

の0.5, 0.6, 0.7倍だけ張力 F を増加させた場合の半筋節長 L の変化を示している。張力を F_0 の0.5および0.6倍変化させた場合は、張力変化後筋節長に一過性の僅かな増加が生じるが、その後、張力変化しない場合と同様の収縮を見せる。一方、張力を F_0 の0.7倍変化させた場合、張力変化後に加速度的な筋節長の増加を引き起こす。このことから、Negroniモデルはある程度以上の張力変化に対して不安定な挙動を見せることが分かる。

4. 考 察

2・1節に示したとおりPEPMLは手続き的記述形式であるため、3章で用いた各実験プロトコルのPEPML記述が示すとおり、本来手続きである実験プロトコルを自然に記述することができる。宣言的に記述しなければならないCellMLに比べて、PEPMLは実験プロトコルに適しているといえる。一方、数式による宣言的記述では性質上その解釈が一意であることが保証されるが、PEPMLでは、手続きとして記述された実験プロトコルの形式的意味論を厳密に定義することにより、宣言的記述と同様に解釈の一意性を保証しており、実装や計算条件によって生じるプロトコル実行結果の曖昧さを回避している。さらに、実験プロトコルにはCellMLの数式表現での記述が非常に困難なものがある。2・2節の式6で示したプロトコルや、3・3節で用いたプロトコルのような、ある時刻における変数の値を参照する式はCellMLでは記述できない。そのため、このようなプロトコルをCellMLで記述するためには、仮変数などを用いた特殊で技術的な記述が必要とされ、非常に記述困難であるとともに可読性に劣る。また、CellMLを用いた場合もimport機能を使うことでモデルとプロトコルを分

離して記述可能ではあるが、CellMLで書かれた実験プロトコルをモデルに適用する場合、両ファイル間で参照される変数について手動で対応関係を確認した上で接続関係をXMLで記述する必要がある。これは、特に工学系以外の利用者にとって困難を伴う作業である。それに対して、PEPMLではオントロジーを用いて実験プロトコルを記述することにより、新たな編集作業なしに実験プロトコルをモデルに適用することができる。これらのことから、CellMLを用いても実験プロトコルが記述可能であるとはいえ、実験プロトコルに特化したPEPMLは有効かつ有用であるといえる。

3章で行った実験によって、実験プロトコルをPEPMLを用いて電子的に記述することにより細胞生理学モデルを用いた再現実験、モデル比較実験、モデル解析実験の実行を簡易化することができることを示した。3・1節の実験では、PEPMLおよび提案シミュレーション手法を用いることで既発表論文に記載された実験を再現できた。このことから、提案手法を用いることによりシミュレーション実験の再現を効率化することができるといえる。生理学モデリング研究にとって公開モデルの再現性は非常に重要である[9]。再現実験の効率化は既存モデル利用の利便性を高めるだけでなく、同一実験を容易に反復実行できるため、モデルの検証が簡易化されることでモデル開発の効率化にも寄与する。また、3・2節のモデル比較実験では、オントロジーを用いたPEPMLファイルを用いることにより、異なるモデルに対して同じ実験プロトコルを容易に適用可能であることを示した。この実験と比較した、外液カリウム濃度に対する活動電位の変化は、例えば高カリウム血症における心臓興奮伝播シミュレーションを行う際に、シミュレーションに用いるモデルの選択、シミュレーション結果の解析を行う上で非常に重要である。モデル汎用的な実験プロトコルの記述によるモデル比較実験の効率化は、細胞生理学モデルを用いたシミュレーション研究に対して有効である。さらに、3・3節の実験は、モデル解析の場面においても提案手法を用いた実験プロトコルのシミュレーションが有効であることを示した。この実験で解析対象とした細胞長変化に対する張力の変化および、張力変化に対する細胞長の変化は、細胞の収縮特性を考える上で重要な要素であり、例えば心筋細胞モデルを用いた心室拍動シミュレーションや循環動態シミュレーションを行う際に、モデル特性を知る上で非常に重要な解析である。これらのことから、オントロジーを用いたPEPMLによる実験プロトコルの汎用的な記述および、提案手法による実験プロトコルのシミュレーションは、モデル開発やモデル利用研究、モデル応用の効率化に大きく寄与するといえる。

```

<event id="initial">
  <condition>
    <eq><time /><literal value="0" /></eq>
  </condition>
  <action>
    <set.value>
      <variable link="cmo:ID.half.sarcomere.length" />
      <literal value="0.97" units="um" />
    </set.value>
  </action>
</event>
<event id="InstantaneousShortening">
  <condition>
    <eq>
      <variable link="cmo:ID.external.force" />
      <literal value="25.0" units="mN/mm2" />
    </eq>
  </condition>
  <action>
    <sub.value>
      <variable link="cmo:ID.half.sarcomere.length" />
      <literal value="0.006" units="um" />
    </sub.value>
  </action>
</event>

```

図10 Negroniモデル実験プロトコルB PEPML主要部分
Fig. 10 Main part of experimental protocol B for Negroni model.

5. 結 論

本稿では、細胞生理学モデルに対する実験プロトコルの

ための記述言語 PEPML を提案し、PEPML を用いた細胞生理学実験シミュレーション手法を提案した。PEPML では実験プロトコルを手続きとして、モデルから分離して記述可能であり、オントロジーを用いることで特定モデルに依存しない汎用的プロトコルが記述可能である。提案シミュレーション手法では、手続きとして記述された実験プロトコルをモデル変数に対する境界条件として解釈することで、細胞生理学シミュレーションの数値計算が可能である。実験により、提案手法が実験プロトコルの記述およびシミュレーションに有効であることを示した。

本稿ではモデル記述形式として CellML を対象に議論を進めたが、提案手法は特に CellML に依存したものではなく、モデル内変数の一意的参照が可能であり、モデルが数値計算可能な形に変換可能であれば、他の細胞生理学モデル記述言語に対しても適用できる。今後、SBML など他のモデル記述言語への適用方法について検討していく。また、多様な実験プロトコルに対するより簡易な記述を実現するため、プロトコル内変数の導入や、詳細なイベント実行条件の指定などの、PEPML 仕様拡張を検討する。さらに、組織および臓器レベルのモデル、シミュレーションに対する実験プロトコルの記述、オントロジーを用いた変数の対応方法についても今後の課題である。

実験プロトコルを PEPML で記述することにより、容易に再現可能な状態で実験プロトコルを交換することが可能である。形式的に記述された細胞生理学モデルとともに実験プロトコルを記述した PEPML ファイルを公開することで、シミュレーション実験が即時に再現可能な形で配布可能になる。さらには、標準的な実験プロトコルを記述したファイル群は、モデルの検証に効果的であると考えられる。論文実験結果の再現性向上や、モデル利用の利便性向上などにより、提案手法はモデル開発およびモデル応用の促進に役立つと考えられる。

文 献

- Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, Kitano H, Arkin AP, Bornstein BJ, Bray D, Cornish-Bowden A, Cuellar AA, Dronov S, Gilles ED, Ginkel M, Gor V, Goryanin II, Hedley WJ, Hodgman TC, Hofmeyr JH, Hunter PJ, Juty NS, Kasberger JL, Kremling A, Kummer U, Le Novère N, Loew LM, Lucio D, Mendes P, Minch E, Mjolsness ED, Nakayama Y, Nelson MR, Nielsen PF, Sakurada T, Schaff JC, Shapiro BE, Shimizu TS, Spence HD, Stelling J, Takahashi K, Tomita M, Wagner J, Wang J: The Systems Biology Markup Language (SBML): A Medium for Representation and Exchange of Biochemical Network Models. *Bioinformatics*. 19(4): 524-531, 2003.
- Cuellar AA, Lloyd CM, Nielsen PF, Bullivant DP, Nickerson DP, Hunter PJ: An Overview of CellML 1.1: a Biological Model Description Language. *SIMULATION*. 79(12): 740-747, 2003.
- Shimayoshi T, Komurasaki K, Amano A, Iwashita T, Matsuda T, Kanazawa M: A Method to Support Cell Physio-

logical Modelling Using Description Language and Ontology. *IPSJ Trans Bioinformatics*. 47(SIG 17): 83-92, 2006.

- Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV: A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286(4): 1573-1589, 2004.
- Luo CH, Rudy Y: A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res*. 74(6): 1071-1096, 1994.
- Noble D, Varghese A, Kohl P, Noble P: Improved guinea-pig ventricular cell model incorporating a diadic space, I_{Kr} and I_{Ks} , and length- and tension-dependent processes. *Can J Cardiol*. 14(1): 123-134, 1998.
- Wan X, Bryant SM, George H: The Effects of $[K^+]_o$ on Regional Differences in Electrical Characteristics of Ventricular Myocytes in Guinea-Pig. *Exp Physiol*. 85(6): 769-774, 2000.
- Negroni JA, Lascano EC: A Cardiac Muscle Model Relating Sarcomere Dynamics to Calcium Kinetics. *J Mol Cell Cardiol*. 28(5): 915-929, 1996.
- Le Novère N, Finney A, Hucka M, Bhalla US, Campagne F, Collado-Vides J, Crampin EJ, Halstead M, Klipp E, Mendes P, Nielsen P, Sauro H, Shapiro B, Snoep JL, Spence HD, Wanner BL: Minimum information requested in the annotation of biochemical models (MIRIAM). *Nat Biotechnol*. 23(12): 1509-1515, 2005.

鷗吉 隆夫 (シマヨシ タカオ)

1999年京都大学大学院修士課程了。同年三菱電機株式会社入社。2003年財団法人京都高度技術研究所研究員。2007年同副主任研究員。現在に至る。細胞モデリング、生体シミュレーション環境構築の研究に従事。
IEEE EMBS, 情報処理学会各会員。



天野 晃 (アマノ アキラ)

1993年京都大学大学院博士課程学修退学。同年工学部助手。1995年広島市立大学助教授。2002年京都大学大学院情報学研究所助教授。現在に至る。生体シミュレーション、文書画像処理、コンピュータビジョンの研究に従事。



IEEE BME, CS, ISMRM, 電子情報通信学会, 人工知能学会, 日本生体医工学学会各会員。

松田 哲也 (マツダ テツヤ)

1981年京都大学医学部卒。1988年京都大学大学院医学研究科博士課程了。医学博士。同年4月京都大学医学部附属病棟第3内科助手。1997年同医療情報部助教授。2000年京都大学大学院情報学研究所助教授。現在に至る。生体シミュレーション、循環器領域のMRI撮影法および画像処理に関する研究に従事。



ISMRM, SCMR, IEEE BME, 日本生体医工学学会, 日本内科学会, 日本循環器学会, 日本磁気共鳴医学会, 電子情報通信学会各会員。

興奮伝達時間の左心室壁運動に与える影響 —リング形状左心室モデルによるシミュレーション研究—

高田 康弘*・天野 晃*・宋 仁煥*・陸 建銀***・嶋吉 隆夫*†
石川 覚志††・小寺 秀俊**・松田 哲也*

The Influence of Activation Time on Left Ventricular Wall Motion —Simulation Study of Ring Shape Left Ventricular Model—

Yasuhiro TAKADA,* Akira AMANO,* Inhwan SONG,* Jianyin LU,*** Takao SHIMAYOSHI,*†
Satoshi ISHIKAWA,†† Hidetoshi KOTERA,** Tetsuya MATSUDA*

Abstract The heart is an organ with highly complex structure and its pump function is affected by various factors. Many reports showed the strong relation between the excitation-propagation phenomenon in the heart and its pump function. But the experimental studies often failed to provide the mechanistic insights due to the complex cross-talks built in these processes. In this study, we focus on the relation between the activation time and the contraction of the tissue. The contraction simulation coupled with the excitation propagation simulation was performed using the finite element model of the ventricular ring. We performed the simulation with 7 types of stimulation with various pacing sites in the tissue, and compared the pump functions by the area ejection fraction. The results showed that when the activation time became long, the area ejection fraction became non-linearly small. The results of this study showed the excitation propagation is one of the important parameter of the left ventricular wall motion.

