

細胞の増殖を捉える —計測法から比速度算出まで—

小西 正朗*・堀内 淳一

細胞数を測定する方法と聞いて読者の皆様はどのような方法を思い浮かべるだろうか？微生物を取り扱うことが多い場合は、濁度法や乾燥菌体重量だろう。動物細胞を扱う人は血球計による細胞計数法を思い浮かべるのではないだろうか。培養中の細胞動態を捉える基本中の基本ともいべき細胞濃度の測定方法や増殖の捉え方は研究や業務の中でルーチン化して、意識しないようになっていないだろうか。本稿では、基本に立ち戻り、微生物を中心に細胞計数の手法・比増殖速度の算出方法について、概説したい。

1. 測定方法の種類と選択

対象とする微生物や培養条件・サンプル量により適切な測定方法が存在する。たとえば、乾燥重量法は正確であるが少なくとも、数十mgの細胞が必要となることや、測定結果がでるまで、半日から1日程度の時間が必要となる。そこで濁度法がよく採用される。培地中に濁りや着色成分ないこと、培養中に細胞形状が変化しないこと、細胞同士が凝集しないことなどが条件としてあげられる。オンラインで測定する場合、静電容量を電極で測定する方法が採用される^{1,2)}。環境中サンプルなどから特

表1. 細胞濃度の測定方法

測定方法	特徴（長所⇔短所）
乾燥菌体重量法	正確⇔測定に時間がかかる
濁度法	簡便⇔濁りや細胞形状変化が影響
顕微鏡法	正確、形状変化に影響されにくい⇔計数に習熟と時間がかかる
静電容量法	生菌のリアルタイム計測⇔専用電極必要
NAD測定	直接法が困難な場合有効⇔細胞含量変化の影響、煩雑
湿重量法	糸状菌などで有効⇔必要細胞量大、精度低い
平板培養法	生菌数を測定可、懸濁物に影響されない⇔培地組成の影響、培養に時間がかかる
最確数法	低濃度で有効⇔培養に時間がかかる
Real Time PCR法	間接法、特定の菌種を(半)定量⇔rRNAコピー数の影響
Flow cytometry法	生菌数・形状などを同時測定可⇔機器が高価

定の微生物量を推定する場合、リアルタイムPCR法などが採用される³⁾。表1に示すようにさまざまな測定方法があり測定原理や特徴をよく理解し適切な方法を選択する必要がある。

2. 乾燥重量法

もっとも基本的な細胞量の測定方法であり、細胞の絶対量を直接推定できる方法である。しかしながら、菌体の乾燥に数時間程度を要し、測定に必要な細胞量が多いので、培養状態を監視するためのルーチン測定には不向きだと言える。また、希薄なサンプルは必要な培養液量が多くなるので、直接測定することは困難である。そこで、乾燥菌体重量法と他の測定方法で代表的なサンプルを同時に測定し、相関関係を明らかにすることで、ルーチン測定の結果から乾燥菌体重量を推定する方法がよく採用される。一般的な培地を用いた培養であれば、濁度法を採用することが多い。

あらかじめ秤量しておいた秤量管やアルミ皿に一定体積の洗浄した細胞懸濁液を載せ、乾燥した後、再度秤量して、前後の重量変化から体積あたりの乾燥重量を測定するという、至って簡単な原理での測定であるが、正確に定量するためには、いくつかのコツがある。

秤量管の定量 容器として使用するガラス製の秤量管やアルミ皿は水分や皮脂などが付着していないきれいなものを使用するが、これらの容器は乾いているように見えても、完全に乾燥していないことが多い。あらかじめ、110°Cで3時間程度加熱し完全に水分を除去してから、デシケーター内で常温に冷ましてから、精密天秤(0.1 mg程度まで測定できるもの)で秤量する。熱いまま測定すると天秤の風防ボックス内で空気の対流が起これ、正確な重量を測定することができない。

細胞の洗浄 培養液中には細胞の他に増殖に必要な栄養成分(有機物)や塩類・細胞が分泌したタンパク質などが含まれる。細胞の乾燥重量を推定するためには、これらの成分を取り除く必要がある。0.2から0.3 g程度の細胞量を確保できるように培養液をサンプリングする。一般的に乾燥菌体重量(g/L)と濁度(OD₆₀₀もしくはOD₆₆₀)の比例定数は0.2–0.5程度なので、濁度が

