

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4853358号  
(P4853358)

(45) 発行日 平成24年1月11日(2012.1.11)

(24) 登録日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 21/77	(2006.01)	GO 1 N 21/77	D
GO 1 N 21/76	(2006.01)	GO 1 N 21/76	
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	D

請求項の数 10 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2007-93955 (P2007-93955)	(73) 特許権者	000005452
(22) 出願日	平成19年3月30日(2007.3.30)		株式会社日立プラントテクノロジー
(65) 公開番号	特開2008-249628 (P2008-249628A)		東京都豊島区東池袋四丁目5番2号
(43) 公開日	平成20年10月16日(2008.10.16)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成21年9月9日(2009.9.9)		弁理士 平木 祐輔
		(72) 発明者	岡野定 雅弘
			東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
			株式会社日立製作所 中央研究所内
		(72) 発明者	小澤 理
			東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
			株式会社日立製作所 中央研究所内
		(72) 発明者	野田 英之
			東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
			株式会社日立製作所 中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発光測定装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料溶液を収める試料容器と、  
前記試料溶液の検出のための発光試薬溶液を収める発光試薬槽と、  
前記試料溶液と前記発光試薬溶液について化学反応を生じさせる反応容器と、  
前記反応容器内での発光を検出するための検出部と、  
前記試料溶液を吸引放出するノズルと、  
前記ノズルの動作を制御するアーム部と、  
前記ノズルへの圧力を制御する圧力制御部と、  
を含み、前記ノズルに吸引された前記試料溶液を前記反応容器内に放出して発光検出を行  
なう測定工程の前後において、前記アーム部が前記ノズル表面に残留した発光基質を分解  
洗浄するために、前記ノズルを前記発光試薬溶液が充填された前記反応容器に導入するこ  
とを特徴とする、発光測定装置。

10

【請求項2】

さらに溶菌溶液を収める溶菌容器を含み、かつ前記アーム部が前記ノズル表面に付着し  
た生菌を溶菌するために、前記ノズルを前記溶菌溶液に導入することを特徴とする、請求  
項1に記載の発光測定装置。

【請求項3】

前記圧力制御部が、前記ノズルへの試料溶液の吸引前後において、気体もしくは試料溶  
液と混合しない液体を前記ノズル内に吸引するように圧力を制御することを特徴とする、

20

請求項 1 または 2 に記載の発光測定装置。

【請求項 4】

さらに前記検出部により検出された検出値を格納する記憶部と、前記記憶部に格納された検出値と閾値を比較する比較演算部を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の発光測定装置。

【請求項 5】

前記比較演算部が前記記憶部に格納された前記洗浄工程および/または溶菌工程で検出されたバックグラウンドの検出値と閾値を比較し、その結果により、前記洗浄工程と前記測定工程を切り替える制御装置を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の発光測定装置。

10

【請求項 6】

試料溶液をノズルに吸引し、前記ノズルから前記試料溶液を発光試薬溶液が充填された反応容器内に放出して発光検出する測定工程の前後において、

前記試料溶液を吸引したノズルを発光試薬溶液が充填された前記反応容器に導入し、前記ノズル表面に残留した発光基質を分解する洗浄工程を実施することを特徴とする、発光測定方法。

【請求項 7】

さらに、前記洗浄工程前に、前記試料溶液を吸引したノズルを溶菌溶液に浸し、前記ノズル表面に付着した生菌を溶菌する工程を含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記洗浄工程および/または溶菌工程で検出される発光をモニタリングする工程を含むことを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ノズルへの試料溶液の吸引前後において、気体もしくは試料溶液と混合しない液体を前記ノズル内に吸引する工程を含むことを特徴とする、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記洗浄工程および/または溶菌工程で検出されたバックグラウンドの検出値と閾値を比較し、その結果により、前記洗浄工程と前記測定工程を切り替えることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高精度かつ迅速簡便な発光測定装置と発光測定方法に関する。より詳細には、測定対象外の生菌や残留ATPに由来するバックグラウンドを抑えて、1 CFUレベルの極微量の生菌数を高精度に計測可能な生物化学発光計測装置および発光測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

各種臨床医学や食品工場、基礎研究の現場といった無菌性や生物的清浄度が要求される環境では、空気中の微生物数(生菌数)の測定が広く行なわれている。特に医薬品工業などの現場環境では、生菌数の環境モニタリングの処置基準値は空中浮遊菌で1 CFU (Colony Forming Unit、生菌数の単位)/m<sup>3</sup>、表面付着菌(機器)で1 CFU/24 ~ 30 cm<sup>2</sup>、表面付着菌(壁)で1 CFU/24 ~ 30 cm<sup>2</sup>、表面付着菌(床)で5 CFU/24 ~ 30 cm<sup>2</sup>、手指付着菌で1 CFU/5 指、作業服表面付着菌で5 CFU/24 ~ 30 cm<sup>2</sup>とすべての数値で5 CFU以下が示されており、この値を超えた場合には直ちに調査を行い、必要に応じて是正処置をとる必要がある。

