

はじめに	p.2
1. タイムラプス映像解析 (Time-lapse Shadow Image Analysis) (TSIA)	p.3
1.1 映像検出	p.4
1.2 三次元ピント (焦点) 合わせ	p.4
1.3 X-Y 分解能 : 拡大効果を得ること	p.5
1.4 タイムラプス計測	p.5
1.5 コロニー分離計数 アルゴリズム	p.6
1.6 コロニーカウントグラフ	p.6
2. 全自動迅速微生物検出装置 MicroBio μ 3D (μ 3D 装置)	p.7
2.1 基本性能	p.9
2.1.1 基本性能 : コロニー映像の 3D 表示機能	p.9
2.1.2 コロニーと食物残渣	p.9
2.1.3 コロニー分離計数機能	p.10
2.1.4 自動検出カウント	p.10
2.1.5 コロニー計数レンジ	p.11
2.1.6 映像解析とタイムラプス計測の相乗効果	p.11
2.1.7 計測レンジ (10 の 0 乗)	p.12
2.2 全自動検出アプリケーション	p.12
2.2.1 大腸菌 (<i>E. Coli</i>) 検出	p.12
2.2.1.1 大腸菌群陰性試験の自動計測	p.13
2.2.2 緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) 検出	p.15
2.2.3 アスペルギルス (<i>Aspergillus brasiliensis</i>) 検出	p.15
2.2.4 エクソフィアラ (<i>Exophiala Jeanselmei</i>) 検出	p.15
2.2.5 試料中の 2 菌種同時検出	p.16
2.2.6 一般生菌数 カウント	p.16
2.2.7 フィルター法による微生物検査	p.17
2.2.8 嫌気性細菌クロストリジウム検出	p.17
3. TSIA の業績と恩恵	p.18
3.1 業績	p.18
3.2 恩恵	p.18
4. TSIA による寒天培地評価法	p.19
4.1 回収率の把握	p.19
4.2 性能の把握	p.19
4.3 寒天培地 試験成績書	p.21
おわりに	p.22
参考文献	p.22

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**迅速法**です。

<https://www.pmda.go.jp/files/000164258.pdf>

従来の標準平板培養法と同じ培養条件で、ミクロンサイズの初期段階の **増殖能** を示すマイクロコロニーを確認してカウントします。2001 年、マイクロバイオ社の Time-lapse Shadow Image Analysis (**TSIA**)（タイムラプス影像解析）開発プロジェクトは、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によって**採択**され、**資金提供**されています。マイクロバイオ社は、開発した TSIA に基づくマイクロコロニー法で、生菌の全自動迅速検出装置 **MicroBio μ3D AutoScanner** を実用化しています。

培養法による生菌検出では、試料を寒天培地に添加して一定時間培養します。その結果、微生物は増殖して目に見えるコロニーを形成します。それをカウントしたコロニー数は、培養開始前に試料中に存在していた微生物の生菌数と同じだとしています。

平板培養法は、日本薬局方および食品衛生法で定められた公的試験法（**公定法**）であり、食品、飲料、医薬品、日用品、化粧品などの業界では、製品の品質管理の一環として寒天培地を用いた目視検査が行われています。これは、培養法が問題を引き起こす生菌を検出する上で**最も信頼できる**という事実に基づいています。

しかし、従来の培養法には次のような**問題点**がありました。

- 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**時間がかかる**。
- ② 手作業による目視検査は**手間がかかる**。

したがって、より迅速で自動化された検査方法が求められていました。

これに対応するため、培養を行わず迅速に検出する方法が提案、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ではありませんでした。その理由は、迅速法には「死んだ微生物にも反応する」、「少数の微生物には反応しない」、などの欠点があるためです。培養法に基づかない方法では、最終的に社会の要請に応える検査法にはならないのです。

産業界では公定法に従って生存微生物を、簡便、正確、かつ迅速に検出して計数する方法の開発が強く求められており、適切な検査ツールや機器の提供が社会的な急務となっていました。

TSIA は、マイクロバイオ社によって開発された**微生物検出および定量化試験方法論**（microbial detection and quantification methodology）であり、これを実施する MicroBio μ3D 装置は自動的に迅速に生菌を検出します。**寒天培地**を使い捨て“**生菌センサー**”として使用し、培養開始から一定時間ごとに培養過程をモニターしてマイクロコロニーのレベルからコロニーを検出・計数します（図 1）。これらのコロニーは最終的に肉眼で確認できます。



図 1 平板培養法の検出迅速化

1. タイムラプス画像解析 (Time-lapse Shadow Image Analysis) (TSIA)

この解析法は、検査対象の寒天培地を培養しながら培地全体を顕微鏡レベルで連続タイムラプスモニタリングし、微小コロニーを検出・計数して自動的にコロニーカウントグラフを描画する解析方法です。

微小コロニーの検出とその増殖能の確認を確実にするため、直径 90mm の寒天培地シャーレ全体の観察視野を確保しながら、複雑な操作をすることなく焦点深度の全方向に存在するコロニーを同時に検出します。

カラーイメージ半導体センサーは、X-Y 軸の面積検出だけでなく、Z 軸の濃度や高さの検出にも使用されます。寒天試料全体に白色光を透過させて画像を取得し、培養しながらタイムラプスマニターを継続し、マイクロコロニーを検出してその増殖を確認し、リアルタイムでカウントします (図 2)。

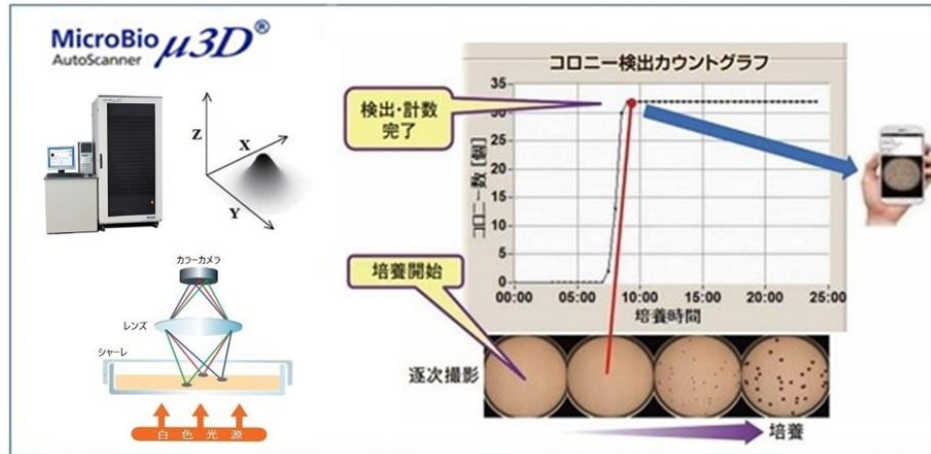


図 2 タイムラプス画像解析法に基づくシステム

TSIA は、次の技術要素から構成されています。

技術要素

- ・ 画像検出 (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 (マイクロコロニー画像の面積・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の分離計数)
- ・ 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)

試料を連続培養しながらミクロンレベルで出現するコロニーの 3D 画像を取得し、成長を確認してグラフを自動生成します。TSIA は、これらの技術要素の組み合わせからな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)。

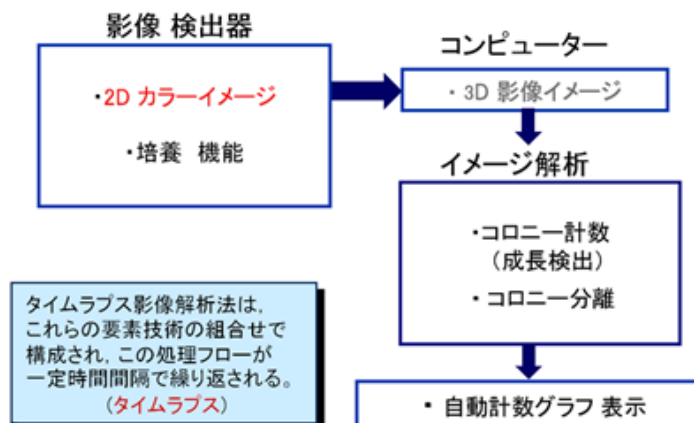


図 3 タイムラプス画像解析の技術要素と処理フロー

1.1 影像検出 [特許]

寒天培地シャーレに白色光を照射し、培地中のコロニーの影を培地からカラーイメージセンサーに投影し、2D カラー画像である画像を取得します。この画像は光の透過率を表しているため、コロニーの形態を示す影像勾配である**立体情報**が得られます。X-Y 画像はエリアセンサーの大きさによって解像度が変わるため、素子数の多いイメージセンサーほど 2D 画像としての解像度が高くなります。通常、カラー画像から変換されたグレースケール画像は、濃度を表す Z 軸上に 256 階調あります。1 階調の違いは肉眼では判別できませんが、コンピュータなら 1 階調でも判別でき、各ピクセルが暗くなることが確認できて微小コロニーの「**増殖能**」の**確認**に役立ちます (図 4)。

