(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3749933号
(P3749933)
(45)発行日　平成18年3月1日(2006.3.1)　(24)登録日　平成17年12月16日(2005.12.16)

(51)Int.Cl.　　F I
C12Q 1/06 (2006.01)　　C12Q 1/06
C12M 1/34 (2006.01)　　C12M 1/34　D

請求項の数 2　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願平6-525414
(86)(22)出願日　平成6年4月5日(1994.4.5)
(65)公表番号　特表平8-510123
(43)公表日　平成8年10月29日(1996.10.29)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/003717
(87)国際公開番号　WO1994/026870
(87)国際公開日　平成6年11月24日(1994.11.24)
審査請求日　平成13年3月15日(2001.3.15)
(31)優先権主張番号　08/061,678
(32)優先日　平成5年5月14日(1993.5.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
スリーエム　カンパニー
アメリカ合衆国５５１３３―３４２７ミネソタ州　セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス３３４２７、スリーエム・センター（番地の表示なし）
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　伊藤　晃
(72)発明者　モーガン、スコット・ディー
アメリカ合衆国５５１３３―３４２７ミネソタ州　セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス３３４２７（番地の表示なし）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微生物増殖の迅速な定量化の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

接種された培養基内の微生物コロニーを接種から６乃至１２時間以内に検出し、カウントする方法であって、

ａ）　上記培養基を有する培養デバイスを撮像してマスクイメージを獲得し、

ｂ）　上記接種された培養基外にあるマスクイメージのピクセルを識別するために上記マスクイメージを処理し、

ｃ）　上記マスクイメージ内のノイズピクセルを識別するために上記マスクイメージを処理し、

ｄ）　上記ステップｂ）、ｃ）で識別されたピクセルに背景の値を割り当て、

ｅ）　上記培養デバイスを撮像し、上記背景の値を有するピクセルを除外して第１のコロニーイメージを獲得し、

ｆ）　あるタイムインターバルの間、上記培養基を培養し、

ｇ）　上記培養デバイスを撮像し、上記背景の値を有するピクセルを除外して第２のコロニーイメージを獲得し、

ｈ）　上記第２のコロニーイメージから第１のコロニーイメージを差し引くことを含め、上記第１及び第２のコロニーイメージを処理して未加工の時間経過イメージを生成し、

ｉ）　上記未加工の時間経過イメージを再評価して、評価された時間経過イメージを生成し、

ｊ）　ヒットピクセルを識別するため、

１）局所最小を識別し、
２）中央のピクセルの値をしきい値と比較して検査し、
３）上記中央のピクセルに直接隣接する近隣ピクセルが上記中央のピクセルの値よりも大きな値であることを保証するために少なくとも２つの近隣ピクセルを検査し、
４）上記各近隣ピクセルに隣接し、上記中央のピクセルの反対側にある１つ隔たった隣接ピクセルが、上記隣接する近隣ピクセルの値よりも大きな値を有していることを保証するために上記１つ隔たった隣接ピクセルを検査し、
５）上記検査を満たした各中央のピクセルをヒットピクセルと分類すること、を含めて、上記評価された時間経過イメージを処理し、
ｋ）　上記第１と第２のコロニーイメージの間に上記培養基に現れた微生物コロニーを識別するため上記ヒットピクセルを集めてかたまりにし、
１）　上記培養基内の上記微生物コロニーの合計カウントを提供すること、
の各ステップを含む方法。
【請求項２】
接種された培養基内の微生物コロニーを接種から６乃至１２時間以内に検出し、カウントする方法であって、
ａ）　上記培養基を撮像して第１のコロニーイメージを獲得し、
ｂ）　あるタイムインターバルの間、上記培養基を培養し、
ｃ）　上記培養基を撮像して第２のコロニーイメージを獲得し、
ｄ）　上記第２のコロニーイメージから第１のコロニーイメージを差し引くことにより上記第１及び第２のコロニーイメージを処理して未加工の時間経過イメージを生成し、
ｅ）　上記未加工の時間経過イメージ内で局所最大であるヒットピクセルを識別するため、
１）中央のピクセルの値をしきい値と比較して検査し、
２）上記中央のピクセルに直接隣接する近隣ピクセルが上記中央のピクセルの値よりも小さな値であることを保証するために少なくとも２つの近隣ピクセルを検査し、
３）上記各近隣ピクセルに隣接し、上記中央のピクセルの反対側にある１つ隔たった隣接ピクセルが、上記隣接する近隣ピクセルの値よりも小さな値を有していることを保証するために上記１つ隔たった隣接ピクセルを検査し、
４）上記検査を満たした各中央のピクセルをヒットピクセルと分類すること、の各ステップを含めて上記未加工の時間経過イメージを処理し、
ｆ）　上記第１と第２のコロニーイメージの間に上記培養基に現れた微生物コロニーを識別するため上記ヒットピクセルを集めてかたまりにし、
ｇ）　上記培養基内の上記微生物コロニーの合計カウントを提供すること、
の各ステップを含む方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、接種された表面の微生物コロニーの自動カウントに関する。より詳しくは、本発明の方法は、コロニー増殖の特徴化された兆候の変化を早期に検出することにより、接種された表面の微生物コロニーを、早期に検出することとカウントすることとを備える。
背景技術
たとえばペトリ皿内での、微生物コロニーの増殖をカウントする種々の方法およびデバイスが知られている。訓練された実験作業員により、人手でコロニーをカウントすることがよく知られている。この方法は、達成されたカウントの精度に限界があるとともに、人手によるカウントという時間のかかるやっかいな仕事を実行するために熟練した作業員を用いることに関連するコストなどの多くの欠点を有する。
これらの問題は、培養されたペトリ皿内の微生物コロニーの早期検出が必要なときには、さらに問題となる。早期検出は製造者にとって非常に役に立つ。なぜなら、早期検出によって、製造者は、スクラップすなわち無駄な製品となる可能性のあるものの製造を中止することができ、また、追加の出費となるそれらの汚染された製品のさらなる処理を回避で

