

(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2017-169455

(P2017-169455A)

(43) 公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(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	Z N A	2 G O 4 3	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	2 G O 5 4	
G O 1 N	21/64	(2006.01)	G O 1 N	21/64	F	4 B O 6 3	
G O 1 N	21/78	(2006.01)	G O 1 N	21/78	C		

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2016-56271 (P2016-56271)  
 (22) 出願日 平成28年3月18日 (2016. 3. 18)

(出願人による申告) 平成25年~27年度、農林水産省、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業実用技術開発ステージ(重要施策対応型)「マルチ蛍光スペクトル分析FISHFCによる食品衛生細菌迅速一括検査システムの商品モデル開発」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 000173511  
 公益財団法人函館地域産業振興財団  
 北海道函館市桔梗町379番地  
 (71) 出願人 391026106  
 株式会社電制  
 北海道江別市工栄町8番地の13  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (72) 発明者 大坪 雅史  
 北海道函館市桔梗2丁目23番33号 公益財団法人函館地域産業振興財団内

最終頁に続く

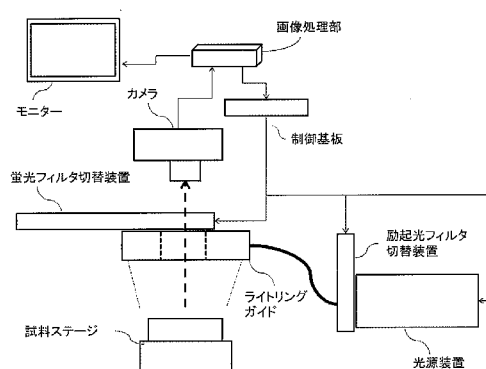
(54) 【発明の名称】 培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を用いた食品中の細菌からのシグナル検出方法

(57) 【要約】

【課題】 畜産物、水産物は、比較的蛍光ノイズが低い、農産物、取り分け緑黄色野菜は、色素をふくむため、蛍光ノイズの問題が大きい。そこで、より広汎な種類の食品においてノイズの発生しない新たな蛍光シグナル自動検出方法の開発を課題とした。

【解決手段】 培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を用いて、増殖された微生物を、低倍率光学系を用いて、メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段により検出することにより、ノイズの発生しない新たな蛍光シグナルを自動検出する微生物検査方法を提供する。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

特定微生物の検出可能限界値が少なくとも食品の試料 1 g 中10個相当 (10CFU/g) 以下となるように、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法により検査する、食品の微生物検査法であって、

前記培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法が、(1)食品の0.1g以上の試料を含む液体を、有効ろ過面積が直径24mmの円の面積と同等又はそれ以上の面積を有するメンブレンフィルターを用いてろ過し、(2)マイクロコロニーの大きさを20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ mとなるように培養することを含み、

前記検査が、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法により増殖された特定微生物を、低倍率光学系を用いて、メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段により検出することを特徴とする、前記食品の微生物検査方法。

10

**【請求項 2】**

前記特定の色を色相とし、明るさを明度とする請求項 1 に記載の食品の微生物検査方法。

**【請求項 3】**

前記低倍率光学系が光学倍率1倍乃至6倍である請求項 1 に記載の食品の微生物検査方法。

**【請求項 4】**

前記メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段が、第1の蛍光検出光学条件である励起波長460 - 500nm、蛍光波長515nm以上の条件で、蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質を第1の蛍光物質とし、食品試料に対し、前記第1の蛍光物質で標識した特定微生物(以下、対象細菌ともいう)検出用DNAプローブを用い培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションを行い前記第1の蛍光検出光学条件でカラー撮影し、撮影画像における第1の蛍光物質の蛍光固有の色と明るさの特徴に基づいて検出対象細菌からのシグナルと食品からのノイズとを弁別し、対象細菌を検出することを特徴とする請求項 1、2または3に記載の食品の微生物検査方法。

20

**【請求項 5】**

前記メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段が、第2の蛍光検出光学条件である励起波長520 - 560nm、蛍光波長570nm以上の条件で蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質を第2の蛍光物質とし、食品試料に対し、前記第2の蛍光物質で標識した対象細菌検出用DNAプローブを用い培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションを行い前記第2の蛍光検出光学条件でカラー撮影し、撮影画像における第2の蛍光物質の蛍光固有の色と明るさの特徴に基づいて検出対象細菌からのシグナルと食品からのノイズを弁別し、対象細菌を検出することを特徴とする請求項 1、2または3に記載の食品の微生物検査方法。

30

**【請求項 6】**

前記メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段が、第3の蛍光検出光学条件である励起波長590 - 650nm、蛍光波長660nm以上の条件で蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質を第3の蛍光物質とし、食品試料に対し、前記第3の蛍光物質で標識した対象細菌検出用DNAプローブを用い培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションを行い前記第3の蛍光検出光学条件でカラー撮影し、撮影画像における第3の蛍光物質の蛍光固有の色と明るさの特徴に基づいて検出対象細菌からのシグナルと食品からのノイズを弁別し、対象細菌を検出することを特徴とする請求項 1、2または3に記載の食品の微生物検査方法。

40

**【発明の詳細な説明】**

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、食品製造業や環境分析などの産業分野で、培養併用インサイチューハイブリダイゼーション法を用いて、対象微生物のマイクロコロニーの蛍光シグナルを、色、明るさ、大きさに基づきノイズと区別して検出する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

大腸菌、サルモネラ、リステリア、腸炎ピブリオなど特定微生物の検出あるいは計数する微生物検査は、食品や環境中の衛生評価のために必須である。一般に、これらの検査は、培養法により行われ、陽性確定に至るまで複数の項目（増菌培養、分離培養、推定試験、確認試験）の実施と、それに伴う1日～8日間の日数を要し、手間と時間とがかかった。

## 【0003】

本発明者らは、上述の産業分野における微生物検査に、メンブレンフィルターを用いる培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を開発した（特許文献1 特許第4785449号）。

## 【0004】

この方法は、食品0.1g当たりの測定ができることから混釈平板培養法と同等の検出可能限界値（10 CFU/g）をもち、食品中の生きた特定細菌の検出、計数が迅速（7時間～24時間以内）に可能である。また、メンブレンフィルター全域に渡って取得した蛍光画像を画像処理手段に入力して画像処理し、メンブレンフィルター上の検出対象微生物の個数を自動的に計数可能なように構成した。画像処理方法は、多くの生鮮食品の場合には、マイクロコロニーの蛍光像がノイズとなる介在物等の蛍光像よりも光量や発光面積の点で大きく勝り、簡単に弁別可能なため、安価な画像処理機器でもリアルタイムに実現可能な一般的な粒子計数プロセスで計数可能とした。例えば、TAMRAを腸内細菌科検出用DNAプローブに標識し、これを用いて培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を行ったとき、大腸菌を添加した食品（菌数：約 $10^3$  CFU/g）豚肉、いか、サバ、チキンカツ等の腸内細菌科を正確に計数した。

## 【0005】

また、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を簡易にする検査キットとして高さのある外枠付メンブレンフィルターを発明した（特許文献2 特許第4950433号）。

## 【0006】

なお、食品からの微生物標準試験法としては、腸内細菌科菌群集落計数法NIHSJ-16（非特許文献1）がある。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】特許第4785449号公報

【特許文献2】特許第4950433号公報

## 【非特許文献】

## 【0008】

【非特許文献1】腸内細菌科菌群集落計数法NIHSJ-16 食品からの微生物標準試験法（<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>）

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法は、食品製造業などの産業分野での畜産物と水産物の微生物検査への応用の道を拓いた。特許文献1の手法は、その実施例2に記載の通り、検出対象を腸内細菌科とし、供試細菌として大腸菌を最終濃度 $1.0 \times 10^2$ 以上CFU/gを添加した食品試料（キャベツ、レタス、ピールオレンジ、豆腐、豚肉、チ

10

20

30

40

50

キンカツ、いか等)において、腸内細菌科を正確に計数した。

#### 【0010】

ところで、種々の食品の中には、自家蛍光を発する成分があることが知られており、特に、農産物、取り分け緑黄色野菜は色素をふくむため、自家蛍光が計測に影響を与えることが懸念された。そこで、発明者等は、特許文献1の手法の広範な食品への適用可能性をさらに検討するため特許文献1記載の培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法について、食品の自家蛍光ノイズが蛍光シグナル自動計数に及ぼす影響を試験した。試料には表1の12種類の食品を用いた。また、試験には、簡易検査キットを試作し用いた。このキット構成は、直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレに、直径50mmの濾紙を5枚入れ、その上に、特許文献2記載の高さのある外枠付メンブレンフィルター(直径47mm、ポアサイズ0.8 $\mu$ m以下のディスク型メンブレンフィルターと外径47mm内径42mm高さ15mmのリング状アクリルを貼り合わせた)を、フィルター面を下にして、置き、これに直径60mm高さ10mmのプラスチックシャーレのフタを被せるものとする。

10

#### 【0011】

各々の食品試料25gをストマッカー用袋に入れ、さらに細菌検査希釈液(リン酸緩衝液)225mlを加え懸濁し試料10倍希釈液(試料0.1g/ml)を調製した。その1mlを簡易検査キットに添加した。希釈液がフィルター面から濾紙へろ過された後、その高さのある外枠付メンブレンフィルターをエタノールに20分浸して固定化し乾燥させた。次に、その高さのある外枠付メンブレンフィルターを直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレに置き、ハイブリダイゼーション緩衝液(20%ホルムアミド、0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4])1.5mlを添加し、46 20分置いた後、液を排水した。次いで、洗浄液(0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、180mM 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4])を添加し46 15分置いた後、排液した(洗浄)。蒸留水で高さのある外枠付メンブレンフィルターをすすいだ後乾燥した。これにより、食品試料0.1gを含み、かつ、細菌マイクロコロニー(大きさ20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ m)を含まない食品試料標本を調製した。各種食品試料標本のメンブレンフィルター全面について特許文献1記載の自動計数(光量や発光面積の点で、マイクロコロニーとノイズを弁別する手段)を行った。

20

#### 【0012】

蛍光検出光学条件は、第1の蛍光検出光学条件としては励起波長460 - 500 nm、蛍光波長515 nm以上、第2の蛍光検出光学条件としては励起波長520 - 560 nm、蛍光波長570nm以上、第3の蛍光検出光学条件は励起波長590 - 650nm、蛍光波長660nm以上とした。蛍光ラベルしたDNAプローブを用いない場合、前記条件下で計数される蛍光は、すべてノイズ(光量や発光面積がマイクロコロニーと同等である食品由来自家蛍光)となる。その結果、多くの食品は、ノイズを含むことが判明した。ノイズ数は、試料の種類、蛍光検出条件により異なるが、概して、第1の蛍光検出光学条件は、12種類全ての食品試料でノイズが甚だしかった。第2の蛍光検出条件では、キャベツ、ニンジン、豆腐とメンチカツでノイズが検出されたが、その他の食品から検出されなかった。第3の蛍光検出条件では、緑色農産物のレタスとインゲンから100個台/gのノイズが検出された(表1)。

