

コロニー増殖過程逐次観測による生菌数の計数法に関する研究

仙台電波工業高等専門学校 情報工学科 竹茂 求

1. 研究の背景

食品の安全、衛生を確保することは社会的な重要課題である。スーパーマーケットやコンビニエンスストア等で日常的に購入して食する加工食品は、全て食品衛生法の指針によってその衛生検査・管理が義務付けられている。衛生検査において、特に“生菌数”は食品の検査試料1g中に“生存する”微生物の数を表し、食品の微生物汚染の指標として用いられる。生菌数を計数するには“混釈法”が最も確実であり、食品衛生法に基づく公定法では、食品の生菌数を混釈法で計数することを義務付けている。

混釈法では、先ず生菌の試料と標準寒天培地をシャーレでよく混ぜ、35℃に保たれたインキュベータ内で48時間培養する。その後、生菌が増殖して形成したコロニーの数を、目視あるいはコロニーカウンターを用いて数え、その数を培養前の生菌数とする。混釈法は増殖したコロニーを観察するために、生菌であることが確認されるが、以下の3つの問題がある。

- (1) 肉眼でコロニーを確認できるまで長時間の培養を要すること。
- (2) 人間が目視で計数するのは能率的でないこと。
- (3) コロニーカウンターでの計数も、菌濃度が高い場合には長時間の培養の結果コロニーどうしが重なってしまい、計数が困難あるいは不正確なこと。

特に(1)の問題は、食品の安全性を早期に確認できないことを意味しており、新鮮な食品を消費者に提供する上で大問題である。そこで、できるだけ早く細菌の有無を検出する方法として、“迅速法”と呼ばれる幾つかの方法が提案されている¹⁾。しかしながら、これらのいわゆるハイテク法は「死んだ菌も計数してしまう」「計数に先立つ前処理が必要である」「生菌数の概数しかわからない、少数の生菌は検出できない」等、個々の方法に個々の問題があり、生菌数を数える方法としては、依然として、混釈法が最も確実とされる所以である。また迅速法は公定法で認められていないので、食品加工工場等では、迅速法による細菌のスクリーニングと混釈法による生菌数の計数を併用せざるを得ないのが現状である。生菌数を“迅速に・簡便に・確実に”計数できる測定法の開発が強く望まれている。

2. 問題解決法

混釈法の最大の利点は、生菌だけを確実に計数できることである。生菌数の計測において、混釈法の利点を生かし、混釈法の3つ問題を解決することが可能な次の方法を提案する^{2, 3)}。

コロニー数を早期に計測するために、生菌がコロニーを形成する過程を培養開始初期

から継続的に計測する。何らかの方法で拡大して計測すれば、ある程度の大きさに成長したコロニーから順次検出されるはずである。この方法を用いると、コロニーが検出される時間は採用する光学系によって異なるであろうが、48 時間待たなくても“成長が早いコロニーから逐次検出され、新たに検出されるコロニーが無くなった時点でコロニー数が確定する”。この手続きの要は、コロニーの成長過程・変化を観測すること、つまり、生菌のみを識別して計測できることである。また、コンピュータによる検出機構の自動化により、問題（2）は解決される。また、2. 3 で示す計数アルゴリズムによって重なったコロニーを分離識別することが可能であり、問題（3）も解決される。

2. 1 光学系

コロニーの拡大計測において、通常の結像型光学顕微鏡は、様々な深度に存在するコロニーに焦点を合わせる必要があり、計測の自動化には不向きである。本研究では、計測の容易な自動化を実現する目的で、以下の“CCD 直視型投影光学系”を考案した。図1に CCD 直視型投影光学系の原理の模式図を示す。

シャーレの上方から点光源を照射し、被写体の陰影像を CCD イメージセンサ上に形成する。各コロニーに焦点を合わせないで陰を見るために、様々な深度のコロニーを同時に観測できることが利点である。

