

濁度発育曲線の差分パターン解析による細菌同定の試み

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

A Trial for Identification of Bacteria with Distance Analysis of the Differential Pattern of Turbidity Growth Curve

Kazumasa SATO*, Hidetoshi MIIKE**, Hajime HASHIMOTO**,
Yoshio EBINA** and Takaoki MIYAJI***

Abstract

An automated processing system of bacterial information is constructed by microcomputer, turbidity detecting apparatus and some electrical circuits. The system shows good reproducibility in monitoring bacterial growth curve. For ten species of coliform bacteria, identification test is tried, and 93.3% identification rate is obtained. Several problems in multi-channeling of the system are discussed.

1 はじめに

臨床細菌検査の主たる検査項目は、(1)菌種の同定、(2)薬剤感受性および、(3)菌濃度の推定であろう。近年これらの検査の自動化、省力化が種々の物理、化学的方法を導入して行なわれている。病院等においては従来の検査の簡略化として簡易キット等が用いられ、省力化がなされている。また、インピーダンス^{1, 2)}、濁度^{3, 4, 5)}、光散乱パターン⁶⁾、ガスクロマトグラフィ法⁷⁾による試みもなされ、一部は製品化されている。この中で最も簡単で、かつ再現性の良い方法として、濁度による検出法があり、近年数種の自動化機器に採用されている。製品化された機器として、MS-2³⁾、Autobac 1⁴⁾、AMS⁵⁾等が市販されている。いずれも多チャンネル装置で、前述の(1)、(2)および(3)の目的に使用可能である。主として3～5時間後の最終濁度の値から結果を出している。各装置とも長短があり、また性能に比べて高価でもあるため小病院などで広く日常検査に使用されていない。そこで我々はコンパクトで性能の良い細菌自動検査装置の開発を目標に種々の試みを行なっている^{8, 9)}。

本研究では、それらのうち菌増殖に伴う濁度変化

を情報源とした細菌検査自動処理システムについて述べる。前述の装置の多くは、その最終値だけの計測値を用いている。我々は、成長過程における情報を逐次計測し、それらを積極的に最大限利用し、それからの特徴を利用する。このためチャンネル当りの確度も上がると考えられる。この装置には、マイクロコンピュータ（以下、マイコンと称する）を導入し、他の機器制御をすると共に、逐次取り込まれる情報を随時、自動処理しながら、それらの結果をマイコンのメモリに記憶し、またモニターテレビ（CRT）上に表示している。プログラムの主な部分は、BASICで組み必要に応じて機械語も使用している。BASICであるので処理プログラムが簡単に変えられる。コンピュータ操作に慣れていない病院関係者が使えるように出来るだけ簡単なキー操作のみで使用できるようにした。本論文ではマイコンを導入した自動計測及び処理システムを中心に、この装置の有効性について報告する。今回はシステムを菌種同定に用いた例を報告するが、薬剤感受性検査等にも有効であり、現在、検討中である。

2 システム

Fig. 1は、このシステムのブロック図である。システムは検出装置の制御、並びに情報処理等を行なうマイコン（SORD-M100）を中心に、濁度情報検出

* 山口短期大学電子工学科

** 電気工学科

*** 山口大学医学部付属病院

部 (4 CH-detector) 及び処理結果等を表示 (CRT) 記録—保存 (X—Y plotter, Magnetic tape etc.) する機器で構成されている。Fig. 2は、入出力装置機器を接続するマイコンの基板エッジを示す。¹⁰⁾

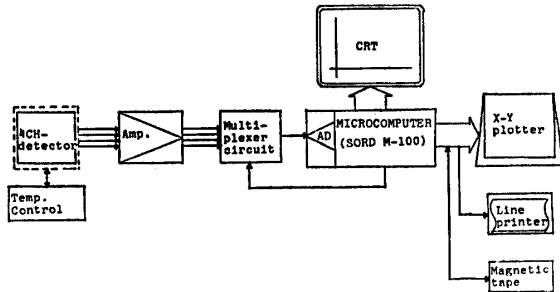


Fig. 1 Blockdiagram of the full system for bacterial identification.

