

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3998782号
(P3998782)

(45) 発行日 平成19年10月31日(2007.10.31)

(24) 登録日 平成19年8月17日(2007.8.17)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34
C 1 2 Q	1/66	(2006.01)	C 1 2 Q 1/66
			B

請求項の数 8 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平9-317792	(73) 特許権者	390019585
(22) 出願日	平成9年11月5日(1997.11.5)		ミリポア・コーポレーション
(65) 公開番号	特開平11-137293		MILLIPORE CORPORATI ON
(43) 公開日	平成11年5月25日(1999.5.25)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 821、ビレリカ、コンコード・ロード・ 290
審査請求日	平成16年2月9日(2004.2.9)	(74) 代理人	100067817
			弁理士 倉内 基弘
		(74) 代理人	100085774
			弁理士 風間 弘志
		(72) 発明者	瀬戸 進
			神奈川県横浜市泉区弥生台34-12
		(72) 発明者	門司 佳夫
			大阪府河内長野市南花台2-2-8
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物数の迅速測定法とそれに使用するろ過膜

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ろ過膜の少なくとも微生物を捕捉すべき面をATP分解酵素を含む溶液に浸漬するか、または少なくとも微生物を捕捉すべき表面にATP分解酵素を含む溶液を塗布または噴霧した後、乾燥処置を施し、そのろ過膜で検体をろ過し、その検体中に含まれている微生物をろ過膜上に捕捉し、その上から微生物中の発光反応成分を抽出するための液体抽出試薬を噴霧し、ついで発光試薬を霧状に噴霧して捕捉した微生物近傍位置で発光させ、その発光点数を発光測定装置を用いて計数する、微生物数を測定する方法。

【請求項2】

使用するATP分解酵素液の濃度が0.1 - 10 U / 10 ml である請求項1に記載の微生物数を測定する方法。 10

【請求項3】

前記発光試薬がルシフェリン - ルシフェラーゼである、請求項1または2に記載の微生物数を測定する方法。

【請求項4】

前記発光反応成分がアデノシン三リン酸である請求項1 - 3のいずれかに記載の微生物数を測定する方法。

【請求項5】

前記抽出試薬がアルコール類、エーテル類、エステル類、またはメタン、エタン、メチレンもしくはエチレン等のハロゲン誘導体、アセトニトリル、トリエチルアミンより選択 20

される一種以上である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の微生物数を測定する方法。

【請求項 6】

前記ろ過膜が、ポリビニリデンフルオライド、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリスルホンより選択される疎水性ろ過膜；及び親水性ポリテトラフルオロエチレン、親水性ポリビニリデンフルオライド、親水性ポリカーボネート、親水性ポリスルホン、親水性ポリアミドより選択される親水性プラスチック、アセチルセルロース、ニトロセルロース又はそれらの混合物等のセルロース系材料より選択される請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の微生物数を測定する方法。

【請求項 7】

前記ろ過膜が、ろ過後に疎水性を復元する親水化处理された疎水性ろ過膜である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の微生物数を測定する方法。

【請求項 8】

前記発光点数測定装置が、検出部に、遮光ハウジングと、該ハウジング内で前記ろ過膜を保持する標本ホルダと、該ハウジング内で該ろ過膜に接近して配置され 2 次元的に配列した検出端を有するテーパファイバーと、該ファイバーからの光を増幅し撮像する超高感度テレビカメラとを具備しているテーパファイバー入力式生物発光画像解析システム装置である請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の微生物数を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は食品、製薬、化粧品、電子工業等の分野で使用する水、原料、中間体或いは製品等の中に存在する微生物数を迅速、簡便且つ高感度で測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

食品、製薬、化粧品等の分野では周知のように使用する水、原料、中間体或いは製品中の微生物の管理が極めて重要である。又、電子工業でも使用する水の水質管理は重要であって、その中の微生物数は常に把握しておく必要がある。そのため、それらの工業分野においては微生物数測定が必須となっている。

【0003】

これらの微生物数の測定には、従来より検体中に存在する微生物を寒天平板培地上で培養しコロニーを生成せしめて検出する食品衛生検査指針に基く、いわゆる標準寒天平板法が一般的に用いられている。しかし、この方法は手間がかかる上に判定までに長時間を要し、微生物の有無の判定あるいは微生物数などの検査結果の判定が遅れるため、特に製造あるいは製品出荷の段階で判定待ち時間を要し、時間的経済的に大きなロスとなっている。したがって、より簡便な方法の開発が望まれていた。

