

## 細菌の電氣的・光学的同時測定による自動検査法 (第2報)

橋本 基\*・三池秀敏\*・蛭名良雄\*・常岡英弘\*\*・宮地隆興\*\*

### A Method Detecting Bacteria in Culture Medium by Simultaneous Measurement of Electrical Impedance and Turbidity

Hajime HASHIMOTO, Hidetoshi MIIKE, Yoshio EBINA,  
Hidehiro TSUNEOKA and Takaoki MIYAJI

#### Abstract

An identification method is proposed for some bacteria by utilizing the parameters obtained from the simultaneous measurement of electrical impedance and turbidity. The examined bacteria are *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus morgani* and *Streptococcus faecalis* which are clinically isolated and identified by our group. The culture broth is Brain Heart Infusion (BHI). Much effort has been paid on making suitable cell. From the view of sterilization and repeatedly use, the cells are made by glass. The turbidity is measured by pair of CdS-LED (red) elements. The impedance is measured by means of previously proposed four-electrode method. The electrodes are gold and stainless-steel wires (0.7mm $\phi$ ) which are verified to give no difference in measuring impedance. The recorded impedance decrease is good in its reproducibility comparing it to that of two-electrode method. The rate of the change of these two quantities are computed from the recorded data yielding reproducible curves against time (denoted as "rate pattern"). The rate patterns for impedance and turbidity give inherent ones for examined 6 bacteria. Some numerical values, peak value, half width, and so on, of rate patterns are measured from the curves. Some ratios and absolute values of parameters are selected as trial characteristic parameters. Bacteria are classified by each characteristic parameters. 5 characteristic parameters are needed for identifying 6 bacteria. The rate patterns seem to be useful in screening or identification of clinical bacteria.

#### 1. まえがき

臨床検査における細菌検査は、他の検査分野と比べて多くの入手と時間を要する。そのためこの分野でも、近年特に検査の自動化、省力化が望まれるようになり、多くの方法が提案され開発が進められるようになってきた。一方では培地試薬のディスク化や、組合わせ培地の開発等<sup>1)</sup>が進められている。これらは現在行なわれている方法の簡易化を目的としたものである。しかし結果を得るには現行の方法と同程度の時間を要し、検査時間の短縮という面からは大きな期待はできない。また、一方では自動化、迅速化を目的とした新しい物理的、化学的手法を用いた検査法の開発がある。その中には電氣的な方法<sup>2~11)</sup>、光学的な方法<sup>12~15)</sup>、電気化

学的方法<sup>16)</sup>、放射性物質を用いた方法<sup>17)</sup>等がある。

我々は第2の方向の1つとして、それぞれ異なった情報を与えると考えられる細菌培養液の電気インピーダンスと濁度を同時に測定する方法を提案した<sup>8~11)</sup>。第1報では *Escherichia coli* を対象として、同時測定の基礎実験の結果を報告した<sup>8)</sup>。しかし、光学的な濁度測定に比較して、電気インピーダンス測定の安定性に問題が残っていた。これは電極表面効果の影響と考えられ、この効果を除くために、インピーダンス測定に4電極法を採用した<sup>10)</sup>。典型的な2種の菌 *Escherichia coli* と *Staphylococcus epidermidis* での実験結果から菌種の特徴を示すパラメータとして、発育速度 ( $\alpha$ )、等価代謝時間 (T) を求めた。その後さらに菌種を増して実験を重ねてゆくと、対数増殖期の短い菌種もあり、これらのパラメータの値を求めにくい例も多かった。

\* 電気工学科

\*\* 本学医学部付属病院

今回は細菌培養セル，測定装置に改良を加え，6種類の細菌について濁度，インピーダンス同時測定を行なった。また菌種判別を目的として，得られた発育曲線及びそれらから求められた時間微分（差分）パターンについて比較検討した。その結果，時間微分パターンはそれぞれ菌種に特有のパターンを示し，このパターンから適当な特徴パラメータを抽出することによって，少なくとも6種類の細菌について定量的な菌種判別が可能であることがわかった。

2. 実験装置

装置は文献(10)とほとんど同じであるが，細菌培養セル及び濁度測定法に改良を加えたので，改めてここで述べる。

細菌培養セルは Fig.1 に示すようなガラスセルを用

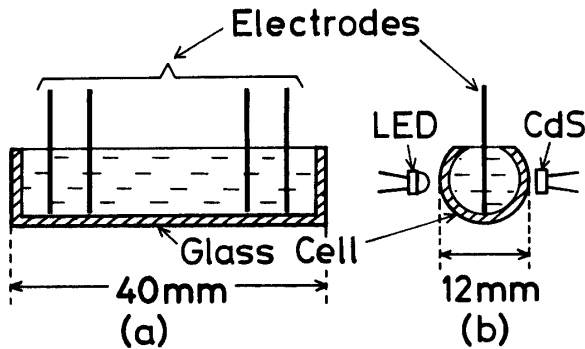


Fig.1 Section diagram of Culture-Cell.