* 著者紹介 北見工業大学工学部バイオ環境化学科(助教) E-mail: konishim@mail.kitami-it.ac.jp

10程度の培養液でも、0.1 L程度の培養液が必要となる。秤量が正確であれば、1/10程度の量でも測定可能であるが精度が落ちる。細胞の洗浄には、超純水もしくは脱イオン水を用いることが多いが、浸透圧差により細胞内成分が溶出していないことを確認する必要がある。細胞内成分の溶出は、細胞がバーストしていないことを顕微鏡で確認すればよいが、筆者らの経験では後述の濁度法との比例定数が0.2–0.4程度になっていれば、問題ないことが多い。細胞成分の溶出が疑われる場合は、浸透圧を調整した緩衝液を使用しても良い。洗浄操作は遠心分離で細胞を回収し、洗浄液で再懸濁した後、再び遠心分離で細胞を回収する操作を2回程度繰り返せばよい。油など、疎水性基質を含む培地の場合は、酢酸エチル相などで油を抽出後、アルコールで溶媒相を水相と混合した後、遠心分離で細胞を回収することで洗浄操作を行える⁴⁾。

細胞の乾燥と秤量 細胞の乾燥時間は容器の形状や液量によって変化するが、十分な開口がある容器であれば、110°C、3時間程度で乾燥することが多い。乾燥時間を変えて複数回測定し、恒量に達しているか確認することをお勧めする。乾燥時間が長すぎると炭化がおこり、重量が増加することがあるので注意する必要がある。乾燥後は乾燥材（シリカゲル・五酸化リンなど）を入れたデシケーターで冷まし、吸湿を防ぐとよい。室温に戻して秤量する。

3. 濁度法

生物工学分野では、より迅速に細胞濃度を知るために、分光吸光度計で濁度を測定することが多い。この方法は片側から光をあて、サンプルを透過した光を反対側の受光素子で検出する方法である。装置が安価であり、簡便なため、多用されている。希薄溶液中で粒径がほぼ一定の場合に吸収と同じく式1に示すように懸濁物質量と測定値がほぼ比例する領域のみで正確な測定が可能である。

入射光強度 I_0 、透過光強度 I 、細胞濃度 C (g/L) とすると、ランベルトベールの式と同様に、

$$E(\text{濁度}) = \log \frac{I_0}{I} = KC \quad (\text{式1})$$

の関係がある(式1)。 K は測定条件における比例定数である。この関係は低濃度の場合のみ成り立つので、図1のように希釈系列を作成し、細胞濃度と濁度が比例関係にある領域で測定できていることを確認しておく必要がある。

一般的な分光光度計はサンプルを入れるキュベットと受光部が離れているため、透過光は散乱のみならず、屈折の影響も受ける。サンプルと受光部の距離により、測

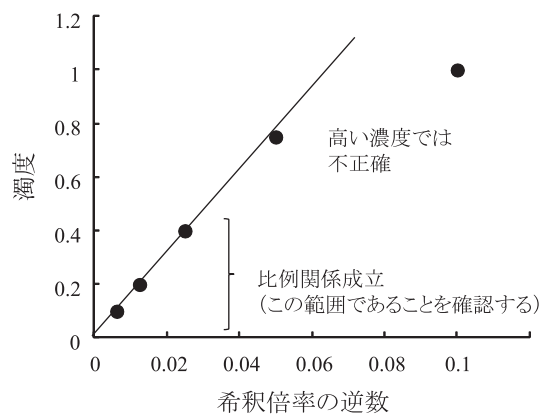


図1. 希釈倍率と濁度の関係

表2. 濁度法でよく使用される波長

波長 (nm)	適用
600	酵母(酵母様真菌)・細菌など
660	大腸菌・細菌など
730	シアノバクテリア・微細藻類など

定値が影響する。すなわち、簡易測定による濁度値は使用する分光光度計に依存することに注意されたい。電圧自動制御フォトマル(光電子増倍管)タイプの検出器の場合、濃厚な培養液を測定すると正確な測定値が得られないだけでなく、過電圧による検出器の損傷の危険があるので注意すべきである。

波長選択 測定波長は光の散乱特性から波長が短いほど感度がある傾向があるが、培地成分の吸収の影響も大きくなることから、600や660 nmが選択されることが多い。葉緑素を含む光合成微生物では、クロロフィルの吸収帯を避けるため、730 nmが選択されることが多い(表2)。初めて扱う微生物の場合、同種の微生物や近縁の微生物の研究例からの波長が使用されることが多いか調査するとよい。

測定 培地の吸収がバックグラウンドとなるため、培地のみをあらかじめ測定しておくといふ。希薄なサンプルはそのままキュベットに入れて測定する。リニアレンジがわからないサンプルは数倍程度までの希釈系列を作成し、濁度と希釈倍率が比例関係にあることを確認する。濃厚なサンプルは水もしくは培地で希釈して、リニアレンジ内で測定する。

検量線 使用する装置や条件で濁度と細胞量が比例している必要がある。比例関係を求めるためには、対数増殖後期の細胞を使用して、希釈系列を作成し、細胞濃度が異なるサンプルを準備する。サンプルの濁度と乾燥菌体重量を測定し、プロットするとよい(図2)。濁度と

