

コロニートランスファ装置

Automatic Colony Transfer and Analyzing System

バイオ技術の研究開発では、有用かつ高性能な微生物を入手することが極めて重要である。そのため、自然界から採取した天然微生物や変異処理、遺伝子操作等を行ったものなど、多種多様な微生物からスクリーニング(選抜)することが行われている。その中心操作である微生物コロニーの外観解析や移植作業は従来手作業によって行われ、多くの労力と時間を要してきた。そこで全自動化によるスクリーニングの省力化、迅速化及び定量化を目的としたコロニーの自動外観解析、移植装置の開発が望まれていた。半導体製造装置で実用経験を積み、ブラシアップしてきた画像処理技術、及び精密メカトロニクス、クリーンスペース技術を応用して、ソース(試験)シャーレ上の微生物コロニーの個数・大きさ・形状・色調の自動認識と解析、無菌環境下での高速・高精度な自動移植、及び移植作業のモード化による操作のワンタッチ化を特長とするコロニートランスファ装置を開発した。

生見 益三* *Masumi Nukumi*
岩谷 福雄** *Fukuo Iwaya*
大熊 道雄*** *Michio Ôkuma*
緒田原 蓉二**** *Yôji Odawara*

1 緒言

微生物を用いたバイオ技術産業の進展は目覚ましいが、その成否は有用かつ高性能な微生物の入手にかかっていると言える。このような微生物を入手するには、土壌などから採取した天然微生物や、既知の微生物に種々の物理的、化学的変異処理を施した中からスクリーニングを行っている¹⁾。また近年、遺伝子操作も可能となり、遺伝子組換えや細胞融合により目的とする機能、性能を持った微生物を意図的、計画的に作ることも可能となってきた^{2),3)}。

いずれにしても、これらの多種多様な微生物群から目的機能の優れた微生物をスクリーニングするには、純化して種々の培地に移植し、機能、性能の特定を行わねばならない。その基本作業であるコロニーの外観解析や移植作業は、手作業が中心で多くの労力と時間を要するものである。

そこでコロニーの個数、大きさ、形状、色調などを自動認識し、それらのデータを解析し、目的に合致したコロニーを自動的に移植できるコロニートランスファ装置の開発を行った。

まず、天然からの微生物選抜用として、昭和59年10月にコロニー形状、色調解析機能付きの高級機(CT-2000)を開発し、次に変異処理、遺伝子操作を行った微生物の移植用として、昭和60年10月に白黒認識、大量移植用の量産形機(CT-3000)を開発した。これらの装置の開発によって移植作業の定量化、高精度化及び無菌化が実現し、更に省力化、迅速化により大量処理が容易となり研究開発期間の短縮が可能になった。

2 装置の概要

コロニートランスファ装置は、ソースシャーレの平板寒天培地上に培養した微生物のコロニーの外観を自動認識し、指定した条件に適合したコロニーを自動的に高精度でオブジェクトシャーレ上の指定の位置に移植するもので、用途に応じてCT-2000とCT-3000の2機種を開発した。両装置の基本仕様を表1に示す。

移植作業には、一般にニクロム線の先端を直径1~2mmのループ状にして、これを1回ずつ火炎殺菌して用いるか、蒸気滅菌したつまようじ、竹ぐしなどを使い捨て方式で使用する¹⁾。本装置では自動化を考慮して、精度が良く取扱いが容易な金属製の針を移植針とし、使い捨て方式で使用する。

本装置での移植動作は、ソースシャーレ上のコロニーを移植針で刺し、針に菌を付着させた後、オブジェクトシャーレ上の指定の位置に移動して寒天に刺し込む動作であり、針の刺し込み深さはソース側、オブジェクト側とも0.1mm単位で任意に設定できるが、移植を確実にするため通常ソース側よりもオブジェクト側を深くする。

2.1 CT-2000の構成

天然からの微生物を選抜するCT-2000では、コロニーをITV(工業用テレビジョン)カラーカメラで認識し、研究者によってあらかじめ指定された条件に従い、高速・高精度で全自動移植を行う。研究者はコロニーの認識番号、大きさ、形状、色調などの選抜の条件と、何番地のオブジェクトシャーレにどのような配列で移植するかをあらかじめ指定す

* 日立電子エンジニアリング株式会社埼玉工場 ** 日立電子エンジニアリング株式会社 *** 日立製作所システム事業部
**** 日立製作所基礎研究所

表1 コロニートランスファ装置の基本仕様 CT-2000は解析、分類用、CT-3000は大量移植用である。

項目	CT-2000	CT-3000
対象シャーレ	丸形シャーレ φ90mm	
搭載個数	ソース側	168シャーレ
	オブジェクト側	504シャーレ
移植速度	約2秒/1移植	2.5~6.5秒/1移植
移植精度	±0.1mm	
植付位置	最低1mm以上の間隔 (0.1mmピッチで可変)	1~100個/シャーレ (10モード選択可)
レプリカ処理	2個まで可	4個まで可
アガーピース対応	—	3シャーレまで可
認識	カラー認識 色調64分類	白黒2値化処理
	コロニー径 φ1mm以上	コロニー径 φ0.5mm以上
選抜条件	条件を任意に指定	コロニーの大きさの範囲指定
移植針形状	リール線 φ0.3mm	単品針 φ0.5mm
移植針収納数	2,000本分/リール	最大6,000本(追加可)
外形寸法	本体: 1,340×奥行920×高さ1,685(mm)	幅2,000×奥行1,300×高さ1,500(mm)
	コンソール: 幅1,200×奥行800×高さ1,200(mm)	
重量	本体: 約800kg コンソール: 約100kg	約700kg
電源	AC100V, 20A	AC100V, 20A
その他	●解析機能 (色調, 形状, 時系列など)	●画面ハードコピー ●クリーンユニット ●ユーティリティユニット (エア, 真空源)
	●クリーンユニット ●グラフィックプリンタ	

