

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 6 月 16 日(16.06.2016)



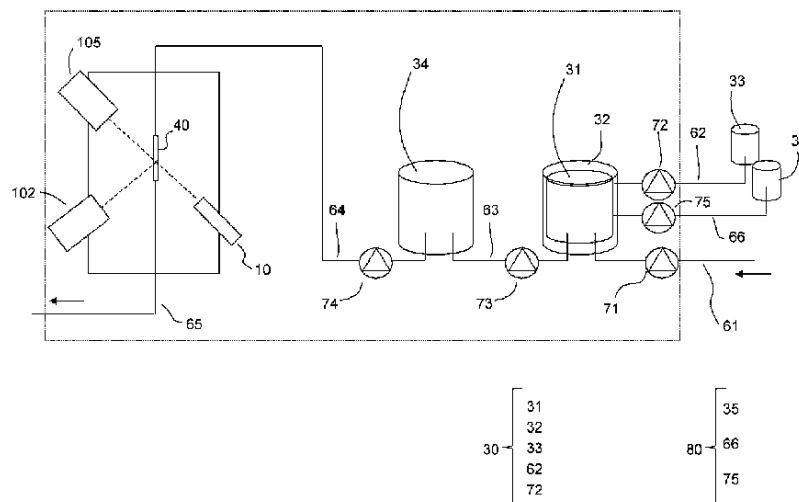
(10) 国際公開番号
WO 2016/093295 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/084605
- (22) 国際出願日: 2015 年 12 月 10 日(10.12.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-251150 2014 年 12 月 11 日(11.12.2014) JP
- (71) 出願人: アズビル株式会社 (AZBIL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1006419 東京都千代田区丸の内 2 丁目 7 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 長谷川 倫男 (HASEGAWA, Norio); 〒1006419 東京都千代田区丸の内 2 丁目 7 番 3 号 アズビル株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: APPARATUS FOR DETECTING MICROORGANISM

(54) 発明の名称: 微生物の検出装置



(57) Abstract: An apparatus for detecting a microorganism, comprising a sugar-adding mechanism (30) for adding sugar to a test solution that may include a microorganism, a fixing-agent-adding mechanism (80) for adding a fixing agent for fixing a microorganism in the sugar-added test solution, a light source (10) for irradiating excitation light into the test solution to which sugar and a fixing agent has been added, and a fluorescence detection unit (102) for detecting fluorescence produced by the test solution thus irradiated with excitation light.

(57) 要約: 微生物を含みうる検査対象溶液に糖を添加する糖添加機構 30 と、糖を添加された検査対象溶液に微生物を固定する固定剤を添加する固定剤添加機構 80 と、糖及び固定剤を添加された検査対象溶液に励起光を照射する光源 10 と、励起光を照射された検査対象溶液で生じる蛍光を検出する蛍光検出部 102 と、を備える微生物の検出装置。

WO 2016/093295 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：微生物の検出装置

技術分野

[0001] 本発明は検出技術に関し、微生物の検出装置に関する。

背景技術

[0002] 微生物が発する自家蛍光を検出することにより、微生物の存在を検出する方法が提案されている（例えば、非特許文献1ないし4参照。）。微生物が発する自家蛍光は、微生物に含まれるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）等の代謝産物に由来すると考えられている（例えば、非特許文献4参照。）。皮膚細胞においては、培養液にグルコースを添加すると、NADHの量が増加するとの報告がある（例えば、特許文献1参照。）。

[0003] 微生物が発する自家蛍光は微弱であり、自家蛍光を観察する前に、微生物に紫外線を照射することによって、微生物が発する自家蛍光の強度を上げることが提案されている（例えば、特許文献2参照。）。また、自家蛍光によらずに、蛍光染色法で染色した微生物を検出することも提案されている（例えば、特許文献3参照。）。さらには、アデノシン三リン酸（ATP）を検出することにより、細胞の存在の検出する方法も提案されている（例えば、特許文献4参照。）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2011-107124号公報

特許文献2：特開2014-153199号公報

特許文献3：特許第4487985号公報

特許文献4：特開2013-116083号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：MJ Miller et al, Evaluation of the BioVigilant IMD-A, A novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time

e environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part I. Review of the Technology and comparative studies with conventional methods. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology (2009) vol 63 (3), 245-

非特許文献2: T Naramura et al, Novel system to detect bacterial in real time in aquatic environments. Biocontrol Science (2013) vol 18 (2), 75-82

非特許文献3: TH. Sheper et al, Monitoring of NADH-dependent culture fluorescence during the cultivation of Escherichia coli. The Chemical Engineering Journal (1987) vol34, B7-B12.

非特許文献4: W Beyeler et al, On-line measurements of culture fluorescence: Method and application. European Journal of Applied Microbiological Biotechnology (1981) vol 13, 10-14

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明者は、鋭意研究の末、特許文献2に記載されているように、紫外線を微生物に照射すると、生きている微生物のみならず、死んでいる微生物においても自家蛍光の強度が上がることを見出した。そのため、特許文献2に記載された方法では、死んでいる微生物に対して、生きていて代謝活性を有する微生物のみの自家蛍光の強度を上げることができない。

[0007] また、特許文献3に記載された蛍光染色法は、生菌と死菌の判別が可能であるが、蛍光染色剤は高価かつ有害である。さらに、蛍光染色剤は不安定であり、冷蔵あるいは冷凍して遮光条件下で保管する必要があり、使用期限も短い。

[0008] またさらに、特許文献4に記載された方法は、生細胞の細胞壁を破壊し、かつATP分解酵素を失活させることによって、細胞内のATPを抽出する工程が必要である。そのため、特許文献4に記載された方法は、手順が煩雑である。

[0009] そこで、本発明は、代謝活性を有していた微生物由来の蛍光を正確かつ容易に検出可能な検出装置を提供することを目的の一つとする。なお、蛍光とは、自家蛍光を含む。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の態様によれば、（a）微生物を含みうる検査対象溶液に糖を添加する糖添加機構と、（b）糖を添加された検査対象溶液に微生物を固定する固定剤を添加する固定剤添加機構と、（c）糖及び固定剤を添加された検査対象溶液に励起光を照射する光源と、（d）励起光を照射された検査対象溶液で生じる蛍光を検出する蛍光検出部と、を備える、微生物の検出装置が提供される。

[0011] 糖添加機構が、糖を添加された検査対象溶液を保管する検査対象溶液タンクを含んでいてもよい。検査対象溶液タンクが、糖を添加された検査対象溶液を所定の時間保管してもよい。糖添加機構が、検査対象溶液タンク内の糖を添加された検査対象溶液の温度を調節する温度調節器を更に含んでいてもよい。

[0012] 糖添加機構が、検査対象溶液タンクに接続された、糖を含む溶液を保管する糖溶液タンクを更に含んでいてもよい。糖添加機構が、糖溶液タンクから検査対象溶液タンクに、糖を含む溶液を送る糖溶液ポンプを更に含んでいてもよい。

[0013] 検査対象溶液タンクが、糖を添加された検査対象溶液中に酸素が取り込まれないように、糖を添加された検査対象溶液を保管してもよい。

[0014] 糖が、グルコース、フルクトース、マンノース、及びヘキソースからなる群から選択される少なくとも一つであってもよい。

[0015] 固定剤添加機構が、検査対象溶液タンクに接続された、固定剤を含む溶液を保管する固定液タンクを含んでいてもよい。また、固定剤添加機構が、固定液タンクから検査対象溶液タンクに、固定剤を含む溶液を送る固定液ポンプをさらに含んでいてもよい。固定剤がホルムアルデヒド又はメタノールであってもよい。

[0016] 光源が、糖及び固定剤を添加された、流れている検査対象溶液に励起光を照射してもよい。あるいは、光源が、糖及び固定剤を添加された、静止している検査対象溶液に励起光を照射してもよい。

[0017] 上記検出装置が、死んでいる微生物が発する自家蛍光の強度と、生きており、糖を与えられた微生物が発する自家蛍光の強度と、の境界値以上の強度の蛍光を検出したときに、検査対象溶液に生きている微生物が含まれていたと判定する判定部をさらに備えていてもよい。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、代謝活性を有していた微生物由来の蛍光を正確かつ容易に検出可能な検出装置を提供可能である。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の実施の形態に係る微生物の検出装置の模式図である。

[図2]本発明の実施の形態に係る微生物の検出装置の模式図である。

[図3]本発明の実施の形態に係る微生物の炭素代謝系を示す模式図である。

[図4]本発明の実施の形態に係る微生物の好気呼吸鎖を示す模式図である。

[図5]本発明の実施の形態の実施例1に係る大腸菌のセル・ケーキから発せられた蛍光のスペクトルを示すグラフである。

[図6]本発明の実施の形態の実施例1に係る表皮ブドウ球菌のセル・ケーキから発せられた蛍光のスペクトルを示すグラフである。

[図7]本発明の参考例に係るNADHの励起蛍光マトリックスを示すグラフである。

[図8]本発明の実施の形態の実施例2に係る大腸菌の蛍光画像である。

[図9]本発明の実施の形態の実施例2に係る表皮ブドウ球菌の蛍光画像である。

[図10]本発明の実施の形態の実施例2に係る大腸菌及び表皮ブドウ球菌の蛍光強度を示すグラフである。

[図11]本発明の実施の形態の実施例3に係る大腸菌及び表皮ブドウ球菌におけるNADHの合成量に相関する490nmにおける溶液の吸光度を示すグ

ラフである。

[図12]本発明の実施の形態の実施例4に係る大腸菌におけるNADHの合成量に相関する546nmにおける溶液の吸光度を示すグラフである。

[図13]本発明の実施の形態の実施例4に係る表皮ブドウ球菌におけるNADHの合成量に相関する546nmにおける溶液の吸光度を示すグラフである。

[図14]本発明の比較例に係る退色前の死んでいる大腸菌の蛍光画像である。

[図15]本発明の比較例に係る退色後の死んでいる大腸菌の蛍光画像である。

[図16]本発明の比較例に係る退色後、紫外線を照射されたことにより蛍光強度が上昇した、死んでいる大腸菌の蛍光画像である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下に本発明の実施の形態を説明する。以下の図面の記載において、同一又は類似の部分には同一又は類似の符号で表している。但し、図面は模式的なものである。したがって、具体的な寸法等は以下の説明を照らし合わせて判断すべきものである。また、図面相互間においても互いの寸法の関係や比率が異なる部分が含まれていることは勿論である。

