

# マイコンを用いたバクテリアの発育速度の 自動処理システム

佐藤和雅\*・三池秀敏\*\*\*・橋本 基\*\*・蛭名良雄\*\*\*・宮地隆興\*\*\*\*

## A Microcomputer System Analyzing the Time Dependent Growth Speed of Bacterial Culture

Kazumasa SATO, Hidetoshi MIKE, Hajime HASHIMOTO,  
Yoshio EBINA and Takaoki MIYAJI

### Abstract

To study the parameters characterizing the bacterial species, a microcomputer system is made up by using the microprocessor TK80 kit (8K RAM), an A/D converter, the digital memory (DM 305), an oscilloscope and some recorders. The growth of *E. coli* and *Staph. epidermidis* is examined on the real time in their log-phase. The estimated growth speed shows the time dependent fluctuation around its averaged values. The power spectrum of the growth speed is also calculated on the real time by the use of the wellknown Fast Fourier Transformation program. The growth speed and its Fourier spectrum illustrate the different behaviors between the examined bacterial species, and seem to be good parameters identifying the bacterial species.

### §1. はじめに

臨床細菌検査における主な目的は、被検体中の菌種の同定、及びそれらの菌数の見積りである。現在、病院などで行っている細菌検査では、多くの労力と時間を要している。近年、細菌検査時間の短縮化及び自動化に関する研究がさかんに行われ、多くの報告がなされてきた。この中で培養液の濁度の変化量を求める方法は、菌数を反映する<sup>1)2)</sup>再現性のある便利な方法として広く利用され、一部では医療機器（アボットMS-2など）として利用されている。しかし、それらの機器は高価であり、特に細菌の同定にはコストほどの威力を発揮していない。菌培養などの臨床的観点からの基礎的な研究はあまり多くないことによるものと思

われる。我々は臨床的な面から、菌種の同定及び、その数を求めるより安価な装置開発を目ざし、基礎的な研究を行っている。

本報告では、菌培養液の濁度変化から対数増殖期での速度パラメータをマイコンを用いる事により、オンラインで解析する方法及びその結果について述べる。発光ダイオードとCdS-Cellよりなる簡単な濁度測定装置<sup>3)</sup>からの出力電圧をA/D変換器を通してマイコン(TK-80)に取り込む。このデータからその対数値、発育速度、及びその時間変化のフーリエ解析等をマイコンでオンラインで処理し、シンクロスコープ上に表示する装置を開発した。これらの処理結果から種々の量の時間変化、また、平均的世代交替時間も定まる。本報告では、従来着目されていなかった発育速度の時間的揺らぎに留意し、そのパワースペクトル解析も行なっている。培養液にブレイン・ハート・インフュージョン(BHI)を用いて、大腸菌(*E. coli*)と表皮ブドウ球菌(*St. ep.*)で実験を行ない、これらの処理デ

\* 電気工学科研究生

\*\* 大学院電気工学専攻

\*\*\* 電気工学科

\*\*\*\* 本学医学部付属病院

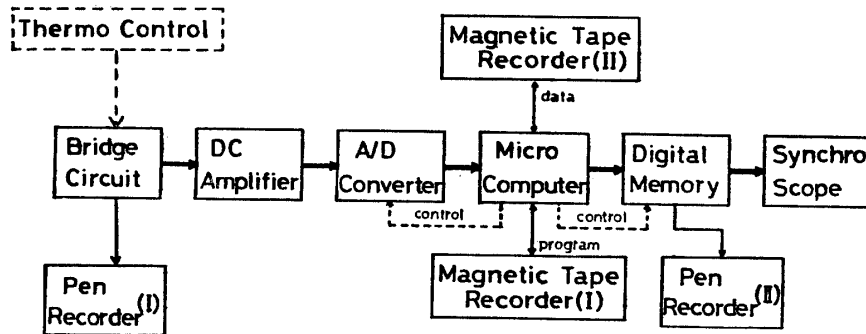


Fig. 1 Block diagram of microcomputer system.

