

安定した検出精度を持つ実時間細菌検出システムの開発

Development of a Real-Time Bacillus Detection System with Steady Detection Accuracy

高橋 信行 武井 昌史 平井 登 佐々木 健太† 澤田 大剛+ 野田 真+

藤原 里美+ 大坪 雅史* 宮原 則行*

Nobuyuki Takahashi Masafumi Takei Noboru Hirai Kenta Sasaki† Daigo Sawada + Makoto Noda+
Satomi Fujiwara+ Otsubo Masashi* Noriyuki Miyahara*

1. はじめに

近年、特に食品衛生管理において、集団食中毒や院内感染などが社会問題となっている。中でも、大腸菌 O-157 食中毒事故(1996 年)や、加工牛乳などに起因する黄色ブドウ球菌食中毒事故などは大きな問題となった。このことから、消費者の食の安全性に対する関心が高まり、徹底した食品衛生管理を行う動きが増えてきている。しかし、食品衛生のための細菌検査の方法として従来まで行われてきた培養法では、細菌を人が肉眼で観測できる大きさまで培養するため、検査に 1~8 日間もの日数を要するばかりか、顕微鏡での目視観察のために観測者の目に疲労と負担が伴うことが問題視されている。これらのような問題を解決するためにも、正確かつ迅速な細菌検出の方法が求められている。

以上のような背景を踏まえて、本研究では、細菌を実時間で検出できるシステムを開発し、細菌検査をコンピュータを用いて自動化することで、肉眼での観測のために必要だった培養時間を短縮させ、細菌の検出精度を向上させることに成功した。

2. 細菌検出システム

2.1 細菌検出システムの概要

試料中の細菌固有の遺伝子に蛍光物質でマーキングし、この試料に励起光を当てて蛍光物質を発光させ、これを蛍光顕微鏡で測定して、細菌を検出・計数するシステムを開発した。本システムでは、蛍光顕微鏡の蛍光フィルタで蛍光光以外の光をカットした蛍光画像(図 1)を高感度 CCD カメラで撮影し、この CCD カメラの信号を PC に実時間で取り込んだ蛍光画像から、輝度分布を元にした画像処理することで、細菌の検出・計数を行っている[1]。細菌検査においては、菌種や試料に関する事前情報を必要とせず、背景画像と異質な細菌を実時間で計数できることが望ましいが、一般にこのような計数には多くの計算コストが必要となる。そのため、本システムでは、計測の高速化と広範囲な細菌検査への適用性とのバランスを考え、必要最低限の事前情報を用いて計数時間の短縮を図った。本システムの概略を図 2 に示す。

一方、画像を PC に取り込む際に、試料を 1 枚の画像として取り込むと、解像度の不足から、高精度な細菌検出ができない。この問題を解決するために、試料を固定しているステージを左上から順番に移動させて、試料全体を複数の蛍光画像に分割しそれぞれの画像に対して順次画像処理

を行った。但し、高精度な検出精度と常に安定した計数結果を実現するため、画像分割に伴う単一細菌の多重計数などの計数誤差の補正には、パターンマッチング処理で対応した。

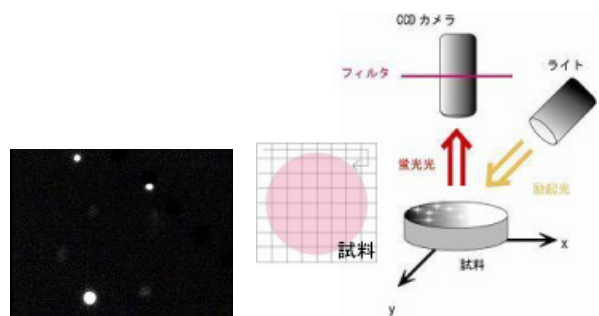


図 1 蛍光画像

図 2 蛍光計測

2.1 試料の計測

試料は 46mm φ の円形をしており、これを 1 枚の画像として取り込むと解像度の不足の理由から高精度な細菌検出が出来ない。そこで、試料全面を x 方向に 24、 y 方向に 32 に分割して、計 768 の画像それぞれに対して、試料を固定しているステージを左上から順に移動させて、分割された画像に順次画像処理を行った。ステージは約 0.24 秒間隔で移動し、この移動に同期させて蛍光画像を取り込み、これを画像分繰り返すことで試料全面の細菌のコロニーの計数を行った。試料全面を 768 画像として走査するには約 3 分間の時間が必要であり、この間に計数処理することが、本研究で重要視する実時間性である。

2.2 分散値による蛍光計測

標的の領域を検出するために、画像の縦の幅を H 、横の幅を W 、画像全体の濃度値の平均を μ として、式(1)と式(2)に示す画像の x 軸方向と y 軸方向で走査した分散値を用いた。これらの分散値が基準値 T を上回った領域に標的である細菌が存在すると仮定する。まず、 x 軸方向からの分散値を計算し、その値が閾値 T を超えた領域を $x_1 \leq x \leq x_2$ とし、同様に、 y 軸方向からの分散値が、閾値 T を超える領域を $y_1 \leq y \leq y_2$ とする。この $x_1 \leq x \leq x_2$ と $y_1 \leq y \leq y_2$ が重なり合う領域を、標的が存在する領域として検出する。

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{W} \sum_{y=1}^W (I_{xy} - \mu)^2 \quad (1 \leq x \leq W) \quad (1)$$

$$\sigma_y^2 = \frac{1}{H} \sum_{x=1}^H (I_{xy} - \mu)^2 \quad (1 \leq y \leq H) \quad (2)$$

