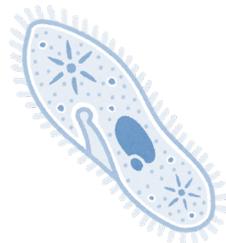
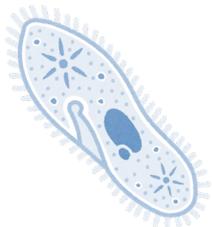
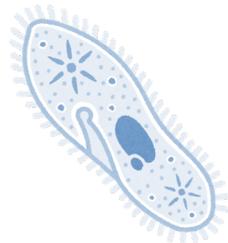
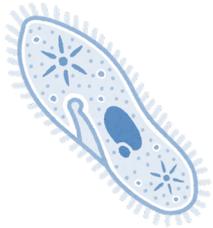
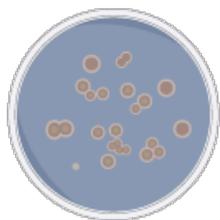


# 吸光度計を用いた ゾウリムシの細胞数測定



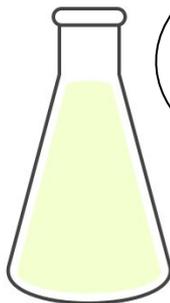
# ゾウリムシの培養方法



バクテリア

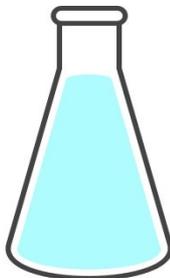


接種

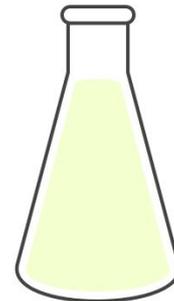


レタス培養液

2日間  
培養



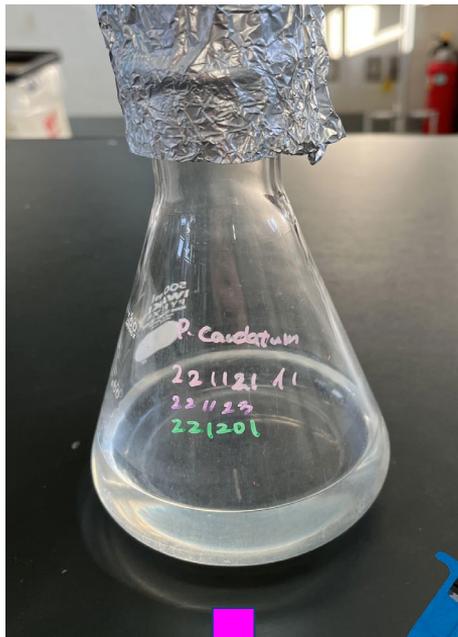
ゾウリムシ懸濁液



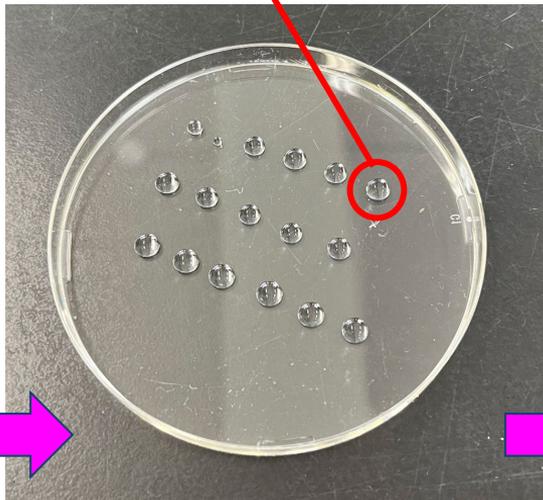
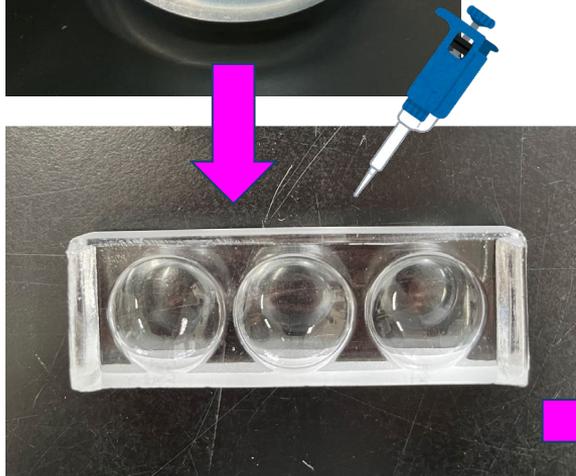
レタス培養液  
+  
ゾウリムシ懸濁液

