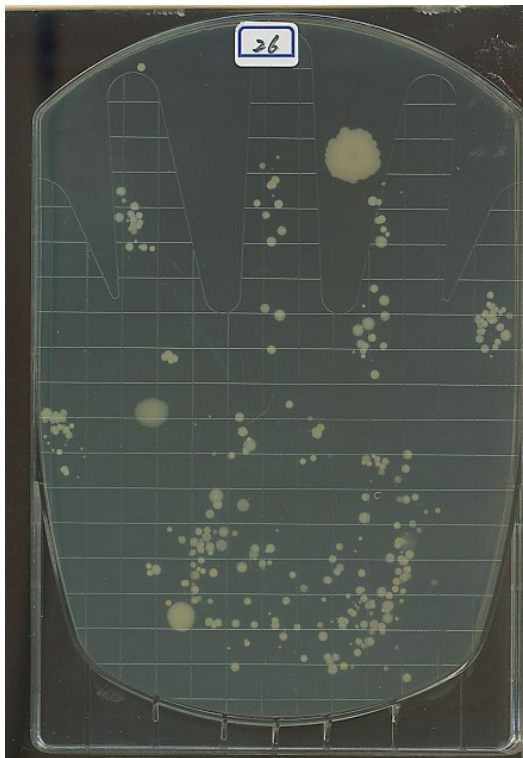


画像処理ソフトを利用したハンド式細菌検査

- I. 画像処理ソフトを利用したハンド式細菌検査 手順書
- II. 実験データの処理(コロニー数測定、コロニー密度計算)



I. 画像処理ソフトを利用したハンド式細菌検査 手順書

1) 必要な器具

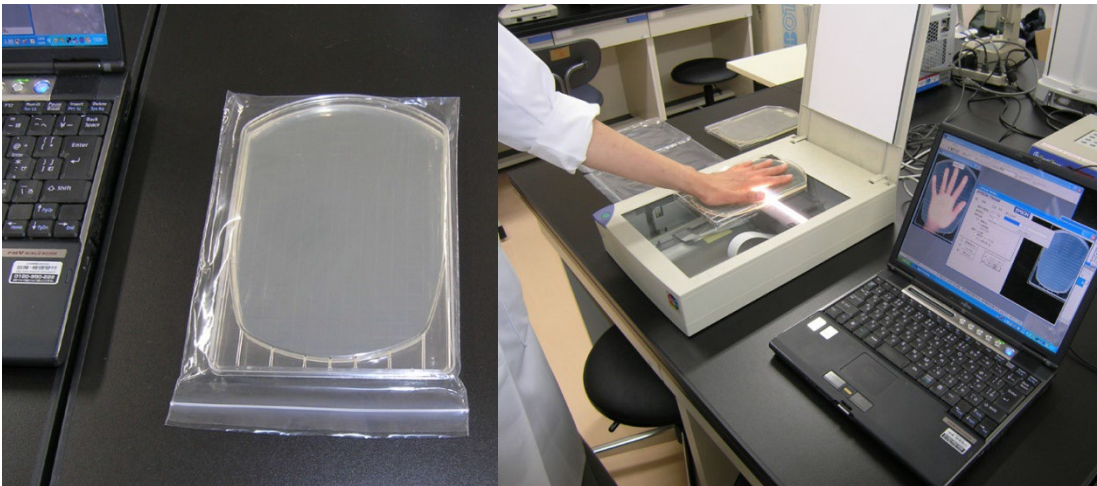
- ・ハンドスタンプシャーレ(シャーレ):アテクト社製
- ・スキャナー、PC(アドビの Photoshop 等の画像編集アプリインストール済み)
- ・一般的な細菌検査室設備(恒温培養器、オートクレーブ等)

2) 取り込み準備(実験室)

- ・シャーレを袋から出す。このとき、シャーレのふたは開けないように注意。→ 番号をラベルに記入する → シャーレの裏側最上部に接して貼り付ける → シャーレをスキャナーの所定の位置に置く(まだ、ふたは開けない)
 - ・スキャナーの上部の光源(蛍光灯)等が映り込まない位置に設置。
 - ・シャーレ 2 枚 1 枚目:手洗い前、
 2 枚目:手洗い後(液体せっけん洗浄:アルコール洗浄)
- ※ 各自でシャーレの番号を記憶する。(プリントの隅にメモするとよい)

