

第4章 微生物検査の迅速化技術

第6節 デジタル顕微鏡法

- 測定原理：投影・スキャン型顕微鏡＋培養＋画像処理
- 適用可能な食品：食品全般
- 検出感度：1 CFU/ml
- 測定に要する時間：菌種によって異なる。(例：大腸菌 6～8時間程度)

はじめに

細菌検査業務を実施する必要がある業界では、生きた細菌の数を正確に速く計測したいというニーズが存在している。特に食品衛生法により生菌数を把握することが義務付けられている食品業界では、公定法による検査を実施しなければならないが、結果を得るのに長時間を要する。この状況に対応するため、公定法を踏襲しながら、速くて正確で自動的に結果を得る方法と機器を考案して特許を出願し、国立仙台電波工業高等専門学校との共同研究を経て「デジタル顕微鏡」技術を確立した。この技術が新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の研究開発事業の開発テーマとして採択され、検査システムが製作されるに至った。本システムは、特に定量試験用として確立されたものである。

1. 測定原理

試料を寒天培地で混釈したシャーレを培養しながら、レーザー光線等を照射して試料内の細菌の増殖結果によるコロニーの「影像」を CCD センサーで画像イメージとして取り込み、コンピュータに転送して逐次解析し、正確なコロニー数をリアルタイムで把握する。CCD の 1 素子が数 μm 角であるため、エリアセンサーを採用した場合は、培養されてコロニーサイズが CCD 素子サイズより大きくなったときにデータとして取り込むことができる。通常 CCD の画素数は数十万以上という密度なので、取り込まれた画像はすでに拡大された効果をもっている。コロニー計数は国立仙台電波工業高等専門学校により開発された特殊なアルゴリズムを採用したソフトウェアによって実施される。

このシステムを使用すれば、混釈シャーレを培養しながら、増殖してくるコロニーをミクロの複眼でモニターし続け、短時間に正確なコロニー数を確実に把握できる。そのまま培養を継続して 24 時間または 48 時間後にコロニー数を目視で計数すれば、公定法を実施していることになる。

1.1 システム構成

このシステムは、主に、培養部、画像検出部と画像解析用コンピュータから構成される（図-1）。培養機構、検出機構、シャーレ収納・ハンドリング機構などにより多種のモデルが用意でき、これに応じて価格も大幅に異なる。使用目的に応じ、これらの主要部要素を組み合わせた次のようなモデルがある。