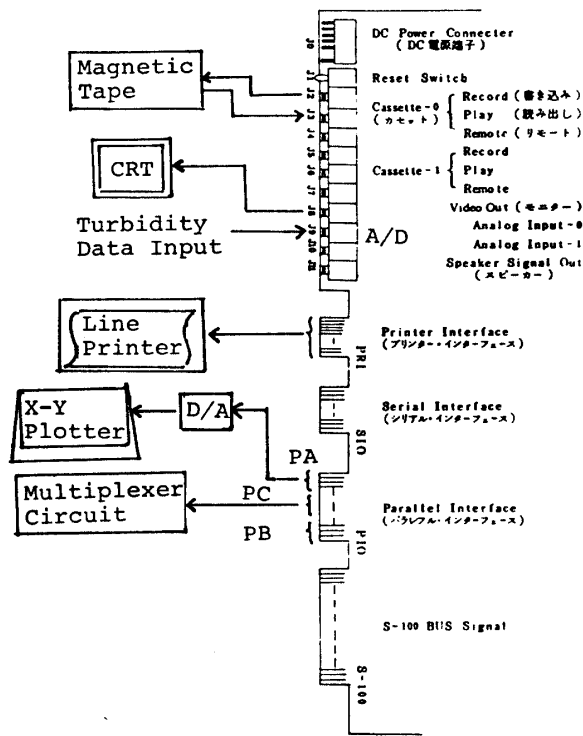


Fig. 2 Arrangement of connector edge between microcomputer (SORD M—100) and I/O instruments.

2.1 検出部

Fig. 3は、培養液の濁度変化を測定する検出装置を示す。培養セルは、図に示すような小型の試験管 (8 mmφ×50mm) を用い、培養液の蒸発を防ぎ、発育環境を一定とするためにゴム栓を使用した。濁度の検出は、光源の赤色発光ダイオード (LED) と受光素子のフォト・トランジスタ (PHT) を用い、透過

光で測定している。透過光強度に比例した光電流より、可変抵抗 Vr 端子間に直流電圧を出力する。検出回路では Vr により、測定スタート時の零点調整を行ない、受光素子の PHT からの出力を増幅し、濁度の微小の変化までとらえることが出来る。培養セル及び濁度検出部は、周囲温度等による影響を避けるため発泡スチロールで囲まれ、サーミスタと電子制御回路よりなる恒温システムで室温から50°C程度まで (今回は 37±0.1°C一定) の調整が可能である。多チャンネル化への一つの試みとして今回の検出部は、4 CHで構成され、実験能率が上がった。各チャンネルの感度のばらつきは、あらかじめ次段の直流増幅器で調整され、マイコン内蔵の A/D 変換器 (Fig. 2 Analog Input—0, J9, 5V, 8ビット精度) に分解能良く入力されるよう増幅率を調整してある。

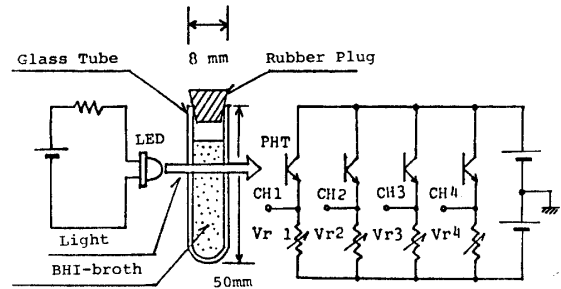


Fig. 3 Turbidity detecting apparatus.

2.2 マイコンによる測定、制御及び解析

2.2.1 マルチプレクサの制御

4チャンネルの情報を処理するのにマルチプレクサを使用し、マイコン内蔵の Parallel Interface (Fig. 2, PIO) のCポートからの信号により、それらのリレーを制御している。各リレーはCポートの4ビットから7ビットに一一対一で対応し、それらのビットが High となれば on する。これにより、あるチャンネルだけの情報がマイコン内蔵の A/D を通して取り込まれる。

2.2.2 濁度変化及び濁度差分値の計測

Fig. 4は、オンラインシステム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すると、CRT上に各チャンネルの濁度情報データが表示され、これをモニタしながら各チャンネルの零点調整を検出部の変抵抗 Vr で行なう。この後、2.2.1で述べたマルチプレクサのリレーをマイコンで制御し、各チャンネルの濁度情報データを一定のサンプリングタイムでマイコンに取り込む。今回は、あるチャンネルから次のチャンネルの切換時間を3秒とし、1つのチ

