

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6366604号
(P6366604)

(45) 発行日 平成30年8月1日(2018.8.1)

(24) 登録日 平成30年7月13日(2018.7.13)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04
G 0 6 T	1/00	(2006.01)	G O 6 T 1/00 4 0 0 B
G O 1 N	21/27	(2006.01)	G O 1 N 21/27 A
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34 B
			C 1 2 M 1/34 D

請求項の数 3 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2015-549506 (P2015-549506)	(73) 特許権者	505005049
(86) (22) 出願日	平成25年12月13日 (2013.12.13)		スリーエム イノベイティブ プロパティ ズ カンパニー
(65) 公表番号	特表2016-510211 (P2016-510211A)		アメリカ合衆国, ミネソタ州 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ポスト オ フィス ボックス 3 3 4 2 7, スリーエ ム センター
(43) 公表日	平成28年4月7日 (2016.4.7)	(74) 代理人	100088155
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/074887		弁理士 長谷川 芳樹
(87) 国際公開番号	W02014/099644	(74) 代理人	100107456
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)		弁理士 池田 成人
審査請求日	平成28年12月6日 (2016.12.6)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	61/739, 789		弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成24年12月20日 (2012.12.20)	(74) 代理人	100162352
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 酒巻 順一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガス産生微生物のコロニーの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

撮像装置を使用して、透明なフィルムカバーシートを有する前面と半透明の基板を有する後面とを有する薄膜型培養器の第1の画像を生成することであって、

前記第1の画像が前記薄膜型培養器の前記前面に照明を与えながら生成され、

前記薄膜型培養器が、微生物によって、第1の色により観察可能な第1の生成物に変換される指示化合物を含み、

前記薄膜型培養器が、第1の種類 of 微生物によって気体に変換されうる栄養成分を含む、ことと、

前記撮像装置を使用して、前記薄膜型培養器の第2の画像を生成することであって、前記第2の画像が前記薄膜型培養器の前記後面に照明を与えながら生成される、ことと、

前記第1の画像を解析して前記薄膜型培養器内の第1の位置の微生物コロニーを識別することと、

前記第2の画像を解析して前記薄膜型培養器内の第2の位置の第1の気泡を識別することと、

前記第1の位置が前記第2の位置から所定の距離の範囲内にあるかを判定することと、を含み、

前記第1の画像が、後面照明に対する前面照明の第1の比で前記薄膜型培養器を照明しながら生成され、前記第2の画像が、前記第1の比よりも小さい後面照明に対する前面照明の第2の比で前記薄膜型培養器を照明しながら生成される、方法。

10

20

【請求項 2】

前記第 2 の画像を解析して第 1 の気泡を識別することが、前記第 1 の気泡の周囲の第 1 の所定の領域を解析して第 2 の気泡を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の気泡のサイズパラメータを第 2 の気泡のサイズパラメータと比較することを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年12月20日出願の米国仮特許出願第61/739,789号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願の開示内容の全体を参照によって本明細書に援用するものである。

【背景技術】

【0002】

生物学的安全性は、現代社会における非常に重要な問題となっている。食物又は他の材料中の生物学的汚染の検査は、食品の開発業者及び販売業者にとって重要かつ、しばしば義務として課される要求事項となっている。生物学的検査は、例えば医療患者から採取された血液試料、実験目的で開発された実験室試料、及び他の種類の生物学的試料などの実験室試料中の細菌又は他の病原体を同定するためにも用いられる。生物学的検査を改良する目的、また、生物学的検査プロセスを効率化し、標準化する目的で様々な方法及び装置を利用することができる。

【0003】

様々な培養器がこれまでに開発されている。一例として、ミネソタ州セントポール所在のスリー・エム社(3M Company)(以下、3Mと称する)により開発された培養器がある。詳細には、この培養器は、3M社によりPETRIFILMプレートの商品名で販売されている。培養器を用いることで、例えば、好気性細菌、大腸菌、大腸菌群、腸内細菌、酵母、かび、黄色ブドウ球菌、リステリア、カンピロバクター菌を始めとする、食品汚染と一般的に関連付けられる微生物の速やかな増殖及び検出を促進することができる。PETRIFILMプレート又は他の増殖培地の使用により、食品試料の細菌検査を簡素化す

【0004】

培養器を使用して細菌を計数するか又はその存在を確認することによって、(食物検査の場合には)是正措置を行い、(医療用途の場合には)正しい診断を行うことができる。他の用途では、培養器を使用することで、実験室試料中の微生物を、例えば実験目的で、急速に増殖させることができる。

【0005】

生物学的スキャンユニットとは、微生物コロニーをスキャン及び/又は計数するために用いられる装置のことを指す。例えば、食品試料又は実験室試料を培養器上に置き、次いでプレートをインキュベーションチャンバに挿入することができる。インキュベーションの後、培養器を生物学的スキャンユニットに入れ、細菌増殖の自動検出及び計数を行うことができる。このようにして、生物学的スキャンユニットは、培養器中の微生物コロニーの検出及び計数を自動化し、これにより人為的エラーを低減することによって生物学的検査プロセスを改善するものである。

【0006】

一般的には、本開示は、スキャン画像内の物体を区別するための技術に関する。詳細には、この技術を使用することで、2枚の基板の間にヘッドスペースを設けずに配置された培地を含む培養器の画像内に存在するガス産生微生物のコロニーを識別する。更に、この技術を使用することで、培養器のスキャン画像内のガス産生微生物のコロニーの数を計数することができる。コロニーを計数するには、培地の入った培養器をスキャンユニットに

10

20

30

40

50

挿入する。培養器を挿入するとスキャンユニットは培養器の画像を生成する。次いで、スキャンユニット内で、又はデスクトップコンピュータ、ワークステーションなどの外部の演算装置によって実行される画像処理及び解析のルーチンを用いてガス産生微生物のコロニーの数を計数又は他の方法で決定することができる。本発明によれば、ガス産生コロニーを区別する方法が述べられる。本方法を用いることで、従来の方法と比較して、スキャンされた画像内の微生物コロニーの自動計数の精度を向上させることができる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様では、本開示は方法を提供する。この方法は、撮像装置を使用して、透明なフィルムカバーシートを有する前面と半透明の基板を有する後面とを有する薄膜型培養器の第1の画像を生成することを含みうる。前記第1の画像は培養器の前面に照明を与えながら生成される。前記培養器は、微生物によって、第1の色により観察可能な第1の生成物に変換される指示化合物を含む。前記培養器は、第1の種類の微生物によって気体に変換されうる栄養成分を含む。方法は、前記撮像装置を使用して、前記薄膜型培養器の第2の画像を生成することであって、前記第2の画像が前記培養器の前記後面に照明を与えながら生成される、ことと、前記第1の画像を解析して前記培養器内の第1の位置の微生物コロニーを識別することと、前記第2の画像を解析して前記培養器内の第2の位置の第1の気泡を識別することと、前記第1の位置が前記第2の位置から所定の距離の範囲内にあるかを判定することと、を更に含んでもよい。

10

20

【0008】

いずれの実施形態においても、前記第1の画像は、後面照明に対する前面照明の第1の比で培養器を照明しながら生成され、前記第2の画像は、前記第1の比よりも小さい、後面照明に対する前面照明の第2の比で培養器を照明しながら生成されうる。上記の実施形態のいずれにおいても、前記第1の気泡は第1の外周を有してよく、前記第2の画像を解析して気泡を識別することは、前記第1の外周に付随する暗い輪を識別することを含みうる。上記の実施形態のいずれにおいても、前記第2の画像を解析して第1の気泡を識別することは、前記第1の気泡のサイズパラメータを計算することを含みうる。上記の実施形態のいずれにおいても、方法は、第1の気泡のサイズパラメータを第2の気泡のサイズパラメータと比較することを更に含みうる。上記の実施形態のいずれにおいても、方法は、前記第1の画像を使用して前記培養器内の微生物コロニーの数を数えることを更に含みうる。上記の実施形態のいずれにおいても、方法は、前記第1及び第2の画像を使用して前記栄養成分を気体に変換しない微生物コロニーの数を数えることを更に含みうる。

30

【0009】

別の態様では、本開示は、コンピュータ可読命令を含むコンピュータ可読媒体を提供する。前記コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、前記プロセッサを含む画像解析システムに、前面と前面の反対側の後面とを有する薄膜型培養器の第1の画像を解析させることができる。前記第1の画像は培養器の前面に照明を与えながら生成される。前記第1の画像を解析することは、前記培養器内の第1の位置の微生物コロニーを識別することを含む。前記コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、プロセッサに薄膜型培養器の第2の画像を更に解析させることができ、前記第2の画像は、前記培養器の後面に照明を与えながら生成されるものである。前記第2の画像を解析することは、培養器内の第2の位置の気泡を識別することを含む。前記コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、プロセッサに、前記第1の位置が前記第2の位置から所定の距離の範囲内にあるかを更に判定させることができる。

40

【0010】

コンピュータ可読媒体の上記の実施形態のいずれにおいても、前記第2の画像を解析して気泡の第2の位置を特定することは、前記気泡の周囲の暗い輪を識別することを含みうる。上記の実施形態のいずれにおいても、前記コンピュータ可読媒体は、プロセッサにより実行されると、システムに、第1の画像を使用して培養器内の微生物コロニーの数を数

50

えさせることが可能な命令を更に含む。上記の実施形態のいずれにおいても、前記コンピュータ可読媒体は、プロセッサにより実行されると、システムに、第1及び第2の画像を使用して培養器内のガス産生微生物のコロニーの数を数えさせることが可能な命令を更に含む。

【0011】

更なる別の態様では、本開示は方法を提供する。この方法は、薄膜型培養器の増殖領域の画像を解析して気泡を検出することと、複数の前記気泡を分類することと、を含み、前記複数の気泡を分類することは、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。いずれの実施形態においても、前記気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、第1の気泡のサブセットを第1の非生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含んでよく、方法は、前記第1の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値を指定することを更に含む。いずれの実施形態においても、前記気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、第2の気泡のサブセットを生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含んでよく、方法は、前記生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の下限値を指定することを更に含む。

10

【0012】

更なる別の態様では、本開示はコンピュータ可読媒体を提供する。コンピュータ可読媒体は、プロセッサにより実行されると、前記プロセッサを含む画像解析システムに薄膜型培養器の増殖領域の画像を解析させて気泡を検出させるとともに複数の前記気泡を分類させるコンピュータ可読命令を含み、前記複数の気泡を分類することは、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。いずれの実施形態においても、前記気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、第1の気泡のサブセットを第1の非生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含んでよく、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記第1の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値を指定させることが可能である。いずれの実施形態においても、前記気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、第2の気泡のサブセットを生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含んでよく、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の下限値を指定させることが可能である。

20

30

【0013】

更なる別の態様では、本開示は方法を提供する。この方法は、薄膜型培養器の増殖領域の画像の第1の領域を解析させて前記第1の領域内の第1の気泡の数を検出することと、前記画像の第2の領域を解析させて前記第2の領域内の第2の気泡の数を検出することと、前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数と比較することと、を含みうる。いずれの実施形態においても、方法は、前記画像の第3の領域を解析して前記第3の領域内の第3の気泡の数を検出することと、前記第1の気泡の数又は前記第2の気泡の数を前記第3の気泡の数と比較することと、を含みうる。いずれの実施形態においても、方法は、前記画像を解析して前記培養器の前記増殖領域内の気泡を検出することと、複数の気泡を分類することと、を更に含んでよく、前記複数の気泡を分類することは、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。特定の実施形態では、方法は更に、前記第1、第2、又は第3の領域のいずれかの気泡が、前記第1の群又は前記第2の群のいずれに割り振られるかを判定することを含みうる。

