

1. はじめに

細菌検査では一般生菌数を把握することも重要な検査項目の一つであり、産業界では公定法により迅速で正確に把握したいという要望がある。

マイクロバイオ社はこの要望を満たすため、検査対象試料を添加した寒天培地について、厚さを含む培地の全部分を同時に観察できるようなデジタル顕微鏡方式を開発し、これを応用して Biomatic DMCS という機器を製品化している。

本稿では、この計測の基本概念と製品化された機器の特性や応用例などを紹介する。

2. デジタル顕微鏡方式の開発

微生物は1 μm から 100 μm の“極微小”のものという認識が一般的であるが、半導体製造のメタライゼーション技術もサブミクロンの域に達し、トランジスタ素子も極微小に製造できるようになり、今や1素子サイズが微生物のサイズに匹敵するほどである。デジタルカメラの集積化が進み、画像の解像度が著しく向上する中、厚みのある寒天培地中に形成される微生物の微小なコロニーよりも更に微小な影像素子から成る CCD のスクリーンにレーザー光などの平行光により“影絵”として投影できることがマイクロバイオ社の開発部で確認された。この発想をもとに寒天培地を使用した培養型の細菌検査技術として測定概念を構築したものがデジタル顕微鏡方式である。

迅速で自動的に正確な菌の検出ができ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により基礎技術が確立された後、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て試作機器が作製されている。Biomatic DMCS(Digital Microscope Culturing System)は、公定法を踏襲しながら迅速検査が自動的にできる機器として製品化されたものである。

3. 検出原理

図1は、検出機構の概念を示したものである。原理は、レーザーなどによる平行光を試料が添加された寒天培地に照射して、培地中に形成されるミクロンサイズの細菌によるコロニーを、更に小さな半導体素子が基盤の目にならんだスクリーンに投影させて画像を収集するというもので、基本的には拡大する機能は装備していない。小さいものを更にそれより小さい素子から構成されたスクリーンに投影させて画像を取得するもので、CCD センサーの画素数が高密度であるため、取り込まれた画像はすでに拡大された効果を持っている。

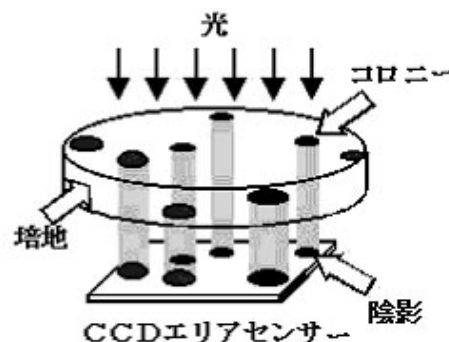


図1 Biomatic™ DMCS 検出機構の概念

4. Biomatic™ DMCS

図 2 は DMCS の概念図で、検出機構により一定時間間隔で取り込まれた画像イメージは、コンピュータに転送されて逐次解析され、正確なコロニー数としてリアルタイムで把握される。

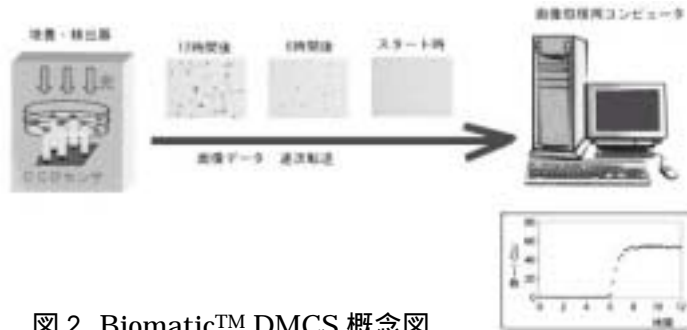


図 2 Biomatic™ DMCS 概念図

写真 1 は、S-12 インキュベータ1台から構成される Biomatic DMCS の基本システムであるが、シャーレを装填したディスク状プレート部分が常に回転してこれを挟み込むように作られた上下アルミプレートから成る培養部を通過して確実に設定温度が加わるようにし、逆さまで培養されているシャーレの上蓋に付きやすい結露が計測を妨げないように自然に蒸発するよう設計されている。S-12 モジュールを開けた状態は写真 2 のとおりであるが、開けた上扉が所定温度を保つヒータープレートになっている。S-12 モジュールは DMCS Multi-System として何台でも接続できる。



