

抗生物質投与下における大腸菌の運動性の 自己相関関数による評価法 (I)

岡田 秀希*・蛸名 良雄*・伊藤 康展**

An Evaluating Method of the Motility of *E. coli* under Application of Antibiotic by Auto-Correlation Function (I)

Hideki OKADA, Yoshio EBINA and Yasunobu ITOH

Abstract

The development of rapid clinical test is one of the important problems in the diagnosis of antibiotic susceptibility for coliform bacteria. As a first step to approach that, we have been calculating the method to obtain some diagnosis parameters. The present paper tries specially to verify the validity of our fitting method to obtain the parameters from the experimental data of *E. coli* under application of sulbenicillin. The analysis is carried out in the following lines ;

(1) compute the Auto-correlation functions (SCF) of experimental data and that of Brownian model, (2) thus obtained SCF are tried to fit the theoretical SCF presented by Chen group. The fitting criterion is to see whether the minimum value of AIC (Akaike information criterion) is established, in which the theoretical one is a linear combination of SCF of Brownian and moving particles, (3) the validity of obtained motile parameters is discussed by inspecting the change in that of Brownian model against the change of particle form factor. We discuss preprocessing method to obtain the stable values from the fluctuated digital data, and the average method to obtain reliable SCF.

1. 序

著者らのグループではここ数年来、抗生物質投与後の大腸菌 (*E. coli*) の運動性の変化過程を、レーザー散乱光強度の揺らぎ信号の解析から調べてきた¹⁾。ここでは適当なサンプリング周波数 (SF) で得た揺らぎ信号のパワースペクトル解析をもとにする。信号波形が速度情報を反映しているならば、SF の大きさに相当する速度の情報が得られることが期待される。

一方、対象とする大腸菌は約 1 ミクロン長の棒状を

しており、その運動速度は自力運動ではブラウン運動よりも数倍速い程度²⁾で、通常の状態では両者の運動が混然としている。ここに抗生物質を投与すると、活動している大腸菌は時間経過につれて徐々に死滅してゆくものと予想され、ブラウン運動をする菌数が増えてくる筈である。この過程の時間経過は数十分と遅いので、我々は系を準定常状態とみなしデータ処理を行なう。これまでは評価する量としてパワースペクトル密度 (PWS)、平均速度 (VEL) を求め、そこから大腸菌の運動性を表わすパラメータを求めてきた³⁾。しかし投与薬剤量、投与後の経過時間等とこれらの量の変化の対応が必ずしも満足すべきものではなかった⁴⁾。これは PWS, VEL を求める際のデジタルデータの処理法が確立されていなかった為と思われる。

* 電気工学科

** (株)島津製作所

本論文では以上の点をふまえ、データ処理法が直ちに評価でき、計算時間短縮の可能性をもつ自己相関関数(SCF)に着目した。(SCFのフーリエ変換からPWSが求まる⁵⁾。)まず、実験データ、シミュレーションによる時系列データをもとにし、それとすでにフランスのChenらのグループ²⁾が自力運動、あるいはブラウン運動している異方形(棒状)微粒子に対して得ていたSCFに関する表式とをフィッティングさせ、大腸菌の運動性を表わすパラメータを得る。

実験値からのSCFを求める際に必要なデータの预处理に用いる時系列データ収録の際のサンプリング周波数(SF)の大きさ、SCFを求める時の総データ数(NMAX)の大きさ、安定なSCFを求める平均法、フィッティングさせる時間幅(STT)等を検討する。

2. 解析原理

この章では実験データ、及びブラウン運動モデル式のシミュレーションによって得られるデータからのSCFと理論的に得られるSCFとをフィッティングさせる方法について述べる。Chenらが得た運動する大腸菌に対するSCFの表式は、ブラウン運動、自力運動のそれぞれに対して²⁾

$$F_b(\tau) = \exp(-w/\epsilon) \cdot \exp(w/3) \cdot \int_{-1}^{+1} d\mu \cdot P(q, \mu) \times \exp(-w\mu^2) / \int_{-1}^{+1} d\mu \cdot P(q, \mu) \dots\dots(1)$$

