

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号： 51303
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010 ~ 2012
 課題番号： 22580299
 研究課題名（和文） デジタルホログラフィを利用したカビ菌糸の迅速自動検出法の開発
 研究課題名（英文） Development for rapidly automatic detection of fungi with digital holography
 研究代表者
 那須 潜思（NASU SENSHI）
 仙台高等専門学校・知能エレクトロニクス工学科・教授
 研究者番号： 80208066

研究成果の概要（和文）：

本研究では、微細なカビ菌糸の存在を検出する方法としてデジタルホログラフィを取り上げ、これを使ったカビの撮影・再生方法について検討した。振動の影響を受けやすい位相シフト法を用いずに、SN 比を確保しやすい光学系について検討した結果、Gabor 型が優れていることを示した。また、青カビを培養して成長過程を逐次撮影する実験を行い、再生画像の 2 値化画像から、約 1 日の培養でカビの存在を検出可能であることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we use digital holography for detection of fungi, and examined about a method to achieve higher signal-to-noise ratio (s/n). It was shown that Gabor type optical setup was good for better s/n. Next, investigation of consecutive observation by digital holography for detecting viable fungus in agar media was done. From the binary images, fungi could be detected within a day of incubation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
2012 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：画像処理・画像認識，光応用計測

1. 研究開始当初の背景

食品，医薬品，化粧品などへのカビの混入は，品質問題上重大である。しかし，カビが成長して形状や色を目視で確認できるようになるまでには 1 週間もの長時間が必要とされるため，迅速に計測できる装置の開発への強い要望がある。現在，カビの検査法としては，培養法の他に DNA を利用して検出する方法が提案されている。DNA を用いる方

法は，迅速であることに加えて種類の同定まで正確にできる特長がある反面，殺菌されて死んだものにも反応してしまう。そのため生きたカビの検出が目的である上記の検査方法としてはあまり普及しておらず，依然として培養法が主流である。

一方，研究代表者らは，これまでに食品中に生存する菌数（生菌数）を培養法で迅速に検査する装置の開発に向けて研究を進めて

おり、その成果の一部は既に実用化している（図1参照）。この方法を我々は、「逐次観測によるデジタル顕微鏡法」と呼んでいる。この方法によって、食品中の生菌数検査の代表である標準平板菌数測定法において目視検査で24ないし48時間要していた検査時間を、大幅に短縮することができた。その特徴は次のとおりである。

- (1) 培養中における逐次観測によって、生きている菌だけを確実に検出可能であること。
- (2) 近接したコロニー（生菌のかたまり）が重なり合う以前の画像を使うことによって、重なりによる誤計数を回避し正確な計数ができること。
- (3) 画像取得におけるピント合わせ不要な光学系の工夫によって、コロニーがまだ数十 μm という目視では不可能な微小な段階で、自動計測を可能としたこと。
- (4) 短時間で自動計測終了後、規定時間経過後に目視検査をすることによって、食品衛生法を全うできること。

最近の研究成果としては、暗視野照明にP偏光および長波長光を併用することによって、画像の取得時における高コントラスト化を達成し、その結果直径90mmのシャーレに混釈した大腸菌の生菌数を約8時間で測定できることを示した。

上記の生菌数計測法をカビの検出に適用しようとする、上記の(1)と(2)の考え方は利用可能と考えられる一方で、次の問題が生じる。カビの菌糸は数 μm と細く、これまでに計測してきたコロニーより1桁も小さいため、上記で用いた光学系の適用が困難である。そのため、これまでの延長技術ではなく、光の位相を利用して被写体の情報を記録する新しい手法の導入を試みる。



図1 以前に開発した生菌数迅速計測装置

2. 研究の目的

本研究では、数 μm のカビの菌糸をピント合わせ不要で検出する技術として、三次元計測の分野で知られている「デジタルホログラフィ」技術の適用を試みる。デジタルホログラフィとは、従来のホログラフィでは物体光と参照光の干渉縞を高解像度の特殊写

真乾板上に露光するのに対して、近年のデジタルカメラに使われている高解像度イメージセンサを写真乾板の代わりに用いて干渉縞を記録し、コンピュータ内の計算で像の再生処理を行う技術である。デジタルホログラフィをカビの検出へ適用することの利点を以下にまとめる。

