

Time-lapse Shadow Image Analysis (TSIA) による

適切な寒天培地評価法の提供

細菌学者コッホが確立したとされる寒天培地培養法は最も信頼性が高く確実な方法とされており、分析法の検証が極めて厳しいとされる認証機関の米国 AOAC も認証にはこの培養法を標準参照法としています。しかし「人手による平板培養法を良し」とする長い歴史的慣習があり、培養法に使用される寒天培地の性能については、検査対象のサンプルに含まれる細菌のうち実際に培養や検出できた割合を示す「回収率」の良さだけで評価されています。具体的には目視確認で回収率が60%以上であれば「菌は発育良好」とされているので、培地メーカーでもこの判定基準（criteria）で性能試験が実施され、結果は「発育良好」とだけ試験成績書に記載されているのが現状です。全てのコロニーが理想的に同じように成長すると全てのコロニーがほぼ同時に検出されるはずですが、現実には各細菌の性質と生育環境の違いによって検出時間に差が生じます。生育環境による差異をできるだけ少なくするために寒天培地の性能評価が重要なのです。微生物の増殖成長をより適切に評価して使用するために、 μ 3D 装置は、「生菌検出センサー」としての寒天培地性能の万全な評価法も提供しています。

※ 微生物検査は無菌検査のために実施されてきています。 μ 3D 装置は寒天培地を生菌センサーとして採用していますので、寒天培地の性能は、理想的には回収率が100%のものが求められます。

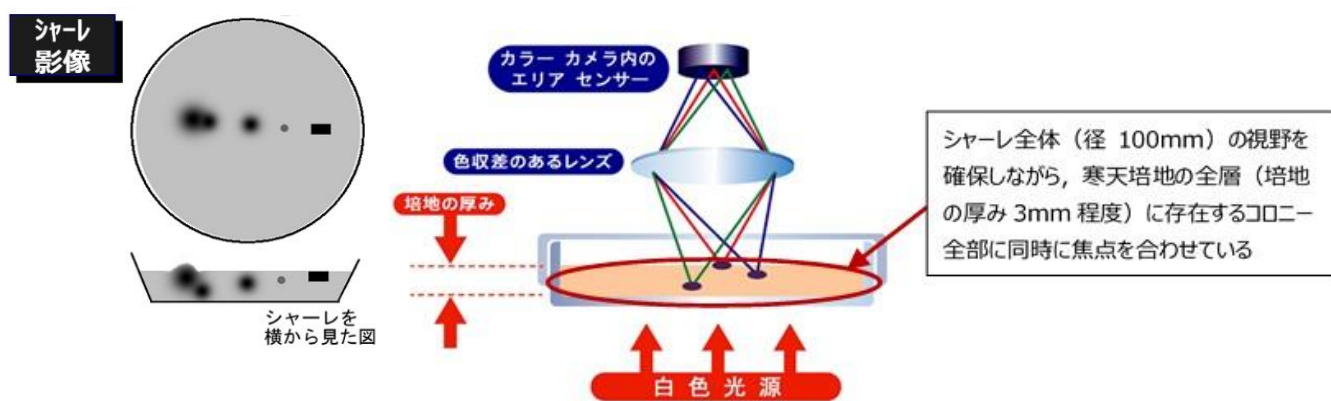
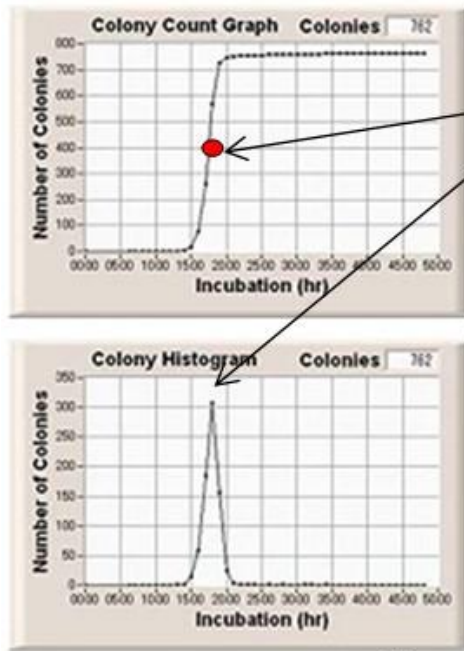


図1 シャレ影像と寒天培地シャレの寒天全層

μ 3D 装置は、シャレ全体の視野、厚さが約3mmの寒天培地の全層に存在するコロニーを、同時に継続的に観測・計数します（図1）。 μ 3D 装置で寒天培地の性能を適切に評価するために、培地表面だけの性能を反映する塗抹法ではなくて、養分が3次元方向から供給されてコロニーが培地のどこにあっても同じように培養される混釈法を用います（ただしカビのような好気性菌は塗抹法にします）。培養対象の標準菌株の生菌試料（菌数は30 cfu以上）を混釈した寒天培地を μ 3D 装置で培養・計測します。