30

#### 【0013】

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法の検出限界は10CFU/gとするためには、食品試料10倍希釈液1mlの測定においてノイズは検出されてはならない。特許文献1記載の検出限界10CFU/gとするインサイチューハイブリダイゼーション法の自動計数手段は、第2蛍光検出手段においては、黄赤色農産加工品、畜産物、水産物に適用でき、第3の蛍光検出手段では、黄赤色農産物、黄赤色農産加工品、白色農産物、畜産物、畜産加工品、水産物に適用できるものだった。

40

#### 【0014】

産業の現場で応用するためには、できるだけ広汎な種類の食品試料に適用できることが望ましい。そこで、より広汎な種類の食品においてノイズの発生しない新たな蛍光シグナル自動検出方法の開発を課題とした。

50

【0015】

【表1】

表1 食品のノイズ数測定

食品試料		食品中の蛍光ノイズ数 (個/g)		
		第1の蛍光検出 光学条件 励起波長 460-500 nm 蛍光波長 515 nm 以上	第2の蛍光検出光 学条件 励起波長 520-560 nm 蛍光波長 570nm 以上	第3の蛍光検出 光学条件 励起波長 590-650nm 蛍光波長 660nm 以上
緑色農産物	キャベツ	$2.8 \times 10^4$	$1.0 \times 10^1$	<10
	レタス	$3.7 \times 10^4$	<10	$7.2 \times 10^2$
	エンドウ	$3.2 \times 10^4$	<10	$1.5 \times 10^2$
黄赤色農産物	ニンジン	$2.2 \times 10^4$	$2.0 \times 10^1$	<10
	トウモロコシ	$4.0 \times 10^4$	<10	<10
黄赤色農産加工品	オレンジジュース	$6.0 \times 10^3$	<10	<10
白色農産加工品	豆腐	$7.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^1$	<10
畜産物	豚肉	$7.0 \times 10^4$	<10	<10
畜産加工品	メンチカツ	$1.2 \times 10^4$	$4.0 \times 10^1$	<10
	チキンカツ	$1.2 \times 10^4$	<10	<10
水産物	いか	$4.7 \times 10^4$	<10	<10
	ひらめ	$2.5 \times 10^4$	<10	<10

10

20

【0016】

上記表1に示されるように、畜産物、水産物は、比較的蛍光ノイズが低い、農産物、取り分け緑黄色野菜は、色素をふくむため、蛍光ノイズの問題が大きいと考えられる。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者は、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法の蛍光シグナルと食品由来の蛍光ノイズを区別する新たなシグナルの自動検出手法を開発するため、様々な食品の自家蛍光とDNAプローブの標識に用いる蛍光物質の蛍光シグナルを比較した。

30

【0018】

通常蛍光測定は、励起波長に対して、特定の波長範囲の蛍光強度（明るさ）を測定することで行われるが、検討の結果、本願発明者らは、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法の蛍光シグナルと食品由来の蛍光ノイズを区別するためには、観察用の蛍光の限定された波長範囲の明るさのみではノイズとの区別が困難であるが、観察対象の色と明るさを計測し、両者が一定範囲に入るシグナルを蛍光プローブ由来のシグナルであると評価することで自動化計測できることを見出した。

40

【0019】

より具体的には、本願発明者らは、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を用いる食品等の微生物検査方法において、有効な過面積が直径24mmの円の面積と同等又はそれ以上の面積を有するメンブレンフィルターを用いてる過し、マイクロコロニーが大きさ20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ mとなるように培養し、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法により増殖された特定微生物を、メンブレンフィルターの低倍率光学系で蛍光シグナルを特定の色と明るさで、固体素子により、自動検出することにより、食品衛生基準で必要とされる精度で細菌を自動検出できることを見出して、本願発明を完成させた。

【0020】

50

ここで、信号（シグナル）とノイズの弁別条件は、一般的には次のように決めることができる。すなわち、ノイズ及び信号（シグナル）が既知のサンプルを用いて、ノイズ及び信号（シグナル）の色相・明度を実測し、信号（シグナル）とノイズの光学的特徴から色相と明度による弁別条件を決定することができる。具体的には、大腸菌等細菌を添加した試料、大腸菌等細菌を添加しない試料それぞれについて腸内細菌科計数を蛍光測定による本願発明の方法より計数し、同時に、標準法（対照法）により計数を実施する。試料には、腸内細菌科が含まれる場合と含まれない場合がある。

#### 【0021】

各試料について本発明の方法による装置計数の値が対照法の計数と一致するよう、装置計測条件（明度、色相）を検討する。両者の計数値がほぼ一致することによって、装置計測においてノイズとシグナルが区別できることとなり適切な明度と色相範囲を決めることができる。開発した本願発明の方法の妥当性は、食品試料の測定を本願発明で開発した手法と標準的な対照法とで行い両者の結果を比較し、評価することができる。

10

#### 【0022】

##### 1. 第1の蛍光検出光学条件

本願発明者らは、始めに第1の蛍光検出光学条件（励起波長460 - 500 nm、蛍光波長515 nm以上）で検討した。また、この条件で蛍光を示し、その蛍光輝度（%）が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質であればいずれの蛍光物質も第1の蛍光物質として用いることができるが、例えば、Alexa fluor488、FITC、FluorX、Dylight488、5-FITC、FAM(5'FAM)、DY-495-X5、DY-495、Fluorescein、ATTO495、ECD、DY-485XL、PE、Quantum Red、ParCP、Oregon green488、spectrum green等を用いることができる。具体的には、Alexa fluor488を挙げることができる。ここでは、Alexa fluor488で標識した腸内細菌科DNAプローブを用いた。食品試料として、3色ミックス野菜（インゲン、トウモロコシ、ニンジン）、メンチカツ、ひらめを用いた。各食品試料は、大腸菌を添加した（シグナル+ノイズ区）と添加しない（ノイズ区）の2つの区分を設けた。食品試料（シグナル+ノイズ区、または、ノイズ区）に細菌検査用希釈液を加え混和して10倍希釈液（0.1g/ml）を調製した。各々の10倍希釈液1mlとマイクロコロニー形成培地1mlを混和して、これを前述の簡易検査キットに添加した。

20

#### 【0023】

シグナル+ノイズ区の場合は、37℃で6.5時間培養し、細菌のマイクロコロニーを形成させた（マイクロコロニー形成培養）。その後、100%エタノール2mlを簡易検査キットに加え、10分固定した（固定化）。次に、高さのある外枠付メンブレンフィルターを取り出し乾燥後、これに各種の高さのある外枠付メンブレンフィルターにAlexa fluor488標識腸内細菌科検出プローブを含むハイブリダイゼーション液2mlを添加し46℃で30分反応させ、次に洗浄液10mlを添加し、46℃で15分静置した後、排水して洗浄し、高さのある外枠付メンブレンフィルターを蒸留水ですすいだのち乾燥させた。

30

#### 【0024】

次に、ノイズ区の場合は、食品試料10倍希釈液1mlと2倍濃度細菌培養液体培地1mlを混和して、簡易検査キットに添加後、マイクロコロニー形成培養は行わず、後の操作は、シグナル+ノイズ区と同様に行った。これら、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法標本、すなわち、シグナル+ノイズ区、ノイズ区の高さのある外枠付メンブレンフィルターに対して、前述の第1の蛍光検出光学条件にて、カラー撮影した。各区分の撮影画像の輝点の色相と明度を測定した。測定データを比較し、シグナルとノイズの弁別条件を検討した。

40

#### 【0025】

その結果、第1の蛍光検出光学条件にて、第1の蛍光物質のシグナルを特徴する色相と明度を見出した。具体的には、色相範囲：H64-H98、明度：V150以上だった。

#### 【0026】

##### 2. 第2の蛍光検出光学条件

次に、第2の蛍光検出光学条件（励起波長520 - 560 nm、蛍光波長570nm以上）で検討し

50

た。この条件で、蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質であればいずれの蛍光物質も第2の蛍光物質として用いることができるが、例えば、PhycoerythrinB、TRITC、Cy3、DY521XL、Alexa fluor555、DyLight547、Rhodamine、DY-548、DY-554、Alexa fluor546、DY-556、Northernlight557、Oyster550、5-TAMRA、DY-505-X5、DY-547、Oyster556、DY-549、ATTO550、B-PE、DY-560、Spectrum Orange、TAMRA等を用いることができる。具体的には、TAMRAを挙げることができる。ここでは、TAMRAで標識した腸内細菌科DNAプローブを用いた。食品試料として、3色野菜(インゲン、トウモロコシ、ニンジン)、メンチカツ、ひらめを用いた。各食品試料は、大腸菌を添加した(シグナル+ノイズ区)と添加しない(ノイズ区)2つの区分を設けた。培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法標本作成は、前述の第1の蛍光検出光学条件と同様に行った。次いで、標本に対して、前述の第2の蛍光検出光学条件にて、カラー撮影した。各区分の撮影画像の輝点の色相と明度を測定した。測定データを比較し、シグナルとノイズの弁別条件を検討した。

10

#### 【0027】

その結果、第2の蛍光検出光学条件にて、第2の蛍光物質のシグナルを特徴する色相と明度を見出した。具体的には、色相範囲：H44-H54、明度：V150以上及び色相範囲：H54-H74、明度：V100以上だった。

#### 【0028】

### 3. 第3の蛍光検出光学条件

次に、第3の蛍光検出光学条件(励起波長 590 - 650nm、蛍光波長660nm以上)で検討した。この条件で、蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質であれば、いずれの蛍光物質も第3の蛍光物質として用いることができるが、例えば、Allophycocyanin(APC)、Cy5、APC-XL、Alexa Fluor 647、Oyster 645、DY 635、DY-636、DYLight 649、HiLytePlus 647等を用いることができる。具体的には、Cy5を挙げることができる。ここでは、Cy5で標識した腸内細菌科DNAプローブを用いた。食品試料として、3色野菜(インゲン、トウモロコシ、ニンジン)、メンチカツ、ひらめを用いた。各食品試料は、大腸菌を添加した(シグナル+ノイズ区)と添加しない(ノイズ区)2つの区分を設けた。培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法標本作成は、前述の第1の蛍光検出光学条件と同様に行った。次いで、標本に対して、前述の第3の蛍光検出光学条件にて、カラー撮影した。各区分の撮影画像の輝点の色相と明度を測定した。測定データを比較し、シグナルとノイズの弁別条件を検討した。

20

30

#### 【0029】

その結果、第3の蛍光検出光学条件にて、第3の蛍光物質のシグナルを特徴する色相と明度を見出した。具体的には、色相範囲：H340-H360、明度：V80以上、及び、色相範囲：H0-H20、明度：V80以上だった。

