

# ビデオモニター型細菌検出装置 Biomatic™ VDCS (Video Detection Culturing System)

<マイクロバイオ株式会社>

はじめに

一般的に細菌検出装置と言えば、バイオテクノロジーを採用した機器や高度なエレクトロニクスを採用した複雑な機構を持つ機器を想像してしまう。このシステムは、センシメディア法と呼ばれる細菌検査システムを採用しているため、機器の構造が極めてシンプルになる。そればかりか、検出精度も良く、検出した結果のデータにより菌の増殖程度を簡単に数値化でき、グラフで表現できる。本稿では、この検出法の原理とともに、ビデオモニター型の検出装置 Biomatic™ VDCS (Video Detection Culturing System) を紹介する。

## 1. センサー機能

センシメディア法は、定性試験用細菌検査技術として、マイクロバイオ社が測定概念を構築した培養型の検査システム（特許第 3225484 号）である。検出には計測法体系の「試験モード」の概念を利用しているが、重要な特徴として、検査用具である SensiMedia™ 自体が検出判定能力を有し、判定出力がデジタル信号的に変化することが挙げられる。

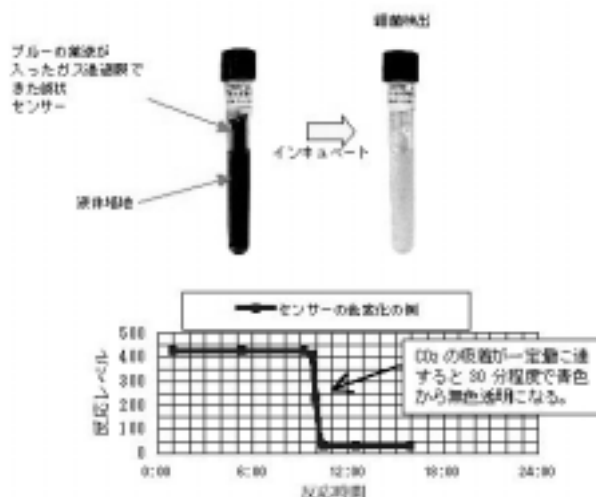


図1 CO<sub>2</sub> センサーの動作

標準のセンシメディアは、滅菌済み試験管の中に培養液と CO<sub>2</sub> センサーが封入してある用具で、試料を 1 ml 添加してインキュベートするものである。センサーは、精度と再現性を追求するために積分型にしてある。菌の増殖とともに産生される

CO<sub>2</sub> を吸着して蓄積し、一定の値に達した時点で、センサー自体の色をデジタル信号のように約 30 分程度で濃紺色から無色透明に反転する（図 1）。

## 2. センシメディア (SensiMedia™) の種類

図 2 に示すように、センシメディアは基本形としては 2 種類が用意されている。標準タイプは試料を 1 ml 添加するように設定されているが、SML シリーズでは試料を大容量添加できる。



標準 SM シリーズ (16ml 試験管)      大容量 SML シリーズ (40ml 試験管)

図2 センシメディアの種類

どちらの用具も、試料を添加した後に液面上にセンサーが突出している状態となるようにして使用する。この部分を目視検査すれば、菌の検出が確認できる。

## 3. ビデオモニター型検出機構

センシメディアを使用して細菌検査を実施する場合は目視で結果を判定できるが、この目視検査作業は、カメラで画像を取得してコンピュータにそのデータを転送して画像解析することにより、自動化することができる（図 3）。

