

## 画像処理を用いた菌発育終末点の新しい判定法

荻原 利彦<sup>1)</sup>・高本 雄治<sup>2)</sup>・柴田 明佳<sup>3)</sup>・沼田 千鶴<sup>1)</sup>・小林 正幸<sup>4)</sup>・菅野 治重<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 麻布大学環境保健学部\*

<sup>2)</sup> サッポロビールプラント事業部

<sup>3)</sup> 日本医科大学多摩永山病院

<sup>4)</sup> 第一精密開発部

<sup>5)</sup> 千葉大学医学部

(平成9年10月29日受付・平成10年1月20日受理)

一般細菌および酵母様真菌に対する感受性試験の MIC 判定には、凝集法（日本化学療法学会）、濁度法（NCCLS, 日本医真菌学会）、酸化還元反応呈色色素法などが用いられている。一般に、MIC 判定ではその自動化や判定値の客観性が求められ、それぞれの方法に利点があるものの、問題点も指摘されている。今回、我々は感受性試験の MIC 判定法の一つである凝集法に注目し、画像処理技術を用いて、凝集性を有する菌について菌発育に伴う凝集沈殿塊を調べ菌発育終末点の判定を試みたところ、いくつかの問題点を解決することができた。この方法を用いることにより、自動化はもちろん、凝集法の欠点であった主観性を排除して客観的に結果を検討でき、凝集法における MIC 判定の応用範囲拡大の可能性が示唆されたので報告する。今回、凝集性の強い ATCC 株の 3 菌種を、日本医真菌学会提案の抗真菌剤感受性試験法に準拠して作成された検査用マイクロプレートである「酵母様真菌 FP」を利用して、37℃ で 48 時間培養した後、凝集法と濁度法により菌発育終末点を判定した。さらに、プレートウェル底面の凝集沈殿塊像をパソコンに取り込み、画像処理により凝集沈殿塊の面積と個数を判定し、日本化学療法学会より提案された MIC 判定法にそって菌発育終末点を判定したところ、本方法による菌発育終末点は、目視による凝集法によって得られた菌発育終末点とほとんど一致し、濁度法による菌発育終末点とも近い値であった。この結果、凝集性を有する菌であっても画像処理法を用いることにより、菌の発育陽性判定を客観的に判定できる可能性が示唆された。本方法を濁度法と併用することにより、信頼性の高い MIC 自動判定システムの構築が可能であろう。

**Key words:** image processing, MIC, endpoint, microdilution, yeast

一般細菌においては、1990 年に日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告<sup>1)</sup>により微量液体希釈法による MIC 判定の標準化が行われた。一方酵母様真菌に対する抗真菌剤薬剤感受性試験の標準化への試みも進んでいる。これらの試みへの第一歩としては、National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) による 1982 年の抗真菌剤薬剤感受性試験の実態調査結果を踏まえた、1992 年の標準化勧告案 M27-P が挙げられる<sup>2)</sup>。さらに 1995 年、NCCLS は M27-P を改訂し、より実用化へと向けた M27-T を提案している<sup>3)</sup>。また、1995 年には国内においても、M-27P に準拠しながら改良を加えた感受性試験法が日本医真菌学会から提案された<sup>4)</sup>。

M27-P は macrodilution 法であったが、その後提案された M27-T や日本医真菌学会提案の試験法では、現場の検査室でも応用のきく microdilution 法であった。しかしながら、この微量液体希釈法であっても、より簡便に抗真菌剤薬剤感

受性試験ができる薬剤固着型マイクロプレートの安定供給と、MIC 決定のための簡便で客観的な菌発育終末点の測定法の確立という問題点が浮かび上がってきた。最近、日本医真菌学会提案の試験法に準じた試験試薬として、薬剤固着型マイクロプレートが開発され、これを用いた比較試験における結果は日本医真菌学会試験法と高い一致性を示した<sup>5)</sup>。

