

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5673623号  
(P5673623)

(45) 発行日 平成27年2月18日 (2015. 2. 18)

(24) 登録日 平成27年1月9日 (2015. 1. 9)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006. 01)  
 GO 1 N 33/569 (2006. 01)  
 GO 1 N 5/02 (2006. 01)  
 C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 9 3  
 GO 1 N 33/569  
 GO 1 N 5/02 A  
 C 1 2 Q 1/02

請求項の数 10 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2012-162831 (P2012-162831)  
 (22) 出願日 平成24年7月23日 (2012. 7. 23)  
 (62) 分割の表示 特願2010-167194 (P2010-167194)  
 の分割  
 原出願日 平成22年7月26日 (2010. 7. 26)  
 (65) 公開番号 特開2012-211924 (P2012-211924A)  
 (43) 公開日 平成24年11月1日 (2012. 11. 1)  
 審査請求日 平成24年7月23日 (2012. 7. 23)  
 (31) 優先権主張番号 特願2010-53586 (P2010-53586)  
 (32) 優先日 平成22年3月10日 (2010. 3. 10)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000232483  
 日本電波工業株式会社  
 東京都渋谷区笹塚一丁目50番1号 笹塚  
 NAビル  
 (74) 代理人 100091513  
 弁理士 井上 俊夫  
 (74) 代理人 100162008  
 弁理士 瀧澤 宣明  
 (72) 発明者 小山 光明  
 埼玉県狭山市大字上広瀬1275番地の2  
 日本電波工業株式会社 狭山事業所内  
 (72) 発明者 若松 俊一  
 埼玉県狭山市大字上広瀬1275番地の2  
 日本電波工業株式会社 狭山事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の検出方法及び微生物検出装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

両面に電極が形成された圧電振動子を用い、その圧電振動子の一面側の電極に形成した抗体層に、抗原抗体反応により前記抗体層に吸着する抗原を有する検出対象である微生物が混入している可能性がある試料液を供給する工程と、

次いで、前記抗体層に液体培地を供給して、前記試料液を液体培地で置換する工程と、

その後、液体培地の供給を停止した静置状態下にて、検出対象である微生物が増殖可能な温度に前記液体培地の温度を保って、前記圧電振動子を発振回路により発振させ、圧電振動子の発振周波数を測定する工程と、を含み、

前記抗体層に吸着された微生物が液体培地内で増殖し、当該増殖した微生物が前記抗体層に吸着することによる質量増加に伴う前記発振周波数の経時的な低下の有無またはその低下度合いに基づいて生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方を求めることを特徴とする微生物の検出方法。

【請求項 2】

前記圧電振動子は、両面に電極を形成して構成された微生物検出用の第1の振動領域と、弾性的な境界層を介して前記第1の振動領域とは異なる領域に設けられ、前記圧電振動子の両面に電極を形成して構成された参照用の第2の振動領域とを備え、前記抗体層は前記第1の振動領域の一面側の電極に形成され、前記第2の振動領域のいずれの電極にも抗体層が形成されていないことを特徴とする請求項1記載の微生物の検出方法。

【請求項 3】

10

20

前記生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方は、前記第2の振動領域の発振周波数が低下し始める前に測定された発振周波数に基づいて求めることを特徴とする請求項2に記載の微生物の検出方法。

【請求項4】

前記発振回路は、発振周波数の測定値を表示する表示部に接続され、前記発振周波数の測定値を時系列データとして前記表示部に表示する工程を含むことを特徴とする請求項1ないし3のいずれか一項に記載の微生物の検出方法。

【請求項5】

前記発振周波数を測定する工程は、温度調節部を備えた恒温の培養容器内に圧電振動子を入れた状態で行われることを特徴とする請求項1ないし4のいずれか一項に記載の微生物の検出方法。

【請求項6】

前記微生物は菌体であることを特徴とする請求項1ないし5のいずれか一項に記載の微生物の検出方法。

【請求項7】

両面に電極が形成された圧電振動子を用い、その圧電振動子の一面側の電極に形成した抗体層に検出対象である微生物を吸着させ、当該圧電振動子から得られた発振周波数の経時変化に基づいて生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方を求めることにより検出対象物を検出する検出装置であって、

試料液が供給される培養空間を備え、この培養空間に前記抗体層が形成された面を向けて圧電振動子を保持するための培養容器と、

この培養容器に、抗原抗体反応により前記抗体層に吸着する抗原を有する検出対象である微生物が混入している可能性がある試料液を供給する試料液供給部と、

前記培養容器に液体培地を供給する培地供給部と、

前記圧電振動子を発振させるための発振回路と、

前記培養空間内を恒温に保つための温度調節部と、

前記試料液供給部と培地供給部との間で、前記培養容器の接続先を切り替える供給液切替部と、を備え、

前記供給液切替部により、前記培養容器の接続先を試料液供給部として、当該培養容器に試料液を供給するステップと、次いで、この培養容器の接続先を培地供給部に切り替え液体培地を供給して前記試料液を液体培地で置換するステップと、その後、液体培地の供給を停止した静置状態下にて、前記温度調節部により、検出対象である微生物が増殖可能な温度に培養容器内の温度を保って、前記発振周波数の経時的な低下の有無またはその低下度合いを測定するステップと、を実行し、

前記抗体層に吸着された微生物が液体培地内で増殖し、当該増殖した微生物が前記抗体層に吸着することによる質量増加に伴う前記発振周波数の経時的な低下の有無またはその低下度合いに基づいて生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方を求めることを特徴とする検出装置。

【請求項8】

圧電振動子は、両面に電極を形成して構成されると共に、その一面側の電極に前記抗体層が形成された微生物検出用の第1の振動領域と、弾性的な境界層を介して前記第1の振動領域とは異なる領域に設けられ、前記圧電振動子の両面に電極を形成して構成されると共に、これら両面の電極のいずれにも抗体層が形成されていない参照用の第2の振動領域とを備え、

前記第1の振動領域を発振させる第1の発振回路と、前記第2の振動領域を発振させる第2の発振回路と、を備えたことを特徴とする請求項7記載の検出装置。

【請求項9】

前記生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方は、前記第2の振動領域の発振周波数が低下し始める前に測定された発振周波数に基づいて求めることを特徴とする請求項8に記載の検出装置。

## 【請求項 10】

前記微生物は菌体であることを特徴とする請求項 7 ないし 9 のいずれか一項に記載の検出装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、例えば菌体などの微生物の存在の有無や微生物の増殖速度を圧電振動子により検出する方法及び微生物検出装置に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