Keywords: left ventricular wall motion simulation, activation time, excitation propagation simulation, myocardial cell model, ejection fraction, biosimulation.

1. はじめに

近年、ライフサイエンス分野における研究の発展により、心筋細胞の生理学的特性の解明が急速に進展しており、精密な定量的モデルが構築されるようになってきている。これらの細胞モデルを利用することにより、計算機上

で心筋に関する細胞レベルの定量的なシミュレーション実験が行われるようになり、更に多数の細胞モデルを利用して心筋組織の収縮、あるいは心臓の拍動に関するシミュレーション実験も可能となって来た。

心臓は、右心房の大静脈境界部にある洞房結節で自動的に発生した興奮により拍動を続ける。洞房結節で発生した興奮は、心房筋細胞間の興奮伝播現象に従い心房全体に広がる。心房を伝わった興奮波は、右心房下方、心室中隔の近傍にある房室結節に到達する。房室結節は、網状から次第に束状になり、ヒス束に移行し、心室中隔に下降したのち、左脚(left bundle branch)と右脚(right bundle branch)に分岐する。左脚はまた左脚前枝、左脚中隔枝、左脚後枝に分岐する。ヒス束に始まるこれらの線維は、刺激伝導系の特殊心筋の最終末端であるプルキンエ線維に移行する。電気興奮が心筋細胞間を伝播することにより心臓を構成する個々の心筋細胞の興奮が生じる。そして、細胞の張力が発生し、血液を拍出する。正常な心室内では興奮伝播現象により興奮が広がるが、その際の興奮伝達時間として、経壁方向には10~20[msec][1]、左心室全体で70~90

生体医工学シンポジウム 2007 発表 (2007 年 9 月, 札幌)
2007 年 7 月 30 日受付, 2007 年 10 月 10 日改訂, 2007 年 11 月 22 日再改訂

Received July 30, 2007; revised October 10, 2007, November 22, 2007.

* 京都大学大学院情報学研究所
Graduate School of Informatics, Kyoto University

** 京都大学大学院工学研究科
Graduate School of Engineering, Kyoto University

*** 京都大学細胞・生体機能シミュレーター開発センター
Leading Project for Biosimulation, Kyoto University

† 財団法人京都高度技術研究所
ASTEM RI/Kyoto.

†† 株式会社メカニカルデザイン
Mechanical Design and Analysis Co., Ltd.

[msec][1]を要する。一方、刺激伝導系異常の一つである左脚ブロックにおいては、プルキンエ線維の左脚における興奮伝播が障害される。経壁方向の興奮伝達時間は正常例と同じ10~20[msec][2]であるが、円周方向の興奮伝達時間に約70~90[msec][3]を要すると報告されている。なお、経壁方向の興奮伝達時間は、内膜面におけるある点において興奮が生じた後、その点から最短距離に位置する外膜面上の点において興奮が生じるまでの時間とする。また、円周方向の興奮伝達時間は、ある短軸断面において、内膜上に興奮が生じた後、断面内の全ての細胞に興奮が生じるまでの時間とする。

刺激伝導系及び興奮伝播現象は左心室壁運動に密接に関係しており、動物実験による刺激伝導系異常と左心室壁運動の関係解析は多数報告されている。Verbeekらによるイヌを用いた研究[4]では、同一の最高血圧に設定した正常な刺激伝導系をもつ心臓と、左脚ブロックを生じた心臓において、後者では1回拍出量が36%程度低下すると報告されている。

しかしながら、動物実験では、細胞そのものの生理学特性や、血液循環に関わる血管の特性等、様々な要素が互いに関連しており、個々の要素や現象に関し、定量的な解析を行うことは困難である。シミュレーションモデルを利用した研究では、対象となる現象に関する条件のみを変更した実験を行うことが可能であり、モデルの解析により生理学的な機構の評価が可能であるため、新たな作業仮説の構築が容易である。

シミュレーションによる興奮伝播現象と心機能の定量的な解析に関する研究としては、陸らによる研究[5]がある。この研究では、心筋組織モデルとして多数の心筋細胞モデルを直列に連結したモデルを用いており、等尺状態の心筋組織モデルに等間隔に電気刺激点を設定し、最大収縮力を計測している。刺激点数の変更により組織興奮伝達時間を変更することで、興奮伝達時間と最大収縮力の関係を解析しており、興奮伝達時間が増大すると、組織最大収縮力の減少率は非線形に増大すると報告されている。これは、心筋細胞の長さ張力関係が原因であり、時間的に遅れて収縮を開始する細胞は、興奮開始以前に細胞長が引き延ばされ、最初に興奮する細胞に対し最大収縮力が増大するために生じる現象である。しかしながら、この研究では、等尺状態における組織最大収縮力を評価しており、実心臓における心内圧に起因する機械的負荷及び組織長の変化は考慮されていない。

そこで、本研究では、実際の心臓における心筋組織の機械的負荷及び組織長の変化を考慮したモデルを構築し、生理学的な心内圧及び体積変化のもとで興奮伝達時間と心機能の関係を定量的に評価する。

2. 左心室壁運動シミュレーション

2-1 壁運動シミュレーションの概要

本研究では、生理学的な心内圧及び体積変化を伴う心拍動において、興奮伝達時間と心機能の関係をシミュレーション実験により定量的に評価するため、細胞の興奮伝播現象に関する興奮伝播シミュレーションと、組織の変形に関する収縮シミュレーションが必要である。

複雑な心筋細胞モデルの修正や検証は時間を要する作業であるため、本研究における興奮伝播シミュレーションでは、後述するモデルの格子点上に細胞モデルを配置し、固定タイムステップ(0.01 msec)を用いて前進オイラー法で計算する有限差分法を用いる。この場合、各細胞モデルに対応する組織の体積を考慮する必要がないので、単位体積で正規化された心筋細胞モデルのソフトウェアをそのまま利用できる。ここでは、細胞モデルのソフトウェアとして皿井らによって提案されたsimBio[6]を用いる。心筋細胞の電気生理学特性は強い非線形性を持つので、この計算では、差分格子間隔を小さくする必要がある。なお、心筋細胞モデルとしては、高精度に電気生理学及び収縮特性を再現できるKyotoモデル[7]を用いた。一方、収縮シミュレーションでは、組織形状の大変形を効率良く計算できるので、有限要素法を用いて組織形状変化を計算する。有限要素法は、大きな要素サイズを用いても計算誤差が小さいという利点を有するが、要素数の増大に対し計算時間が増大するため、大きな格子間隔を用いて要素数を小さくすることにより、計算時間の短縮を図る必要がある。これら2種類のシミュレーションを、同時に連成計算により実行する場合、同一の格子間隔を用いる必要があるが、要素数が増大するため計算時間が膨大になるという問題がある。

本実験で用いたKyotoモデルを含む多くの心筋細胞モデルでは、興奮伝播速度は膜興奮時の最大立ち上がり速度に依存するが、細胞の力学的環境が興奮伝播速度に与える影響は比較的小さい。そこで、本研究では、はじめに等尺状態における左心室形状モデルで興奮伝播シミュレーションを行い、各細胞の興奮時刻を取得し、次に左心室形状モデルにおいて、興奮伝播シミュレーションで取得した興奮時刻を用いて電気生理学モデルを刺激し、収縮シミュレーション実験による心機能の評価を行う。

2-2 左心室形状モデル

本研究では、現実的な計算時間でシミュレーションを行うため、左心室形状を単純化した近似モデルとして、リング形状モデルを利用する。モデルは、内半径20[mm]、外半径30[mm]、壁厚が10[mm]とした。また、細胞方向は全て円周方向に一致してとした。

前述の通り、興奮伝播シミュレーションでは、格子間隔を小さくする必要がある。Kyotoモデルを用いた興奮伝播シミュレーションにおいては、本研究における実験条件で



図1 収縮シミュレーションで用いる400要素モデル

Fig. 1 400 elements model for the left ventricular wall motion simulation.

は、実験的に細胞間距離を1.2[mm]以下とする必要があることを確認した。そこで、円周方向160要素、経壁方向10要素の格子により構成される1600要素のモデルを用いた(以下1600要素モデル)。なお、コンダクタンスは、細胞方向(円周方向)と、細胞方向に直交する方向(経壁方向)の2種類設定する。また、このモデルは、左室長軸方向には一様であるとし、厚さ方向は考慮しない。

収縮シミュレーション実験で利用するモデルは、図1に示すような経壁方向5層、円周方向80要素のリングモデルであり、節点数960、要素数400の6面体メッシュデータである。以下400要素モデルと呼ぶ。なお、本モデルの厚さは2[mm]である。

2.3 興奮伝播シミュレーション実験

興奮伝播シミュレーションでは、刺激部位を変更することで、種々の興奮伝播パターンを実現した。ここでは7種類の刺激方法を定義した。本論文では、刺激方法を刺激パターンと呼ぶ。

はじめに、生理学的な興奮伝播状態として、正常刺激伝導系における興奮伝播、および、病態として左脚ブロックにおける興奮伝播を取り上げる。正常刺激伝導系における興奮伝播は、右脚と左脚から分岐した前枝・後枝より内膜上に興奮が伝わり、内膜上で急速に興奮が広がって、さらに心室全体へ遅い速度で興奮が広がるため、内膜面の細胞はほぼ同時に興奮を開始するとみなすことができる。そこで、本実験では、正常刺激伝導系のモデルとして、内膜面に接する全ての細胞に電流刺激を行う刺激法を用いることとし、内膜1層刺激(endocardium stimulation)と呼ぶ。左脚ブロックにおける興奮伝播は、左脚からの刺激が障害されるため、右脚のみから興奮が伝わり、内膜面では1点から興奮が広がるように観測される[3,8]。なお、経壁方向の興奮の広がり方については、調査した範囲で報告例がなく、詳細な興奮の順序は報告されていない。本実験では、左脚ブロックや左心室内膜起源の期外収縮と同様に興奮の同期性が失われる状態として、内膜に接する1箇所のみに電流刺激を行う刺激法を用いることとし、1点刺激

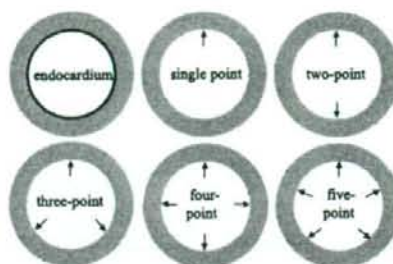


図2 各刺激パターンにおける刺激位置

Fig. 2 Electrical stimulation position for the six stimulation conditions.

