

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4415290号
(P4415290)

(45) 発行日 平成22年2月17日(2010.2.17)

(24) 登録日 平成21年12月4日(2009.12.4)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34 A
G O 1 N	27/26	(2006.01)	G O 1 N 27/26 3 7 1 A
G O 1 N	27/416	(2006.01)	G O 1 N 27/46 3 2 1
			G O 1 N 27/46 3 3 6 M

請求項の数 2 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2000-81766 (P2000-81766)	(73) 特許権者	501083643
(22) 出願日	平成12年3月17日(2000.3.17)		学校法人慈恵大学
(65) 公開番号	特開2001-258592 (P2001-258592A)		東京都港区西新橋三丁目25番8号
(43) 公開日	平成13年9月25日(2001.9.25)	(73) 特許権者	301021533
審査請求日	平成18年12月6日(2006.12.6)		独立行政法人産業技術総合研究所
			東京都千代田区霞が関1-3-1
		(74) 代理人	100088672
			弁理士 吉竹 英俊
		(74) 代理人	100088845
			弁理士 有田 貴弘
		(74) 代理人	100103229
			弁理士 福市 朋弘
		(74) 代理人	100087804
			弁理士 津川 友士

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤感受性測定方法およびその装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

測定対象微生物および所定の薬剤を含む第1溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第2溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極(1a)(2a)を用いて検出することにより薬剤感受性を測定する方法であって、両酸素電極(1a)(2a)からの出力信号を、第1の所定時間の間、第2の時間間隔で収集し、各酸素電極(1a)(2a)からの各出力信号を、その前後の所定個数の出力信号を用いて移動平均化し、移動平均化された各出力信号の時間微分値を算出し、この両時間微分値を用いて薬剤感受性を測定することを特徴とする薬剤感受性測定方法。

【請求項2】

測定対象微生物および所定の薬剤を含む第1溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第2溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極(1a)(2a)を用いて検出することにより薬剤感受性を測定する装置であって、両酸素電極(1a)(2a)からの出力信号を、第1の所定時間の間、第2の時間間隔で収集する収集手段(3)(4)と、収集された各酸素電極(1a)(2a)からの各出力信号を、その前後の所定個数の出力信号を用いて移動平均化する移動平均化手段(5)(6)と、移動平均化された各出力信号の時間微分値を算出する時間微分値算出手段(7)(8)と、算出された両時間微分値を用いて薬剤感受性を測定する感受性測定手段(9)とを含むことを特徴とする薬剤感受性測定装置。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【 発明の属する技術分野 】

この発明は薬剤感受性測定方法およびその装置に関し、さらに詳細にいえば、測定対象微生物および所定の薬剤を含む第1溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第2溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極を用いて検出することにより薬剤感受性を測定する方法およびその装置に関する。

【 0 0 0 2 】

【 従来技術 】

従来から、酸素電極を用いて溶存酸素量を検出することによって薬剤感受性を測定する方法として、次の方法が提案されている。

10

【 0 0 0 3 】

測定対象微生物および所定の薬剤を含む第1溶液と、測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第2溶液とを準備し、両溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極を用いて出力信号（電流値）として検出する。そして、例えば、検出間隔 $0.1 \text{ s} \times 5$ データを2秒ごとに30回収集し、収集した60個のデータの平均値をその時間の平均値として記録する。

【 0 0 0 4 】

この分単位のデータを基にして、以下の処理を行う。

【 0 0 0 5 】

電流値の絶対値が酸素電極によって10～20%程度違うため、絶対値でなく、電流値の時間微分値を用いることとする。絶対値は溶存酸素量（溶存酸素濃度）に比例するので、電流値の時間微分値は酸素消費速度、すなわち微生物の呼吸量に比例する。呼吸量抑制がみられたことを示す基準として、薬剤無添加、かつ測定対象微生物を含む第2溶液の50%まで呼吸量（時間微分値）が低下した場合を用いる。また、解析に用いるデータとしては、時間微分値の違いが最も大きく出る時点が望ましいため、第2溶液で電流値が0になる（第2溶液中の酸素がなくなる）時点を用いて、その前10分間の電流値の時間微分値を最小二乗近似で求めたものを用いる。