ータの比較により菌種の同定が可能であることが示された。

## §2. マイコン処理システム

### 2.1 メインシステム

データ処理システムのブロック図を Fig.1 に示す。各ブロックの相互関係を矢印で示した。このシステムの中央の太い矢印の流れが、マイコン導入によるオンライン処理システムの主な部分である。

この矢印の順に各装置、機器の働きを説明する。ブリッジのブロックはすでに前報<sup>4)</sup>で詳しく報告した。すなわちこの部分で Cell の濁度はアナログの電気信号(電圧)に変わり、菌数変化に比例する電圧が出力される。Cell を含めたブリッジ回路は、温度変動をさける為、温度コントロール回路で  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  で一定温度に保たれている。ブリッジからの出力電圧は2つに分け、一つは各時間毎のモニタ用に用い、もう一方は直流増幅器により増幅し、A/D 変換器 ( $\mu\text{AD}-08$ ) に入力しアナログ量をデジタル量に変換する。このデジタル量をマイコンに一定の間隔でサンプリングして入力する為、マイコンからパルス信号を送り A/D 変換器を制御している。この入力データをマイコンで処理し、マイコン自体に格納するとともに、デジメモ (DM 305) に記憶させる。デジメモはデータ表示用のインターフェースとして用いており、各処理データは D/A 変換して、シンクロスコープ上に描かせる事が出来るし、必要な場合はペンレコーダのチャート紙上に記録出来る。現在、手持ちの適当な出力インターフェースがない為このような一見むだな使い方をしている。このオンラインシステムにより、処理データが随時モニタできる。

### 2.2 サブシステム

ブリッジ回路からの一方の出力はペンレコーダ I で随時記録し、菌数増加の様子をモニタしている。また

マイコンで処理したデータは、磁気テープ (Mag. Tap. Rec. II) に記録出来るようになっている。必要な時にそのデータを再生しマイコンにロードし、再処理、解析などが出来る。又、磁気テープには、処理プログラムを記録してある。

## §3. マイコン処理方法

### 3.1 データ取り込み区間

細菌の発育は Fig. 2 のように変化する<sup>5)</sup>が、ここで解析に用いたデータは次の理由から対数増殖期 (log phase) から採った。菌数同定パラメータの一つとして、細菌の発育速度が考えられる。この値がほぼ一定値をとるのはこの時期であるし、菌の活動が活発となり、菌独自の特性が外に表われ易いと考えられるからである。実際、後で示すように、濁度が平均値のまわりに揺らぎ、そこから算出した等価的な発育速度が菌種に特有の揺らぎを示していることが解る。従って、この時期は菌種判別の有用な情報を含んでいるものと

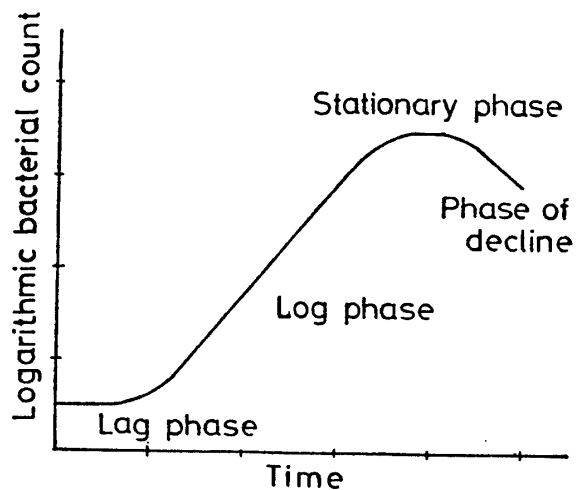


Fig. 2 Growth curve of bacterial culture.

考えられる。

### 3.2 菌数変化処理

Fig. 3 に各時間で菌数変化, その対数値及びその傾きから算出した等価的な発育速度をマイコン処理で算出する為のプログラムのフローチャートを示す。マイコンをスタートさせます初期値などの設定を行なう。ここで Mode (モード) 設定<sup>6)</sup>とはマイコンが外部の装置とやりとりするための入出力ポートの設定である。ここで用いた TK80 では A/D 変換器よりマイコンに取り込む為の入力ポート, 処理結果をデジメモに送り込む為の出力ポート, 又それを制御する為の出力ポートを指定する。k はマイコン入力処理データ数で k=512 (約7時間) となったらマイコンをストップさせる。入力データ  $x_i$  の 10 個毎の和の平均値  $x_k$  をマイコン処理入力データとするため, i はそのカウント数 (1~10) を示すものである。次にマイコンにより A/D 変換器を制御しながら入力データ  $x_i$  を 5 秒間隔で取り込みこれらの 10 個の和  $X_k$  を求めてから  $x_i$  の平均値  $x_k$  を算出し順次, 菌数の対数値  $y_k$ , 発育速度  $\alpha_k$  を算出してデジメモにそれらを出している。  $X_k = \sum_{i=1}^{10} x_i / 10$  としたのは濁度の揺らぎから見かけ上の菌数変動  $x_i$  を少なくする為の処置である。