- (1) レンズによる結像を全く用いないために、撮影時にピント合わせが不要。
- (2) 光の位相情報を利用するため、透明に近く数 μm という微小なカビ菌糸でも検出可能。本研究では、デジタルホログラフィという比較的新しい技術を用いて、カビの微小な菌糸の検出に適用して、カビ検出における計測時間の大幅な短縮を目指す。

一般的にデジタルホログラフィでは、干渉縞が細くなりすぎないように、参照光と物体光を同軸上で合成し、イメージセンサへ垂直に入射させる構成が用いられる。その場合、ホログラムの撮影において、参照光の位相を3種類以上変化させて3回以上撮影し、得られたホログラムに対して位相シフト法を適用して、不要な干渉成分の除去処理が行われることが多い。そのような位相シフト法が、透過物体である寒天培地中にあるカビ菌糸に十分適用可能であるのかどうか、もしも問題があればその問題を回避または低減する手段について検討することが第1の目的である。

次に、本研究におけるカビの検出に適したホログラムの撮影方法が決まったら、デジタルホログラフィ技術を利用してカビの検出の可能性の確認、および培養後どれだけの時間経過すれば、ホログラフィ再生画像からカビの存在を判定できるようになるのかについての検討を行うことが第2の研究目的である。

3. 研究の方法

(1) ホログラムの撮影方法についての検討
まず、研究目的の1番目であるカビ菌糸を検出するために適切なホログラムの撮影方法について検討する。

本研究補助金で購入した微小な距離のシフトが可能なピエゾ素子を用いて、位相シフト光学系を構成した。それを用いて位相シフトデジタルホログラフィの予備実験を行った結果、防振台を用いても振動の影響を避けきれず、物体部分に縞模様が残る問題が見られた。これは本研究で扱う2,3 μm 程度の太さの菌糸の撮影においては、極微小な振動であっても位相シフト法のために3回撮影すると、その各ホログラムの間で位置ずれが生じてしまい、再生画像にその影響が残ったと考えられた。また、振動による外乱の影響を受けないように実験装置に工夫を凝らす方法も考えられるが、費用が膨大になり現実的

でない。そこで、位相シフト法を使わず1回だけの撮影で済ませる方法について検討する。

位相シフト法の適用時によく使用される基本的な透過型のデジタルホログラフィの光学系の配置(図2)を用いる場合と、図3に示すGabor型と呼ばれる参照光を物体光と分離しない光学系について、再生画像のコントラスト等の品質の比較検討を行う。

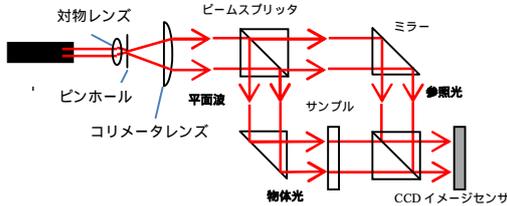


図2 デジタルホログラフィにおけるホログラム取得用光学系の基本構成

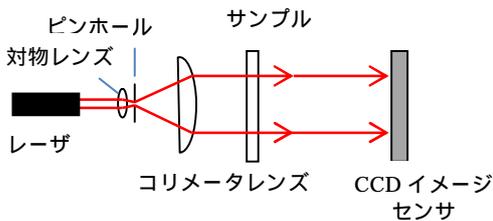


図3 Gabor型のデジタルホログラフィ光学系の構成

使用した機器と光学部品の仕様を表1に示す。今回の実験でサンプルは、爪楊枝の先に太さ20~30 μm の綿糸を付けたものを用いる。まず、図2のように透過型デジタルホログラフィの光学系を構築する。次にサンプルをイメージセンサから20cmの位置に挿入し、通常の透過型でホログラムの撮影を行う。次に図2光学系において参照光の光路を黒い紙で遮断することによって等価的にGabor型の構成として、ホログラムの撮影を行う。最後に、ピント距離を綿糸へ合わせて画像再生を行い、最もピントが合っていると思われる再生画像中でSN比を測定し、測定結果から比較検討を行う。SN比は式(1)で定義する。

$$\text{SN比} = \frac{\text{綿糸付近の平均階調値} - \text{綿糸の信号}}{\text{綿糸付近の平均階調値} - \text{ノイズ}} \quad (1)$$