20

【 0 0 0 6 】

この方法を採用すれば、得られた両時間微分値から薬剤感受性を測定することができる。

【 0 0 0 7 】

【 発明が解決しようとする課題 】

上記の方法を採用した場合には、電流値が0になるまで測定を行い続けなければならないので、薬剤感受性の測定を行うための所要時間が著しく長くなってしまいうという不都合がある。

30

【 0 0 0 8 】

また、このような不都合を解消しようとするれば、連続解析を行い、例えば、各電流値の10分間の時間微分値と、各薬剤濃度での時間微分値と第2溶液の時間微分値との比をデータとして用い、それぞれの変化をみるようにすることが考えられる。

【 0 0 0 9 】

しかし、1分ごとのデータでこのような解析を行う場合には、求められる時間微分値がデータのノイズの影響を大きく受け、正確な解析が困難である。また、第2溶液の時間微分値との比を求めると、第2溶液のノイズの影響によりさらに大きな影響を受け、解析精度が一層低下してしまう。

40

【 0 0 1 0 】

この薬剤感受性の測定は、臨床検査の目的で行われることが多く、この場合には、患者の治療のために迅速な測定、正確な測定の両立が強く要望されている。

【 0 0 1 1 】

【 発明の目的 】

この発明は上記の問題点を鑑みてなされたものであり、短時間で正確に、薬剤感受性の測定を行うことができる薬剤感受性測定方法およびその装置を提供することを目的としてい

50

る。

【 0 0 1 2 】

【課題を解決するための手段】

請求項 1 の薬剤感受性測定方法は、測定対象微生物および所定の薬剤を含む第 1 溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第 2 溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極を用いて検出することにより薬剤感受性を測定するに当たって

、
両酸素電極からの出力信号を、第 1 の所定時間の間、第 2 の時間間隔で収集し、各酸素電極からの各出力信号を、その前後の所定個数の出力信号を用いて移動平均化し、移動平均化された各出力信号の時間微分値を算出し、この両時間微分値を用いて薬剤感受性を測定する
方法である。

10

【 0 0 1 3 】

請求項 2 の薬剤感受性測定装置は、測定対象微生物および所定の薬剤を含む第 1 溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第 2 溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極を用いて検出することにより薬剤感受性を測定するものであつて、

両酸素電極からの出力信号を、第 1 の所定時間の間、第 2 の時間間隔で収集する収集手段と、収集された各酸素電極からの各出力信号を、その前後の所定個数の出力信号を用いて移動平均化する移動平均化手段と、移動平均化された各出力信号の時間微分値を算出する時間微分値算出手段と、算出された両時間微分値を用いて薬剤感受性を測定する感受性測定手段とを含むものである。

20

【 0 0 1 4 】

【作用】

請求項 1 の薬剤感受性測定方法であれば、測定対象微生物および所定の薬剤を含む第 1 溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第 2 溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極を用いて検出することにより薬剤感受性を測定するに当たって、

両酸素電極からの出力信号を、第 1 の所定時間の間、第 2 の時間間隔で収集し、各酸素電極からの各出力信号を、その前後の所定個数の出力信号を用いて移動平均化し、移動平均化された各出力信号の時間微分値を算出し、この両時間微分値を用いて薬剤感受性を測定するのであるから、単に平均化してデータ列を作成する場合と比較してノイズの影響を小さくでき、測定精度を高めることができる。また、連続解析を行うので、所要時間を短縮することができる。この結果、測定精度の向上と所要時間の短縮とを両立させることができる。

30

【 0 0 1 5 】

請求項 2 の薬剤感受性測定装置であれば、測定対象微生物および所定の薬剤を含む第 1 溶液中の溶存酸素量、および測定対象微生物を含むとともに、薬剤を含まない第 2 溶液中の溶存酸素量を、それぞれ酸素電極を用いて検出することにより薬剤感受性を測定するに当たって、

収集手段によって、両酸素電極からの出力信号を、第 1 の所定時間の間、第 2 の時間間隔で収集し、移動平均化手段によって、収集された各酸素電極からの各出力信号を、その前後の所定個数の出力信号を用いて移動平均化し、時間微分値算出手段によって、移動平均化された各出力信号の時間微分値を算出し、感受性測定手段によって、算出された両時間微分値を用いて薬剤感受性を測定することができる。

