

1. はじめに

食品業界をはじめ、日用品、医薬品、化粧品など多くの業界では、製品中に品質問題を引き起こす微生物汚染があるかどうかの検査に、培養方式でコロニーを確認するという公的試験法に基づいた細菌検査が実施されている。また、目的によっては1個の微生物を定性的に検出したり、一定以下または以上の菌数を定量的に検査したりしている。

工場によってはこの検査の検体数が日々数百という場合も多く、大量処理型の迅速自動細菌検査システムが必要とされている。

本稿では、寒天培地を用いた公的試験法を自動化して迅速にコロニーを検出して正確に計数するために開発されて製品化された大量処理型検査装置である Biomatic DMCS (Digital Microscope Culturing System) FA-100 の開発経緯、原理、特長などを紹介する。

2. 開発経緯

食品業界などでは、製品は殺菌工程を経ているので無菌に近い状態である。このような製品中に生きている細菌が微量でも混入した場合、流通過程において品質問題を引き起こす可能性があるため、出荷前に問題となる菌が製品中にないことを確認する必要がある。また、公的試験法による生菌数の確認も日々の検体数がたいへん多い。このように、生きている菌が検査の対象である場合には、検査システムを開発するうえにおいて、検出技術をはじめ、検出要素などについて、どのような方式が最適であるかを考慮したうえで、具体的な用具や機器を開発する必要がある。

2.1 菌検出技術

細菌を検出する技術にも各種あるが、下記の例のようにそれぞれ特徴がある。

DNA 関連技術

菌は死んでいる。

抗原抗体反応

菌が生きていても死んでいても反応。

ATP 検出

生きているものは何でも反応。

培養型

生きているものに反応。

生菌を検出するというを目的とした場合、古くから知られているが、培養して増殖するから生きているとする培養型が自然であり、培養型を除いたいずれの方式も“生きている細菌だけを確実に検出する”という用途にも、また、定量試験という用途にも、採用するには方法原理からして困難である。

2.2 検出要素

試料に存在する細菌の増殖した結果として、培養しながら観察する検出要素には、次のようなものがある。

コロニーの形成

増殖と相関が高い。広範な菌。

定量試験にも適している。

CO₂ の発生量

増殖と相関が高い。広範な菌。

O₂ の消費量

主に好気性菌が対象。

培養媒体の pH 変化

試料の pH による影響が高い。

電気抵抗の変化量

センサーは試料接触型。

ATP 量

菌量との相関性が低い。

抗原抗体反応

菌との特異性が高過ぎる。

このうち、公的試験法にも採用されている“コロニーの形成”が最も確実で、成長が進めばコロニーを目視で確認できるというメリットがあり、生菌数も同時に確定できるという利点もある。このような考察から検出要素と技術を選択し、検出と同時に増殖程度を数値化できるシステムを開発すれば生菌を確実に検出できることになる。これは言い換えれば、生菌検出と定量試験の両方に向いている寒天培地を用いた公的試験法を自動化することがアプローチとして最もよいということを意味している。

2.3 デジタル顕微鏡方式

この方式は、試料を添加した寒天培地を培養しながら経時的にモニターし、培地の表面や培地中に存在する細菌により増殖してくるコロニーをマイクロ(直径 μm)の微小なレベルで検出するもので、実質上、公的試験法を全自動化しているものである。この方式は、そもそも定量試験用として考案されたものであるが、検出原理は図1に示すようにシンプルであり、とても有効である。

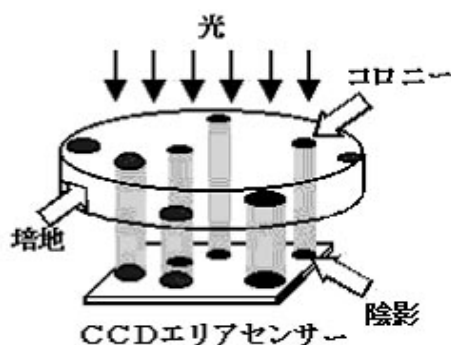


図1 デジタル顕微鏡の検出概念

試料が添加され培養中の寒天培地にレーザー光などの平行光を照射して CCD のようなマイクロ四方のトランジスタから成る基板の目のようなアレー状のスクリーンにマイクロのコロニーを“影絵”として投影してその画像を一定時間間隔で収集し、コンピュータにより画像解析して成長しているコロニーを検出するものである。

この特長は、寒天培地のシャーレ全体について平行光を照射することで、深さ方向にも焦点を合わせることなくマイクロレベルの影絵が収集できることにある。

この方式はマイクロバイオ社により考案されて特許出願されたもので、この方法と細菌検査機器は、仙台電波高専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、Biomatic DMCS として製品化されている。

