MicroBio AutoScanner μ3D

全自動 迅速
微生物検出装置

MicroBio Corporation

マイクロバイオ株式会社

https://www.microbio.co.jp

目次

はじめに ・・・

はじめに

マイクロコロニー法は独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）が指定・分類する微生物検出の**迅速法**であり、人手で時間をかけて実施する**従来の標準平板培養法（公定法）**による**生菌（生きた細菌）の検出**を**初めて自動化、迅速化**したものです。

https://www.pmda.go.jp/files/000267006.pdf

この技術はマイクロバイオ社のタイムラプス影像解析（Time-lapse Shadow Image Analysis; TSIA）開発プロジェクトが2001 年に新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のコンソーシアム研究開発**プロジェクト**として採択・実施され、この開発された技術は、生菌全自動迅速検出装置 MicroBio µ3D AutoScanner（µ3D 装置）に搭載されて実用化されました。本解説は、培養法による生菌検出の自動化と迅速化を実現する様々な技術的開発の成果とその活用に焦点を当てています。また、この技術を用いた生菌検出の実施例を紹介しています。 以下に先ず背景となる従来の**標準平板培養法（公定法）の問題点と**、TSIA および µ3D **装置**の要点を概観します。

（1） 背景：従来からの標準平板培養法（公定法）の問題点

標準平板培養法は、**食品衛生法**などでは生菌検出の公的試験法（**公定法**）とされています。試料を寒天培地に添加して培養すると、試料に含まれていた個々の生菌が分裂増殖して一定時間後にはそれぞれが目に見えるコロニーを形成します。従って、培養後のコロニー数は培養開始前に試料中に存在していた生菌数を意味しています。培養法は生菌をわずか 1 個からでも検出する**最も信頼できる方法**であり、それが公定法として指定されている理由となっています。そのため、食品、飲料、医薬品、日用品、化粧品などの業界で、品質管理の一環として広く実施されています。

しかし、コロニーを目視で数えていた従来の培養法には次のような**問題点**があります。

① コロニーが目視で確認できる大きさになるまで培養に一日以上の**時間がかかる**。
② 目視での計数検査は**手間がかかる**。

なお手間に関しましては、目視の代わりにコロニーカウンターを使用することもありますが、培養に時間がかかるのは同じであり、計数精度にも課題があります。従って、より迅速で自動化された正確な検査方法が求められていました。

そこでこれまで培養を行わず迅速に検出する色々な方法が、提案、開発、導入されてきましたが、公定法として採用されたものはありませんでした。 その理由は、これまで提案された迅速法には「死んだ細菌にも反応する」、「少数の細菌には反応しない」などの欠点があり、確実性において「生きた細菌だけを 1 個からでも検出する」という培養法には代われないからです。 つまり、培養法を用いない方法は公的に社会の要請に応える検査法にはならないのです。

このような背景で、培養法（公定法）に基づいて、しかも生菌を簡便、正確、かつ迅速に検出して計数する方法の開発が社会で強く求められており、適切な検査ツールや機器の提供が急務となっていました。

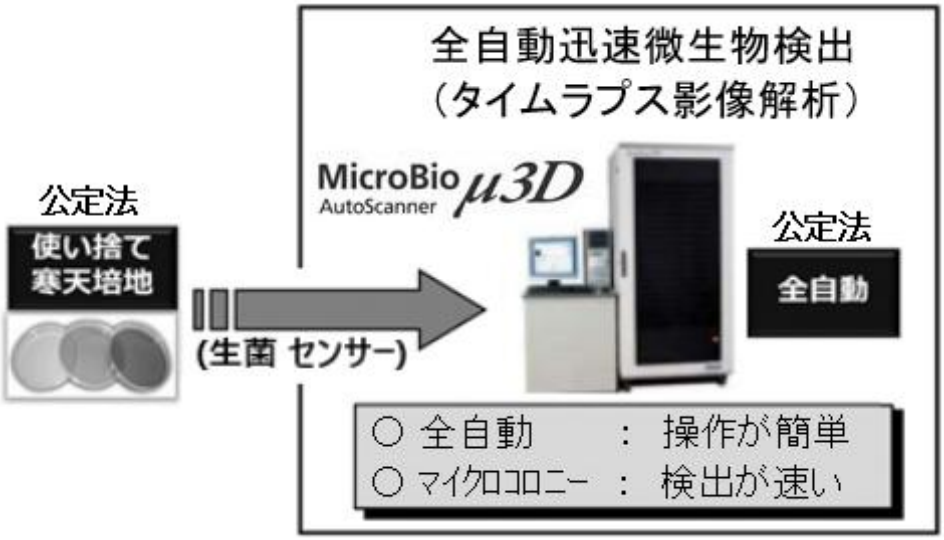


図 1 平板培養法 の 検出 自動迅速化

（2） タイムラプス影像解析（TSIA）と MicroBio μ3D 装置

マイクロバイオ社によって開発された TSIA **は**培養法を採用しながら**自動的**にかつ**迅速**に生菌を検出する**微生物の検出・定量化試験**の**方法論**（microbial detection and quantification methodology）で、MicroBio μ3D 装置がその方法論の実施を実現しています。**寒天培地**を使い捨て**生菌センサー**として採用し、培養開始から培養過程を一定時間ごとに自動モニターして、コロニーを肉眼では確認できない初期のマイクロコロニーの段階から正確に検出・計数します（**図 1**）。従来の目視によるコロニー確認では、コロニー数が多い場合には大きく成長したコロニーどうしが重なり合って正確な計数ができなかったのに対し、TSIA では重なる前のコロニー数を自動に、かつ正確に計数することが可能になっています。

1．タイムラプス影像解析（Time-lapse Shadow Image Analysis; TSIA）

TSIA は ①検査試料をシャーレの**寒天培地で培養しながら**、②**培地全体の面積、深度**を、③光学的に**ミクロレベルで継続的に観察**（タイムラプスモニタリング）し、④画像解析で**微小コロニーを自動検出・計数**して、⑤コロニーカウントグラフを描画出力する微生物の**検出・定量化**試験の方法論です。

ミクロレベルで狭い領域に焦点を当てて観測する通常の顕微鏡では、培地の様々な場所に存在するコロニー全部を計測することはできません。それに対して TSIA は寒天試料全体に白色光を透過させてコロニーの 3D **影像**を取得する方法により、直径 90mm のシャーレ全体の面領域、３㎜程度の厚さの培地の全深度に存在する**マイクロコロニー**それぞれを自動で同時に**検出**します。そして**培養**しながら継続的に**タイムラプスモニター**し、一定以上の大きさに成長したミクロコロニーから**リアルタイム**で逐次検出して**カウント**し、検出コロニー数の時間変化のグラフを自動生成します。数日培養してから目視で計数する従来の方法と異なり、この方法は新たに検出しなくなったことが確認された段階（寒天培地全体の中のコロニーが検出済）で全コロニー数が自動的に確定します（ヒストグラム表示もできます）。大腸菌の場合はデソキシコレイト寒天培地を使用して８時間程度で確定します。カラーイメージ半導体センサーで取得するコロニー画像から、コロニーの数だけでなくコロニー形状を反映した増殖情報も取得可能です。（**図 2**）。

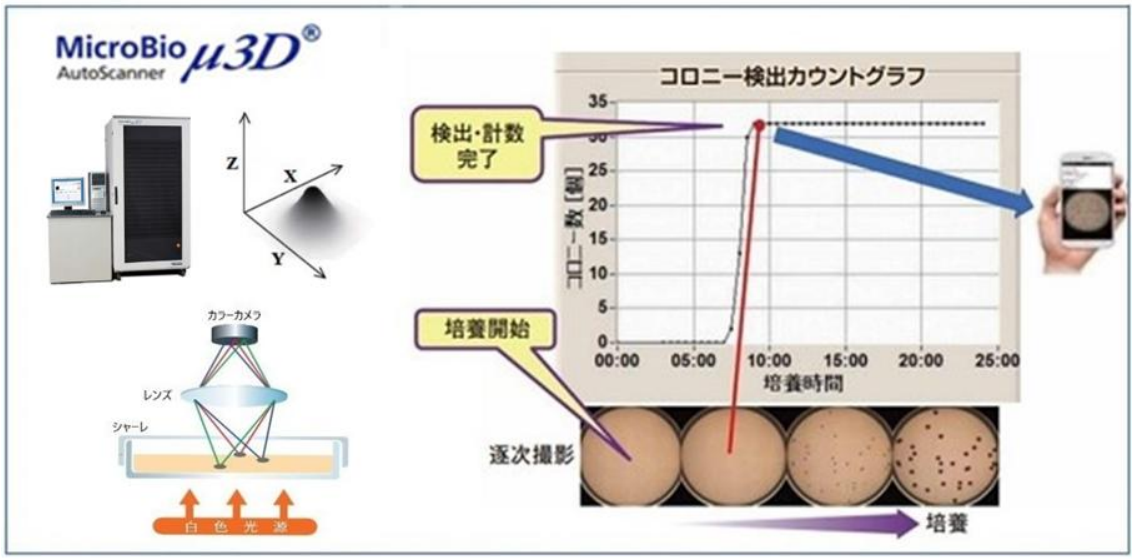


図 2 タイムラプス影像解析法に基づくシステム

TSIA は次の技術要素から構成されています。

技術要素

- **影像検出**（3D 微小コロニー像の取得）
- **三次元ピント合わせ**（寒天培地上および寒天培地中の全コロニーに焦点を合わせる）
- **画像解析**（マイクロコロニー影像の面積・高さ・体積の解析）
- **コロニー分離計数**アルゴリズム（コロニーが成長して接触した場合に分離して計数）
- **グラフ生成**（コロニー数グラフとヒストグラムの自動生成）

TSIA はこれらの技術要素の組み合わせから成る一連の流れを一定時間ごとのタイムラプス計測として繰り返します（**図 3**）。

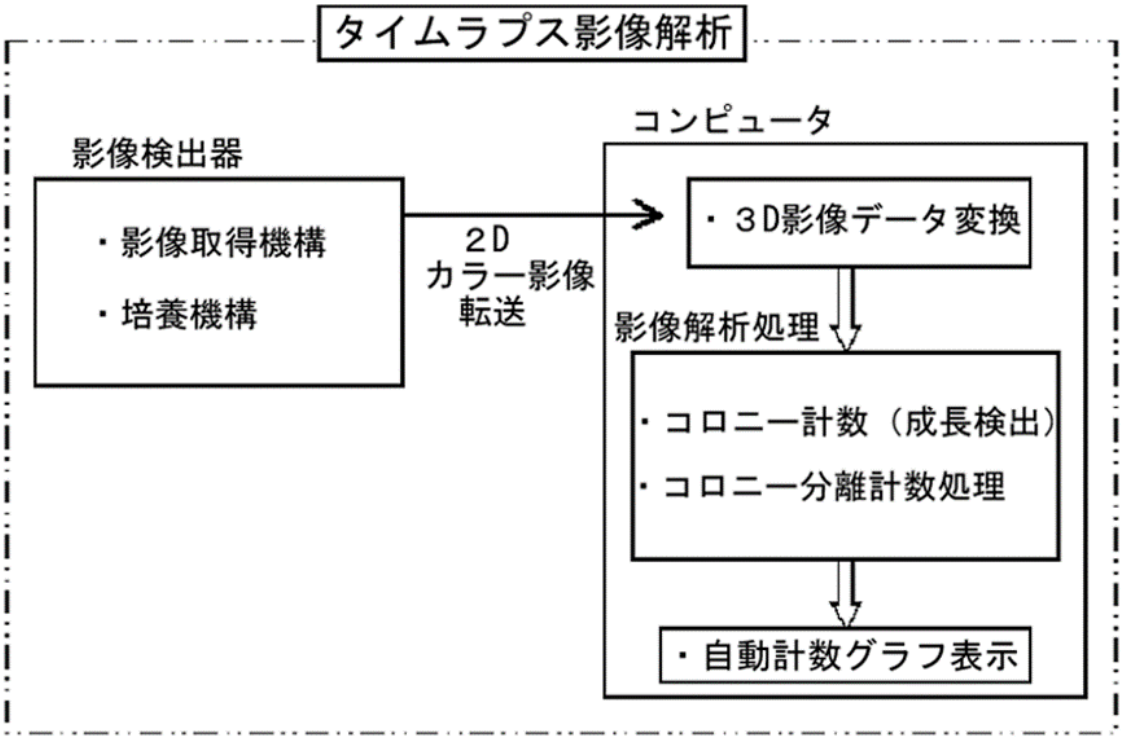


図 3 タイムラプス影像解析 の 技術要素 と 処理フロー

1.1 影像検出 [特許]