3) Photoshop を起動(実験室)

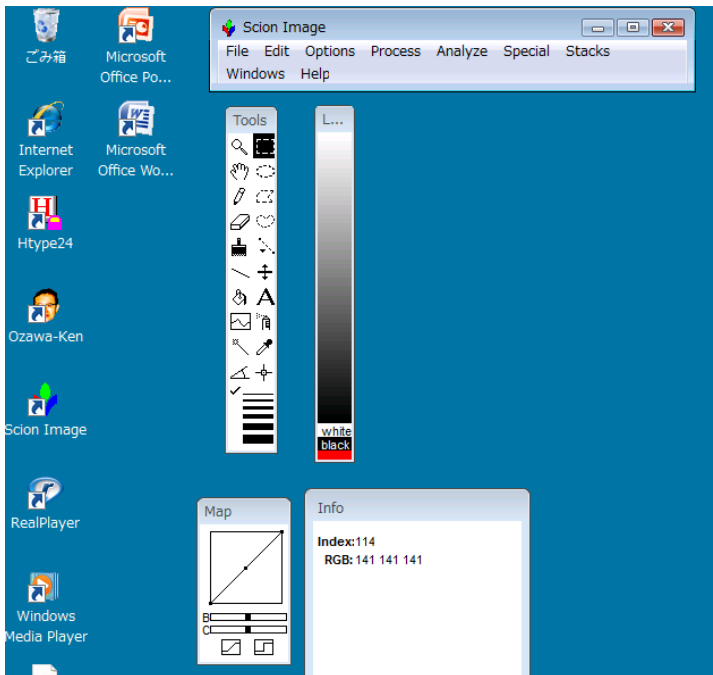
- ・ファイル → 読み込む → TWAIN 対応機器
 - ・シャーレをスキャナー上におき
 - ・プレビュー → シャーレ範囲を選択 → カラー → 72 dpi
 - ・モアレを取り除くのチェックをはずす →
 - ・自動調整を外し、白い掌のハイトーン(白く飛ぶ部分)を少なくする。色調補正明るさマイナス 15%
- ※シャーレの蓋を取り → 被験者の手のひらを接面する もう一人が取り込みボタンを押し、スキャナーをスタートする。 → スキャンが終わったらシャーレの蓋を閉じインキュベーターへ
- ・ファイルから閉じ(ctrl+W)、ファイル形式 tif を選択し、保存する
- ※Tif 形式以外の形式 JPEG 等では面積計算ができる正確な数値(インチ)が出ない



4) イメージを印刷する

手のひらの実寸大になる様にサイズを調整して印刷する

4) Scion イメージ (画像解析ソフト) で面積を計算する



(1) Scion Image を利用する。フリーソフトの NIH Image のウィンドウズ版である。

(2) Scion image を起動する。ファイルメニューや各ウィンドウが操作しやすいように位置を調整する。

(3) File → Open → tif ファイルを開く
グレースケール(白黒)のウィンドウをアクティブにする(前面に出す)。

(4) 指の部分の面積、手のひらの部分の面積を測定するために、あらかじめ境界線を描いておく。

Tool ボックスの線の幅を3番目の太さの線をチェックする → ライントoolを選択する → 各指の付け根の部分で直線で区切るようにラインを描画する。

接面している手のひら部分と手首の部分の境界が不明瞭な場合は → 鉛筆tool→境界部分

を実線で境界線を描画しておく

※失敗したときは **ctrl+Z** で1操作前までは戻ることができる。それ以前は **scion image** を終了してやり直す。再度 **tif** ファイルを開いた際、画像が乱れた場合は、編集前の画像ファイルからやり直す。