40

【0003】

試料中の生菌数の計測には、試料をそのまま、もしくはフィルター上に生菌を捕捉した後、試料中の生菌を標準寒天培地で長時間培養し、コロニーを検出する方法が、日本薬局方に記載され、従来から行なわれている。しかしながら、この方法は時間がかかるという

50

欠点がある。

【0004】

また生菌数を計測する別の方法として、酵素ルシフェラーゼと基質ルシフェリン、ATPの発光反応を利用した生物化学発光測定方法が迅速かつ簡単な計測方法としてしばしば用いられる。まず測定対象となる生菌からATPを抽出し、ATPを基質として発光反応を触媒するルシフェラーゼとルシフェリンを含む発光試薬でATPを分解して発光させ、発光量からATP量を求め、求められたATP量と生菌当たりのATP量から生菌数を算出する。この発光測定方法を利用して生菌数を計測する方法の例として、キッコーマン株式会社からの論文報告がある（非特許文献1）。この報告においては、*Escherichia coli* (*E. coli*)の菌数を求める検量線から*E. coli*の検出下限は約10 CFUであることが示されている。つまり、発光測定方法は上記環境モニタリングの用途には感度が不十分であった。

10

【0005】

自動測定や反復測定が可能な蛍光測定装置では、対象物を含む試料溶液を反応容器中に分注して、反応容器中の蛍光試薬と対象物を結合させ、この結合した状態に励起光を照射して生じた蛍光を自動測定して反復測定を行なう。分注の操作には分注用のノズルが自動測定や反復測定に便利のため一般的に用いられる。しかしノズルを用いた分注において、ノズルに対象物が残留して、測定精度や感度に影響を及ぼす場合がある。これに対し、測定ごとにノズルに洗浄液の吸引や放出を繰り返し、ノズルを洗浄することで、測定の精度や感度の向上を図る技術が公知である（特許文献1）。しかしこの技術では、ノズルの洗浄は洗浄液による希釈を行うだけであり、またノズルに残留した対象物が、ノズルから除去されたかは確認していない。

20

【0006】

【特許文献1】特開平9-304243号公報

【非特許文献1】Analytical Biochemistry, 2003, 319, p287-295

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記従来技術の発光測定方法と洗浄方法を用いて、5 CFU以下で1 CFUレベルの極微量の生菌数の超高感度な測定を目標として、自動測定および反復測定に適用する検討を行なった結果、以下の課題が新たに見出された。

30

【0008】

ATPはすべての生物の細胞に含まれるため、生菌ばかりではなく、単細胞生物や多細胞生物に存在し、またこれら細胞の周りには遊離のATPが存在する。発光測定方法は蛍光測定方法に比べて発光量が微量なため、計測対象の生菌以外に由来するATPが測定環境中からノズルに付着する場合や、ATPを少量含む試料溶液と多量に含む試料溶液を交互に測定する場合は、試料溶液に計測対象外の生菌が混入したり、ノズルに別試料由来のATPが残留する。そのため、この残留ATPがバックグラウンド発光の変動として測定され、測定感度や測定精度が1 CFUレベルといった極微量の生菌数計測には不十分である。しかも従来の洗浄方法は、洗浄液による希釈を行うだけであるため、ノズルに付着した生菌や残留したATPを除去することが難しく、1 CFUレベルの高感度自動測定および反復測定が困難である。また、洗浄工程を確認する適切な手段が無い場合、洗浄工程が不十分となり感度や精度の低下を招いたり、洗浄工程の短縮が困難であり、生菌数の計測を速やかに行なえない。

40

【0009】

本発明の課題は、ノズルに付着した生菌や残留ATP由来のバックグラウンドを抑えて、高精度で迅速な発光測定方法とそのための装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記課題を解決するため検討した結果、発光試薬によりノズル洗浄を行なうことにより、ノズルに付着した計測対象外の微生物や残留ATPを予め消去した後に、清浄なノズルを

50

用いて試料溶液を反応容器中に分注することにより、精度の高い発光測定が可能になることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

すなわち、本発明は、試料溶液を収める試料容器と、前記試料溶液の検出のための発光試薬溶液を収める発光試薬槽と、前記試料溶液と前記発光試薬溶液について化学反応を生じさせる反応容器と、前記反応容器内での発光を検出するための検出部と、前記試料溶液を吸引放出するノズルと、前記ノズルの動作を制御するアーム部と前記ノズルへの圧力を制御する圧力制御部とを含み、前記ノズルに吸引された前記試料溶液を前記反応容器内に放出して発光検出を行なう測定工程の前後において、前記アーム部が前記ノズル表面に残留した発光基質を分解洗浄するために前記ノズルを前記発光試薬溶液が充填された前記反応容器に導入することを特徴とする、発光測定装置に関する。

10

【0012】

前記発光測定装置は、さらに溶菌溶液を収める溶菌容器を含み、前記ノズル表面に付着した生菌を溶菌させるために、前記アーム部が前記ノズルを前記溶菌溶液に導入するものであってもよい。