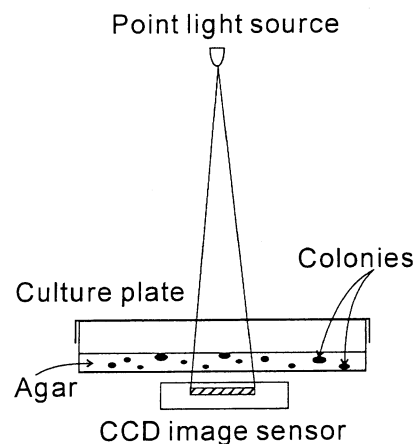


図1. 光学系の模式図

35°Cのインキュベータ内でコロニーが増殖する過程を CCD直視型投影光学系で逐次観測した結果の一部を図2に示す。実験では、点光源として白色 LED を使い、CCD イメージセンサは、市販の対角 1/3 インチ白黒 CCD カメラのレンズを除去して使用した。また検体として大腸菌 *E. coli* (ATCC25922)を用いた。図2では、時間経過と共に面積が増大するコロニーの陰影像が確認される。また、矢印で示した陰影を始めとして、時間が経過しても変化しないノイズが確認される。これらの画像からコロニーを識別し

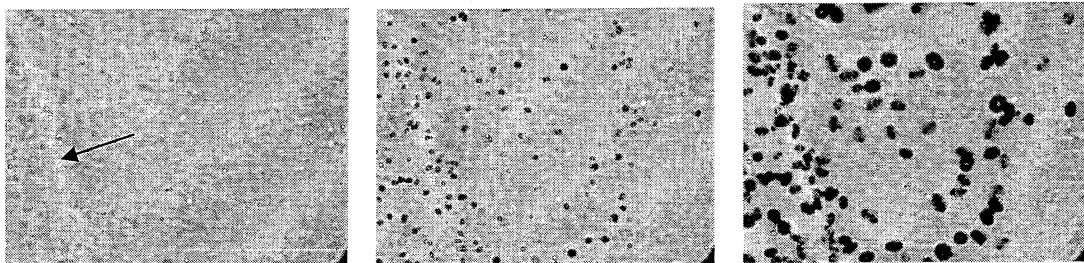


図2. CCD 直視型投影光学系による取得画像：左から培養開始直後、4 時間後、24 時間後の画像

て、コロニー数を計数する。

2. 2 画像処理によるコロニーの識別

CCD 直視型投影光学系で取得したコロニーの陰影像をグレースケール画像としてコンピュータに取り込み、適当なしきい値で2値化することによって、白の培地と黒のコロニーを識別する。

このとき、取得画像をそのまま2値化すると、試料に含まれるゴミや培地・照明のむらを誤ってコロニーと識別する可能性がある。そのため、逐次取得した画像と初期画像の差分画像を作成するのが有効である。つまり、培養開始時にはまだコロニーが形成されていないはずであるから、初めに取得した画像に存在する陰影像はノイズであると考え、差分処理によって除去する。画像の差分手続きの有効性を明確にするために、また、2値化のしきい値を決定する方法の根拠を示すために、先ず図3に (a) 培養開始直後および (b) 24時間後に取得した画像のヒストグラムを示す。0階調が黒色で、255階調が白色に対応する。200階調近傍に見られるピークが培地領域に対応し、(b) の画像で成長する50~150階調付近の領域がコロニーに対応する。図3では、培地領域のピークの半値幅が30階調程度あり、培地・照明のむらが大きい。図4に、取得画像と培養開始時の画像との差分画像のヒストグラムを示す。図4では、0階調近傍のピークが培地に対応し、時間が経過すると100~150階調付近に成長するピークがコロニーに対応することに注意する。培地に対応するピークの半値幅はいずれの時間でも1階調以下であり、培地や照明の不均一性が除去されている。図4から、しきい値を50程度に設定すれば培地とコロニーが識別できそうである。培養開始後24時間後の取得画像と培養開始時の画像との差分画像に対して、しきい値を50として2値化した画像を図5に示す。取得画像を目視で見てコロニーと判断される領域が、図5では、ほぼ正しくコロニーと識別されている。

なお厳密には、培地状態や照明のむらは、時間経過とともに微妙に変化するため、差分処理では除去できない小さなノイズが生じる場合がある。これらのノイズを誤ってコロニーと識別しないように、ある程度の大きさ以下の陰影像はノイズと見なす必要があ