$$\begin{aligned} \epsilon &= 3(b-a)/(2a+b) \\ q &= 4\pi/WL \cdot RI \cdot \sin(\theta/360 \cdot \pi) \\ WL &= 0.6328 \times 10^{-4}, RI = 1.33 \\ w &= Zq^2 \epsilon t \quad Z = (kT/6\pi n) \cdot ((2a+b)/3ab) \\ K &= 1.38 \times 10^{-16} \\ n &= C_0 + T(C_1 + T(C_2 + T(C_3 + T(C_4 + T \cdot C_5)))) \\ C_0 &= 1.792 \times 10^{-2}, C_1 = -6.1626 \times 10^{-4} \\ C_2 &= 1.583 \times 10^{-5}, C_3 = -3.059 \times 10^{-7} \\ C_4 &= 3.781 \times 10^{-9}, C_5 = -2.112 \times 10^{-11} \end{aligned}$$

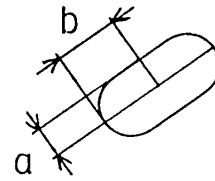
$$F_s(\tau) = \int_{-1}^{+1} d\mu \cdot P(q, \mu) \cdot 1 - 3(D/C)^2 / (1 + (D/C)^2)^3$$

$$C = (6/\langle v^2 \rangle)^{1/2} \quad D = q\mu t \dots\dots(2)$$

で表される。ここでaは回転長方楕円体の短径、bは長径(Fig. 1)、vは平均運動速度、Tは温度、θは散乱角、数値はChenらの求めた変数である。式(1)、(2)で我々は大腸菌は二重構造でなく、一重の膜構造をしていることを考慮し、Form Factorの式⁷⁾を簡略化して使った。

さて、運動している微粒子のうちブラウン運動をし

ている粒子の割合をαとすると、フィッティングさせ



$$t = b/a$$

Fig. 1 Schematic figure of major and minor axes of spherical elongated particle in a model of E. coli.

るべき式CH(τ)は、

$$CH(\tau) = \alpha \cdot F_b(\tau) + \beta \cdot F_s(\tau), (\alpha + \beta = 1) \quad (3)$$

とおける。

一方、実験値及びシミュレーションの時系列データXより得られるSCFは、次式から求める。

$$C(\tau) = (1/NB^2) \cdot \sum_{i=1}^{NB^2} X(i) \cdot X(i+\tau) \dots\dots(4)$$

$$(NB^2 = NMAX/2)$$

ここでX(i)、X(i+τ)は時刻i、i+τにおけるデータである。

種々の条件で得られる(4)式を求め、それらと理論的に得られる(3)式とをMarquardt法⁹⁾でフィッティングさせることを試みる。この時パラメータα、v、b、t(=b/a)を変えながらAIC(赤池の情報量基準)を求め、その最小値⁹⁾で最もフィッティングしたと判断する。このようにしてAIC最小値を与える実験値、シミュレーションモデルのα、v、b、tが得られることになる。

3. 実験データの集録

3.1 実験解析システム

本研究で用いた実験システムのブロック図をFig. 2に示す。実験の方法及びデータの集録の詳細は、文献(4)及び付録Aに示されているが、以下に必要なところを略記する。He-Neレーザー光を試料に当て、θ=10°方向の散乱光を光電変換、増幅し、その出力信号データをPCMデータレコーダー(NF回路設計ブロック、RP-882)を介して一旦VTR(東芝、V503D)に記録した。その後必要に応じて記録信号を再生し、FFTスペクトルアナライザ(アドバンテスト、TR-9403)であらかじめ設定したサンプリング周波数(SF)で取り込み、このデジタルデータをコンピュータ(PC-8001 Mk2)に送りフロッピーディスクに記録しておく。これをコンピュータ(FM16β)で解析し、結果はX-Yプロッターなどに出力する。

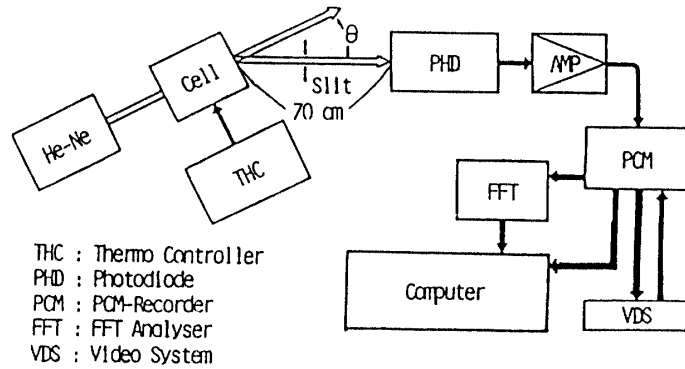


Fig. 2 Block diagram of experimental system.