【0013】

ノズルへの吸引の精度を高めるために、前記圧力制御部は、前記ノズルへの試料溶液の吸引前後において、気体もしくは試料溶液と混合しない液体を前記ノズル内に吸引するように圧力を制御することが望ましい。

【0014】

また前記発光測定装置は、前記検出部により検出された検出値を格納する記憶部と、前記記憶部に格納された検出値と閾値を比較する比較演算部を含んでいてもよい。

20

【0015】

さらに前記発光測定装置は、前記比較演算部は前記記憶部に格納された前記洗浄工程および/または溶菌工程で検出されたバックグラウンドの検出値と閾値を比較し、その結果により、前記洗浄工程と前記測定工程を切り替える制御装置を含んでいてもよい。

【0016】

本発明はまた、試料溶液をノズルに吸引し、前記ノズルから前記試料溶液を発光試薬溶液が充填された反応容器内に放出して発光検出する測定工程の前後において、前記試料溶液を吸引したノズルを発光試薬溶液が充填された前記反応容器に浸し、前記ノズル表面に残留した発光基質(ATP)を分解する洗浄工程を実施することを特徴とする、発光測定方法も提供する。

30

【0017】

前記方法は、前記洗浄工程前に、前記試料溶液を吸引したノズルを溶菌溶液に浸し、前記ノズル表面に付着した生菌を溶菌する工程を含んでいてもよい。

【0018】

また前記方法は、前記洗浄工程および/または溶菌工程で検出される発光をモニタリングする工程を含んでいてもよい。

【0019】

ノズルへの吸引の精度を高めるために、前記ノズルへの試料溶液の吸引前後には、気体もしくは試料溶液と混合しない液体を前記ノズル内に吸引する工程を含んでいてもよい。

40

【0020】

さらに前記方法では、前記洗浄工程および/または溶菌工程で検出されたバックグラウンドの検出値と閾値を比較し、その結果により、前記洗浄工程と前記測定工程を切り替えてもよい。

【発明の効果】

【0021】

本発明はノズルに付着した測定対象外生菌や残留したATPを、発光試薬溶液や溶菌溶液を用いて除く洗浄工程を、測定工程の前後において実行することにより、1 CFUレベルの極微量の生菌数の超高感度な自動測定を可能にする。また本発明では、検出部を用いて洗

50

浄の工程で生じる発光をモニタリングすることにより、ノズルに付着した生菌や残留したATPが所定水準以下になったことを確認できるため、洗浄工程に要する時間を短縮でき、洗浄工程を最適化できる。さらに本発明では、極微量の生菌数の計測が迅速簡便に行えるため、結果的に極微量の生菌数のリアルタイムモニタリングが実現できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下、図面を参照しながら、実施例により本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0023】

〔実施例1〕

まず実施例1に基づく洗浄装置の構成を、図1を用いて説明する。

本洗浄装置は、ノズル101と溶菌溶液102、発光試薬溶液103、検出部104、試料溶液105、反応容器106、溶菌容器107、試料容器108、発光試薬供給部109、発光試薬槽110、配管111、圧力制御部112、アーム部113、制御部114、記憶部115、比較演算部116で構成される。

【0024】

ノズルに付着した生菌の除去について検討するため、まず従来技術として本発明の構成要素の1つである溶菌溶液102の代わりに例えば純水を用いてノズルの洗浄をした(洗浄Aとする)。続いて本発明として、本発明の構成要素である溶菌溶液102を用いてノズルの洗浄をした(洗浄Bとする)。これにより従来技術と本発明の結果を比較した。

【0025】

実施例1において、ノズル101にはGL Science株式会社製シリカキャピラリーチューブを用いた。なおノズルにはガラス製はもちろんのこと樹脂製や金属製なども用いることができる。さらにノズルにはキャピラリーの代わりに、ピペットなどに用いられるチップや樹脂製のチューブなどを用いることもできる。

【0026】

溶菌溶液102には生菌を溶菌する作用があるキッコーマン株式会社製ルシフェールHSセットに含まれるATP抽出試薬を用いた。なおこの他に、塩化ベンザルコニウムやTriton X-100、Triton X-114、Nonidet P-40、Tween 20、Tween 80、Brij-35、Brij-58、3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate、n-Octyl-s-D-glucoside、n-Octyl-s-D-thioglucosideなどの界面活性剤や、トリクロロ酢酸やドデシル硫酸ナトリウム、塩化グアニジン、尿素などのタンパク質変性剤、リゾチームなどの溶菌酵素、アルコールやエーテル、フェノールなどの有機溶剤、pH 10以上の強アルカリ性溶液、pH 4以下の強酸性溶液、を1つ、もしくは2つ以上で構成される溶液を用いることができる。

【0027】

発光試薬溶液103にはキッコーマン株式会社製ルシフェールHSセットに含まれる発光試薬HSを用いた。なお発光試薬溶液には、発光物質が光を放つ化学反応を触媒する作用を持つ酵素として例えばルシフェラーゼやペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼを含む溶液を用いることができる。