(single point stimulation)と呼ぶ。

次に、興奮伝達時間の異なる非生理的な刺激方法として、内膜面に接する等間隔な2~5細胞に電流刺激を行う方法を考え、それぞれ、2点刺激(two-point stimulation)、3点刺激(three-point stimulation)、4点刺激(four-point stimulation)、5点刺激(five-point stimulation)と定義する。更に、興奮時刻に遅延がない理想的な刺激方法として、全細胞が同時に興奮する全点同時刺激法(simultaneous stimulation)を定義する。各刺激パターンにおける刺激位置を図2に示す。

興奮伝播シミュレーションでは、1600要素モデルに対し、上記刺激パターンによる電気刺激を与え、モノドメイン方程式[9]により興奮伝播現象を計算する。

2.4 収縮シミュレーション実験

2.4.1 シミュレーション計算法 収縮シミュレーションでは、400要素モデルを用いて、電気生理学シミュレータと構造力学シミュレータを実行し、組織の収縮変形を計算する。シミュレーションにおいては、電気生理学シミュレータは、細胞間の興奮伝播現象を考慮せず、前節の興奮伝播シミュレーションで得られる興奮時刻を用いて個々の細胞に電流刺激を与え、各細胞で独立に電気生理学モデルの計算を行う。構造力学モデルにおいては、400要素モデルを使用し、各要素に対応する心筋細胞モデルの発生張力を入力として、有限要素法(Finite Element Method: FEM)により心筋組織の収縮変形を計算する。本研究においては、有限要素法のソルバとしてエムエスシーソフトウェア株式会社のMSC.Marc(以下Marcとする)を用いる。左心室内圧は次の計算により求める。この値は、有限要素法の計算において、リングモデルにおける心内膜面に相当する面要素に、面荷重として適用される。設定する最小及び最大内圧を P_{ED} 、 P_{ES} とし、全細胞モデルの平均収縮力を F_{LV} とし、その最小値及び最大値を F_{ED} 、 F_{ES} とする。このとき、左心室内圧 P_{LV} は、次式により計算する。

$$P_{LV} = \frac{F_{LV} - F_{ED}}{F_{ES} - F_{ED}} (P_{ES} - P_{ED}) + P_{ED} \quad (1)$$

なお、モデル要素の材料特性は Mooney-Rivlin 体としており、ヤング率 50 KPa の線形弾性体に相当する特性を使用している。また、要素収縮力は、要素の応力マトリックスに対し、細胞方向成分に収縮力に相当する応力が加算されるとして形状変化を計算する。

400 要素モデルにおける各要素の興奮時刻は、対応する 1600 要素モデルにおける要素の興奮時刻の平均を用いる。

2.4.2 シミュレーションパラメータの検討 弛緩している心筋を圧縮すると、心筋の並列弾性特性により、伸展力が生じる。これを静止張力 (resting tension) T_p と呼ぶ。一方、心筋を引き伸ばした状態で等尺性収縮を起こしたとき、発生する張力を発生張力 (developed tension) T_b と呼ぶ。静止張力に発生張力を加えたものを全張力 T_{tot} と呼ぶ[10]。

$$T_b = T_p + T_{tot} \quad (2)$$

本実験では、細胞モデルである Kyoto モデルから発生張力 T_b が出力され、心筋組織材料特性により T_p が決まり、左心室内圧により T_{tot} が決まる。内圧と張力の関係はラプラスの法則に従う[11]。半径 R 、厚さ h の円筒状の壁に内圧 P を与えると、張力 T と内圧 P の間に次式が成立する。

$$\frac{T}{R} = \frac{P}{h} \quad (3)$$

ラプラスの法則では心筋組織の伸展力は考慮されていないため、上式における張力 T は全張力 T_{tot} に相当する。

心筋組織の発生張力は精密な計測が困難であり、報告されている生理実験値の範囲も広い。また、心筋組織の材料特性については、圧縮側に関する精密な定量的報告はなく、報告されているヤング率の精度はかなり低い。さらに、全張力は、左室半径と壁厚に依存するため、同一内圧下でも部位により異なる。

左心室のシミュレーションにおいては、これらの値を調整することにより駆出率を変更することが可能であるため、シミュレーションモデルの検証対象となる生理実験を可能な限り正確に反映するパラメータを選択する必要がある。

ここで、ラプラスの法則を用いて、生理学実験の実測値より張力を求める。イヌの収縮末期の左心室内径 R_{ES} [4]、壁の厚さ h_{ES} [4]、内圧 P_{ES} [12] は、それぞれ $R_{ES}=14.5$ [mm][4]、 $h_{ES}=13.0$ [mm][4]、 $P_{ES}=130$ [mmHg]= 17.33 [mN/mm²][12]と報告されている。

式(3)より、イヌの収縮末期における左心室の全張力 $T_{ES,tot}$ は次のようになる。

$$T_{ES,tot} = 19.3 \text{ [mN/mm}^2] \quad (4)$$

また、Kyoto モデルにおける収縮末期の発生張力 $T_{KM,b}$ は細胞長により変化するが、

$$T_{KM,b} = 32 \text{ [mN/mm}^2] \quad (5)$$

程度の値である。

一方、収縮末期の静止張力は、50 KPa 程度のヤング率を

持つ心筋組織が、15~20%程度短縮した場合の応力に対応すると考えられる。短縮率を20%とすると、 $T_{ES,p} = 10$ [mN/mm²]となり、 $T_b = T_p + T_{tot}$ の関係に近い値となる。そこで、本研究では、これらの値をそのまま利用してシミュレーションを行った。

3. 評価実験

3.1 興奮伝播シミュレーション

3.1.1 実験条件 興奮伝播現象における伝播速度は組織のコングクタンクスによって変化する。ここでは興奮伝達時間が生理的範囲となるように、コングクタンクスを調節した。実験の結果、単位長さ当たりの経壁方向のコングクタンクスを70[nS mm]、円周方向のコングクタンクスを120[nS mm]にした場合、経壁方向の興奮伝達時間は18[msec]、円周方向の興奮伝達時間は75[msec]となった。そこで、ここでは上記コングクタンクスを全ての刺激パターンに対して用いることとした。なお、組織に与える刺激電流は、興奮伝播現象が生ずる最小の電流量を実験的に求め、各部位において4[msec]の間、-6000[pA]の電流を1×2要素に与えることとした。

興奮伝播シミュレーションにおける左心室形状モデルには、1600要素のリング形状モデルを用いた。刺激方法は2・3節で述べた7種類のうち、全要素の興奮開始時刻が同一である全体同時刺激を除く1点刺激、2点刺激、3点刺激、4点刺激、5点刺激、内膜1層刺激の6種類を用いた。

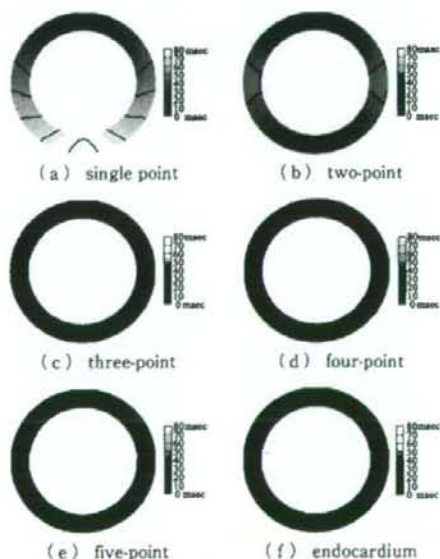


図3 各刺激パターンに対する興奮時刻
Fig. 3 Distribution of activation time for six stimulation conditions.

3・1・2 結果 6種類の刺激方法で左心室形状モデルに刺激を与えたときの興奮時刻を図3(a)から図3(f)に示す。各要素について、興奮が発生した時刻を濃淡で表示した。また、各刺激パターンに関する経壁方向及び円周方向の興奮伝達時間を表1に示す。経壁方向の興奮伝達時間は1点刺激から5点刺激まで等しく、17.2[msec]であった。また内膜1層刺激では14.0[msec]であった。円周方向の興奮伝達時間は、内膜1層刺激においては14.0[msec]であり、5点刺激、4点刺激、3点刺激、2点刺激、1点刺激の順に増大した(表1)。

3・2 収縮シミュレーション

3・2・1 実験条件 収縮シミュレーションには400要素のリングモデルを用いた。前節で得られた6種類の刺激パターンに対する興奮時刻、および全体同時刺激にあたる全細胞で同一の興奮時刻を用いた場合の計7種類の刺激パターンについて、各要素の興奮時刻を計算し、収縮シミュレーションにおける刺激時刻として用いた。要素材料特性としては、2・4・1節で説明したMooney-Rivlin体を用いた。本実験では、動物実験における左脚ブロック例との比較を行うことを考え、収縮末期圧と拡張末期圧として、動物実験と同様に、全ての刺激パターンに対し、 $P_{ES}=17.33$ [mN/mm²], $P_{ED}=1.35$ [mN/mm²]を用いた。

表1 各刺激パターンに対する経壁方向及び円周方向の興奮伝達時間

Table 1 The transmural and the circumferential activation time for each stimulation condition.

stimulation condition	transmural activation time[msec]	circumferential activation time[msec]
single point	17.2	83.1
two-point	17.2	45.8
three-point	17.2	33.5
four-point	17.2	27.2
five-point	17.2	23.7
endocardium	14.0	14.0

表2 各刺激パターンに対する面積駆出率

Table 2 Resulting area ejection fraction with seven stimulation conditions.

stimulation condition	area ejection fraction[%]
single point	13.10
two-point	18.62
three-point	20.32
four-point	20.59
five-point	20.71
endocardium	21.13
simultaneous	21.51

3・2・2 結果 1点刺激の実験において、刺激部位及び、興奮時刻がもっとも遅くなる、左室長軸に対して対称な位置の、内膜、壁中央、外膜における細胞長の時間変化及び静止張力の時間変化を図4及び図5に示す。各刺激パターンに関して、内膜底面の面積を用いた面積駆出率を表2に、興奮伝達時間と駆出率の関係を図6に示す。駆出率は、1点刺激における13.10%が最小となり、全体同時刺激における21.51%が最大となり、刺激点密度が大きくなるほど駆出率が大きくなる傾向があった。内膜1層刺激の駆出率21.13%を基準とすると、1点刺激では駆出率は13.10%であり、38.0%の減少、2点刺激では18.62%であり11.9%の減少、3点刺激では20.32%であり、3.8%の減少、4点刺激では20.59%であり、2.6%の減少を示し、5点刺激では20.71%であり、内膜1層刺激の場合に近い値となった。

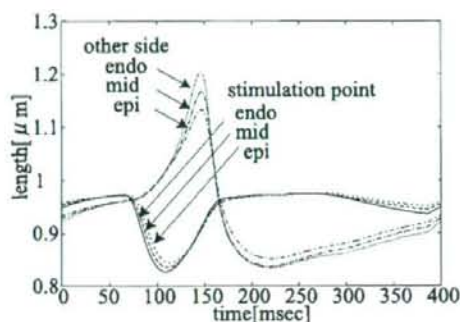


図4 1点刺激における刺激点 (stimulation point) 及び反対側 (other side) 内膜 (endo), 中央 (mid), 外膜 (epi) の細胞長変化

Fig. 4 Length of endo- mid- and epicardial cells at the stimulation point and its symmetrical point in the single point stimulation experiment.