3.2 実験データの取り込み

コンピュータに取り込まれた実験データには著しく大きな雑音信号が数ヶ所含まれているものもあった。これは装置に外部からの振動が加わった為か、又は装置内の気流からくる温度の急激な変化から、セル内に対流が起きることなどによる雑音信号と考えられる。これらを除去する為にビデオテープからデータを取り込む際、ブラウン管上の観察で異常信号を認めた時はこれをカットして取り込んだ。

4. 自己相関関数の計算、及びフィッティングの結果

4.1 データの前処理法 (移動平均法)

3.2 のようにして得られた時系列データをプロットしてみると、Fig. 3 のようにベース線がゆっくりと変動しているのが見られる。この遅い変動をプログラムの上で除く為、次のような移動平均法を行なった。全時系列データ (NMAX個) をいくつかの区間 (1区間 =

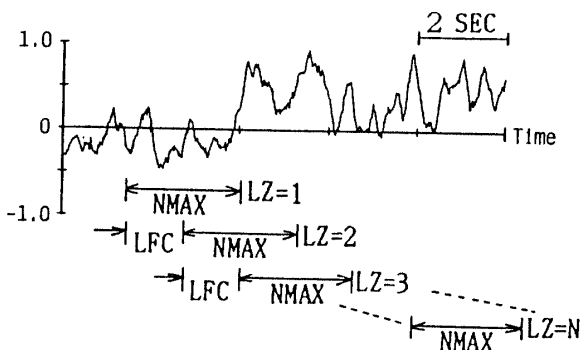


Fig. 3 The time course of the monitored light intensity. The data are obtained from the scattered laser light of sample cells.

NMAX 個) に分割し、その区間を LFC 個ずつ N 回 (LZ) 移動させながら平均し、それをもとのデータから差し引き新しいデータとする。(SCF 計算でもこの移動平均法に似た方法を用いた。その時は平均値を差し引かない。)この方法によってハイパスフィルターをかけたことになり、信号の低周波のうねりが除去でき、必要な信号が強調される。

4.2 実験データからの SCF の計算とフィッティング

すでに述べたように、サンプリング周波数 (SF) の大きさで捉えられる大腸菌の速さは異なってくるのが予想される。これを見る為、SF=10, 20, 50, 100, 200 (Hz) の 5 種に設定し SCF の計算を行なったが、この報告では主として 200 (Hz) について述べる。

Fig. 4-a, b に SF=200(Hz), NMAX=2000(個), LFC=1000(個), 移動平均の回数 N=20 回を取り込み SCF を計算した結果を示す。いずれも STT は 1 秒である。なお図には式(3), (4)を使って CH (τ) と C (τ) とをフィッティングさせた結果を破線で示した。Fig. 4-a は比較の為薬剤を入れなかったもの(コントロール), Fig. 4-b はスルベニシリン 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 投与の結果である。非常によくフィットしていることがわかり、AIC 法が有効であることを示している。

次にこのようにしてフィットさせた時得られるパラメータ α の変化を見てみよう。投与後 15 分目においてはブラウン、自力運動の粒子数は同じ位の比率であるのに対し、薬剤を投与したものは除々に死滅菌の割合 (α) が増加してゆく。この様子は Fig. 5 に示されている。時間経過にしたがって次第に α が大きくなり $\alpha = 0.82$ に近づく。これは後の 5 節に示すがほぼブラウン運動だけのシミュレーションで得られた値 (0.9) に近い。このことから薬剤投与後この時点で大多数の菌が死滅し、自力運動をしなくなったことが想像される。