40

【 0 0 1 6 】

したがって、単に平均化してデータ列を作成する場合と比較してノイズの影響を小さくでき、測定精度を高めることができる。また、連続解析を行うので、所要時間を短縮することができる。この結果、測定精度の向上と所要時間の短縮とを両立させることができる。

【 0 0 1 7 】

【発明の実施の形態】

50

以下、添付図面を参照して、この発明の薬剤感受性測定方法およびその装置の実施の態様を詳細に説明する。

【0018】

図1はこの発明の薬剤感受性測定装置の一実施態様を示すブロック図である。

【0019】

この薬剤感受性測定装置は、薬剤および微生物を添加してなる第1溶液を収容する第1セル1と、薬剤を添加せず、微生物を添加してなる第2溶液を収容する第2セル2と、第1セル1に装着されて第1溶液の溶存酸素量を検出し、測定電流値を出力する第1酸素センサ1aと、第2セル2に装着されて第2溶液の溶存酸素量を検出し、測定電流値を出力する第2酸素センサ2aと、第1酸素センサ1aから出力される測定電流値を時系列的に保持する第1保持部3と、第2酸素センサ2aから出力される測定電流値を時系列的に保持する第2保持部4と、第1保持部3に時系列的に保持されている測定電流値から移動平均値を算出し、時系列的に保持する第1移動平均値算出保持部5と、第2保持部4に時系列的に保持されている測定電流値から移動平均値を算出し、時系列的に保持する第2移動平均値算出保持部6と、第1移動平均値算出保持部5に時系列的に保持されている移動平均値から第1の時間微分値を算出する第1時間微分値算出部7と、第2移動平均値算出保持部6に時系列的に保持されている移動平均値から第2の時間微分値を算出する第2時間微分値算出部8と、第1の時間微分値と第2の時間微分値とに基づいて薬剤感受性を測定する薬剤感受性測定部9とを有している。

10

【0020】

次いで、図2のフローチャートを参照して図1の薬剤感受性測定装置の作用を説明する。

20

【0021】

ステップSP1において、第1セル1に収容された溶液に薬剤および微生物を添加するとともに、第2セル2に収容された溶液に薬剤を添加せず、微生物を添加し、ステップSP2において、第1酸素センサ1a、第2酸素センサ2aによる溶存酸素量の検出を開始し、ステップSP3において、第1酸素センサ1a、第2酸素センサ2aから出力される測定電流値をそれぞれ時系列的に保持し、ステップSP4において、それぞれ時系列的に保持されている測定電流値から移動平均値を算出し、ステップSP5において、それぞれ算出された移動平均値に対から最小二乗近似で時間微分値を算出し、ステップSP6において、それぞれ算出された時間微分値に基づいて薬剤感受性を測定し、そのまま一連の処理を終了する。

30

【0022】

前記移動平均値の算出は、図3に示すように、該当する測定電流値（ハッチングが施された円を参照）と、この測定電流値に先行するn個（nは1以上の整数であり、好ましくは、5から10程度の値を選択することが好ましい）の測定電流値と、この測定電流値に続くn個の測定電流値との平均値を算出して、該当する測定電流値の移動平均値とすることにより達成される。このように移動平均値を算出すれば、例えば、ある測定電流値がノイズの影響を大きく受けていても、移動平均値におけるノイズの影響を大幅に低減することができる。

【0023】

したがって、薬剤感受性の測定における、所要時間の短縮、および測定精度の向上を両立させることができる。

40

【0024】

微生物として*S. epidermidis*（表皮ブドウ球菌）、*E. faecalis*（エンテロコッカス属菌）を用い、微生物の量を 10^6 cfu/mlに設定して薬剤感受性を測定した結果を表1、表2に示す。なお、薬剤として、PCG（ペニシリンG）、IPM（イミペネム）、MINO（ミノサイクリン）、EM（エリスロマイシン）、OFLX（オフロキサシン）、ST（スルファメトキサゾール・トリメトプリン）、VCM（バンコマイシン）、CMZ（セフメタゾール）を採用した。また、（イ）は従来法で測定したMIC値（最小発育阻止濃度）（ $\mu\text{g/ml}$ ）（所要時間は18時間）、（ロ）は移動平

