ノート

B.F.E.試験における画像処理を利用したコロニー数の計測法

皆川　森夫*

Colony Counting Method Using Image Processing in B.F.E.Testing

MINAGAWA Morio*

1. 緒　　言

バクテリア飛まつ捕集効率（Bacterial Filtration Efficiency；本文中「B.F.E.」と略す）試験は，黄色ブドウ球菌を含む懸濁液のエアロゾルを 6 段構成のカスケードインパクタ内にセットした寒天培地入りのペトリ皿で捕集し，これを培養することで，コロニー（細菌の集合体）を作り，その数によりマスク等のバクテリア飛まつ捕集効率を求めるものである。

その際，黄色ブドウ球菌のコロニー数は，ペトリ皿 1 枚あたり多いもので 400 個以上形成される場合もある。このため目視により逐一，コロニー数を計測するのは，時間と手間を要する作業となっている。

そこで本研究では，画像処理を利用することで，コロニー数を効率的に計測する方法について検討し，B.F.E.試験の省力化を図るものとする。

2.　画像処理による計数プログラムの開発

2.1　画像処理に供するデータ

JIS T 9001:2021 医療用及び一般用マスクの性能要件及び試験方法のなかのバクテリア飛まつ捕集効率試験法に準じて B.F.E.試験を行った。

B.F.E.試験は，絹の JIS 標準添付白布を試料とし，これを 1 枚，2 枚，3 枚積層させた場合について，各々3 回ずつ行った。また試料のない状態でのブランク試験は 1 回のみとした。

試験後，カスケードインパクタ各段にセットした寒天培地を培養後，形成したコロニーをデジタルカメラで撮影し，画像処理に供した。形成したコロニーの画像の例を図 1 に示す。また本研究で画像処理に供する画像データのサイズ（画素数），またペトリ皿およびコロニーの実寸法と画素数の対応等の仕様に関して表 1 に示す。

2.2　画像処理法の検討

本研究における画像処理には，無償で利用可能な画像処理ライブラリ Open Source Computer Vision Library（以下「OpenCV」）を利用して，

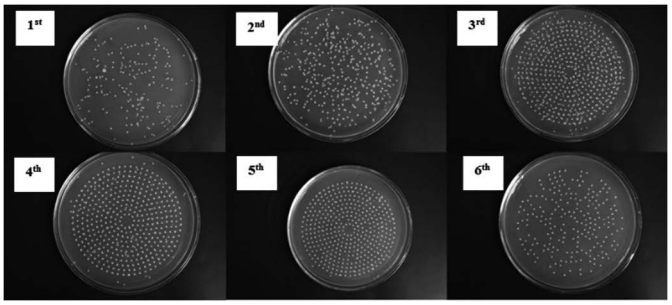

図 1　形成した黄色ブドウ球菌コロニー
（試料なしの結果）

表 1　画像データの仕様

項目	内容
撮像デバイス	デジタル一眼レフカメラ D3500（(株) Nikon）
original 画像のサイズと階調	・4,200×2,800pixel ・256 階調
実寸法と画素数の対応	・ペトリ皿（φ90mm）：2,000～2,500 pixel ・コロニー（約φ1.4mm）：30～40 pixel

* 素材応用技術支援センター

画像データ内のオブジェクト数（要素数）を数えるための画像処理法を検討し，プログラムを作成した[1)]。

なお OpenCV による画像処理用プログラムの開発および実行環境には，科学・統計計算用アプリケーションを多くパッケージングしたプラットフォーム Anaconda が提供する統合開発環境 Jupyter Notebook を利用し，プログラムの作成に使用する言語には Python を利用した。