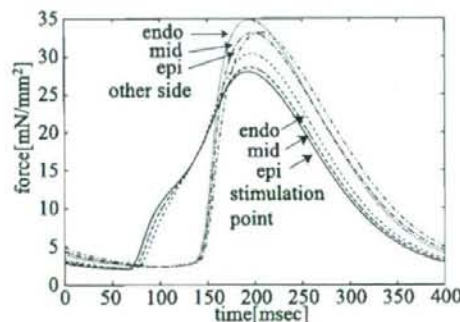


図5 1点刺激における刺激点 (stimulation point) 及び反対側 (other side) 内膜 (endo), 中央 (mid), 外膜 (epi) の細胞収縮力変化

Fig. 5 Force of endo- mid- and epicardial cells at the stimulation point and its symmetrical point in the single point stimulation experiment.

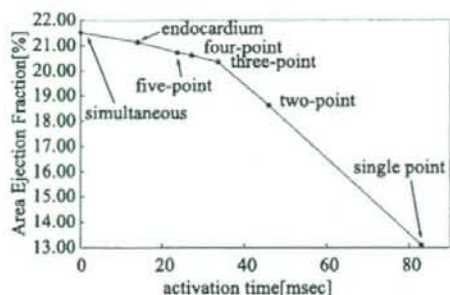


図 6 興奮伝達時間と面積駆出率の関係

Fig. 6 The relation between the area ejection fraction and the activation time.

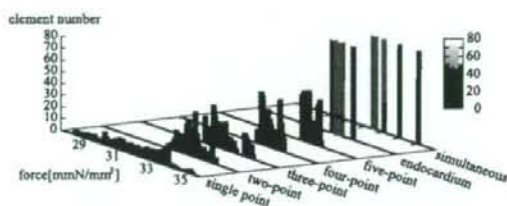


図 7 各刺激パターンに対する各細胞発生張力のヒストグラム
Fig. 7 Elementary force histogram with seven stimulation conditions.

また、図 7 に、各刺激パターンの収縮末期において、モデル中の要素が発生している発生張力分布をヒストグラム表示した。この結果から、興奮到達時間の増大に対し、発生張力の分布が広がることが確認できる。

4. 考 察

興奮パターンを変化させた場合、心臓の駆出率が変化することが確認された。刺激パターンによって興奮時刻分布が変化すると駆出率に差が生じたが、その原因として心筋細胞の発生張力分布の変化が考えられる。ある時刻における発生張力分布は、興奮時刻の分布と強い相関関係がある。刺激点間距離が小さいと興奮伝達時間が短縮し、刺激点間距離が大きいと延長するが、興奮時刻差が増大すると収縮末期における心筋細胞の平均発生張力は小さくなる。図 7 では、刺激点の間隔が狭い全体同時刺激や内膜 1 層刺激の場合、発生張力分布の範囲が狭く、心筋細胞の発生張力は 31 [mN/mm²] から 32 [mN/mm²] に集中している。これに対し、刺激点密度が低い 1 点刺激の場合、心筋細胞の発生張力は 27.6 [mN/mm²] から 34.5 [mN/mm²] まで幅広く分布しており、内膜 1 層刺激における分布に比べ、張力の低い方に広がっている。このため平均収縮力が低下し、同一心内圧に対して、より大きい左室半径を必要としたと考えられる。刺激点の間隔が狭くなるほど、心筋細胞の発生

張力もある値に集中し、平均発生張力が増大する。

本実験で得られた面積駆出率は内膜 1 層刺激の場合 21.13%、1 点刺激の場合 13.10% であった。従来研究として興奮伝達時間と等尺状態における心筋組織の発生張力の関係を解析した陸らの研究 [5] では、興奮伝達時間の遅延による発生張力の低下は 3 ~ 4% 程度と報告されている。本研究においても、発生張力はそれほど低下していないが、左心室モデルにおける面積駆出率に対しては、顕著な影響が確認された。現在でも、細胞の収縮と左心室の収縮の関係は未解明な部分がかかなり多いが、この結果は、実験室的な条件における細胞や組織の実験結果は、臓器としての結果と必ずしも一対一に対応しないことを示していると考えられる。

イヌを用いた実験では、正常例の駆出率として 38.3%、左脚ブロック例 28.2% と報告されている [4]。報告されている駆出率と面積駆出率の関係 [13] を利用すると、それぞれ 24.3% と 17.2% の面積駆出率に相当する。本実験では、興奮の同期が失われた状態のモデルとして 1 点刺激のモデルを用いたが、左心室内膜面における興奮伝達時間に関しては、報告されている動物実験値 [3] に近い値となっている。しかしながら、経壁方向の興奮順序については、Berenfeld らによるシミュレーション実験の報告 [15] で、左脚ブロックにおいて、興奮は内膜側から広がると報告されているが、動物実験における計測結果は報告されていない。本研究で用いた 1 点刺激の興奮パターンは、左脚ブロックにおける興奮伝播様式とある程度の関連性はあるものと考えられる。本実験の結果は、動物実験における左脚ブロックの結果と直接比較は出来ないが、内膜同時刺激と 1 点刺激における面積駆出率は、それぞれ 21% と 13.1% であり、左脚ブロックの動物実験との比較では、15%、24% 程度小さい値となっている。本実験では、細胞収縮力、ラプラス則から計算される全張力、静止張力に関して、モデルと文献の値をそのまま利用しており、これらの値は報告値にもかなり大きな開きがあるため、生体におけるバランスからずれている可能性がある。また、左心室体積と左心室内圧の関係として用いたラプラス則は、実際の心臓における関係とはかなり異なる。動物実験との比較においてシミュレーション実験の結果を議論するためには、これらの点に関してより詳細な調査と検討が必要になると考える。

また、本実験では、左室内圧として、心筋細胞の平均収縮力に比例する圧力を用いており、等容性の収縮期及び弛緩期を再現していない。このため内圧変化は生理実験結果とは異なるが、心筋細胞の発生張力は細胞長による制御が強く、細胞長変化速度の影響はそれほど大きくない [14] ため、駆出率の比較に与える影響はそれほど大きくないと考えられる。しかしながら、等容性の期間が駆出率に与える影響を評価することは重要であり、これは今後の課題である。

本実験と動物実験の報告値は、興奮伝達時間と駆出率との関係において、傾向はよく合っており、本実験モデルは、心臓のポンプ機能に対して、興奮伝達時間の短縮が一定の機能向上に貢献する可能性を示唆していると考えられる。これは、両室ペースング等の興奮伝達時間を改善する治療等において、興奮伝達時間を指標とした新たな治療効果評価法が有効である可能性を示唆していると考えられる。

5. 結 論

心臓における刺激伝導系及び興奮伝播現象は、心臓のポンプ機能と密接に関係していることが知られているが、循環動態には様々な要素が関連しており、動物実験において個々の要素が与える影響を定量的に解析することは困難である。本論文では、シミュレーションにより、興奮伝播現象が左心室の壁運動に与える影響を評価した。左心室の拍動シミュレーションは、心臓を構成する心筋細胞の収縮力を計算する電気生理学モデルと組織の変形を計算する構造力学モデルに基づいて実現した。

実験の結果、本研究で用いた左心室形状モデルでは、興奮が左心室全域まで広がる興奮伝達時間が長いほど、面積駆出率が減少した。正常例として用いた内膜1層刺激の面積駆出率が21.13%であったのに対して、左脚ブロックの例として用いた1点刺激での駆出率は13.10%となった。この結果は、正常な心臓から左脚ブロックとなったイヌの実験において駆出率が低下した結果と同様の傾向を示した。本研究の結果より、興奮伝達時間は左心室壁運動において非常に重要なパラメータであり、興奮伝播時間を短縮することにより、効率的な心筋収縮を実現できる可能性が示唆された。

今後の課題として、実際の心臓の状態により近いモデルとして、弁を有し等容期の再現が可能な血管系モデルを導入し、精密なシミュレーションを行うこと、駆出率以外にエネルギー消費等の評価を行うこと、右室を含めたシミュレーションを行うこと、また3次元の精密な左心室モデルを利用し心電図の対応を取るなどが挙げられる。

文 献

1. Guyton A: TEXTBOOK of MEDICAL PHYSIOLOGY, 9th Ed. W.B. Saunders Comp. Pennsylvania, 1995.
2. He B, Li G, Zhang X: Noninvasive Imaging of Cardiac Transmembrane Potentials Within Three-Dimensional Myocardium by Means of a Realistic Geometry Anisotropic Heart Model. *IEEE Trans Biomed Eng.* 50(10): 1195, 2003.
3. Vassallo J, Cassidy D, Marchlinski F, Buxton A, Waxman H, Doherty J, Josephson M: Endocardial activation of left bundle branch block. *Circulation.* 69(5): 914-923, 1984.
4. Verbeek X, Vernoooy K, Peschar M, Cornelussen R, Prinzen F: Intra-Ventricular Resynchronization for Optimal Left Ventricular Function During Pacing in Experimental

- Left Bundle Branch Block. *J Am Coll Cardiol.* 42(3): 558-567, 2003.
5. 陸 建銀, 西 俊文, 芦原貴司, シュナイダーナタリー, 天野 晃, 松田哲也, 小寺秀俊: 心室筋興奮到達時間の組織収縮力への影響: シミュレーションによる解析, *生体医工学.* 44(1): 170-176, 2006.
6. Sarai N, Matsuoka S, Noma A: simBio: a Java package for the development of detailed cell models. *Prog Biophys Mol Biol.* 90: 360-377, 2006.
7. Matsuoka S, Sarai N, Kuratomi S, Ono K, Noma A: Role of Individual Ionic Current Systems in Ventricular Cells Hypothesized by a Model Study. *Jap J of Physiol.* 53(2): 105-123, 2003.
8. Vernoooy K, Verbeek X, Peschar M, Crijns H, Arts T, Cornelussen R, Prinzen F: Left bundle branch block induces ventricular remodelling and functional septal hypoperfusion. *Eur Heart J.* 26: 91-98, 2005.
9. 岡本良夫編著: 心臓のフィジオーム. 森北出版, 東京, 2003.
10. 本郷利憲, 廣重 力: 標準生理学. 医学書院, 東京, 2000, 9章.
11. 菅 弘之, 高木 都, 後藤業一, 砂川賢二: 心臓力学とエネルギー. コロナ社, 東京, 2000, pp.11.
12. Solomon S, Nikolic S, Glantz S, Yellin E: Left ventricular diastolic function of remodeled myocardium in dogs with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 274: H945-H954, 1998.
13. Wisneski J, Pfeil C, Wyse D, Mitchell R, Rahimtoola S, Gertz E: Left ventricular ejection fraction calculated from volumes and areas: underestimation by area method. *Circulation.* 63(1): 149-151, 1981.
14. Nobuaki Y, Kamei Y, Lu J, Shimayoshi T, Ishikawa S, Amano A, Kotera H, Matsuda T: Reproducing Nonlinear Force Velocity Relation of Myocardial Tissue by a Nonlinear Parallel Elastic Component. *Proc IEEE EMB Conf:* 612-615, 2006.
15. Berenfeld O, Jalife J: Purkinje-muscle reentry as a mechanism of polymorphic ventricular arrhythmias in a 3-dimensional model of the ventricles. *Circ Res.* 1; 82(10): 1063-1077, 1998.

