

PCR チューブをセルに用いた簡易比色計による 分裂酵母培養液の濁度測定と有用性について

大倉 未奈子・竹澤 有美・尼子 克己

仁愛大学人間生活学部

Turbidity Measurement of Fission Yeast Culture Solution With a Simple Colorimeter Using PCR Tubes as a Cuvette Tubes, and its Usefulness.

Minako OHKURA, Yumi TAKEZAWA and Katsumi AMAKO

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jin-Ai University

PCR チューブをセルとして用いるポリジメチルシロキサン光学系の比色計 (Picoscope®) を用いて、分裂酵母培養液の濁度測定を行った。Picoscope® は他の簡易比色計や紫外可視分光光度計と比べ、細胞濃度が低いときには理論値より低い吸光度を示したが、細胞濃度が高いときには良好な直線性を示した。双方が直線性を示す領域はクロスオーバーしており、併用することにより希釈操作を伴うことなく培養液中の細胞濃度を求められることが示された。本測定系が他の濁度測定系に対して持つ優位性と限界について考察した。

キーワード：比色計 細胞計数 ランベルト・ベールの法則

細胞計数は、個体の健康状態の確認や細胞内成分の定性的・定量的分析に用いられるなど生命科学分野において最もルーティンな実験操作のひとつである。高等動物の血液中に含まれる各種血球の分布状況は極めて有用な情報であり、臨床の現場では自動血球計数器やフローサイトメーターなど全自動測定装置が用いられるようになっている。用手的には血球計算盤等を用いた顕微鏡観察が、初歩的であるが直接的な方法として主に実験室レベルで行われている。食品衛生学の分野では、微生物を含む各種溶液の一部を寒天培地に塗布し、培養後に形成されたコロニー数を以て塗布時の生細胞数とみなす「コロニーカウンティング」が、基本的手技として用いられている。

直接計数でなくとも、細胞数を反映する様々な指標を用いて間接的に細胞数を測定する方法が考案され、実際に利用されている (小西・堀内 2015)。乾燥菌体重量は大量培養を伴う微生物実験で菌体量の指標とされる。細胞を電解質が含まれる油滴とみなし、そのコンダクタンスから細胞濃度を測定する方法はリアルタ

イムでの細胞計数に利用される。生体エネルギー代謝の中心化合物である NAD(P)^+ 量を反映したホルマゼン生成は、迅速に生細胞を検出する方法として活用されている。細胞抽出液を用いたリアルタイム PCR による DNA 検出は、感染症の診断や環境サンプル中のメタゲノムなど、種特異的検出に威力を発揮し、デジタル PCR の開発によって定量精度を増している。

このように数多くの細胞計数法が実用されているが、生化学・微生物学分野ではその簡便さ、迅速さから可視分光光度計や比色計で濁度を測定することが極めて多い。濁度測定はセルや試験管の片側から光を当て、試料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。希薄溶液中で粒径がほぼ一定の場合に限れば、入射光強度 I_0 、透過光強度 I 、細胞濃度 C (cells/mL) の間に吸収におけるランベルト・ベールの法則と同様の関係が成立する。

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

大腸菌では 660 nm, 酵母では 600 nm, シアノバクテリア等の光合成微生物ではクロロフィルによる吸光帯を避けるため 730 nm が, 測定波長としてそれぞれ用いられることが多い. A は細胞の種類や状態, 使用機器などによって決まる比例定数である. 実際には, 自身が用いる菌株を液体培養する際に何らかの直接計数法と濁度測定を同時に行うことで, 自分の実験系における A を求め, E と C の間に成立する比例関係を用いて細胞濃度を求めることになる.

本研究ではポリジメチルシロキサンを用いた光学系 (PDMS-based system) (Nomada *et al.* 2016) による簡易比色計: Picoscope[®] を分裂酵母培養液の濁度測定に適用した. 本機は PCR チューブをセルとして用い, 30 μ L という微量測定が可能というユニークな性質を持つ. その有用性について他の分光計 (従来型の比色計および紫外可視分光光度計) と比較した.

材料と方法

菌株および試料調製 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* PR109 株を用いた. 培地には YES 培地 (3% D-glucose, 0.5% Yeast extract, 200 mg/L adenine sulfate, 200 g/mL, Uracil, 200 mg/L Histidine, 200 mg/L Leucine, 200 mg/L Lysine) を用いた (Hagan 2016). 200 mL 容の三角フラスコに入れた 40 mL の滅菌済み YES 培地に PR109 株を植菌し, 振とう培養器 (TAITEC BR-15LF) で 30°C, 130 rpm で定常期まで 2 日間振とう培養した. この培養液を, 同日に調製した YES 培地で 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 および 200 倍に段階的に希釈した培養液を各 5 mL 調製し, 測定に供した.

