

コロニー形態の時間変化に着目した細菌自動検査の試み

山田健仁*・橋本 基**・三池秀敏**・蛭名良雄**・宮地隆興***

A Computer System Identifying Bacteria by Monitoring Colony Forming Process

Takehito YAMADA*, Hajime HASHIMOTO**, Hidetoshi MIIKE**
Yoshio EBINA** and Takaoki MIYAJI***

Abstract

A measuring and data processing system is made up by using microcomputer set (PC-8001), TV camera combined with microscope, and digital memory (DM 301) as A/D transducer. The optical source condition is discussed for observing stereo-type microscopical pictures. The colony forming process is examined by the system to get characteristic parameters of bacteria. The examined bacteria are typical nine coliform ones isolated from clinical sample. The culture medium is Brain Heart Infusion agar plate. As characteristic parameters, we propose the time course of colony area and volume which are automatically estimated from the digital pictures. The identification of nine bacteria is tried by using these parameters, and gives good result.

1. ま え が き

臨床細菌検査において細菌検査は検体中の菌種の同定、菌数の推定、及び薬剤感受性を主な目的としている。しかし、現在病院などで行なっている細菌検査では、多くの人手と時間を要する。すなわち、採取した材料を寒天平板上に塗抹培養することにより分離株を得ることから始まり、その分離した細菌を培養し、種々の化学薬品、抗生物質を用いて生化学的性質から細菌の同定を行い、またその感受性の程度に応じて対策を講じる。また、検体を希釈し分離培養して、生じたコロニー（細菌集落）を数えて細菌数を推定する方法（コロニーカウント法）が行なわれている^{1), 2)}。

以上のような従来の方法を単純化するのみでは本質的に検査の迅速化は期待できない。そのため近年、複雑な検査プロセスの特定の段階を省き細菌検査の迅速化、自動化への試みが数多く発表されている。その中には、細菌培養液の電気伝導度変化の測定による方法、培養液の光透過度の変化から光学的に測定する方

法などの物理的測定技術を導入し自動化を目指すもの^{3), 4)}、生化学検査のキット化による簡易法⁵⁾などがある。

しかし、これらの方法の場合、寒天培地上での培養による検体の分離株を求めることから出発するため、これだけで1日以上時間を必要とする。検査時間を本質的に短縮するために分離培養の段階を利用する菌種分類は魅力あるテーマである。

そのために分離培養段階でのコロニーの形成に着目し、その顕微鏡画像よりコロニーの特徴抽出を試み、コロニーを分類することを考えた。これはまた時間変化する立体像の顕微鏡画像に対する特徴抽出の問題でもあり、現在まだ解決を見ていない。顕微鏡画像を利用することは人間の目では捉えきれない微小な対象を扱えうる、人間の目で判別する場合には個人差が存在するがこれを除去できる可能性等の利点がある。一方、対象をコロニーとした場合、どの程度の大ききになればその存在を捉えうるか、分離増殖のためには、検体をいかに接種すれば観測しやすいか（接種方法）の問題が存在する。

本報告では、自動的にとらえうるコロニー画像特徴の再現性を確かめるため一個のコロニーのみを調べるこ

* 大学院電気工学専攻

** 電気工学科

*** 本学医学部付属病院

とにする。

すでに医用顕微鏡画像処理の分野ではガン細胞の診断、白血球の分類、異常染色体の分類の自動化装置が開発されフィールドテストの段階に到っているものもある^{6), 9)}。

コンピュータを中心としたオンライン自動計測の利点は次のようにまとめられよう。

- 1) 観測時間が長くて良い。(省力化できる)
- 2) 時間変化の特徴をソフトウェアの工夫により多面的に捉えうる。
- 3) 多重情報を視覚化できる。

これらの利点を利用し我々はコロニー形態の時間変化に着目した細菌の自動検査のための安価なシステムの製作と特徴抽出のためのソフトウェアの開発を試みた。本報告では基礎的データを得ることを目的とした。このためシステムはTVカメラとマイクロコンピュータ(以下マイコン)フロッピーディスク(F.D.)というコンパクトなものとした。コロニーの形態変化から、自動的にコロニーの面積変化、立体的な形態変化の特徴パラメータ抽出を行い、これらを組み合わせることにより腸内細菌を中心とした9種類の細菌を判別することができたので報告する。

