

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5160123号  
(P5160123)

(45) 発行日 平成25年3月13日(2013.3.13)

(24) 登録日 平成24年12月21日(2012.12.21)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 Q 1/04 (2006.01)** C 1 2 Q 1/04  
 C 1 2 M 1/42 (2006.01) C 1 2 M 1/42

請求項の数 5 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2007-92494 (P2007-92494)                  (22) 出願日 平成19年3月30日 (2007.3.30)                  (65) 公開番号 特開2008-245593 (P2008-245593A)                  (43) 公開日 平成20年10月16日 (2008.10.16)                  審査請求日 平成22年3月24日 (2010.3.24)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 305027401                  公立大学法人首都大学東京                  東京都新宿区西新宿二丁目8番1号                  (74) 代理人 100094053                  弁理士 佐藤 隆久                  (72) 発明者 内田 諭                  東京都八王子市南大沢一丁目1番地 首都                  大学東京南大沢キャンパス内</p> <p>審査官 清水 晋治</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の同定評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一对の電極が設けられた基板に、測定対象となる微生物を含有する、当該微生物の大きさより十分厚さのある試料液を供給し、前記電極間に所定の電圧を印加して前記微生物を前記試料液内を誘電泳動させる工程と、

前記誘電泳動により前記試料液内を移動する前記微生物を撮影して動画を取得する工程と、

前記撮影した動画を画像解析することにより、前記試料液内を移動する前記微生物の初期位置、t秒後の位置、及び前記初期位置と前記t秒後の位置の間を移動する前記微生物の軌跡を取得し、得られた前記初期位置、前記t秒後の位置及び前記軌跡のデータから、個々の前記微生物の移動の挙動を調べ、前記移動の挙動から少なくとも前記微生物の同定または前記微生物の評価を行う工程と

を具備し、

前記微生物を撮影して動画を取得する工程は、共焦点レンズを含む光学系により照明光を前記試料液内の前記微生物に対して照射し、当該微生物を撮影して、前記試料液からその厚さ方向に領域を選択して結像させ、前記移動する微生物の動画を得ることにより行う

微生物の同定評価方法。

【請求項2】

前記微生物の同定または前記微生物の評価を行う工程において、前記微生物の移動の挙

動から少なくとも前記微生物の移動速度または移動の方向を測定し、少なくとも前記微生物の同定または前記微生物の評価を行う、

請求項 1 に記載の微生物の同定評価方法。

【請求項 3】

前記微生物の同定または前記微生物の評価を行う工程において、前記動画として撮影された前記微生物のうちの一部の微生物を選択して前記微生物の移動の挙動を調べる、

請求項 1 または 2 に記載の微生物の同定評価方法。

【請求項 4】

前記微生物の同定または前記微生物の評価を行う工程において、前記動画として撮影された前記微生物の全てについて移動の挙動を調べる、

請求項 1 または 2 に記載の微生物の同定評価方法。

10

【請求項 5】

前記微生物を誘電泳動させる工程において、前記電極として透明電極を用いて行う、

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の微生物の同定評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は微生物の同定評価方法に関し、特に、誘電泳動を用いた微生物の同定評価方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

例えば、バイオテクノロジー分野の研究や食品業界などの業務などにおいて、菌の検出は必須の基本的な技術として考えられる。

【0003】

一般的な菌の検出法として、培養法が広く用いられている。培養法では、例えば、シャーレに寒天培地を設け、その表面に菌を塗布して所定温度で保持し、菌を増殖させるものである。

しかし、培養法では培養時間が必然的にかかるので菌の検出までに長時間を要するという不利益を有しており、即時的なモニタリングには適さない。

【0004】

30

一方、誘電泳動により菌を検出する方法についても研究がなされているが、この方法では菌の検出感度が低く、また、測定結果と菌の代謝活性の相関などは明確ではない。

【0005】

本発明者は、比較的高密度な条件下において、誘電泳動を行ったときのインピーダンスなどの電気計測から菌種や代謝変化の間接的検出には成功しており、非特許文献 1、2 及び 3 において開示している。

