

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	田宮 央登
論文題目	Development of a convenient microbial-growth evaluation system based on microscopic image analysis (顕微鏡画像解析による簡便な微生物増殖評価システムの開発)		
(論文内容の要旨)			
食品表面における微生物の付着・増殖は、風味や食感の劣化をともなう腐敗を引き起こし、安全性の低下や賞味期限短縮、さらには食品ロスにつながる。これらの問題に対応するには、食品上での微生物増殖挙動を正確に把握し、科学的根拠に基づいて日持ち延長や安全対策を設計することが不可欠である。比増殖速度（μ）は、環境条件や保存料処理により変動する基本的指標として、保存性やリスク評価に広く用いられている。このμを求めるために食品業界で広く用いられてきた植菌試験におけるコロニーカウント法は、多数試料の調製や破壊的サンプリング、培養を要し、時間・労力・費用の負担が大きい。そのため、食品表面の微生物増殖を非破壊かつ迅速に定量評価できる代替手法の確立が強く求められている。 そこで本論文では、従来のコロニーカウント法を代替しうる、食品表面の微生物増殖を評価する新しいシステムの開発を目的とした。本システムは、安価に構築可能な光学顕微鏡で取得した画像に対して画像解析を適用し、食品表面における微生物のμを非破壊にて迅速・定量的に評価することを目指している。 第1章では、食品表面における微生物増殖を非破壊かつ迅速に評価するため、光学顕微鏡と画像解析を組み合わせた簡便な観察システムの基盤構築を行った。モデル微生物として食品腐敗酵母 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> を用いてロースハム表面での観察を試みたが、食品表面の凹凸により微生物の直接観察は困難であった。この課題に対し、食品表面に親水性ポリテトラフルオロエチレン膜を載置し、その上で微生物を培養して観察する方法を導入し、顕微鏡観察を可能にする基盤システムを構築した。ロースハム表面で検証したところ、フィルター上でも酵母は増殖し、菌数増加挙動は食品表面と同様に維持されることを確認した。さらに顕微鏡画像において、酵母細胞領域の周囲に暗色の環状領域が観察されることを見だし、細胞領域と暗色領域を含む領域を「bounded area」と定義した。Bounded areaの画素数の比増加速度を指標として保存料ソルビン酸製剤（SAP）の防腐効果を評価した結果、SAP濃度の上昇に伴い当該指標は低下し、コロニーカウント法から算出されるμの低下と相関した。無添加条件を基準とした相対変化率で比較すると両者は非常に良い一致を示した。以上より、本観察システムが食品表面における微生物増殖挙動の変化および防腐効果を、簡便かつ定量的に評価できる有用な代替手法となりうることを示された。 第2章では、第1章で構築した観察システムを発展させ、顕微鏡画像からμを直接推定することを目的として、bounded area画素数の時間変化を記述する数理モデルを開発した。顕微鏡画像では細胞領域境界が不明瞭であるため、bounded area外周と実際の細胞領域との距離が一定であると仮定し、定数マージンを導入した。さらに、細胞数が時間とともに指数関数的に増加し、細胞領域およびbounded areaが円形に拡大するという仮定に基づき、bounded area画素数の時間変化を記述する理論式を導出した。サンプル上に載置した親水性ポリカーボネート膜上での乳酸菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> の顕微鏡画像データに本モデルを適用したところ、理論式は観測データに良好に適合し、最小二乗法によるフィッティングにより画像ベースで個々のコロ			

ニーの比増殖速度を推定できた。さらに、複数コロニーの推定値を集約して集団レベルの比増殖速度を再構築し、従来のコロニーカウント法から得られる比増殖速度と比較した結果、両者は良好に一致した。加えて、実際の食品（ロースハム）においても同様の一致が確認された。以上より、bounded area画素数の時間変化と数理モデルに基づき、食品表面における微生物の μ を、顕微鏡画像から非破壊的かつ迅速に直接推定できる新しい画像解析アプローチを確立した。

