

近赤外分光法による細菌同定法の可能性と問題点 —ブドウ球菌 (MRSA, MSSA) と大腸菌の同定を例にして—

¹東京慈恵会医科大学附属青戸病院臨床検査医学, ²東京慈恵会医科大学附属青戸病院小児科

³ブラン・ルーベ株式会社, ⁴関西学院大学理学部

松永 貞一¹⁾²⁾ 長谷川美奈子¹⁾ 龍野 国弘¹⁾ 川満 幸子¹⁾
大崎 一男³⁾ 三浦 剛³⁾ 尾崎 幸洋⁴⁾ 黒坂 公生¹⁾

(平成7年1月23日受付)

(平成7年4月10日受理)

Key words: near-infrared spectroscopy, *Staphylococcus aureus*,
Escherichia coli, rapid identification

要 旨

近赤外分光法は近年農産物や食品工業, 化学工業, 医薬品工業の分野に於いて急速に利用されてきている。我々はこの方法を医学の分野にも応用してきたが, 近赤外分光法を細菌の同定に利用する事を試みた。その第一のステップとして我々は大腸菌と黄色ブドウ球菌を近赤外分光法を用いて弁別した。この方法で更にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌とメチシリン感性黄色ブドウ球菌を弁別した。この結果をリファレンスとすると未知の菌の名称を知る事が出来た。さらに, 未処理菌のみでなくサブMICのABPC濃度で培養した菌や加熱滅菌処理したメチシリン感性黄色ブドウ球菌の弁別も可能であった。この識別法は濃度依存性であった。将来的には二つの異なる菌の重み係数の検討から新しい研究分野を開拓する事も可能と考えられた。

序 文

近赤外光は, 750nm~2,500nmの領域を占める可視光域と赤外域に挟まれた領域の波長を持つ光である。近赤外光の吸収に基づく分光分析法は古くから知られていたが, そのスペクトルが複雑で解析が困難であったため従来あまり用いられることはなかった。しかし, コンピュータの発達や周辺技術の進歩により, 近年, 食品, 農産, 薬品, 高分子, 繊維等の分野でその品質管理や成分の定性分析, 定量分析などの目的で近赤外分光分析法は多岐にわたり利用され始めている¹⁾。本法は生体や試料を損なう事なく非侵襲的, かつ実時間で情報が得られることから医学の分野でもその応用が徐々に試みられ始めている。

我々はすでに近赤外分光分析法の医学への新しい応用法を幾つか報告してきたが, 本論文ではこれまでの我々の報告を更に一步前進させ, ブドウ球菌 (MRSA, MSSA) と大腸菌を材料として本法による細菌の鑑別を詳しく検討した。細菌の同定は, 従来, 形態学的観察・生化学的性状・免疫学的手法等を用いて行われているが, 近赤外分光法を用いた方法はこれらの従来の手法とは全く異なる手法であり, すでに確立されている手法を補完する検査法として利用できる可能性があると考えたので報告する。

材料と方法

A. 近赤外分光測定装置

近赤外分光測定には, ブラン・ルーベ社のフーリエ変換近赤外分析計 InfraProver (インフラプローバー) を用いた。本機は, 原理的には同社からすでに発売されている近赤外分光装置 InfraAl-

別刷請求先: (〒125) 東京都葛飾区青戸6-41-2

慈恵医大青戸病院小児科・中央検査部

松永 貞一

alyzer (インフラライザー) 500と同じであるが、これにフーリエ変換分光技術を合体させたため InfraAnalyzer 500では識別できなかった2つの異なる試料の弁別も可能となっている。この装置は、約1秒間の測定時間内に、1,000nm から2,500nmの近赤外領域での試料の、透過、透過反射または拡散反射の測定値を約3nm毎、すなわち500ポイントについて測定値を得ることができる。測定は1試料について5つの異なった場所で行った。