きるからである。
早期検出の有益な適用の一例は、食品製品における微生物の検査である。製品の汚染レベルを示す微生物コロニーのカウントを得るために、製品サンプルが抜き取られて、培養デバイスが接種されて、２４時間またはそれ以上の時間をかけて培養される。もし、サンプルが過度の汚染を示すと、多くの場合には、製品を廃棄しなければならない。培養後６から１２時間の範囲内で過度の汚染についての信頼できる早期検出および定量化が可能となれば、製造者に歓迎されるであろう。なぜなら、それによって処理の早い段階で汚染された製品を確認でき、それによって、廃棄されるべき製品と汚染された処理装置を通ることによって汚染されているかもしれない追加の製品とを処理するときにこうむる追加出費を回避することができるからである。
技術者は培養デバイスを用いて過度の汚染の早期検出を実行することができるが、自動検出システムとは対照的に、カウントを与える技術者を有することに関連する欠点がある。早期コロニー増殖の重要な指標は、増殖速度、すなわち培養デバイスの連続する読み取り間の変化である。人である技術者が増殖速度を正確に測ること、あるいは、数百個にもなる可能性のある培養デバイスに対して、そのすべてをたった一人の技術者が監視して、増殖の兆候のわずかの間の変化を区別することは、不可能でないとしても、困難である。また、コロニーのカウントを与える技術者を雇うことは、一般的には比較的コストがかかり、早期検出に関連してさらに作業が困難になると、そのコストはさらに一層高くなるものと予想することができる。
微生物コロニーをカウントする自動システムは知られているが、一般的には、十分に培養された増殖培養基、すなわち、２４時間またはそれ以上かけて培養された増殖培養基のトータルカウントを与えるようにされている。この公知のシステムは、２つの基本的なカテゴリーに分けることができる。
第１のカテゴリーは、ハードウエアの電気回路またはデジタルコンピュータとともにカメラまたはビデオ装置を用いるシステムを含む。このシステムは、培養デバイスの全体的な光吸収を計測することによって、培養デバイス内のコロニーの個数をカウントし、または、培養デバイスの全体的な汚染レベルを検出するシステムを含む。このようなシステムの例は、欧州特許出願公開第０ ３０１ ６００号明細書、ペリー氏の米国特許第３，８１１，０３６号明細書、ミヤケ氏他の米国特許第５，００３，６１１号明細書、仏国特許出願公開第２ ６０２ ０７４号明細書に開示されている。
これらのシステムは、上記したように、たとえば２４時間またはそれ以上の比較的長い時間をかけて培養された、培養デバイス内のコロニーをカウントするようにデザインされている。これらのシステムは、ひとつの培養デバイスについてコロニーの信頼できる早期カウントを与えるようには、デザインされていない。
自動カウントシステムの第２のカテゴリーは、カウント処理を実行するために、一般的には、ひとつの配列の光電検出器とハードウエアの電気回路とを用いる。これらのシステムは、一般的には、コロニーが存在するか存在しないかを表示する信号を与える。これらは、コロニーの強度、すなわちインターバル間の増殖速度に関する情報を与えない。システムはコロニーの増殖を決定するために用いられる指示薬の変動する強度の徴候を示すことができないので、それらのシステムは、微生物コロニーの早期検出とカウントとについて、特に役に立つという訳ではない。
公知の自動カウントシステムは、十分に培養された培養デバイスについてコロニーをカウントするように、または、培養デバイスの全体的な光吸収を計測することにより培養デバイス内の全体の汚染レベルを検出するように、または、コロニー増殖の兆候の強さを計測することなく単にコロニーをカウントするように、デザインされているので、微生物コロニーの正確な早期カウントを行なう自動化された方法は、知られていない。
しかし、信頼できる早期検出とカウントとは、コロニー増殖の１またはそれ以上の特徴化された徴候におけるわずかの間の変化を監視することによって、達成されることが可能である。このような徴候は、微生物コロニーによって増殖中に生成される酸や酵素のような目に見えない指示薬や、裸眼で見ることができる、あるいは見ることができない他の兆候

を含むことが可能である。
したがって、コロニー増殖の特徴化された兆候における変化を早期に検出することによって、接種された培養デバイスにおける微生物コロニーの早期検出および定量化を備える方法に対するニーズが存在する。

発明の要旨

本発明の方法は、本発明の早期検出の利点を与えるため、培養の早い段階におけるコロニー増殖の特徴化された兆候の変化に依存している。撮像ステップ中に収集されたデータは、特徴化された兆候における微妙な変化の検出を強調するため、本発明の方法に従って処理される。
本発明による好ましい方法において用いられる培養デバイスは、増殖中に微生物コロニーにより形成される酸の存在により引き起こされる特定の色変化を生じる。コロニー増殖の徴候として培養期間の早い段階においてたよられているのは、この色変化である。
本発明で開示されたデータ収集およびその処理の方法は、コロニー増殖の早期検出に特に有利である。この方法は、公知の自動システムおよび検出方法では達成不可能であり、また、人の技術者により合理的に繰り返されることができない。
好ましい方法において、酸領域は各微生物コロニーのまわりを囲み、各酸ゾーンに関連する色変化は高感度ビデオ装置を用いて検出される。そして、収集されたデータは、微生物コロニーの信頼できる早期定量化を与えるため、本発明のイメージ処理方法にしたがって、処理される。
本発明によるこの方法のこれらのおよび他の種々の特徴と利点とは、以下の詳細な説明および関連図面を読むと、明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

図１は、本発明による方法を実行するためのイメージ処理システムの好ましい実施例の略図である。
図２は、本発明による方法で用いられるペトリフィルム（ＰＥＴＲＩＦＩＬＭ、商標）プレートの斜視図である。
図３は、本発明による方法のデータ収集部のひとつの好ましい実施例を表したフローチャート図である。
図４及び５は、本発明による方法のイメージ処理部のひとつの好ましい実施例を表したフローチャート図である。
図６Ａ及び６Ｂは、本発明のひとつの好ましい方法により処理された、評価された時間経過イメージの略図である。
図７は、さらに処理を受けた図６Ｂのイメージの略図である。
図８は、さらに処理を受けた図７のイメージの略図である。

好ましい方法の詳細な発明

以下、本発明による好ましい方法と変形例の方法との説明を行なう。説明では、この好ましい方法と変形例の方法との種々の特徴を図示する図１～８を参照する。
図１は、本発明による好ましい方法を実行するための好ましいシステムの構成要素を図示した略図である。図示したように、システム１０は、メインプロセッサ１２と、ビデオディスプレイおよび／またはプリンタのような連携する出力デバイス１４とを含む。メインプロセッサ１２は、光源１６を制御する電源１８を、制御する。メインプロセッサ１２は、レンズ２２とフィルタアタッチメント２４とを含むビデオカメラ２０も、制御する。カメラ２０の下には、キャリア３０が配置される。このキャリア３０は、微生物を増殖させる複数の培養デバイス３２を保持するようにデザインされている。
キャリア３０および培養デバイス３２の上面を照明するために用いられるライト１６は、好ましくは、ゼネラルエレクトリックにより供給される標準的な直線状の１５ワット蛍光管である。もっとも、必要により、多くの他の光源を代わりに用いることが可能である。代わりの光源のひとつとして考えらえるものは、環リング形状の蛍光管であろう。
電源１８は、連続した強度のちらつきのない照明を供給するため、ライト１６に供給される電気エネルギを制御するランプコントローラである。好ましい電源１８は、５０kHzの