第3章では、本手法の実用化を見据え、推定精度と測定効率に関わる解析条件として、bounded areaの面積拡大倍率（拡大倍率）と観察コロニー数（サンプルサイズ）を系統的に評価した。乳酸菌 *L. mesenteroides* の顕微鏡画像に第2章の数理モデルを適用し、両解析条件の最適化を試みた。拡大倍率10倍で算出した個々のコロニーの比増殖速度を参照値と定義した上で、拡大倍率を4～10倍に変化させ、データを途中で打ち切った場合の平均相対誤差（MRE）を算出した。その結果、拡大倍率7倍以上でMREは5%未満となり、短時間観察でも精度を維持できることが示された。サンプルサイズを3～60に変化させた評価では、サンプルサイズ60個で算出した集団としての比増殖速度を参照値と定義した上で、10個以上でMREは5%未満となり、少数コロニーの観察でも安定した推定が可能であった。さらに、拡大倍率とサンプルサイズを同時に変化させた場合、例えば拡大倍率10倍・サンプルサイズ3個と、拡大倍率6倍・サンプルサイズ10個でMREがいずれも9.1%となるなど、異なる条件で同等の精度を達成する際のトレードオフ関係を確認した。以上より、目的や状況に応じて拡大倍率（観察時間）とサンプルサイズを調整することで、精度と迅速性を柔軟に両立できる実用的な運用条件を提示した。

以上のように本論文は、親水性膜を用いた顕微鏡観察系の構築、bounded areaに基づく防腐効果評価指標の提示、ならびにbounded areaの時間変化を利用した数理モデルによる μ の直接推定法の確立を通じて、食品表面の微生物増殖および防腐効果を、従来法に比べて簡便かつ非破壊的に定量評価できるシステムを開発したものである。本手法は、保存料・処方・保存条件のスクリーニングや、日持ち設計・品質管理における評価の迅速化に資するとともに、食品安全性の向上と食品ロス削減を支える基盤技術となることが期待される。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

食品表面における微生物増殖の理解と制御は、食品の品質保持と安全性確保、ならびに食品ロス低減に通じる重要課題である。増殖挙動の定量評価には比増殖速度(μ)が広く用いられてきたが、従来の植菌試験におけるコロニーカウント法は、破壊的处理と煩雑な操作、培養時間を要し、日常的な品質管理への適用に大きな制約があった。本論文は、安価に構築可能な光学顕微鏡による観察と画像解析・数理モデルを統合し、食品表面の微生物増殖および防腐効果を非破壊・迅速・定量的に評価するシステムを構築したものである。評価すべき点として以下の3点が挙げられる。

1. 微生物の観察が困難な食品表面に対し、親水性ポリテトラフルオロエチレン膜を用いた観察系を導入して顕微鏡観察を可能にし、細胞領域とその周囲の暗色環状領域を含むbounded areaを定義した。さらにbounded areaの画素数の比増加速度を指標化し、保存料濃度依存的な変化がコロニーカウント法由来の μ の変化と良好に一致することを示した。
2. Bounded areaの時間変化から μ を直接推定するため、定数マージンを導入した数理モデルを構築した。本数理モデルを乳酸菌の顕微鏡画像に適用し、個々のコロニーおよび集団レベルの比増殖速度が高精度で推定できることを実証した。推定値が従来法から算出される参照値と良好に一致し、食品表面においても同様の一致が確認された点は、食品表面での非破壊的 μ 評価として学術的意義が大きい。
3. 実用化を見据え、bounded areaの画素数拡大倍率と観察コロニー数が推定精度に与える影響を平均相対誤差で整理し、両者のトレードオフ関係を定量的に提示した。これにより、目的や制約条件に応じて精度と迅速性を両立させる運用条件の選択を可能とし、現場での日常的な評価への適用可能性を高めた。

以上のように、本論文は、食品表面における微生物増殖や防腐効果を、従来法に比べ簡便かつ非破壊的に定量化しうる新たな顕微鏡観察系を構築し、画像解析への新規数理モデルの導入により比増殖速度の推定を可能とするとともに、その運用条件の最適化を達成している。その成果は、食品微生物学、数理生物学、食品安全学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和8年1月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)