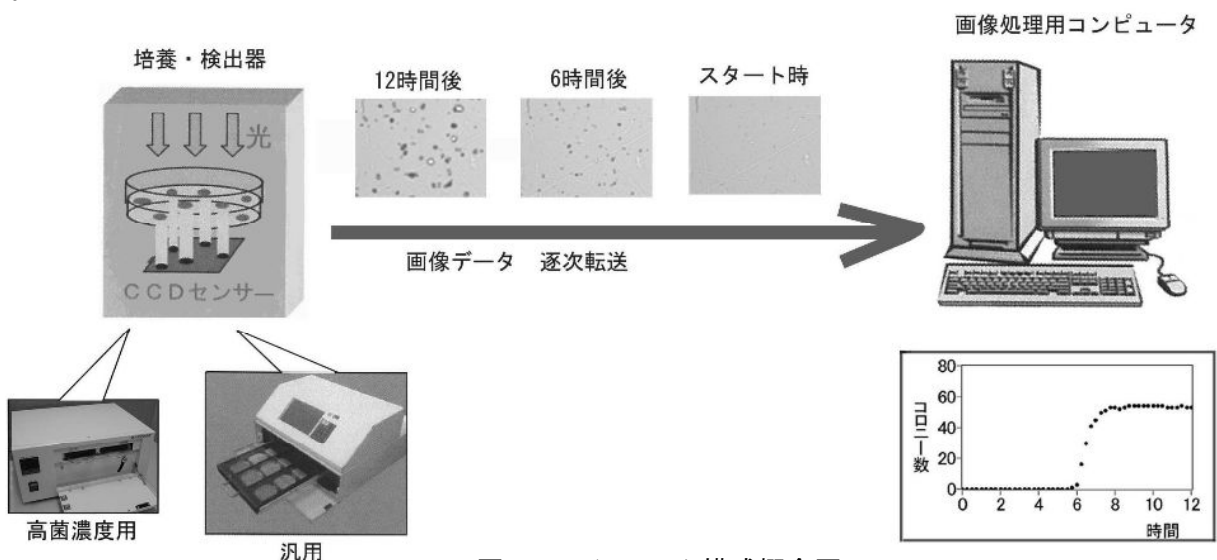


図-1 システム構成概念図

(1) コロニーカウンター型デジタル顕微鏡

- ① CCD 投影型、シャーレ収納なし
- ② CCD スキャン型、シャーレ収納なし

(2) 逐次処理型デジタル顕微鏡

- ① CCD 投影型、アルミブロックヒーター型、シャーレ収納 (2~8 枚程度)
- ② CCD スキャン型、アルミブロックヒーター空調型、シャーレ収納固定型 (1 モジュール 3 枚 (最大 7 モジュール))
- ③ CCD スキャン型、アルミブロックヒーター空調型、シャーレ収納可動型 (1 モジュール 9 枚 (最大 7 モジュール))

1.2 デジタル顕微鏡の検出機構

1.2.1 CCD 投影型

レーザーや単一光源による光を媒体に照射し、観察される媒体が光を通過させるだけの透明度を有しているとすれば、その内部のいろいろな深度に点在する微小物体の陰影像を、媒体の厚さに係わらずミクロンオーダーのサイズでそのまま CCD の表面に投影することができる (図-2)。さらに、レーザーによる回析を積極的に利用すれば、透明な寒天培地に透明のコロニーが増殖した場合でも計数することができる。寒天培地を対象媒体として、1 画素のサイズが数 μm の CCD エリアセンサーを用いて培養しながら観察した場合、例えば $1\mu\text{m}$ の生菌が存在していたとすれば、何回か分裂増殖してコロニーサイズが画素サイズより大きくなったときに陰影像としてコロニーが画像で確認される。この顕微鏡を用いれば、検出機構の構造にもよるが、10mm 程度の厚さをもった寒天培地の場合でも、いろいろな深度に分布する直径が数十 μm のコロニーを、特に焦点を合わせることなく同時に観測が可能である。

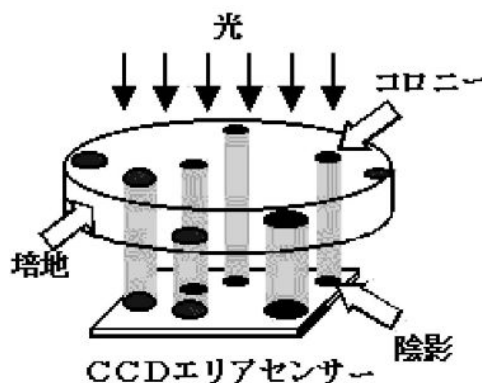


図-2 CCD 投影型顕微鏡原理図

1.2.2 CCD スキャン型

定量試験としての一般的な生菌数の計数は、例えば惣菜のような試料を対象にした場合、微量な汚染レベルが対象ではなく、判定基準はむしろ桁数が多くなるので、前述した原理そのままの CCD 投影型のような極めてシンプルな構造で対応できる。しかしながら、低濃度の汚染を確実に検出するだけの目的や研究などの目的のためにシャーレ全体を観察しながら、数 CFU レベルからすべて計測していく場合には、CCD スキャン型の機種が適当である。

図-3 に示すように、シャーレ全面を一度に観測するため、全体を CCD のサイズに縮小してスキャンしながら全体像を再構築している。結像系レンズが介在するがピント合わせが不要となる光学機構とし、解像度と焦点深度のトレードオフにより画像処理に必要なコントラストを得て全体を観察することができる構造となっている。

投影型スキャン型の使い分けは、以下のとおりである。

CCD 投影型 : 非加熱食材等のような、生菌数が比較的多い試料の一般生菌数計測

CCD スキャン型 : 加熱食肉製品等のような、生菌数が少ない試料の一般生菌数計測

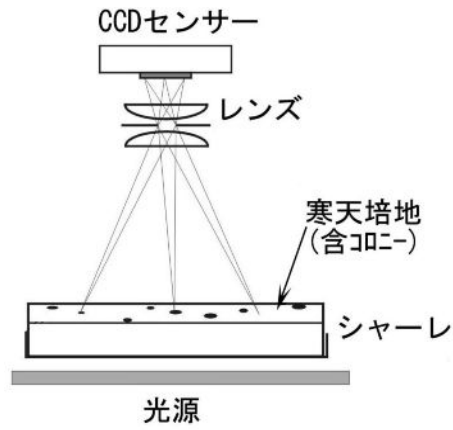


図-3 CCD スキャン型顕微鏡原理図

1.3 培養機構

それぞれの用途に応じて、アルミブロックヒーター式（図-4）、アルミブロックヒーター空調式（図-5）などの方式があり、検出機構の組合せにより目的の検出が実施できるようになっている。