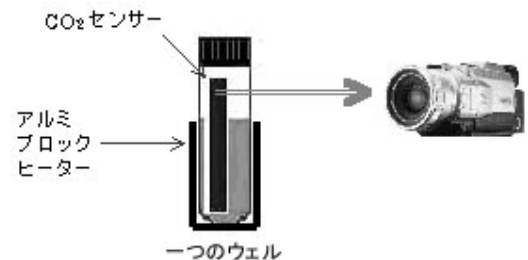


図3 目視検査の自動化

Biomatic™ VDCS はこのようなアプローチを採用した細菌検出装置で、システム構成の概念は図 4 のようになる。

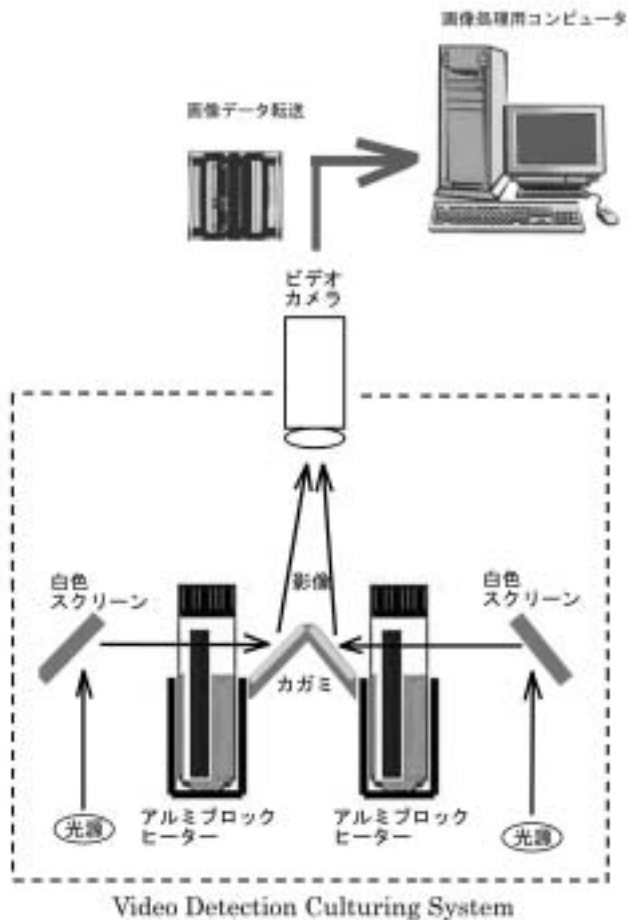


図4 システム構成概念図

このシステムの特徴は、ビデオカメラにより試験管内のセンサー画像をモニターするのではなく、光源によりライトアップされた白いスクリーンによるバックライトでセンサーの陰影を浮かき出させ、試験管の列をカガミに写し込み、その画像部分のデータをカメラで収集するものである（図5）。

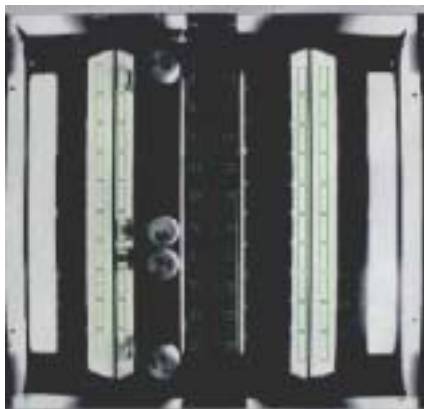


図5 転送画像データ

#### 4. 検出判定

ビデオカメラは、コンピュータからの指示により試験管列の画像を1分間に1回の頻度でサンプルする。各試験管の画像は、検出判定用のソフトウェアウインドウが設定されていて、1回画像がサンプルされる毎に、ウインドウの面積に対するセンサーによる影像面積の割合が計算される（図6）。臨界割合とは、ウインドウ面積に対する比率で設定された判定基準を言うが、この臨界割合以下にセンサーの影像面積が減少した時点で生菌が検出されたものと判断される。

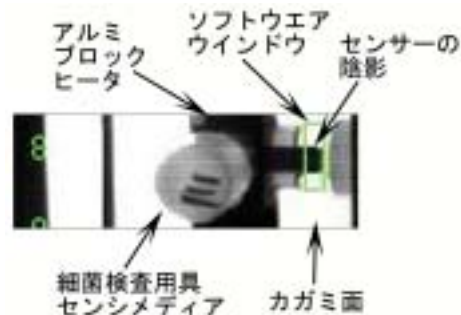


図6 判定用ソフトウェアウインドウ

国立仙台電波工業高等専門学校により開発された処理プログラムのコア部分を含む画像処理アルゴリズムは次のようになる。

- 1) カメラによりグレースケール(0~255)の画像を取得する。
- 2) ウインドウ内の画像を「2値化しきい値（この場合は129として）」を境に2値化する。（グレースケール画像--->2値化画像）
- 3) 2値化画像に占めるセンサーによる“影像”の面積の割合を計算する。（図7）

