

レーザー光散乱を利用した薬剤下における
細菌粒径分布変化の計測

正 員 橋本 基[†] 正 員 蛭名 良雄[†] 正 員 三池 秀敏[†]

Measurement of Bacterial Size Distribution Change
under Drugs by Laser Light Scattering

Hajime HASHIMOTO[†], Yoshio EBINA[†] and Hidetoshi MIIKE[†], Members

あらまし 臨床細菌検査への応用を目的とし、レーザー光散乱を利用して細菌の粒径分布計測を行った。ここで用いた方法は、Rayleigh-Debye 散乱近似に基づいて、光散乱パターンから粒径分布を解析する清水氏らの方法に、著者らが改良を加えたものである。本研究では、計測、処理の自動化のため、マイクロコンピュータを用いたシステムを試作した。そして代表的な腸内細菌である *Escherichia coli* (大腸菌) を用い、7 種類の薬剤 (抗生物質) に対する粒径分布の時間変化を計測した。細菌試料は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の薬剤を含んだ培養液中で 30~180 分培養後、遠心分離で菌を取り出し、生理食塩水で $10^5 \sim 10^6$ 個/cc の濃度に希釈して計測した。その結果、試験管希釈法による MIC 値との比較から、薬剤の効果のあるものは 30~60 分で粒径分布の形やピークの位置が変化することがわかった。電子顕微鏡観測により、これらは細菌の形が変わること、また大きくなることを反映していることが確認された。一方、薬剤の効果のないものは、180 分以内では粒径分布はほとんど変化しない。本方法は、短時間で薬剤効果の有無を推定可能であり、臨床細菌検査における薬剤感受性検査の迅速化、省力化に有望と思われる。

1. ま え が き

細菌に抗生物質を与えると、その薬剤に対して弱い (感受性である) 場合、多くの細菌は大きさや形状が変化することが知られている⁽¹⁾。このような変化を短時間で捉えることができれば、細菌検査における薬剤感受性検査の迅速化、簡略化の点から興味がある^{(2),(3)}

我々は、レーザー光散乱を利用し、種々の条件下での細菌の粒径分布計測を行ってきた^{(4)~(6)}。このような光学的な計測法は、非接触、非破壊で行えるという特徴があり、細菌などの微生物や生体細胞の計測に適した方法である。ここで用いている計測法の基本原理は、清水氏らによって提案された方法⁽⁷⁾で、Rayleigh-Debye 散乱近似⁽⁸⁾ (以下 R-D 近似) に基づいて、散乱パターン (散乱光強度の角度分布) から、解析的に微粒子の粒径分布を求めるものである。しかし我々が対象としている細菌は、R-D 近似の条件を十分満足せず、棒状のものも多い。従って、粒径分布に解析誤

差を生じていた⁽⁴⁾。我々は、反復法により解析誤差を改善する方法⁽⁹⁾、棒状粒子が偏長回転楕円体で近似できる場合の粒径分布解析法⁽⁶⁾等を提案し、細菌のような 1 μm 程度の大きさの微粒子に対しては、ほぼ完全な粒径分布が得られることを報告してきた。

本論文では、改良した解析法を用い、臨床細菌検査における薬剤感受性検査への応用の手がかりとして、主に典型的な腸内細菌である *Escherichia coli* (大腸菌、以下 *E. coli*) を対象とし、薬剤下での粒径分布の時間変化の計測を行った結果について報告する。

2. 計測・処理システム

2.1 装 置

計測システムの概略を図 1 に示す。光源はランダム偏光の He-Ne レーザ (日本科学エンジニアリング NEO-F, 2mW) である。レーザー光はチョッパで 250 Hz の断続光にし、レンズを通して試料を入れたセル (直径 20 mm の円柱状ガラスセル) に照射した。ガラスセルの入射面は凸レンズの効果を持つため、セル内で平行光線となるように間にレンズを入れた。散乱光は二つのピンホールを通し、ホトダイオードで検出し

[†] 山口大学工学部電気工学科, 宇部市
Faculty of Engineering, Yamaguchi University, Ube-shi, 755 Japan

た。散乱パターンは、ステッピングモータで検出器を回転させ、適当な位置で止めて計測した。検出器からの電気信号はそのレベルに応じて一旦減衰し、ロックインアンプ (NF Circuit, LI-575) で増幅して 8 bit のデジタル信号に変換し、マイクロコンピュータシステム (NEC, PC-8000 シリーズ) に取り込んだ。