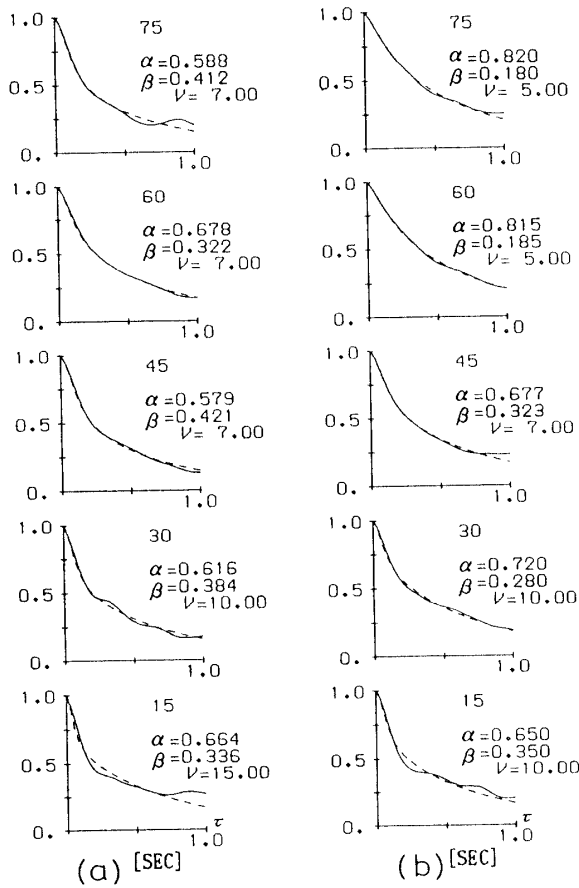


Fig. 4 Auto-correlation function against the correlation time τ at every 15 minutes after application of drug. The average number is 20. The velocity unit of ν is $\mu\text{m/s}$.
 a : SCF of control data (non-drug),
 b : SCF of the data obtained under the application of sulbenicillin 100 $\mu\text{g/mL}$.

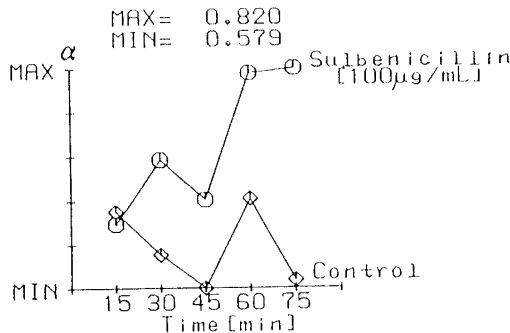


Fig. 5 Time course of the rate α of Brownian particles.

また Fig. 4— a, b での ν はそれぞれのフィッティングより求めた自力運動をしている大腸菌の特性運動速度である。この値自体も等価的に遅くなっている。コントロールでも ν が変化し少し小さくなっている。セルに試料を入れてからの挙動とも解釈でき、このような ν の変化は興味ある点である。なおこのフィッティングに際しては長短軸比 $t=1, 2, 3$ をも考慮した。したがって $t=2$ において良好な結果が得られたことは、報告されている *E. coli* の形状¹⁾ ($t=2 \sim 3$) を考慮すると興味ある。

5. ブラウン運動のモデルにもとづいたシミュレーション¹⁰⁾による SCF を用いたフィッティング方法の妥当性の検討

α, β の値が前節のようにして求めたが、その妥当性の検討が必要である。この節では既知のブラウン運動の時系列データによる SCF を求め、前節と同じ方法でフィッティング ((3)式と(4)式を AIC 最小値を評価基準としてフィットさせる)を試みる。

付録 B に述べる方法によりブラウン運動している球状微粒子のシミュレーションによる時系列データ $X(i)$ を作成し、(4)式で SCF を計算し(3)式とフィッティングを行なった。Fig. 6 にその結果の一部を示す。上段は STT = 2 秒、下段は 1 秒である。ここで(3)式を求める時、一般に楕円体微粒子と仮定した。 $t=1$ において α の比率が大きく、これはシミュレーションによる時系列データ作成の際ブラウン粒子 ($\alpha=1$ に相当) を $t=1$ の球状粒子と相定していることとほぼ一致している。以上より今回使用するフィッティング法により実験データに含まれるブラウン運動の成分を抽出、分析できる可能性があることがわかる。