昨今、食の安全に対する意識が高まりをみせており、食品や飲料等を変敗させる変敗菌の早期発見は重要な課題となっている。

従来、食品や飲料等に変敗菌が含まれているか否かの判断をする手段として、Immuno Assay (免疫計測法)、ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay: 酵素結合免疫吸着法)、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC/MS: Gas Chromatograph/Mass Spectrometry)、液クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS: Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry) 等の計測法が用いられてきたが、測定の前処理が煩雑であり判定の精度も十分であるとは言えない。そのため、長い時間を掛けて変敗菌を培養する方法が一般的である。

## 【0003】

この培養方法は、試料液中に存在する可能性のある変敗菌を培養温度 30 から 60 の下で例えば 2 日から 4 日かけて培養した上で、コロニーの目視検査を行う方法である。しかし、この方法では食物や飲料等の短期間での判定が必要な試験対象に対しては適用することが難しく、製造してから短期間で出荷できないという課題がある。

特許文献 1 には、生物試料を識別するための方法であって、センサーアレイに結合した成分がその表面上の質量の増加を測定することによって直接決定されること、表面の質量増加の検出法が水晶発振子天秤であること、生物試料が真菌、ウイルス、細菌であることが記載されているが、本発明を記載しているものではない。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0004】

【特許文献 1】特表 2000-513436 (請求項 1、7 及び 15)

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明はかかる事情においてなされたものであって、その目的は、より短期間で試料液中の微生物の有無や微生物の増殖速度を簡便に、速やかに検出することのできる方法を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明は、両面に電極が形成された圧電振動子を用い、その圧電振動子の一面側の電極に形成した抗体層に、抗原抗体反応により前記抗体層に吸着する抗原を有する検出対象である微生物が混入している可能性がある試料液を供給する工程と、

次いで、前記抗体層に液体培地を供給して、前記試料液を液体培地で置換する工程と、その後、液体培地の供給を停止した静置状態下にて、検出対象である微生物が増殖可能な温度に前記液体培地の温度を保って、前記圧電振動子を発振回路により発振させ、圧電振動子の発振周波数を測定する工程と、を含み、

前記抗体層に吸着された微生物が液体培地内で増殖し、当該増殖した微生物が前記抗体層に吸着することによる質量増加に伴う前記発振周波数の経時的な低下の有無またはその

10

20

30

40

50

低下度合いに基づいて生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方を求めることを特徴とする微生物の検出方法である。

【 0 0 0 8 】

また、前記検出方法の具体例を挙げておく。

( a ) 前記圧電振動子は、両面に電極を形成して構成された微生物検出用の第 1 の振動領域と、弾性的な境界層を介して前記第 1 の振動領域とは異なる領域に設けられ、前記圧電振動子の両面に電極を形成して構成された参照用の第 2 の振動領域とを備え、前記抗体層は前記第 1 の振動領域の一面側の電極に形成され、前記第 2 の振動領域のいずれの電極にも抗体層が形成されていない。またこのとき、前記生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方は、前記第 2 の振動領域の発振周波数が低下し始める前に測定された発振周波数に基づいて求めること。

10

( b ) 前記発振回路は、発振周波数の測定値を表示する表示部に接続され、前記発振周波数の測定値を時系列データとして前記表示部に表示する工程を含む。

( c ) 前記発振周波数を測定する工程は、温度調節部を備えた恒温の培養容器内に圧電振動子を入れた状態で行われることを特徴とする場合。

( d ) 微生物は菌体である。

【 0 0 0 9 】

さらに他の発明は、両面に電極が形成された圧電振動子を用い、その圧電振動子の一面側の電極に形成した抗体層に検出対象である微生物を吸着させ、当該圧電振動子から得られた発振周波数の経時変化に基づいて生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方を求めることにより検出対象物を検出する検出装置であって、

20

試料液が供給される培養空間を備え、この培養空間に前記抗体層が形成された面を向けて圧電振動子を保持するための培養容器と、

この培養容器に、抗原抗体反応により前記抗体層に吸着する抗原を有する検出対象である微生物が混入している可能性がある試料液を供給する試料液供給部と、

前記培養容器に液体培地を供給する培地供給部と、

前記圧電振動子を発振させるための発振回路と、

前記培養空間内を恒温に保つための温度調節部と、

前記試料液供給部と培地供給部との間で、前記培養容器の接続先を切り替える供給液切替部と、を備え、

30

前記供給液切替部により、前記培養容器の接続先を試料液供給部として、当該培養容器に試料液を供給するステップと、次いで、この培養容器の接続先を培地供給部に切り替え液体培地を供給して前記試料液を液体培地で置換するステップと、その後、液体培地の供給を停止した静置状態下にて、前記温度調節部により、検出対象である微生物が増殖可能な温度に培養容器内の温度を保って、前記発振周波数の経時的な低下の有無またはその低下度合いを測定するステップと、を実行し、

前記抗体層に吸着された微生物が液体培地内で増殖し、当該増殖した微生物が前記抗体層に吸着することによる質量増加に伴う前記発振周波数の経時的な低下の有無またはその低下度合いに基づいて生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方を求めることを特徴とする検出装置である。

40

【 0 0 1 0 】

前記検出装置の具体例を挙げておく。

( e ) 圧電振動子は、両面に電極を形成して構成されると共に、その一面側の電極に前記抗体層が形成された微生物検出用の第 1 の振動領域と、弾性的な境界層を介して前記第 1 の振動領域とは異なる領域に設けられ、前記圧電振動子の両面に電極を形成して構成されると共に、これら両面の電極のいずれにも抗体層が形成されていない参照用の第 2 の振動領域とを備え、前記第 1 の振動領域を発振させる第 1 の発振回路と、前記第 2 の振動領域を発振させる第 2 の発振回路と、を備える。またこのとき、前記生きている微生物の有無及び微生物の増殖速度の少なくとも一方は、前記第 2 の振動領域の発振周波数が低下し始める前に測定された発振周波数に基づいて求めること。

50

( f ) 前記微生物は菌体である。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明は、圧電振動子の電極上に形成した抗体層に微生物を吸着させ、この抗体層に液体培地を供給して微生物を培養し、菌体の増殖を共振周波数の変化として検出するようにしている。この結果、簡便に速やかに微生物の有無や増殖速度を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