一般細菌の MIC 判定法としては、日本化学療法学会による、凝集沈殿塊の大きさや個数を肉眼的に確認する方法がある<sup>1)</sup>。また、酵母様真菌の MIC 判定法では濁度法、すなわち菌が発育した液体培地を振盪攪拌し、目視またはマイクロプレートリーダーを用いて濁度を調べて MIC 値を判定する方法がある<sup>4,6)</sup>。さらに、酸化還元反応呈色色素を用いて、菌発育の状態を色調で判定しようとする方法もあり<sup>7-9)</sup>、標準法との互換性や再現性の高さが確認されている。

我々はより簡便で客観的な菌発育終末点の判定方法を開発

中であるが、目視法の応用範囲拡大の可能性を追求するため、画像処理技術を導入して菌発育終末点の判読を試みた。今回、菌凝集性の強い ATCC 株 3 菌種を薬剤固着型マイクロプレートに接種培養し、ウェル底面の顕微鏡画像をパソコンに取り込み、凝集沈殿塊の個数と面積を求めた。その個数と面積値を、目視法と濁度法にもとづいて判読した菌発育終末点と比較し、画像処理法による MIC 判定の可能性を検討した。

### I. 材料と方法

試験菌株の薬剤感受性測定には、手技による誤差を極力避けるため、薬剤感受性測定用マイクロプレートである「酵母様真菌 FP」(栄研化学)を利用した。このマイクロプレートは日本医真菌学会提案の標準試験法である微量液体希釈法に準拠して作製されたもので、96 穴の各ウェルには、RPMI1640 培地で 10 段階に希釈された 5 種の薬剤が凍結され、 $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存されたものである。薬剤の種類とその濃度は、アムホテリシン (amphotericin B; AMPH-B): 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ , フルシトシン (flucytosine; 5-FC) とフルコナゾール (fluconazole; FLCZ): 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64  $\mu\text{g/ml}$ , イトラコナゾール (itraconazole; ITZ): 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{g/ml}$ , ミコナゾール (miconazole; MCZ): 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{g/ml}$  となっている。

測定菌には、凝集性が強く、今回入手の機会を得た ATCC 株の *Candida parapsilosis* (ATCC 90019), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258) の 3 菌種を用いた。接種菌は、生理食塩水に接種真菌を入れトーマ血球計算板で菌数を算定した後、ウェル内の最終接種菌濃度が  $1 \times 10^8$  CFU/ml になるように分注した。今回は、移動による沈殿凝集塊の変形を避けるため、菌を接種したマイクロプレートを顕微鏡上の細胞培養用恒温器に入れたので、培養温度は  $37^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した。

#### 1) 肉眼による菌発育終末点の判定 (以下目視法)

日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告<sup>1)</sup>の一般細菌のための発育陽性の判定法である、「直径 1 mm 以上の凝集沈殿塊または 1 mm 以下であっても 2 個以上の凝集沈殿塊が認められた場合は発育陽性とする」という判定法にもとづき、マイクロプレートウェル底面からの目視により、発育陽性が認められなかった希釈濃度の最小濃度を菌発育終末点と判定した。

#### 2) 濁度による菌発育終末点の判定 (以下濁度法)

マイクロプレートリーダー (MTP-32, CORONA ELECTRIC) を使用して波長 630 nm の光を用いて各ウェルの濁度を測定した。0.2 × (PC-NC) + NC で計算された値を基準値として、発育コントロールの 80% 阻止濃度 (IC<sub>80</sub> 法<sup>2)</sup>) 以上の発育が認められた場合、すなわち基準値より高い値のウェルを発育陽性とし、菌

発育を阻止した濃度の中で最小の希釈濃度を菌発育終末点とした。ただし、PC はポジティブコントロール、NC はネガティブコントロールにおける濁度の値であり、測定直前にプレートミキサー (EM-33, TAITEC) で 1 分間振盪攪拌した。