測定装置および器具 PDMS-based system 比色計として Picoscope[®] (ウシオ電機) を用いた. セルには 200 μ L 容フラットキャップ型 PCR チューブ (Watson- 深江化成 137-211C) を用いた. 専用制御ソフトウェア PAS-110 は Nexus 7 (2013) (Google) 上の Android 5.0 で機器本体と Bluetooth 接続して操作した. LED 光源は利用できる R, G, B の三色のうち R (波長域 575-660 nm, 最大感度波長 615 nm) を用いた. AS-110 は検量線作成後測定値が吸光度で表示されるように設計されているが, 今回の実験では

検量線作成画面上に 16bit (0 ~ 65535) で表示される透過光量を読み取り, Microsoft Excel 2013 上で (式 1) に従って濁度を求めた. LED 出力と時定数は設定で変更可能であるが, 特に記載しない限り, セルを装着していない状態での表示値が 60000 以下となるコンディションに限って測定を実施した. ブランクは植菌されていない YES 培地でとった. 従来型の簡易比色計 (Colorimeter) として, Colourwave CO7500 (WPA, filter=595 nm) を用い, パイレックスガラス試験管 (13 mm Φ) をセルとして用いた. 紫外可視分光光度計 (Spectrophotometer) として Genesis 10S (Thermo- fisher Scientific, λ =600 nm) を用い, プラスチックキュベットをセルとして用いた.

結果

三種の測定装置による結果比較 同一試料を用いて A; PDMS-based system (Picoscope[®]), B; 簡易比色計 (Colorimeter), C; 紫外可視分光光度計 (Spectrophotometer) で濁度測定した. それぞれの結果を図に示す. 図中の Adjusted OD₆₀₀ は, C の紫外可視分光光度計 (光路長 = 1 cm) において OD₆₀₀ が 0.1 から 1.0 の範囲に収まるよう培養液を希釈したときの測定結果から換算した理論上の OD であり, 縦軸の値は希釈なしに試料を測定したときに各機器が示した測定値である. A の Picoscope[®] では, 濁度の低いところではズレが大きいものの, 一般の分光光度計が苦手とする Adjusted OD₆₀₀ \geq 1.0 以上の領域において, 少なくとも 5.0 付近まで理論的濁度と極めて良好な相関を示した. この結果は, 濁度測定そのものがさほど強い波長依存性を示さないことと, PCR チューブを用いることで測定時の光路長が短いこと, 用いたチューブの製造精度が思いの外高いことが影響していると考えられる. 一方試験管を挿入する B の Colorimeter, プラスチックキュベットを用いた C の Spectrophotometer ではいずれも, $0.05 \leq$ Adjusted OD₆₀₀ \leq 1.0, では良好な直線性を示したものの, それを超えると希釈なしでは吸光度が見かけ上低くなった.