2. 実験方法

2.1 測定システム

測定システムのブロック図を Fig. 1 に示す。本システムはマイコン(PC-8001)を中心とするが以下各部分について説明する。

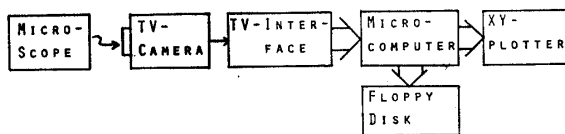


Fig. 1 Blockdiagram of monitoring system

Microscope 部: Nikon の MD-2 倒立顕微鏡を用いた。コロニーの顕微鏡像は立体像のため光源には特に注意を必要とする。光源を絞るとレンズ作用によりコロニーの透過像は実体像と著しく異なる。また光を散乱させすぎると像の周辺部のぼけが大きくなりコロニーの形態を捉えにくくなる。そこで、ここでは集光レンズをはずし、更にシャーレの上蓋に葉包紙を置いて散乱入射光を得た。

TVカメラ部: 透過像はTVカメラ(日立CCTV、

HV-62形)を通してTVカメラインタフェース(TV CIF)により8 bit, 44×44点のデジタル画像に変換される。

マイコン部: デジタル画像は一定時間毎に自動的にマイコンのメモリに取り込まれ処理される。またデータはフロッピーディスク(PC-8031)で磁気ディスクに保存される。処理後のデータはメモリに蓄積されX-Yプロッタ(渡辺測器 MIPLLOT)でハードコピー可能である。システム全体はマイコンにより制御される。

2.2 試料と実験手順

今回実験で対象とした菌種は Table 1 に示す9種類の細菌であり、本稿中で使用している略号も合わせて示す。

Table 1. Bacterial name tested and its code

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

日常細菌検査の対象となる腸内細菌を中心としており、各菌の固有の特徴パラメータを求めるため、山口大学医学部付属病院検査部において分離同定されたものを用いた。また検査用の寒天培地は一般細菌増殖用の Brain Heart Infusion (BHI) を混合したものを用いた。

各菌は実験の初期条件を整えるため BHI 寒天平板上に白金耳を用い、懸濁液を画線塗抹し、一夜培養する。充分成育したコロニーよりガラス細線(先端直径約200μm)で細菌を採取し、ガラス細線をマニピュレータにセットし、顕微鏡で見ながら位置を定め、予め保温しておいた BHI 寒天平板上にきずをつけないように接種する。(Fig. 2)

この接種法では菌数は10⁴~10⁵個になる。これによりコロニーの位置が定まり、初期接種数が多いため、コロニー形成の時間を早め、測定時間が短縮される。また一個の菌から成長させてもあとで示すようコロニーの形はほぼ同じになる。

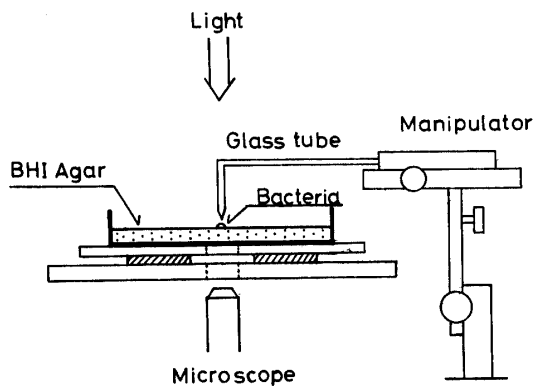


Fig. 2 Inoculation apparatus

接種された寒天平板は約37°Cで保温培養される。この際シャーレの上蓋に水滴がつかないようにシャーレの上面も温めてある。

この培養状態が Fig. 1 のシステムにより捉えられコロニーの形成過程が測定される。

2.3 ソフトウェア

システム全体は中心のマイコンで制御されるが、測定処理する主なプログラムは次の3部に分かれる。

- 1) コロニーの初期位置を決めるプログラム。
- 2) 一定の間隔でデータのサンプリングと、ディスクの制御を行うプログラム。
- 3) 画像の歪補正とコロニー部のエッジ検出とこれに基づく画像の2値化を行いコロニー面積の変化等を処理するプログラム。