50

均値を求めることなく最小二乗近似により傾きを求める方法で測定した場合のMIC値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) / 所要時間(分)、(八)は移動平均値を求め、最小二乗近似により傾きを求める方法で測定した場合のMIC値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) / 所要時間(分)を示している。

【0025】

【表1】

略名	(イ)	(ロ)	(ハ)
PCG	0.06	0.12/160	0.12/135
IPM	≤ 1	0.5/160	0.5/60
MINO	≤ 0.12	0.0025/102	0.0025/53
EM	≤ 0.12	0.03/91	0.01/50
OFLX	≤ 1	0.25/98	0.12/90
ST	≤ 0.25	0.5,1/45	0.5/37
VCM	≤ 1	0.25/102	0.06/70

10

【0026】

【表2】

略名	(イ)	(ロ)	(ハ)
CMZ	>64	256/33	512/18
MINO	1	0.1/29	0.06/15
EM	1	0.1/46	0.06/30
OFLX	2 4	2/54	2/35
VCM	2	1/46	0.5/25

20

【0027】

表1、表2において各方法による測定値、所要時間を比較すれば、移動平均値を求め、最小二乗近似により時間微分値を求める方法で測定することにより、測定精度の向上、および所要時間の短縮を両立できていることが分かる。

【0028】

また、標準菌株7菌種 { E . coli : 大腸菌、K . pneumoniae : 肺炎桿菌、P . aeruginosa : 緑膿菌、P . mirabilis : (プロテウス属菌)、S . aureus : 黄色ブドウ球菌、S . epidermidis : 表皮ブドウ球菌、E . faecalis : (エンテロコッカス属菌) } と抗生剤16薬剤 (CPZ : セフォザゾーン、MINO : ミノサイクリン、OFLX : オフロキサシン、ABPC : アンピシリン、LMOX : ラタモキシセフ、PIPC : ピペラシリン、GM : ゲンタマイシン、FOM : フォスフォマイシン、PCG : ペニシリンG、EM : エリスロマイシン、ST : スルファメトキサゾール・トリメトプリン、VCM : バンコマイシン、IPM : イミペネム、CMZ : セフメタゾール、AZT : アズトレオナム、CFS : セフスロジン) を用い、微生物の量を $10^6 \text{cfu}/\text{ml}$ に設定して薬剤感受性を測定した結果、従来法との一致率は、移動平均値を求めることなく最小二乗近似により電流値の時間微分値を求める方法で測定した場合には76%、移動平均値を求め最小二乗近似により電流値の時間微分値を求め

30

40

【0029】

【発明の効果】

請求項1の発明は、単に平均化してデータ列を作成する場合と比較してノイズの影響を小さくでき、測定精度を高めることができ、また、連続解析を行うので、所要時間を短縮することができ、ひいては、測定精度の向上と所要時間の短縮とを両立させることができるという特有の効果奏する。

【0030】

請求項2の発明は、単に平均化してデータ列を作成する場合と比較してノイズの影響を小さくでき、測定精度を高めることができ、また、連続解析を行うので、所要時間を短縮す

50

ることができ、ひいては、測定精度の向上と所要時間の短縮とを両立させることができるという特有の効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の薬剤感受性測定装置の一実施態様を示すブロック図である。