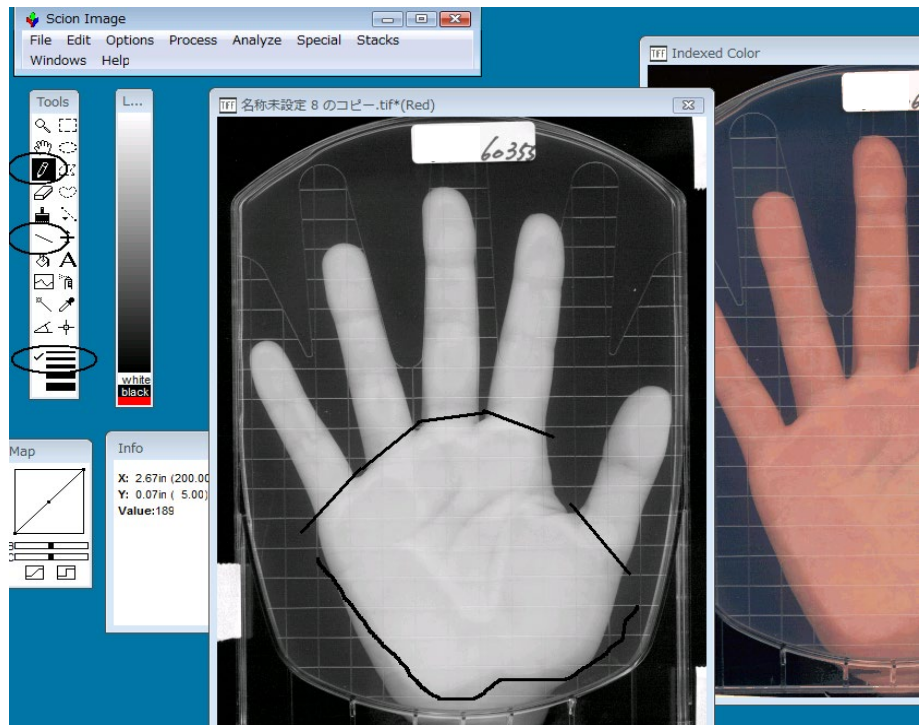
(5) また、手のひらの部分はハイライト(明るく)になっているので、このままでは面積測定できない。白黒反転画像にするために以下の操作を行う。

→Edit → invert

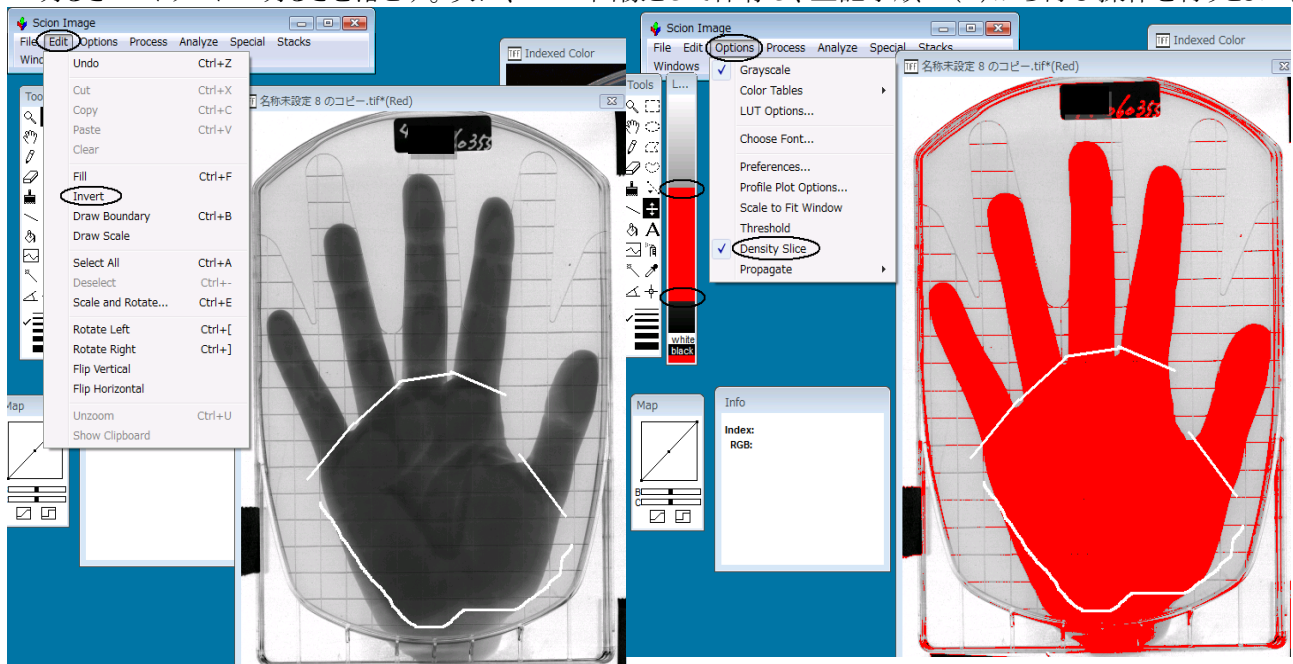
グレースケールの画像は連続的な階調で濃さが表現されている。面積を測定するためには白と黒の2階調に変換する必要がある。(2値化、0が白、1が黒)