(a) longitudinal section.

(b) cross section.

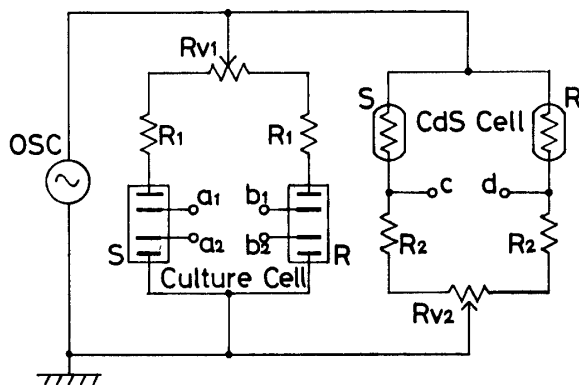


Fig.2 Bridge circuit measuring the change of electrical impedance and turbidity. Symbol S or R of Culture-Cell and CdS Cell represents the sample or reference cell respectively.

$R_1$  : 150K $\Omega$  resistor.

$R_{V1}$  : 100K $\Omega$  variable resistor.

$R_2$  : 100 $\Omega$  resistor.

$R_{V2}$  : 200 $\Omega$  variable resistor.

OSC : 1KHz sinusoidal voltage source.

いた。また4電極法でインピーダンスを測定するために，電極を4本取り付け付けた。電極材料として金又はステンレススチール線(0.7mm $\phi$ )を用いた。濁度は発光ダイオード(LED)を光源とし，CdS-セルで透過光を検出することによって測定した。また冷却素子を用いた温度制御装置で長時間にわたって培養セルの温度を37 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$ Cに保った。さらにこの温度変動や液の蒸発等の影響を除くために，Fig.2に示すように培養セル(Culture-Cell)，CdS-セル(CdS-Cell)でブリッジ回路を構成し，差動形とした。培養セル及びCdS-セルの一方は細菌を接種するサンプル(S)セルで，他方は培地のみの参照(R)セルとする。ブリッジ回路の電源(OSC)には1KHzの正弦波を用いた。ここで培養セル中の液のインピーダンスは500 $\Omega$ 程度で，ブリッジをバランスさせた時にこれと直列に接続される抵抗 $R_1$ (150K $\Omega$ ) +  $\frac{1}{2}R_{V1}$ (50K $\Omega$ )に比べて十分小さく，培養液には定電流が流れているとみなせる。(約50 $\mu$ Armsの電流を流している)従って $a_1$ - $a_2$ 間又は $b_1$ - $b_2$ 間の電位差は，この間の液のインピーダンスに比例する。また，CdS-セルの抵抗は約8K $\Omega$ でCdS-セルと直列に接続されている抵抗 $R_2$ (100 $\Omega$ ) +  $\frac{1}{2}R_{V2}$ (100 $\Omega$ )に比べて十分大きく，CdS-セルには定電圧が加えられているとみなせる。従って， $c$ 又は $d$ の電圧はCdS-セルを流れる電流に比例し，CdS-セルの入射光強度の変化が小さいときは，入射光強度に比例した電圧が得られる。

検出回路のブロック図を Fig.3 に示す。インピーダンス検出部では入力段が特に高入力インピーダンスであることが必要である。このため EFT OP-AMP (LF-356)を用いた DC 結合差動アンプをプリアンプとして設けた。入力インピーダンスはおよそ10 $^8\Omega$ 程度である。その他の部分はインピーダンス検出部(a)，濁度検出部(b)共に同一の回路で構成した。出力はイ

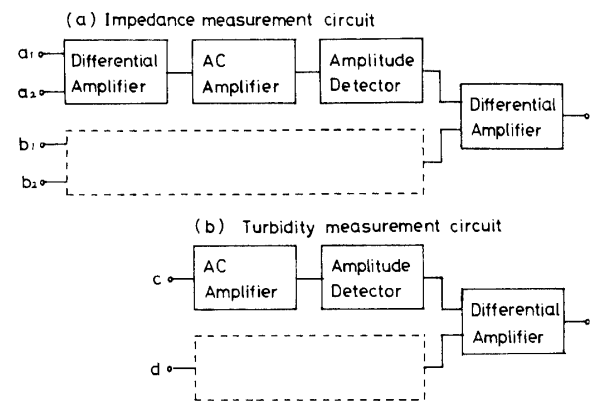


Fig.3 Blockdiagram of measuring electrical circuit.