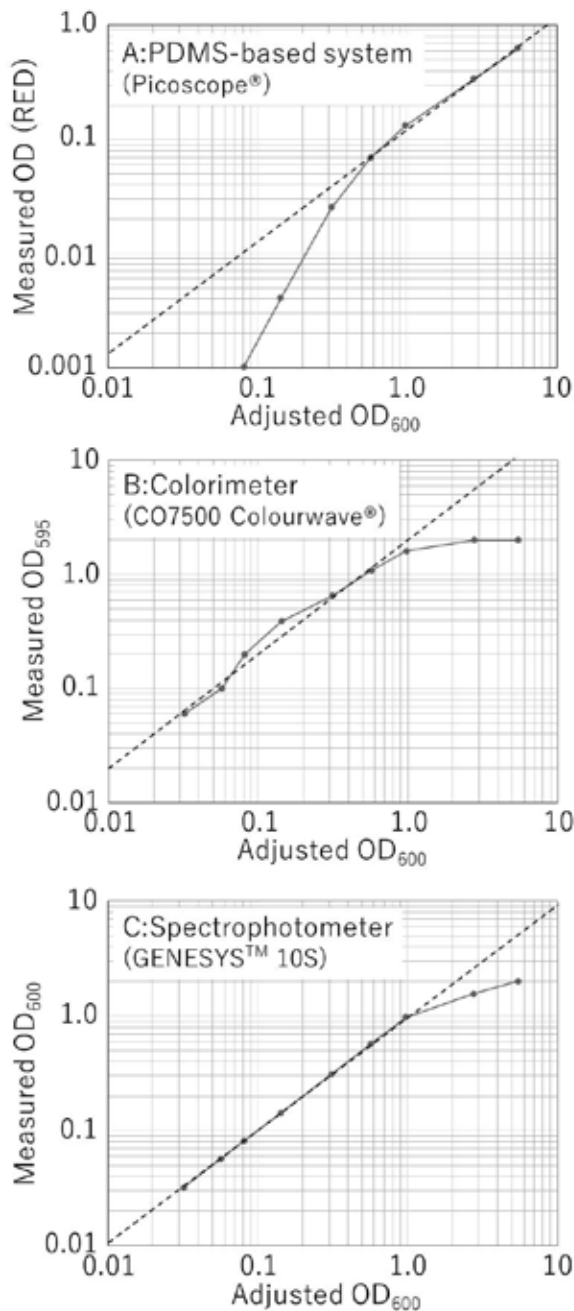


図 三種の測定装置による分裂酵母濁度測定の結果の比較. Aの測定は、LED 強度 = 50%，時定数 = 10 msで行った。

考察

教科書ならびに各種実験書では、ランベルト・ベールの法則に「希薄溶液についてのみ成立する」という注釈が付されている。実際、濃厚溶液あるいは極めて細胞濃度の高い培養液を順次希釈した溶液を調製し測定すると、高濃度領域では比例関係が成立せず、機器によっては Error が表示される。これを根拠に、生化学実験では必ず「検量線の式は検量範囲でのみ使いな

さい。」と学生に指示する。しかしながら、ランベルト・ベールの法則においては「分子間相互作用」や「化学平衡の位置の変動」といった化学の問題を根拠にその限界を示しているが、実際には分光光度計における測光の限界が濃度と吸光度の比例関係を損なう原因となっている。すなわち、吸光度が光源から光電子増倍管に届く光子の割合を常用対数にして計算される以上、吸光度が 1 なら検出部に届く光子量が 10 分の 1、2 なら 100 分の 1 となり、測光誤差、特に迷光の影響を強く受けるために吸光度としての精度を確保できないため、比例関係が損なわれるのである（逆に 0.1 を割るような低い吸光度では相対誤差が大きくなるという問題については、成書には併記されている（Day and Underwood 1980）ものの案外理解されていない）。従って、濃厚溶液であっても測定機器における原理上の問題を何らかの方法、例えば光路長を短くすることによって取り除くことができれば、従来測定できないとされた濃厚溶液であってもランベルト・ベールの法則に従う分光学的特性が得られる可能性がある。濁度は散乱を基にした測定であるが、細胞の凝集などが起こらなければ同様の議論が可能である。先行研究として大腸菌培養液での報告（Takahashi 2016）があるが、細胞サイズが長さ、直径ともに大腸菌の 4～5 倍の分裂酵母を用いて、本実験を実施した。

PDMS-based system による濁度測定では、濃厚な細胞懸濁液でも実用範囲で希釈操作なしに問題なくデータ取得が可能であることが明確に示された。同一試料を三本の独立した PCR チューブで繰り返し測定した際の表示値（透過光量）のばらつきは概ね 1% 以内（データ示さず）であり、円錐状という光学的に不利な形状であっても十分な精度を維持していた。低濃度の細胞懸濁液では濁度の直線性は失われているが、 $OD=0.1$ における透過率は $e^{-0.1}=0.9905$ となり、ブランクに比して僅か 1% の減衰を観察することになる。これが困難なことは前述したチューブ間のばらつきを考慮すれば明らかであろう。

Colorimeter および Spectrophotometer におけるプロファイルは、全般的に直線性において Spectrophotometer が優れていたが Adjusted $OD_{600} \geq$

1.0 ではいずれも直線から外れる結果となった。Colorimeter では円筒状の試験管がセルとして用いられ、試験管間で形状にややばらつきのあることが全体的な直線性を損なう原因になったと考えられる。Spectrophotometer の $OD_{600} \geq 1.0$ での成績は一般的な吸収測定時の成績に比べ不良であるが、これは例えばセルと光源、あるいはセルと検出部の距離が比較的長いという当該機種構造が影響しているのかもしれない。しかし、PDMS-based system と他の測定機器は Adjusted $OD_{600}=1.0$ 付近を境に互いにオーバーラップした直線性を示すことから、双方を併用することで広い範囲で十分な精度の濁度測定が可能である。実験室では試験管、あるいは三角フラスコに試験管を溶接した培養器具を装備しているが、Colorimeter での測定に必要最低限の培地量 (3 mL) があれば、培養初期は Colorimeter、後期および回収機には 30 μ L を採取して PDMS-based system で測定を行うことにより、途中での試料損失を考慮せずに回収が可能である。分裂酵母でも出芽酵母でも $OD_{600} = 0.3 \sim 0.35$ のとき概ね 1.0×10^7 個/mL であり (山本 1991)、厳密には個別の測定が必要であるが細胞の概数を把握することが可能である。また酵母細胞の場合湿重量の三分の二を内容液が占めるという既報 (Gancedo and Gancedo 1973) の数値を参考にすれば、抽出液中の測定試料の濃度を細胞内のモル濃度に変換して議論する (Amako et al. 2006) ことも十分に可能である。

