

明 細 書

発明の名称：微生物の検査方法及びその装置

技術分野

[0001] 本発明は、微生物の検査方法及びその装置に関し、特にバラスト水等に含まれて生存しているプランクトン等の微生物を検出するのに適した微生物の検査方法及びその装置に関する。

背景技術

[0002] 荷物を積載していない船舶は、当該船舶を安定させるためにバラスト水を搭載して航行し、荷物を積載する海域において搭載された前記バラスト水を排出する。

バラスト水は、通常、搭載する海域と異なる海域に排出されるため、該バラスト水に含まれるプランクトンや細菌等の微生物を本来の生息地以外の海域に運び、生態系を破壊する等の問題を引き起こす虞がある。

[0003] このような問題に対処するため、バラスト水の規制に関する国際的なルールが策定され、「船舶のバラスト水および沈殿物の規制および管理のための国際条約（バラスト水管理条約）」が採択されている。

[0004] 上記バラスト水管理条約に関連する「バラスト水サンプリングに関するガイドライン（G2）」は、「バラスト水排出基準（D-2）」において、船舶から排出されるバラスト水に含まれて生存している微生物の許容個体数を、前記微生物の最小サイズにより区分して規定している。例えば、最小サイズが $50\mu\text{m}$ 以上の微生物（以下、「Lサイズ生物」という。）については $10\text{個}/\text{m}^3$ 以下、最小サイズが $10\mu\text{m}$ 以上 $50\mu\text{m}$ 未満の微生物（以下、「Sサイズ生物」という。）については $10\text{個}/\text{mL}$ 以下といったように規定している。

[0005] 現在までに、上記バラスト水などの水中で生息している微生物細胞を計測する方法として、特許文献1に記載されたものが知られている。

[0006] 上記特許文献1に記載の方法は、まず微生物の生細胞に存在する酵素又は

補酵素と反応し細胞内で蛍光物質を生成する化学物質を、微生物を含む測定対象試料に作用させる。次に一定時間混合接触を行い、細胞内に生成した蛍光物質を励起するに必要な波長の光を試料に照射する。そして試料中の個々の微生物から発する光を点の数として計測する微生物細胞の生細胞の計測方法である。

[0007] これにより、従来の寒天培養方法では10時間～数十時間必要であった測定時間が10分以内と格段に早くなる。また、生菌の発する光を点として光学的、電氣的に検知計測する手段を確立したことにより生菌の直接自動計数が可能となり、殺菌装置のコントロール、製品品質の迅速管理が速やかに行えるといったメリットがある。

[0008] しかしながら、上記特許文献1記載の方法は、水の種類、温度、染色剤の種類、濃度、染色時間などの相違によって測定値がばらつくことがある。

[0009] 他の方法として、上記バラスト水を排出する際に上記排出基準を満たしているか否かを確認するために、送水ポンプで汲み上げた海水をフローセルに通水して画像計測するもの（例えば、特許文献2）、送水ポンプで汲み上げた海水を目開きの異なるフィルタユニットに通水してフィルタ上の微生物を発光させて微生物を計数するもの（例えば、特許文献3）などの微生物検査装置が知られている。

[0010] 上記特許文献2に記載の微生物検査装置は、液体の検体を流しつつ該検体中に存在する生細胞を持つ生物を染色する染色部と、前記染色が施された検体を流しつつ前記生物の濃度を高めるように濃縮する濃縮部と、前記濃縮された検体中の前記生物を含む個体の画像情報を取得する個体計測部と、前記個体計測部より出力された前記個体の画像情報より前記生物の測定を行う制御手段とを備えている。

これにより、検体の液体中の生物の染色工程、液体中の生物の濃縮工程、液体中の生物の情報取得の工程等を一連で行えるため、各方式を個別に行う手法と比べて、ひとつの工程を終えた検体の一部が次の工程に進むまでの待機時間を大幅に短縮、または0とすることができ、待機時間での染色の状

態の劣化を防ぐ意味で安定した生物の生死の情報を取得することができるというメリットがある。

[0011] しかしながら、上記特許文献2記載の微生物検査装置は、送水ポンプで汲み上げた海水を各種工程に順次通水させるため、装置が大掛かりとなり、製造コスト高となる。そして測定が完了するには少なくとも数時間かかることがある。

[0012] また、上記特許文献3に記載の微生物検査装置は、海水を目開きの異なる3種のフィルタを直列に配置してなるフィルタユニットに通水する工程と、フィルタに補集され生存している微生物による発色、発光および蛍光のうちいずれかを発生させる工程と、発色、発光および蛍光のうちいずれかを検出して画像解析によってバラスト水または海水中の微生物数を計数する工程とを備えたことを特徴とするものである。