る。また、認識されたコロニーの形状解析、色調解析及び時系列解析のデータは、G-CRT^{※1)}画面に表示し、選抜条件決定の参考となるように配慮した。

装置外観を図1に、装置構成を図2に示す。CT-2000は、ソースシャーレ上に分布する種々のコロニーを分類し整理す

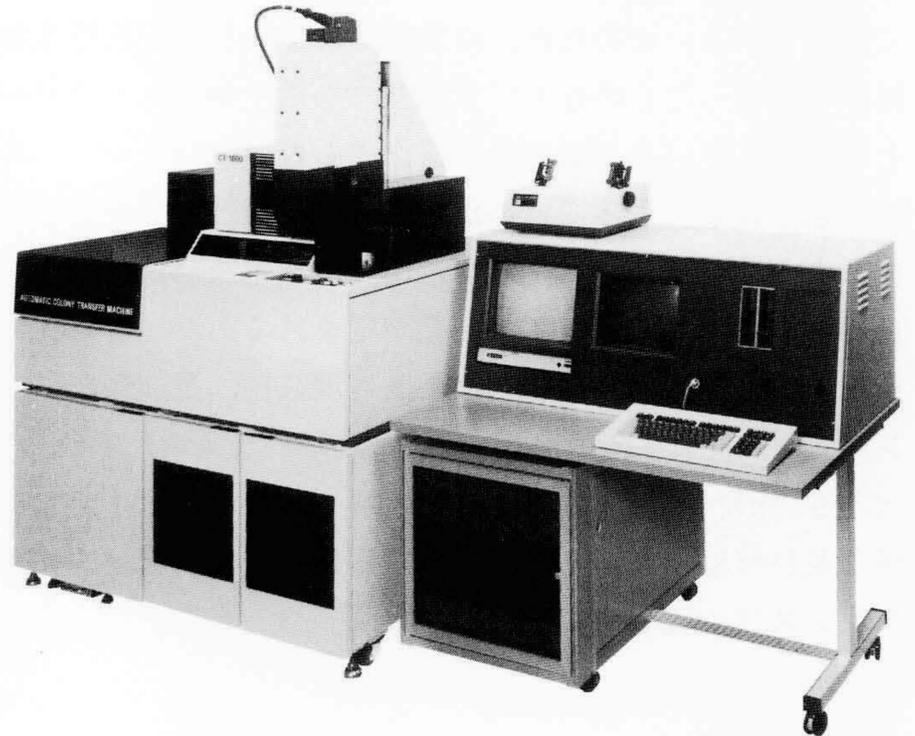
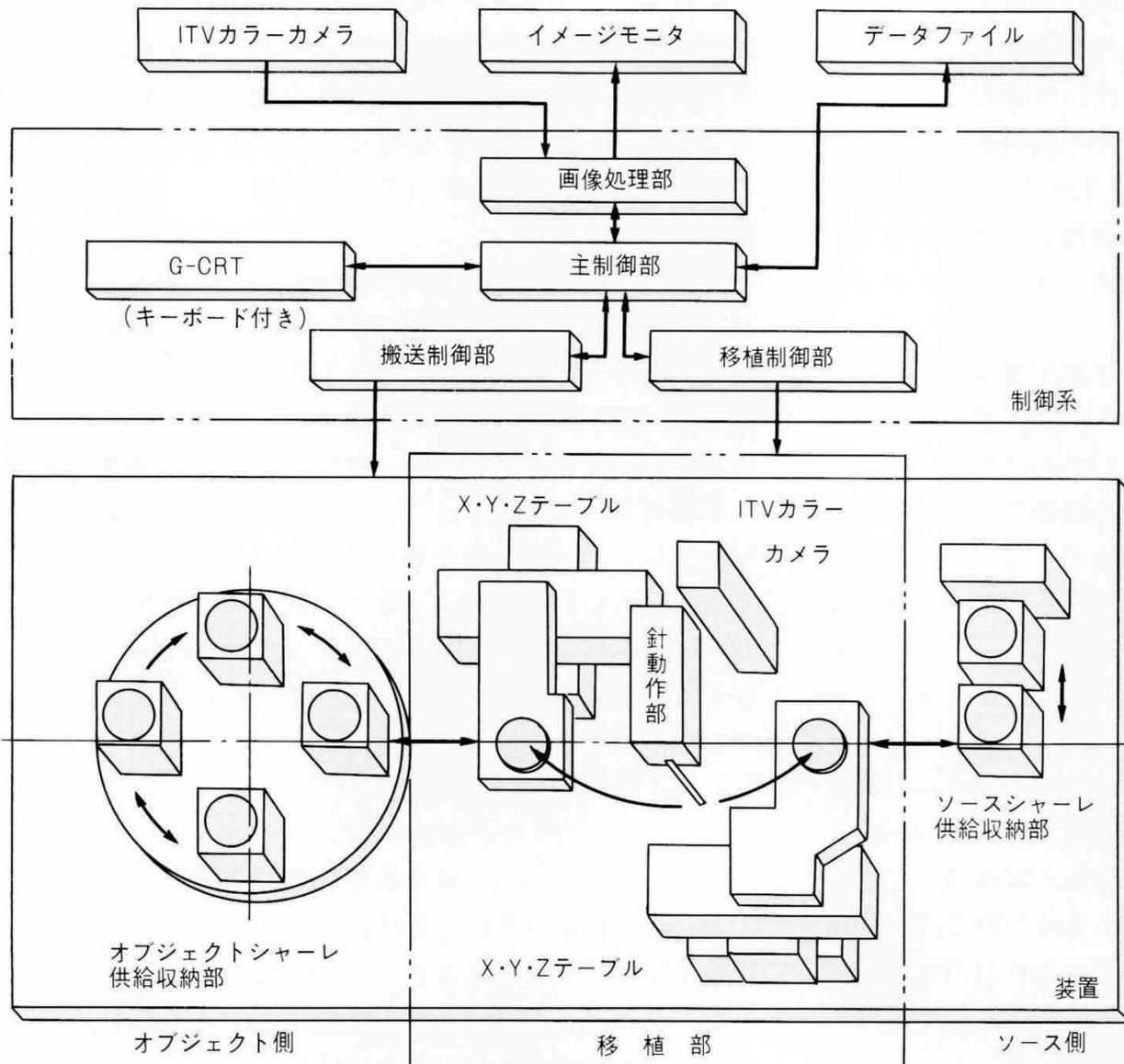


図1 CT-2000の外観 コロニーの形状、色調解析機能付きで、分類や整理に向き研究用である。



注: 略語説明
ITV(工業用テレビジョン)
G-CRT(Graphic Cathode Ray Tube)

図2 CT-2000の構成 色調を含めた種々の解析データに基づき、選抜条件、移植条件を指定する。

※1) G-CRT(Graphic Cathode Ray Tube)は、図形が表示できるブラウン管ディスプレイである。

ることを主目的としているため、すべてのシャーレを段付きのマガジンに収納し、シャーレの番地を明確に管理している。

移植針はリールに巻かれた直径0.3mmのアルミニウム線で、滅菌のため設けた加熱ブロックの中を通したあと定寸切断して使用し、1ポイント移植ごとに使い捨てする。

移植動作、針の交換は高速化のためカム駆動としシーケンシャルであるが、種々の選抜条件、移植条件に対応するため、ソースシャーレ及びオブジェクトシャーレは各々独立して動作するX・Y・Zテーブル上に1個ずつセットする方式とした。