B. データ処理と判定理論

InfraProver はクラスター分析とライブラリー分析の2つの定性分析手法を備えている。このうち先ず、今回用いたクラスター分析について概説する。

2つの異なる試料群 (例: ブドウ球菌10株と大腸菌10株。以下、この例に従い括弧内に例示して解説する。)の差異の判定を行うため、各々の試料群 (例: $10 \times 2 = 20$ 株) から得られたスペクトル情報を同一の500次元の吸光度空間に置き、複数の点 (例: 20点) の集団とする。つぎに、多変量解析法の中の主成分分析法を用いて、これらの点 (例: 20点) の集団の分散が最大となる軸を求め、これを第1主成分とする。さらに、この第1主成分と直交し、分散が最大となる軸を求め、これを第2主成分とする。以下同様に第15主成分まで軸をもとめる。これを主成分分析と呼ぶ。この主成分分析した結果を主成分空間にデータとして展開し、個々のサンプル (例: 10×2) が内包する情報 (許容半径) から形成される集団 (例: ブドウ球菌と大腸菌の2集団) (Fig. A)とスペクトルより得られた未処理情報 (例: 20個) の差 (スペクトル残差) から2つの異なる試料 (例: ブドウ球菌と大腸菌) の差異の判定を行う。この手法は、極めて類似した2群の弁別に利用される。

本機には他に、差異の顕著な群を弁別する際用いられるライブラリー分析がある。これは、主成分分析した結果を主成分空間にデータとして展開し、2つの異なる試料群の中心間距離 (Fig. B)とスペクトル残差から差異の判定を行う方法である。今回は、この方法では菌の弁別は出来なかった。

Fig. A Image of plot of two different samples after calculation of the radii.

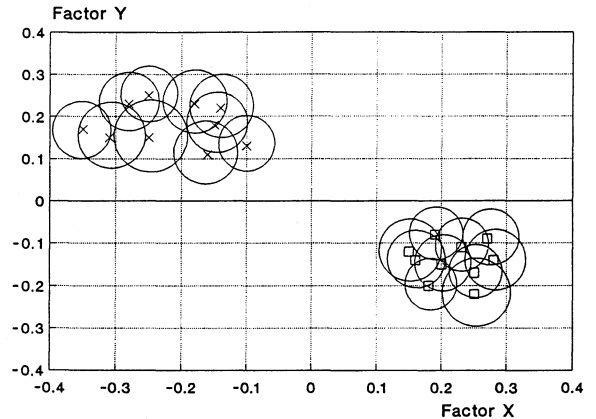
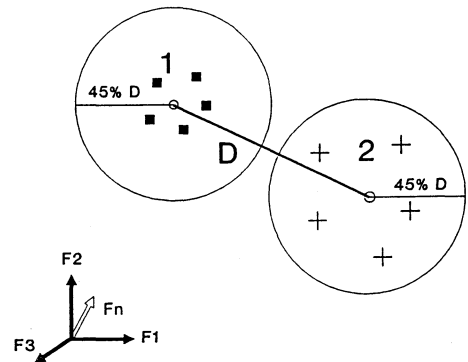


Fig. B Image of distance limits of two different samples.



我々はこの様にして、InfraProverを用いて細菌の識別が可能であるか否かについて検討した。

C. 実験対象

実験対象とした細菌は、慈恵医大附属青戸病院臨床検査医学教室保存および慈恵医大附属青戸病院中央検査部より得られた病巣分離の大腸菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、メチシリン感性黄色ブドウ球菌(MSSA)である。

D. 菌液の調整と測定方法

上述の菌を増菌用ミューラーヒントン液体培地にて一昼夜培養し生理食塩水にて洗浄後、生理食塩水に懸濁させたものを、富士の光電光度計を用い5mg/mlに調整して試料とした。

試料は深さ0.3mmの特殊セル(シロップ・カッ

Fig. 1 1-factor plot for qualitative model (cluster model) of *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *E. coli*. No. 1~24 indicate *Staphylococcus aureus* (MRSA) and No. 25~48 indicate *E. coli*.

B R A N + L U E B B E I N F R A P R O V E R

2-Factor Plot for Qualitative Model of MREC-11
Displayed are the 48 spectra in the series