[0021] 実施の形態に係る微生物の検出装置は、図1及び図2に示すように、微生物を含みうる検査対象溶液に糖を添加する糖添加機構30と、糖を添加された検査対象溶液に微生物を固定する固定剤を添加する固定剤添加機構80と、糖及び固定剤を添加された検査対象溶液に励起光を照射する光源10と、励起光を照射された検査対象溶液で生じる蛍光を検出する蛍光検出部102と、を備える。

[0022] 検査対象溶液は、例えば、純水、製薬用水、注射用水、及び培養液であるが、これらに限定されない。また、微生物を含みうるとは、検査対象溶液が微生物を含む可能性があることを意味し、検査のうえ、検査対象溶液が微生物を含んでいないと判定されることもある。

[0023] 微生物の例としては細菌及び真菌が含まれる。細菌の例としては、グラム陰性菌及びグラム陽性菌が挙げられる。グラム陰性菌の例としては、大腸菌

が挙げられる。グラム陽性菌の例としては、表皮ブドウ球菌、枯草菌、マイクロコッカス、及びコリネバクテリウムが挙げられる。真菌の例としては、黒カビ等のアスペルギルスが挙げられる。ただし、微生物はこれらに限定されない。

[0024] 微生物が励起光を照射されると、微生物に含まれるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）等の蛍光性の代謝産物が、蛍光を発する。なお、蛍光とは、自家蛍光を含む。

[0025] 糖添加機構30は、微生物を含むか否かを検査される検査対象溶液を保管する検査対象溶液タンク31と、検査対象溶液タンク31内の溶液の温度を調節する温度調節器32と、を含む。検査対象溶液タンク31には、検査対象溶液タンク31に検査対象溶液を送液するためのパイプ等の流路61が接続されている。流路61には、第1の送液ポンプ71が設けられている。流路61は、例えばプラントの配管に接続されていてもよいが、これに限定されない。

[0026] 糖添加機構30は、流路62を介して検査対象溶液タンク31に接続された、糖を含む溶液を保管する糖溶液タンク33をさらに含む。糖としては、グルコース、フルクトース、マンノース、及びヘキソース等を挙げることができる。流路62には、糖溶液タンク33から検査対象溶液タンク31に、糖を含む溶液を送る糖溶液ポンプ72が設けられている。

[0027] 例えば、第1の送液ポンプ71によって流路61から検査対象溶液タンク31内に検査対象溶液が貯められ、さらに糖溶液ポンプ72によって流路62から糖溶液が検査対象溶液タンク31内の検査対象溶液に添加される。その後、検査対象溶液タンク31は、糖を添加された検査対象溶液を、例えば30分間等、所定の時間保管する。その間、温度調節器32は、検査対象溶液タンク31内の糖を添加された検査対象溶液の温度を調節して、例えば30℃から37℃に保つ。これにより、検査対象溶液内に含まれる微生物がインキュベートされる。

[0028] なお、検査対象溶液タンク31が糖を添加された検査対象溶液を保管する

時間は、後述するように、検査対象溶液に含まれる微生物においてNADH等の蛍光性の代謝産物が増大する時間であれば、特に限定されない。また、温度調節器32が調節する、糖を添加された検査対象溶液の温度は、後述するように、検査対象溶液に含まれる微生物においてNADH等の蛍光性の代謝産物が増大する温度であれば、特に限定されない。

[0029] 例えば検査対象溶液に微生物が含まれている場合、検査対象溶液タンク31内で糖を添加されることによって微生物が富栄養状態となる。富栄養状態となると、図3に示すように、例えば微生物の炭素代謝系において蛍光性の代謝産物であるNADHが生成される。NADHは、励起光を照射されると、自家蛍光を発する。そのため、糖を与えられた、生きており代謝活性を有している微生物は、励起光を照射されたときに、貧栄養状態のときと比べて、強い自家蛍光を発するようになる。

[0030] なお、代謝活性を有していない微生物、あるいは死んでいる微生物は、糖添加機構30によって微生物に糖が添加されても、NADHの合成量が増大することはない。そのため、代謝活性を有していない微生物、あるいは死んでいる微生物は、糖添加機構30によって微生物に糖が添加されても、貧栄養状態のときと比べて、強い自家蛍光を発するようにはならない。

[0031] また、図4に示すように、微生物の好気呼吸鎖において、NADHの水素が酸化される。そのため、励起光を照射されたときに微生物から発せられる自家蛍光の強さは、微生物の呼吸活性と反比例する傾向にある。したがって、微生物の酸素呼吸によるNADHの消費を抑制するために、図1に示す検査対象溶液タンク31は、糖を添加された検査対象溶液中に酸素が取り込まれないよう、糖を添加された検査対象溶液を保管してもよい。例えば、糖を添加された検査対象溶液の体積が検査対象溶液タンク31の体積の8割以上10割以下となるよう、検査対象溶液タンク31に糖を添加された検査対象溶液が充填される。これにより、糖を添加された検査対象溶液に空気中の酸素が取り込まれることを抑制することが可能となる。

[0032] 固定剤添加機構80は、流路66を介して検査対象溶液タンク31に接続

された、固定剤を含む溶液を保管する固定液タンク 35 を含む。固定剤としては、ホルムアルデヒド、及びメタノールを挙げることができる。固定剤を含む溶液としては、ホルマリン、及び任意の濃度のメタノールを挙げることができる。流路 66 には、固定液タンク 35 から検査対象溶液タンク 31 に、固定剤を含む溶液を送る固定液ポンプ 75 が設けられている。

[0033] 固定剤添加機構 80 は、検査対象溶液タンク 31 で糖を添加されて所定の時間保管された検査対象溶液に、固定剤を含む溶液を添加する。これにより、検査対象溶液に含まれている微生物が固定される。糖を与えることによって NADH の蓄積量が増大した微生物は、固定されると、代謝が止まる。そのため、固定された微生物においては、NADH の蓄積量が減少しない。

[0034] 検査対象溶液タンク 31 で糖及び固定剤を添加された検査対象溶液は、第 2 のポンプ 73 によって流路 63 を経てリザーバータンク 34 に送られる。リザーバータンク 34 は、流量に制限があるセル 40 に送られる糖及び固定剤を添加された検査対象溶液を一時保管する。リザーバータンク 34 内の糖及び固定剤を添加された検査対象溶液は、第 3 のポンプ 74 によって流路 64 を経てセル 40 に送られる。セル 40 は透明であり、光源 10 が照射する励起光の焦点に位置する。

[0035] 光源 10 は、セル 40 中を流れる、糖及び固定剤を添加された検査対象溶液に向けて、励起光を照射する。光源 10 としては、例えば、発光ダイオード (LED) 及びレーザが使用可能である。励起光の波長は、例えば 250 ないし 550 nm である。励起光は、可視光であっても、紫外光であってもよい。励起光が可視光である場合、励起光の波長は、例えば 400 ないし 550 nm の範囲内であり、例えば 405 nm である。励起光が紫外光である場合、励起光の波長は、例えば 300 ないし 380 nm の範囲内であり、例えば 365 nm 又は 340 nm である。ただし、励起光の波長は、これらに限定されない。図 2 に示すように、光源 10 には、光源 10 に電力を供給する光源駆動電源 11 が接続されている。光源駆動電源 11 には、光源 10 に供給される電力を制御する電源制御装置 12 が接続されている。

- [0036] 蛍光検出部 102 は、微生物が発する自家蛍光を検出する。蛍光検出部 102 は、蛍光波長帯域の光を受光する受光素子 20 を備える。受光素子 20 としては、フォトダイオード及び光電子増倍管等が使用可能であり、光を受光すると、光エネルギーを電気エネルギーに変換する。
- [0037] 受光素子 20 には、受光素子 20 で生じた電流を増幅する増幅器 21 が接続されている。増幅器 21 には、増幅器 21 に電力を供給する増幅器電源 22 が接続されている。また、増幅器 21 には、増幅器 21 で増幅された電流を受け取り、受光素子 20 が受光した光の強度を算出する光強度算出装置 23 が接続されている。光強度算出装置 23 は、例えば、検出した光のスペクトルの面積に基づいて、光の強度を算出する。光強度算出装置 23 には、光強度算出装置 23 が算出した光の強度を保存する光強度記憶装置 24 が接続されている。
- [0038] 微生物の検出装置は、励起光を照射された液体中で生じた、励起光と波長が同じ散乱光を検出する散乱光検出部 105 をさらに備えていてもよい。散乱光検出部 105 は、検査光を照射された微生物で生じる散乱光を検出する。散乱光検出部 105 は、散乱光を受光する散乱光受光素子 50 を備える。散乱光受光素子 50 としては、フォトダイオード等が使用可能であり、光を受光すると、光エネルギーを電気エネルギーに変換する。
- [0039] 散乱光受光素子 50 には、散乱光受光素子 50 で生じた電流を増幅する増幅器 51 が接続されている。増幅器 51 には、増幅器 51 に電力を供給する増幅器電源 52 が接続されている。また、増幅器 51 には、増幅器 51 で増幅された電流を受け取り、散乱光受光素子 50 が受光した散乱光の強度を算出する光強度算出装置 53 が接続されている。光強度算出装置 53 には、光強度算出装置 53 が算出した散乱光の強度を保存する光強度記憶装置 54 が接続されている。
- [0040] セル 40 内を検査対象溶液が流れると、光源 10 が励起光を照射し、蛍光検出部 102 が蛍光波長帯域の光の強度を測定し、時系列的に光強度記憶装置 24 に保存する。また、散乱光検出部 105 が、散乱光を測定し、散乱光