しかし、これらの方法よりもさらに高い精度で、菌などの微生物を同定し、代謝活性などを評価する方法が求められている。

【非特許文献 1】円城寺隆治、尼子恵里、内田諭、朽久保文嘉、「インピーダンス計測法による損傷大腸菌の誘電泳動特性解析」、静電気学会誌、31巻、1号、pp. 8-13 (平成19年2月)

40

【非特許文献 2】円城寺隆治、尼子恵里、内田諭、朽久保文嘉、「誘電泳動インピーダンス計測法による大腸菌の代謝活性モニタリング」、静電気学会講演論文集、pp. 181-186 (平成18年9月)

【非特許文献 3】内田諭、円城寺隆治、朽久保文嘉、「大腸菌およびイースト菌混合液における誘電泳動特性」2006年春季第53回応用物理学関係係連合講演会予稿集、p. 1390 (平成18年3月)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

解決しようとする問題点は、高い精度で菌などの微生物を同定し、代謝活性などを評価することが困難であるという点である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明によれば、一对の電極が設けられた基板に、測定対象となる微生物を含有する、当該微生物の大きさより十分厚さのある試料液を供給し、前記電極間に所定の電圧を印加して前記微生物を前記試料液内を誘電泳動させる工程と、前記誘電泳動により前記試料液内を移動する前記微生物を撮影して動画を取得する工程と、前記撮影した動画を画像解析することにより、前記試料液内を移動する前記微生物の初期位置、t秒後の位置、及び、前記初期位置と前記t秒後の位置の間を移動する前記微生物の軌跡を取得し、得られた前記初期位置、前記t秒後の位置及び前記軌跡のデータから、個々の前記微生物の移動の挙動を調べ、前記移動の挙動から少なくとも前記微生物の同定または前記微生物の評価を行う工程とを具備し、

10

前記微生物を撮影して動画を取得する工程は、共焦点レンズを含む光学系により照明光を前記試料液内の前記微生物に対して照射し、当該微生物を撮影して、前記試料液からその厚さ方向に領域を選択して結像させ、前記移動する微生物の動画を得ることにより行う、微生物の同定評価方法が提供される。

【0008】

上記の本発明の微生物の同定評価方法は、まず、一对の電極が設けられた基板に測定対象となる微生物を含有する試料液を供給し、電極間に所定の電圧を印加して微生物を誘電泳動させる。

20

次に、誘電泳動により移動する微生物を撮影して動画を取得し、動画の画像解析処理により、個々の前記微生物の移動挙動を調べ、移動挙動から微生物の同定及び/または微生物の評価を行う。

上記の本発明に係る微生物の同定評価方法は、従来方法に係る誘電泳動時のインピーダンスなどの電気計測を行う手法に、マイクロ粒子画像速度計測（マイクロPIV）と称せられる画像解析方法を適用したものであり、低密度の細菌群においても泳動状態を直接的に把握でき、従来の手法に比べて大幅な検出感度の向上が見込まれる。

【0009】

本発明の微生物の同定評価方法は、好適には、前記動画の画像解析処理により、個々の前記微生物の移動挙動を調べる工程において、前記移動挙動から、前記微生物の移動速度及び/または移動の方向を測定し、前記微生物の同定及び/または前記微生物の評価を行う。

30

【0010】

本発明の微生物の同定評価方法は、好適には、前記動画の画像解析処理により、個々の前記微生物の移動挙動を調べる工程において、前記動画に撮影された前記微生物のうちの一部の微生物を選択して移動挙動を調べる。

あるいは好適には、前記動画の画像解析処理により、個々の前記微生物の移動挙動を調べる工程において、前記動画に撮影された前記微生物の全てについて移動挙動を調べる。

【0011】

好適には、前記微生物を誘電泳動させる工程において、前記電極として透明電極を用いて行う。

40

【発明の効果】

【0012】

本発明の微生物の同定評価方法によれば、画像解析により得られる誘電泳動時の菌の移動挙動から、微生物の同定及び/または微生物の評価を行うものであり、高い精度で菌などの微生物を同定し、代謝活性などを評価することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下に、本発明に係る微生物の同定評価方法の実施の形態について、図面を参照して説