周波数で蛍光管１６に電気エネルギを供給する。好ましい電源は、テキサス州リチャードソンにあるメルコンから入手可能であるメルコンＦＺ０４１６－２である。
本発明による好ましい実施例を実行するために用いられるカメラ２０は、カリフォルニア州ウエストレイクビレッジにあるスペクトラソースインスツルメンツからの型番ＭＣＤ２２０である。このカメラ２０は、熱ノイズをできるだけ小さくするためにペルチエ冷却され、ピクセルあたり１２ビットでイメージをメインプロセッサ１２に供給し、１９２×１６５ピクセルの解像度を有する。好ましいレンズ２２は、好ましいカメラ２０に関して互換性がある標準Ｃマウントズームレンズである。レンズ２２は、所望の視野に焦点が合うように調整される。
メインプロセッサ１２は、好ましくは、４８６プロセッサを有するＩＢＭ互換のＰＣである。もっとも、データを制御して検索するために十分な計算容量及び能力を有する任意の適切なマイクロプロセッサを代わりに用いることができる。
好ましい方法は反射された光の特定波長の検出を含むので、レンズ２２はまた、好ましくは、一対のバンドパスフィルタ２４を備える。このバンドパスフィルタ２４は、培養デバイス３２から反射された光を通すために、カメラ２０と培養デバイス３２との間に置かれることが可能である。好ましい方法において、このバンドパスフィルタ２４は、マサチューセッツ州ホリストンにあるコリオンから入手可能である。
好ましい方法を実行するために用いられる好ましいフィルタは、スペクトルピークが６５０nmでありバンド幅が４０nmである赤フィルタである。第２の好ましいフィルタは、スペクトルピークが５５０nmでありバンド幅が４０nmである緑フィルタである。フィルタのバンド幅は、撮影のために、ＳＮ比、すなわちコントラストを最適化するとともに、カメラ２０の積分時間をできるだけ小さくするように選択される。
以下に述べるように、フィルタ２４の選択は、コロニーの増殖の特定の徴候に基づいて使用に適したイメージを得るために、培養デバイス３２に存在しているコロニーと、他のフィルタに置換すること（あるいは、全くフィルムを使用しないこと）とにより表される特性によって決まる。究極のフィルタ選択は、当業者によく知られるようになるであろうから、さらに説明しないことにする。
複数の培養デバイス３２を保持するようにデザインされたキャリア３０は、好ましくは、不透明材料で形成される。好ましい実施例において、不透明材料は、イメージの曇りをできるだけ小さくするために、各培養デバイス３２において撮像される領域の背景色に一致するか、または単に黒い。
複数の培養デバイスを含むキャリア３０の使用は、システム１０が、位置ずれを生じる可能性のあるオペレータによるハンドリングなしに複数の培養デバイス３２を監視でき、および／または、培養デバイス３２の汚染物質の追加をモニタできるという利点がある。キャリア３０はまた、誤った結果に導く可能性のある培養基の移動を防ぐ。キャリア３０は選択任意であるが、上記した利点により、好ましいシステム１０において用いられることが理解されるであろう。
ひとつの実施例において、キャリア３０は各培養デバイス３２の培養領域の非常に近くに位置する位置合わせマーク３４を含む。位置合わせマーク３４は、キャリア３０がデータ収集時間の間に移動されるとき、撮像システム１０が連続するイメージ間で高い繰り返し精度を与えるための位置合わせポイントとして適している。
培養デバイス３２を培養するために熱を与える加熱面３６が、キャリア３０の下にある。好ましくは、キャリア３０および加熱面３６の全体アセンブリは、キャリア３０の培養デバイス３２のそれぞれについてデータ収集ポイント間を正確かつ繰り返し可能に移動するために、x－yテーブル（図示せず）に取り付けられる。
位置合わせマーク３４は、撮像装置を通じて位置合わせを与えるために使用されることが可能であるが、x-yテーブルの繰り返し可能な位置決めは、データ収集ポイント間に位置合わせを与えるために、位置合わせマーク３４の代わりに、用いられる。好ましいx－yテーブルは、xおよびyの両方向に１ピクセル幅より小さい精度で繰り返し可能に位置決めする。

培養デバイスの微生物コロニーをカウントする好ましいシステム１０および方法は、ともに、主として、ミネソタ州セントポールの３Ｍカンパニーから入手可能なペトリフィルムプレートのような使捨て培養デバイス用に、デザインされている。さらに詳しくは、本発明による好ましい方法は、食品その他の製品のサンプルにおける微生物の存在を検出するために用いられるあるバージョンのペトリフィルムプレートを用いるように、デザインされている。好ましいプレートは、増殖する微生物コロニーを囲むより高いpHの領域において目に見える色変化を生じるようにデザインされている。好ましいプレートにおいて、色の変化は、プレートの培養領域に配置されたフェノールレッドコーティングによって生じる。このプレートは、コロニーによって作られた酸に反応して、赤い背景に黄色に着色されたエリアを作る。

しかし、撮像システム１０に対する適切な変形に関しては、本発明による方法において好ましいプレートに代えて、ペトリフィルムコリフォームカウント（ＰＣＣ）プレートや標準ペトリ皿のような他の培養デバイス３２を用いることができることが、理解されるであろう。

本発明による好ましい実施例において使用するための（また、培養デバイスとして上記で参照された）ペトリフィルムプレート３２のひとつの実施例は、図２に表されている。プレート３２は、ダム４４が配置されるベース４２を含む。ダム４４は、プレート３２の培養領域にくぼみを与えるために用いられる。好ましくは、柔軟なカバー４６がプレート３２の一端に沿って取り付けられる。

ペトリフィルムプレートのような微生物を培養するための使い捨てデバイスのより完全な説明については、読者は、ハンセン氏他による米国特許第４，５６５，７８３号明細書を参照されたい。この明細書は、このようなデバイスに関するその開示を参照するために、本明細書に組み込まれている。好ましいペトリフィルムプレートの化学反応は、マック氏他により１９９３年5月１４日に出願された米国特許出願第０８／０６２，３１１号明細書に、より完全に開示されている。

フォームダム４４の色が白く、培養エリア４８に対して反射率が高いのでカメラ２０により生成されるイメージの“ブルーミング”または“きらめき”を引き起こす可能性があるため、上記されたキャリア３０は、ペトリフィルムプレート３２の本商業的実施例に対して特に役立つ。ブルーミングは、イメージ及びその後のイメージ処理の品質を著しく低下する可能性がある。この理由により、フォームダムはブルーミングをできるだけ少なくするため、好ましい方法ではキャリア３０を用いてマスクされる。

使用に際して、上記されたペトリフィルムプレートのような培養デバイス３２は、微生物汚染物質について食品サンプルその他の物質を検査するために用いられる。そのプロセスにおいて、プレート３２の培養領域４８は、標準接種手順を用いて検査されるべき材料を接種され、プレート３２は検査されたサンプルに存在する微生物の個数を決定するために培養される。微生物が増殖するにつれて、それらは、好ましいプレート３２に配置されたフェノールレッド指示薬と化学反応を引き起こす酸を作り出す。この変化により、通常の赤い培養面４８に黄色エリアがいつかは現れるようになる。そして、この黄色エリアは、検査されたサンプル内の汚染物質のレベルを決定するために、カウントされる。

本検査方法は、培養デバイス３２のそれぞれについてコロニーカウントの正確な兆候を与えるため、２４時間の培養期間に頼っている。本発明による方法の特別な利点は、コロニー増殖の初期段階で生成される色変化を強調するために、着色されたイメージをフィルタに通して処理することによって汚染されたサンプルの早期検出を与えることができる点である。早期検出によって、接種後６から１２時間の間に、ユーザーは微生物コロニーの正確なカウントを得ることができるはずであることを意味する。

好ましい方法における培養デバイス３２は、好ましいプレート３２におけるフェノールレッド指示薬の化学反応を用いるが、本発明によるシステム１０および方法に対する適切な変形に関しては、標準的なペトリ皿及び細菌培養基のような多くの他の培養デバイスを代わりに用いることが可能であることが理解されるであろう。

さらに、好ましい方法のアルゴリズムを用いて早期コロニーカウントを与えるために微生

物増殖の他の指示薬を用いることが可能であろう。他のタイプの指示システムは、ニュートラルレッド、フェノールレッド、ブロモチモールブルー、ブロモクレゾールパープル、クロロフェノールレッド、ブロモクレゾールグリーン、ヒドロオキシピラニネトリスルホン酸（ＨＰＴＳ）のような代わりの発色指示薬を含むことができる。また、４-メチル-ウンベリフェロン（４-ＭＵ）を用いる蛍光のような他の非発色指示薬が適切な照明、フィルタリング、データ収集装置とともに使用されることも可能である。さらに、好ましい方法は可視光に頼っているが、本発明の好ましい方法を実行するために紫外線および赤外線領域を含む任意の放射線を用いることができることが、理解されるであろう。

コロニー増殖の上記の代わりの指示薬のいずれかを用いる好ましい方法の適用は、イメージデータを収集するために用いられるプロセスに対する調整とともに実行されることが可能であろう。しかし、本発明の方法は、早期コロニー増殖を指示できる収集されたイメージデータの任意の適切なセットに適用するようにデザインされている。