#### 3) 画像処理による菌発育終末点の判定 (以下画像処理法)

画像処理による凝集沈殿塊面積の測定は、48 時間培養後のマイクロプレートを、顕微鏡用ビデオカメラ (IF-8500, Ikegami; コネクターレンズ×2.5) を取り付けた倒立顕微鏡 (IMT-2, オリンパス; 対物レンズ×1) に装着したウェルスキャナー (WS-R AX-C-P, 第一精密) にセットし、ウェルを一穴ずつ移動させながら、各ウェルの顕微鏡画像データをパソコン (Macintosh Performa 5220, Apple computer) に TIFF 方式を用いてグレースケールで取り込んだ。一画面の大きさ縦 7.8 mm, 横 10.5 mm の解像度を、それぞれ 240 dot, 320 dot に設定したので、一画面を構成する 76,800 個の各一点 (ピクセル) が占める面積は  $1.066 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  である。また、各点の濃淡は 256 階調 (8 ビット) で表わした。

ウェルスキャナーの設定移動距離と実際の移動距離のずれによりウェル周辺部に濃淡のむらができた。この影響を避け、かつ正規化を考慮し、ウェル中央部の面積  $10 \text{ mm}^2$  に相当する円内を測定範囲とした。この中央測定範囲円内の画像データに閾値 170 で 2 値化処理を施し、凝集沈殿塊の面積と個数を測定した。その後、日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告<sup>1)</sup>の発育陽性判定法に準拠して菌発育終末点を判定した。すなわち、「直径 1 mm 以上の沈殿塊」を「面積  $0.7854 \text{ mm}^2$  (=737 ピクセル) 以上の沈殿塊」に読み替えた。もう一つの条件である「1 mm 以下であっても 2 個以上の沈殿塊が認められた場合は発育陽性とする」については、画像処理で凝集沈殿塊個数を簡単に測定できるので、この条件にもとづいた。結果、画像処理による菌発育終末点判定では、「面積  $0.785 \text{ mm}^2$  以上の凝集沈殿塊またはそれ以下の面積であっても 2 個以上の凝集沈殿塊が認められた場合は発育陽性」とし、陽性が認められなかった希釈系列の中で、もっとも低い薬剤濃度を菌発育終末点とした。

各判定は同一プレートを用いて行った。判定順序は、まず目視法で、続いて画像データの取り込みを行ってから濁度法で判定し、その後画像処理法で判定した。なお、ウェルスキャナーの移動命令は、パソコン (PC-9801VM, NEC) の RS-232C ポートを通じ自作ソフトで制御し、画像の取り込みや処理は Adobe Photoshop と NIH Image を用いた。

## II. 結果

*C. parapsilosis* (ATCC 90019) を「酵母様真菌 FP」

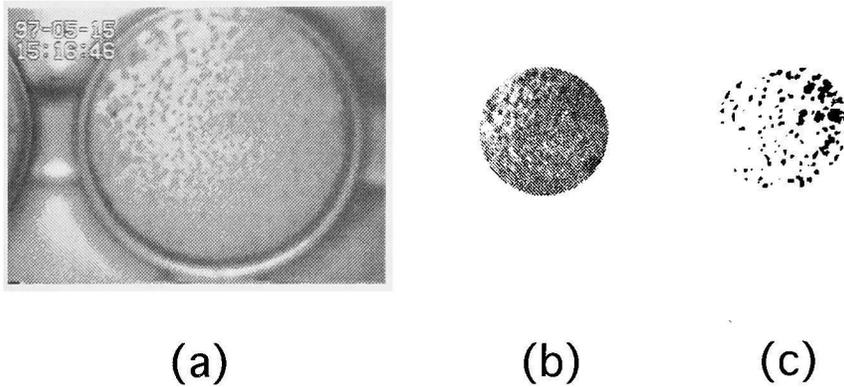


Fig. 1. Image of colonies of *Candida parapsilosis* in a microplate well containing amphotericin B at 1  $\mu\text{g/ml}$ , obtained by a microcomputer and light microscope. The microplate for antifungal susceptibility testing was incubated for 48 hours at 37°C.