10

【図 1】本発明の実施の形態に係る、培養装置の一部を示した外観斜視図である。

【図 2】前記培養装置の各部品の上側を示した分解斜視図である。

【図 3】前記培養装置を示す縦断面図である。

【図 4】本発明の実施の形態に係る、電極の上面に培地層を形成した水晶振動子を模式的に示した縦断面図である。

【図 5】試料液を添加した培地層において菌が培養されている状態の前記水晶振動子を模式的に示した縦断面図である。

【図 6】前記培養装置の全体の構成を模式的に示した図である。

【図 7】前記水晶振動子の周波数温度特性の一例を表した特性図である。

【図 8】前記培養装置による測定結果の一例を示した特性図である。

20

【図 9】第 2 の実施の形態に係る微生物検出装置の構成を示す説明図である。

【図 10】前記微生物検出装置の培養器内に配置される水晶振動子の構成を示す模式図である。

【図 11】前記微生物検出装置に用いられる水晶振動子及び配線基板を示す斜視図である。

【図 12】前記水晶振動子を備えた圧電センサーを示す斜視図である。

【図 13】前記微生物検出装置による測定結果の一例を示した特性図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本発明に係る菌体の検出方法の実施形態について、図面を用いて説明する。図 1 及び図 2 は夫々この実施形態で用いる培養装置の一部を示した外観斜視図及び分解斜視図である。7 は培養器（培養容器）であり、支持体 7 1 とカバー 8 1 とからなり、これらの間には、図 3 にも示すように封止部材 3 A、配線基板 3、水晶振動子 2、水晶押さえ部材 4 の各部品がこの順に下から重ね合わさることにより構成される。

30

【 0 0 1 4 】

圧電振動子である水晶振動子 2 は、図 2 に示すように圧電片である円形状の水晶片 2 1、励振電極 2 2 及び導出電極 2 4、2 5（図 4 では図示せず）より構成されている。水晶片 2 1 の表面側には箔状の励振電極 2 2 が当該水晶片 2 1 よりも小径の円形状に形成され、また、箔状の導出電極 2 4 の一端側が前記励振電極 2 2 に接続されて形成されている。この導出電極 2 4 は、水晶片 2 1 の端面に沿って屈曲され水晶片 2 1 の裏面側に回し込まれている。一方、水晶片 2 1 の裏面側にも励振電極 2 2 及び導出電極 2 5 が表面側と同様のレイアウトで接続されて形成されている。前記励振電極 2 2 及び導出電極 2 4、2 5 の等価厚みは例えば 0.2  $\mu\text{m}$  であり、電極材料としては例えば金あるいは銀などが用いられている。

40

【 0 0 1 5 】

図 4 に示すように水晶片 2 1 に設けられた表面側（試料液に接触する側）の励振電極 2 2 には、微生物例えば菌体である変敗菌の培養環境となる吸着層である培地層 10 が形成されている。この培地層 10 としては例えば滅菌寒天培地を用いることができる。この寒天培地の層厚は、例えば 0.1  $\mu\text{m}$  から 1  $\mu\text{m}$  とされる。層厚が 0.1  $\mu\text{m}$  以下では菌の増殖が困難であり、また層厚が 1  $\mu\text{m}$  を超えると、寒天は粘度が高いため水晶振動子が容

50

易に駆動しないためである。励振電極 22 上に培地層 10 を形成する手法は例えば次のようにして行われる。まず水晶ウエハの表裏両面において、多数の水晶片の形成位置に対応した位置に電極パターンを形成する。次いでこの水晶ウエハを回転自在なバキュームチャック（真空吸着機能を備えた回転スラージ）にウエハ中心と回転中心とを位置合わせした状態で水平に保持する。そして所定の寒天濃度に調整した培地を含む溶液をウエハの中心に供給すると共にスピンチャックを、当該スピンチャックの回転軸に連結されているモータにより回転させ、これにより溶液をウエハの表面に広げて薄い液膜を形成する。この液膜の厚さは回転数に応じて調整できることから、この回転数を調整することにより、層厚が  $0.1\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$  の培地層 10 をウエハ上に形成することができる。その後ウエハをダイシングにより分断して水晶振動子の個片が得られる。なお図面では励振電極上にのみ培地層 10 が形成されていることとして描いているが、このスピンコーティング法によれば水晶片の表面全体に培地層 10 が形成されることになる。この場合であっても、水晶片の表面全体の面積に対する電極の面積の割合が多くなるように構成することにより、培地の重量が水晶振動子の駆動に影響を与えることはない。この時点でのこの水晶振動子の発振周波数を微生物検出の際の基準とする。その際、寒天濃度が一定であれば粘性抵抗は一定であるとみなし、KANAZAWA-GORDON の式を用いる。

10

#### 【0016】

図 2 に戻って、配線基板 3 は例えばプリント基板により構成され、その表面には電極 31、電極 32 が間隔をおいて設けられている。前記電極 31、32 との間には、後述するように水晶振動子 2 の裏面側の励振電極 22 が臨む気密空間をなす凹部のための貫通孔 33 が形成されており、その口径は励振電極 22 が収まる大きさに形成されている。配線基板 3 の後端側には、接続端子部 34、35 が設けられており各々導電路を介して電極 31、32 に電氣的に接続されている。封止部材 3A は中央に凹部が形成された円形体からなり、貫通孔 33 の下面を塞いで水晶振動子 2 の裏面側雰囲気である気密空間を構成する役割を持っている。水晶振動子 2 の導出電極 24、25 は、導電性接着剤により電氣的に接続される。

20

#### 【0017】

水晶押さえ部材 4 は、弾性材料例えばシリコンゴムを用いて配線基板 3 に対応した形状に作られている。水晶押さえ部材 4 の下面には図 3 に示すように、水晶振動子 2 の励振電極の周囲部分を支持体 71 側に押さえつけるように構成されている。水晶押さえ部材 4 の役割は水晶振動子 2 を配線基板 3 に形成されている貫通孔 33 の外側領域に押し付けて、カバー 81 を支持体 71 に装着したときに水晶押さえ部材 4 が、水晶振動子 2 及び配線基板 3 を支持体 71 側に押し付ける。

30

#### 【0018】

カバー 81 は、図 3 に示すように下面に形成された凹部 82 と、支持体 71 側に設けられた突起 75 とが嵌合することで支持体 71 に対して位置決めされるとともに、ねじ 83 が支持体 71 側の孔 74 に螺嵌することにより固着される。また培養器 7 を構成するカバー 81 及び支持体 71 には温度調節部であるヒータ 60 が設けられ、このヒータ 60 により、培地層が置かれる雰囲気予め設定した温度雰囲気（恒温雰囲気）に設定している。

#### 【0019】

支持体 71 は配線基板 3 を収容し保持する凹部 72 が設けられており、この凹部 72 には係合突起 73 が垂直方向に伸びて配線基板 3 の係合孔 37a、37b 及び水晶押さえ部材 4 の係合孔 46a、46b に係合し、配線基板 3 と水晶押さえ部材 4 の位置を固定する。

40

#### 【0020】

続いて培養装置の回路部分及び信号処理部分について説明すると、図 6 中、50 は発振回路、51 は信号処理部、52 はパーソナルコンピュータであり、このパーソナルコンピュータ 52 の画面は表示部をなすものである。

発振回路 50 は、配線基板 3 に形成されている電極 34、35 に電氣的に接続され、例えば支持体 71 に設けられる。信号処理部 51 は、発振回路 50 からの周波数の信号をア