の光強度を時系列的に光強度記憶装置 54 に保存する。セル 40 を流れた検査対象溶液は、流路 65 から排出される。

[0041] 実施の形態に係る微生物の検出装置は、中央演算処理装置 (CPU) 300 をさらに含む。CPU 300 は、判定部 301 を含む。判定部 301 は、蛍光波長帯域の光の強度の値を光強度記憶装置 24 から読み出す。また、判定部 301 は、散乱光の強度を、光強度記憶装置 54 から読み出す。判定部 301 は、蛍光波長帯域の光と、散乱光と、が、同時に検出されたとき、検査対象溶液に微生物が含まれていると判定する。

[0042] また、判定部 301 は、予め、死んでいる微生物が発する自家蛍光の強度と、生きており、糖を与えられた微生物が発する増大した自家蛍光の強度と、の境界値を設定し、当該境界値以上の自家蛍光の強度を検出したときに、固定剤が添加される前は生きていた微生物が検査対象溶液に含まれていたと判定してもよい。

[0043] 判定部 301 は、例えば、判定結果を出力装置 401 から出力する。出力装置 401 としては、ディスプレイ、スピーカ、及びプリンタ等が使用可能である。

[0044] 以上説明した、実施の形態に係る微生物の検出装置によれば、検査対象溶液が、微生物にとって栄養に乏しいものであった場合においても、糖添加機構 30 によって微生物に糖が添加され、生きており代謝活性を有している微生物において NADH の合成量が増大する。そのため、蛍光検出部 102 において、生きており代謝活性を有している微生物に含まれる NADH 由来の蛍光の強度が強くなる。よって、検査対象溶液に含まれる、生きており代謝活性を有していた微生物を正確かつ容易に検出することが可能となる。

[0045] また、固定剤を添加する前から代謝活性を有していない微生物、あるいは死んでいる微生物は、糖添加機構 30 によって微生物に糖が添加されても、NADH の合成量が増大することはない。そのため、実施の形態に係る微生物の検出装置は、固定剤を添加する前から代謝活性を有していない微生物、あるいは死んでいる微生物に対して、固定剤を添加するまで代謝活性を有し

ていた微生物を高い感度で検出することが可能である。

[0046] さらに、微生物の種類によっては、代謝速度が速く、代謝の中間産物であるNADHの消費が速いものがある。そのため、糖添加機構30によって微生物に糖を与えることによってNADHの蓄積量を増大させても、その後、すみやかにNADHが消費されてしまう場合がある。NADHが消費されてしまうと、微生物が発する自家蛍光も弱くなる。これに対し、固定剤添加機構80によって、糖添加によりNADHの蓄積量が増大した微生物を固定すると、NADHの蓄積量が減少しない。そのため、固定剤添加機構80は、糖添加によるNADHの蓄積量の増大による、上昇した自家蛍光強度の維持を可能にする。

[0047] (その他の実施の形態)

上記のように本発明を実施の形態によって記載したが、この開示の一部をなす記述及び図面はこの発明を限定するものであると理解すべきではない。この開示から当業者には様々な代替実施の形態、実施例及び運用技術が明らかになるはずである。例えば、粒子による散乱光の強度は、粒子の粒径と関連する。また、微生物の粒径は、微生物の種類によって異なる。そのため、検出した散乱光の強度から、検査対象溶液に含まれる微生物の種類を特定してもよい。また、図1においては、セル40内を流れている検査対象溶液に励起光を照射する例を示したが、容器中に保存された、流れていない、静止している検査対象溶液に励起光を照射してもよい。このように、本発明はここでは記載していない様々な実施の形態等を包含するということを理解すべきである。

実施例

[0048] (調製例1)

微生物として、大腸菌 (*Escherichia coli*, ATCC 13706) と、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228) を用意した。次に、 -80°C でストックされた大腸菌、及び表皮ブドウ球菌のそれぞれを容積が300mLの三

角フラスコ中の150 mLのトリプトソイ液体培地（ベクトン・ディッキンソン アンド カンパニー、型番：211825）に植菌し、定常期に達するまで32℃で一夜、好氣的に培養した。

[0049] 培養後、培養液を遠心機（久保田商事株式会社、2410）で2,100 g × 10分で遠心して集菌した。上清の培地を取り除いた後、菌を5%グルコースーリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に再懸濁した。さらに、同条件で遠心し、上清を取り除くことで菌を洗浄した。当該洗浄を計3回繰り返し、再度、菌を、20 mLの5%グルコースーPBSに懸濁した。また、対照として、糖を添加していないPBSで同様の処理をした菌の懸濁液も調製した。

[0050] 次に、懸濁液を、蓋をしっかりと締めることによって、酸素の供給を制限した50 mLの遠心管中で、32℃、3～4時間、菌体が沈まないよう振とうしながらインキュベートした。インキュベート終了後、ただちに終濃度4%になるようにホルムアルデヒド（シグマアルドリッチ、型番：F8775）を添加して菌を固定し、遠心してその沈殿をセル・ケーキ（Cell cake）とした。また、セル・ケーキの一部を1.5 mLの遠心管に取り分け、滅菌水を加えて遠心機（日立、CT-13R）で1回遠心洗浄したのち、沈殿物を滅菌水に再懸濁して、菌の懸濁液を得た。

[0051] （実施例1）

調製例1で調製したセル・ケーキをスライドガラス上に十分量塗布し、スライドガラスを蛍光分光光度計（日本分光株式会社、FP8500）のフィルム測定ホルダに固定した。蛍光分光光度計において、励起光の励起波長を365 nmとし、励起光源側に360～370 nm透過のバンドパスフィルター、蛍光検出器側に420 nmカットオンのロングパスフィルターを使用し、セル・ケーキから発せられる蛍光スペクトルを取得した。

[0052] その結果、図5に示すように、糖を添加された溶液でインキュベートされた大腸菌のセル・ケーキから発せられた蛍光のスペクトルは、糖を添加されなかった溶液でインキュベートされた大腸菌のセル・ケーキから発せられた

蛍光のスペクトルと比較して、ピークにおける蛍光強度が増大した。このことは、糖（グルコース）の添加により、大腸菌内においてNADHが蓄積されたことを示している。

[0053] また、図6に示すように、糖を添加された溶液でインキュベートされた表皮ブドウ球菌のセル・ケーキから発せられた蛍光のスペクトルは、糖を添加されなかった溶液でインキュベートされた表皮ブドウ球菌のセル・ケーキから発せられた蛍光のスペクトルと比較して、ピークにおける蛍光強度が増大した。このことは、糖（グルコース）の添加により、表皮ブドウ球菌内においてNADHが蓄積されたことを示している。

[0054] （参考例）

終濃度が $13\text{ }\mu\text{mol/L}$ となるようにNADH・2Na（和光純薬、型番：042-16233）をPBSに溶解し、NADH溶液を得た。得られたNADH溶液の励起・蛍光マトリックス（EEM:Excitation-Emission Matrix）蛍光分光光度計（日本分光株式会社、FP8500）で測定した。励起・蛍光マトリックスは、励起波長を連続的に変化させながら蛍光スペクトル計測し、得られた蛍光スペクトルを励起波長ごとに並べることによって得られる。結果として、図7に示すNADHの励起・蛍光マトリックスが得られた。図7に示すように、NADHは、約 350 nm の励起光を照射すると、強い蛍光を発するが、 405 nm の励起光で照射された場合は、弱い蛍光を発する。

[0055] （実施例2）

調製例1で得た菌の懸濁液 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ をスライドガラスに塗布し、風乾した後、スライドガラス上の菌を蛍光顕微鏡（オリンパス、BX51）で観察し、励起波長 405 nm による蛍光画像を撮影した。蛍光顕微鏡には、蛍光ミラーユニット（オリンパス、U-MNV2フィルターキューブ）を使用した。その結果、図8及び図9に示すように、大腸菌及び表皮ブドウ球菌のいずれにおいても、糖（グルコース）を添加せずにインキュベートした場合と比較して、糖（グルコース）を添加してインキュベートした場合の方が、

明るい蛍光画像が得られた。

[0056] さらに、撮影した蛍光画像を、画像解析ソフトウェア（メディアサイバーネティックス社、ImagePro Plus）で、グレースケール変換した後、同画像解析ソフトウェアに菌を認識させ、ピクセルあたりのグレースケール値の平均値をとることで、菌が発した蛍光の強度を数値化した。その結果、図10に示すように、大腸菌及び表皮ブドウ球菌のいずれにおいても、糖（グルコース）を添加せずにインキュベートした場合と比較して、糖（グルコース）を添加してインキュベートした場合の方が、強い蛍光を発することが明らかとなった。

[0057] また、参考例で示したように、励起光の波長が405 nmのときは、励起光の波長が約350 nmのときと比べて、NADHは弱い蛍光を発する。しかし、本実施例の結果は、糖（グルコース）及び固定剤（ホルムアルデヒド）の添加によりNADHの蓄積を図ることで、励起光の波長が405 nmでも、明るい蛍光画像が得られることを示している。