チャンネル当り12秒間隔としている。マイコンでは、12秒毎のデータを5点平均により1分毎のデータとし、これをその時期における濁度変化値として、逐次メモリ上に記憶しながら計測している。この平均化処理は、偶発的な揺らぎ（例えば、細菌の代謝による二酸化炭素の発生に伴う気泡やごみの動きによる散乱）などによる濁度への影響を少なくするためである。このデータの時間的変化を描かせたグラフを濁度発育曲線と定義した。次に一分毎の濁度データから、後に 3.3 で詳述するが、今回我々が菌種の同定に用いた濁度差分発育曲線を求める処理を行なっている。処理プログラムは、マイコンをスタートしてから、 $10 \times i + j$ ($i = 0, 1, 2, \dots, 41; j = 0, 1, 2, \dots, 9$) 分後の濁度データを X_{ij} とすると、まずこのデータ10分間の和 $Y_i = \sum_{j=0}^9 X_{ij}$ を計算する。次に10分毎に $4Y_i = Y_{i+1} - Y_{i-1}$ を求め随時 CRT 上に表示すると共に逐次メモリ上に記録している。この $4Y_i$ はマイコンをスタートしてから $10 \times i$ 分後の等価的発育速

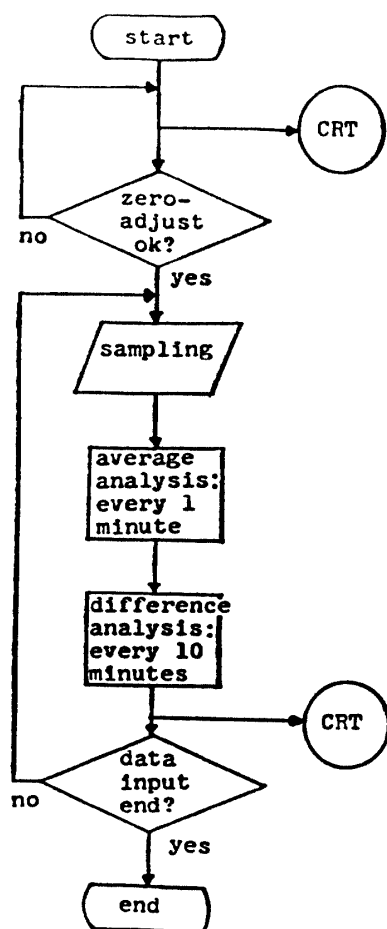


Fig. 4 Flow chart of main program in micro-computer on-line system

度で、我々はこれを濁度差分発育値とよび、これらの時間的変化を描かせたグラフを濁度差分発育曲線と定義した。これらの処理は、マイコンをスタートしてから逐次行なわれ、7時間後に終了する。全処理終了後、濁度（4チャンネル分、1.68K byte）及びその差分値データ（4チャンネル、0.168K byte）は、マグネティックテープに記録—保存され、再び新たな解析等も行なえるようにしてある。濁度発育曲線及び、濁度差分発育曲線は、メモリ上に記録されている各データをマイコンのPIOのAポート（Fig. 2, 8 bit）から出力し、D/A を通して X-Y プロッターによりハードコピーし記録される。

2.3 測定例によるシステムの安定性

2.2.2 で述べた処理によって得られた結果の一部を Fig. 5 に示す。これらは、後に述べる実験方法に従い行なった。図は、*Proteus mirabilis* (PM) と *Streptococcus faecalis* (ST) の濁度発育曲線を表わす。これらは、同一条件下（温度、培養液等）で、全チャンネルに同種の菌を同一菌濃度接種し、増殖させた結果を重ね合わせたものであり、各菌の持つ特徴的なパターンが良く再現されているのがわかる。例えば ST では、濁度が一度小さくなる時期が必ず全チャンネルとも出現している。従って定性的には、各チャンネルのばらつきはなく、安定しているといえる。最終

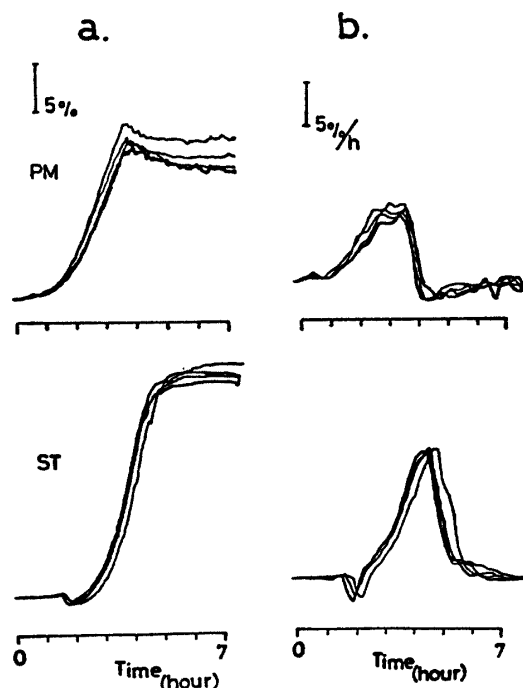


Fig. 5 Example of reproducibility of turbidity growth curve and its differential one.

