

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年2月13日 (13.02.2003)

PCT

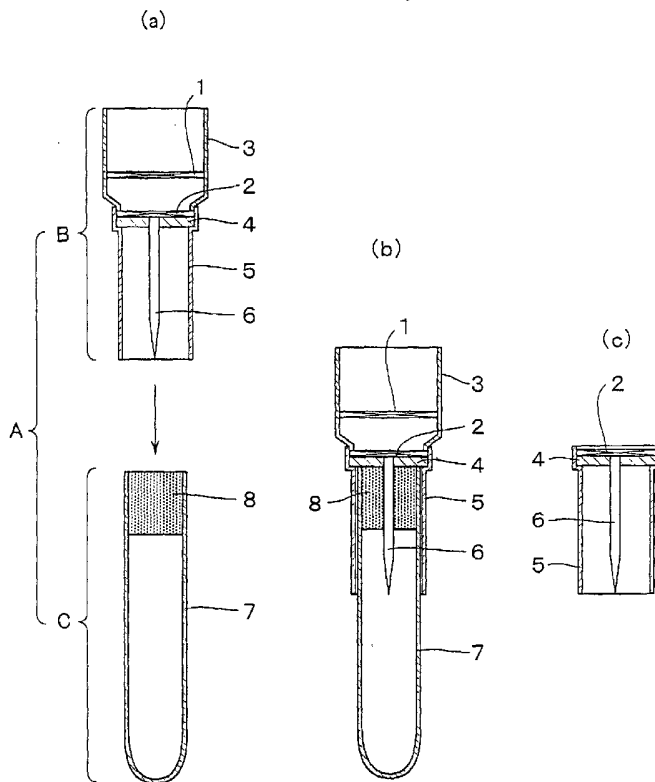
(10) 国際公開番号  
WO 03/012397 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 1/10, 21/78, 33/48, C12Q 1/06, 1/24, C12M 1/28, 1/34
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07713
- (22) 国際出願日: 2002年7月30日 (30.07.2002)
- (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2001-230054 2001年7月30日 (30.07.2001) JP  
特願2002-81015 2002年3月22日 (22.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下精工株式会社 (MATSUSHITA SEIKO CO., LTD.) [JP/JP];
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田代 義和 (TASHIRO, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒486-0833 愛知県春日井市上条町3丁目114 マナーハウス603 Aichi (JP). 島北 寛仁 (SHIMAKITA, Tomonori) [JP/JP]; 〒485-0831 愛知県小牧市東2丁目111番 松下精工寮 Aichi (JP). 衣川 昭徳 (KINUGAWA, Akinori) [JP/JP]; 〒251-0023 神奈川県藤沢市鶴沼花沢町13-10-908 Kanagawa (JP). 笹井 八郎 (SASAI, Hachirou) [JP/JP]; 〒253-0111 神奈川県高座郡寒川町一之宮8-21-5 Kanagawa (JP). 中島 浩 (NAKAJIMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒251-0861 神奈川県藤沢市大庭5601-25 Kanagawa (JP). 小林 芳

[続葉有]

(54) Title: MICROORGANISM-COLLECTING CHIP, MICROORGANISM-COLLECTING KIT, METHOD OF QUANTIFYING MICROORGANISMS, SPECIMEN FOR CONFIRMING NORMAL STATE OF MICROORGANISM-QUANTIFYING APPARATUS AND MICROORGANISM-QUANTIFYING APPARATUS

(54) 発明の名称: 微生物採取チップ、微生物採取キット、微生物計量方法、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体及び微生物計量装置



(57) Abstract: It is intended to efficiently collect microorganisms from a test sample and accurately detect and quantify the thus collected microorganisms. A microorganism-collecting chip fundamentally comprising a filter for removing contaminants and another filter for capturing microorganisms. A microorganism-collecting kit comprising the above-described microorganism-collecting chip and a suction filtration means. The suction filtration means is exemplified by a negative pressure tube provided with a rubber stopper at the opening. The microorganism-collecting chip has a liquid specimen container into which

[続葉有]



WO 03/012397 A1



- 久 (KOBAYASHI, Yoshihisa) [JP/JP]; 〒485-0812 愛知県 小牧市 城山五丁目7の3 Aichi (JP). 牧瀬 智之 (MAKISE, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒509-0263 岐阜県 可児市 緑6丁目53番地 Gifu (JP).
- (74) 代理人: 清水 善廣, 外(SHIMIZU, Yoshihiro et al.); 〒169-0075 東京都 新宿区 高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

a liquid specimen is to be injected and a hollow needle capable of penetrating through the rubber stopper provided at the opening of the negative pressure tube. A liquid specimen injected into the container is filtered under suction due to the pressure of the negative pressure tube. Contaminants are removed by using the contaminant-removing filter, while microorganisms are captured on the microorganism-collecting filter. Next, the microorganisms captured on the microorganism-collecting filter are detected and quantified by using the unit involving the microorganism-collecting filter.

(57) 要約:

本発明は、微生物を検査対象から効率良く採取し、また、採取された微生物を正確に検出して計量することを目的とする。

本発明の微生物採取チップは異物を除去するフィルタと微生物を捕集するフィルタを基本構成とする。微生物採取キットは上記のような微生物採取チップと吸引ろ過手段とからなる。吸引ろ過手段は、例えば、口部にゴム栓が設けてある陰圧管である。また、微生物採取チップは液状検体を注入する液状検体注入容器と陰圧管の口部に設けられたゴム栓を貫通させることができる中空針を有する。液状検体注入容器へ注入された液状検体は陰圧管の圧力によって吸引ろ過される。異物は異物除去フィルタで除去され、微生物は微生物採取用フィルタ上に捕集される。その後、微生物採取用フィルタを含むユニットを用いて微生物採取用フィルタ上に捕集された微生物を検出し計量する。

## 明細書

微生物採取チップ、微生物採取キット、微生物計量方法、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体及び微生物計量装置

### 技術分野

本発明は、検査対象に付着した微生物を採取する手段であり、これらを発色及び発光、蛍光発光させ、検査対象に存在する生細胞及び死細胞あるいは特定の微生物を効率よく捕集し、検出し、測定するための微生物採取チップ、微生物採取キット、この微生物採取キットを使用した微生物計量方法、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体及び微生物計量装置に関するものである。

### 背景技術

従来、この種の微生物採取手段としては、ポンプの作動による圧力変化によって微生物を含み得る液状検体から微生物をろ過してフィルタ上に微生物を捕集した後、ユニットを分解してピンセットのような細かい作業を行うことができる道具を用いて採取した微生物が付着しているフィルタを回収して測定するものがあった。

このような従来 of 微生物採取手段では、微生物の採取にポンプなど大掛かりな装置を必要としている。また、異物などの影響が直接あるような検体の場合、異物除去過程を別途必要としている。さらにフィルタ上に採取した微生物を検査するためにフィルタのみを回収する必要がある。この作業にはピンセットなど細かい作業を行うための道具を必要としているため、効率を低下し、大量のサンプルを処理することができない。さらにポンプを使用するため機器が大きな物となり、食品検査工程など、作業スペースが狭い場所ではできるものではない。これらは、迅速性が求められる微生物検査において、ある程度の検査時間及び技術を必要とする。従って、誰もが簡便に迅速に行うことができるというものではないという課題がある。

本発明は、このような従来 of 課題を解決するものであり、異物除去用フィルタ

と微生物採取用フィルタを一体化させたものを用いることで迅速化、簡易化を図った微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、異物除去用フィルタの孔径を5乃至20  $\mu\text{m}$ とすることで微生物を通過させ、異物を極力除去するとともに、微生物採取用フィルタの孔径を0.2乃至0.8  $\mu\text{m}$ とすることで微生物を確実に捕集する微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、異物除去用フィルタを底部とする液状検体注入容器を設けることで液状検体の容量が多量の場合でも対応できる微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、異物除去用フィルタの前段に液状検体注入容器を設け、液状検体注入容器を異物除去用フィルタを含む部位と着脱可能とすることで、液状検体注入容器を繰り返し使用することができる微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、液状検体注入容器開口部を覆う綿棒付き蓋を付加することで検査対象における角部や隙間などのような微生物を採取しにくい場所からこれを簡便に採取することができる微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、微生物採取用フィルタを含む部位を単独にて取り外しが可能なものとするすることで、微生物計量装置に微生物採取用フィルタを部位ごと設置できる微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、微生物採取用フィルタを暗色のフィルタとすることで、背景（バックグラウンド）の発光を抑制して微生物計量を精度よく行うことができる微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、微生物採取用フィルタ上にある種の成分からなる薄膜を形成することで、背景（バックグラウンド）の発光を抑制して微生物計量を精度よく行うことができる微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、薄膜の膜厚を適切な値とすることで、薄膜を形成することの効果をより確実なものとする微生物採取チップを提供することを目的としている。