2.2 CT-3000の構成

CT-3000は移植作業の量的処理を専用に行うもので、簡便な操作で大量移植を可能にしたものである。

装置外観を図3に、装置構成を図4に示す。CT-3000は純化、検定のための大量連続処理を目的としているため、シャーレの供給、収納容量はソース側で最大168個、オブジェクト側で最大504個と大容量とした。また、レプリカ処理対応のため、オブジェクト側には4種類の培地を同時にセットできる方式とした。

シャーレマガジンは、作業性と大容量化を考慮して積重ね

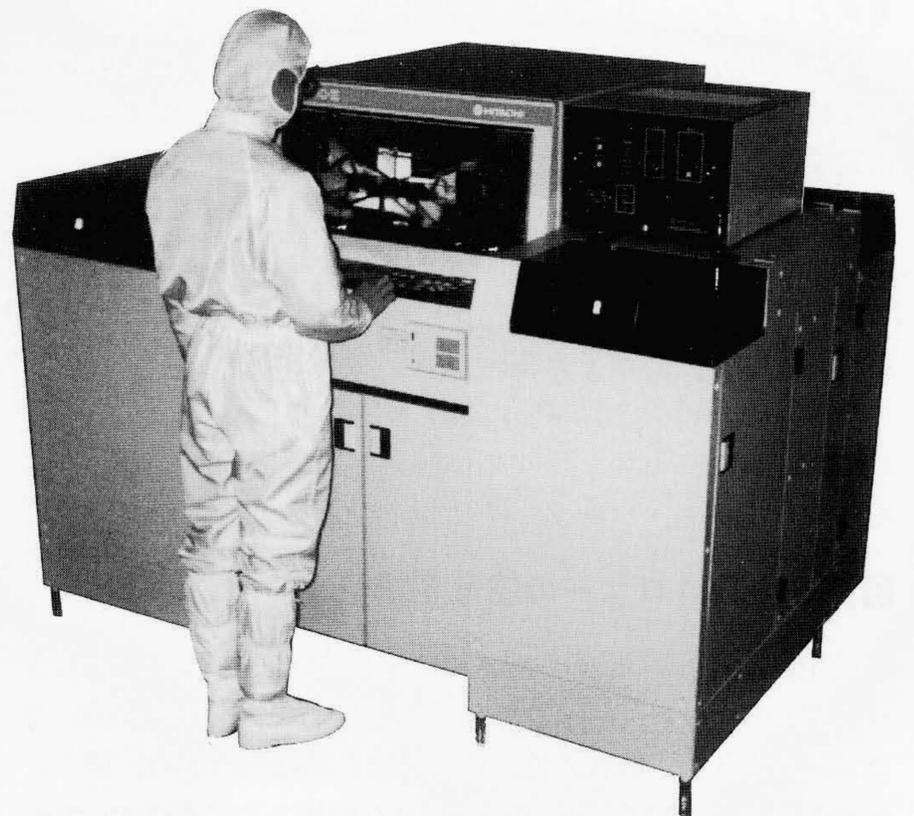


図3 CT-3000の外観 シャーレの供給、収納数が大容量で、大量移植用である。

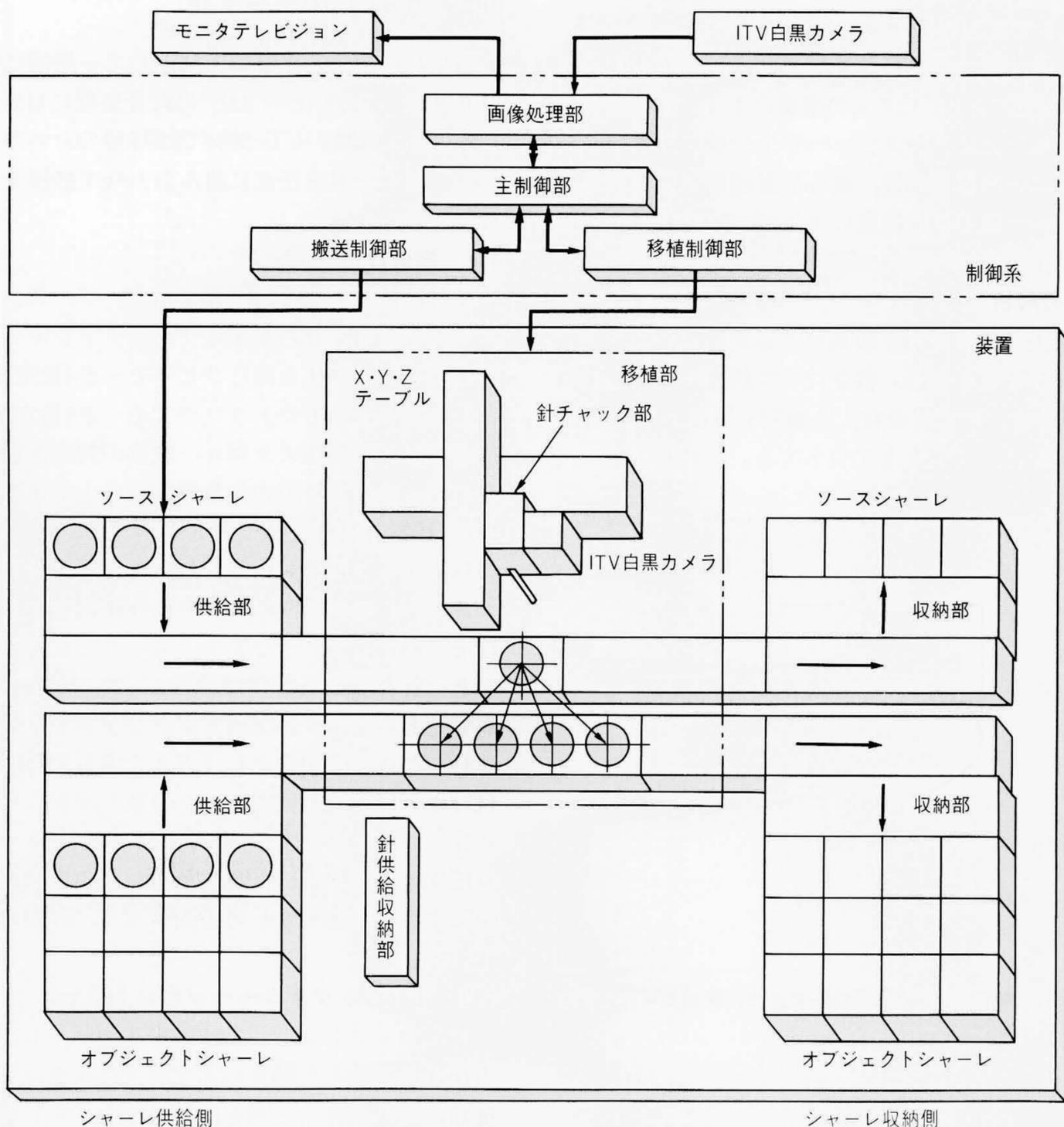


図4 CT-3000の構成 オブジェクトシャーレは最大4個同時セットできる。選抜条件、移植条件はモード化され、簡便な操作で大量移植を行う。

方式とし、シャーレの番地の管理は行っていない。

ITV白黒カメラによるコロニーの認識は、大きさと重心位置座標で、選抜条件はコロニーの大きさであり、その範囲を指定する。

移植針は直径0.5mmのステンレス単品針を使用し、1コロニー移植ごとに交換する。使用済みの針は洗浄、滅菌処理をして再使用が可能で、装置動作中に針ストック部へ連続的に追加補充することができる。