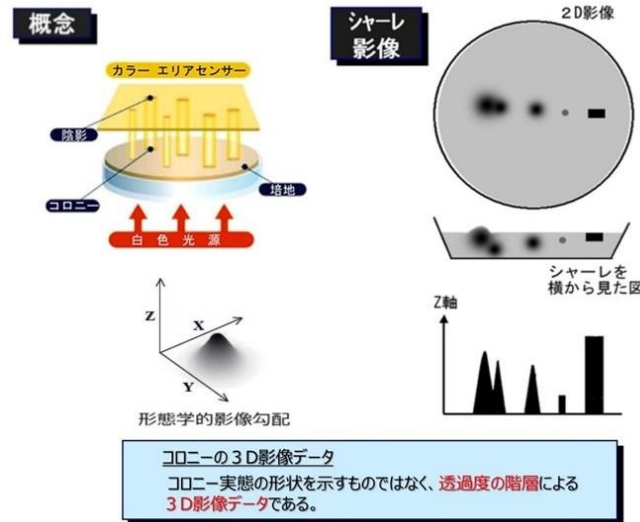


図 4 寒天培地の影像

1.2 三次元ピント (焦点) 合わせ [特許]

直径約 90mm の寒天培地シャーレ**全体**の視野を**確保**しながら、厚さ約 3mm の寒天の**深さ方向**の**全コロニー**に同時に**焦点**を合わせる操作をします。そのために色収差の大きな凸レンズを用いて意図的に波長の違いによる結像位置のズレを生じさせています。白色光が寒天培地全体を通過するように、寒天培地シャーレをカメラと光源の間に配置します。コロニーが白色光を受けると、コロニーの背後に影ができますが、各コロニーの背後の各層の寒天培地がスクリーンの役割を果たします。スクリーン層が深さ方向に距離があっても、カラーで撮影することで各色の光 (波長の異なる光) がそれぞれ同時に各コロニーに焦点を合わせることができ、各色の光による影像を取得することができ、**一回の撮影**で寒天培地内 (培地表面も) の**すべてのコロニーの影像**が**取得**できます (図 5)。

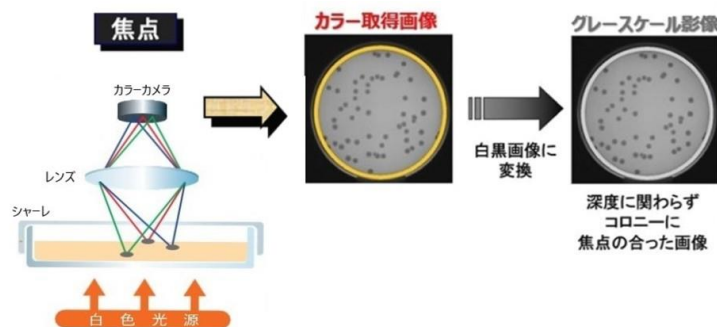


図 5 三次元ピント合わせ (全コロニーへの焦点合わせ)

凸レンズを使用する目的は、マイクロコロニーを拡大することではなく、各コロニーの背後に投影されたすべての影に焦点を合わせることで (図 6)。

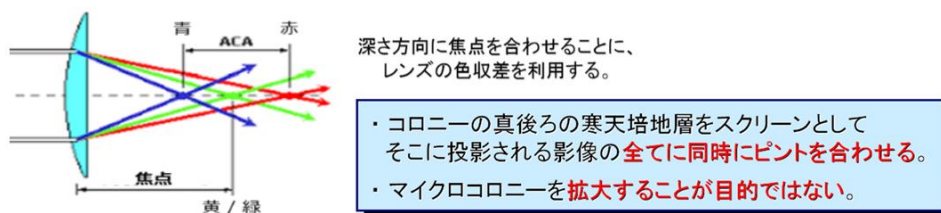


図 6 凸レンズの色収差

1.3 X-Y 分解能：拡大効果を得ること

カラーイメージセンサーはマイクロオーダーの受光素子をアレイ状に並べた半導体デバイスです。カメラに搭載されているセンサーの素子数は多いほど高い画質で撮影できると言われています。この解析法 TSIA はマイクロコロニーを拡大して撮影するのではなく、多数の微小な半導体素子で構成されるアレイ状のカラーエリアセンサーをバックスクリーンとして使用し、これにマイクロコロニーが形成される寒天培地のシャーレ全体の画像を投影しているのです。撮影した画像をカメラの微小な素子から成るスクリーンのイメージセンサーに投影することで、撮影したときにすでに**拡大効果のある画像**が得られているのです。目視確認のために拡大写真が必要な場合は、得られた画像を拡大すればよい、ということになります。

分解能 (resolution) とは測定可能な最小値のことで、測定の細かさの限界 (感度) とも表現されますが、装置が確実に検知できる最低の入力 (マイクロコロニーの大きさ) のことであり、細かければより小さなマイクロコロニーを検出できることとなります。

図 7 は拡大効果の一例です。サイズが約 100mm×100mm の寒天培地シャーレの大きな画像を小さなイメージ エリア センサーに投影するという事は、拡大像を撮るのではなく、画像をマイクロ複眼アレイのスクリーンに投影してハメ込み、拡大効果を得るという操作になります。1M イメージ エリア センサーを搭載したカメラの解像度が 100 μ m であることを示します。つまり、画像の 1 ピクセルが 100 μ m 四方に相当することになります。ディスプレイに拡大画像を表示するには、取得した画像を拡大すればよいこととなります。

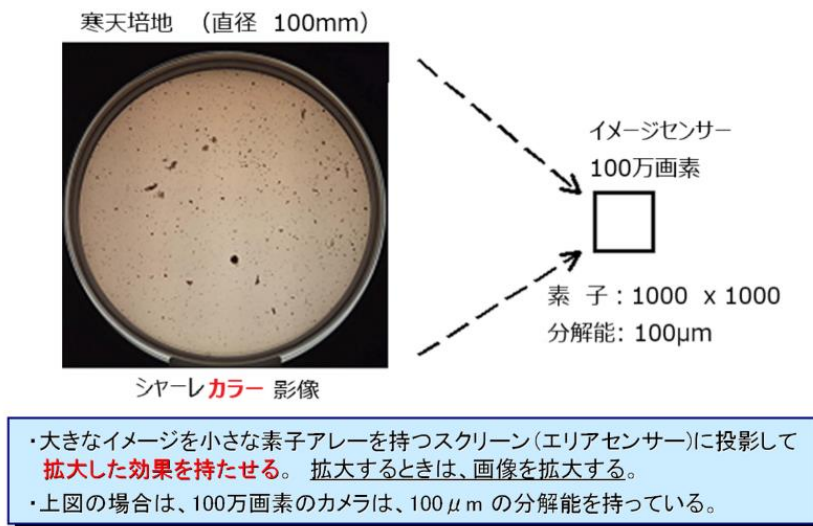


図 7 拡大効果と X-Y 分解能 (resolution)

1.4 タイムラプス計測

検査が開始されると、培養が継続され、**定期的**に**影像**が**取得**されます。画像解析を行い、生きた微生物による目視で確認できない微小なコロニーを検出し (図 8) , **増殖**していることを**確認**して**コロニー数**を**自動カウント**します。計数と同時にグラフが生成され、順次表示されます。

培養を継続的にモニターしているということは、従来の方が自動化され、培養方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実現できていることを意味しています。

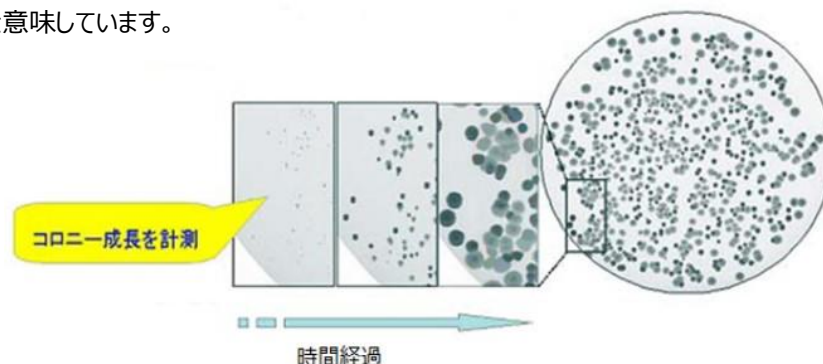


図 8 タイムラプス計測

1.5 コロニー分離計数 アルゴリズム

培養中にマイクロコロニーが検出されると目視で確認する前に2つ以上のコロニーが接触して結合してしまい、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 Colony Forming Unit (CFU) と呼んでいますが、TSIA の場合はタイムラプス測定により培養開始からミクロンレベルで培養をモニターしているため、カウント結果は極めて正確であり、計数単位はCFU の代わりに「個」を使用できます。結果のカウントは培養開始前のサンプル中の微生物数に対応しています。これを実現するために、TSIA には「コロニー分離計数アルゴリズム」があり、通常はこの機能を ON にしてコロニー計数を行っています。

コロニー分離計数アルゴリズム [特許] (図 9)

1. マーカーはコロニーの増殖と同じように大きくしていく。
2. コロニーが接触したらマーカー更新を止めて、接触前のマーカーを保持する。
3. マーカーをファイルに逐次保存していく。