また、本発明は、上記のような微生物採取チップと吸引ろ過手段を備えた微生物採取キットを提供することを目的としている。

また、吸引ろ過手段に陰圧管を用いることでポンプなどの装置や特別な技術を必要としない微生物採取キットを提供することを目的としている。

また、陰圧管の口部にゴム栓を設けることで、外部から管をゴム栓に刺すことで吸引できる微生物採取キットを提供することを目的としている。

また、中心部が薄層となっているゴム栓を用いることで、外部から容易に管を刺すことができる微生物採取キットを提供することを目的としている。

また、微生物採取用フィルタ下部に陰圧管内部に届く中空針を設けることでゴム栓を貫通し、陰圧管内部に届きやすい微生物採取キットを提供することを目的としている。

また、本発明は、上記のような微生物採取チップを用いて染色した微生物を微生物採取用フィルタの上に捕集し、生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、本発明は、上記のような微生物採取チップを用いて微生物を微生物採取用フィルタの上に捕集した後、微生物を染色し、生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、液状検体に墨汁を添加することで微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集する際にフィルタ上を黒くすることにより、背景（バックグラウンド）や異物の発光を抑制して微生物計量を精度よく行う微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、微生物が捕集された微生物採取用フィルタの上から墨汁を添加することで、上記と同様、微生物計量を精度よく行う微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を使用して装置が正常状態にあることを確認した後、微生物計量を行うことで、装置異常に基づく不正確な計量結果を導き出すようなことがない微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体に高分子蛍光粒子を表面に固定した基材を使用することで装置の状態の確認を正確に繰り返して何度も行うこ

とができる微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体に染色した微生物を表面に固定した基材を使用することで装置の状態の確認を正確に行うことができる微生物計量方法を提供することを目的としている。

また、本発明は、特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を使用することで装置の状態の確認を正確に行う微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を提供することを目的としている。

また、基材を暗色とすることで背景（バックグランド）の発光を抑制して装置の状態の確認を正確に行う微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を提供することを目的としている。

また、発光体を固定した基材上にある種の成分からなる薄膜を形成することで、背景（バックグランド）の発光を抑制して装置の状態の確認を正確に行う微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を提供することを目的としている。

また、薄膜の膜厚を適切な値とすることで、薄膜を形成することの効果をより確実なものとする微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を提供することを目的としている。

また、本発明は、微生物採取チップにおける微生物採取用フィルタに捕集された微生物を計量するための微生物計量装置であって、装置が正常状態にあることを確認できるようにした装置を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明の微生物採取チップは、上記目標を達成するため異物を除去するフィルタ及び微生物採取用フィルタを設けたものであり、ろ過によって微生物採取用フィルタ上に微生物を捕集することを特徴とする。そして、本発明によれば、検査対象が食材屑や環境中の砂塵などの特殊なものであっても、野菜屑や肉片などの異物を効率よく除去でき、これらの大きさよりも小さく異物除去用フィルタを通過できる微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集し、これら捕集した微生物をあらかじめ染色若しくは捕集後染色することで検出が容易になる微生物採取チップが得られる。

また、異物除去用フィルタの孔径を5乃至20 $\mu\text{m}$ とし、微生物採取用フィルタの孔径を0.2乃至0.8 $\mu\text{m}$ としたことを特徴とする。そして、本発明によれば、異物除去用フィルタの孔径を5乃至20 $\mu\text{m}$ とすることで異物を極力除去し、微生物採取用フィルタの孔径を0.2乃至0.8 $\mu\text{m}$ とすることで微生物を微生物採取用フィルタ上に確実に捕集することができる微生物採取チップが得られる。

また、異物除去用フィルタが液状検体注入容器の底部としてなることを特徴とする。そして、本発明によれば、液状検体の容量が多い場合でもろ過が容易なものとなり、また、液状検体を異物除去用フィルタ上に注ぐことが容易なものとなる微生物採取チップが得られる。

また、異物除去用フィルタのさらに前段に液状検体注入容器を設けたことを特徴とする。そして、本発明によれば、液状検体注入容器を異物除去用フィルタを含む部位と着脱可能とすることで、液状検体注入容器を繰り返し使用することができる微生物採取チップが得られる。

また、液状検体注入容器開口部を覆う綿棒付き蓋を備えたことを特徴とする。そして、本発明によれば、まな板上の傷や検査対象の角など検出しにくい部位からの微生物の採取を容易なものとすることができる微生物採取チップが得られる。

また、微生物採取用フィルタを含む部位を単独にて取り外しが可能なものとしたことを特徴とする。そして、本発明によれば、微生物採取用フィルタを含む部位を単独にて取り外しすることでフィルタのみを取り外す必要性をなくし、微生物計量のための操作を容易なものとする微生物採取チップが得られる。

また、微生物採取用フィルタを暗色のフィルタとしたことを特徴とする。そして、本発明によれば、背景（バックグランド）が発光して正確な微生物計量を阻害することを効果的に抑制することができる微生物採取チップが得られる。

また、フィルタ上に金、銅、クロム、白金、パラジウムから選ばれる少なくとも一種の金属成分を含む薄膜を形成したことを特徴とする。そして、本発明によれば、背景（バックグランド）が発光して正確な微生物計量を阻害することを効果的に抑制することができる微生物採取チップが得られる。

また、薄膜の膜厚を10乃至50nmとしたことを特徴とする。そして、本発

明によれば、薄膜を形成することの効果により確実なものとした微生物採取チップが得られる。

また、本発明の微生物採取キットは、上記目標を達成するため上記のような微生物採取チップと吸引ろ過手段とからなることを特徴とする。そして、本発明によれば、食品工場などの現場で、誰もが簡単にしかも確実に微生物の採取及び計量を行うことができる微生物採取キットが得られる。

また、吸引ろ過手段を陰圧管としたことを特徴とする。そして、本発明によれば、吸引ろ過手段に陰圧管を用いることでポンプなどの特殊かつ大掛かりな装置を必要とせず、簡易に、かつ迅速に微生物を採取できる微生物採取キットが得られる。

また、陰圧管の口部にゴム栓が設けてあることを特徴とする。そして、本発明によれば、陰圧管の口部にゴム栓を設けることで、外部から管をゴム栓に刺すことで吸引できるとともに、管を刺す際に滑りにくいなど扱いが容易となり、吸引後のろ過液の廃棄が容易となる。また、ゴム栓を用いることで微生物採取キットにおける陰圧管の密閉性を保つことができる微生物採取キットが得られる。

また、陰圧管口部のゴム栓の中心部が薄層となっていることを特徴とする。そして、本発明によれば、陰圧管口部のゴム栓の中心部が薄層となっていることで中空針などを少ない抵抗で刺し込むことができる微生物採取キットが得られる。

また、微生物採取チップの微生物採取用フィルタ下部に陰圧管内部に届く中空針を設けたことを特徴とする。そして、本発明によれば、中空針を設けることで中空針より上部に設置した液状検体を容易に吸引ろ過することが可能となる微生物採取キットが得られる。

また、本発明の微生物計量方法は、上記目標を達成するため生死細胞を発色させる第1の化合物と死細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第2の化合物と生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第3の化合物との中で1種類または複数種類と、特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する少なくとも1種類以上の第4の化合物を液状検体に接触させ、微生物が液状検体に含まれている場合には微生物を染色した後、上記のような微生物採取チップを用いて微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、その波長差および発



色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出することを特徴とする。そして、本発明によれば、生細胞や死細胞や特定微生物を精度よく簡単に計量できる微生物計量方法が得られる。

また、本発明の微生物計量方法は、上記目標を達成するため上記のような微生物採取チップを用いて微生物を含み得る液状検体から微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、捕捉された微生物に生死細胞を発色させる第1の化合物と死細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第2の化合物と生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第3の化合物との中で1種類または複数種類と、特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する少なくとも1種類以上の第4の化合物を接触させ、微生物を染色した後、その波長差および発色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出することを特徴とする。そして、本発明によれば、液状検体の容量が多い場合であっても第1乃至第4の化合物の使用量は少量で、生細胞や死細胞や特定微生物を精度よく簡単に計量できる微生物計量方法が得られる。

また、液状検体に墨汁を添加することを特徴とする。そして、本発明によれば、微生物採取用フィルタ上に製造上の問題で微細な陥没線などが存在する場合であってもそれがもとで背景（バックグラウンド）が発光したりすることを抑制し、また、異物が発光したりすることを抑制して微生物計量を精度よく行うことができる微生物計量方法が得られる。

また、微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、微生物採取用フィルタの上から墨汁を添加して微生物採取用フィルタ上を黒くすることを特徴とする。そして、本発明によれば、上記と同様、微生物計量を精度よく行うことができる微生物計量方法が得られる。

また、特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含む微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を使用し、予め当該発光体を検出して微生物計量装置が正常状態にあることを確認した後、生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出することを特徴とする。そして、本発明によれば、装置に異常があれば発光体を正確に検出することができないので、装置の状態の確認を行うことで微生物計量を正確に行うことができる微生物計量方