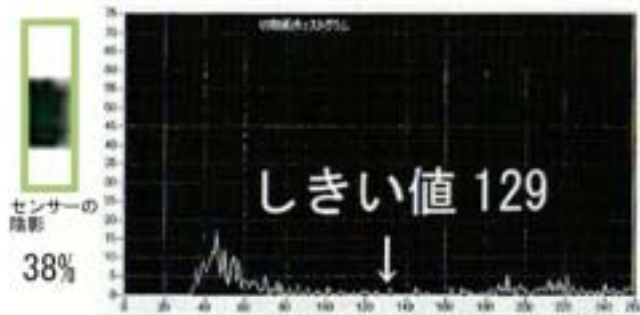


図7 (例) ヒストグラムと陰性の面積割合

- 4) 影像の面積があらかじめ設定された臨界割合（例えば 5%）より減少した時点で陽性（菌検出）と判断する（図 8）。

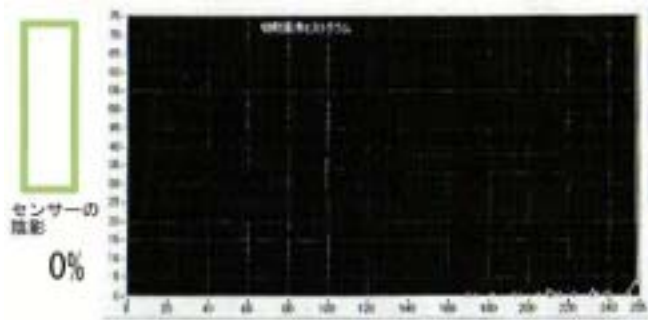


図 8 (例) ヒストグラムと陽性の面積割合

### 5. Biomatic™ VDCS L-40

ビデオモニター型細菌検出装置のうち、大容量センシメディア用（40 本装填）の L-40 を紹介する。（図 9）



図 9 Biomatic™ VDCS L-40

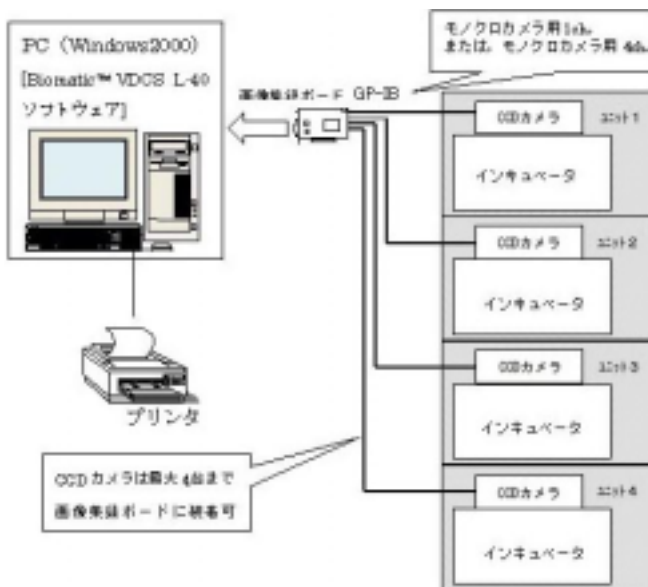


図 10 ハードウェア構成図

ハードウェア構成図（図 10）に示すように、4 チャンネル用の画像収録ボードをインターフェイスとして採用すれば、1 システムについて、SML シリーズのセンシメディアを 40 本収用できるインキュベータを 4 台まで接続できる。



図 11 インキュベータ内部

インキュベータは図 11 に示すように、アルミブロックヒータを採用し、1 列に 10 本ずつ、合計 40 本のセンシメディアを装填できる。温度設定は PID により制御された 2 温度帯を有し、20 本ずつ異なった温度で検査できる。

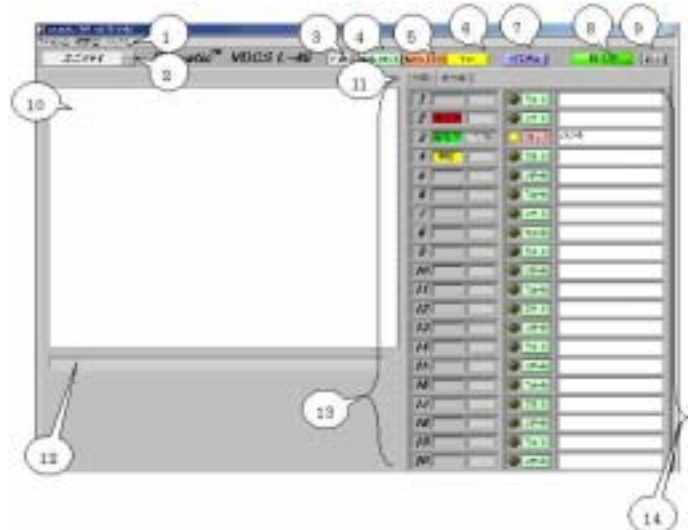


図 12 操作メイン画面

図 12 はディスプレイ上の操作メイン画面で、操作機能は次のとおりである。

#### メニュー

- a) [印刷]：表示ユニットの検出データ印刷
- b) [終了]：VDCS L-40 ソフト終了
- c) [ファイル自動保存]：データ自動保存
- d) [調整画像取得]：静止画像取得表示
- e) [バージョン]：ソフトのバージョン情報