(a) Impedance measurement circuit.

(b) Turbidity measurement circuit.

ンピーダンス及び濁度の変化分として、ペンレコーダに記録される。入力側の記号  $a_1, a_2, b_1, b_2, c, d$  は Fig. 2 の同じ記号の端子と接続することを意味する、

### 3. 試料及び実験方法

細菌は臨床検査で対象となることの多い *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus morganii*, *Streptococcus faecalis* (本学医学部細菌検査室で患者から採取し、検査、同定した細菌) の6種類を用いた。

培養液は一般細菌増殖用として市販されている Brain Heart Infusion (以下 BHI) を使用した。

接種する細菌は、初期条件を整えるために BHI で一夜培養したものをを用い、2mmφ の白金耳で接種する (約  $10^5 \sim 10^6$  個)。また測定を始める約1時間前に培養液を入れた培養セルを装置にセットしておく。

## 4. 結果

### 4.1 実験結果

本装置で測定した *Escherichia coli* と *Proteus morganii* の結果の一例を Fig. 4 (a), (b) に示す。共に濁度変化に小さな揺らぎが見られる。このときに取り出してみると、濁りに不均一さが観測された。従ってこれは細菌の発育に伴う細菌密度の不均一さに原因があるものと考えられる。この揺らぎは全部の菌種で観測された。また *Proteus morganii* の例では後半で濁度が減少しているが、これは細菌の沈殿によるものである。これらの例では現われていないが、気泡を発生する場合もあり、この場合は濁度の曲線にパルス状の揺らぎが観測される。それに対してインピーダンス変化は、ほとんどの場合なめらかな曲線となる。そこでこのようなデータから、特に濁度変化の揺らぎを除くた