50

明する。

【 0 0 1 4 】

図 1 は、本実施形態に係る微生物の同定評価方法を実施するための測定装置の模式構成図である。

例えば、基板に互いに絶縁された後述する一对の電極が設けられ、これらを被覆して絶縁膜が形成されており、試料基板 1 0 が構成されている。

また、例えば、試料基板 1 0 の電極に接続して交流電源 1 5 が設けられている。

また、例えば試料基板 1 0 は配管 1 6 a を介して試料液供給源 1 6 と接続されており、試料液が供給及び回収されて、試料基板 1 0 と試料液供給源 1 6 間で循環するように構成されている。

10

試料液には、測定対象となる微生物が含有されており、上記のように試料基板 1 0 に試料液が供給された状態で、試料基板 1 0 の電極に交流電源 1 5 により所定の電圧を印加すると、微生物を誘電泳動させることができる。

測定対象となる試料液中に含まれる微生物は、主として菌類や細菌類であるが、ウイルスなどにも適用できる。

【 0 0 1 5 】

また、本実施形態の測定装置においては、例えば、試料基板 1 0 上において誘電泳動により移動する微生物を撮影する撮影系が設けられている。

例えば、上記の撮影系として、試料基板 1 0 上で微生物を照明するための光を出射する光源 2 0 と、レンズ ( 2 1 a ~ 2 1 f )、ピンホール ( 2 2 a , 2 2 b )、ダイクロイックミラー 2 3、吸収フィルタ 2 4、CCDカメラなどの撮像装置 2 5 が設けられている。

20

上記の撮影系において、例えば、光源 2 0 からの光 L は、レンズ ( 2 1 a , 2 1 b )、ピンホール 2 2 a 及びレンズ 2 1 c を経てダイクロイックミラー 2 3 で反射し、レンズ 2 1 d により集光して試料基板 1 0 上に照射される。反射した光はレンズ 2 1 d を経てダイクロイックミラー 2 3 を通過し、吸収フィルタ 2 4、レンズ 2 1 e、ピンホール 2 2 b を経て、共焦点レンズ 2 1 f によって撮像装置 2 5 の受光面で結像するように入射する。

例えば、撮像装置 2 5 により、試料基板 1 0 上で誘電泳動により移動する微生物が撮影され、動画を取得することができる。

【 0 0 1 6 】

また、本実施形態の測定装置においては、例えば、撮像装置 2 5 に接続してコンピュータ 3 0 が設けられている。

30

コンピュータ 3 0 上で起動する画像解析ソフトにより、微生物の動画の画像解析処理がなされ、個々の微生物の移動挙動が調べられて、移動挙動から微生物の同定及び/または微生物の評価がなされる。

【 0 0 1 7 】

得られる誘電泳動の挙動は、対象の微生物の複素誘電率に対応し、複素誘電率は微生物 ( 菌 ) の種類によって異なっている。複素誘電率は、対象の微生物の誘電率と導電率に関係しており、例えば、印加する電圧を高周波にするほど、得られるデータは微生物を構成する膜の状態に対応するデータとなり、低周波にするほど、得られるデータは微生物の代謝活性に対応するデータとなる。

40

例えば、誘電泳動での微生物の集まり具合で、微生物 ( 菌 ) の種類を同定することができる。

【 0 0 1 8 】

また、微生物の移動速度、及び/または移動方向によって、微生物 ( 菌 ) の種類の同定及び/または代謝活性の評価を行うことができる。

これには、例えば前もって種々の微生物 ( 菌 ) の移動速度や移動方向、さらには、種々の活性の微生物 ( 菌 ) の移動速度や移動方向を測定しておくことで、測定対象の微生物の移動挙動に対応させることで、微生物の同定及び/または代謝活性の評価が可能である。

【 0 0 1 9 】

図 2 ( a ) は、試料基板 1 0 の構成をより詳細に示す模式平面図であり、図 2 ( b ) は

50

図2(a)中のX-X'における断面図である。

例えば、ガラスなどの透明材料あるいはその他の材料からなる基板11上に、例えばクロムなどからなる一对の電極(12a, 12b)が設けられ、これらを被覆して絶縁膜13が形成され、試料基板10が構成されている。