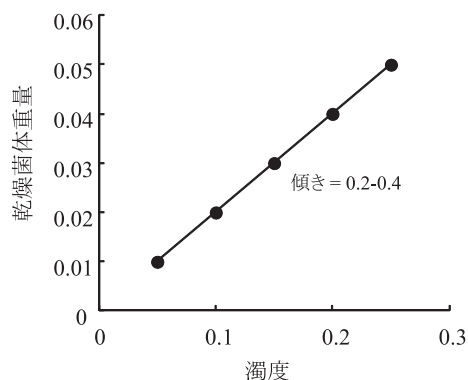


図2. 濁度から乾燥菌体重量を求めるための検量線

検量線の傾きの積が乾燥重量となる。濁度法で測定したデータをもとに、細胞増殖を定量的に議論する場合、培養条件や状態が異なるサンプルをいくつか測定し、検量線の傾きが同等と判断できる範囲を調査しておくべきである。培養条件検討を行う場合、最初にこのような検量線を作成し、濁度を測定して菌体量を推定する方法がとられることが多いが、培養条件により細胞の形状や大きさが変化していないかをチェックするため、時々、乾燥菌体重量と濁度の関係をチェックするくらいの慎重さを身につけたいところである。

4. コロニーカウンティング

コロニーカウンティング法は寒天培地上に出現する微生物コロニーが1細胞に由来していると仮定して、コロニーを計数することで、培養液中の生菌数を推定する方法である。前述の方法は生菌と死菌を判別せずにバイオマス量を測定する方法に対して、コロニーカウンティング法は寒天培地中にコロニーを形成する能力を保持している活性のある細胞数を計数する点で異なる。懸濁物などが混入しているサンプル中の生菌数を推定することも可能である反面、培養を介するため、時間がかかることが欠点である。また、多くの場合、多段階の希釈操作を介するため、熟練しなければ測定誤差が大きくなりやすい傾向がある。寒天培地は使用する微生物が十分生育できる培地であればよいが、培養時間を短くするためにはリッチな培地が好ましい。バクテリアの場合、nutrient brothやLuria-Bertani (LB) 培地が使用され、酵母の場合、イーストペプトンデキストロース (YPD) 培地やイーストモルト (YM) 培地、ポテトデキストロース培地が使用されることが多い。コロニー数と生菌数が比例関係になる範囲はおおよそ500個以下の範囲である。寒天プレート上に50～300程度のコロニーが現われるように希釈すると精度よく生菌数を推定できる。濃度未知のサ

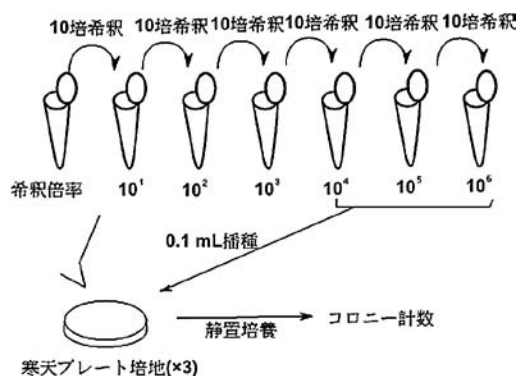


図3. コロニーカウンティング法の概略図

ンプルの場合、良好な条件を正確に推定できないので、図3のように10倍ずつの希釈系列を作成し、複数の希釈段階のサンプルを播種することが多い。

希釈時にピペッターのチップを交換しない場合、希釈時の細胞懸濁が十分でない場合は、大きな実験誤差につながることが多い。毎回の希釈操作で新しいチップを使用すること、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌することが重要である。

一般的に生菌数は元の培養液1 mLあたりのコロニー数をコロニーフォーミングユニット (cfu) として表す。cfuの単位はcolonies/mLで表す。顕微鏡下で計数した細胞数と得られるコロニーの数は必ずしも一致しない。コロニーを形成する細胞数として評価されるため、cellsではなくcoloniesを単位としている。

5. 比増殖速度の求め方

細胞の比増殖速度は、培養条件や培養法を検討する際や細胞の増殖ポテンシャルを推定する上で非常に重要なパラメーターとなる。細胞分裂で増殖する微生物や培養細胞は良好な条件では2倍、4倍、8倍と細胞数を増やしていく。そのため、増殖の速度（一定時間あたりの増殖量）は一定ではなく時間とともに変化してしまう。そのため増殖速度を定量的に表す場合、比速度を考慮する機会が多い。比増殖速度は増殖速度を菌体量で除した値に相当する。前述の細胞濃度の測定結果に基づいて、実験的に比増殖速度を求める場合、前提となる比増殖速度の考え方を理解して取り扱うことが望ましい。

増殖速度式 培養条件が一定と見なせる場合、比増殖速度と菌体量が比例関係にあることを考慮し、菌体量を X (g/L)、比増殖速度を μ (h^{-1})、時間を t (h) と表すと式2-1に示す微分方程式を導くことができる。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{式2-1})$$