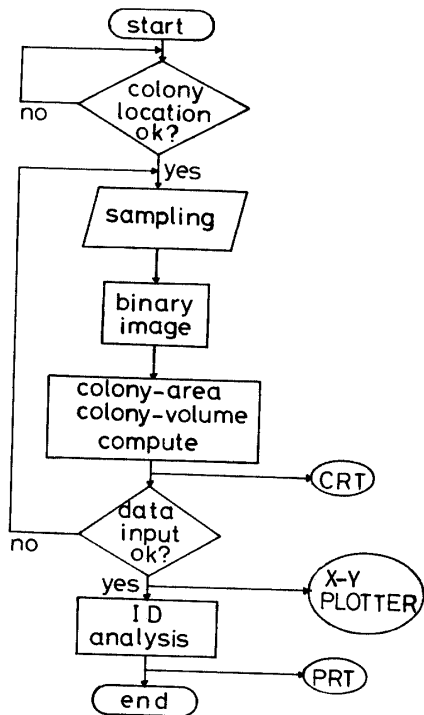


Fig. 3 Flow chart of monitoring colony forming process and data processing

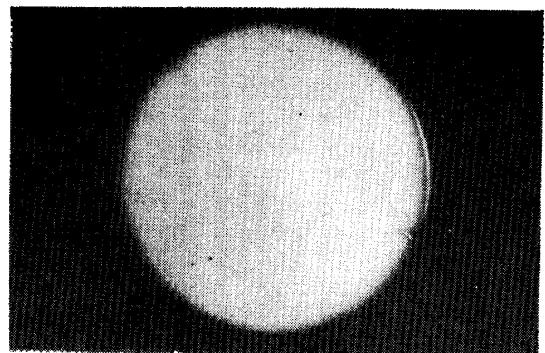
以上のプログラムによって計測が行なわれ、計測後データを X-Y プロッタ, プリンタに書き出す。また得られたデータに基づき解析を行う。

Fig. 3 にこれら一連の作業の流れ図を示す。

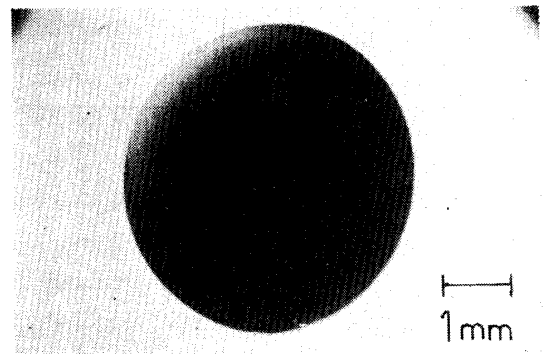
3. 実験結果及び議論

3.1 コロニーの実体像と再生像との比較

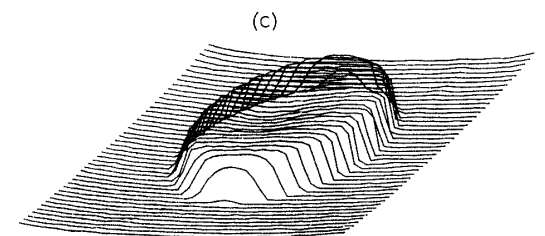
まずコロニーの反射光による像と透過光による像との対応を述べる。



(a)



(b)



(c)

Fig. 4 Image of colony form (KL)

- a) reflected picture
- b) transmitted picture
- c) digitalized picture from b)

Fig. 4 (a) に KL のコロニーの反射光顕微鏡像の写真, (b) に透過光顕微鏡像の写真を示す。また (c) に

透過像のデジタル再生像を示す。透過像のデジタル画像は中心がやや凹になっているがこれは肉眼による実体像との比較からコロニーのレンズ作用によるものと思われる。今回使用した菌種は、ほぼこの **KL** と同様に円形、またはそれに近い周辺形状を呈す。しかし、厚みは異り **KL** のような凸レンズ状を示すものと、**CI** のように扁平なもの、これらの中間の **PR** などに分かれる。デジタル画像はコロニーの盛り上りの形態（立体的）とその透明度の複合情報を含んでいる。したがってデジタル画像とコロニーの実体像（反射光による）との間にはある程度の差異が存在する。コロニー面積の時間変化を求めてみる。このためコ