法が得られる。

また、発光体を高分子蛍光粒子とすることを特徴とする。そして、本発明によれば、高分子蛍光粒子が長期間にわたって安定で均一な発光を維持するので、装置の状態の確認を正確に繰り返して何度でも行うことができ、しかも人体に対する安全性が確保された微生物計量方法が得られる。

また、発光体を染色した微生物とすることを特徴とする。そして、本発明によれば、発光体が計量対象となる微生物と同じ大きさや形状であるので、装置の状態の確認を正確に行うことができる微生物計量方法が得られる。

また、本発明の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体は、上記目標を達成するため特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含み、微生物計量を行う前に微生物計量装置が正常状態にあることを確認するためのものであることを特徴とする。そして、本発明によれば、微生物計量装置が正常状態にあるか否かを正確に判定できる当該装置の正常状態確認検査用検体が得られる。

また、基材を暗色としたことを特徴とする。そして、本発明によれば、背景（バックグラウンド）の発光を抑制して、装置の状態の確認を正確に行うことができる微生物計量装置の正常状態確認検査用検体が得られる。

また、特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材上に金、銅、クロム、白金、パラジウムから選ばれる少なくとも一種の金属成分を含む薄膜を形成したことを特徴とする。そして、本発明によれば、背景（バックグラウンド）の発光を抑制して、装置の状態の確認を正確に行うことができるとともに、発光体の発光強度の調整、例えば、発光強度が強すぎる場合に発光強度を弱めることができ、また、基材の表面に固定した発光体の脱落などが防止された微生物計量装置の正常状態確認検査用検体が得られる。

また、薄膜の膜厚を10乃至1000nmとしたことを特徴とする。そして、本発明によれば、薄膜を形成することの効果をより確実なものとした微生物計量装置の正常状態確認検査用検体が得られる。

また、本発明の微生物計量装置は、上記目標を達成するため上記のような微生物採取チップにおける微生物採取用フィルタの微小な一定面積に予め定められた

波長域で励起光を照射する光源と、前記励起光によって発光する予め定められた波長域の光を受光する受光手段と、前記光源によって照射されて発光した光を設定した一定の時間内に受光し、その受光した光量が設定したしきい値の範囲内のときに微生物と判断する微生物判断手段と、前記微小な一定面積を連続または断続的に移動させる移動手段と、微生物判断手段から微生物と判断された信号から微生物の数量を積算する積算手段を有する微生物計量装置であって、特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含み、微生物計量を行う前に微生物計量装置が正常状態にあることを確認することができるようにしたことを特徴とする。そして、本発明によれば、正常な装置状態で生細胞や死細胞や特定微生物を精度よく簡単に計量できる微生物計量装置が得られる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の微生物採取キットの一態様の断面図である。

第2図は、本発明の微生物採取キットのその他の態様の断面図である。

第3図は、本発明の微生物採取キットを使用して微生物計量を行うための装置の一態様の概略図である。

第4図は、本発明の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体の一態様の斜視図（一部透過図）である。

第5図は、第4図に示した検査用検体における樹脂フィルムの正面図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の微生物採取チップ、微生物採取キット、微生物計量方法、微生物計量装置の正常状態確認検査用検体及び微生物計量装置を図面を用いて説明する。しかしながらこれらは以下の説明に何ら限定されるものではない。

第1図（a）は本発明の微生物採取キットの一態様の断面図である。微生物採取キットAは微生物採取チップBと吸引ろ過手段Cとからなる。微生物採取チップBは基本構成として前段にあるプレフィルタとしての異物除去用フィルタ1と後段にある暗色（例えば黒色）の微生物採取用フィルタ2（例えば白色のフィルタ上に炭素薄膜を形成したもの）とからなる。異物除去用フィルタ1の孔径は異

物を極力除去するために5乃至20  $\mu\text{m}$ とされ、微生物採取用フィルタ2の孔径は微生物を確実に捕集するために0.2乃至0.8  $\mu\text{m}$ とされている。ここで孔径は最小孔径を意味するものとする。微生物採取チップBは液状検体注入容器3を有し、異物除去用フィルタ1は液状検体注入容器3の底部としてなる。微生物採取用フィルタ2は台座4の上に配置され、台座4は台座保持部材5に保持されている。台座保持部材5に保持された台座4には中空針6が一体成形されている。液状検体注入容器3と台座保持部材5は着脱自在に嵌合するようになっている。吸引ろ過手段Cは陰圧管7であり、陰圧管7の口部はゴム栓8で封止されている。

微生物採取用フィルタ2を暗色のフィルタとすることで、背景（バックグラウンド）が発光して正確な微生物計量を阻害することを効果的に抑制することができる。また、フィルタ上に金、銅、クロム、白金、パラジウムから選ばれる少なくとも一種の金属成分を含む薄膜を形成してもよい。これらの成分は300乃至550 nm程度の波長の励起光に対する分光反射率が低いという性質を有するので、微生物採取用フィルタ2を暗色のフィルタとし、さらにフィルタ上に上記の薄膜を形成すれば、効果はより向上する（アルミニウムや銀は上記の波長の励起光に対する分光反射率が高いので採用できない）。薄膜は、一種の金属成分からなるものの他、合金、金属酸化物、金属炭化物、金属窒化物、金属炭窒化物などからなるものであってもよい。また、積層薄膜であってもよい。薄膜の形成方法としては、真空蒸着法、イオンスパッタリング法、イオンプレーティング法などの公知の気相成長法が好適に採用される。薄膜の膜厚は10乃至50 nmとすることが望ましい。10 nmを下回ると薄膜を形成することの効果十分に発揮されない恐れがある一方、50 nmを超えるとフィルタの孔が目詰まりを起し、フィルタ本来の機能に影響を及ぼす恐れがあるからである。

液状検体は、検査対象が飲料水などの液状サンプルの場合はそれ自体が液状検体となる。検査対象が野菜や肉をはじめとする食材などの固体サンプルの場合はそれをホモジナイズして液状検体を調製したり、その表面から綿棒などを用いて微生物を採取し、これを生理食塩水などに遊離させて液状検体とする。また、まな板などの調理器具などが検査対象となる場合、その表面から綿棒などを用いて微生物を採取し、これを生理食塩水などに遊離させて液状検体とする。このよう

にして準備された液状検体を微生物採取チップBの液状検体注入容器3に注入する。その後、陰圧状態の陰圧管7の口部のゴム栓8に中空針6を突き刺し、第1図(b)に示したように中空針6にゴム栓8を貫通させることで液状検体は吸引ろ過される。なお、台座保持部材5の下部は中空針6を確実に陰圧管7のゴム栓8に突き刺すためのガイドとしての機能を持たせるためや取扱者が中空針6で怪我をしないように伸長されている。

液状検体が異物除去用フィルタ1を通過した際、微生物よりも大きな異物は異物除去用フィルタ1に捕集され除去される。異物除去用フィルタ1の前段に大型の異物、例えば、野菜屑や繊維などを捕集するためのフィルタを設け、異物の除去を目的としたフィルタを積層形態にしてもよい。異物除去用フィルタ1を通過した液状検体は微生物採取用フィルタ2に到達し、液状検体に微生物が含まれている場合、微生物は微生物採取用フィルタ2に捕集される。なお、微生物採取用フィルタ2と台座4との境界面には液状検体が微生物採取用フィルタ2の全面に満遍なく行き渡るように溝が設けてある。これにより微生物採取用フィルタ2の局部に微生物が集中して捕集されるような現象を抑制することができる。

液状検体注入容器3と台座保持部材5は着脱自在に嵌合するようになっているので、微生物採取用フィルタ2上に微生物を捕集した後、液状検体注入容器3は取り外し、第1図(c)に示したように微生物採取用フィルタ2を含む部位のみを微生物計量装置の計量台へ移動することが可能である。

なお、異物除去用フィルタの前段に別途液状検体注入容器を設けてもよい。

なお、陰圧管の口部のゴム栓の中心部を薄層としてもよい。

なお、液状検体の調製は別途試験管などを使用して行えばよいが、予め液状検体注入容器3に生理食塩水などを注入しておき、そこに綿棒などを用いて採取された微生物を遊離させて液状検体としてもよい。

なお、液状検体注入容器3と台座保持部材5は着脱自在に嵌合するようになっているが、両者の接合はネジを用いて行ってもよい。また、両者は製造当初は一体成形されたものであってもよく、外周に渡る適当な位置に両者の分離を容易にするための分離溝を設けておき、この分離溝を利用して両者を分離するようにしてもよい。

