

# 自動グラム染色機PoCGS<sup>®</sup>-iEと 微生物推定支援AIソフトウェアBiTTE<sup>®</sup>-iEについて

カーブジェン株式会社

## はじめに

カーブジェン(株)は微生物検査工程の効率化・標準化を目指し、機器・ソフトウェアを販売する専門メーカーである。今回は微生物検査工程のうち、グラム染色による微生物推定に着目し、自動グラム染色機 PoCGS<sup>®</sup>-iE と微生物推定支援 AI ソフトウェア BiTTE<sup>®</sup>-iE について紹介する。

## 1. 食品検査におけるグラム染色の 有用性とその課題

グラム染色は細胞表層構造の違いにより細菌を二種類に大別する染色法で、微生物の形態などと組み合わせて、細菌分類の指標として広く用いられている。本染色法ではグラム染色で染まるものは「グラム陽性」、染まらないものは「グラム陰性」と分類される。グラム陽性菌の細胞表層には厚いペプチドグリカン層が露出しており、前染色で使用するクリスタルバイオレットで青紫色に染まるが、グラム陰性菌には細胞表層に細胞外膜が存在するため、脱色工程で使用するエタノールによ

て色素が抜けることで染め分けが可能となる。さらに、グラム陽性菌にはブドウ球菌やレンサ球菌などの球菌と、ラクトバチルスやクロストリジオイデスなどの桿菌がある。一方、グラム陰性菌には、腸内細菌目細菌や緑膿菌などの桿菌と、淋菌や髄膜炎菌などの球菌があり、細菌の構造でグラム陽性菌と違い、細胞壁の外に外膜が存在する。

グラム染色の工程として、一般的なハッカー変法を例にすると、前染色、媒染、脱色、後染色の4工程があり、染色自体は数分、顕微鏡による観察で数分程度で実施可能で、迅速に微生物の推定を行うことが可能な検査である。

実際、食安発 0729 第4号の「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」の中でも、非加熱食肉製品及び特定加熱食肉製品の大腸菌の試験法や黄色ブドウ球菌試験法の一工程としてグラム染色を行い顕微鏡検査を行うことが記載されている。一方で、グラム染色と顕微鏡検査を行うにあたっての課題として、以下が挙げられる。

- 染色技術が属人的であり、品質にばらつきがある

- 染色を行う時間がない（染色を行うのに手間がかかる）
- 顕微鏡検査で微生物を正しく判断できない

弊社はこれらの課題を解決すべく自動グラム染色機 PoCGS<sup>®</sup>-iE と微生物推定支援 AI ソフトウェア BiTTE<sup>®</sup>-iE を開発したため、以下で紹介していく。

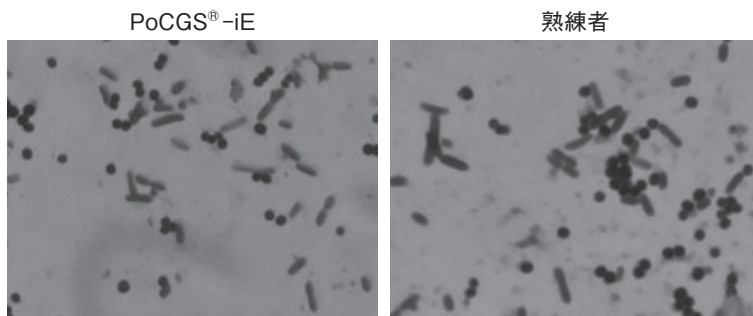


写真1 球菌:黄色ブドウ球菌(標準菌株) 桿菌:大腸菌(標準菌株)

## 2. 自動グラム染色機 PoCGS<sup>®</sup>-iE の特長

### 2-1. 技術者の染色方法を模倣

スプレー方式やディップ方式ではなく、前染色、媒染、脱色、後染色、水洗に必要な一連の試薬を、手技と同様の滴下方式で染色を行う。これにより、専門の熟練者と同等の高い染色品質を可能にした。即ち、PoCGS<sup>®</sup>-iE で染色したスライドと専門の熟練者が染色したスライドを、専門の技術者が判読した際に、判読結果（推定微生物の結果）については全て一致し、染色ムラやアーチファクトも熟練者のスライドと同様に少ない結果であった（写真1）。

### 2-2. 小型サイズ

1枚単位での自動染色を可能にする小型染色機（サイズ／重量：W204mm × D280mm × H350mm/8.7kg）であり、かつ廃液タンクと接続可能なため、水場近くである必要もなく、設置場所を選ばない（写真2）。



