

令和元年6月7日現在

機関番号：51303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07976

研究課題名(和文)コロニーの色判別に基づく腸内細菌検査における病原性菌の自動判別法の開発

研究課題名(英文) Development of a methodology for automatic bacterial distinction between pathogenic and non-pathogenic by color discrimination on bacterial colonies in stool test

研究代表者

那須 潜思 (Nasu, Senshi)

仙台高等専門学校・総合工学科・教授

研究者番号：80208066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌検査に関して、SSおよびEMAC 寒天培地を用いて、それぞれサルモネラおよびEHEC(026, 0111, 0157)の疑いがある検体を確実に自動検出する方法について検討した。また、サルモネラおよびEHECについて、各々陽性および陰性の未知検体を各20検体以上用意し、自動判定実験を行った。陽性検体を陽性と判定した割合(感度と呼ぶ)と陰性検体を陰性と判定した割合(特異度と呼ぶ)についてまとめた結果は、サルモネラでは感度100%、特異度87%、EHECでは感度100%、特異度60%であった。いずれの場合も、当初の目標であった陽性検体を見落とすことなく、検体数を半分以下にスクリーニングできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、現在は目視で行われている腸内細菌検査における第一段階のスクリーニング検査について、コロニーの色情報を画像解析して自動化することを試みるものである。この検査は、大きな機関では一日に数万検体を処理する場合がある。しかし、検体の陽性率は極めて低く(サルモネラ属で0.04%、0157で0.002%、赤痢菌は殆どなし)、検査労力の殆どが単純作業ではあるが見落としは許されないという人間に不向きなスクリーニングに費やされている。本研究結果により、60%の検体の陰性を自動判定できれば、人間の労力を残りの40%の二次検査以降に集中することができるため、無駄な労力とコストの大幅削減が実現できる。

研究成果の概要(英文)：In the stool test, automatic testing method that can find Salmonella and EHECs(026, 0111, 0157) with Salmonella-Shigella agar or EMAC-II agar was studied. Over twenty unknown samples each with or without Salmonella and EHECs(026, 0111, 0157) were prepared, then automatic screening examination to distinguish positive candidates from negative candidates was implemented. The results in the automatic screening, the sensitivity was 100% and the specificity was 87% concerning to Salmonella and the sensitivity was 100% and the specificity was 60% concerning to EHECs(026, 0111, 0157). In both cases, the number of the samples could be reduced to less than half with this screening without missing positive candidates.

研究分野：工学

キーワード：腸内細菌検査 画像処理 サルモネラ EHEC 感度・特異度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大量調理施設衛生管理マニュアルや労働安全衛生規則等に基づき、調理従事者等は月に1回以上、定期的に腸内細菌検査を受ける必要がある。このため、腸内細菌検査の件数は膨大な数に及ぶが、その中で陽性検体は数千件に一件以下と発生確率が低いため、検査の第一段階として目視によるスクリーニング検査を実施されている。スクリーニング検査は、検体を専用の寒天培地に塗抹して一日培養し、細菌のコロニーの色彩等を目視で観察し、陽性が疑われるものを分別するものである。スクリーニングにおいて陽性が疑われた検体には、続いて生化学的性状検査や血清学的試験などの詳細な検査が行われる。このスクリーニング検査は、大きな機関では一日に数万検体を処理する場合がある。しかし、検体の陽性率は極めて低く（サルモネラ属で0.04%、O157で0.002%、赤痢菌は殆どなし）、検査労力の殆どが単純作業ではあるが見落とすは許されないという人間に不向きなスクリーニングに費やされている。