40

【0014】

更なる別の態様では、本開示はコンピュータ可読媒体を提供する。このコンピュータ可読媒体は、プロセッサにより実行されると、プロセッサを含む画像解析システムに、薄膜型培養器の増殖領域の画像の第1の領域を解析させて前記第1の領域内の第1の気泡の数を検出させ、前記画像の第2の領域を解析させて前記第2の領域内の第2の気泡の数を検

50

出させ、前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数と比較させることが可能なコンピュータ可読命令を含む。いずれの実施形態においても、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記画像の第3の領域を解析させて前記第3の領域内の第3の気泡の数を検出させ、前記第1の気泡の数又は前記第2の気泡の数を前記第3の気泡の数と比較させることが可能である。いずれの実施形態においても、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記画像を分析させて前記培養器の前記増殖領域内の気泡を検出させ、複数の前記気泡を分類させることが可能であり、前記複数の気泡を分類することは、前記複数の気泡のそれぞれと関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。いずれの実施形態においても、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記第1、第2、又は第3の領域のいずれかの気泡が、前記第1の群又は前記第2の群のいずれに割り振られるかを判定させることが可能である。

10

【0015】

本発明の異なる態様は多くの利点をもたらすものである。例えば、本発明は、培養器上の微生物コロニーの自動計数の精度を向上させることができる。詳細には、本明細書に述べられる計数規則は、一般的に生じる、培養器内の微生物コロニーの自動計数の精度を低下させる問題を解決するものである。

【0016】

これらの実施形態及び他の実施形態の更なる詳細を、添付の図面及び以下の説明文に記載する。他の特徴、目的、及び利点は、説明文及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかとなる。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】スキャン装置によって生成される画像の画像解析を行う外部コンピュータに接続されたスキャン装置を含む例示的なシステムの斜視図である。

【図2】図1に示されるシステムに相当する生物学的スキャンシステムのブロック図である。

【図3】微生物培養器の自動解析のプロセスを示すフロー図である。

【図4】本開示に基づく微生物培養器を解析する方法の一実施形態のブロック図である。

【図5】本開示に基づくガス産生微生物のコロニーを区別するための計数規則のフロー図である。

30

【図6】薄膜型培養器の一部の白黒画像であり、培養器の後面のみを照明した際に得られた画像である。

【図7】図6の薄膜型培養器の一部の白黒画像であり、培養器の前面のみを照明した際に得られた画像である。

【図8】図6のラインスキャンにおける画素の赤、緑、及び青色成分のそれぞれの相対強度のグラフである。

【図9】図7のラインスキャンにおける画素の赤、緑、及び青色成分のそれぞれの相対強度のグラフである。

【図10A】微生物のガス産生コロニー及び非ガス産生コロニーを示す薄膜型培養器の一部の白黒画像であり、培養器の後面のみを照明した際に得られた画像である。

40

【図10B】画像の第1のマスク領域を示す図10Aの白黒画像である。

【図10C】画像の第2のマスク領域を示す図10Aの白黒画像である。

【図10D】画像の第3のマスク領域を示す図10Aの白黒画像である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

微生物の検出及び計数は、多くの様々な分野において普遍的な問題である。微生物は、ほとんどすべての食品、水、空気中、及び人が触れる様々な表面及び物質中に存在している。こうした微生物はしばしば有害であり、したがってこれを測定して管理する必要がある。

50

【 0 0 1 9 】

物質（例えば、食品、水、環境残渣）中の微生物の存在を検出するために広く用いられている慣例の1つに、適宜調製した、試験しようとする物質の試料を培養器に入れ、微生物をコロニーに増殖させることがある。このような培地中で培養すると、コロニーは肉眼に見えるようになり、計数することができるようになる。それぞれの目に見えるコロニーは1個の元の微生物に対応している。本開示の方法は、微生物のコロニーを増殖及び計数するためのこうした培養器を使用して行われる。培養器は、個々のコロニーが分離された状態に維持されるように、基質（例えば、寒天、グアーガム、又はペクチンなどのゲル化剤）中に分散された水性栄養培地を含んでいる。多くの培養器は、本明細書に述べられるような指示化合物を更に含んでいる。本開示に基づくガス産生微生物のコロニーを増殖及び検出するのに適した培養器としては、2枚の基板の間に配置された培地を有する培養器が挙げられる。すなわち、培地は、培地と2枚の基板の両方との間にヘッドスペースを設けずに2枚の基板の間に挟まれる。

10

【 0 0 2 0 】

本開示の方法における使用に適した培養器としては、例えば、スリー・エム社（3M Company）によりPETRIFILMの商品名で販売される薄膜型培養器が挙げられる。PETRIFILM薄膜型培養器は、例えば、米国特許第5,364,766号、同第5,601,998号、及び同第5,681,712号をはじめとする、多くの公報に開示されており、これらの全容をいずれも参照によって援用するものである。

20

【 0 0 2 1 】

通常の寒天培地及びPETRIFILMプレートに使用されている培地をはじめとする多くの培地は、微生物の存在を示すための指示化合物を含んでいる。指示化合物としては、例えばpH指示薬、発色酵素基質、及び酸化還元指示薬が挙げられる。指示化合物は、生成物に直接的又は間接的に変換されると、微生物コロニー及び/又はコロニーの周囲の培地に色の変化を与える。こうした色の変化は、培地中の微生物コロニーの存在の検出をしばしば容易にするものであり（例えば、コロニーと培地との間の色のコントラストを高める）、また、色の変化は、特定の指示化合物と反応する特定のコロニーを、その指示化合物と反応しない別の微生物コロニーから区別する機能も有する。

【 0 0 2 2 】

微生物を増殖及び区別するための多くの種類の培地は、2種類以上の指示化合物を含んでいる。例えば、PETRIFILM大腸菌計数プレート中の培地は、水性緩衝液及び/又は試料で水和される場合、酸化還元指示薬（塩化トリフェニルテトラゾリウム、以下、「TTC」）及び発色酵素基質（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド、以下、「X-gluc」）を含んでいる。TTCは、微生物細胞と反応して、グラム陰性菌選択的増殖培地中で増殖する任意の細菌コロニーの細胞塊を染色する赤みがかった色のホルマザンを生成する。これに対して、X-glucは、選択的増殖培地中で増殖可能であること以外に、-D-ガラクトシダーゼ酵素活性を有する細菌（例えば、-D-ガラクトシダーゼ酵素活性を有する大腸菌株）のみと反応する。X-glucの加水分解によってインディゴ色素が生成され、コロニーの細胞塊を青く染色するとともに-D-ガラクトシダーゼ酵素活性を有するコロニーの周囲にそれほど濃くない青色の輪を形成する。

30

40

【 0 0 2 3 】

本開示の方法を用いることで、複数の指示化合物の1以上との反応に基づいて、またそれぞれのガス生成能又はその欠落によって、微生物コロニーを区別することが可能であると考えられる。微生物コロニーは、1以上の指示化合物と反応して、微生物の存在を示す呈色又は蛍光生成物を生成することができる。更に、微生物コロニーに付随する気泡の存在によって、そのコロニーが、培養器中に存在する栄養成分をガス状の最終生成物（例えば、二酸化炭素）に代謝することが可能な微生物群に属することが示される。

【 0 0 2 4 】

したがって、本開示に基づく方法で使用される培養器は、ガス状の最終生成物（例えば

50

、二酸化炭素)に変換されうる(例えば、発酵によって)有効量の栄養成分を含むものである。培養器はまた、微生物の活動によって産生され、培養器中に閉じ込められた気泡が、水和したゲルの一部を実質的に置換することで、光学的に検出可能な空隙が平面状の層の間に形成されるという特徴的な構造(すなわち、2つのほぼ平面状の層の間に挟み込まれた水和したゲル)を有している。いずれの実施形態においても、栄養成分は、例えばグルコース、スクロース、ラクトース、又は上記の炭水化物の任意の2つ以上の組み合わせなどの炭水化物とすることができる。当業者であれば、微生物の活動によってガス状の最終生成物に変換され、本開示に基づいてガス産生コロニーを識別するための培地中に使用することができる様々な栄養成分が認識されるであろう。

【0025】

本開示の方法で使用される培地は、1つの種類の微生物の増殖にとって、他の種類の微生物よりも有利となるようなものを選択することができる。例えば、培地は、特定の微生物(例えば、グラム陰性菌)の増殖を阻害する、かつ/又は他の微生物の増殖に有利な選択的成分(例えば、抗生物質、塩化ナトリウム、胆汁塩、クリスタルバイオレットなどの色素)を含むことができる。当業者であれば、本開示の方法に基づいて使用される培養器中で特定の微生物の増殖を促進させるために使用することが可能な様々な選択物質が認識されるであろう。

【0026】

本開示の方法に基づけば、試料は、当該技術分野では周知の手順にしたがって調製され、培養器中に接種され、インキュベートされる。試料の調製では、試料を培養器中の栄養培地の中(例えば、平板混釈法)又はその表面上(例えば、平板表面塗抹法)に導入するのに先立って試料から非微生物破片を低減又は除去するために、必要に応じて希釈、酵素的消化、濾過、及び/又は沈降を行ってもよい。

【0027】

試料中に存在することが疑われる微生物の増殖に適した温度での十分なインキュベーション時間の後、培養器中の微生物コロニーの画像を撮影するための撮像システムを使用し、異なる画像解析スキームを適用することによって、微生物コロニーを検出及び計数することができる。培養器中の微生物コロニーを計数及び/又は区別するために使用される撮像システムの例は、国際公開第WO 98/59314号、並びに米国特許第7,298,885号、同第8,094,916号、及び同第7,496,225号に見ることができ、これらの全容を参照により本明細書に援用するものである。培養器中の微生物を検出及び/又は計数するための画像解析スキームの例は、米国特許第6,058,209号及び同第6,243,486号に見ることができ、これらの全容を参照により本明細書に援用するものである。

【0028】

本開示は、培養器(例えば、薄膜型培養器)の画像内の微生物コロニーを計数するための技術に関するものである。この技術を使用することで培養器中の微生物コロニーの自動計数の精度を高めることができる。本明細書に開示される計数規則は、個別に用いるか、又は例えば、いずれもそれらの全容を本明細書に参照によって援用するところの国際公開第WO 2005/062744号、及び2012年12月20日出願の発明の名称が「画像内の微生物コロニーを区別するための方法(METHOD OF DIFFERENTIATING MICROBIAL COLONIES IN AN IMAGE)」である米国仮特許出願第61/739,786号に開示される計数規則などの他の計数規則と組み合わせて用いることができる。

【0029】

本明細書に開示される計数規則は、通常、コンピュータにより実行可能なソフトウェアの命令として保存され、生物学的スキャンシステム又は画像解析システム内のプロセッサ(例えば、必要に応じてスキャン装置と接続されるプロセッサ及び画像解析ソフトウェア)によって実行される。また、これらの規則は、特定用途向け集積回路(ASIC)、フィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)、又は当該技術分野では周知の各種のハードウェア要素などのハードウェア内で実行することもできる。本明細書に述べられる

10

20

30

40

50

規則は、スキャンされる増殖培地に応じて、個別に、又は他の計数規則との任意の組み合わせとして適用することができる。いずれの場合も、本明細書に述べられる規則を適用することにより、培養器（例えば、薄膜型培養器）上の微生物コロニーの自動計数の精度を向上させることができる。

【0030】

いずれの実施形態においても、本開示の方法では、培養器内の微生物コロニーを検出及び計数するためのシステムを用いる。培養器内の微生物コロニーを検出及び計数するためのシステムは、例えば、いずれもその全容を参照によって本明細書に援用するところの国際公開第WO 96/18720号、同第WO 96/18167号、同第WO 2005/062744号に述べられている。