なお、中空針はゴム栓を貫通し、陰圧管内部に到達するものであれば、長さ制限を持つものではない。

第2図(a)は本発明の微生物採取キットのその他の態様の断面図である。微生物採取キットDは微生物採取チップEと吸引ろ過手段Fとからなる。微生物採取チップEが第1図(a)に示した微生物採取チップBと異なる点は、液状検体注入容器13の上にその開口部を覆う綿棒51が付いた蓋52を備えていることである。微生物採取キットに綿棒を付属させておくことで、表面にキズが多い検査対象や調理場の角など、形状の複雑な検査対象からのサンプリングを容易かつ簡便なものとすることができる。さらに微生物採取チップEのように綿棒51を蓋52と一体化することで形状を単純化することができる。第2図(a)に示したように液状検体注入容器13の中に予め生理食塩水53を注入しておくとともに、綿棒51を生理食塩水53に浸る長さのものにしておけば、綿棒52を用いて検査対象から微生物を採取した後、蓋52を液状検体注入容器13に被せて微生物採取チップEを上下左右に振とうすることにより綿棒51に付着していた微生物を生理食塩水53に遊離させて液状検体を調製することが容易となる。

微生物を生理食塩水53に遊離した後は、第2図(b)に示したように中空針16にゴム栓18を貫通させることで液状検体は吸引ろ過され、微生物採取用フィルタ12上に微生物が捕集される。その後、第1図(c)に示したのと同様にして液状検体注入容器13を取り外し、微生物採取用フィルタ12を含む部位のみを微生物計量装置の計量台へ移動して計測を行う。

なお、綿棒は蓋とは必ずしも一体化されている必要はない。

なお、綿棒は必ずしも生理食塩水に漬かる長さのものである必要はなく、振とうすることで綿棒に付着していた微生物を生理食塩水に遊離させることができるものであればどのような長さのものであってもよい。

なお、綿棒は微生物採取キットの製造当初から生理食塩水に浸っていてもよい。その場合、生理食塩水で綿棒が濡れているため、特に乾燥した検体対象からの微生物の採取を有効に行うことができる。

なお、綿棒に付着した微生物の生理食塩水への遊離を別途試験管などで行って液状検体を調製し、調製された液状検体を液状検体注入容器に注入するようにし

てもよい。

以上のようにして微生物採取用フィルタ上に捕集された微生物は種々の方法により検出することができるとともに計量することができるが、以下には生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出し計量する方法を説明する。

本発明の第一の微生物計量方法は、生死細胞を発色させる第1の化合物と死細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第2の化合物と生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第3の化合物との中で1種類または複数種類と、特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する少なくとも1種類以上の第4の化合物を液状検体に接触させ、微生物が液状検体に含まれている場合には微生物を染色した後、微生物採取チップを用いて微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、その波長差および発色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する方法である。この方法によれば、生死細胞、生細胞、死細胞、特定微生物が異なる波長で発色するので、その波長差および発色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出することができる。

発色は例えば蛍光によるものが挙げられる。この場合、第1の化合物を核酸結合性の化合物とすることで生死細胞の細胞単体レベルでの高精度の計量ができる。また、第2の化合物を核酸結合性の化合物とすることで死細胞の細胞単体レベルでの高精度の計量ができる。また、第3の化合物を微生物由来物質と反応することで発色する化合物とすることでその発色量の相違により生きている微生物のみを計量することができる。この際、微生物由来物質を酵素タンパク質とすることでその反応性から微生物の生死を判別できる。また、特定微生物由来物質を酵素タンパク質とすることでその反応性から特定微生物の生死を判別できる。

微生物を蛍光染色するために使用される生死細胞を発色させる第1の化合物としては、例えば、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩（誘導体であってもよい）のような生死細胞の膜表面より非特異的に浸透し、細胞内に存在する核酸と特異的に結合することで発色する化合物が挙げられる。死細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第2の化合物としては、例えば、プロピデュ

ームイオダイド（誘導体であってもよい）のような死細胞の膜表面より非特異的に浸透し、細胞内に存在する核酸と特異的に結合することで発色する化合物が挙げられる。生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第3の化合物としては、例えば、6-カルボキシフルオレセインジアセテート、2', 7'ジクロロフルオレセインジアセテート、6-(N-スクシンイミジルオキシカルボニル)-3', 6'-0, 0'-ジアセチルフルオレセイン、ジヒドロドロダミン、二酢酸フルオレセイン、二酢酸4-アジドフルオレセイン（これらは誘導体であってもよい）のような細胞内に浸透し、生細胞内に存在する酵素タンパク質、例えば、エステラーゼによって分解されることで発色する化合物が挙げられる。特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する第4の化合物としては、例えば、4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド（これらは誘導体であってもよい）が挙げられる。これらは、大腸菌や大腸菌群が生産する酵素タンパク質であるβ-グルクロニダーゼやβ-ガラクトシダーゼと特異的に反応することによって分解されて4-メチルウンベリフェロンを生成する。4-メチルウンベリフェロンは紫外光に対し、励起され蛍光を発する。

第1乃至第4の化合物は、例えば、生理食塩水に溶解された状態で使用され、液状検体に添加されることで、微生物が液状検体に含まれている場合には微生物を染色しうる。生理食塩水に溶解された状態の第1乃至第4の化合物は、その適量を点眼剤容器などに収容して用時に液状検体に添加できるようにしてもよい。なお、染色時間は検査対象の種類や液状検体の容量などに応じて適宜設定されるべきものである。

染色された微生物を含む液状検体を本発明の微生物採取キットを用いて吸引ろ過することにより、微生物採取チップにおける微生物採取用フィルタ上に染色された微生物を捕集する。この際、例えば、染色された微生物を含む液状検体にポリソルベート80などの界面活性剤を添加しておけば、異物除去用フィルタに捕集される異物に付着してしまつて微生物採取用フィルタに捕集されないような微生物も、効率よく異物除去用フィルタを通過させて微生物採取用フィルタに捕集することができる。さらに液状検体にポリペプトンなどの培地成分を添加してお



けば、操作中における微生物の活性を維持することができる。界面活性剤とともに培地成分を含有する液剤、例えば、LP希釈液「ダイゴ」（日本製薬社製の商品名）はこのような目的を達成するために好適に使用される。吸引ろ過を行った後は、第1図(c)に示したような微生物採取用フィルタ2を含む部位のみを微生物計量装置の計量台へ移動して計測を行う。染色された微生物を含む液状検体にグリセリンなどの多価アルコールを添加しておけば、微生物採取用フィルタ表面が乾燥してしまうことによる微生物の失活や発光の減退を防止することができる。

なお、微生物採取チップにおいて、第1乃至第4の化合物を担持させたフィルタを微生物採取用フィルタの前段に設置するようなことも可能である。

第3図は微生物計量装置の一態様を示す概念図である。この微生物計量装置は、光源104、光源集光手段としてのレンズ110、受光部111を含む。光源104から発せられた励起光から目的の波長を取り出すために励起光分光フィルタ112で分光する。分光された励起光はプリズム113を経て、光路を変化させられる。光路を変化させられた励起光はレンズ110を経て検査台116に設置された微生物採取用フィルタ2を含む部位、即ち、微生物採取用フィルタ2と台座4と台座保持部材5と中空針6とからなる組合せ体の微生物採取用フィルタ2の表面に集光される。そこで励起光によって励起された微生物が有する蛍光は、再びプリズム113を透過する。その際、蛍光はプリズム113をそのまま透過し、受光部111に到達する。受光部111に到達した蛍光は、目的の蛍光のみを取り出すために蛍光分光フィルタ114を経て、受光部111に内蔵された光電変換素子115に到達し、信号化され、認識される。また、図には示していないが、この微生物計量装置は検査台116を移動する手段を備えており、微生物採取用フィルタ2の表面の蛍光発光を全て、若しくは一部を受光することができる。

光電変換素子115に到達した蛍光は、微生物判断手段105において微生物若しくは異物と判断され、微生物と判断された蛍光は積算されて、その数量が計量される。

光源104より発生した励起光は、レンズ110によって集光されるが、その際、レンズ110によって励起光を照射する範囲は微小な一定面積に集光される。

この場合、微小な一定面積とは微生物の大きさに基づいて設定した場合、一辺0.2  $\mu\text{m}$ 乃至7.0  $\mu\text{m}$ 程度の範囲を指し示す。また、現在最も利用されている微生物検出手段の一つである寒天培地拡散法との比較に基づいた場合、寒天培地拡散法によって培養、増殖した微生物の集団によって形成されるコロニーは、その距離が近接している場合、コロニー同士が重なり合う場合があり、最終的に目視で確認した場合、一つのコロニーとして認識してしまう事例が生ずる場合がある。そこで、この場合の微小な一定面積とは、コロニー同士が重なり合わない距離に基づいた場合、一辺100  $\mu\text{m}$ 乃至500  $\mu\text{m}$ 程度の範囲を指し示す。

レンズ110によって集光された励起光の照射時間は、蛍光を発する化合物の消光時間と励起光強度に依存する。化合物の種類によっては、自然界に存在する紫外光によっても分解する場合があり、2秒乃至300秒前後の範囲内で励起光を照射することが望ましい。