ヒストグラムによる培地性能の定量的評価

図2に示すように各時間での検出コロニー数の変化（コロニーカウントグラフ）をヒストグラム（histogram）で表すと、コロニー検出が始まる時刻から一定値に収束する時刻の間にピーク構造を示します。このヒストグラムは寒天培地中と表面の全コロニーが検出される時間幅の検出したコロニーの分布を意味しているもので、その形状が釣鐘状あるいはベル型（統計学的には正規分布）に近ければ、全ての生菌が同じように成長していること、つまり培地の性能が良いことを意味します。試料中の菌数は十分に多くします（ランダムサンプリング数は30以上にします）。サンプリング間隔（タイムラプス モニターの間隔）を短くすれば、より正規分布の形状（図3）に近づきますが、増殖が遅い菌の方が正規分布の形状に近くなります。このように微生物の培養状況（培地の培養能力）をグラフで表示できることは、標準菌株の生菌を用いて培地性能の評価を、数値化して可視化できることを意味しています。 μ 3D 装置は、添加した生菌を100%回収のできる性能を持つ寒天培地を、ヒストグラムで評価できます。 μ 3D 装置は、このような回収率が約100%の優良な寒天培地を生菌センサーとして使用します。サンプリング間隔は短い方がよいのですが、増殖の速い大腸菌でも20分に一回分裂するとされていますので30分間隔程度が実務的なのです。検出されるコロニー総数が数個の場合はヒストグラムのピークが鋭角になります。試料中の標準菌株のサンプル数が多い場合には釣鐘状に近づきます。標準試料として添加する菌数が少ない場合はグラフの形状が正規分布を示さないで添加菌数は30以上で、多い方が好ましいのです。



コロニーカウントグラフの中心に至る前は、傾きは+
 過ぎると、傾きは-
 ヒストグラムは、コロニーカウントグラフの中心でピークとなる。(正規分布を形成する)
 至る前は、増加する
 過ぎると、減少する

PDA 寒天培地 30分毎に影像取得
C. albicans

図 2 コロニーカウントグラフとその変化量のヒストグラム

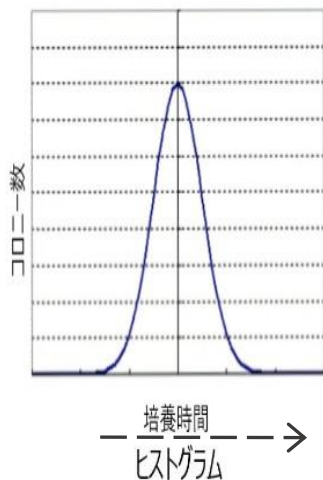


図 3 TSIA による寒天培地評価：ヒストグラム（ガウス分布）

ヒストグラムによる培地性能評価法は、現行の方法つまり菌数の分かっている試料を寒天培地に添加して長時間培養した後（場合によっては 120 時間など）に、目視検査で計数したコロニー数で回収率を求めるという方法、と比較して、より具体的で確実に性能を数値で得て視覚的に示して評価するものです。従って寒天培地を μ 3D 装置（TSIA 評価法）で評価し、下記（図 4）のような試験成績書が添付されている方が好ましいのです。

