

細菌の電氣的・光学的同時測定による自動検査法

橋本 基*・井本恒雄**・三池秀敏***・古賀和利***・蛭名良雄***・
宮地隆興****・山本英弘****

Rapid Automated Bacterial Identification by Simultaneously Measuring Electrical Conductance and Transmitted Light Intensity

Hajime HASHIMOTO, Tsuneo IMOTO, Hidetoshi MIKE, Kazutoshi KOGA,
Yoshio EBINA, Takaoki MIYAJI, and Hidehiro YAMAMOTO

Abstract

The growth curve of bacterial culture of *E. coli*. was studied by simultaneously measuring the changes of electrical conductance and of transmitted light intensity of culture broth. From the observed curves, we estimated the numerical values of parameters (lag phase period, growing speed and metabolic period) expressing the growth curve of bacterial culture and concentration of bacteria *E. coli*. These values were in a reasonable range comparing with the published data about *E. coli*. The present result suggests a possibility that by our method we can rapidly and automatically identify the species of bacteria and estimate its concentration in the culture broth.

1. まえがき

臨床検査における細菌検査は、検体中の細菌の種類
の同定・菌数の推定を、迅速にかつ正確に行なうこと
が必要である。しかし、現在病院等で主に行なわれて
いる方法は、多くの人手と時間を要する。すなわち採
取した材料を培養して細菌数をふやした後、諸種の薬
物を用いて生物学的性質から細菌の種類を同定を行な
う。また、一定の材料中に含まれている細菌を希釈し
カンテン培養して、生じたコロニー（細菌集落）を数
えて測定するコロニーカウント法と呼ばれる方法で、
菌数を推定している。このような古典的な方法では多
くの人手を要し、また検査を行なうのに時間がかかり、
迅速性を要する臨床検査の目的と一致しない。このた
め近年特に臨床細菌学の分野で、細菌の種類を同定・
菌数の推定のスピード化・自動測定化が望まれるよう
になった。そこで、いろいろな物理的・化学的手段を

用いた方向からの研究が行なわれるようになり、多く
の報告がなされている。その一つに、細菌培養液の電
気伝導度変化の測定による方法がある^{3), 4), 5)}。細菌の
物質代謝作用によって、炭水化物のような電気伝導度
の低い物質が乳酸のような電気伝導度の高い物質に変
えられ蓄積していく。このために培地の電気伝導度の
時間変化がおこり、これを測定するものである。また
他に、培養液の光透過度の変化から光学的に測定する
方法もある⁶⁾。これは培養液内の細菌密度が変化する
と光透過の程度が変化するので、これを利用するもの
である。その他放射性物質を使って測定する方法⁸⁾、
レーザー光の散乱により測定する方法⁷⁾の報告がある。
しかしこれらは、細菌の種類を同定・菌数の推定の点
においてはまだ不十分と思われる。

そこでわれわれは、細菌の種類によって異なる細菌
の成長の過程およびその特徴を示すパラメータと、菌
数に依存するパラメータの値を得るために、培養液の
電気伝導度変化・光透過度変化の同時測定を行なった。
得られたパラメータの値から細菌の種類を同定や菌数
の推定を行なおうと考えた。本論文では、一般的な腸
内細菌である大腸菌 (*E. coli*) を用い、基礎的な実験
を行なった。その結果、大腸菌の成長の過程を示す準

* 大学院電気工学専攻

** 電気工学科学生（現在清水建設）

*** 電気工学科

**** 本学医学部付属病院

準備期の長さ, 発育速度, 代謝時間等, またそれらの温度依存性などについて有効な知見を得ることができたのでここに報告する。

2. 原 理

細菌の生菌数でみた増殖曲線は, Fig. 1 に示すものが一般に知られている^{1), 2)}. これによると, 増殖曲線は大きく4つに分けて考えられる. 最初に環境に適応し分裂に備えるための時期があり, 準備期又は誘導期 (Lag phase) と呼ばれる. 次に規則正しく分裂する時期があり, 対数増殖期 (Log phase) と呼ばれる. そして培養条件の悪化により, 菌数の増加がとまり, しだいに死滅していく. この時期はそれぞれ, 静止期 (Stationary phase), 死滅期 (Phase of decline) と呼ばれる.