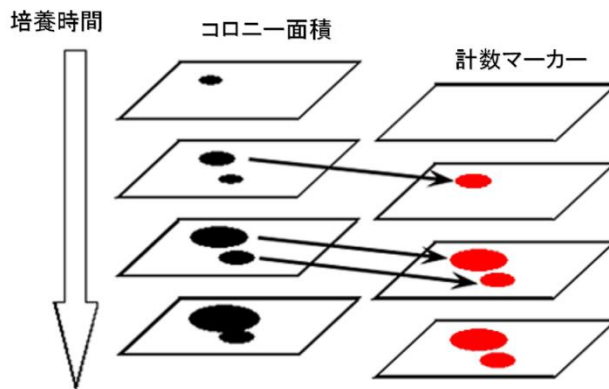
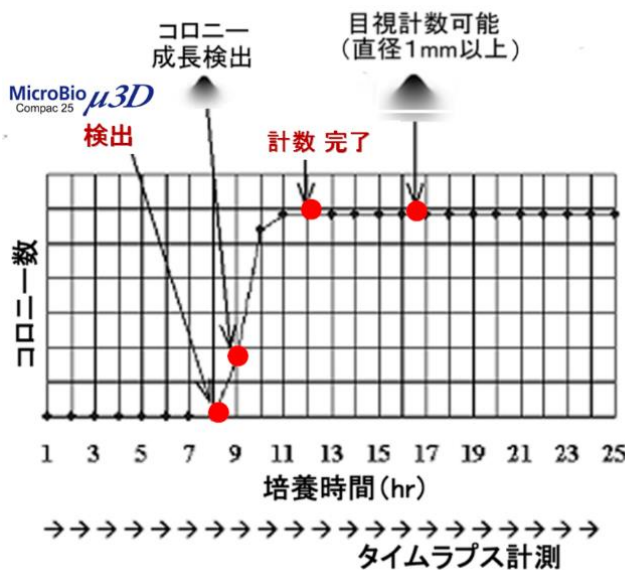


図 9 コロニー分離計数アルゴリズム

1.6 コロニーカウント グラフ

タイムラプス測定を行うとコロニーカウントグラフが自動生成・描画されます。同時に、コロニーヒストグラムも生成されます(表示可)。グラフには線形(linear)および対数(logarithmic)の表示スケールがあります。肉眼で確認できる前の微生物コロニーの増殖を検出・カウントして自動的にグラフを作成します(図 10)。



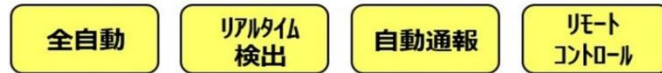
グラフ表示
 タイムラプス計測を実施すると自動的にコロニーカウントグラフが描かれる。グラフには、カウントグラフとヒストグラムがあり、検査中でも表示できる。表示スケールにはリニアと対数目盛がある。

成長検出アルゴリズム
 肉眼で目視確認できる前に、コロニーの成長を検出・カウントできる。

図 10 コロニーカウントグラフ

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

*公定法 自動化 * 大腸菌群 陰性試験 * 一般生菌数 迅速計数
*フィルター(MF)法 * カビ検出・計数 *21CRF Part11 対応



TSIA は MicroBio μ3D システムに採用されて実用化されています (図 11)。寒天培地 培養法は PC で コンピュータ化されており、培養しながらリアルタイムで検出が可能で、微生物が検出されると、プレート画像を添付した自動アラート e-mail がスマホ に送信されます (シャレ画像付)。アラート受信時は、インターネット経由で 遠隔操作 も可能です。



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

図 12 に MicroBio μ3D AutoScanner のハードウェアを示します。5 枚の寒天シャーレが装填されるトレイは 20 段の棚状になっており、トレイ転送ロボットによって画像取得モジュールに移動され、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

プログラムを起動すると操作用のメイン パネルが表示されます (図 13)。寒天培地シャーレをセットし、テスト **開始** ボタンを押すだけで検査を開始します。シャーレのセット位置は装置が自動的に検出します。温度設定、試験結果データの保存、試験中のシャーレ表示などの個別操作は、各機能の操作タブをクリックすると、それぞれのウィンドウが表示されて操作ができます。各プレートの培養状況を培養中でも確認できます。**表示開始** ボタンをクリックすると、画像とカウント グラフを表示するパネルが開きます。検出状況は、検査中の確認だけでなく、検出状況は時間を遡って確認することもできます。

インキュベーター / 検出器

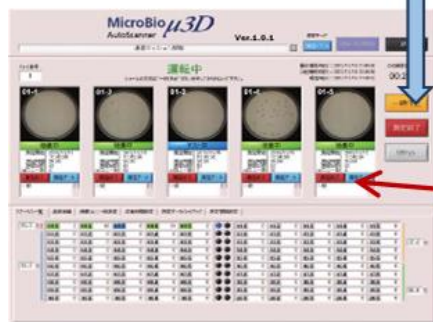


オプション プログラム

part 11対応、バーコードリーダー等、

シャーレを**セット**して
スタート**ボタン**を押すだけ } 操作が **カンタン**

メインパネル



結果データ ディスプレイ

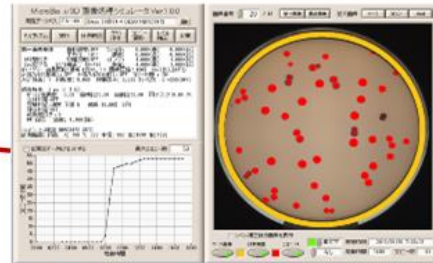


図 13 MicroBio μ3D AutoScanner ソフトウェア

インキュベーターモジュールは、ホットプレートであるシェルフで構成されています (図 14)。空気培養器とは異なり、一定温度を印加できます。ただし、**精度が高く温度が安定し過ぎるので弊害**が起きることもあり得ます。



図 14 ホットプレート インキュベーター

温度は PID 制御されていてモニターされた温度がログに記録され、グラフで表示されます (図 15)。この装置には、ソフトウェアの**温度ロガー**が搭載されており、テスト中のインキュベータ温度を **4 温度帯**ごとに常時モニターし、必要に応じてグラフを表示することができます。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 を送信することもできます。



図 15 温度コントロール パネル / ロガー

温度サイクル機能

温度を周期的に上げ下げしながら効果的な温度をかけることができる温度サイクル機能も搭載しています (図 16)。

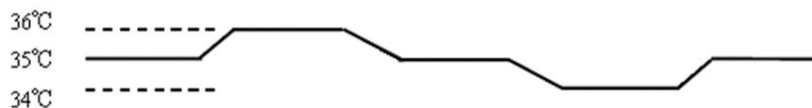


図 16 温度サイクル機能 (この例では、実効温度は 35°Cです)

空気インキュベーターとは異なり、シャーレを直接加熱し、PID 制御により一定温度に保つことができます。精度が高すぎて特定の種類の微生物を検出できないこともあります。例として、35°Cの一定温度では、33°Cまではよく生育する微生物が検出できない場合があります。空気培養器では、寒天プレートの出し入れの際にドアの開閉が頻繁にあり、温度が下がっていたので、この菌も検出できたとの報告があります。このような事態を防ぎ、必要なときは使用できるように、本システムには温度サイクル機能が搭載されています。

2.1 基本性能

検査結果は画像とグラフで示されていますが、コロニーが分かりにくいときは赤色でマーカーを ON にすることができます。

(μ 3D 装置はマーカー添付機能 (ON/OFF) を持っていて、マーカーの色は任意に選ぶことができます。)

2.1.1 基本性能：コロニー画像の 3D 表示機能

コロニーをクリックするだけで **マイクロコロニー** の **3D 表示** ができます (図 17)。この解析法で採用している画像は Z 情報を含んでいるので、コロニー判定においては 3D 形状を解析ソフトウェアでの自動判定基準として採用しています。コロニーなどの 2D 画像を選んでクリックしてコロニー画像を上から、横から、下からと、360°の目視観察もできます。

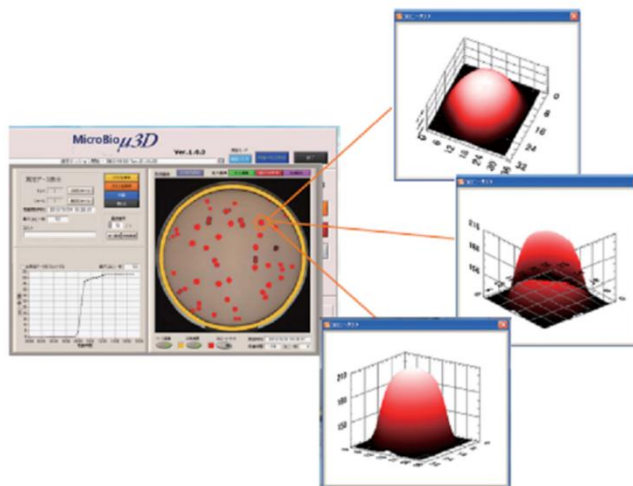


図 17 コロニー画像 3D 表示

2.1.2 コロニーと食物残渣

取得したカラー 2D 画像をグレースケール画像に変換すると、濃度勾配の諧調をもった 3D 陰影データとなります (図 18)。また、コロニーは $1\ \mu\text{m}$ 以下の 1 微生物が分裂して形成されたものなので、円形やディスク状コロニーの 2D 画像は、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記録でもあり、光の透過度を表す 3D 画像では円錐状かそれに近い形状を呈し、微生物の種類によってその形状が異なることが細かくわかります。コロニーと食物残渣の 3D 画像を比較すると、**食物残渣の 3D 画像**は微生物のものとは異なっており、円形 (円錐状) ではなく**不規則な形状**をしています。