これにより、段階的なサイズごとの微生物の捕捉を実現でき、その結果、サイズごとの基準で規制された許容残存基準を満たしているかどうかを迅速に測定できる。

[0013] しかしながら、特許文献3記載の微生物検査装置は、特許文献1と同様に送水ポンプで汲み上げた海水を各種工程に順次通水させるものであり、装置が大掛かりとなり、製造コスト高になることがある。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：特開平3-43069

特許文献2：特開2009-85898

特許文献3：特開2007-135582

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明は上記問題点にかんがみ、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で、しかも高精度に測定することができる微生物の検査方法及びその

装置を提供することを技術的課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] 上記課題を解決するため本発明は、試料溶液中の微生物量を測定するための微生物の検査装置であって、光を透過する材質で形成された試料容器を有し、該試料容器内で試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合手段と、前記試料容器に励起光を照射する励起光源と、

光を検知して電気信号に変換する受光手段と、前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する制御手段と、を備え、前記試料溶液は、試料に、微生物を染色する蛍光染色試薬が添加されて構成されており、前記受光手段は、前記励起光源からの前記励起光の照射による、前記試料溶液からの蛍光発光を検知し、前記制御手段は、前記受光手段からの電気信号に基づき発光数を検出し、前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出するという技術的手段を講じた。

これにより、試料容器に試料と微生物を染色する蛍光染色試薬とを添加し、攪拌混合手段により試料容器の攪拌・混合を行い、次いで試料溶液を攪拌しつつ試料容器に励起光を入射させ、さらに、受光手段により微生物の蛍光発光を受光するため、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することが可能となる。また、本発明の装置はフロー式ではないため装置を小型化することが可能となり、製造コストも安価となる。

[0017] また、請求項2記載の発明は、前記受光手段と前記制御手段との間にフィルタリング手段を備え、前記フィルタリング手段は、前記受光手段からの電気信号中の、低周波成分のノイズ及び高周波成分のノイズを濾波することを特徴とする。

これにより、電気信号が制御手段に取り込まれる前に、フィルタリング手段によって外乱が濾波されるので、微生物の蛍光発光の受光量に相応する電気信号と外乱とを明確に区別することができる。これにより、微生物量の測定誤差が生じることがなく、測定値がばらつく問題も生じず、安定して測定

することが可能となる。

[0018] そして、請求項3記載の発明は、前記フィルタリング手段が、ハイパスフィルタとローパスフィルタとを連結したバンドパスフィルタであることを特徴とする。

[0019] 請求項4記載の発明は、前記励起光源が、前記試料容器に対して直交するように励起光を照射するように配置され、前記受光手段は、前記励起光源の励起光と直交した角度で前記蛍光発光を受光するように配置されることを特徴とする。

これにより、励起光源からの励起光が直接受光手段に入射することがなく、また、蛍光発光の厚み部分が薄くなる（例えば、図2のように、発光部分の幅が従来20mm～30mmであったものが、幅M（3mm）のように狭くなり、厚み部分が薄くなる。）ため、バックグラウンドと微生物の蛍光発光との光量の差異がきわめて明確になり、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものとなる。

[0020] また、請求項5記載の発明は、前記受光手段と前記試料容器との間にスリット部材を設けたことを特徴とする。

これにより、ノイズとなるバックグラウンドの蛍光発光の面積が狭まるため、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものとなる。

[0021] さらに、請求項6記載の発明は、前記励起光源と前記試料容器との間に前記励起光源からの光を平行光に変換する平行光変換手段を設けたことを特徴とする。

これにより、励起光源からの励起光の広がりを抑えて、平行光で試料容器の被照射面に照射されるため、バックグラウンドの蛍光発光の厚み部分が薄くなり、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものである。

[0022] 請求項7記載の発明は、前記平行光変換手段が、平板にねじ切孔を穿設して形成したものであることを特徴とする。

これにより、安価な材料によって励起光源からの励起光がねじ切孔によって角度が強制され、ねじ切孔から照射された光の指向角を狭くすることができる。このため、バックグラウンドの蛍光発光の厚み部分が薄くなるため、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものである。

[0023] また、請求項 8 記載の発明は、前記平行光変換手段が、凸レンズで形成したものであることを特徴とする。

これにより、安価な材料によって励起光源からの励起光の指向角を狭くすることができる。このため、バックグラウンドの蛍光発光の厚み部分が薄くなり、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するものとなる。

[0024] 請求項 9 記載の発明は、試料溶液中の微生物量を測定するための微生物の検査方法であって、試料容器内で試料に微生物を染色する蛍光染色試薬を添加した試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合工程と、前記試料容器に励起光を照射する励起工程と、前記励起光の照射による、前記試料容器からの蛍光発光を検知して電気信号に変換する受光工程と、該受光工程により変換された電気信号から発光数を検出し、前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する微生物数推定工程とを備えたものである。