【0028】

従来技術である洗浄Aでは、まずノズル101を純水に浸して、続いてノズル101を反応容器106中の発光試薬溶液103に浸して、ノズルの洗浄工程をフォトンカウンティング方式の検出部104でモニタリングした。

【0029】

本発明である洗浄Bでは、ノズル101を溶菌容器107中の溶菌溶液102に浸して、続いてノズル101を反応容器106中の発光試薬溶液103に浸して、ノズルの洗浄工程を検出部104でモニタリングした。

【0030】

図2はノズル101の洗浄工程を検出部104でモニタリングした結果である。図2は縦軸が発光強度で横軸が測定時間である。発光強度は、フォトンカウンティング形式で1秒当たりの光子数(CPS: Count Per Second)として検出している。破線は閾値として発光試薬溶液1

10

20

30

40

50

03のバックグラウンドの平均値を示している。図2(1)と図2(2)中の矢印はノズル101を発光試薬溶液103に浸した時を示している。

【0031】

図2(1)は従来技術である洗浄Aの結果である。図2(1)から、ノズル101を発光試薬溶液103に浸しても発光しないことを示した。

【0032】

図2(2)は本発明である洗浄Bの結果である。図2(2)から、ノズル101を発光試薬溶液103に浸すと発光することを示した。

【0033】

図2は、従来技術である洗浄Aを行なっても発光を観察できなかった。このノズル101には少なくともATPは付着していないか、例えばATPが付着していたとしてもそのATPはノズルに付着した生菌の細胞膜の内部に収納されており、洗浄Aの方法ではATPが菌の外部に漏出しなかったと考えられる。続いて、本発明である洗浄Bを行なうと発光が観察された。このことから、ノズル101を溶菌溶液102に浸すことでノズルに付着した生菌が溶菌され、続いてノズル101を発光試薬溶液103に浸すことで、ノズル101に残留した生菌由来のATPが発光試薬溶液103で分解されて発光したことが示された。ATPの分解による発光は、発光試薬溶液103のバックグラウンド程度まで減少したことから、例えばノズルにATPあるいは生菌が残留していた場合であってもノズルに残留したATPが発光試薬溶液の103のバックグラウンド程度まで分解されてノズルが洗浄されたことが示された。また本発明では、ノズル101に残留した生菌由来のATPが除去される過程を、ATPの発光試薬溶液による分解で生じる発光を検出部104で検出することにより、モニタリングできることが示された。

【0034】

なお実施例1では発光試薬溶液103のバックグラウンドを閾値として用いているが、発光試薬溶液103のバックグラウンドが、検出部104のダークカウントと同程度ならば、検出部104のダークカウントを閾値として用いることもできる。

【0035】

以上より、本実施例の洗浄Bにより、ノズル101に付着した生菌を除去でき、発光試薬溶液103のバックグラウンドの水準までノズルを洗浄できることが示された。また本発明の装置では、検出部104を備えることで、ノズル101の洗浄工程をモニタリングすることができ、ATPの分解で生じる発光を検出することで、発光の消失、すなわちATPの分解が終了した時点ですみやかに洗浄を終了でき、結果として洗浄工程に要する時間を短くすることが可能であることが確認された。

【0036】

〔実施例2〕

実施例2では、ノズル101が試料溶液105を分注する際にノズルの開口部や外壁などに残留するATPを除去する効果について検討した。実施例2では試料溶液105としてATP溶液を用いた。なお試料溶液には、酵素によって化学反応を受けて発光する物質として、ルシフェリンやOrthophosphoric monoester、ペルオキシダーゼ基質などを用いることもできる。

【0037】

本発明の特徴であるノズル101と発光試薬溶液103、検出部104を備えた洗浄装置と洗浄方法、発光測定方法を用いて、まずノズル101を試料容器108中の試料溶液105に浸して、続いてノズル101を反応容器106中の発光試薬溶液103に浸して、ノズル101に残留した試料溶液105由来のATPを分解して、ノズルの洗浄工程を検出部104でモニタリングした。モニタリングの結果を図3(1)に示す。続いてノズル101を発光試薬溶液103から取り出し、ノズル101にATPが残留していないかを確認するため、再度発光試薬溶液103に浸して検出部104でモニタリングした。モニタリングの結果を図3(2)に示す。

【0038】

図3中の矢印はノズル101を発光試薬溶液103に浸した時を、破線は発光試薬溶液103のバックグラウンドの平均値(閾値)を示している。

図3(1)から、ノズル101を発光試薬溶液103に浸すと発光が観察された。このことから、

10

20

30

40

50

ノズル101を発光試薬溶液103に浸すことで、ノズル101に残留した試料溶液105由来のATPが発光試薬溶液103により分解されて発光したことを示している。ATPの分解による発光は、発光試薬溶液103のバックグラウンド程度まで減少したことから、ノズルに残留したATPが発光試薬溶液の103のバックグラウンド程度まで分解されて、ノズルが洗浄されたことを示している。