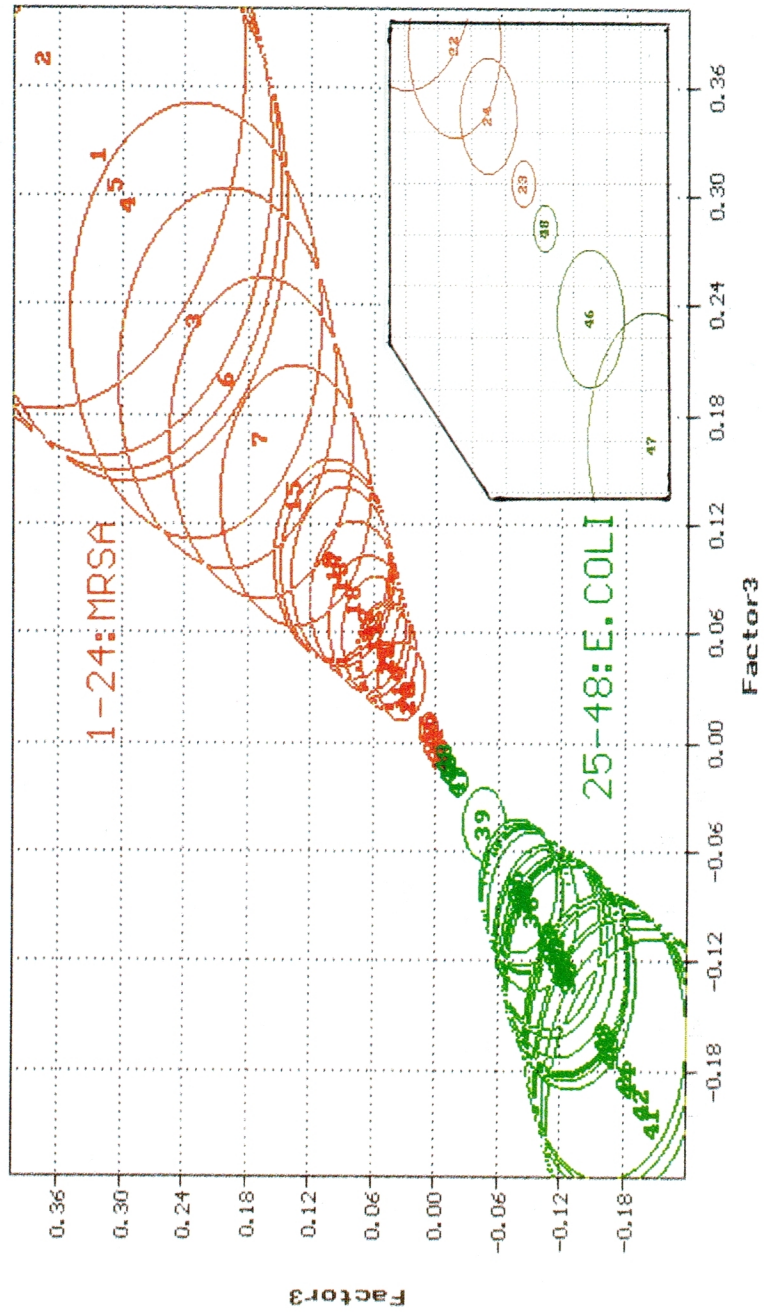
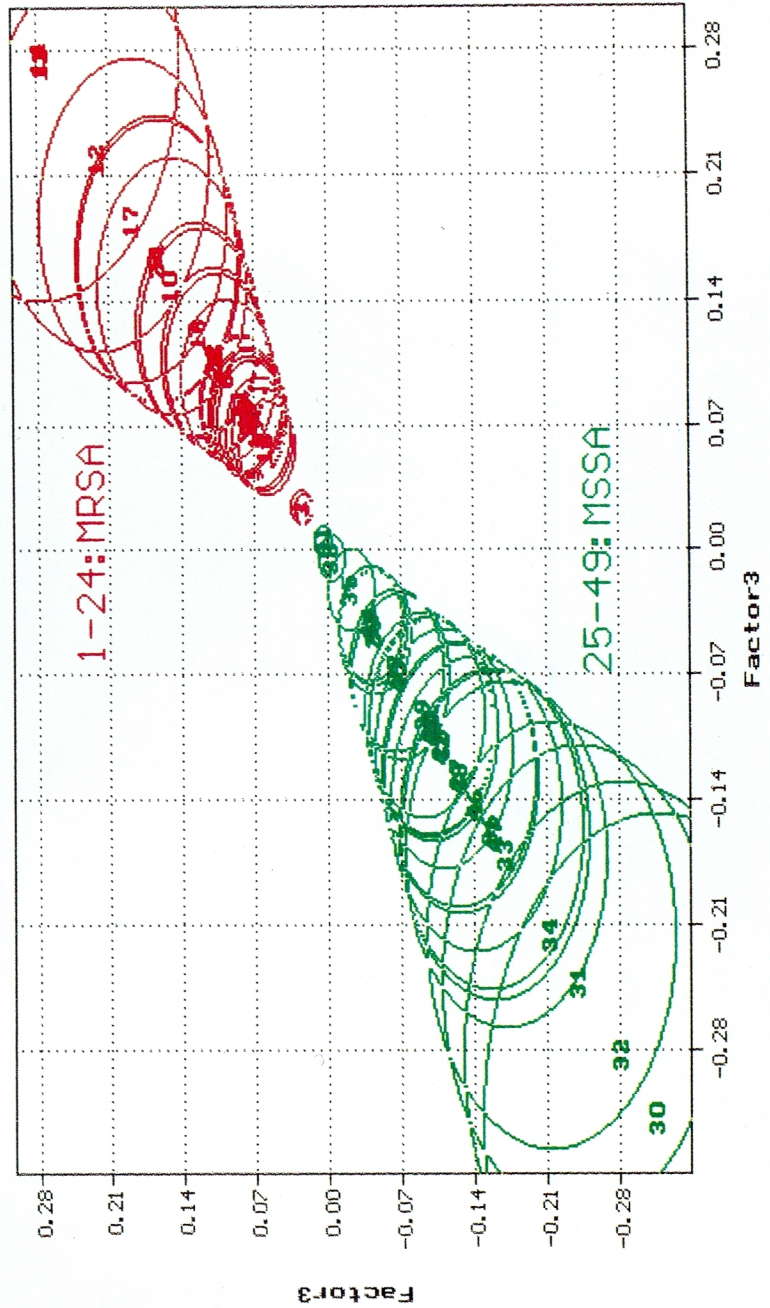