10

【0031】

図1は、培養器内の微生物コロニーを検出及び計数するためのシステム20の一実施形態の斜視図を示したものである。システム20は、外部コンピュータ22と接続されたスキャナ21を有しており、外部コンピュータ22はスキャナによって生成された画像の画像解析を行う。外部コンピュータ22は、例えば、培養器24の画像解析を行うようにプログラムされたマイクロプロセッサを含みうる。外部コンピュータ22は、パーソナルコンピュータ（PC）、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、手持ち式コンピュータ、ワークステーション、タブレットパーソナルコンピューティングデバイス、携帯デバイスなどで構成することができる。例えば、ソフトウェアプログラムを外部コンピュータ22にロードすることによってスキャナ21によって生成される培養器24の画像の画像解析を容易とすることができる。

20

【0032】

スキャナ21は、インターフェース25を介して外部コンピュータ22と接続されている。インターフェース25は、例えば、ユニバーサル・シリアル・バス（USB）インターフェース、ユニバーサル・シリアル・バス2（USB2）インターフェース、IEEE 1394ファイヤーワイヤー（Fire Wire）インターフェース、スモール・コンピュータ・システム・インターフェース（Small Computer System Interface）（SCSI）、アドバンス・テクノロジー・アタッチメント（Advance Technology Attachment）（ATA）インターフェース、シリアルATAインターフェース、ペリフェラルコンポーネントインターコネクト（PCI）インターフェース、従来のシリアル若しくはパラレルインターフェース、無線接続などを含みうる。

30

【0033】

培養器24は、培養器24を識別するために用いられるバーコード又は他の種類の識別マークなどの標示29を必用に応じて有してもよい。RFIDタグ、光学的に検出可能な二次元コードなども標示として使用することができる。いずれの場合も、標示29は、培養器24で増殖され試験されている微生物の種類を識別することができる。スキャナ21は、培養器24をスキャナ21内の第1の位置に引き込んで標示29の画像を生成し、次いで培養器24を第2の位置に引き込んで増殖領域27の画像を生成するような設計とすることができる。このようにして、培養器の標示29及び増殖領域27の画像をシステム20によって生成することができる。また、1つの画像で標示29及び増殖領域27の両方を撮影することもできる。いずれの場合も、標示29をスキャンすることで、使用されているプレートの種類の識別が容易となることにより、1以上の所望の計数規則を自動的に適用することができる。

40

【0034】

例として、培養器24は、スリー・エム社（3M）よりPETRIFILMプレートの商品名で販売される薄膜型培養器で構成することができる。培養器24を用いることによって、例えば大腸菌、大腸菌群細菌、腸内細菌、サルモネラ菌などを含む、ガス産生微生物による食品汚染と一般的に関連付けられる微生物の速やかな増殖及び検出を促進することができる。培養器は、一般に、生物学的増殖並びに細菌の検出及び計数に一般的に使用される増殖培地の1つの種類を含むものである。しかしながら、本発明は、本明細書で検

50

討される他の種類の増殖培地とともに適用することもできる。

【0035】

いずれの実施形態においても、薄膜型培養器は、透明なフィルムカバーシートで構成された前面を有してよく、後面は、例えば、PETRIFILM大腸菌/大腸菌群計数プレート、PETRIFILM大腸菌群計数プレート、及びPETRIFILM腸内細菌計数プレートなどの半透明な基質で構成される。理論によって束縛されるものではないが、半透明なフィルムと透明フィルムとの間に配置された比較的薄い(例えば、厚さ約1~2mm)培地の組み合わせが、本開示に基づいてガス産生コロニーを区別するうえで有利な光学的条件を与えるものと考えられる。

【0036】

培養器上の微生物コロニーの自動計数の精度を高めるため、本開示の方法の異なる態様では、画像処理の際に適用することができる規則を確立している。換言すれば、下記により詳しく述べる規則は、撮像装置から直接画像を受信しないシステム20又は画像解析システム(図に示されていない)において実行されるコロニー計数アルゴリズムの一部を構成しうるものである。これらの規則は、スキャンされる増殖培地の種類及び想定されうる問題に応じて、個別に、又は他の画像解析規則(国際公開第WO 2005/062744号に述べられる計数規則)との任意の組み合わせとして用いることができる。1以上の計数規則を適用することで、薄膜型培養器などのような増殖培地上の微生物コロニーの自動計数の精度が高められることにより、システム20のような生物学的スキャンシステムを改良することができる。

【0037】

図2は、システム20(図1)に相当しうる、生物学的スキャンシステム30のブロック図である。システム30は、増殖培地の1以上の画像を生成してプロセッサ34にその画像を提供する撮像装置32を含んでいる。プロセッサ34はメモリ36に接続されている。メモリ36は、撮像装置32により生成された画像の画像解析を促進する、プロセッサにより実行可能な様々なソフトウェア命令を保存する。詳細には、メモリ36は、培養器上の微生物コロニーの自動計数の精度を向上させるために画像解析の際に適用される1以上の計数規則37を保存する。出力装置38は、プロセッサ34が判定した結果を受信してその結果をユーザに提供する。

【0038】

例として、撮像装置32は、培養器の1以上の画像を生成するための2次元単色カメラで構成することができる。異なる照明要素(図に示されていない)を使用して培養器の前後を照明することができる。例えば、照明要素は培養器を1以上の色で照明ことができ、培養器の1以上の画像が撮像装置32によって生成されうる。更に、コントローラ(図に示されていない)によって、培養器の各画像について、後面照明に対する前面照明の比を制御することができる。薄膜型培養器の画像を得るために使用することが可能な、必要に応じて複数の照明色による、前面及び後面の照明を与える撮像装置の非限定的な一例が、本明細書にその全容を参照によって援用するところの米国特許第8,094,916号に述べられている。

【0039】

本開示に基づく画像の解析方法では、培養器の少なくとも1つの画像を使用する。必要に応じて、本方法では、培養器を照明する異なる条件を使用してそれぞれが得られる2個の画像を用いることによって、ガス産生微生物のコロニーをより正確に区別することができる。第1の画像は、培養器の前面(すなわち、撮像装置に面する培養器の面)を照明しながら得ることができる。薄膜型培養器の前面は、透明なカバーシートを有する面である。第2の画像は、培養器の「後面」を照明しながら得ることができる。薄膜培養器の後面はカバーシートの反対側の面である。ガス産生微生物のコロニーのプレートを検出するように構成された多くのPETRIFILM(例えば、PETRIFILM大腸菌/大腸菌群計数プレート、PETRIFILM大腸菌群計数プレート、PETRIFILM迅速大腸菌群計数プレート、及びPETRIFILM腸内細菌計数プレート)では、薄膜培養器

10

20

30

40

50

の後面は半透明なポリマーフィルムを有している。

【0040】

培養器の「前面」を照明することは、培養器の前面を照明する照明要素から入射する照明に培養器を曝露することを含みうる。一実施形態では、第1の画像は、培養器の前面を照明する照明要素から入射する照明の100%と、培養器の後面を照明する照明要素から入射する照明の0%とを用いて得ることができる。別の実施形態では、例えば、第1の画像は、培養器の前面を照明する照明要素から入射する照明の80%と、培養器の後面を照明する照明要素から入射する照明の20%とを用いて得ることができる。後面照明に対する前面照明の比は、培養器中の特定の種類の栄養培地に対して最適なコントラストを与えるように選択することができる。

10

【0041】

本方法のいずれの実施形態においても、第1の画像は、後面照明に対する前面照明の第1の比（例えば、100%：0%）で培養器を照明しながら生成され、第2の画像は、前記第1の比よりも小さい、後面照明に対する前面照明の第2の比（例えば、0%：100%）で培養器を照明しながら生成される。いずれの実施形態でも、第1の比は1：1よりも大きくてよい。いずれの実施形態でも、第2の比は1：1よりも小さくてよい。

【0042】

注意すべき点として、本明細書で使用するときの「第1の画像」とは、培養器が主としてプレートの前面からの照明を受光しながら得られる画像のことを指し、本明細書で使用するときの「第2の画像」とは、培養器が主としてプレートの後面からの照明を受光しながら得られる画像のことを指すものである。示唆される画像を得る時間的な順序は、「第1の画像」及び「第2の画像」なる用語の使用が意図するところではない。したがって、培養器の第1の画像は、培養器の第2の画像よりも前又は後で得ることができる。更に、一方の画像（例えば、それぞれ第1の画像又は第2の画像）を、他方の画像（例えば、それぞれ第2の画像又は第1の画像）を得た直後に撮像培養器によって得る必要はない。第1及び第2の画像は、各画像の取得の間の時間に生じる顕著な生物学的変化（例えば、増殖又は酵素活性）又は物理的变化（例えば、脱水）の可能性を防ぐために十分に近い時間で得ることが推奨される。したがって、好ましい一実施形態では、第1の画像は、第2の画像が得られた時間の約30秒以内に得られる。

20

【0043】

当業者であれば認識されるであろう点として、撮像装置が培養器の前面に面して配置され、更に照明要素が培養器の前面に照明が向けられるように配置されたシステムでは、撮像装置によって生成される画像は、培養器及びその内容物から反射される光から実質的になることがある。更に、当業者であればやはり認識されるであろう点として、撮像装置が培養器の前面に面して配置され、更に照明要素が培養器の後面に照明が向けられるように配置されたシステムでは、撮像装置によって生成される画像は、培養器及びその内容物によって透過及び/又は反射される光から実質的になることがある。

30

【0044】

培養器の「後面」を照明することは、培養器の後面を照明する照明要素から入射する照明に培養器を曝露することを含みうる。一実施形態では、第2の画像は、培養器の後面を照明する照明要素の100%と、培養器の前面を照明する照明要素から入射する照明の0%とを用いて得ることができる。別の実施形態では、第2の画像は、培養器の後面を照明する照明要素から入射する照明の80%と、培養器の前面を照明する照明要素から入射する照明の20%とを用いて得ることができる。後面照明に対する前面照明の比は、培養器中の特定の種類の栄養培地に対して最適なコントラストを与えるように選択することができる。

40

【0045】

本開示の方法のいずれの実施形態においても、後面照明によって得られる画像のみ又は前面照明によって得られる画像のみを用いることが望ましい場合がある。図6及び7に示され、また下記に述べられるように、後面照明は、薄膜型培養器内の培地と気泡（例えば

50

、気泡の外周)との間の特に高いコントラストを与えることができる。

【0046】

これらの画像はプロセッサ34に提供されるとともにメモリ36にも保存されうる。いずれの場合にも、各画像は、培養器上の細菌の数を決定するために計数規則37を適用することにより解析される。撮像装置32の解像度は、約155ピクセル/cmとすることができる。その場合、画像中の1cmの線は長さ155ピクセルである。

【0047】

プロセッサ34は、メモリ36に保存されたソフトウェアを実行する汎用マイクロプロセッサからなるものとしてすることができる。あるいは、プロセッサ34は、特定用途向け集積回路(ASIC)又は他の特定の設計を有するプロセッサからなるものであってもよい。いずれの場合も、プロセッサ34は、異なる計数規則37を実行することによって培養器上の微生物コロニーの自動計数の精度を高める。

【0048】

メモリ36は、プロセッサ34により適用される、プロセッサにより実行可能なソフトウェア命令を保存するコンピュータ可読媒体の一例である。例として、メモリ36は、ランダムアクセスメモリ(RAM)、読み出し専用メモリ(ROM)、不揮発性ランダムアクセスメモリ(NVRAM)、電氣的に消去可能なプログラマブル読み出し専用メモリ(EEPROM)、フラッシュメモリなどで構成することができる。下記に述べるもののような計数規則37はメモリ36に保存され、画像解析に用いられるより大きなソフトウェアプログラムの一部を形成することができる。