【0039】

図3(2)は、図3(1)のノズル101を発光試薬溶液103から取り出し、再び発光試薬溶液103に浸して検出部104でモニタリングした結果である。図3(2)から、ノズル101を発光試薬溶液103に再び浸しても発光は生じず、ノズル101にATPが残留していないことが確認された。

10

【0040】

以上より、発光試薬溶液103を用いることで、ノズル101に残留したATPをバックグラウンドの水準まで除去できることが示された。また、ノズル101に残留したATPが除去される過程を検出部104でモニタリングできることを示した。また本発明の装置では、検出部104を備えることで、ノズル101の洗浄工程をモニタリングすることができることが示された。さらに、ATPの分解で生じる発光を検出することにより、発光が消失した時点、すなわちATPの分解が終了した時点ですみやかに洗浄を終了し、結果として洗浄工程に要する時間を短縮できることが示された。

【0041】

〔実施例3〕

実施例3では、ATPと生菌を定量的に測定した。試料溶液105としてATP溶液もしくは生菌を溶菌した菌懸濁液を用いて、発光試薬溶液103に加えるATPのモル数を1、2、5、10、50、100、1000 amol、生菌数を1、2、5、10、20、45 CFUとした。なお生菌としてE coliを用いた。また生菌は、Pseudomonas aeruginosaやSerratia marcescensなどのグラム陰性菌やBacillus subtilisやMicrococcus luteus、Staphylococcus aureusなどのグラム陽性菌、Candida albicansやCryptococcus albidus、Saccharomyces cerevisiaeなどの酵母やカビであってもよい。さらに生菌は生細胞であり、ATPはすべての細胞に含まれることから、生細胞である動物細胞や植物細胞であってもよい。

20

【0042】

実施例3の工程を以下に説明する。まずノズル101に付着した生菌を溶菌溶液102と発光試薬溶液103で除いて、次に試料溶液105を分注し、さらにノズル101に残留した試料溶液105を発光試薬溶液103で除いて、分注したノズル内の試料溶液105を発光試薬溶液103に加えた。最後に分注後にノズル101に残留したATPを、発光試薬溶液103を吸引と放出することで除いた。

30

【0043】

洗浄・測定工程は図4の流れに従う。なおノズル101の分注精度を高めるため、ノズル101に図5(1)で示すように緩衝液501を満たした。この緩衝液の代わりに水や界面活性剤を含む溶液、有機溶媒を用いることもできる。なお緩衝液に、アピラーゼやデアミナーゼ、ルシフェラーゼなどATPの分解を触媒する酵素やATPを分解や修飾する化学物質を含ませれば、ノズル内の緩衝液に対してATPの混入を防ぐことができる。また緩衝液、ATPの分解を触媒する酵素を含む緩衝液、界面活性剤を含む溶液、水、有機溶媒をノズル内から吐出して洗浄することも可能である。ここでは、ATPを測定対象としたが別の対象を測定する場合は、本発明の考えを適用して測定対象物を分解する成分を緩衝液に含ませることにより、同様に測定できる。

40

【0044】

洗浄・測定工程を開始(ステップ401)、発光試薬供給部109は発光試薬槽110から配管111を通じて反応容器106に発光試薬溶液103を供給した(ステップ402)。アーム部113はノズル101を溶菌溶液102に浸し(ステップ403)、続いて発光試薬溶液103に浸した(ステップ404)。圧力制御部112はノズル101へ図5(2)に示すように空気502を吸引した(ステップ405)。アーム部113はノズル101を図5(3)で示すように試料溶液105に浸した(ステップ406)。圧力制

50

御部112はノズル101に図5(4)で示すように試料溶液503を吸引し(ステップ407)、次に図5(5)で示すようにノズル101に空気504を吸引して、試料溶液503を空気の層で挟み込んだ(ステップ408)。アーム部113はノズル101を図5(6)で示すように発光試薬溶液103に浸し(ステップ409)、生じた発光を検出部104でモニタリングした(ステップ410)。

【0045】

図6に図4の洗浄・測定工程の手順で得られた測定結果をまとめた。図6中の破線は発光試薬溶液103のバックグラウンドの平均値(閾値)を示している。

【0046】

図6(1)は図5(6)で示すようにノズル101内に試料溶液503を保持した状態で、ノズル101の洗浄工程を検出部104でモニタリングした結果である。図6(1)中の矢印はノズル101を発光試薬溶液103に浸した時を示している。図6(1)からノズル101を発光試薬溶液103に浸すことで、破線で示した閾値よりも発光強度が上昇した。また上昇した発光強度は時間と共に減少した。図6(1)は、ノズル101に残留したATPが分解と共に発光していることを示している。