移植は、移植針を保持した針チャック部をX・Y・Zテーブルで動作させて行い、種々の移植条件は操作性向上のためにモード化を図り、ワンタッチで指定できる方式とした。

3 微生物コロニーの認識と解析

微生物を平板寒天上で15~72時間程度培養すると、直径1~5mmのコロニーを作る。人手によるコロニーの選抜は、コロニーの大きさ、形状、色、表面の感じ(滑面か否か)、固さ、色素生成能、気菌子の有無形態などを指標として行うが、現在の認識技術では大きさ、形状及び色の自動認識が可能である。

3.1 コロニーの認識

CT-2000ではコロニーをITVカラーカメラで撮像し、画像処理して得られる情報は図5に示すように各コロニーの面積、重心位置座標、最大径、最小径、外周長及び色調(R・G・B各64階調)*2)の6種類である。これらの情報により、移植動作時モニタテレビジョン上にソースシャーレ上の総コロニー数、移植されるコロニーの認識番号、重心位置座標及び面積を表示し、更にコロニー像の重心位置に十字マークを付けることによって、移植作業の進行状況の確認を容易にしている。

3.2 コロニーの解析

コロニーの選抜条件の決定を容易にするために、コロニーの認識で得られた情報を基に、表2に示す解析を行い、コロニーの大きさ別分布、形状別分布、色調別分布などをG-CRTに表示するとともに、プリントアウトする。

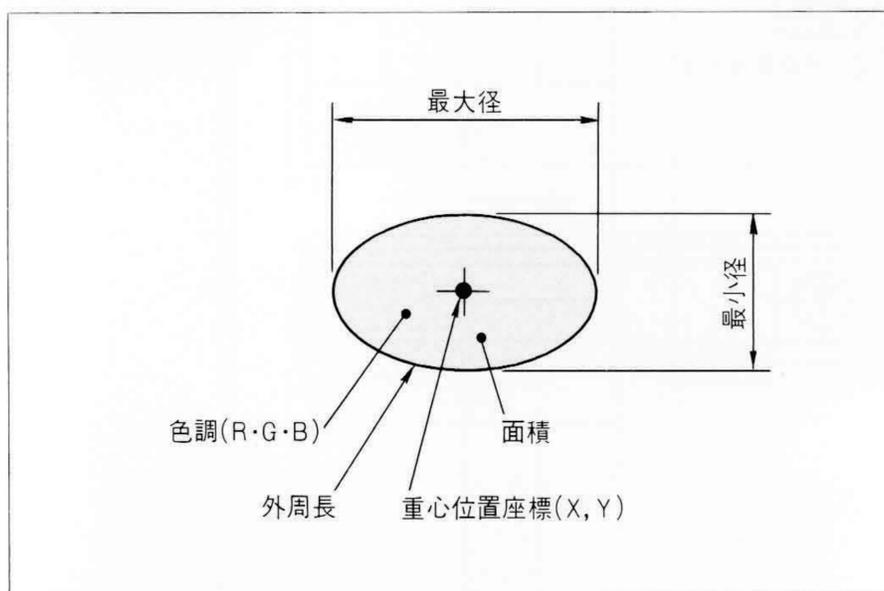


図5 コロニーの認識情報 各コロニーごとに、認識番号と上記6種のデータが入力される。

表2 コロニーの解析 解析データをパラメータとして、大きさ別、形状別、色調別などの分布が得られる。

分類	解析データ	内容
個数	番号	認識番号
分布	重心座標	重心位置のX, Y座標
大きさ	面積	面積
	直径	面積等価円直径
形状	ひずみ	最大径/面積等価円直径
	凹凸	外周長/面積等価円外周長
	形状比	最大径等価円外周長/外周長
色調	平均色調	重心位置周辺(9絵素分)の平均R・G・B
	64階調分類	色見本(64階調)と比較した色調番号

注:略語説明 R・G・B(*2)参照

3.3 時系列解析

認識、解析データをフロッピーディスクにファイルしておき、ある一定時間培養後のデータと比較することによって、コロニーの時間的変化を検出することができる。この時間的変化率をパラメータとしてコロニーを解析すれば、新たに発生したコロニーや成長の速いコロニーを選抜することができる。

4 移植動作のモード化

微生物の純化、検定の方法として一般的に行われているレプリカ法、アガーピース法¹⁾の大量処理に対処し、操作性の向上を図るために、CT-3000では移植のための各動作をモード化し、各モードを任意に組み合わせて移植を実行する方式とした。

4.1 植付け位置モード

植付け位置モードを図6に示す。ソースシャーレ上のコロニーの分布を、そのままオブジェクトシャーレ上に再現する従来のレプリカ法と同じコピーモード(設定0)と、縦横規則正しく整列させるマトリックスモード(設定1~9)とした。後者では、培養後のコロニー位置の対応関係を見やすくできるので、次の段階での作業効率が向上できる。

4.2 移植針動作交換モード

移植するコロニーが替わるときは必ず針交換を行うが、1コロニーの移植に関して針の動作交換方法を図7に示すようにモード化した。すなわち、モード1は1ポイント移植するごとに針を交換する方式で、ソースコロニーを整理するのに有効である。モード2はオブジェクトシャーレの数だけ移植を行った後、針交換を行う方式で最も移植速度が速いが、植付けごとに徐々に移植される菌数が少なくなる。この欠点を補うために、移植するごとにソースコロニーへ戻り、移植量を確保するのがモード3である。この場合、以前の刺し込み位置より一定量ずらした位置へ戻り、移植量の均一化を図っている。

4.3 オブジェクトシャーレセットモード

オブジェクトシャーレは最大4個セットできる。セットの方法は培地により図8に示すように4モードがある。特に2種類培地の場合、二対を同時搬送セットし搬送時間の短縮を図っている。また、移植動作はエリア①を完了後、エリア②へ移る。