ロニーデジタル画像を2値化する。寒天上のコロニーの特色を生かして、境界値をまず次のようにして決めた。コロニーの中心は動かないのでコロニーが存在している部分の行、列の差分値をとり、この値が実験的に求めた閾値(5)を越える画素の濃度値の平均値を2値化の閾値とする。この閾値以上の濃度値をもつ画素を総計しコロニーの等価的な面積（以下コロニー面積）とする。また閾値以上の画素の濃度値を総計したものを等価的な体積（以下コロニー体積）とする。

一定時間毎（10分間隔）に自動的にコロニー面積・体積を計測し発育過程を調べた。

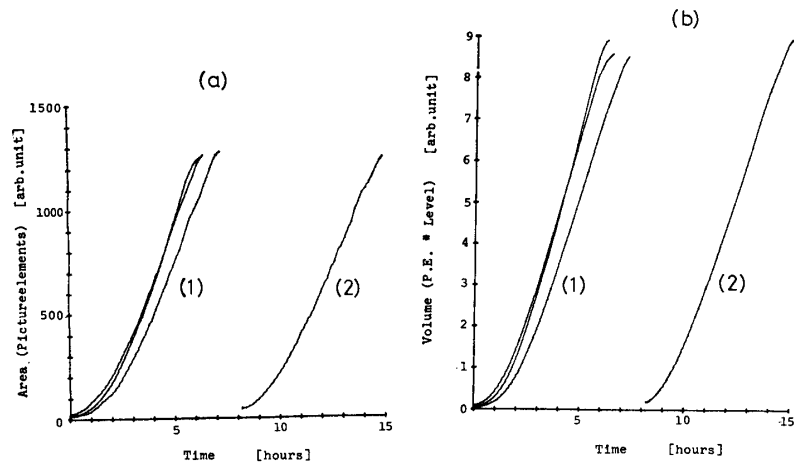


Fig. 5 Reproducibility of the colony growth curves (KL)

a) colony-area curves

b) colony-volume curves

(1) grown from many bacteria

(2) grown from one bacterium

3. 2 コロニーの等価的面積・体積変化

Fig. 5 (a) (b) は、コロニー面積・体積変化パターンの再現性を確かめた結果である。横軸に時間、縦軸にコロニー面積・体積をとった。接種菌数はガラス細線の先端の状態に依存するためばらつくが、たんに時間軸を平行移動するだけでほぼ重ね合わせることができる。

以上は接種菌数が多数個の場合であるが一個の菌からコロニーを作ったときのコロニー面積・体積変化の対応をみてみよう。一個の菌は画線塗沫により分離し本システムが捉えうる大きさになった状態（接種後約8時間）で画面の中心にセットした。**KL** についてこの結果を Fig. 5 (a) (b) に示す。それぞれ8時間を

起点としている。図からわかるように時間軸の平行移動だけで多数個の場合におけるコロニー面積・体積変化のパターンに重なる。また肉眼による観察でも両者のコロニー形状に差異は認められなかった。以上のことから多数個の菌を接種してもその菌のコロニーの特徴は失なわれることなく測定時間の短縮をはかりうる事がわかる。今回は菌種間のコロニー形態の時間変化の差異を捉えることを目的としたため多数個接種する方法をとった。

Fig. 6 は各菌種に対するコロニー面積・体積のパターンである。各曲線は各々の菌種に特有のパターンを有している。これらの変化曲線が細菌の増殖過程を反映していることは明らかである。