好ましい方法の説明の以下の部分は、明確のために、データ処理部とイメージ処理部とに分けられている。

データ収集

さて、図１を参照すると、本発明による好ましい方法において、多数の培養デバイス３２は接種され、培養のためにキャリア３２に配置される。好ましい方法において、培養デバイス３２は、微生物により汚染物質を検査される食品サンプルや他の同様な製品を、接種される。

好ましい早期検出システムは、１２時間以内の培養で、より好ましくは接種後６時間から８時間の期間内で、完全なコロニーカウントを与える。好ましい方法において、培養デバイス３２は、初期には、約２時間培養され、このときに、上記した撮像システム１０を用いて各培養デバイス３２からイメージが収集される。

図３は、本発明による好ましい方法のデータ収集ステップを図示している。この方法において、培養エリア４８を、キャリア３０のマスクと、またはマスクが使用されなければフォームダム４４と、区別するために、マスクイメージが撮像される（ステップ５２参照）。

また、マスクイメージは、培養エリア４８におけるノイズがコロニー倍殖の徴候として誤って認識されることを排除するために、使用されることも可能である。ノイズは、培養基の穴、泡、食品物質、非接種エリア、ダスト、その他の物すなわち培養エリア４８の背景において不連続となる条件からなる可能性があるであろう。マスクイメージを用いてノイズの検出を強調するために、好ましくは、システム１０は、マスクイメージとコロニーイメージ（以下に説明される）のために使用される上からの照明に加えて、下からの照明を備える。

しかし、好ましい方法において、本質的には、マスクイメージは、接種されたエリア４８を、まわりを囲んでいるキャリア３０やフォームダム４４と区別するために使用される。各培養デバイスの接種されたエリア４８の外側境界を示すことによって、そうする。

適切なイメージを与えるために、好ましい方法においてカメラ２０によって撮像されるマスクイメージは、ピークスペクトル値が６５０nmでバンド幅が４０nmの赤フィルタ２４を使用する。好ましプレート３２の培養エリア４８は（プレート３２のフェノールレッドにより）赤いので、赤フィルタが用いられ、たとえば、好ましい赤フィルタを通して見ると培養エリア３８は白いように見える。

好ましい方法において、イメージの最も高いレベルのコントラストを短い積分時間を保つ必要とつり合わせるために、レンズ２２の絞りが適切に設定されて、約３秒の積分時間を用いて、カメラ２０はマスクイメージを撮像する。

積分時間の決定は、光源１６の強度とフィルタ２２のバンド幅とを含む多数の変数により影響される。好ましくは、積分時間は、カメラ２０のＣＣＤにおける熱ノイズの影響をできるだけ少なくするため（上記した条件を考慮しながら）できるだけ小さくする。

好ましいカメラ２０は、１９２×１６５ピクセル配列の各イメージを収集する。好ましいカメラ２０は、各イメージにピクセルあたり１２ビットを与え、それにより、各ピクセル

には、カメラ２０の各ピクセルにおいて検出される光の強さに基づいて０から４０９５までのひとつの値が割り当てられる。値が０のピクセルは黒い対象（カメラ２０の対応するピクセルに光が実質的に戻らない）に対応し、値が４０９５のピクセルは完全に白い対象（カメラ２０の対応するピクセルを完全に飽和する）に対応する。
マスクイメージの赤フィルタのために、キャリア３０のマスク部分は、カメラ２０に対して黒く見え、ピクセルはゼロに近い値を全体的に有する。マスクイメージに対するフィルタリングは、培養エリア４８とキャリア３０のマスクとの間のコントラストを強調するように選択される。その結果、培養エリアとマスクとの間のピクセル値には、好ましくは、はっきりした相違があり、それによって、システム１０が２つのエリアを区別できるようになる。
好ましいマスクイメージにおいて、１０００～１５００またはそれ以下の値を有するピクセルに９９９９の値が割り当てられ、キャリア３０のマスクにあることを示す。ピクセルがマスクにあるかどうかを決定するために用いられる値は、積分時間、フィルタリング、照明、マスクと培養エリア４８とのコントラストのような種々の要因に基づいて、変更可能である。正確な値は、予め決定されるか、実際のデータに基づいて適切な統計学的方法または他の方法により、各培養デバイス３２について確立されることが可能である。
値のいかんに拘わらずコロニー増殖を示すもとのとして考慮されるべきでないのはどのピクセルかを示すためにコロニーイメージを処理するときに、そのマスクイメージは、９９９９の値が割り当てられたマスクに対応するピクセルとともに、用いられることができる。また、マスクイメージは、コロニーイメージの位置合わせを与えるためにも、用いられることが可能である。マスクイメージは、マスク（またはフォームダム４４）と培養エリア４８との間の境界を示すことによって、位置合わせのために使用されることが可能である。もし、マスクイメージが位置合わせのために使用されるべきであれば、好ましくは、マスクは、システムがコロニーイメージ間の回転を補償できるようにするために、非円形状である。
システムは、（上記したように）キャリア３０の位置合わせマーク３４を、または培養エリア４８の端を用いることができるが、好ましい方法は、カメラ２０の下でキャリア３０を移動するために用いられるx-yテーブルの精度に頼る。x-yテーブルは、好ましいカメラ２０を用いるとき、xおよびyの両方向に１ピクセルの寸法より小さい繰り返し位置決め精度を有し、その結果、さらに位置決めすることは余分となるであろう。
マスクイメージが収集された後、第１のコロニーイメージは、好ましい方法において、接種後２時間で、収集される（図３のステップ５４参照）。第１のコロニーイメージは、少なくとも初期時間の間に培養デバイス３２が培養されて培養基があるレベルの適切な平衡に達することができた後に、収集される。
好ましい方法において、第１のコロニーイメージは、カメラ２０のレンズ２２の前に配置された緑フィルタ２４を用いて初期の２時間の培養時間の後に収集される。この緑フィルタは、好ましくは、スペクトルピークが５５０nmでバンド幅が４０nmである。この緑フィルタは、好ましい方法において用いられる好ましい培養デバイス３２で増殖する微生物コロニーによって作り出される黄色に対して感度がよい。
緑フィルタを通された第１のコロニーイメージが得られるとき、好ましいカメラ２０は、好ましくは、コントラストをできるだけ大きくするために絞りが適切に設定されて４０ミリ秒の積分時間を用いて操作される。赤フィルタを通されたマスクイメージを撮像するときにイメージコントラストをできるだけ大きくすることとカメラ２０によって形成されるノイズをできるだけ小さくすることとに関する同じ条件が、緑フィルタを通された第１のコロニーイメージを撮像されるときにも、適合する。
好ましい方法において、赤及び緑フィルタ２４はフィルタホイール（図示せず）に取り付けられる。フィルタホイールは、所望のフィルタリングを提供するためにレンズの前でフィルタを動かす。このようなデバイスは当業者によく知られており、さらに詳細な説明を行わないこととする。
好ましい緑フィルタおよびカメラを用いることによって、第１のコロニーイメージが収集