2.4 Biomatic™ DMCS S-12

Biomatic DMCS (Digital Microscope Culturing System) S-12 は、次のような考察により開発されている。

- (1) 存在する細菌が生きています菌であることを確実に確認するために、培養法を用いる。
- (2) 検出の迅速性を実現するために、大きく成長した細菌のコロニーを人間が肉眼で確認するのでは

なく、デジタル顕微鏡方式の光学的計測技術を用いて、細菌が成長してコロニーを形成する過程を、培養開始時からマイクロレベルで継続的に観測し、増殖によるマイクロな(μm レベル)成長変化を検出して生菌数を確定する。

- (3) 検出の自動化を実現するために、計測画像を画像処理解析する。

図2はDMCSの概念図であるが、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。

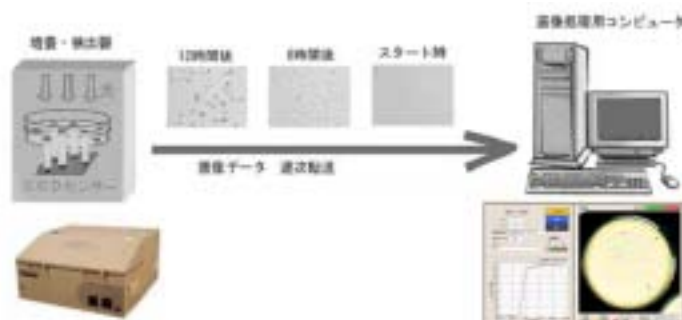


図2 Biomatic™ DMCS 概念図



写真1 Biomatic™ DMCS S-12 システム

Biomatic DMCS S-12(写真1)は、公的試験法を自動的に実施でき、検出が迅速な定量検査用装置として製品化されたトップラインの細菌検査機器であるが、検出が速いので定性試験用としても採用されている。S-12は1モジュールでシャーレが12枚収容でき、専用ラックを使用すれば、1ラックにつき3モジュールずつ追加できるタイプの検査機器で、検査需要に柔軟に対応できるものである。

Biomatic DMCS S-12を実際に採用しているアプリケーションには、次のようなものがある。

- a. 乳業メーカー
 - ・大腸菌群の迅速検査(6時間から)
 - ・乳酸菌の定量迅速検査(24時間以内)
- b. 食品・食品素材・惣菜製造
 - ・大腸菌群の定性迅速検査
 - ・一般生菌数の定量迅速検査(8時間から)

- c. 日用品・化粧品メーカー
 - ・大腸菌群の定性迅速検査
 - ・真菌・酵母菌の定性迅速検査(1～3日)
- d. 医薬品メーカー
 - ・真菌・酵母菌の定性迅速検査(1～3日)
 - ・抗菌試験
- e. 飲料メーカー
 - ・フィルター法による定性・定量検査

3. Biomatic™ DMCS FA-100

(DMCS Full-Auto 100)

モデル FA-100 は、DMCS トップラインの S-12 の機能を踏襲しながら、ユーザーの要望を反映させて 100 個のシャーレ検体を培養しながら同時計測できるようにした定量検査機器である。(写真 2)



写真 2 Biomatic™ DMCS FA-100 システム

3.1 ハードウェア



写真 3 DMCS FA-100 ハードウェア

FA-100 本体の物理的サイズは、約高さ 175cm、横幅 80cm、奥行 70cm で、シャーレがどこにセットされているか分かるようにドアはシースルーになっている。このドアを開くと写真 3 のようになっているが、シャーレを 5 個収容できるトレイが上から 20 段並んでいるので、合計 100 個のシャーレを装填できる。各トレイは、ヒートプレートの上に設置してあるので、設定した温度で直接培養される。

画像は、多量の検体数を処理するため撮影型で取得されるが、サンプリング時間になると、トレイが上の段から 1

枚ずつ順に、奥のリードステーションにミクロンオーダーの制御で移送され、トレイ上のシャーレ 5 個ずつの画像が取得される。

測定は、一定時間間隔でシャーレ 5 個ずつの画像が撮影されてコンピュータに転送され、画像解析されて検出・計数される。サンプリングタイムは、30 分に 1 回から設定できるようにしてある。

3.2 ソフトウェア

コンソール PC の電源を入れると自動的に Biomatic™ DMCS FA-100 のプログラムが起動し、図 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あるが、基本的には表示パネルであり、測定操作は機器本体のドアを開け、空いている場所にシャーレをセットするだけで計測が開始され、シャーレを取れば終了する。