[0058] （調製例2）

−80℃でストックされた大腸菌、及び表皮ブドウ球菌を3 mLのトリプトソイ液体培地に植菌し、定常期に達するまで32℃で一夜、好氣的に培養した。培養後、培養液を遠心機（日立、CT-13R）で2,100 g × 5分で遠心して集菌した。上清の培地を取り除いた後、菌を5%グルコース−PBSに再懸濁した。さらに、同条件で遠心し、上清を取り除くことで菌を洗浄した。当該洗浄を計3回繰り返し、再度、菌を、5%グルコース−PBSに懸濁して、懸濁液を得た。また、対照として、糖を添加していないPBSで同様の処理をした菌の懸濁液も調製した。

[0059] （実施例3）

調製例2で調製した懸濁液を、ただちに、600 nmにおける光学密度（OD: Optical Density）が0.75となるように、希釈して、希釈液を得た。さらに、代謝阻害剤プロクリン200（シグマアルドリッチ）を終濃度15 ppmになるように添加した希釈液も調製した。

[0060] その後、ただちに、希釈液にNADH検出試薬（プロメガ社、CellTiter 96（登録商標） Aqueous One Solution Cell）を添加し、遮光して37℃で4時間インキュベートした。NADH検出試薬の取扱説明書によれば、この間、NADH検出試薬に含まれるテトラゾリウム化合物が菌によって生物的に還元され、溶液に可溶な発色性のホルマザン産物へと変換される。この変換は、代謝活性がある菌のデヒドロゲナーゼによって産生されるNADHによって行われると考えられる。反対に、菌に代謝活性がない場合、この変換は生じない。そのため、ホルマザン産物の量は、代謝活性を有する菌のNADHの合成量に比例するものと考えられる。

[0061] 4時間インキュベートした後、希釈液を遠心して菌を除き、ホルマザン産物の量を示す490nmにおける希釈液の吸光度を測定した。その結果、図11に示すように、大腸菌及び表皮ブドウ球菌のいずれにおいても、糖（グルコース）の添加により、NADHの合成量が増加することが示された。一方、大腸菌及び表皮ブドウ球菌のいずれにおいても、糖（グルコース）とともに代謝阻害剤を添加すると、NADHの合成量が減少することが示された。このことは、NADH由来の自家蛍光を測定することによって、代謝活性を有する微生物を検出することが可能であることを示している。

[0062] （調製例3）

−80℃でストックされた大腸菌、及び表皮ブドウ球菌を3mLのトリプトソイ液体培地に植菌し、定常期に達するまで32℃で一夜、好氣的に培養した。培養後、培養液を遠心機（日立、CT-13R）で2,100g×5分で遠心して集菌した。上清の培地を取り除いた後、菌を5%グルコースー滅菌水に再懸濁した。さらに、同条件で遠心し、上清を取り除くことで菌を洗浄した。当該洗浄を計3回繰り返し、再度、菌を、5%グルコースー滅菌水に懸濁して、懸濁液を得た。また、対照として、糖を添加していない滅菌水で同様の処理をした菌の懸濁液も調製した。

[0063] （実施例4）

調製例3で調製した懸濁液を、ただちに、600nmにおける光学密度（OD: Optical Density）が0.75となるように、希釈して、希釈液を得た。その後、ただちに、希釈液に、NADH検出試薬（プロメガ社、CellTiter 96（登録商標）Aqueous One Solution Cell）を添加し、遮光して37℃でインキュベートした。NADH検出試薬添加直後を0時間として、希釈液の一部を採取、遠心して菌を除き、NADHの合成量を示す546nmにおける希釈液の吸光度を測定した。以後、1時間ごとに同様に測定した。その結果、図11及び図12に示すように、大腸菌及び表皮ブドウ球菌のいずれにおいても、糖（グルコース）の添加により、NADHの合成量が増加することが示され、糖（グルコース）無添加のサンプルとの差異は、インキュベート30分後から確認できることが示唆された。

[0064] （比較例）

滅菌水に懸濁した大腸菌に、終濃度が4%になるようにホルムアルデヒドを添加し、約2分間静置して、大腸菌を殺菌し、固定した。次に、遠心機（日立、CT-13R）を使用して、滅菌水で2回、大腸菌を洗浄した後、大腸菌を滅菌水に再懸濁した。その後、0.5μLの懸濁液をスライドガラスに滴下して風乾し、蛍光顕微鏡（オリンパス、BX51）で、U-MNV2フィルターキューブを使用して大腸菌を観察した。このとき、励起光で大腸菌を90秒間露光したところ、図14及び図15に示すように、蛍光の退色を確認された。

[0065] その後、蛍光顕微鏡で観察したスライドガラスを、蛍光分光光度計（日本分光株式会社、FP8500）にセットし、200nmの紫外線を10分間照射した。その後、再び、蛍光顕微鏡でスライドガラス上の大腸菌を観察したところ、図16に示すように、紫外線照射前と比較して、蛍光強度が強くなったことが確認された。この結果は、紫外線の照射により、一度退色した蛍光が明るくなること、また、紫外線の照射により、死んでいる微生物でも蛍光強度が強くなり、代謝活性を有する微生物の検出の妨げになることを示

している。

産業上の利用可能性

[0066] 以下に限定されないが、本発明は、医薬用精製水、食品用精製水、飲料用精製水、及び半導体装置製造用精製水の製造現場等で利用可能である。

符号の説明

- [0067] 1 0 光源
- 1 1 光源駆動電源
- 1 2 電源制御装置
- 2 0 受光素子
- 2 1 増幅器
- 2 2 増幅器電源
- 2 3 光強度算出装置
- 2 4 光強度記憶装置
- 3 0 糖添加機構
- 3 1 検査対象溶液タンク
- 3 2 温度調節器
- 3 3 糖溶液タンク
- 3 4 リザーバタンク
- 3 5 固定液タンク
- 4 0 セル
- 5 0 散乱光受光素子
- 5 1 増幅器
- 5 2 増幅器電源
- 5 3 光強度算出装置
- 5 4 光強度記憶装置
- 6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6 流路
- 7 1 第 1 の送液ポンプ
- 7 2 糖溶液ポンプ

- 7 3 第2のポンプ
- 7 4 第3のポンプ
- 7 5 固定液ポンプ
- 8 0 固定剤添加機構
- 1 0 2 蛍光検出部
- 1 0 5 散乱光検出部
- 3 0 1 判定部
- 4 0 1 出力装置

請求の範囲

- [請求項1] 微生物を含みうる検査対象溶液に糖を添加する糖添加機構と、
前記糖を添加された検査対象溶液に前記微生物を固定する固定剤を添加する固定剤添加機構と、
前記糖及び前記固定剤を添加された前記検査対象溶液に励起光を照射する光源と、
前記励起光を照射された前記検査対象溶液で生じる蛍光を検出する蛍光検出部と、
を備える、微生物の検出装置。
- [請求項2] 前記糖添加機構が、前記糖を添加された検査対象溶液を保管する検査対象溶液タンクを含む、請求項1に記載の微生物の検出装置。
- [請求項3] 前記検査対象溶液タンクが、前記糖を添加された検査対象溶液を所定の時間保管する、請求項2に記載の微生物の検出装置。
- [請求項4] 前記糖添加機構が、前記検査対象溶液タンク内の前記糖を添加された検査対象溶液の温度を調節する温度調節器を更に含む、請求項2又は3に記載の微生物の検出装置。
- [請求項5] 前記糖添加機構が、前記検査対象溶液タンクに接続された、糖を含む溶液を保管する糖溶液タンクを更に含む、請求項2ないし4のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。
- [請求項6] 前記糖添加機構が、前記糖溶液タンクから前記検査対象溶液タンクに、前記糖を含む溶液を送る糖溶液ポンプを更に含む、請求項5に記載の微生物の検出装置。
- [請求項7] 前記検査対象溶液タンクが、前記糖を添加された検査対象溶液中に酸素が取り込まれないように、前記糖を添加された検査対象溶液を保管する、請求項2ないし6のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。
- [請求項8] 前記糖が、グルコース、フルクトース、マンノース、及びヘキソースからなる群から選択される少なくとも一つである、請求項1ないし

7のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。

[請求項9] 前記固定剤添加機構が、前記検査対象溶液タンクに接続された、固定剤を含む溶液を保管する固定液タンクを含む、請求項2ないし7のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。

[請求項10] 前記固定剤添加機構が、前記固定液タンクから前記検査対象溶液タンクに、前記固定剤を含む溶液を送る固定液ポンプを更に含む、請求項9に記載の微生物の検出装置。