高田 康弘 (タカダ ヤスヒロ)

2006年京都大学工学部電気電子工学科卒業。同年京都大学大学院情報学研究所入学、現在に至る。生体シミュレーションの研究に従事。



天野 晃 (アマノ アキラ)

1993年京都大学大学院博士課程学修退学。同年工学部助手。1995年広島市立大学助教授。2002年京都大学大学院情報学研究所助教授。現在に至る。生体シミュレーション、文書画像処理、コンピュータビジョンの研究に従事。



IEEE BME, CS, ISMRM, 電子情報通信学会, 人工知能学会, 日本生体医工学学会各会員

宋 仁煥 (ソン イナン)

2007 年京都大学工学部電気電子工学科卒業。同年京都大学大学院情報学研究所入学。現在に至る。生体シミュレーションの研究に従事。



陸 建銀 (リク ケンギン)

2002 年京都工芸繊維大学博士課程修了。同年オムロン株式会社センシング研究所、顔認識などの研究開発に従事。2004 年から京都大学生体・細胞シミュレーションプロジェクト研究員、生体シミュレーション、特に心筋細胞・心臓の収縮シミュレーションの研究に従事。

電子情報通信学会会員。



嶋吉 隆夫 (シマヨシ タカオ)

1999 年京都大学大学院工学研究科修士課程了。2003 年(財)京都高度技術研究所入社。生体機能シミュレーション、ソフトウェアシステムの研究に従事。

IEEE EMBS, 情報処理学会会員。



石川 寛志 (イシカワ サトシ)

1980 年大阪府立阿倍野高校卒業。1992 年日本マーク(株)入社。1999 年合併吸収によりエムエスシーソフトウェア(株)勤務。2006 年 4 月より(株)メカニカルデザイン名古屋支社勤務。専門分野は非線形構造解析。

日本ゴム協会、日本材料学会、日本機械学会会員。



小寺 秀復 (コチラ ヒデアツシ)

1980 年京都大学卒業。1982 年京都大学工学研究科機械工学専攻修了。1982 年から 1993 年まで松下電器産業(株)中央研究所にて計算科学の研究に従事。1993 年から 2000 年まで京都大学工学研究科助教授。2000 年から教授。

現在の所属：京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 教授。

現在の専門分野：マイクロシステム、マイクロ TAS および計算科学。

所属学会：日本機械学会・電気学会・精密工学会・トライロジー学会・塑性加工学会等。



松田 哲也 (マツダ テツヤ)

1981 年京都大学医学部卒業。1988 年京都大学大学院医学研究科博士課程修了。医学博士。同年 4 月京都大学医学部附属病院第 3 内科助手。1997 年同医療情報部助教授。2000 年京都大学大学院情報学研究所教授。現在に至る。生体シミュレーション、循環器領域の MRI 撮影法および画像処理に関する研究に従事。

ISMRM, SCMR, IEEE BME, 日本生体医工学会、日本内科学会、日本循環器学会、日本電気共鳴医学会、電子情報通信学会、各会員。



ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface watersH. Kodaka^{1,2}, S. Mizuochi¹, M. Saito² and H. Matsuoka²¹ Research Institute of Advanced Technology, Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, Hokunanmoro, Yuki, Ibaraki, Japan² Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Nakamachi, Koganei, Tokyo, Japan**Keywords**coliforms, EC-Blue-10, *E. coli*, enumeration, MPN, water.**Correspondence**Hidemasa Kodaka, Research Institute of Advanced Technology, Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, 1075-2, Hokunanmoro, Yuki, Ibaraki 307-0036, Japan.
E-mail: h-kodaka@yuki.nissui-pharm.jp

2007/0564: received 10 April 2007, revised and accepted 20 September 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03627.x

Abstract**Aim:** A new medium, EC-Blue-10, containing chromogenic and fluorogenic substrates, KNO₃ and sodium pyruvate has been developed for the rapid simultaneous detection and enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water.**Methods and Results:** Two evaluations of EC-Blue-10 were carried out. Firstly, EC-Blue-10 was compared with Colilert-MPN for 96 water samples using MPN for total coliforms and *E. coli*. Secondly, the detection of coliforms and *E. coli* were compared using 2400 tubes of EC-Blue-10 and Colilert-MPN. The regression coefficients between EC-Blue-10 and Colilert-MPN for total coliforms and *E. coli* were 0.91 and 0.89, respectively. For the detection results, the Cohen's kappa values between the two media were 0.79 for coliforms and 0.72 for *E. coli*.**Conclusions:** EC-Blue-10 is almost same as Colilert-MPN for the detection of coliforms and *E. coli* in surface waters. Further evaluation for EC-Blue-10 is needed to verify in different geographical areas.**Significance and Impact of the Study:** EC-Blue-10 is useful method for the rapid and simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water sample.**Introduction**

Total coliforms and *Escherichia coli* are important indicators of the sanitary quality of drinking water. The standard test for the coliform group is either the multiple-tube fermentation technique (Grasso *et al.* 2000) or the membrane-filter technique (Bernasconi *et al.* 2006). Since traditional multiple-tube fermentation and membrane-filter methods require a minimum of 24 h incubation followed by a confirmation procedure lasting 24–48 h, there is a requirement for rapid test methods for the emergency testing of drinking water supplies. During recent decades new chromogenic or fluorogenic, defined substrate methods based on β -galactosidase for total coliforms or β -glucuronidase for *E. coli* and ready-made culture media have been introduced (Edberg and Edberg 1988). Many chromogenic media based on β -galactosidase for total coliforms use *o*-nitrophenol- β -D-galactopyrano-

side (ONPG) or chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) as a substrate. The results of studies comparing media containing ONPG or CPRG and 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) with standard methods (Edberg *et al.* 1988; Buckalew *et al.* 2006) provide critical information confirming the accuracy of the defined substrate technology (DST) method, its comparability to a standard method, and its applicability for use. ONPG could be replaced successfully by 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) (Manafi and Kneifel 1989). However, there are few studies testing commercially available liquid media that use X-Gal and MUG for the simultaneous determination of total coliforms and *E. coli* in water (Manafi and Kneifel 1989; Geissler *et al.* 2000; Hörman and Hänninen 2006). We have developed a new medium using X-Gal and MUG for rapidly and simultaneously detecting total coliforms and *E. coli* in water. EC-Blue-10 is a new medium in a special

plastic disposable tube sterilized by electron beam. After incubation at 35°C for 24 h, the development of a blue-green colour in an initially light yellow-coloured solution demonstrates the presence of coliforms and fluorescence at 366 nm in the same tube demonstrates the presence of *E. coli*. Since a DST method has been used as a Japanese standard method since 1992 (Japan Water Works Association [JWWA] 2001), it was decided to use this DST method to confirm the validity of EC-Blue-10 for rapidly and simultaneously detecting coliforms and *E. coli* in temperate humid climate zone waters sampled in Japan.

Materials and methods

EC-Blue-10

EC-Blue-10 consists of a granulated medium in a special plastic bottle sterilized by electron beam. The medium was developed primarily for the rapid growth of *Enterobacteriaceae* (Kodaka et al. 1995) and contains the following ingredients g l⁻¹: Trypticase peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 5.0, NaCl 5.0, K₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 1.0, KNO₃ 1.0, sodium pyruvate 1.0, sodium dodecyl sulphate (SDS) 0.1, MUG 0.1, X-Gal 0.1, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside 0.1 and pH 7.1 ± 0.2.

Effect of media for the detection of coliform bacteria from chlorinated water sample

Escherichia coli American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) 11775, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 were used in this study. Each coliform bacterium was suspended in sterilized phosphate buffer saline (PBS) solution prepared to make 20 000 CFU 400 ml⁻¹ in 500 ml Erlenmeyer flask. The bacteria suspension was kept in the water bath at 20°C until mixing with chlorine solution. The chlorine solution was prepared to a target concentration of 0.3 mg l⁻¹ (0.3 ppm) in 400 ml sterilized PBS solution in 500 ml Erlenmeyer flask. The chlorine solution was kept in the water bath at 20°C until mixing with the bacterial suspension. The 400 ml bacterial suspension and 400 ml chlorine solution were mixed promptly in 1000 ml sterilized brown Erlenmeyer flask with stopper. This mixed solution was stirred by stirring bar and 100 ml mixed solution was taken at 15, 30, 60, 120 and 300 s after adding sodium hypochlorite (NaOCl) into 300 ml sterilized Erlenmeyer flask containing 0.5 ml of 1 mol l⁻¹ of sodium thiosulfate. Each 50 ml sample was diluted with 450 ml sterilized PBS solution. About 10 ml of diluted sample was inoculated into 10 tubes of EC-Blue-10, Colilert-MPN, Lactose Broth with bromothymol blue (LB; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo,

Japan) and Brilliant Green Lactose Bile broth (BGLB; Nissui Pharma.). These cultures were incubated at 36 ± 1°C for 48 h. During the 48-h incubation, the positive reaction was observed at 20, 24, 28 and 48 h. This experiment was done three times for each strain. The comparison for detection of each coliform from chlorinated water samples was carried out to sum up the positive results from the data of three experiments.

Influence of heterotrophic bacteria for coliforms and *E. coli* detection

Each coliform bacterium (*E. coli* ATCC 11775, *Cit. freundii* ATCC 8090, *Ent. cloacae* ATCC 13047 and *Kl. pneumoniae* ATCC 13883) was suspended in 250 ml sterilized PBS solution to make 20 CFU ml⁻¹. Three heterotrophic bacteria [*Flavobacterium odoratum* Japan Collection of Micro-organisms (JCM, Saitama, Japan) 7458, *Acinetobacter calcoaceticus* JCM 6842 and *Pseudomonas aeruginosa* from JWWA] were mixed and suspended in 250 ml PBS solution to make 60 000 CFU ml⁻¹. Each coliform bacterium and the heterotrophic suspension were mixed in equal volumes. The mixed bacterial suspension was inoculated into 10 tubes of two media and incubated at 35°C. The positive reaction was observed at 20, 24, 28 and 48 h. The experiments were done in duplicate for each coliform bacterium.