発光を検出する際、光源104の波長の幅が広いものである場合は、励起光分光フィルタ112によって励起波長を調整、分光することが可能となる。励起光分光フィルタ112は、目的の検出対象に応じて変えられるため、様々な蛍光を発する化合物に対応できる。また、同時に、発光した蛍光波長の幅が広いものである場合は、目的の発光を検出するために蛍光分光フィルタ114を目的の検出対象に応じて変えることで様々な蛍光を発する化合物に対応できる。

光源104としては、各種ダイオード、ハロゲンランプ、キセノンランプ、冷陰極管、レーザー、ブラックライト、水銀ランプなどが挙げられる。これらの光源のうち最大励起波長が比較的限定されているダイオード、冷陰極管、ブラックライトなどは、前記励起光分光フィルタ112および蛍光分光フィルタ114を使用することなく実施できる場合がある。また、ハロゲンランプ、水銀ランプなどについては、励起光分光フィルタ112および蛍光分光フィルタ114を使用する必要がある場合がある。

プリズム113およびレンズ110は、必要に応じてそれぞれ紫外光を透過する性質を有する。紫外光を透過する性質を有するものとしては石英ガラスなどが挙げられる。これにより紫外光で励起される化合物などにも対応できる。微生物採取用フィルタ2を含む部位を設置する検査台116は回転能を有する。レンズ

110により集光された励起光は、微生物採取用フィルタ2の外周部より中心部へ、若しくは、中心部より外周部へ、半径分の距離を移動する。その際、レンズ110により集光された励起光の位置が外周部に存在するときと中心部に存在するときで検査台116の回転速度を変化させることによって、レンズ110により集光された励起光が外周部に存在するときと中心部に存在するときで励起された化合物が発した蛍光のずれ、残像および残光の発生を防止することができる。

第3図に示したように検査台116は微生物採取用フィルタ2を含む部位を嵌合させるための陥没部分（装置溝）を有し、ここに微生物採取用フィルタ2を含む部位をそのまま組み込むことができる形状としてある。なお、この際、例えば、検査台116に、微生物採取用フィルタ2がその上に位置するように金属平板を設け、微生物採取用フィルタ2が金属平板に押し付けられるような状態で組み込まれるようにすることで、検査台116上で微生物採取用フィルタ2が凹凸なく平滑に保持されるようにすれば、微生物採取用フィルタ2に捕集された微生物の定量をより確実なものにすることができる。

なお、集光した位置を認識する手段を設けることでレンズ110によって集光された励起光の位置を認識し、集光が軌道から逸れないように、また、逸れた場合は再び軌道に戻すように設定されるものである。

なお、励起光を照射する微小な一定面積は、正方形を含む多角形に限らず、円形、楕円形などでも可能であり、検体を照射できるものであればよい。

なお、励起光若しくは蛍光を分光する手段として回折格子などを利用することも可能である。

なお、検査台116の回転速度を調整することで蛍光の残像および残光を防ぐこととしたが、励起光を照射するレンズ110の移動速度を調整することで残像および残光を防ぐことも可能である。

なお、集光した位置を認識する手段は、必ずしも励起光の集光位置を直接認識する必要は無く、微生物採取用フィルタ2上の軌道を把握するものであればよい。

本発明の第二の微生物計量方法は、微生物採取チップを用いて微生物を含み得る液状検体から微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、捕捉された微生物に生死細胞を発色させる第1の化合物と死細胞を前記発色と異なる波長で発色

させる第2の化合物と生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第3の化合物との中で1種類または複数種類と、特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する少なくとも1種類以上の第4の化合物を接触させ、微生物を染色した後、その波長差および発色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する方法である。この方法によれば、液状検体の容量が多い場合であっても微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後で微生物を染色するので、第1乃至第4の化合物の使用量は少量で、生細胞や死細胞や特定微生物を精度よく簡単に計量することができる。

液状検体に墨汁を添加することで微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集する際にフィルタ上を黒くすることにより、背景（バックグラウンド）や異物の発光を抑制して微生物計量を精度よく行うことができる。墨汁は必ずしも液状検体に添加しなければならないわけではなく、微生物が捕集された微生物採取用フィルタの上から添加してもよい。

第4図は本発明の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体の一態様の斜視図（一部透過図）である。この正常状態確認検査用検体151は、その表面に所定個数の特定波長の励起光によって発光する発光体154が固定されるとともに所定個数の傾き高さ確認マーク155が印刷されている基材（例えば樹脂フィルム）152とその支持枠153からなる。

基材の表面に固定する発光体としては、高分子蛍光粒子や染色した微生物などが挙げられる。高分子蛍光粒子は長期間にわたって安定で均一な発光を維持するので、装置の状態の確認を正確に繰り返して何度でも行うことができ、しかも人体に対する安全性が確保されている点において利用価値が高い。高分子蛍光粒子は、ポリスチレンやスチレンージビニルベンゼンなどを材質とする粒子であって、粒子を重合する際に特定波長の励起光によって発光する蛍光染料を添加して製造されるものであり、種々のものが市販されている。高分子蛍光粒子は0.1乃至1.0  $\mu\text{m}$ の粒子径のものを使用することが望ましい。小さすぎるとその個数を精度よく計測することが困難になったり、後述するように基材として微生物採取用フィルタを採用した場合、フィルタの孔から高分子蛍光粒子が落下するので検査用検体としての加工性が悪くなったりする一方、大きすぎると発光強度が強すぎる

ことにより計測精度に影響を及ぼす恐れがあるからである。高分子蛍光粒子は、単一種類の高分子蛍光粒子を固定してもよいし、例えば、350乃至400 nmの波長の励起光によって青色発光する高分子蛍光粒子と、500乃至550 nmの波長の励起光によって赤色発光する高分子蛍光粒子といったように、異なる波長の励起光によって異なる色彩で発光する複数種類の高分子蛍光粒子を固定してもよい。

染色した微生物を基材の表面に固定する場合、固定する微生物は、検査目的とする微生物が生菌であるか死菌であるかその両方であるかによって、生菌、死菌、生死混合菌の中から適宜選択される（例えば、検査目的とする微生物が死菌である場合には死菌計量用光源の正常状態を確認する必要があるので死菌を基材に固定しなければならない）。生菌や生死混合菌を固定する場合は、操作上における人体への安全性を確保しなければならないことに留意すべきである。

基材は樹脂フィルムその他、ガラス、紙、金属などであってもよい。また、微生物採取用フィルタを基材として使用してもよい。微生物採取用フィルタを基材として使用すれば、特定波長の励起光によって発光する発光体をろ過することで、当該発光体を、容易にフィルタ上に捕集、即ち、基材の表面に固定することができる。基材は暗色（例えば黒色）とすることが望ましい。背景（バックグラウンド）の発光を抑制して、装置の状態の確認を正確に行うことができるようにするためである。また、特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材上に金、銅、クロム、白金、パラジウムから選ばれる少なくとも一種の金属成分を含む薄膜を形成すれば、これらの成分は300乃至550 nm程度の波長の励起光に対する分光反射率が低いという性質を有するので、基材を暗色とし、さらに特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材上に上記の薄膜を形成すれば、効果はより向上する（アルミニウムや銀は上記の波長の励起光に対する分光反射率が高いので採用できない）。また、このような薄膜を形成すれば、発光体の発光強度の調整、例えば、発光強度が強すぎる場合に発光強度を弱めることが可能になるとともに、基材の表面に固定した発光体の脱落などを防止することも可能になる。薄膜は、一種の金属成分からなるものの他、合金、金属酸化物、金属炭化物、金属窒化物、金属炭窒化物などからなるものであっても

よい。また、積層薄膜であってもよい。薄膜の形成方法としては、真空蒸着法、イオンスパッタリング法、イオンプレーティング法などの公知の気相成長法が好適に採用される。薄膜の膜厚は10乃至1000 nmとすることが望ましく、20乃至100 nmとすることがより望ましい。10 nmを下回ると薄膜を形成することの効果が十分に発揮されない恐れがある一方、1000 nmを超えると基材の表面に固定した発光体の個数を精度よく計測することや発光体の発光強度の調整が困難になるからである。

第5図は第4図に示した表面に所定個数の特定波長の励起光によって発光する発光体154が固定されるとともに所定個数の傾き高さ確認マーク155が印刷されている樹脂フィルム152の正面図である。発光体154を染色した微生物とする場合、微生物の染色は、例えば、上記の生死細胞を発色させる第1の化合物や死細胞を発色させる第2の化合物や生細胞を発色させる第3の化合物を適宜用いて行えばよい。発光体154は第3図に示したような微生物計量装置により検出することができる。この正常状態確認検査用検体を使用して所定個数の発光体を検出することができることを確認した後、液状検体の微生物計量を行う。所定個数の発光体を検出することができたならば、装置は正常状態にあることを意味する。一方、所定個数の発光体を検出することができなかったならば、装置は正常状態にないことを意味するので、装置の調整などを行う必要がある。