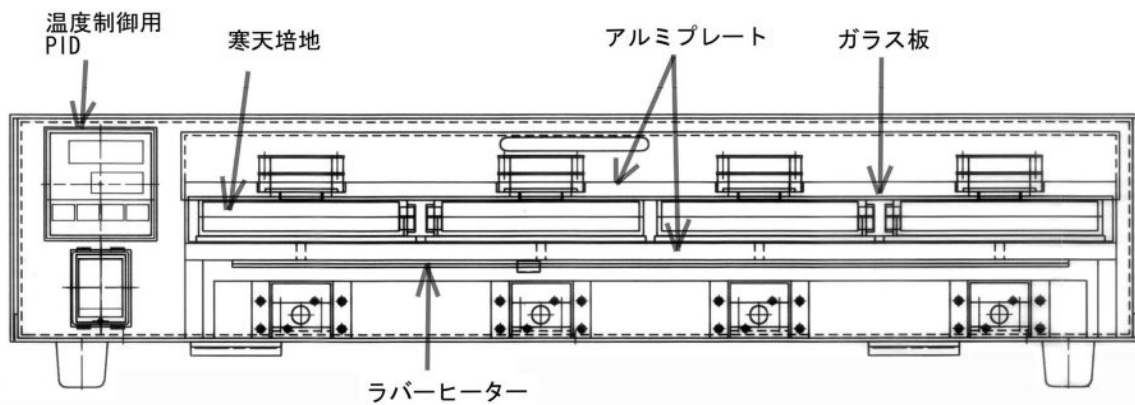


図-4 アルミブロックヒーター式培養機構

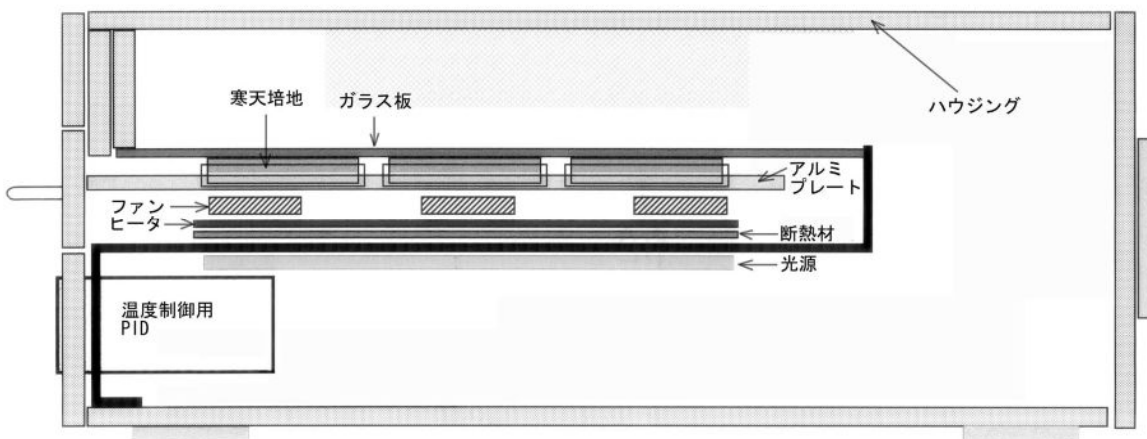


図-5 アルミブロックヒーター空調式培養機構

1.4 コロニー計測ソフトウェア

コロニー検出画像処理システムは、培養開始時から試料を観測し、観測結果を一定時間間隔で逐次画像情報としてコンピュータに取り込む方法を採用している。その都度、取得画像に対してコンピュータで適切な画像処理を行えば、生菌が増殖して形成するコロニーがデジタル顕微鏡の解像度に達したのから順に検出される。新たに検出されるコロニーがなくなった時点で、グラフに表示されるコロニー数（図-8）は一定数に到達し、それまでに計数されたコロニーの数が総生菌数として確定される（図-6）。培養開始時のコロニーが重ならない段階から観測するので、コロニーを正確に計数することが可能である。また、食物残渣などによる計数への悪影響も回避できる（図-7）。さらに、基本アルゴリズム（図-9）に加えて、ノイズ処理や、生菌数が非常に多く、24 時間後などの長時間培養後では重なってしまう場合には、コロニー数が最大の画像を構築して総生菌数を決定するアルゴリズムなどが用意されている（特許願済）。