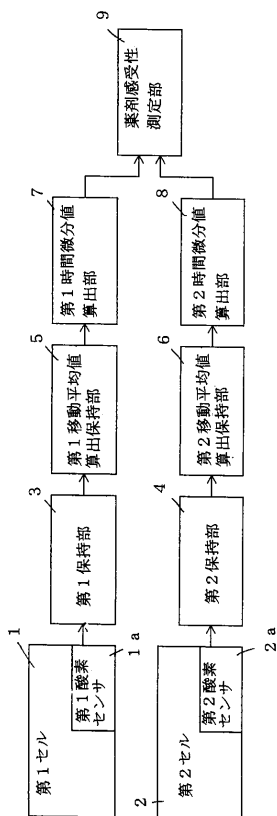
【図2】この発明の薬剤感受性測定方法の一実施態様を示すフローチャートである。

【図3】移動平均値の算出を説明する概略図である。

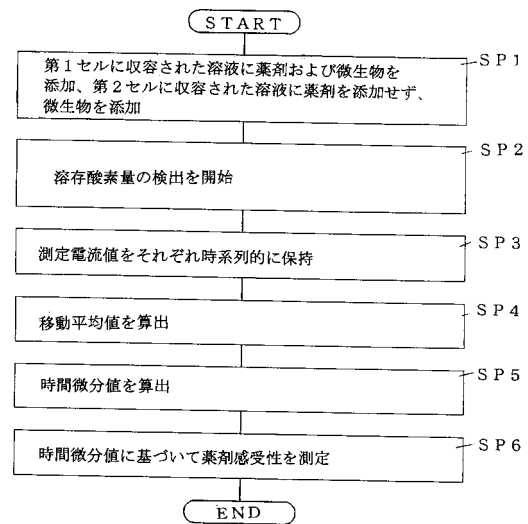
【符号の説明】

- 1 a 第1酸素センサ 2 a 第2酸素センサ
- 3 第1保持部 4 第2保持部
- 5 第1移動平均値算出保持部 6 第2移動平均値算出保持部
- 7 第1時間微分値算出部 8 第2時間微分値算出部
- 9 薬剤感受性測定部

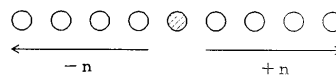
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(73)特許権者 000002853

ダイキン工業株式会社

大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル

(74)代理人 100088672

弁理士 吉竹 英俊

(74)代理人 100088845

弁理士 有田 貴弘

(74)代理人 100103229

弁理士 福市 朋弘

(72)発明者 町田 勝彦

東京都港区西新橋3丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内

(72)発明者 保科 定頼

東京都港区西新橋3丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内

(72)発明者 牛田 多加志

茨城県つくば市東1-1-4 通商産業省工業技術院 産業技術融合領域研究所内

(72)発明者 新井 潤一郎

茨城県つくば市御幸が丘3番地 ダイキン工業株式会社 内

(72)発明者 片山 秀夫

茨城県つくば市御幸が丘3番地 ダイキン工業株式会社 内

(72)発明者 奥村 千晶

茨城県つくば市御幸が丘3番地 ダイキン工業株式会社 内

(72)発明者 天野 義久

茨城県つくば市御幸が丘3番地 ダイキン工業株式会社 内

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 特開平02-222098(JP,A)

1. 町田勝彦, シンポジウムI: 薬剤耐性菌をめぐる諸問題 感受性検査の迅速化の試み, 日本臨床微生物学雑誌, 1999年 6月25日, 第9巻, 第2号, p. 46-51

新井潤一郎、外1名, 酸素電極法による微生物の呼吸測定を指標とした薬剤スクリーニング, 電気化学および工業物理化学, 1999年 5月 5日, Vol. 67, No. 5, p. 479-483

手塚健二、外10名, 溶存酸素測定装置を用いた歯周病原性細菌Actinobacillus actinomycetem comitansに対する抗生物質の迅速感受性試験の検討, 日本歯周病学会会誌, 1999年 6月28日, 第41巻, 第2号, p. 201-209

槌谷恵美、外4名, 多チャンネル電極式溶存酸素濃度測定装置(DOX-96)を用いた細菌の迅速薬剤感受性の検討~基準株、臨床分離株の測定~, 日本臨床微生物学雑誌, 1999年12月15日, 第9巻, 第4号, p. 120 (演題番号: 03)

AMANO Yoshihisa, et al., Measuring respiration of cultured cell with oxygen electrode as a metabolic indicator for drug screening, 「HUMAN CELL」日本ヒト細胞学会雑誌, 1999年 7月20日, Vol. 12, No. 1, p. 3-10

ISA transaction. 1998, Vol.37, No.1, p.3-19

ISA transaction. 1999, Vol.38, No.3, p.217-224

Automatica. 1990, Vol.26, No.5, p.925-928

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/24

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)