【0049】

出力装置38は、結果をユーザに対して通信するために用いられるディスプレイ画面を通常有している。しかしながら、出力装置38は、プリンタなどの他の種類の装置を含んでもよい。出力装置38は、ディスプレイ(図に示されていない)など、スキャンユニットの一部を構成してもよく、又は外部コンピュータ22(図1)のディスプレイ画面のようにスキャンユニットに対して外部であってもよい。

【0050】

図3は、自動培養器分析のプロセスを示すフロー図である。図3に示されるように、プロセッサ34は、培養器の1以上の画像を受信する(ステップ41)。プロセッサ34は、メモリ36から様々なソフトウェアルーチン呼び出すことによって培養器上の微生物コロニーを識別する(ステップ42)。例えば、細菌コロニーは、栄養培地中の1以上の指示化合物と反応した(すなわち、直接的又は間接的に)後にコロニーが生成する固有の色に基づいて識別することができる。コロニー認識の他の態様も本明細書において検討する。プロセッサ34により実行されるソフトウェアは、インキュベーションの間にコロニーが増殖した増殖領域の色変化に基づいて、培養器上の増殖領域の識別及び細菌コロニーの自動計数を可能とする。必要に応じて、プロセッサは、識別された微生物コロニーを計数するためのルーチン呼び出すことができる。ガス産生コロニーは、培養器内のガスを産生しないコロニーの数とは別の数として分離して計数することができる。

【0051】

本開示の方法によれば、プロセッサ34は、1以上の規則を適用することによって増殖培地上の微生物コロニーの計数の精度を向上させることができる(ステップ43)。これらの規則は、解析される培養器の種類に応じて、個別に適用されうるか、又は異なる規則の組み合わせを用いることができる。これらの規則は、メモリ36から個々に呼び出されうるか、又はより大きな画像解析ソフトウェアプログラムのサブルーチンを構成しうる。これらの規則は個々に適用するか、又は異なる規則のセットを適用することができる。規則のセットが用いられる場合、各規則が適用される順序は、1以上の画像を得るためにスキャンされるプレートの種類に基づいて選択することができる。選択される各規則の適用順序は最終的な結果に影響しうる。異なる規則のサブセットを任意の順序で適用してもよく、選択される規則のサブセットの順序も最終的な結果に影響しうる。

【0052】

図4は、本開示に基づく方法100の一実施形態を示す。本方法は、培養器の前面を照明しながら第1の画像を得るステップ51と、培養器の後面を照明しながら第2の画像を得るステップ52と、を含む。培養器の前面及び後面は、本明細書に開示される撮像システムを用いて照明することができる。方法100は更に、第1の画像を解析して培養器内の微生物コロニーの位置を特定するステップ53を含む。方法100は更に、第2の画像を解析して培養器内の気泡の位置を特定するステップ54を含む。

【0053】

第2の画像を解析して気泡の位置を特定することは、気泡を、培養器内の培地と区別することが可能な(画像内の)物体として識別することを含みうる。気泡を、培地と区別することが可能な物体として識別することは、ワイス(Weiss)(米国特許第6,381,353号)により開示される画像解析法を適用することによって行うことができる。画像の解析は、RGB(赤/緑/青)画像処理アルゴリズムを含みうる。これに代えるか又はこれに加えて、画像の解析は、HSI(色相、彩度、及び強度)、HSL(色相、彩度、及び輝度)、HSV(色相、彩度、及び明度)アルゴリズム、又はこれらの組み合わせを含みうる。ガス産生コロニーによって産生される気泡は、薄膜型培養器のカバーシートと基板との間に配置された培地の一部又は全部をしばしば置換することから、気泡は、周囲の培地及び/又は微生物コロニーよりも大幅に色の薄い画像内の領域として検出することができる。しかしながら、薄膜型培養器の固有の構成は、画像内の気泡の存在を検出する代替的な手法を可能とする、すなわち、気泡の周囲の比較的暗い輪の検出を可能とするものである。

【0054】

理論に束縛されずに言えば、培地と接触する気泡の縁は、気泡全体にわたった光の透過を可能とするレンズとして機能しうると考えられる。更に、こうした縁は、透過光の像を反射するミラーとして機能しうる。したがって、培地及びコロニーは通常は着色され、その色は通常は、薄膜型培養器の背面を形成する基板よりも暗いため、培地及び/又はコロニーの透過(又は反射)像は、気泡の比較的明るい色の中央部を囲んだ比較的暗色の輪を形成する。このような暗い輪は、図6に示され、実施例1に述べられるように、培地と、また、培地よりも一般的に暗い微生物コロニーと容易に区別することが可能なくっきりした色及び/又は輝度変化として検出することが可能である。

【0055】

第1及び第2の画像を得ることによって、画像内の物体が少なくとも1つの色の色調で画定される。したがって、第1及び/又は第2の画像を解析して各画像内の微生物コロニーを識別することは、当該技術分野では周知の画像解析方法にしたがって画像内の物体をコロニーとして識別することを含む。例えば、ワイス(Weiss)は、物体の大きさ、視認性、色、表面の質、及び形状を含む1以上の基準に基づいて画像内の物体(例えば微生物コロニー)を識別するための方法について述べている(本明細書にその全容を参照によって援用する米国特許第6,243,486号)。上記に述べたように、TTCを含む指示化合物と反応する微生物コロニーを検出するための方法は、赤色の色調を検出するように構成することができ、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニドを含む指示化合物と反応する微生物コロニーを検出するための方法は、青色の色調を検出するように構成することができる。

【0056】

第1及び/又は第2の画像を解析して画像内の微生物コロニーを識別することは、画像内で検出されたあらゆるコロニーの位置を特定することを含む。培養器内の特定のコロニーの位置を用いてそのコロニーの位置を培養器内の気泡の位置と比較する。特定のコロニー又は気泡の位置は、画像内でXY軸により特定することができる。したがって、好ましい実施形態では、第1の画像が得られた後でかつ第2の画像が得られる前に、培養器を動かすか又は他の方法で扱うことなく、第1及び第2の画像の両方が得られる。また、位置合わせ指標(例えば、PETRIFILMプレートの2つ以上の隅、又は任意の培養器上に形成された位置合わせマーク)を用いて各画像を適切に方向付けることによって第1

10

20

30

40

50

及び第2の画像内の物体（例えば、コロニー、気泡）の位置を決定及び比較することもできる。

【0057】

第1及び第2の画像を解析して培養器内の微生物コロニー及び気泡の位置を特定した後、方法100は更に、微生物コロニー及び気泡の位置を比較するステップ55を含む。位置を比較することは、特定の微生物コロニーとそのコロニーの近くの1以上の気泡との間の距離（例えば、ピクセルでの）を計算することを含みうる。この距離を用いることで、その気泡が特定のコロニーに付随したものであるか否かを判定し、それによりその特定のコロニーがガス産生微生物のコロニーであると結論づけることができる。

【0058】

PETRIFILM大腸菌/大腸菌群計数プレートと使用するために製造者によって提供される解釈の手引き書には、気泡が特定のコロニーに付随したものであるか否かの判定に関する指標が与えられている。一部において、この指標は気泡と微生物コロニーとの近接度に関連している。一般的に、特定の微生物コロニーと接触している気泡は、そのコロニーに付随している（すなわち、コロニーにより産生された）ものとみなされる。更に、コロニーの直径の約3倍に等しい距離の範囲内に位置する気泡は、そのコロニーに付随している（すなわち、コロニーにより産生された）ものとみなされる。したがって、本開示に基づいて、画像（例えば、本明細書に開示される第1の画像又は第2の画像）を解析してガス産生微生物の存在又はその位置を特定することは、その画像を解析して1以上の気泡の存在又はその位置を特定することを含む。いずれかの近接した微生物コロニーに対する気泡の位置を用いることで、その気泡がそのコロニーを形成する微生物によって産生されたものであるか否かが判定される。

【0059】

画像（例えば、本明細書に開示される第1の画像又は第2の画像）を解析して1以上の気泡の存在又はその位置を特定することは更に、その画像を解析して画像内の該1以上の気泡のサイズパラメータ（例えば、半径、直径、及び/又は面積）を決定することを含みうる。サイズパラメータは、例えば、気泡の半径、直径、又は面積内のピクセルの数を計算することによって決定することができる。1つの画像内に複数の気泡が観察された場合、複数の気泡のそれぞれのサイズパラメータを、例えばヒストグラムで比較することができる。こうしたヒストグラムは、画像内に見られる気泡のサイズ（例えば、半径、直径、又は面積）の分布を示すことができる。更に、ヒストグラムは、気泡のサイズ分布におけるギャップも示すことができる。これらのギャップを用いて、非生物由来の気泡を生物由来の気泡から区別することができる。

【0060】

本明細書にその全容を参照により援用するところの国際公開第W02012/012104号は、薄膜型培養器において観察されうる小さな非生物由来の気泡の存在について述べている。当該出願は、微生物コロニーが成長するにしたがって、微生物コロニーの周囲の領域内の非生物由来の気泡が縮小又は消失することについて更に開示している。下記に説明する図6では、非生物由来の気泡及び微生物コロニーの周囲の領域（すなわち、非生物由来の気泡のない領域）を明確に見ることができる。したがって、本開示の方法のいずれの実施形態も、コロニーの周囲の領域内の気泡の数を計算することを更に含んでもよい。コロニーの周囲の領域の面積は、例えばコロニーの面積の約5倍以下でありうる。本方法は、必要に応じて、微生物コロニーに近接した領域内に観察される気泡の数を、コロニーを含まない培養器内の栄養培地の別の領域（例えば、「コントロール」領域）内に観察される気泡の数と比較することを含んでもよい。この比較が行われる場合、微生物コロニーに近接した領域内に観察される気泡の数が、コントロール領域内に観察される気泡の数よりも大幅に少ない場合には、微生物コロニーに近接した第1の気泡の存在は、第1の気泡のサイズにかかわらず、その微生物コロニーがガス産生微生物のコロニーであることを示しうる。

【0061】

いずれの実施形態においても、本開示の方法は、第1の気泡のサイズパラメータを第2の気泡のサイズパラメータと比較することを更に含む。画像内に複数の気泡が存在する場合、第1の気泡のサイズパラメータを第2の気泡のサイズパラメータと比較することは、複数の気泡のそれぞれについてサイズパラメータの値のヒストグラムを作成することを含む。サイズパラメータの値（例えば、半径、直径、又は面積）の分布は、同様なサイズを有する気泡の集団を表しうる。これらの集団は1以上の群に分けることができる。

【0062】

このヒストグラムを用いることで、ガス発生微生物によって発生された第1の気泡を、ガス発生微生物によって発生されたものではない第2の気泡と区別するために用いられるサイズパラメータ値の閾値（例えば、気泡の半径、直径、又は面積について）又はサイズパラメータの範囲を決定することができる。有利な点として、培養器内で観察される複数の気泡のサイズの比較を用いて、比較的均一なサイズを有する傾向がある非生物由来の気泡を、非生物由来の気泡よりもしばしば大きい、微生物コロニーによって発生された気泡と区別することができる。

10

【0063】

PETRI FILM大腸菌/大腸菌群計数プレートと使用するために製造者によって提供される解釈の手引き書には、気泡が特定のコロニーに付随したものであるか否かの判定に関する更なる指標が与えられている。一般的に、ある気泡が特定の微生物コロニーに近接しており、その気泡の直径が、近接したコロニーの直径に概ね等しいか又はそれよりも大きい場合、その気泡はそのコロニーに付随する（すなわち、そのコロニーによって発生された）ものとみなされる。しかしながら、当業者であれば、ガス発生コロニーに付随する気泡は、その気泡が付随するガス発生微生物のコロニーよりも小さいサイズパラメータの値（例えば、直径）を有する場合がある（例えば、試料及び/又は培養器が微生物のガス発生を阻害する栄養成分を含む場合）点は認識されるであろう。