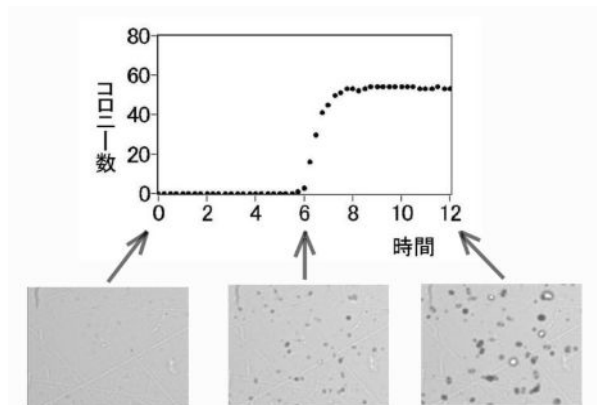


図-6 増殖過程モニター（大腸菌 ATCC25922）

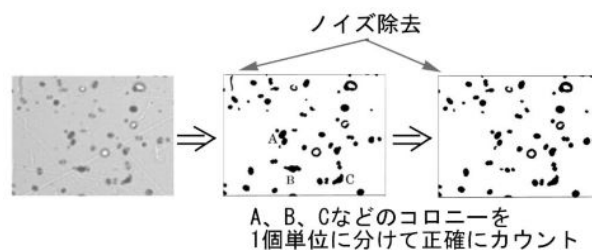


図-7 コロニーカウント画像処理 出

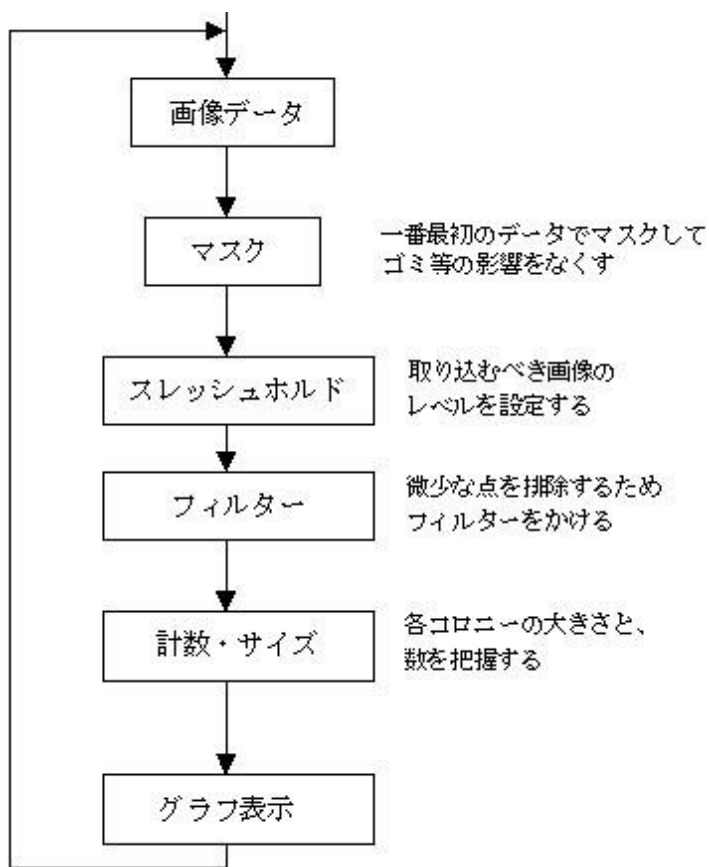


図-9 基本アルゴリズム

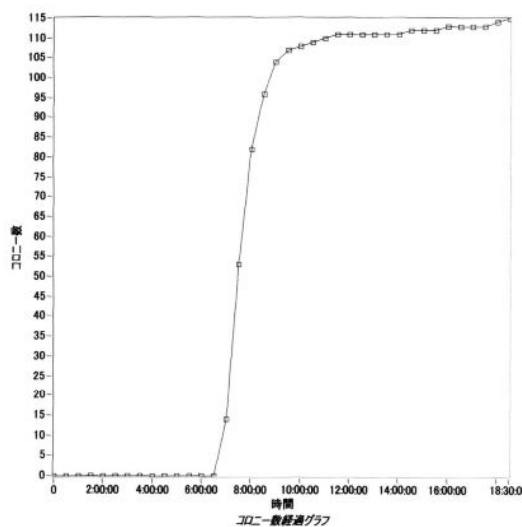
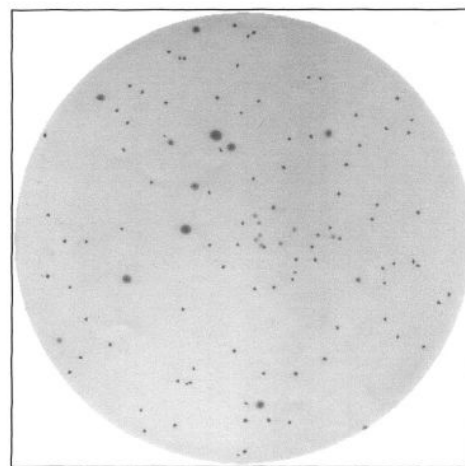


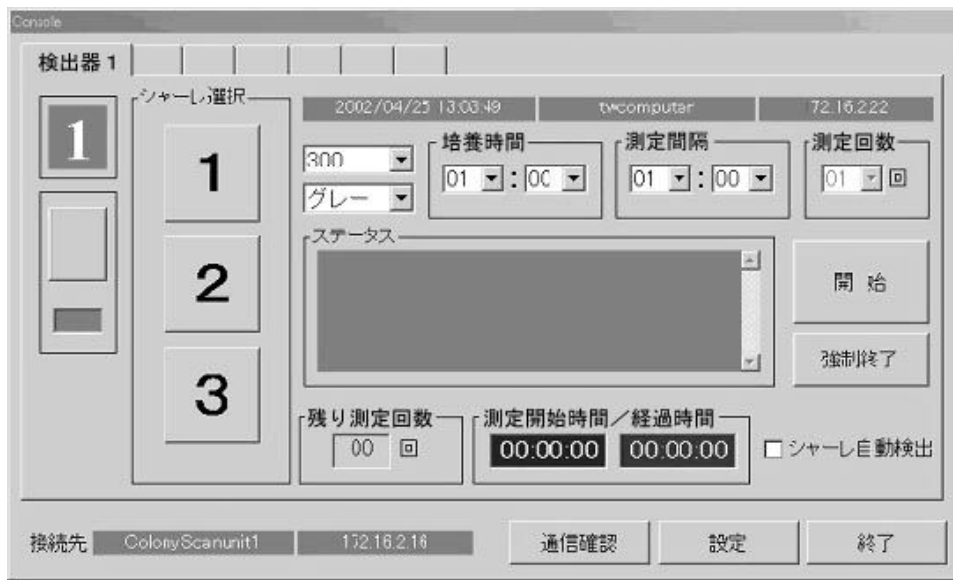