表3. 計算方法による推定値の違い

時間 t (h)	誤差0%		誤差±20%	
	濁度	μ (h^{-1})*	濁度	μ (h^{-1})*
0	0.0200	—	0.0202	—
3	0.0364	0.200	0.0310	0.142
6	0.0664	0.200	0.0689	0.204
9	0.1210	0.200	0.1071	0.185
12	0.2205	0.200	0.2359	0.205
15	0.4017	0.200	0.3907	0.197
18	0.7320	0.200	0.8207	0.206
20	1.0920	0.200	1.0920	0.200

*初期条件 (t_0) ならびに測定時間 (t) の2点のデータから算出

式2-1は変数分離形の微分方程式なので、簡単に式2-2に変形できる。さらに初期菌体量を X_0 とすると式2-3が導出できる。

$$\frac{1}{X} dX = \mu dt \quad (\text{式2-2})$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (\text{式2-3})$$

(ここで \ln は \log_e を表す)

式2-3は式2-4の形でも表せるので、培養条件が一定の範囲内では指数的に増加することがわかる。細胞が2倍になるために必要な時間を倍加時間 t_d は式2-3に $X/X_0 = 2$ となるときなので、式2-5、式2-6で表すことができる。

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{式2-4})$$

$$\ln 2 = \mu t_d \quad (\text{式2-5})$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{式2-6})$$

実験的な推定方法 上記のごとく、理論上は異なる時間の2点の菌体量が推定できれば、比増殖速度を求めることができるはずである。しかしながら、2点のデータから比増殖速度を求めた場合、菌体量の推定誤差の影響を大きく受けるために精度の高い推定値を算出することは困難である。表3に初期菌体濃度0.02、比増殖速度 0.2 h^{-1} の場合の計算に基づく濁度変化とコンピューター上で乱数を用いて算出した、最大±20%の実験誤差を含む濁度変化を示している。誤差±20%のデータを用いて、初期条件 (t_0) と測定時間 (t) の2点のデータから計算した比増殖速度を算出したところ、±20%の実験誤差を含むデータでは、実験誤差の影響を強く受けるため2点で計算した場合、精度が非常に低いことがわかる。

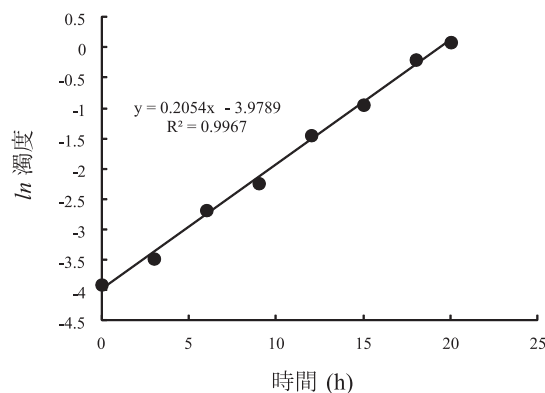


図4. 実験データからの比増殖速度の推定方法. 図中の式は最小二乗法で推定した関係式を示す. R^2 は決定係数 (相関係数の二乗) を示す.

そこで対数増殖している培養液を経時的にサンプリングし複数のデータを基に比増殖速度を推定する。式2-3は菌体量 X の対数値が時間に比例し、その比例定数が比増殖速度 μ (h^{-1}) に対応することを表している。つまり、培養時間を横軸、菌体量の対数値を縦軸として、散布図にプロットし、その傾きを、最小二乗法により計算すればよい (図4)。ここで、菌体量の単位については最終的に除されるため、どのような測定値を使用してもよく、濁度データをそのまま使用してもよい。表3の例を計算すると、 μ は 0.205 h^{-1} となり、推定誤差は2.5%程度に抑えることができることがわかる。

このグラフが直線で得られない場合は、対象の細胞は指数増殖しておらず、培養期間中に何らかの制限因子が存在することを意味している。制限因子が存在する培養においては、採用するデータにより、計算結果に大きな影響を与えるので、より慎重な解析が必要となる。

6. おわりに

筆者らは主にバイオプロセスに関する研究に携わっているが、細胞濃度測定や比増殖速度の取扱いについて、正しく取り扱われていない例を目にすることがある。基本に立ち戻り、これらについて正しく取り扱っているか再考する機会にいただければ幸いである。

文 献

- 1) 生物工学会編：生物工学実験書 改訂版, p. 93, 培風館 (2002).
- 2) 片倉啓雄ら：有用微生物培養のイロハ, p. 83, NTS出版 (2014).
- 3) Makino, S. and Cheun, H.: *J. Microbiol. Methods.*, **53**, 141 (2003).
- 4) Konishi, M. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 702 (2011).