$x_k$  の対数  $y_k = \log x_k$  の刻々の変化は,  $y_k$  の時間変化分から等価的な発育速度  $\alpha_k$  がわかる。発育速度  $\alpha_k$  の算出の原理を簡単に説明する。発育速度  $\alpha$  は

$$\alpha = (\log n_2 - \log n_1) / (t_2 - t_1) \cdot \log 2 \quad (1)$$

で与えられる。ここで  $(t_1, t_2)$  は対数増殖期における 2 時点で  $(n_1, n_2)$  はそれらの時点での菌数である。いま 2 時点  $(t_1, t_2)$  における  $x_k$  の値を  $(x_1, x_2)$ , その対数値を  $(y_1, y_2)$  とすると菌数  $(n_1, n_2)$  は  $(x_1, x_2)$  に比例していると考えられるので, これらの比例定数 A をとれば

$$n_1 = Ax_1, \quad n_2 = Ax_2 \quad (2)$$

となり, (1) 式に (2) 式を代入することにより

$$\alpha = (\log x_2 - \log x_1) / (t_2 - t_1) \cdot \log 2 \quad (3)$$

したがって (3) 式は

$$\alpha = (y_2 - y_1) / (t_2 - t_1) \cdot \log 2 \quad (4)$$

で導かれる。処理入力データ間隔を T (秒) とすれば, 時刻  $t_k$  での発育速度  $\alpha_k$  は

$$\alpha_k = (y_{k+n} - y_k) / nT \cdot \log 2 \quad (5)$$

で与えられる。このプログラムでは処理入力データを 50 秒に 1 回の処理をしているので  $t_2 - t_1 = 1/12$  (300 秒) とすれば, (5) 式から

$$\alpha_k = 12(y_{k+6} - y_k) / \log 2 \quad (6)$$

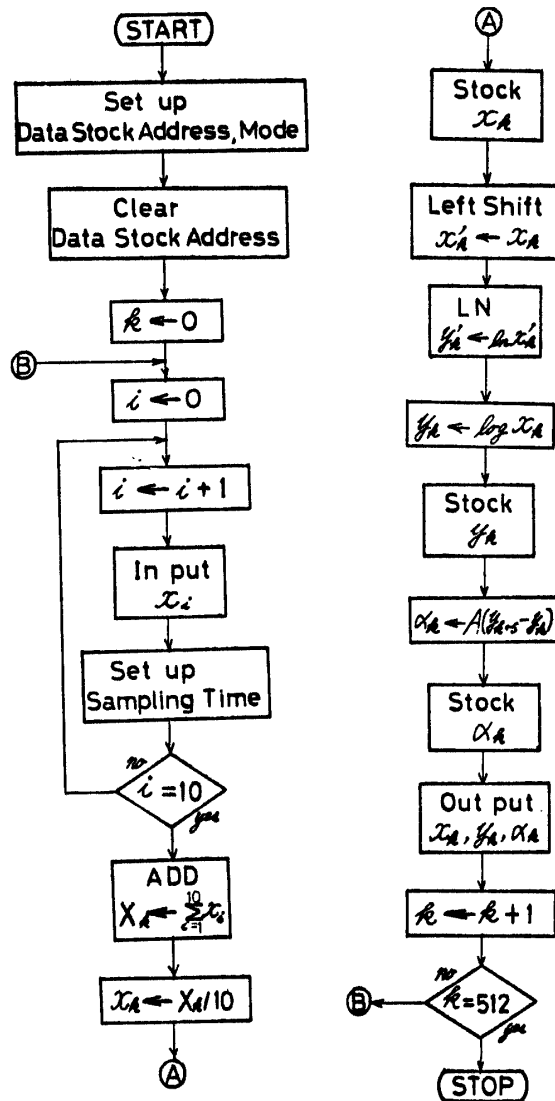


Fig. 3 Flow chart for the calculation of  $x_k, y_k$  and  $\alpha_k$ .