#### 【0030】

これら第1、第2、又は、第3の蛍光条件で用いる特定の蛍光物質のシグナルにおいて固有の色調と明度をそれぞれ明らかとした。これらをシグナルの検出条件として用いて、自動検出する手法を設構築し、これらの広汎な種類の食品への適用性を調査した。その結果、第1、第2の、第3の蛍光検出条件が広汎な食品へ適用できることが明らかとなった。

40

#### 【0031】

なお、以下の実施例では、第1、第2、又は、第3の蛍光条件で、それぞれ代表的な蛍光物質を用いて検討したが、他の蛍光色素を使った場合も、励起波長と蛍光波長が類似のものは、色相・明度が大きく変化する事がないことは、当業者には明らかである。

#### 【0032】

これらのことから、培養併用インサイチューハイブリダイゼーション法を用いて、第1、第2、又は第3の蛍光検出条件において、対象微生物のマイクロコロニーの蛍光シグナルを、色及び、明るさに基づきノイズと区別して検出する方法を構築した。

#### 【発明の効果】

50

## 【0033】

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションにおいて、特許文献1記載の細菌のシグナル自動検出方法は、食品試料の種類によってノイズが発生し測定に誤りを起こすことのあることが明らかとなり、ノイズが発生する食品には、適用できない問題があったが、本発明の細菌のシグナル検出方法は、食品から検出対象細菌をノイズと区別して正確に自動計数することができ、広汎な種類の食品に適用できる。また、食品製造業、食品加工業などの産業分野での、製造工程中での検査への利用や、製品出荷前の検査など、正確性と迅速性を要求される産業上の多くの工程で利用可能で、産業上きわめて有益なものである。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【0034】

【図1】本件発明で使用する測定装置の概略図。

【図2】第1の蛍光検出光学条件で3色ミックス野菜から出るノイズの測定結果。

【図3】第1の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加した3色ミックス野菜から出るシグナル及びノイズの測定結果。

【図4】第1の蛍光検出光学条件でひらめから出るノイズの測定結果。

【図5】第1の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加したひらめから出るシグナル及びノイズの測定結果。

【図6】第1の蛍光検出光学条件でメンチカツから出るノイズの測定結果。

【図7】第1の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加したメンチカツから出るシグナル及びノイズの測定結果。

20

【図8】第2の蛍光検出光学条件で3色ミックス野菜から出るノイズの測定結果。

【図9】第2の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加した3色ミックス野菜から出るシグナル及びノイズの測定結果。

【図10】第2の蛍光検出光学条件でひらめから出るノイズの測定結果。

【図11】第2の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加したひらめから出るシグナル及びノイズの測定結果。

【図12】第2の蛍光検出光学条件でメンチカツから出るノイズの測定結果。

【図13】第2の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加したメンチカツから出るシグナル及びノイズの測定結果。

30

【図14】第3の蛍光検出光学条件で3色ミックス野菜から出るノイズの測定結果。

【図15】第3の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加した3色ミックス野菜から出るシグナル及びノイズの測定結果。

【図16】第3の蛍光検出光学条件でひらめから出るノイズの測定結果。

【図17】第3の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加したひらめから出るシグナル及びノイズの測定結果。

【図18】第3の蛍光検出光学条件でメンチカツから出るノイズの測定結果。

【図19】第3の蛍光検出光学条件で大腸菌を添加したメンチカツから出るシグナル及びノイズの測定結果。

## 【発明を実施するための形態】

40

## 【0035】

<本願発明の概要>

本願発明は、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を用いる食品等の微生物検査方法において、有効ろ過面積が直径24mmの円の面積と同等又はそれ以上の面積を有するメンブレンフィルターを用いてろ過し、マイクロコロニーの大きさが20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ mとなるように培養することを含み、前記検査が、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法により増殖された特定微生物を、メンブレンフィルターの低倍率光学系で蛍光シグナルを特定の色と明るさで、固体素子により、自動検出する手段を特徴とする細菌の検出方法を含む。

## 【0036】

50

(1) 培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法

本願発明において、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法は、微生物を含有する試料を培地で培養しマイクロコロニーを形成させた後に、微生物検出用の蛍光プローブを用いて検出することを含有する。蛍光プローブとしては、rRNAを標的とするものが使用でき、特許第4785449号に記載のものを用いることもできる。

【0037】

蛍光シグナルを特定の色、例えば、上記第1、第2、又は第3の蛍光検出光学条件で、色と明るさを自動で検出する手段を備えた培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法を使用する装置を利用することができる。具体的には、例えば、次のように行うことができる。

【0038】

(イ) 試料のろ過

メンブレンフィルターを吸引濾過フィルターユニットに組み込み、試料液を濾過する。

特許文献2記載の高さのある外枠つきメンブレンフィルターを用いる場合は、吸引濾過用フィルターベースに置き、試料液を濾過する。または、試料液1mlとマイクロコロニー形成培地1mlを混合して、簡易検査キット（構成：直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレに、直径50mmの濾紙を5枚入れ、その上に、特許文献2記載の高さのある外枠付メンブレンフィルター（直径47mm、ポアサイズ0.8μm以下のディスク型メンブレンフィルターと外径47mm内径42mm高さ15mmのリング状アクリルを貼り合わせた）を、フィルター面を下にして置き、これに直径60mm高さ10mmのプラスチックシャーレのフタを被せる）に添加してろ過を行ってもよい。

【0039】

(ロ) 培養

ベース上のメンブレンフィルターを固形の培地（ゲル状培地、あるいは液体培地を含む繊維状パット）の上に置き、フィルターを他方の面（裏側面）と培地を接触させる。所定条件で培養し、マイクロコロニーをフィルターの表側の面上に形成させる。例えば、高さのある外枠つきメンブレンフィルターを寒天培地上に置き、検出対象細菌の至適温度下にて、約5～6時間程度培養することにより、マイクロコロニーをメンブレンフィルターの表側に形成させることができる。または、前述の試料液を供した簡易検査キットをそのまま培養してもよい。

【0040】

(ハ) 固定

メンブレンフィルターを適切な固定液（エタノールなど）に浸し、その後乾燥させる。高さのある外枠つきフィルターを用いる場合は、例えば、メンブレンフィルターを、エタノールを含んだ濾紙の上におくことにより固定することもできる。

【0041】

(ニ) ハイブリダイゼーション

例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液と特定細菌検出用蛍光標識プローブを入れた専用の容器にフィルターを移し、ハイブリダイゼーションさせることができる。高さのある外枠つきフィルターを用いる場合は、フィルター上に特定細菌検出用蛍光標識プローブとハイブリダイゼーション緩衝液を添加し、所定の温度で反応させる。

【0042】

(ホ) プローブの標識蛍光物質

第1の蛍光検出光学条件（励起波長460 - 500 nm、蛍光波長515 nm以上）を用いる培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションにおいては、この条件で蛍光を示し、その蛍光輝度（%）が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である蛍光を示す物質を第1の蛍光物質とし、これを対象細菌検出用DNAプローブの標識蛍光物質に用いる。例えば、Alexa fluor488やFITC等を用いることができる。

【0043】

第2の蛍光検出光学条件（励起波長520 - 560 nm、蛍光波長570nm以上）を用いる培養併

10

20

30

40

50

用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションにおいては、この条件で蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である蛍光を示す物質を第2の蛍光物質とし、これを対象細菌検出用DNAプローブの標識蛍光物質に用いる。例えばTAMRAを用いることができる。

【0044】

第3の蛍光検出光学条件(励起波長590-650nm、蛍光波長660nm以上)を用いる培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションにおいては、この条件で蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である蛍光を示す物質を第3の蛍光物質とし、これを対象細菌検出用DNAプローブの標識蛍光物質に用いる。例えばCy5を用いることができる。

10

【0045】

(ヘ)洗浄

例えば、メンブレンフィルターを、ピンセットを用いて、専用の容器に移し、その中でフィルターを洗浄液に浸して洗浄できる。また、高さのある外枠つきメンブレンフィルターを用いる場合は、フィルター上に洗浄液を添加し、所定の温度で反応させることもできる。

【0046】

(ト)標本作成

例えば、メンブレンフィルターをスライドガラス上に置き、その上に封入剤を加え、次いでカバーガラスを被せこれを標本とする。しかし、高さのある外枠つきメンブレンフィルターを用いる場合は、その作業は不要となる。

20

【0047】

(チ)蛍光シグナル計数

第1、第2、第3の蛍光検出光学条件を備え、蛍光検出部に付随した低倍率光学系(倍率1倍乃至6倍)で、メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段を有するシグナル自動検出方法を実行できる装置に、標本を供し、蛍光シグナルを測定することができる。

【0048】

(2)メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段を有するシグナル自動検出方法における各種条件の設定

30

本願発明において、メンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段を有するシグナル自動検出方法の条件を次の通り調整する。

【0049】

(イ)メンブレンフィルター

具体的には、食品等の試料0.1gを一時に検査できるようにすればよく、そのためには、例えば、メンブレンフィルターとして、有効濾過面積が直径24mmの円の面積と同等又はそれ以上の面積を有するメンブレンフィルター、例えば、直径47mmのメンブレンフィルターを用いることができる。

【0050】

メンブレンフィルターの素材は、通常市販されているいずれのものでよく、例えば、ポリカーボネート又はセルロースアセテートを用いることができる。平均ポアサイズは、細菌を捕集できるように、 $0.4\mu\text{m}$ ~ $0.8\mu\text{m}$ が望ましい。またメンブレンフィルターの底面は、吸引濾過フィルターベースに設置でき、固定培養時に固定培地に密接でき、顕微鏡の操作台に設置できる形状であればよい。

40

【0051】

必要に応じて、メンブレンフィルターの表側の面に、その外部に高さのある外枠(以下外枠と言う。)を設けることもできる。

【0052】

外枠をメンブレンフィルターに付けることにより、一定量の液体をメンブレン上に収容可能となり、メンブレンフィルター上にハイブリダイゼーション用及び洗浄用の溶液が保

50

持できるようになる。また、この外枠により、メンブレンフィルターはたるみのない状態で保持できる。外枠は、例えば、メンブレンフィルターに隙間なく直接に接着することもできるが、メンブレンフィルターの周囲にメンブレンフィルターをたるまないように保持する保持枠を設けその上に高さを持った外枠を設けることもできる。外枠の素材は、プラスチック、金属、セルロースなど、一定の硬さとフィルターをたるみなく張らせるための一定のテンションに耐えられる素材で液体が透過しない素材であればよい。外枠の高さは、対物レンズ（1倍～10倍）を用いて外枠付フィルター面に焦点を合わせたとき、対物レンズが該外枠に接触しない高さで、通常の実顕微鏡用であれば、例えば、3mm～30mmとすることができる。外枠の形状は、例えば、円柱状、四角などに形成でき任意であるが、円柱状の外枠とすることが望ましい。円柱状の外枠は、メンブレンフィルターの面積よりも開口部の面積が大きくなるように、例えば、ファンネル状、漏斗状に形成することもできる。高さのある外枠付きメンブレンフィルターとしては、メンブレンフィルターに外壁を設けた市販品、例えば、パーミアブルサポートトランスウェルを用いることもできる。

