

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5907947号
(P5907947)

(45) 発行日 平成28年4月26日(2016.4.26)

(24) 登録日 平成28年4月1日(2016.4.1)

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

請求項の数 11 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2013-503208 (P2013-503208)	(73) 特許権者	506423291
(86) (22) 出願日	平成23年4月6日 (2011.4.6)		コミサリア ア レネルジイ アトミック
(65) 公表番号	特表2013-523147 (P2013-523147A)		エ オ ゼネ ルジイ アルテアナティ
(43) 公表日	平成25年6月17日 (2013.6.17)		ーフ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/051481		COMMISSARIAT A L' EN
(87) 国際公開番号	W02011/125033		ERGIE ATOMIQUE ET A
(87) 国際公開日	平成23年10月13日 (2011.10.13)		UX ENERGIES ALTERNA
審査請求日	平成26年3月26日 (2014.3.26)		TIVES
(31) 優先権主張番号	10/01406		フランス国 エフー75015 パリ パ
(32) 優先日	平成22年4月6日 (2010.4.6)		ティメン ” ル ポナン デ” リュ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ルブラン 25

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的粒子のクラスターを検出するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面 (1 1) 上の生物学的粒子のクラスター (1 2) を検出する方法であって、
該方法は

- 光源を使用して、3次元表現が得られる表面を照らし、
- 光センサを使用して、表面により反射または透過された光に対応する信号を検出する
ものであり、

該方法は、

a) 検出されるクラスター (1 2) がその上で成長している前記表面 (1 1) の3次元トポグラフィー表現 (2 0) を決定する第1のステップ (E 1) (ここで、前記表面 (1 1) の前記3次元トポグラフィー表現 (2 0) は、前記表面のトポグラフィーの3次元マップまたは2つの隣接するピクセルの間の強度の変動が前記表面の高度の変動を表す2次元画像である) ;

b) 前記トポグラフィー表現を前処理する操作する第2のステップ (E 2) (ここで、前処理操作は、基準表面を検出するステップ、基準表面を差し引くステップを含む)、及び前記3次元トポグラフィー表現において、生物学的粒子のクラスターに潜在的に対応する領域を画定する少なくとも1つの輪郭を検出するステップである

c) 前記3次元トポグラフィー表現 (2 0) において閉領域 (2 3) を画定するために輪郭 (2 2) を抽出する第3のステップ (E 3) (ここで、ピクセルを連結している前記輪郭は、同じ勾配または同じグレーレベルに対応する)、

10

20

d) 生物学的粒子のクラスターに対応し得るものとして前記閉領域(23)を特定する第4のステップ(E4)

を含み、

これらのステップは、電子データプロセッサ手段を利用して実行される、方法。

【請求項2】

前記生物学的粒子が、細菌、酵母または真菌等の微生物、および植物または動物細胞から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記生物学的粒子が、100 μm以下の直径または主要寸法を示す、請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項4】

前記表面(11)が、培養培地と空気等の周囲媒体との間の界面、機能化基板の表面、および微多孔膜の表面から選択される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記表面のトポグラフィ表現を決定することにある前記第1のステップ(E1)が、接触なしに、および試料調製なしに行われる光学的方法により実行される、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記表面のトポグラフィ表現を決定することにある前記第1のステップ(E1)が、色共焦点マイクロトポグラフィにより実行される、請求項5に記載の方法。

20

【請求項7】

前記表面のトポグラフィ表現を決定することにある前記第1のステップ(E1)が、シュリーレン写真またはオンブロスコピーにより実行される、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

少なくとも1つの輪郭を検出することにある前記第3及び第4のステップ(E3、E4)が、表面の前記トポグラフィ表現の局所的勾配を測定して閾値化することにより実行される、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

連続した時間で、第1のステップ(E1)並びに第3及び第4のステップ(E3、E4)を反復するステップと、第3及び第4のステップ(E3、E4)において特定される、経時的に変化する形状またはサイズを有する領域のみを選択するステップとを含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項10】

クラスター内に存在する生物学的粒子の量を評価することにある追加的ステップを含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

クラスター内に配置された微生物の *in situ* または *ex situ* 同定の追加的ステップを含む、請求項2から10のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面上、例えば培養培地または機能化基板の表面上の、微生物(細菌、酵母、真菌等)等の生物学的粒子、または植物もしくは動物細胞のクラスターを検出する方法に関する。そのような粒子は、微視的な、典型的には約0.5 μmから3 mmの、より具体的には、0.5 μmから10 μmの範囲内にある寸法を示す。

【0002】

本発明は、特に、微生物のコロニーの検出に適用される。

【背景技術】

【0003】

50

多くの用途において、培養培地上、通常は栄養ゲル表面上の細菌または酵母等の微生物の成長を、可能な限り速やかに検出することが望ましい。一般に、ゲロス培養培地の表面は、数ミリメートル (mm) の距離にわたって延在する数マイクロメートル (μm) の局所的な深さ欠陥を示すことが多いことから、正確な平面性から大きく逸脱する。試料とともに運搬される埃または残骸もまた、高い空間周波数を示す局所的な表面変形を生じ得る。

【0004】

細菌および酵母は、可視、近紫外、または近赤外領域の光をほとんど吸収しないため、またその屈折率が周囲媒体の屈折率に非常に近いため、その成長の開始時に同定するのが困難である。したがって、典型的には、 $100\ \mu\text{m}$ を超える直径を示すコロニーのみを肉眼により検出することができ、コロニーがそのような直径まで成長するのに要する時間は、典型的には、約6時間 (h) から24 h である。