図-8 グラフに表示されるコロニー数（混釈）

2. 測定方法

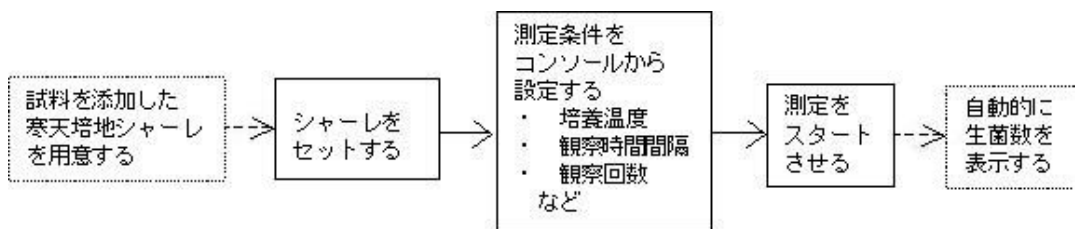
汎用型のシステムを代表例（図－１０）として説明する。一般生菌数を計測する場合は、試料準備作業は標準寒天培地を使用した公定法に従う。用意されたシャーレを検査システムにセットして、培養温度、培養時間、コロニー観察の間隔時間などの設定を検出器のコンソール（図－１１）から入力し、検査をスタートする（図－１２）。自動的にリアルタイムの画像がコンピュータ画面に表示され、観察時の生菌数が数値で表示されるとともにグラフ表示もされる。必要に応じて、収集されたデータにより増殖過程を逐次再現表示するという機能も利用できる。