Fig. 2 1-factor plot for qualitative model (cluster model) of MRSA and MSSA. No. 1~24 and No. 25~49 indicate MRSA and MSSA, respectively.

B R A N + L U E B E I N F R A P R O V E R

2-Factor Plot for Qualitative Model of MRMS-1
Displayed are the 49 spectra in the series



プ) に入れ、近赤外領域に吸収を持たぬ石英ガラスの蓋をする。気泡の混入が無いことを確かめた後、異なる5カ所で、InfraProverの光ファイバプローブを用いて1,000nm~2,222nmの波長域で、各々5回測定を行った。

成 績

A. 細菌の弁別

A-1. ブドウ球菌と大腸菌の弁別

Fig. 1にブドウ球菌と大腸菌の判別の結果を示す。右上の輪がブドウ球菌、左下の輪が大腸菌である。一つの輪は一つの菌の結果を意味している。ブドウ球菌群と大腸菌群のそれぞれの菌群の測定結果は相互に混じる事なく2つの群に明瞭に分かれた。

A-2. MRSA と MSSA の弁別

グラム陰性桿菌の代表としての大腸菌とグラム陽性球菌の代表としてのブドウ球菌が本法で識別出来たことから、次にブドウ球菌をMRSAとMSSAの2群に判別できるか否かを検討した。Fig. 2に結果を示す様に、右上にMRSA、左下にMSSAと両者は2群に明瞭に分かれた。

A-3. 大腸菌, MSSA, MRSA の弁別

以上をまとめ、大腸菌, MSSA, MRSAの3者を、横軸に第一主成分、縦軸に第三主成分をとり

二次元で示したのがFig. 3である。3種類の菌は各々の集団となって弁別された。

B. 未知の菌の判定

Fig. 2に示したMRSAとMSSAのデータをMRSAとMSSA判別のリファレンスとして用い、未知のMSSAをこの中に入れ、正しくMSSAと判別されるか否か見た。Table 1に見るごとく、5株の未知のMSSAはすべてMSSAと正しく判別された。

さらに、このMRSAとMSSA判別用リファレンスに大腸菌を入れたとき、大腸菌がどの様に判別されるかも検討した。Table 2にその結果を示す。検体番号1はMSSAと誤って弁別された。検体番号2の大腸菌は本装置のクラスター判別手法においてスペクトル残差はMRSA, MSSAの許容範囲内であるが許容距離が双方の許容半径の中に入らず、MRSA, MSSAのどちらにも判別されなかった。検体番号3, 4, 5はスペクトル残差がMRSA, MSSAの許容範囲内になく、検体番号2の菌よりスペクトル的に更にMRSA, MSSAよりかけ離れていると見なされMRSA, MSSAのどちらにも判別されなかった。このように5株の大腸菌のうち1株はMSSAと誤って識別されたが、残りの4株はMRSA, MSSAのどちらとも

Fig. 3 2-factor plot for qualitative model (cluster model) of MRSA, MSSA and *E. coli*. No. 1~4, No. 5~8, and No. 9~12 indicate MRSA, *E. coli* and MSSA, respectively.