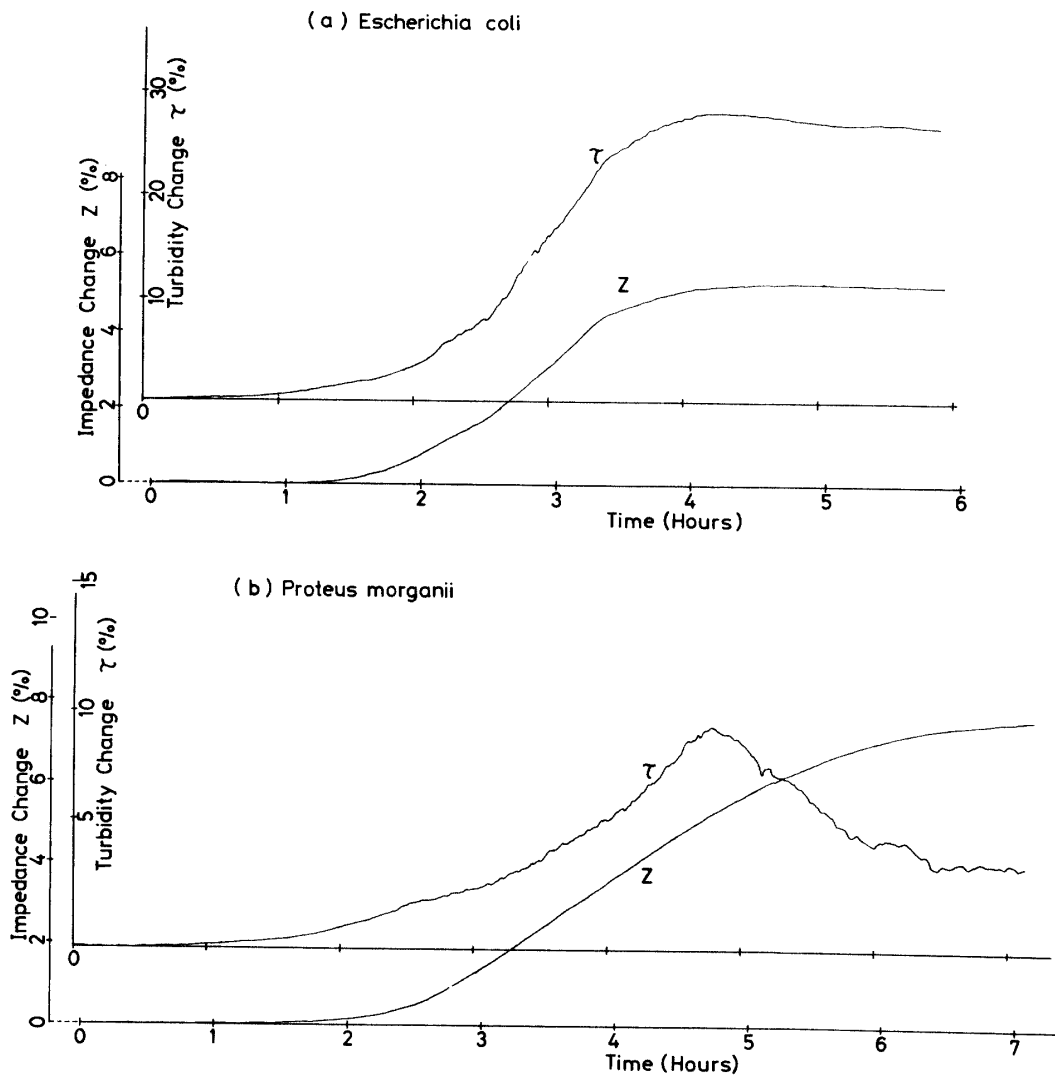


Fig. 4 Examples of the curves simultaneously recorded on a chart recorder. *Escherichia coli* (a), *Proteus morganii* (b) grown in BHI at 37°C.