寒天培地シャーレに白色光を照射して、培地中のコロニーの影像をカラーイメージセンサーに投影し、2D カラー画像として取得します。 この画像の濃淡情報からコロニーの形状を反映した**立体情報**が得られます。コロニーが成長するとカラー画像から取得するグレースケール画像の諧調（256 階調）が変化しますが、画像解析では 1 階調の変化でも判別できるので肉眼では判別できない**増殖能**が**精確**に評価できます（**図 4**）。

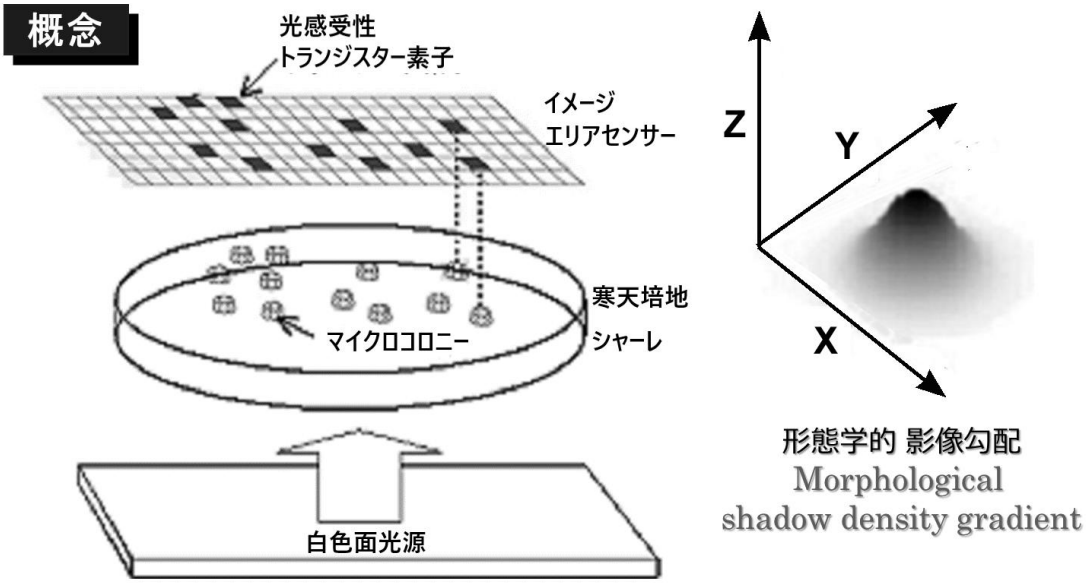


図 4 寒天培地の影像

1.2 三次元ピント（焦点）合わせ［特許］

混釈法の**平板培養法**でのミクロなコロニー検出では、培地の表面だけでなく寒天の厚さ 3mm 程度の全深度に存在する**マイクロコロニー**の観測が必要です。これを自動で行うために、光の波長（色）によって結像位置が異なる凸レンズの**色収差**の性質を利用します。様々な波長を含む**白色光**を培地に照射し、各コロニーの背後の培地に映るコロニーの影像を色収差が大きい凸レンズを用いてカラー画像として取得します。ここでは培地の各層がそれぞれ**スクリーン**の役目を果たしています。レンズの焦点は白色光に含まれる赤、青、緑の色で異なるので色々な深度に焦点が合った画像を**一度の撮影**で取得できます（**図 5**）。このカラー影像を白黒のグレースケール画像に変換したものが三次元の影像グラデーション情報を持つマイクロコロニーのデータ（**μ3D データ**）です（**図 6**）。

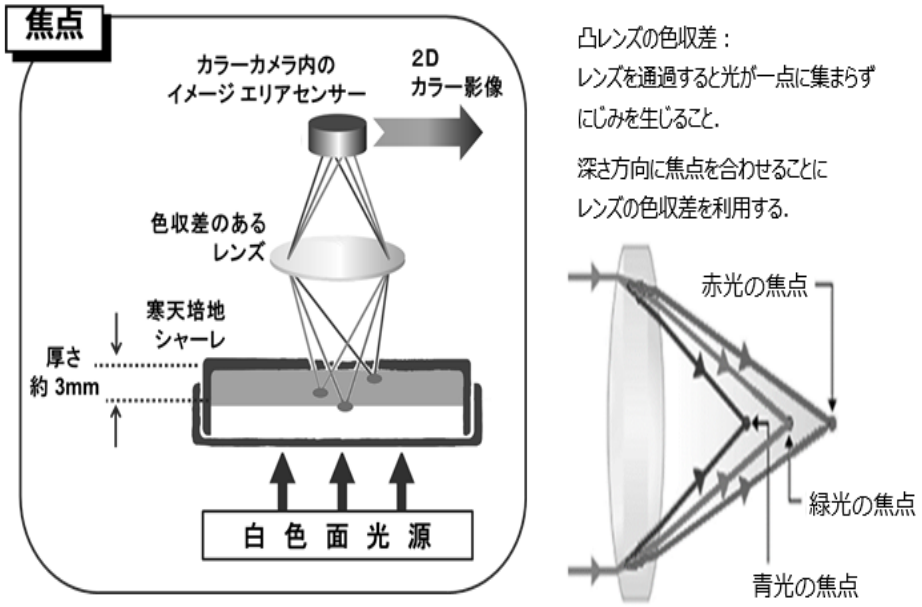


図 5 三次元ピント合わせ（全コロニーへの焦点合わせ）

図 6 2D カラー影像から 3D モノクロ影像へ

1.3 X-Y 分解能：拡大効果

TSIA では多数の微小な半導体素子で構成される**カラーエリアセンサー**に寒天培地の**画像**を**投影**します。シャーレ全体が小さなカラーエリアセンサーに投影されるので全体の大きさは物理的には縮小されます。しかし、センサーを構成する受光素子の大きさがミクロンオーダーと小さいので、分離識別可能な最小値つまり画像の**分解能**（resolution）は人間の目視よりもはるかに優れています。**図 7** は 1M イメージ エリア センサー搭載カメラの画像の 1 ピクセルが 100μm 四方に相当し、解像度が 100μm であることを示します。コンピュータでは 100μm の精度で解析でき、またディスプレイに画像を表示すれば 100μm の分解能の大きな画像を目視で確認でき、結果として画像の拡大効果があるのです。

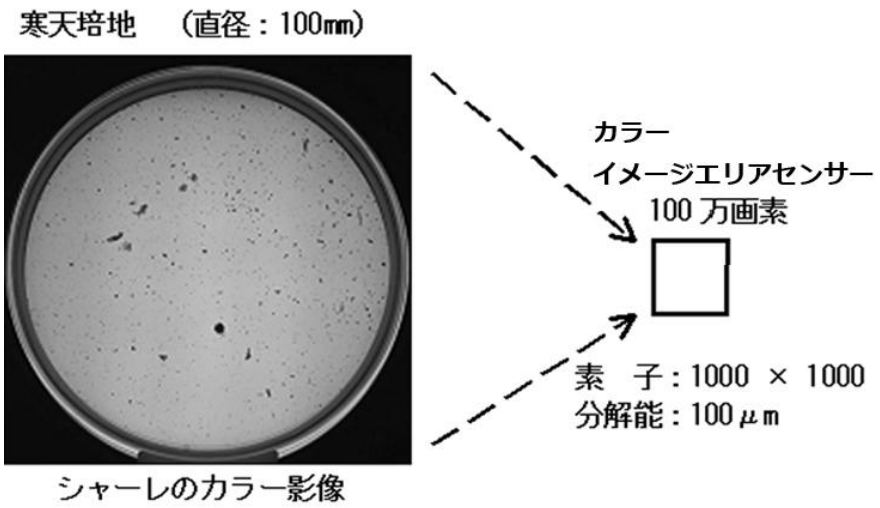


図 7　拡大効果と X-Y 分解能（resolution）

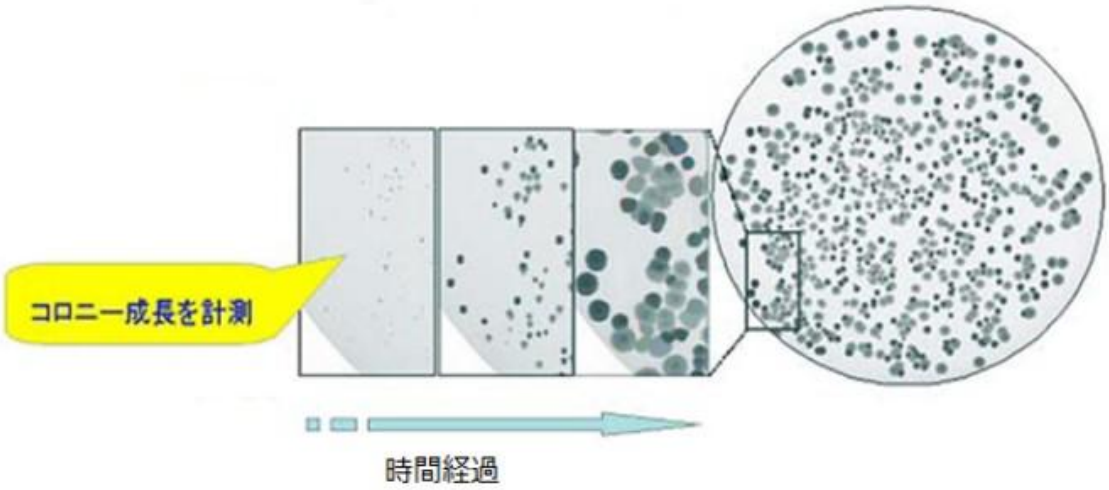


図 8 タイムラプス計測

1.4　タイムラプス計測とコロニーカウントグラフ

培養開始から継続的に培養し、定期的に影像を取得して画像解析するので、コロニーがまだ目視で確認できない微小段階から逐次検出され（**図 8**）、コロニーの**増殖過程**が**コロニーカウントグラフ**として順次**自動生成**されます（**図 9**）。これらは従来の培養法自体を変更することなく、より迅速なリアルタイム検出が自動で実現できていることを意味しています。グラフは線形（linear）と対数（logarithmic）の**表示スケール**が選択できます。また、コロニーが新たに検出される時間の範囲を明示する**コロニー ヒストグラム**（histogram）の表示も可能です（[2.5 TSIA による寒天培地評価法：適切な寒天培地評価法の提供] p.12 参照）。