となる。したがって, (6) 式により発育速度を求めることができ, 各時刻  $t_k$  での  $\alpha_k$  がモニタできる。

### 3.3 揺らぎに対する処理

マイコンによる対数増殖期のある区間における発育速度の時間変化及びその変化を高速フーリエ変換 (FFT)<sup>7)</sup> し, そのパワースペクトル (PSFFT) を求めるプログラムのフローチャートを Fig.4 に示す。

これは, 特に  $\alpha_i$  の揺らぎに注目し, 菌種の判別を試みる方法である。マイコン入力データ  $x$  が菌の対数増殖期である 3 (V) になってから, 10 秒間隔で取り込み, 2 分ごとに  $\alpha$  を算出している。この 128 個の  $\alpha$  を FFT 処理させ, そのパワースペクトルを求める。この直流分は平均的发育速度を与える。パワースペク

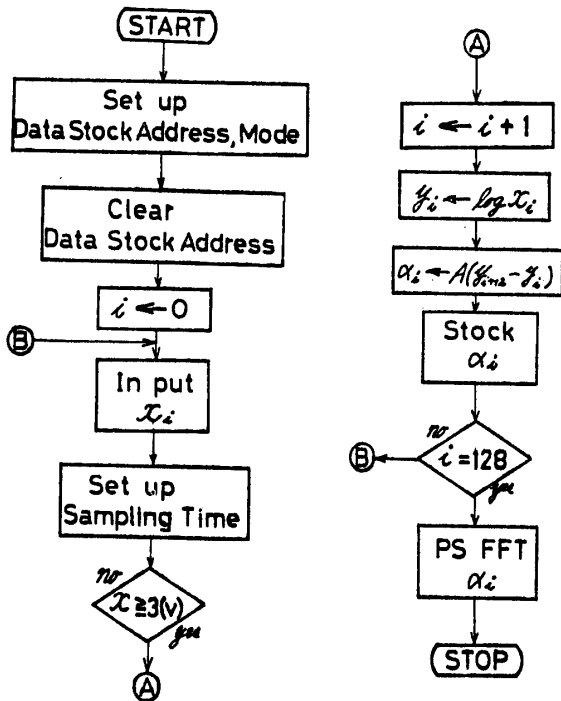


Fig. 4 Flow chart for the calculation of power spectrum with fast Fourier transform of  $\alpha$ .

トルのパターンが菌種の違いを反映するものかどうか現在検討中である。この解析結果もシンクロスコープ上に表示できる。

3.4 世代交替時間

マイコンによる対数増殖期のある区間における世代交替時間を求めるプログラムのフローチャートをFig.

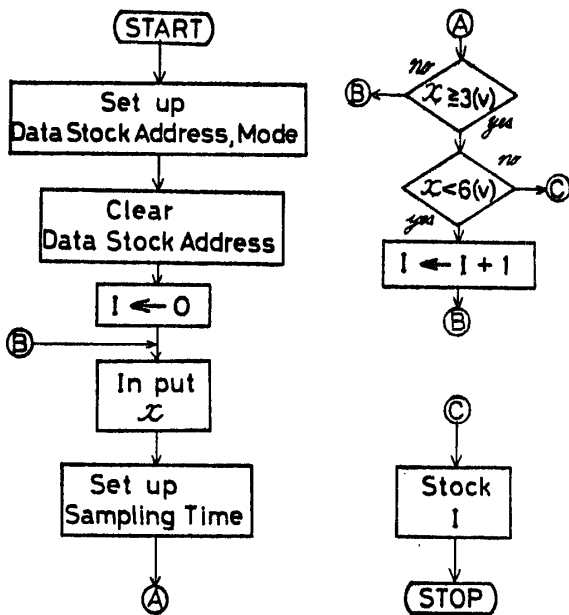


Fig. 5 Flow chart for the calculation of generation time.

5 に示す。世代交替時間とは菌数が2倍になるのにかかる時間であるので、ここではマイコン入力データ  $x$  が2倍になるのにかかる時間を求めることにした。ここでは入力電圧が3V から6V になるまでにかかる時間より求めている。 $x$  を一定間隔でとりこみ3~6(V) の範囲内にあるかどうかをマイコンで逐次比較し判断させる。 $x$  がこの範囲であれば  $I$  を1増す。これによりカウント数  $I$  を求めれば世代交替時間が求まる。入力取り込みのサンプリング時間を  $T$  (時間) とすれば、世代交替時間  $(1/\alpha) = T \times I$  となる。

このプログラムでの入力データ間隔は5秒としている。このカウント数はマイコンのある番地に格納しているのでマイコンからこの番地の内容を読み出して世代交替時間を求めている。世代交替時間は菌種判別の重要なパラメータの一つと考えられるが、簡単な処理で求められるのがこの方法の利点である。