20

【0064】

図5は、本開示に基づく、コロニーを複数のコロニーのタイプに区別するための規則を示したフロー図である。図2に示されるように、プロセッサ34は、メモリ36に保存されたソフトウェアを呼び出して第1及び第2の画像内のコロニー及び気泡の位置を特定してマッピングする（ステップ61）。詳細には、プロセッサ34は、第1の画像を用いて識別及び位置特定されたコロニーが、第2の画像を用いて識別及び位置特定された気泡に近接した位置にマッピングされるか否かを判定する（ステップ62）。第1及び第2の画像を解析しながら気泡に近接したコロニーが見つかった場合、プロセッサ34は、その気泡が、近接するコロニーに付随したものであるか（すなわち、そのコロニーにより発生されたものであるか）否かを判定するための近接計数を適用する。上記に述べたように、気泡が、コロニーの所定の距離の範囲内（例えば、コロニーの直径の約3倍に相当する範囲内）にある場合、培養器内のコロニーは、第1のタイプ（例えば、「ガス発生型」、図5のステップ63を参照）として数えられる。上記に述べたように、気泡が、コロニーの所定の距離の範囲内にはない（例えば、コロニーの直径の約3倍に相当する範囲よりも離れている）場合、培養器内のコロニーは第2のタイプ（例えば、「非ガス発生型」、図5のステップ64を参照）として数えられる。

30

40

【0065】

必要に応じて、更なるステップ（図に示されていない）を、図5に示される計数ルールに追加することができる。更なるステップは、ステップ61の後でステップ63又はステップ64の前の任意の点において、一連のステップに挿入することができる。第1の更なるステップは、画像内のそれぞれの気泡のマップ位置を気泡のサイズ（例えば、直径又は面積）と関連付けるものである。第2の更なるステップは、気泡のサイズを所定のサイズ値（又は所定のサイズ値の範囲）と比較することで特定の気泡のサイズが、所定のサイズ値よりも小さいか、それよりも大きいか、若しくはそれに等しいかを判定するか、又は特定の気泡のサイズが所定の範囲内にあるか否かを判定するものである。したがって、これ

50

らの更なるステップを含む計数規則は、それぞれの気泡に関連付けられた2つのパラメータ（すなわち、気泡のサイズ及び気泡とコロニーとの近接度）を用いることによって、その気泡が微生物の活動にともなうものであるか否かの判定を行う（すなわち、微生物コロニーがガス産生微生物のコロニーとして数えられるべきか否かを判定する）。

【0066】

本方法の特定の実施形態では、ある微生物コロニーをガス産生微生物のコロニーとして識別することは、コロニー中の微生物が属する特定の分類又は群を操作者が同定することを可能とするものである。例えば、培地がグラム陰性腸内細菌の増殖を促す栄養成分及び選択物質を含み、培地中の発酵性栄養成分がラクトースである場合、その微生物は大腸菌群細菌として知られる細菌群に属するものとして仮に同定することができる。別の例として、培地がグラム陰性腸内細菌の増殖を促す栄養成分及び選択物質を含み、培地中の発酵性栄養成分がグルコースである場合、その微生物は腸内細菌科として知られる細菌科に属するものとして仮に同定することができる。

10

【0067】

図6は、薄膜型培養器の増殖領域の一部の白黒画像を示している。この画像は、実施例1で述べるように、培養器の後面のみを照明した際に得られたものである。増殖領域内には複数の微生物コロニー（71～73）が存在している。図6には、複数の気泡（81～84）も示されている。気泡81～83は、気泡に近接した（すなわち、コロニーの直径の約3倍以下の距離の範囲内）少なくとも1つの微生物コロニー（例えば、コロニー71）よりも大きい面積を有していることが観察される。したがって、本開示の方法によれば、3個の気泡すべて（気泡81～83）が「生物由来の」気泡である（すなわち、これらは試料中の微生物によって産生されたものである）とみなされる。これに対して、培養器の増殖領域内の培地全体にわたって多数の非常に小さい気泡84が分散している。これらの気泡（すなわち、気泡84）は、培養器が接種された後、まもなく（すなわち、微生物のコロニーが培養器中に出現する数時間前に）培養器中に確認されること、また、気泡の面積（体積）が長時間のインキュベーション後に増大しない（例えば、一般的にこれらの気泡は典型的な微生物コロニーの直径よりも大幅に小さいままである）ことから、これらの気泡は、上記に述べたように「非生物由来の」気泡である（すなわち、これらは試料中の微生物によって産生されたものではない）とみなされる。図6には、培養器の増殖領域の一部のラインスキャンの経路90も示されている。経路90は、気泡82を含む画像の一部を横断している。

20

30

【0068】

気泡の面積を決定するために図6に示される画像のより大きな部分を解析した場合、この画像では、約90個の非生物由来の気泡（すなわち、気泡84）の平均の面積は50ピクセル以下であった（すなわち、約50個のピクセルの面積は比較的小さい非生物由来の気泡のサイズの上限を表した）。これに対して、図6の2次元画像における生物由来（すなわち、微生物の活動にともなう）の気泡81～83のそれぞれの個々の面積は、それぞれ約625ピクセル、1125ピクセル、及び875ピクセルであった。したがって、非生物由来の気泡（すなわち、約50ピクセル以下の面積を有する気泡）の比較的密な集団と、生物由来の気泡（すなわち、約500ピクセル以上の面積を有する気泡）の比較的疎らな集団との間のサイズのギャップを用いることで、特定の画像内の生物由来の気泡を指定するために用いることが可能な下方閾値（例えば、約75ピクセル、約100ピクセル、約200ピクセル、又は約250ピクセル）を設定することができる。いずれの実施形態においても、この閾値は、非生物由来の気泡群の最大のサイズパラメータ値の所定の設定比率（例えば、約125%、約200%、約300%、約400%）に基づいて閾値を決定する動的計算（すなわち、特定の培養器の特定の画像の気泡集団に基づいて計算される）を用いて設定することができる。

40

【0069】

したがって、本開示の方法に基づけば、気泡を、約50ピクセル以下の2次元的面積を有する第1の群、及び約50ピクセルよりも大きい2次元的面積を有する第2の群の少な

50

くとも2つの群に分類することができる。したがって、第1の群に分類された(例えば、サイズに基づいて)気泡は、非生物由来であることが疑われる気泡(すなわち、恐らく微生物に付随したものではない)として識別することができる。逆に、第2の群に分類された(例えば、サイズに基づいて)気泡は、生物由来であることが疑われる気泡(すなわち、恐らく微生物に付随したものである)として識別することができる。本方法のいずれの実施形態においても、第2の群についてサイズの下限値を指定することができる。例えば、第2の群のサイズの下限値は、非生物由来の気泡の推定されるサイズの上限值よりも少なくとも50%大きい、少なくとも100%大きい、又は少なくとも150%大きいサイズパラメータの値とすることができる。本方法によれば、第1の群のサイズの上限值と第2の群のサイズの下限值との間に含まれるサイズパラメータの値を有する気泡を有する任意の培養器を、検査技師によって再検討するために必要に応じてフラグ付けすることができる。

10

【0070】

本方法の特定の実施形態では、生物由来であることが疑われる気泡のサイズの上限值を指定することができる(例えば、コントロール培養器を使用して特定の微生物について生物由来の気泡の最大のサイズを確立することにより)。これらの実施形態では、第2の群のサイズの上限值を上回る気泡は第3の群に分類される。第3の群は、例えば、接種時に培養器に導入された可能性のある比較的大きな非生物由来の気泡を含んでおり、操作者による使用の問題を示唆しうる。画像内でサイズの上限值を上回る気泡が観察された場合、助言を与えるメッセージが操作者に対して提示されてもよい。

20

【0071】

図7は、図6に示される薄膜型培養器の同じ部分の白黒画像を示したものである。この画像は、実施例1で述べるように、培養器の前面のみを照明した際に得られたものである。生物由来の気泡(すなわち、図6の気泡81~83)が視認されるが、培養器と生物由来の気泡との間のコントラストは大幅に低くなっている。更に、図7の画像では、気泡の外縁は、図6の後面が照明された画像におけるほどには輪郭がはっきりしていない。図7には、図6に示される増殖領域の一部のラインスキャンの経路91も示されている。経路91は、図6の経路90と同じピクセルに対応している。

【0072】

後面が照明された画像内のコロニーの存在及び位置を特定し、かつ前面が照明された画像内の微生物コロニーの存在及び位置を特定するため、画像解析アルゴリズムはしばしばデジタル画像内のピクセルをライン毎に解析し、第1のピクセル又は第1のピクセル群の色相及び/又は色強度を、第1のピクセルに近接した第2のピクセル又は第1のピクセル群に近接した第2のピクセル群の色相及び/又は色強度と比較する。この種の比較は、画像内の微生物コロニー、気泡、又は他の物体の縁を示しうる色及び/又は強度のシフトをアルゴリズムが認識することを可能にするものである。図8は、図6の後面が照明された画像内のライン90に沿ったピクセルからの赤、緑、及び青の透過された色強度のグラフを示している。気泡の外周の互いに反対の縁部にもなう暗い輪によって示される、気泡のはっきりとした境界を、鋭い負のピーク(それぞれA及びB)としてグラフ内に見ることができる。図9は、図7の前面が照明された画像内のライン91に沿ったピクセルから得られた赤、緑、及び青の反射されたピクセル強度のグラフを示している。

30

40

【0073】

画像を解析して薄膜型培養器内の気泡の存在及び個々のサイズを特定する方法を提供する以外に、本開示は、画像を解析して薄膜型培養器内の特定の気泡(例えば、「第1の」気泡)の2次元コンテキストを特定する方法も更に提供するものである。第1の気泡の「2次元コンテキスト」とは、第1の気泡に近接した所定の領域内の他の気泡の有無のことを指す。近接した気泡の存在及びその数を用いることで、第1の気泡が、生物由来であることが疑われる(すなわち、恐らくは微生物の活動にともなう)気泡であるか、又は非生物由来であることが疑われる(すなわち、恐らくは微生物の活動にともなったものではない)気泡であるかを判定することができる。

50

【 0 0 7 4 】

例として、図 1 0 A は、図 6 の画像に示される薄膜型培養器のより大きな部分の画像を示している。図 1 0 A では、微生物コロニー 7 1、7 2、7 3、7 4、及び 7 5 が、培地中に存在する発色性指示薬との反応によって明らかである。図 1 0 A では、非生物由来の気泡 8 4、並びに生物由来の気泡 8 1、8 2、8 3、8 5、8 6、及び 8 7 も明らかである。一態様では、生物由来の気泡（8 1～8 3 及び 8 5～8 7）は、本明細書に述べられるようにそれぞれのサイズ及び / 又は微生物コロニーに対する近接度に基づいて生物由来のものとして識別することができる。別の態様では、生物由来の気泡は、それらの 2 次元的コンテキストに基づいて識別することができる。図 1 0 A は、非生物由来の気泡は微生物コロニーを含まない培地の領域にほぼ均一に分散しているが（図 1 0 B を参照）、1 以上

10

【 0 0 7 5 】

薄膜型培養器の画像内の特定の気泡の 2 次元的コンテキストを解析するための 1 つの方法として、培養器の増殖領域の画像を、それぞれが均一な所定のサイズ及び形状を有する複数の小区画に分割し、それぞれの小区画内の気泡の数を数えることがある。これは例えば、画像解析の分野では周知のマスキング法によって行うことができる。図 1 0 B ~ 1 0