*2) R・G・Bとは、光の三原色である赤(Red)、緑(Green)、青(Blue)の略である。

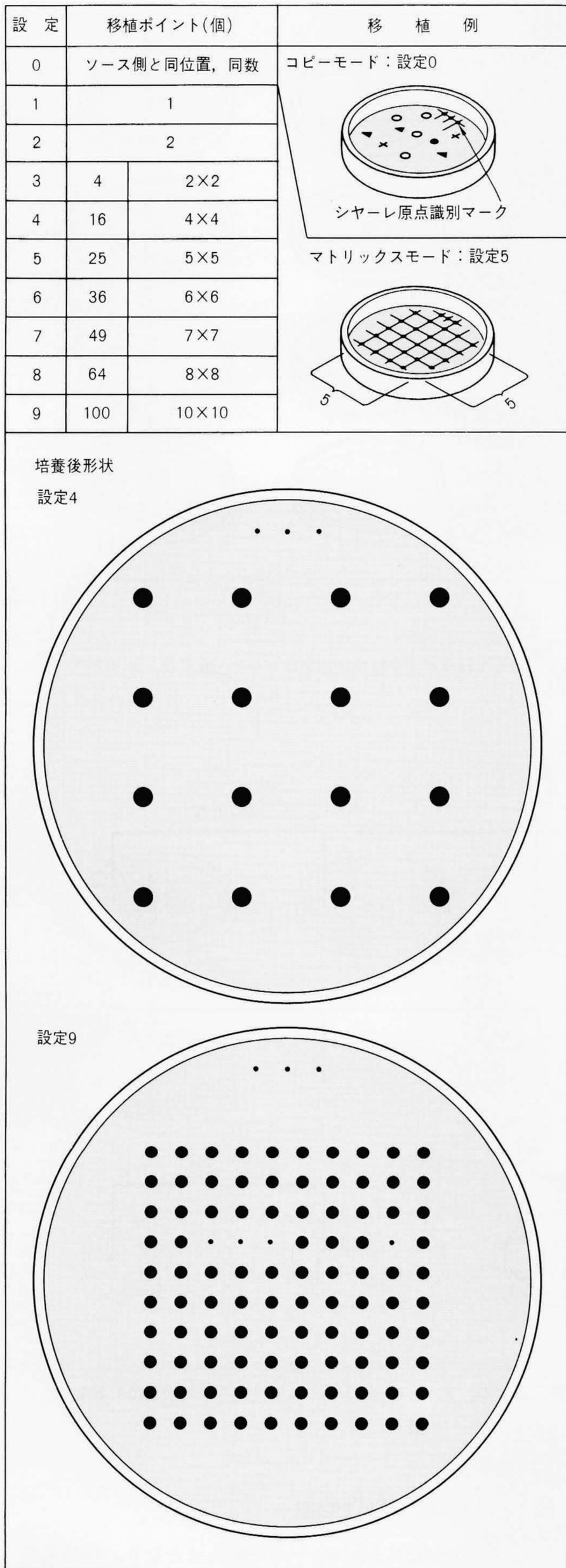


図6 コロニーの植付け位置 移植前に針でシャーレ原点識別マークを付ける。マトリックスモードの植付けピッチは、各設定で固定である。

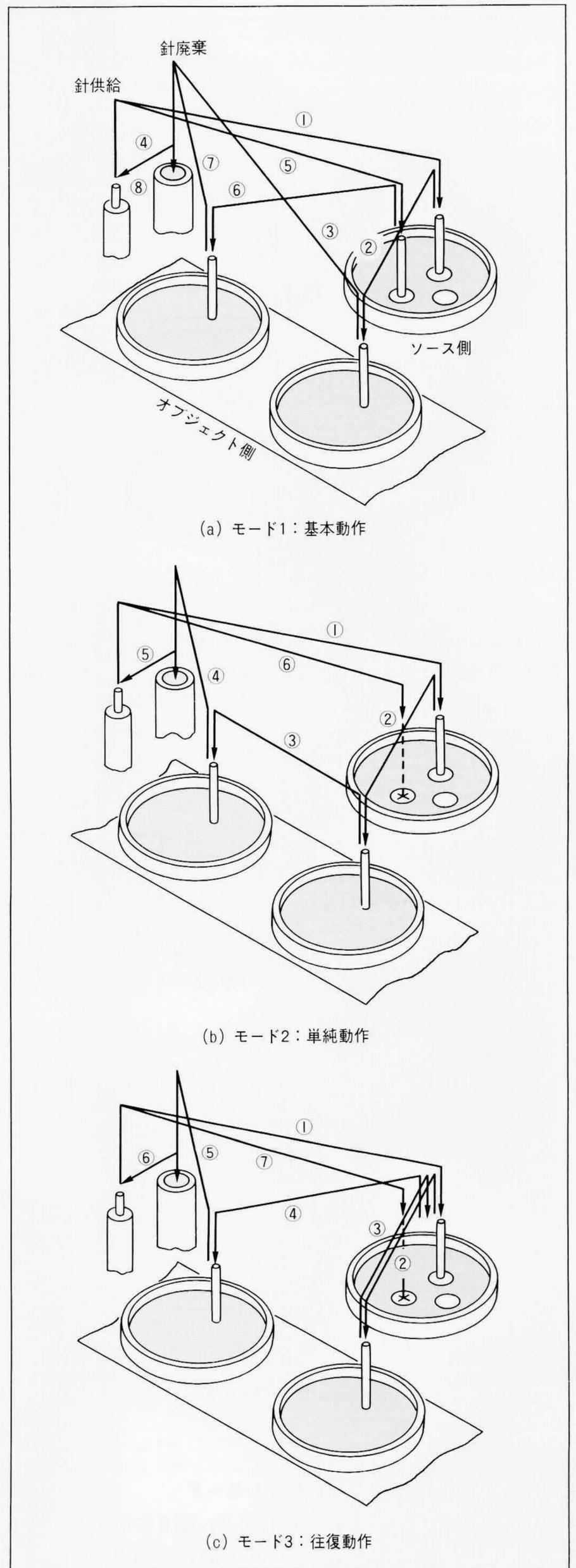


図7 移植針動作交換方法 モード1はコロニーの整理に有効である。モード2, モード3はレプリカ法などの大量処理に適している。

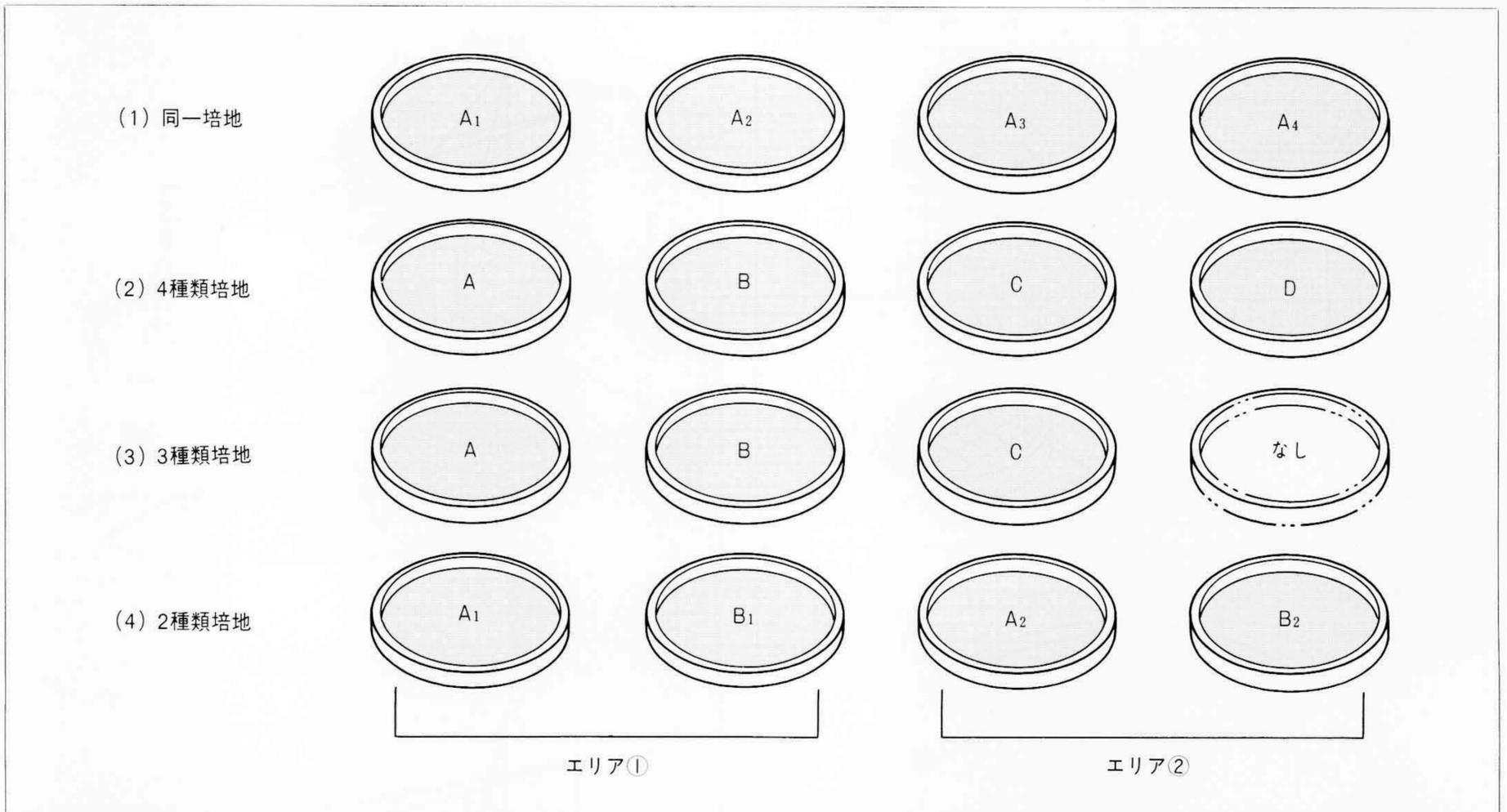