セルをセット後、計測はマイクロコンピュータ制御により自動的に行われる。散乱光は、5~90度の範囲で5度間隔で測定した。また1点はノイズの影響を小さくするため、0.8秒間隔で100点サンプリングし、中央値をとった。従って、1回の測定は約30分要する。データの処理、解析はその内容によって、マイクロコンピュータまたはTSSで大型コンピュータ (NEC, ACOS-850) を用いて行った。

図2は、本装置で測定したポリスチレン人工微粒子球 (Duke Scientific社製、公称直径1.091 μm 、標準偏差0.8%、屈折率1.59) の散乱パターンである。測定は、蒸留水で粒子を $10^5\sim 10^6$ 個/ccの濃度に希釈して行った。○は測定点を表し、実線はMie理論より計算した理論値である。散乱角10度で両者を一致させて表した。図3(a)は、実験に用いた人工微粒子の電子顕微鏡写真である。図3(b)は、上の写真(粒子数約50個)より求めた粒径分布である。データ数が少ないため、なめらかな分布ではないが、これを正規分布と見なすと、主径値は1.125 μm 、標準偏差は約8%となる。人工微粒子の大きさには、かなりばらつきがあることがわかる。他にも、この程度のばらつきがあ

ることが報告されている⁽¹⁰⁾。また、写真より測定した直径は、公称値より約3%大きい。この程度の誤差は、写真の粒子周辺部でのぼけによる読み取り誤差と考えられる。これらを考え合わせ、ここでは人工微粒子の平均直径、屈折率は公称値を用い、標準偏差は写真より測定した値を用いて散乱パターンを計算した。この理論値と測定値は良く一致しており、この結果は装置が十分な特性を持っていることを示している。また、大きさ1 μm 程度の粒子を対象とする場合、散乱パターンの測定は5度間隔で十分であることも示している。

2.2 粒径分布解析法

粒径分布 $n(r)$ は、測定した散乱パターン $I(k_s)$ から次の変換式⁽⁷⁾を用いた反復法⁽⁹⁾によって解析する。

$$n(r) \propto \frac{\partial}{\partial r} \frac{1}{r} \frac{\partial^2}{\partial r^2} S^{-1}[I(k_s)] \quad | \quad r > 0 \quad (1)$$

$$k_s = \frac{2\pi}{\lambda} n_r \sin(\theta/2) \quad (2)$$

ここで λ は媒質中で光の波長、 n_r は散乱体の比屈折率、 θ は散乱角を表す。また S^{-1} は球ベッセル逆変換を表す。

図4は、*E. coli*の粒径分布の解析例である。*E. coli*は短径約1 μm 、長径約3 μm の棒状の細菌(図7(a)参照)である。散乱パターンの測定は、生理食塩水(0.7 wt% NaCl aq.)で細菌を約 $10^5\sim 10^6$ 個/ccの濃度に希釈して行った。この解析では、溶液中

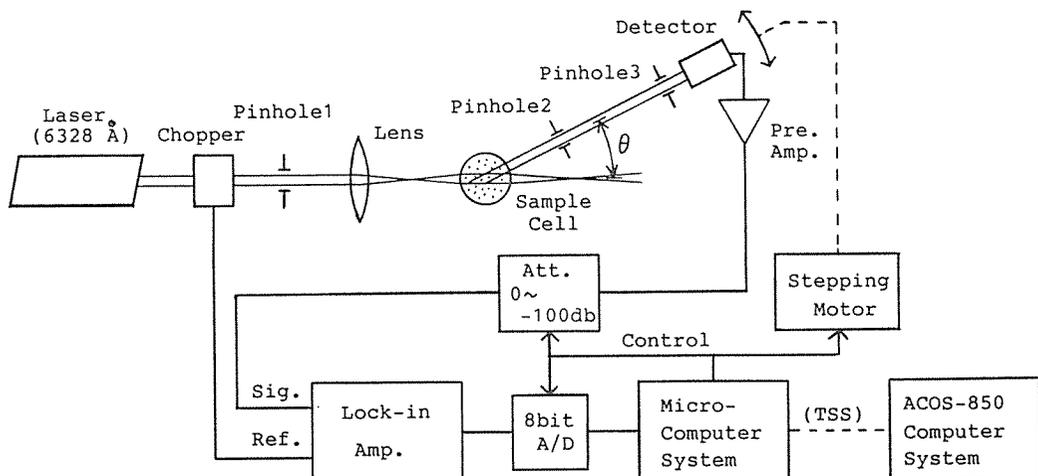


図1 計測システム
Fig. 1 Measurement system.