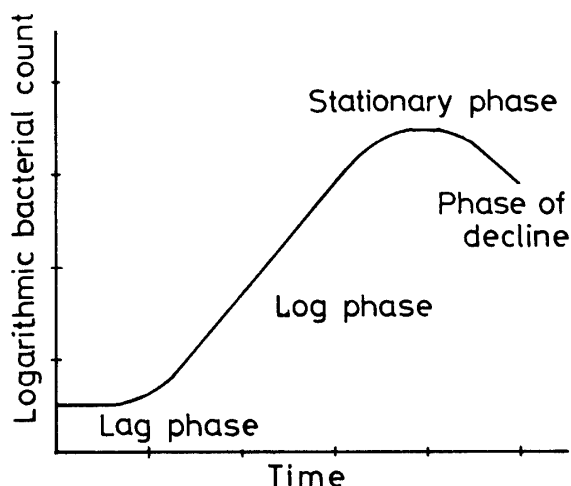


Fig. 1 Growth curve of bacterial culture.

今, 時刻 $t=0$ において n_0 個の細菌を培養液に接種したとする. 準備期の時刻 t における細菌数を $n(t)$ とすると, 次式で表わせる.

$$n(t) = n_0 \quad (1)$$

対数増殖期の時刻 t における細菌数は, 準備期の長さを t_1 , 発育速度を α とすると次式で表わされる.

$$n(t) = n_0 e^{\alpha(t-t_1)} \quad (2)$$

このとき, 培養液の透過光量 $I(t)$ は, 細菌を接種する以前の透過光量を I_0 として近似的に次式で表わされる.

$$\begin{aligned} I(t) &= I_0 - An(t) \\ &= I_0 - An_0 e^{\alpha(t-t_1)} \end{aligned} \quad (3)$$

ここに A は, 1 個の細菌が透過光量を変化させる程度を表わす係数である. 従って, 光学的に $(I(t) - I_0)$ を測定すると, 接種細菌数 n_0 , 準備期の長さ t_1 , 発育

速度 α , 等が求められる. 一方, 準備期を過ぎた個々の細菌の活動は一定で, 一様に代謝作用を行なうものとする. この時に, 一個の細菌は炭水化物のような栄養物を取り込んでから, τ だけ時間がたって乳酸のような代謝産物を排出すると仮定する. さらにこの代謝産物は時間的に変化せず, 培養液内に蓄積するものと仮定する. これらの仮定のもとで, 時刻 t での培養液の電気伝導度 $G(t)$ は, 細菌を接種する以前の培養液の電気伝導度を G_0 として次式で表わされる.

$$\begin{aligned} G(t) &= G_0 + \int_0^t Bn(t-\tau) dt \\ &= G_0 + Bn_0 \{e^{\alpha(t-t_1-\tau)} - 1\} \end{aligned} \quad (4)$$

ここに B は, 1 個の細菌の代謝産物による電気伝導度の変化の程度を表わす係数である. 従って, 電氣的に $(G(t) - G_0)$ を測定すると, n_0 , α , t_1 , τ 等の情報が得られる. なお, (4) 式は (3) と比較すると, 代謝作用に要する時間 τ だけ遅れていることに注目しよう.

3. 材料及び実験装置

細菌は, われわれが扱うのに比較的安全で, 一般的な腸内細菌である大腸菌 (*E. coli*) を選んだ.

培養液は, ブレイン・ハート・インフュージョンとして市販されている一般細菌増殖用のものを用いた.

培養用セルは, Fig. 2 に示すようなものを用いた. セルは光透過度測定を行なうためにガラス・チューブでできており, 電気伝導度測定を行なうために直径 0.7mm の白金電極を取り付けた. セルの両端は液の漏れを防ぐためにゴム栓をした. また, 光学的測定の

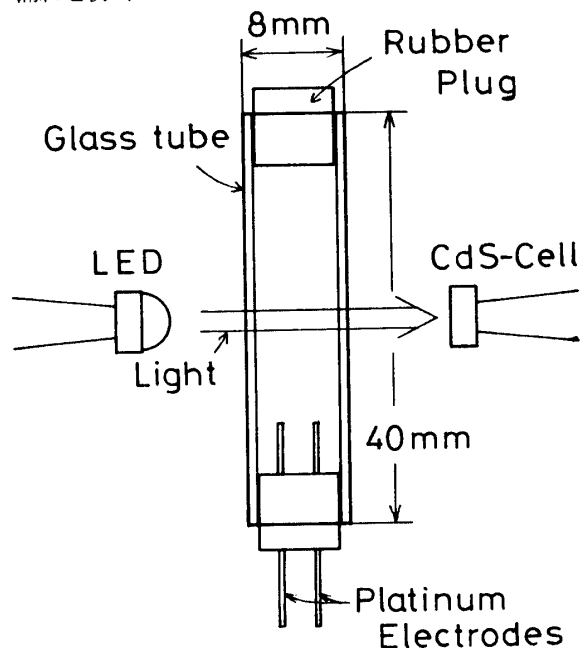


Fig. 2 Configuration of measuring cell.