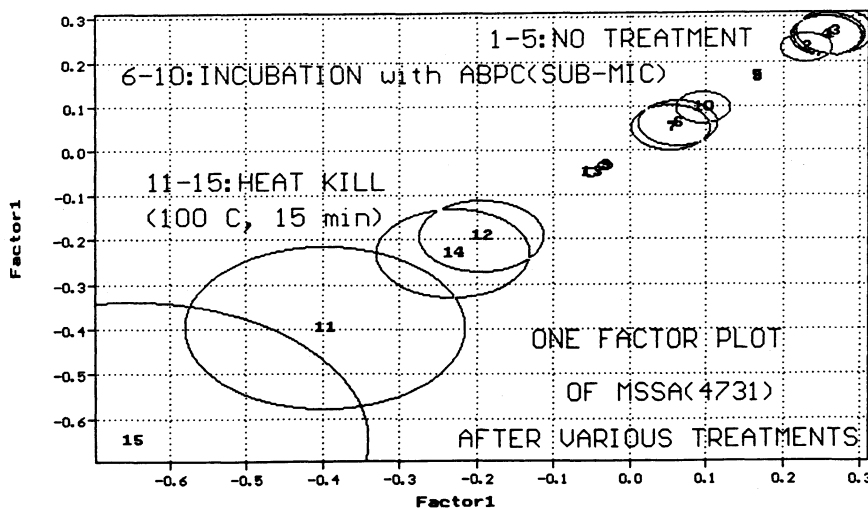


Table 1 Predicted identity and true identity of MSSA in the reference model for MSSA vs. MRSA

Sample	True I.D.	Predict I.D.	Residual
1	MSSA	2	0.00539
2	MSSA	2	0.00315
3	MSSA	2	0.00620
4	MSSA	2	0.00357
5	MSSA	2	0.00684

Identification Name : 1 MRSA 2 MSSA
 Allowed Residual : 0.01908
 Correctly Identified : 5=100%

判別できないという判定結果となり80%の正答率であった。

C. 菌の変化の測定

A 項 B 項で、大腸菌、MRSA、MSSA の識別の可能性が大であるという結果を得たので、次のステップとして、菌の培養条件を変えることにより生理的状态を変えた時に起こる変化を本法で捉えることが出来るか否か検討した。Fig. 4 は ABPC に対する最小発育阻止濃度 (MIC) $6.25\mu\text{g/ml}$ の MSSA を増菌用液体培地にてそのまま一昼夜培

Table 2 Predicted identity and true identity of *E. coli* using reference for MSSA vs. MRSA

Sample	True I.D.	Predict I.D.	Residual
1	<i>E. coli</i>	2	0.00543
2	<i>E. coli</i>	0	0.01404
3	<i>E. coli</i>	none	0.02308
4	<i>E. coli</i>	none	0.03345
5	<i>E. coli</i>	none	0.03041

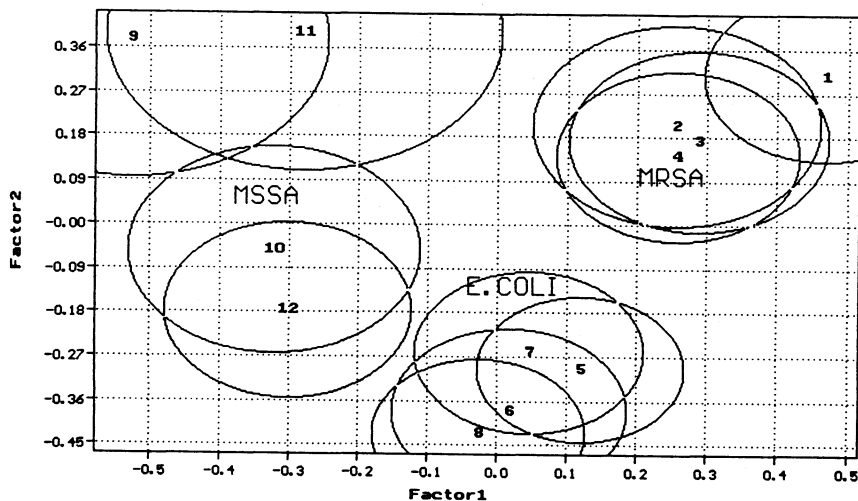
Identification Name : 1 MRSA 2 MSSA
 Allowed Residual : 0.01908
 Correctly Identified : 4=80%