10

### 【0053】

#### (ロ) DNAプローブ

DNAプローブとしては、種々の蛍光プローブを用いることができる。具体的には、蛍光標識したrRNAに対するオリゴヌクレオチドが挙げられる。腸内細菌科 (TGCTCTCGCGAGGT CGCTTCTCTT) や *Cl. Perfringens* (AATGATGATGCCATCTTTCAACA) 等を用いることができる (特許文献1)。

20

### 【0054】

#### (ハ) 自動計測における低倍率蛍光検出光学系

本願発明では、試料中の検出目的の特定細菌を培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法により増殖させるため、低倍率蛍光検出光学系を用いることができる。微生物の蛍光シグナルは、倍率が1倍から6倍の低倍率蛍光検出光学系により検出できるが、直径47mmの高さのある外枠付メンブレンフィルターを標本とする自動計測においては、倍率が2倍から6倍の低倍率蛍光検出系では、1視野面積が標本のメンブレンフィルター全面の一部であるため、標本の2次元スキャン測定を要し、移動試料ステージが必要となる。倍率が1倍の低倍率蛍光検出系では、1視野面積が標本全面をカバーでき、1視野測定のみで標本全面測定が完了し、試料移動ステージが不要となり、測定が短時間となる。

30

### 【0055】

#### (ニ) 自動計測における蛍光検出光学条件

自動計測装置では、上述した第1の蛍光検出光学条件、第2の蛍光検出光学条件、及び第3の蛍光検出光学条件を備え、それぞれの条件に簡単に切り替え、計測できる。

### 【0056】

#### (三) 本発明で使用する自動化計測装置

本願発明では、倍率1倍乃至6倍の高解像度低倍率光学系を用いる事でメンブレンフィルター全体の蛍光画像を少ない回数の観測で取得でき、カラー撮像素子で撮像する事でシグナル蛍光と自家蛍光などのノイズ成分を色相・明度で自動判別することが可能である。

以下本発明で使用する装置の具体的様態を図1に基づいて説明する。

40

### 【0057】

#### (イ) 試料ステージ

高解像度低倍率光学系の使用により、倍率1倍光学系では試料ステージの移動が不要となっている。試料ステージは、装置内の完全暗室内に設置されており、励起光以外の入光がない状態になっている。また、2倍乃至6倍の光学系を用いる場合には、少ない撮影回数でメンブレンフィルター全体を撮影できるよう移動ステージを採用する。

### 【0058】

#### (ロ) 励起光源

ハロゲンランプ光源からの光を、ファイバーを経由して、励起波長フィルターに通して励起光とし、試料ステージ上の試料に対し、ライトガイドを通して均一の励起光を照射し

50

ている。

【0059】

(八) 光学フィルター切り替え装置(励起フィルター用、蛍光用吸収フィルター用)

励起光源からの励起光(白色)を表示部での選択蛍光標識にあわせ、励起光フィルターへ自動的に切替を行う。また、蛍光検出部の前段にある蛍光用吸収フィルターについても、対応する吸収フィルターへ自動的に切り替わる。

【0060】

第1蛍光検出条件には、励起光フィルターとしてはバンドパスフィルター460-500nmを、蛍光シグナル用吸収フィルターとしてはロングパスフィルター515nm以上を用いることができる。

10

【0061】

第2蛍光検出条件には、励起光フィルターとしてはバンドパスフィルター 520-560nmを、蛍光シグナル用吸収フィルターとしてはロングパスフィルター570nm以上を用いることができる。

【0062】

第3蛍光検出条件には、励起光フィルターとしてはバンドパスフィルター590-650nmを、蛍光シグナル用吸収フィルターとしてはバンドパスフィルター660nm以上を用いることができる。

【0063】

(二) 蛍光検出部(カメラ)

20

デジタルカラーカメラとしては、例えば、CMOS素子サイズが35mmフルサイズ(35.9×24.0mm、画総数7360×4912)のものを、蛍光検出部には、高解像度のデジタルカラーカメラを使用し、細菌のマイクロコロニーを検出できるものを用いることができる。カメラには低倍率光学系：倍率1倍乃至6倍を使用することができる。これは、マイクロコロニーの形成と高解像度蛍光検出部により、低倍率光学系を使用する事ができている。光学系倍率を1倍とすることにより、一回の観測によるフィルターデバイス全体の計測が可能になり、大幅な観測時間短縮に寄与している。

【0064】

(ホ) 画像処理部

蛍光検出部で撮像された蛍光カラー画像に対して色相・明度を基にした画像処理判別を行い、判別結果をモニターへ表示する。また、制御基板への制御命令も行う。

30

【0065】

(ヘ) システム制御基板

画像処理部からの命令を受け、光源の制御(ON/OFF、光量調整)やフィルター切替装置の制御を行う。また、各種機器からのエラー信号を受信し、画像処理部へ伝達する。

【0066】

(ト) モニター

画像処理部の処理結果の表示を行い、装置の操作状況などの表示も行う。

【0067】

(チ) 装置の特徴

40

第1の蛍光検出条件、第2の蛍光検出条件、又は第3の蛍光検出条件をモニター画面から選択し、自動で切り替えることができる。撮影条件(光源強度、ISO、露出、シャッター速度)は、モニター画面から選択入力できる。計測範囲はフィルターデバイス全体とする。

【0068】

(4) 具体的な試料の自動化測定

上記(1)の培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法により調整された測定試料を(2)のメンブレンフィルター上のDNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段を有するシグナル自動検出方法における各種条件に調整し、(3)記載の測定装置を使用し、以下のように行うことができる。

50

## 【0069】

具体的には、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法で、標本を高さのある外枠付メンブレンフィルターに対して、前述の第1の蛍光検出光学条件にて、カラーカメラ撮影する。撮影画像を、まず、(i)撮影画像全体の画素に対して、色相及び明度の条件に当てはまるかを判定し、色相及び明度の条件に当てはまらない画素は、例えば、マスク処理することにより、除外することができる。次に、(ii)当てはまった画素の中からコロニーである画素の集合体(輝点)を探索し、検出する画像処理を行う。画像処理においては、撮像画像からの、円形、楕円、三角、四角形、など形状の判別は一般化されているところ、コロニーは、基本的に円形・楕円形をしているので、画素集合体が円形または楕円形の形状で、大きさ、つまり直径又は長径及び短径が20~150 $\mu$ mである画素集合体を自動検出の対象とすることができる。

10

## 【0070】

ここで、第1の蛍光検出光学条件で測定する場合は、例えば、撮影条件をハロゲン光源出力10%、カメラ設定露出時間2.0秒、露出F3.5、ISO感度 12800とする。次に、撮影画像の画素集合体(輝点)の色相範囲はH64-H98、明度はV150以上であって、円形または楕円形の形状で、大きさが、直径又は長径及び短径20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ mである画素集合体を自動検出の対象とすることができる。第2の蛍光検出光学条件で測定する場合には、例えば、撮影条件をハロゲン光源出力10%、カメラ設定露出時間0.6秒、露出F3.5、ISO感度 25600とする。次に、撮影画像の輝点が色相範囲はH44-H54、明度はV150以上、又は色相範囲はH54-H74、明度はV100以上であって、円形または楕円形の形状で、直径又は長径及び短径が20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ mである画素集合体を自動検出の対象とすることができる。第3の蛍光検出光学条件で測定する場合は、例えば、撮影条件をハロゲン光源出力10%、カメラ設定露出時間1.0秒、露出F3.5、ISO感度 1250とする。次に、撮影画像の画素集合体(輝点)の色相範囲はH340-H360、明度はV80以上、又は、色相範囲はH0-H20、明度はV80以上であって、円形または楕円形の形状で、直径又は長径及び短径が20 $\mu$ m乃至150 $\mu$ mである画素集合体を自動検出の対象とすることができる。なお、光源の強度を変化させても、色相は大きく影響を受ける事はない。また、光源の強度にあわせ、カメラの露光時間を短くする事で、同様に判別する事が可能である。

20

## 【0071】

本願発明は、上記した実際の色相・明度範囲に限定されず、色相と明度条件を調整することにより、食品由来の蛍光ノイズと蛍光プローブ由来のシグナルとを弁別することが可能であり、様々な食品ノイズにも対応できるものである。

30

## 【0072】

## (5) 蛍光検出光学条件の組み合わせ

また、上記(4)の試料の自動化測定において、第1の蛍光物質を用いたDNAプローブを使用し第1の蛍光検出光学条件での測定、第2の蛍光物質を用いたプローブを使用し第2の蛍光検出光学条件での測定、及び第3の蛍光物質を用いたDNAプローブを使用し第3の蛍光検出光学条件での測定、からなる3種類の蛍光検出光学条件から選ばれる任意の2以上の蛍光検出光学条件を組み合わせ、より精度よく測定することもできる。

40

## 【実施例】

## 【0073】

## [実施例1]

## 新規自動蛍光シグナル検出法の開発

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法の蛍光シグナルと食品由来のノイズを区別する新たな自動計数手法を開発するために様々な食品の自家蛍光とDNAプローブの標識に用いる蛍光物質の蛍光シグナルを下記の通り比較した。

## 【0074】

始めに第1の蛍光検出光学条件(励起波長460 - 500 nm、蛍光波長515 nm以上)で検討した。また、この条件で蛍光を示し、その蛍光輝度(%)が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質を第1の蛍光物質とし、Alexa fluor488を用いた。Alexa fluor

50

488で標識した腸内細菌科細菌検出用DNAプローブ (TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT) 特許文献1 (特許第4785449号) を用いた。また、簡易検査キットを試作し用いた。このキット構成は、直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレ内に、直径50mmの濾紙を5枚入れ、その上に、特許文献2記載の高さのある外枠付メンブレンフィルター (直径47mm、ポアサイズ0.4 μ m以下のディスク型メンブレンフィルターと外径47mm内径42mm高さ15mmのリング状アクリルを貼り合わせた) をフィルター面を下にして置き、さらに、プラスチックシャーレ蓋 (直径60mm、高さ10mm) を高さのある外枠付メンブレンフィルターの外枠とプラスチックシャーレの外縁に被せる。