【0004】

この要望に応じて種々の迅速検出方法の提案がなされており、例えば、検体液中の微生物数が十分に多い場合は、少量を小試験管に採取したり、又、微生物数がやや少ない場合はフィルターを用いてろ過捕捉して濃縮した後ろ過膜を取り外し、極く少量の無菌水等にフィルターを浸漬し微生物を懸濁した後、その一部を小試験管に採取し、これに抽出試薬および発光試薬を加えて微生物中のアデノシン三リン酸（以下 ATP と略す）の量をルミノメーターを用いて総光量を測定し、これから微生物数を算出するバイオミルネッセンス法が知られている（特開平 2 - 57197 号、特開平 2 - 163098 号等、春田三佐夫他「食品微生物検査の簡易化、自動化、迅速化」第 58 頁、サイエンスフォーラム（1985）日本）。

【0005】

しかしながら、これらの方法は、微生物数が少ない検体液の場合（例えば $10^3 \sim 10^4$ 個/ml 以下）では抽出される ATP 量が少なくルミノメーターの測定限界以下のため検出が不可能であり、かかる場合には例えば検体液の微生物をろ過捕捉したろ過膜をその微

10

20

30

40

50

生物の増殖に適した栄養成分を含む培地で培養を行い、微生物数を検出限界以上に増加させてから総光量を測定し微生物数算出を行わなければならないという高度な技術を必要とする等問題点があり、より一層の改善が求められていた。

【0006】

この問題を解決するために、本発明者等はPCT公開WO92/14838号において、親水性のろ過膜（親水性ポリテトラフルオロエチレン、親水性ポリビニリデンジフルオリド、親水性ポリカーボネート、親水性ポリスルホン、親水性ポリアミド等のプラスチック系材料やアセチルセルローズ、ニトロセルローズ又はそれらの混合物等のセルローズ系等の材料からなる例えば孔径約0.1～1μmのろ過膜）を格子状の疎水性区画壁（ポリフルオルエチレン、ポリビニリデンジフルオリド、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン等からなる区画壁でその高さはろ過膜面上例えば約0.01～0.05mm、その巾は例えば約0.1～2mmの区画壁）で区画して区画壁により完全または実質的に隔離された多数の出来るだけ小面積（例えば2mm²以下）の親水性区画を形成してなる、ろ過膜要素を作製し、検体液を大気下にろ過した後該検体液中に含まれている微生物を上記区画内に捕捉し、乾燥を行った後、各区画の堰を越すことなろ過膜を湿らせる程度の抽出試薬、発光試薬の必要最小限度の量、すなわち、捕捉された微生物からの抽出成分および発光成分が他区画へ拡散流出を防止することなく、且つ区画内で希釈拡散を最小限にする程度の量で、微粒子状のスプレーを行い、得られた標本を高感度の生物発光画像解析システムを適用して処理することにより、微生物数由来の発光点のみを撮像し、当該課題を解決する方法を見出したことを特徴とする検体中の微生物数測定方法を提供した。

10

20

【0007】

この微粒子状のスプレーの方法によれば、微生物から抽出されたATP成分（発光成分）のオーバーフローが防止される結果、発光点の発光レベルが高くなり、検出効率が高められ、その結果、微生物の培養をまったく必要としないか、あるいは短時間の培養しか必要としない迅速な微生物数の計数が可能となった。

【0008】

更に、検体液中に存在する微生物数が少ない場合により簡便に且つ正確に微生物数を検出、計数するためには、発光成分を更に局在化する必要がある。そこで本発明者等は先願発明（特開平5-328995号、平成4年4月1日出願）において、上記WO92/14838号に記載されたるろ過膜要素を用いて、微生物数が10²個以下/ろ過膜要素、好ましくは50個以下/ろ過膜要素を含む検体液のろ過を行った後、ろ過膜上に分散捕捉された微生物に対して特にATPの良抽出剤として沸点が120以下の揮発性大気下、抽出剤を微粒子状に噴霧した後、大気下、抽出剤を速やかに揮散させ、次いでルシフェリン-ルシフェラーゼ系の発光試薬を高濃度で且つ微粒子状に噴霧する方法により発光反応速度を増加させ結果的に発光点毎の発光量を増加させることができた。