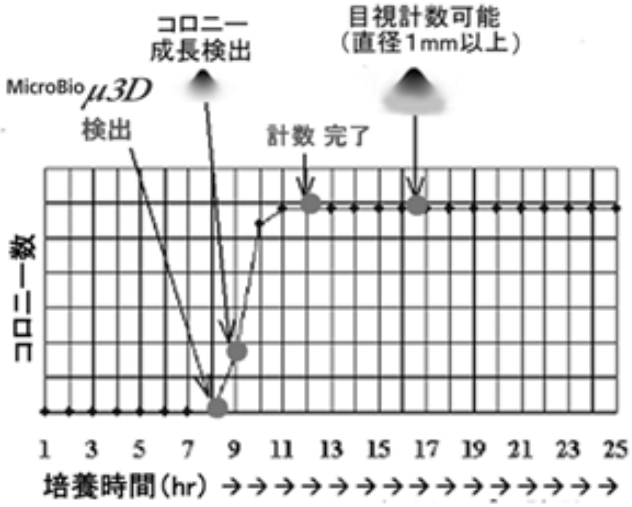
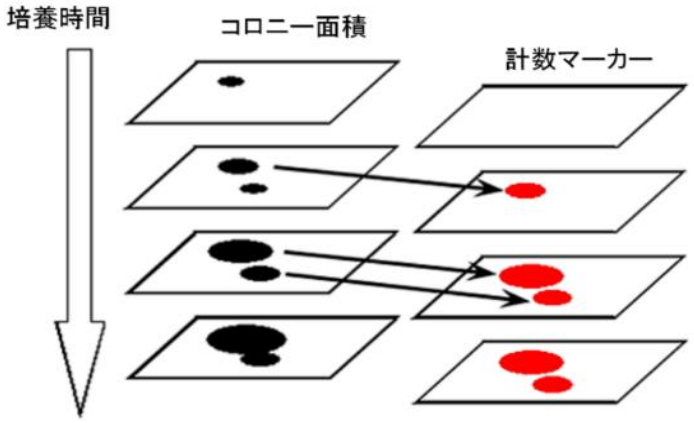


図 9 コロニーカウントグラフ

1.5 コロニー分離計数アルゴリズム

人が目視で実施する従来の培養法では、成長した 2 つ以上のコロニーが目視で確認する前に接触して結合し、大きなコロニーを形成することがあります。 このためコロニーカウント結果に用いる計数単位をコロニー数ではなく Colony Forming Unit（CFU）と呼びますが、TSIA では培養開始から継続的にミクロンレベルでモニターしているため、コロニーが結合する前の画像情報を利用した以下の **コロニー分離計数アルゴリズム**により正確なコロニー数の計数が可能です。 カウント数は培養開始前の試料中の生菌数と同等レベルであるため計数単位は CFU の代わりに「個」を使用できます。

コロニー分離計数アルゴリズム［特許］（図 10）



1. 計数マーカーはコロニーの増殖と同じように大きく更新していく。
2. コロニーが接触したら計数マーカー更新を止めて**接触前**の**マーカー**を**保持**する。
3. 計数マーカーを逐次保存していく。

図 10 コロニー分離計数アルゴリズム

2．全自動・迅速・微生物検出装置 MicroBio µ3D（µ3D 装置）AutoScanner

MicroBio µ3D AutoScanner システムは TSIA を実用化した装置です（**図 11**）。 **寒天培地培養法**で微生物を培養しながら**リアルタイム**でコロニーを自動**検出**します。 菌を検出したときには、装置はシャーレ画像を添付した**自動アラート** e-mail を**スマホ**に送信できます。 アラートメールを受信した時は、装置をインターネット経由で**遠隔操作**できます（リモートで確認できます）。

図 11 MicroBio µ3D AutoScanner 全自動迅速 微生物検出装置

2.1　ハードウェア

図 12 に MicroBio µ3D AutoScanner の**ハードウェア**を示します。 インキュベーターモジュールは 20 段の棚で構成され(**図** 13) 各棚には 5 枚の寒天シャーレが装填できるトレイがあり、転送ロボットがトレイを画像取得モジュールに移動し、各タイムラプス期間でプレート影像が取得されます。

図 12　MicroBio µ3D AutoScanner **の　ハードウェア**

図 13　**ホットプレート　インキュベータ**

2.2 操作方法

寒天培地シャーレをセットして開始ボタンを押すだけで、シャーレのセット位置を装置が自動検出し、検査を開始します。 メインパネルで殆どの操作が出来、温度設定、試験結果データの保存、試験中のシャーレ表示、各プレートの培養状況（画像とカウントグラフ）などの個別操作も**タブ**のクリックで行えます。 **検出状況**は時間を**遡っての確認**も可能です。（**図** 14）

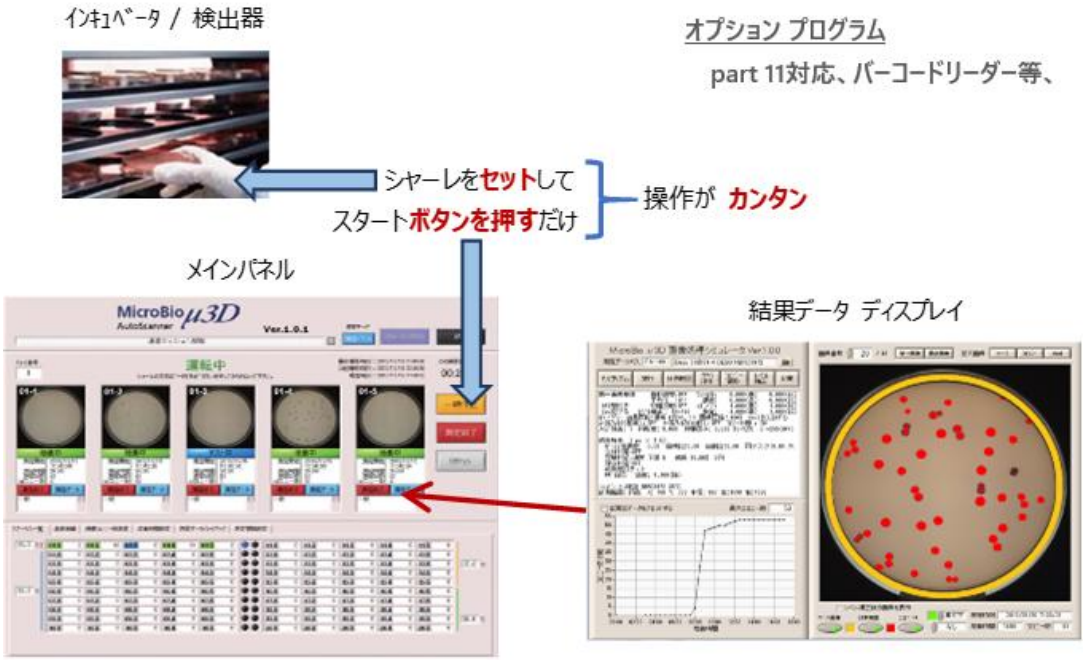


図 14　MicroBio µ3D AutoScanner **操作パネル**

2.3 温度制御

空気培養器ではなく、シャーレを直接加熱してフィードバック制御する PID **制御**なので、**温度を高い精度で設定可能**です。 4 つの温度帯ごとに常時モニターして記録しグラフ表示できます（**図 15**）。

※PID 制御とは、比例制御(P)、積分制御(I)、微分制御(D)の 3 つの動作を組み合わせたフィードバック制御の一種です。

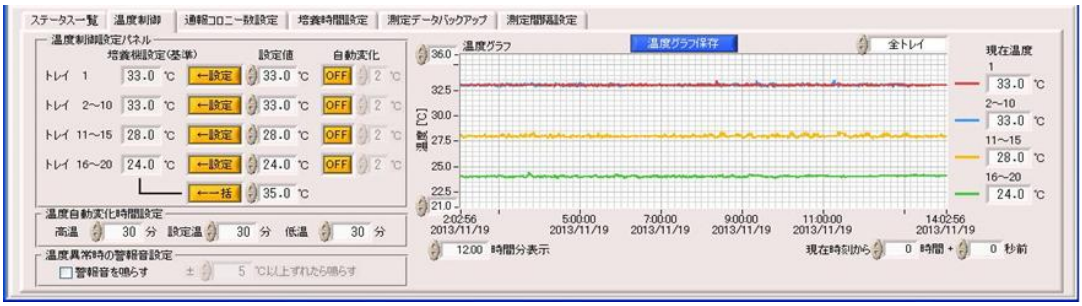


図 15　温度コントロール パネル / ロッガー

ところで、例えば 35℃の一定温度では、33℃より高い温度では生育しにくい微生物を検出できないことがあります。これは温度設定の精度が高過ぎると温度がブレないために、微生物の種類によっては検出できない場合があることを意味します。一方で空気培養器では寒天プレートの出し入れで頻繁にドアを開閉するため温度が下がるため温度設定の精度が落ちますが、皮肉にもそのような菌も検出できたという報告があります。 本システムには、必要に応じて**温度を周期的に上げ下げ**できる**温度サイクル機能**も搭載しています（**図 16**）。 また、温度が指定範囲外になった場合にスマホに自動警報 e-mail を送信できます。

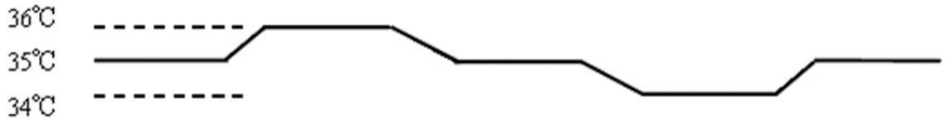


図 16　温度サイクル機能（実効温度 35℃の例）

2.4　コロニーの検出

（1）コロニー影像の濃淡情報による食物残渣等との識別

コロニーは 1 μm 以下の 1 微生物が分裂増殖して形成したものなので、コロニーの 2D 影像は、木の年輪や地層のように、時間経過の累積結果を反映した情報です。取得したカラー2D 影像をグレースケール画像に変換してコロニー影像の濃淡を 256 諧調のデータとして取得し、X-Y 平面の位置情報に濃度情報を Z 座標として加えた 3D 陰影データがコロニー情報です。この情報は対象コロニー画像のクリックで 360°の方向（上・横・下等）から見た**3D 表示**が可能です（**図 17**）。