ための光源は発光ダイオード(LED)を、受光器としてはCdS—セルを用いた。

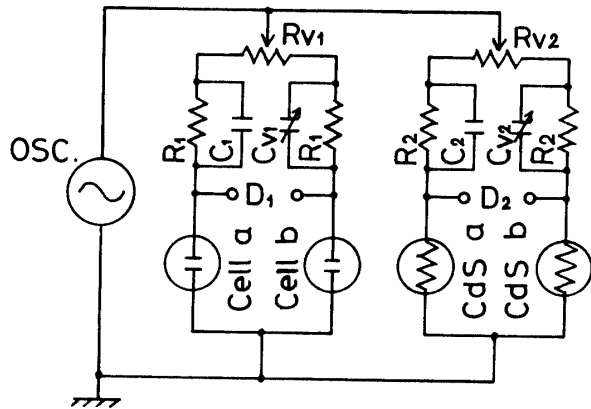


Fig. 3 The measuring circuit of Electrical Conductance and Transmitted Light Intensity. Culture-cell (a) and CdS-cell (a) : measuring Culture-cell and CdS-cell; Culture-cell (b) and CdS-cell (b) : reference of Culture-cell (a) and CdS-cell(a); R_1 : 5K resistor; R_2 : 50 K resistor; R_{v1} : 1K variable resistor; R_{v2} : 10K variable resistor; C_1, C_2 : 330pF capacitor; C_{v1}, C_{v2} : 450pF variable capacitor. Oscillator provides 0.8V_{p-p}, 1KHz sinusoidal tension.

Fig. 2 に示す測定系は温度変化や液の蒸発等の影響を非常に受け易いので、これらの影響を少なくするために Fig. 3 に示すようなブリッジ回路を構成した。一方の培養用セル及びCdS—セルは比較用で、各々培養液だけの電気伝導度及び光透過度を測定するものである。ブリッジ回路には、培養液の分極をさけるためとブリッジ出力信号の増幅回路を簡単にするために、0.8V_{p-p}, 1 KHz の正弦波を加えた。さらに測定系は温度変動が0.1°C以内になるように制御した。

ブリッジ出力信号は、Fig. 4 のブロック図で示すように AC. AMP. で増幅し、 $Q=100$ の帯域フィルタを通して S/N を向上させた。そして振幅検波を行ない、

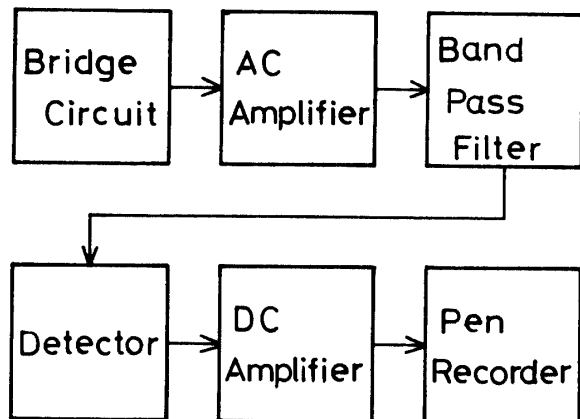


Fig. 4 Blockdiagram of the measuring system.