さらに、例えば、試料基板10の電極に接続して交流電源15が設けられている。

例えば、上記の試料基板10に微生物を含有する試料液14が供給された状態で、電極に交流電圧を印加することで、微生物の誘電泳動がなされる。

例えば、電極(12a, 12b)間のギャップGは10 $\mu$ m程度である。また、例えば電極(12a, 12b)間に10~数kV/cmの電界、例えば100V/cm程度の電界が生じるように交流電源により電圧を印加する。交流電圧の周波数は、例えば数kHz~数MHzであり、例えば100kHzあるいは1.0MHzである。

10

#### 【0020】

図3は、上記の一对の電極のレイアウトの例を示す平面図である。

上記の一对の電極(12a, 12b)は、図2(a)に示す簡単な形状でもよいが、例えば、図3のような櫛型電極とすることができる。櫛型電極の互いの歯が交互に入り込んだ構成とすることにより、電極自体の面積に比べて広い領域で誘電泳動を引き起こすことが可能である。この場合、例えば、各電極(12a, 12b)の幅Wは100 $\mu$ m程度、ギャップGは10 $\mu$ m程度である。電極(12a, 12b)の厚さは、印加する電圧にもよるが、上記のように100V/cm程度の電界となるように電圧を印加する場合は、数nm~数100nm程度の膜厚でよい。より高電圧を印加する場合には、数 $\mu$ m~数mm

20

#### 【0021】

また、試料基板に形成される電極として、ITOなどの透明電極を用いることによって電極を通して微生物の挙動を捉えることが可能となり、動画から微生物の移動挙動をより容易に調べることができるようになる。さらに、試料基板10を構成する基板11が透明である場合、試料基板を通過した光を検出して画像を得るように構成することも可能である。

#### 【0022】

上記のような構成の測定装置を用いて、微生物の同定及び評価を行うには、まず、一对の電極(12a, 12b)が設けられた試料基板10に測定対象となる微生物を含有する試料液14を供給し、電極(12a, 12b)間に所定の電圧を印加して微生物を誘電泳動させる。

30

次に、カメラにより誘電泳動により移動する微生物を撮影して動画を取得する。

#### 【0023】

次に、コンピュータ30上で起動する画像解析ソフトなどを利用して、上記で取得された動画の画像解析処理を行い、個々の前記微生物の移動挙動を調べる。

次に、得られた移動挙動から、微生物の同定及び/または微生物の評価を行う。

#### 【0024】

上記の本実施形態の微生物の同定評価方法によれば、画像解析により得られる誘電泳動時の菌の移動挙動から、微生物の同定及び/または微生物の評価を行うものであり、高い精度で菌などの微生物を同定し、代謝活性などを評価することができる。

40

#### 【0025】

図4は、画像解析ソフトにおいて調べる微生物の移動挙動を示す模式図である。

例えば、電極(12a, 12b)間に交流電圧が印加されると、誘電泳動により微生物は移動する。このときの微生物の移動挙動を画像解析により調べて、各微生物の初期位置 $P_0$ 、t秒後の位置 $P_t$ 、その間の微生物の軌跡TRを得る。

上記のように得られた初期位置 $P_0$ 、t秒後の位置 $P_t$ 、軌跡TRのデータから、微生物の速度、速度分布、移動方向、移動方向分布などを得ることができ、これをもって、微生物の同定及び/または代謝活性などの評価を行う。

#### 【0026】

50

上記の画像解析処理においては、例えば、動画に撮影された前記微生物のうちの一部の微生物を選択して移動挙動を調べることができる。あるいは、動画に撮影された微生物の全てについて移動挙動を調べてもよい。

一部を選択して画像解析を行う場合、例えば、ほとんど移動していない微生物を処理から除外することで、解析を阻害する成分を除外できる場合がある。

【0027】

図5は、試料基板10の模式断面図である。

基板11上に設けられた電極12に対して、試料液14が十分な厚さをもって供給されている場合、電極12が形成する電界の作用が試料液14中の電極12に近い部分(例えば図面上領域R)に留まり、電極12からそれよりも遠い部分では実質的に誘電泳動が生じないような場合がある。