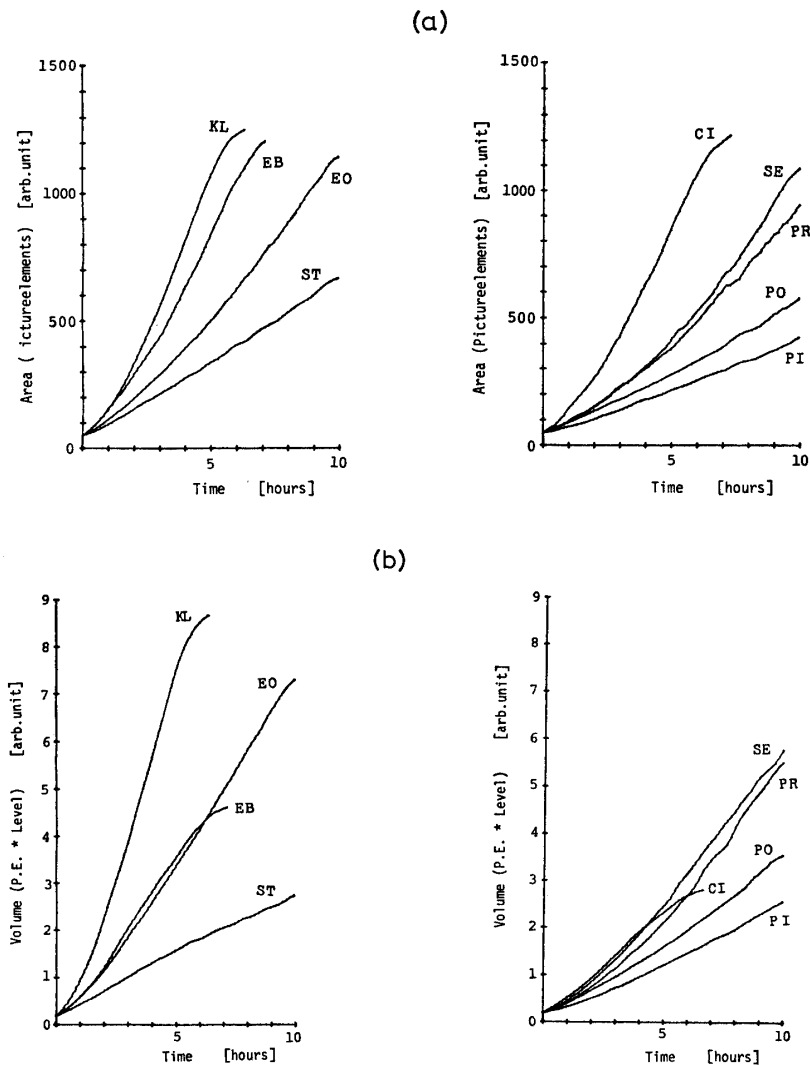


Fig. 6 Characteristic growth curves of nine bacteria

- a) colony-area curves
- b) colony-volume curves

3.3 発育曲線（コロニー面積・体積変化曲線）と標準パターン間の距離解析

コロニー面積・体積変化曲線（以下発育曲線）の再現性に注目し、同一の菌種について得られた2, 3例の発育曲線を平均し標準パターンとし、そのパターンと新たに得られた未知の菌での発育曲線との距離を求めることで、各パターンの類似性を検討した。この場合接種菌数が不定であるため、比較するパターンを初期値をある一定値としパターンを時間軸上で平行移動して距離を求めた。パターン間の距離 D は

$$D_s = \sum_i |S_x(i) - S_s(i)|$$

$$D_v = \sum_i |V_x(i) - V_s(i)| \dots \dots (1)$$

で定義される。ここで S_x, V_x は未知のパターンのコ

ロニー面積・体積を、 S_s, V_s はその標準パターンを示す。

さらに類似度を求めるために、次式で定義される判別関数 ID を用いた。

$$S-ID = \left\{ 1 - \frac{\sum_i |S_x(i) - S_s(i)|}{\sum_i S_s(i)} \right\} \times 100(\%)$$

$$V-ID = \left\{ 1 - \frac{\sum_i |V_x(i) - V_s(i)|}{\sum_i V_s(i)} \right\} \times 100(\%) \dots \dots (2)$$

Table 2 は以上の操作で求められた各菌種の標準パターンと未知の菌との類似度を ID で表わしたものである。Table 2 (a) は未知の菌が KL に最も近いことを示しており実際この菌は KL であった。一方、(b) は ID が2種の菌でほとんど同じ例である。これは発育曲線 (Fig. 6) を比較してもわかるようにか