【0075】

食品試料は、ひらめ、3色ミックス野菜 (インゲン、ニンジン、トウモロコシ)、メンチカツを用いた。

10

【0076】

各食品試料は、大腸菌を添加した試料 (シグナル+ノイズ区) と添加しない試料 (ノイズ区) の2つの区分を設けた。

【0077】

食品試料 (シグナル+ノイズ区、または、ノイズ区) 25gをストマッカー用袋に採取し、細菌検査用希釈液225mlを加え混和して10倍希釈液 (0.1g/ml) を調製した。食品試料希釈液1mlと一般細菌マイクロコロニー形成培地 (カゼインペプトン34g、ソイペプトン6g、酵母エキス12g、グルコース 5g、塩化ナトリウム 10g、ピルビン酸ナトリウム2.2g、リン酸二水素カリウム2.7g、リン酸水素ナトリウム5g、リン酸水素二ナトリウム19.2g、胆汁酸塩No.3 1.12g、精製水1Lを滅菌 (121 °C、15分) する。) 1mlを混和して、これを前述の簡易検査キットに添加した。

20

【0078】

シグナル+ノイズ区の場合は、次に、37 °Cで6.5時間培養し、細菌のマイクロコロニーを形成させた (マイクロコロニー形成培養)。その後、100%エタノール2mlを簡易検査キットに加え、10分固定した (固定化)。次に、高さのある外枠付メンブレンフィルターを取り出し乾燥後、直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレ内に移し、これに各種の蛍光物質で標識した10 μ m腸内細菌科細菌検出用プローブ5 μ lを含むハイブリダイゼーション緩衝液 (20%ホルムアミド、0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]) 1.5mlを添加し46 °Cで30分反応させ (ハイブリダイゼーション)、排水した。次に洗浄液 (0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、180mM塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]) 10mlを添加し、46 °Cで15分置いて排水して (洗浄)、その高さのある外枠付メンブレンフィルターを蒸留水ですすいだのち乾燥させた。

30

【0079】

ノイズ区の場合は、食品試料10倍希釈液1mlとマイクロコロニー形成培地1mlを混和して、簡易検査キットに添加後、マイクロコロニー形成培養は行わず、後の操作は、シグナル+ノイズ区と同様に行った。

【0080】

これら、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法標本、すなわち、シグナル+ノイズ区、ノイズ区の高さのある外枠付メンブレンフィルターに対して、前述の第1の蛍光検出光学条件にて、カラーカメラ撮影した。装置としてはデジタルカメラ (CMOS素子サイズが35mmフルサイズ (35.9×24.0mm、画素数7360×4912)) とハロゲンライト、フィルター切りかえ装置 (励起光側：小型回転式フィルター切替装置 (6枚切替)、蛍光側：薄型回転式フィルター切替装置 (8枚切替)) 等を材料として自動化計測装置を前記の通り試作して使い、ハロゲン光源出力は10%とし、Alexa fluor488用のフィルター (励起：バンドパスフィルター 460 - 500 nm、吸収：ロングパスフィルター-515 nm以上) を用いた。カメラ設定は、露出時間：2.0秒 F:3.5 ISO12800とした。各区分の撮影画像をモニター画面に映し出し、様々な色や明るさ、大きさの輝点の集合体 (画素の集合) について、目視で、シグナルの画素集合体とノイズの画素集合体を区別した。次に、目視で見分けたノイズである画素の集合体 (大きさ20-150 μ m相当) をランダムに10点以上で色相・明度

40

50

を測定した。同様にシグナルである画素集合体（大きさ20-150 μm相当）をランダムに10点で色相・明度を測定した。

## 【0081】

（結果）

第1の蛍光検出光学条件での測定結果を、表2から表10及び図2から図7に示す。3色ミックス野菜の結果（ノイズ区（表2、図2）、シグナル+ノイズ区（表3、表4、図3）、ひらめの結果（ノイズ区（表5、図4）、シグナル+ノイズ区（表6、表7、図5））、メンチカツの結果（ノイズ区（表8、図6）、シグナル+ノイズ区（表9、表10、図7））から、第1の蛍光検出光学条件で第1の蛍光物質の弁別条件を検討した。色相の範囲は、コロニーに含まれている蛍光標識の蛍光が強い場合と微弱な場合で見え方が違うため、色相に範囲を持たせた。その結果、色相範囲がH64-H98であって明度がV150以上の範囲内の輝点をシグナルと弁別する弁別条件とし、これを自動計測条件とした。

10

## 【0082】

よって、3色ミックス野菜シグナル+ノイズ区の結果のうち、表3は、シグナル、表4はノイズとなり、合わせて、図3に示す。次に、ひらめのシグナル+ノイズ区のうち、表6はシグナル、表7はノイズとなり、合わせて、図5に示す。さらに、メンチカツのシグナル+ノイズ区のうち、表9はシグナル、表10はノイズとなり、合わせて図7に示す。

## 【0083】

## 【表2】

表2 第1の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

20

色相 H	58	57	64	59	68	63	62	58	64	63	57	58	66	57	62	64
明度 V	216	200	106	159	82	117	112	92	114	100	170	151	85	179	121	104

## 【0084】

## 【表3】

表3 第1の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

30

色相 H	76	79	74	73	78	77	76	66	69	72
明度 V	213	147	160	198	141	148	165	193	220	199

## 【0085】

## 【表4】

表4 第1の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	57	56	49	60	64	68	65	58	64	63
明度 V	132	171	247	169	74	101	104	136	92	110

## 【0086】

## 【表5】

表5 第1の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

40

色相 H	62	62	60	62	57	63	64	64	66	66	63	61	61	63	67
明度 V	144	117	217	152	180	125	111	107	105	96	157	112	109	102	92

## 【0087】

【表 6】

表 6 第 1 の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	86	81	85	72	73	80	61	70	77	69
明度 V	208	177	208	204	228	156	255	255	225	215

【0088】

【表 7】

表 7 第 1 の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	59	58	65	60	70	66	60	63	61	61
明度 V	255	206	120	187	100	123	239	103	215	189

10

【0089】

【表 8】

表 8 第 1 の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	60	61	65	62	59	59	56	59	64	65	60	62	64	61	65
明度 V	170	149	95	130	204	219	171	254	90	84	186	120	115	197	103

20

【0090】

【表 9】

表 9 第 1 の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	70	83	82	80	72	72	69	64	74	73
明度 V	187	144	156	141	221	233	223	239	238	163

【0091】

【表 10】

表 10 第 1 の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	66	59	68	70	69	58	63	63	61	58
明度 V	107	203	107	79	105	184	143	170	185	161

30

【0092】

次に、第2の蛍光検出光学条件（励起波長520 - 560 nm、蛍光波長570nm以上）で検討した。この条件で、蛍光を示し、その蛍光輝度（%）が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質を第2の蛍光物質とし、TAMRAを用いた。TAMRAで標識した腸内細菌科細菌検出用DNAプローブ（TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT）特許文献1 特許第4785449号）を用いた。食品試料として、3色野菜（インゲン、トウモロコシ、ニンジン）、メンチカツ、ひらめを用いた。各食品試料は、大腸菌を添加した（シグナル+ノイズ区）と添加しない（ノイズ区）2つの区分を設けた。培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法標本作成は、前述の第1の蛍光検出光学条件と同様に行った。次いで、標本に対して、前述の第2の蛍光検出光学条件にて、カラー撮影した。装置としてはデジタルカメラ（CMOS素子サイズが35mmフルサイズ（35.9×24.0mm、画総数7360×4912））とハロゲンライト、フィルター切りかえ装置（励起光側：小型回転式フィルター切替装置（6枚切替））、蛍光側：薄型回転式フィルター切替装置（8枚切替）等を材料として自動化計測装置を前記の通り試作して使い、ハロゲン光源出力は10%とし、TAMRA用のフィルター（励起：バンドパスフィルター 520 - 560nm、吸収：ロングパスフィルター 570nm以上）を用いた。カメラ設定は、露出時間：0.6秒 F:3.5 ISO25600とした。

40

50

## 【 0 0 9 3 】

撮像をモニター画面に映し出し、様々な色や明るさ、大きさの輝点の集合体（画素の集合）について、目視で、シグナルの画素集合体とノイズの画素集合体を区別した。次に、目視で見分けたノイズである画素の集合体（大きさ20-150 μm相当）をランダムに10点及びシグナルである画素集合体（大きさ20-150 μm相当）をランダムに10点で色相・明度を測定した。測定データを比較し、シグナルとノイズの弁別条件を検討した。

## 【 0 0 9 4 】

第2の蛍光検出光学条件の測定結果は、表11から表19及び図8から図13に示す。3色ミックス野菜の結果（ノイズ区（表11、図8）、シグナル+ノイズ区（表12、表13、図9））、ひらめの結果（ノイズ区（表14、図10）、シグナル+ノイズ区（表15、表16、図11））、メンチカツの結果（ノイズ区（表17、図12）、シグナル+ノイズ区（表18、表19、図13））から、第2の蛍光検出光学条件で第2の蛍光物質の弁別条件を検討した。検討した。色相の範囲は、コロニーに含まれている蛍光標識の蛍光が強い場合と微弱な場合で見え方が違うため、色相に範囲を持たせた。その結果、色相範囲がH44-H54であって明度をV150以上の範囲、及び色相範囲がH54-H74であって、明度がV100以上の範囲内の輝点をシグナルとする弁別条件とし、これを自動計測条件とした。

10

## 【 0 0 9 5 】

なお、表11から表19までの測定では、よって、3色ミックス野菜シグナル+ノイズ区の測定結果のうち、表12は、シグナル、表13はノイズとなり、合わせて図9に示す。次に、ひらめのシグナル+ノイズ区のうち、表15はシグナル、表16はノイズとなり、合わせて、図11に示す。さらに、メンチカツのシグナル+ノイズ区のうち、表18はシグナル、表19はノイズとなり、合わせて図13に示す。

20

## 【 0 0 9 6 】

## 【表11】

表11 第2の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	41	44	49	58	69	68	60	71	53	45
明度 V	120	132	118	99	44	52	100	41	115	109

## 【 0 0 9 7 】

30

## 【表12】

表12 第2の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、シグナル+ノイズ区、(1)でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	48	45	55	55	46	56	49	60	57	50
明度 V	255	237	255	255	226	186	174	124	107	255

## 【 0 0 9 8 】

## 【表13】

表13 第2の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、シグナル+ノイズ区、(2)でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

40

色相 H	80	39	61	53	49	73	58	59	49	53
明度 V	63	127	99	147	91	50	67	98	107	108

## 【 0 0 9 9 】

## 【表14】

表14 第2の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	41	48	53	59	60	56	59	62	54	96
明度 V	122	116	116	105	97	101	95	85	108	43

## 【 0 1 0 0 】

50

## 【表 15】

表 15 第2の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	53	52	50	64	54	61	53	56	43	55
明度 V	237	234	234	197	195	193	151	251	251	249

## 【0101】

## 【表 16】

表 16 第2の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	75	54	66	71	39	45	53	50	47	39
明度 V	53	168	68	62	132	128	69	165	95	123

