

## アプリケーションノート

# 酵母の生存率測定（発酵研究）

### 概要

酵母の増殖および生存率を継続的にモニターすることは、発酵プロセスの管理に非常に重要です。最も一般的な方法は、ASBC血球計数法です。これは、発酵容器からサンプルを採取し、メチレンブルーで染色し、血球計算板を使用して顕微鏡下で手動で測定する方法です。

ASBC血球計数法はよく使われており、非常に少ないサンプル量で測定できることが特長です。ASBC血球計数法で用いられる血球計算板は、顕微鏡下では図1のように使用されます。

血球計算板全体を手動で測定するのは時間がかかるため、実際は板上の一部で測定を行い、その結果を平均して全体の細胞数を算出します。このように、実際に測定する領域が限られるため、作業者の解釈による誤差が25%程度あることが知られています。

細胞数をより正確にカウントし、より多くのサンプル量を測定することによって統計的有意性を向上させ、さらに測定時間および作業者による潜在的な誤差を排除する方法の確立が望まれています。

FlowCamは、このプロセスを自動化するのに非常に有効です。ASBC血球計数法を用いて数十の細胞のみを測定するのに要するのと同じ時間で、FlowCamでは数千の細胞を撮像、測定することができます。また、画像解析ソフトウェアVisualSpreadsheetは、生存率測定、細胞数のカウント結果を自動的に生成します。これにより、作業者による潜在的な誤差が減り、再現性の高い結果が得られます。さらに、FlowCamによって得られたデータは母集団が大きいいため、ASBC血球計数法に比べはるかに高い統計的有意性が得られます。

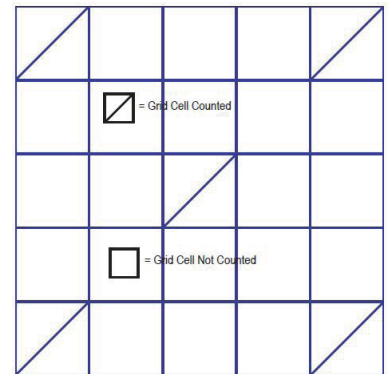


図1. 血球計算板

血球計算板上の複数の領域で細胞を計数し、その平均から全体数を計算します。

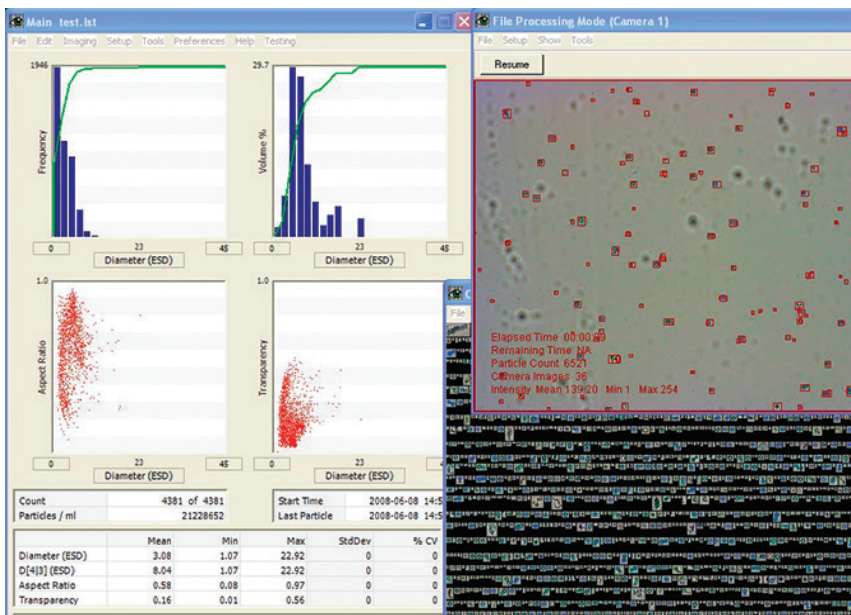


図2. VisualSpreadsheetで生成した生存率測定、細胞数のカウント結果

アプリケーションノート(裏面へ続く)

**YOKOGAWA**



Co-innovating tomorrow™

ライフイノベーション事業本部営業統括部

(0422)-52-5550

✉ [flowcam@cs.jp.yokogawa.com](mailto:flowcam@cs.jp.yokogawa.com)