され、そのイメージの各ピクセルは、カメラ２０の各ピクセルで検出された光の強度に基づいて、０と４０９５との間の値が割り当てられる。赤フィルタを通されたマスクイメージと同様に、０の値を有するピクセルは（カメラ２０の対応するピクセルに光を実質的に全く戻さない）黒い対象に対応し、４０９５の値を有するピクセルは（カメラ２０の対応するピクセルを完全に飽和させる）完全に白い対象に対応する。
また、好ましい緑フィルタを通されたイメージは、培養エリア４８においてノイズを識別するためにも、使用されることが可能である。ノイスは増殖された培養基のボイドやクラック、接種中に形成された泡、接種物質などからなる可能性がある。培養中に見える可能性がある、増殖された培養基のボイドやクラックをできるだけ少なくするために、湿った環境を与えること、すなわち、培養エリア４８からの蒸発を制限するために培養中のペトリフィルムプレートの端をシールすることは、都合がよいかもしれない。
また、マスクイメージを収集するために使用される赤フィルタと同様、コロニーイメージを収集するために使用される緑フィルタと組み合わせて偏向フィルタを用いることも、都合がよいかもしれない。偏向フィルタは、デバイス３２の上の柔軟なカバー４６（図２参照）によって引き起こされる反射を減少させることができる。たとえば、偏向フィルタが光源を覆って配置され、偏向フィルタがカメラレンズを覆って配置されることができる。代わりに、培養デバイス３２に対して反射防止の柔軟なカバー４６を備えてもよい。
あるいは、付加的なノイズイメージが、（好ましい方法において）４０nmのバンド幅を有する４５０nmフィルタを用いて、各時点で収集されることが可能である。マスクイメージとコロニーイメージとについて議論された同じ条件が、任意のノイズイメージに適合する（たとえば、積分時間とコントラストとのバランスなど）。好ましい４５０nmのフィルタは、ゲル（すなわち、培養基）の厚さにおける変化、特に割れやボイドに敏感であるので、選択される。しかし、４５０nmフィルタとイメージとは、微生物増殖を検出するために使用される色変化に対して敏感でない。第１のコロニーイメージが収集された後、予め決定されたタイムインターバルの間に、培養デバイス３２は培養される（図３のステップ５６参照）。その後に、緑フィルタを用いて第２のコロニーイメージが収集される（ステップ５８）。コロニーイメージ間の好ましいタイムインターバルは、６０分である。その結果、第２コロニーイメージが培養デバイス３２の接種後３時間で収集される。インターバルの長さは、微生物コロニーの増殖速度、pH指示薬の感度、接種物のpH、およびイメージシステム１０の感度に基づいて、変えることが可能である。受け入れ可能な精度を与える最も低い周波数（最も長いインターバルに対応する）が好ましい。なぜなら、システム１０がモニタできる培養デバイス３２の数は、各培養デバ３２についてのデータ収集の周波数に反比例するからである。
また、第１のコロニーイメージと同様に、第２のコロニーイメージも、上記のように撮像された赤いフィルタを通されたマスクイメージにおいて９９９９の値が割り当てられたピクセルを除いて、０～４０９５の範囲の値を有するピクセルからなる。

イメージ処理

第１および第２コロニーイメージが収集された後、それらのイメージを分析して培養デバイス３２に現れる微生物コロニーのカウントを与えるために、本発明による好ましい方法のイメージ処理部が用いられる。好ましいイメージ処理方法におけるステップは、図４及び５のフローチャートに表されている。
以下では好ましい方法のイメージ処理部のひとつの繰り返しだけが説明されるが、この方法は、上記したように、任意の数の連続するタイムインターバルで収集された一連のコロニーイメージを分析するために用いられるであろうということが、理解されるであろう。
好ましい方法の好ましいイメージ処理部は、“多すぎてカウントできない”（ＴＮＴＣ）という結果を培養デバイスが生じるかどうかを決定するステップ６０から開始する。ＴＮＴＣ決定は、第１コロニーイメージのすべてのピクセルについての平均ピクセル値と第２コロニーイメージについての平均ピクセル値とを決定することによって行なわれる（赤フィルタを通されたマスクイメージにおいて９９９９の値を割り当てられたピクセルを含まない）。

第１および第２コロニーイメージについての平均ピクセル値が比較され、平均ピクセル値の差が予め決められたＴＮＴＣしきい値を越えているならば、培養デバイスはＴＮＴＣ結果を生じるであろうという決定がなされる。
好ましいＴＮＴＣしきい値は１５％である。すなわち、第２コロニーイメージの平均ピクセル値が第１コロニーイメージの平均ピクセル値より１５％またはそれ以上越えているならば、ＴＮＴＣ決定がなされる。ＴＮＴＣしきい値は、データ収集時間の間のタイムインターバルやコロニー指示薬の化学反応などの多くの要因に基づく変動に支配されることが理解されるであろう。
第１および第２コロニーイメージがＴＮＴＣ決定を示さないならば、好ましい方法のイメージ処理部の次のステップ６２は、第１コロニーイメージの各ピクセルの値を第２コロニーイメージの対応するピクセル値から差し引くことである。
この引き算ステップ６２の結果は、第１および第２コロニーイメージが収集された時間に対応して連続するタイムインターバルで収集されたコロニーイメージの各ピクセルについての強度差を示す未加工の時間経過イメージである。好ましい処理において、赤フィルタを通されたマスクイメージにおいて９９９９の値が割り当てられたピクセルは、その値を９９９９に設定することによって、未加工の時間経過イメージにおいてマスクされる。
次のステップ６４は、５０と６００との間の値を有する未加工の時間経過イメージにおけるそれらのピクセルの再評価である。相対的に小さい値（５０）はＭＩＮＤＩＦＦとして以下で参照され、大きい値（６００）は、ＭＡＸＤＩＦＦとして参照される。ＭＩＮＤＩＦＦおよびＭＡＸＤＩＦＦ内のピクセルは、０と４０９５との間の値を有するように、直線的に再評価される。換言すると、ＭＩＮＤＩＦＦピクセル（５０の値を有する）は再評価されて４０９５に設定され、ＭＡＸＤＩＦＦのピクセル（６００の値を有する）は再評価されて０に設定される。上記範囲の両極端の間にある値を有するピクセルは、直線的に再評価されて、０～４０９５の範囲内の値となる。
さらに、第１および第２コロニーイメージ間のＭＩＮＤＩＦＦ値を下回る差を示す未加工の時間経過イメージのこれらのピクセルは、すべて、４０９５の値（白に対応する）を割り当てられ、順に、イメージの背景に対応する。選択されたＭＩＮＤＩＦＦ値より小さい差は、システム１０によって割り当てられたピクセル値の誤差マージン（すなわち、ノイズフロア）内であると決定されるので、これらのピクセルは背景を割り当てられる。第１および第２コロニーイメージ間のピクセル値の間の差は十分小さく、それだけで、ピクセル値の差を無視してそれらに培養エリアの背景を割り当てることができる。
ＭＡＸＤＩＦＦの値より大きい差を有するピクセルは、すべて０（黒に対応する）に設定される。なぜなら、好ましい方法において、ピクセル値のそのような差は、分析されているタイムインターバルの間にその位置で酸の著しい集中が形成されたことを示すからである。この変化は、一般には、増殖する微生物コロニーの中央を表すであろう。
上記された直線再評価ステップ６４は、第１および第２コロニーイメージ間のインターバルにおいて表れた変化を示すグレースケール化されたイメージを与える。この直線的に再評価されたイメージは、“評価された時間経過イメージ”ということにする。この評価された時間経過イメージは、以下に述べるようにコロニーカウントを決定するためにさらに処理される。
上記されたピクセル値の直線的再評価に対する変形例は、ルックアップテーブルを用いて、ＭＩＮＤＩＦＦとＭＡＸＤＩＦＦの範囲内に入る未加工の時間経過イメージのピクセルに、予め決定されたテーブルに基づいて４０９５～０の範囲の値を割り当てることであろう。しかし、ルックアップテーブルの使用は、上記された直線的再評価処理に比べて、表示する目的に対して遅く、その結果、直線的再評価は好ましい方法で用いられている。
未加工の時間経過イメージを再評価するために用いられるＭＩＮＤＩＦＦおよびＭＡＸＤＩＦＦの値は、微生物コロニーの増殖速度、指示薬のpH感度、接種物のpH、撮像システム１０の感度のような多くの要因に基づいて変動する可能性があることが、理解されるであろう。このように、ＭＩＮＤＩＦＦ～ＭＡＸＤＩＦＦの範囲は調整可能であり、その最適範囲は一般的には実験を通じて決定されなければならないであろうということが、理解