6. 議 論

この節では(1)サンプリング周波数、(2)データ数より今回のフィッティングを検討する。

6.1 サンプリング周波数による違い

これまで SF = 200 Hz のデータを示してきたが、他の SF (100 Hz 以下)でも、Fig. 4— a, b と同じ時間範囲のデータで SCF の計算とフィッティングを行なった。SF が小さくなることによりデータ数が減少した分だけカーブのきめ細かさが失われたものの、各周波数の SCF カーブは、ほぼ一致した。今回のデータで計算された STT ならば、SF = 50 Hz 以上であれば見た目にも殆ど

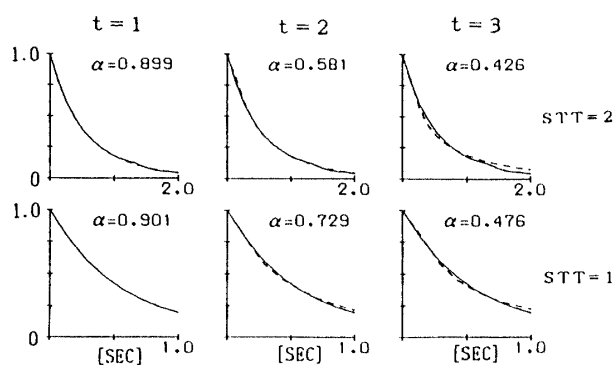


Fig. 6 Auto-correlation function of velocity of Brawnian particle against the correlation time τ . t means the ratio of majour to minor axis lengths of elongated particle. STT stands for the fitting area length of SCF curve (in second).

違いはなかった。

6.2 フィッティングに用いる相関時間幅 (STT) 及び SCF 計算時のデータ数

フィッティングの際は SCF カーブのどこまでの範囲を対象とするかが問題となる。今回我々は STT = 1, 2, 5, 10について行なったが、ここでは全データにわたりよくフィットした STT = 1, 2 秒の 2 種を選択しこれを示した。1 秒と 2 秒を比較すると、2 秒では相関時間の長い所でカーブに変動がありうまくフィットしなかった。5, 10 秒でも 2 秒と同様であった。自己相関時間の数学的意味から E. coli の運動の相関時間が 1 秒程度を反映していると解釈できる。

また NMAX, LFC を 2 倍 (NMAX = 4000, LFC = 2000) として、前述のデータ数 (NMAX = 2000, LFC = 1000) での計算に用いたのと同じ時間範囲のデータで SCF を計算した。NMAX を多くとればとるほど、 τ の大きいところでカーブが波打つ形となった。(Fig. 7 矢印箇所) これは自力運動などの相関時間を考慮すると当然である。

6.3 フィッティングに適した SCF カーブとデータ数

以上のことからフィッティングに適した SCF カーブを求める為のいくつかの条件をまとめる。6.2 の NMAX, LFC について他のいくつかを試みたが、NMAX の大小にかかわらず SCF カーブの STT = 2 秒以上の所では Fig. 7 のような不安定な変動を示した。このままでフィッティングを行なうと Fig. 4—a, b のようなびったり一致したフィッティングカーブは得られず、AIC も

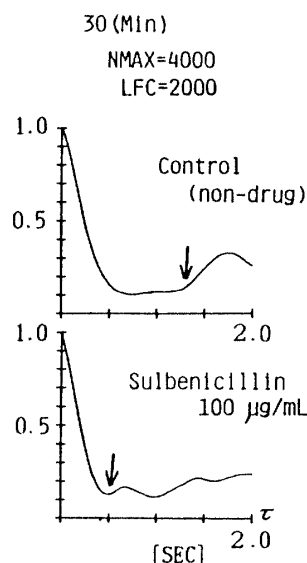


Fig. 7 Auto-correlation function against the correlation time τ . A mark with downward arrow mean a start time of unstable SCF which probably indicates that of uncorrelation between moving E. coli.