50

ナログ／デジタル変換（A／D変換）し、所定の信号処理を行って周波数信号の周波数を計測する。

【0021】

次に、このように構成された培養装置を用いて、試料液中に目的とする菌体が存在するか否かを検出する工程について説明する。この例では菌体の変敗菌であるとする、変敗菌が通過するフィルタを用意し、試料液をこのフィルタに通過させる。次いで通過した液を例えばスポイトで採取し、支持体71に装着された既述の水晶振動子2上の培地層10の表面に滴下し、薄く延ばす。その後カバー81を支持体71に装着し、ヒータ60により培養器7内の温度（水晶振動子2が置かれている雰囲気温度）が例えば40～60、この例では45に加熱される。

10

【0022】

そして前記雰囲気は気密に保たれ、培地層10上の試料液が蒸発して例えば当該雰囲気が飽和水蒸気雰囲気となる。一方パーソナルコンピュータ52には水晶振動子2の発振周波数の計測値が時系列で取り込まれ、その画面には当該時系列データが表示される。培養器7内は試料液の水分が蒸発して飽和となるまで水晶振動子2の電極上の試料液及び培地層10の合計質量が変化するが、飽和雰囲気が確立されると合計質量が安定する。そして図5に示すように培地層10に塗布された試料液中に変敗菌（検出対象物15）が存在すれば培地層の栄養分を取り込んで増殖するため、電極上の部分の質量が増殖開始時から増加し、発振周波数が小さくなっていく。このため発振周波数の時系列データを例えばパーソナルコンピュータ52の画面にグラフ化して表示するようにすれば、発振周波数の立ち上がり

20

を例えば目視で検出することにより変敗菌の存在が確認できる。また発振周波数の低下の度合いを求めることにより変敗菌の増殖速度が得られる。この場合発振周波数と水晶振動子2の電極22の上に搭載されている搭載物の質量との関係を予め求めておけば、例えば所定の時間間隔毎の増殖速度を求めることができる。また培養器7に前記雰囲気に各々連通する送気管（送気路）、排気管（排気路）を接続し（図示せず）、排気管を開放した状態で送気管から気体例えば乾燥空気を供給して水晶振動子2上の水分をある程度除去する。次いで培養器7内の設定温度において例えば飽和水蒸気雰囲気よりも僅かに水蒸気が少ない空気を送り込み、送気管及び排気管に設けた各バルブを閉じ、水晶振動子2上の水分が僅かに蒸発して前記雰囲気が飽和水蒸気になった後、発振周波数の計測を行うようにしてもよい。

30

【0023】

なお、培養温度の設定値については、菌体の生育温度の範囲内において水晶振動子の周波数の温度特性が最も安定となる温度とすることが好ましい。図7にはATカットの水晶振動子の周波数温度特性の一例を示す。この場合においては、生育温度範囲内において単位温度変化あたりの周波数変化量が最も小さい温度は、グラフの極値の時の温度である45であり、培養温度をこの温度に設定することが望ましい。試料液は、飲料水であればそのまま前記フィルタを通して作成できるが、食品中の変敗菌の有無を調べる場合には、公定法に基づく方法で変敗菌を培養するかまたは変敗菌を直接水に混ぜた後、前記フィルタを通すことにより試料液が作成される。

このような菌体の検出方法によれば、培地層10に試料液を滴下し、周波数が安定した後、例えば数十分後に発振周波数が低下し始めるので、短時間で菌体の有無を検出でき、従って食品や飲料水中に変敗菌が存在するか否かを速やかに検出することができる。また操作が簡単であり、測定精度も高い。

40

なお本発明において菌体とは、真菌及び細菌などを指す。

【0024】

上述の培養装置を用い、既述のようにして変敗菌を含む試料液を水晶振動子2の培地層10に付着させ、発振周波数が安定した後、当該周波数に対する周波数差分の経時変化を測定した。測定結果を図8に示す。水晶振動子としては直径8.7mmで9MHzのATカット水晶振動子（電極径5.0mm）を用い、周波数の計測は10MHz/秒で行った。検出対象物となる菌株として *Alicycobacillus acidoterre*

50

s t r i s の標準株 ( A T C C 4 9 0 2 5 ) を用い、これを層厚  $0.5 \mu\text{m}$  の水晶振動子上の寒天培地において摂氏  $45$  度で培養した。なおこの寒天には酵母エキス、グルコース、各種微量元素等を添加した。図 8 に示すように、培養開始からおよそ  $0.5$  時間後には周波数が  $1 \text{ Hz}$  低下しており、その後も固有周波数は低下し続けている。これは変敗菌の増殖による質量増加によるものであり、このことから変敗菌の増殖が確認できる。なお周波数の検出のための装置としては、出願人が販売している、極めて高精度に周波数を測定できる装置 (登録商標 N A P i C O S システム) を用いている。

#### 【 0 0 2 5 】

また、事前に重量と発振周波数の関係を表す検量線を求めておくことで、周波数差を質量増加量に変換できるため、各培養経過時点における質量変化の速度、すなわち各培養経過時点における検出対象物の増殖速度を数値化することができる。

10

#### 【 0 0 2 6 】

次に、抗体を利用して菌体などの微生物を検出する第 2 の実施の形態について説明する。本例に係る微生物の検出方法は、水晶振動子 2 a の励振電極 2 2 上に吸着層として抗体層を設け、この水晶振動子 2 a の載置雰囲気中に培地溶液 (液体培地) を供給して微生物の培養が行われる点が、励振電極 2 2 上に培地層 1 0 を形成して培養を行う第 1 の実施の形態に係る検出方法と異なっている。図 9 は第 2 の実施の形態に係る微生物の検出方法を利用した微生物検出装置 7 0 の構成を示している。図 9 において、第 1 の実施の形態と共通の構成要素には図 1 ~ 図 6 に付したものと同様の符号を付してある。

#### 【 0 0 2 7 】

20

図 9 に示した微生物検出装置 7 0 において、培養器 7 0 0 は、水晶振動子 2 a と配線基板 3 a とから構成される圧電センサーを水晶押さえ部材 4 及び封止部材 3 A を用いて培養器 7 0 0 内に保持する点において、図 2、図 3 に示した培養器 7 と共通している。一方で当該培養器 7 0 0 のカバー 8 1 には、当該培養器 7 0 0 内に試料液を供給するための供給ポート 7 0 4、及び培養器 7 0 0 内から試料液を排出するための排出ポート 7 0 5 が設けられており、外部から試料液や培地溶液を供給できる点が、培地層 1 0 に試料液を塗布して閉鎖雰囲気中に配置する第 1 の実施の形態に係る培養器 7 と異なっている。