Evaluation procedure for untreated and chlorinated natural water

The natural water samples were collected by eight water-work stations following the instructions issued by JWWA between September (average temperature: 24.4°C at Tokyo) and October (average temperature: 20.1°C at Tokyo) 1998. Ten-litre water samples were collected in sterilized bottles and were kept in the dark and at a cool temperature (5°C) until examination. The examinations were carried out within 48 h of collection. Each water sample was tested in duplicate on the same day. The water samples were put into sterilized 3000 ml Erlenmeyer flasks and stirred with a magnetic stirrer at 20 ± 1°C. The following procedure was carried out in accordance with the instructions of JWWA. NaOCl solution was added to give a concentration of 0.2 mg l⁻¹ for lake-waters and 0.5 mg l⁻¹ for river-waters. The sampling time after the addition of NaOCl was 20, 60, 180, 300 and 1800 s. Each water sample was then put into sterilized 300 ml Erlenmeyer flasks containing 1 mol l⁻¹ of sodium thiosulfate. Total coliforms and *E. coli* in each of the 16 untreated and 80 chlorinated natural water samples (total 96 water samples) were then estimated using EC-Blue-10 and Colilert-MPN (Colilert, IDEXX Laboratories, KK, Tokyo,

Japan) by the five-tube, five-dilution MPN method. Each medium was incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. The results were read at 24 h for total coliforms and *E. coli*. The presence of coliforms using EC-Blue-10 was identified by the development of a blue-green colour in an initially light yellow coloured solution and the presence for *E. coli* was identified by the development of fluorescence at 366 nm in the same vessel. For Colilert-MPN, the development of a yellow colour indicated the presence of coliforms and fluorescence on exposure to long-wavelength UV light denoted the presence of *E. coli*.

Isolation and identification

The presence of total coliforms was confirmed by identifying the bacterial isolate(s) to species level from at least one positive EC-Blue-10 and Colilert-MPN tube per row according to the method of Edberg *et al.* (1988). The isolation of bacteria was carried out by streaking onto Levine-Eosin Methylene Blue agar (L-EMB, Becton, Dickinson and Company). Colonies with a typical green metallic sheen, representative of each morphology present, were picked and re-streaked on XM-G agar (the agar medium containing 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (Magenta-Gal) and 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt (X-Gluc), Nissui Pharma.) and incubated for 24 h at 35°C . Presumptive identification for coliforms and *E. coli* was confirmed by Magenta-Gal and X-Gluc reactions on XM-G agar, respectively. Bacterial isolates were inoculated onto plate count agar to confirm the purity of cultures. The isolates for identification were selected after due consideration of geographical differentiation, sampling time and colony morphology on L-EMB and XM-G agar. Gram-negative rods were identified by API 20E system (bioMérieux Japan Ltd, Tokyo, Japan) and ID TEST EB-20 (Nissui Pharma.) (Kodaka *et al.* 2004). The identification of all isolates was also confirmed by standard methods.

Tests for microbial and physical properties

The tests were done according to the Japanese Standard Methods for Examination of Water (JWWA 1993). The standard plate count (SPC) using plate count agar incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 h and the heterotrophic plate count (HPC) using PYG agar (g l⁻¹: peptone 2.0, glucose 0.5, yeast extract 1.0, agar 15, pH 7.0 ± 0.1) incubated at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for 7 days were carried out before adding NaOCl. The residual chlorine was measured using the *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine method. The turbidity was measured with a turbidimeter (ANA-7S Tokyo, Koden, Tokyo, Japan) comparing the sample with a kaolin turbidity standard solution [1 mg of kaolin in 1000 ml of

distilled water has a turbidity of approx. one nephelometric turbidity units (NTU)]. The water temperature was measured with Celsius liquid-in-glass thermometer. The pH was measured with a pH meter (HM-60V, TOA Electronics, Tokyo, Japan) with a glass electrode.

Statistical analysis

Total results for the 96 sets of MPN data were calculated as log₁₀ MPN of total coliforms and *E. coli* 100 ml⁻¹ of water samples. Statistical calculations were carried out with the MICROSOFT EXCEL 2000 statistics package. The statistical analysis consisted of regression analysis and paired *t*-test for the MPN data. The chi-square test and Cohen's kappa for homogeneity of presence/absence results were compared using 2400 tubes of EC-Blue-10 and Colilert-MPN, respectively. All statistical analyses were performed with a level of significance of 0.05. The data were also analysed according to the ISO 17994 (2004) for the establishment of equivalence between EC-Blue-10 and Colilert-MPN methods, prescribes calculation of 100-times the logarithmic (ln) difference. The evaluation of equivalence is based on the mean and the expanded uncertainty derived from the standard uncertainty of the mean.

Results

Effect of media for coliform bacteria from chlorinated water sample

No difference between 24 and 48 h for positive reactions were observed among four media. Therefore, we have compared the cultures for positive reaction at 24 h incubation. A total of 30 tubes were examined at each chlorine treatment time. For the detection of *E. coli* ATCC 11775 after chlorine treatment for 15, 30, 60, 120 and 300 s, positive X-Gal tubes of EC-Blue-10 were 6, 4, 9, 3 and 0, respectively, and positive ONPG tubes of Colilert-MPN were 11, 4, 11, 1 and 1, respectively. Positive MUG tubes of EC-Blue-10 were 6, 4, 9, 3 and 0, respectively, and positive MUG tubes of Colilert-MPN were 10, 2, 11, 1 and 1, respectively. The positive gas production tubes of LB were 19, 15, 18, 4 and 3, respectively. The positive gas production tubes of BGLB were 16, 10, 16, 3 and 0, respectively. For the detection *Cit. freundii* ATCC 8090, positive X-Gal tubes of EC-Blue-10 were 29, 29, 21, 7 and 1, respectively, and positive ONPG tubes of Colilert-MPN were 30, 30, 25, 7 and 5, respectively. The positive gas production tubes of LB were 30, 30, 13, 12 and 4, respectively. The positive gas production tubes of BGLB were 27, 12, 3, 3 and 0, respectively. For the detection of *Ent. cloacae* ATCC 13047, positive X-Gal tubes of EC-Blue-10 were 15, 7, 4, 2 and 0, respectively, and positive ONPG

tubes of Colilert-MPN were 6, 3, 4, 1 and 0, respectively. No positive tubes for gas production in LB and BGLB were observed. For the detection of *Kl. pneumoniae* ATCC 13883, positive X-Gal tubes of EC-Blue-10 were 27, 27, 26, 9 and 12, respectively, and positive ONPG tubes of Colilert-MPN were 3, 5, 3, 1 and 1, respectively. The positive gas production tubes of LB were 25, 29, 28, 20 and 23, respectively. The positive gas production tubes of BGLB were 19, 21, 23, 14 and 12, respectively. MUG reaction in each medium was not observed with *Cit. freundii* ATCC 8090, *Ent. cloacae* ATCC 13047 and *Kl. pneumoniae* ATCC 13883.

Heterotrophic bacterial influence to detect coliforms and *E. coli*

The heterotrophic bacteria at 10^4 CFU level found in these samples appeared neither to interfere with coliforms and *E. coli* detection nor to account for the differences between EC-Blue-10 and Colilert-MPN in coliforms and *E. coli* detection. Mixtures of the heterotrophic bacteria did not result in false-negative analyses.

Untreated and chlorinated natural water samples

A total of 96 MPN tests for each water sample and each NaOCl exposure time were carried out using EC-Blue-10 and Colilert-MPN. The results of the regression analyses for total coliforms are shown in Table 1. Median \log_{10} MPN $100 \text{ ml}^{-1} \pm$ standard deviation (SD) for total coliforms with EC-Blue-10 and Colilert-MPN were 2.11 ± 1.32 and 2.23 ± 1.38 , respectively. The regression coefficient, slope and intercept between EC-Blue-10 and Colilert-MPN were 0.91, 0.96 and -0.0012 , respectively (Table 1). The results of the regression analyses for *E. coli* are shown in Table 1. Median \log_{10} MPN $100 \text{ ml}^{-1} \pm$ SD for *E. coli* with EC-Blue-10 and Colilert-MPN were 0 ± 0.91 and 0 ± 0.89 , respectively. The regression coefficient, slope and intercept between EC-Blue-10 and Colilert-MPN were 0.89, 0.85 and 0.084, respectively. The means of MPN results for total coliforms and *E. coli* with EC-Blue-10 and Colilert-MPN were not statistically significantly different ($P > 0.05$) by paired *t*-test. For all comparisons, the slope and intercept values, as determined by linear regression analysis, were close to 1.00 and 0.00, respectively. The presence/absence results using 2400 tubes of EC-Blue-10 and Colilert-MPN were compared. For the coliform test, the results were 959 positive tubes of EC-Blue-10 and 925 positive tubes of Colilert-MPN (Table 2). For the *E. coli* test 208 tubes were positive using EC-Blue-10 and 217 tubes were positive using Colilert-MPN (Table 2). These results indicated no significant difference between the two media using the

Table 1 Parameters of each test for total coliforms and *Escherichia coli* from water samples*

Parameters	Total coliforms		<i>E. coli</i>	
	EC-Blue-10	Colilert-MPN	EC-Blue-10	Colilert-MPN
No. of tested samples	96	96	96	96
No. of positive samples	93	87	37	41
Median (\log_{10} MPN/100 ml)	2.11	2.23	0	0
SD (\log_{10} MPN/100 ml)	1.32	1.38	0.91	0.89
95% Confidence limit	0.26	0.28	0.18	0.18
Regression coefficient	0.91		0.89	
Slope	0.96		0.85	
Intercept	-0.0012		0.084	
t†	1.75		-0.17	
df	95		95	

*Include 16 untreated and 80 chlorinated water samples.

†Paired *t*-test at the significance level ($P = 0.05$).

Table 2 Comparison of presence/absence results from 2400 tubes for coliforms and *Escherichia coli*

Test kit	Coliforms				<i>E. coli</i>			
	Pr*	Ab†	k‡	P§	Pr*	Ab†	k‡	P§
EC-Blue-10	959	1441	0.79	0.62	208	2192	0.72	0.10
Colilert-MPN	925	1475			217	2183		

*Pr, presence.

†Ab, absence.

‡k, Cohen's kappa value.