微生物	2D画像	3D画像	食品残渣	2D画像	3D画像
大腸菌			牛肉		
黄色ブドウ球菌			豚肉		
バチルス菌			玉葱		

図 18 マイクロコロニーと食物残渣の 3D 画像データ

2.1.3 コロニー分離計数機能

3D 影像検出による“コロニー分離計数機能”を ON にした検出の状況は図 19 のとおりです。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。8 時間目に取得された 3D データでは 2 個のコロニーが検出・計数されています。24 時間も培養すると、従来法の目視検査ではこのようなコロニーの重なりを防ぎながら計数することができないため、コロニー計数単位は CFU であり、1cfu とカウントされます。この装置ではコロニー分離計数機能が ON のときには正確に 2 個とカウントします。**カウント** が **精確**です。このことからこの装置を使用したときは、計数単位は“個”にしてもよいことを示唆しています。24 時間培養後の目視検査では 1 つのコロニーになっていますが、この装置はタイムラプス計測データを保存して時間を遡って計数の検証ができますので 2 個のコロニーであったことが検証できます。

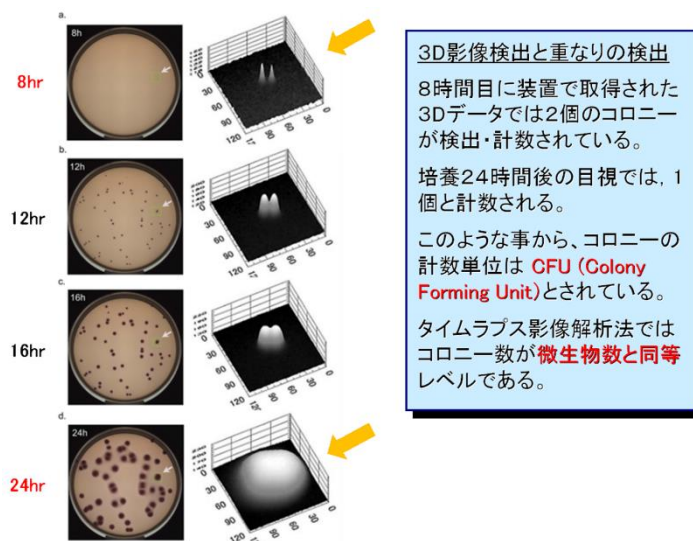


図 19 コロニー分離計数 例

[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]

2.1.4 自動検出カウント

この装置は培養中にマイクロコロニーを検出し、その成長を確認します。検出対象が大腸菌などの単一種の場合、肉眼でコロニーを目視する前にコロニーの総数を正確に検出・計数し、コロニーの検出とカウントを完了（グラフがプラトーになる）します（図 20）。

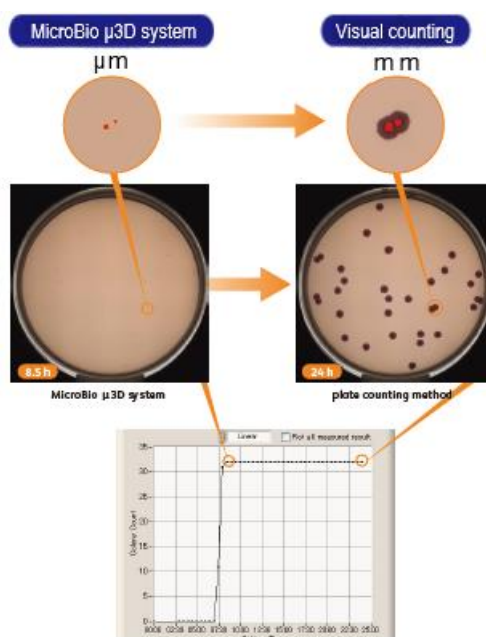


図 20 自動検出カウント

[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]

2.1.5 コロニー計数レンジ

μ3D 装置は**広い計数レンジ**を持っています。1コロニーを検出する感度を保持しながら数千コロニーまで計測できる検出能力の直線性を確認のための試験をしてみたところ、図 21 の結果を得ています。大腸菌の密度はそれぞれ 5, 50, 500, および 5,000 個/ml に調整して 1ml ずつ混釈しています。装置がカウントしたコロニー数は、それぞれ 4 (○), 51 (△), 482 (□), 5,342 (*) です。いずれのシャーレでも 10~12 時間あたりにコロニーが検出され、13~15 時間あたりでコロニー数が安定してグラフのプラトーに達しています。

1~数千までを対数個数レンジで表示すると 10 倍ずつになるので、正確に計数していると言えます。数千のレンジは、正確なコロニー数は目視検証できませんが、保存されたデータを遡り、計数ソフトウェアにより検証することができます。

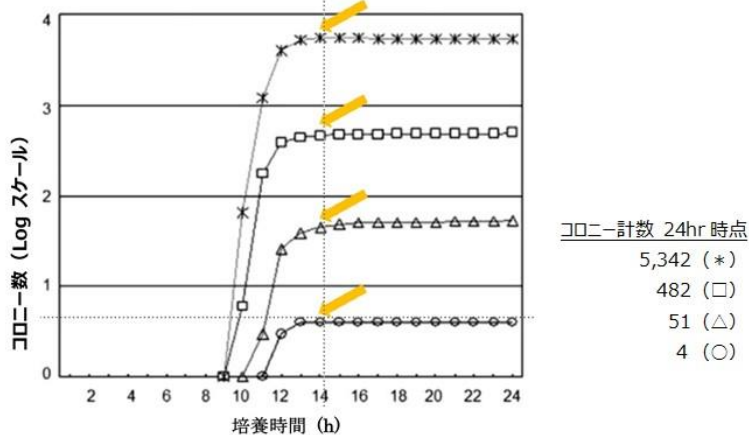


図 21 コロニー計数レンジ [デソキシコレイト寒天培地, 35°C 24 時間培養, 大腸菌検出・計数]

2.1.6 画像解析とタイムラプス計測の相乗効果

コロニーの写真とコロニー影像との相違は、光が通過できる**物体の下に増殖するコロニーの検出**について顕著に現れます。微生物コロニーが薄い物体（例えばハンバーグ片）の下に存在しているような場合でも、透過していく光による陰影はコロニーが濃くなるとこれを影像データに反映させるので容易に検出が可能となります（図 22）。通常の写真はこのような 3 次元情報が持っていないので立体的な画像解析はできません。言い換えれば、肉片の下のコロニーは目視では確認できないということになります。この解析法によれば、このようなコロニーも検出でき、コロニーマーカー（赤色）を ON にするとコロニーの所在が明確になります。

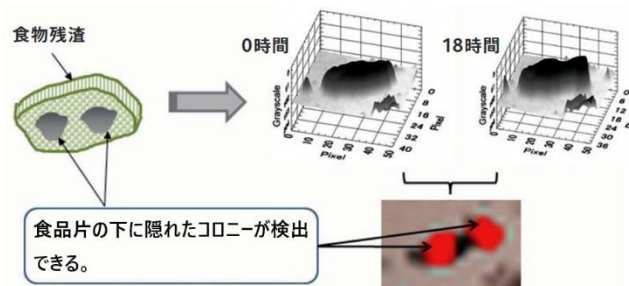


図 22 画像検出とタイムラプス計測の相乗効果

3D 影像とタイムラプス計測の相乗効果によってこのような検出ができています。図 23 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 3D 影像は取り出せません。

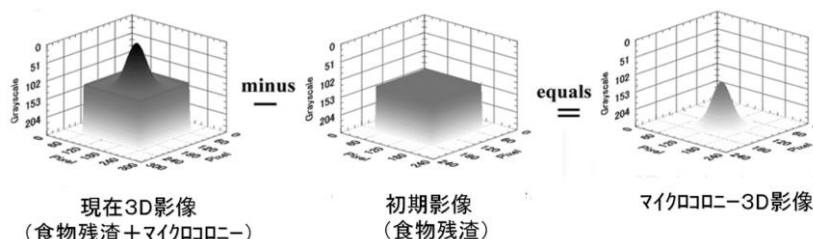


図 23 食品残渣下のマイクロコロニー検出の原理

2.1.7 計測レンジ（10 の 0 乗）

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 時間培養したところ、多量な**食物残渣**（ハンバーグ片）のある中で目視確認不可能なほどの**4 個のコロニー**を正確に**計数**しています（図 24）。（保存データを遡って目視で検証しています）この例の場合は、24 時間の培養工程で、15 時間培養時点で 4 個のコロニーが検出されて菌数もこれで確定しています。