図4に示すSN比の測定範囲例のように、測定対象である綿糸の階調値を赤枠内で複数取得し、最も階調値が低い点の値を綿糸の信号とする。また、綿糸近傍の階調値を緑枠内から複数取得し、最も階調値が低い点の値をノイズとする。これらの値と緑枠内の平均階調値を綿糸付近の平均階調値として計算を行う。同様の計算方法でそれぞれの再生画像

から90ヶ所ずつ測定する。

表1 使用機器の仕様

使用機器	仕様等
光源	半導体レーザー (λ :635nm, 最大出力:20mW)
対物レンズ	顕微鏡対物レンズ($\times 60$)
コリメータレンズ	$f = 200\text{mm}, 50\text{mm}$
ピンホール	3 μm 径
直角プリズムミラー	一辺:50mm, 波面精度 /4
ビームスプリッタ	一辺:50mm, 波面精度 /4
イメージセンサ	Apogee ALTA U16M 画素ピッチ:10 μm 画像数:4096 \times 4096 撮影範囲:36.7mm \times 36.7mm

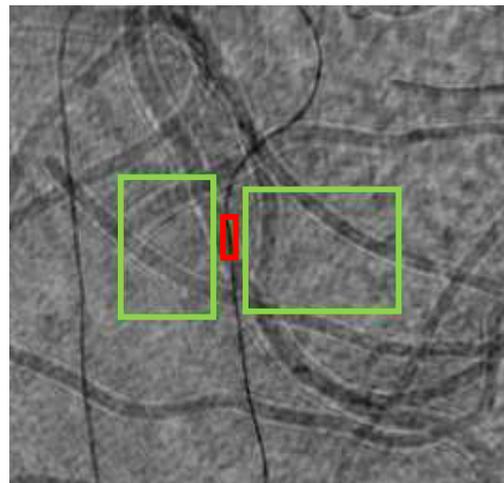


図4 SN比計算のための階調値取得範囲例

(2) 青カビの撮影・再生と逐次観測実験

まず、実際に青カビを培養して、ホログラフィで菌糸がどの程度のSN比で撮影できるのかについて確認する。

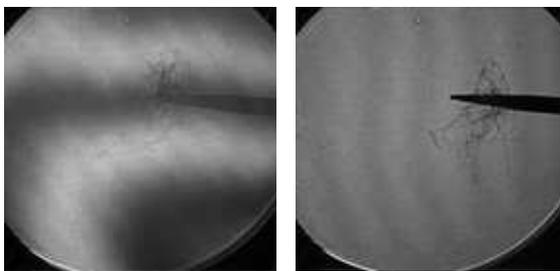
寒天培地中の菌糸の観測を行うため、図3の光学系を使用し、表1の機器を使用して実験を行う。サンプルとして、厚さ約2mmのポテトデキストロース寒天培地に青カビの胞子を混ぜた液体を数滴垂らして、培地表面から染みこませたものを使用する。25 $^{\circ}\text{C}$ に設定したインキュベータ内に18時間放置して培養したものをサンプルとしてホログラムを取得する。サンプルはイメージセンサから65mm離れた位置に挿入して撮影する。また、同時に光学顕微鏡でも同じサンプルの菌糸の撮影を行い、再生画像と比較することで、菌糸を観測できるか検討した。また、菌糸近傍の階調値を取得し、SN比を測定する。

次に、カビの成長過程を以下のようにしてインターバル撮影を行う。カビの培養は実験条件としては一定温度とすべきであるが、ホ

ホログラフィ光学系全体を恒温装置内に設置することはできない。このため、光学系を覆っている暗幕内にヒーターを設置して、暗幕内部の温度が 25 付近になるように設定した。実際にはおおよそ 22 から 25 の範囲内であった。ホログラム取得用のカメラをパソコンから制御し、30 分間隔で自動撮影する。撮影されたホログラムから、角スペクトル法を用いて再生計算を行う。また、視野全体の背景の光量の均一性を向上させるため、各時刻の画像を初期画像で除算する。こうして得た再生画像にしきい値処理を施して、カビの部分と背景との識別を行う。しきい値としては、経験的に 256 階調の 1/2 である 128 とした。