図8 オブジェクトシャーレセットモード 移植は針の動作交換モードに従って行うが、2種類培地ではエリア①完了後、エリア②へ移る。

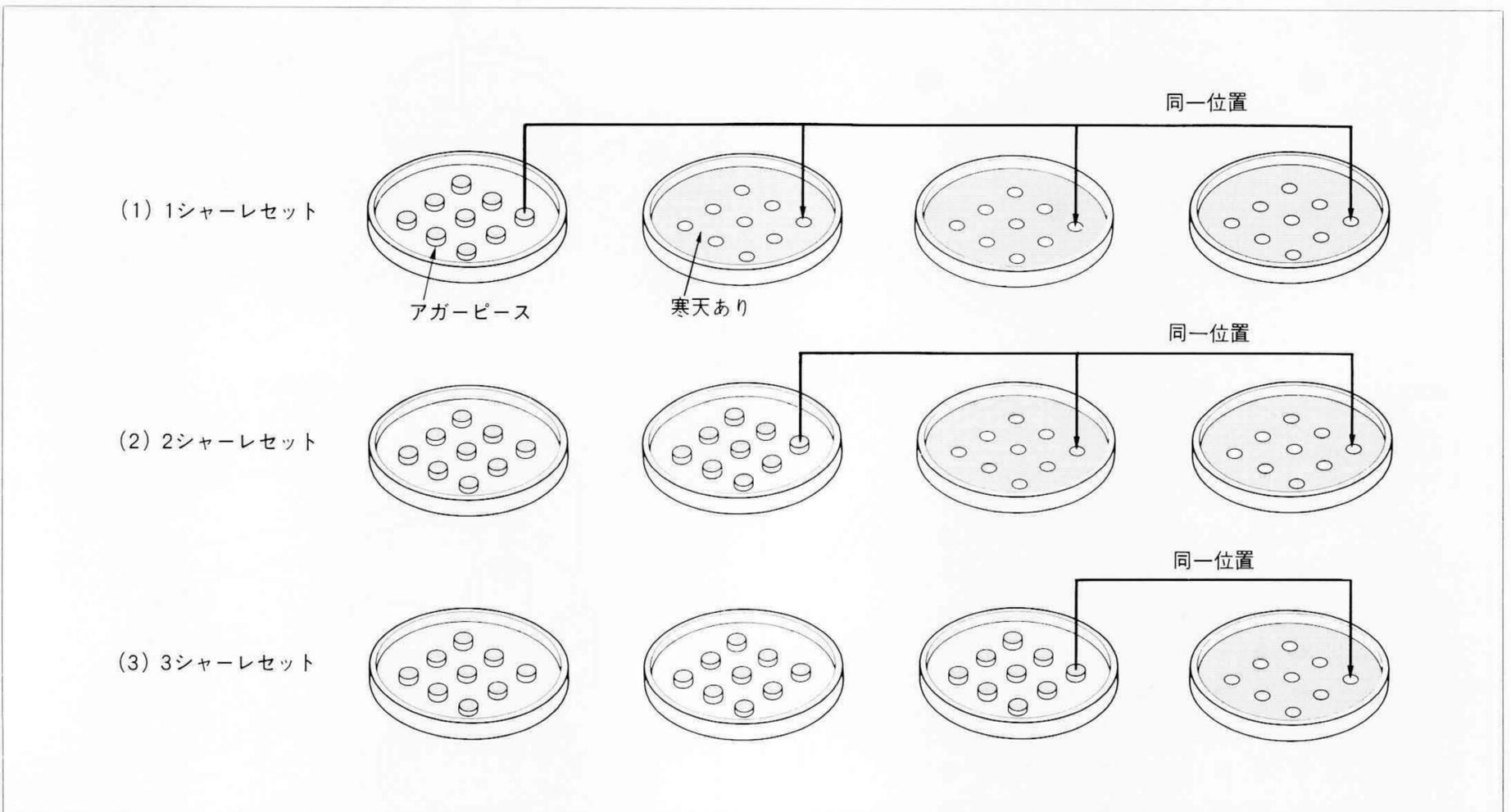


図9 アガーピースシャーレセットモード アガーピースはすべて位置認識する。アガーピースシャーレ以外は平板寒天培地である。

4.4 アガーピースシャーレセットモード

アガーピースシャーレの個数により、図9に示すように3モード化した。アガーピースへの移植は、自動認識したアガーピースの重心位置へ行うが、それに続く平板寒天培地上への移植は直前のアガーピース位置座標と同一位置へ行う。