されるであろう。
さらに、直線的再評価ステップは選択任意であり、ビデオモニタでの時間経過イメージの表示を強調するために好ましい方法においては使用されることが理解されるであろう。その結果、イメージを表示することなく微生物コロニーのカウントだけを与えるようにデザインされるならば、未加工の時間経過イメージは、再評価することなく、処理されることが可能であろう。
好ましい方法において用いられた評価される時間経過イメージが形成された後、次のステップ６６は、酸ゾーンの中心でありしたがってコロニーの中心であるピクセルはどれであるかを決定するために、評価された時間経過イメージを処理することである。コロニーの中心にあると決定されたこれらのピクセルは、“ヒットピクセル”ということにする。ヒットピクセルが識別された後、これらは、評価された時間経過イメージにおいてピクセルのマトリックスを包囲するために、ステップ６８で拡大される。そして、互いに重なりあったこれらのマトリックスは、ステップ７０で集めてかたまりにされ、個々の微生物コロニーの境界を識別するため、ステップ７２で各クラスターすなわちかたまりのまわりにサークルが形成される。
新しいコロニーに対応する新しい酸ゾーンだけが決定される最初の繰り返しの後に、イメージ処理体系のその後の繰り返しは、より詳細を以下で説明される拡大体系を用いて、既に識別されたコロニーを拡大するステップ７４を備える。
この処理の好ましい新しいコロニーの検出部は、図４のフローチャートと図６Ａ及び６Ｂの略図との両方に示されている。最初のステップ６６は、評価された時間経過イメージにおける各ピクセルを検査してどれがヒットピクセルであるかを決定する。マスクイメージにおいて９９９９の値を割り当てられたこれらのピクセルは、各培養エリア４８を取り囲むキャリア３０のマスクにあるので、検査されない。
さらに、ノイズイメージが収集されるならば（好ましい方法において４５０nmを用いる）、それらはコロニーイメージと同様に処理され、データ収集時間の間に（根本的には乾燥のために）培養基に変化が生じたかどうかを決定する。そうするために、第１のノイズイメージは、第２のノイズイメージから引き算され、時間経過ノイズイメージを形成する。“ノイズ”しきい値を越える差を示すこれらのピクセルには、９９９９の値が割り当てられ、これらはノイズであると考えられる領域内にあることを示す。このイメージは、培養エリア４８内のノイズ部を示し、マスクイメージとともに使用されて、微生物コロニーカウントを決定するときにどのピクセルが無視されるべきであるかを示す。好ましい方法において、ノイズしきい値は２５である。もっとも、この値は変動する対象となり、一般的には実験を通じて設定されなければならないであろうということが、理解されるであろう。
ステップ６６は、以下にさらに詳細に説明される。本質的に、評価された時間経過イメージの各ピクセルは、局所最小の中心（好ましい方法においては、第１および第２コロニーイメージ間の著しい変化を示す未加工の時間経過イメージにおける局所最小値に対応する）であるか否かを決定するために検査される。局所最小であれば、ピクセルが新しいコロニーの中心の近くまたは近傍にあり、好ましい方法においてヒットピクセルとして識別されるべきであることを示すであろう。
図６Ａの略図を参照すると、各ピクセル１００は、あるレベルの“暗”を有するピクセルだけが検査されることを保証するために、好ましい方法において、まず、酸ゾーンしきいレベルに対して検査される。このフィルタリングは、明の酸ゾーンしきいレベルのまたはそれを越えるピクセルが酸ゾーンに一般的には配置されないので、処理する必要をできるだけ少なくするのに役立ち、処理時間がこれらのピクセルを検査することに浪費されないであろう。
好ましい方法において、酸ゾーンしきい値は、３６００より小さいか等しい。この３６００という値は、実験により確立されたものであり、たとえば、微生物コロニーの増殖速度、pH指示薬の感度、接種物のpH、撮像システム１０の感度に基づいて変動する可能性があることが、理解されるべきである。

酸ゾーンしきいレベルより小さいか等しいと評価された時間経過イメージのピクセルは十分に暗く、さらに以下に説明するようにこれらが局部最小であるかどうかを決定するために検査される。
ピクセル１００が上記の条件に適合すると識別された後、ピクセル１００のすぐ隣の４つの北（N_1）、南（S_1）、東（E_1）および西（W_1）の隣接ピクセルも検査されて、これらが、ピクセル１００について検査を続けるために十分に暗いかどうかを決定する。好ましい方法において、これらのピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）が検査されて、その４個のうちの少なくとも３個が酸ゾーンしきいレベル、すなわち好ましい実施例においては３６００より小さいか等しい値を有するかどうかを決定する。
これらの隣接するピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）の少なくとも３個が酸ゾーンしきいレベルより小さいか等しい値を有するならば、中央のピクセル１００についてのさらなる検査が正当化される。もしこの検査が不合格であれば、ピクセル１００が通過されてヒットピクセルとして分類されることはあり得ない。
もし、上記された第２の条件に適合したならば、すべての４個の隣接するピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）は、再び検査され、中央のピクセル１００の値より大きいかまたは等しいかどうかを決定する。もし、すべての４個の隣接するピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）が中央のピクセル１００の値より大きいか等しい値を有するならば、中央のピクセル１００は、検査されたこれらのなかで最も暗いピクセルであり、したがって、コロニーの中央に対応する局所最小である。この検査が通過されなければ、ピクセル１００はヒットピクセルとして分類されることはあり得ない。
もし、すべての４個の直ぐ隣が中央のピクセル１００より大きいか等しい値を有するならば、中央のピクセルが可能性のある局所最小であることを保証するため、さらなる検査が実行される。この検査は、中央のピクセル１００の直ぐ隣のピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）から１段移動されたピクセル（N_2，S_2，E_2，W_2）を用いる。これらのピクセル（N_2，S_2，E_2，W_2）の４個のすべてが、これらに対応する、中央のピクセル１００と境界をなすすぐ隣の隣接のピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）より大きいか等しい値を有することを保証するために、これらのピクセル（N_2，S_2，E_2，W_2）が検査される。
もし、ピクセル（N_2，S_2，E_2，W_2）の少なくとも１個がそれに対応するすぐ隣の隣接ピクセル（N_1，S_1，E_1，W_1）より大きいか等しい値を有するならば、少なくとも１方向に中央のピクセル１００から外側に、ピクセル値の勾配が存在する。それは中央のピクセル１００をダークスポットと識別し、少なくとも１方向外側の２個のピクセルは暗さの程度が小さい。
もし、上記のすべての検査に適合すれば、隣接するすべての（N_1，S_1，E_1，W_1）は、それらのいずれもが９９９９の値を有しないことを保証するために、検査される。もし、検査されたピクセルのいずれかひとつが９９９９の値を有するならば、中央のピクセル１００はヒットピクセルとしては分類されない。なぜなら、それは、マスクの近くの培養エリアの端、または、ノイズエリアの近くにあり、いずれの場合も、にせものの読み取りにより局所最小の誤った決定となる可能性があるからである。
好ましい方法は、上記されたように４つのコンパス方向にピクセルを検査することに頼っているが、任意の他の方向のピクセルが上記された方法の方向に沿って検査されることも可能であり、本発明は上記された方法そのものに限定されるべきではない。
最後に、中央のピクセル１００から最も近い既に識別されたコロニー端までの距離が（もし存在すれば）計算される。この距離が予め決められた最小距離（ＭＩＮＤＩＳＴ）より大きいならば、中央のピクセル１００は、ヒットピクセルとして識別されることが可能である。もし、この距離がＭＩＮＤＩＦＦより小さいか等しければ、中央のピクセル１００はヒットピクセルとして識別されることができない。存在している微生物コロニーに接近しすぎているからである。
好ましい方法において、ＭＩＮＤＩＳＴは、３．１ピクセルに設定される。この値は、コロニーの拡大しているひとつの酸ゾーンにおいて多数の局所最小を誤検出することをできるだけ少なくするため、実験を通じて決定された。ＭＩＮＤＩＳＴ値は、それだけで、コ