🌐 [www.yokogawa.co.jp](http://www.yokogawa.co.jp)

## アプリケーションノート

### 酵母の生存率測定（発酵研究）

#### 計測及び解析方法

サンプルを発酵容器から採取し、ASBC血球計数法と同様に、メチレンブルーで染色しました。サンプルをFlowCamにセットし、毎秒7フレームですべての細胞を自動撮像・測定しました。

上記のように、FlowCamは、サンプルを流しながら、自動的に撮像し、個々の細胞を認識・測定・解析することができます。また撮像と同時に、個々の細胞画像に対して最大26の特徴量を出力することができます。

メチレンブルーは死細胞を青く染色します。図3は、血球計算板で細胞を測定する方法を示しています。

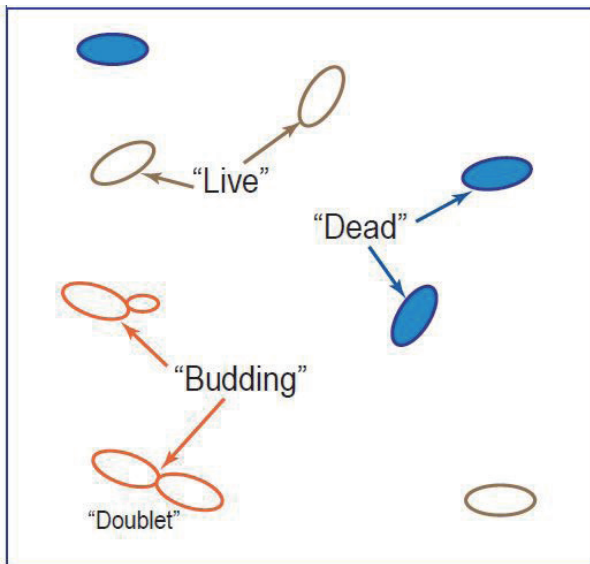


図3. 血球計算板による細胞計測

FlowCamでは、個々の細胞の特徴量 (AverageBlueなど) に基づき、生細胞: "Live" (図.4-b) と死細胞: "Dead" (図.4-c) を簡単に区別することができます。

また、酵母の増殖形態(Budding)は出芽と分裂(Doublet)に分けられます。出芽と分裂はよく似た形態です。FlowCamではこれらの増殖形態をBuddingとして区別することができます。本アプリケーションノートでは増殖形態の細胞(図.4-d)を抽出しています。

#### 解析結果

次ページの画像(図4-a~d)は、FlowCamにおいて生細胞、死細胞、および増殖中の細胞を自動的に分析したものです。

FlowCamによって合計8709個の酵母細胞を35秒で自動的に計測しました。ASBC血球計数法とは異なり、これは推定値ではなく実測値です。

FlowCamを用いて、実測値に基づいた各細胞の状態(生細胞、死細胞、および増殖中の細胞)毎の濃度を自動的に算出しました。

ASBC血球計数法と比較し、FlowCamでは大量の測定値から濃度を計算するため、はるかに統計的に有意なデータとなりました。また、実験者の解釈が排除されるために、FlowCamは高い再現性を示します。

酵母の細胞の状態を分類する条件の設定は、最初に1度行うことによってその後は同様の計測に繰り返し使用することができます。この条件設定は、VisualSpreadsheetで簡単に定義することができ、ユーザは目的の状態の細胞画像をクリックして指定することによって、識別の条件として設定できます。次いで、VisualSpreadsheetは統計的パターン認識を使用して、類似の状態の細胞を検出します。このように、細胞の分類は自動的に行われます。