大きな値となってしまう。また α もこのカーブの振動部分に左右されやすく定まった値が得にくい。一方 STT = 1 秒以内ではどの時間データでも非常になめらかなカーブが得られる。しかもこの場合は比較的移動平均回数が少なくてもあまり変化がない。

今回はこの STT = 1 秒以内のカーブ (200Hz の場合 200 個) についてフィッティングを行なった。このデータ個数についても 5 種行なったが、50 個以下でフィッティングさせるとそのカーブに粗さが目立つ (6.1)。 α の値も 100 個以上での結果はほぼ同じ値であるにもかかわらず、50 個以下でフィッティングさせると α の値が少しずつ異なっていた。以上よりフィッティングに際しては最低でも 100 個のデータは必要であると思われる。またさらに速い大腸菌の運動速度を捉えたい時はこれまでよりさらに短い STT でフィッティングの必要があり、前述のデータ数を満たす為より高い SF で取り込み、フィッティングに用いるデータ数を最低 100 個に増やす必要がある。

7. ま と め

大腸菌を使ってその運動をレーザーの散乱光強度信号として取り込み、自己相関関数 (SCF) を計算し、それを使って菌の運動性評価を行なった。以下にその結果を示す。

(1) 菌の運動速度(数マイクロン/秒)を捉えるにはサンプリング周波数50(Hz)以上で取り込む必要がある。

(2) より速い運動速度(数十マイクロン/秒)を捉えるには、SFを高く(500Hz程度)しフィッティングに用いるデータ数を100個位とった方が良い。

(3) フィッティングで用いるデータを得るためのSCF曲線のSTTは1秒(=SF×個数)位で良く合うようだ。これが長すぎるとフィッティングに適したSCFカーブが得られなかった。

(4) フィッティングに適したSCFを得るためN=20回の移動平均をとれば良いようである。

(5) SCF計算の前に、生データを移動平均の方法により適当なNMAX, LFCで作った平均値を差し引く前処理をしてやる必要がある。(今回はNMAX=256, LFC=64)

以上今回数例で得た結果をまとめたが、今後は他の多くの実験データの処理を行なう予定である。軸比tについては今回は整数値の3種を考慮したが、薬剤によるE. coliの形状変化(走査型顕微鏡写真所見から)を考慮するとさらにtを実数とし、拡大して解析する必要があると思われる。

なお、現在大島商船高専助教授の橋本基氏には、実験を進める際、及びデータ処理等に関して有意な御助言をいただいた。ここに深謝する。

付 録 A

1. 散 乱 角

散乱角 θ の決定は、大腸菌が球形でないため重要である。 θ が大きいと大腸菌の異方形の為に起こる回転拡散の影響が大きい。 θ が小さいほど楕円体性の影響が小さくなる。これを確かめる為に、死滅した大腸菌を使って相関関数を求めた。SCFを散乱角 θ をパラメータとして横軸時間をスケーリング時間に直してプロットした。 $\theta=10^\circ$ から 20° では一本の曲線に乗るが、 $\theta=5^\circ$ では曲線からずれる。この $\theta=5^\circ$ でのずれは散乱光強度が強すぎるためと思われ、回転によるブラウン運動の影響がほとんどない $\theta=10^\circ$ で実験を行なった。

実験システム信頼性については半径 $0.545(\mu\text{m})$ 、 $1.5(\mu\text{m})$ のポリスチレンラテックス粒子のブラウン運動の散乱光を測定して、パワースペクトル、SCFなどの解析からその粒径を求めてチェックした。実験的に得られる数値は各々 $0.559(\mu\text{m})$ 、 $1.49(\mu\text{m})$ であった。

2. 試 料

実験に用いた細菌は、山口大学医学部付属病院検査部において分離、同定された腸内細菌(E. coli)である。培養液はBrain Heart Infusion(以下BHI)を用い、 120°C 、2気圧で加圧滅菌してある。また $0.45\mu\text{m}$ 孔のフィルターで濾過することにより、液中の浮遊物を取り除いた。E. coliは低温保存した寒天培地から、試験管中のBHI(約3 mL)に白金耳で接種し、 37°C の培養箱内で6時間培養した。この時の細菌濃度は約 10^8 (cfu/mL)である。次にこの試料の中から運動性の良い菌を取り出す為に、2000回転で10分間遠心分離をし、この後10分間放置して上澄み液をスポイトで任意の濃度のBHI(約1 mL)に混ぜ合わせた。

実験用のガラスセルは、2枚のスライドガラス間にシリコンゴムを挟み、中央に正方形の穴($1 \times 1\text{cm}^2$)をあけ、細菌の入ったBHIを封入したものをを用いる。セルは温度コントローラで 30°C に保つ。

