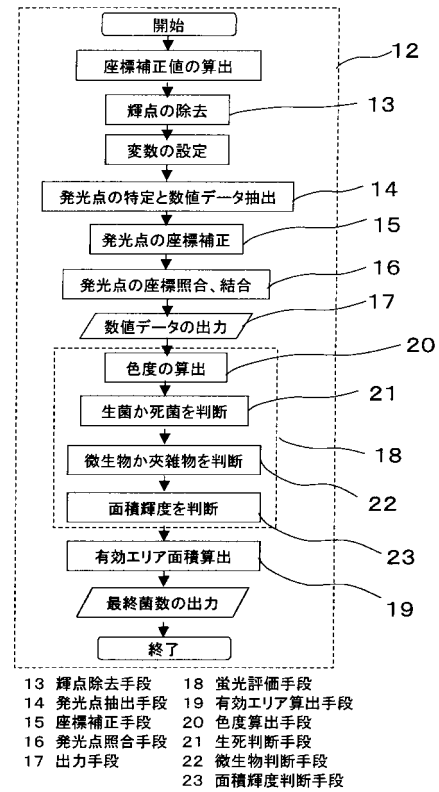
50

2 5	表示ウィンドウ	
2 6	色彩表示オブジェクト	
2 7	背景	
2 8	点検用チップ	
2 9	メンブレンフィルタ	
3 0	メンブレンフィルタ押さえリング	
3 1	点検用チップ外枠	
3 2	蛍光粒子	
3 3	焦点深度範囲の判定上限値を示す線	
3 4	E . c o l i を示すプロット	10
3 5	水道水中の微粒子を示すプロット	
3 6	面積輝度上限値を示す一次直線	
3 7	面積輝度下限値を示す一次直線	
3 8	ドットプロット表示手段	
3 9	カーソル	
4 0	始点	
4 1	頂点 a	
4 2	頂点 b	
4 3	終点	
4 4	多角線	20
4 5	始点	
4 6	頂点 a	
4 7	頂点 b	
4 8	頂点 c	
4 9	頂点 d	
5 0	多角形	
5 1	中心	
5 2	長軸	
5 3	短軸	
5 4	長軸の長さ	30
5 5	長軸の角度	
5 6	楕円形 a	
5 7	楕円形 b	

【図 1】



【図 2】

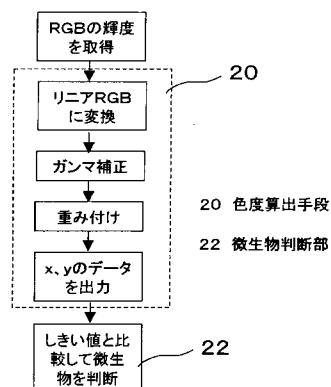


【図 3】

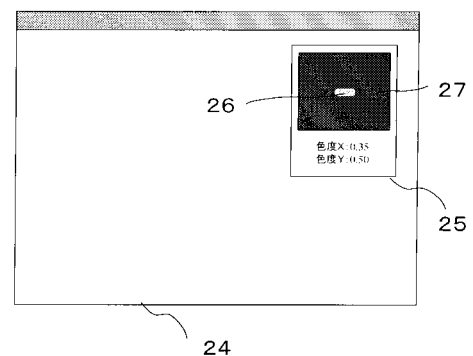
(a)

発光物No.	B輝度	G輝度	R輝度	x	y
1	1	151	64	0.354	0.517
2	1	151	64	0.354	0.517
3	1	79	19	0.322	0.505
4	1	194	80	0.356	0.524
5	1	68	3	0.292	0.510
6	1	82	18	0.320	0.508
7	1	87	23	0.327	0.508
8	1	90	32	0.339	0.504
9	1	81	11	0.309	0.514
10	1	117	32	0.333	0.520

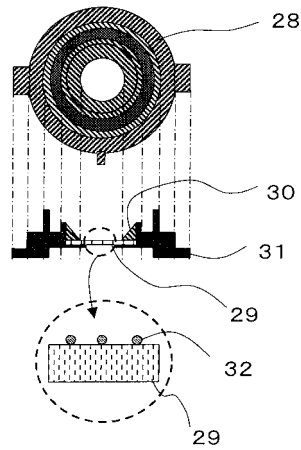
(b)