これにより、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することができる。また、蛍光発光の厚み部分が薄くなるため、バックグラウンドと微生物の蛍光発光との光量差が極めて明確となり、微生物の蛍光発光の検出精度を向上することができる。

[0025] また、請求項 10 記載の発明は、前記受光工程と前記微生物数推定工程の間に、前記受光工程により変換された電気信号中の、低周波成分のノイズ及び高周波成分のノイズを濾波するフィルタリング工程を備えたことを特徴とする。

これにより、電気信号が制御手段に取り込まれる前に、フィルタリング手

段によって外乱が濾波されるので、微生物の蛍光発光の受光量に相応する電気信号と外乱とを明確に区別することができる。これにより、微生物量の測定誤差が生じることがなく、測定値がばらつく問題も生じず、安定して測定することが可能となる。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で、しかも高精度に測定することができる微生物の検査方法及びその装置を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]本発明の実施形態に係る微生物の検査装置の全体を示す斜視図である。

[図2]本発明の実施形態に係る測定部の概略平断面図である。

[図3]本発明の第1の実施形態に係る微生物の検査装置の全体構成を示すブロック図である。

[図4]本発明の第1の実施形態に係る微生物の検査装置の測定フローを示すフロー図である。

[図5]本発明の第2の実施形態に係る微生物の検査装置の全体構成を示すブロック図である。

[図6]本発明の第2の実施形態におけるフィルタリング手段の回路の一例を示す図である。

[図7]本発明の第2の実施形態に係る微生物の検査装置の測定フローを示すフロー図である。

[図8A]平行光変換手段の一実施形態を示す概略断面図である。

[図8B]平行光変換手段の一実施形態を示す概略断面図である。

[図9A]スリットの有無により観察面が狭まることを示す作用図である。

[図9B]スリットの有無により観察面が狭まることを示す作用図である。

[図10A]微生物の個体数と光電子増倍管（PMT）の受光カウントとの相関関係を示すグラフである。

[図10B]微生物の個体数と光電子増倍管（PMT）の受光カウントとの相関関

係を示すグラフである。

[図11A]微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を示すグラフである。

[図11B]微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を示すグラフである。

[図11C]微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を示すグラフである。

[図11D]微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を示すグラフである。

[図12A]フィルタリング手段を装着する前の取得電圧の波形を示すグラフである。

[図12B]フィルタリング手段を装着する前の取得電圧の波形を示すグラフである。

[図12C]フィルタリング手段を装着する前の取得電圧の波形を示すグラフである。

[図13A]フィルタリング手段を装着した後の取得電圧の波形を示すグラフである。

[図13B]フィルタリング手段を装着した後の取得電圧の波形を示すグラフである。

[図13C]フィルタリング手段を装着した後の取得電圧の波形を示すグラフである。

[図13D]フィルタリング手段を装着した後の取得電圧の波形を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0028] (第1の実施形態)

本発明を実施するための形態を図面を参照しながら説明する。図1は本実施形態に係る微生物の検査装置の全体を示す斜視図であり、図2は本実施形態に係る測定部の概略平断面図であり、図3は本実施形態に係る微生物の検査装置の全体構成を示すブロック図である。

[0029] 図1及び図2に示すように本発明の検査装置1は、CPU基板などの制御機構を内蔵して測定結果等の情報処理作業や統計処理作業などを行う本体部2と、該本体部2に並設した操作ボタン等の配置構成からなる操作部3と、

前記測定結果等を表示するために液晶パネル等で形成された表示部４と、光を透過する透明な材質（例えば、ガラスや石英やアクリル樹脂等）で形成されたバッチ式の試料容器５を収容し、試料溶液Ｓ中の微生物数を光学的に計数する測定部６とを主要部として構成されている。符号７は試料容器４内に収容された試料溶液Ｓを攪拌するための回転子であり、該回転子７は前記試料容器５内に試料溶液Ｓ及び発光試薬とともに収容し、前記試料容器５を測定部６に収容したときに、該測定部５内に内蔵されたマグネティックスター２７により回転駆動される構成となっている。これにより、試料容器５内の試料と発光試薬とからなる試料溶液Ｓを所定温度で攪拌混合しながら試料溶液Ｓ中の微生物数を計数することができ、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することが可能となる。

[0030] 図１に示す検査装置１の寸法は、幅が３００ｍｍ、奥行が３００ｍｍ、高さが１００ｍｍ、重量は約２～４ｋｇの範囲に形成されており、手持ちトランク（図示せず）等に収容して、持ち運び可能であり、船舶内での測定や、屋外での測定が可能である。

光を透過する透明な材質で形成されたバッチ式の試料容器５は、底面が５０ｍｍ×５０ｍｍ、高さが６０ｍｍの角柱状に形成され、水位が４０ｍｍのときの内容量が１００ｍｌ（ミリリットル）に設定されている。試料容器５はこのような角柱状に限定されることはなく、内容量を１００ｍｌ（ミリリットル）程度確保することができれば、円柱状であっても、立方体であってもよい。