4. 研究成果

(1) ホログラムの撮影方法についての検討
通常参照光と物体光を別経路で与えた場合(図 2)と参照光を遮って撮影した場合(図 3 の Gabor 型に相当)の綿糸の再生画像を、それぞれ図 5(a)および(b)に示す。また、両者の SN 比の比較結果を図 6 に示す。



(a) 透過型 (b) Gabor 型

図 5 光学系の違いによる綿糸再生画像の比

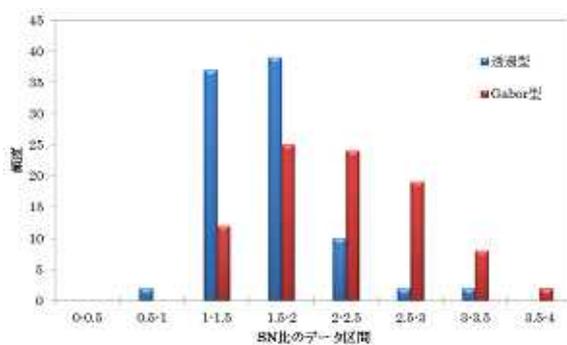
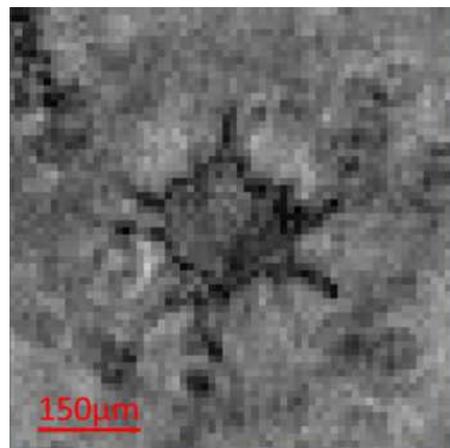


図 6 光学系の違いによる SN 比の分布の違い

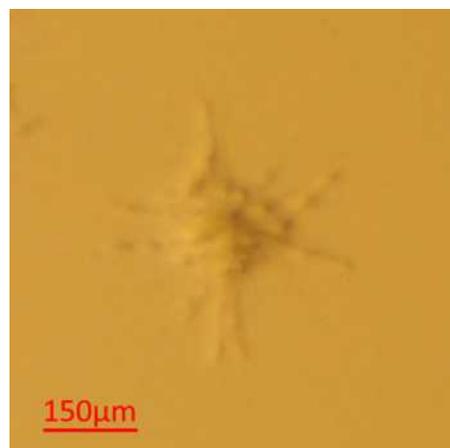
図 5(a)の通常の透過型の場合には、背景の培地部分にも干渉縞が見られるだけでなく、綿糸や爪楊枝の部分の黒の濃度が図 5(b)と比べて薄いことが見て取れる。また、図 6 から、Gabor 型を用いる方がコントラスト比が高くなることが確認され、しきい値処理に有利であると考えられる。これらの結果から、位相シフト法を用いずに計測する場合には、Gabor 型の光学系が優れていることがわかった。

(2) 青カビの撮影・再生と逐次観測実験

約 25 で 18 時間培養した青カビについて、ホログラフィ再生画像と顕微鏡写真画像のカビ部分を拡大したものをそれぞれ図 7(a)および(b)に示す。図 7 の 18 時間経過時点では、目視では確認が困難であるが、培地表面の内部に存在するカビがホログラフィ再生画像にはっきりと写っていることがわかる。