10

【0005】

好ましくは黒いバックグラウンドに対比させた高度顕微鏡による検査は、1つの可能な手法であるが、実行するのが困難である。

【0006】

他の技術が一般に使用される。

【0007】

例えば、微生物の代謝により蛍光物質に変換される様々な非蛍光添加剤を使用して、微生物を蛍光性とすることができ、そのような物質は、長期にわたり微生物内に残留するように選択される。その方法は、細菌が蛍光性となるまでに相当な長さの時間 (5 h を超える) を必要とし、また、蛍光を発生する代謝物が生成される必要がある。

20

【0008】

同様に、発色培地により、選択的に微生物を可視化することができるが、染色には肉眼に見えるようになるまで相当な長さの時間 (数時間) を必要とするという、同じ問題が生じる。

【0009】

さらに、それらの方法の全ては、微生物の代謝の深刻な妨害に繋がる危険性を有し、一方でその後の試験 (例えば抗生物質に対する感受性の測定) には、微生物が可能な最も好ましい条件下で成長することが必要となる。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】フランス特許第2738343号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、微生物のコロニー等の小さい寸法のクラスターの、その成長の開始時における早期検出の達成を可能とする、可能な限り少なく含まれる生物学的粒子の培地を検出する方法を提供することにより、上述の欠点を軽減することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明によれば、そのような目的は、表面上の生物学的粒子のクラスターを検出する方法であって、

- a) 前記表面のトポグラフィー表現を決定するステップ、および
 - b) 前記トポグラフィー表現において、生物学的粒子のクラスターに潜在的に対応する領域を画定する少なくとも1つの輪郭を検出するステップ
- を含む方法により達成される。

【0013】

これらのステップは、(特にステップa) を実行するための) 適切な測定デバイスと関

50

連して、好適にプログラムされたコンピューターまたは他の電子データプロセッサ手段を使用して実行される。

【0014】

本発明の有利な実行例において、

前記生物学的粒子は、細菌、酵母または真菌等の微生物、および植物または動物細胞から選択され得る。

【0015】

前記生物学的粒子は、10 μmから3 mm、または好ましくは100 μmを含む数百 μm以下、例えば100 μm以下の範囲にある直径または主要寸法を示してもよい。

【0016】

前記表面は、培養培地と空気等の周囲媒体との間の界面、機能化基板の表面、および多孔膜の表面から選択され得る。

【0017】

前記表面のトポグラフィ表現を決定することにある前記ステップ a) は、侵害を最小限とすることを保証するために、接触なしに、および試料調製なしに行われる光学的方法により実行され得る。特に、光学的方法は、色共焦点マイクロトポグラフィ、またはシュリーレン写真もしくはオンプロスコピーの方法により構成され得る。

【0018】

少なくとも1つの輪郭を検出することにある前記ステップ b) は、表面の前記トポグラフィ表現の局所的勾配を測定して閾値化することにより実行され得る。

【0019】

本方法はまた、前記トポグラフィ表現を前処理する操作を含んでもよく、前処理操作は、基準表面を検出するステップと、基準表面を差し引くステップとを含む。

【0020】

本方法は、連続した時間で、ステップ a) および b) を反復するステップと、ステップ b) において特定される、経時的に変化する形状またはサイズを有する領域のみを選択するステップとを含み得る。

【0021】

本発明の有利な変形例において、本方法は、検出されたクラスターのサイズ、例えばその体積に関連する指標を定量化することにある追加的ステップ c) を含み得る。これは、問題となる生物学的粒子の平均サイズが既知である場合に特に有利である。そのような状況下では、このステップ c) により、クラスター内に存在する生物学的粒子の量を評価することができる。対象となる生物学的粒子の平均サイズを知っているため、個々に考えて、クラスターのサイズが決定されれば、前記クラスター内に存在する生物学的粒子の数を定量することは容易である。本発明のそのような変形例は、生物学的粒子が微生物であり、前記微生物のその後の処理が想定される場合に特に有利であり、この場合コロニーから試料を採取する必要がある。したがって、この変形例により、例えば試料を採取する前に、存在する微生物の量が十分であることを確認することができる。

【0022】

本発明の有利な変形例において、方法は、クラスター内に配置された微生物の *in situ* または *ex situ* 同定の追加的ステップを含み得る。

【0023】

本発明の他の特徴、詳細、および利点は、例示のために示される添付の図面を参照してなされる以下の説明を読むことで明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】その上に細菌のコロニーが存在する培養培地の表面を示す図である。

【図2】本発明の実行例における本方法の様々なステップを示す図である。

【図3】本発明の方法の第1の変形例において使用される色共焦点マイクロトポグラフィの原理を示す図である。

10

20

30

40

50

【図4】図4 Aおよび4 Bは、細菌が播種された培養培地に対し色共焦点マイクロトポグラフィーの技術を適用することにより得られた実験結果を示す図である。

【図5】図5 A、5 B、5 C、5 Dおよび5 Eは、細菌が播種された培養培地に対し色共焦点マイクロトポグラフィーの技術を適用することにより得られた実験結果を示す図である。

【図6 A】シュリーレン写真の技術に基づく、本発明の方法の第2の変形例を示す図である。

【図6 B】シュリーレン写真の技術に基づく、本発明の方法の第2の変形例を示す図である。

【図6 C】シュリーレン写真の技術に基づく、本発明の方法の第2の変形例を示す図である。

10

【図6 D】シュリーレン写真の技術に基づく、本発明の方法の第2の変形例を示す図である。

【図7 A】オンプロスコピーの技術に基づく、本発明の方法の第3の変形例を示す図である。

【図7 B】オンプロスコピーの技術に基づく、本発明の方法の第3の変形例を示す図である。

【図7 C】オンプロスコピーの技術に基づく、本発明の方法の第3の変形例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