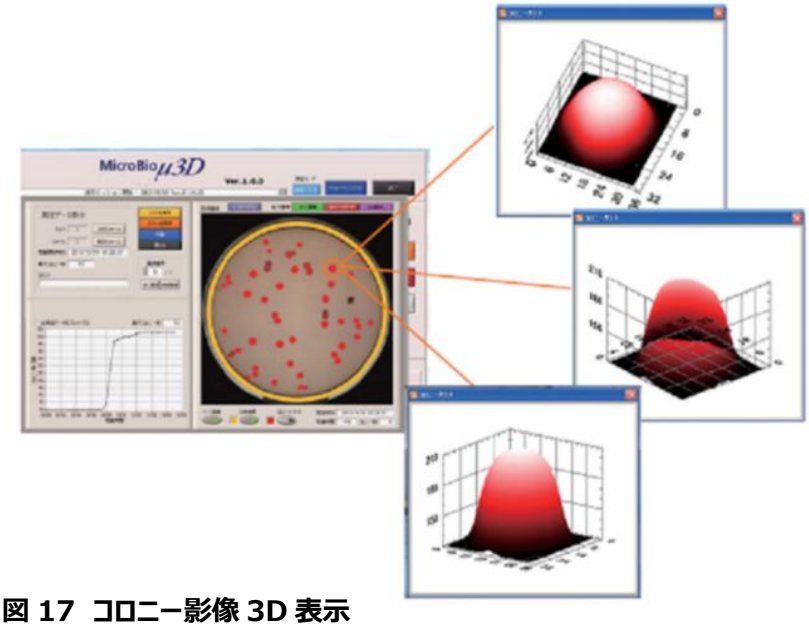


図 17　コロニー影像 3D 表示

コロニーの 3D 影像と試料に含まれた食物残渣の 3D 影像を**図 18** に示します。コロニーの 3D 影像は円錐かそれに近い形状ですが微生物の種類によって形状が異なることが細かくわかります。一方で**食品残渣**の **3D 影像**は円形（円錐状）ではなく**不規則**な**形状**をしています。

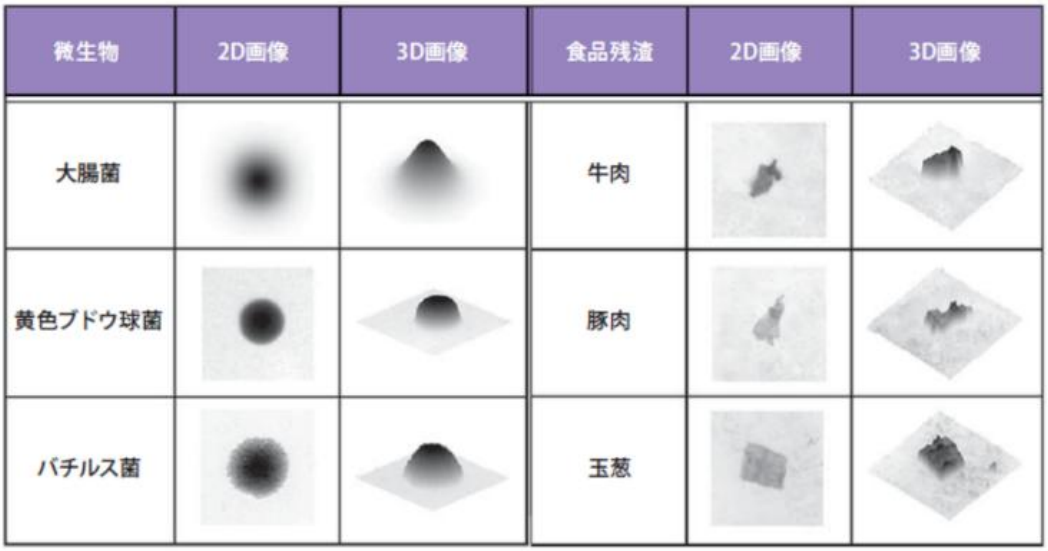


図 18　マイクロコロニーと食物残渣の３D 影像データ

また、この形状の相違とタイムラプス計測の相乗効果で、本システムでは以下のように、光が通過できる**物体**の**下**に隠れて目視では確認できない**コロニー**の**検出**も可能です。

例えばコロニーが薄い混入物（例えばハンバーグ片）の下に存在している場合でも、透過していく光によるコロニーの陰影は時間が経過してコロニーが濃くなると影像データに反映します。一方で混入物の濃淡は変化しません。**図 19** に示すように、現在の 3D 影像から培養開始時点の初期影像を差し引けばマイクロコロニー分に相当する 3D 影像が取得できます。 コロニー3D 影像はコロニーが食物残渣の上部にあっても下部にあっても取り出せますが、通常の写真画像ではこのような立体的な画像解析はできません。マーカー添付機能で**図 20** のようにコロニーをマーカー色で明確にできます。

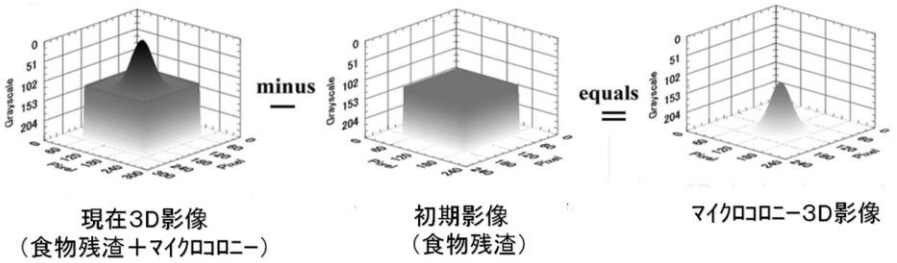


図 19　食品残渣下のマイクロコロニー検出の原理

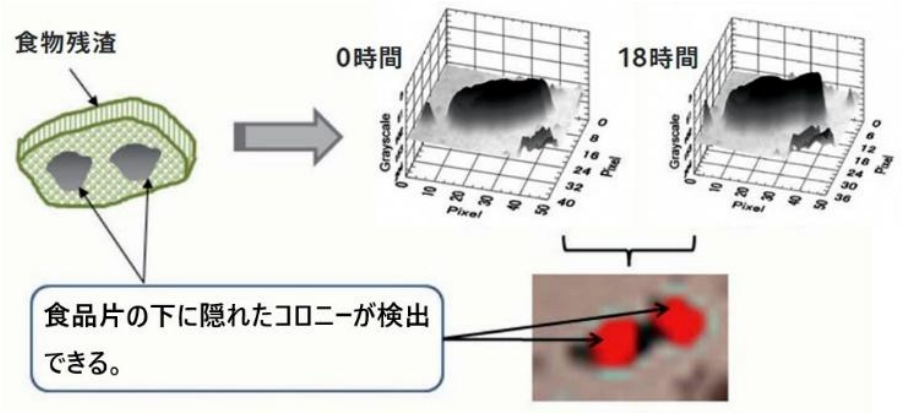


図 20　混入物から識別したコロニー影像

肉片試料をデソキシコレイト寒天培地に混釈して 35℃で 24 時間培養した結果、多量の**食物残渣**（ハンバーグ片）の中で目視確認不可能な**４個のコロニー**を**計数**しました。 この計数が正しいことは保存データを遡った画像の分析で確認しています（**図 21**）。 この例の場合は 15 時間培養時点で４個のコロニーが検出されて菌数が確定しています。

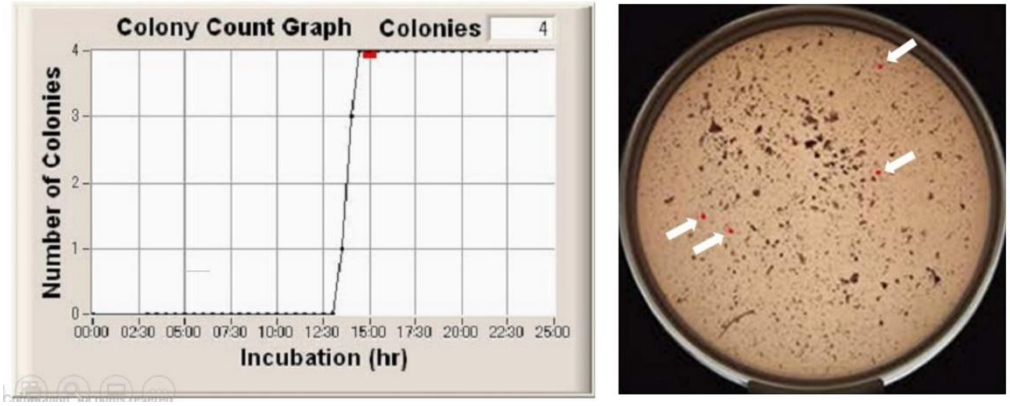


図 21　肉片中の４コロニー検出　（コロニーカウントグラフと最終画像（赤色マーカー付））

ハンバーグ試料中の *E. coli* 検出（mp4）
https://www.microbio.co.jp/JPN/img/detection_of_coliform_in_humberg_fragments.mp4

（２）コロニー分離計数機能

タイムラプス計測ではコロニーの成長過程を継続して観測しているので、コロニーが重なる以前の画像情報を利用して重なったコロニーを分離識別することができます。先ずコロニー分離計数機能を OFF にした計数例を**図 22** に示します。 培養８時間後に取得された３D データでは２個のコロニーが検出・計数されていますが 24 時間後は重なって１個になっています。この場合、検出コロニー数は時間経過で減少することになり、コロニーの重なりを識別できない従来法の目視検査のようにコロニー計数単位は CFU とする必要があります。 一方でコロニー分離計数機能を ON にすると重なる前の画像情報を利用して正確に 2 個とカウントします（**図 23**）。これはこの機能を使用したときは計数単位を「個」にしてもよいことを示唆しています。 検出対象が大腸菌などの単一種の場合はグラフが平らになって検出コロニー数が一定になった時点で全てのコロニー検出が完了します。