養した菌液、同じ菌株を最小発育阻止濃度より低い $1.0\mu\text{g/ml}$ の濃度 (サブ MIC) の ABPC の存在下で一昼夜培養した菌液、無処理一昼夜培養菌液を 100°C で15分煮沸したときの菌液、以上3種類の菌液を用意しこれらを測定したときの結果である。右上から左下へ順に、無処理菌、サブ MIC の条件で培養した菌、煮沸した菌を示す。煮沸群はサブ MIC 群と比べ無処理群からスペクトル的にかけ離れて、3つの群に分けて識別された。

D. 菌濃度の影響

本法を実用化する際の問題点として、菌の濃度

Fig. 4 1-factor plot for qualitative model (cluster model) of MSSA in various conditions. No. 1~5 indicate MSSA without treatment, No. 5~10 indicate MSSA treated with ABPC in Sub MIC level and No. 11~15 indicate MSSA killed by heat.



が測定結果に及ぼす影響を検討する必要がある。そこで今回のMRSAの実験に用いた菌濃度 5×10^8 cfu/mlを濃度1としたとき5倍から0.08倍までの7段階の濃度の菌液を作製しその近赤外スペクトルを測定した。Fig. 5にその結果を示す。菌液濃度が低いほど透過反射が大きくなる現象が認められた。この近赤外スペクトルを主成分分析した時の結果をFig. 6に示す。濃度の違いによって

グラフ右上から左下へ順に異なる群に弁別された。

考 察

近赤外分光分析法は生体や試料を損なう事なく非侵襲的、かつ実時間で情報が得られることから医学の分野でもその応用が徐々に試みられ始めている。この中には、既に我々が発表したようなヘモグロビンの酸素飽和度の測定²⁾³⁾をはじめ、動脈

Fig. 5 Selected Near-Infrared (NIR) spectra of *Staphylococcus aureus* (MSSA) in various concentrations.

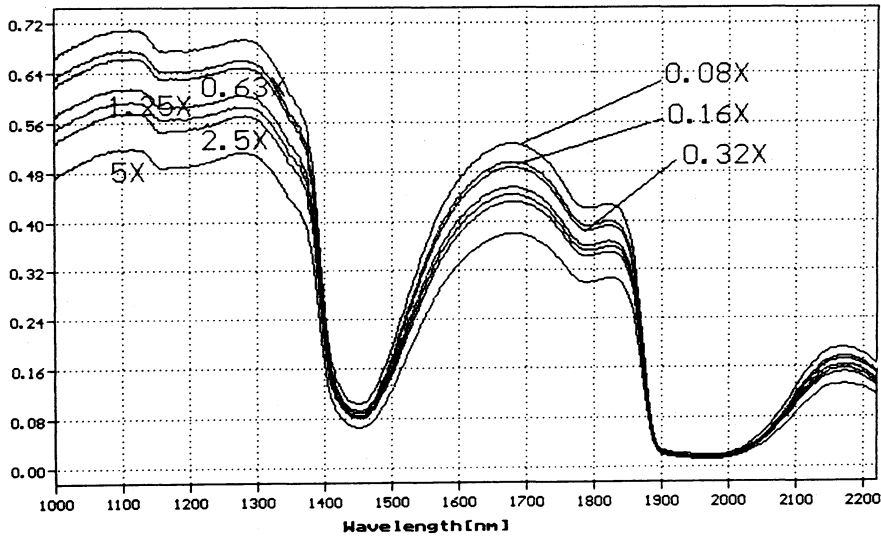


Fig. 6 1-factor plot for qualitative model (cluster model) of *Staphylococcus aureus* (MSSA) in various concentrations.