20

【0025】

図1は、ペトリ皿10の平面図を示し、皿は、表面11上に成長した細菌12のコロニーを有する栄養培地(ゲロス)を含有する。本発明の方法は、これらのコロニーが肉眼に見えない程非常に小さい直径(数十マイクロメートル、例えば30 μ m以下の直径)を有する、その成長の初期段階において、これらのコロニーを検出することを目的とする。培養培地の表面11(すなわちゲロス-空気界面)は、ゲロスの表面状態に関連した不規則性13を示す。図1の例において、ゲロスは、空気に直接露出しており、結果として乾燥する傾向にあり、それにより、その表面の変質、特にその平均レベルの変動もたらされる。有利には、ゲロス表面上の生物学的粒子のクラスターを検出する方法は、これらの表面不規則性、および表面が受ける変質を考慮する。

30

【0026】

本発明の方法は、栄養培地の表面での細菌の増殖が隆起を形成するという既知の事実を利用する。コロニーの成長の初期段階中のこの隆起の高さは、数百ナノメートル規模、またはマイクロメートル規模である。本発明の基礎となる考えは、適切な画像処理に関連した既知の表面トポグラフィー技術を使用して、生物学的粒子のクラスターに関連した隆起を検出することにある。

【0027】

図2に示されるように、本発明の方法の第1のステップE1は、検出されるクラスター12がその上で成長している表面11のトポグラフィー表現20を決定することにある。この図に示される例において、トポグラフィー表現は3次元であり、具体的には、トポグラフィー表現は「3次元シート」の形態である。表面の各点は、 Oxy 面内の座標(x, y)を有し、3次元トポグラフィー表現において、好ましくは Oxy 面に垂直な軸 Oz に沿った z 座標に関連している。この表現は、基準の Ox 、 Oy 、 Oz 枠内の3次元表面の形態、または、要素 $a_{i,j}$ が Oxy 面内の座標(i, j)を有する点の z 軸に沿った高さに対応する行列の形態であってもよい。

40

【0028】

第2のステップE2は、トポグラフィー表現20を前処理する操作であり、この操作は、ベース表面を検出して差し引くステップを含む。上で説明されたように、表面11は明確に画定されない可能性があり、さらには経時的に変動する可能性がある。粒子のクラスターの良好な検出を確実にするために、適切なデータ処理、例えば、典型的にはマイクロ

50

メートル当たり約 $0.001 (\mu\text{m}^{-1})$ 、例えば $1/2000 \mu\text{m}^{-1}$ から $1/500 \mu\text{m}^{-1}$ の範囲にあるカットオフ周波数でのローパス空間フィルタリングにより抽出されるベース表面を決定する必要がある。培養培地の調製による傷、厚さの変動、さらには不均一な変動、および平面性からの逸脱は、全て消失する。

【0029】

より単純な変形例において、平面で傾いたベース表面を決定するために、表面の領域の周辺において平均勾配が計算される。

【0030】

参照番号 21 は、フィルタリングされた 3 次元シート（より一般的には、トポグラフィー表現）を指し、低い空間周波数の不規則性 201（例えば培養培地 13 の不規則性に起因する）は、上述の処理操作により排除されている。シート 21 上に残留するものは全て、十分に小さいサイズのおよび/または十分に高い空間周波数を含む不規則性および粗さ 202 である。空間周波数の「高い」という用語は、 $1/500 \mu\text{m}^{-1}$ を超える周波数を意味するように使用される。非常に高い周波数の成分、すなわち数 μm^{-1} を超える空間周波数に対応する成分を排除することが可能であり、そのような成分は、培養培地を構成するゲルの粗さに対応する。

【0031】

第 3 のステップ E 3 は、3 次元シート 21 から輪郭 22 を抽出することにある。既知の様式で、輪郭は、シートの局所的勾配の測定、続いて閾値化、または帯域通過空間フィルタリングによって、当業者に知られている輪郭検出器フィルタにより、例えば数 $/500 \mu\text{m}^{-1}$ から数 $/10 \mu\text{m}^{-1}$ の範囲にある通過帯域を有するフィルタにより検出され得る。輪郭 22 の少なくともいくつかは、第 4 のステップ E 4 において、生物学的粒子のクラスターに対応し得るものとして特定される閉領域 23 を画定する。ステップ E 4 は、考慮される閉領域を選択する操作を含み得る。例えば、選択基準を適用することができ、それにより、十分に小さい寸法（数十マイクロメートル規模の対角線または直径）の領域のみが、潜在的に生物学的粒子のクラスターを表すものとして維持される。変形例または組合せにおいて、連続した時間で、ステップ E 1 ~ E 4 を反復することができ、また経時的に変動する形状またはサイズを有する領域 22 のみを選択することができる。生物学的粒子のクラスターは、経時的に変化する「生きた」構造であり、一方非生物学的構造は、たとえあるとしても、2 つの連続した測定の間ほとんど変化しない。また、これによって、

【0032】

検出されるクラスターがその上で成長する表面のトポグラフィー表現を決定することにある方法の第 1 のステップ E 1 は、それ自体知られている様々な異なるマイクロトポグラフィー技術を適用することにより実行され得る。検出されるクラスターの成長の妨害を回避するために、接触を必要としない技術、具体的には、試料調製を必要としない（すなわち、染料、フルオロフォア、またはその前駆体の使用によらない）光学的技術を使用することが特に好ましい。