値については、多少のばらつきはあるが、2.1で述べた増幅器の調整だけでは解決できない。この原因の検討は後で議論する。

3. 実験結果 (菌種同定への応用の試み)

ここでは、開発したシステムを菌種同定に応用した例について述べる。差分発育曲線により得られる情報だけで対象とした10種の菌の178例に対し93%以上の同定精度が得られた。

3.1 実験方法 (試料, 手順)

今回実験で対象とした細菌10種類をTable 1に示す。本論文中で使用している略号も合わせてこれに示している。これらの細菌は、日常細菌検査の対象となる腸内細菌で、全て山口大学医学部付属病院検査部で分離同定されたものである。検査用培養液は、一般細菌増殖用のBrain Heart Infusion (BHI) 3.7gを蒸留水100gに溶かし、作成後、加圧滅菌器(圧力鍋)を用いて121°C(2気圧)の飽和水蒸気で10分間、加圧滅菌したものを使用した。各菌は、初期条件を整えるため、BHI中で一夜培養(約37°C)される。(このときの濃度は、ほぼ 10^9 CFU/ccとなっている。)この菌は、別に用意された検査用の試験管(約1.5cc)中に、白金耳で接種される。このとき、初期菌数は、ほぼ 10^6 CFU/ccとなる。検査用の試験管等は、加圧滅菌し、接種時に用いる白金耳は、火炎滅菌を行なっている。

Table 1. Bacterial isolates tested.

Bacterial Name	
Escherichia coli	(EO)
Streptococcus faecalis	(ST)
Klebsiella pneumoniae	(KL)
Enterobacter sp.	(EB)
Serratia marcescens	(SE)
Citrobacter sp.	(CI)
Proteus mirabilis	(PM)
Proteus morgani	(PO)
Proteus rettgeri	(PR)
Proteus inconstans	(PI)

3.2 濁度発育曲線及び濁度差分発育曲線

対象とした10種類の菌の示す典型的な濁度発育曲線

及び濁度差分発育曲線の測定例をFig. 6に示す。差分発育曲線は、2.2.2で述べたように濁度データから逐次、計算されたもので、菌の増殖の割合の時間的変動が濁度差分発育曲線により詳細に反映している。これは、菌種を同定する目的から極めて有効な情報を与えており我々は、これを今回の菌種の同定に用いた。

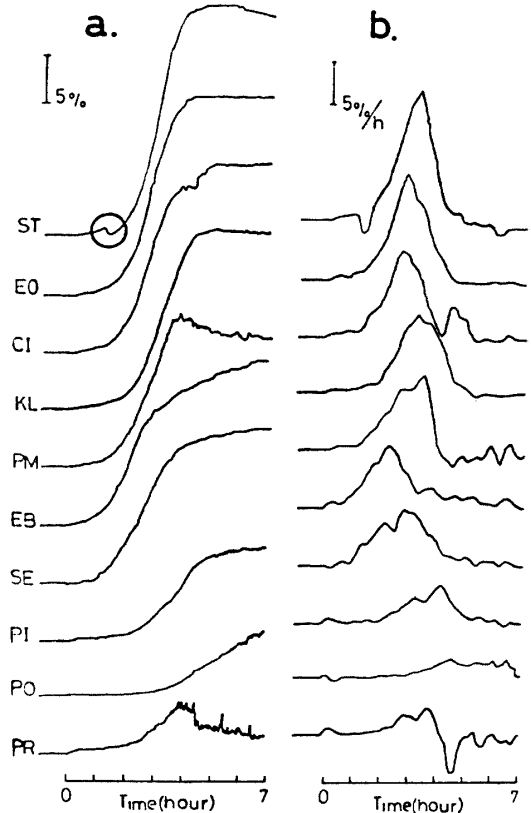


Fig. 6 Typical example of growth curve of ten bacteria.