写真 1 Biomatic™ DMCS 基本システム



写真 2 DMCS S-12 インキュベータ内部

機器の特長は次のとおりである。

- 公定法による寒天培地を使用して検出
- 検出が迅速 (例) デソキシコレート寒天培地で大腸菌群 6 時間検出
- 混釈したものも計測可能
- 正確なコロニー数をリアルタイムでカウント
- 試料残渣を無視して生菌を正確に検出
- 設定菌数を超えた場合は、電話で自動通報
- 選択培地など、寒天培地は何でも計測可能
- 寒天培地をセットするだけで測定を開始
- 機器の遠隔操作が可能
- 定性試験にも使用可能

5. 検査作業

コンソール PC の電源を入れると自動的に Biomatic™ DMCS S-12 のプログラムが起動し、写真 3 の画面が表示される。測定に関連する設定パネルはこの画面だけで、操作はこの画面から実施される。

S-12 の温度制御部に所定の温度をセットし、シャーレを装填した後、メイン画面からサンプリング時間間隔 (分単位)、プリヒート回数、測定回数をセットして測定を開始させる。

プリヒートはシャーレの上蓋の結露を取り払うのに要する時間を設定するためのもので、シャーレに結露がない場合は、設定する必要はないが、通常 3 時間程度になるようセットする。