## 【0102】

## 【表 17】

表 17 第2の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	81	81	106	83	89	96	94	95	108	83
明度 V	250	244	245	241	245	255	241	242	243	243

## 【0103】

## 【表 18】

表 18 第2の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	61	69	58	67	68	69	61	61	66	66
明度 V	242	253	254	252	255	255	248	249	251	255

## 【0104】

## 【表 19】

表 19 第2の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	75	75	118	115	75	71	71	79	73	78
明度 V	247	236	228	231	235	240	239	245	248	236

## 【0105】

次に、第3の蛍光検出光学条件（励起波長 590 - 650nm、蛍光波長660nm以上）で検討した。この条件で、蛍光を示し、その蛍光輝度（%）が最適蛍光波長で得られる最大蛍光輝度の90%以上である物質を第3の蛍光物質とし、Cy5を用いた。Cy5で標識した腸内細菌科細菌検出用DNAプローブ（TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT）特許文献1 特許第4785449号）を用いた。食品試料として、3色野菜（インゲン、トウモロコシ、ニンジン）、メンチカツ、ひらめを用いた。各食品試料は、大腸菌を添加した（シグナル+ノイズ区）と添加しない（ノイズ区）2つの区分を設けた。培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法標本作成は、前述の第1の蛍光検出光学条件と同様に行った。次いで、標本に対して、前述の第3の蛍光検出光学条件にて、カラー撮影した。装置としてはデジタルカメラ（CMOS素子サイズが35mmフルサイズ（35.9×24.0mm、画総数7360×4912））とハロゲンライト、フィルター切りかえ装置（励起光側：小型回転式フィルター切替装置（6枚切替）、蛍光側：薄型回転式フィルター切替装置（8枚切替））等を材料として自動化計測装置を前記の通り試作して使い、ハロゲン光源出力は10%とし、Cy5用のフィルター（励起：バンドパスフィルター590-650nm、吸収：ロングパスフィルター660nm以上）をもちいた。カメラ設定は、露出時間：1.0秒 F:3.5 ISO1250とした。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 6 】

撮像をモニター画面に映し出し、様々な色や明るさ、大きさの輝点の集合体（画素の集合）について、目視で、シグナルの画素集合体とノイズの画素集合体を区別した。次に、目視で見分けたノイズである画素の集合体（大きさ20-150 $\mu$ m相当）をランダムに10点及びシグナルである画素集合体（大きさ20-150 $\mu$ m相当）をランダムに10点以上で色相・明度を測定した。測定データを比較し、シグナルとノイズの弁別条件を検討した。

## 【 0 1 0 7 】

第3の蛍光検出光学条件での測定結果は、表20から表28及び図14から図19に示す。3色ミックス野菜（ノイズ区（表20、図14）、シグナル+ノイズ区（表21、表22、図15））、ひらめ（ノイズ区（表23、図16）、シグナル+ノイズ区（表24、表25、図17））、メンチカツ（ノイズ区（表26、図18）、シグナル+ノイズ区（表27、表28、図19））から、第3の蛍光検出光学条件で第3の蛍光物質の弁別条件を検討した。色相範囲がH340-H360であって、明度がV80以上、及び、色相範囲がH0-H20であって、明度がV80以上の範囲内にある輝点をシグナルと弁別する条件とし、これを自動計測条件とした。

## 【 0 1 0 8 】

よって、3色ミックス野菜シグナル+ノイズ区の測定結果のうち、表21は、シグナル、表22はノイズとなり、合わせて、図15に示す。次に、ひらめのシグナル+ノイズ区のうち、表24はシグナル、表25はノイズとなり、合わせて、図17に示す。さらに、メンチカツのシグナル+ノイズ区のうち、表27はシグナル、表28はノイズとなり、合わせて、図19に示す。

## 【 0 1 0 9 】

## 【表 2 0】

表 20 第3の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	354	351	358	356	358	355	352	0	0	354
明度 V	70	42	37	54	54	69	30	13	3	34

## 【 0 1 1 0 】

## 【表 2 1】

表 21 第3の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	354	358	355	355	356	354	355	356	355	355	356	350	355	356	357
明度 V	214	217	141	168	204	135	105	96	131	120	60	75	79	87	133

## 【 0 1 1 1 】

## 【表 2 2】

表 22 第3の蛍光検出光学条件、試料：3色ミックス野菜、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	0	0	0	0	358	353	0	354	0	0
明度 V	39	39	45	17	37	27	30	42	35	40

## 【 0 1 1 2 】

## 【表 2 3】

表 23 第3の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	30	0	0	330	30	0	0	0	0	0
明度 V	2	4	0	2	2	4	1	5	10	7

## 【 0 1 1 3 】

## 【表 2 4】

表 24 第3の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	357	357	356	358	357	355	355	359	355	358	355	355	354	359	356
明度 V	146	146	174	163	153	157	153	182	140	99	81	97	95	73	83

## 【0 1 1 4】

## 【表 2 5】

表 25 第3の蛍光検出光学条件、試料：ひらめ、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	0	0	348	12	355	0	0	351	12	354
明度 V	9	15	16	5	27	7	16	20	5	11

## 【0 1 1 5】

## 【表 2 6】

表 26 第3の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、試料：メンチカツ、ノイズ区でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	0	6	12	0	12	30	30	0	10	353
明度 V	10	9	5	7	5	2	2	5	6	9

## 【0 1 1 6】

## 【表 2 7】

表 27 第3の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、シグナル+ノイズ区（1）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	354	354	357	356	355	355	356	356	354	356	357	354	356	356	355
明度 V	132	139	103	108	117	100	118	82	113	93	66	55	77	73	69

## 【0 1 1 7】

## 【表 2 8】

表 28 第3の蛍光検出光学条件、試料：メンチカツ、シグナル+ノイズ区（2）でのカラー撮像輝点の色相と明度測定

色相 H	0	358	357	357	0	0	0	0	0	0
明度 V	11	37	25	49	26	7	14	37	6	8

## 【0 1 1 8】

## [ 実施例 2 ]

本発明の蛍光シグナル計測法による食品の蛍光ノイズ測定

特許文献1記載の蛍光計測法は、表1記載の食品試料に対し、蛍光ノイズを示した。同じ食品試料を、本発明手法により、次の通り計測した。

## 【0 1 1 9】

試料に表1の13種類の食品を用いた。また、試験には、簡易検査キットを試作し用いた。このキット構成は、直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレに、直径50mmの濾紙を5枚入れ、その上に、特許文献2記載の高さのある外枠付メンブレンフィルター（但し、直径47mm、ポアサイズ0.8 $\mu$ m以下のディスク型メンブレンフィルターと外径47mm、内径42mm、高さ15mmのリング状アクリルを貼り合わせた）をフィルター面を下にして置くものとした。

## 【0 1 2 0】

各々の食品試料25gをストマッカー用袋に入れ、さらに細菌検査用リン酸緩衝液225mlを加え懸濁し試料10倍希釈液（試料0.1g/ml）を調製した。その1mlを簡易検査キットに供した。希釈液がろ過された後、その高さのある外枠付メンブレンフィルターをエタノールに

10

20

30

40

50

20分浸し固定化し乾燥させ、ハイブリダイゼーション緩衝液（20%ホルムアミド、0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]）1.5mlを添加し、46℃で20分置いた。次いで、洗浄液（0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、180mM 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]）を添加し46℃で15分置いた後、排液して洗浄した。蒸留水で高さのある外枠付メンブレンフィルターをすすいだ後乾燥した。これにより食品試料0.1gを含み、かつ、細菌マイクロコロニー（円形のコロニーで、直径20μm乃至150μm）を含まない食品試料標本を調製した。次に、高さのある外枠付きメンブレンフィルターの蛍光を特定の2色以上の色と明るさで検出する手段により、第1、第2、第3の蛍光物質の蛍光シグナル自動検出条件で測定した。ここで計数される蛍光は、すべてノイズ（光量や発光面積がマイクロコロニーと同等である食品由来自家蛍光）となる。使用する装置としては、実施例1で使用した同じ自動化計測装置を使用し、倍率が1倍の低倍率蛍光検出系を用いた。蛍光シグナル検出条件は次の通りである。

10

#### 【0121】

##### 第1の蛍光物質の蛍光シグナル自動検出条件

ハロゲン光源出力10%、Alexa fluor488用のフィルター（励起：バンドパスフィルター 460 - 500 nm、吸収：ロングパスフィルター 515 nm以上）を使用。カメラ設定は、露出時間：2.0秒 F:3.5 ISO12800とする。色相範囲：H64-H98、明度：V150以上とする。なお、本件実施例では、カメラの解度と撮像されたエリアから、1画素あたりの大きさは約10μmであるから、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体は、大きさ20-150μmに相当するので、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体で、色相範囲：H64-H98、明度：V150以上のものを、シグナルとして自動検出した。

20

#### 【0122】

##### 第2の蛍光物質の蛍光シグナル自動検出条件

ハロゲン光源出力10%、TAMRA用のフィルター（励起：バンドパスフィルター 520 - 560 nm、吸収：ロングパスフィルター 570nm以上）を使用。カメラ設定は、露出時間：0.6秒 F:3.5 ISO25600とする。色相範囲：H44-H54、明度：V150以上、又は、色相範囲：H54-H74、明度：V100以上とする。なお、本件実施例では、カメラの解度と撮像されたエリアから、1画素あたりの大きさは約10μmであるから、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体は、大きさ20-150μmに相当するので、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体で、色相範囲：H44-H54、明度：V150以上、又は、色相範囲：H54-H74、明度：V100以上の画素集合体を、シグナルとして自動検出した。

30

#### 【0123】

##### 第3の蛍光物質の蛍光シグナル自動検出条件

ハロゲン光源出力10%、Cy5用のフィルター（励起：バンドパスフィルター 590-650nm、吸収：ロングパスフィルター 660nm以上）を使用。カメラ設定は、露出時間：1.0秒 F:3.5 ISO1250とする。色相範囲：H340-H360、明度：V80以上、又は、色相範囲：H0-H20、明度：V80以上とする。なお、本件実施例では、カメラの解度と撮像されたエリアから、1画素あたりの大きさは約10μmであるから、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体は、大きさ20-150μmに相当するので、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体で、色相範囲：H340-H360、明度：V80以上、又は、色相範囲：H0-H20、明度：V80以上シグナルとしての画素集合体を、シグナルとして自動検出した。