公立はこだて未来大学

† 東京エレクトロンソフトウェアテクノロジーズ(株)

+ (株)東和電気製作所

* 北海道立工業技術センター

2.3 システムの安定した検出精度

試料を複数画像に分割して処理する際、1つの画像の上下左右には、他の画像と重複して観測される領域が生じる。これらの重複領域に細菌があれば、1つの細菌が複数の細菌として誤計数される場合がある。このような誤計数を防ぐため、本研究ではテンプレートマッチングを用いた。同一試料での複数回計数でも、常に同一の結果が得られることを、本システムの安定性の基準とした。

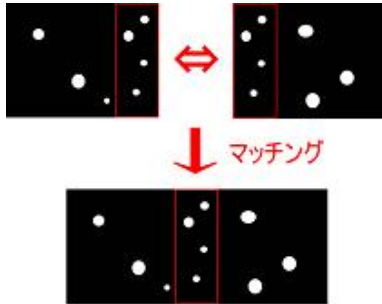


図3 蛍光画像のマッチング

2.4 システムの動作環境

開発したシステムの実用化を視野に入れ、本研究では表1に示すような比較的一般的に使われるPCと同程度のスペックで計数システムが動作するように開発を行った。開発したシステムを表1のPC上で動作させたところ、表1に示す程度のCPU・メモリを使用し、1蛍光画像に対する処理時間は約0.05秒であり、試料を固定するステージの動作に同期させて実時間で処理するには十分であることを確認した。

表1 開発したシステムの動作環境

OS	SUSE Linux 10.0
CPU	Intel P4 up to 3.06GHz+
メモリ	2xDDR400 DIMM up to 2GB
CPU使用率	約70%
メモリ使用量	約300MB
画像処理時間	約0.05秒

3. 実験結果と評価

図4、図5に図1に示した蛍光画像のx軸方向、y軸方向から見た分散値を示す。細菌が存在する領域の分散値が高くなっており、両画像で高分散値が重なる領域に細菌が検出されていることを確認した。

さらに、鳥ひき肉のサルモネラ菌、牛肉の0-157、加熱した豚肉、加熱したシチューの4種類の試料に対し、開発したシステムを用いて細菌計数を行った。

分散値による細菌計数では、鳥ひき肉のサルモネラ菌、

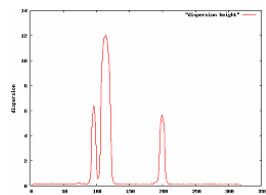


図4 x軸方向からの分散値

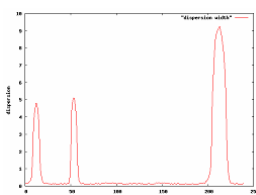


図5 y軸方向からの分散値

牛肉の0-157のようなノイズの少ない蛍光画像が得られる試料では、肉眼での計数結果と同様の結果を得た。一方、加熱した豚肉、加熱したシチューのようなノイズの多い蛍光画像が得られる試料に対しては、ノイズが細菌検出の基準である分散値に影響を及ぼし未検出や誤検出が見られ、肉眼での計数結果とは異なった結果を得た。

本システムの実用化を考える上では、さまざまな実環境下に対応させる必要があり、前述したノイズの多い試料に対しても、我々が開発している白色化フィルタを応用するなどして、正確な計数を実現することが今後の課題である。ただし、白色化フィルタ処理には多くの計算量が必要であり、単体のコンピュータで実時間処理するのは困難である。そこで、実時間性、正確性など、要求仕様に応じた計数を可能とするため、蛍光画像の実時間取り込みだけでなく、DVD等への記録蛍光画像からの計数にも対応することが有効であると考えられる。

また、テンプレートマッチングに関しては、肉眼でマッチングさせるべき領域が観測できた場合、ほぼ正しく重複領域を検出し、重複処理を行うことが出来た。ただし、画像取り込みと試料走査の非同期により、実際の蛍光画像とは異なった蛍光画像が観測される場合があり、この場合、マッチングの精度が下がる箇所が時折観測された。これについては、観測される蛍光画像から同期のタイミングを自動判別することが出来るようにハードウェア側の改良で対応する。

本研究の実時間性の基準である3分以内に、細菌を計数するシステムを開発した。開発したシステムは、ノイズが少ない試料に関しては、テンプレートマッチング処理により誤計数が少なく、安定性した計数が可能なシステムである。

4. おわりに

近年、消費者の食の安全性に関する関心は高まっており、徹底した食品衛生管理を行う動きが多くなっている。しかし、従来、衛生検査に採用されていた培養法と呼ばれる手法では、細菌の培養に要する多くの時間と観測者の目に対する疲労が伴い、多くの試料に対して検査を行うにはあまり効率的とはいえない。そこで本研究では、培養法での問題点を解決するために、3分以内に検査が終了する実時間性と、1つの試料で常に同様の結果が得られる安定性を重要視し、衛生検査をコンピュータにより自動化する方法を提案しそのシステムを開発した。さらに、実際の試料により実験結果から開発したシステムの有用性と改善点を示した。

謝辞

本研究は、平成15年～17年都市エリア産学官連携促進事業(一般型)ならびに平成18年～20年都市エリア産学官連携促進事業(発展型)の助成を受けたものである。

参考文献

[1] 大坪雅史, 宮原則行, 剣持美帆, 澤辺智雄, 山崎浩司, 高橋信行, 藤原里美, 須貝保徳, 荒磯恒久, “培養併用光 in situ ハイブリダイゼーション法を応用した食品衛生細菌の新しい迅速検査法”, 食品工業論文誌, vol. 49 No. 20, pp. 46-53, 2006.