#### 【 0 0 2 8 】

培養器 7 0 0 の供給ポート 7 0 4 は、試料液と培地溶液との混合を抑えつつ、各液を一時的に保持する不図示のサンプルループを備えると共に、培地溶液を保持したシリンジポンプなどからなる培地溶液供給部 7 0 1 と、試料液を保持した注射器などからなる試料液供給部 7 0 2 との間で供給ポート 7 0 4 の接続先を切り替える供給液切替部 7 0 3 と接続されている。一方、排出ポート 7 0 3 は、吸引ポンプ 7 0 7 を介して排液受槽 7 0 8 に接続されており、この吸引ポンプ 7 0 7 を利用して培養器 7 0 0 内への培地溶液や試料液の供給及び排出が行われる。

30

#### 【 0 0 2 9 】

また本例に係る培養器 7 0 0 は、水晶振動子 2 a に接続される発振回路 5 0 と共に例えば熱風式の恒温チャンバー 7 0 6 内に配置されることにより、水晶振動子 2 a の配置雰囲気の温度調節が行われる点がヒータ 6 0 を用いて温度調節を行う第 1 の実施の形態と異なる。

40

また水晶振動子 2 a 発振回路 5 0 に接続され、信号処理部 5 1 を介してパーソナルコンピュータ 5 2 に接続される点は図 6 に示した第 1 の実施の形態と同様である。

#### 【 0 0 3 0 】

ここで本実施の形態に係る水晶振動子 2 a は、図 1 0、図 1 1 ( a )、図 1 1 ( b ) に示すように水晶片 2 1 の表裏両面に設けられた励振電極 2 2 a、2 2 b が 2 組設けられており、各々第 1 の振動領域 2 0 a 及び第 2 の振動領域 2 0 b を形成している。そして第 1 の振動領域 2 0 a の表面側の励振電極 2 2 a の上面には、検出対象物 1 5 である菌体の表面に特異的に含まれる膜タンパク質などを抗原として、当該抗原と反応する抗体を担持させてなる抗体層 1 1 が形成されており、菌体を励振電極 2 2 a 表面に吸着させる微生物検出用の振動領域を構成している。一方で第 2 の振動領域 2 0 b の励振電極 2 2 b の表面に

50



は、前記抗原と反応しにくいタンパク質などからなるブロッキング層 1 2 が形成されており、菌体は当該励振電極 2 2 b の表面には吸着しにくい。このため第 2 の振動領域 2 0 b は、微生物の吸着に起因しない他の要因（例えば後述の環境変化）に起因する発振周波数の変化を検出するための参照用の振動領域を構成していることになる。

#### 【 0 0 3 1 】

励振電極 2 2 a への抗体の固定は、例えば他方側の励振電極 2 2 b が予めマスクされた水晶振動子 2 a の上面側に前記抗体を含む試薬を供給することなどにより露出している励振電極 2 2 a の表面に抗体層 1 1 を形成する。他方側の励振電極 2 2 b へのブロッキング層 1 2 の形成も同様に、抗体層 1 1 が形成される励振電極 2 2 a をマスクしてから当該他方側の励振電極 2 2 b をブロッキング層となるタンパク質を含む試薬と接触させることなどにより行われる。

10

#### 【 0 0 3 2 】

そして図 1 2 に示すように水晶振動子 2 a は、第 1 の振動領域 2 0 a 及び第 2 の振動領域 2 0 b から各々独立して発振周波数を取り出すことが可能な配線基板 3 a 上に配置されており、各領域 2 0 a、2 0 b が別々の発振回路 5 0 に接続されている。図 1 1、図 1 2 に示した例では、表面側の励振電極 2 2 a、2 2 b は共通の導出電極 2 4 及び配線基板 3 側の電極 3 2 を介して接続端子部 3 5 に引き出され、発振回路 5 0 側の接地ラインに接続されている。一方、裏面側の励振電極 2 2、2 2 b は別々の導出電極 2 5 及び配線基板 3 側の電極 3 1 を介して接続端子部 3 4 に引き出され、各々独立した発振回路 5 0 に接続されている。

20

#### 【 0 0 3 3 】

例えばウェルシュ菌などの芽胞細菌は、5 0 ~ 7 0 といった比較的高い温度条件下でも増殖することが可能であり、こうした温度条件下で保存される食品の変敗要因となる。このため芽胞細菌を検出対象物 1 5 とする場合には、食品の保存状態と同じ温度条件下で試料液と接触させた水晶振動子 2 a を保持し、抗体層 1 1 に吸着する菌体の存否や菌体の増殖の有無を測定する必要がある。一方で水晶振動子 2 a の発振周波数特性は周囲の温度変化や流体の粘度変化など（簡単のため以下、環境変化という）に応じて変化することが知られているところ、発振周波数の変化が抗体層 1 1 への菌体の吸着に起因するものなのか、恒温チャンバー 7 0 6 における温度制御の変動や周囲の流体の粘度変化に起因するものなのかを短時間の測定で峻別することは困難である。

30

#### 【 0 0 3 4 】

そこで本実施の形態に係る微生物検出装置 7 0 は、菌体が吸着する抗体層 1 1 を設けた第 1 の振動領域 2 0 a と、菌体が吸着しないブロッキング層 1 2 を設けた第 2 の振動領域 2 0 b と、を同じ環境下に配置している。これにより、第 1 の振動領域 2 0 a からは菌体の吸着、環境変化の双方に起因する発振周波数の変化が取得される一方、第 2 の振動領域 2 0 b からは菌体の吸着を除いて、周囲の環境変化のみに起因する発振周波数の変化を取得できる。そこで第 1、第 2 の振動領域 2 0 a、2 0 b から各々取得した発振周波数の差をとることにより、第 1 の振動領域 2 0 a の発振周波数から環境変化の影響が取り除かれ、菌体の吸着に起因する発振周波数の変化のみを取り出すことが可能となる。

40

#### 【 0 0 3 5 】

以下、上述の微生物検出装置 7 0 の作用について説明する。はじめに培養器 7 0 0 内に圧電センサーを装着し、培養器 7 0 0 及び発振回路 5 0 の周囲の温度が例えば試料液中に含まれる食品の保存温度となるように恒温チャンバー 7 0 6 の温度設定を行う。恒温チャンバー 7 0 6 の温度が安定したら、供給液切替部 7 0 3 を培地溶液供給部 7 0 1 側に接続してから吸引ポンプ 7 0 7 を作動させ、培養器 7 0 0 内およびこれに接続された配管内に、培地溶液を送液パッファとして満たす。そして発振回路 5 0 を作動させ、第 1、第 2 の振動領域 2 0 a、2 0 b からの発振周波数の取得を開始する。

#### 【 0 0 3 6 】

しかる後、供給液切替部 7 0 3 の接続先を試料液供給部 7 0 2 に切り替え、培養器 7 0 0 に向けて試料液を供給し、培養器 7 0 0 内が試料液にて置換されたタイミングでいった