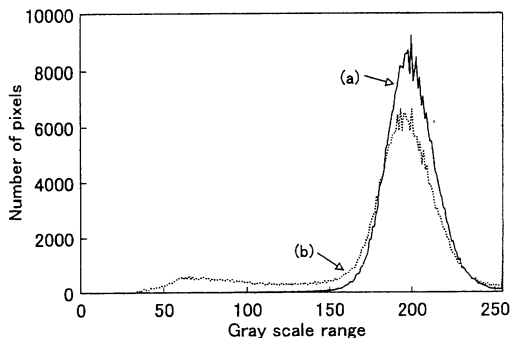


図3. 取得画像のヒストグラム

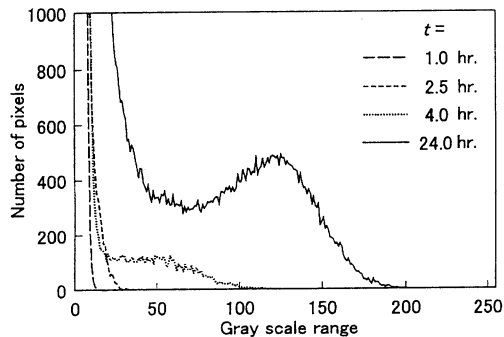


図4. 差分画像のヒストグラム

る。この処理により、真のコロニーを誤ってノイズと見なしてしまう場合があるが、真のコロニーであれば、いずれは成長して大きくなるので、最終的なコロニー数の計数を誤る心配はない。ここでは、erosion 処理と dilation 処理を各 2 回行って小さい連結領域を除去している。

また、しきい値をここでは便宜的に 50 に固定したが、コロニーが成長した画像では、ヒストグラムが培地とコロニーの 2 つのピーク構造を示すために、例えば“判別分析法”などの“しきい値自動決定法”も有効である。ただし、コロニーが成長していない培養初期段階の画像に対してしきい値自動決定法を用いる場合、培地のノイズがコロニーと誤判定されてしまう不都合が生じる。この誤判定を回避するためには、画像に意図的な擬似コロニーを作成する方法が有効である⁴⁾。

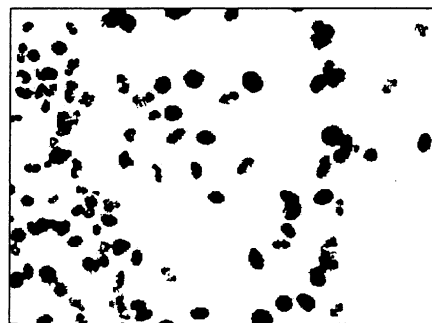


図 5. 培養後 2.4 時間の取得画像の 2 値化

2. 3 重なったコロニーの分離識別アルゴリズム

図 6 (a) は、培養開始時から 15 分間隔で取得した各画像と培養開始時の画像との差分画像をとり、2 値化してコロニー数をカウントした結果である。コロニーは培養 4 時間後から急に検出されはじめ、5 時間後を最大として、その後減少している。これは、図 2 あるいは図 5 からわかるように、時間が経過するとコロニーが大きくなってコロニーどうしが重なり、複数のコロニーを誤って 1 個のコロニーと計数してしまうことに起因している。