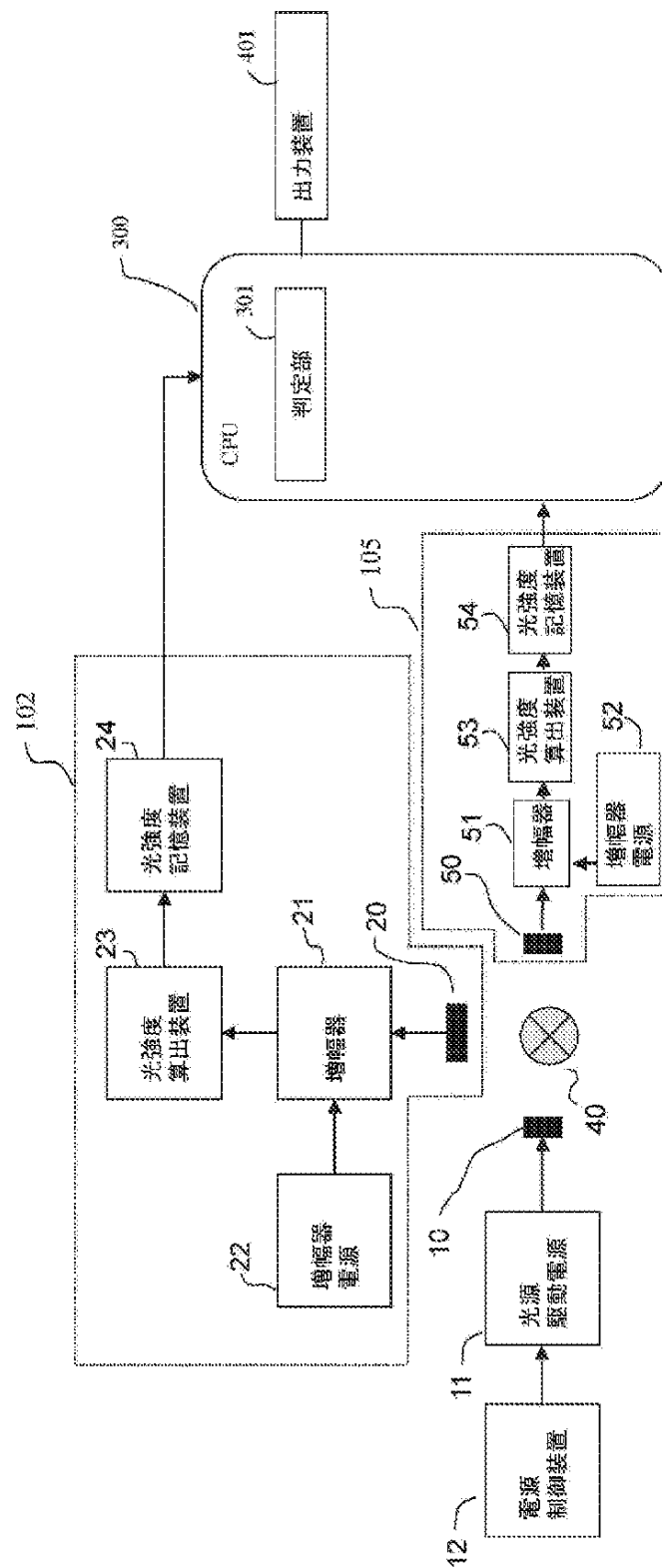
[請求項11] 前記固定剤がホルムアルデヒド又はメタノールである、請求項1、9及び10のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。

[請求項12] 前記光源が、前記糖及び前記固定剤を添加された、流れている前記検査対象溶液に励起光を照射する、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。

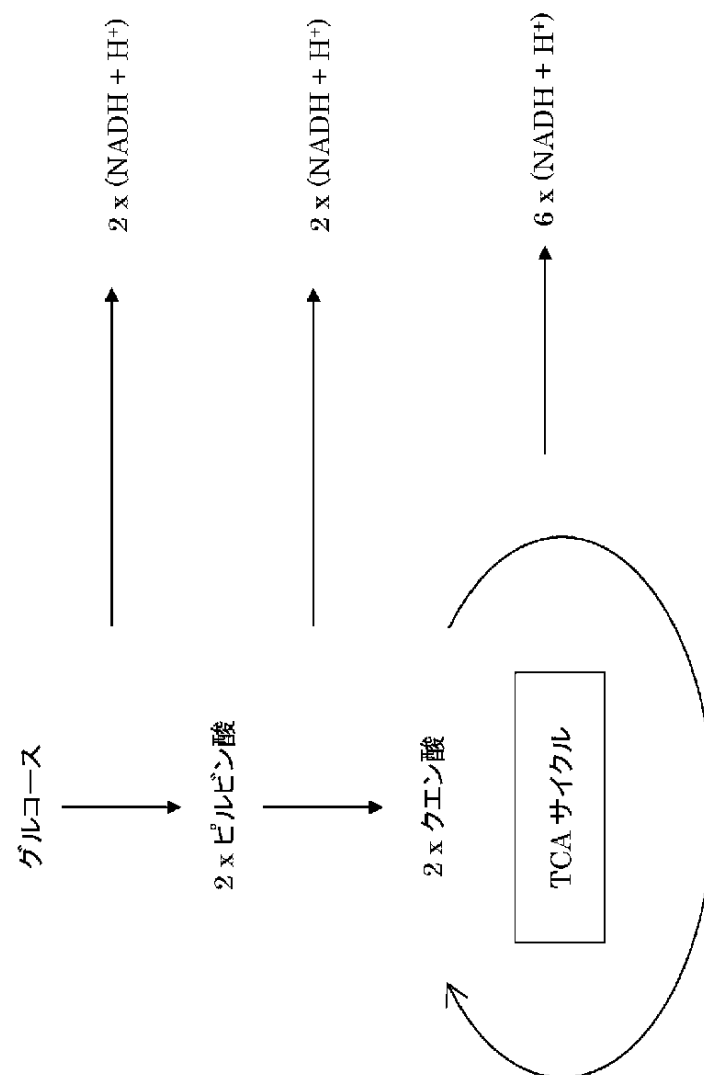
[請求項13] 前記光源が、前記糖及び前記固定剤を添加された、静止している前記検査対象溶液に励起光を照射する、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。

[請求項14] 死んでいる微生物が発する自家蛍光の強度と、生きており、糖を与えられた微生物が発する自家蛍光の強度と、の境界値以上の強度の蛍光を検出したときに、前記検査対象溶液に生きている微生物が含まれていたと判定する判定部を更に備える、請求項1ないし13のいずれか1項に記載の微生物の検出装置。

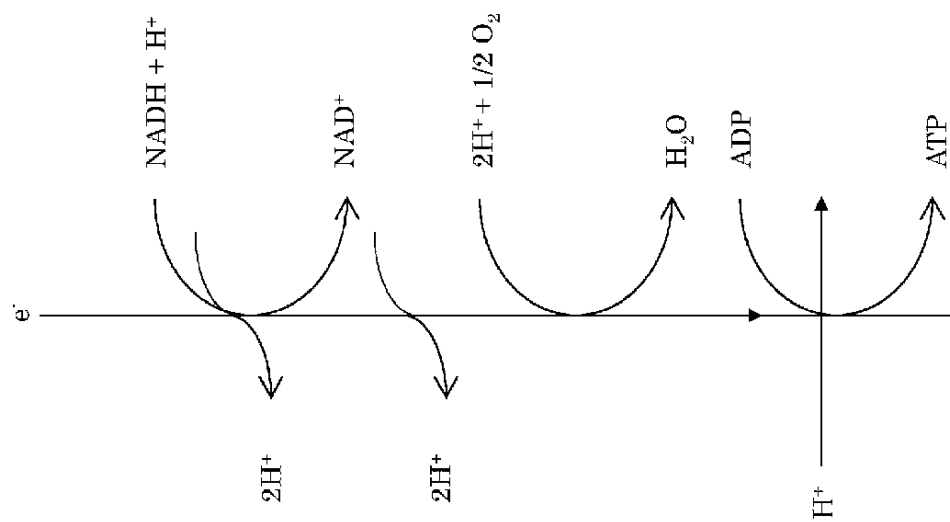
[図2]



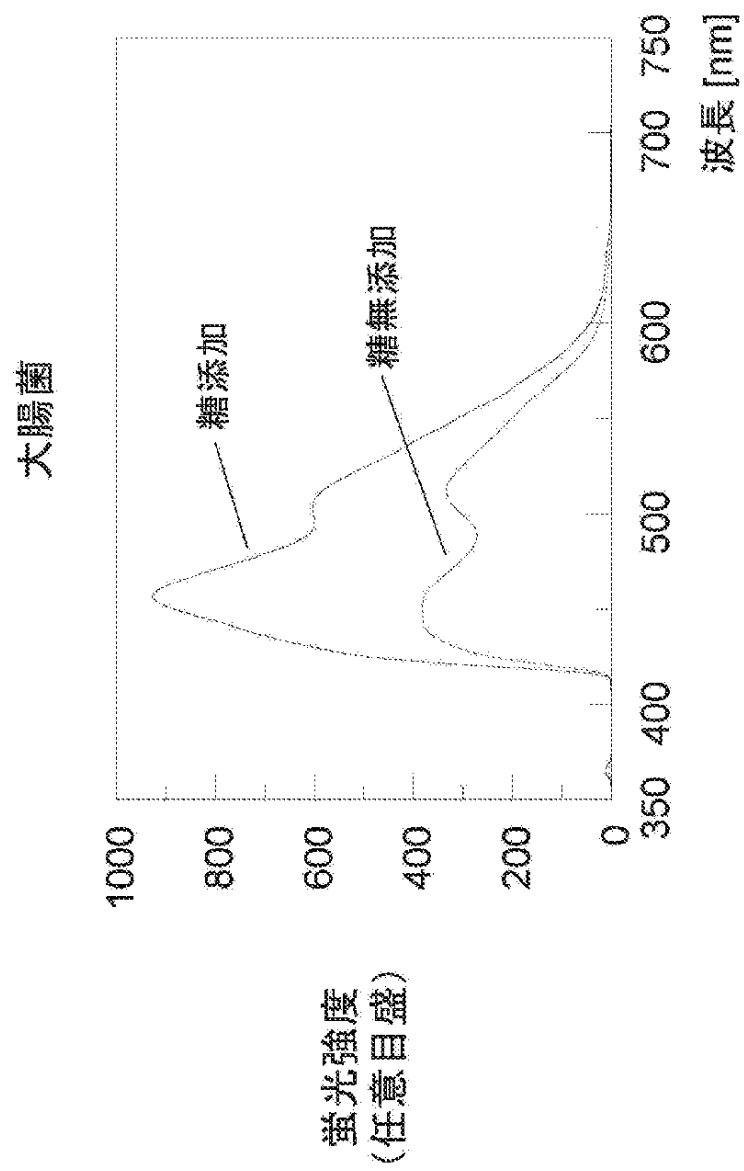
[図3]