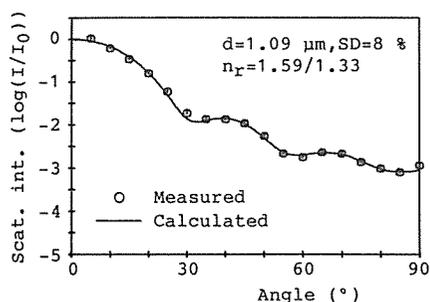
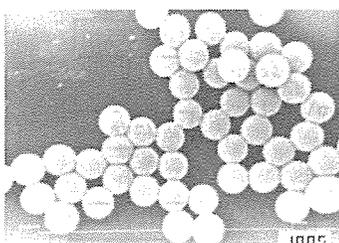


図2 ポリスチレン球の散乱パターン
Fig. 2 Scattering pattern of polystyrene spheres.

(a) SEM photograph (X10000)



(b) Size distribution

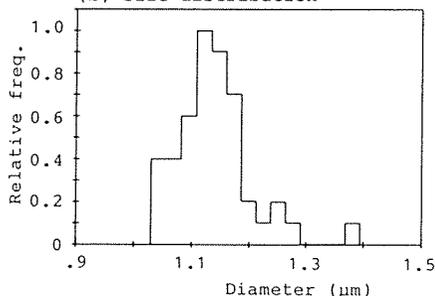


図3 ポリスチレン球の電子顕微鏡写真と粒径分布
Fig. 3 SEM photograph and size distribution of polystyrene spheres.

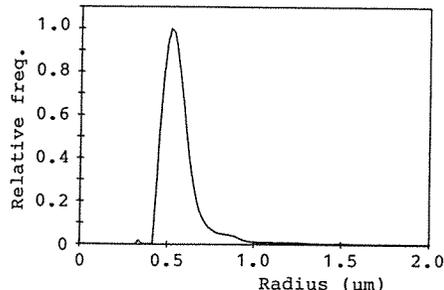


図4 *E. coli* の粒径分布解析例

Fig. 4 Size distribution analysis of *E. coli*.

での細菌の比屈折率として、別報[†]で求めた値 1.52/1.33 を用いた。*E. coli* の粒径分布は、粒径約 0.5 μm で最大値となり、粒径の大きい方にすそを引いた非対称の分布である。棒状の回転楕円体粒子の場合、粒径分布のピーク値を与える粒径は短径を示し、細長いことを反映して粒径の大きい方にすそを引く[†]。この結果は、*E. coli* が短径約 0.5 μm の棒状粒子であることを示しており、写真観測の結果と合致する。

3. 薬剤下での細菌の粒径分布計測

3.1 方法

ここでは主に *E. coli* を用いて実験を行った。試料作成および実験手順を図 5 に示す。一夜培養した菌液を、あらかじめ薬剤を投与して 37°C に保温しておいた培養液と混合する。このとき薬剤濃度は 100 μg/ml 一定とした。培養液は、一般細菌増殖用の Brain Heart Infusion (Difco Lab.) を用いた。混合液を 37°C で培養後、遠心分離で菌を取り出す。これを生理食塩水で約 10⁵~10⁶個/cc の濃度に希釈して散乱パターンを計測した。遠心分離の時間 (15 分) も培養時間を含め、培養時間を変えて粒径分布を解析した。また一連の実験ごとに、薬剤を入れない新しい培養液を用いて同じ手順で実験し、これを Control (対照) とした。この場合、混合後すぐに遠心分離を行った。

用いた薬剤は、表 1 に示す 7 種類の抗生物質である。このうち、Ampicillin, Sulbencillin, Cephalotion は、主に細胞壁を破壊、あるいは細胞壁合成を阻害する薬剤である⁽¹⁾。また Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracycline, Erythromycin は、蛋白質合成を阻害する薬剤である⁽¹⁾。