写真2 PoCGS<sup>®</sup>-iEの外観

### 2-3. 迅速な染色

検体のスライドガラスへの塗抹、乾燥が完了していれば、スライドを染色槽にセットし、ボタンを押下すれば約5分で染色が完了する。なお、メタノール等を使用して固定する場合は、アルコールでの固定から染色、脱色、水洗を行うことも可能であり、また火災固定を用いる場合は、染色工程から開始することも可能である。

### 2-4. カスタマイズ可能な染色プログラム

当社として推奨している染色プログラムを含



写真3 染色プログラムを設定するパネル

め、10個まで固有の染色プログラムを登録することができる。試薬の滴下時間を1秒単位で変更することが可能であるため、施設固有の染色プログラムの構築が可能であり、また検体や、塗抹の厚さによって、細かく調整することも可能となる（写真3）。

## 2-5. 対応可能な染色方法、試薬の幅広さ

上述の通り、試薬の滴下時間を染色プログラム毎に調整することが可能であるため、バーミー法、ハッカー変法、フェイバー法など全ての染色方法について対応しており、また、使用する染色試薬も施設ごとに対応可能である。

## 3. 微生物推定支援 AI ソフトウェア BITTE®-iE の特長

### 3-1. スマートフォンで撮像した画像をもとに AI が微生物を推定

BITTE®-iE は大量のグラム染色像を学習させた画像識別 AI（人工知能）と連動したスマートフォンのアプリであり、容易に使用することが可能である。グラム染色後、通常であれば顕微鏡を目で見て確認する代わりに、スマートフォンで顕微鏡の視野を撮像し（写真 4）、クラウドにその視野画像をアップロードすると、クラウド上の AI が約 10 秒で微生物を推定する。グラム陽性球菌（GPC）、グラム陽性桿菌（GPR）、グラム陰性桿菌（GNR）、グラム陰性球菌（GNC）、酵母様真菌を鑑別し、参考情報として推定される菌種を表示する（写真 5）。その精度は 7 種分類（GPC / GPR / GNR / GNC / 酵母様真菌 / 複数菌 / 菌体無し）で約 95% の精度である（表 1）。

### 3-2. グラム染色判読の支援、教育に有益

上述の通り、スマートフォンで顕微鏡視野の写真撮るだけで微生物推定を行うことができるため、熟練した判読者がいない場合の支援や、非熟練の方々の教育に資するツールとして有益である。

## おわりに

グラム染色は食品検査における微生物同定の手法として重要な手法であるが、その染色と判読の品質は検査者の技術に依存することが多く、目が離せない手間のかかるものであった。当社が開発した、自動グラム染色機 PoCGS®-iE と微生物推



写真4 スマートフォンで顕微鏡視野を撮像する様子

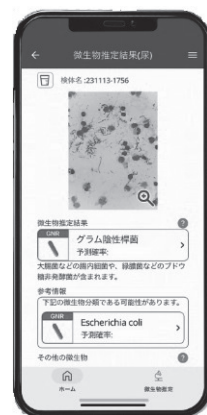


写真5 BITTE®-iEの微生物推定結果画面

表1 微生物の分類精度の一例

| Class U1 | Class U2                                  |
|----------|---|
| yeast    | <i>Candida</i> spp.                       |
| GPC      | GPC cluster                               |
| GPC      | <i>Enterococcus faecalis</i>              |
| GPC      | <i>Enterococcus faecium</i>               |
| GPC      | <i>Streptococcus agalactiae</i>           |
| GPC      | other GPC                                 |
| GPR      | <i>Corynebacterium</i> spp.               |
| GNR      | <i>Enterobacter cloacae</i>               |
| GNR      | <i>Escherichia coli</i>                   |
| GNR      | <i>Klebsiella oxytoca</i>                 |
| GNR      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>              |
| GNR      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>             |
| GNR      | other GNR Enterobacteriaceae              |
| GNR      | other GNR Glucose non-fermenting bacteria |
| GNC      | GNC                                       |
| Poly.    | polymicrobial                             |
| None     | No bacteria.                              |

定支援 AI ソフトウェア BITTE®-iE は、属人化を解消し品質を標準化でき、手間のかからない迅速な補助ツールとして有用であると考えている。

### 引用文献

食安発 0729 第 4 号「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌 及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」