【図 4】

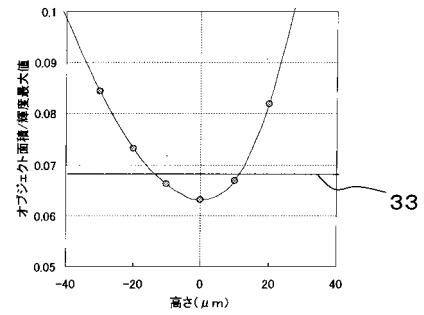


【図 5】



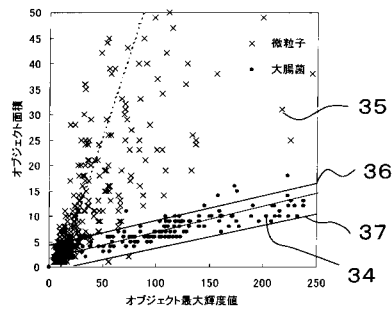
- 28 点検用チップ
29 メンブレンフィルタ
30 メンブレンフィルタ押さえリング
31 点検用チップ外枠
32 蛍光粒子

【図 6】



33 焦点深度範囲の判定上限値を示す線

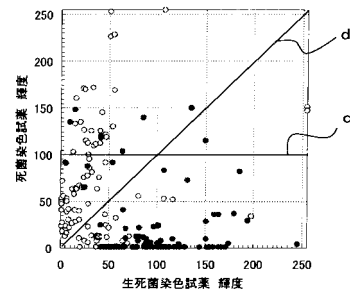
【図 7】



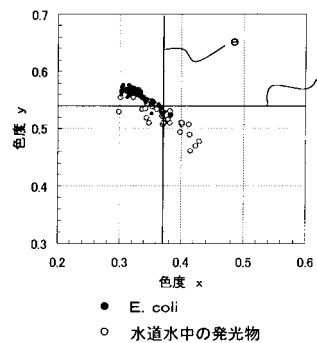
- 34 E. coliを示すプロット
35 水道水中の微粒子を示すプロット
36 面積輝度上限値を示す一次直線
37 面積輝度下限値を示す一次直線

【図 8】

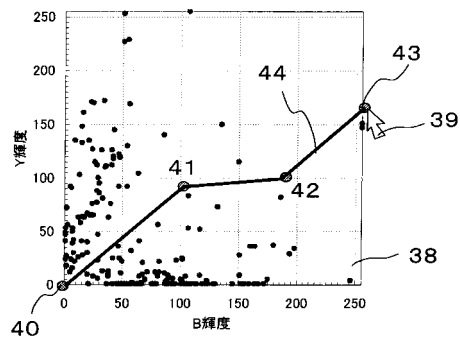
(a)



(b)

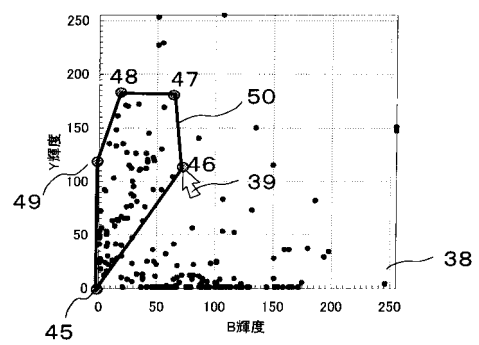


【図 9】



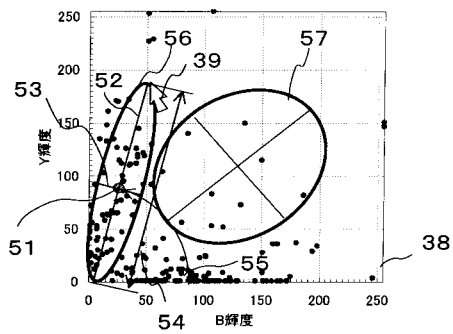
- 38 ドットプロット表示手段
- 39 カーソル
- 40 始点
- 41 頂点a
- 42 頂点b
- 43 終点
- 44 多角線

【図 10】



- 38 ドットプロット表示手段
- 39 カーソル
- 45 始点
- 46 頂点a
- 47 頂点b
- 48 頂点c
- 49 頂点d
- 50 多角形

【図 11】

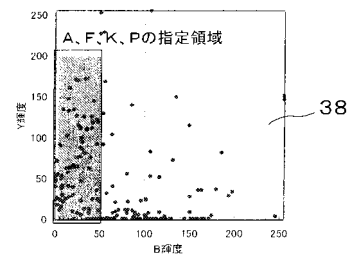


- 38 ドットプロット表示手段
- 39 カーソル
- 51 中心
- 52 長軸
- 53 短軸
- 54 長軸の長さ
- 55 長軸の角度
- 56 楕円形a
- 57 楕円形b

【図 12】

(a)

38 ドットプロット表示手段



(b)

U	V	W	X	Y
P	Q	R	S	T
K	L	M	N	O
F	G	H	I	J
A	B	C	D	E

フロントページの続き

(72)発明者 田代 義和

愛知県春日井市鷹来町字下仲田 4 0 1 7 番 松下エコシステムズ株式会社内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB01 CC10 CC11 FA01 FA10 FA11 GB06