低域フィルタを通し、DC. AMP. で増幅してペンレコーダで記録させた。現在本装置は、0.01%までの電気伝導度変化、光透過度変化が測定できる。回路の詳細は付録に示す。

4. 実験方法及び実験結果

4.1 実験方法

実験の前に培養用セルと培養液を2気圧121°Cの水蒸気で20~30分加圧滅菌を行なった。その後無菌的に培養液0.4ccを培養用セルに入れ、大腸菌を接種した。接種する菌は、ブレイン・ハート・インフュージョン培地でだいたい静止期にある菌を用い、白金耳で接種を行なった。このとき、1白金耳につく菌数は古典的なコロニーカウント法を用いて測定すると、およそ 2.5×10^5 個であった。

実験は、温度を一定とし白金耳による接種回数をパラメータとしたものと、接種回数一定で温度をパラメータとしたものを行なった。

4.2 実験結果

本実験装置による測定結果の一例を Fig. 5 に示す。これは温度37°Cで、接種回数1回のものである。こ

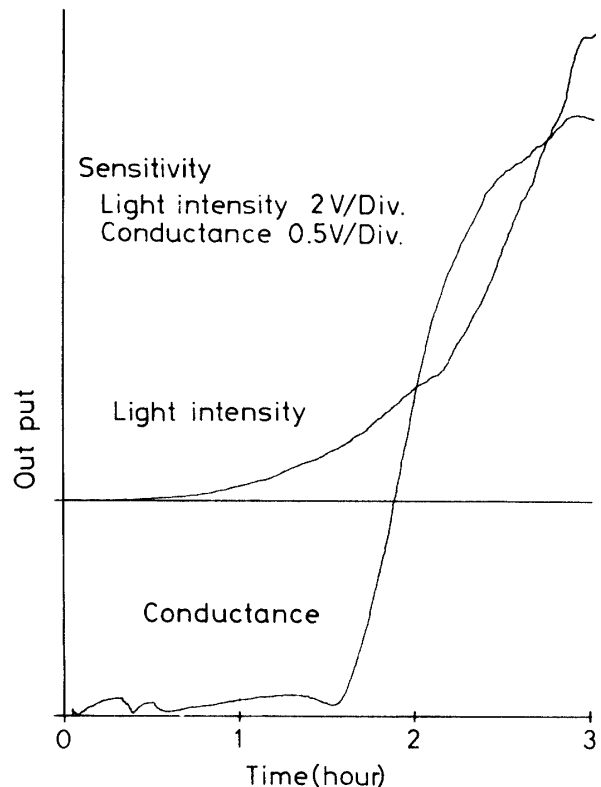


Fig. 5 Typical curves recorded on the chart recorder, temperature: 37°C, inoculated 1 time.

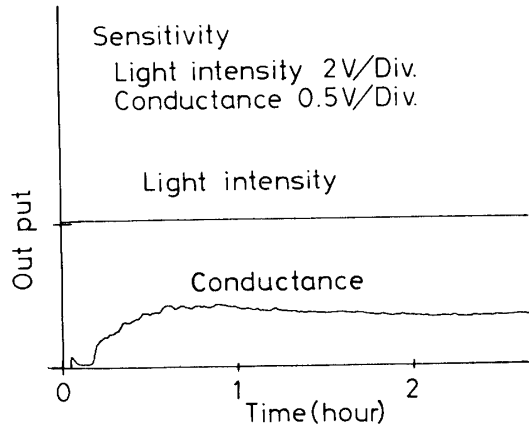


Fig. 6 Typical curves recorded on the chart recorder, temperature: 37°C, no inoculation.

の例では、光学的には接種後1時間以内で変化が現われ、電気的には1.5時間で変化が現われている。また Fig. 6に温度 37°Cにおけるブランク実験例を示す。Fig. 5と Fig. 6の両者を比較すると、明らかに細菌の

増殖による変化が現われている。

Fig. 7, Fig. 8 に測定結果から、培養用セルの電気伝導度変化と光透過度変化に換算し、それぞれ初期値 G_0 と I_0 で規格化した結果を示す。Fig. 7に温度 37°C一定で、接種回数をそれぞれ1回、3回、6回としたものを示す。この結果から、温度一定の時は電気伝導度変化および光透過度変化の形状はほぼ同一で、接種回数の違いは時間の違いに現われている。また、Fig. 8に接種回数は1回一定で、温度をそれぞれ 37.0°C, 30.5°C, 25.5°Cとしたものを示す。この結果から、温度による違いは傾きの違いに現われていることがわかる。

また、Fig. 7, Fig. 8の結果から、大腸菌の増殖過程を示すパラメータの値を次のようにして求めた。最初に接種菌数 n_0 は次のようにして求めた。光透過度変化の結果から、対数増殖期の直線を延長し、光透過度変化の現われる時刻 t_1 の値を読む。この値と、光透過度変化が飽和に達した時刻 t_4 の値の比から (5) 式より求めた。このとき、光透過度変化が飽和に達した時の大腸菌の菌数は、コロニーカウント法によりおよそ 5×10^8 個/ccであったことを用いた。