ロニー増殖速度、指示薬の感度、システムの感度、イメージが収集されるときの周波数などの多数の要因に基づいて、変わり得ることが理解されるであろう。
上記した検査にすべて適合すると、中央のピクセル１００はステップ６６でヒットピクセルとして分類される。ここで、上記処理の結果を示す図６Ｂを参照すると、いくつかのヒットピクセル１００，１１０，１２０，１３０，１４０は、上記された方法を用いて局所最小として識別された。
コロニーを識別するためにヒットピクセル１００，１１０，１２０，１３０，１４０を用いるクラスリング処理すなわち集めてかたまりにする処理の例は、図７の略図において見ることができる。より詳しくは、ピクセル１００はマトリックス１０２を包囲するために拡大され、ピクセル１１０はマトリックス１１２を包囲するため拡大される。同様に、残りの各ヒットピクセル１２０，１３０，１４０は、対応する３×３マトリックス１２２，１３２，１４３にそれぞれ拡大される。
図示されたように、マトリックス１０２および１１２はともに重なり、その結果、ヒットピクセル１００および１１０は互いに集まってかたまりとなる。３×３マトリックスは、拡大を実行するために使用されるので、各ヒットピクセル１００，１１０，１２０，１３０，１４０は、８つの隣接する結合部に基づいて、重なり合っている隣接部（もし、存在すれば、）を用いて分類される。
ヒットピクセル１００，１１０，１２０，１３０，１４０が拡大されてかたまりにされた後、サークルが各クラスすなわちかたまりを包囲するためにつくられる。このサークルは、識別されたコロニー１，２及び３の境界を識別するために使用される。培養デバイス３２において拡大する酸ゾーン内のコロニーの重複カウントを防ぐために、サークルは実際のコロニーよりわずかに大きくすることが好ましい。
このとき、アルゴリズムは、微生物コロニー１，２及び３を識別することになる。６０分のインターバルを用いてかつ２時間で撮像を開始する好ましい方法において、このコロニーカウントは、培養後３時間の時点（緑フィルタを通された第２のコロニーイメージが収集される時点に対応する）で決定されるであろう。
また、好ましい方法は、識別されることが可能なコロニーの最大個数について限界（ＭＡＸＮＯという）を含んでいる。もし、ＭＡＸＮＯより大きいコロニーの個数がカウントされると、培養デバイスはＴＮＴＣ（すなわち、多すぎてカウントできない）デバイスとして表示されるべきであるから、最大値が設定される。このＴＮＴＣ決定は、オペレータに、汚染が著しいサンプルが発見されたことを警告する。好ましい方法における実際のＭＡＸＮＯは、１００である。それは、実験を通じて決定され、培養デバイスの寸法、撮像システムの解像度などの多くの要因に基づいて、変わり得る。
本発明による好ましいイメージ処理方法は、より早期に評価された時間経過イメージにおいて識別されたコロニーの拡大を含む。たとえば、もし、コロニー１，２及び３が（培養後）２時間と３時間との間に現れる初期の評価された時間経過イメージにおいて識別されたならば、連続する評価された時間経過イメージは、３時間と４時間とに収集された緑フィルタを通されたコロニーイメージを用いて形成されるであろう。そして、連続する評価された時間経過イメージは、初期の評価された時間経過イメージにおいて識別されたコロニーが拡大されるべきであるかどうかを決定するために用いられるであろう。
この処理の拡大部は、連続する評価された時間経過イメージを形成するために用いられたタイムインターバル中にコロニー増殖を示すかどうかを決定するために、（初期の評価された時間経過イメージにおいて識別された）既知のコロニーの端にあるピクセルを検査することを本質的に含む。
好ましい拡大処理において、すぐ近くに接近している他のコロニーを巻き込むポイントにコロニーを拡大することを避けるために、プライオリティリストが使用さる。すべての新しいコロニーが上記されたように識別されると、処理を開始するときの計算順であるプライオリティリストの一番最後にそれが追加される。
たとえば、コロニー１は拡大しているかどうかを決定するために、最初に分析されるであろう。好ましい方法において、最初の検査は、各コロニーを形成するサークルの円周の内

側に丁度ある４つの内部ピクセル１５０a，１５２a，１５４a及び１５６aの値を決定することを含む。
この４つのピクセルは、コロニー１を形成するサークルの中央からＮＳＥＷ方向に大略位置するように、選択される。もっとも、任意の数の方向に位置する任意の個数のピクセルが検査されることが可能であることが、理解されるであろう。
次のステップは、それぞれが、上記の識別されたピクセル１５０a，１５２a，１５４a及び１５６aを（径方向に）丁度越えて位置する外側ピクセル１５０b，１５２b，１５４b及び１５６bのそれぞれの値を決定することを含む。これらの外側ピクセルは、好ましくは、検査されているコロニーの円周の丁度外側にある。
上記の識別されたピクセルの各対の値は、コロニーが識別されたピクセルの方向に拡大しているかどうかを決定するために比較される。もし、外側ピクセル（１５０b，１５２b，１５４b及び１５６b）が、対応する内側ピクセル（１５０a，１５２a，１５４a及び１５６a）より大きいか等しい値を有するならば、コロニーはその方向に拡大している。
好ましい方法において、４対のピクセルの少なくとも２対は、コロニーが拡大される前に拡大を示さなければならない。図８に示されたように、コロニー１はこの検査に適合する。なぜなら、内側と外側とのピクセル対の全てが拡大を示すからである。したがって、コロニー１は外側へ拡大し、好ましい方法において、その径は１ピクセル増加される。この値は、予想される増殖速度、データ収集間のインターバルなどの多くの要因に基づいて、大きくなり得る。
このとき、コロニー１は、ここでは２-３-１と決められたプライオリティリストの一番最後に移動される。そして、コロニー２が分析されて、内側および外側ピクセル１６０a／１６０b，１６２a／１６２b，１６４a／１６４b及び１６６a／１６６bを用いて拡大する検査に適合するかどうかを決定する。図８に示されたように、コロニー２は、検査に適合せず、拡大されず、したがって、優先リストの一番上に残る。
そして、コロニー３は、拡大するかどうかを決定するために、分析されるであろう。図示したように、内側及び外側ピクセル１７０a／１７０b及び１７６a／１７６bの２対が拡大を示し、その結果、コロニー３は拡大を包囲するために拡大させる。拡大後、コロニー３は、優先リストの一番下に移動して、このとき２-１-３となるであろう。
好ましい方法は、各コロニーの径をＲＡＤＭＡＸとして参照される値に制限する。好ましい方法において、ＲＡＤＭＡＸは５０ピクセルに設定される。もっとも、この値は、撮像システムの解像度、培養デバイスの寸法、微生物増殖速度などの多くの要因に基づいて変わり得ることが理解されるであろう。
アルゴリズムにおいてこの時点で、トータルカウントは３コロニーとして表示される。インターバル間に拡大するこれらのコロニー、たとえばクラスター１および３だけが、確認されたコロニーとして識別されることが可能であると考えられる。識別されたが増殖を示さなかったコロニー２は、その後に増殖を示すときに確認されるようになる可能性がある未確認コロニーとして、識別されることが可能である。しかし、好ましい方法において、すべてのコロニーは、拡大挙動を示すかどうかにかかわらず、トータルカウントにカウントされる。
コロニーカウントの表示の後に、システム１０は、再びリセットして、次のタイムインターバルの間培養デバイス３２を培養し、その後、コロニーイメージを収集する方法は、新しいコロニーを識別して存在するコロニーを拡大するために、そのイメージを処理するステップにしたがって繰り返される。
上記処理の１つの繰り返しを通じて説明されたが、異なる時間に収集されたデータは上記されたのとほとんど同様にして処理されるであろうということが、理解されるであろう。重要な唯一の変更点は、処理の１つの繰り返しにおいて識別されたコロニー内にあるピクセルが、システムの処理のスピードアップのために、後のイメージにおいて無視されてよいことであろう。