使用した抗生物質のスルベニシリンは、殺菌性で細胞膜合成阻害効果をもっている。

3. 操作手順

測定にあたっては、試料の入ったガラスセルを作成し、表面をアセトンで拭きセルホルダーに装着する。そして検出器のついたアームを動かして $\theta=10^\circ$ に調整した。その後セルの温度が一定になるまで約15分間待つて測定を始め、検出器からの信号を記録する。

また実験では薬剤の効果をはっきり確認する意味で、薬剤無投与(以後コントロールと称す)でのデータも取り込み比較に用いた。これ以後のデータ解析については本論で述べる。

付 録 B

1. シミュレーションによるブラウン運動での時系列データの作成

時系列データの作り方は文献(10)に詳しく述べられている。本文で使うデータの都合上文献の必要部分を転記する。『ブラウン運動をする粒子の速度はN回衝突のあとで次式で表わされる。

$$V_N = V_{N-1} - G [u_{N-1}(\cos w_N - 1) + u_{N-1} \cdot e_{\perp N-1} \cdot \sin w_N]$$

$$G = m / (M + m)$$

ここで V_N はブラウン粒子の速度、 u は衝突前の相対速度、 N は衝突回数、 e_{\perp} は u に垂直な単位ベクトルである。また M はブラウン粒子の質量、 m はその周りの熱粒子の質量を表わす。 w_N はN回目の衝突前後のベクトルのなす角度でここでは乱数を与えて求める。』

我々はこの X 方向の速度の式を使って時系列データを求めた。ここで $m = 3 \times 10^{-23} \text{g}$, $M = 1 \times 10^{-22} \text{g}$, 初速度 $V_0 = 5 \mu\text{m}/\text{sec}$ とおいて得られたデータの例を Fig. 8 に示す。G は大小 1 対の粒子のモデルで各々の質量の比で求まるものである。その大きさは 2 個の粒子が衝突後ブラウン粒子 (M) がどれだけの速度に変化するかに大きく影響する。ブラウン粒子の質量が小さいほど熱粒子のエネルギーを受け、速度変化分が大きくなり結局衝突 1 回前の速度との差が大きくなる。G が 2 倍になると得られる速度 V_N は 2 倍となり、Fig. 8 に示す時系列データの振幅が 2 倍になる。

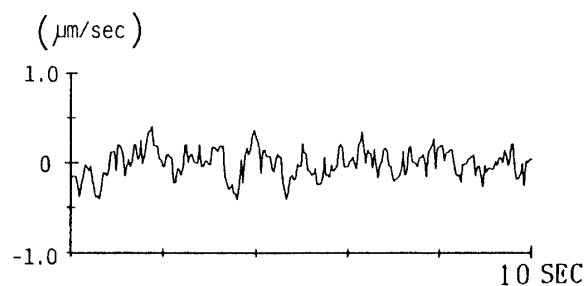


Fig. 8 The time course of velocity of Brownian particles.

参 考 文 献

- 1) 三池秀敏, 石風呂克美, 蛭名良雄: レーザー光散乱による薬剤投与下の腸内細菌の活性度の検出, 電子通信学会技術報告 MBE82-102, pp. 141-144 (1983. 3)
- 2) M. Holz, and S. H. Chen, Applied Optics Vol. 17, No.12 pp.1930-1937 (1978)
- 3) 伊藤康展, 蛭名良雄, 栗山安男, 橋本 基: 動的散乱法を用いた大腸菌の運動性の時間的変化解析, 電子通信学会技術報告 MBE86-21 pp. 53-59 (1986. 6)
- 4) 伊藤康展: 大腸菌の運動パラメータの時間変化による薬剤効果の評価 修士論文 (昭和62. 3)
- 5) 日野幹雄: スペクトル解析 pp.210-236 (昭52) 朝倉書店
- 6) H. Z. Cummins, Photon correlation spectroscopy and velocimetry pp.200-225 (1977)
- 7) S. H. Chen, M. Holz, and P. Tartaglia, Applied Optics Vol. 16, No.1 pp.187-194 (1977)
- 8) 坂元, 石黒, 北川: 情報量統計学 pp.42-64 (昭58) 共立出版
- 9) 山岡: マイコンによる薬物体内動態解析法 pp. 33-54, pp.147-159 (昭59)
- 10) 三島信彦: マイコン物理 pp.75-95 (昭58) 共立出版

(昭和63年10月15日受理)