20

【 0 0 7 6 】

本開示の方法によれば、薄膜型培養器の画像を解析することは、複数の領域を解析して領域内に存在する気泡の数を検出することを含みうる。いずれの実施形態でも、2 以上の領域が重なり合ってもよい。一実施形態では、各領域を解析するために用いられるマスクは、画像全体にわたってライン毎にラスタースキャンされることで隣り合う領域間の相違を観察し、これにより、微生物コロニーを含みうる（その画像内の）対象となる特定の領域を識別することができる。対象となる領域（例えば、図 1 0 A の領域 1 0 1、1 0 2、及び 1 0 3）は、画像内の他の領域（例えば、同様のサイズを有する領域）に対して対象となる領域内の気泡の数が少ないことによって識別することができる。

30

【 0 0 7 7 】

本開示の方法によれば、画像を解析することは、画像の別の領域に対して大幅に少ない数の気泡を有する、画像の疑われる領域（例えば、上記の対象となる領域の 1 以上）を識別することを更に含んでもよい。これらの場合では、疑われる領域の一部（例えば疑われる領域の中央部）における気泡の存在は、微生物の活動にともなう生物由来の気泡の存在を示しうる。こうした状況が検出された場合、疑われる領域内で検出される気泡のサイズによって、疑われる領域内の気泡が生物由来の気泡であることを確認することができる。疑われる領域内の気泡のサイズが画像の他の領域内で検出された非生物由来の気泡よりも大きい場合、このことはその気泡が生物由来のものであることを強く示唆する。そのサイズによらず、疑われる領域（すなわち、画像内の培地の他の領域よりも大幅に少ない気泡を有する画像の領域）内に位置する微生物コロニーに近接した気泡は、生物由来の気泡である可能性があり、その培養器をガス産生微生物について陽性として報告することができる。これに代えるか又はこれに加えて、画像を操作者によって再検討を行うためにフラグ付けすることができる。

40

50

【 0 0 7 8 】

スキャンシステム及び/又は画像解析システムと薄膜型培養器の画像内の気泡及び/又は微生物コロニーを区別するための計数規則との使用についてはこれまでに述べられている。このような計数規則をスキャンシステムで使用することによって培養器上の微生物コロニーの自動計数の精度を向上させることができる。

【 0 0 7 9 】

薄膜型培養器の画像を解析するための上記に述べた技術は、薄膜型培養器に接種された試料中の微生物の有無を検出するための方法において使用することができる。一態様では、本方法は、薄膜型培養器の増殖領域の画像を解析して気泡を検出することと、複数の前記気泡を分類することと、を含み、前記複数の気泡を分類することが、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。本明細書に述べられるように、増殖領域の画像を解析して気泡を検出することができる。気泡は、サイズパラメータに基づいて分類することができ、本明細書に述べられるように各群のサイズの上限值及び/又はサイズの下限值を指定することができる。いずれの実施形態においても、気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、気泡の第1のサブセットを、第1の非生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含みうる。これらの実施形態では、本方法は更に、本明細書に述べられるように、第1の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限值を指定することを含む。いずれの実施形態においても、気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、気泡の第2のサブセットを、生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含みうる。これらの実施形態では、本方法は更に、本明細書に述べられるように、生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の下限值を指定することを含む。

10

20

【 0 0 8 0 】

別の態様では、本方法は、薄膜型培養器の増殖領域の画像の第1の領域を解析して前記第1の領域内の第1の気泡の数を検出することと、前記画像の第2の領域を解析して前記第2の領域内の第2の気泡の数を検出することと、前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数とを比較することと、を含む。前記第1及び第2の領域を解析することは、本明細書に述べられるように前記領域の特定の大きさ及び形状を画定する画像マスクを用いて前記第1及び第2の領域内の気泡の数を数えることを含みうる。いずれの実施形態においても、本方法は、前記画像の第3の領域を解析して前記第3の領域内の第3の気泡の数を検出することと、前記第1の気泡の数又は前記第2の気泡の数を前記第3の気泡の数と比較することと、を含みうる。前記第1の領域、第2の領域、及び/又は第3の領域は互いから間隔を隔ててもよく、又は前記領域の少なくとも2つが部分的に重なり合ってもよい。

30

【 0 0 8 1 】

更なる別の態様では、本明細書に述べられる方法の2以上を1つの方法に組み合わせて薄膜型培養器内の微生物の有無を検出することができる。例えば、本方法は、薄膜型培養器の増殖領域の画像の第1の領域を解析して前記第1の領域内の第1の気泡の数を検出することと、前記画像の第2の領域を解析して前記第2の領域内の第2の気泡の数を検出することと、前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数と比較することと、前記画像を解析して前記培養器の前記増殖領域内の気泡を検出することと、複数の前記気泡を分類することと、を含んでよく、前記複数の気泡を分類することは、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。特定の実施形態では、本方法は更に、前記第1、第2、又は第3の領域のいずれかの気泡が、前記第1の群又は前記第2の群のいずれに割り振られるかを判定することを含みうる。有利な点として、この実施形態では、特定の気泡のサイズは、それに近接した気泡の数及びサイズを説明するコンテキストで解析され、これにより、2つの別々の基準を用いることで特定の気泡が生物由来のものであるか又は非生物由来のものであるかが確認される。

40

【 0 0 8 2 】

50

これらの技術はソフトウェアで実行されるものとして述べられている。その場合、コンピュータ可読媒体に、上記に述べた規則の1以上を具体化した、プロセッサにより実行可能な命令が保存される。例えば、コンピュータ可読媒体としては、ランダムアクセスメモリ(RAM)、読み出し専用メモリ(ROM)、不揮発性ランダムアクセスメモリ(NVRAM)、電氣的に消去可能なプログラマブル読み出し専用メモリ(EEPROM)、フラッシュメモリなどの非一過性コンピュータ可読媒体が挙げられる。コンピュータ可読媒体には、ソフトウェアを顧客に提供するために用いられるCD-ROMなどの不揮発性メモリも含まれる。また、コンピュータ可読媒体には、例えば、ソフトウェアをインターネットなどのネットワーク上で提供するための電磁搬送波も含まれる。

【0083】

しかしながら、同じ技術をハードウェアで実行することも可能である。ハードウェア装置の例としては、特定用途向け集積回路(ASIC)、フィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)、特別に設計されたハードウェア要素、又はこれらの任意の組み合わせが挙げられる。更に、本明細書に述べられる技術の1以上を、ハードウェア、ソフトウェア、又はファームウェアで部分的に実行することもできる。

【0084】

したがって、本開示は、薄膜型培養器内の微生物の有無を検出するためのコンピュータ可読命令を含んだコンピュータ可読媒体を提供する。一態様では、コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、前記プロセッサを含む画像解析システムに、前面と前面の反対側の後面とを有する薄膜型培養器の第1の画像を解析させ、本明細書に述べられるように、前記第1の画像は前記培養器の前記前面に照明を与えながら生成されるものである。前記第1の画像を解析することは、前記培養器内の第1の位置の微生物コロニーを識別することを含む。前記コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、更に、プロセッサに、薄膜型培養器の第2の画像を解析させ、前記第2の画像は、前記培養器の前記後面に照明を与えながら生成されるものである。前記第2の画像を解析することは、本明細書に述べられるように、前記培養器内の第2の位置の気泡を識別することを含む。前記コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、プロセッサに、前記第1の位置が前記第2の位置から所定の距離の範囲内にあるかを更に判定させる。

【0085】

別の態様では、前記コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、プロセッサを含む画像解析システムに、薄膜型培養器の増殖領域の画像を解析させて気泡を検出させるとともに複数の気泡を分類させる。前記複数の気泡を分類することは、本明細書に述べられるように、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。いずれの実施形態においても、前記気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、第1の気泡のサブセットを第1の非生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含んでよく、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記第1の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値を指定させる。いずれの実施形態においても、前記気泡を第1の群と第2の群とに分類することは、第2の気泡のサブセットを生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含んでよく、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の下限値を指定させる。

【0086】

別の態様では、コンピュータ可読命令は、プロセッサにより実行されると、プロセッサを含む画像解析システムに、薄膜型培養器の増殖領域の画像の第1の領域を解析させて前記第1の領域内の第1の気泡の数を検出させ、前記画像の第2の領域を解析させて前記第2の領域内の第2の気泡の数を検出させ、前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数と比較させる。いずれの実施形態においても、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記画像の第3の領域を解析させて前記第3の領域内の第3の気泡の数を検出させ、前記第1の気泡の数又は前記第2の気泡の数を前記第3の気泡の数と比較させる。いずれ

10

20

30

40

50

の実施形態においても、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記画像を分析させて前記培養器の前記増殖領域内の気泡を検出させ、複数の前記気泡を分類させ、前記複数の気泡を分類することは、本明細書に述べられるように、前記複数の気泡のそれぞれと関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む。特定の実施形態では、前記コンピュータ可読命令は更に、プロセッサに、前記第1、第2、又は第3の領域のいずれかの気泡が、前記第1の群又は前記第2の群のいずれに割り振られるかを判定させる。

【0087】

いずれの実施形態においても、コンピュータ可読命令を含むコンピュータ可読媒体は、本明細書に述べられる方法の2以上を含む命令を含みうる。前記2以上の方法を個別に又は組み合わせとして用いることでガス産生微生物のコロニーの検出の精度を向上させることができる。

10

【0088】

実施形態

実施形態Aは、

撮像装置を使用して、透明なフィルムカバーシートを有する前面と半透明の基板を有する後面とを有する薄膜型培養器の第1の画像を生成することであって、

前記第1の画像は前記培養器の前記前面に照明を与えながら生成され、

前記培養器が、微生物によって、第1の色により観察可能な第1の生成物に変換される指示化合物を含み、

20

前記培養器が、第1の種類 of 微生物によって気体に変換されうる栄養成分を含む、ことと、

前記撮像装置を使用して、前記薄膜型培養器の第2の画像を生成することであって、前記第2の画像が前記培養器の前記後面に照明を与えながら生成される、ことと、

前記第1の画像を解析して前記培養器内の第1の位置の微生物コロニーを識別することと、

前記第2の画像を解析して前記培養器内の第2の位置の第1の気泡を識別することと、

前記第1の位置が前記第2の位置から所定の距離の範囲内にあるかを判定することと、を含む方法である。

【0089】

実施形態Bは、前記第1の画像が、後面照明に対する前面照明の第1の比で前記培養器を照明しながら生成され、前記第2の画像が、前記第1の比よりも小さい、後面照明に対する前面照明の第2の比で前記培養器を照明しながら生成される、実施形態Aの方法である。

30

【0090】

実施形態Cは、前記第1の比が約100%：0%である、実施形態Bの方法である。

【0091】

実施形態Dは、前記第2の比が約0%：100%である、実施形態B又は実施形態Cの方法である。

【0092】

実施形態Eは、前記第1の気泡が第1の外周を有し、前記第2の画像を解析して第1の気泡を識別することが、前記第1の外周に付随する暗い輪を識別することを含む、上記の実施形態のいずれか1つの方法である。

40

【0093】

実施形態Fは、前記第2の画像を解析して第1の気泡を識別することが、前記第1の気泡のサイズパラメータを計算することを含む、上記の実施形態のいずれか1つの方法である。

【0094】

実施形態Gは、前記サイズパラメータが半径、直径、又は面積である、実施形態Fの方法である。

50

【 0 0 9 5 】

実施形態 H は、前記第 2 の画像を解析して第 1 の気泡を識別することが、前記第 1 の気泡の周囲の第 1 の所定の領域を解析して第 2 の気泡を検出することを含む、上記の実施形態のいずれか 1 つの方法である。

【 0 0 9 6 】

実施形態 I は、前記第 1 の所定の領域が微生物コロニーを含み、前記方法が、前記第 1 の所定の領域内の気泡の数を、微生物コロニーを含まない第 2 の所定の領域内の気泡の数と比較することを更に含む、実施形態 H の方法である。