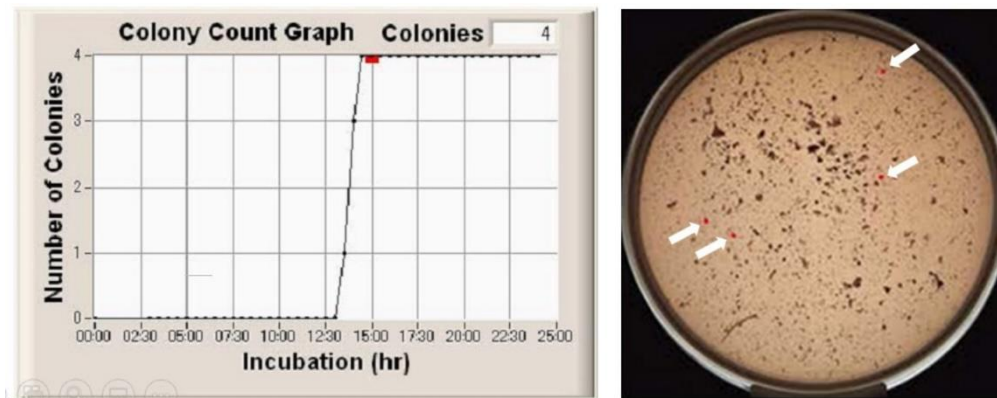


図 24 肉片中の 4 コロニー検出（コロニーカウントグラフと最終画像（赤色マーカー付））

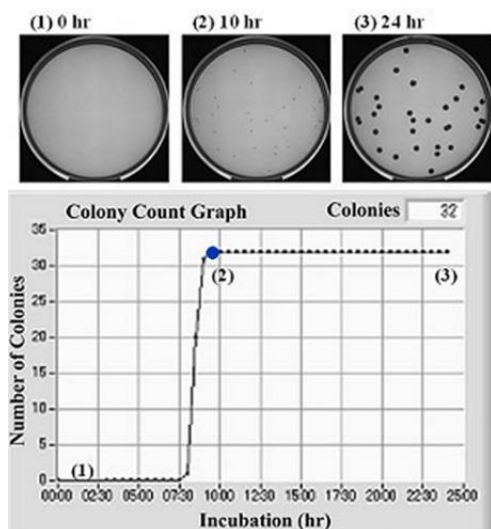
ハンバーグ試料中の *E. coli* 検出 (mp4)

https://www.microbio.co.jp/JPN/img/detection_of_coliform_in_humberg_fragments.mp

2.2 全自動検出アプリケーション

この検査装置を使用したアプリケーションの異なる検出実施例を以下に示します。

2.2.1 大腸菌 (*Escherichia coli*) 検出 (図 25)



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 25 *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.mp

大腸菌群 陰性試験

生きた大腸菌群が試料中に存在しないことを確認するには、「大腸菌が 1 個」でも存在していたら、培養すれば“この時間までに存在が確認できる”ということを検証しておき、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**では検査が終了したときまで**何も起きない**（生菌がない）ことで、菌が存在していないことを確認しています。

注意) 食品製造業界では食品衛生法で大腸菌群陰性試験が義務付けられている食品がありますが、**培地の性能**を含め、培養条件をあらかじめ検証しておくことをお勧めします。(大腸菌群の検出は、培地性能と直接関係しています)

2.2.1.1 大腸菌群 陰性試験 の 自動計測

微生物検査は、検査対象菌が陰性であることを確認するために実施されていることが多いです。陰性を確認するということは、“**微生物がないこと**”を確認することで、培養法を自動化するには、①**培地の培養性能の把握** ②**検査プロトコル設定**、が必要となります。マイクロコロニー法を採用した **AutoScanner** が製品化されたことにより、①を確認して、②を設定したうえで、**大腸菌群 陰性試験 の 全自動計測 が 確実に 実施**できるようになっています。

グラフ形状による寒天培地の評価

培地性能は、回収率だけで評価するのではなく、培地が対象微生物の増殖をいかに良くサポートしているか、を確認して評価します。AutoScanner の作成する **性能グラフ (コロニーカウントグラフ、コロニーヒストグラム)** を見て確認します。

([4. TSIA による寒天培地評価法] p.19~21 を参照) (MicroBio web [寒天培地 評価法](#) 参照)

デソキシコレイト寒天培地を、標準菌株 **NBRC 3972** (日本薬局方に記載) を用いて、次のステップで**性能**を評価します。

ステップ1 試料の菌濃度は 1,000cfu/ml 程度にします。

(300 や 500 でもよいのですが、**標準分布を得るためには**、多い方が好ましいのです)

ステップ2 この試料 1 ml を**デソキシコレイト寒天培地**に混釈します。

それと同時に、同じ試料 1ml を**標準寒天培地**に混釈します。

ステップ3 AutoScanner で同時に**培養**し、デソキシコレイト寒天培地の**性能グラフ**と**回収率**を得ます。

AutoScanner は、**寒天培地** を使い捨て“**生菌センサー**”として使用していますので、**培地の選定は重要**です。

※大腸菌群陰性試験をして製品(食品)を出荷しても汚染回収事故があった多くのケースでは、使用したデソキシコレイト寒天培地が、ATCC259221 の増殖が良好でも、NBRC2972 の回収率が 20%程度のものでしたのです。

デソキシコレイト寒天培地による定性試験 (大腸菌群 陰性試験) の プロトコル設定

大腸菌群は、グラム陰性の無芽胞性の桿菌で、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されています。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、例えば *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*などが含まれます。この中でも、エロモナス (*Aeromonas*) の**増殖が遅い**とされています。解析の設定は、**定量試験のコロニー検出設定** (☑繋がり防止 ON) を使用します。

全ての大腸菌群の陰性試験を保証するには、一番**増殖の遅い**とされている**大腸菌群**の菌を使用して、検査に採用する**デソキシコレイト寒天培地**で培養して、**プロトコル時間**を設定します)

エロモナス標準菌株の菌濃度 1,000cfu/ml 程度の試料 1ml をデソキシコレイト寒天培地に混釈して培養します。

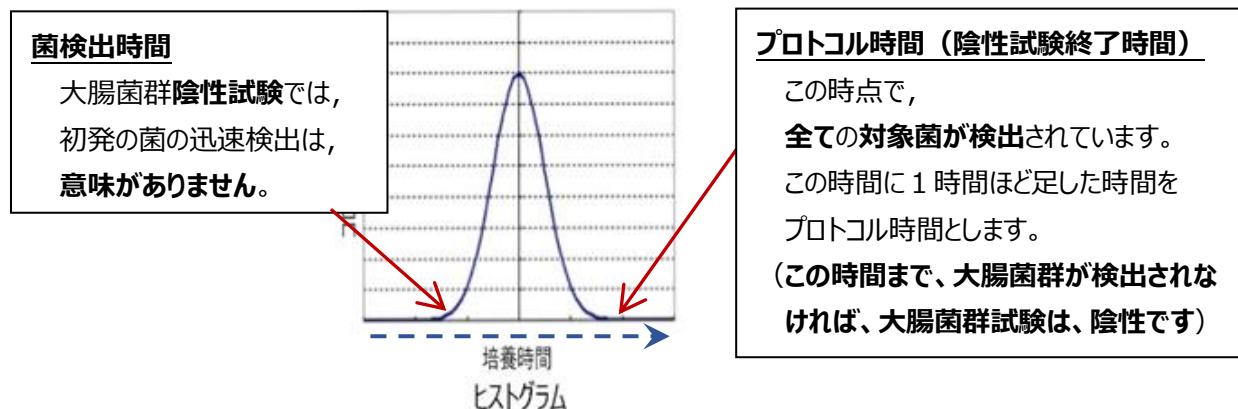


図 26 大腸菌群 検出 ヒストグラム

大腸菌群陰性試験は、大腸菌群の中で、一番増殖が遅いエロモナスが混釈されたデソキシコレイト寒天培地に全部増殖して検出される時間に、ガードバンドとして1時間ほど加えた時間をプロトコルとします。この**プロトコル時間**まで、**何も検出しなければ大腸菌群 陰性** が確実であるということ（図 26）が、バリレーションされたこととなります。

大腸菌群 **陰性試験** の場合は、試験を終了する **プロトコル時間**が**重要** となります。プロトコル時間が迅速であることが重要です。このため、**培地の性能が良く**、かつ、**検出の迅速性（装置性能）が良い**こと、の確認が必要で、そこで、はじめてプロトコル時間を設定することができます。初発の菌の検出が迅速でも、この時間で陰性試験を終えることはできないのです。**“菌がない”（陰性）** ことと、**“検出できなかった”（偽陰性）** ことは、違うのです。

AutoScanner による デソキシコレイト寒天培地 での 大腸菌群 陰性試験 の 全自動化

下記は、牛乳試料中の大腸菌群の検査を実施した例になります。

（大腸菌群は野生株で、検出データは A 乳業からの提供です）

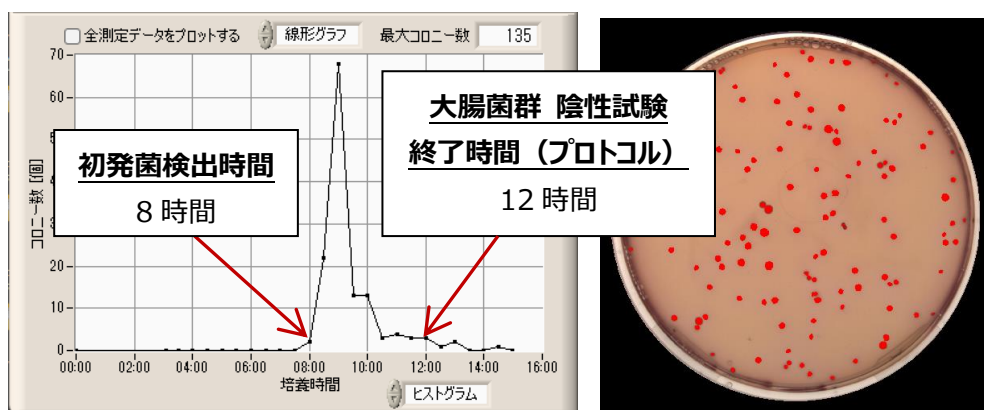


図 27 デソキシコレイト寒天培地による 牛乳混釈試料中の大腸菌群 陰性試験 陽性実例 [ヒストグラム グラフ と タイムラプス画像]