図－１０ 汎用型システム（シャーレ 9 枚用）



図－１１ 培養・検出器 コンソール表示（シャーレ 3 枚用）



図－１２ デジタル顕微鏡による検査

シャーレ 9 枚用の検出ユニットは、1 台の画像処理用コンピュータに 7 ユニットまで接続可能である。図-13 に数値で示された部分の機能を以下に述べる。

- ① 表示するユニットの切替えスイッチ
- ② 各ユニットの測定開始時間を表示
- ③ コメントの入力と表示の切替えスイッチ
- ④ コメントの入力あるいは表示画面
- ⑤ 測定対象シャーレ名表示
- ⑥ 各シャーレの最新コロニー画像表示
- ⑦ 選択したシャーレの拡大画面を表示するスイッチ
- ⑧ 各シャーレの検出コロニー数の時間変化図
- ⑨ 各シャーレの現時点での検出コロニー数の数値表示

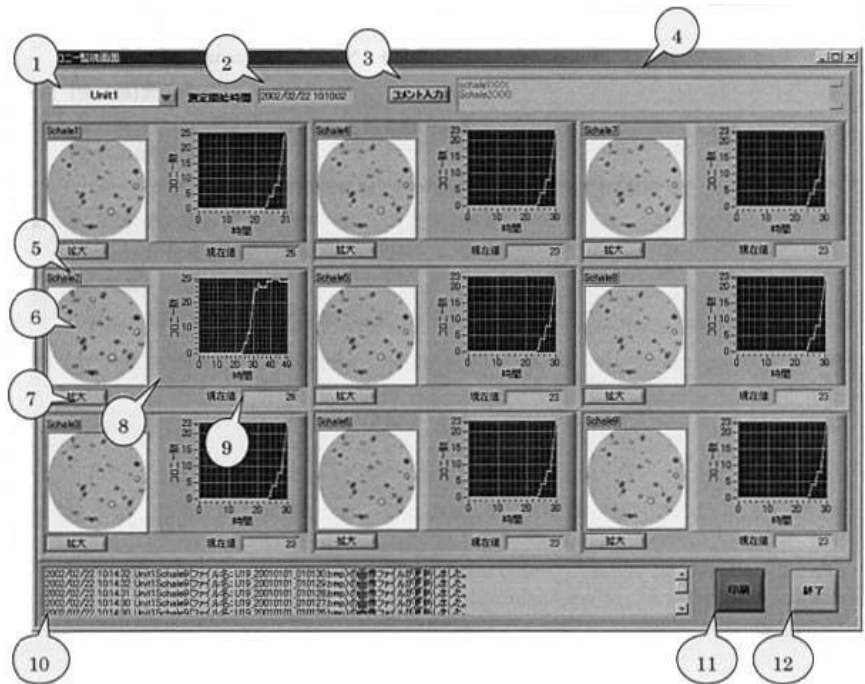


図-13 ユーザーインターフェイス（シャーレ 9 枚用）

- ⑩ コロニー計測装置の更新情報およびエラーメッセージの表示
- ⑪ ユニット情報の印刷
- ⑫ コロニー監視ソフトウェアの終了

なお、各シャーレについて拡大表示した後に、以下の作業が可能である。

- ・取得画像と 2 値化画像の切替え
- ・取得画像と 2 値化画像の保存
- ・シャーレ情報の保存
- ・シャーレ情報の印刷

3. 応用例

応用分野としては、公定法による一般生菌数の迅速な把握が主なものとなる。基本的に定量試験用であり、コロニー数を把握する目的の装置であるが、その他に、増殖が遅い菌の迅速な検出や、色変化も含めた選択培地を利用した定性試験にも使用できる。

4. 使用に際しての注意点

菌の種類によっては、目視で容易に確認できるまでにはコロニーが増殖しない場合があり、目視検査の結果と本システムによる検査結果とに差異が発生することもあるので、注意を要する。

[小川廣幸]

小川廣幸：デジタル顕微鏡法，サイエンスフォーラム，食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！，168～174 (2002)

参考文献

- 1) 竹茂 求ら：コロニー増殖過程逐次計測による混釈法での生菌数高速自動計測法，平成 13 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集，1A-6，6 (2001)