§P, P value by chi-square.

chi-square test ($P > 0.05$). The substantial agreements between the two kits obtained using Cohen's kappa were 0.79 for total coliforms and 0.72 for *E. coli*. Table 3 shows statistical evaluations of the equivalence of the two methods for total coliforms and *E. coli* according to ISO 17994 (2004). Samples were excluded from calculations when both methods gave zero (0, 0). The expanded uncertainty was derived from the standard uncertainty of the mean by using the coverage factor $k = 2$. The evaluation for results of the comparison and the confidence interval of the expanded uncertainty around the mean was calculated by computing the lower limit (x_L) and upper limit (x_H). The x_L and x_H for total coliforms and *E. coli* were -3.0 and 51.6 and -44.9 and 44.3 , respectively. Assuming that the maximum acceptable deviation (D) has been chosen as $D = 10\%$. The means of relative difference for total

Table 3 Statistical evaluation of the equivalence of the two MPN methods for total coliforms and *Escherichia coli* according to ISO 17994 (2004)

	No. of Samples	n ₀ *	n†	Mean relative difference	SD	Expanded uncertainty range		One-sided evaluation
						x _L	x _H	
Total coliforms	96	1	95	24.3	133.0	-3.0	51.6	Inconclusive
<i>E. coli</i>	96	47	49	-0.3	156.0	-44.9	44.3	Inconclusive

*n₀, number of samples excluded because of zero.

†n, number of samples retained for analysis.

Table 4 Statistical evaluation of P/A results according to ISO 17994 (2004)

	nA*	nB†	x ² ‡
Coliform	147	101	8.53
<i>E. coli</i>	49	63	1.75

*nA, the number of samples where EC-Blue-10 was positive and Colilert-MPN negative.

†nB, the number of samples where EC-Blue-10 was negative and Colilert-MPN positive.

‡x², Poisson index of dispersion.

coliforms and *E. coli* were 24.3 and -0.3, respectively. The evaluations for total coliforms and *E. coli* in accordance with one-sided evaluation of ISO 17994 (2004) were both 'inconclusive' because the data were insufficient for decisions. Table 4 shows statistical evaluation of P/A results for coliform and *E. coli* according to ISO 17994 (2004). The values of the Poisson-index of dispersion (x²) for coliform and *E. coli* were 8.53 and 1.75, respectively. EC-Blue-10 and Colilert-MPN methods were considered to be 'different' for coliform, however both methods were considered to be 'not different' in accordance with evaluation for two P/A methods of ISO 17994 (2004).

Bacterial isolates

Table 5 shows species of Gram-negative isolated from untreated and chlorinated water samples. The total number of isolates for identification from EC-Blue-10 and Colilert-MPN were 41 and 46, respectively. The coliforms (excluding *E. coli*) that were isolated from water samples were *Cit. amalonaticus*, *Ent. agglomerans*, *Ent. cloacae*, *Ent. intermedium*, *Kl. Pneumoniae* and *Serratia marcescens*. There were mixed cultures of total coliforms present in both EC-Blue-10 and Colilert-MPN tubes.

Relation between coliforms and bacterial counts

Table 6 shows the microbiological and physical properties of each sample during the experiments. The HPC ranged from 3550 to 140 500 CFU ml⁻¹ with PYG agar and the

Table 5 Species of Gram-negative identified

Species	% of all isolates identified by	
	EC-Blue-10	Colilert-MPN
Coliforms		
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	5	2
<i>Enterobacter agglomerans</i>	13	1
<i>Ent. cloacae</i>	1	9
<i>Ent. intermedium</i>	3	1
<i>Escherichia coli</i>	40	42
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	9
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	2
<i>Ser. marcescens</i>	10	1
Noncoliforms		
<i>Aeromonas caviae</i>	1	2
<i>Morganella morganii</i>	5	2
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	1
<i>Ps. fluorescens</i>	3	4
<i>Ps. putida</i>	5	15
<i>Proteus vulgaris</i>	1	7

Total isolates for identification from EC-Blue-10 and Colilert-MPN were 41 and 46, respectively.

SPC ranged from 1305 to 141 000 CFU ml⁻¹ with plate count agar. No relationship was noticed between SPC, HPC and coliforms.

Discussion

Statistical evaluations of the equivalence of the EC-Blue-10 and Colilert-MPN methods for total coliforms and *E. coli* according to one-sided evaluation of ISO 17994 (2004) were 'inconclusive' for total coliforms and *E. coli*. About 25 additional samples for total coliforms and about 1000 additional samples for *E. coli* would have been sufficient numbers to reach firm decisions. The ONPG test with the ONPG peptone-water medium is preferable for growth of the organisms (Lowe 1962). EC-Blue-10 contains biological material such as peptone for the enhanced growth for bacteria, whereas Colilert-MPN is minimal medium for bacteria. Two ingredients of

Table 6 Microbial and physical properties of each water sample during the experiments

Sampling areas	No. of coliforms isolated		No. of <i>E. coli</i> isolated		SPC* (CFU ml ⁻¹)	HPC† (CFU ml ⁻¹)	Free Cl ⁻ (mg l ⁻¹)	Total Cl ⁻ (mg l ⁻¹)	Temp. (°C)	NTU‡	pH
	EC-Blue-10	Colilert-MPN	EC-Blue-10	Colilert-MPN							
A-lake	25	17	4	4	1305	2563	0.1	0.2	21.1	0.6	7.3
B-river	31	38	12	16	21700	120500	0.2	0.4	20.5	2.9	7.4
C-river	26	20	6	6	141000	140500	0.3	0.5	20.1	0.5	7.4
D-lake	46	35	14	5	1118	3550	0.1	0.2	20.8	2.0	8.6
E-river	32	34	8	11	2503	26575	0.2	0.5	20.0	0.8	7.3
F-river	30	26	11	10	16275	71000	0.4	0.5	19.6	2.6	7.3
G-river	33	34	4	7	1973	6700	0.1	0.3	20.1	1.5	7.6
H-river	43	47	13	25	19950	71000	0.1	0.5	20.3	1.1	7.5
Mean	33	31	9	11	25728	55299	0.2	0.4	20.5	1.5	7.6
SD	8	10	4	7	47408	54313	0.1	0.1	0.5	0.9	0.4

Sixteen untreated and 80 chlorinated water samples were tested.

*SPC, Standard plate count.

†HPC, Heterotrophic plate count.

‡NTU: Nephelometric turbidity units.

EC-Blue-10 are also different from Colilert-MPN. Firstly, EC-Blue-10 contains sodium pyruvate as nonenzyme peroxide-degrading compound to increase the detection of chlorine-stressed coliform bacteria (Sartory 1995). Secondly, the KNO₃ in EC-Blue-10 is important for bacteria, as it allows energy production during nitrate respiration (Hadjipectrou and Stouthamer 1965). Bacteria, commonly considered part of the total coliform group were isolated from both EC-Blue-10 and Colilert-MPN tubes. *E. coli* was isolated from tubes with both positive-colour and -fluorescence. *E. coli* was primarily isolated from water samples, followed by *Ent. agglomerans*, *Kl. pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Every isolate was inoculated into both media to confirm the reactions. No different reactions were observed between EC-Blue-10 and Colilert-MPN. There did not appear to be a significant difference in the distribution of bacterial species in either medium. The HPC on most samples were higher than the SPC. Only one sample, C-river, had almost the same microbiological count (Table 6). The results of heterotroph interference study and the results in Table 6 support the notion that heterotrophic bacteria do not interfere with the detection or enumeration of total coliforms and *E. coli* by the EC-Blue-10. After the addition of NaOCl, total coliforms were detected from the H-river water sample using both methods. The microbial and physical properties of this water sample were not significantly different from the other water samples (Table 6). We have not investigated why total coliforms were detected after the addition of NaOCl. There was a concern that bacteria other than *E. coli* might exhibit fluorescence. No false-negative results were observed in this study. However, we did find false-positive results, with β -glucuronidase positive *Staph. warneri* being isolated

from EC-Blue-10 and pyoverdin positive *Ps. putida* being isolated from Colilert-MPN. *Staph. warneri* could be resistant to 0.1 g SDS l⁻¹ in EC-Blue-10 (Kodaka *et al.* 1995). We agree with Edberg *et al.* (1988) that each test was limited by design to drinking water distribution samples and the user should first establish the efficacy of the test in each water sample. A weak fluorescent reaction for MUG test can be read in the aqueous phase of the medium. A disadvantage of EC-Blue-10 was that it was difficult to read a weak-positive blue colour, because the base colour of EC-Blue-10 is light yellow. However, the medium in EC-Blue-10 was developed primarily for the rapid growth of *Enterobacteriaceae* (Kodaka *et al.* 1995). If coliforms were present in the water sample, they could grow sufficiently. Therefore, it would be very rare to observe a weak reaction and if a weak reaction was observed, it could be confirmed by comparison to the EC-Blue-10 comparator.

In conclusion, EC-Blue-10 gave results that were almost statistically equivalent to the DST method currently accepted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Therefore, the EC-Blue-10 is as useful as the DST method for the detection of coliforms and *E. coli* in temperate humid climate zone water. However, the water samples tested were very limited in this evaluation of EC-Blue-10 and therefore, it is recommended that a more extensive evaluation of EC-Blue-10 be undertaken.

Acknowledgements

The authors thank JWWA for providing the evaluation protocol and water samples for this study. We also thank Dr Richard Meldrum of Llandough Hospital (Penarth, UK) for critically reading the manuscript.

References

- Bernasconi, C., Volponi, G. and Bonadonna, L. (2006) Comparison of three different media for the detection of *E. coli* and coliforms in water. *Water Sci Technol* **54**, 141–145.
- Buckalew, D.W., Hartman, L.J., Grimsley, G.A., Martin, A.E. and Register, K.M. (2006) A long-term study comparing membrane filtration with Colilert® defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. *J Environ Manage* **80**, 191–197.
- Edberg, S.C. and Edberg, M.M. (1988) A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale J Biol Med* **61**, 389–399.
- Edberg, S.C., Allen, M.J., Smith, D.B. and the national collaborative study (1988) National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1595–1601.
- Geissler, K., Manafi, M., Amorós, I. and Alonso, J.L. (2000) Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. *J Appl Microbiol* **88**, 280–285.
- Grasso, G.M., Sammarco, M.L., Ripabelli, G. and Fanelli, I. (2000) Enumeration of *Escherichia coli* and coliforms in surface water by multiple tube fermentation and membrane filter methods. *Microbiology* **103**, 119–125.
- Hadjipetrou, L.P. and Stouthamer, A.H. (1965) Energy production during nitrate respiration by *Aerobacter aerogenes*. *J Gen Microbiol* **38**, 29–34.
- Hörman, A. and Hänninen, M.-L. (2006) Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Res* **40**, 3249–3256.
- ISO 17994 (2004) *Water Quality – Criteria for Establishing Equivalence between Microbiological Methods*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Japan Water Works Association (1993) *Standard Methods for Examination of Water*. Tokyo, Japan: Japan Water Works Association [in Japanese].
- Japan Water Works Association (2001) *Standard Methods for Examination of Water*. Tokyo, Japan: Japan Water Works Association [in Japanese].
- Kodaka, H., Ishikawa, M., Iwata, M., Kashitani, F., Mizuochi, S. and Yamaguchi, K. (1995) Evaluation of new medium with chromogenic substrates for members of the family *Enterobacteriaceae* in urine samples. *J Clin Microbiol* **33**, 199–201.
- Kodaka, H., Uesaka, Y. and Kashitani, F. (2004) Nissui glucose fermentative gram-negative rod identification system EB-20 gives a unique profile for typical non-sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* **42**, 354–358. [Erratum. *J Clin Microbiol* **42**, 1857].
- Lowe, G.H. (1962) The rapid detection of lactose fermentation in paracolon organisms by the demonstration of β -D-galactosidase. *J Med Lab Technol* **19**, 21–25.
- Manafi, M. and Kneifel, W. (1989) A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. *Zentralbl Hyg Umwelt-med* **189**, 225–234 [in German].
- Sartory, D.P. (1995) Improved recovery of chlorine-stressed coliforms with pyruvate supplemented media. *Water Sci Technol* **31**, 255–258.