30

【0009】

かかる方法を実施することにより、ろ過膜上に捕捉された微生物に対し、極めて少量の抽出剤および発光試薬と微生物が所在する局所付近でATP抽出および発光反応が起るため、微生物の存在局所の極近傍で発光するので前述した生物発光画像解析システム装置を用いる発光点の撮像、画像処理、解析がより効果的に行なわれるようになった。

40

【0010】

しかしながら、上記のように親水性区画と疎水性隔壁とを有するろ過膜要素を用い、大気下、ATP抽出液と発光液とを順に霧状に噴霧（スプレー）する方法、あるいは更に抽出液を揮発性のものにした方法を、食品、製薬、化粧品あるいは電子工業において実際に使用されている純水、原料、中間品あるいは製品から採取された検体液（実液）中に存在する少数個の微生物を検出・計数する場合には、未だ若干の問題が残されている。

【0011】

例えば食品工業において、中間品あるいは製品であるビールあるいは酒中に含まれる微生物の内、1個当たりATP含量の大きい酵母の場合は計数上問題は少ないが、酵母に対して

50

A T P 含量が 1 / 1 0 ~ 1 / 1 0 0 程度である細菌類を検出し、計数する場合には問題が少なくない。その理由は細菌がろ過捕捉されている分離膜自身からのノイズ発光や、実液中に含まれるノイズ発光が強いため、微生物（細菌）からのみ由来する発光点をバックグラウンド（ノイズ発光）と明確に識別できない場合がある。その場合は実液をろ過した後その微生物の増殖に適した栄養寒天培地あるいは栄養培地を滲み込ませたバット上に置き、25 - 60 で 2 - 20 時間培養を行って微生物を増殖させた後ろ過膜で捕捉された細菌の捕捉極近傍内で A T P 抽出とこれにつづく発光を行って微生物由来の発光を出来るだけ強くして、ノイズ発光との差を大きくしてから、発光画像解析システムを用いて細菌数の検出・計数を行う必要がある。最近、ノイズ発光を抑制しようとする試みがなされ、例えば Boeringer 社のかかるキット取り扱い説明書によれば、発光試薬に、A T P 消去剤を加えてバックグラウンドノイズを抑制する方法が提案され、Lumac 社においても同様の提案がなされている。しかしこれらの方法では本来的に検出すべき微生物由来の A T P の発光をも抑制するため、微量の微生物を対象に迅速に計数をするには適用しがたい。

10

【 0 0 1 2 】**【 発明が解決しようとする課題 】**

以上の背景に基づき、本発明は、ろ過膜上に捕捉した微生物の計数に微生物由来の発光に影響を与えずにノイズを消去し、微生物数のみをより正確且つ簡便に検出乃至計数する方法及びそれに使用するためのろ過膜を提供することを課題とする。

【 0 0 1 3 】**【 課題を解決するための手段 】**

本発明者等は、上記の出願に開示している（PCT公開WO92/14838号、特開平6-237793号）ろ過膜要素を前処理する方法即ち、A T P 分解酵素液に浸漬したろ過膜を使用する方法が、極めて優れていることを見出し本願発明を想到するに至った。すなわち、本発明はA T P 分解酵素液に浸漬し、乾燥したろ過膜を用いて、微生物を含む液体をろ過してろ過膜に捕捉し、必要に応じ短時間培養し、液状抽出試薬、次いで液状発光試薬を細かい霧状に噴霧して微生物及びその近傍に接触させることにより、ノイズ発光点のない目的とする微生物由来の発光点のみを検出する方法を見出したものである。また、必要に応じてA T P 分解酵素溶液を濾過膜の微生物を捕捉する片面のみに噴霧あるいは塗布して乾燥後、上述のごとく液体を濾過する工程に供し、以下同様にして微生物由来の発光点のみを検出して構わない。