[ユニット選択]：ユニットを表示選択

[印刷]：ユニットの検出データ印刷

[ユニット検出スタート]：ユニット検出開始

[ユニット検出ストップ]；ユニット検出中断

- [クリア]：判定中断、試験管検出状況クリア
- [判定停止]：判定を一時的に停止
- [検出中]LED：試験管が検出中の時のみ表示
- [終了]：ソフトウェア終了
- [ユニット画像]表示欄：最新取得画像表示
- [試験管表示切替]：ユニットの 1～20 および 21～40 の試験管情報を切替表示
- [検出状況]表示欄：メッセージ等が表示
- [試験管検出状況]：試験管ごとの検出状況
- [試験管設定項目]：備考入力欄

## 6. 初期設定用ファイル

一般に検出装置は、検出感度や判定基準等について、ハードウェアである電子回路などで調整を行なっているケースが多い。このシステムでは、これらの調整を主にソフトウェアのデータを変更することで実施している。イニシャルファイルと呼ばれる初期設定用ファイルは、これに関連するデータが格納されているファイルで、Biomatic™ VDCS L-40 ソフトウェア起動時に、このファイルから画像処理の設定情報が読み込まれる。

表1 イニシャルファイル設定データ

種類	項目	項目内容
設定	ユニット数	ユニット数を設定
	ユニット毎試験管数	1ユニット内 設定可能最大試験管数
	ファイル保存	YES/NO
	2値化閾値	
画像処理	臨界割合閾値	
	撮影間隔(分)	ユニット画像撮影間隔
画像処理座標設定 (ピクセル)	試験管画像処理枠の高さ	高さ値
	試験管画像処理枠の幅	幅値
	TextOffsetX 1	試験管番号 1～10 の表示位置 (LEFT を基準)
	TextOffsetY 1	試験管番号 1～10 の表示位置 (TOP を基準)
	TextOffsetX 2	試験管番号 11～20 の表示位置 (LEFT を基準)
	TextOffsetY 2	試験管番号 11～20 の表示位置 (TOP を基準)
	TextOffsetX 3	試験管番号 21～30 の表示位置 (LEFT を基準)
	TextOffsetY 3	試験管番号 21～30 の表示位置 (TOP を基準)
	TextOffsetX 4	試験管番号 31～40 の表示位置 (LEFT を基準)
	TextOffsetY 4	試験管番号 31～40 の表示位置 (TOP を基準)
画像処理座標 (ピクセル)	*(試験管番号)_LEFT	試験管画像処理枠表示位置 (40 試験管)
	*(試験管番号)_TOP	試験管画像処理枠表示位置 (40 試験管)

判定基準等の設定値の把握を容易にするため、調整用データ収集ソフトウェアが用意されているので、ユーザーがデータを参考にしてイニシャルファイルへの設定値を決定することができる。

表1に示された各設定項目の役割は、次のとおりである。

### a. 画像処理

#### ・2値化閾値

256階調のグレースケールにおいて、どの数値をもって白か黒の境にするかを決定

#### ・臨界割合閾値

ソフトウェアウインドウ内でのセンサー陰影面積の占める割合がこの値以上であれば陰性で、これ以下になれば陽性となる“しきい値(スレッシュホールド)”

#### ・撮影間隔(分)

分単位で撮影間隔が設定可能

### b. 画像処理座標設定(ピクセル)

#### ・試験管画像 処理枠の高さ

試験管画像上に設定される判定用ソフトウェアウインドウ枠の高さを設定

#### ・試験管画像 処理枠の幅

試験管画像上に設定される判定用ソフトウェアウインドウ枠の幅を設定

#### ・TextOffsetX1～4, Y1～4

試験管10本毎の1列から4列に対する試験管番号の表示位置を設定するオフセット

### c. 画像処理座標(ピクセル)

#### ・\*(試験管番号)\_LEFT

各試験管に対する左端からの座標位置

#### ・\*(試験管番号)\_TOP

各試験管に対する上端からの座標位置

## 7. 増殖特性の把握

図13は、10倍ごとに希釈された系列の試料をそれぞれのセンシメディアに添加した後、Biomatic™ VDCS を使用して、37℃で培養したときに検出した時間データを、縦軸が菌数の対数目盛りで横軸が時間のグラフで表したものである。