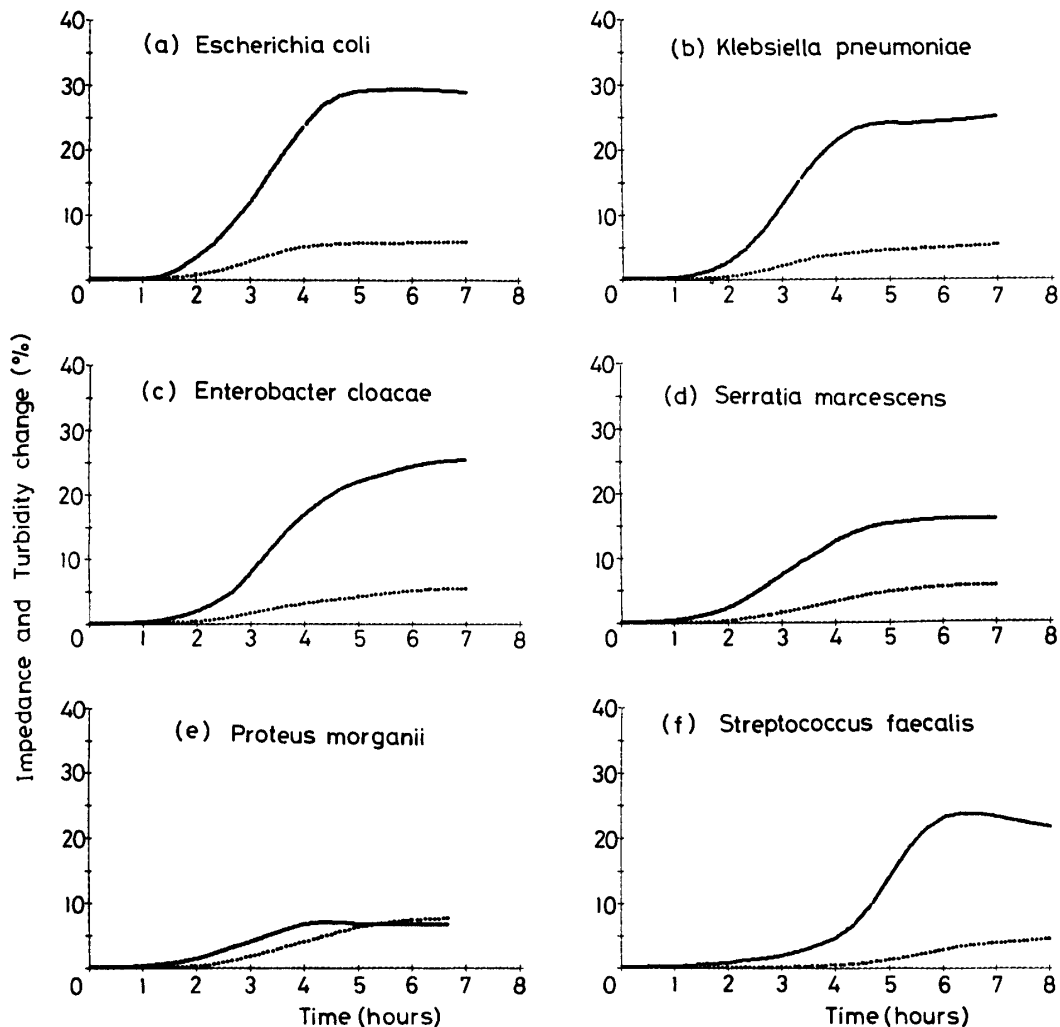


Fig.5 Time course of electrical impedance and turbidity change. The changes are represented in percentage. (— : Turbidity, ..... : Impedance)

めに、20分間隔でサンプリングし、3点平均化法で処理した。結果の1例を6種類の細菌について Fig.5(a)~(f) に示す。実線は濁度変化、点線はインピーダンス変化で、それぞれ初期値で割りパーセントで表わした。この結果からは濁度変化の小さい *Proteus morganii* を除くとよく似た形をしており、菌種による違いがはっきりしない。次に Fig.5 から求めた時間微分(差分)パターンを Fig.6 (a)~(f) に示す。ただし、インピーダンスの値は5倍のスケールで書いてある。それぞれの細菌の特徴を比較してみると、*Escherichia coli* は濁度、インピーダンス共によく似た形であり、ピークが高く幅が狭い。また、ピークの前後の曲線の形が対称となっている。*Klebsiella pneumoniae* では濁度の形は *Escherichia coli* とよく似ているが、インピーダンスの後半が長く伸びている点が *Escherichia coli* と異なっている。*Enterobacter cloacae* の特徴は、インピ

ーダンス、濁度共にピークが高く、ピークより後半が長い。また、インピーダンスにピークが2つあるのが大きな特徴である。*Serratia marcescens* は、インピーダンス、濁度共にピークの高さは中程度で幅が広い。濁度はピーク点より後半が長く、インピーダンスはピーク点より前半が長いという特徴を示す。*Proteus morganii* はインピーダンスのピークは高いが濁度のピークは低く、共に幅は広い。インピーダンスはピーク点より前半が長い。*Streptococcus faecalis* の濁度は、ピークが高く幅が狭い。インピーダンスはピークの高さは中程度で、幅が広いのが特徴である。このように微分パターンは、菌種によってかなり異なっている。くり返し測定した結果再現性も高く、菌種特有のパターンを示す。