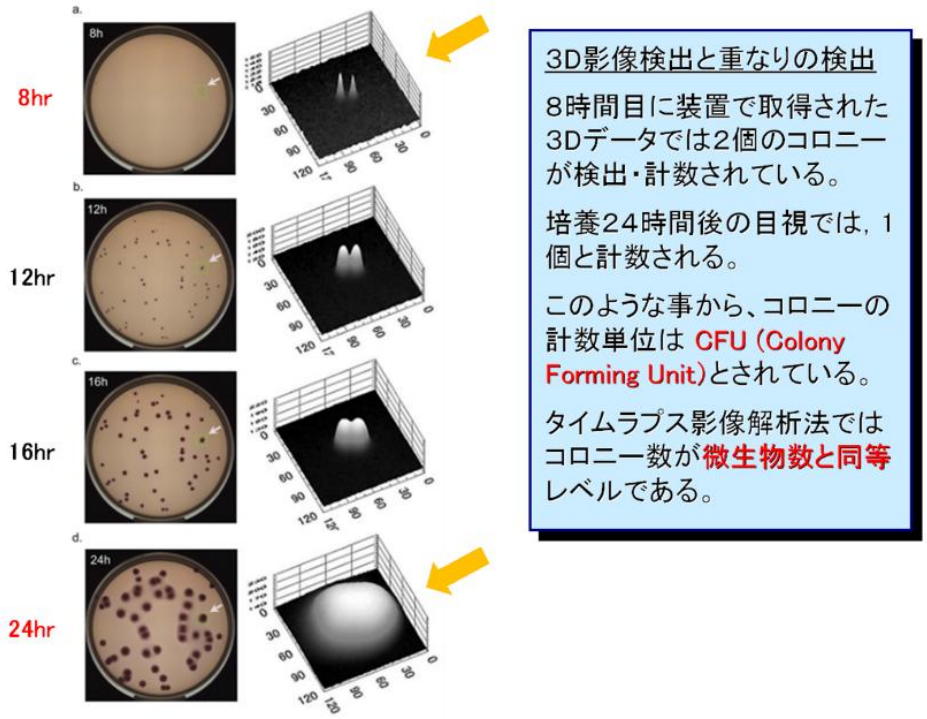


図 22　コロニー分離計数機能 OFF の計数

［デソキシコレイト寒天培地、35℃　24 時間培養、大腸菌検出・計数］

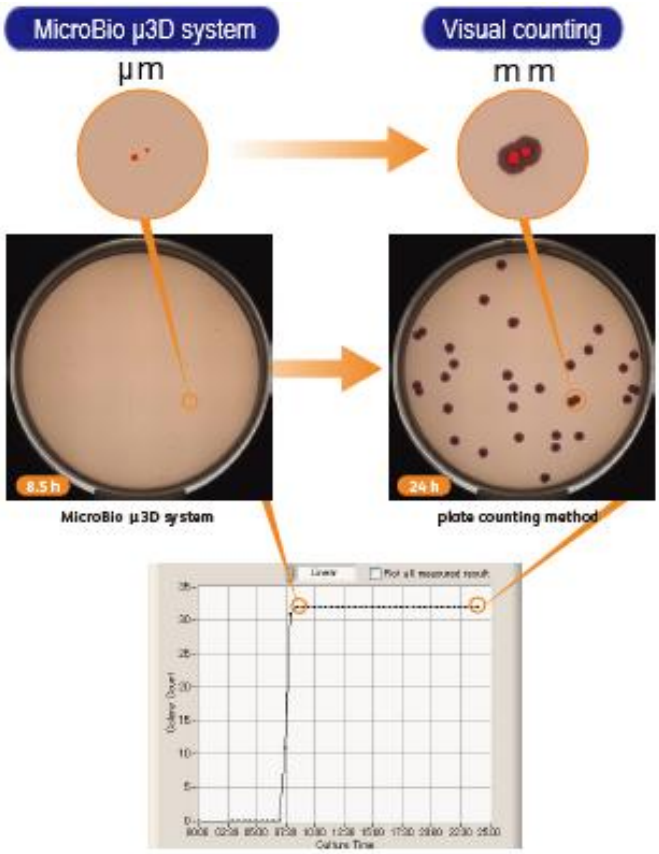


図 23　コロニー分離計数機能 ON の計数

［大腸菌の検出・計数、デソキシコレイト寒天培地、35℃で 24 時間培養］

コロニー分離計数機能を用いると μ3D 装置は**数千個までの**コロニー数を正確に計数可能です。大腸菌の試料を 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍に希釈して 1ml ずつ混釈して実験した結果を**図 24** に示します。いずれのシャーレでも培養 9～12 時間後からコロニーが検出され始め、13～15 時間後に一定値に収束してコロニー数が決定しています。装置がカウントしたコロニー数はそれぞれ 5,342（＊）、482（□）、51（△）、4（○）で希釈倍数をよく反映した結果です。保存された画像データの時間を遡ってコロニーの重なりの分離識別状況を分析した結果、何れも正確に計数できていることが確認されています。目視によるコロニー数の計数は 300 個程度が限度とされていることからも、数千個まで適用できる μ3D 装置の計数範囲は非常に広いことが分かります。

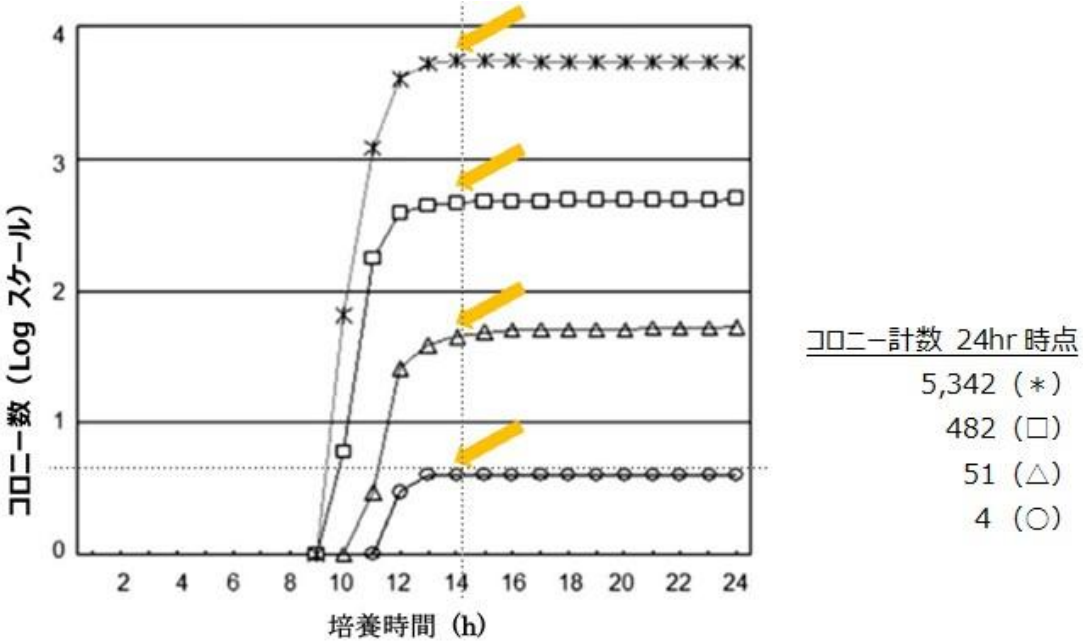


図 24　μ3D 装置は広い範囲のコロニー数が正確に計数可能

［デソキシコレイト寒天培地、35℃　24 時間培養、大腸菌検出・計数］

2.5 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、**μ3D 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。μ3D 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。

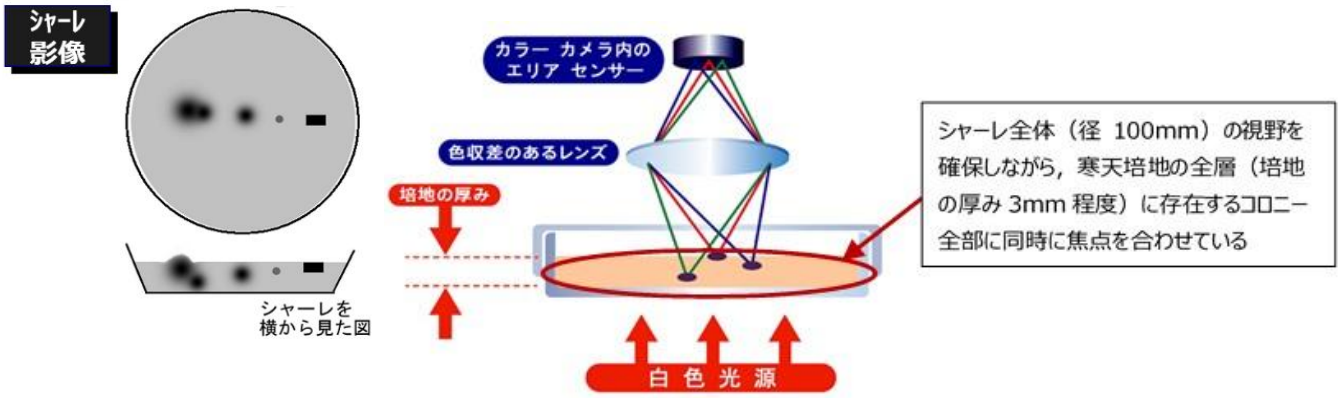


図 25　シャーレ影像 と 寒天培地シャーレの寒天全層

μ3D 装置は、シャーレ全体の視野、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 25**）。μ3D 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 μ3D 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 26 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 27**）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。μ3D 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。μ3D 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ので**添加菌数**は 30 以上で、**多い方が好ましいのです**。

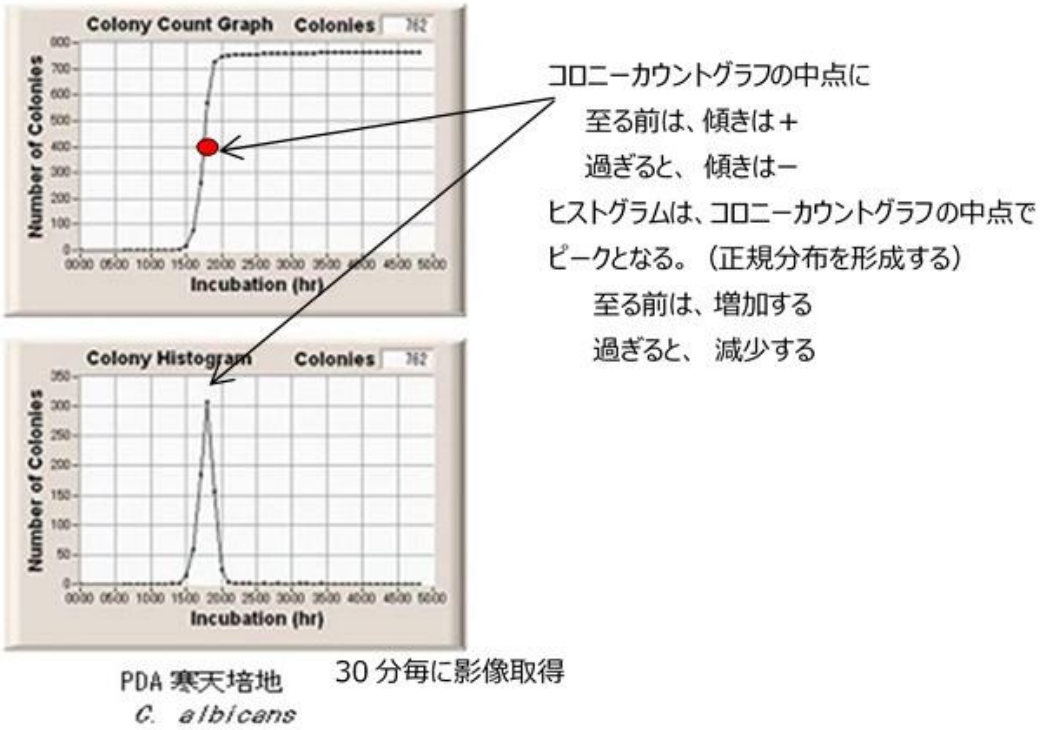


図 26 コロニーカウントグラフとその変化量のヒストグラム

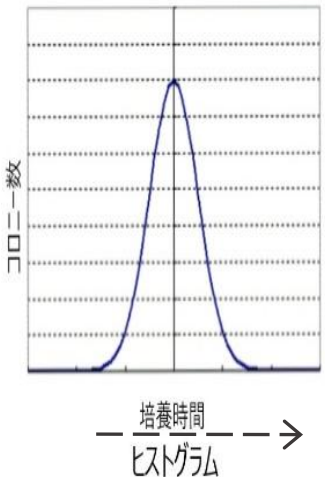


図 27 TSIA による寒天培地評価：ヒストグラム（ガウス分布）

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 μ3D 装置（TSIA 評価法）で評価し、下記（**図 28**）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。