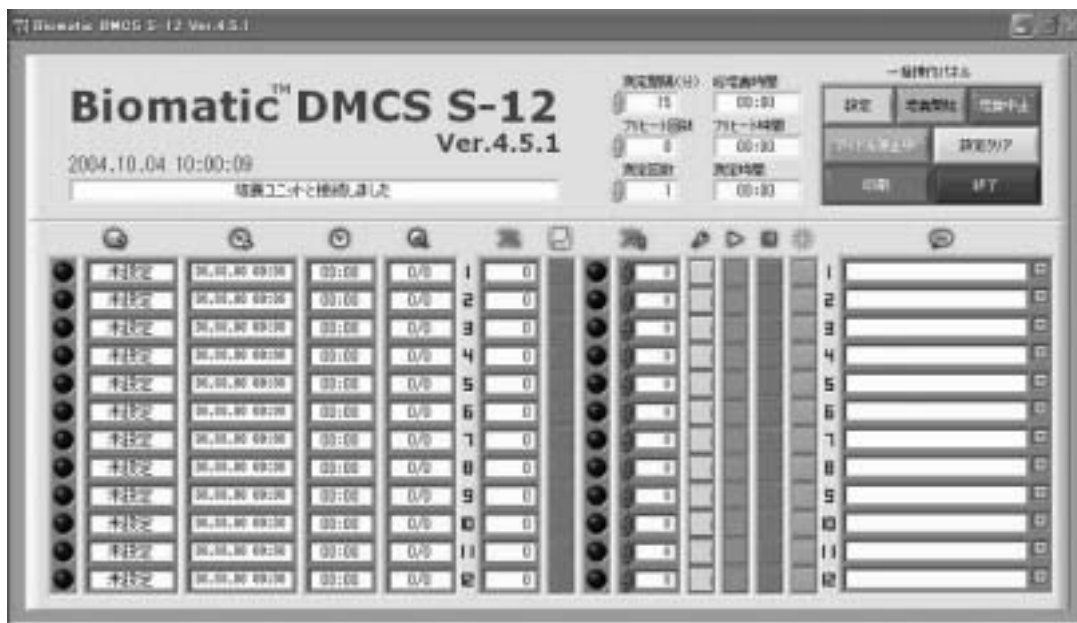


写真 3 メイン画面

菌が検出された場合でその状態を観察したいときは、測定データ表示のボタンをクリックすれば写真 4 の画面が表示される。

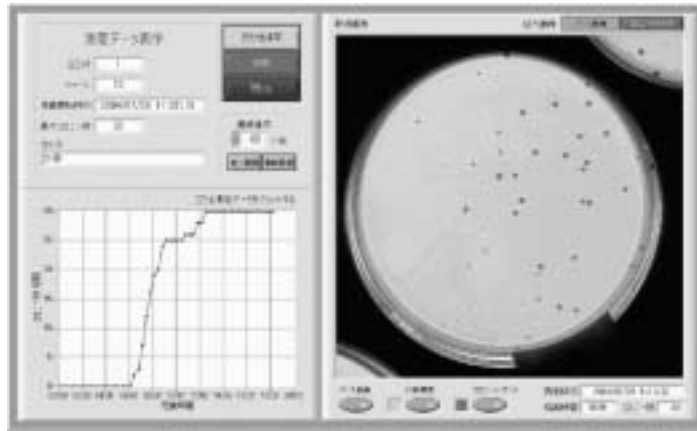


写真 4 測定データ表示画面

測定データの画面からは、時間を遡って状態を観察したり、シャーレ画像を拡大してターゲットのコロニーを観察したりすることが測定中でも実施できる。

試験中に収集したデータを保存しておけば、試験後に添付のユーティリティソフトウェアであるシミュレータやビューなどで解析もできる。

6. 応用例

参考として数例紹介する。表示画像は測定データ表示ではなく、保存データからビューあるいはシミュレータで再表示されたものであるが、実際の検出と全く同じものである。

6.1 大腸菌群の検出

デソキシコレート寒天培地による大腸菌群の検出は次の表示ようになる。混釈した試料は、ポテト菓子をスタマックしたもので、検出開始時のシャーレ画像(写真 5)には食物残渣が見える。6時間後(写真 6)には数百の大腸菌群が検出されている。