20

30

本発明はまた、これらの微生物の迅速測定法に使用するためのろ過膜として上記の優れた特性を発揮するろ過膜自体を提供する。すなわち、本発明のろ過膜は少なくとも微生物を捕捉すべき面のA T P が除去されまたは存在しないろ過膜である。このようなろ過膜は、A T P 分解酵素を含む溶液に浸漬するか、または少なくとも微生物を捕捉すべき表面にA T P 分解酵素を含む溶液を塗布または噴霧した後、乾燥処置を施することにより得られたものである。

本発明の原理は次の通りである。所定濃度以上のA T P 分解酵素液に浸漬し乾燥したろ過膜を用い、検体中の微生物を吸引ろ過等により付着させ、十分洗浄ろ過して、乾燥する。次いで抽出試薬により発光成分例えばA T P を抽出する。抽出試薬は例えばメタノールあるいはエタノールのような揮発性のものでもよいし、そうでなくてもよい。抽出されたA T P にルシフェリン・ルシフェラーゼからなる発光試薬を噴霧して発光させることにより検出精度が著しく高まる。更に、高精密の発光画像解析システムを用いて微生物数の検出・計数を行なうことにより、微量な発光成分をより正確に検出計数することができる。本発明を採用することによって、ろ過膜自身からのノイズ発光点を完全には消去出来ず、微生物由来の発光点とは識別できなかった従来法に比べ、検出精度を著しく高められ、その計数値は極めて精度、信頼性が高くなった。

40

【 0 0 1 4 】**【 発明の実施の形態 】**

以下に本発明をより詳細に説明する。本発明では、親水性区画を格子状の疎水性区画で取り囲んで形成した特殊ろ過膜や、疎水性ろ過膜、例えばP V D F（ポリビニリデンフルオ

50

ライド)、PTFE(ポリテトラフルオルエチレン)、PE(ポリエチレン)、PC(ポリカーボネート)、PP(ポリプロピレン)、PA(ポリアミド)、PS(ポリスルホン)等、従来からこの目的に使用されている任意のろ過膜を使用することができる。

次に、ろ過膜を例えば0.1-10U(Apyrase、0.085~8.5mg protein / 10ml、sigma社製)のATP分解酵素液に浸漬し、室温~35、10分間以上保温した後、取りだしノイズ発光成分の二次汚染の無いように十分に注意して乾燥して、ろ過に使用する。(乾燥は60、10~30分で加熱乾燥するのが望ましい。)

ろ過時、ろ過膜に捕捉される検体液中の微生物数は検出精度を高めるために 10^2 個/膜以下、更には50個/膜以下が望ましい。

次に、ATPの液状抽出試薬としては、アルコール類、エーテル類、エステル類、またはメタン、エタン、メチレンもしくはエチレン等のハロゲン誘導体、アセトニトリル、トリエチルアミン等が使用できる。沸点120以下の抽出剤で噴霧後、揮散しやすいものは特に好適である。もし残留すれば発光酵素の阻害が生じるので注意して除去する必要がある。

次に、液状発光試薬(例えばキッコーマン社、ルシフェールLU)を噴霧して発光させる。

これらの液状試薬は直径20 μ m以下、好ましくは5~10 μ mの微粒子のミスト状に噴霧する。

噴霧手段としては、超音波微粒子噴霧器、特に自動式超音波微粒子噴霧器を使用するとよい。

【0015】

実際の工程では、まず、カップ状ろ過容器等例えば日本ミリポアリミテッド製の「マイクロフィル、ステリフィル(商品名)」等に前記のろ過膜を装着して検体液をろ過し、微生物をろ過膜上に捕捉する。

次にろ過器からろ過膜を取り外し、乾燥後、標本ホルダーにのせ、ろ過膜の上からATP抽出試薬を、超音波式噴霧器(松下電器製等)を用いてろ過膜上に噴霧(スプレー)する。更に、ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光試薬を上記噴霧器により噴霧添加し、発光せしめる。続いて、発光したろ過膜(以下標本と略す)をカメラ視野内にセットし、生物発光画像解析システム装置(例えばRMDS、日本ミリポア(株)製(商品名))を用いて、発光を累積させた後画像処理を行いノイズと見なされる発光を消去し残る発光点を計測して、微生物数を測定する。