大腸菌群 陰性試験 実例 (A 乳業データ提供の陽性のケース) (mp4)
https://www.microbio.co.jp/JPN/img/histogram_of_coliform_detection_in_mixed_milk_sample.mp4

公定法： デソキシコレイト寒天培地 使用 の 大腸菌群 陰性検査

AutoScanner による 公定法の 全自動化 [赤色検出]

AutoScanner には、**光源の色**（グレイスケール、赤、青、緑、NTSC）を選択できる**モード**（図 28）があります。

また、**受光部**には、**ソフトウェアの色フィルター**（図 29）が装備されています。

このフィルターにより、任意の**受光の色**を選択できます。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、光源を赤色モードで、同時に受光も赤色で検出できます。前の検出例は、赤色で検出された例で、デソキシコレイト寒天培地を使用した**公定法**を**全自動化**した例になります。

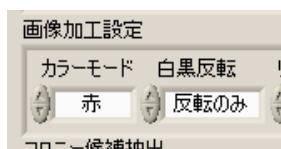
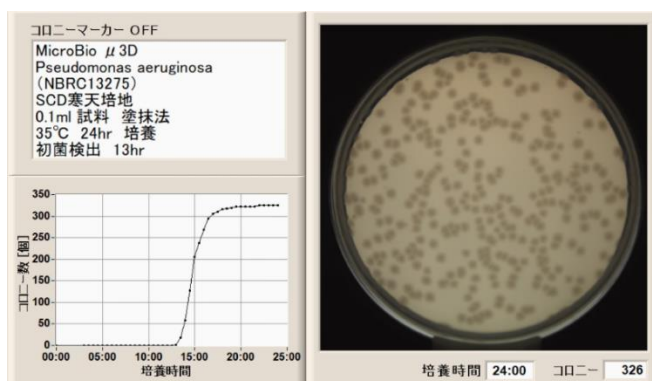


図 28 検出部の色モード選択



図 29 受光部のカラーマスク [赤範囲を指定中]

2.2.2 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 検出 (図 30)

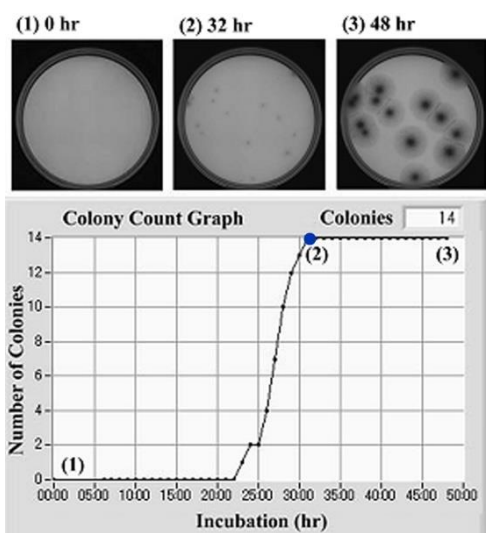


菌株 : *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC13275)
 0.1ml 試料 塗抹法
 培地 : SCD 寒天培地
 培養 : 35°C 24hr
 検出 : 326 colonies
 初菌検出 13hr

図 30 *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

2.2.3 アスペルギルス (*Aspergillus brasiliensis*) 検出 (図 31)



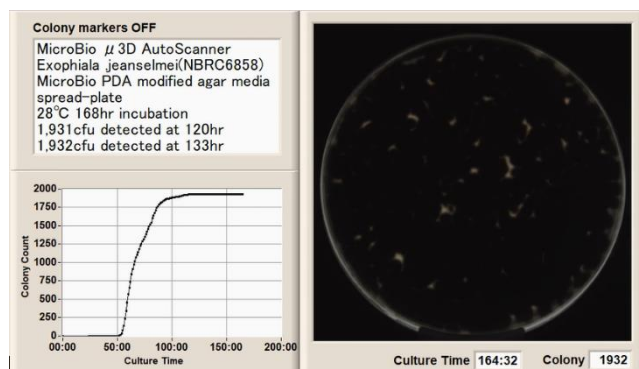
菌株 : *Aspergillus brasiliensis* (NBRC 9455)
 培地 : ポテトデキストロース標準寒天培地 (PDA)
 培養 : 30°C 48h 混釈法
 検出 : 14 colonies

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

図 31 *Aspergillus brasiliensis* 検出 [コロニーカウントグラフとタイムラプス画像]

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

図 32 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 装置で検出を実施した例を示しています。増殖のため菌糸が重なり合っシャレ全面が黒くなっているためマーカー無しではコロニーが確認できませんが、正確に計数できています。



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°C 168h 塗抹法
 検出 : 1,932 colonies (120h で 1,931 カウント)

図 32 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) “**エクソフィアラ**” は飲料や日用品の製造で、製品がこのカビで汚染されていて品質問題や**回収問題**を引き起こしています。食品業界ではポテトデキストロス寒天培地 (PDA) がカビ検出用培地の主力として一般的に採用されていますが、エクソフィアラは PDA ではほとんど増殖しないので**通常の PDA では 検出 が 困難**です。食品業界では PDA をカビの検出に使用していますので、これが製品回収などの問題を引き起こしている主な原因の一つとなっています。

このエクソフィアラは、サブロー デキストロス寒天培地か、マイクロバイオ社の PDA を使用すれば、確実に検出できます。この培地を用いて μ3D 装置で検査すれば、他のカビ・真菌と同様に全自動で迅速に検出ができます。フィルター法の場合でもエクソフィアラの検出にはこれらの培地が有効です。

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**ください。試料液濃度に勾配ができますので、μ3D 装置による正確な検出と計数ができなくなります。

2.2.5 試料中の 2 菌種同時検出

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 33)。

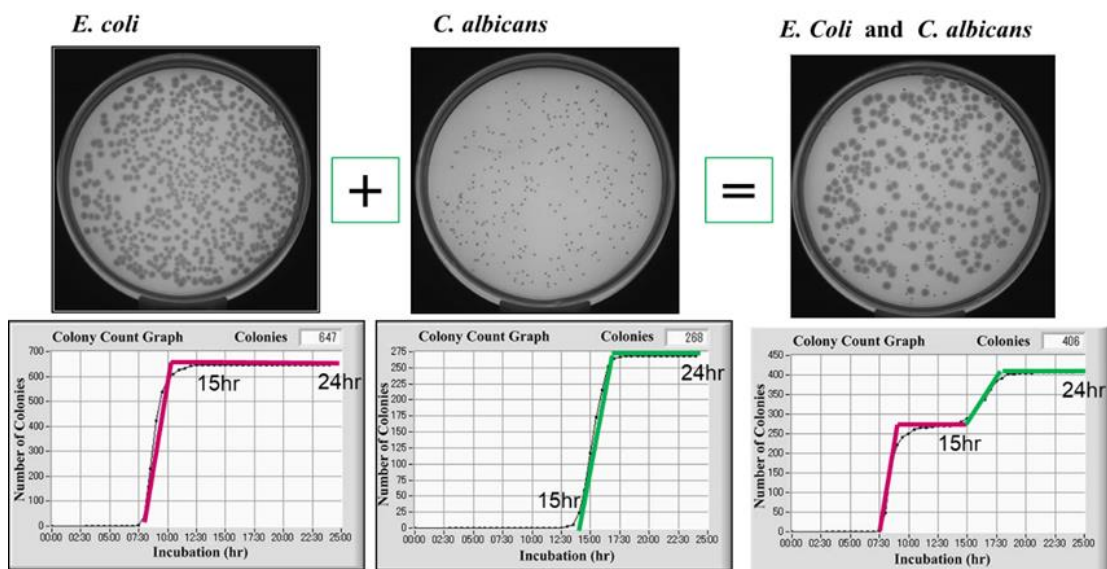
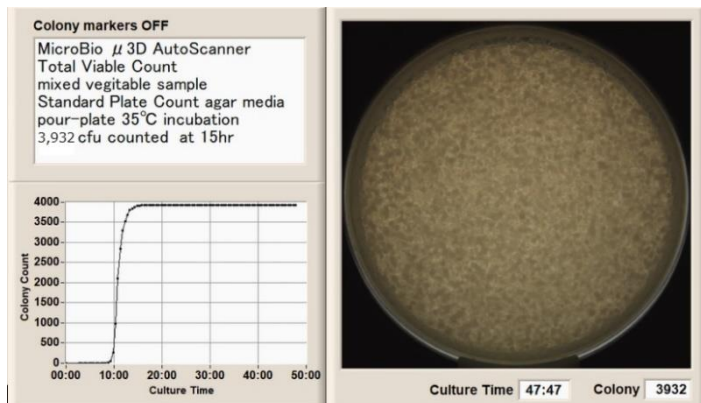