3.2 結果および検討

結果を図 6 に示す。(a) は比較のために、薬剤を入れない培養液中での時間変化を示す。この場合粒径分布の形に変化はなく、粒径分布のピークの位置が 30 分でわずかに大きい方に移動し、180 分後では最初の値にもどっている。この変化は、新しい培養液に接種することにより、増殖の停止していた細菌が発育を開始し、始めの約 30 分で大きくなり、その後分裂が始まると最初の大きさに戻ることを反映しているものと考えられる。

図 6 (b)~(h) は、薬剤を入れた時の結果である。細胞壁に効く薬剤 (b)~(d) では、時間と共に粒径分布のピー

[†] 応用物理投稿中 (散乱パターン解析による微粒子の粒径分布計測法—長球形粒子の散乱パターン近似と粒径解析法—)

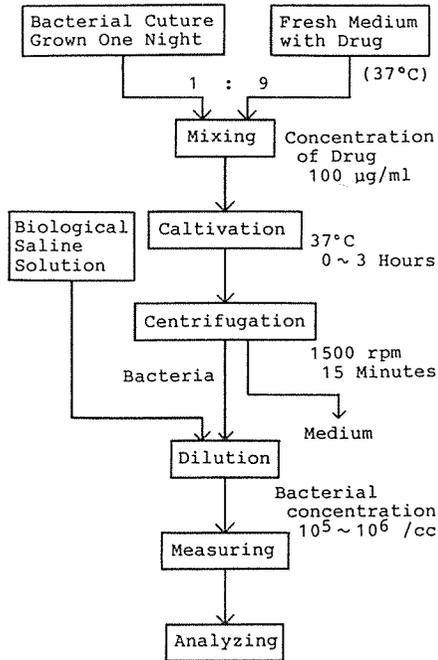


図5 実験手順
Fig. 5 Processes of experiment.

クの位置が移動し、すその広がりも大きくなっている。また、これらの薬剤に共通して、粒径分布の大きい方に振動が現れている。1時間後の細菌の状態を図7の電子顕微鏡写真に示す。このうち、(a)は薬剤を投与していない正常な状態のものである。中に球状に近く見えるものもあるが、細菌の方向の違いによるものであり、ほぼ大きさ、形状はそろっている。(b)、(c)は細胞壁に効く薬剤の例であるが、これらの薬剤では(a)に比べると全体に細菌が肥大し、大きさも揃いになっていることがわかる。粒径分布のピークの移動や広がり、このような細菌の大きさの変化を反映している。また、図7(c)の右下で、2個の細菌が癒着しているのが観測される。粒径分布の大きい方での振動は、このように細菌が数個癒着したものの存在を示

いていると考えられる。更に、図6(d)の粒径分布を見ると、粒径の小さい方にもピークが現れている。このとき光学顕微鏡で観察すると、細菌が破壊されて小片になっているものがあった。細胞壁に効く薬剤で時々見られる粒径の小さい方でのピークは、このような破壊された細菌の小片を反映しているものと考えられる。

次に、図6(e)~(h)は、主に蛋白質合成を阻害する薬剤に対する例である。このうち、(e)、(f)の薬剤に対しては、時間と共に粒径分布が右に移動している。図7(d)、(e)の写真に示すように、これらの薬剤では細菌が大きくなっていることに対応している。また、これらの薬剤では、粒径分布の形は変化しない。一方、図6(g)、(h)の薬剤に対しては、粒径分布はほとんど変化していないか、むしろ薬剤下で細菌が小さくなる傾向を示している。この例を図7(f)に示す。正常な状態(a)とほとんど大きさ、形状に差はなく、粒径分布解析の結果と合致している。

薬剤の効果の有無または強弱は、MIC (Minimal Inhibitory Concentration) テストによって検査される⁽¹¹⁾。試験管希釈法⁽¹¹⁾によるMIC値を表2に示す。これによるとTetracycline, Erythromycinを除く他の薬剤はMIC値が100 µg/ml以下であり、実験の薬剤濃度(100 µg/ml)で効果が有ることがわかる。粒径分布計測の結果と比較すると、細胞壁に効く薬剤では粒径分布の形状が明らかに変化しているもの、また蛋白質合成を阻害する薬剤を投与したとき粒径分布が右に移動するものは、薬剤の効果の有るものと一致する。粒径分布がほとんど変化していないかむしろピークが粒径の小さい方に移動するものは、薬剤の効果が無いものと一致する。また、MIC値がちょうど100 µg/mlと判定されたCephalothin, Kanamycinでは、同様な効果を有するMIC値の低い薬剤と比較すると、粒径分布の変化が現れるのが遅くなっている。このことは、実験に用いた全ての薬剤について、薬剤濃度を変えてMIC値前後で粒径分布を計測し、確認されている。粒径分布変化の薬剤の種類による違いや、