【0016】

ここで用いる生物発光画像解析システムは、従来の測定装置に比べ、微弱な発光であっても高感度に検知し且つ光を著しく強めて処理することができ、しかもデータの処理及び解析も早く簡便であり、さらに本発明の特殊なる過膜及び試薬の噴霧器を用いるスプレー効果とが相乗して、1個の微生物細胞をも検出できる新規で画期的なもので、極めて優れた微生物測定法を実現するのに寄与している。

【0017】

システムの概要は図1~2のように、このシステムは上記の抽出試薬及び発光試薬で処理した後のろ過膜(標本)5を支持するための標本ホルダー9、標本ホルダーの下に置かれた全反射板6、遮光ハウジング8、ろ過膜に出来るだけ接近させて配置され発光を2次元的に検出するテーパファイバー7、光増幅部及び撮像管からなる超高感度テレビカメラ10、カメラコントローラー11、イメージプロセッサ12、データ解析装置13、テレビモニター14から構成されており、特に日本ミリポア(株)製、RMDS(商品名)のテーパファイバー入力式あるいは同様の測定機能を有するものが好ましい。超高感度テレビカメラとしては冷却型固体撮像素子(CCD)を用い、約-30~-120に冷却することにより、カメラ自身からのノイズを抑制して微弱発光を蓄積できるテレビカメラを用いることができる。例えば浜松ホトニクス社製の冷却CCDデジタルイメージングシステムがある。別法として、撮像部のテーパファイバー7及び超高感度テレビカメラ10を反転させ、その上に標本をセットした標本ホルダーを配置して操作することもで

10

20

30

40

50

きる。標本5とテーパーファイバー7はなるべく接近させてセットするのが望ましい。それによって測定感度が著しく向上され、また従来必要であった走査が不要となる。なお、必要に応じて測定を自動化するため抽出試薬及び発光試薬の噴霧器や標本の搬送装置などを組み合わせてセットすることも出来る。

【0018】

測定は、発光処理した前記標本（微生物を保持したろ過膜）を保持した標本ホルダー9をテーパーファイバー面に密着させて置き、超高感度テレビカメラ、カメラコントローラー及びイメージプロセッサを用いて2次元的に光子を30～180秒間、例えば120秒間蓄積し、微生物からの発光を撮像し、データ解析装置により画像処理を行い発光ノイズを消去して微生物由来の強い発光のみを残してテレビモニターに表示する。この処理によって微生物由来以外の発光がノイズとして消去されるので測定された発光点数は微生物数と略一致する。

10

【0019】

ここで用いる生物発光画像解析システムは、従来の測定装置に比べ、微弱な発光であっても高感度に検知し且つ光を著しく強めて処理することができ、しかもデータの処理及び解析も早く簡便であり、さらに本発明の特殊なる過膜及び試薬の噴霧器を用いるスプレー効果とが相乗して、1個の微生物細胞をも検出できる新規で画期的なもので、極めて優れた微生物測定法を実現するのに寄与している。

【0020】

【作用】

本発明では、ATP分解酵素液に浸漬処理したろ過膜を用いて微生物を捕捉し、続いて抽出試薬液（特にATP抽出試薬液）及び発光試薬（特にルシフェリン-ルシフェラーゼ試薬）を適量微粒子の状態に噴霧添加するので、特にろ過膜由来のノイズ成分を消去できて、極めて微量の菌体成分をも容易に高精度に測定することが可能となった。

本発明の方法はろ過膜のATP分解酵素処理により、微生物の発光に全く影響なくろ過膜自身からのノイズの発生を防ぎノイズ発光が著しく低下するため、従来法を超える明瞭な発光点を得られ、S/N比が増大し、検出が容易になるので、培養が必要でも短時間で済み、測定が迅速に行える。

20

【0021】

【実施例】

実施例1

疎水性の格子を有する親水性のPVDF膜（RMHV、47mm、日本ミリポア製）およびポリカーボネート膜（HTTP、47mm、日本ミリポア製）をアピラーゼ液（2U/pH7、Hepes緩衝液10ml、sigma製）に30、30分浸漬した後、取り出し、クリーンベンチ内で風乾する。ろ過膜をろ過器（ステリフィル、日本ミリポア製）に装着する。100mlの無菌水を加え吸引ろ過する。ろ過膜を取り外し、風乾して標本ホルダーに載せる。超音波式噴霧器（松下電工製）を用いてATP抽出試薬を20秒間噴霧する。再度、風乾で抽出試薬中のアルコールを十分揮散させてから、その上を中空のプラスチック製カバーで覆い、更に、発光試薬を同超音波式噴霧器で7秒間噴霧して発光させる。直ちに、標本を生物発光画像解析機のカメラ上に置いて2分間フォトカウンティングを行ないテレビモニター上に撮像されるバックグラウンドの全光子数（420×420pixel中の光子総数）と発光点数を測定して表1の結果を得た。