【 0 0 9 7 】

実施形態 J は、前記第 1 の気泡のサイズパラメータを第 2 の気泡のサイズパラメータと比較することを更に含む、実施形態 F ~ I のいずれか 1 つの方法である。

10

【 0 0 9 8 】

実施形態 K は、前記第 1 の画像を使用して前記培養器内の微生物コロニーの数を数えることを更に含む、上記の実施形態のいずれか 1 つの方法である。

【 0 0 9 9 】

実施形態 L は、前記第 1 及び第 2 の画像を使用して前記栄養成分を気体に変換する微生物コロニーの数を数えることを更に含む、実施形態 K の方法である。

【 0 1 0 0 】

実施形態 M は、前記第 1 及び第 2 の画像を使用して前記栄養成分を気体に変換しない微生物コロニーの数を数えることを更に含む、上記の実施形態のいずれか 1 つの方法である。

20

【 0 1 0 1 】

実施形態 N は、前記指示化合物がテトラゾリウム色素を含む、上記の実施形態のいずれか 1 つの方法である。

【 0 1 0 2 】

実施形態 O は、前記栄養成分が炭水化物を含む、上記の実施形態のいずれか 1 つの方法である。

【 0 1 0 3 】

実施形態 P は、前記炭水化物が、グルコース、スクロース、ラクトース、又は上記の炭水化物の任意の 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される、実施形態 O の方法である。

30

実施形態 Q は、コンピュータ可読命令を含むコンピュータ可読媒体であって、前記コンピュータ可読命令が、プロセッサにより実行されると、前記プロセッサを含む画像解析システムに、

前面と前記前面の反対側の後面とを有する薄膜型培養器の第 1 の画像を解析させ、
前記第 1 の画像は前記培養器の前記前面に照明を与えながら生成され、
前記第 1 の画像を解析することは、前記培養器内の第 1 の位置の微生物コロニーを識別することを含み、

前記薄膜型培養器の第 2 の画像を解析させ、
前記第 2 の画像は前記培養器の前記後面に照明を与えながら生成され、
前記第 2 の画像を解析することは、前記培養器内の第 2 の位置の気泡を識別することを含み、

40

前記第 1 の位置が前記第 2 の位置から所定の距離の範囲内にあるかを判定させる、コンピュータ可読媒体である。

【 0 1 0 4 】

実施形態 R は、前記第 2 の画像を解析して気泡の第 2 の位置を特定することが、前記気泡の周囲の暗い輪を識別することを含む、実施形態 Q のコンピュータ可読媒体である。

【 0 1 0 5 】

実施形態 S は、コンピュータ可読命令であって、前記プロセッサにより実行されると、前記システムに、前記第 1 の画像を使用して前記培養器内の微生物コロニーの数を数えさ

50

せるコンピュータ可読命令を更に含む、実施形態 Q 又は実施形態 R のコンピュータ可読媒体である。

【0106】

実施形態 T は、コンピュータ可読命令であって、前記プロセッサにより実行されると、前記システムに、前記第 1 及び第 2 の画像を使用して前記培養器内のガス産生微生物のコロニーの数を数えさせるコンピュータ可読命令を更に含む、実施形態 Q 又は実施形態 R のコンピュータ可読媒体である。

【0107】

実施形態 U は、

薄膜型培養器の増殖領域の画像を解析して気泡を検出することと、

複数の前記気泡を分類することと、を含み、前記複数の気泡を分類することが、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第 1 の群又は第 2 の群に割り振ることを含む、方法である。

10

【0108】

実施形態 V は、前記気泡を第 1 の群と第 2 の群とに分類することが、第 1 の気泡のサブセットを第 1 の非生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含み、前記方法が、前記第 1 の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値を指定することを更に含む、実施形態 T の方法である。

【0109】

実施形態 W は、前記気泡を第 1 の群と第 2 の群とに分類することが、第 2 の気泡のサブセットを生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含み、前記方法が、前記生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の下限値を指定することを更に含む、実施形態 U 又は実施形態 V の方法である。

20

【0110】

実施形態 X は、前記生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の下限値が、前記第 1 の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値よりも少なくとも約 2 倍大きい、実施形態 W の方法である。

【0111】

実施形態 Y は、コンピュータ可読命令を含むコンピュータ可読媒体であって、前記コンピュータ可読命令が、プロセッサにより実行されると、前記プロセッサを含む画像解析システムに、

薄膜型培養器の増殖領域の画像を解析させて気泡を検出させ、

複数の前記気泡を分類させ、前記複数の気泡を分類することが、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第 1 の群又は第 2 の群に割り振ることを含む、コンピュータ可読媒体である。

30

【0112】

実施形態 Z は、前記気泡を第 1 の群と第 2 の群とに分類することが、第 1 の気泡のサブセットを第 1 の非生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含み、前記コンピュータ可読命令が更に、前記プロセッサに、前記第 1 の非生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値を指定させる、実施形態 Y のコンピュータ可読媒体である。

40

【0113】

実施形態 A A は、前記気泡を第 1 の群と第 2 の群とに分類することが、第 2 の気泡のサブセットを生物由来であることが疑われる気泡群に分類することを含み、前記コンピュータ可読命令が更に、前記プロセッサに、前記生物由来であることが疑われる気泡群のサイズパラメータ値の上限値を指定させる、実施形態 Z のコンピュータ可読媒体である。

【0114】

実施形態 B B は、

薄膜型培養器の増殖領域の画像の第 1 の領域を解析して前記第 1 の領域内の第 1 の気泡の数を検出することと、

50

前記画像の第2の領域を解析して前記第2の領域内の第2の気泡の数を検出することと

、前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数と比較することと、を含む方法である。

【0115】

実施形態CCは、

前記画像の第3の領域を解析して前記第3の領域内の第3の気泡の数を検出することと

、前記第1の気泡の数又は前記第2の気泡の数を前記第3の気泡の数と比較することと、を更に含む実施形態BBの方法である。

【0116】

実施形態DDは、

前記画像を解析して前記培養器の前記増殖領域内の気泡を検出することと、

複数の前記気泡を分類することと、を含み、前記複数の気泡を分類することが、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む、実施形態BB又は実施形態CCの方法である。

【0117】

実施形態EEは、

前記第1、第2、又は第3の領域のいずれかの気泡が、前記第1の群又は前記第2の群のいずれに割り振られるかを判定することを更に含む、実施形態DDの方法である。

【0118】

実施形態FFは、コンピュータ可読命令を含むコンピュータ可読媒体であって、前記コンピュータ可読命令が、プロセッサにより実行されると、前記プロセッサを含む画像解析システムに、

薄膜型培養器の増殖領域の画像の第1の領域を解析させて前記第1の領域内の第1の気泡の数を検出させ、

前記画像の第2の領域を解析させて前記第2の領域内の第2の気泡の数を検出させ、

前記第1の気泡の数を前記第2の気泡の数と比較させる、コンピュータ可読媒体である。

【0119】

実施形態GGは、前記コンピュータ可読指令が、前記プロセッサに更に、

前記画像の第3の領域を解析させて前記第3の領域内の第3の気泡の数を検出させ、

前記第1の気泡の数又は前記第2の気泡の数を前記第3の気泡の数と比較させる、実施形態FFのコンピュータ可読媒体である。

【0120】

実施形態HHは、前記コンピュータ可読指令が、前記プロセッサに更に、

前記画像を解析させて前記培養器の前記増殖領域内の気泡を検出させ、

複数の前記気泡を分類させ、前記複数の気泡を分類することが、前記複数の気泡のそれぞれに関連付けられたサイズパラメータに基づいて、それぞれの気泡を第1の群又は第2の群に割り振ることを含む、実施形態FF又は実施形態GGのコンピュータ可読媒体である。

【0121】

実施形態IIは、前記コンピュータ可読命令が、前記プロセッサに更に、前記第1、第2、又は第3の領域のいずれかの気泡が、前記第1の群又は前記第2の群のいずれに割り振られるかを判定させる、実施形態HHのコンピュータ可読媒体である。

【実施例】

【0122】

実施例1 ガス産生コロニーの検出方法

トリプチックソイブロス(TSB、カタログ番号K89)をハーディ・ダイグノスティクス社(Hardy Diagnostics)(カリフォルニア州サンタマリア)より入手した。細菌

10

20

30

40

50

株として、大腸菌 (ATCC 25922)、大腸菌 (3M-FR4)、サルモネラ・エンテリカ (Salmonella enterica) (ATCC 51812)、及びエンテロバクター・アムニゲナス (Enterobacter amnigenus) (ATCC 51898) をマイクロバイオリジクス社 (ミネソタ州、セントクラウド) より入手した。TSBの終夜培養物をそれぞれの細菌株について調製した。薄膜型培養器 (3M PETRIFILM大腸菌/大腸菌群計数 (EC) プレート) 及びバターフィールドリン酸緩衝液を、いずれもスリー・エム社 (3M Company) (ミネソタ州セントポール) より入手した。

【0123】

各株の終夜培養物をバターフィールドリン酸緩衝液中に約25コロニー形成単位 (CFU) / mLとなるように希釈した希釈物を調製した。3M PETRIFILMプレートに、透明フィルムカバーを持ち上げ、1 mLの希釈した試料をコーティングされた底フィルムの中心にピペットで加え、カバーシートを再び被せることによって接種した。製造者 (スリー・エム社) (3M) によって提供された塗抹装置を使用して試料を所望の表面積 (約20 cm²) に均一に塗抹した。接種したプレートを35で24時間インキュベートした。

10

【0124】

培養器撮像システムを使用してPETRIFILM培養プレート上のコロニーを画像化し、識別した。撮像システムは、培養プレートを配置するためのプラットフォームとして機能する、中心に配置されたガラスプラテン (ホワイトフラッシュオパールガラス) を有していた。2つの別々の発光ダイオードのセット (各セットは2個の赤色LED、2個の緑色LED、及び2個の青色LEDを含む) を使用して各培養プレートを照明した。一方のセットは、培養プレートの上方かつ左側 (長手方向寸法に対して) に配置し、他方のセットは上方かつ右側 (培養プレートの長手方向寸法に対して) に配置した。培養器の上に配置されたLED群からの光は、培養器から遠ざかる方向に光拡散反射表面内に向けられ、光拡散反射表面によってほぼ均一な照明パターンが培養プレートの前面に照射された。同様に、培養プレートの後面を2つの別々の発光ダイオードのセット (各セットは2個の赤色LED、2個の緑色LED、及び2個の青色LEDを含む) を使用して照明した。一方のセットは、培養プレートの下方かつ左側 (長手方向寸法に対して) に配置し、他方のセットは下方かつ右側 (培養プレートの長手方向寸法に対して) に配置した。培養器の下に配置されたLED群からの光は、培養器から遠ざかる方向に光拡散反射表面内に向けられ、光拡散反射表面によってほぼ均一な照明パターンがガラスプラテン (上記に述べた) の後面に照射され、培養プレートの後面に均一な照明パターンを形成した。

20

30

【0125】

AptinaモデルMT9P031 CMOS撮像センサ (アプティナ・イメージング社 (Aptina Imaging) (カリフォルニア州サンホセ)) をプラットフォームの上に直交するように配置し、培養プレートの画像を撮影するように位置決めした。撮像センサ及びプラットフォームを、培養プレートがセンサの焦点面内に位置するように調節した。培養プレートの前面 (透明フィルム面) が撮像センサに面するようにプラットフォーム上で培養プレートの向きを調節した。黒いカバーを使用して撮像装置を室内光から隔離した。得られた画像において、すべての画像ピクセルのヒストグラムで飽和したピクセルが約10%未満となるように画像の露出を選択した。第1の画像は培養プレートの前面からの照明のみを用いて撮影し、第2の画像は培養プレートの後面からの照明のみを用いて撮影した。画像は両方とも、培養プレートがプラットフォーム上のまったく同じ位置に維持された状態で撮影した (すなわち、両方の画像が撮影されるまでプレートをプラットフォームから動かさなかった)。これにより、対応するXY座標の位置を合わせることによって、2つの画像内に同時に存在するコロニーを識別することが可能となる。