このようにすれば、菌の増殖特性がグラフで把握できる。

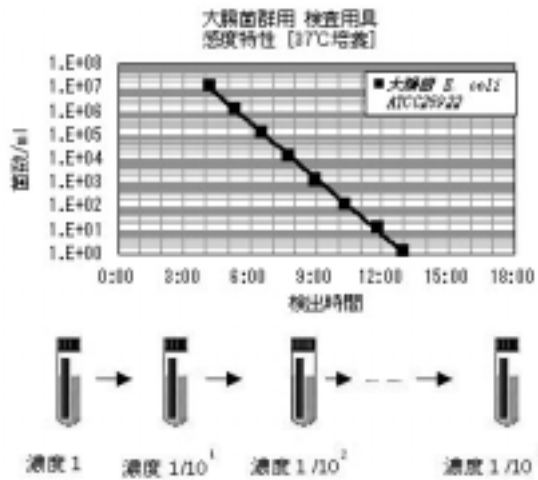


図 13 菌の増殖特性

### 8. 検出対象菌の特定検出

センシメディアは、検出したい菌を一番速く増殖するように培養液が調整された検査用具で、検出対象菌以外はできるかぎり増殖が抑制されている。添加された試料 1ml 中に 1cfu 存在する場合に反応に要する時間をプロトコルとすれば、それ以上時間が経過してもセンサーが陰性を保持していれば、検出対象菌が試料中存在していなかったことになる。

センシメディアは、食品検査用途を中心として、大腸菌群用、サルモネラ用、黄色ブドウ球菌用、O157 用など、20 種類ほどが用意されている。

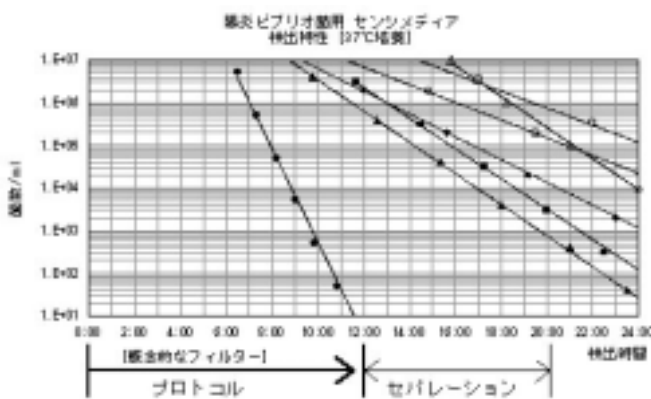


図 14 (例) センシメディアによる菌検出特性

図 14 は、腸炎ビブリオ菌用のセンシメディアを Biomatic™ VDCS で使用する場合の例であるが、試料を添加したセンシメディアを装填して検査を

開始すると、検出対象菌が試料中に存在すればプロトコル内でセンサーが陽性になる。プロトコルを経過してもセンサーが陰性であるときは、対象菌が存在しないことになる。通常の場合 1,000/ml 程度の他の菌が混入しているとするれば、プロトコルが完了してから次に増殖してくる菌の 1,000/ml の試料が検出されるまでの時間をセパレーションとしてできるだけ長くとれるように培地が調整してある。

### 9. Biomatic™ VDCS L-40 の応用例

飲料工場における製品検査について、大容量センシメディアを使用した場合の、このシステムの応用例を紹介する。

栄養価の高い飲料は、飲料自体が培養液と同様の効果を持っている。理想的な細菌検出は、製品自体に増殖する菌を迅速に検出することである。例えば、ある工場で 5 種類の飲料を製造しているとして、これらについて A 菌と B 菌および酵母の検出を実施したいとする。5 製品のうち 2 製品が乳酸菌飲料であるため、pH が低く、酵母以外は、増殖しないことが確認されている。