表1 抗生物質

製品名	成分名	会社名
ピクシリン	Ampicillin	明治製菓株式会社
リラシリン	Sulbenicillin	武田薬品工業株式会社
Cephalothin 標品	Cephalothin	藤沢薬品工業株式会社
Chloramphenicol 標品	Chloramphenicol	藤沢薬品工業株式会社
硫酸カナマイシン	Kanamycin	明治製菓株式会社
Tetracycline 標品	Tetracycline	藤沢薬品工業株式会社
ERYTHROCIN-I. V.	Erythromycin	Abbott. Lab.

表2 E. coli の MIC 値

薬剤	MIC 値 (µg/ml)
Ampicillin	12.5
Sulbenicillin	6.25
Cephalothin	100.
Chloramphenicol	3.1
Kanamycin	100.
Tetracycline	>400.
Erythromycin	400.

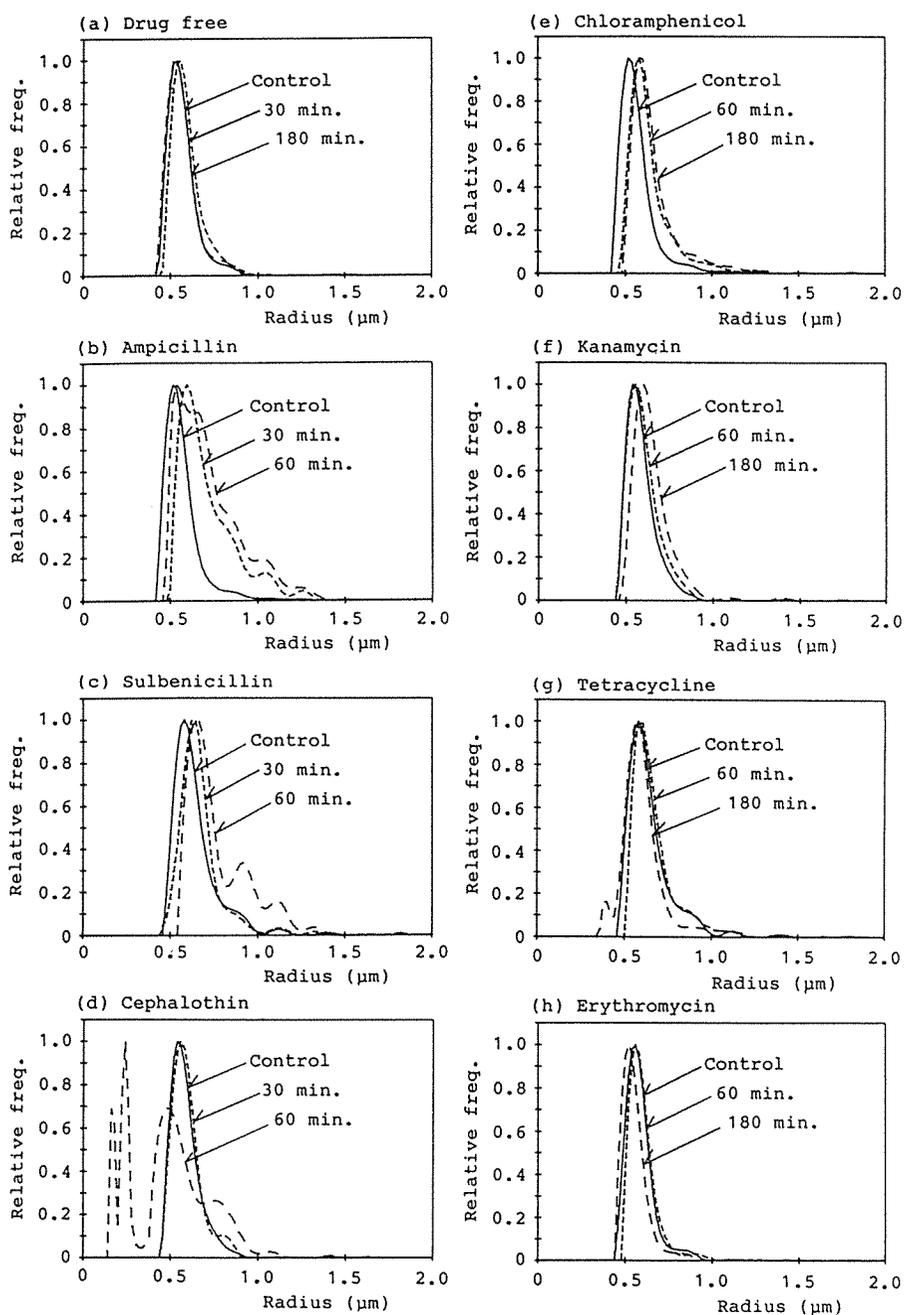


図6 薬剤下での *E. coli* の粒径分布変化