Option → density slice(一定の濃さ以下を0に、一定の濃さ以上を1に)

(6) 手形の範囲が赤色になるように、Lut バーで調整する。境界線の抜けた部分が赤くつぶれないように調整する。赤色の部分が2値化の1(黒)になる。画面上の白かグレーの部分は0に相当する。Lut バーの調整によってシャープ上の横ラインを消す(グレーにする)ことができる(ラインの色が赤からグレーになるように調整するとよい)



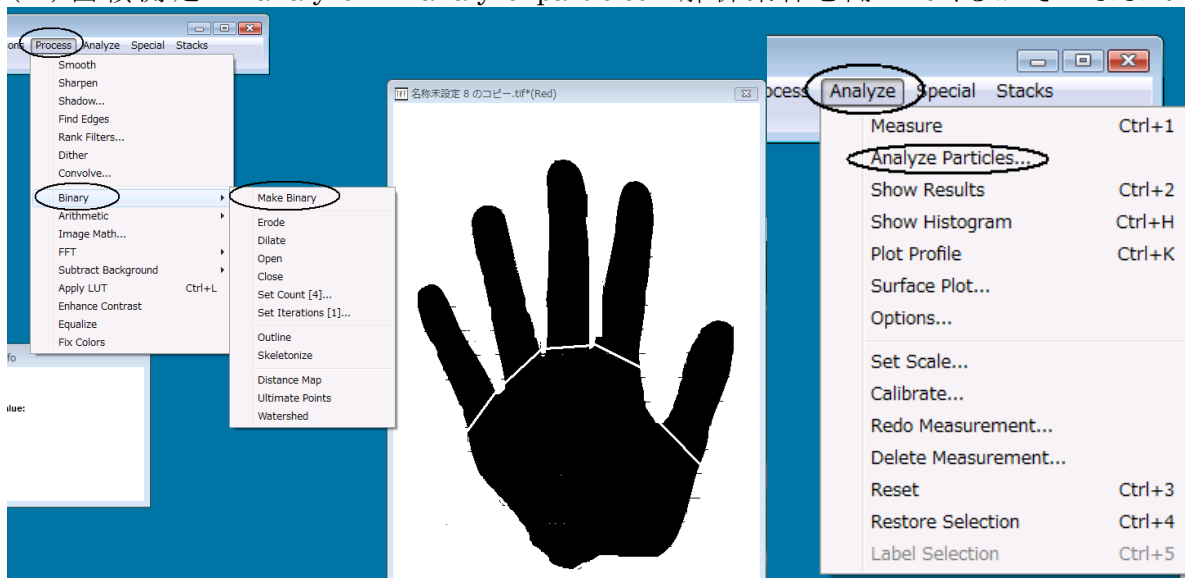
※手のひらの部分が一樣に、赤色に2値化できない場合がある。特に、スキャンで取り込んだ画像のハイライト部分が白く飛び、グレースケール値になっていない場合である。この場合は、TIFF画像を Photoshop で開き、色調調整 → 明るさコントラスト → 明るさを落とす。次に、TIFF画像として保存し、上記手順の(1)から再び操作を行うとよい。