【0033】

一般に、光学的マイクロトポグラフィー技術は、光源を使用して、3 次元表現が得られる表面を照らすこと、光センサを使用して、表面により反射または透過された光に対応する信号を検出すること、および、

検出された信号から、表面の 3 次元トポグラフィー表現を決定することを含む。

【0034】

表面の照明は、周囲媒体から表面に向けて方向付けられてもよい。照明が平行化されていない場合、測定されるゾーン上に集光されてもよい。光源は、空間および/もしくは時間干渉性であってもよく、または非干渉性であってもよい。光源は、多色または単色であってもよい。検出は、相補型金属酸化物 - シリコン (CMOS)、電荷結合素子 (CCD)

10

20

30

40

50

)、光電子増倍管、フォトダイオード等の種類の1次元画像センサ(ストリップ)または2次元画像センサ(マトリックス)により実行され得る。センサは、検出された光のスペクトルの分析を可能とする分光機能を有してもよい。また、センサは、共焦点検出器デバイスを構成するために、ダイヤフラムまたは「ピンホール」と結合されてもよい。

【0035】

以下において、本発明の好ましい実行例を構成するものとして2つの技術が詳述される。それにもかかわらず、他の光学的技術、例えばオートコリメーションまたは画像処理による表面へのオートフォーカス、干渉および/またはホログラフィー法、反射波面の分析等も、本発明の方法に適用することができる。

【0036】

表面上の生物学的粒子のクラスターの早期検出に成功裏に適用されている、第1のマイクロトポグラフィー光学技術は、色共焦点マイクロトポグラフィーである。色共焦点マイクロトポグラフィーは、サプライヤーであるStill S. A.により開発されたものであり、フランス特許第2738343号に詳述されている。

【0037】

色共焦点マイクロトポグラフィー技術、または色共焦点画像化は、図3に示される。

【0038】

例えばピンホールに関連した広範囲光源の形態で実装される白色光(または、いずれにしても多色光)の点光源300は、対物レンズ310により集光される光線301を放出する。このレンズ310は、拡張された軸方向の色収差を示し、その結果、光線301の様々なスペクトル成分が、レンズの光軸に沿って離間したそれぞれの焦点321、322、323等に集光される。このようにして集光された垂直入射光線は、試料の表面330上に方向付けられる。表面330により反射した光は、再びレンズ310を通過し、この時は光源300に向けて伝搬し、反射光の一部が、分光光度計360の正面に配置された軸方向に可動性のピンホール350に向けて方向付けられるビームスプリッタ340により抽出される。これにより空間フィルタリングが達成され、ピンホール350と共役な点から来た光線のみが、分光光度計360に到達することができる。レンズ310の軸方向の色度により、これらの光線は、レンズ310と反射面330との間の距離Hに依存するそれぞれの明確な波長 λ_i を示す。したがって、分光光度計360により測定される波長 λ_i から、距離Hを決定することができる。

【0039】

このように、表面330のトポグラフィー表現を走査により得ることができる。

【0040】

本発明の方法を実行するためのこの技術の使用は、播種されたゲロス培養培地、ならびに、

1キロヘルツ(kHz)のサンプリング周波数、
約300 μ mの距離ダイナミックレンジ、および

1000ピクセルCCDストリップ(各ピクセルは300ナノメートル(nm)の高さをコードする)をその検出器として使用した分光光度計
を特徴とする光学システムを使用することにより、実験的に実証されている。

【0041】

スーパーピクセル化等の信号処理方法により、300nm未満の垂直分解能を得ることができる。そのような既知の方法は、隣接するピクセルのコンテンツを結合することにより分解能を改善するのに役立つ。

【0042】

例えば、サプライヤーであるAltimet製Alti surf 500装置を使用することができる。

【0043】

実験結果は図4Aおよび4Bに示され、また図5Aから5Eにも示される。これらの図において、3次元シートは、完全に等価でグレースケール(暗灰色は低い高度、薄灰色ま

10

20

30

40

50

たは白色はより高い高度)を使用する表現により置き換えられる。

【0044】

図4Aは、スタフィロコッカス・エピデルミデス (*Staphylococcus epidermidis*) が播種されたゲロス培養培地の表面のトポグラフィ表現である。表面が縞状に数十マイクロメートルにわたり歪んでいることが観察され得る。図4Bは、ベース表面を差し引く前処理後の同じ表現を示す。表面の歪みは消失するが、約2 μ mの高さ、および10 μ mから数百 μ mの範囲にある直径を有する細菌のコロニーを観察するのは困難ではない。その後、コロニーは、局所的勾配の計算および閾値化により自動的に特定された。この例において検討されたゲロス表面のサイズは、1.2mm \times 5mmであった。

10

【0045】

図5Aは、バックグラウンドを差し引く前の、大腸菌 (*Escherichia coli*) が播種された別のゲロス培養培地の表面のトポグラフィ表現である。図5Bは、縞状の表面不規則性を示すバックグラウンド表面を示し、図5Cは、バックグラウンドが差し引かれた後の表面を示すが、細菌のコロニーが明確に現れている。

【0046】

図5Dおよび5Eは、それらのコロニーのうちの2つの1次元プロファイルの経時的な変動(0、1.3h、2.2h、3h、3.9hの時点)を示す。約2h後にコロニーが検出可能となること、およびその成長速度を追跡することが可能であることが確認され得る。

20

【0047】

この方法において、培地の表面のトポグラフィの表現は、3次元表現である。検出される輪郭は、体積を画定する閉じたループに対応する。使用される輪郭検出方法に依存して、閉じたループは、同じ勾配または同じ高度に対応するピクセルを相互に連結している。