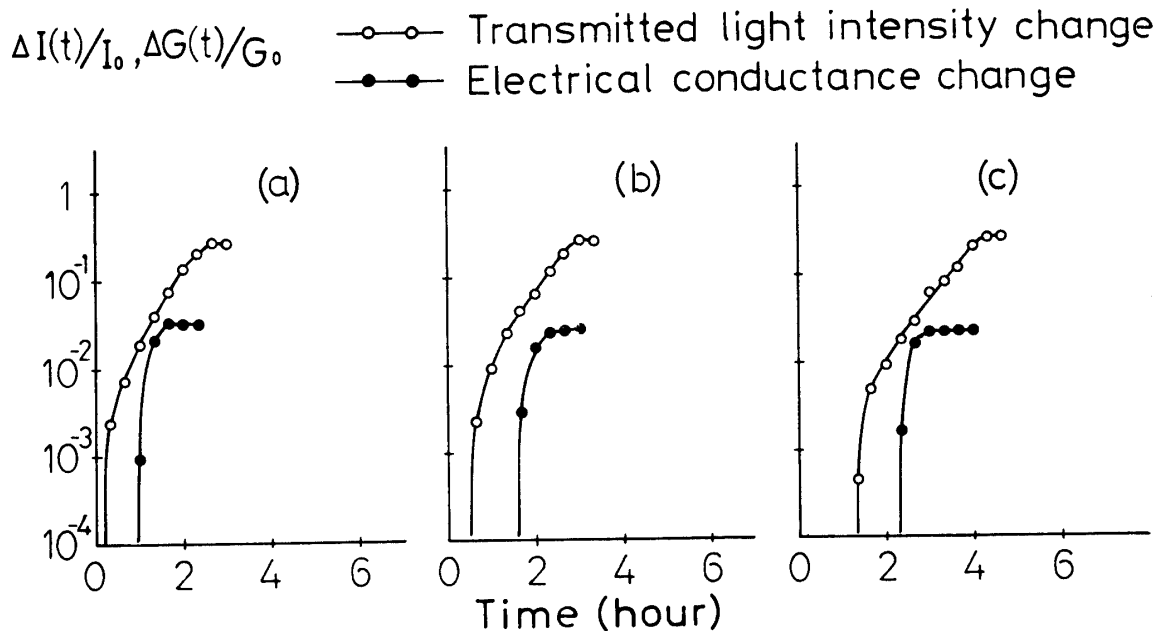


Fig. 7 The changes of electrical conductance and transmitted light intensity through the measuring cell. Here the changes (ΔG and ΔI) of the parameters were divided by the initial values (G_0 and I_0), respectively. The bacteria *E. coli* was cultured in the BRAIN HEART INFUSION broth, under the constant temperature: 37°C.

- a) inoculation: 6 times,
- b) inoculation: 3 times,
- c) inoculation: 1 times.