40

#### 【0124】

その結果、第1、第2及び第3の蛍光検出光学条件いずれにおいても、細菌検出限界10 CFU/gにおいて、ノイズを発生しなかった（表29）。

#### 【0125】

## 【表 29】

表 29 本発明による食品の蛍光測定

食品試料 (マイクロコロニー含まず)		食品中の蛍光ノイズ数 (個/g)		
		第1の蛍光検出 光学条件 励起波長 460-500 nm 蛍光波長 515 nm 以上	第2の蛍光検出光 学条件 励起波長 520-560 nm 蛍光波長 570nm 以上	第3の蛍光検出 光学条件 励起波長 590-650nm 蛍光波長 660nm 以上
緑色農産物	キャベツ	<10	<10	<10
	レタス	<10	<10	<10
	エンドウ	<10	<10	<10
黄赤色農産物	ニンジン	<10	<10	<10
	トウモロコシ	<10	<10	<10
黄赤色農産加工品	オレンジジュース	<10	<10	<10
白色農産加工品	豆腐	<10	<10	<10
畜産物	豚肉	<10	<10	<10
畜産加工品	メンチカツ	<10	<10	<10
	チキンカツ	<10	<10	<10
水産物	いか	<10	<10	<10
	ひらめ	<10	<10	<10

10

20

## 【0126】

## [実施例3]

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーションのシグナル検出方法による食品中の特定細菌の計数への適用評価

本発明の食品中の特定細菌の計数への適用性を検討した。

特定細菌を腸内細菌科とした。同一食品試料に対し培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法と腸内細菌科計数対照法による計数を行い、両手法の値の比較を次の通り行った。

30

## 【0127】

## 材料

## 供試菌株

腸内細菌科細菌として *Escherichia coli* ATCC11775 を用いた。

## 【0128】

## VRBG寒天

ペプトン7g、胆汁酸塩No.3 1.5g、食塩5.0g、クリスタルバイオレット 0.002g、酵母エキス3.0g、ブドウ糖10g、ニュートラルレッド0.03g、寒天15g、精製水 1Lを煮沸溶解後、47℃に冷却して使用した。

40

## 【0129】

## 食品試料

ひらめ、3色ミックス野菜（インゲン、ニンジン、トウモロコシ）、メンチカツを用いた。各食品試料は、大腸菌を添加した（菌添加区）と添加しない（非添加区）の2つの区分を設けた。

## 【0130】

## マイクロコロニー形成培地

カゼインペプトン34g、ソイペプトン6g、酵母エキス12g、グルコース 5g、塩化ナトリウム 10g、ピルビン酸ナトリウム2.2g、リン酸二水素カリウム2.7g、リン酸水素二カリウム

50

△5g、リン酸水素二ナトリウム△19.2g、胆汁酸塩No.3 1.12g、精製水 1 L を低温殺菌（80～100℃、30分）し、室温まで冷却した。

【0131】

#### 検査キット

直径55mmで高さ15mmのプラスチックシャーレ（底面を下に置く）に、直径50mmの濾紙（No.2定量用濾紙 アドバンテック社）を5枚入れ、その上に、特許文献2記載の高さのある外枠付メンブレンフィルター（直径47mm、ポアサイズ0.8μm以下のディスク型メンブレンフィルターと外径47mm、内径42mm、高さ15mmのリング状アクリルを貼り合わせた）をフィルター面を下にして置くものとする。さらに、プラスチックシャーレ蓋（直径60mm、高さ10mm）を高さのある外枠付メンブレンフィルターの外枠とプラスチックシャーレの外縁に被せる。

10

【0132】

#### 腸内細菌科細菌検出用DNAプローブ（特許文献1 特許第4785449号）

腸内細菌科細菌検出用DNAプローブとして、蛍光物質で標識した次の塩基配列のDNAプローブを用いる（TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT）。

【0133】

#### DNAプローブの標識蛍光物質

メンブレンフィルターの蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段が、第1の蛍光検出光学条件（励起波長460 - 500 nm、蛍光波長515 nm以上）の場合は、DNAプローブを標識する第1の蛍光物質をAlexa Fluor 488とする。

20

【0134】

メンブレンフィルターの蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段が、第2の蛍光検出光学条件（励起波長520 - 560 nm、蛍光波長570nm以上）の場合は、DNAプローブを標識する第2の蛍光物質をTAMRAとする。

【0135】

メンブレンフィルターの蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段が、第3の蛍光検出光学条件（励起波長590 - 650nm、蛍光波長660nm以上）の場合は、DNAプローブを標識する第3の蛍光物質をCy5とする。

【0136】

#### ハイブリダイゼーション緩衝液

20%ホルムアミド、0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]

30

【0137】

#### 洗浄液

（0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、180mM 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]）10ml

【0138】

#### 蛍光シグナル自動検出

使用する装置としては、実施例1で使用した同じ自動化計測装置を使用し、倍率が1倍の低倍率蛍光検出系を用いた。

40

【0139】

メンブレンフィルターの蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段において、第1、第2、第3の蛍光物質の蛍光シグナル検出条件を次の通りとする。

【0140】

#### 第1の蛍光物質由来のマイクロコロニー蛍光シグナル自動検出条件

ハロゲン光源出力10%、Alexa fluor488用のフィルター（励起：バンドパスフィルター 460 - 500 nm、吸収：ロングパスフィルター 515 nm以上）を使用。カメラ設定は、露出時間：2.0秒 F:3.5 ISO12800とする。色相範囲：H64-H98、明度：V150以上とする。

【0141】

なお、本件実施例では、カメラの解度と撮像されたエリアから、1画素あたりの大きさ

50

は約10 $\mu$ mであるから、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体は、大きさ20-150 $\mu$ mに相当するので、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体で、色相範囲：H64-H98、明度：V150以上の画素集合体を、シグナルとして自動検出した。

【0142】

第2の蛍光物質由来のマイクロコロニー蛍光シグナル自動検出条件

ハロゲン光源出力10%、TAMRA用のフィルター（励起：バンドパスフィルター 520 - 560 nm、吸収：ロングパスフィルター 570nm以上）を使用。カメラ設定は、露出時間：0.6秒

F:3.5 ISO25600とする。色相範囲：H44-H54、明度：V150以上、又は、色相範囲：H54-H74、明度：V100以上とする。なお、上記と同様に、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体は、大きさ20-150 $\mu$ mに相当するので、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体で、色相範囲：H44-H54、明度：V150以上、又は、色相範囲：H54-H74、明度：V100以上の画素集合体を、シグナルとして自動検出した。

10

【0143】

第3の蛍光物質由来のマイクロコロニー蛍光シグナル自動検出条件

ハロゲン光源出力10%、Cy5用のフィルター（励起：バンドパスフィルター590-650nm、吸収：ロングパスフィルター 660nm以上）を使用。カメラ設定は、露出時間：1.0秒

F:3.5 ISO1250とする。色相範囲：H340-H360、明度：V80以上、又は、色相範囲：H0-H20、明度：V80以上とする。なお、上記と同様に、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体は、大きさ20-150 $\mu$ mに相当するので、縦横2画素ずつ以上かつ15画素以下の画素集合体で、色相範囲：H340-H360、明度：V80以上、又は、色相範囲：H0-H20、明度：V80以上シグナルとしての画素集合体を、シグナルとして自動検出した。

20

【0144】

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法

食品試料25gをストマッカー用袋に採取し、細菌検査用希釈液225mlを加え混和して10倍希釈液（0.1g/ml）を調製した。食品試料希釈液1mlをマイクロコロニー形成培地1mlと混和して、これを簡易検査キットに添加した。

【0145】

シグナル+ノイズ区の場合は、次に、37 で6.5時間培養し、細菌のマイクロコロニーを形成させた（マイクロコロニー形成培養）。その後、100%エタノール2mlを簡易検査キットに加え、10分固定した（固定化）。次に、高さのある外枠付メンブレンフィルターを取り出し乾燥後、これに各種の蛍光物質で標識した腸内細菌科検出プローブ液を添加し46 で30分反応させ、次に洗浄液を添加し、46 で15分洗浄し、高さのある外枠付メンブレンフィルターを蒸留水ですすいだのち乾燥させた。

30

【0146】

ノイズ区の場合は、食品試料10倍希釈液 1 ml をマイクロコロニー形成培地1mlと混和して、これを簡易検査キットに添加した。次に、マイクロコロニー形成培養は行わず、後の操作は、シグナル+ノイズ区と同様に行った。次にメンブレンフィルターの蛍光シグナルを特定の色と明るさで検出する手段において、第1、第2、第3の蛍光物質の蛍光シグナルを前記検出条件で測定した。

40

【0147】

腸内細菌科計数対照法

上記した非特許文献1（腸内細菌科菌群集落計数法NIHSJ-16）記載の腸内細菌科の標準法（集落計数法）を参考に次の通り実施した。

【0148】

培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法で調製した食品試料希釈液を滅菌シャーレに1ml加え溶解VRBG寒天を注ぎ、重層固化した。これを35 で24時間培養後、腸内細菌科菌群の典型的コロニーを計数した。

【0149】

50

## 結果

食品の腸内細菌科計数の結果（表30）、すべての食品試料（菌添加区）において、第1、第2および第3の蛍光検出光学条件のいずれにおいても、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法の値は、腸内細菌科計数対照法の値と比べ、1/10倍から10倍以内で、測定誤差の許容範囲にあると考えられ、細菌の計数値として妥当な結果だった。食品試料（非添加区）については、第1、第2および第3の蛍光検出光学条件のいずれにおいても、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法と対照法は腸内細菌科を検出せず（<10 CFU/g）、妥当な結果だった。

## 【0150】

よって、DNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の2色以上の色と明るさで検出する手段による検出可能限界を10CFU/gとする培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法（UFU/g）は、第1、第2及び第3の蛍光検出光学条件において正確な計数ができ広汎な種類の食品検査に用いることができることが示された。

## 【0151】

本実施例では、食品の代表として、上記3種の試料を用いたが、食品は、大きく農産物、畜産物、水産物の3つに分類され、これらが単独あるいは複合して構成されているので、広汎な食品におけるノイズに関わる要素は、これら3種に含まれ、これらに適用出来れば他の食品にも適用できるものである。特に、使用した3種野菜は、3種の色（緑、黄、橙～赤）をもつ野菜試料で、緑黄色野菜の代表であり、この緑黄色野菜のノイズを判別できれば、本願発明が、広汎な食品に適用できることは明らかであるが、本実施例では、念のため畜産物、水産物のノイズも確認し、以下の表30に示されるように正確な計数ができることが確認できた。

## 【0152】

## 【表30】

表30 食品の腸内細菌科計数結果

食品試料	培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法 (UFU/g)			腸内細菌科計数対照法 (CFU/g)
	プローブ標識蛍光物質 Alexa fluor488 第1の蛍光検出光学条件	プローブ標識蛍光物質 TAMRA 第2の蛍光検出光学条件	プローブ標識蛍光物質 Cy5 第3の蛍光検出光学条件	
3色野菜ミックス (菌添加区)	$3.6 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	$4.6 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$
3色野菜ミックス (非添加区)	<10	<10	<10	<10
ひらめ (菌添加区)	$5.3 \times 10^3$	$7.5 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$
ひらめ (非添加区)	<10	<10	<10	50
メンチカツ (菌添加区)	$4.2 \times 10^3$	$4.3 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$8.6 \times 10^3$
メンチカツ (非添加区)	<10	<10	<10	<10