※コロニー検出画像と、コロニーカウントグラフあるいはヒストグラムが添付されていることが望ましいのです。

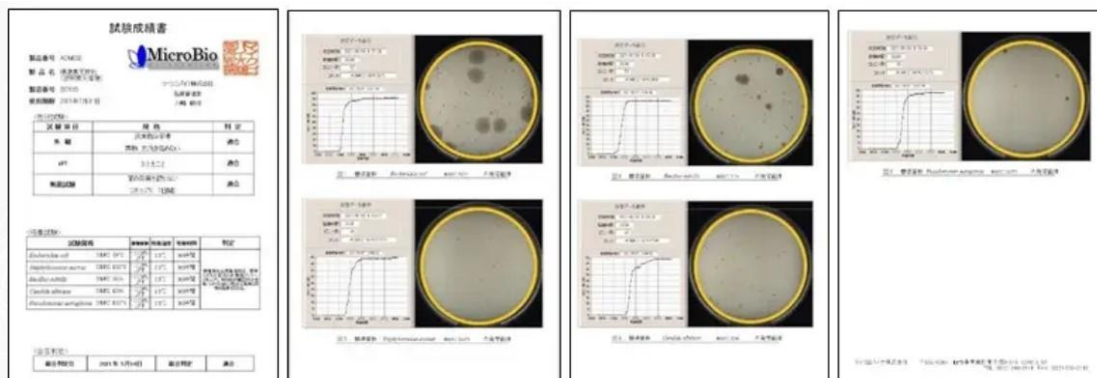
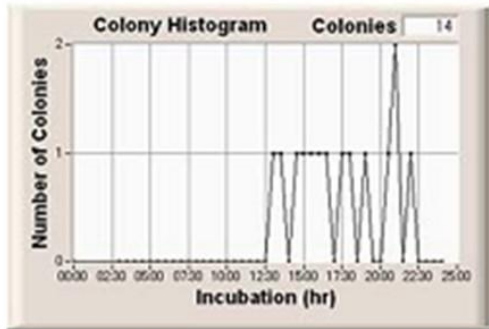
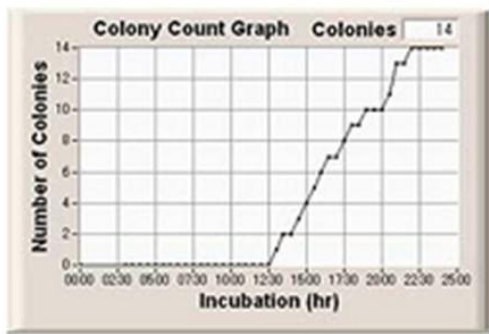


図 4 寒天培地 試験成績書の例

性能が悪い寒天培地の例を、図 5 に示します。



デソキシコレイト寒天培地
塩分濃度 1 %

標準菌株 : *E. coli* (NBRC3972)

寒天培地 : デソキシコレイト寒天培地 (塩分濃度 1 %)

試料形態 : 1ml 試料、混釈、

培養温度 : 35°C、24 時間培養

検出結果 : 回収率は 20%以下で、グラフの形状が悪く、性能が悪い。

デソキシコレイト寒天培地の塩分濃度を 1%まで上げて

その培養性能を *E. coli* の標準菌株で確認した。

このデソキシコレイト寒天培地は塩分濃度が 1%以上になると 24 時間培養後で回収率も 20%以下になることが分かる。

図 5 TSIA による寒天培地評価 : 性能が悪い例 [*E. coli* によるデソキシコレイト寒天培地の評価]

コロニーカウントグラフ と ヒストグラム

性能の良い寒天培地で生菌検出を実施しますと、培養の時間軸に、寒天培地に増殖してくる生菌コロニーとして、一定期間、ヒストグラムが表示されます。何種類もの微生物が試料に混在しているときは、ヒストグラムは時間軸にスペクトラム (spectrum) 状に表示されますが、各菌の増殖率が同様な場合 (例えば、大腸菌群) は、ヒストグラムとしては重なり合いますので、これらの菌群をあたかも 1 菌種のように扱い、総合ヒストグラムとして扱い、陰性試験のプロトコルを決めます。

下図は、ヒストグラムを表示しています。図 6 は真菌、図 7 は細菌の例になります。

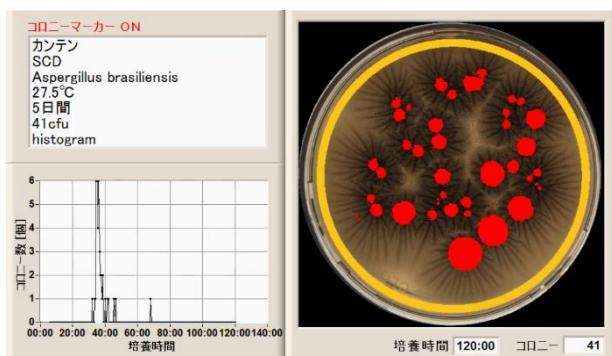


図 6 真菌の例 : *Aspergillus brasiliensis*
[コロニーカウントグラフ、ヒストグラム]

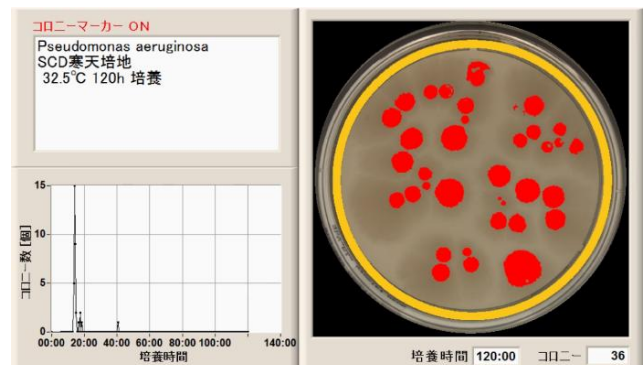


図 7 細菌の例 : *Pseudomonas aeruginosa*
[コロニーカウントグラフ、ヒストグラム]