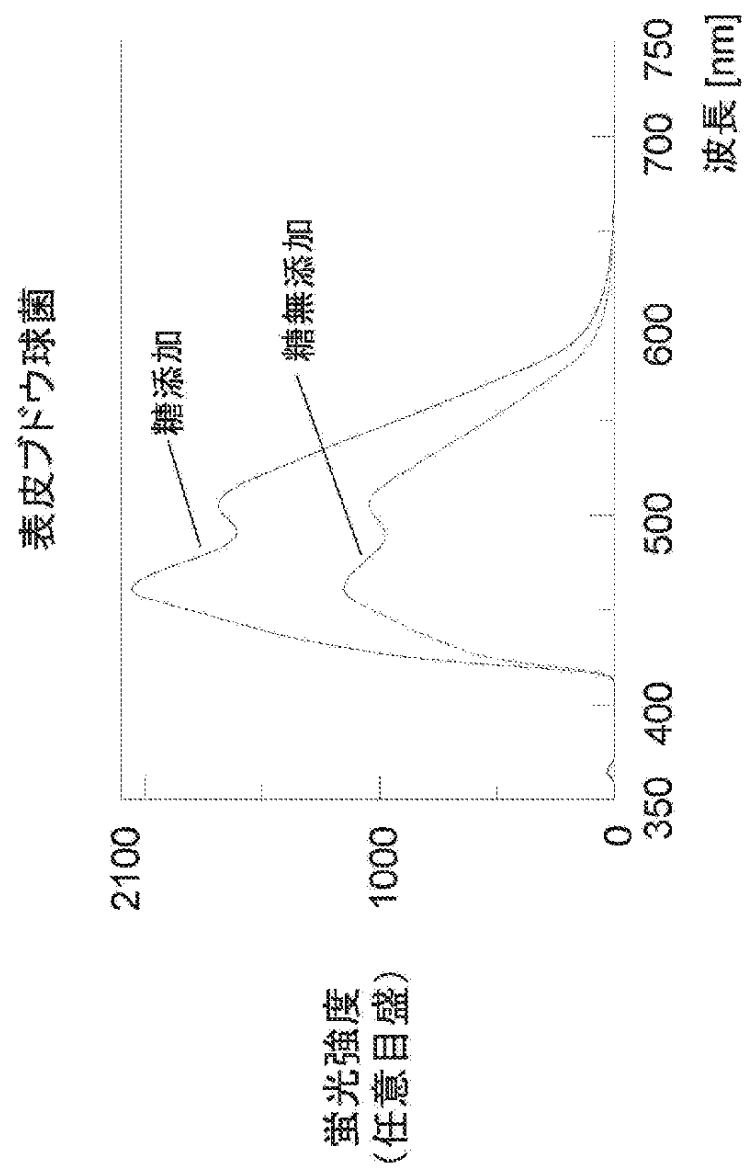
[図4]



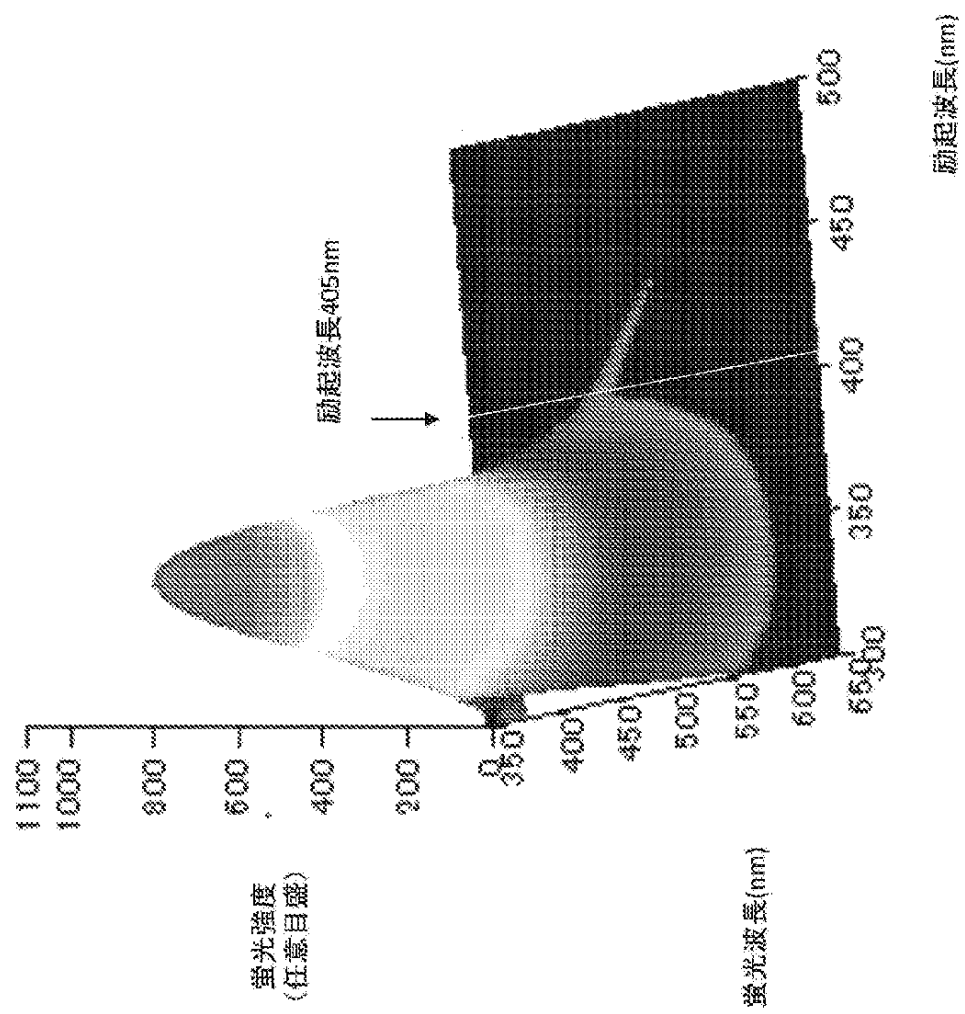
[図5]



[図6]

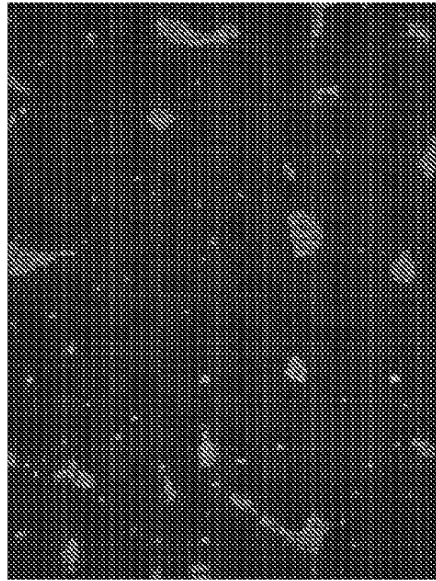


[図7]

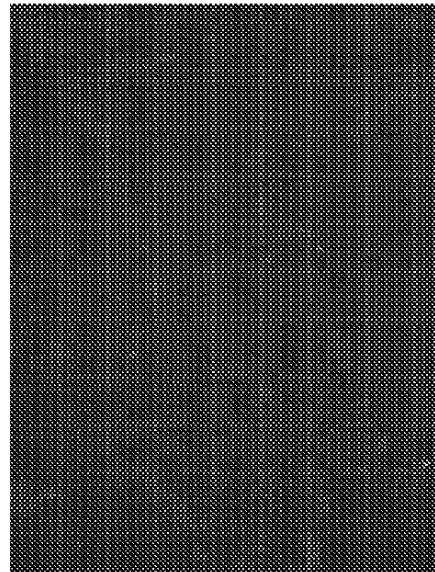


[図8]

大腸菌



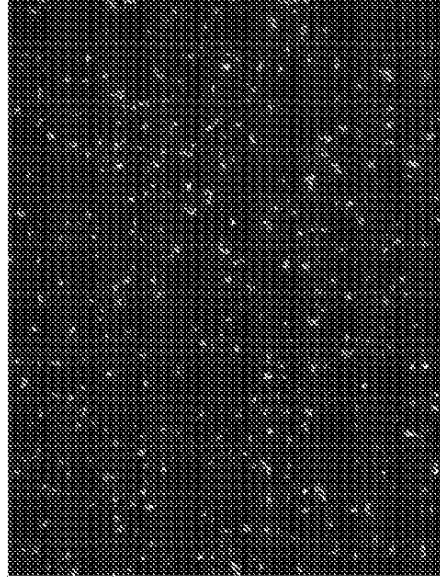
糖添加



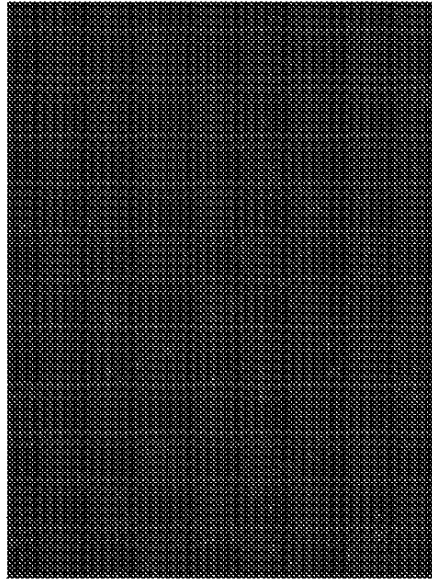
糖無添加

[図9]