§4. マイコンによる処理結果

4.1 濁度から菌数、発育速度等の見積り

ブリッジ回路からの出力を8ビット A/D 変換器を通してマイコンにとり込み、時間を横軸にして Fig.6, Fig.7 に示した。Fig. 6, Fig. 7 は培養液 BHI 中での大腸菌、表皮ブドウ球菌に対する量を表わしている。図で時間0 とおいてあるのは、菌を接種してブリッジをバランスさせて数十分間放置し、出力が出はじめたスタートの時間を意味する。この時間はほぼ対数増殖開始時間に相当している。図から大腸菌、表皮ブドウ球菌の発育速度が異なることがわかる。

(1) 菌数の変化

出力電圧の大きさの割合は(2)式から、菌数に比例しているのので、ある出力電圧の時点での菌数を決めると Fig.6a, 7a の縦軸は菌数を表わすことになる。出10V 力のとときの菌数は、そのときの濁度装置出力電圧を逆算することにより、 $10^8$  個ぐらいであることがわかる<sup>4)</sup>。このグラフでは  $10^8$  個とし、電圧に対応させた。これから、大腸菌では約3時間で菌数が  $10^8$  個になっているのに対し、表皮ブドウ球菌では約6時間もかかっていることがわかる。これは、大腸菌の方が表皮ブドウ球菌より増殖が盛んであるためである。各時刻での菌数がモニタ出来る事により、大腸菌と表皮ブドウ球菌の判別はこのグラフからは、対数増殖を始めてから3時間以内に出来る。今迄に実験した結果のグラフからもこれと同様なことが言える。

(2) 菌数の対数値変化

対数増殖期では、菌数は指数関数的に変化する。菌

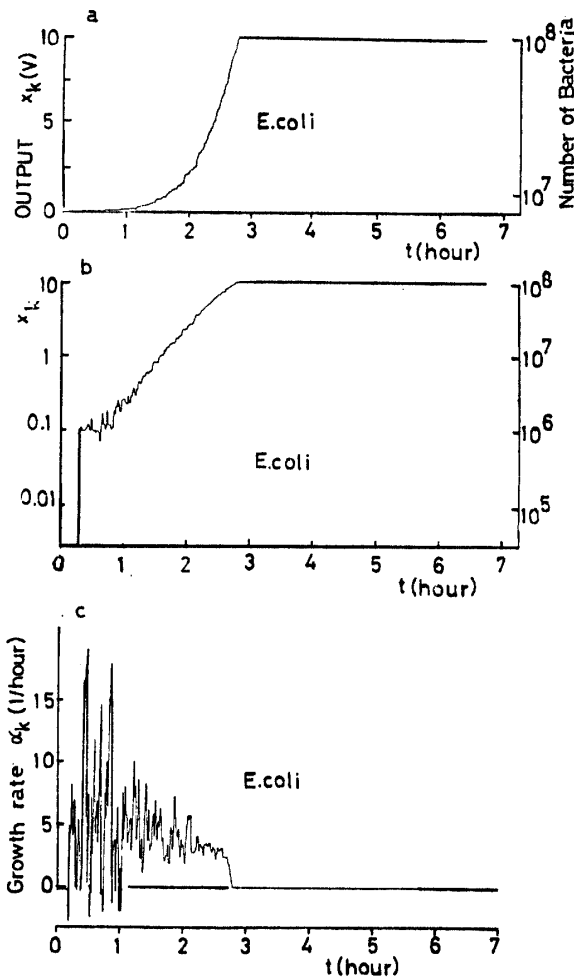


Fig. 6 Results of analysis in E. coli.

- a) output voltage  $x_k$ ,  $x_k$  is proportional to the number of bacteria.  
 b) log-plot of  $x_k$ .  
 c) growth rate  $\alpha_k$ .