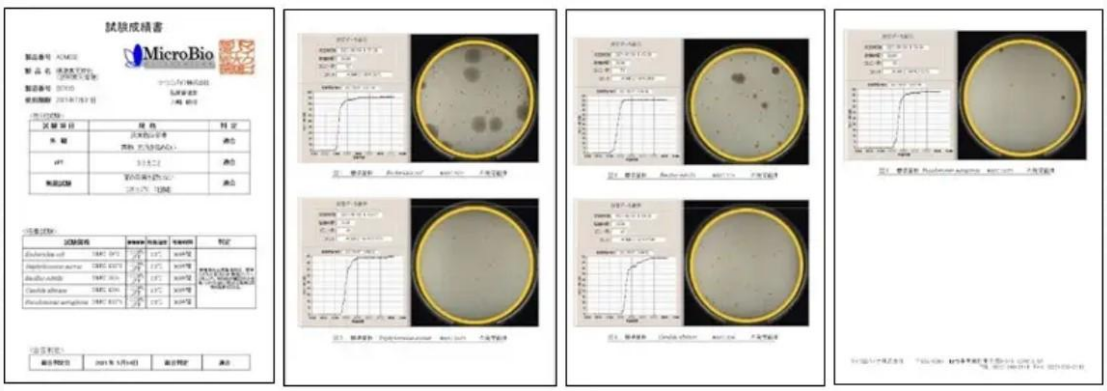
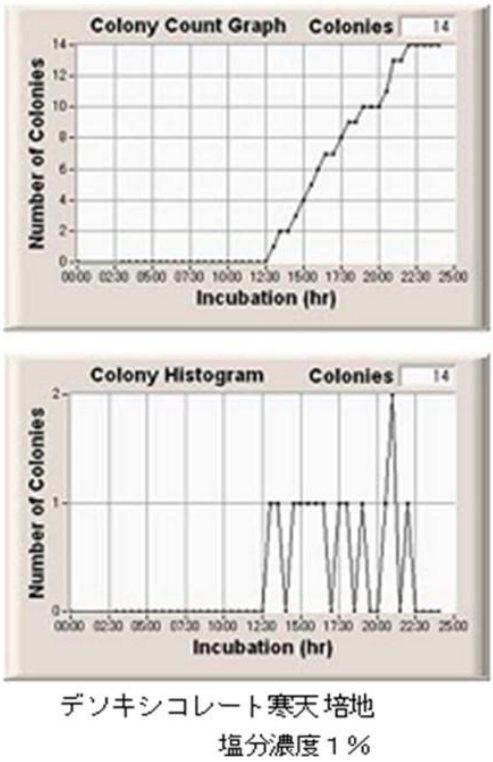


図 28 寒天培地 試験成績書の例

性能が悪い寒天培地の例を、**図 29** に示します。



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℃、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 29　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]

2.6 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。

下に、平板塗抹法とフィルター法のヒストグラムを、**図 30 に**真菌、**図 31 に**細菌の例を示します。

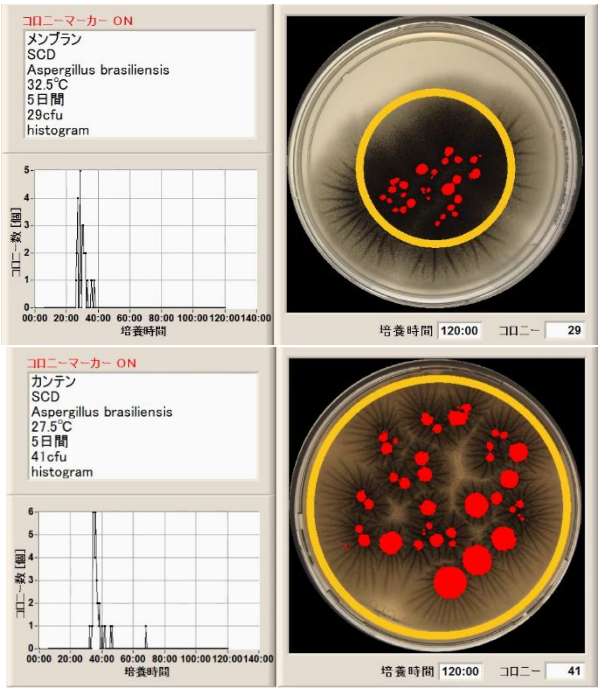


図 30　真菌の例：*Aspergillus brasiliensis*
[コロニーカウントグラフ、ヒストグラム]

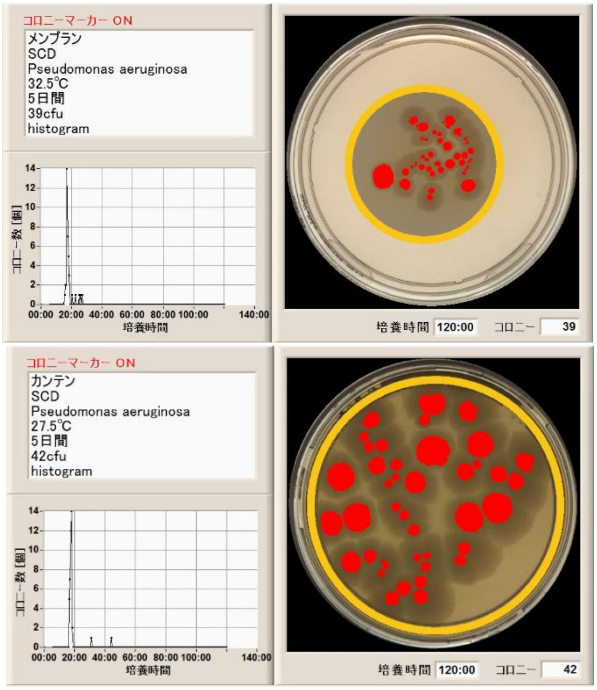
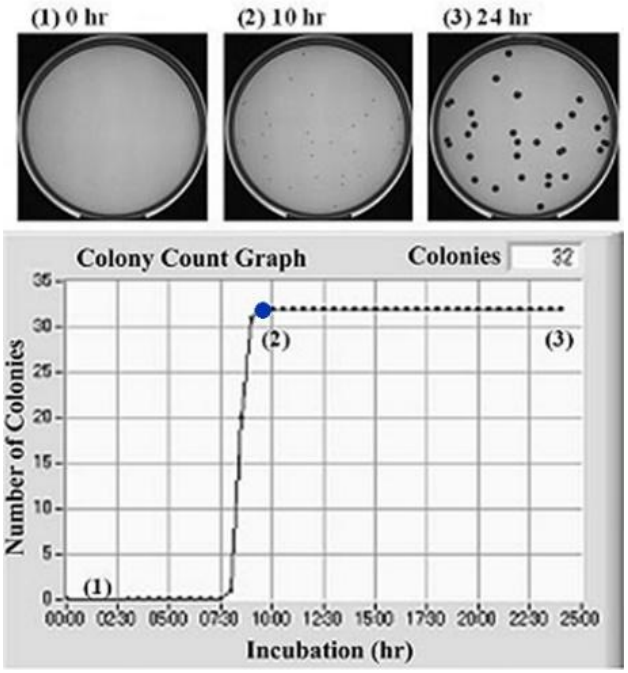


図 31　細菌の例：*Pseudomonas aeruginosas*
[コロニーカウントグラフ、ヒストグラム]

3． μ3D 装置を用いた検査の実例

3.1 大腸菌（*Escherichia coli* ）検出（図 32）



菌株：*E. coli*（NBRC3972）
培地：デソキシコレイト寒天培地
培養：35℃　24h　混釈法
検出：32 colonies

図 32　*E. coli* 検出　[コロニーカウントグラフとタイムラプス画像]

E. coli Detection (mp4)
https://www.microbio.co.jp/Eng/img/2Desoxycholate_agar_media_E_coli_detection.mp4

（1）大腸菌群 定性試験（陰性試験）の 自動計測

生きた大腸菌群が試料中に存在しないことを確認する陰性試験には、「大腸菌が 1 個」でも存在している場合は「培養すれば“この時間までに存在が確認できる”」ことを検証して明確に把握しておく必要があります。 この意味で**検出精度**は**培地**の**性能**に**依存**しています。 **無菌試験**は検査が終了したときまで**何も起きない**ことで、生菌が検出されないことを確認しています。

大腸菌群はグラム陰性の無芽胞性の桿菌（かんきん）で、乳糖を分解して酸とガスの両方を生ずる好気性または通性嫌気性の菌と言われています。大部分は腸内細菌ですが土壌、沿岸海水などに広く分布しており、エロモナス（*Aeromonas*）、シトロバクター（*Citrobacter*）、クレブシエラ（*Klebsiella*）、大腸菌（*Escherichia*）、エンテロバクター（*Enterobacter*）などが含まれます。この中でもエロモナスは増殖が遅いと言われています。大腸菌群陰性とはこれら**全てが陰性**である必要があります。

5 種類混合試料でデソキシコレイト寒天培地を用いてヒストグラムを取得した結果、プロトコルは 14 時間に設定でき、この時間まで培養試験をして何も検出しなければ、**大腸菌群陰性**としてよいことになります。

<u>総合ヒストグラム</u>による**<u>大腸菌群増殖</u>**の**<u>把握</u>**

デソキシコレイト寒天培地での大腸菌群**各種**の**増殖ヒストグラム**（**図 33**）と**総合ヒストグラム**（**図 34**）は、次のようになります。　（ [2.5　TSIA による寒天培地評価法：適切な寒天培地評価法の提供] p.12 を参照）

シトロバクター	エンテロバクター	大腸菌	クレブシエラ	エロモナス
Citrobacter freundii	*Enterobacter cloacae*	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Aeromonas hydrophila*
(NBRC12681)	(ATCC 13047)	(NBRC3972)	(ATCC 33495)	(NBRC 3820)

図 33　大腸菌群各種の増殖ヒストグラム

図 34　大腸菌群（５種類混合）試料 総合 ヒストグラム　（スペクトラム）

（デソキシコレイト寒天培地使用、培養温度 35℃）

注意）**大腸菌（*E. coli*）の検出だけ**で**プトロコル時間を設定**している場合は**大腸菌群陰性**試験が**偽陰性**になる確率が高いので注意してください。**大腸菌**は日本薬局方が指定している **NBRC3972** を使用します。デソキシコレイト培地はメーカーによって性能が異なり、ATCC2592 の回収率が 100%でも NBRC3972 は 20%しか回収できないことがあります。

注意）食品が試料の場合には、試料が培地の一部となります。例えば**コーヒー**飲料、**ココア**、などは、ポリフェノール（カテキンなどを含む）が入っていますので**検出が遅れます**。（プロトコル設定が悪いと偽陰性になります．）

※ AutoScanner は光源の色（グレイスケール、赤、青、緑、NTSC）を選択できます（**図 35**）。 また、ソフトウエアの色フィルターで任意の受光の色を選択できます（**図 36**）。 例えば、大腸菌群の陰性試験にデソキシコレイト寒天培地を使用したときは受光を赤色モードで検出します。マイクロコロニーを赤色で検出すれば確実な検出ができます。

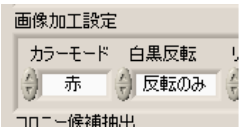
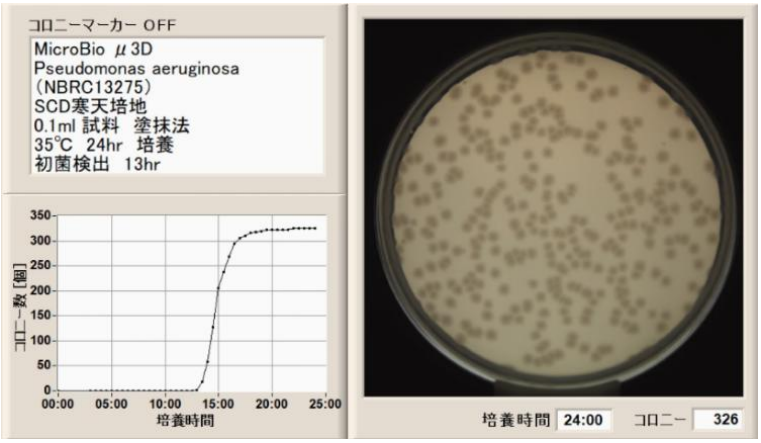