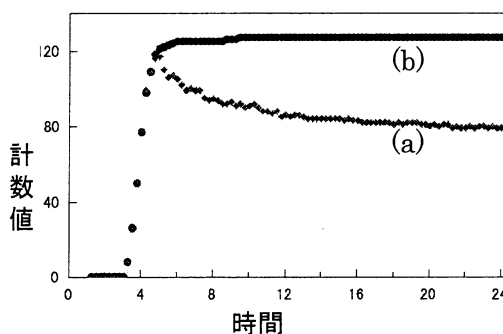


図 6 検出コロニーの時間変化

本研究では、コロニーを培養開始時から継続して観測しているために、これら重なったコロニーを分離して、識別することが可能である。そのアルゴリズムを以下に示す。

差分画像の 2 値化画像から直接コロニー数を計数するのではなく、コロニー数を計数するための特別な 2 値化画像を 1 つ用意する。これを“コロニー識別用画像”と呼ぶ。“コロニー識別用画像”の初期状態は、一番初めに作成された差分画像の 2 値化画像そのものとする。以後、新しい差分画像から 2 値化画像を作成する度に、以下の手続きを行い、コロニー識別用画像を更新し、コロニー数を計数する。新しい差分画像から作成された 2 値化画像を“新画像”と呼ぶ。新画像の各コロニー領域に着目し、それらのコロニーが (1) 新たに検出されたコロニーであるか、(2) 既に検出されたコロニーが

成長したものであるか、それとも、(3) 複数のコロニーが重なって一つになったものか、次のアルゴリズムで判定する。まず、新画像の各コロニー領域について、コロニー識別用画像の対応する領域のコロニー数 n を調べる。新画像の各コロニーは、

- (1) $n = 0$ の場合には、新たに検出されたコロニーと判定する
- (2) $n = 1$ の場合には、既に検出されたコロニーが成長したものと判定する
- (3) $n > 1$ の場合には、複数のコロニーが重なって作られたものと判定する

$n > 1$ の場合は、新画像の該当するコロニーは複数のコロニーが重なったものであるから、コロニー数に対して間違った情報を与える。従って、コロニー識別用画像の対応する領域を更新しない。 $n = 0, 1$ の場合は、新画像のコロニーはコロニー数に対して正しい情報を与えるので、コロニー識別用画像の対応する領域を更新する。図7は、このアルゴリズムの模式図である。

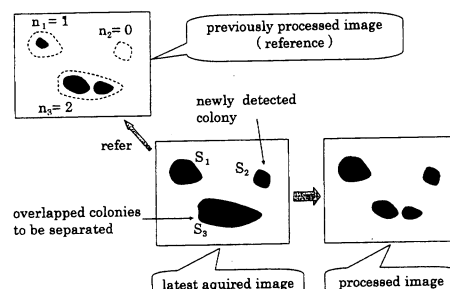


図7 重なったコロニーの分離識別アルゴリズム

このアルゴリズムを用いて作成されたコロニー識別用画像を、培養後24時間の場合について図8に示す。図8では、図5では重なっていたコロニーが分離識別されていることがわかる。またこのアルゴリズムを用いてコロニー数を計数した結果を、図6(b)に示した。図6(b)ではコロニー数は減少することなく、6時間程度でほぼ一定値に収束し、コロニー数が決定されている。なお、図6(b)で、培養後8時間あたりに見られるコロニー数の増加は、計測している CCD 領域の外側のコロニーが大きく成長して、CCD 領域に現れたことに起因する。

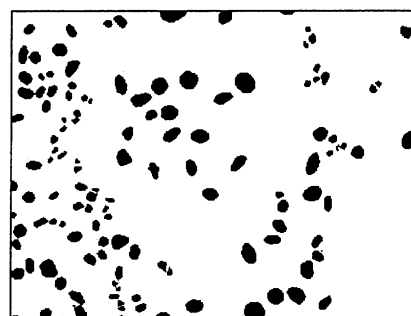


図8 コロニー識別画像

2. 4 実験結果

様々な菌濃度の検体試料について、本研究で提案した方法を採用してコロニー数を計数した結果を図9に示す。図9では、菌の濃度によらず培養後3~4時間でコロニーが検出されはじめ、6時間程度で検出コロニー数が一定値に達し、コロニー数が確定している。なお、一度一定値に達した後に数個のコロニーが新たに検出される場合があるが、これは観測している CCD 領域外のコロニーが大きく成長して CCD 領域内に入ってきたことに起因する。