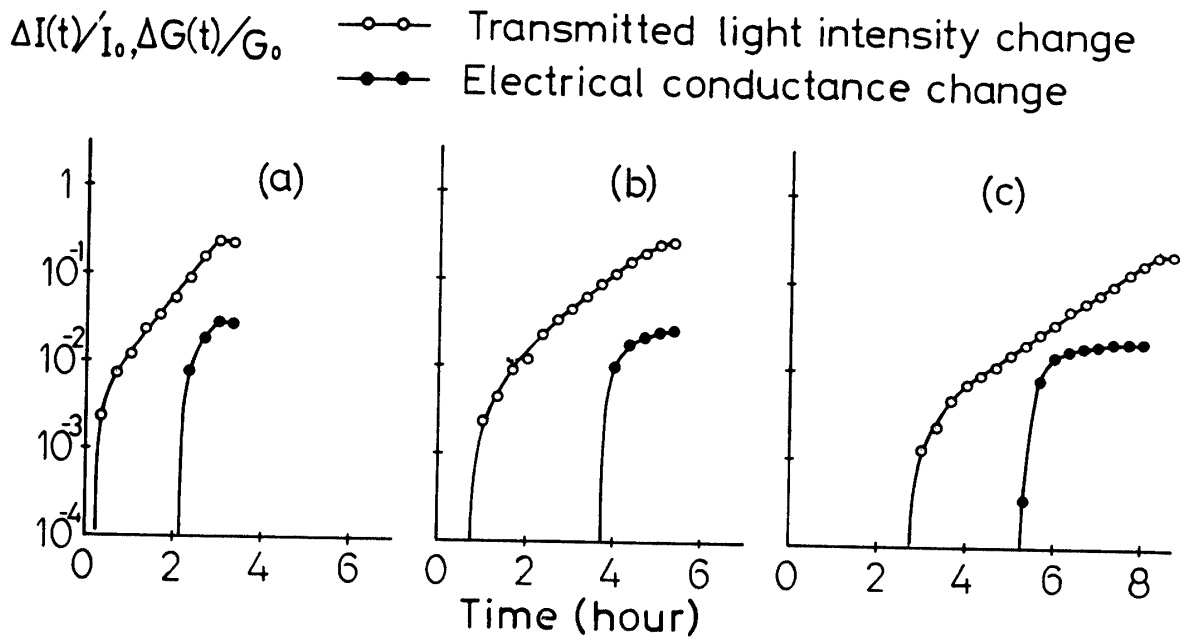


Fig. 8 The changes of electrical conductance and transmitted light intensity through the measuring cell. Here the changes (ΔG and ΔI) of the parameters were divided by the initial values (G_0 and I_0), respectively. The bacteria *E. coli* was cultured in the BRAIN HEART INFUSION broth, under the constant inoculation: 1 time.

- a) temperature: 37.0°C,
- b) temperature: 30.5°C,
- c) temperature: 25.5°C.

Table 1. Estimated values by measuring the changes of Electrical Conductance and Transmitted Light Intensity.

temperature (°C)	inoculation (times)	inoculated bacterial count n_0 (1/cc)	growing speed α (1/min)	Lag phase period t_l (min)	metabolic period τ (min)
37.0	6	20×10^5	0.039	10	40
	3	17×10^5	0.038	25	60
	1	7×10^5	0.038	60	50
37.0	1	8×10^5	0.038	10	120
30.5		12×10^5	0.024	30	180
25.5		6×10^5	0.019	140	140

$$n_0 = (5 \times 10^8) \times \frac{\Delta I(t_1)/I_0}{\Delta I(t_4)/I_0} \quad (5)$$

また、発育速度 α は、対数増殖期において、時刻 t_2 , t_3 における光透過度変化の値から次式より求めた。

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{\log n(t_3) - \log n(t_2)}{(t_3 - t_2) \log 2} \\ &= \frac{\log(\Delta I(t_3)/I_0) - \log(\Delta I(t_2)/I_0)}{(t_3 - t_2) \log 2} \quad (6) \end{aligned}$$

準備期の長さ t_l は、菌接種後から光透過度変化の現われるまでの時間から求めた。代謝時間 τ は、光透過度変化と電気伝導度変化の現われる時間差から求めた。以上のようにして求めた値を Table 1 に示す。

5. 議 論

本実験では、大腸菌の発育速度 α は温度一定のときはほぼ 0.038/分という値が得られた。この値は接種細菌数には依存しないことがわかった。また、この値は温度が低いほど小さな値となる傾向にある。このことから、温度一定のとき α の値は細菌の種類および培地の種類に依存し、菌数には依存しないと考えられる。本装置により、 α の値はかなりの精度で求めることができる。従って、何種類かの培地における α の値を測定すれば、細菌の種類の同定を行なうことが可能であると思われる。

次に、接種細菌数 n_0 の値は (5) 式より求めた値である。このとき、光透過度変化の値が飽和に達したときの値 ($\Delta I(t_4)/I_0$) は、本装置では誤差 10% 以内で測定可能である。また、光透過度変化が飽和に達した

時、温度や培地を一定条件とすれば、細菌数はほぼ同一数と考えられる。従って、接種細菌数 n_0 の値は、誤差10%以内で求めることが可能である。ここで、実験結果より求められた n_0 の値から、1白金耳につく菌数はおよそ 7×10^5 個と推定される。また、コロニーカウント法により推定された菌数は 2.5×10^5 個であった。この違いは、1白金耳につく菌数は1回ごとに違っており、またコロニーカウント法における希釈培養を行なう時の誤差等により生じたものと思われる。