【図１】

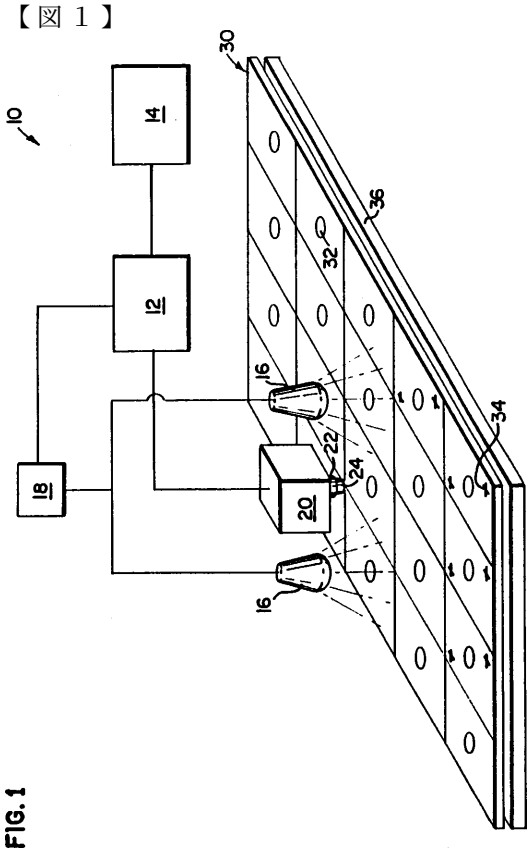


FIG. 1

【図２】

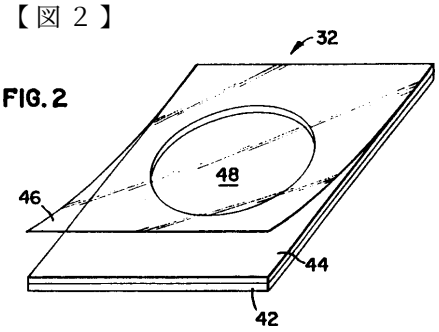


FIG. 2

【図３】

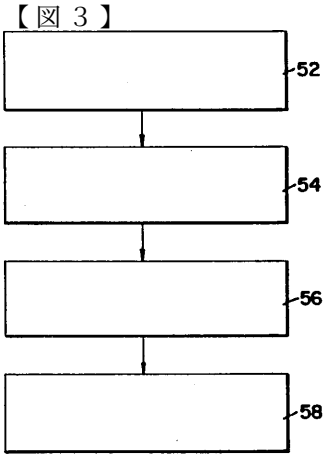


FIG. 3

【図４】

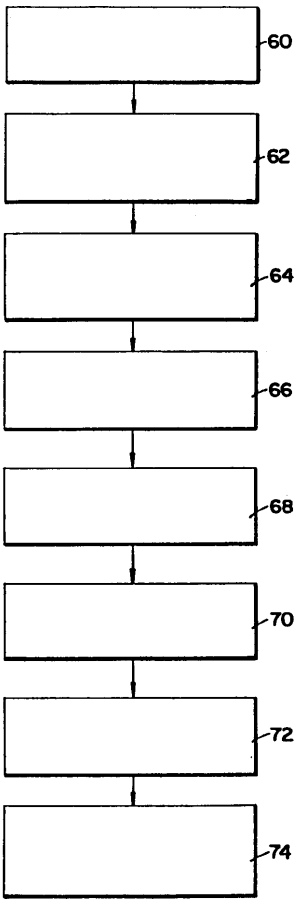
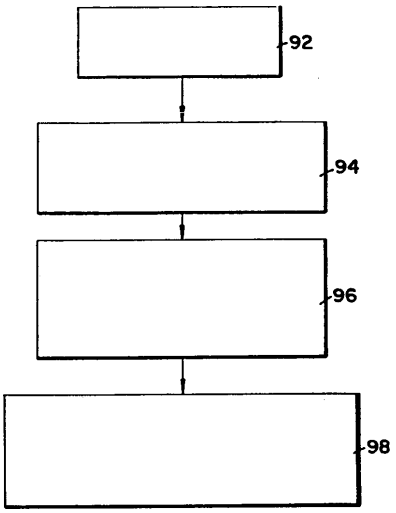


FIG. 4

【図５】

FIG. 5



【図６Ａ】

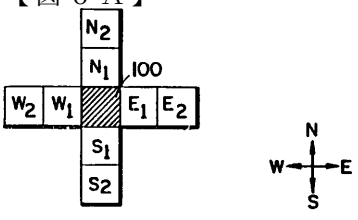
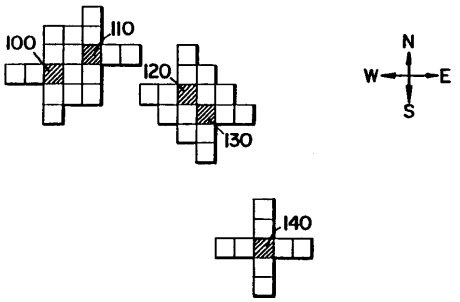


FIG. 6A

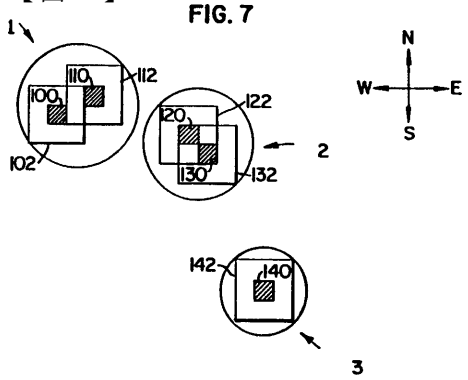
【図６Ｂ】

FIG. 6B



【図７】

FIG. 7



【図８】

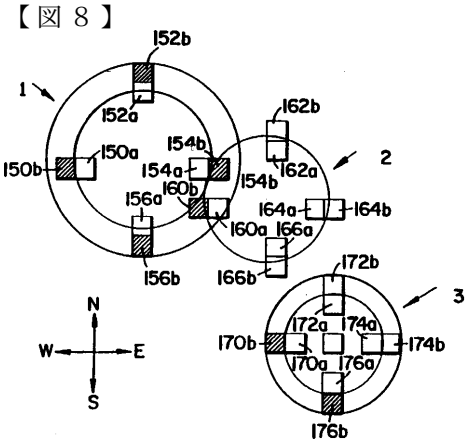


FIG.8

フロントページの続き

審査官　上條　肇

(56)参考文献　特開昭６０－０８３５９７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q 1/00 - 3/00
C12M 1/34
BIOSIS(DIALOG)
EUROPAT(QUESTEL)
JSTPlus(JOIS)
WPI(DIALOG)