(a) Colonies of *C. parapsilosis* (bottom view), (b) Image processing of parts of colonies which were cut into a circle (10 mm<sup>2</sup>) at the center of the microplate well, (c) The area of the colonies was processed to a black tone (area of colonies, 1.33 mm<sup>2</sup>; number of colonies, 92)

に接種し、AMPH-Bの1  $\mu\text{g/ml}$ の薬剤希釈濃度で48時間培養した後にパソコンへ取り込んだ画像をFig. 1 (a)に示した。画像ほぼ中央にシャーレ様に見えるのがプレートのウェル底面の画像である。次に、このウェルの中央部に面積10 mm<sup>2</sup>となるように凝集沈殿塊測定範囲円を設定し(Fig. 1 (b))、閾値を170として2値化処理を行った(Fig. 1 (c))。この2値化画像の黒い部分が凝集沈殿塊部分であり、この画像から求めた凝集沈殿塊面積は1.33 mm<sup>2</sup>、個数は92個であった。このデータより、凝集沈殿塊の個数は2個以上かつ面積は0.785 mm<sup>2</sup>以上なので、発育は陽性と判定された。

同様に、*C. parapsilosis* (ATCC 90019)のAMPH-Bの各薬剤希釈濃度系列(0.03, 0.06, 0.125,

0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ )に対する凝集沈殿塊面積を測定した結果をFig. 2に示した。0.25  $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では、測定範囲円内全域の10 mm<sup>2</sup>に菌が凝集沈殿していた。また、0.5  $\mu\text{g/ml}$ と1  $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度での凝集沈殿塊面積はそれぞれ4.08 mm<sup>2</sup>, 1.33 mm<sup>2</sup>であったが、2  $\mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度では、0.785 mm<sup>2</sup>以上または2個以上の凝集沈殿塊は測定できなかった。この測定値より、画像処理法で判定した菌発育終末点は2  $\mu\text{g/ml}$ であった。また、本系列の画像データをパソコンに取り込む直前に、目視法により判定した菌発育終末点は2  $\mu\text{g/ml}$ であった。さらに、画像取り込み直後にマイクロプレートリーダーで濁度を測定した結果をFig. 3に示した。この濁度データからIC<sub>50</sub>法で判定した菌発育終末点値は、IC<sub>50</sub>法の基準値が0.0668と算出されたので1  $\mu\text{g/ml}$ であった。これらの結果、画像処理法から判定した菌発育終末点は目視法の値と一

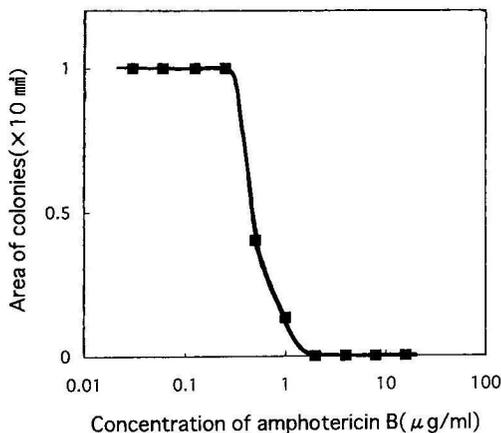


Fig. 2. Areas of colonies of *Candida parapsilosis* which were measured by image processing after 48 hours of incubation at 37°C versus the concentration of amphotericin B. The endpoint read by the image processing method was 2  $\mu\text{g/ml}$  (endpoint: 2  $\mu\text{g/ml}$  by the visual method and 1  $\mu\text{g/ml}$  by the spectrophotometric method).

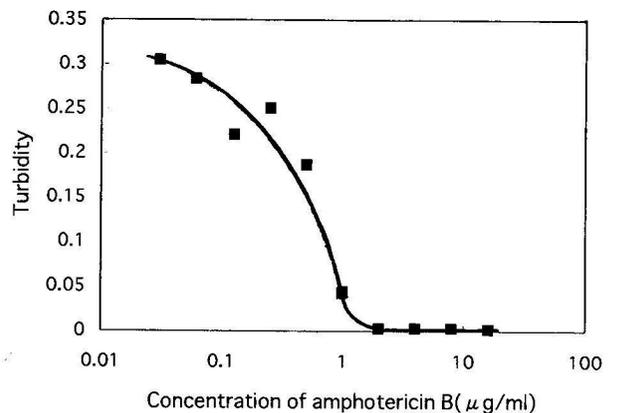


Fig. 3. Turbidity of the microplate wells read by a microplate reader versus the concentration of amphotericin B against *Candida parapsilosis* after 48 hours of incubation at 37°C. The endpoint determined with the spectrophotometer was 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Table 1. Comparison of broth microdilution determined endpoints of five antifungal agents against three reference strains determined by three methods