30

40

【0022】

【表1】

ろ過膜の種類	RMHV		HTTP	
	有り	無し	有り	無し
アピラーゼ処理	有り	無し	有り	無し
全フォトン数 ⁽¹⁾	259876	459629	44150	65460
輝点が検出された膜 ⁽²⁾	1	9	0	10

10

(1) は試験したろ過膜20枚の平均値を示す

(2) は試験したろ過膜20枚中で自動計数により輝点が検出された膜の数を示す

【0023】

実施例2

グルコース・ペプトン培地（日本製薬製）5mlを含む中試験管に1白金耳のサッカロミセスセルビシエ（*Saccharomyces cerevisiae* IFO 0209）を接種して30、1夜培養した後、無菌水で約100CFUになるように希釈し、その0.2mlを検体液とした。格子付き特殊ろ過膜（RMHV）をアピラーゼ液（IU/pH7、Hepes緩衝液10ml）に30、1時間浸漬し、風乾し60、30分加熱した後、ろ過器に装着する。無菌水20mlを加えた上に、上述の検体液0.2mlを加えてから吸引ろ過した。更に、無菌水20mlでろ過洗浄した後、ろ過膜を取り外し標本ホルダーにのせ風乾する。中空のプラスチック製カバーでその上を覆い、超音波式噴霧器を用いて抽出試薬を20秒間噴霧し、5分以上風乾してから、同噴霧器を用いて発光試薬を7秒間噴霧して発光させる。直ちに標本を測定機のカメラ上において2分間フォトンカウンティングを行ない、テレビモニター上に撮像される発光点を測定して表2の結果を得た。

20

30

【0024】

【表2】

アピラーゼ処理	輝点数/膜 ⁽¹⁾	輝度 ⁽²⁾	S/N比 ⁽¹⁾
有り	22、18、17	99152、92578、86771	91.3、85.2、79.9
無し	21、20、16	78308、72129、69103	62.1、57.2、54.8

40

(1) ろ過膜3枚を試験して各膜の輝点数および輝点のS/N比を平均で示す

(2) 各膜ごとの全輝点を20×20 pixelの光子量で測定して平均で示す

【0025】

実施例3

50

ソイビーンカゼインダイジェスト培地（日本製薬製）5 ml を含む中試験管に1白金耳のエシェリシエア コリ (*Escherichia coli* IFO 3301) を接種し、30℃で1夜培養した後、無菌水で約100 CFU/mlになるように希釈し、その0.2 ml を検体液とした。ポリカーボネート膜（HTTP）をアピラーゼ液（2 U / pH 7、Hepes 緩衝液10 ml）に30℃、2時間浸漬し、風乾した後、ろ過器に装着する。無菌水で十分洗浄ろ過し、無菌水20 ml を加えた上に、上述の検体液0.2 ml を加えてから吸引ろ過した。更に、無菌水20 ml で洗浄ろ過した後、ろ過器からろ過膜を取り外し、ソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地上において30℃、4時間培養した。ろ過膜を取り出し、標本ホルダーに載せ風乾する。中空のプラスチック製カバーでその上を覆い、超音波式噴霧器を用いて抽出試薬を20秒間噴霧し、5分間以上風乾してから、更に、同噴霧器を用いて高濃度発光試薬（通常の3倍濃度）を7秒間噴霧して発光させる。直ちに、標本を測定器のカメラ上に置いて2分間フォトンカウンティングを行ない、テレビモニター上に撮像される発光点を測定して表3の結果を得た。

10

【0026】

【表3】

アピラーゼ処理	輝点数/膜 ⁽¹⁾	輝度 ⁽²⁾	S/N比 ⁽¹⁾
有り	17、16、20	2668、2461、3181	7.8、7.3、9.3
無し	21、18、15	3416、3150、2935	3.4、4.0、4.5