Fig. 6 Size distribution changes of *E. coli* under drug.

MIC値と薬剤濃度の関係は、他の腸内細菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* で実験) でも同様であった。

4. むすび

臨床細菌検査における薬剤感受性検査への応用の試みとして、数種類の抗生物質を投与した培養液中での細菌の粒径分布の時間変化を計測した。その結果、

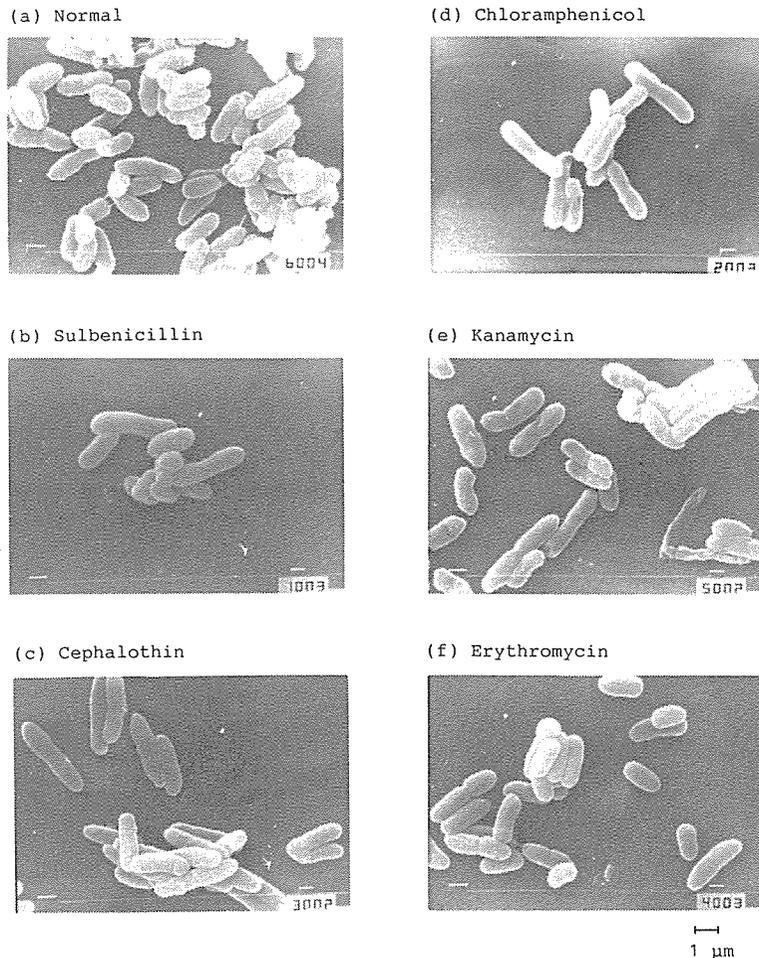


図7 *E. coli* の電子顕微鏡写真. 薬剤を投与した培養液中で1時間培養 (X10000)
 Fig. 7 SEM photographs of *E. coli* cultivated in a drug medium for one hour (X10000).

MIC 値との比較により, 薬剤の効果の有るものは, 薬剤投与後 30 分~1 時間で粒径分布が変化することがわかった. この変化は, 薬剤の種類によってそれぞれ異なる. ここでは主に *E. coli* の測定例を示したが, 腸内細菌の他の菌種でも同様であった.