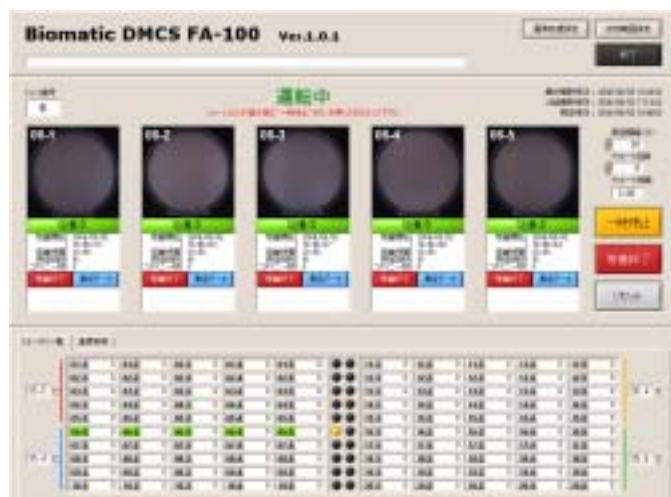


図 3 DMCS FA-100 操作パネル

トレイとシャーレ番号を示した 100 個のシャーレ表は、検出したコロニー数を表示している。検出したシャーレについて検出状況を詳しく観察したい場合は、シャーレ番号を直接押すか、または画像を表示中のトレイの見たいシャーレ画像の下に配置してあるブルーの“測定データ”ボタンを押せば、図 4 のような操作画面が現れる。

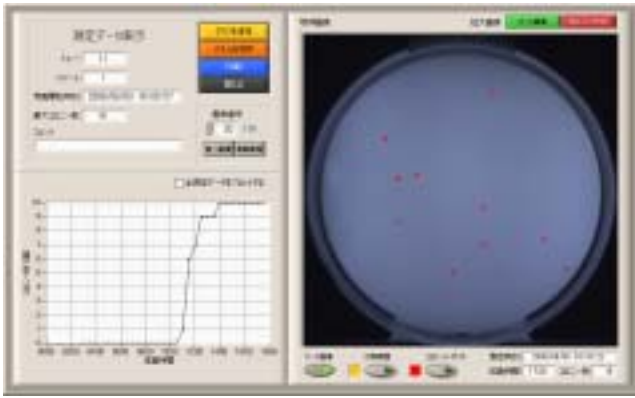


図4 DMCS FA-100 測定データ表示

測定データ表示の画面からは、このシャーレについて、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、どのコロニーを計数したかをチェックするなど、検出状況を確認することが測定中でも実施できる。

収集したデータはクリアしなければ検査後でも保持されているので、データを長期保存したり、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ピュアなどで解析したりもできる。

3.3 特長

FA-100 は DMCS S-12 の長所を踏襲していて、次のような特長がある。

- 公的試験法を全自動化している。
- 100検体を同時計測できる。
- 目視では不可能な微小レベル(数十 μm のコロニー)で生菌数を正確に自動的にカウントする。(迅速検出, 生菌数迅速カウント)
- 試料残渣のキャンセル機能により、生菌によるコロニーだけを検出する。
- 設定菌数を越えて検出した場合は、携帯電話などへ自動通報する。
- 公的試験法による寒天培地を使用するので余分な消耗品のコストはない。
- 検査結果はデジタルデータで数値化し、画像とグラフで表示する。
- 一定間隔サンプリングでモニターし、リアルタイムで検出する。
- シャーレをセットするだけで検査を開始する。
- シャーレを抜き取るだけで検査を終了する。
- 混釈も塗沫も計測できる。
- 検査結果を電子データで保存できる。
- 遠隔で操作できる。

4. おわりに

Biomatic DMCS FA-100 は、検体数を多く処理できるようにすることを念頭に置き、公的試験法を全自動化した細菌検査機器である。これは、DMCS S-12 で培った技術が背景にあることにより製品化が可能となったものではあるが、さらに、多検体処理に適した技術と構造の工夫が加えられている。迅速性、多検体処理、全自動化などの各要求度の兼ね合う点を見つけ出し、実用的なレベルでバランスをとっているため、各産業界における品質管理などの検査実務には、たいへん役に立つものと確信している。

小川廣幸: デジタル顕微鏡技術の応用による公定法に準じた迅速・簡単な細菌検査, フードケミカル, p11 ~ 15 (2006, 9)

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!, p168 ~ 174 (2002)
- 3) 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), p84 ~ 87 (2005)