	Method	Antifungal agent				
		AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITZ	MCZ
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90019	spectrophotometric	1	0.5	4	0.5	4
	visual	2	2	8	0.5	4
	image processing	2	2	8	0.5	4
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	spectrophotometric	1	0.125	16	2	0.25
	visual	2	0.125	16	2	0.5
	image processing	2	0.125	32	2	0.5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	spectrophotometric	1	8	16	0.06	2
	visual	2	16	32	0.25	2
	image processing	2	16	32	0.25	2

AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole, ITZ: itraconazole, MCZ: miconazole (unit:  $\mu\text{g/ml}$ )

致し、濁度法から判定した菌発育終末点とも近かった。

*C. parapsilosis* (ATCC 90019) を含め、*C. glabrata* (ATCC 90030)、*C. krusei* (ATCC 6258) の3菌種を抗真菌剤感受性検査用プレートにそれぞれ接種し、37℃ 48時間培養後に濁度法、目視法、画像処理法から、AMPH-B、5-FC、FLCZ、ITZ、MCZの各薬剤に対する菌発育終末点を判定した結果をTable 1に示した。目視法と画像処理法から判定された菌発育終末点は1つを除きすべて一致した。また濁度法から判定された菌発育終末点は、目視法や画像処理法により判定された菌発育終末点とほとんどが同じ結果で、差のあったものでも薬剤希釈系列で1管以内の差であった。

### III. 考 察

病院などの検査室において、臨床株を対象としたMIC値を判定する場合、目視法や濁度法などが広く用いられている。しかし、凝集性を有する菌のMIC判定において、目視法ではその熟練度や主観性による誤差が、濁度法では振盪攪拌するという作業などのため、誤差が生じる可能性がある。それらに比べ、画像処理法(Figs. 1, 2)による発育陽性判定では、日本化学療法学会抗真菌剤感受性測定法検討委員会報告<sup>1)</sup>の判定法に準拠した基準をパソコンに設定することで、その基準と測定データの比較をパソコンが厳密に行うので、安定した客観的な菌発育終末点を得られ、かつ、目視法による菌発育終末点とほぼ一致した(Table 1)。

目視法による菌発育終末点判定は短時間で終了したが、画像処理法による菌発育終末点判定では、1画像データ(200 kbyte以上)の取り込みに20秒ほどを費やすので、必要なデータを取り込むには数十分が必要であった。取り込みの時間については今後改善の必要がある。しかしながら、目視法では凝集沈殿塊の直径が1mm前後のため判定が微妙な場合や、確認できないような小さい凝集沈殿塊などが存在した場合でも、画像処理法では問題なく判定できた。また今回は、画像の二値化処理における閾値を170に設定したが、顕

微鏡光源の種類やビデオカメラの感度によっては、調整する必要があるだろう。

目視法と画像処理法で判定した菌発育終末点がほぼ完全な一致を見たのは、目と機器という違いはあるが、それぞれ日本化学療法学会抗真菌剤感受性測定法検討委員会報告<sup>1)</sup>の判定法と、同基準に準拠した方法で求めているからであろう。このことは、今回我々が用いた画像処理法により、目視による菌発育陽性判定を忠実に実行できる機器システムが構築できることを意味している。

しかし、濁度による菌発育終末点は、その判定法が根本的に異なるため、目視法や画像処理法の値とは少し差違を生じた(Table 1)。ウェルの中の菌と薬剤の希釈液を考えた場合、濁度に影響をおよぼすいくつかの要因が考えられる。それは、薬剤や培地自身が持つ色や、薬剤の影響による菌の膜構造変化に伴う光学的異方性変化やウェル部の湾曲による屈折光変化などである。しかも、これらの要因は取り除くことが不可能であり、その量を判定することも難しい。また、濁度測定の前にはプレートを振盪攪拌するが、凝集の速い菌では濁度測定途中に凝集沈殿が進むので、この要因も目視法や画像処理法との結果に違いを与えられられる。ここではデータを示さないが、我々の測定においても、同じプレートで濁度法から菌発育終末点を判定した結果、振盪攪拌方法や測定スピードを変えることにより菌発育終末点の値に違いが出た。濁度法による菌発育終末点判定では、これらのことを考慮し、判定結果は十分検討する必要がある。