50

ん吸引ポンプ 707 を停止する。このとき試料液中に、抗体層 11 の抗体と抗原抗体反応を示す芽胞細菌などの変敗菌が含まれている場合には、当該変敗菌が抗体層 11 へ吸着し、図 13 (a)、図 13 (b) の「変敗菌吸着」と記した期間に示すように第 1 の振動領域 20a の発振周波数が低下する。

【0037】

一方でブロッキング層 12 が設けられた第 2 の振動領域 20b 側では変敗菌の吸着は殆ど発生しないので、前記期間における発振周波数の変化は見られない。ここで簡単のため、図 13 (a)、図 13 (b) に示した各例では、培地溶液供給部 701 から供給される培地溶液及び試料液供給部 702 から供給される試料液は、恒温チャンバー 706 にて温度調整されている培養器 700 内の温度とほぼ同じ温度に予め調整されている。また培地溶液、試料液の粘度もほぼ揃っており、培地溶液-試料液の切り替えに起因する発振周波数の変化は発生しないものとする。

【0038】

こうして予め定めた時間が経過し、抗体層 11 に十分量の微生物が吸着可能な時間が経過したら、供給液切替部 703 の接続先を培地溶液供給部 701 に再度切り替えてから吸引ポンプ 707 を作動させ、培養器 700 内を培地溶液にて置換する。こうして培養器 700 内が培地溶液で満たされた状態となったら、再び吸引ポンプ 707 を停止して培養器 700 内を静置状態とする。ここで抗体層 10 に吸着した変敗菌が生きている場合には、培地溶液から栄養分を受け取って変敗菌が増殖する。このとき変敗菌の増殖は、当該変敗菌が吸着されている抗体層 11 の表面付近にて発生するので、培養器 700 内が静置状態となっている場合には、増殖した変敗菌は培地溶液内を拡散し、その一部は抗体層 11 に吸着する。

【0039】

この結果、図 13 (a) に「変敗菌が増殖」と記した期間に示すように、増殖した変敗菌の吸着に起因して、時間の経過と共に第 1 の振動領域 20a 側の発振周波数が低下する。一方でブロッキング層 12 が設けられた第 2 の振動領域 20b 側においては、依然として発振周波数の低下は殆ど見られない。そしてこれら図 13 (a) 中の「変敗菌吸着」及び「変敗菌が増殖」と記載した期間中に、温度変化や粘度変化など培養器 700 内の環境変化があった場合であった場合には、共通の温度、培地溶液雰囲気内に載置された第 1、第 2 の振動領域 20a、20b では、これらの環境変化に伴う発振周波数の変化がほぼ同程度の幅で発生する。

【0040】

このため、例えば第 1、第 2 の振動領域 20a、20b から得られた発振周波数の差分の絶対値をとることにより環境変化に伴う発振周波数の変化が相殺され、変敗菌の吸着のみに起因する発振周波数の変化を取り出すことができる。そして、第 1 の実施の形態と同様に、予め求めておいた変敗菌の重量と発振周波数の低下量との関係を示す検量線などを用いて変敗菌の吸着量が特定される。

また環境変化に起因する第 1、第 2 の振動領域 20a、20b の発振周波数の変化量が厳密には等量でない場合もあり得る。この場合には、予め求めておいた比例定数を各発振周波数に乘じ、温度や粘度などの単位変化あたりの発振周波数の変化量を互いに揃えてから両発振周波数の差分を取ることで、こうした環境変化に伴う発振周波数の変動を正しく相殺することができる。

【0041】

なお、変敗菌の増殖が指数関数的に進んでいくと、培地溶液内の変敗菌の濃度が高くなり、ブロッキング層 12 の上に変敗菌が沈着するなどすると共に、第 2 の振動領域 20b に沈着した変敗菌も増殖を開始する。この結果、図 13 (a) 中の「第 2 の振動領域 20b でも増殖」と記した期間に示すように、第 2 の振動領域 20b 側の発振周波数も低下し始める場合がある。しかし、既述のように第 2 の振動領域 20b 側の発振周波数は、当該領域 20b にて変敗菌の増殖が観察されるまでの期間中(図 13 (a) 中の「変敗菌吸着」及び「変敗菌が増殖」の期間に相当する)は殆ど変化しない。従って、これらの期間内

に得られたデータを利用すれば、変敗菌の有無及び増殖速度の計測を正しく行うことができる。

【 0 0 4 2 】

また試料液に含まれている変敗菌が死んでいる場合には、図 1 3 ( b ) に示すように「変敗菌吸着」と記した期間にて第 1 の振動領域 2 0 a の発振周波数が低下するが、当該変敗菌が増殖しないので、当該第 1 の振動領域 2 0 a の発振周波数はこれ以上変化しない。また変敗菌が殆ど吸着しないことに伴って、第 2 の振動領域 2 b の発振周波数も一定の値を保つこととなる。このような場合においても環境変化に起因する発振周波数の変化は、第 1、第 2 の振動領域 2 0 a、2 0 b から得られる発振周波数の差分の絶対値をとることなどにより相殺することができる。

10

【 0 0 4 3 】

第 2 の実施の形態に係る微生物検出装置 7 0 によれば、抗体層 1 1 を設けた水晶振動子 2 a を培養器 7 0 0 内に配置し、この培養器 7 0 0 に試料液を供給して抗体層 1 1 を設けた水晶振動子 2 の発振周波数の変化に基づいて検出対象物である微生物の有無や微生物の増殖速度を検出する。従来行われていた寒天培地上で増殖させた菌体などの微生物を光学顕微鏡などにより観察する手法では、微生物の有無や増殖速度を特定するためには例えば 3 日 ~ 1 週間程度の試験期間を要していた。これに対して水晶振動子 2 a などの圧電振動子を用いた微生物の検出法は感度が高く、例えばナノグラムといった非常に微量の質量変化を検出することが可能である。このため、光学的に観察可能になるまで微生物の増殖を待つ必要がなく、例えば 1 0 時間 ~ 2 日といった従来よりも非常に短い時間で検出対象物の有無や増殖速度を検出することが可能となる。

20

【 0 0 4 4 】

また感度の高い水晶振動子 2 a を用いる本法においては、水晶振動子 2 a の周囲の温度変化や水晶振動子 2 a と接する液体 ( 試料液や培地溶液 ) の温度変化や粘度変化などの環境変化が水晶振動子 2 a の発振周波数に与える影響が大きくなる。ここで第 2 の実施の形態に係る微生物検出装置 7 0 では、微生物を吸着させるための抗体層 1 1 が設けられた微生物検出用の第 1 の振動領域 2 0 a と、微生物を吸着させない参照用の第 2 の振動領域 2 0 b と、を備えた水晶振動子 2 a を用いているので、両振動領域 2 0 a、2 0 b から得られた発振周波数の差分を取ることで、環境変化の影響を相殺し、微生物の吸着に起因する発振周波数の変化を正しく把握することが可能となる。