3.3 濁度差分発育曲線パターンを用いた同定の試み

Fig. 7に今回我々が菌種同定解析処理に使用した距離計算のプログラムのフローチャートを示す。対象とした10種類の菌の濁度差分発育曲線の中で再現性の良いデータを各々いくつか平均し、これを各菌種の標準パターンとした。この際、菌の増殖を最も特徴付けていると思われる区間(以下特徴パターン区間と称す)をデータ41点(7時間)中より30点(5時間)選び標準パターンとしてマイコンメモリの別の領域に記憶させた。これを新たに得られた未知の菌の濁度差分発育曲線(以下サンプルパターンと称す)との最短距離 D_{min} を求めるために使用している。この際、初期接種菌数のばらつきによる特徴パターン区間の出現時間に変動があることを考慮しサンプルパターンデータ

(41点)を1点ずつ、12回スライドさせ各距離を求めた。このとき、スライド数 P における距離 $D(P)$ を次式で定義した。

$$D(P) = \sum_{i=0}^{29} |\tau_x(P+i) - \tau_s(i)| \quad \dots\dots(1)$$

ここで τ_s は標準パターンデータ、 τ_x はサンプルパターンデータを示す。 $D(P)$ 中の最小値を D_{min} とした。この D_{min} の値から菌の類似度を評価する。

D_{min} が小さいほど類似性がある。Fig. 7 に示したこ

の解析プログラムのフローチャートでは順次サンプルパターンをスライドして $D(P)$ を計算し、この中の最小値 D_{min} を選び出しこのときの P を P_{min} とし、この解析結果 D_{min} と P_{min} をラインプリンタに記録させた。

Table 2 に以上の解析により求められた結果の1例を示す。この場合菌 PI との距離が55で最小であ

Table 2. The results of distance analysis

Name	Distance (D_{min})	Slide No. (P_{min})	
EO	592	11	
ST	737	7	
KL	450	9	
EB	233	10	
SE	191	7	*
CI 1	445	10	
PM	517	10	
PO	185	0	*
PR	361	10	
PI	55	8	**
CI 2	486	11	

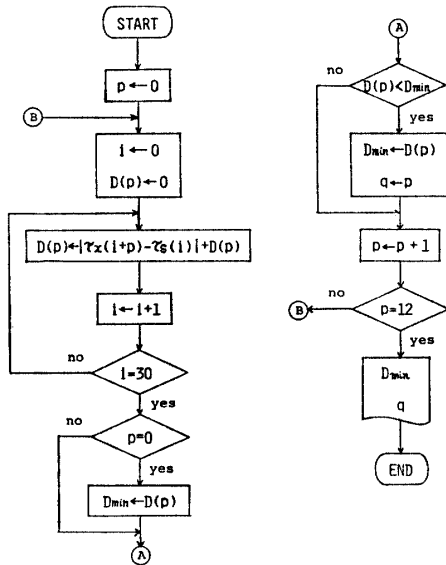


Fig. 7 Flow chart of distance analysis of differential growth curve.

Table 3. Example of the result of bacterial identification by distance analysis.

TESTED BACTERIA	IDENTIFIED BACTERIA									
	EO	ST	KL	EB	SE	CI	PM	PO	PR	PI
EO	33	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ST	—	24	—	—	—	—	—	—	—	—
KL	3	—	21	—	—	—	—	—	—	—
EB	—	—	—	18	2	1	—	—	—	—
SE	—	—	—	—	15	—	—	—	—	1
CI	1	—	2	—	—	15	—	—	—	—
PM	1	—	—	—	—	—	12	—	—	—
PO	—	—	—	—	—	—	—	11	—	—
PR	—	—	—	—	—	—	—	—	8	1
PI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9

166/178 : ACCURACY = 93.3%

り、同定した菌が PI であることを主張すると共に、この解析法で比較的類似した菌として距離185のPO, 191のSEが候補としてあげられている。(CIについては2つの標準パターンを用意した。)以上の同定法を適用した結果、178例中166例の正確な判定を行ない、93.3%の確率が得られた。Tabel 3にその判定結果を示す。