【0048】

輪郭により画定される各体積は、指標により定量化され得るが、この指標は、前記体積に含まれるピクセルの重み(すなわち高さ)の積分を含んでもよい。この積分を計算する間、ピクセルの重みは閾値化に供されてもよい。換言すれば、ある特定の閾値を超える重み値のみが考慮される。この閾値は、輪郭を構成する1つもしくは複数のピクセルの重み、または、輪郭により画定された表面積にわたり分布する1つもしくは複数のピクセルの重みに基づいて確立され得る。

30

【0049】

体積を構成する微生物の種類が既知である場合、この指標により、そのバイオマスを推定することができる。

【0050】

別の実行例において、生物学的粒子のクラスターは、「ストリオスコピー」としても知られるシュリーレン写真法により検出される。

【0051】

シュリーレン写真は、それ自体知られた、フーリエ光学の原理に基づく光学的方法である。図6Aは、本発明の第2の実行例を行うためのシュリーレン構成を示す。

40

【0052】

点光源600は、実質的に単色の光の発散ビーム601を放出し、これがその後対物レンズ620により集光される。表面611上で成長する検出される微生物のコロニー612を有する播種された培養培地を含む透明ペトリ皿610は、集光されたビームを通過させるようにレンズ620のすぐ下流側に位置付けられる。レンズ620の焦点面には、マスク630が配置される。マスクは、偏向されることなくレンズおよびペトリ皿を通過してきた光源から来る光線の全てを遮蔽する。表面611が完全に平面で均一である(および幾何光学近似の範囲内である)場合、ビーム601内の光の全ては、マスクにより遮断される。実際には、コロニー612に起因するものを含む表面不規則性611は、光線の

50

一部を偏向してマスクを通過させる。フーリエ光学の観点からは、レンズの焦点面内において、表面 6 1 1 の空間周波数スペクトルに対応する光の分布が形成され、したがってマスクは高域空間フィルタリングを行うことが知られている。

【 0 0 5 3 】

画像化システム（カメラ 6 4 0）は、マスクの下流側に位置付けられ、培養培地の表面上に焦点を合わせられる。画像化システムにより取得された画像は、表面 6 1 1 の局所的勾配に関する情報を含み、したがって、前記表面の 3 次元シートを再構成することが可能となる（さらにより良いことには、これはすでに部分的に高域フィルタリングに供されており、いかなる前処理も必要としない）。

【 0 0 5 4 】

マスクは有限寸法のものであることを考慮すると、閾値以上の角度で偏向された光線のみが検出される。この閾値は、マスクがレンズの回折パターンと同じサイズを示す場合に最小となる。光源 6 0 0 が純粹に点光源であると仮定すると（これは常に近似である）、検出され得る唯一の局所的勾配は、 $\lambda / (n - 1) d$ （式中、 λ は使用される光の波長であり、 d は、レンズの直径であり、 n は、媒体の屈折率である）を超える勾配である。角度 θ の局所的勾配は、角度 $(n - 1) \theta$ で光線を偏向し、回折を超える偏差のみが観察され得る。実際には、培養培地は数ミリラジアン規模の表面欠陥を有し、いかなる前処理もなしに実行可能とするためには、この理論的境界値よりはるかに大きいマスクが必要となる。マスクの直径は、 $(n - 1) l * p_{max}$ （式中、 p_{max} は、表面欠陥の最大局所的勾配であり、 l は、レンズとマスクとの間の距離である）の規模である必要がある。1 μm の厚さおよび 30 μm の直径を有する微小コロニーは、 $(1.35 - 1) / 15 = 23$ ミリラジアンの波面に対する平均局所的勾配をもたらし、これは、ゲルの表面欠陥よりはるかに大きく、したがって容易に観察される。コロニーの端部における局所的勾配はさらにより大きく、典型的には、数百ミリラジアン（または 10 分の数ラジアン）以上である。

【 0 0 5 5 】

色共焦点画像化等の幾何学的マッピング技術に勝るシュリーレン写真の利点は、微小コロニーのサイズよりも高い横方向の分解能を有する必要がないことであり、黒いバックグラウンドが使用されているため、分解能限界より小さい物体を検出および位置決定するのは困難ではない（ただし、当然ながら、前記分解能限界より互いに近接した 2 つの物体を分離することはできない）。

【 0 0 5 6 】

別の利点は、単一取得において、観察野が上述の共焦点マイクロトポグラフィ技術を使用した場合よりも広範な領域に及ぶことができることである。したがって、シュリーレン法により画像を取得することによって、ペトリ皿の広範な部分、またはさらに皿の全てを観察することができる。

【 0 0 5 7 】

この方法において、培地の表面のトポグラフィの表現は 2 次元表現、すなわち画像であり、2 つの隣接するピクセルの間の強度の変動は、照射された物体の表面の高度の変動、および n またはその屈折率の局所的変動を表す。検出される輪郭は、面積を画定する閉じたループに対応する。これらのループは、共通したグレーレベルの変動に対応するピクセルを相互に連結する。

【 0 0 5 8 】

2 つの隣接するピクセルの間の高度の変動が、細菌のコロニーにより生成される場合、その端部は、典型的には 10 分の数ラジアンを超える、培養培地の表面に対する角度を形成する。そのような勾配は、関連する角度が典型的には 10 ミリラジアン未満である培養培地のレベルの変動により形成される勾配より大きい。

【 0 0 5 9 】

図 6 B は、シュリーレン写真により本発明の方法を実行することができる別の構成を示す。図 6 A の構成とは異なり、照射ビーム 3 0 1' は、透明ペトリ皿 6 1 0 を通過する際