Table 2. Example of ID (identify parameter) value

| | | | | BACTERIA | | | | |
|-----|----------|------|------|----------|----------|------|------|----|
| | BACTERIA | S-ID | V-ID | | BACTERIA | S-ID | V-ID | |
| (a) | EO | 41 | 36 | (b) | EO | 80 | 69 | |
| | EB | 87 | 13 | | EB | 56 | 75 | |
| | ST | 0 | 0 | | ST | 74 | 41 | |
| | KL | 98 | 97 | | ** | KL | 50 | 41 |
| | CI | 88 | 0 | | CI | 56 | 68 | |
| | SE | 18 | 0 | | SE | 91 | 90 | ** |
| | PO | 0 | 0 | | PO | 53 | 58 | |
| | PR | 0 | 0 | | PR | 97 | 98 | ** |
| | PI | 0 | 0 | | PI | 7 | 9 | |

なり類似したコロニーの成育を示す。したがって類似度 ID は菌種判別に有効であるが、ID で接近する菌種については新たなパラメータが必要だといえる。

3.4 コロニーの形態変化

コロニーのデジタル画像からその等価的な立体像を解析する。各画素は 8 bit の濃度値で表わされてい

る。各々の濃度で切断したときの断面積を各々の濃度での画素数を計数して求める。

Fig. 7 に横軸を面積（画素数）、縦軸に濃度値をとったコロニー像の形態変化を 2 例示す。なお図中の曲線につけた数字は接種後の時間（hour）を表わす、この曲線をたどることによってコロニーが立体的に成

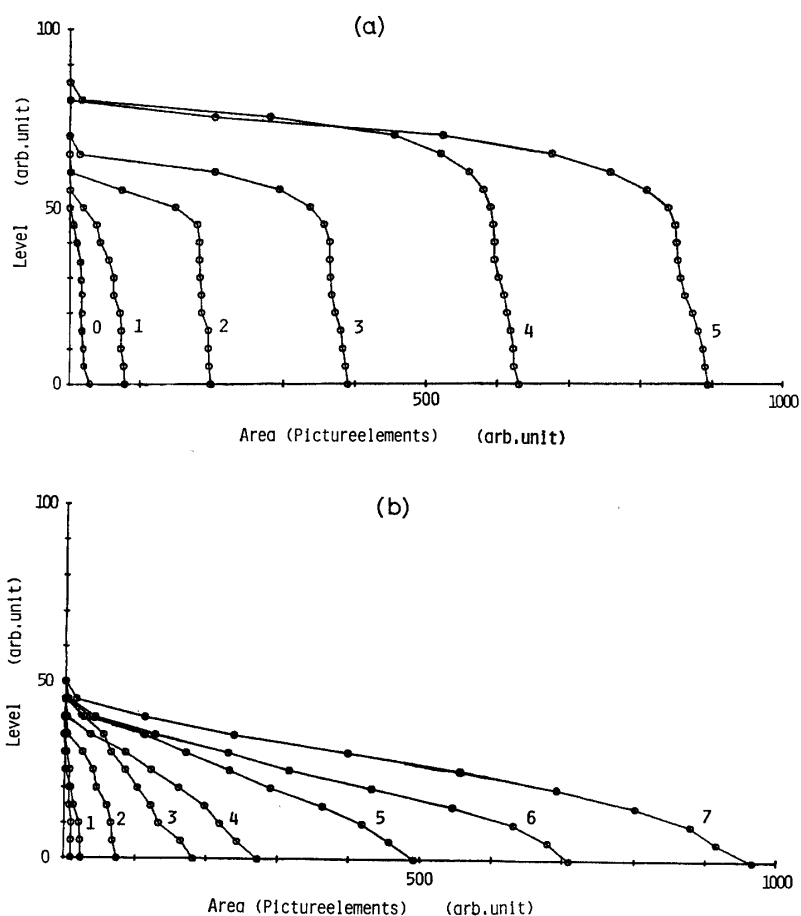


Fig. 7 Equivalent 3-dimensional picture of colony form
(a) KL, (b) CI. Added numbers represent the time from inoculation.