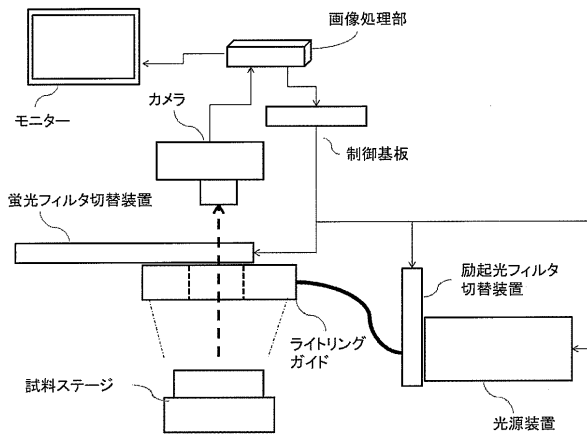
## 【産業上の利用可能性】

## 【0153】

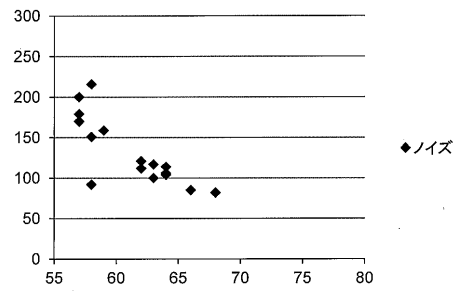
こうして、DNAプローブ由来蛍光シグナルを特定の2色以上の色と明るさで検出する手段による培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション法（UFU/g）は、広汎な種

類の食品検査に用いることができることが示されたので、食品製造業、食品加工業などの産業分野で利用可能な自動微生物検査装置をきわめて安価に提供可能となり、食品の安全・安心な供給にも大きな貢献が可能である。

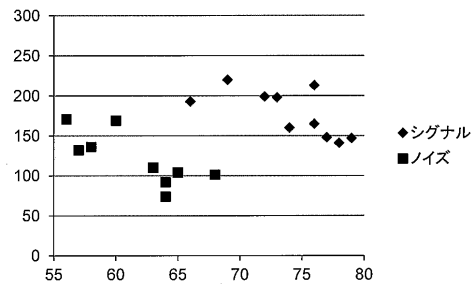
【 図 1 】



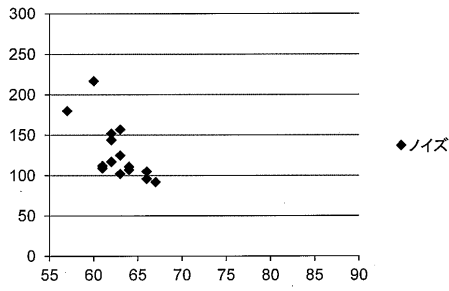
【 図 2 】



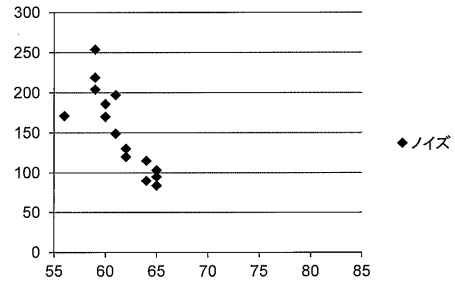
【 図 3 】



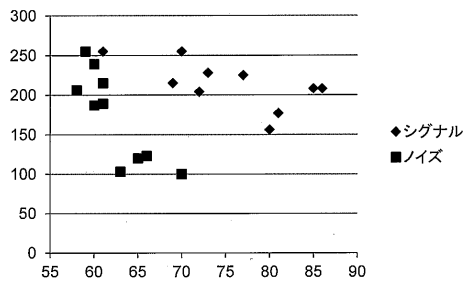
【 図 4 】



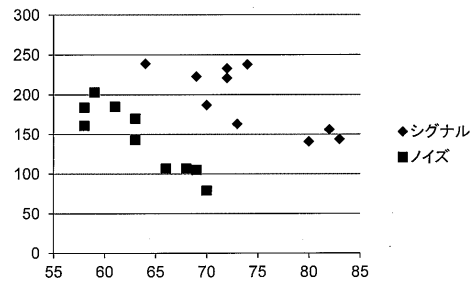
【 図 6 】



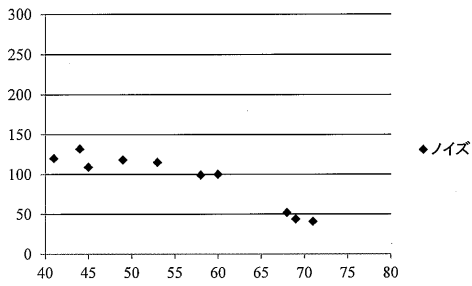
【 図 5 】



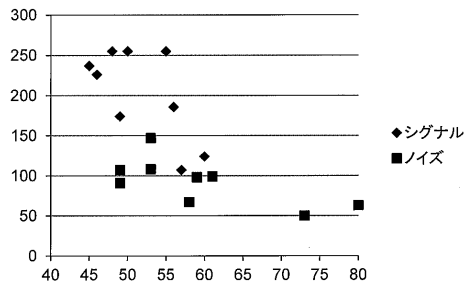
【 図 7 】



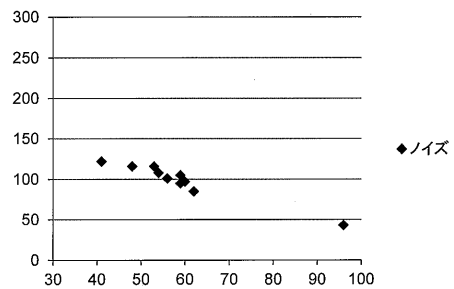
【 図 8 】



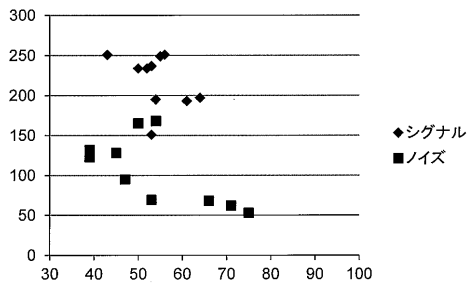
【 図 9 】



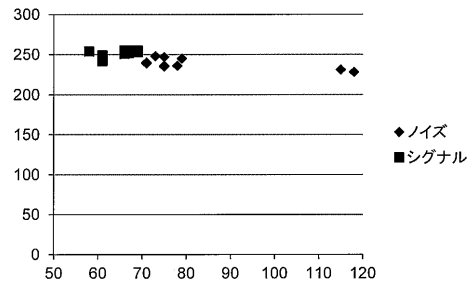
【 図 10 】



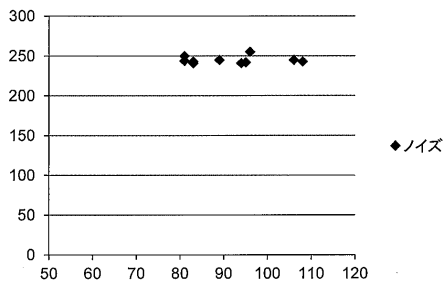
【 図 1 1 】



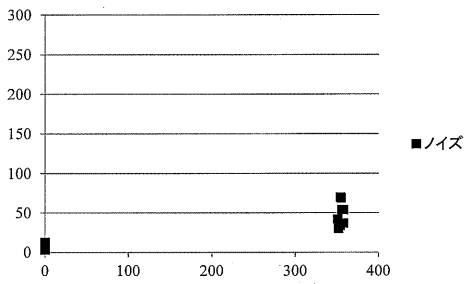
【 図 1 3 】



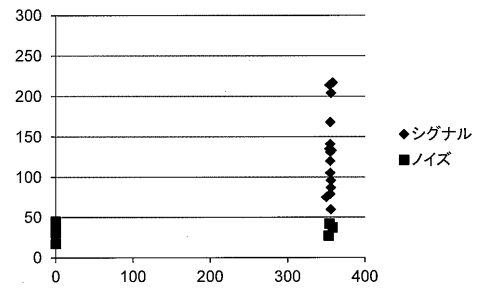
【 図 1 2 】



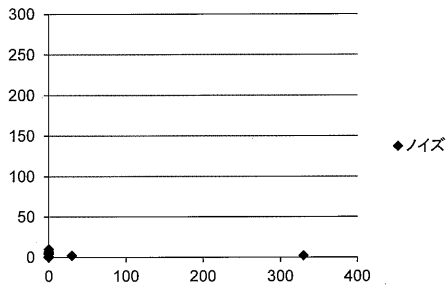
【 図 1 4 】



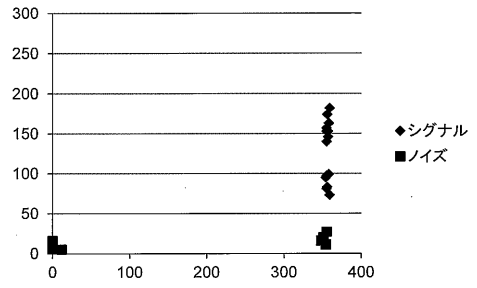
【 図 1 5 】



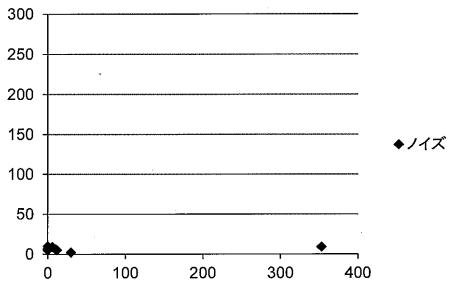
【 図 1 6 】



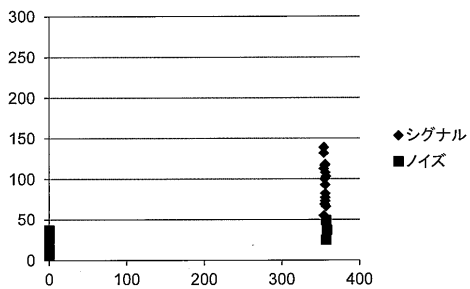
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【配列表】

2017169455000001.app

## フロントページの続き

(72)発明者 高瀬 雅由

北海道江別市工業町8番地の13 株式会社電制 江別工場内

(72)発明者 須貝 保徳

北海道江別市工業町8番地の13 株式会社電制 江別工場内

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 BA17 CA04 DA01 DA06 EA01 FA01 FA02 FA06  
HA01 HA05 JA02 KA02 KA05 LA03 MA01  
2G054 AA08 AB10 BB02 CA20 CA22 CE02 EA03 EB01 EB02 FA12  
FA16 FA17 FA19 GA03 GA04 GE06  
4B063 QA01 QQ05 QQ16 QQ42 QR32 QR35 QR56 QS03 QS34 QS36  
QX02