30

【 0 0 4 5 】

ここで第 1 の実施の形態に示した培養装置と第 2 の実施の形態に示した微生物検出装置 7 0 の各構成は、必要に応じて適宜入れ替えることが可能である。例えば第 1 の実施の形態で用いたヒータ 6 0 を第 2 の実施の形態の微生物検出装置 7 0 に設けてもよいし、反対に第 1 の実施の形態の培養器 7 を恒温チャンバー 7 0 6 内に配置してもよい。また、いわゆるフローインジェクション方式の第 2 の実施の形態の微生物検出装置 7 0 を第 1 の実施の形態に係る培養器 7 のようにバッチ式として構成してもよい。この場合には、例えば供給ポート 7 0 4 や排出ポート 7 0 5 を設けていない培養器 7 0 0 内に抗体層 1 1 に、試料液を予め塗布した水晶振動子 2 a を配置し、その後、培養器 7 0 0 内に培地溶液を供給した後、カバー 8 1 で支持体 7 1 の蓋をして、当該培養器 7 0 0 内を予め設定された温度に調整することにより微生物の検出が行われる。この他、第 1 の実施の形態に係る培養装置にて微生物検出用の第 1 の振動領域 2 0 a と参照用の第 2 の振動領域 2 0 b とを備えた水晶振動子 2 a を用いた圧電センサー ( 以下、ツインセンサーという ) を用いてもよい。これとは反対に、環境変化の影響が問題とならないような場合には、第 2 の実施の形態に係る微生物検出装置 7 0 において、ツインセンサーに代えて参照用の振動領域 2 0 b を設けていない図 2 に記載の水晶振動子 2 を用いてもよい。

40

【 符号の説明 】

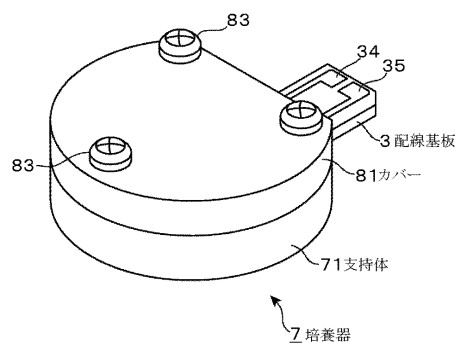
【 0 0 4 6 】

- 7            培養器
- 4            水晶押さえ部材

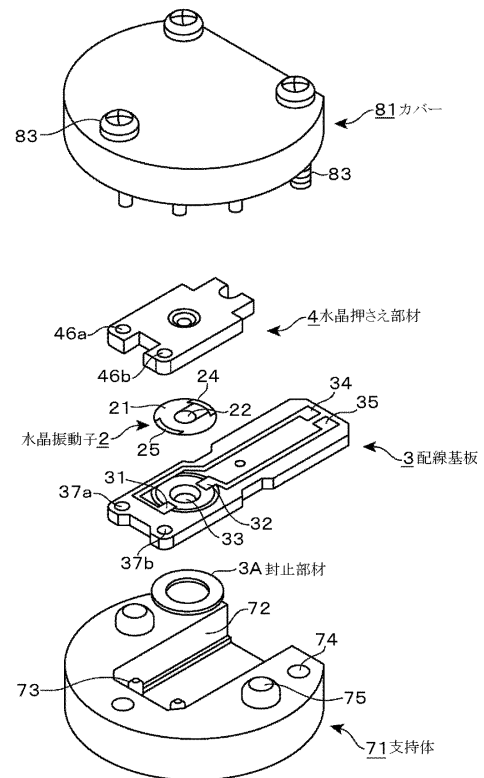
50

- 1 0 培地層
- 1 5 検出対象物（変敗菌）
- 2 水晶振動子
- 2 2 励振電極
- 5 0 発振回路
- 5 1 信号処理部
- 5 2 パーソナルコンピュータ
- 7 1 支持体
- 8 1 カバー