10

20

30

40

50

に平行化され、次いで、皿の下流側の第1のレンズ620'により集光される(レンズの焦点距離: 200 mm、直径: 50 mm(これらの値は例示のみを目的として示される))。第2のレンズ621(焦点距離: 10 mm、開口数NA: $f/3$ (ここでも、これらの値は例示のみを目的として示される))は、ペトリ皿の画像を形成する。レンズ620'の焦点面内にあるマスク630'は、観察表面611における局所的勾配変動により、または前記表面における屈折率の局所的変動により反射されなかった光線(および下方に偏向された光線、ただしこれは必須ではない)を遮断する。細菌のコロニーが培養培地の表面611上で成長すると、表面に入射する光放射を偏向し、光はマスク630'上に集束せずに検出器640(例えば、 1400×1000 3 μm ピクセルを有するカメラ)により検出される。したがって、細菌のコロニー612は、表面611における局所的勾配のばらつきを生じさせるため、それらは、黒いバックグラウンド上の光の点の形態で、検出器640により検出され得る。

10

【0060】

図6Aの構成の場合のように、発散/集束ビームの代わりに平行照射ビームを使用することは、信号の強度を、観察されている表面の部分の位置から独立させる効果を有する。換言すれば、観察野全体にわたり、培養培地610の表面611上の局所的勾配の位置とは無関係に、観察表面における同じ局所的勾配が、検出器において同じ強度を有する信号を生成する。

【0061】

図6Cは、トリプケース大豆ゲロース(TSA)型ゲロースの表面上に播種されてから8時間後の大腸菌型の細菌のコロニーを観察するための、図6Bの構成の使用に対応する。白い点は、細菌のコロニーに対応する。画像の右下部分における明るい直角を形成する連続線は、視覚的基準を構成するスライドガラスに対応する。

20

【0062】

図6Dは、播種から24時間後の同じ培養培地の写真である。図6Dにおける撮影された細菌のコロニーと、透過シュリーレン写真により検出された図6Cに示されるものとの間に、良好な一致が見られることが確認され得る。

【0063】

シュリーレン写真はまた、検出器と同様に光源が培養培地に面するように配置される反射構成においても実行することができる。これは、不透明な培地を観察するのに適切である。

30

【0064】

別の実行例において、細菌のコロニーは、オンブロスコピーの技術を実装した構成により観察される。そのような構成を図7Aに示す。平行光線が、培養培地を含むペトリ皿710を通過し、次いで第1のレンズ720(レンズの焦点距離: 200 mm、直径: 50 mm(これらの値は、例示のみを目的として示される))により検出器740上に集光される。細菌のコロニー712が培養培地の表面711上に成長すると、高度、ひいては表面711上に形成される局所的勾配の変動のために光放射を偏向する。シュリーレン法とは異なり、観察表面上の高度の変動および/または屈折率の変動により偏向された放射は、検出器740(1400×1000 3 μm ピクセルを有するカメラ、焦点距離 $f = 10$ mm、開口数 $NA = f/3$ の対物レンズ(これらの値は例示のみを目的として示される))により検出されない。このデバイスは、検出器740により形成された画像に表れる暗いゾーンにより、分析される平面上の局所的勾配を検出するのに役立つ。したがって、この方法において、細菌のコロニー712は、薄いバックグラウンド上の暗い点の形態で観察され、このバックグラウンドは、培養培地の表面711に対応する。

40

【0065】

シュリーレン写真の話題で上述したように、オンブロスコピーを実行する際、培地の表面のトポグラフィの表現は2次元表現、すなわち画像であり、2つの隣接するピクセルの間の強度の変動は、照射された物体の表面の高度の変動を表す。また、この強度の変動は、前記表面における屈折率の局所的変動を表し得る。

50

【0066】

図7Bは、TSAゲロースの表面上に播種されてから8時間後の大腸菌型の細菌のコロニーを観察するために、図7Aの構成を使用した結果を示す。暗い点は、細菌のコロニーに対応する。これらのコロニーは、図6Dの結果(写真)および透過シュリーレン写真により得られた図6Cに示される観察に一致する場所にあることが観察され得る。

【0067】

シュリーレン技術と同様に、オンブロスコピーにより、検出器740と同様に光源700が観察される培養培地を含むペトリ皿710に面するように配置される反射構成において、細菌のコロニーの観察を実行することができる。図7Cは、そのような構成を示し、光源から生成される光放射は、ビームスプリッター750により偏向され、次いでレンズ720により平行化される。そのような構成は、培養培地が不透明である場合に好ましい。

10

【0068】

シュリーレン写真および表面マッピングの両方に関して、成長による変化を明確化するために好適な画像処理および連続画像減算の任意の方法を使用することが有利である。

【0069】

クラスターの場所が特定されたら、細菌自体は、例えば*in situ*分析(回折、ラマン分光)により、または質量分析等の他の分析方法による既知の測定を使用して同定され得る。そのような状況下では、分析は*ex situ*で行われ、したがって細菌のコロニーを取り出す必要がある。

【0070】

トポグラフィーによる位置は、例えば、ある特定の閾値を超える体積のクラスターを選択可能とすることができ、選択されたクラスターは、その後定性分析に供される。

20

【0071】

本発明は、培養培地の表面上の微生物のコロニーを検出することに限定されない。検出される生物学的クラスター、より一般的には生物学的粒子が位置する表面は、同等に良好に、固体、例えばガラスまたは機能化シリコンの基板であってもよく、または、濾液中に得られる細菌を回収するために使用され、恐らくは、ただし必ずではないが、培養培地上に設置するのに好適な微細孔フィルタであってもよい。方法の第2のステップE2中に実行される前処理操作は、好ましくは、考慮される表面の種類に適合される。