#### 4.2 菌種判別の試み

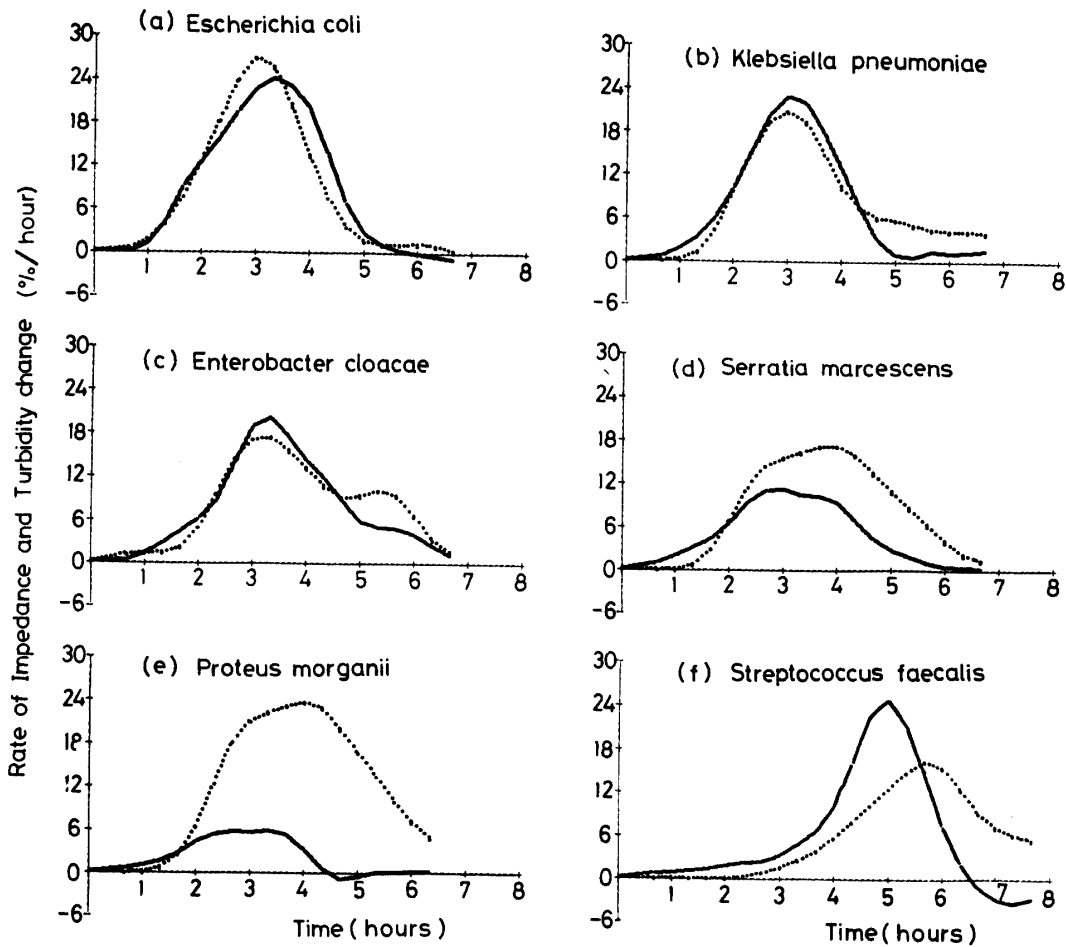


Fig.6 The rate of impedance and turbidity change (rate pattern). These curves are computed from the data shown in Fig.5. The curves for impedance are expanded by 5 times.  
(——— : Turbidity, ..... : Impedance)

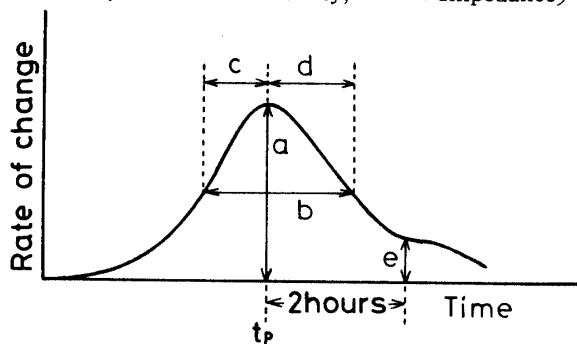


Fig.7 Definition of the parameters characterizing the patterns found in Fig.6.  $t_p$  indicates the time of summit of the pattern.  
a : height of the summit at the time  $t_p$ .  
b : width of the half summit.  
c : length of b before  $t_p$ .  
d : length of b after  $t_p$ .  
e : height of the curve at 2 hours after from  $t_p$ .

微分パターンから、菌種判別のための定量的なパラメータの抽出を試みた。Fig.7に示すようにピーク(ただし、ピークが2つ以上あるときは最も早く現われるピークとする)の時刻を $t_p$ とし、 $t_p$ での曲線の高さをa、半値幅をbとする。このbを2つに分け、bの $t_p$ より前の長さをc、bの $t_p$ より後の長さd、又ピークから2時間後の曲線の高さをeとする。微分パターンは同一スケールで書かれているので、これらの数値を長さで求めることができる。いくつかのパラメータの数値が求まるが、ばらつきが小さく、他の菌種との重なりが少なく、菌種を分離するのに有効であると思われるものをFig.8(a)~(e)に示す。横軸にパラメータの値をとり、記号の数はデータ数を表わす。小文字の $\alpha$ ,  $\tau$ はそれぞれインピーダンス、濁度の微分パターンより求められたことを表わす。(c), (d)で