【0047】

制御部114はモニタリングした値を検出値として記憶部115に格納し、比較演算部116は記憶部115に格納された検出値と閾値とを比較した(ステップ411)。

【0048】

図6(2)は比較演算部116が検出値と閾値を比較した時の検出部104でのモニタリングの結果である。図6(2)から検出値は発光試薬溶液103のバックグラウンドの値(閾値)と同程度を示した。図6(2)の結果は、ノズル101を発光試薬溶液103に浸すことで、ノズル101に残留したATPが除去されたことを示している。

【0049】

続いて圧力制御部112はノズル101内の試料溶液503を発光試薬溶液103に放出して、検出部104は試料溶液503と発光試薬溶液103により生じる発光を検出部104で測定した(ステップ412)。

【0050】

図6(3)は5 amol ATPを発光試薬溶液103に加えたときの測定結果である。図6(3)中の矢印は、ノズル101内の5 amol ATPを発光試薬溶液103に放出した時を示している。図6(3)は、5 amol ATPを加えた際に生じた発光が、洗浄工程でモニタリングされた発光(図6(1)のノズル101を発光試薬溶液105に浸した時)と同程度の強度であることを示した。

【0051】

制御部114は検出した値を測定値として、記憶部115に格納した。測定値を格納後、ノズル101に残留したATPを除去するため、アーム部113は図5(7)で示すようにノズル101を発光試薬溶液103に浸し、圧力制御部112は図5(8)で示すようにノズル101に発光試薬溶液505を吸引し、図5(9)で示すようにノズル101内の発光試薬溶液505を反応容器106中に放出した(ステップ413)。検出部104はこの過程で生じた発光をモニタリングした(ステップ414)。

【0052】

図6(4)はノズル101に発光試薬溶液505を吸引し放出した時の発光を検出部104でモニタリングした結果である。図6(4)中の矢印はノズル101内の発光試薬溶液505を放出した時を示している。図6(4)は、発光の減少とともにノズル101に残留したATPが分解していく過程を示している。

【0053】

制御部114はモニタリングした値を検出値として記憶部115に格納した。比較演算部116は記憶部115に格納された検出値と閾値を比較して(ステップ415)、検出値が閾値と同程度の時、ノズル101の洗浄を終了した(ステップ416)。

【0054】

図4の洗浄・測定の工程をステップ401からステップ416まで繰り返して、1、2、10、50、100、1000 amol ATPを発光試薬溶液103に加えて生じた発光を検出部104で測定した。図6(5)は2 amol ATP、図5(6)は1 amol ATPの測定の結果である。図6(5)(6)中の矢印は、ノ

10

20

30

40

50



ズル101内のATP溶液を発光試薬溶液103に放出した時を示している。洗浄工程の結果である図6(1)と(4)で示したように、ノズルにATPが残留した場合、そのATPの量に応じて発光強度がばらついたり、偏ったりする。このような場合、試料溶液105を発光試薬溶液103に加えた際に生じる発光は、ノズルに残留したATPの発光分を含むため誤差が大きくなる。しかし図6(5)と(6)で示すように、2 amol ATPと1 amol ATPを加えた際に生じる発光の強度は両者の間で差があり、2 amolと1 amolのモル数の差を検出できることを示した。

【 0 0 5 5 】

図7は1、2、5、10、50、100、1000 amol ATPの発光測定値から発光試薬溶液103のバックグラウンドを減算した結果を、縦軸に発光強度(CPS)、横軸にATPのモル数(amol)でまとめた図ある。図7の発光強度とATPのモル数の関係には直線性があり、本発明の方法は1 amol ATPの定量が可能な高い定量性を有することが示された。従って、ATPが残留したノズル101(図6(1)と(4))でも、本発明の洗浄装置と洗浄方法、発光測定方法を用いてノズルに残留したATPを除くことで、1 amol ATPを定量的に測定することが可能であることが示された。

【 0 0 5 6 】

図8は1、2、5、10、20、45 CFUの発光測定値から発光試薬溶液103のバックグラウンドを減算した結果を、縦軸に発光強度(CPS)、横軸にCFUでまとめた図ある。図8から、発光強度とCFUの関係には直線性があり、1 CFUの定量が可能な高い定量性を示した。従って、約5 mol ATPが残留したノズル(図6(1)と(4))でも、本発明の洗浄装置と洗浄方法、発光測定方法を用いることで、1 CFUを定量的に測定することが可能なことを示した。

【 0 0 5 7 】

以上の結果から、本発明は、ノズル101に付着した生菌と残留したATPを除去することで、試料溶液105を高精度でかつ高感度に発光測定が可能である。また本発明は、検出部104を備えることにより、洗浄工程をモニタリングできる。さらに本発明は、ATPの分解で生じる発光を検出することで、発光が消失した時点、すなわちATPの分解が終了した時点ですみやかに測定に移ることができ、結果として洗浄工程に要する時間を短縮することができる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 5 8 】

本発明により、高精度かつ短時間で生菌数の測定が可能になる。よって、本発明は、臨床医療現場や食品工場、基礎研究の現場など無菌性や生物的清浄度が要求される分野において有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 9 】