また、準備期の長さ t_1 と代謝時間 τ の値は、ばらつきの大きな結果が得られた。準備期の長さ t_1 は、接種した細菌がどの時期にあったかという初期状態が異なっていたために、ばらついた値が得られたと思われる。代謝時間 τ については、この値は何に依存するか、大腸菌だけを用いた基礎的な実験の段階では、確かなものは得られなかった。しかし、細菌の種類、培地の種類、細菌の数を変えたときに違った τ の値が得られれば、 τ もまた細菌の種類の同定や菌数の推定を行なうための1つのパラメータとなると思われる。

6. まとめ

ここに述べた大腸菌を用いた基礎的な実験における電気的・光学的同時測定から、大腸菌の増殖過程を示すいくつかのパラメータの値を求めることができた。この結果、細菌の数は n_0 の値から推定でき、発育速度 α の値を用いて種類の同定を行なうことが可能であることがわかった。この方法は、迅速に、かつ自動的に細菌の種類の同定や菌数の推定が可能なので、臨床における細菌検査に応用できるであろう。

2) 橋本雅一：「臨床検査講座」, 医歯薬出版 (1977)
 3) CARL GÖRAN HEDEN, TIBORILLEN: "NEW APPROCHES TO THE IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS" A WWILEY BIOMEDICAL-HEALTH PUBLICATION (1975)
 4) Amiram UR, M.D.: BIO-MEDICAL ENGINEERING JULY, 342 (1970)
 5) Steven Specter, Richard Throm, Robert Strauss, Herman Friedman: J, Clin. Microbiol. Nov., 489 (1977)
 6) 井本恒雄：山口大学工学部卒業研究論文 (1977)
 7) Koichi Shimizu, Akira Ishimaru: Applications of Optics in Medicine and Biology 89, 22 (1976)
 8) Strauss, R.R., R. Throm, H. Friedman: J. Clin. Microbiol. 5, 145 (1977)
 9) Wyatt, P.J.: Appl. Opt. 7, 1879 (1968)

(昭和53年4月15日 受理)

付 録

装置の電気回路図を、付一Fig. 1に示す。

交流増幅器は、ブリッジ回路からの微小な信号を受けるため、高入力インピーダンス、高利得の差動入力型である。本回路では入力インピーダンスは約 $1M\Omega$ となる。また、利得は信号源インピーダンスによって異なるが、信号源インピーダンスが $1k\Omega$ のとき約1000倍である。

帯域フィルタの中心周波数 f_0 は、 C, R_3 により次式で決まる。

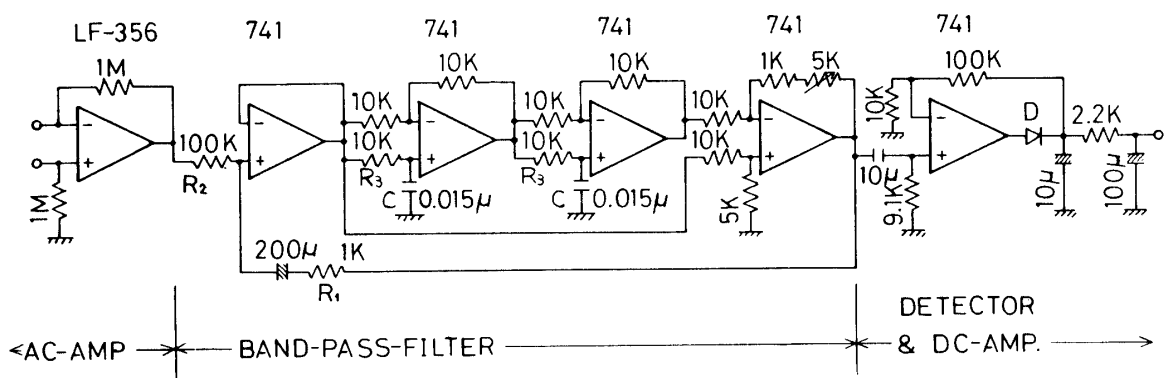
$$f_0 = 1 / (2\pi CR_3) \tag{付一(1)}$$

また、帯域幅を表わす Q のおよその値は、 R_1, R_2 により次式で決まる。

$$Q = f_0 / \Delta f = R_2 / R_1 \tag{付一(2)}$$

本回路では、 f_0 はおよそ $1kHz$ 、 Q はおよそ100という値となる。この部分の利得は1である。

振幅検波器、直流増幅器は、1つの回路で構成される。この部分では、交流電圧の最大値が10倍の直流電圧として出力される。



Appendix-Fig. 1 Electrical circuit of the measuring system.