本研究で提案した方法の計数精度を調べるために、各試料について、培養後48時間に目視で計数した結果と比較する。図10で、破線は実験結果と目視による計数結果が

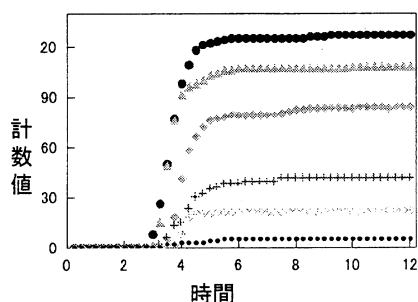


図9 菌濃度が異なる場合のコロニー数検出

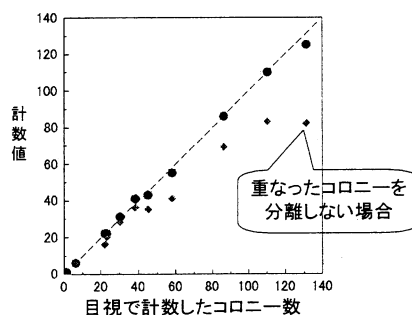


図10 コロニーの自動計数結果と目視での係数結果との比較

一致する理想的な場合を表す。○印は重なったコロニーを分離識別するアルゴリズムを用いた場合を表し、目視で計数したコロニー数とほぼ一致する。迅速法として知られる方法は、通常、菌数のオーダーを評価するのが限界であることを考えると、本方法は極めて高い精度で計数できることを意味している。図10で◇印は、コロニーを分離識別するアルゴリズムを用いない場合を表す。図10は、菌濃度が高い場合は、コロニーを分離識別するアルゴリズムを用いる必要があることを示している。

3. まとめと展望

生菌数を最も確実に計数できる混釈法を採用し、コロニーの成長過程を継続的に観測することによってコロニー数を早期に計数する方法を提案した。コロニーの計測手段として、焦点を合わせる必要がない“CCD 直視型投影光学系”を考案し、計測の容易な自動化を実現した。本方法を大腸菌に適用して実験した結果、コロニー数が6時間程度で正確に計数できることを確認した。特に、コロニーが成長して重なった場合は、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アルゴリズムが有効であることを示した。

本方法は、培養後6時間程度でコロニー数が決定されるので、食品加工工場等での衛生検査に有効である。また、本方法は混釈法を採用しているために、培養後6時間程度でコロニー数が決定した後にも培養を継続すれば、培養開始48時間後に通常の公定法を全うすることが可能である。本研究で提案された方法は、食品検査技術の分野でその有効性が既に評価され、微生物検査の新しい迅速化技術“デジタル顕微鏡法”として認知されている³⁾。一方で、実用化においては、検査対象に応じて、以下に述べるような解決すべき問題も残されている。

公定法では、シャーレに300個以上のコロニーが存在する場合は、シャーレの一部1 cm² 領域のコロニーを計数して、シャーレの面積を乗じることでシャーレ全体のコロニー数とする方法が認められている。そのため、ここで採用した CCD 直視型投影光学系は、生菌数が多い惣菜等の検査ではそのまま実用化が可能である。しかし、菌数が少な

い食品の検体においては、シャーレ全体を観測できる光学系の検討が必要である。これに関しては、CCD エリアセンサでなく CCD ラインセンサを採用する方式を考案し、現在商品化が進められている⁵⁾。

なお、菌の種類によってコロニーの成長速度が異なることがわかっている。現在、発展的な研究課題として、“検体に含まれる特定の種類の生菌の数を計数する研究”を、中小食品産業活性化技術開発支援事業として農林水産省に採択された「デジタル顕微鏡を用いた病原菌・低温細菌の迅速検出技術の開発」で行っている。

参考文献

- (1) 「食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！」，(株)サイエンスフォーラム (2002)
- (2) 竹茂求他：コロニー増殖過程逐次観測による生菌数の計数法，計測自動制御学会論文集 Vol.39,N06,pp521-527(2003)
- (3) 小川廣幸：デジタル顕微鏡法，「食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！」，(株)サイエンスフォーラム，pp168-174 (2002)
- (4) 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数法－CCD 投影型顕微鏡を用いた方法－，情報処理学会東北支部 2000 年度第 4 回研究会 00-4-9 (2001,3)
- (5) 平成 12 年度地域新生コンソーシアム研究開発事業：即効型地域新生コンソーシアム研究開発「デジタル顕微鏡を応用した微生物検出装置の開発」成果報告書(2002)