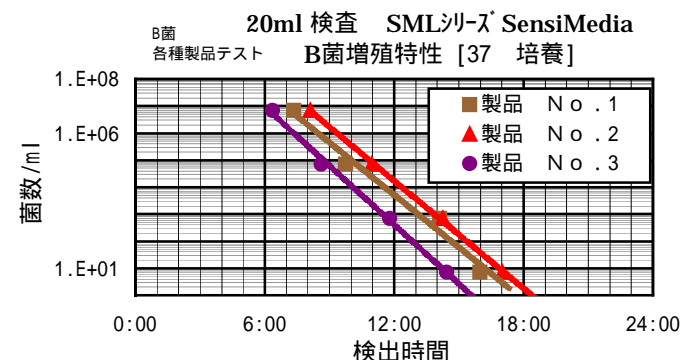
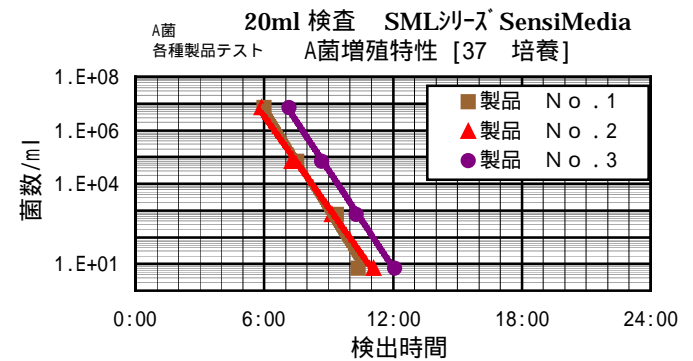


図 15 細菌 A,B の製品 1,2,3 についての増殖特性

製品(1,2,3)中における細菌AとBの増殖特性は図15のとおりなので、大容量センシメディアに20mlの製品をそれぞれ添加してBiomatic™ VDCS L-40にセットして37で培養すれば、20時間以内にA菌、B菌ともに検出できる。

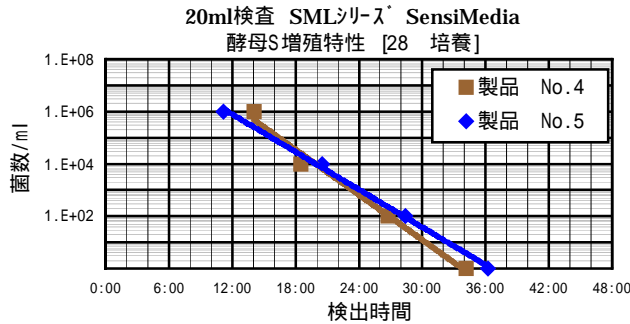


図16 酵母Sの製品4,5についての増殖特性

製品4と5は乳酸菌飲料なのでpHが低いが、酵母Sの増殖が確認されている(図16)。細菌検査と同様に、それぞれ20mlの製品をセンシメディアに添加して28で培養すれば、試料中に酵母Sが存在すれば40時間以内で検出できる。

Biomatic™ VDCS L-40とセンシメディアを用いて確認作業を実施したうえでアプリケーションを設定すれば、効率が良く、簡単で確実な細菌検出を実施できる。

おわりに

細菌検査、特に食品業界における検査は、最終製品は殺菌工程を経ている場合が多いので生きている菌の検出が主体となる。これを確実に実施するには、検出システムは培養型に依存することになる。

検出システムの類は、検出機構であるセンサーがシステム性能を決定する重要な部分を占めているが、培養型の細菌検査システムは、培養液の性能が更に重要な部分を占めていると言える。

Biomatic™ VDCSは、この2つの要点を考慮して開発されたシンプルで実用的なシステムで、センシメディアの持つ積分型センサーの能力と培養液の特性が最大限に引き出せている。

小川, : “ビデオモニター型細菌検出装置 Biomatic™ VDCS (Video Detection Culturing System)”, ジャパン フードサイエンス, Vol.42, No.4, pp.69-75 (2003)

### 参考文献

- 1) 小川廣幸ら：呈色反応方式による細菌検査の数値化, 食品工業, Vol.43, No.14, 58~61 (2000)
- 2) 小川廣幸：論理的手法による寒天培地の開発(例：サルモネラ菌用), 食品工業, Vol.44, No.10, 39~41 (2001)
- 3) 小川廣幸：細菌増殖特性の数値化とその応用, 食品と開発, Vol.37, No.1, 66~70 (2002)
- 4) 小川廣幸：センシメディア法, 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!, 158~165 (2002)

<http://www.microbio.co.jp>  
<mailto:info@microbio.co.jp>