図 35　検出部の色モード選択

図 36　受光部のカラーマスク［赤範囲を指定中］

3.2 緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）検出（図 37）

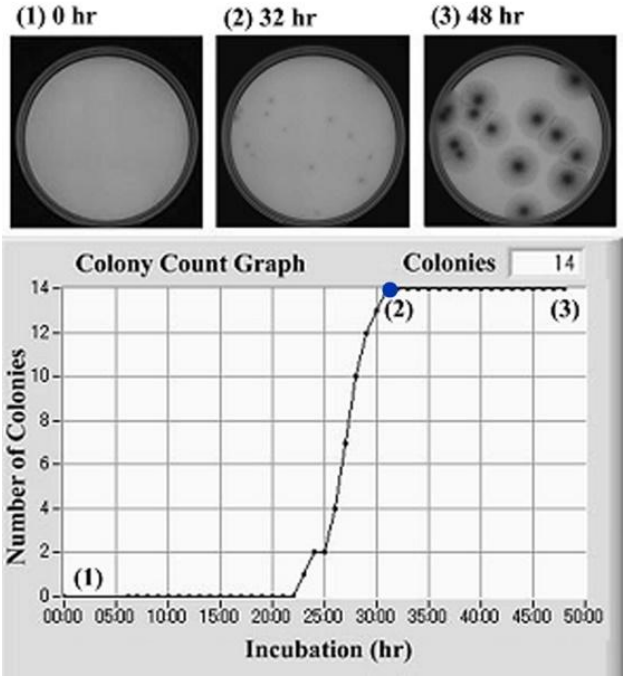


菌株：*Pseudomonas aeruginosa*
(NBRC13275)
0.1ml 試料　塗抹法
培地：SCD 寒天培地
培養：35℃　24hr
検出：326 colonies
初菌検出　13hr

図 37　***Pseudomonas aeruginosa* 検出**　［コロニーカウントグラフとタイムラプス画像］

Pseudomonas aeruginosa Detection (mp4)
https://www.microbio.co.jp/JPN/img/SCD_agar_media_Pseudomonas_detection.mp4

3.3 アスペルギルス（*Aspergillus brasiliensis*）検出（図 38）



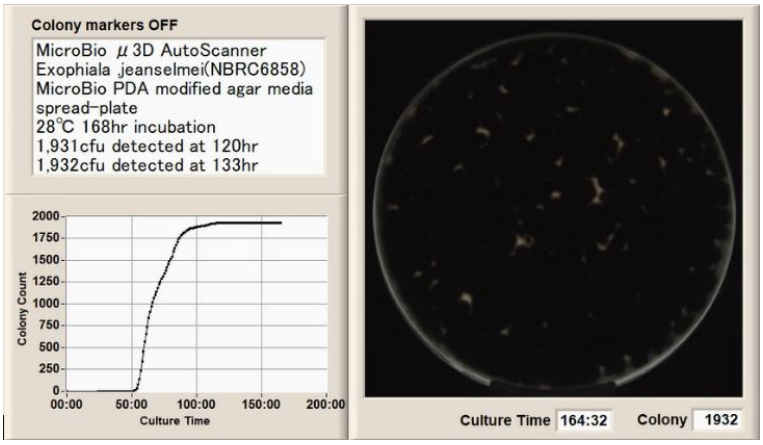
菌株：*Aspergillus brasiliensis*（NBRC 9455）
培地：ポテトデキストロース標準寒天培地　（PDA）
培養：30℃　48h　混釈法
検出：14 colonies

図 38 ***Aspergillus brasiliensis* 検出**　[コロニーカウントグラフとタイムラプス画像]

Aspergillus Detection (mp4)
https://www.microbio.co.jp/Eng/img/10_PDA_Aspergillus_detection.mp4

3.4　エクソフィアラ（*Exophiala Jeanselmei* ）検出

図 37 はエクソフィアラをマイクロバイオ社製のポテトデキストロース寒天培地（PDA）を使用して μ3D 装置で検出した例です。増殖のため菌糸が重なり合ってシャーレ全面が黒くなり、マーカー無しではコロニーが確認できませんが、正確に計数されています。



菌株：*Exophiala Jeanselmei*
（NBRC6858）
培地：マイクロバイオ社製
ポテトデキストロース寒天培地
培養：28℃　168h　塗抹法
検出：1,932 colonies
（120h　1,931 カウント）

図 37　エクソフィアラ　検出　[コロニーカウントグラフと最終画像]

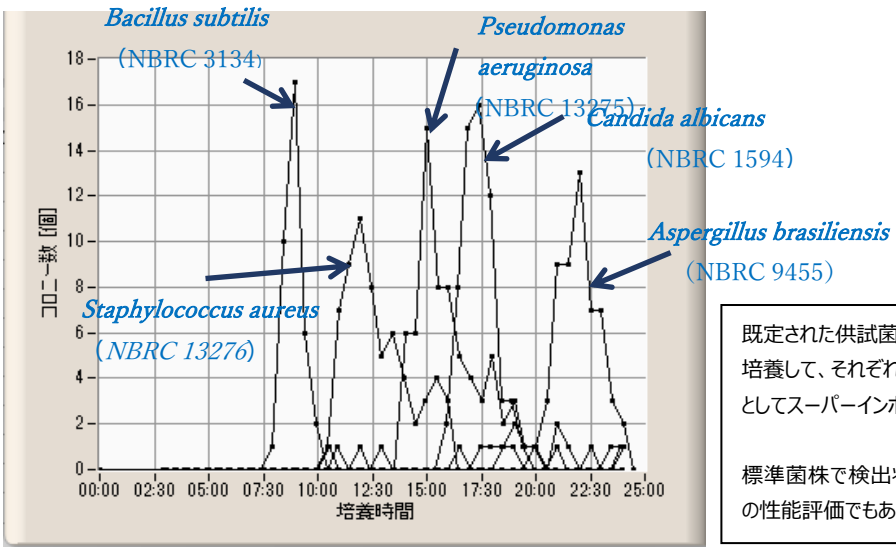
Exophiala Detection (mp4)
https://www.microbio.co.jp/Eng/img/8_MicrpBio_PDA_modified_Exophiala_detection.mp4

注意）ポテトデキストロース寒天培地（PDA）では**エクソフ ィアラ**はほとんど増殖しないので**検出**が**困難**です。サブロー デキストロース寒天培地か、マイクロバイオ社 PDA を使用すれば，確実に検出できます。

注意）**スパイラル法**用の自動**イノキュレーター**は、試料添加に**転用しない**でください。μ3D 装置による正確な検出と計数ができなくなります。

3.5 SCDLP による日本薬局方に規定された供試菌株５種の検出

日本薬局方に規定された供試菌株５種類（①*Aspergillus brasiliensis*（NBRC 9455）、②*Bacillus subtilis*（NBRC 3134）、③*Candida albicans*（NBRC 1594）、④*Pseudomonas aeruginosa*（NBRC 13275）、⑤*Staphylococcus aureus*（NBRC 13276））が SCD（Soybean Casein Digest）LP カンテン培地により検出される状況は、**図 38** のようになります。



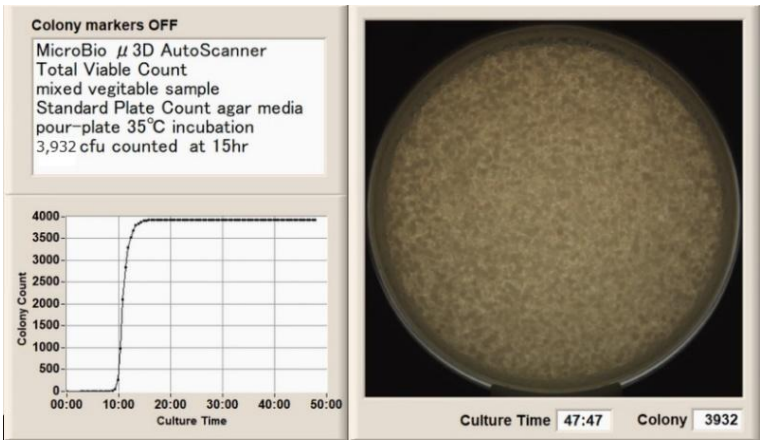
既定された供試菌５種類を SCDLP で、33℃24 時間培養して、それぞれのヒストグラムを時間軸のスペクトラムとしてスーパーインポーズ（superimpose）している.

標準菌株で検出状況をグラフ表示しているので、培地の性能評価でもある.

図 38　日本薬局方に規定された供試菌株５種類
ヒストグラム　スペクトラム（SCDLP 寒天培地、33℃　24h　培養）

3.6 一般生菌数　カウント

コロニー数の検出・計数は 48 時間培養で 3,932 ですが 24 時間で既に 3,932 ですので最終カウントに達しています。 一般生菌数が管理値よりも多い場合は培養の早い段階で判定できます（赤色マーカーON）。 この例の場合は生菌数が多いので目視カウントは不可能です（**図 39**）。



試料：購入した生カット野菜をストマックしてフィルターし、希釈して使用。
培地：標準寒天培地
培養：35°C　48h　混釈法
検出：3,932 colonies

図 39　一般生菌数計数カウント：生カット野菜の例　[コロニーカウントグラフとタイムラプス画像]

Total Viable Count (mp4)
https://www.microbio.co.jp/Eng/img/9_TVC_vegitable_sample.mp4

3.7 試料中の２菌種同時検出［*E. coli*、*Candida albicanse*］

１つの試料に２菌種が混在している場合、成長速度が異なりますのでコロニー数のグラフが階段状になります（**図 40**）。このとき、それぞれの菌がヒストグラム上にはヒストグラムを形成します。