[0031] 前記測定部６は、図１、図２及び図３に示すように、試料容器５を収容して保持する試料容器収容部９と、前記試料容器５に向けて励起光を照射する光源部１３と、該光源部１３から照射された励起光により発光試薬に染色されて試料容器５内で漂っている微生物を観察するための受光部１９とを備えている。そして、受光部１９からは、試料溶液Ｓ中の微生物数を計数し、測定結果等の情報処理作業や統計処理作業などを行うＣＰＵ基板２３に電氣的

に連絡されている。

[0032] 前記試料容器収容部 9 は、前記試料容器 5 の少なくとも二面を取り囲む保持プレート 8 a, 8 b により形成され、前記光源部 13 からの光の照射を遮断しないように前記試料容器 5 を収容保持するものである。

そして、図 2 に示すように、試料容器 5 の被照射面 G に対して法線 A P による励起光が入射されるよう光源部 13 が配置される。前記光源部 13 は、前記試料容器収容部 9 近傍に配置された L E D 光源 10 と、該 L E D 光源 10 の前面に配置され、拡散光を平行光に変換する平行光変換手段 11 (L E D の光を、一面に向かって同じ角度で均一に光線が当たる平行光に変換するもの) と、スリット状の平行光からなる励起光を試料容器 5 に照射する励起光用バンドパスフィルタ 12 とを備えている。

[0033] 図 8 は平行光変換手段 11 の一実施形態を示す概略断面図である。図 8 A に示す例は、平行光変換手段 11 として所定厚さの平板 31 に所定径のねじ切孔 32 を穿設して形成したものであり、光路長に合わせて平板 31 の厚さ L とねじ切孔の孔径とが適宜設定されている。これにより、L E D 光源 10 から照射される入射角度 θ の散乱光は、ねじ切孔 32 を通過する際には平行光に変換されるものとなる。図 8 A に示す例では、 θ と L との最適条件を S N 比の試験により決定しており、例えば、M3 (ネジ孔の外径) $\times$ 0.5 (ピッチ) とすれば、 θ が 9.5° 、L が 15 mm のときが最適であった。

[0034] 図 8 B に示す平行光変換手段 11 は、L E D 光源 10 の前面に凸レンズ 33 を設けたものであり、L E D 光源 10 から照射された散乱光は、凸レンズ 33 内を通過して外部に出射する際には平行光に変換されるものとなる。

[0035] 本実施形態の光源部 13 は、光源として L E D 光源 10 を用いたが、微生物に含まれる蛍光物質を励起させることができれば、L E D 光源 10 に限らず、平行光の照射が可能な平行光 L E D 光源やレーザ光源や電球を採用することもできる。言うまでもないが、平行光の照射が可能な平行光 L E D やレーザ光源を採用するときは、前述の平行光変換手段 11 は不要となる。

[0036] 図 2 に示すように、前記受光部 19 は、光源部 13 からの法線 A P による

励起光と直交した角度を持って受光面 F が配置されるように設けられる。また、受光部 19 は前記 LED 光源 10 から試料容器 5 に向けて励起光が照射される平行光に対し、これと直交する光軸で蛍光が受光されるように配置構成した光電子増倍管 (PMT) 14 と、該蛍光用バンプアスファルト面に配置した蛍光用バンプアスファルト 15 と、該蛍光用バンプアスファルト 15 の前面に配置した集光用レンズ 16 と、該集光用レンズ 16 の前面に配置したスリット 17 と、該スリット 17 と前記試料容器 5 との間隙に設置され、微生物に含まれる蛍光物質を励起させ、これにより発光した蛍光を集光し結像させるためのリレーレンズ 18 と、を備えたものである。

[0037] 前記光電子増倍管 (PMT) 14 と試料容器 5 との間のスリット 17 は、観察面をスリット状に狭めるものである。すなわち、図 9A のようにスリットなしの状態では、受光面 F が円で形成されるバックグラウンドを監視するのに対し、図 9B のようにスリットありの状態では、受光面 F が斜線を除いた縦長スリットで形成されるバックグラウンドを監視することになる。したがって、受光面 F の受光面積が図 9B のように狭まる結果、ノイズとなるバックグラウンドの蛍光発光の面積も狭まるため、バックグラウンドの蛍光発光に対する微生物の蛍光発光の信号の比が向上し、微生物の蛍光発光の検出精度が向上するのである。

[0038] なお、受光部 19 は、受光センサとして光電子増倍管 (PMT) 14 を用いた例を示したが、これに限定されることはなく、シリコンフォトダイオード (SiPD) や、アヴァンシエフォトダイオード (APD) など、光電子増倍管 (PMT) と同様に微生物に含まれる蛍光物質の発光を検知することができる各種の光検出器を採用することができる。