第5図に示した樹脂フィルム152の表面には所定個数の特定波長の励起光によって発光する発光体154が固定されている他、4個の傾き高さ確認マーク155が印刷されている。4個の傾き高さ確認マーク155に光を照射し、その反射光の出力レベルが均等かどうかを調べることにより、例えば、第3図に示した微生物計量装置における検査台116の傾きの有無などを検査することができる。また、出力レベルが規定値通りかどうかを調べることにより、検査台116が規定高さとなっているかどうかなどを検査することができる。

なお、本発明の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体の形状については特段の制限があるわけではないが、例えば、第3図に示した微生物計量装置における検査台116が有する陥没部分（装置溝）に微生物採取用フィルタ2を含む部位と同様に組み込むことができる形状とすることが望ましい。また、検査台11

6に、正常状態確認検査用検体151の基材152がその上に位置するように金属平板を設け、基材152が金属平板に押し付けられるような状態で組み込まれるようにすることで、検査台116上で基材152が凹凸なく平滑に保持されるようにして、装置の正常状態の確認をより確実なものにしてもよい。

#### 産業上の利用可能性

以上の実施例から明らかなように、本発明によれば液状検体から微生物をろ過する過程で異物除去用フィルタと微生物採取用フィルタを設け、微生物採取用フィルタ上に微生物を捕集することを特徴とするものであり、異物の多く存在する食材屑や環境中の砂塵などの特殊な検体対象から調製された液状検体のろ過を容易なものとし、操作の迅速化、構造の簡略化が可能という効果がある微生物採取チップが提供される。

また、上記のような微生物採取チップと吸引ろ過手段とを組み合わせることにより、食品工場などの現場で、誰もが簡単にしかも確実に微生物計量を行うことができる微生物採取キットが提供される。

また、上記のような微生物採取キットを用いて生細胞や死細胞や特定微生物を誰もが精度よく簡単に計量できる微生物計量方法が提供される。

また、上記のような微生物計量を行う前に装置が正常状態にあることを確認するための特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含む微生物計量装置の正常状態確認検査用検体が提供される。

また、上記のような正常状態確認検査用検体を使用して装置が正常状態にあることを確認することができる微生物計量装置が提供される。

## 請求の範囲

1. 前段にプレフィルタとしての異物除去用フィルタと後段に微生物採取用フィルタを組み合わせてなり、微生物を含み得る液状検体から微生物をろ過して微生物採取用フィルタ上に微生物を捕集する微生物採取チップ。
2. 異物除去用フィルタの孔径が5乃至20  $\mu\text{m}$ であり、微生物採取用フィルタの孔径が0.2乃至0.8  $\mu\text{m}$ である請求の範囲第1項記載の微生物採取チップ。
3. 異物除去用フィルタが液状検体注入容器の底部としてなる請求の範囲第1項又は第2項記載の微生物採取チップ。
4. 異物除去用フィルタのさらに前段に液状検体注入容器を設けた請求の範囲第1項又は第2項記載の微生物採取チップ。
5. 液状検体注入容器開口部を覆う綿棒付き蓋を備えた請求の範囲第3項又は第4項記載の微生物採取チップ。
6. 微生物採取用フィルタを含む部位を単独にて取り外しが可能なものとした請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の微生物採取チップ。
7. 微生物採取用フィルタを暗色のフィルタとした請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の微生物採取チップ。
8. フィルタ上に金、銅、クロム、白金、パラジウムから選ばれる少なくとも一種類の金属成分を含む薄膜が形成された請求の範囲第1項乃至第7項のいずれかに記載の微生物採取チップ。
9. 薄膜の膜厚が10乃至50 nmである請求の範囲第8項記載の微生物採取チップ。
10. 前段にプレフィルタとしての異物除去用フィルタと後段に微生物採取用フィルタを組み合わせてなり、微生物を含み得る液状検体から微生物をろ過して微生物採取用フィルタ上に微生物を捕集する微生物採取チップと吸引ろ過手段とからなる微生物採取キット。
11. 吸引ろ過手段を陰圧管とした請求の範囲第10項記載の微生物採取キット。



- 1 2. 陰圧管の口部にゴム栓が設けてある請求の範囲第 1 1 項記載の微生物採取キット。
- 1 3. ゴム栓の中心部が薄層となっている請求の範囲第 1 2 項記載の微生物採取キット。
- 1 4. 微生物採取チップの微生物採取用フィルタ下部に陰圧管内部に届く中空針を設けた請求の範囲第 1 1 項乃至第 1 3 項のいずれかに記載の微生物採取キット。
- 1 5. 生死細胞を発色させる第 1 の化合物と死細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第 2 の化合物と生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第 3 の化合物との中で 1 種類または複数種類と、特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する少なくとも 1 種類以上の第 4 の化合物を液状検体に接触させ、微生物が液状検体に含まれている場合には微生物を染色した後、請求の範囲第 1 項記載の微生物採取チップを用いて微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、その波長差および発色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する微生物計量方法。
- 1 6. 請求の範囲第 1 項記載の微生物採取チップを用いて微生物を含み得る液状検体から微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、捕捉された微生物に生死細胞を発色させる第 1 の化合物と死細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第 2 の化合物と生細胞を前記発色と異なる波長で発色させる第 3 の化合物との中で 1 種類または複数種類と、特定微生物由来物質と反応することで前記発色と異なる波長で発色する少なくとも 1 種類以上の第 4 の化合物を接触させ、微生物を染色した後、その波長差および発色量から生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する微生物計量方法。
- 1 7. 液状検体に墨汁を添加する請求の範囲第 1 5 項又は第 1 6 項記載の微生物計量方法。
- 1 8. 微生物を微生物採取用フィルタ上に捕集した後、微生物採取用フィルタの上から墨汁を添加して微生物採取用フィルタ上を黒くする請求の範囲第 1 5 項又は第 1 6 項記載の微生物計量方法。
- 1 9. 特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含む

微生物計量装置の正常状態確認検査用検体を使用し、予め当該発光体を検出して微生物計量装置が正常状態にあることを確認した後、生細胞と死細胞の両方またはいずれか一方と特定微生物を同時検出する請求の範囲第15項又は第16項記載の微生物計量方法。

20. 発光体が高分子蛍光粒子である請求の範囲第19項記載の微生物計量方法。

21. 発光体が染色した微生物である請求の範囲第19項記載の微生物計量方法。

22. 特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含み、微生物計量を行う前に微生物計量装置が正常状態にあることを確認するための微生物計量装置の正常状態確認検査用検体。

23. 基材を暗色とした請求の範囲第22項記載の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体。

24. 特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材上に金、銅、クロム、白金、パラジウムから選ばれる少なくとも一種の金属成分を含む薄膜が形成された請求の範囲第22項又は第23項記載の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体。

25. 薄膜の膜厚が10乃至1000nmである請求の範囲第24項記載の微生物計量装置の正常状態確認検査用検体。

26. 請求の範囲第1項記載の微生物採取チップにおける微生物採取用フィルタの微小な一定面積に予め定められた波長域で励起光を照射する光源と、前記励起光によって発光する予め定められた波長域の光を受光する受光手段と、前記光源によって照射されて発光した光を設定した一定の時間内に受光し、その受光した光量が設定したしきい値の範囲内のときに微生物と判断する微生物判断手段と、前記微小な一定面積を連続または断続的に移動させる移動手段と、微生物判断手段から微生物と判断された信号から微生物の数量を積算する積算手段を有する微生物計量装置であって、特定波長の励起光によって発光する発光体を表面に固定した基材を含み、微生物計量を行う前に微生物計量装置が正常状態にあることを確認することができるようにした装置。