40

【0126】

2つの画像をImagePro Plusソフトウェア (メディアサイバネティクス社 (Media Cybernetics) (メリーランド州ロックビル)) を使用して解析した。個々のコロニーのサイズを、第1の培養プレート画像 (100%前面照明) から決定した。撮像プ

50

プログラムによって、疑われるコロニーの画像の最も長い寸法を含むピクセルのラインに沿って観察される赤、緑、及び青のピクセル強度の変化を解析した。ローカルバックグラウンドに対する強度の変化を規定するピクセル位置を用いて、コロニーの画像の辺縁をマークし、コロニーの直径を測定した（直径の距離は、コロニーの辺縁をマークしたピクセル点間に位置するピクセルの数として報告した）。

【 0 1 2 7 】

第2の培養プレート画像を用いて気泡の直径を決定した（100%後面照明）。撮像プログラムによって、気泡の画像の最も長い寸法を含むピクセルの線に沿って観察されるピクセルの色強度の変化を解析した。RGB（赤/緑/青）画像処理技術を使用したところ、緑色のチャンネルが、この培養器で使用した特定の増殖培地中の気泡を識別するうえで最大のコントラストを与えた。ローカルバックグラウンドの色強度に対するピクセルの色強度の鋭い低下が見られたピクセル位置を特定し、気泡の周囲に暗い輪を形成する位置としてマークした。気泡の直径を、2つの特定されたピクセル位置間のピクセルの数を数えることによって測定した。

10

【 0 1 2 8 】

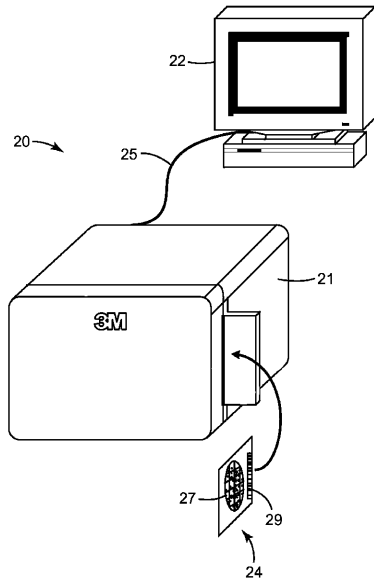
次のステップでは、撮像プログラムによって気泡の画像のサイズ及び近接度（第2の培養プレート画像より得られたもの）を、最も近くのコロニーの画像のサイズ及び位置（第1の培養プレート画像より得られたもの）と比較し、上記に述べた気泡のサイズ及び近接度の基準を適用した。この基準によれば、図6の気泡81、82及び83はいずれもコロニー71に付随するものであり、更に少なくとも気泡81はコロニー73に付随するものであると結論づけることができる。更に、図6のコロニー72に付随する生物由来の気泡は存在しないと結論づけることができる。

20

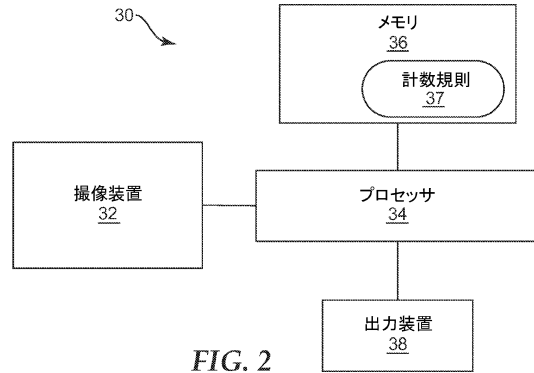
【 0 1 2 9 】

いずれの場合にも、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく様々な改変を行うことが可能である。例えば、本明細書に述べられる規則の1つ以上を他の規則とともに、又は他の規則をとみなわずに用い、これらの規則の異なるサブセットを所望の実現形態に応じて任意の順序で適用することができる。これらの実施形態及び他の実施形態は以下の特許請求の範囲に含まれる。

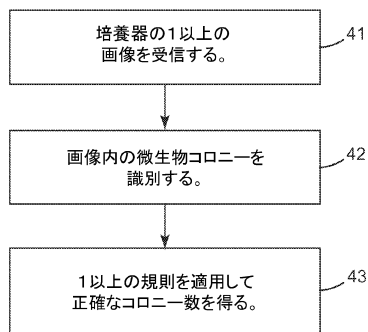
【図1】



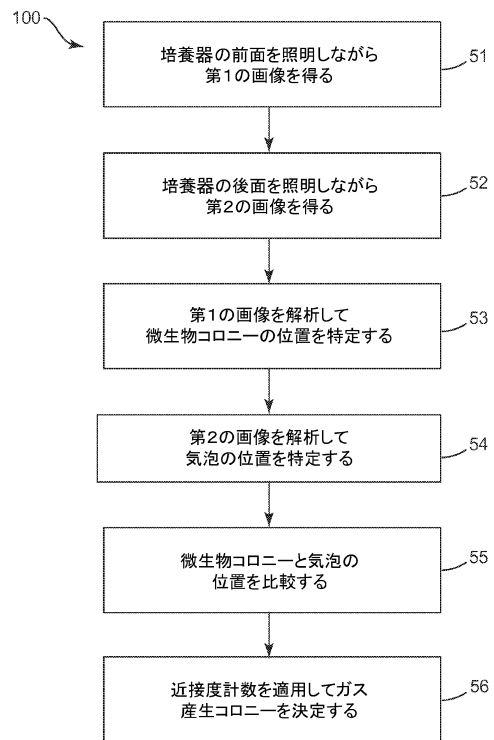
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

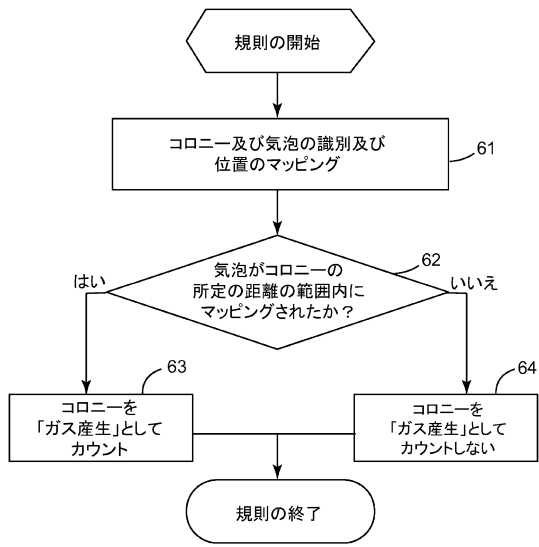


FIG. 5

【図6】

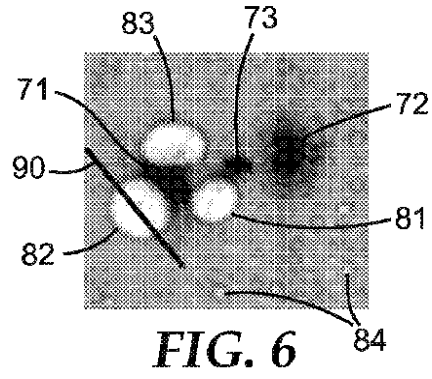


FIG. 6

【図7】

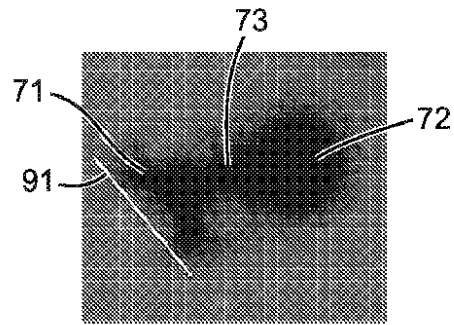


FIG. 7

【図8】

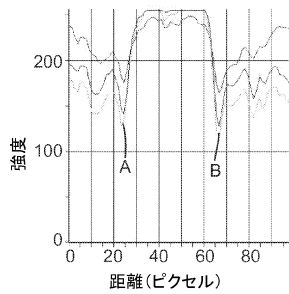


FIG. 8

【図9】

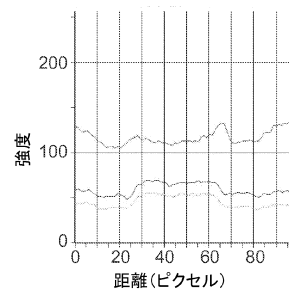


FIG. 9

【図10A】

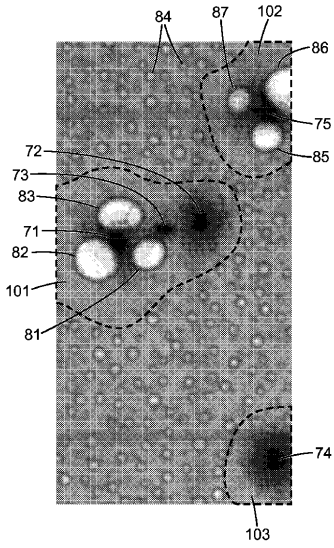


FIG. 10A

【図10B】

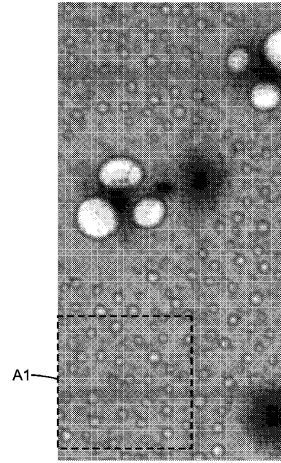


FIG. 10B

【図10C】

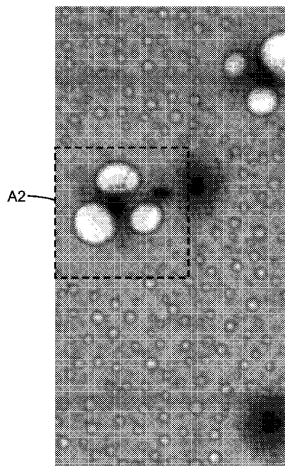


FIG. 10C

【図10D】

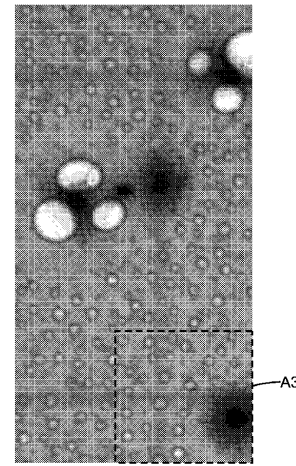


FIG. 10D

フロントページの続き

- (72)発明者 ボレア, フィリップ エー.
アメリカ合衆国, 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
- (72)発明者 ウィリアムズ, マイケル ジー.
アメリカ合衆国, 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

審査官 中村 勇介

- (56)参考文献 特表2007-533296(JP,A)
国際公開第2012/012104(WO,A1)
特表2006-507837(JP,A)
米国特許出願公開第2012/0094327(US,A1)
国際公開第2012/152768(WO,A1)
特表2006-508362(JP,A)
特表2011-507524(JP,A)
特開2010-104301(JP,A)
特表2012-513763(JP,A)
INTERPRETATION GUIDE - 3M PETRIFILM E. COLI AND COLIFORM COUNT PLATES, [ONLINE], ドイツ, 2008年 1月 1日, URL, http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guides.pdf

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M1/00-3/10