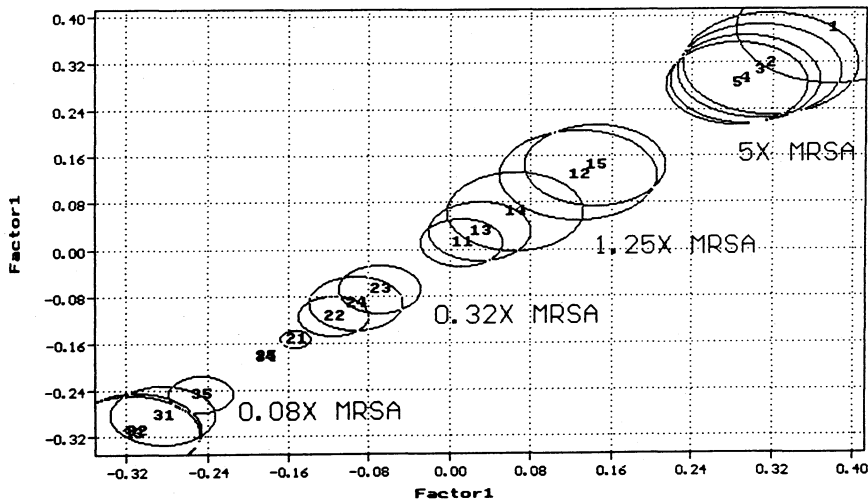
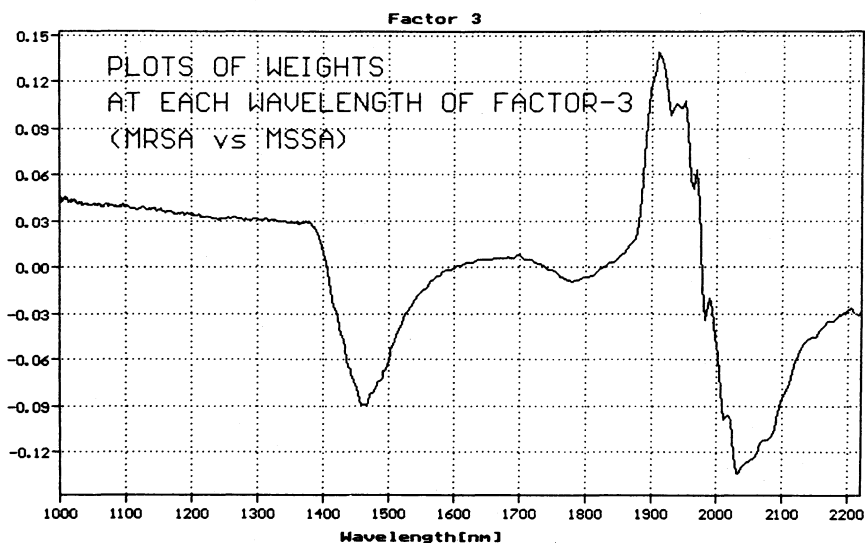


Fig. 7 Plots of weights at each wavelength of Factor-3 a for differentiation of MRSA and MSSA.



硬化、肝臓病、糞便、脳浮腫、脳循環などの解析が挙げられる。

今回、我々は近赤外分光分析法の新しい医学への応用として、本法に多変量解析による主成分分析機能を加えたブラン・ルーベ社のフーリエ変換近赤外分析計 InfraProver を用いて細菌の弁別を試み、この方法により、グラム陰性桿菌の代表としての大腸菌とグラム陽性球菌の代表としてのブドウ球菌の弁別が可能であること、さらにブドウ球菌を本法により MRSA と MSSA に弁別できることを示した。細菌の同定は、従来、形態学的観察・生化学的性状・免疫学的手法等を用いて行われているが、近赤外分光法を用いた方法はこれらの従来の手法とは全く異なる手法であり、すでに確立されている手法を補完する検査法として利用できる可能性があると考えられる。本法の長所として特記されるべきは、生体や試料を損なう事なく非侵襲的、かつ実時間で情報が得られることである。これらは、従来法では不可能な検査法上の特徴であり、本法を更に検討することにより更に多くの細菌学検査上の用途に応用できることが期待される。今回は大腸菌とブドウ球菌に的を絞って検討したが、すでに我々は溶血性連鎖球菌、*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*,