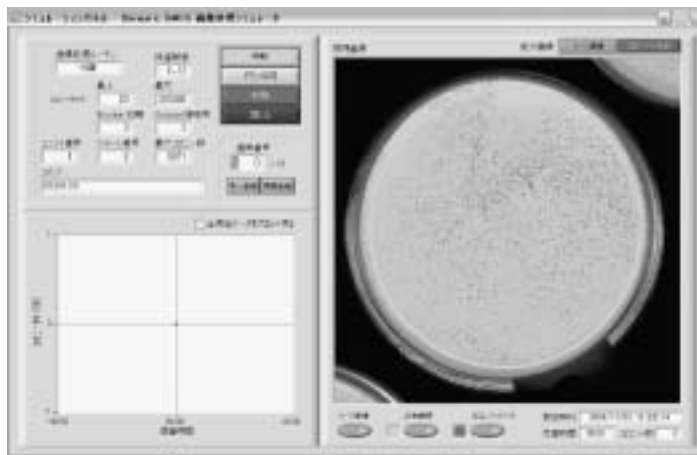


写真 5 大腸菌群の検出開始時

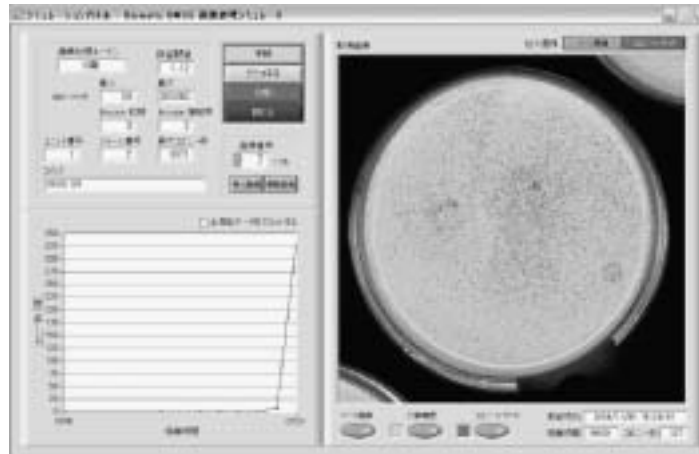


写真 6 大腸菌群 6 時間後検出

6.2 一般生菌数の把握

目視では生菌のカウントが不可能と思われるような試料の例としてウコン粉末(写真 7)を紹介する。カウント時間は混在していた菌の種類により異なる。この例の場合は増殖を示すグラフが階段状にならなかったこと(写真 8)から、原材料のウコン粉末には単一種類の菌が存在していることが分かる。

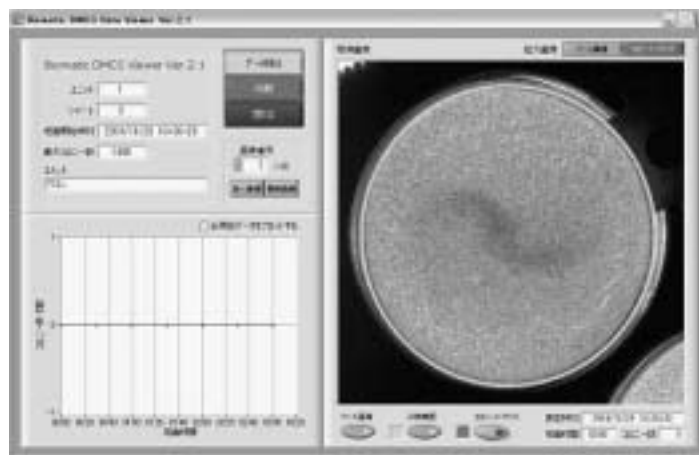


写真 7 一般生菌数カウント開始 3 時間後

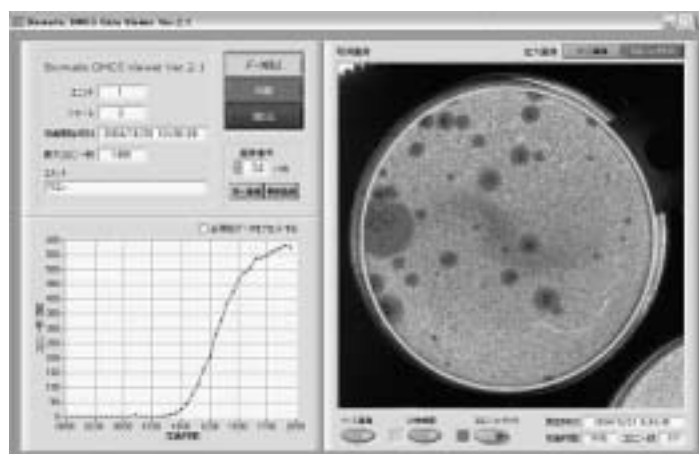


写真 8 一般生菌数カウント開始 19 時間後

6.3 カビの検出

カビの検出には通常5日間を要すると言われている。カビは種類が多いので検出の条件も単一にできないため、プロトコルとしてカビが存在していないことを“何時間以内”で確認できるとは断言できないが、このシステムを使用すれば通常のカビは48時間以内(写真9,10)で検出が可能なのである。