(7) Process → binary → make binary (2値化)

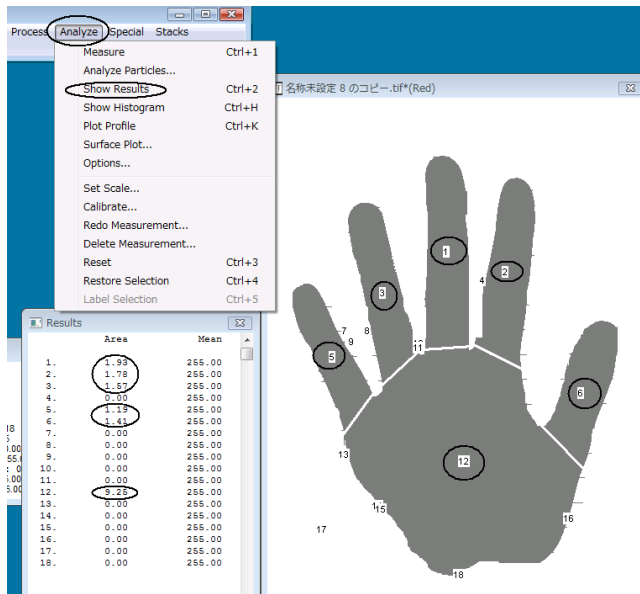
画面全体の2値化された1の部分が黒くなる。面積を計算したときに黒い部分は全て別々に計算されるので、不要なラインや、粒状の部分を消す。消しゴムツールや、囲みツールで選択後 delete する。

(8) 面積測定 analyze → analyze particles 解析条件を聞いてくるがそのまま OK する。



(9) 計算された範囲が番号表示される、指などで独立の範囲があるか、小さい斑点に過ぎないのか確認する。

(10) analyze → show result で計算結果が出る。番号は範囲に相当する番号。データの単位は平方インチである。集計時には $1\text{inch}^2 = 6.45\text{cm}^2$ で補正し、平方センチメートル単位にする。



- (11) Printscreen で result 画面と手のひらの画像をコピーし、エクセルに貼り付けておく。このファイルが後でデータを集計するために必要なファイルとなるので、「学籍番号ハンド面積データ.xlsx」と名前を付けて保存しておく。この操作でデータを保存するので忘れないようにする。
- (12) Scion image を終了する際は、保存する必要はない。Scion image で画像やイメージを保存しても、再度読み込む際に正しく表示されない場合があるためである。
- (13) 「学籍番号ハンド面積データ.xlsx」を提出する。

II. 実験データの処理(コロニー数測定、コロニー密度計算)

(A) コロニー数の測定

手形の印刷画像と細菌コロニーの印刷画像を重ねることによって、コロニーのもととなる指の部位が判明する。各部位別にコロニー数をカウントする。一度カウントしたコロニーの再カウントを防ぐために、カウント時にはペンでチェックするとよい。配布する「細菌検査入力表.xlsx」に個数を記録する。

(B) コロニー密度の計算

前項では、手のひらの部位別にコロニー数を計測した。各指の部分と手のひらの部分では面積が大きく異なるので、コロニー数だけでは、付着していた細菌数の多少に関して考察は不十分となる。そこで、前回測定した面積をもとに、密度を計算する。これによって単位面積当たりのコロニー数の情報から、細菌汚染され易い部位かどうか分かる。データの入力は、配布する「細菌検査入力表.xlsx」におこなう。

- (1) 前回提出した集約ファイルから該当するデータをコピー貼り付けを行う
- (2) 面積 cm^2 は数式で算出したので、貼り付けの際には、セルを右クリック→「形式を選択して貼り付ける」「値のみ」を選び、数値を貼り付けることにする。
- (3) 密度は数式で求める。密度=コロニー数(個)/面積(cm^2)

(C) 提出

「細菌検査入力表.xlsx」ファイルを提出する