【0072】

表面上にある周囲媒体は、真空、またはガスもしくは液体等の流体であってもよく、ガス、特に空気が好ましい。周囲媒体は、汚染の危険性、および該当する場合にはゲロースの揮発の危険性を回避するために、密閉されていてもよい。

30

【 図 1 】

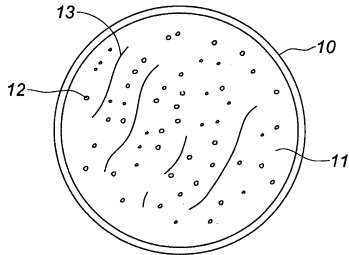


Fig. 1

【 図 2 】

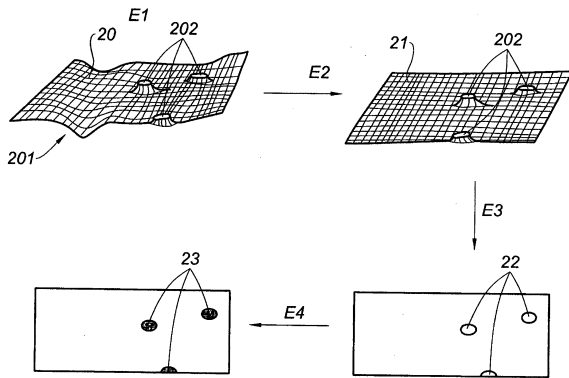


Fig. 2

【 図 3 】

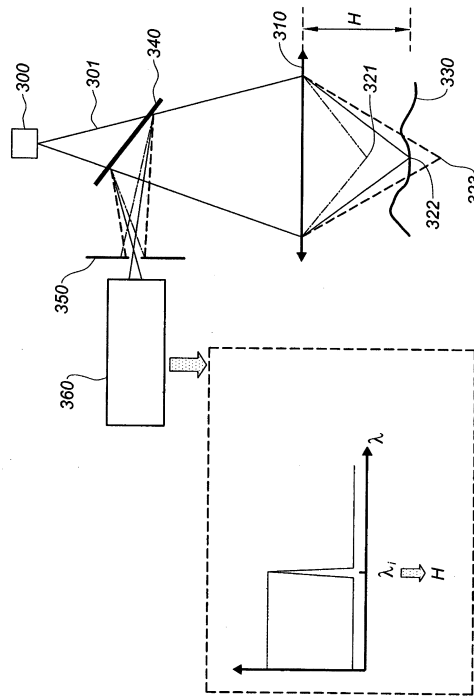


Fig. 3

【 図 4 】

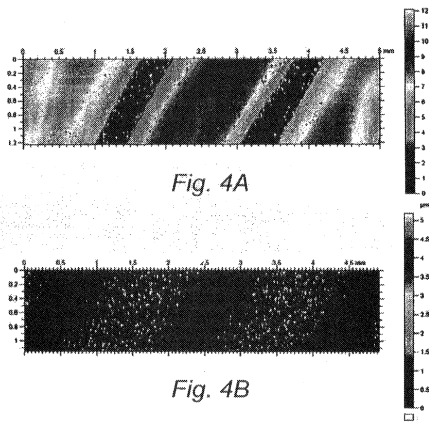


Fig. 4A

Fig. 4B

【 図 5 】

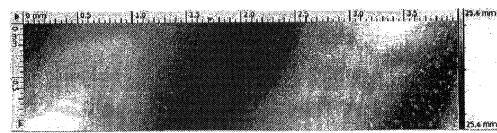


Fig. 5A

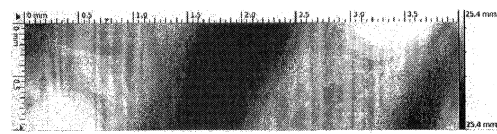


Fig. 5B

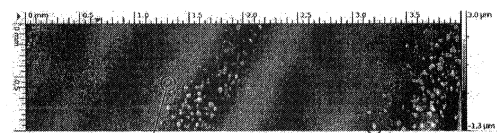


Fig. 5C

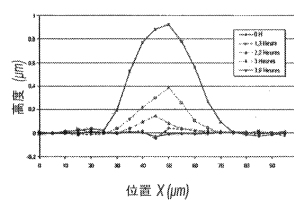


Fig. 5D

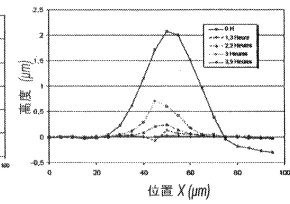


Fig. 5E

【 6 A 】

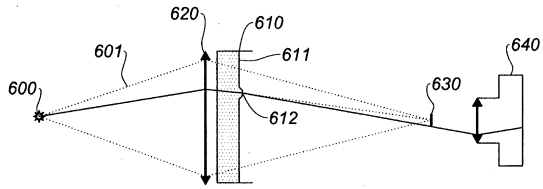


Fig. 6A

【 6 C 】

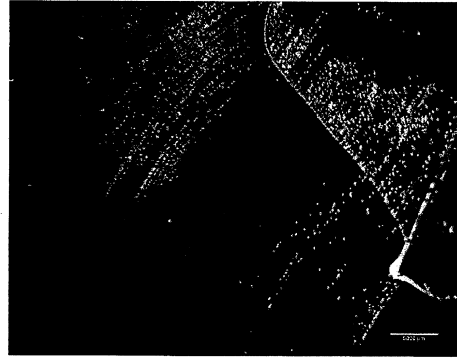


Fig. 6C

【 6 B 】

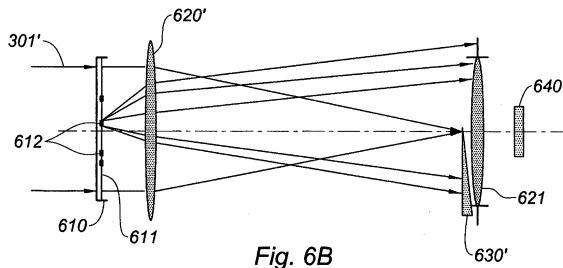


Fig. 6B

【 6 D 】

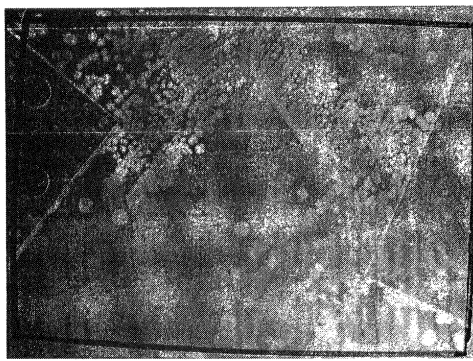


Fig. 6D

【 7 B 】

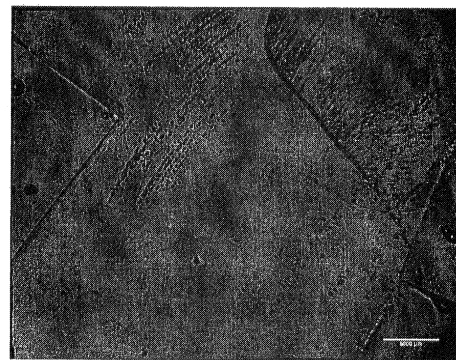


Fig. 7B

【 7 A 】

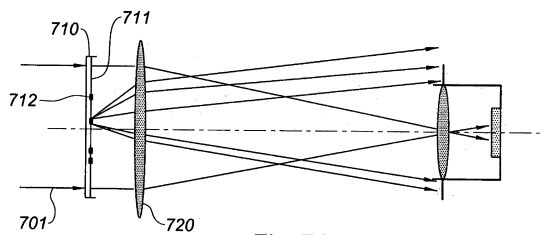


Fig. 7A

【 7 C 】

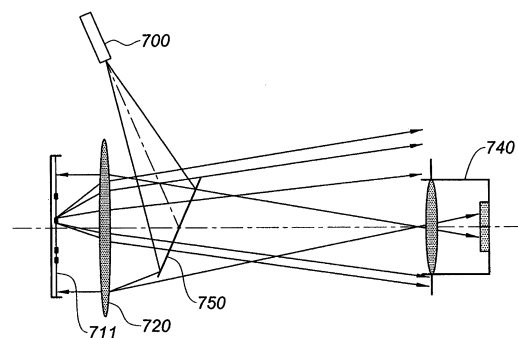


Fig. 7C

フロントページの続き

- (73)特許権者 511004737
 ビオムリュ
 フランス国 エフ - 6 9 2 8 0 マーシー レトワル シュマン ド オルム (番地なし)