Enterobacter cloacae, *Pseudomonas aeruginosa* などの菌の弁別の可能性を報告している。将来的には、Fig. 6 に示した菌濃度の主成分分析の結果を用い、これを菌の濃度のリファレンスとして未知の検体の濃度を知り、その上で次に菌識別のためのリファレンスを用いて与えられた菌が何であるかを識別することが可能になるものと我々は考えている。

本法の将来の展望と応用の可能性として細菌学の新しい展開と方向付けの利用が挙げられる。Fig. 7 は、MSSA と MRSA の弁別に最も有用であった第三主成分の分析内容を、横軸に波長、縦軸に主成分の重み係数を取り示したものである。このグラフから、2種の細菌を識別するために、各々の波長が第三主成分では、どの程度寄与しているかを読み取ることが出来る。すなわち、重み係数を示す縦軸のほぼまん中の0から大きくかけ離れているところの波長が MRSA と MSSA の識別に役だった波長である。将来は、重み係数のスペクトルの波長の解析・解釈から両菌の違いの原因となる物質を類推することが可能と思われる。

本論文の要旨は第40回日本臨床病理学会総会ならびに第39回ブドウ球菌研究会において口演発表した。

文 献

- 1) 尾崎幸洋, 岩橋榎夫: 近赤外分光法, 現代化学, 12: 36—42, 1992.
- 2) 松永貞一, 尾崎幸洋, 所 敏治, 石岡憲昭, 三浦剛: 近赤外拡散反射分光法による非侵襲生体計測の試み, 医学のあゆみ, 152: 467-468, 1990.
- 3) 要旨集のため筆者名不要: 日本分光学会医学生物部会シンポジウム, 「赤外, 近赤外領域スペクトルによる病体解析」講演要旨集, 1992.
- 4) Coblenz, W.W.: Bulletin of Bureau of Standards, 7: 619—663, 1911.
- 5) 錦田晃一, 西尾悦雄: 細菌の赤外スペクトル, 「チャートで見る FT-IR」, p. 144—145, 講談社, 東京, 1990.
- 6) Neumann, D., et al.: The classification of bacterial FT-IR pattern by multivariate statistical techniques. p. 425—429. in "Spectroscopy of biological molecules state of the art"—Proceedings of Third European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bologna, Italy, 1989. Edited by Bertoluzza, A., Fagnano, C. & Monti, P. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy, 1989.
- 7) 松永貞一, 福士 真, 三浦 剛, 長谷川美奈子, 川満幸子, 飯倉洋治, 前川喜平, 町田勝彦, 黒坂公生, 尾崎幸洋: 近赤外分光法を用いた細菌同定の試み, 医学のあゆみ, 166: 189—190, 1993.
- 8) Ozaki, Y., Matsunaga, T. & Miura, T.: Non destructive and Noninvasive Monitoring of Deoxyhemoglobin in the Vein by use of a near-infrared reflectance spectrometer with a fiber-optic probe. Applied Spectroscopy 46: 180—182, 1992.

Non-Destructive and Rapid Identification of Bacteria Using Near-Infrared Spectroscopy

Teiichi MATSUNAGA¹⁾²⁾, Minako HASEGAWA¹⁾, Kunihiko RYUNO¹⁾,
Sachiko KAWAMITSU¹⁾, Kazuo OSAKI³⁾, Tsuyoshi MIURA³⁾,
Yukihiko OZAKI⁴⁾ & Kosei KUROSAKA¹⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, Aoto Hospital, The Jikei University School of Medicine

²⁾Department of Pediatrics, Aoto Hospital, The Jikei University School of Medicine

³⁾Bran + Luebbe K.K. Shinjuku-ku, Tokyo

⁴⁾Department of Chemistry, School of Science, Kwansai Gakuin University

Near-infrared (NIR) spectroscopy has recently come to be applied extensively in agricultural, food and chemical industries, and pharmaceutical science. We have been attempting to expand this method in the field of medical science. For example, we tried to use NIR spectroscopy for determination of bacteria. As the first step of this attempt, we differentiated between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using NIR spectroscopy. This method could still further differentiate Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). Using those results as reference, the true name of bacteria from unknown bacteria was given. Not only untreated bacteria, but also we differentiated untreated MSSA, MSSA cultured in sub MIC concentration of ABPC and heat-killed MSSA. This identification method is sensitive to the bacterial concentration. In the future, the some new idea of a new direction of research from the result of plots of weights from two different bacteria will appear.