5 移植速度と処理能力

実際の移植動作は各種モードの組合せとなり、移植速度、処理能力は図10に示すように、針の交換モード、シャーレ当たりの植付け数によって大きく左右される。

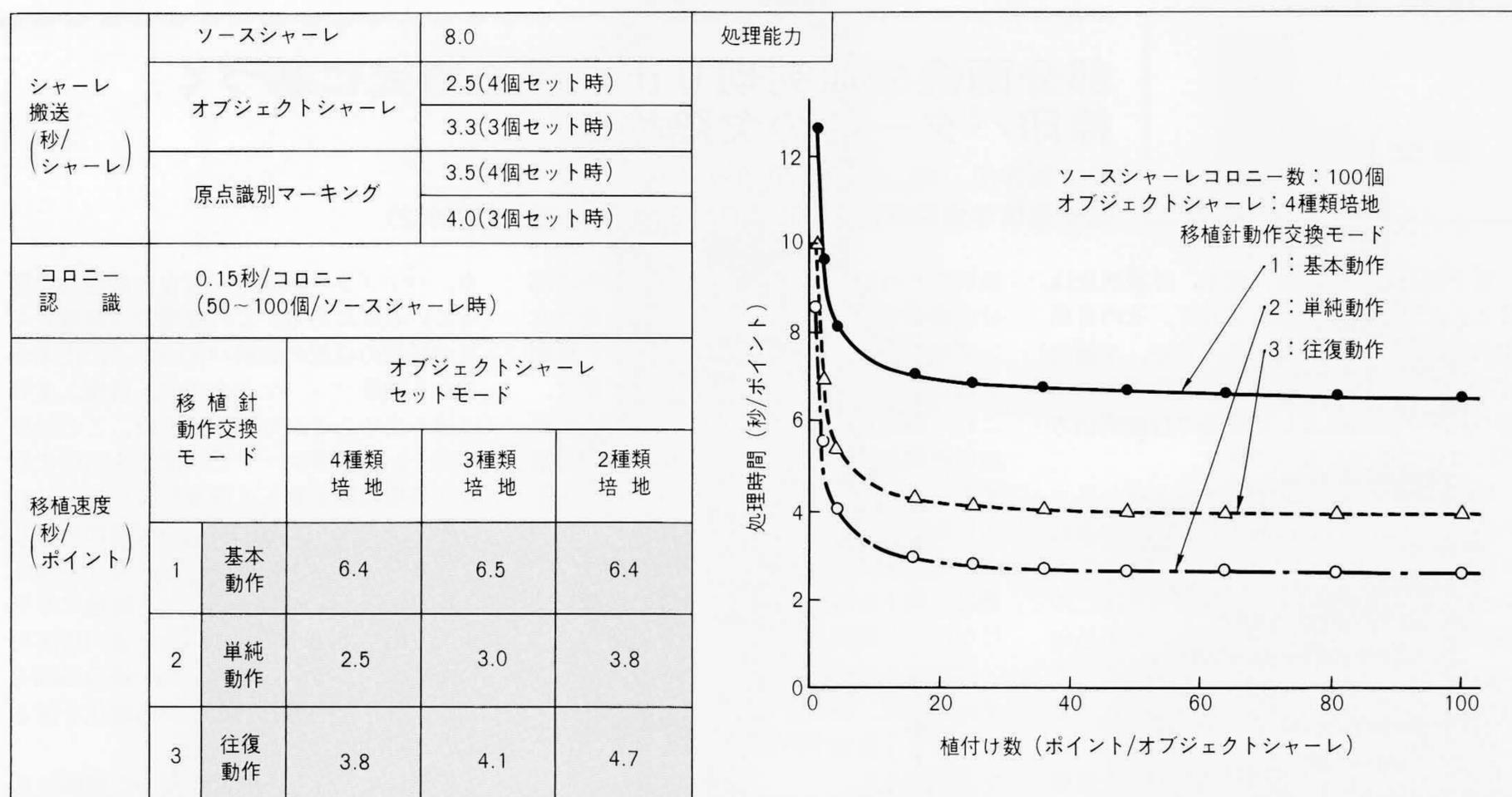


図10 移植速度と処理能力 処理能力は、シャーレ搬送、コロニー認識及び移植動作の時間を含んでいる。

6 無菌化対策

6.1 移植針の無菌化

使用する針は装置へセットする前に洗浄、滅菌処理が必要であるが、装置へセット後の滅菌対策として以下の二つの方法を採用した。

(1) 針ストック内での殺菌灯による滅菌

針ストック内では各針は磁力により反発し、適度な距離をおいて整列しているため、ストック上部に設けた殺菌灯で滅菌できる。

(2) 針供給ホルダでの加熱滅菌

針供給ホルダにヒータを埋設し温度制御することによって、移植作業に用いる直前の針先端部を、1本ずつ熱により加熱滅菌する。

6.2 装置内の無菌化

装置内はできるだけカバー化し、掃除を容易にするとともに、以下の二つの無菌化対策を行っている。

(1) 装置内上部殺菌灯による滅菌

装置の電源を切ると装置内の殺菌灯が点灯し、移植部の滅菌を行う。また、電源を入れると自動的に消灯し移植作業ができる。

(2) クリーンユニットによる無菌化

装置上部に設置されたクリーンユニットのフィルタを通り、無菌清浄化された空気の流れの中で移植が実施される。また、装置内部の菌類は、空気出口に設けられた回収用フィルタで回収され、外部への拡散を防止する。

7 結 言

微生物のスクリーニングには、研究者が微生物学的知識を背景に解析、分類を行う作業と、多種多数の膨大な量の繰返し作業が必要であるが、それぞれの作業に対応した自動化装置を開発し実用化した。現在、コロニーの解析情報は大きさ、形状、色調だけと少ないが、今後の解析情報の増加、認識技術及び解析技術の向上によって、より知的な作業の自動化が可能になるであろう。