FIG. 1

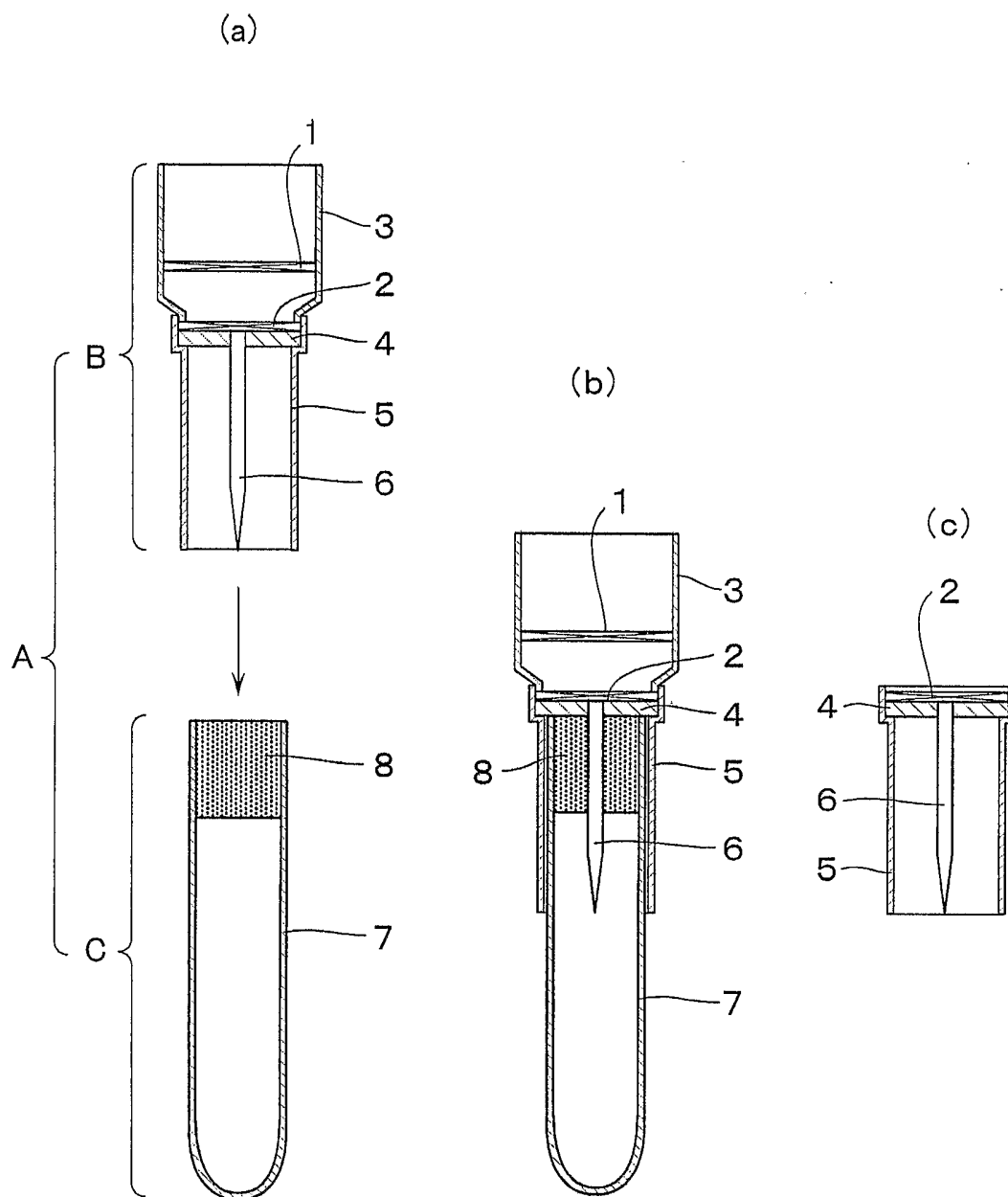


FIG. 2

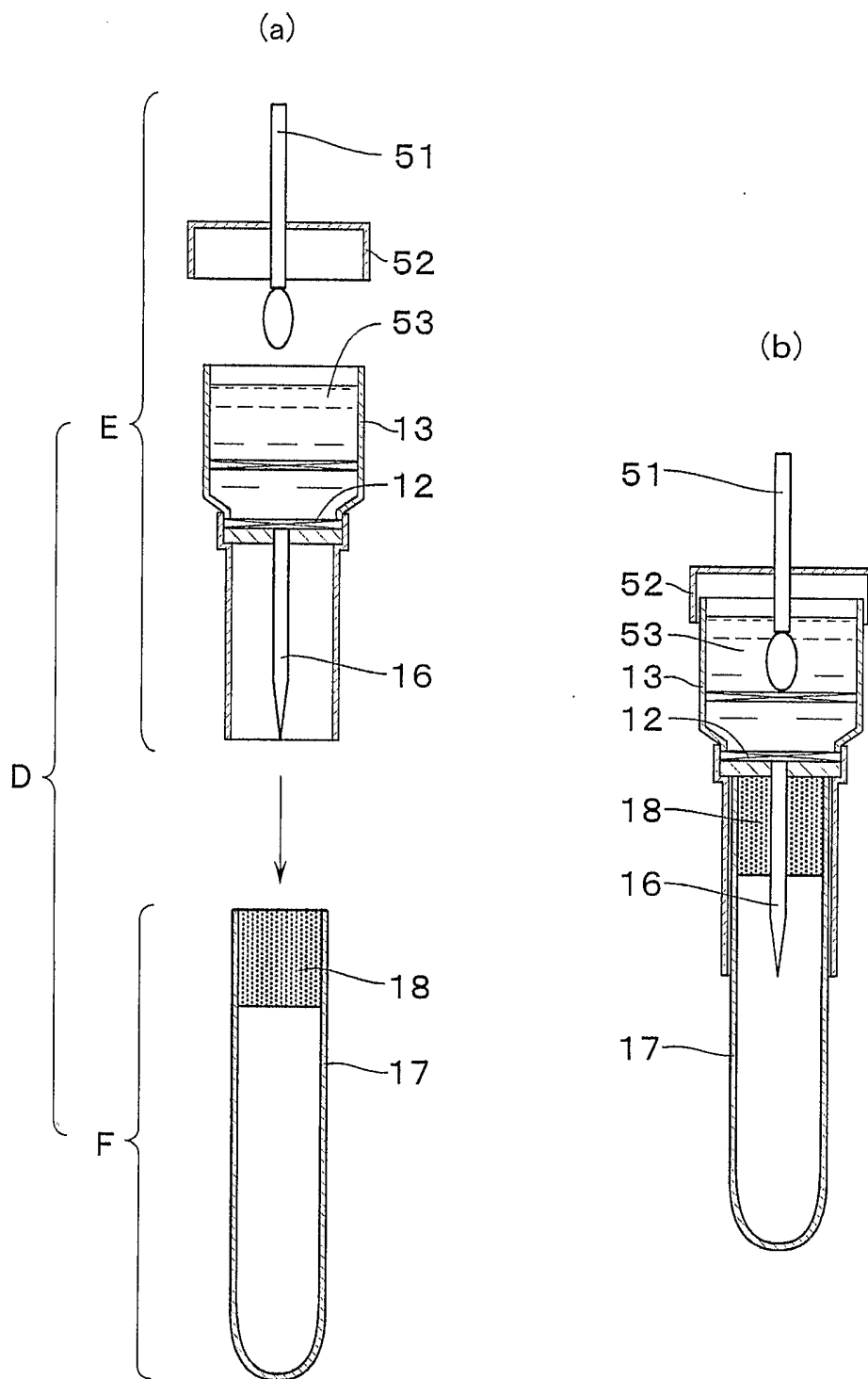


FIG. 3

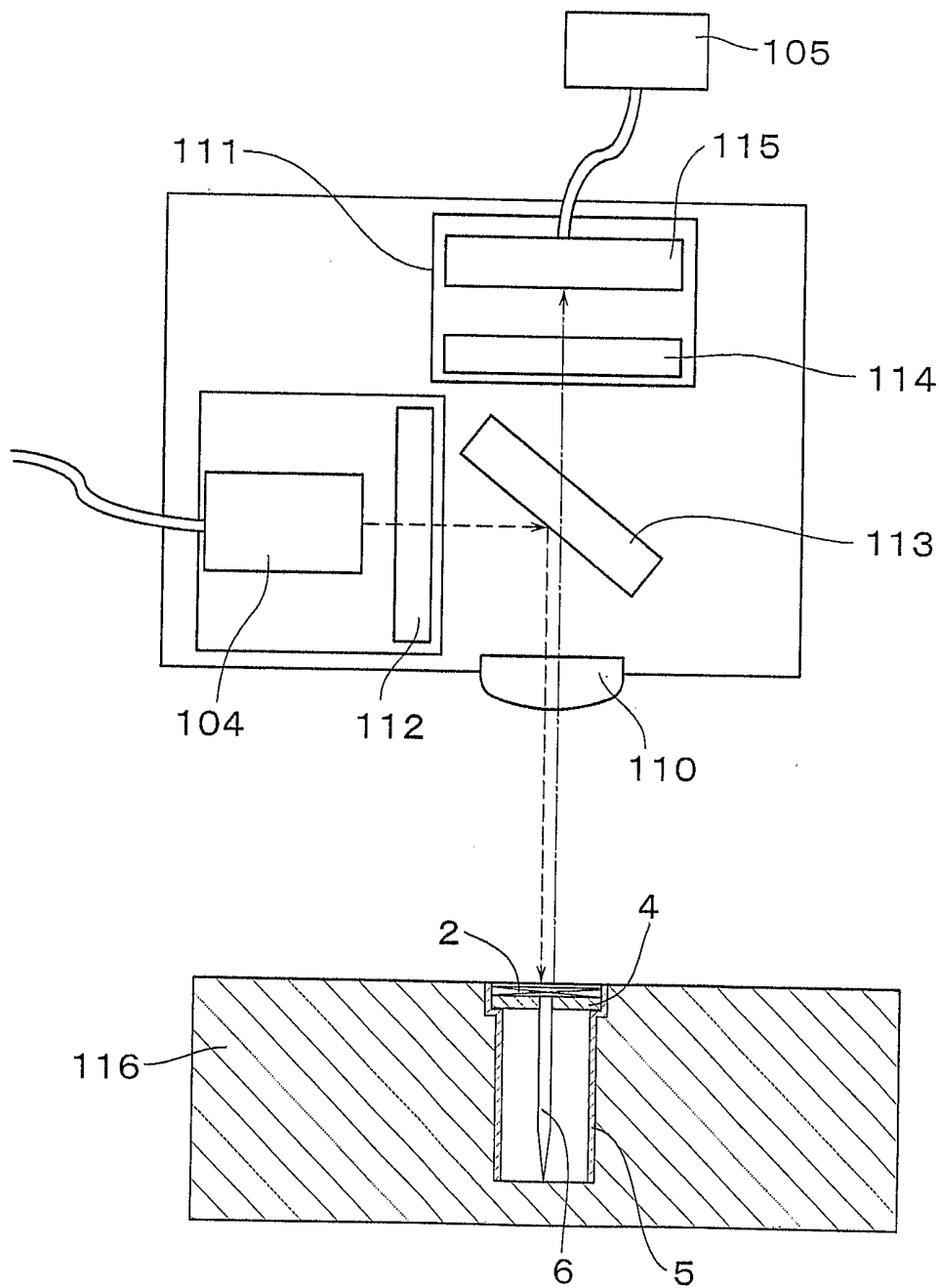


FIG. 4

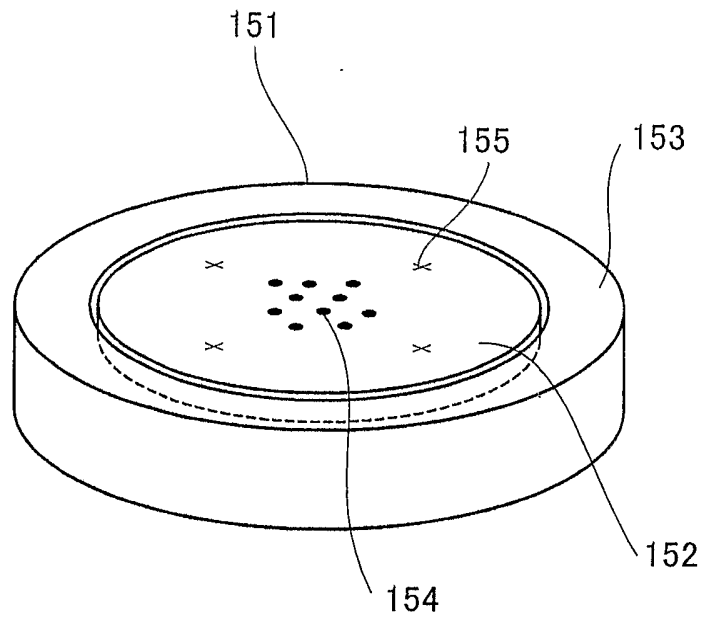
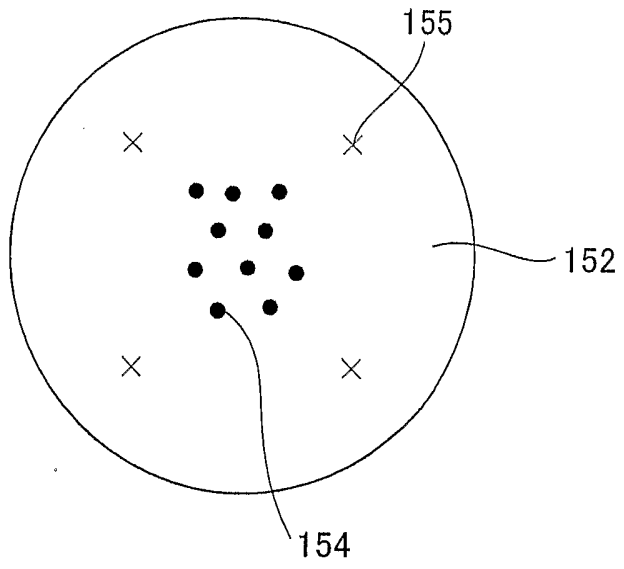


FIG. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07713

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N1/10, G01N21/78, G01N33/48, C12Q1/06, C12Q1/24,  
C12M1/28, C12M1/34

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)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N1/00-1/44, G01N21/62-21/83, G01N33/48-33/483,  
C12Q1/00-1/70, C12M1/00-1/42

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

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

JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 98/20352 A (Abbott Laboratories), 14 May, 1998 (14.05.98), Full text; Figs. 1 to 18 & US 5578459 A Full text; Figs. 1 to 18 & JP 2001-526773 A Full text; Figs. 1 to 18	1-7, 10-21, 26 8, 9, 13
Y	JP 5-273217 A (Meidensha Corp.), 22 October, 1993 (22.10.93), Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	1-7, 10-21, 26

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 document 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  
29 October, 2002 (29.10.02)

Date of mailing of the international search report  
19 November, 2002 (19.11.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07713

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 59897993 A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 27 April, 1999 (27.04.99), Full text; Figs. 1 to 6 & JP 9-65893 A Full text; Figs. 1 to 2 & WO 96/30542 A Full text; Figs. 1 to 6 & EP 818540 A Full text; Figs. 1 to 6	2, 7
Y	The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan Nenji Taikai Yoshishu, Dai 28 Kai (JP), The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan, 22 May, 2001 (22.05.01), page 44.	5
Y	JP 11-113562 A (Konica Corp.), 27 April, 1999 (27.04.99), Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none)	15-21, 26
Y	US 5952238 A (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 September, 1999 (14.09.99), Full text; Figs. 1 to 2 & WO 96/24044 A Full text; Figs. 1 to 2 & EP 807816 A Full text; Figs. 1 to 2	17, 18