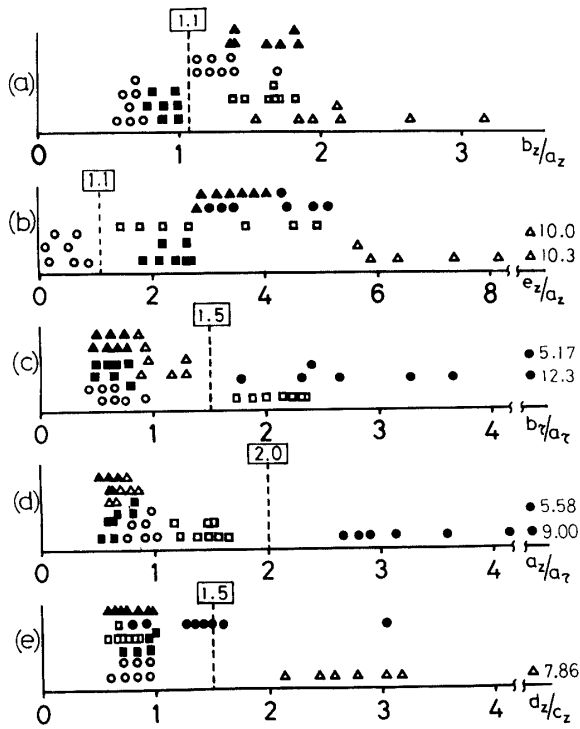


Fig.8 Classification of bacteria by using characteristic parameters defined in Fig.7. The abscissa stand for the ratio of parameters. The stack of symbols represents the trial number of experiments. The symbols with number on the right side indicate the points over scale. (○): *Escherichia coli*, (■): *Klebsiella pneumoniae*, (△): *Enterobacter cloacae*, (□): *Serratia marcescens*, (●): *Proteus morgani*, (▲): *Streptococcus faecalis*.

特に *Proteus morgani* のばらつきが大きいのは、この種が培養液中で沈殿しやすいためである。くり返し測定した結果、濁度の微分パターンの高さにばらつきが大きくこの数値 ( $a_t$ ) が含まれるパラメータは、ばらつきが大きくなっている。

さらに Fig. 8 よりそれぞれのパラメータにおいて、図中の点線で示される適当なレベルを設け、グループ分けした。結果を Table 1 に示す。ここでレベル以上を+, レベル以下を-で表わし,  $\Delta$  は両方にまたがり分離不能なものを表わす。この結果より今回用いた6種類の菌種では、5種のパラメータで判別できることがわかる。

5. 議 論

インピーダンス測定に4電極法を採用し、さらに細菌培養セルを改良したことにより、安定な測定が可能となった。そして、ベースラインが変動して使用できなかったステンレススチールでも金と同様良好な結果を得ることができた。これは培養セルの断面積が以前のセル<sup>10)</sup>の約1/7になり、等価的に培養液のインピーダンスが増加した。従って大きな出力電圧が得られるようになり、電極の影響が相対的により小さくなったことが考えられる。さらに実験の結果、培養セルに培養液を入れ装置にセットした後約1時間はベースラインの変動が大きかった。これは温度が平衡に達するまでの時間と、電極が培養液になじむのに要する時間と考えられる。今回培養セルの材質をガラスにしたことにより熱伝達特性がよくなり、初期の温度平衡に達する時間が短くなった。1時間後からはベースラインの変動は非常に小さくなる。そこで、測定を始める約1時間前に培養セルを装置にセットし、初期ドリフトが治まった後で菌を接種したことも、ベースラインの変動が小さくなったことの理由の1つと考えられる。またベースラインの変動の原因の1つと考えられる液の蒸発も、培養セルとふたの間にシリコンゴムシートをはさんでしめつけ解決した。ステンレススチールが使用できることは、安価な点で大きな利点と考えられる。

以前判別パラメータとして提案した発育速度 ( $\alpha$ ) と等価代謝時間 (T) を用いて6種類の細菌の菌種判別を試みた、しかし *Escherichia coli* を除くと他の5

Table 1 Discrimination test of parameters. Symbol (+) and (-) represent that the parameters take the position of right and left sides to the broken line in Fig.8, respectively.  $\Delta$  express that symbols are distributed on both sides of broken line.