解 説

微生物の迅速検出法

齊藤美佳子・松岡 英明

1. はじめに

微生物検出法の基本は培養法であるが、培養時間が長く、その時間の調整も難しい。特に測定対象が食品の場合、食品を微生物汚染から守り、食品の安全性を確保するためには、微生物の迅速検出法が重要である、との認識が高まってきている。

微生物菌数を迅速に測定するために種々の蛍光色素が利用されている。これらの蛍光色素によって蛍光を発するようになった細胞は、顕微計測やフローサイトメトリーで細胞単位での計数が可能である。また、細胞懸濁液の蛍光計測によって細胞集団の蛍光強度測定も容易にできる。蛍光計測の成否はいかにしてバックグラウンドを低く抑えるか、にかかっている。環境から採取した試料や食品試料中には、種々の固形物、色素、タンパク質、脂質などが含まれており、これらが共存した状態で染色操作すると、菌体以外のもので蛍光色素に染まるものが多々見られる。これがバックグラウンドとなる。例えば、生菌染色用の色素で染まる物質が含まれていれば、仮に菌体がいなかったとしても、「菌がいる」という結果になってしまう。こうした問題を防ぐ方法は、試料の精製に尽きる。そこで本稿では、迅速な生菌検出法である蛍光計測について、その原理、測定例について、さらに非培養法の鍵になるであろう、前処理技術について紹介する。

2. 微生物生死菌判別技術の動向

微生物検出は、生死菌判別と特定菌の同定に分けて考えられる。殺菌処理の適不適を判断するためには生死菌判別による。菌の種類を問わず確実に殺菌されていることを保障することが必要であるから、非特異的な検出原理でなければならない。

一般細菌用寒天培地でコロニー形成を調べる方法が依然として最も信頼できる方法とされている。確かに、分裂増殖してくる細胞が生細胞である、ということは誰もが認めることである。しかし、環境中には増殖しにくい菌が多数いるので、コロニーができなかったからといって、生菌がいないとは言い切れない。それが「偽陰性」である。また、一般細菌用培地と言っても、メーカーによって成分が同じとは限らない。この点も気になる点である。実用的には、コロニー形成まで1日以上以上の時間を要する点が問題であり、これに代わる迅速法の要請は極めて大きい。迅速法には、非培養法、細胞成長顕微解析法、マイクロコロニー法、などがある(表1)¹⁻¹²⁾。培養法と非培養法では、同一試料でも、生菌数が一致するとは限らない。その原理から予想されるように、培養法の方が少なめになる傾向がある。その傾向を概念的に示したものが図1(神戸大学、大澤 朗教授より供与いただいた図を改変)である。ストレスを印加し続けると、細胞が弱っていくが、その結果、増殖能が失われても細胞として死んでしまったわけではない。生きてはいるが増殖できない菌ということで、Viable but non-culturable cellsと呼んでいる。図2は、同一試料中の大腸菌を、培養法と非培養法で実測した例である。この例でも、

表 1. 生菌検出法

迅速性	培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法	文献
通常培養法	培養法	細胞分裂、増殖を繰り返し肉眼で検知できる大きさのコロニー形成を待ち、これを計数。	寒天培地コロニー計数法 フィルム、不織布などのシート状培地でのコロニー計数法	
		細胞分裂、増殖した菌体量を濁度、あるいは重量で計測。	液体培地培養法	
迅速法	マイクロコロニー法 (培養法)	細胞分裂、増殖を繰り返すが、通常のコロニーよりはるかに小さなコロニーの状態、これを計数。	蛍光染色法、顕微計数	[1]
	細胞成長顕微解析法 (培養法)	細胞成長に伴う形状変化を直接顕微解析。	菌糸伸長速度計測法 酵母出芽形状解析法	[2, 3] [4]
		色素分子に対する細胞膜透過性の有無によって生死判別。生細胞では透過性無。色素分子の受動的取込。	蛍光染色法 (PI, DAPI など) レドックス色素を利用した電気化学測定法	[5, 6]
	非培養法	細胞内エステラーゼ活性。生細胞で活性。	エステル型蛍光色素 (FDA, CFDA など) を細胞内導入	[7, 8]
		栄養基質取込活性。生細胞は能動的取込。	蛍光基質法 (2NBIX, NBD-Gly など)	[9, 10]
		生細胞が持つ還元力を直接、あるいは適当なメディエーターを介して計測。	蛍光色素法 NAD法 (テトラゾリウム塩の利用など) 電気化学的方法	
		呼吸活性。分子状酸素を電子受容体とした還元力。	酸素電極法、走査型電気化学顕微鏡	[11, 12]
		生細胞では高エネルギー分子の生成。	ATP法 (ルシフェリン・ルシフェラーゼ系)	[13]
		生細胞では生体高分子 (DNA, RNA, タンパク, etc.) 合成。	タンパク質定量法	
		生細胞では遺伝子発現。	GFPなどのレポーター遺伝子を利用して遺伝子発現を可視化	

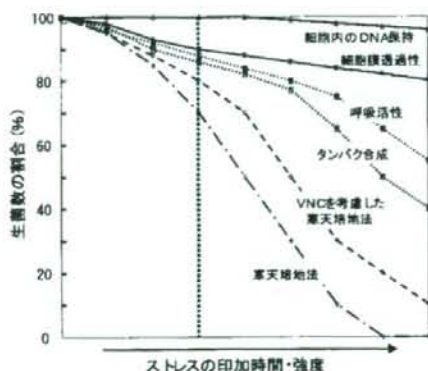


図 1. 生菌判別の指標の違いによる生菌率の相違

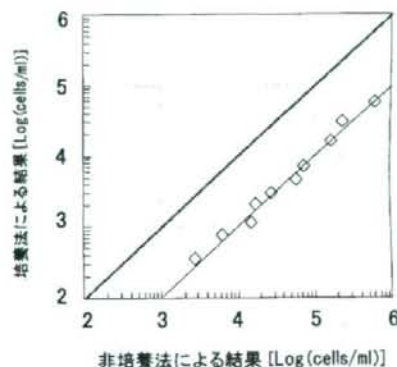


図 2. 培養法と同一の結果を出力する非培養法

確かに、培養法の方が生菌数が少なくなっている。上述のように、培養法と非培養法と同じ結果になるとは限らないが、迅速法の結果を補正して、両者の値が等しくなれば良しと考えられる。

3. 一般生菌数測定に利用される蛍光色素

3.1 細胞内酵素によって直接蛍光分子に変換される色素

フルオレッセインジアセテート (FDA), カルセイン AM などは蛍光を発しないが、疎水性の分子であるため細胞膜を透過する。細胞内で、エステラーゼによってエステル部分が切れフルオレッセインになると蛍光分子に変わる (図3(A))。しかし、死細胞では細胞内のエステラーゼが失活しているため FDA のままである。したがって、生細胞のみ蛍光を発する。この原理の色素で上市されているものは、ほとんどフルオレッセイン誘導体である。酵素活性が低かったり、細胞ごとに様でなかったりする場合の問題解決が実用化の鍵になる。

3.2 DNA と反応して蛍光を発する色素の利用

プロピジウムイオダイド (PI) (図3(B)), エチジウムブロマイド (EB), DAPI, SYTO BC (Invitrogen) など多数知られている。これらのうち、PI や EB はイオン性分子のため細胞膜は透過できないが、死細胞では細胞膜が損傷され、色素が細胞内に拡散して核に達して DNA と結合して蛍光を発する。その結果、死細胞のみが蛍光を発する。一方、DAPI, SYTO BC は疎水的な

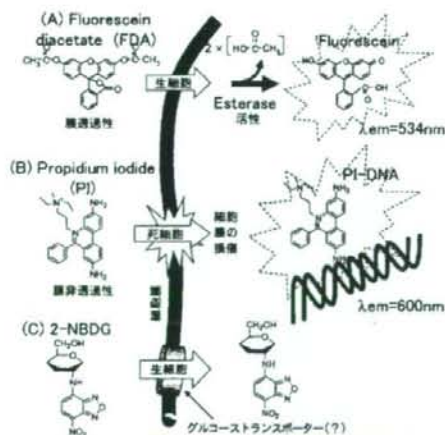


図3. 一般生菌数計測に利用される蛍光色素の例

分子のため、生細胞の細胞膜も透過し、生細胞、死細胞共に蛍光を示す。従って、この2種の蛍光色素、例えば DAPI と PI で二重染色すれば、顕微画像上で、DAPI 染色像と PI 染色像の解析により、生細胞数が求められる。細胞以外の共存物質で蛍光を発するものを如何に減らすかに工夫が必要である。

3.3 蛍光修飾した栄養基質分子

グルコースは大抵の細胞が栄養源として取り込む基質である。このグルコースに蛍光標識した2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose) が微生物によって取り込まれ濃縮され、菌体が強い蛍光を示すようになる (図3(C))。能動的に取り込まれるので、取り込み速度は速い。2-NBDGは、細胞内に取り込まれてから蛍光分子に変わるFDAとは異なり、元々蛍光分子であるが、細胞内に濃縮されるので、細胞は外液に比べて相対的に強い蛍光を発するようになる (図4)。従って、そのままでも蛍光細胞を識別できるが、実用的には2-NBDG を取り込ませた後、細胞を濾過、または遠心分離によって分離した後、顕微計測する。最近、第二の蛍光基質である NBD-アミノ酸が合成され、2-NBDG と併用することで多くの食中毒菌等が蛍光計数できることが分かった (図5, 表2)。上記のエステラーゼの場合と同様、菌種の違い、同一菌種でも細胞ごとに取り込み活性が一樣ではないことが実用化にむけて解決すべき課題

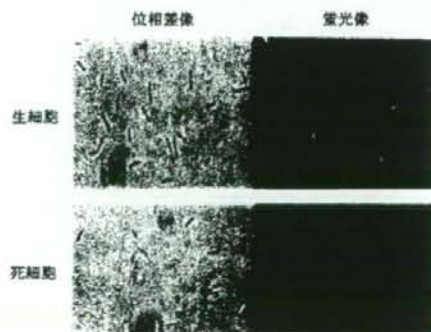


図4. 2-NBDG を用いて生きている大腸菌を検出