## アプリケーションノート

### 酵母の生存率測定 (発酵研究)

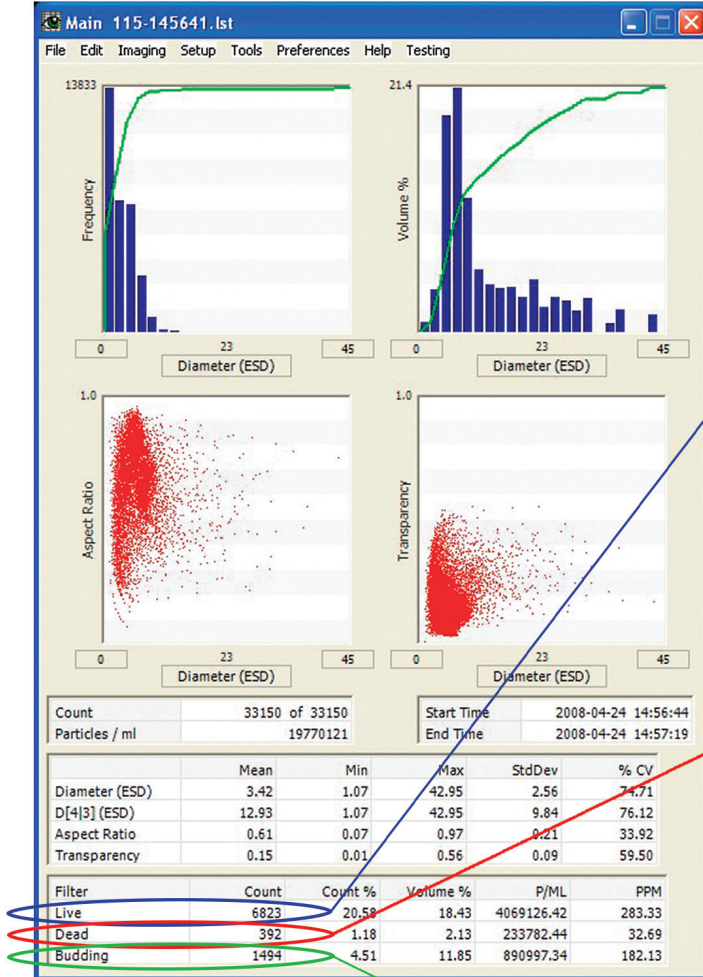


図4-a. FlowCamによって測定された細胞状態毎の測定結果

測定総細胞数: 8709カウント

測定時間: 35秒

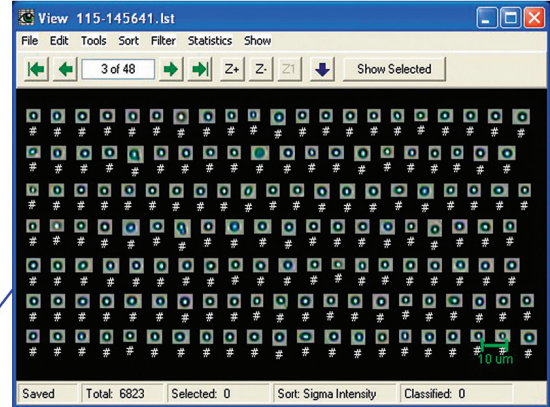


図4-b. 検出生細胞数: 6823カウント

生細胞数: 4.07M セル/mL

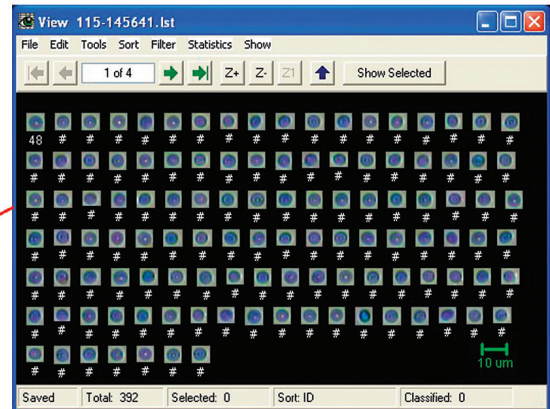


図4-c. 検出死細胞数: 392カウント

死細胞数: 0.23M /mL

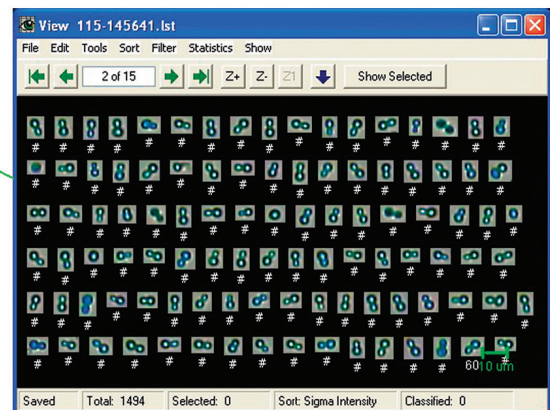


図4-d. 検出増殖細胞数: 1494カウント

増殖細胞数: 0.89M セル/mL