表皮ブドウ球菌

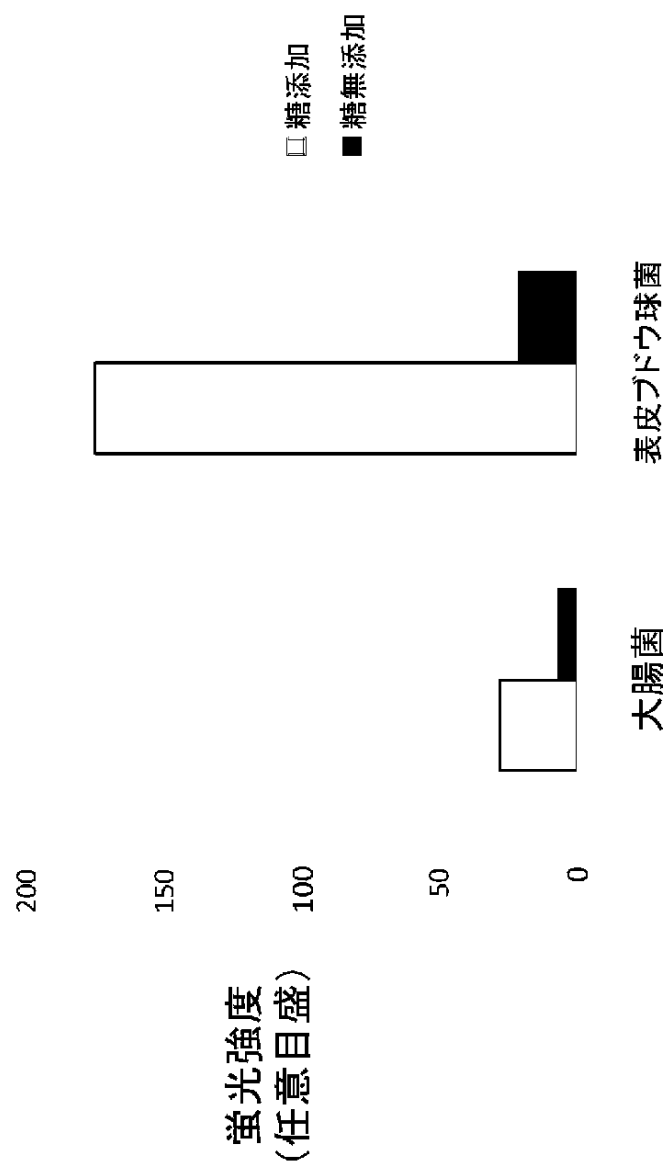


糖添加

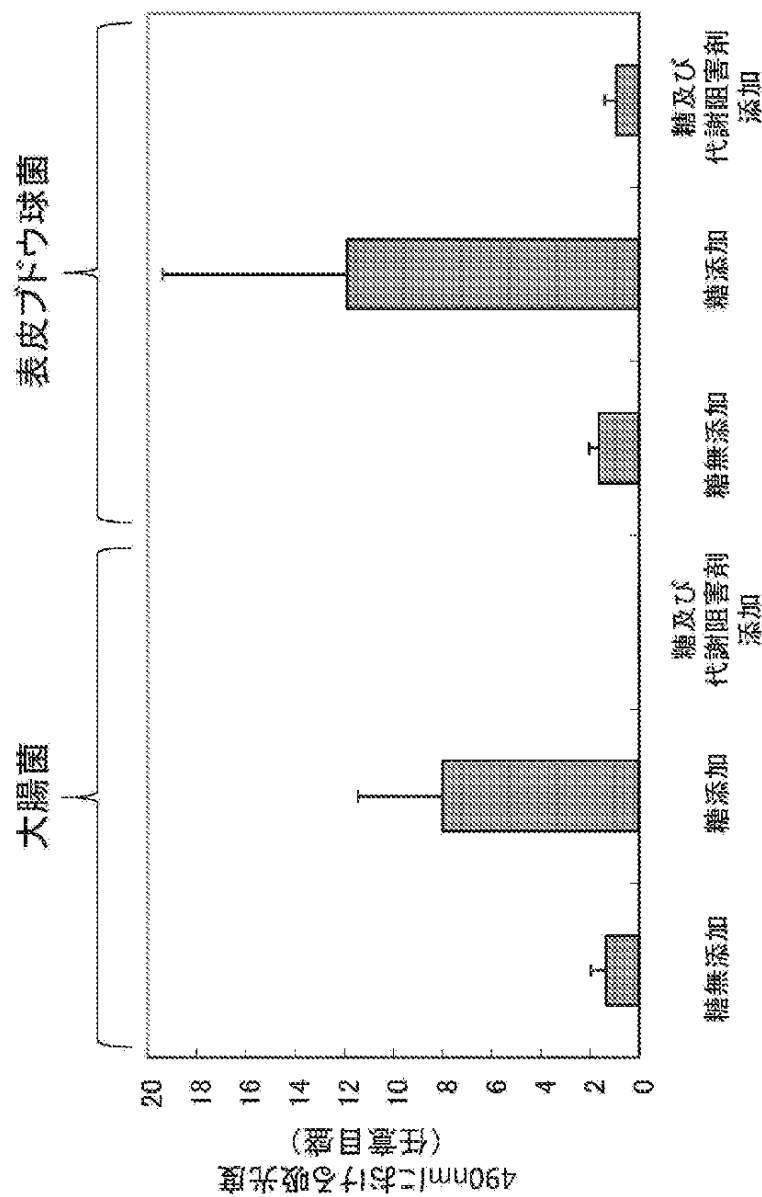


糖無添加

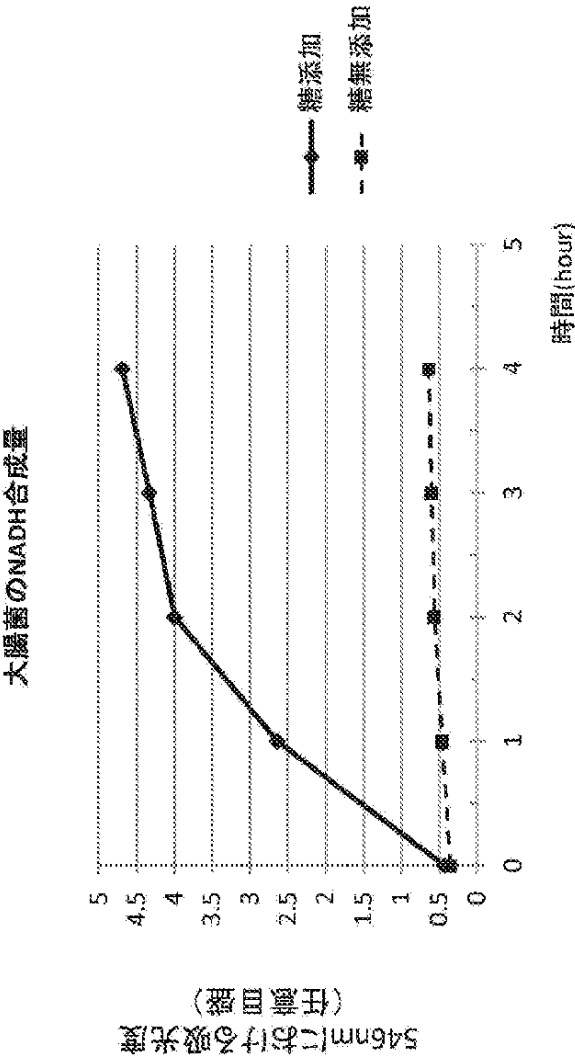
[図10]



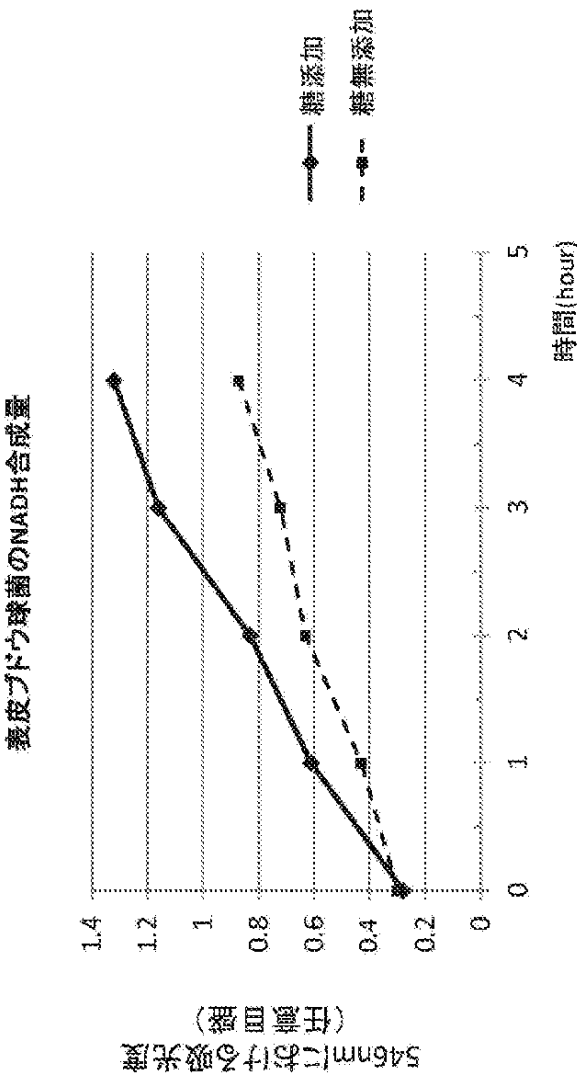
[図11]