図 33 試料中に 2 菌種を同時に検出した場合 (標準寒天培地, 33°C 24h 培養)

2.2.6 一般生菌数 カウント

コロニー数は 24 時間培養で 3,932 検出・計数となっていますが、48 時間目でも 3,932 となっていますので、24 時間ですでに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 34)。



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 34 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_vegetable_sample.mp4

2.2.7 フィルター法による微生物検査

フィルター法実施のための解析設定を露光時間自動調整 ON に設定しておくこと、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。モードをマーカーON にしておくこと、検出したコロニーが判別し易くなります（図 35）。

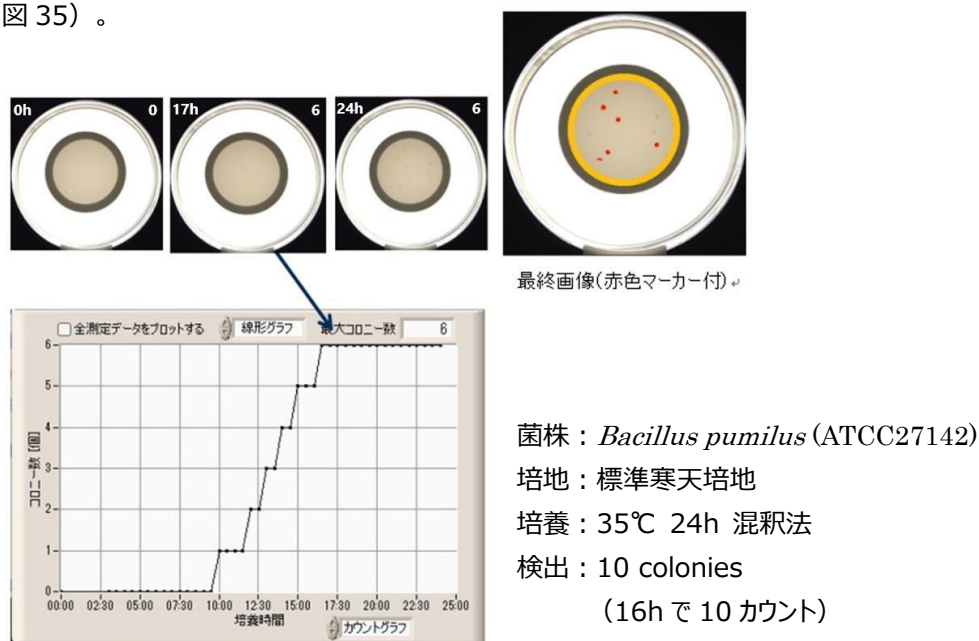


図 35 フィルター法検出例 [コロニーカウントグラフと最終画像 (赤色マーカー付)]

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

2.2.8 嫌気性細菌 クロストリジウム 検出

シャーレごとに嫌気にできる嫌気設定キットを使用すれば、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 μ 3D 装置により 35°C で培養して自動検出します。次の検出結果（図 36）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。SCD の混釈法では嫌気性細菌の検出バリデーションはできないので注意してください。

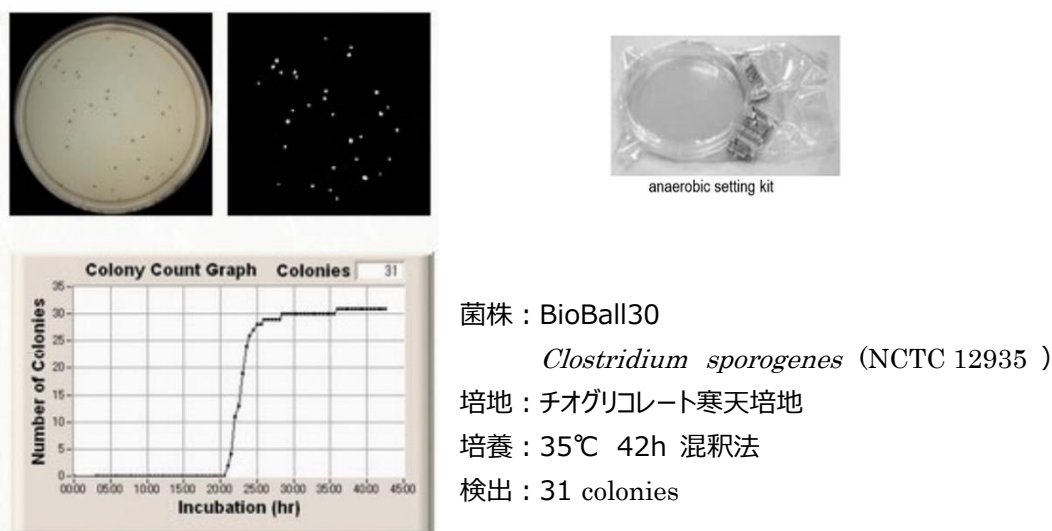


図 36 嫌気性菌クロストリジウム検出 [コロニーカウントグラフ, 最終画像とマーカー]

3. 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。

3.1 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、**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。
(従来技術では達成できなかった内容である。)

3.2 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。

4. TSIA による寒天培地評価法

世界では細菌学者コッホが確立したとされている“人手による平板培養法を良し”とする長い歴史的な慣習があります。米国 AOAC は分析法の検証が極めて厳しいとされる認証機関ですが、認証のためにはこの培養法を標準参照法としています。このような培養法に使用される寒天培地の性能の確認は重要ですが、“回収率”の良さだけで評価されています。

TSIA を実施する μ 3D 装置は寒天培地の培養状況を数値化していますので、①“回収率”だけではなく、②“性能の良さ”も同時に把握できます。

4.1 回収率の把握

寒天培地を評価するには、評価するための標準となる生菌数があらかじめ正確に把握された標準菌株の生菌試料を使用する方がよいのです。

・BIOBALL の使用

BIOBALL は特定菌株の正確な菌数を分取して、それをフリーズドライにした水溶性のボールで、決まった菌数が必要な培地性能試験に利用されています。菌種と菌数により多種類の製品が提供されていますが、菌種には限りがあります。

・フローサイトメータの使用

フローサイトメータは細管を通る微生物の浮遊液や懸濁液にレーザーを照射して蛍光や散乱光を測定することで微生物を正確に計数できる装置です。どの菌種でも生菌を含む培養液の菌数がある場で把握できます。

あらかじめ試料の生菌数が確認できないときは、評価試験対象の寒天培地の他に標準寒天培地（Standard Plate Count 寒天培地）を使用して μ 3D 装置による評価試験と同時に試料の生菌数を同装置で把握します。性能評価に要するサンプル数は、正規分布を得るためには 32 以上が必要とされています。 μ 3D 装置の計測レンジは $10^0 \sim 10^3$ までと広いので、1 万個程度まで正確に計数できますが、1,000 程度の希釈を推奨しています。

4.2 性能の把握

寒天培地の性能を把握するときは、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べきなのです。言い換えれば、表面塗抹では培地表面だけの性能であり、むしろ混釈法が 3 次元方向から養分などが供給されるので、カビのような好気性菌を除いては、試料は混釈法で用意すべきなのです。寒天培地の性能は標準菌株の生菌試料を混釈した寒天培地を μ 3D 装置で培養し、コロニーカウントグラフとヒストグラムを取得してその形状から判断します（図 37）。

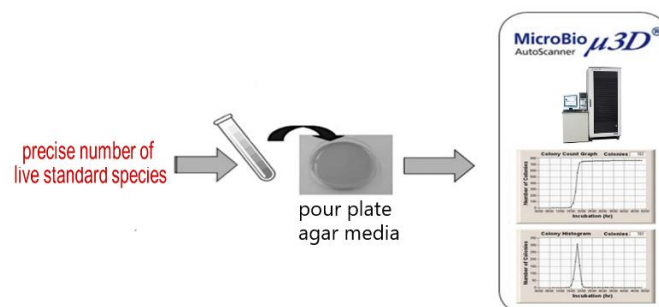


図 37 TSIA による寒天培地評価法

μ 3D 装置はシャーレ全体の視野を確保しながら寒天の厚さが約 3mm の寒天培地の全層に存在するコロニーに同時に焦点を合わせています（図 38）。培養時間軸（培養グラフ X 軸）について、サンプリング時間（タイムラプス モニターの間隔）は短い方がヒストグラム表示するとより正規分布の形状になりますが、サンプリングが 5 分おきでは時間間隔が短すぎますので、30 分おき程度が実務的です。