10

このとき、撮影された画像には実質的に誘電泳動が生じない部分の微生物も画像中に写しこんでしまうことになる。これは、微生物の誘電泳動の移動挙動を解析する上でのノイズ成分となってしまう。

【0028】

上記のような場合には、微生物を撮影して動画を取得する工程において、上記のような共焦点レンズを含む光学系により照明光を微生物に対して照射し、撮影することが好ましい。

共焦点レンズで焦点を結んだ光で照明することにより、有る程度厚みを持った試料液から深さ方向に領域を選択して結像させ、画像を得ることができる。従って、実質的に誘電泳動が生じない部分の微生物が写りこむのを防止することができる。

20

【0029】

上記のように解析される対象となる微生物は、例えば、大腸菌、ピフィズス菌、イースト菌などの菌類などである。

ウイルスにも適用可能であるが、その場合には、電極の構造を上記よりもさらに微細にすることが好ましい。

【0030】

上記の試料基板の電極に対して、印加する電圧を調整することによって、微生物の捕獲、濃縮、殺菌、除去などが可能である。

例えば、100V/cm程度の電圧では、微生物の捕獲、濃縮が可能であり、1kV/cm程度の電圧では微生物を構成する膜に穿孔が発生し、さらに10kV/cm程度の電圧の印加で殺菌が可能である。

30

また混合した菌から、選択して、より分けることなども可能である。

また、活性の低い菌と高い菌が混合しているような場合でも、これらをより分けて高い菌のみを濃縮し、利用することも可能である。

【0031】

上記の本実施形態に係る微生物の同定評価方法によれば、少量の微生物で結果を得ることが可能であって、即時的なモニタリングが可能であり、高い精度で菌などの微生物を同定することができ、さらには代謝活性などを評価することが可能である。

【0032】

40

本発明は上記の説明に限定されない。

例えば、撮影した画像はコンピュータ上で画像解析を行うため、デジタルデータで取得するが、アナログデータをデジタルデータに変換したデータを用いて画像解析を行うようにしてもよい。

上記の実施形態において試料液は循環可能な構成としているが、これに限定されず、適宜試料基板上に供給するようにしてもよい。

試料基板に設けられる電極の構造は、種々な形状としてよく、適宜変更して実施することが可能である。

その他、本発明の要旨を逸脱しない範囲で、種々の変更が可能である。

【産業上の利用可能性】

50

## 【 0 0 3 3 】

本発明の微生物の同定評価方法は、菌、細菌あるいはウイルスなどの微生物を検出し、同定し、代謝活性を評価する方法に適用できる。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 3 4 】

【 図 1 】 図 1 は本発明の実施形態に係る微生物の同定評価方法を実施するための測定装置の模式構成図である。

【 図 2 】 図 2 ( a ) は本発明の実施形態に係る試料基板の構成をより詳細に示す模式平面図であり、図 2 ( b ) は図 2 ( a ) 中の X - X ' における断面図である。