今回用いなかった他の汎用分光計との実用度の比較においても、PDMS-based system は比較的優位な立場にあると考えられる。Takahashi (2016) は一滴型分光光度計では PDMS-based system に比べて測定値のばらつきが大きくなることを指摘している。マイクロプレートリーダーは例えば、ディープウェルプレートで少量多種類の培養を行った際の濁度測定に用いられるが、プレートに対して垂直方向に測定光を入射するために、ピペッティングによる試料採取時の誤差がそのまま測定誤差に反映されることになる。PDMS-based system の場合、PCR チューブの下部を測定光が通過するため、採取量の誤差は測定値に影響を与えない。実際に採取量を 30, 50, 100 μ L と変化させても測定値に違いは見られなかった (データ示さず)。

ただし簡易比色計としての割り切りから、PDMS-based system に注意を要する点は存在する。それは簡易比色計の光源は単色光ではないという点である。図中に描いた破線から、PDMS-based system での $OD=1.0$ における Adjusted OD_{600} は約 8 であるが、PCR チューブ内の光路長は $1/8 = 0.125$ cm よりずっと長い。これは吸収ピーク以外の波長の光が検出部に届いているからであり、吸収極大波長の光がほぼ完全に遮断されるような濃度域では、1 前後の吸光度を示していたとしても、必然的に濃度-吸光度の関係は直線性を失う。安価で供給されている機器でもあり、濁度測定はもちろん、様々な生化学的測定に使用されつつある (佐藤ら 2016) システムであるが、濁度測定ならば定常期に達した培養液が尚も希釈なしに測定可能な範囲にあるのかを予め検討する、あるいは PCR チューブに培地液を等量加えて再度測定してみる、生化学測定ならばバックグラウンドの吸収にも配慮した検量線を作成するなどの慎重な態度が必要であろう。

参考文献

- 小西正朗・堀内淳一 (2015) 細胞の増殖を捉える一計測法から比速度算出までー 生物学 93: 149-152.
- Nomada H, Morita K, Higuchi H, et al. (2017) Carbon-Polydimethylsiloxane-based integratable optical technology for spectroscopic analysis. *Talanta*. **166**: 428-432.
- Hagan, I. (Ed) (2016) Fission Yeast: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Day, R.A., Jr. and Underwood, A.L. (1980) Qualitative Analysis, Prentice-Hall, Inc.
- Takahashi, Y. (2016) Application of polydimethylsiloxane-based optical system for measuring optical density of microbial culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 2486-2489.
- 山本正幸 (編) (1991) 酵母による遺伝子実験法 (バイオマニュアルシリーズ10), 羊土社.
- Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1973) Concentrations of intermediary metabolites in yeast. *Biochimie* **55**: 205-211.
- Amako, K., Fujida, K., Shimohata, T., Hasegawa, E., Kishimoto, R. and Goda, K. (2006) NAD⁺-specific D-arabinose dehydrogenase and its contribution to erythroascorbic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **580**: 6428-6434.

佐藤香枝, 今泉幸子, 森田金市 (2016) パーソナル吸光度計を用いた鉄イオンおよびタンパク質の定量分析. 分析化学 65: 533-537.

SUMMARY

The turbidity of a fission yeast culture solution was measured with a polydimethylsiloxane (PDMS)-based colorimeter using PCR tubes as cuvette tubes (Picoscope®). When the cell concentration was low, the Picoscope® showed lower absorbance values than theoretical values, as compared with other simple colorimeters and ultraviolet-visible spectrophotometers. However, it showed a good linearity when the cell concentration was high. The ranges in which these methods showed linearity crossed over. Therefore, it was demonstrated that the cell concentration in culture solution could be measured without diluting samples by a combination of these methods. In addition, the superiority and limitation of this measuring system over other methods were examined.

KEYWORDS: colorimeter, cell counting, Lambert-Beer Law.