[0039] さらに、図 3 を参照して、本実施形態の検査装置 1 の電気的な制御構成を説明する。本体部 2 を形成する筐体 20 内中央には、AC 電源 21 や二次電池 22 から電源の供給を受けて、前記光電子増倍管 (PMT) 14 により光から電気に変換された出力信号を解析したり、任意の輝度範囲以上にあるかを判定したり、任意の輝度の信号をパルスカウントしたり、前記 LED

光源 10 のオン・オフ制御などを行う CPU 基板 23 が配置されている。前記 AC 電源 21 と前記 CPU 基板 23 との間には、AC/DC 変換器 24 を介在させてある。

[0040] 前記 CPU 基板 23 には、前記光電子増倍管 (PMT) 14、前記 LED 光源 10、読み出し書き込み用記憶部となる RAM 25 及び読み出し専用記憶部となる ROM 26 がそれぞれ電氣的に接続される。また、図 1 に示す操作部 3 の電源ボタン 3a、測定開始ボタン 3b、外部出力ボタン 3c 及び設定ボタン 3d が電氣的に接続されている。そして、前記電源ボタン 3a の押下によりオン・オフの切換制御が行われ、前記測定開始ボタン 3b の押下により測定が開始され、外部出力ボタン 3c の押下により外部のプリンタやパソコンへデータの転送が行われ、設定ボタン 3d の押下により、測定の種類の切換 (L サイズ微生物の測定か S サイズ微生物の測定かの切換) や、判定基準の設定の変更や、しきい値の設定の変更や、測定時間の設定の変更を行うことができる構成となっている。

[0041] そのほか、前記 CPU 基板 23 には、前記回転子 7 を磁力により回転させるマグネティックスター 27、液晶パネル等で形成された表示部 4、CPU 基板 23 など制御機器の冷却用ファン 28、及び RS-232C など外部出力端子 29 を接続してある。

[0042] 図 4 は測定フローを示すフロー図であり、図 1 乃至図 4 を参照して上記構成における作用を説明する。

[0043] まず、作業者はピペット等を使用し、温度 20℃ 程度のバラスト水から 100 ml (ミリリットル) を試料として採取し、試料容器 5 に投入する (図 4 のステップ 1)。次に、試料容器 5 内に蛍光染色試薬を添加する (図 4 のステップ 2)。この蛍光染色試薬は一般的に知られているカルセイン AM (Calcein-AM, ドイツ国 Promocell GMBH 社製) や、FDA などを使用することができる。カルセイン AM は、植物性プランクトンに対して染色しやすい傾向があり、FDA は、動物性プランクトンに対して染色しやすい傾向があり、このため、染色試薬による染色を、カルセイン AM と FDA とを混合した

試薬により染色を行うと、試薬の染色時間を短くして、染色に要する時間を従来の半分にすることが可能となる。そして、作業者は試料容器 5 に回転子 7 を投入後、検査装置 1 の測定部 6 に収容し、測定部 6 の蓋 30 を被着することで測定準備が完了する。ここで、電源ボタン 3 a を押下すれば、該測定部 6 内に内蔵されたマグネティックスターラ 27 の駆動により回転子 7 が回転し、試料溶液 S が攪拌されることになる（図 4 のステップ 3）。

[0044] 次に、作業者は操作部の測定開始ボタン 3 b の押下により、所定時間後 LED 光源 10 が点灯し、励起光用バンドパスフィルタ 12 を透過した光が試料容器 5 に照射されることになる。このとき、例えば、波長特性として 450 nm～490 nm の波長の光が照射され、試料容器 5 内の検体（微生物）が蛍光発光することになる（図 4 のステップ 4）。そして、この蛍光が蛍光用バンドパスフィルタ 15 を透過して光電子増倍管（PMT）14 により検知されることになる（図 4 のステップ 5）。

[0045] 光電子増倍管（PMT）14 は、光電効果の利用により光エネルギーが電気エネルギーに変換されるとともに、電流増幅機能が付加され、高感度に蛍光発光を検知することができる。検知した電気信号は CPU 基板 23 に送られ、一定しきい値以上の受光波形がカウントされることになる（図 4 のステップ 6）。

[0046] さらに、CPU 基板 23 では、受光波形カウント値から前記試料容器 5 内の水 100 ml（ミリリットル）中に存在する微生物数を推定して、排水基準を満たすか否かを表示部 4 に表示されるのである（図 4 のステップ 7）。

[0047] （第 2 の実施形態）

本実施形態においては、受光部 19 と CPU 基板 23 との間にフィルタリング手段 34 が設けられている点が第 1 の実施形態と異なっている。その他の構成は第 1 の実施形態と同様であるため説明を省略する。以下、図面に基づいて説明する。