- (74)代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
- (72)発明者 モワ ジャン - ピエール
 フランス国 エフ - 3 8 1 2 0 サンテグレーヴ リュ ドゥ ラ モンタ 1 5
- (72)発明者 デュボワ マチュー
 フランス国 エフ - 3 8 1 0 0 グルノーブル アヴェニュー ラ プリュイエール 8 7
- (72)発明者 フィガドゥル オリヴィエ
 フランス国 エフ - 0 1 1 5 0 ヴィルボワ ルート ドゥ ラ カリアズ 2 7 9
- (72)発明者 パンストン フレデリク
 フランス国 エフ - 3 8 0 0 0 グルノーブル リュ ルネ トーマ 2 8
- (72)発明者 ボッシー ジュヌヴィエーヴ
 フランス国 エフ - 0 1 5 0 0 アンベリユール アン ビュジェイ ルート ドゥ ヴァレイユ
 7 9
- (72)発明者 ドゥラゼク ローラン
 フランス国 エフ - 3 8 1 0 0 グルノーブル リュ ジュール フェリー 3
- (72)発明者 ギシェール マリーズ
 フランス国 エフ - 3 8 5 1 0 ヴェズロン キュルタン ルート デ ラヴォワール 2 7 1
- (72)発明者 ロマーヌ ファビアン
 フランス国 エフ - 3 8 0 0 0 グルノーブル リュ アンペール 5
- (72)発明者 マラル フレデリク
 フランス国 エフ - 3 8 3 4 0 ヴォルップ リュ ランブールネ 6 3

審査官 松岡 徹

- (56)参考文献 仏国特許出願公開第0 2 7 3 8 3 4 3 (FR, A 1)
 米国特許第0 3 4 6 8 6 1 0 (US, A)
 国際公開第2 0 0 9 / 0 6 4 4 9 5 (WO, A 1)
 特開昭5 9 - 1 6 6 8 4 2 (JP, A)
 国際公開第9 5 / 0 0 0 6 6 1 (WO, A 1)
 特表2 0 0 5 - 5 3 2 0 5 9 (JP, A)
 Letters in Applied Microbiology, 2 0 1 0年, 50, p.258-263
 Journal of Food Science, 2 0 0 9年, 74, 1, p.E8-E15
 Applied Optics, 2 0 0 7年, 46, 17, p.3639-3648

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 Q 1 / 0 4
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)