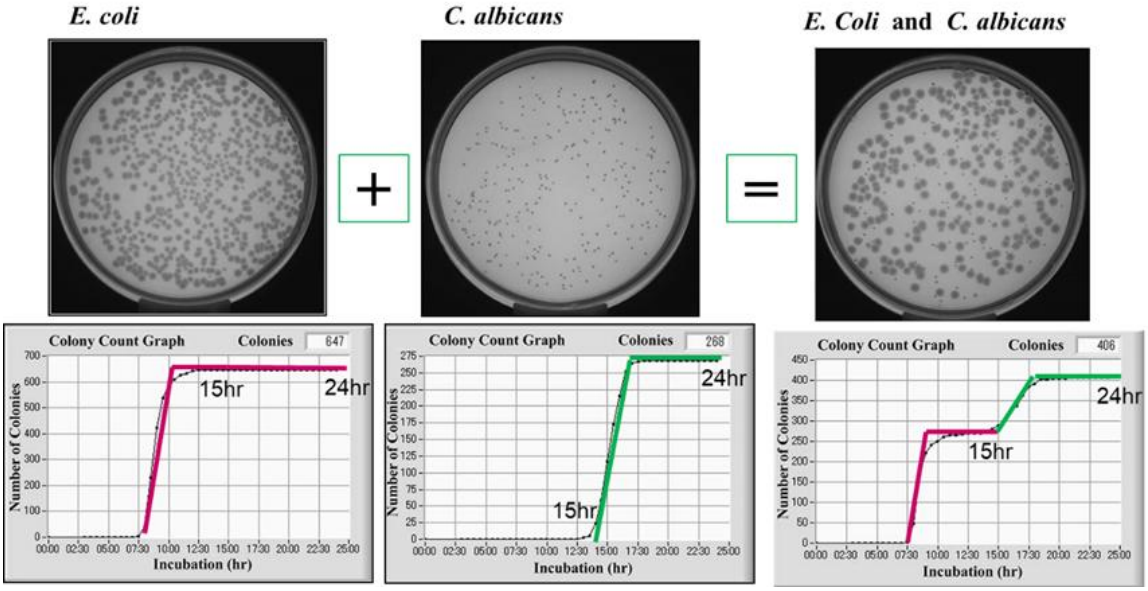
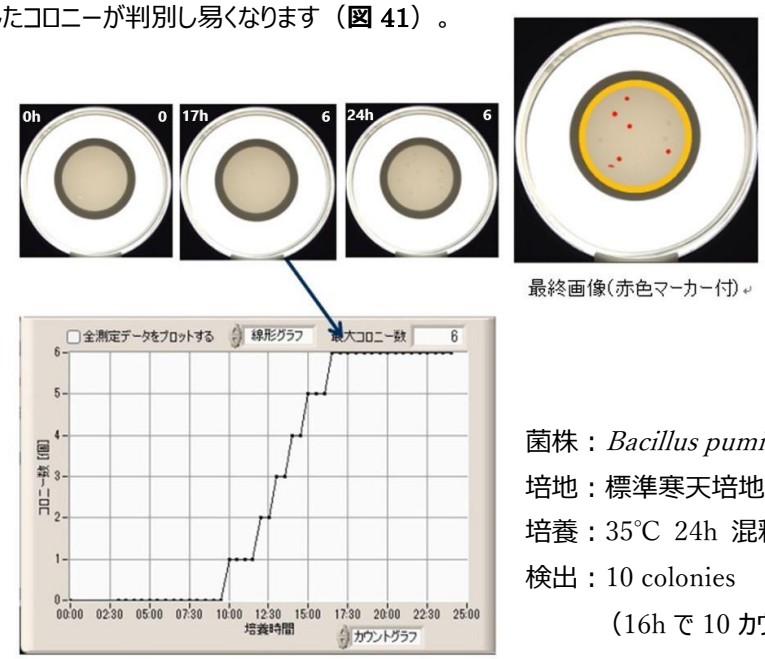


図 40　試料中に２菌種を同時に検出した場合（標準寒天培地、33℃ 24hr 培養）

3.8 フィルター法による微生物検査

フィルターで微生物を効率的に捕集して培養するフィルター法の実施では、露光時間**自動調整**を ON に設定するとフィルター部分の**明度**がグレースケールの中間明度に**自動調整**されるので、フィルター法でも正確に菌数が自動計数されます。マーカーON にすると検出したコロニーが判別し易くなります（**図 41**）。



菌株：*Bacillus pumilus*（ATCC27142）
培地：標準寒天培地
培養：35℃ 24h 混釈法
検出：10 colonies
（16h で 10 カウント）

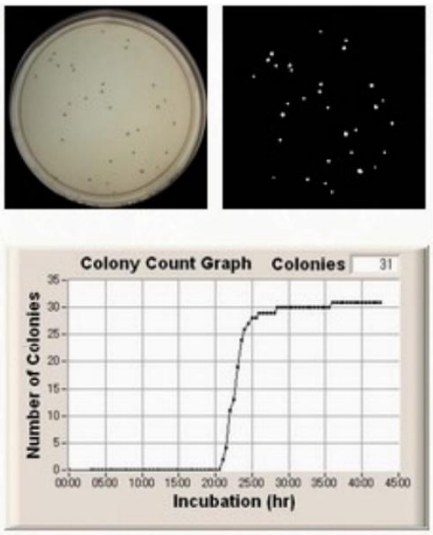
図 41 フィルター法検出 例　[コロニーカウントグラフと最終画像（赤色マーカー付]

Filter Method（mp4）
https://www.microbio.co.jp/Eng/img/15_SPC_FM_Bacillus_pumilus_detection.mp4

3.9 嫌気性細菌　クロストリジウム　検出

嫌気設定キットを使用すればシャーレごとに嫌気にでき、嫌気性菌の迅速検出・計数が全自動で実施できます。 嫌気性細菌であるクロストリジウムは高温でも殺菌が困難な食中毒菌です。 クロストリジウム生菌試料をチオグリコレート寒天培地に混釈して嫌気設定キットで嫌気にして μ3D 装置で 35℃にて培養して自動検出します。 **図 42** は 30 個の *Clostridium sporogenes* が入っている BioBall30 を生菌に戻し、チオグリコレート培地で混釈して検出を確認したものです。

注意）**SCD**（Soybean Casein Digest）培地を使用してクロストリジウム試料を**混釈**して**嫌気培養**すると、培地内の溶存酸素によって**クロストリジウム**は**死滅**してしまいます。 検出バリデーションはできないので注意してください。



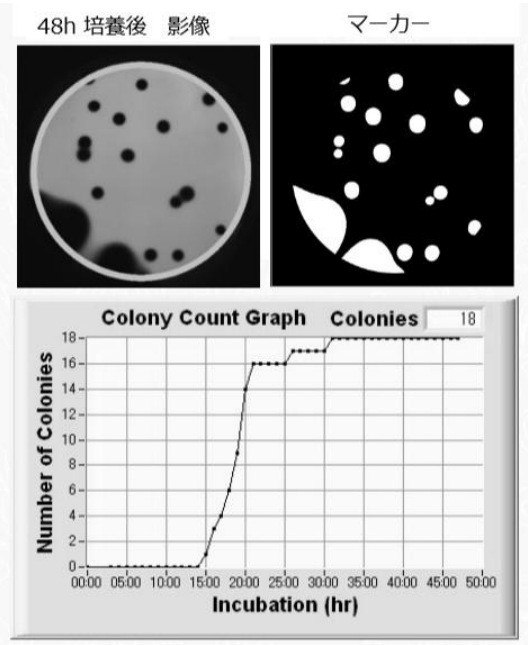
anaerobic setting kit

菌株：BioBall30
Clostridium sporogenes（NCTC 12935 ）
培地：チオグリコレート寒天培地
培養：35℃　42h　混釈法
検出：31 colonies

図 42　嫌気性菌クロストリジウム検出
[コロニーカウントグラフ、最終画像とマーカー]

・嫌気性高温性有芽胞菌（*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*）検出

Clostridium *thermohydrosulfuricum* は *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* の別ですが、**通性好熱性**かつ**偏性嫌気性**の**有芽胞細菌**で、容器包装詰製造では主に大型容器詰食品で殺菌不足や冷却不足（高温放置）を原因として変敗（本来の品質が損なわれる）を引き起こす**変敗原因菌**であることが知られています。これまで嫌気性高温性耐熱有芽胞菌の検出には約一週間を要していましたが、嫌気パウチ（径 100mm）を使用して μ3D AutoScanner 装置にセットし検査すれば **図 43** のように 48 時間以内に自動検出できます。



菌株：*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*
（*ATCC35045*）
培地：クロストリジア寒天培地
培養：60℃　48h 培養
混釈円形パウチ（寒天 15mm　＋　試料 10mL）
検出：31h 18 colonies　全数検出

図 43　嫌気性高温性有芽胞菌検出
最終影像、マーカー、混釈円形パウチ

４．TSIA の業績と恩恵

マイクロコロニー法を実現した TSIA の業績と恩恵は次のとおりです。

4.1 業績

1. 寒天培地培養法を、**そのまま自動化**できた。
2. 培養過程をミクロンレベルでタイムラプス モニターすることにより、**リアルタイム**微生物コロニー**検出・計数**ができて**迅速化**が達成できた。
3. 表面塗抹法、混釈法、フィルター法などの寒天培地試料にかかわらず、シャーレをセットして検査をスタートするだけの作業になった。 “**操作**が**カンタン**”
4. 培養動特性を示す**数値化グラフ**が利用可能になり、**微生物の性状把握**と**寒天培地の性能評価**が正確になった。
5. **従来法**（公定法）と**迅速法**が**同一装置**でできる**世界初**の装置をこの解析法で作製できた。
6. 1,000cfu 程度のコロニーを正確に計数する **比類の無い 精度**を実現した。

4.2 恩恵

・迅速化

マイクロコロニーのレベルからの検出により、リアルタイムで目視よりはるかに早くコロニーを検出することができ、**品質管理工程**の**迅速化**を実現。

・省力化、自動化

寒天培地培養法の寒天培地シャーレをセットするだけで、全自動でコロニーを検出・計数し、コロニーカウント作業を軽減させて**省力化、自動化**して、**コンピュータ処理化**を実現。

・正確性

製品残渣の影響を受けず、多様な製品でコロニー計数ができる**正確性**を実現。

・信頼性

寒天培地を使用した従来法をそのまま活用し、シャーレ画像とコロニー数データとを取得し、電子データ化して **品質管理**の**見える化**を実現。

・培地評価への応用

培養状況を数値化してグラフ表示で視覚化し、**寒天培地評価法**を提供。

おわりに

マイクロコロニー法の μ3D 装置は**寒天培地**を**装置**の**生菌検出センサー**として使用しています。 タイムラプス影像解析に基づいてコロニーをミクロンレベルから継続的に計測して**増殖能**を**確認**し、微生物の**迅速リアルタイム検出を実現**しています。 そしてその方法論のμ3D 装置は、**農学**・微生物学（帰納法）と電子**工学**・情報工学（演繹法）の複合融合（**クロスオーバー**（cross over））なのです。

μ3D 装置を使用すれば**微生物**の**性状**を**グラフ**で表示して、**迅速**に、**的確**に、**自動**で把握できます。**検出性能**は**寒天培地性能**に依存します。そして、ID が付与されている**標準菌株**を使用すれば、**寒天培地性能**を**グラフ**で表示して**適確**に**評価**できます。

これにより**特性試験**（characterization）も正確に実施できるようになっています。 培養の基本条件である温度、pH、塩分濃度や、組成となる糖分や微量添加物（additive）などのパラメータを多次元に変化させて培地特性を得ることができるようになり、温度条件も含めて特定生菌培養における寒天培地組成を**最適化**（optimization）できるようになっています。

マイクロバイオ社 総合システム
https://www.microbio.co.jp/JPN/total_system.html

μ3D 装置によって培地の最適化ができるということは、寒天培地の生菌検出の**確実性**を高めて検出を**さらに迅速化**することができるということを意味しています。 μ3D 装置の微生物検出性能と培地性能を相乗的に向上させることができるのです。

参考文献

Ogawa, H. et al. Noise-free accurate count of microbial colonies by time-lapse shadow image analysis. J. Microbiol. Methods, 91, 420-428 (2012)

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Noise-free accurate count of microbial colonies by time-lapse shadow image analysis

Hiroyuki Ogawa [a,d], Senshi Nasu [b], Motomu Takeshige [c], Hisakage Funabashi [d,1], Mikako Saito [d], Hideaki Matsuoka [d,*]

Ogawa, H. et al. Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. Scientific Reports volume 5, Article number: 10061 (2015)

Ogawa, H. et al. Accurate Enumeration of Aspergillus brasiliensis in Hair Color and Mascara by Time-Lapse Shadow Image Analysis. Biocontrol Science. Volume 20 Issue 4 (2015)

※ タイムラプス影像解析（Time-lapse Shadow Image Analysis）(TSIA）の研究開発は「**寒天培養による微生物の標準試験法を迅速数値化した技術開発**」により科学技術分野で顕著な功績があったとして、平成 27 年度科学技術分野の**文部科学大臣表彰**で科学技術賞（技術部門）を受賞し、文部科学大臣より表彰されています。