4 システムの検討

ここで行なった同定法は、限られた菌種(10種)の限られた実験例(178例)に対して試みたものであり実際に臨床的に使用するにはデータが不十分である。しかし少なくとも同一の菌株であれば同一形の発育曲線パターンを再現する。1種類の培養条件(BHI)下での計測で高い同定率を得たことを考え合わせると基本的な方針は見い出せたといえよう。今回試作した4チャンネルシステムは同一条件下での同時計測という利点を生かし研究段階での実験の迅速化が主たる目的であった。今後、臨床細菌検査に則した糖分解能テスト、薬剤感受性テストなどに使用してゆく場合には相異なる培養条件下での同時測定(多チャンネル化)が必ず必要となる。以下多チャンネル化を中心に試作システムの問題点について検討する。

2.3で述べたように今回試作した4チャンネルの安定性については定性的にほぼ満足な結果が得られたと言える。我々は各チャンネルにおけるばらつきをハードとソフトの両面から押えてきた。ハードにおいては各チャンネルの検出部の感度を次段の増幅器で調整し、ソフトにおいては平均化処理を行なったことなどで良好な安定性を得た。しかし絶対値については多少のばらつきがあった。この原因については、培養液セルの形状に問題があると思われる。現在、8mmφの小型のガラスセルを使用している。曲率が大きく、その位置によりレンズ効果が著しく変わることに原因がある。この解決法としては、(1)培養液セルの直径を大きくし曲率を小さくすること、(2)培養液セルを箱型(平面化)にし曲率の影響を全くなくすることが考えられる。(1)の場合においては大型にすればするほど曲率は小さくなり、それによる影響は軽減されるであろう。しかし多量の培養液が必要となる事や検出部が大型化することで、ある程度の限度がある。(2)の場合においては最も理想的なセルの形状といえるが、これはガラスでは工作が難しくプラスチック等になる。プラスチックでは殺菌が困難であり使い捨て

となる。(1),(2)を比較検討すれば研究開発段階においては限度があり、(1)による安定度アップが妥当であろう。また(2)の方法はシステムが完全に確立し、実用化する場合に採用することが考えられる。(1)の方法においてさらに安定性を持たせるには、(3)セルの方向、位置を固定する方法が考えられる。実験毎の各チャンネルにおける感度変化がなければ2.1で述べたように次段の増幅器であらかじめ各チャンネル感度のばらつきを補正でき問題はないと考えられる。

したがって今後、多チャンネル化し臨床細菌検査に則したテストなどに使用できるシステムを開発する場合、前述の(1),(2),(3)を考慮する必要がある。

現在、当研究室において(1),(3)の方法で実験を行ない検討中である。

5 まとめ

本報告において我々が開発している菌種同定システムにいくつかの有利な点が示された。これらを下記にまとめる。

- 1) マイコンを導入し、菌増殖に伴う濁度変化情報を逐次計測しモニタする細菌検査自動処理オンラインシステムを試作した。
- 2) 数種の菌について上記のシステムで濁度発育曲線を計測し良好な再現性を得た。
- 3) 同システムを用い10種の菌を対象に菌種同定を試みた結果、一種の培養条件のみのデータで93.3%の確度を得、実際の臨床検査に応用する基盤を確立した。

最後に、平素実験装置の作成、実験の補助等に御協力を頂いた山口大学工学部電気工学科の谷戸宗吉技官に謝意を表します。

参考文献

- 1) Ur. A&D, F.J. Brown: J. Med. Microbiol., 8, 19 (1975)
- 2) P. Cady, S.W. Dufour, P. Lawless, B. Nunke & S.J. Kraeger: J. Clin. Microbiol., 7, 273 (1978)
- 3) 高宮春男 医薬情報セミナー「細菌検査の自動化、迅速化手法の開発導入の実際」
- 4) G.E. Buck, B.H. Sietlaff, R. Boshard & J.M. Matsen: J. Clin. Microbiol., 6, 46 (1977)
- 5) 古田 格, 大田恒子, 大場康寛: 臨床検査機器, 試薬. 3, 255 (1980)
- 6) P.J. Wyatt: Applied Optics, 7, 1879 (1968)

- 7) C.S. Gutteridge & J.R. Norris: *J. Appl. Bacteriol* **19-1** (1981)
ogy, **47**, 5 (1979)
- 8) 三池秀敏, 橋本 基, 蛇名良雄: *臨床病理*, **27**, 558 (1979)
- 9) 橋本基, 三池秀敏, 蛇名良雄, 宮地隆興: *医用電子と生体工学*,
10) *SORD M100 Computer マニュアルP V 1-34* (昭和55年10月15日受理)