現在臨床ではディスク法が多く用いられているが, 18~24 時間の検査時間が必要である⁽¹¹⁾. また近年いくつかの新しい検査法, 装置が開発されているが, その多くは細菌の増殖を検出するものであり, 3~5 時間を要する^{(2),(3)}. これらに比べ, 本方法は細菌の増殖ではなく, 形状や大きさの変化を計測するものであり, より短時間で検出が可能である. 以上より本方法は, 細菌の薬剤感受性検査の迅速化法として, 有望な方法と思われる. しかしなお多くの薬剤, 菌種に対

してデータを集める必要があり, 今後実験を重ねて行く予定である.

今回試作した測定装置は, 一つの検出器を回転させて散乱パターンを測定しているのので, 一回の測定に約 30 分かかる. 検出器を複数化すれば更に測定時間を短縮することが可能であり, 現在検討中である.

本研究の一部は, 昭和 60 年度科学研究補助金で行われた.

謝辞 本研究を進めるにあたり, 細菌試料を準備していただいた和田一郎氏, 乗安久晴氏 (山口大学附属病院検査部) に深謝いたします.

文 献

- (1) T. J. Franklin and G. A. Snow: "Biochemistry of Antimicrobial Action 3rd-ed.", Chapman and Hall,

London (1981).

- (2) 笠原, 森安: “細菌感受性検査自動化へのアプローチ”, 臨床病理, **27**, 7, pp. 571-575 (1979-02).
- (3) 三輪谷俊夫: “微生物に関する簡易, 迅速検査法”, 臨床病理, 臨時増刊特集第 37 号, pp. 79-97 (1979).
- (4) H. Hashimoto, K. Kakihara, H. Miike and Y. Ebina: “Rapid Bacterial Testing Method by Size Distribution Measurement with Laser Light Scattering”, Trans. IECE Japan (Section E), **E68**, 5, pp. 304-308 (1985).
- (5) 橋本, 三池, 蛭名: “レーザー光散乱を利用した細菌の粒径分布計測-II”, 昭 60 ME 大会予稿集, 10-1-6.
- (6) 橋本, 蛭名, 三池: “光散乱パターンを用いた粒径分布解析法の改良と薬剤下での細菌粒径分布変化の計測”, 信学技報, **MBE85-78**, (1986-02).
- (7) 清水, 石丸: “フーリエ変換による逆散乱問題の一解法—低濃度散乱体粒径分布の決定—”, 応用物理, **52**, 4, pp. 74-80 (1983).
- (8) A. Ishimaru: “Wave Propagation and Scattering in Random Media”, pp. 22-25, Academic Press, New York (1978).
- (9) 橋本 基: “R-D 近似に基づいた粒径分布計測法の改善”, 信学論 (C), **J69-C**, 6, pp. 793-795 (昭 60-06).
- (10) D. D. Cooke and M. Kerker: “Particle Size Distribution of Colloidal Suspensions by Light Scattering Based upon Single Particle Count ; Polystyrene Latex”, J. Coll. Int. Sci., **42**, pp. 150-155 (1973).
- (11) 小酒井 望編: “微生物検査”, 医学書院 (昭 54).

(昭和 61 年 7 月 7 日受付)



電気学会各会員.

三池 秀敏

昭 46 九州大・工・電子卒. 昭 51 同大学院博士課程了. 同年山口大・工・電気助手. 昭 52 同学部講師. 昭 54 同学部助教授. 現在に至る. 医用電子, レーザおよび画像計測に関する研究に従事. 工博. 日本 ME 学会, 日本物理学会, 電

橋本 基



昭 52 山口大・工・電気卒. 昭 54 同大学院修士課程了. 同年同大・工・電気科助手となり, 現在に至る. 主にレーザ光散乱を利用した微粒子の計測に関する研究に従事. 日本 ME 学会, 応用物理学会各会員.

蛭名 良雄



昭 34 東北大・工・電気科卒. 昭和 36 同大学院修士課程終了. 同年電々公社入社. 昭 37, 東北大学電気通信研究所を経て, 現在山口大・工・教授. 生体信号計測法の開発研究を行っている. 日本 ME 学会員, 生物物理学会員, 電子通信学会員, 応用物理学会各会員.