	$a_z/a_t > 2.0$	$b_z/a_z > 1.1$	$b_t/a_t > 1.5$	$d_z/c_z > 1.5$	$e_z/a_z > 1.1$
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	$\Delta$	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+	-	+
<i>Proteus morgani</i>	+	+	+	$\Delta$	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	+	-	-	+

種は対数増殖期に対応する部分が短かく、パラメータ  $\alpha$ ,  $T$  の値を求めることが困難であった。また、ベースラインのわずかな変動によってこれらのパラメータの値がかなり異なってくる。その結果  $\alpha$ ,  $T$  による菌種判別は良好な結果を得ることができなかった。これに対して微分パターンはわずかのベースラインの変動の影響は無視でき、毎回同様なパターンを示す。菌種による違いもよりはっきり現われ、より確実な判別パラメータの値を求めることができる。

菌種判別パラメータとして時間微分パターンにより5種のパラメータの数値を求め、6種類の菌種判別に対して良好な結果を得た。Cady, P. らはインピーダンス変化曲線からその微分パターンを求め、菌種により異なることを報告している<sup>4)</sup>。しかし同じ菌種に対して同一のパターンを得ることができず、再現性に問題があった。また、*Escherichia coli* と *Proteus mirabilis* のパターンはよく似ており、菌種による違いがはっきりしない。これは2電極法でインピーダンス測定を行なっているために、電極も含めた変化を観測していると考えられる。これと比較すると4電極法で測定した Fig.5 の結果は、電極の影響が除かれているので再現性が高い。

数種類のパラメータを用いて菌種判別を試みた例として、光学的な散乱パターンを利用した報告がある<sup>14)</sup>。これは数種類の抗性物質に対する固定角の光散乱強度 (LSI) を判別パラメータとするものである。この方法は抗性物質の準備が必要であり、装置も複雑と思われる。それに対して本方法は1種類の培養液を準備するだけで、比較的簡単な装置で測定できる。

Fig.6 の微分パターンで *Escherichia coli* と *Klebsiella pneumoniae* は濁度のパターンを比較してみると非常に良く似た形をしており、これだけでは判別困難である。しかしインピーダンスパターンの後半にこの2種の違いが現われており、判別が可能となっている。ここに異なった量を同時に測定している本方法の有効性の1つが示されているであろう。

純培養の細菌を用い、初期菌数を  $10^5 \sim 10^6$  個/cc とすれば、5~7 時間で判別可能である。

## 6. おわりに

細菌培養液の電気インピーダンスと濁度の同時測定

より得られたデータから、時間微分パターンを求めた。時間微分パターンは菌種に特有のパターンを示し、再現性も高い。微分パターンより菌種判別に有効な5種のパラメータを抽出した。このパラメータの数値を比較することによって、今回対象とした6種類の細菌を区別することができた。本方法は細菌検査の自動化、迅速化に対して有望な方法と思われる。終わりに、本研究を進めるにあたって、実験の協力、手助けを頂いた当研究室の諸氏に感謝の意を表したい。

## 参 考 文 献

- 1) 米谷 孝, 武田 勇: 臨床病理, 27, 553 (1979)
- 2) Amiram Ur: New approaches to the identification of microorganisms (C.G. Heden, T. Illeni ed.), 61 (1975)
- 3) P. Cady: New approaches to the identification of microorganisms (C.G. Heden, T. Illeni ed.), 73 (1975)
- 4) P. Cady, et al.: J. Clin. Microbiol., 7, 265 (1978)
- 5) W.K. Hadley, G. Senyk: Microbiology-1975 (D. Schlessinger ed.), Washington, D.C., American Society for Microbiology (1975)
- 6) 土屋俊夫他: 日大医学雑誌, 37, 405 (1978)
- 7) 常岡英弘, 宮地隆興: 臨床病理, 27, 563 (1979)
- 8) 橋本基他: 山口大学工学部研究報告, 29, 71 (1978)
- 9) 橋本基他: 電子通信学会医用電子生体工学研究会, MBE 78-14, 61 (1978)
- 10) H. Hashimoto, et al.: Technology Reports of the Yamaguchi University, (to be published)
- 11) 三池秀敏他: 臨床病理, 27, 558 (1979)
- 12) P.J. Wyatt: Appl. Opt., 7, 1879 (1968)
- 13) K. Shimizu, A. Ishimaru: Appl. Opt. Med. Biol., 89, 22 (1976)
- 14) B.H. Sielaff, et al.: J. Clin. Microbiol., 3, 105 (1976)
- 15) G.E. Back, et al.: J. Clin. Microbiol., 6, 46 (1977)
- 16) V.A. Lemb, et al.: Am. J. Clin. Pathol., 66, 91 (1976)
- 17) R.R. Strauss, et al.: J. Clin. Microbiol., 5, 145 (1977)

(昭和54年10月15日 受理)