測定部 6 は、図 1、図 2 及び図 5 に示すように、試料容器 5 を収容して保持する試料容器収容部 9 と、前記試料容器 5 に向けて励起光を照射する光源

部 1 3 と、該光源部 1 3 から照射された励起光により試料容器 5 内で漂って発光している微生物を観察するための受光部 1 9 とを備えている。そして、受光部 1 9 からは、フィルタリング手段 3 4 を介して CPU 基板 2 3 に電氣的に連絡されている。CPU 基板 2 3 では、受光部 1 9 からの電気信号により試料溶液 S 中の微生物数を計数し、測定結果等の情報処理作業や統計処理作業などを行うことができる。

[0048] 図 6 は本発明の要部となるフィルタリング手段の回路の一例を示す図である。図 6 に示すように、光電子増倍管 (PMT) 1 4 と CPU 基板 2 3 との間には、演算増幅器 3 5、ハイパスフィルタ回路 3 6 及びローパスフィルタ回路 3 7 を電氣的に接続している。前記演算増幅器 3 5 は、前記光電子増倍管 (PMT) 1 4 により受光した受光量に応じて生成された出力電流を電圧に変換し、微小な電流であっても検出を可能とするものである。また、ハイパスフィルタ回路 3 6 は、入力信号のうち、所定の周波数より高い周波数の成分を減衰させず、所定の周波数より低い周波数の成分を逡減させるフィルタリング手段である。一方、ローパスフィルタ回路 3 7 は、入力信号のうち、所定の周波数より低い周波数の成分を減衰させず、所定の周波数より高い周波数の成分を逡減させるフィルタリング手段である。そして、前記ハイパスフィルタ回路 3 6 とローパスフィルタ回路 3 7 とを連結すると、必要な範囲の周波数のみを通過させるバンドパスフィルタ回路 3 8 となる。

[0049] 前記演算増幅器 3 5 は、オペアンプ OP と抵抗 R とを有する。そして、前記ハイパスフィルタ回路 3 6 及びローパスフィルタ回路 3 7 は、互いに電氣的に接続された抵抗 R 1, R 2 とコンデンサ C 1, C 2 とをそれぞれ有している。これにより、演算増幅器 3 5 により光電子増倍管 (PMT) 1 4 からの出力電流が電圧に変換され、次いで、バンドパスフィルタ回路 3 8 の入力側から信号 $V_{in}(t)$ を入力すると、出力側では外乱となる電気信号が濾波された信号 $V_{out}(t)$ が出力されることになる。この濾波された信号 $V_{out}(t)$ を CPU 基板 2 3 に入力すれば、微生物の蛍光発光の受光量に相応する電気信号と外乱とがすでに明確に区別されているから、微生物量の測定誤

差が生じることはなく、測定値がばらつく問題も生じず、安定して測定することが可能となる。

[0050] 図7は測定フローを示すフロー図であり、図1、図2、図5乃至図7を参照して上記構成における作用を説明する。

[0051] まず、作業者はピペット等を使用し、温度20℃程度のバラスト水から100ml（ミリリットル）を試料として採取し、試料容器5に投入する（図7のステップ1）。次に、試料容器5内に蛍光染色試薬を添加する（図7のステップ2）。この蛍光染色試薬は一般的に知られているカルセインAM（Calcein-AM、ドイツ国Promocell GMBH 社製）や、FDAなどを使用することができる。カルセインAMは、植物性プランクトンに対して染色しやすい傾向があり、FDAは、動物性プランクトンに対して染色しやすい傾向があり、このため、染色試薬による染色を、カルセインAMとFDAとを混合した試薬により染色を行うと、試薬の染色時間を短くして、染色に要する時間を従来の半分にすることが可能となる。そして、作業者は試料容器5に回転子7を投入後、検査装置1の測定部6に収容し、測定部6の蓋30を被着することで測定準備が完了する。ここで、電源ボタン3aを押下すれば、該測定部6内に内蔵されたマグネティックスターラ27の駆動により回転子7が回転し、試料溶液Sが攪拌されることになる（図7のステップ3）。

[0052] 次に、作業者は操作部の測定開始ボタン3bの押下により、所定時間後LED光源10が点灯し、励起光用バンドパスフィルタ12を透過した光が試料容器5に照射されることになる。このとき、例えば、波長特性として450nm～490nmの波長の光が照射され、試料容器5内の検体（微生物）が蛍光発光することになる（図7のステップ4）。そして、この蛍光が蛍光用バンドパスフィルタ15を透過して光電子増倍管（PMT）14により検知されることになる（図7のステップ5）。

[0053] 光電子増倍管（PMT）14は、光電効果の利用により光エネルギーが電気エネルギーに変換されるとともに、電流増幅機能が付加され、高感度に蛍光発光を検知することができる。検知した電気信号は、演算増幅器35により