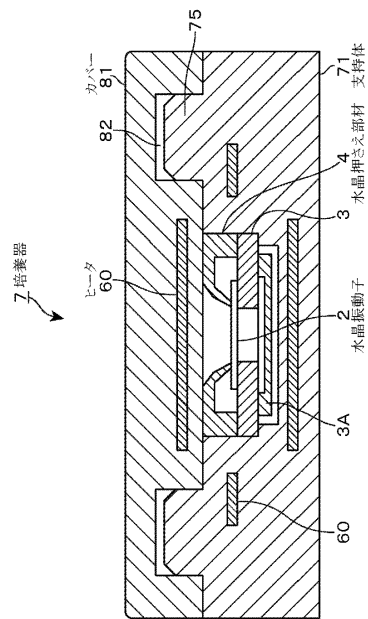
【図 1】



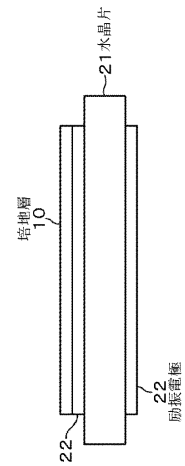
【図 2】



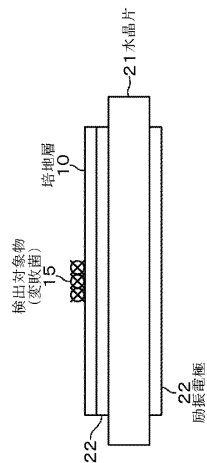
【 図 3 】



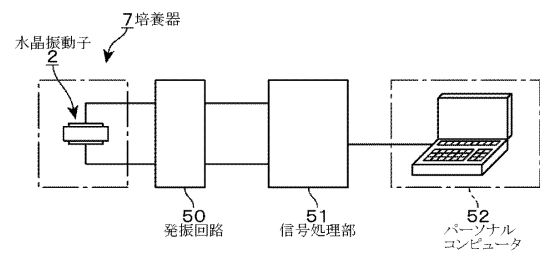
【 図 4 】



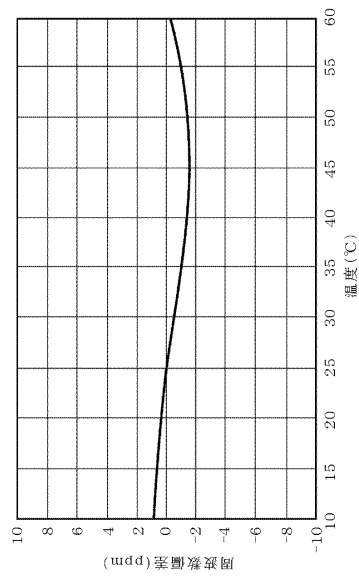
【 図 5 】



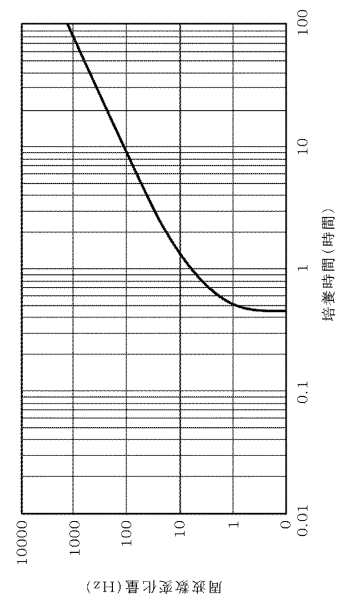
【 図 6 】



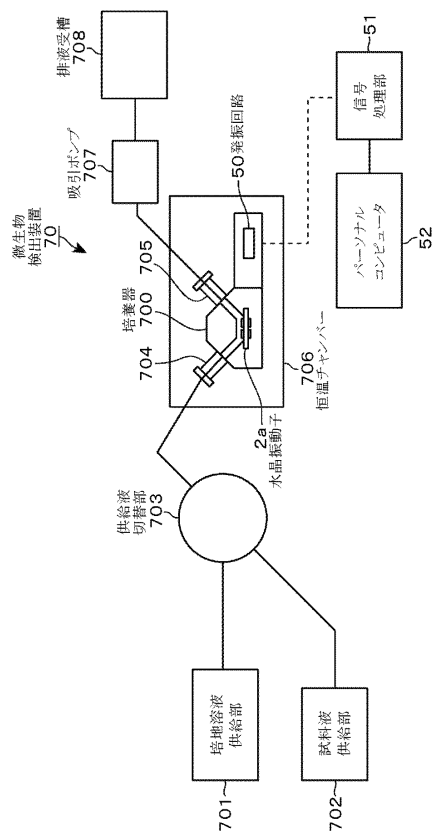
【図 7】



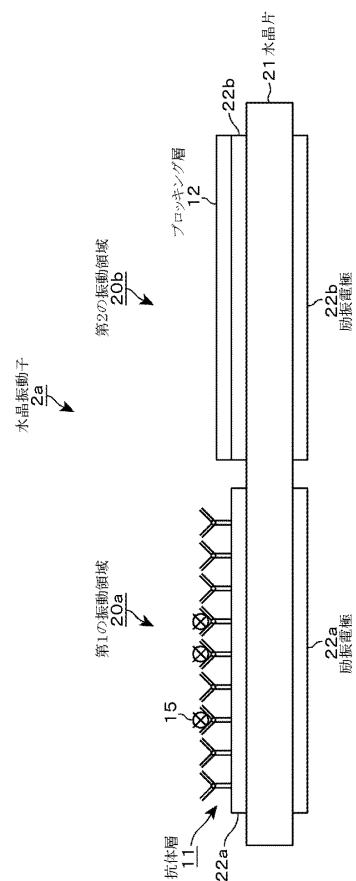
【図 8】



【図 9】

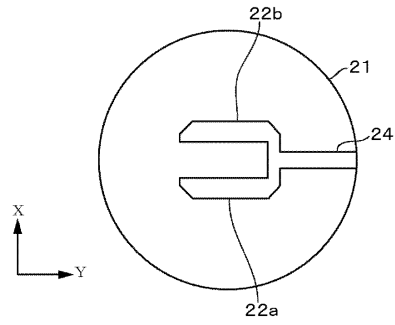


【図 10】

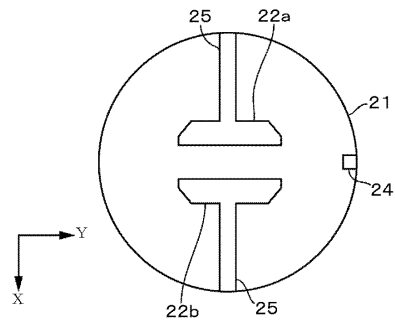


【図 1 1】

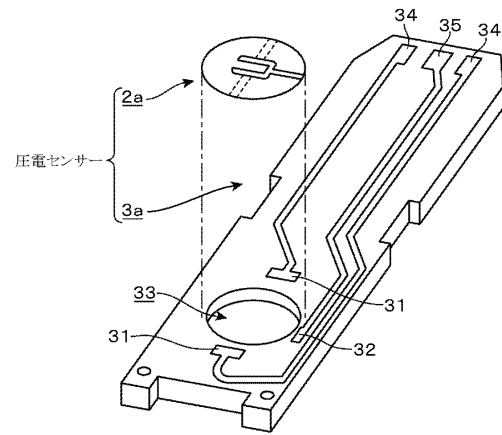
(a) 表面



(b) 裏面

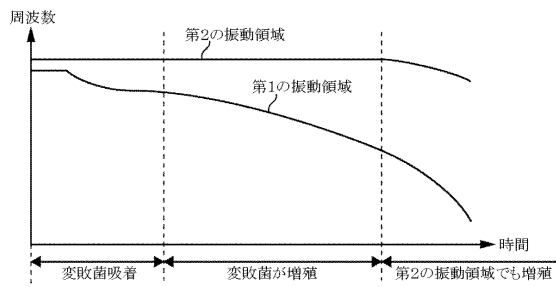


【図 1 2】

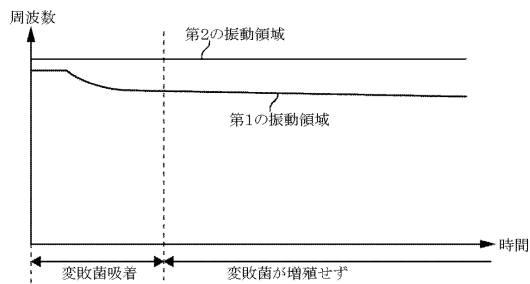


【図 1 3】

(a)



(b)



---

フロントページの続き

(72)発明者 忍 和歌子

埼玉県狭山市大字上広瀬 1 2 7 5 番地の 2 日本電波工業株式会社 狭山事業所内

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開 2 0 0 7 - 1 0 8 1 7 0 ( J P , A )

特開 2 0 0 1 - 1 8 8 0 6 8 ( J P , A )

特表 2 0 0 5 - 5 0 2 3 1 3 ( J P , A )

特開 2 0 0 5 - 1 6 4 4 9 5 ( J P , A )

特開 2 0 0 4 - 0 2 8 5 9 4 ( J P , A )

特開平 0 3 - 1 2 2 5 6 5 ( J P , A )

特開平 0 3 - 2 5 7 3 4 6 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

G 0 1 N 5 / 0 2

C 1 2 Q 1 / 0 2