本研究で開発した画像処理の主なフローを図 2 に示す。このなかで 1～7 の各タスクに対応する関数が逐次画像データを処理する。

また画像処理の条件を表 2，実際に画像処理により二値化したデータの実例を図 3 に示す。

3. 結　果

3.1 コロニー数の比較

開発したプログラムにより算出したコロニー数と目視で計数したコロニー数，開発したプログラムとトリミング処理を組み合わせた場合の

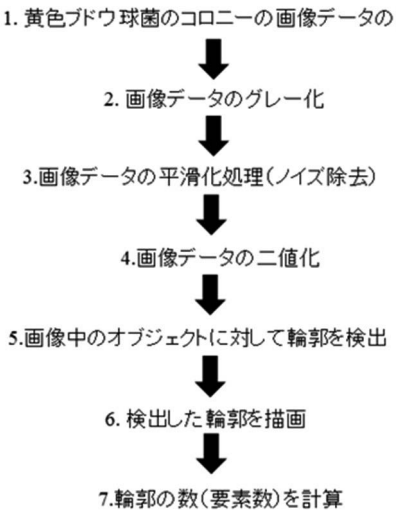

図 2　画像処理のフロー

表 2　画像処理条件

処理	条件
平滑化処理（ノイズ除去）法	・メディアンフィルタ法（重み付けなし）[2)] ・カーネルサイズ：39×39
二値化処理の閾値	130

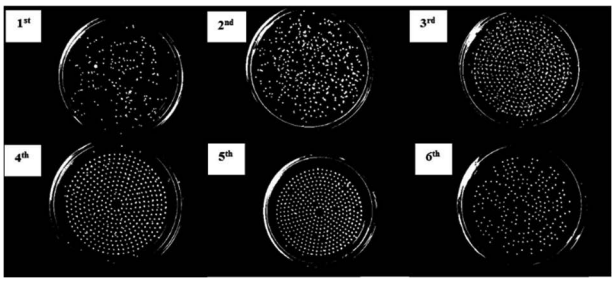

図 3　二値化した黄色ブドウ球菌コロニー
（図 1 を画像処理したもの）

コロニー数を表 3 に示す。なお表中で，試料枚数が 0 枚（ブランク試験）の場合以外の数値に関しては，各試料につき 3 回ずつ測定した数値の平均値を示す。

今回の画像処理方法では，図 3 でも分かるようにペトリ皿の周縁部の画像データが除去されないため，コロニー数の計算結果に誤差を生ずると考えられる。

そこで前処理として，ペトリ皿の周縁部に関して，画像編集ソフト Adobe Photoshop を利用しフリーハンドでトリミングしたうえで，コロニー数を計算した。その結果，コロニー総数（平均値）は目視に対し 7～41 個の差に収まった。なお画像処理により計算したコロニー数は，平滑化（ノイズ除去）処理におけるカーネルサイズと二値化の閾値によって増減するため，トリミング後の値が目視計測に近づくようにカーネルサイズと閾値を調整した。

表 3　コロニー総数の計測結果（単位：個）

計測法	試料枚数	段 No. 1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	合計
a.目視	0	170	323	491	429	395	214	2022
	1	77	195	438	409	381	210	1710
	2	59	170	424	411	380	170	1614
	3	27	63	304	389	323	51	1157
b.画像処理	0	170	317	509	431	411	225	2063
	1	96	198	451	433	400	229	1807
	2	76	172	418	437	394	187	1684
	3	42	78	307	406	310	65	1208
c.画像処理（トリミング）	0	162	301	490	427	398	216	1994
	1	80	185	441	418	383	210	1717
	2	59	165	404	414	378	168	1588
	3	27	63	293	394	289	51	1117

表 4　バクテリア飛まつ捕集効率 B.F.E.の比較（単位:%）

計測法	試料枚数					
	1		2		3	
	B.F.E. (※1)	誤差 (※2)	B.F.E.	誤差	B.F.E.	誤差
a.目視	15.4	-	20.2	-	42.8	-
b.画像処理	11.3	4.2	17.3	3.0	40.7	2.1
c.画像処理（トリミング）	13.9	1.6	20.3	0.1	44.0	1.2

※1 B.F.E.は各試料につき n=3 で測定した結果の平均値
※2 誤差＝|実測値－画像処理による計算値|

3.2　バクテリア飛まつ捕集効率の比較

3.1の結果をもとにバクテリア飛まつ捕集効率 B.F.E.を計算した結果を表 4 に示す。

なおバクテリア飛まつ捕集効率 B.F.E.は次式による。

$$B.F.E.(\%) = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A:試料がない場合の黄色ブドウ球菌のコロニー総数
B:試料がある場合の黄色ブドウ球菌のコロニー総数

その結果，画像処理（トリミング）で求めた B.F.E.の誤差は，目視の場合に対して 2%以内に収まった。

4.　結　　言

(1) B.F.E.試験で必要となる黄色ブドウ球菌のコロニー数を効率的に計測するための画像処理法に関して検討し，その有用性を確認した。

(2) 改良すべき課題として，照明その他の撮像環境の安定化，トリミングの自動化，画像処理条件の最適化などが挙げられる。

(3) 本研究で開発した画像処理プログラムを利用することで，B.F.E.試験での省力化を期待できる。

参考文献

1) http://labs.eecs.tottoriu.ac.jp/sd/Member/oyamada/OpenCV/html/py_tutorials.html, OpenCV-Python チュートリアル

2) 東北学院大学工学部ロボット開発工学研究室 熊谷 正明，“ロボット博士の基礎からのメカトロニクスセミナー第 10 回カメラと画像処理の基礎”