増幅されてバンドパスフィルタ回路36に入力され、外乱となる電気信号が濾波された信号が出力される（図7のステップ6）。そして、外乱となる電気信号が濾波された信号はCPU基板23に送られ、一定しきい値以上の受光波形がカウントされることになる（図7のステップ7）。

[0054] さらに、CPU基板23では、受光波形カウント値から前記試料容器5内の水100mL（ミリリットル）中に存在する微生物数を推定して、排水基準を満たすか否かを表示部4に表示されるのである（図7のステップ8）。

[0055] 以下、本発明の実施例について説明する。まず、上記実施形態の微生物の検査装置の検査精度の確認試験を行った。

実施例 1

[0056] 微生物の個体数と光電子増倍管（PMT）の受光カウントとの相関関係を調査した。S型シオミズツボウムシ（最小サイズ約100 μ m=Lサイズ生物）を複数の試料容器5（100mL容量）にそれぞれ5個体、10個体、50個体、100個体、1000個体と個体別に収容し、それぞれを蛍光染色試薬FDA（濃度0.01[ミリmol／リットル]）で染色した。その結果、収容した微生物の個体数に応じて、波形のカウント数が増加してきており、5個体、10個体、50個体及び100個体の5サンプルについては直線的に応答した（図10A、図10B参照）。このため、得られた波形のカウント数からバラスト水100mL中に存在する微生物の個体数が推定できる。

実施例 2

[0057] 微生物の生死によって検出が可能か否かの試験を行った（図11A～図11D参照）。熱により殺滅処理（60℃、30分の加熱）したS型シオミズツボウムシ（最小サイズ約100 μ m=Lサイズ生物）を、蛍光染色試薬FDA（濃度0.01[ミリmol／リットル]）で染色する。殺滅処理1時間後、殺滅処理20時間後、殺滅処理5日後の3サンプルを作成してそれぞれ測定した。その結果、殺滅処理したものはいずれも一定のしきい値以上の波形

が発見されず、殺滅処理せずに微生物が存在するサンプルと殺滅処理して微生物が存在しないサンプルとの判別が可能である。

実施例 3

[0058] 前記光電子増倍管（PMT）14とCPU基板23との間に、フィルタリング手段を装着する前と装着した後の取得電圧の波形を比較する。

図12はフィルタリング手段を装着する前の取得電圧の波形である。図12Aに示す取得電圧の波形は、外乱（バックグラウンド成分約0.9V波形）と、しきい値を超えた生きた微生物と確認できる明確な山と、しきい値を超えない不明瞭な山との3つが混在したものとなっている。また、図12Bに示す取得電圧の波形は、外乱（バックグラウンド成分約1.4V波形）と、しきい値を超えた生きた微生物と確認できる明確な山との2つが混在したものとなっている。さらに、図12Cに示す取得電圧の波形は、外乱（バックグラウンド成分約0.4V波形）と、しきい値を超えない不明瞭な山との2つが混在したものとなっている。

[0059] 図13はフィルタリング手段を装着した後の取得電圧の波形である。図13Aに示す取得電圧の波形は、外乱となるバックグラウンド成分を取り除くため、ハイパスフィルタ回路36のみを装着したときのものである。図12Bに示す波形と比較すると、約1.4Vあったバックグラウンド成分が0Vに収束されており、外乱が除去されていることが分かる。

[0060] 図13Bの波形は、図13Aで示す破線の円で囲まれた山の波形を拡大したときの立ち上がり波形である。図13Bの波形では、しきい値を挟んで上下動を繰り返しており、測定誤差を大きくする要因となる。そこで、このような高周波波形を除去する目的でローパスフィルタ回路37を装着するのが望ましい。

[0061] 図13Cに示す取得電圧の波形は、外乱の除去と高周波波形の除去とを行うため、ハイパスフィルタ回路36とローパスフィルタ回路37とを結合したバンドパスフィルタ38を装着したときのものである。図13Aの波形と比較すると、高周波ノイズが除去されて波形が滑らかとなった。

[0062] 図13Dの波形は、図13Cで示す破線の円で囲まれた山の波形を拡大したときの立ち上がり波形である。図13Dの波形では、図13Bのようなギザギザ波形がなくなって滑らかになり、しきい値を挟んで上下動を繰り返すこともなくなった。これにより、測定誤差を極めて小さくすることで、精度よく測定することが可能となる。

[0063] 以上のように本実施形態によれば、試料容器5に試料と蛍光染色試薬とを添加した後、攪拌混合手段7により試料溶液の攪拌・混合を行い、次いで、前記試料溶液を攪拌しつつ前記試料容器の被照射面に励起光を入射させ、さらに、受光手段により微生物の蛍光発光を受光するため、攪拌しないで静置して計測するものと比較すれば、極めて短時間で微生物が明るく発光し、バラスト水中の微生物の量を簡便かつ短時間で計測することが可能となる。そして、装置を小型化することが可能となり、製造コストが安価となる。