育していく様子を透過度変化として捉えうる事がわかる。

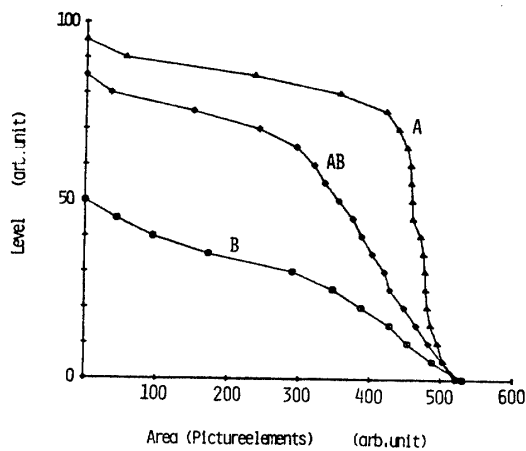


Fig. 8 Characteristic equivalent 3—dimensional picture of each bacterial colonies.

次に各菌についての結果を Fig. 8 に示す。変化曲線はほぼ3種類の特徴的なパターンに分かれる。

その1は、KLのタイプ(A)でコロニー周辺部より濃度が急激に増しており最高濃度値も大きい。その2は、CIのタイプ(B)である。周辺部よりの濃度値は緩かに増加しており最高濃度値も小さい。その3は、これらの中間タイプ(AB)でPR等に見られる。これらを肉眼の観察と対応づけてみる。

Aタイプはコロニーが盛り上がる凸レンズ状、Bタイプはコロニーが低く扁平または透明度の高いもの、ABタイプはその中間的なものである。しかし、菌の中にはパターンが一定ではなく、あるときはBタイプであるときはABタイプを示すものがある。また、A、B、ABタイプには各々いくつかの菌種が含まれているためこれのみでは菌種の判別はできない。しかし、菌種情報が含まれているのですので3.3で述べたパラメータと組み合わせて菌種により正確な判別に利用できる。例えばTable 2(b)の例ではPRとSEのIDが接近しているが、コロニー形態は、前者はABパターン、後者はAパターンと異なっている。したがってこの二菌種を別のものとしてはっきり判別できる。

この立体的形態変化をより詳しく分類することができれば有効なパラメータとなる。

4. ま と め

コロニー形態の時間変化に着目し、オンライン画像処理による特徴パラメータを検討した。以下要約する。

- 1) コロニーの形態変化を自動的に捉え、処理可能な簡易な画像処理システムができた。
- 2) コロニーの面積・体積の時間変化は菌種により異なっており、これは増殖時の差を反映していることがわかった。
- 3) 2)の結果より判別関数IDを用い類似度を明らかにできた。
- 4) 透過光の濃淡によって作られる等価的立体像は各菌である程度の差異があり、ほぼ3つのパターンに分類できた。再現性の点は今後の課題として残った。

今後実験例を増やし、臨床面への応用の可能性を探ってゆきたい。

最後に、本研究を進めるにあたって、測定装置の試作および実験に協力頂いた当検究室の諸氏に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 戸田忠雄, 武谷健二: 戸田新細菌学, 南山堂 (1974)
- 2) 橋本雅一: 臨床検査講座, 医歯薬出版 (1977)
- 3) 橋本 基, 井本恒雄, 三池秀敏, 吉賀和利, 蛇名良雄, 宮地隆興, 山本英弘: 山口大学工学部研究報告, 29, 71 (1978)
- 4) 三池秀敏, 橋本 基, 蛇名良雄, 佐藤和雅: 電子通信学会, MBE 79-73, 69 (1980)
- 5) 米谷 孝, 武田 勇: 臨床病理, 27, 553 (1979)
- 6) 尾上守夫: 医用電子と生体工学, 16, 159 (1978)
- 7) 高木幹雄: 医学のあゆみ, 110, 769 (1979)
- 8) 天神美夫, 尾上守夫, 久野義徳: 医用電子と生体工学, 17, 441 (1979)
- 9) Robert S. Ledley: SCIENCE, 146, 216 (1984)

(昭和55年10月15日受理)