【 図 1 】 図1は、本発明に係る洗浄装置の実施形態を示した図である。

【 図 2 】 図2は、洗浄液と溶菌溶液によるノズルの洗浄の結果を示した図である。

【 図 3 】 図3は、洗浄液と発光試薬溶液によるノズルの洗浄の結果を示した図である。

【 図 4 】 図4は、本発明に係る洗浄装置の流れを説明するための図である。

【 図 5 】 図5は、ノズルの洗浄工程と試料溶液の測定工程を説明するための図である。

【 図 6 】 図6は、洗浄工程と測定工程の一連の発光測定の結果を示した図である。

【 図 7 】 図7は、本発明の洗浄装置と洗浄方法、発光測定方法を用いて、1、2、5、10、50、100、1000 amol ATPを発光測定した結果をまとめた図である。

【 図 8 】 図8は、本発明の洗浄装置と洗浄方法、発光測定方法を用いて、1、2、5、10、20、45 CFUを発光測定した結果をまとめた図である。

【 符号の説明 】

【 0 0 6 0 】

101... ノズル

102... 溶菌溶液

103... 発光試薬溶液

104... 検出部

10

20

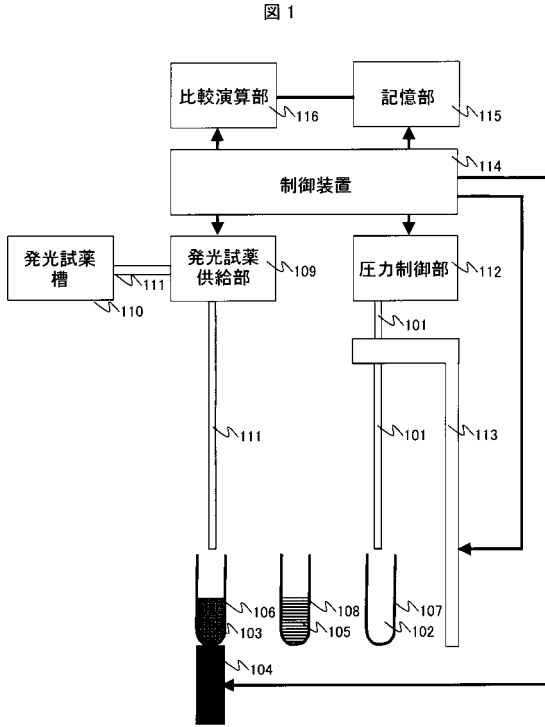
30

40

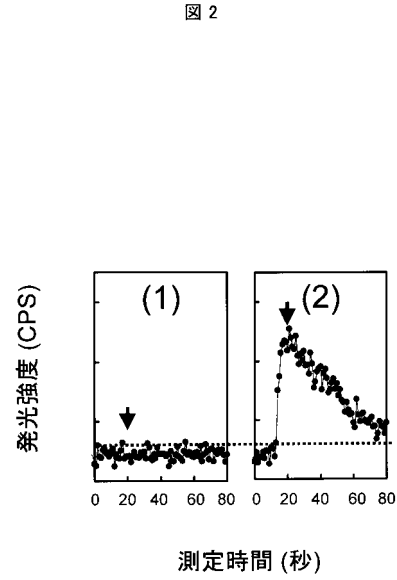
50

105... 試料溶液	
106... 反応容器	
107... 溶菌容器	
108... 試料容器	
109... 発光試薬供給部	
110... 発光試薬槽	
111... 配管	
112... 圧力制御部	
113... アーム部	
114... 制御部	10
115... 記憶部	
116... 比較演算部	
401... 洗浄・測定工程の開始	
402... 発光試薬の供給	
403... ノズルを溶菌溶液に侵入	
404... ノズルを発光試薬に侵入	
405... 空気の吸引	
406... ノズルを試料に侵入	
407... 試料の吸引	
408... 空気の吸引	20
409... ノズルを発光試薬に侵入	
410... 洗浄のモニタリング	
411... 閾値と比較	
412... 試料の放出・発光測定	
413... 発光試薬の吸引	
414... 発光試薬の放出・発光測定	
415... 閾値との比較	
416... 洗浄・測定工程の終了	
501... 緩衝液	
502... ノズルに試料溶液を吸引する前の空気	30
503... ノズルに吸引した試料溶液	
504... ノズルに試料溶液を吸引した後の空気	
505... ノズルに吸引した発光試薬溶液	