スクリーニング検査では、検査目的の菌の成長を選択的に促進すると共に他の菌の成長を抑制し、かつ、菌の種類によってコロニーの発色が異なる寒天培地を利用する。例えば、ニュートラルレッドなどの pH 指示薬を用いる寒天培地が広く普及しており、サルモネラ (Salmonella) 属と赤痢菌 (Shigella 属) に SS 寒天培地 (Salmonella-Shigella Agar) を用いれば、サルモネラ属と赤痢菌は無色半透明のコロニーに成長し、さらにサルモネラ属は産生した硫化水素でコロニーが黒変する。一方、大腸菌 (E.coli) などの無害な腸内細菌は、もし発育しても乳糖を分解して酸性に傾き赤系色に着色する。また、O157 や O111 などの腸管出血性大腸菌 (EHEC) に SMAC 寒天培地を用いれば、EHEC では、ごく中心部のみ赤みを帯びた濃緑色または群青色を呈するのに対して、EHEC 以外では様々あるが、主なものはコロニー周辺部が赤色に着色した濃緑色、あるいはコロニー全体が赤または無色等を示す。

2. 研究の目的

前述のように、現在目視で行われている腸内細菌検査におけるスクリーニング検査は、検体数が膨大であるにもかかわらず、そのほとんどが陰性検体である。このため、本研究では目視検査に先立って、コロニーの色情報の画像解析による機械的な第一段階のスクリーニング検査を導入し、目視検査における膨大な検体数を半分未満に絞り込むことを目的とする。これによって、目視検査における無駄な労力とコストの大幅削減を狙うものである。自動化が困難とされてきた理由の一つは、腸内細菌は菌種と菌数が膨大であると共に、判別対象とする菌によっては目視でも熟練を要するほど微妙な色彩判別が必要なためである。

本稿では、このようなスクリーニングの自動化に関して、適切な照明方法の検討、陽性検体を見落とすことのないスクリーニングのための画像処理方法の検討、検討したスクリーニング方法の評価実験の3項目について報告する。

3. 研究の方法

(1) 照明方法の検討

菌集落を含む検体 (シャーレ) を撮影する場合において、検出対象菌の集落の色調や特徴を確実に写し撮るための照明方法について検討を行う。光源としては、ファイバライトガイドを用いた点光源、ライトガイドによる線状光源、リング状光源、および面光源の4種類を用いた予備実験の結果、点光源と線状光源では照度の不均一性が強く顕れたため、これらを除く2種類の光源のみ用いて比較することとした。さらに、この2種の光源と試料との位置関係によって、表3.1に示すタイプ i からタイプ iv の照明方法について、撮影して得られた画像の比較検討を行う。なお、試料撮影の際の背景としては、照明方法の特徴に合わせて黒または白を選択した。リング状光源としては、MORITEX 社の FLC シリーズで直径が 250mm の冷陰極管を用いた。白色面光源としては、HAKUBA ライトビューア 5700 を使用した。

被写体としての検体は、直径が約 90mm のプラスチックシャーレに入った寒天培地にて培養された、表3.2に示す A~G の7種類のサンプルを使用して行う。

次に、照明方法 ~ について得られた各画像の解析方法について述べる。本研究では、五菌検査と呼ばれる5種類の病原菌 (サルモネラ、赤痢、O157、O26、O111) のスクリーニングを行うことを主目的としているため、選択培地としては SS 寒天培地と EMAC 寒天培地の2種を使用して行うことが基本である。しかしこの節では、菌集落の色を安定して取得できる照明方法の検討が目的であるため、必ずしも上記2種の培地にとらわれる必要はない。そのため、菌集落の発色が複雑ではない CT-SMAC 寒天培地と SS 寒天培地を用いて照明方法の検討を行う。

表 3.1 照明方法

	照明の種類	光源の種類	背景色	
	反射型	リング状光源	黒	
	透過型	明視野	白色面光源	
		暗視野	リング状光源	黒
		暗視野+明視野	リング状光源	白

表 3.2 撮影に用いた検体

	使用培地	菌の種類	見た目の色の特徴
A	CT-SMAC 寒天培地	O157	クリーム色
B		陰性の菌	赤味を帯びる
C	SS 寒天培地	サルモネラ菌	黒
D		赤痢菌	クリーム色
E		陰性の菌	赤味を帯びる
F	EMAC 寒天培地	O157, O26, O111	中央：黒 境界付近：緑色
G		陰性の菌	中央：黒 境界付近：褐色

まず、CT-SMAC 寒天培地を例にとって撮影方法の比較方法を説明する。はじめに、同じ撮影方法で撮影した O157 の画像と陰性の菌の画像を 2 枚用意する。それぞれの画像から、コロニーを 10 個ずつ選び、中心付近の 1 ピクセルの色相の値を調べ、それぞれの平均値を割り出す。この 2 つの平均値の差が小さいほど色が似ているため判別しにくく、差が大きいほど判別がしやすいということになる。図 3.1 に、陰性菌集落と陽性菌集落の色相分布の「平均値の差」および「色相の存在分布の差」を模式的に示した。表 3.1 の ~ の撮影方法それぞれで平均値の差を計算し、これらと比較する。さらに、菌集落のそれぞれの色相上の存在範囲の分布の差についても比較を行う。陰性と陽性の菌集落に関して、各々の色分布の存在範囲が狭く、両者の色分布の平均値が離れているものが優れていると考えられる。SS 寒天培地では、赤痢菌の画像と陰性の菌画像を使用して、CT-SMAC 寒天培地と同様に行う。

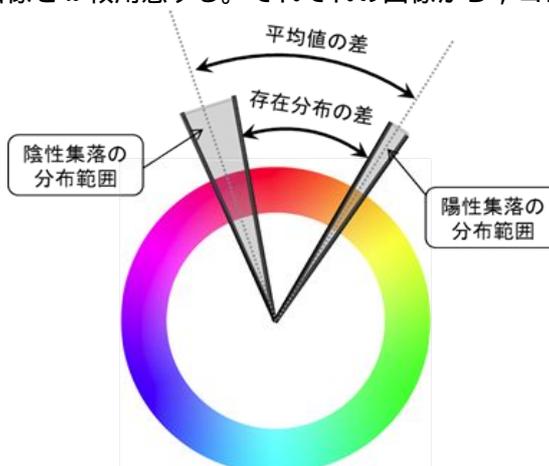


図 3.1 色相環上における菌集落の色相分布に関する「平均値の差」と「色相の存在分布の差」の意味

(2)スクリーニングのための画像処理方法の検討

まず、腸内細菌検査における検体を多数観察および撮影を行い、表 3.2 に概要のみまとめたような特徴を詳細に把握する必要がある。協力企業である(株)BML フード・サイエンスの検査センターにて、腸内細菌検査の検体について、センターの技師により陰性あるいは陽性疑いと判定された検体サンプルを用意して戴いた。ただし、腸内細菌検査は健康な人が対象であるために、陽性の検体数は極めて少なく、撮影当日に存在する陽性疑いの検体数には限りがある。このため、同センターに保管されている陽性の菌株を陰性便に混入し、擬似的に作成された陽性検体も利用することとした。

検体の撮影方法としては、上記(1)で最も良好に区別が可能であると認められた照明方法を利用する。直径が約 90mm のシャーレに入れられた寒天培地に、便を塗抹して約 20 時間経過したサンプルをシャーレのふたを外した状態で、1 枚ずつデジタルカメラで撮影する。画像解析プログラムの開発環境としては、NI 社の LabVIEW 2017 を使用するが、汎用的な処理については、NI 社の Vision Assistant 2017 を用いて作成し、その処理内容を LabVIEW のコードとして取り出してプログラムに組み込んで利用した。

(3)スクリーニングの評価実験

前述の「スクリーニングのための画像処理方法の検討」で検討した判別プログラムを用いて、SS 寒天培地を用いたサルモネラおよび EMAC 寒天培地を用いた EHEC (O157, O26, O111) の判別実験を行う。実験に用いた検体数は、SS 寒天培地におけるサルモネラ陰性検体およびサルモネラ陽性疑い検体画像をそれぞれ 20 シャーレ分用意した。また EMAC 寒天培地における EHEC 陰性検体および陽性疑いの検体画像をそれぞれ 50 シャーレ分用意した。なお、赤痢については、協力していただいた大規模な検査センターでも 10 年に 1 件あるかどうかの低出現頻度であり、陽性検体を入手できないため判別実験を実施していない。

検査の有用性を評価するための指標として、感度と特異度を用いる。感度は陽性検体を正し

く陽性と判定した割合であり、特異度は陰性検体を正しく陰性と判定した割合である。感度と特異度の関係性を図 2.1 に示す。肉眼判定では、陽性の疑いのあるものを陽性検体、陽性検体の疑いのないものを陰性検体としている。図 3.2 の関係から、感度と特異度はそれぞれ、式(3-1)および式(3-2)を用いて求める。

$$\text{感度} = a/(a+c) \times 100 [\%] \quad (3-1)$$

$$\text{特異度} = d/(b+d) \times 100 [\%] \quad (3-2)$$

		肉眼判定	
		陽性	陰性
機械判定	陽性	a 真陽性	b 偽陽性
	陰性	c 偽陰性	d 真陰性

図 3.2 感度と特異度

4. 研究成果

(1) 照明方法の検討

まず、CT-SMAC 寒天培地について、陽性集落と陰性集落の各々の色相分布平均値、および両者の差の計算結果を表 4.1 にまとめて示す。同様に、SS 寒天培地の場合については表 4.2 に示す。また、2 つの寒天培地において計算した平均値の差を撮影方法ごとに表したグラフを図 4.1 に示す。なお、色相は 0~360 の間で環状に色の変化を表すものであり、実際に色相を調べる際もその間で値を出したのだが、計算の都合上、0~360 ではなく、0 を中心として、-180~180 というように変換したため(例えば、345 は、-15 と変換される)、表記がマイナスになっている。表 4.1、表 4.2 より、平均値の差はどの撮影方法においても 30 以上であり、色の違いが十分にあると考えられる。

次に、2 つの寒天培地において計算した色相上の存在分布の差を撮影方法ごとに表したグラフを図 4.2 に示す。計算結果は表 4.3 に示す。表 4.3 中の括弧書きは、色相分布間の値である。表 4.3 より、CT-SMAC 寒天培地については、どの撮影方法でも 25 以上の値となっており、差が十分にあることが確認された。しかし、SS 寒天培地については、CT-SMAC 寒天培地よりも、差が全体的に小さかった。これは、赤痢菌は乳糖遅分解のため、規定培養時間を超えると陰性集落と同様に赤みが出やすい性質があり、本実験においては規定時間の培養後に撮影開始まで室温で数時間保管したために、乳糖をわずかながら分解して赤色寄りに傾き、本来の色相から陰性菌集落の色相に近づいた可能性がある。この点を考慮すると CT-SMAC 寒天培地の結果を主体として検討する方が適切であると考えられるため、「平均値の差」および「色相分布の差」が共に大きい反射型が最も優れていると結論づけられる。なお、透過型・暗視野照明(+明視野照明)と透過型・暗視野照明は、背景の色を黒か白かに変更しただけだったため、結果の傾向が似ているが、全体的に透過型・暗視野照明(+明視野照明)の結果の方が低いいため、この方法は、構成が複雑であるにも関わらず、利点が少ないことがわかった。

表 4.1 CT-SMAC 寒天培地における 2 つの菌の色相分布の平均値とその差

		O157 の色相分布の平均値	陰性の菌の色相分布の平均値	2 つの菌の平均値の差
反射型		32	-18.6	50.6
透過型	明視野	39.2	3	36.2
	暗視野	40.2	-2.6	42.8
	暗視野+明視野	36.9	-0.4	37.3

表 4.2 SS 寒天培地における 2 つの菌の色相分布の平均値とその差

		赤痢菌の色相分布の平均値	陰性の菌の色相分布の平均値	2 つの菌の平均値の差
反射型		22.8	-10.1	32.9
透過型	明視野	35.5	1.2	34.3
	暗視野	35.5	-4.2	39.7
	暗視野+明視野	31.2	-1.5	32.7

表 4.3 2 つの菌の色相上の存在分布の差

		CT-SMAC 寒天培地	SS 寒天培地
反射型		40 (-10~30)	6 (3~9)
透過型	明視野	26 (12~38)	21 (9~30)
	暗視野	31 (7~38)	16 (6~22)
	暗視野+明視野	27 (8~35)	14 (8~22)

(2)スクリーニングのための画像処理方法の検討

スクリーニングとしては、SS 寒天培地を用いたサルモネラとそれ以外の陰性菌との判別方法、および EMAC 寒天培地を用いた腸管出血性大腸菌 EHEC(O157, O26, O111) とそれら以外の陰性菌との判別方法について検討を行った。両者について、以下に判別方法の考え方について述べる。

SS 寒天培地を用いたサルモネラの判別処理としては、最初にシャーレ全体が撮影された画像から、円の検出等によってシャーレの縁部分を検出し、シャーレ内部だけ1でそれ以外は0のマスクを生成する。そのマスク画像と元画像の積演算を施すことによって、シャーレの内部だけを抽出した。次に、切り出されたシャーレ内部画像において、寒天培地と菌集落と見られる部分を識別して、菌集落部分を抽出した。集落部分の抽出においては、集落と培地との境界が鮮明でない場合には、集落が欠落しないように、膨張処理を用いて集落周囲の培地部分も含めて抽出している。その場合でも、ヒストグラムにおいて本来圧倒的に出現頻度の高い培地部分のピークを低くすることができるため、効果が期待できる。菌集落が陰性が陽性疑いであるかを判別する処理の流れを図 4.1 に示す。EMAC 寒天培地を用いる EHEC の判別処理においても、SS 培地の場合と同様に、まずシャーレ内部の抽出を行い、続けて菌集落部分の抽出を行った。EHEC の集落の特徴は、中央部が暗黒色でコロニーに接したごく近傍の培地が緑色になるが、非 EHEC の陰性菌の中には、中央部が暗黒色でも周辺部が赤色または無色を呈するものがあるため、EHEC の判別においては、集落の中央部と周辺部の両方の色相を判定することで、陰性と陽性疑いの識別精度の向上が期待できる。その判別処理の流れを図 4.2 に示す。

なお、SS 寒天培地、EMAC 寒天培地のいずれにおいても、画像判定の途中で処理が異常終了することが稀に発生した。そのような場合には、それも「陽性疑い」として扱うこととした。これは後述の特異度が低下する要因にはなるが、陽性の検体の見落としを避けるために必要であると判断して採用した。

(3)スクリーニングの評価実験

SS 寒天培地におけるサルモネラの判別実験の結果を表 4.4 に示す。表中に示したとおり、感度は 100%、特異度は 86%となった。感度が 100%ということは、陽性の疑いがある検体は全て見落としなく「陽性」として判別されていることを表す。一方、特異度が 86%ということは、「陽性(の疑いあり)」と判定された検体には、陰性のものも 14%含まれていることを表している。

次に、EMAC 寒天培地における EHEC の判別実験の結果を表 4.5 に示す。表中に示したとおり、感度は 100%、特異度は 60%となった。こちらにおいても、感度 100%を達成することができたが、特異度は 60%であり、サルモネラの場合と比べて低かった。その主な理由として、EHEC 以外の陰性集落においても中央が暗黒色で集落の縁内部が緑色のものも存在しており、それらをはじめとして特徴が陽性集落と非常に似ているものが存在することが挙げられる。このように、感度 100%を維持したままで特異度を上げることは容易ではないが、当初目標としていた「機械判定による第一段階のスクリーニングによって、検体数を半分未満に減らす」という点は、特異度が 50%を超えているために達成されたと考えら

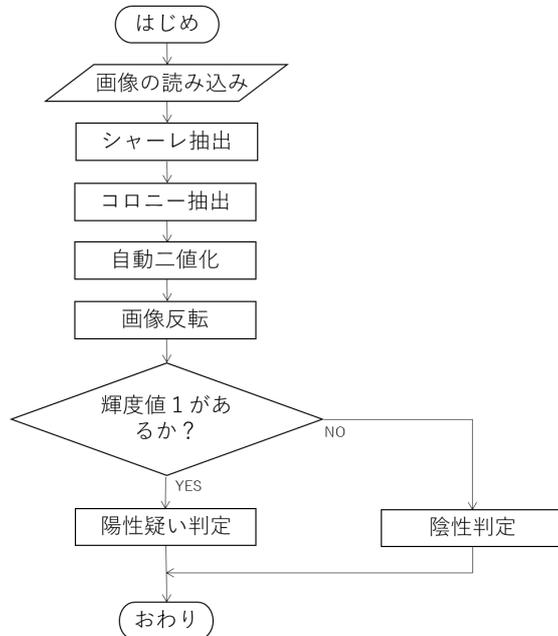


図 4.1 SS 寒天培地におけるサルモネラ集落の判定方法

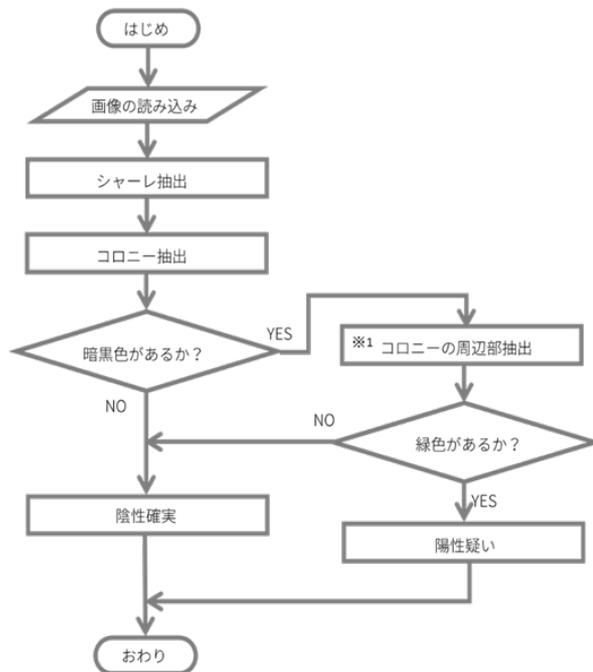


図 4.2 EMAC 寒天培地における EHEC 集落の検出方法

れる。

表 4.4 SS 寒天培地におけるサルモネラ判定の感度と特異度

		肉眼判定			感度・特異度
		陽性[枚]	陰性[枚]	合計[枚]	
機械 判定	陽性[枚]	20	4	24	100% (感度)
	陰性[枚]	0	26	26	86% (特異度)
	合計[枚]	20	30	50	

表 4.5 EMAC 寒天培地における EHEC 判定の感度と特異度

		肉眼判定			感度・特異度
		陽性[枚]	陰性[枚]	合計[枚]	
機械 判定	陽性[枚]	50	20	70	100% (感度)
	陰性[枚]	0	30	30	60% (特異度)
	合計[枚]	50	50	100	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

梅津千安希, 那須潜思, 中川 弘, 腸内細菌検査における病原性菌の陽性判定に関する検討, H28 電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, 2G05 (2016.8)

梅津千安希, 那須潜思, 中川 弘, 腸内細菌検査における培地上の集落の色相値と明度値を利用した自動判定に関する研究[第 2 報], 第 37 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 B-10, 2016, p66

森 芽生, 那須潜思, 腸内細菌検査におけるスクリーニング検査の自動化に関する検討, H30 電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, 1D06, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 中川 弘

ローマ字氏名: Nakagawa Hiroshi