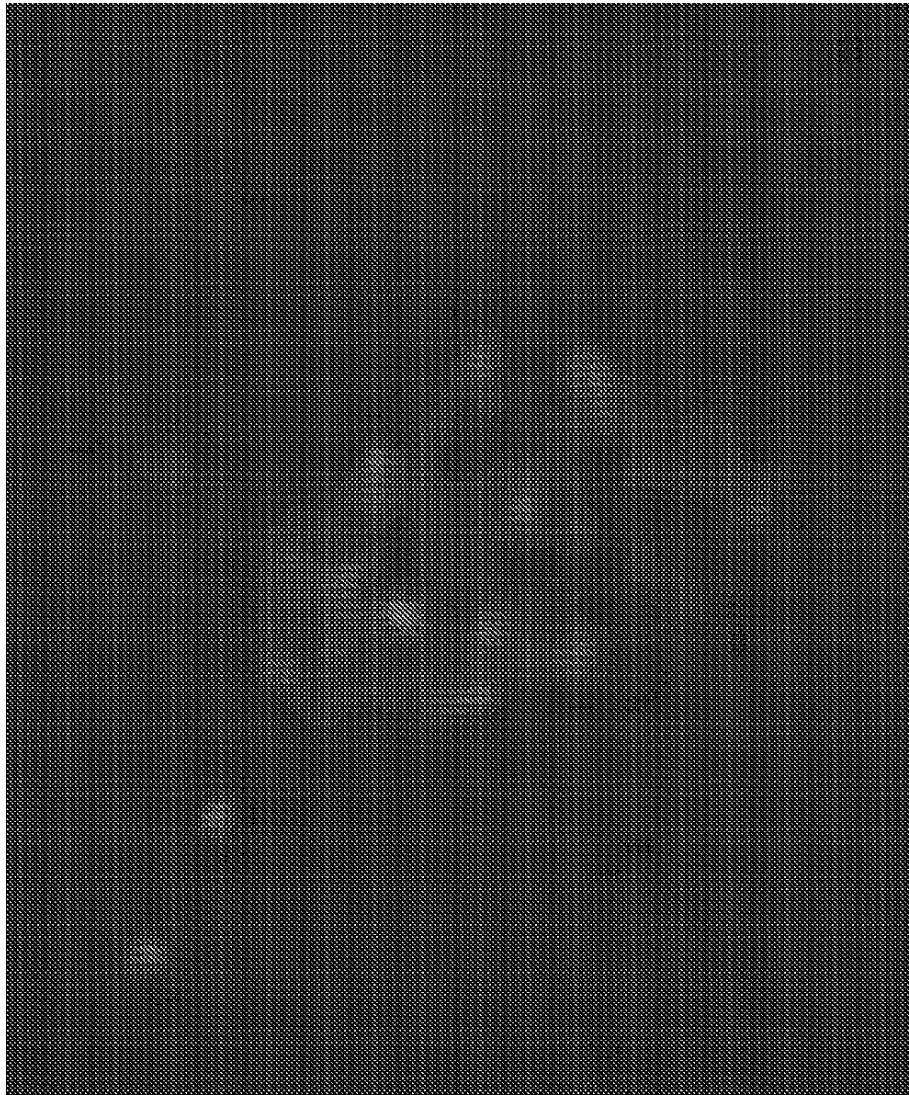
[図12]



[図13]

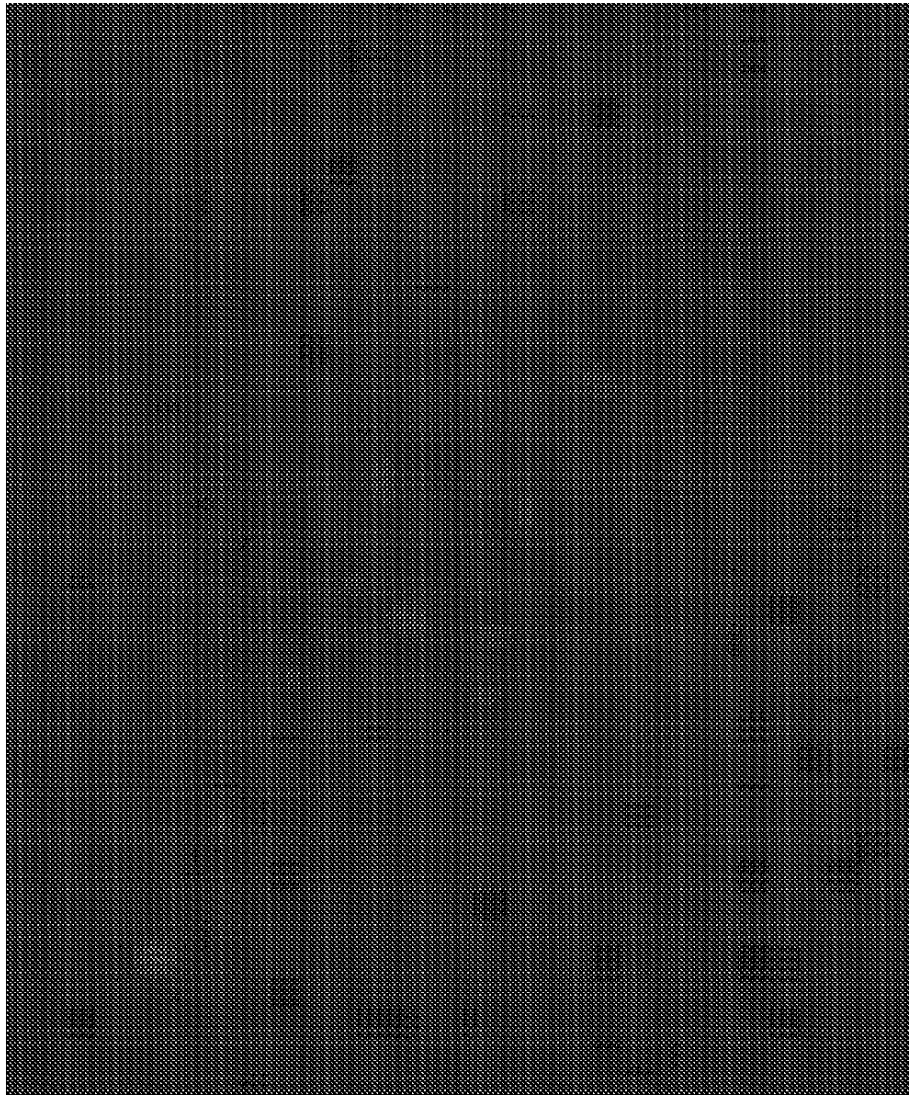


[図14]



退色前

[図15]



退色後

[図16]



退色かつUV照射後

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/084605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/34, C12Q1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), Nikkei Telecom

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIURA Takashi, et al., "Autofluorescence of Pathogenic Fungi", Tohoku J. exp. Med., 1964, Vol.82, No.2, pp.158-163, ISSN:0040-8727, particularly, pp.158-159	1-14
Y	Norio HASEGAWA et al., "Instantaneous bioaerosol detection technology and its application", azbil Technical Review, 2009, pages 2 to 6, particularly, pages 5 to 6	1-14
Y	DELLINGER Marc, et al., "Imaging of cells by autofluorescence: A new tool in the probing of biopharmaceutical effects at the intracellular level", Biotechnol. Appl. Biochem., 1998, Vol.28, pp.25-32, ISSN:0885-4513, particularly, Abstract, pp.30-31	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 2016 (26.02.16)

Date of mailing of the international search report

08 March 2016 (08.03.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/084605

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-183761 A (Azbil Corp.), 02 October 2014 (02.10.2014), paragraphs [0005] to [0028] & US 2014/0287455 A1 paragraphs [0005] to [0006], [0050] to [0068]	1-14
Y	WO 2014/185151 A1 (Konica Minolta, Inc.), 20 November 2014 (20.11.2014), paragraph [0025] (Family: none)	1-14
Y	JP 2002-034595 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 05 February 2002 (05.02.2002), paragraph [0011]; example 1 (Family: none)	1-14
A	JP 2014-168442 A (Azbil Corp.), 18 September 2014 (18.09.2014), & US 2014/0255980 A1 & EP 2775290 A1 & CN 104034706 A	1-14
A	JP 2014-153199 A (Rion Co., Ltd.), 25 August 2014 (25.08.2014), & US 2015/0346077 A1 & WO 2014/122889 A1	1-14
A	JP 2008-187911 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 21 August 2008 (21.08.2008), (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34, C12Q1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), 日経テレコン (Nikkei Telecom)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MIURA Takashi, et al., "Autofluorescence of Pathogenic Fungi", Tohoku J. exp. Med., 1964, Vol. 82, No. 2, pp. 158-163, ISSN:0040-8727, 特 に pp. 158-159	1-14
Y	HASEGAWA Norio, et al., "気中微生物リアルタイム検出技術とその応用", azbil Technical Review, 2009, pp. 2-6, 特に pp. 5-6	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.02.2016

国際調査報告の発送日

08.03.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鳥居 敬司

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4045

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	DELLINGER Marc, et al., "Imaging of cells by autofluorescence: A new tool in the probing of biopharmaceutical effects at the intracellular level", Biotechnol. Appl. Biochem., 1998, Vol.28, pp.25-32, ISSN:0885-4513, 特に Abstract, pp.30-31	1-14
Y	JP 2014-183761 A (アズビル株式会社) 2014.10.02, [0005] ~ [0028] & US 2014/0287455 A1, [0005]-[0006], [0050]-[0068]	1-14
Y	WO 2014/185151 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2014.11.20, [0025] (ファミリーなし)	1-14
Y	JP 2002-034595 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2002.02.05, [0011]、実施例1 (ファミリーなし)	1-14
A	JP 2014-168442 A (アズビル株式会社) 2014.09.18, & US 2014/0255980 A1 & EP 2775290 A1 & CN 104034706 A	1-14
A	JP 2014-153199 A (リオン株式会社) 2014.08.25, & US 2015/0346077 A1 & WO 2014/122889 A1	1-14
A	JP 2008-187911 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008.08.21, (ファミリーなし)	1-14