また、電気信号が制御手段に取り込まれる前に、フィルタリング手段によって外乱が濾波されるので、微生物の蛍光発光の受光量に相応する電気信号と外乱とを明確に区別することができ、微生物量の測定誤差が生じることはなく、測定値がばらつく問題も生じず、安定して測定することが可能となる。

産業上の利用可能性

[0064] 本発明は、バラスト水を排出する際に排出基準を満たしているか否かを確認するための微生物の検査装置に適用することができる。

符号の説明

- [0065]
- | | |
|---|------|
| 1 | 検査装置 |
| 2 | 本体部 |
| 3 | 操作部 |
| 4 | 表示部 |
| 5 | 試料容器 |
| 6 | 測定部 |
| 7 | 回転子 |

- 8 保持プレート
- 9 試料容器収容部
- 10 LED光源
- 11 平行光変換手段
- 12 励起光用バンドパスフィルタ
- 13 光源部
- 14 光電子増倍管（PMT）
- 15 蛍光用バンドパスフィルタ
- 16 集光用レンズ
- 17 スリット
- 18 リレーレンズ
- 19 受光部
- 20 筐体
- 21 AC電源
- 22 二次電池
- 23 CPU基板
- 24 AC／DC変換器
- 25 RAM
- 26 ROM
- 27 マグネティックスターラ
- 28 ファン
- 29 外部出力端子
- 30 蓋
- 31 平板
- 32 ねじ切孔
- 33 シリンドリカルレンズ
- 34 フィルタリング手段
- 35 演算増幅器

- 3 6 ハイパスフィルタ回路
- 3 7 ローパスフィルタ回路
- 3 8 バンドパスフィルタ回路

請求の範囲

- [請求項1] 試料溶液中の微生物量を測定するための微生物の検査装置であって、
- 光を透過する材質で形成された試料容器を有し、該試料容器内で試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合手段と、
- 前記試料容器に励起光を照射する励起光源と、
- 光を検知して電気信号に変換する受光手段と、
- 前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する制御手段と、
- を備え、
- 前記試料溶液は、試料に、微生物を染色する蛍光染色試薬が添加されて構成されており、
- 前記受光手段は、前記励起光源からの前記励起光の照射による、前記試料溶液からの蛍光発光を検知し、
- 前記制御手段は、前記受光手段からの電気信号に基づき発光数を検出し、前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する微生物の検査装置。
- [請求項2] 前記受光手段と前記制御手段との間にフィルタリング手段を備え、
- 前記フィルタリング手段は、前記受光手段からの電気信号中の、低周波成分のノイズ及び高周波成分のノイズを濾波する
- 請求項 1 に記載の微生物の検査装置。
- [請求項3] 前記フィルタリング手段は、ハイパスフィルタとローパスフィルタとを連結したバンドパスフィルタである
- 請求項 2 に記載の微生物の検査装置。
- [請求項4] 前記励起光源は、前記試料容器に対して直交するように励起光を照射するように配置され、
- 前記受光手段は、前記励起光源の励起光と直交した角度で前記蛍光発光を受光するように配置される
- 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の微生物の検査装置。

- [請求項5] 前記受光手段と前記試料容器との間には、スリット部材を設けてなる
- 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の微生物の検査装置。
- [請求項6] 前記励起光源と前記試料容器との間には、前記励起光源からの光を平行光に変換する平行光変換手段を設けてなる
- 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の微生物の検査装置。
- [請求項7] 前記平行光変換手段が、平板にねじ切孔を穿設して形成したものである
- 請求項 6 に記載の微生物の検査装置。
- [請求項8] 前記平行光変換手段が、凸レンズで形成したものである
- 請求項 6 に記載の微生物の検査装置。
- [請求項9] 試料溶液中の微生物量を測定するための微生物の検査方法であって、
- 試料容器内で試料に微生物を染色する蛍光染色試薬を添加した試料溶液の攪拌・混合を行う攪拌混合工程と、
- 前記試料容器に励起光を照射する励起工程と、
- 前記励起光の照射による、前記試料容器からの蛍光発光を検知して電気信号に変換する受光工程と、
- 該受光工程により変換された電気信号から発光数を検出し、前記試料容器中の試料に含まれる微生物量を算出する微生物数推定工程と、
- を備えた微生物の検査方法。
- [請求項10] 前記受光工程と前記微生物数推定工程の間に、
- 前記受光工程により変換された電気信号中の、低周波成分のノイズ及び高周波成分のノイズを濾波するフィルタリング工程と、
- を備えた請求項 9 に記載の微生物の検査方法。