20

(1) ろ過膜3枚を試験して各膜の輝点数および輝点のS/N比を平均値で示す

(2) 各膜の全輝点を40×40 pixelの光子量で測定して平均で示す

【0027】

実施例4

アピラーゼ液（1 U / pH 7、Hepes 緩衝液10 ml）に30℃、1時間浸漬し、風乾したポリカーボネート膜（HTTP、48 mm、日本ミリポア（株）製）60×30分加熱ろ過器に装着する。缶ビール（350 ml）とトマトジュース培地（Difco製）5 ml を含む中試験管に1白金耳のラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis* IFO 3345) を植菌し30℃、1夜培養して無菌水で約100 CFU/mlになるように希釈した菌液を0.2 ml 加えて吸引ろ過する。無菌水20 ml で洗浄ろ過した後、ろ過膜を取り外しトマトジュース寒天培地上に置いて30℃、16時間培養した。培養終了後、ろ過膜を取り出し標本ホルダーに載せ風乾する。中空のプラスチック製カバーでその上を覆い、超音波式噴霧器を用いて抽出試薬を20秒間噴霧し、5分間以上風乾してから、同噴霧器を用いて高濃度発光試薬（常用の3倍濃度）を7秒間噴霧して発光させる。直ちに、標本を測定機のカメラ上に置いて2分間フォトンカウンティングを行ない、テレビモニター上に撮像される発光点を測定して表4の結果を得た。

30

40

【0028】

【表4】

アピラーゼ処理	輝点数/膜 ⁽¹⁾	輝度 ⁽²⁾	S/N比 ⁽¹⁾
有り	23、 18、 19	8236、 7938、 9101	30.5、 29.4、 33.7
無し	21、 17、 24	11396、 8610、 10578	13.8、 10.5、 12.9

(1) ろ過膜3枚を試験して各膜の輝点数および輝点のS/N比の平均を示す

10

(2) 各膜の全輝点を40×40 pixelの光子量で測定して平均で示す

【0029】

【発明の効果】

本発明によれば次の効果が得られる。

(1) 本発明のろ過膜及び方法はろ過膜のATP分解酵素処理により、ろ過膜自身からのノイズの発生を防ぐことを可能にする(実施例1)。

20

(2) 本発明のろ過膜及び方法によれば微生物の発光に影響することなく又ノイズ発光が著しく低下するため、従来法を超える明瞭な発光点が得られ、微少量の微生物も検出できる(実施例2、3、4)。

(3) 本発明のろ過膜及び方法によればS/N比が増大し、従来法に比べ検出が容易になるので、培養の必要がないが短時間の培養ですみ、測定が即時または迅速に行える(実施例2、3、4)。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に使用できる装置の該略図である。

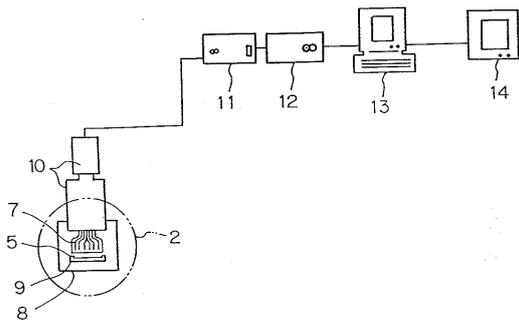
【図2】図1の部分拡大図である。

【符号の説明】

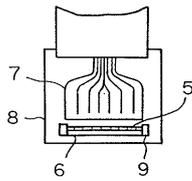
30

- 5 試薬で処理した後のろ過膜(標本)
- 6 全反射板
- 7 テーパーファイバー
- 9ホルダー
- 10 光増幅部及び撮像管からなる超高感度テレビカメラ
- 11 カメラコントローラー
- 12 イメージプロセッサ
- 13 データー解析装置
- 14 テレビモニター

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

審査官 引地 進

- (56)参考文献 特開平06 - 237793 (JP, A)
特開平08 - 131199 (JP, A)
特開平08 - 224096 (JP, A)
特開平02 - 163098 (JP, A)
特開平06 - 129988 (JP, A)
特開平05 - 328995 (JP, A)
国際公開第00 / 039329 (WO, A1)
国際公開第92 / 014838 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00