【 図 3 】 図 3 は本発明の実施形態に係る一对の電極のレイアウトの例を示す平面図である

10

。 【 図 4 】 図 4 は本発明の実施形態に係る画像解析ソフトにおいて調べる微生物の移動挙動を示す模式図である。

【 図 5 】 図 5 は本発明の実施形態に係る試料基板の模式断面図である。

## 【 符号の説明 】

## 【 0 0 3 5 】

1 0 ... 試料基板

1 1 ... 基板

1 2 , 1 2 a , 1 2 b ... 電極

1 3 ... 絶縁膜

20

1 4 ... 試料液

1 5 ... 交流電源

1 6 ... 試料液供給源

1 6 a ... 配管

2 0 ... 光源

2 0 ... 光源

2 1 a ~ 2 1 f ... レンズ

2 2 a , 2 2 b ... ピンホール

2 3 ... ダイクロイックミラー

2 4 ... 吸収フィルタ

30

2 5 ... 撮像装置

3 0 ... コンピュータ

G ... ギャップ

L ... 光

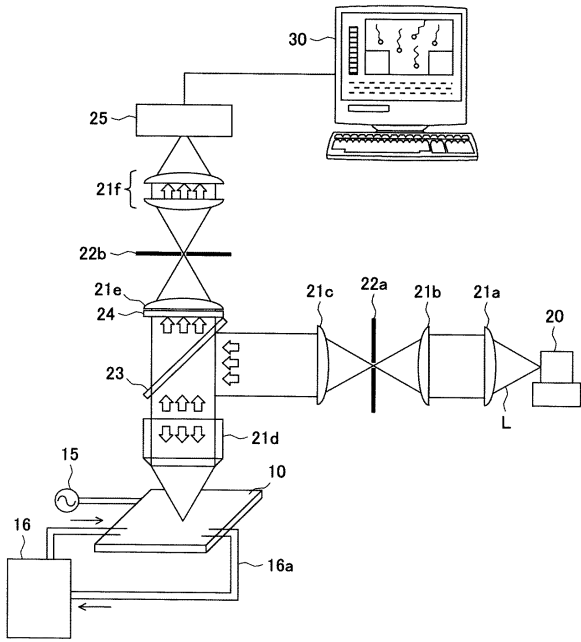
P<sub>0</sub> ... 初期位置

P<sub>t</sub> ... t 秒後の位置

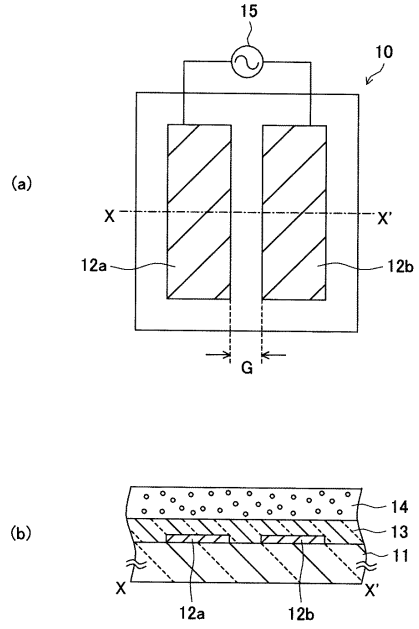
T R ... 軌跡

W ... 幅

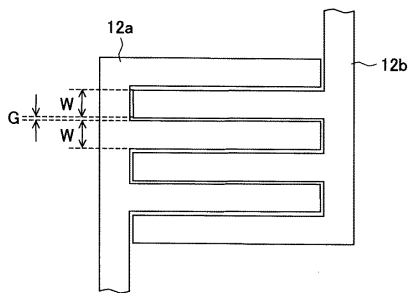
【図1】



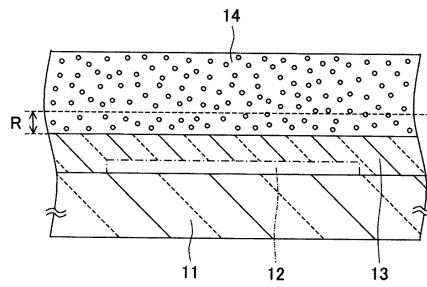
【図2】



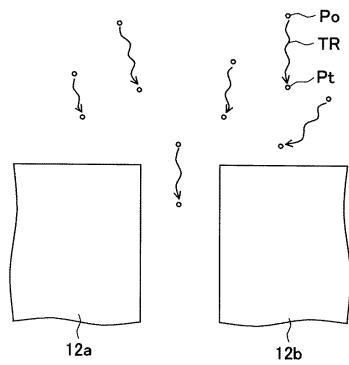
【図3】



【図5】



【図4】





---

フロントページの続き

- (56)参考文献 円城寺隆治、外3名、誘電泳動インピーダンス計測法による大腸菌の代謝活性モニタリング、静電気学会講演論文集'06、2006年9月25日、p.181-186  
Molecular biotechnology. 2000, Vol.16, No.2, p.127-149  
Biochimica et biophysica acta. 2006, Vol.1760, No.3, p.432-439  
伊東智洋、外3名、大腸菌およびイースト菌混合液における誘電泳動特性、第51回応用物理学関係連合講演会講演予稿集、2004年3月28日、No.1、p.581(講演番号:30p-ZS-1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 1/24

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)