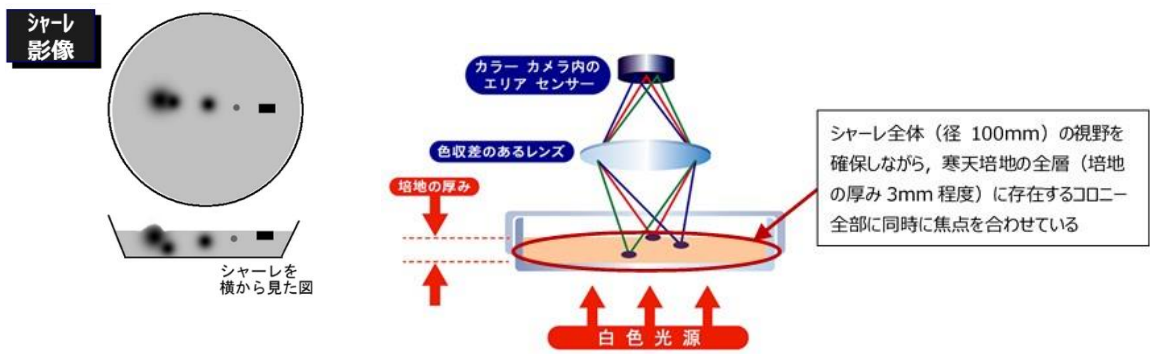


図 38 シャーレ映像 と 寒天培地シャーレの寒天全層

菌検出が開始され始めて検出が完了した時間帯に検出されたコロニーは、混雑された寒天培地内のどこかに存在していたものです。装置は培地全体を観察していますので、**ヒストグラムの釣鐘形状**の開き (図 39) (コロニーカウントグラフでは傾斜の角度になる) は、コロニーの所在による検出時の時間差によるもので、**培養が良好**の場合 (性能の良い培地) は図 40 に示すような形状となります。

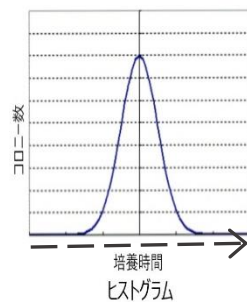


図 39 正規分布 (ガウス分布) [左右対称の釣鐘形状となる]

TSIA 性能評価法のグラフ表示

二

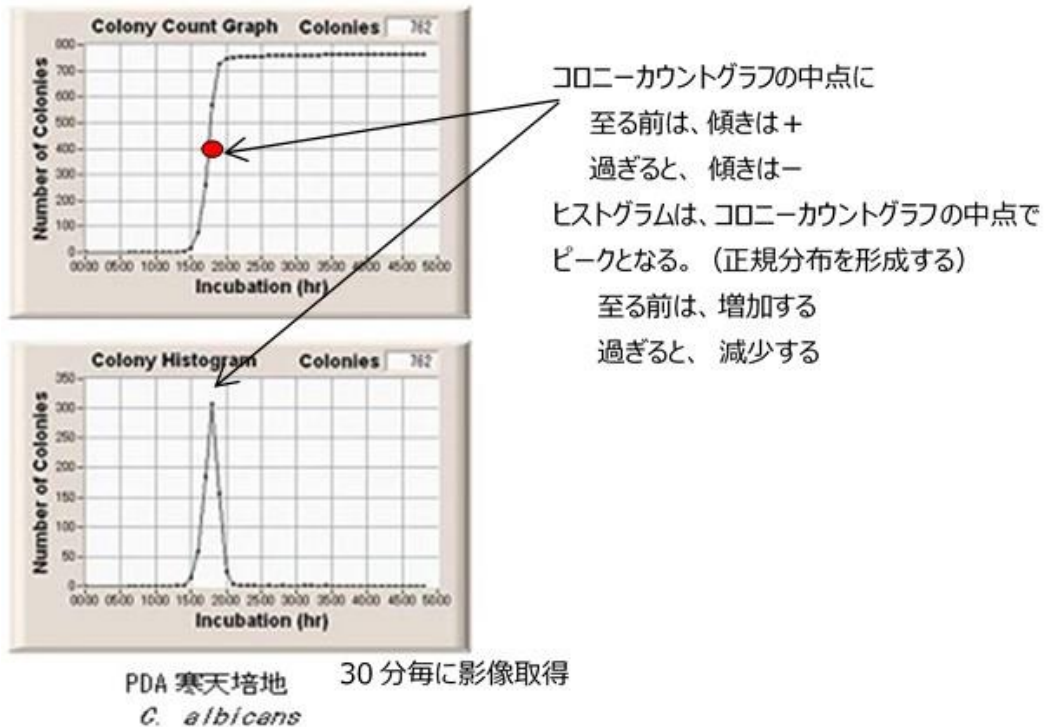
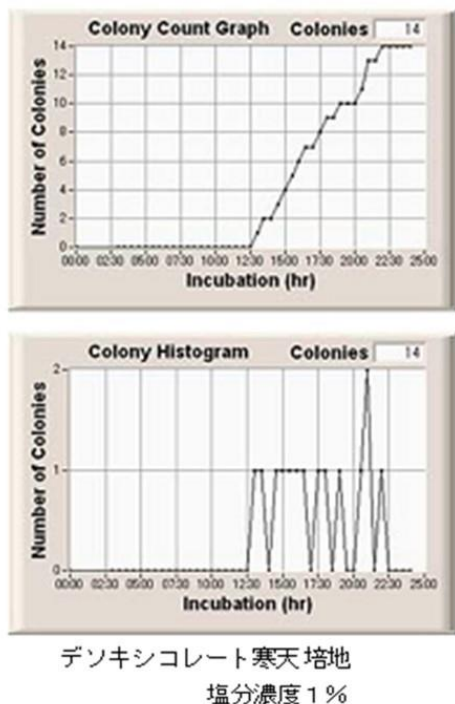


図 40 TSIA による寒天培地評価：性能が良い例

培養されて逐次検出されてくるコロニーは動的にグラフの形状を作り出しますので、寒天培地が微生物の増殖をよくサポートしている場合は、グラフの形状は、コロニーカウントグラフは一段の階段状となり、ヒストグラムは釣鐘形状の正規分布となります（サンプリングが30分に1回の場合は、頂点に鋭角となります）。

微生物を培養しているときの状況をグラフで表示できるようになったということは、その状況を数値化して可視化できたことを意味しています。グラフで培養の性能を評価することは、単に24時間や48時間というような培養時間を決めて培養し、培養された結果としてカウントしたコロニー数により回収率を求めたり、コロニーの大きさを確認したりするという静的なものではなく、培養されて逐次検出されてくるコロニーが動的に作り出したグラフの形状を培地性能の確認に利用できるということの意味をしています。標準試料として添加する菌数が少ない場合は、グラフの形状が完全に形成されないために、添加菌数は多い方が評価するうえで好ましいのです。

性能が悪い寒天培地の例は、図41のとおりです。



標準菌株：*E. coli* (NBRC3972)
 寒天培地：デソキシコレート寒天培地（塩分濃度 1%）
 試料形態：1ml 試料，混積，
 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。

デソキシコレー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。このデソキシコレー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 41 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ート寒天培地の評価]

4.3 寒天培地 試験成績書

寒天培地の性能が平板培養法での正確で迅速な検出を決定するので、培地は TSIA 評価法で評価され、添付される試験成績書には、下記（図 42）のようなデータも添付されている方が好ましいのです。

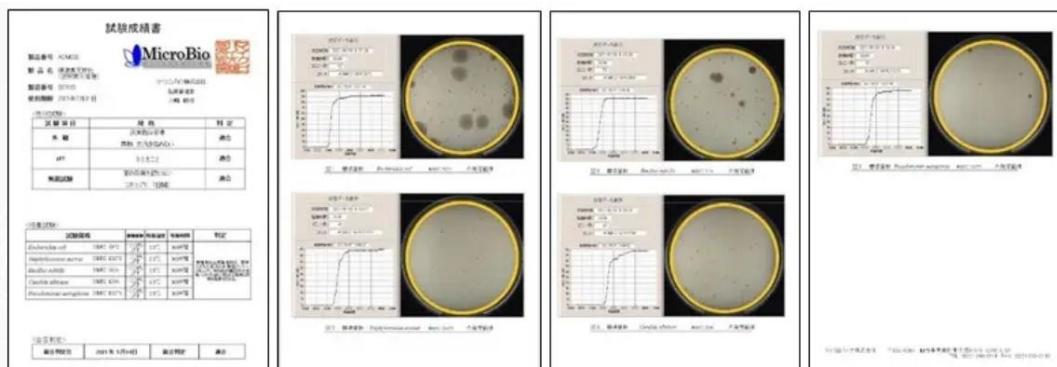


図 42 寒天培地 試験成績書

おわりに

寒天培地を“**生菌検出センサー**”としたマイクロコロニー法は、コロニーをミクロンレベルで検出することで早く見つけて**増殖能を確認**し、検出を**迅速化**したものです。これを実現したタイムラプス映像解析に基づいたマイクロコロニー法の μ 3 D 装置が実用化できたことにより、微生物の**迅速リアルタイム検出**が実現しています。そしてそれと同時に、センサーとしての**寒天培地の性能**を標準菌株の生菌を使用して**正確に評価**できるようにもなっています。

このことは、**特性試験** (characterization) も正確に実施できるようになったということになります。培養の基本条件となる温度、pH、塩分濃度や、組成となる糖分や添加物 (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、温度条件も含め、特定生菌の培養に対する寒天培地組成を**最適化** (optimization) できるようになったのです。

マイクロバイオ社 総合システム

https://www.microbio.co.jp/JPN/total_system.html

培地の最適化ができるということは、生菌検出の**確実性**を高めるとともに、検出を**さらに迅速化**できるということでもあるのです。

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)



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,*}

※タイムラプス映像解析 (Time-lapse Shadow Image Analysis) (TSIA) の研究開発は、平成 27 年度科学技術分野の**文部科学大臣表彰**におきまして、科学技術分野で顕著な功績があったとして「**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**」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。