数を対数目盛上に時間の関数として Fig.6b, Fig.7b に示した。両者は直線的に示されるので、時間  $t=0$  の時の縦軸との交点から接種菌数も求まる。又、この直線の傾きが増殖の速さを表わしている。この傾きから (1) と同様に、大腸菌の方が増殖の速さが大きいことがわかる。ここに載せない実験結果からの処理でも、同様であった。もし接種菌種が一つであることがわかっていると、これにより大腸菌と表皮ブドウ球菌の判別は出来る。

### (3) 発育速度変化

Fig.6b, Fig.7b では、平均的な直線の傾きを問題にした。しかし、細かくみるとその値は多少変動している。そこで、ここでは、この対数値の各時間における微分値、すなわち、夫々の時間における (6) 式から求めた発育速度  $\alpha_k$  を表わしたのが Fig.6c, Fig.7c で

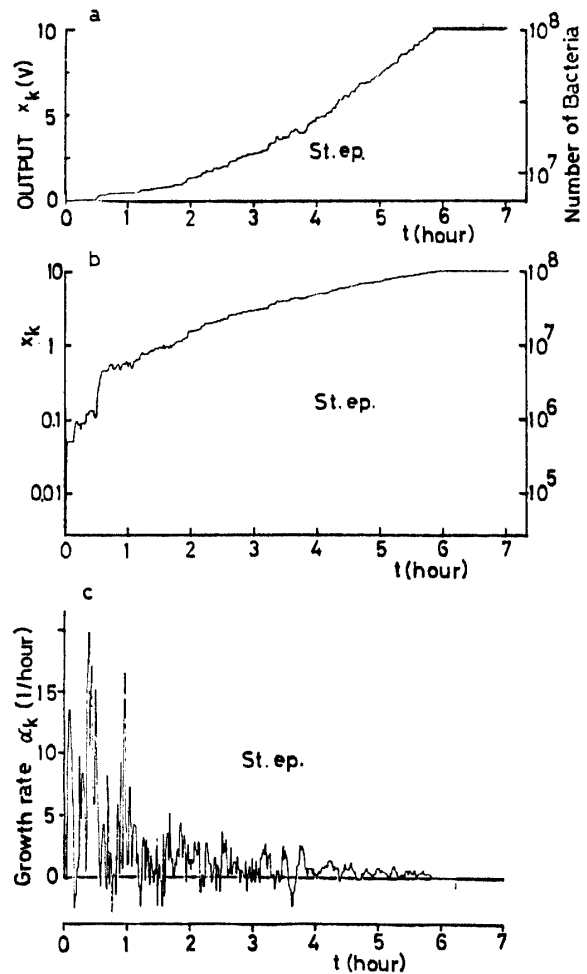


Fig. 7 Results of analysis in St. ep..

- a) output voltage  $x_k$ ,  $x_k$  is proportional to the number of bacteria.  
 b) log-plot of  $x_k$ .  
 c) growth rate  $\alpha_k$ .

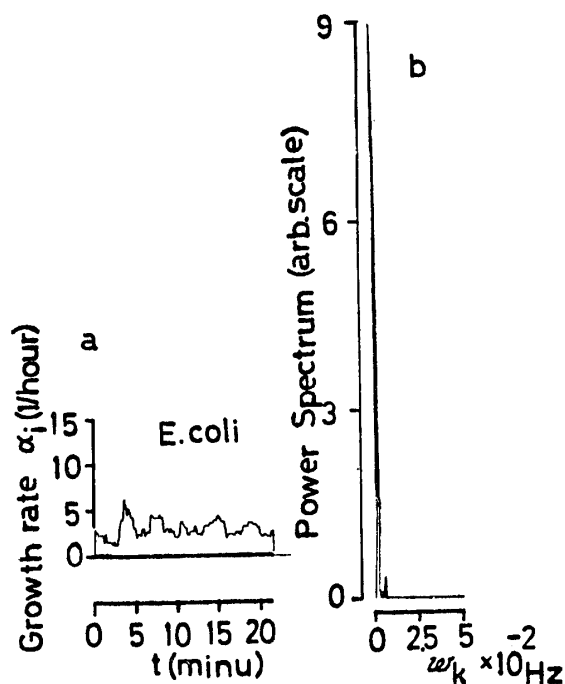
ある。縦軸は、全部一様に対数増殖をしていると仮定したときの発育速度を表わす。図から  $\alpha_k$  は成長中でも、揺らいでいることがわかる。

Fig.6c, Fig.7c を比較すれば、図の曲線からわかるように表皮ブドウ球菌の方が大腸菌よりも揺らぎが大きい。

### 4.2 発育速度の揺らぎのパワー・スペクトル解析

前節では、菌種によって発育速度変動が大きく違っている事をみた。この変動が菌種に特徴的なものであるか否かをみる為にここでは発育速度のフーリエ変換をし、そのパワースペクトルを調べる。

Fig.8a, Fig.9a は入力電圧が 3(V) になってから 10 秒の間隔ごとのデータ 128 個をもとにして、発育速度を表わす (5) 式より求めたものである。これらのグラ

Fig. 8 Fluctuation analysis in *E. coli*.