今回、凝集性を有する菌であっても、その凝集沈殿塊の面積と個数を画像処理で測定することにより、菌発育陽性を自動的・客観的に判定できるという画像処理法の有効性が示された。本方法により、凝集法におけるMIC判定の応用範囲拡大の可能性も示唆された。ただし、使用システムの制限から培養温度が37℃であったり、入手菌株などの問題により、十分なMICと

の議論には至らなかった。今後は、培養温度を含めて本システムに改良を加え、一連の処理をさらに自動化したり、十分発育していないため肉眼では確認できない凝集沈殿塊を画像処理法で測定するなど、判定時間の効率化や省力化を図っていきたい。

#### 文 献

- 1) 五島嵯智子, 岡田 淳, 小栗豊子, 他: 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告。日化療誌 38: 102~105, 1990
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard M27-P, 1992
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Tentative standard M27-T, 1995
- 4) 山口英世, 内田勝久, 久米 光, 他: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992—1994年)。日本医真菌学会雑誌 36: 61~86, 1995
- 5) 須藤貴子, 池戸正成, 楨村浩一, 他: 抗真菌剤感受性試験用プレートの評価。真菌誌 36 (Suppl. 1): 110, D-6, 1995
- 6) Pfaller M A, Messer S A, Coffmann S: Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. J. Clin. Microbiol. 33: 1094~1097, 1995
- 7) 松岡喜美子, 永富由美子, 今西啓子, 他: 呈色色素反応—ドライプレート法による微量液体希釈法—を用いた抗真菌剤薬剤感受性試験。臨床と微生物 23: 101~110, 1996
- 8) 山田誠久, 戸坂雅一, 岡沢 豊: 酸化還元反応呈色色素を用いた微量液体希釈法での抗真菌剤薬剤感受性試験の検討。臨床病理: 67~75, 1996
- 9) Pfaller M A, Vu Q, Lancaster M, et al.: Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. J. Clin. Microbiol. 32: 1625~1628, 1994

### Determination of endpoints of five antifungal agents obtained by image processing on the broth microdilution method

Toshihiko Ogihara<sup>1)</sup>, Yuji Takamoto<sup>2)</sup>, Akiyoshi Shibata<sup>3)</sup>, Chizuru Numata<sup>1)</sup>,  
Masayuki Kobayashi<sup>4)</sup> and Harushige Kanno<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Physiology, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

<sup>2)</sup> Plant Engineering Division, Sapporo Breweries Ltd

<sup>3)</sup> Department of Clinical Laboratory, Nippon Medical School, Tamanagayama Hospital

<sup>4)</sup> Department of Development, Daiichi Mfg. Co. Ltd.

<sup>5)</sup> Department of Laboratory Medicine, Chiba University School of Medicine

The susceptibilities of *Candida parapsilosis* (ATCC 90019), *Candida glabrata* (ATCC 90030) and *Candida krusei* (ATCC 6258) to five antifungal agents (amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole and miconazole) were investigated by the frozen microplate method of antifungal susceptibility testing. The testing microplate was designed according to the method proposed by the Japanese Society for Medical Mycology. This method is similar to M27-T proposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards. The endpoints of the five antifungal agents against three reference strains in the microplate were determined by the usual visual and spectrophotometric methods. The microplate was incubated for 48 hours in air at 37°C. Areas and numbers of colonies at the bottom of the microplate well were determined by a microcomputer and the endpoints of the agents against the reference strains were also determined by image processing. The endpoints obtained by image processing were almost the same as the values obtained by the visual method and similar to the values obtained by the spectrophotometric method. These results suggest that it is possible to determine the endpoint by image processing automatically and objectively.