(a) ホログラフィ再生画像中のカビ



(b) (a)と同じ場所の顕微鏡写真

図 7 菌糸の写真の比較

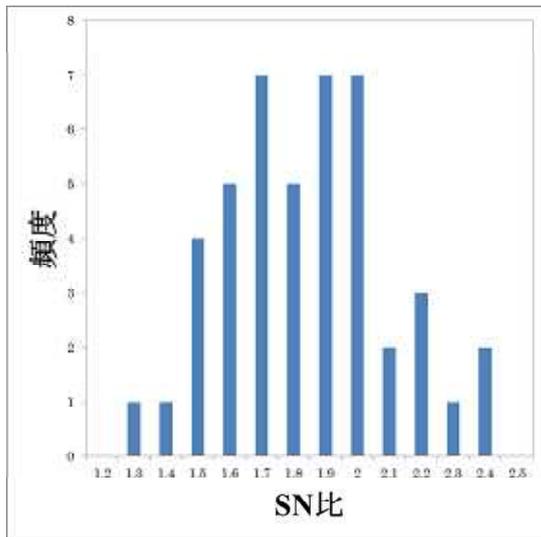


図8 カビ画像のSN比の頻度分布

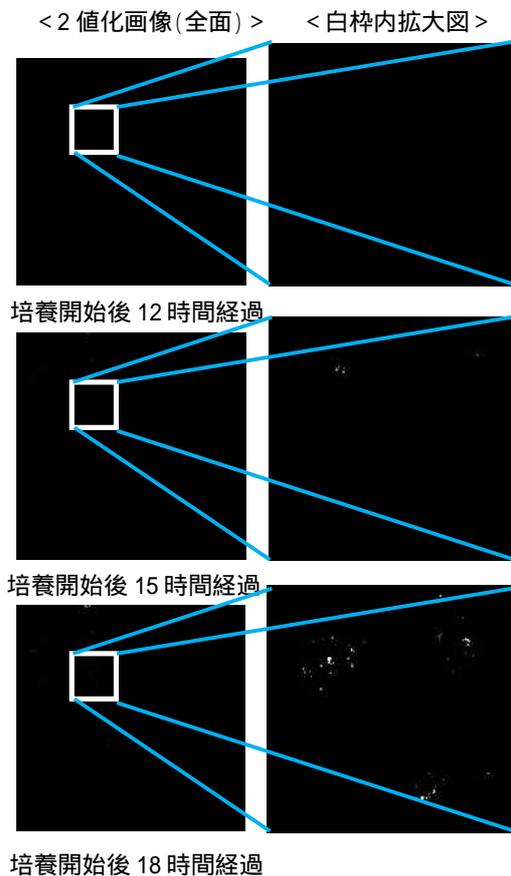


図9 逐次観測による2値化画像例

18 時間培養後の青カビの部分とその近傍の背景部分との SN 比の出現頻度分布をまとめた結果を図 8 に示す。これより、SN 比が 1.7~2.0 くらいの頻度が高いが、1.6 以下のものもあることがわかる。これは、カビの成長速度にばらつきがあることも一因だが、それよりも背景のノイズの状況による影響が

大きい。したがって、ノイズの除去法についてさらなる検討が必要と考えられる。

次に、青カビの成長過程の逐次観測実験結果について述べる。現時点では、カビの形状情報を利用したノイズ除去処理が未完成のため、カビ以外のノイズを残さないようにするために、しきい値を高め設定している。そのため迅速性はやや犠牲になっている。培養開始から、12 時間、15 時間、18 時間経過後の再生画像を初期画像で除算処理し、2 値化した後の画像を図 9 に示す。図 9 の左側の 3 枚はエリアセンサ全範囲(36.7mm×36.7mm)の 2 値化画像、右側の 3 枚はその一部分(白枠内)の拡大画像である。12 時間後の 2 値化画像にはカビに対応する白点は認められない。しかし 15 時間後には、拡大図中の左上付近に小さい白点の集まりが認められ、検出され始めていることが確認できる。さらに 18 時間後になると、15 時間後にはしきい値を越えていなかった下の方にもカビの成長に伴う白点が見られている。この実験では、18 時間で画面内のほとんどのカビに対応する位置に白点が認められ、検出をほぼ完了できた。また実験のサンプル数が不足しているため、青カビの検出に必要なとされる時間を正確に把握できてはいないが、おおよそ培養後 1 日程度で検出が可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

鍵谷龍樹, 那須潜思, 竹茂求, 小川廣幸, Gabor 型デジタルホログラフィを用いたカビ菌糸観測に関する検討, 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 30a-PA1-8, (2013.3.30), 神奈川工科大

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 潜思 (NASU SENSHI)

仙台高等専門学校・知能エレクトロニクス工学科・教授

研究者番号: 80208066

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし