

リアルタイムコロニーカウンターScanStation®を用いた判定の迅速化とコロニー識別機能の評価

株式会社紀文安全食品センター 中川由未

1.はじめに

食の安全性を確保するためには微生物による衛生管理が非常に重要であり、迅速な結果の判断や信頼性、正確性も重要なポイントである。リアルタイムでコロニーをカウントし同時に培養も行えるインターサイエンス株式会社の ScanStation®では、こうしたリスク管理の部分に対する機能が備わっている。本装置は、恒温培養器としての機能を有しながら、同時にコロニー数を継続的に計測することが可能である。培地種類毎に異なる培養時間を設定し、培養開始時間が異なる場合でもそれぞれ独立して設定通りの培養時間で計測できるため、複数種類の培地を任意のタイミングで開始することができる。培養中のシャーレは 30 分又は 1 時間ごとに自動撮影し、経時的な画像を比較することで成長するコロニーのみをリアルタイムでカウントする。さらに、記録された培養時間と計数値のモニタリング結果からコロニー検出推移のグラフが自動作成されるため、従来のように培養終了後まで待つことなく、早期の段階で閾値超過の有無を判定することが可能となる。

また、コロニー識別精度に関して、食品検査ではフィルターを通過してしまう微細な残渣に起因する課題が存在する。培養後のシャーレにコロニーと残渣が混在することで判断が困難となり、経験の浅い検査員が判断に迷うケースが生じる。しかし、ScanStation®では画像解析技術等により培養初期段階からカビを含む微生物を正確にカウント可能なため、識別精度が高く結果判定までの時間を大幅に短縮できる可能性がある。さらに、自社開発したシステムを本装置と連携させることで、判定作業の省力化を実現し、微生物検査の DX 化を進める上で有用性が期待される。

今回は本装置のコロニーカウントシステムを利用し、菌株ごとの発育速度に違いがあるのか(検証 1)、また食品残渣の多い検体の場合どの程度見分けられるか(検証 2)の 2 つの検証を行った。

2.材料および方法

2-1.供試菌株

本検討では、食品の変敗や品質劣化に関与する微生物を中心に、計 9 株を選定した。選定にあたっては、自社保有分離菌株のうち、変敗や発酵に伴うガス生成の原因となり得る乳酸菌や酵母をはじめ、変色や腐敗の原因となる菌株、腹痛や重篤な食中毒症状を引き起こすおそれのある食中毒菌、さらに魚介類や農作物に付着していることが多く加熱耐性をもつ変敗菌を対象とした。

表 1 使用菌種リスト

菌種	由来
<i>Leuconostoc citreum</i>	環境
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	環境
<i>Serratia marcescens</i>	環境
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JFRL精度管理用標準株
<i>Staphylococcus aureus</i>	菌株保存機関から購入
<i>Sporosarcina aquimarina</i>	環境
<i>Bacillus cereus</i>	環境
<i>Bacillus subtilis</i>	環境
<i>Paenibacillus</i> sp.	環境

2-2.菌液調製と培地及び試験方法

細菌の増殖に最も適した温度（至適増殖温度）は菌種によって異なり、一般に低温細菌（至適増殖温度；12～18℃、0℃で増殖可能）、中温細菌（至適増殖温度；25～40℃）、高温細菌（至適増殖温度；55～65℃）に大別される。検証には食品の変敗に関する細菌を主に使用し、その多くが中温細菌であるため培養温度を 35℃とした。

マイクロバンク(イワキ株式会社)で保菌している菌株それぞれ 1 ビーズをあらかじめ用意した試験管の SCD 液体培地(栄研化学株式会社)にとり 35℃で 24 時間培養して得られた菌液を原液とした。

検証 1 ではこの原液をリン酸緩衝生理食塩水(栄研化学株式会社の滅菌希釈水 TP2000)で 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍に希釈し、菌数を測定するために混釈法を用いて検証を行った。混釈したシャーレは 35℃に設定した ScanStation®で 48 時間培養した。

検証 2 で使用する食品は滅菌不織布フィルターバックを使用しても通過してしまう卵や豆類を選定し、残渣と比較する微生物は 1 コロニーが比較的小さい乳酸菌で検証した。食品は 10 g サンプルングレリン酸緩衝液で 10 倍に希釈した後、菌の原液を 1 ml 添加したものを検体の原液とし、10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍に希釈し、標準寒天培地と混釈して 35℃に設定した ScanStation®で 48 時間培養した。

3.結果と考察

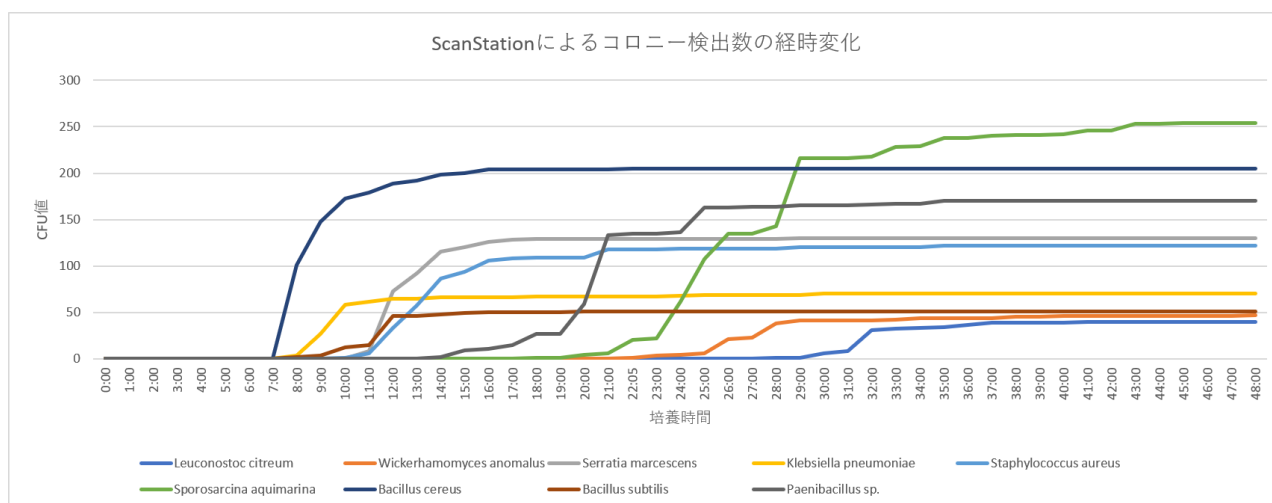
3-1.増殖速度(検証 1)

菌の増殖には4つの段階があり、最初の段階を誘導期と呼び、この段階では菌数にさほど変化はなく、菌が分裂を始めるための準備の期間である。その後、対数増殖期へと入ると菌は分裂を開始し、対数的に一定の間隔で増殖を繰り返すため、一定の増加率を示す。対数増殖期に死滅する菌もいるが、わずかなである。対数増殖期における急激な微生物の増殖に伴い、栄養素の枯渇やpHの変化等で菌数増加率の低下が起こり、増加数と死滅数が同等となり生菌数が一定に保たれる静止期に入る。やがて、徐々に死滅する菌の方が増え死滅期へと繋がる。この経過時間とコロニーカウント数から増殖曲線を作成できるが、今回の検証では、通常の生菌数測定による増殖曲線とは異なり、ScanStation®を用いて1時間ごとにシャーレを自動撮影し、その画像データからコロニーのみをカウントするシステムを利用した。(表2)これにより経時的に得られた累積コロニー数の推移をグラフ化し、菌株ごとの挙動の違いを比較した。(表3)なお、測定の信頼性を確保できるよう最終測定コロニー数が1シャーレ上に30~300の有効範囲内に収まるコロニー数のデータを選別して採用した。

表2 最終測定コロニー数と最大値到達時間 培養条件：35℃/48時間

	菌種	菌数	シャーレ希釈倍率				カウント数 最大値到達 時間
			× 10	× 10 ²	× 10 ³	× 10 ⁴	
1	<i>Leuconostoc citreum</i>	4.0×10 ³	TNTC	40	1	0	41時間
2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4.7×10 ⁴	TNTC	TNTC	47	1	40時間
3	<i>Serratia marcescens</i>	1.3×10 ⁵	TNTC	TNTC	130	16	29時間
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.0×10 ⁴	TNTC	TNTC	70	9	30時間
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.2×10 ⁴	TNTC	122	11	1	35時間
6	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	2.5×10 ³	254	21	3	0	29時間
7	<i>Bacillus cereus</i>	2.0×10 ³	205	22	0	0	22時間
8	<i>Bacillus subtilis</i>	5.1×10 ⁴	TNTC	TNTC	51	2	20時間
9	<i>Paenibacillus</i> sp.	1.7×10 ⁵	TNTC	TNTC	170	13	35時間

表3 菌株別のコロニー検出数の推移



各菌株について、48 時間培養中に得られた最大カウント値に初めて到達した時刻を最大値到達時間とし、比較したところ、それぞれ異なる結果が確認できた。最も早く最大カウント値に到達した菌株では既定の 48 時間と比べて 24 時間以上早い時点で、おおむね最大値に近い計数結果が得られた。ただし、早期判定に適用する際には、菌株や検体毎に最終判定値との一致を確認する必要があり、本検討は装置特性を把握するための予備的な事例検討として実施した。

3-2.コロニーと残渣の識別性能（検証 2）

食品の微生物検査において、培養シャーレ上に形成されるものがコロニーであるか、食品の残渣であるかを識別するには知識と経験が求められる。目視による色調・形態や大きさ等で判別できる場合もあるが、顕微鏡観察やグラム染色による詳細な確認が必要となるケースも少なくない。これら一連の作業には多大な時間と労力を要するため、検査担当者の習熟度が不可欠となる。しかし ScanStation®を用いることで、シャーレの連続的な自動撮影が可能となり、コロニーの場合は経時的な成長過程が画像から確認できるため、残渣との識別が容易となる。

この検証では、比較的大きめの食品残渣を培地と混釈したシャーレと食品残渣及び比較的生育コロニーが小さい乳酸菌を添加し培地と混釈下シャーレとで比較したが、食品残渣そのものによる明らかな誤判定は確認されなかった。（表 4）（表 5）

しかし、経時画像の観察から、培養途中に出現した水滴がコロニーとして誤検出された可能性が考えられた。この水滴は、庫内温度（35℃）と室温（20℃）の温度差や高湿度環境に起因し、シャーレ内に発生したものと推察される。こうした結露の発生が判定に与える影響やその制御条件については十分な比較試験を行っていないため、因果関係の特定には今後の追加検証が必要である。

表 4 食品残渣が入ったシャーレとそこに乳酸菌を添加したシャーレのカウント数

検体名	菌数	シャーレ希釈倍率			
		× 10	× 10 ²	× 10 ³	× 10 ⁴
乳酸菌(<i>Leuconostoc citreum</i>)	4.2×10 ³	TNTC	42	5	1
錦玉子	0×10	0	1*	0	0
錦玉子 + 乳酸菌	7.8×10 ³	TNTC	78	10	0
ゆで卵	0×10	0	3*	0	0
ゆで卵 + 乳酸菌	5.3×10 ³	TNTC	53	9	0
黒豆	0×10	0	6*	0	0
黒豆 + 乳酸菌	9.8×10 ³	TNTC	98	10	0
お多福豆	0×10	7*	1*	0	0
お多福豆 + 乳酸菌	4.9×10 ³	TNTC	49	1	1
豆きんとん	0×10	2*	0	0	0
豆きんとん + 乳酸菌	7.4×10 ³	TNTC	74	3	0

*水滴をカウントした結果

表 5 食品残渣とコロニーの識別写真例

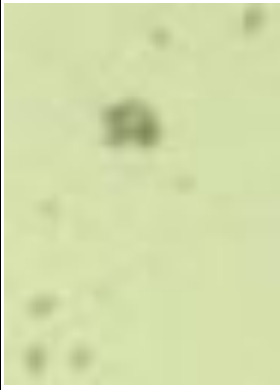
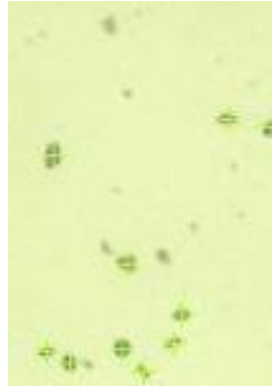
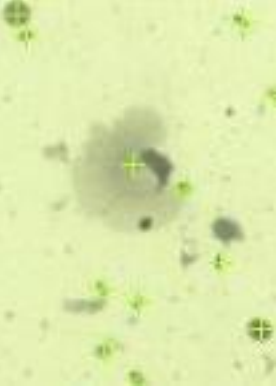
培養開始時の写真				
培養終了時の写真				

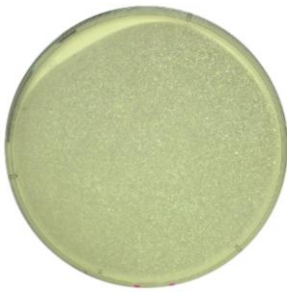
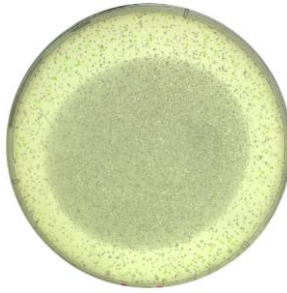
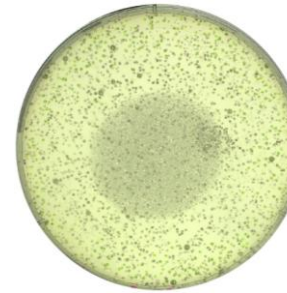
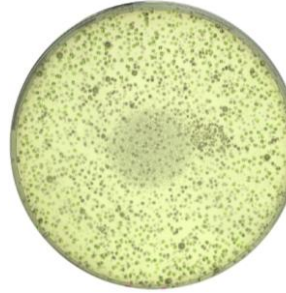
表 6 シャーレの縁に発生した水滴を誤判定している写真

ゆで卵	錦玉子	お多福豆	豆きんとん	黒豆
				

シャーレの縁だけでなく、蓋に発生した結露や水滴が長時間残留した場合にもカウントに支障を来す

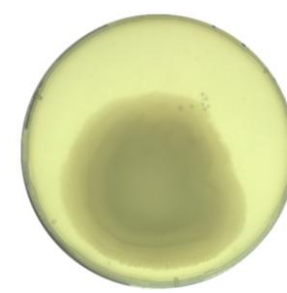
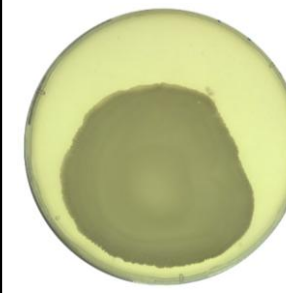
ことがある。(表 7) 装置の仕様上、培養開始後 4 時間程度で自然蒸発する軽微な結露であれば判定に影響はないが、長期間残留した場合は結露下で生育したコロニーはカメラで捕捉されず、正確な経時モニタリングが困難となるケースが確認された。

表 7 シャーレの蓋に発生した水滴

経過時間	カウント数	経過時間	カウント数	経過時間	カウント数	経過時間	カウント数
0時間後	0	10時間後	133	30時間後	377	48時間後	509
							
シャーレの蓋全体が水滴で曇っている		周囲の水滴が蒸発しコロニーがカウントされ始めた		曇りが消えてゆき徐々にカウント範囲が広がる		中央付近のコロニーはカウントされなかった	

また、まれに拡散コロニーでもカウントされないシャーレが発生することがある。(表 8) これは蓋に残った水滴に原因があるのか、またはコロニーの生育速度によるものなのかは追加の検証が必要である。

表 8 拡散コロニーのカウント

経過時間	カウント数	経過時間	カウント数	経過時間	カウント数	経過時間	カウント数
17時間後	0	20時間後	0	34時間後	1	48時間後	1
							
蓋の水滴が全て蒸発した		拡散コロニーの生育が見られる		拡散コロニー上部に重なって生育しているコロニーをカウント		拡散コロニーが大きく濃く生育し他のコロニーが見えなくなる	

3-3.考察

食品の微生物検査において陰性・陽性のみを判定する試験やコロニー数をカウントし菌数で判定する試験等があるが、いずれも正確で迅速な判定をすることが重要である。従来、判定は既定時間の培養後に検査員が目視又は装置などの手段を使い判定するため一定の時間が必要となってしまう。また、早期の判定を行うために数時間おきに恒温培養器を確認するような行為は作業負担が大きく非効率であり、コン

タミネーションや操作上のリスクも生じ得る。装置を使った自動カウントも培養後のシャーレを置いてカウントするものがほとんどで、検査数が多い場合培養時間後の判定に時間がかかり操作する人の手間も増えてしまう。このようにシャーレ培養後に人が目視で菌の生育を確認し、カウントする工程をScanStation®では培養開始から設定した時刻までモニタリングでき、一度に複数のシャーレを同時に行え時間効率も良い等メリットがある。さらに一定間隔でシャーレの写真を撮影するため拡散コロニーであっても広がる前にカウントが可能であり、もし最終的にカウントされなかった場合でも撮影された写真を遡って確認することができる。しかし、シャーレの蓋の水滴が長時間残ってしまうと正しくカウントすることができないため、混釈後にシャーレが曇らないような工夫が必要である。時間短縮というメリットにおいては、規定時間を待たずにコロニーの生育を確認できるため迅速な判定を行えるとともに、判定後はシャーレを取り除き空いたスペースを効率よく次の試験に使用できるところも大きなメリットである。

本検討では、ScanStation®を用いて9株の微生物を経時的に観察したところ、コロニーが検出され始める時刻及び最大カウント値に到達する時刻は菌株によって異なった。既定の48時間より前に計数値がおおむね一定となる菌株もあり、早期判定に活用できる可能性が示された。

また、食品残渣を含む検体では、経時画像によって残渣と成長するコロニーを区別しやすくなることが確認された。一方、結露による水滴の誤検出や拡散性コロニーが十分に計数されない事例も認められた。安定した判定を行うためには、シャーレ内の結露を抑える操作条件の検討が重要である。

ScanStation®は、培養中のシャーレを自動撮影・計数し、過去の画像を遡って確認できる点で、判定作業の省力化と迅速化に有用であると考えられる。今後は対象とする食品や菌株を増やし、早期判定に適した条件を検討していきたい。

※ScanStation®は、インターサイエンス株式会社が保有する登録商標です。

【参考文献】

- 1) 食品微生物学. 株式会社技報堂
- 2) 食品微生物学辞典. 日本食品微生物学会監修. 中央法規出版株式会社
- 3) 微生物殺菌実用データ集. 株式会社サイエンスフォーラム
- 4) 食品微生物検査マニュアル《改訂第2版》. 栄研化学株式会社
- 5) 一般財団法人 食品産業センター. HACCP 手法に関する用語説明≫温度
【<https://haccp.shokusan.or.jp/glossary/ondo/>】(参照 2025-7-24)
- 6) 株式会社 静環検査センター. 生活衛生ニュース 2016 年 4 月
【<https://www.seikankensa.co.jp/eiseinews/documents/28-1604eiseinews.pdf>】(参照 2025-7-24)