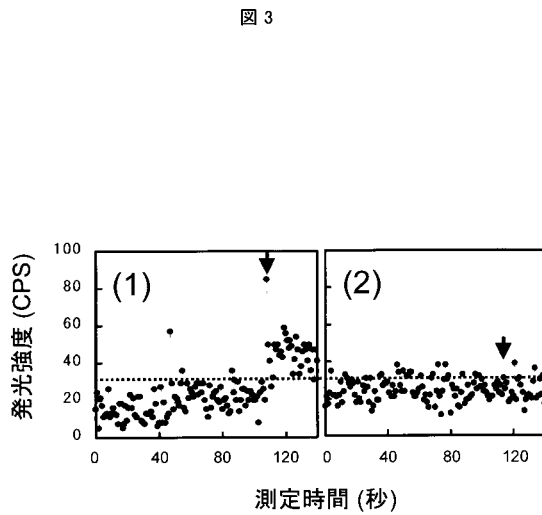
【図1】



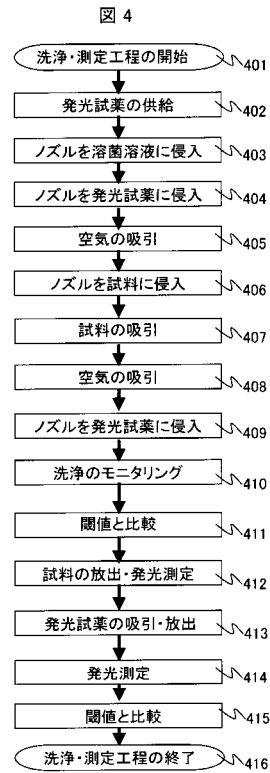
【図2】



【図3】

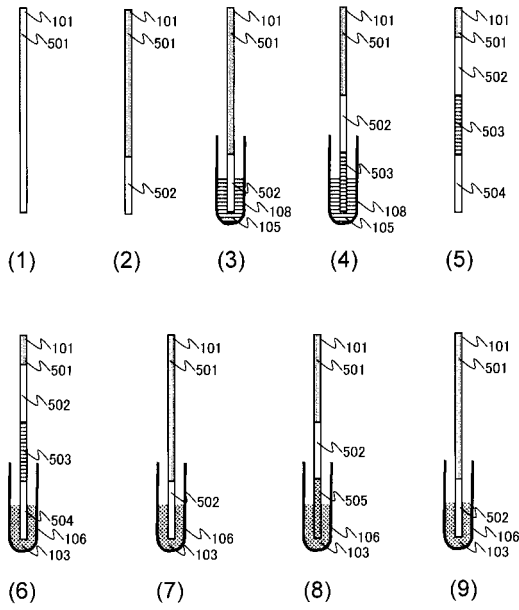


【図4】



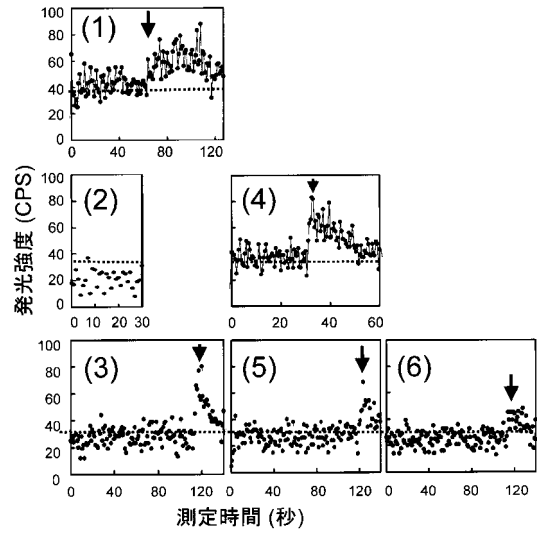
【 図 5 】

図 5



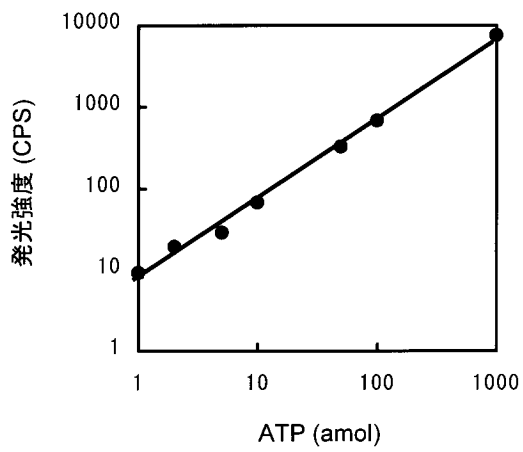
【 図 6 】

図 6



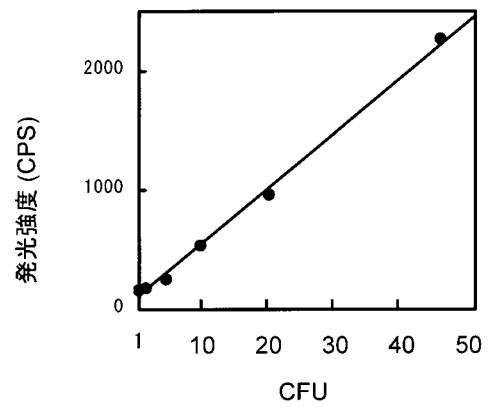
【 図 7 】

図 7



【 図 8 】

図 8



フロントページの続き

(72)発明者 平野 匡章

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

審査官 廣田 健介

(56)参考文献 特開2001-133462(JP,A)

特開2003-329696(JP,A)

特開2000-314738(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/75 - 21/83

C12M 1/34