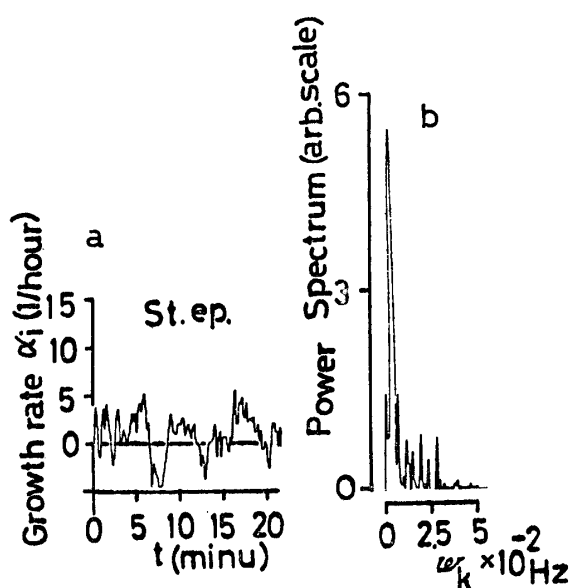
- a) growth rate  $\alpha_i$ .  
b) power spectrum of  $\alpha_i$ .

から発育速度の平均値に対する変動は、大腸菌で最大100%ぐらいであるが、表皮ブドウ球菌では、あまりにも変動しているので、このグラフからは、その平均値が求められないが、大腸菌の数倍以上あるとみられる。これらのパターンが細菌の種類に特徴的なものかをみるためフーリエ変換して、そのパワースペクトルを求めてみた。

Fig.8b, Fig.9b に発育速度変動のパワースペクトルを解析した結果を示す。横軸は周波数で64成分求めている。これから直流成分を比較すれば、明らかに大腸菌と表皮ブドウ球菌の区別ができることを示している。揺らぎに対する交流成分は、両者で大きな違いがある。しかし、現在の所パワースペクトルパターンが菌種によってどのような特徴をもっているか、定量的な判定はできない。今後同種の実験をつみかさねる必要がある。

## §5. 結 論

今まで述べたマイコンシステムにより、どの処理結果も、大腸菌、表皮ブドウ球菌で違いがあることがわかり、菌種がわかっているとほぼ両者は区別可能であることが示された。それぞれの処理方法から、培養液中のある時刻の細菌の活動が、より詳しくわかる。菌数変化だけの処理では、細菌の増殖状態が良くわから

Fig. 9 Fluctuation analysis in *St. ep.*

- a) growth rate  $\alpha_i$ .  
b) power spectrum of  $\alpha_i$ .

ないが、菌数の対数値をとることにより明白になった。発育速度の処理では、揺らぎに対する変動がよくわかるが、パワースペクトル解析からさらに、それが明白になった。

以上のような点からも、多くの目的をもつマイコンによるオンラインシステム開発の一つであったと言える。ここで開発したシステムは、菌種の同定の点からみるとまだ不完全である。今後解決されるべき問題がいくつかある。特に入力インターフェースでは、A/D変換器が8ビットであるので、入力データがあらすぎる。現在、多いビット数のものにする計画である。

## 謝辞

実験にあたっての熱心な助力に対し、谷戸宗吉技官並びに、国永政之、百田正広君に謝意を表す。

## 参 考 文 献

- 1) A.L. Kocch; *Eicchim Eicphys Acta*, 51, 429(1961)
- 2) K. Shmizu, A. Ishimaru: *Applications of Optics in Medicine and Biology* 89, 22(1976)
- 3) 三池秀敏, 橋本基, 蛭名良雄, 宮地隆興: 山口地区情報科学研究会10周年記念特集号
- 4) 橋本基, 三池秀敏, 蛭名良雄, 宮地隆興: 電子通信学会医用電子生体工学研究会 78-14, 61 (1978)
- 5) 戸田忠雄, 武谷健二: 戸田新細菌学, 南山堂 (1977) p. 35
- 6)  $\mu$ CCM-80 トレーニング・キット TK-80 ユーザース・マニュアル p.119
- 7) インターフェース, CQ出版社, No.18 (1978) p.41

(昭和53年10月14日受理)