バイオ技術産業の発展につれて、今後ますますスクリーニングのサンプル数は増大すると考えられることから、本装置の実用化は時宜を得たものであり、移植作業の自動化が研究開発期間の短縮に寄与することを期待したい。

終わりに、本装置の開発に当たり、微生物コロニーの生態分類について御指導をいただいた工業技術院・微生物工学技術研究所の前田英勝室長をはじめ関係各位に対して、厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 発酵工業協会・BIDEC：生物資源スクリーニング機械システム調査研究報告書，日本機械工業連合会（昭60）
- 2) 坂本：バイオテクノロジーは産業をどう変えるか，その現状と展望，産業能率大学出版部（昭57）
- 3) ジェラルド・K・オニール（牧野訳）：六つの超大技術市場，新潮社（昭60）



部分画像の並列切り出し照合方式に基づく 捺印パターンの欠陥検出

日立製作所 嶋 好博・柏岡誠治・他1名

電子通信学会論文誌 J69-D, 3, 417~426 (昭60-2)

電子部品の製造では、従来、外観検査はほとんど目視で行なわれており、その自動化が重要な課題となってきた。本論文は、集積回路などの電子部品での表面の捺印パターンを対象とした欠陥の自動検出方式について述べたものである。

対象とした電子部品、特に、トランジスタや集積回路では、部品の表面に捺印された文字記号が唯一の品種判定の糸口であり、したがって、この捺印パターンはこの部品のもつ品質の一部と言える。この捺印パターンの欠陥としては、文字の消え、文字の一部の欠け、汚れ、にじみ、薄れ、などがある。捺印パターンの外観を検査して、これらの欠陥を検出することは生産上重要な課題であり、そのため従来から肉眼による目視検査が行なわれていた。しかし、検査精度の平準化、コストなどの点から捺印パターンの外観検査の自動化が強く要望されている。

本論文では、まず初めに、これら捺印パターンでの欠陥の特徴を示す。また、文字

識別のために考案され、観測点で文字の部分が存在するかないかを検出する定点サンプリング法を、ストロークに沿った観測点位置で判定を行なうように改良し、更に、これら観測点を縦横に移動できるように振動の処理を加えた文字欠陥検出方式を提案する。この方法は、文字の部分が存在するかないかを検出するための幾つかの観測点の集団を、縦横の二方向に平行移動でき、更に、微小な汚れなどのノイズの影響を受けないよう観測点を中心とした局所パターンに対する判定処理を加えたもので、位置ずれがあり、かつさまざまな欠陥パターンを含むような文字の印字品質の検査に有効な方法である。

次に、本検査方法を実用的な時間で実現するため、画像処理を計算機と専用の回路を組み合わせて実現する欠陥検出装置を開発した。この専用の画像処理装置の構成と動作を述べる。この装置の特徴は、画像メモリに対する局所パターンの並列読み出し処理から照合演算処理までの一連の処理

を、パイプライン制御で行ない高速化を図っている点にある。この装置では画像メモリの任意の位置の局所パターンを、従来からある画像バッファを介さず、直接、並列に読み出すことができる。また、この局所パターンと辞書データとの照合を高速で行なう専用回路を新しく開発している。これらの工夫により、各文字の観測点に対応した辞書を読み出す処理、画像メモリの指定された位置から局所パターンを直接に並列で読み出す処理、画素の照合を並列に実行して結果を蓄積する処理、の一連の処理をパイプライン制御で行ない、高速化を図ることが可能となった。

最後に、試作した装置を用いた実験システムの構成を示し、実際に大量の電子部品の捺印パターンに対して、この実験システムによって外観検査の実験を行ない、実用的な検査時間と検査精度が達成できることを確認した。

Pb系ジョセフソン論理ゲートアレー集積化技術の検討

日立製作所 平野幹夫・矢野振一郎・他2名

電子通信学会論文誌 J69-C, 3, 245~256 (昭61-3)

ジョセフソンデバイスは、極低温の超電導トンネル現象を応用した素子であり、高速のスイッチング動作と低消費電力を兼ね備えた性能をもっていることから、将来の超高速計算機用の要素素子に適するものと期待されている。それには高速化、高集積化技術の開発が必要である。Pb合金系材料を超電導電極に用いたジョセフソンデバイス作製技術の開発は、J.H.Greinerらによって精力的に進められ、素子化技術の基礎になっている。しかし、各種の集積回路が作られるに従い、集積化プロセスに関する課題も多いことが明らかになった。

本論文は、ジョセフソンデバイスの高集積化プロセス技術を開発する目的で、Pb合金を用いた576ゲートのMSI規模に集積化したJGA(ジョセフソン論理ゲートアレー)チップを試作し、プロセス技術の問題点の抽出とその改善について述べた。

試作したPb合金系JGAチップは、四つのOR回路、二つのAND回路の基本ゲートセル

で構成し、5mm平方内に96個配置している。接合の寸法は $\phi 3.5\mu\text{m}$ 、配線は最小線幅 $2.5\mu\text{m}$ の2層配線である。

まず、各種部品のパターン形成プロセスについて検討した。ここでは、パターン寸法の一様性について調べ、配線パターンではウェーハ内で最大偏差 $\pm 0.2\mu\text{m}$ 以内が得られることを確認した。一方、接合形成用SiO窓パターンの形成では、残渣のため接合面積が変動し、接合電流のばらつきの主な原因になっていることを突き止めた。残渣を防ぐ方法として、基板冷却法及び基板遊星回転法を検討し、面積のそろったSiO窓が形成できることを示した。

電極膜形成プロセスの検討では、上部電極膜の腐食及びはがれ不良が発生したが、上部電極保護膜であるSiOの被覆性を改善することで対策を立てた。

論理素子を構成するために多数個のPb-In-Au/oxide/Pb-Bi接合を形成した結果、デバイスの $\frac{1}{2}$ で接合のショート不良が発生

した。下部電極膜には脹れが、上部電極膜にはボイドが各々発生していた。この不良は、上部電極膜中のBiが接合を破壊して下部電極膜中にマイグレーションするために生ずることが明らかになった。低温($\sim 0^\circ\text{C}$)成膜したPb-In-Au膜を下部電極に、またPb-Au膜を上部電極に使用することで接合のショートを皆無にできた。接合電流のばらつきは $\pm 10\%$ が得られ、従来の接合のそれに比べ $\frac{1}{2}$ に低減できた。

以上の改良を行ないJGAを試作した。その結果、外観目視検査による良品チップの取得歩留まりは10~30%であった。JGAチップに搭載した各種ゲート鎖状回路の信号伝搬遅延時間を測定した結果、2入力ORゲートで33ps、2入力ANDゲートで54psが得られ、JGAの高速性及びシステムとしての機能性を実証できた。

本研究は、通商産業省工業技術院の大型プロジェクト「科学技術用高速計算システムの研究開発」の一環として行なわれた。