Y A	WO 87/2802 A (Analysis Systems Inc.), 07 May, 1987 (07.05.87), Full text; Figs. 1 to 24 & JP 7-111425 B2 Full text; Figs. 1 to 24 & JP 63-501597 A Full text; Figs. 1 to 24 & US 4741043 A Full text; Figs. 1 to 9 & EP 571053 A Full text; Figs. 1 to 24	22, 26 23-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07713

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 21 and 26 relate to microorganism-collecting chips or microorganism-collecting kits.

Claims 22 to 25 relate to test specimens for confirming the normal state.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N1/10, G01N21/78, G01N33/48,  
C12Q1/06, C12Q1/24, C12M1/28, C12M1/34

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<sup>7</sup> G01N1/00-1/44, G01N21/62-21/83,  
G01N33/48-33/483,  
C12Q1/00-1/70, C12M1/00-1/42

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 1971-2002年  
日本国登録実用新案公報 1994-2002年  
日本国実用新案登録公報 1996-2002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)

JICSTファイル (JOIS)

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 請求の範囲の番号
Y	WO 98/20352 A (ABBOTT LABORATORIES) 1998. 05. 14, 全文, 第1-18図 & US 5578459 A, 全文, 第1-18図	1-7, 10-21, 26
A	& JP 2001-526773 A, 全文, 第1-18図	8, 9, 13
Y	JP 5-273217 A (株式会社明電舎) 1993. 10. 22 全文, 第1-4図 (ファミリーなし)	1-7, 10-21, 26

C欄の続きにも文献が列举されている。

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

29. 10. 02

国際調査報告の発送日

19.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
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)  
遠藤 孝徳

2J 2909

電話番号 03-3581-1101 内線 3250



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 請求の範囲の番号
Y	US 59897993 A (Idemitsu Kosan Company Limited) 1999. 04. 27, 全文, 第1-6図 & JP 9-65893 A, 全文, 第1-2図 & WO 96/30542 A, 全文, 第1-6図 & EP 818540 A, 全文, 第1-6図	2, 7
Y	日本防菌防黴学会年次大会要旨集, 第28回, (日) 日本防菌防黴学会, 2001. 05. 22, 第44頁	5
Y	JP 11-113562 A (コニカ株式会社) 1999. 04. 27 全文, 第1-2図 (ファミリーなし)	15-21, 26
Y	US 5952238 A (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) 1999. 09. 14, 全文, 第1-2図 & WO 96/24044 A, 全文, 第1-2図 & EP 807816 A, 全文, 第1-2図	17, 18
Y A	WO 87/2802 A (ANALYSIS SYSTEMS INC.) 1987. 05. 07, 全文, 第1-24図 & JP 7-111425 B2, 全文, 第1-24図 & JP 63-501597 A, 全文, 第1-24図 & US 4741043 A, 全文, 第1-9図 & EP 571053 A, 全文, 第1-24図	22, 26 23-25

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-21、26 は、微生物採取チップか微生物採取キットに関するものである。  
請求の範囲 22-25 は、正常状態確認検査用検体に関するものである。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。