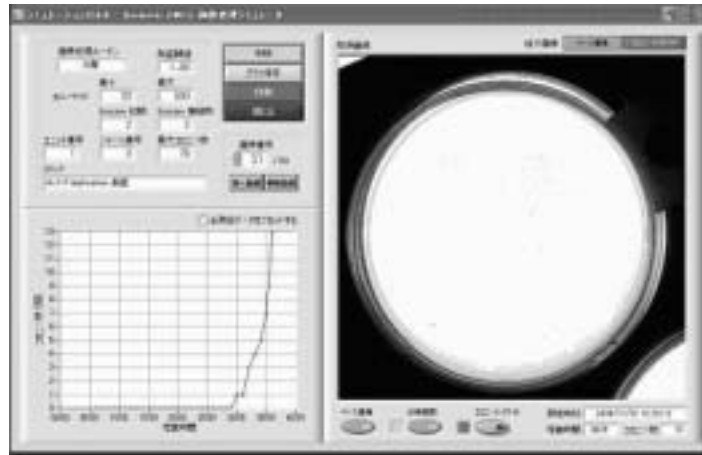


写真9 カビ36時間後検出

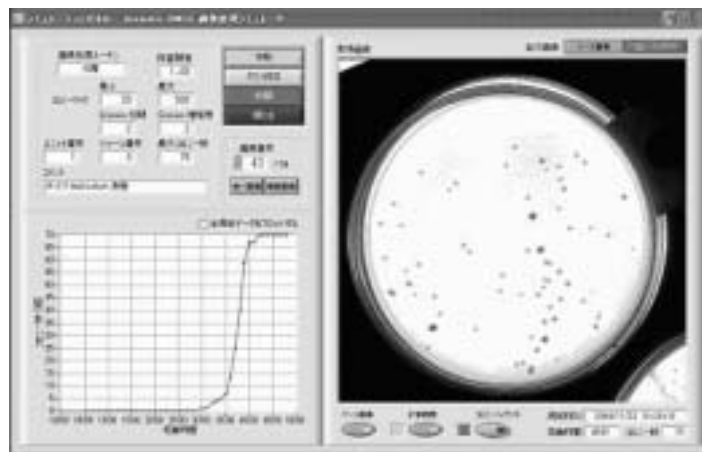


写真10 カビ定性試験48時間内確定

6.4 水の無菌検査(フィルター法)

大量の水をフィルターで濾過し、寒天培地に貼り付けて検査した例(写真11)を紹介する。

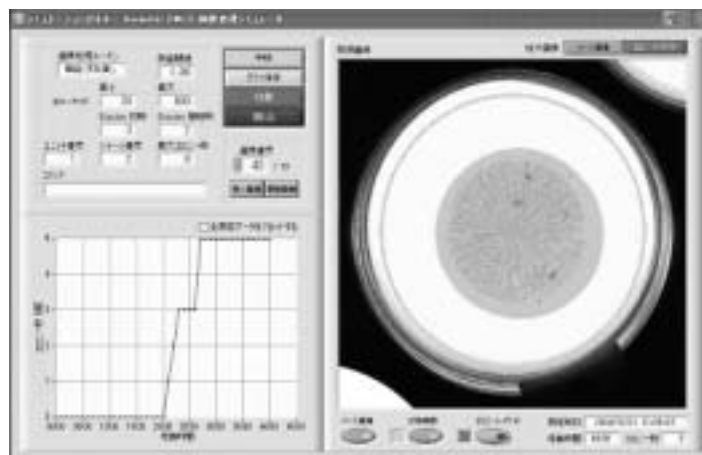


写真11 水を濾過したフィルターの検査

7. おわりに

Biomatic DMCS 自体は定量試験用機器として開発されたが、産業界においては定性試験用機器として先行採用されている。

これは、ハードウェアとしてのコンピュータ技術や画像処理などのソフトウェア関連技術の著しい進歩の結果、寒天培地による細菌検査も培地全面の経時観察が実施できるようになり、リアルタイムで全自動、自動通報、遠隔操作の検査が可能となったことが主な理由と言える。

また、ソフトウェアを含めたこのシステムは単に観察手段を提供するだけでなく、測定結果をグラフや数値で表現できるものであるため、現場では検査に、大学や研究機関では菌の研究に、検査用具製造では開発に、培地製造などでは品質管理や評価に使用されるなど、用途は幅が広い。

小川廣幸：デジタル顕微鏡技術を応用した細菌検査機器バイオマティック DMCS，フードケミカル，
Vol.21 No.3 (239)，84～87 (2005)

参考文献

- 1) 竹茂求他：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，p6，(2001，8)
- 2) 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)

<http://www.microbio.co.jp>

info@microbio.co.jp