25°Cで  
3日間培養

\*「ゾウリムシの電気走性」  
<http://www.edu.pref.kagoshima.jp/curriculum/rika/kou/jikken/seibutu/01/page/page06.htm>より画像引用



この一連の操作を  
最低でも3回繰り返す必要  
がある



# 細胞数測定法の課題

- ・従来の方法での測定には**多くの時間**を要す
- ・目視によるカウントの為、**数値のばらつき**がある

→ 正確性を保つためにも**複数回計測**が必要

# 研究の目的

培養液中のゾウリムシの数を濁度として捉え、  
濁度から細胞数を求めることはできないか

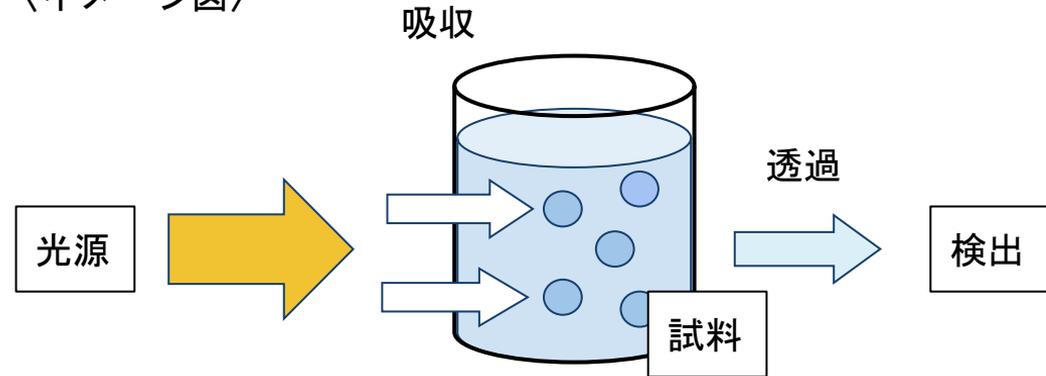


# 吸光光度計について

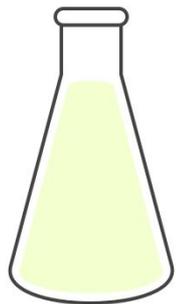


試料に光を当て、吸収した光(吸光度)から分析する機械

〈イメージ図〉

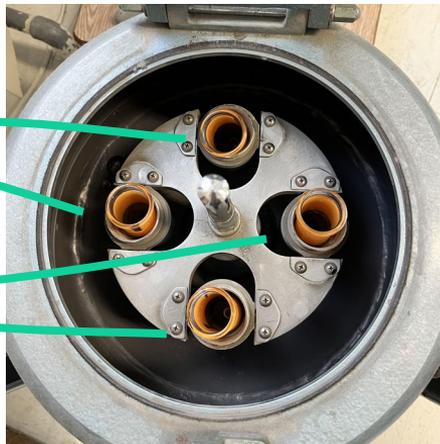


# ゾウリムシの細胞収集



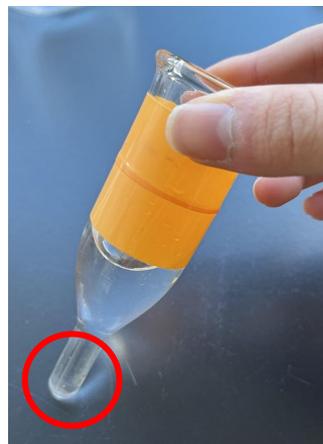
対数増殖期後の  
細胞懸濁液

①



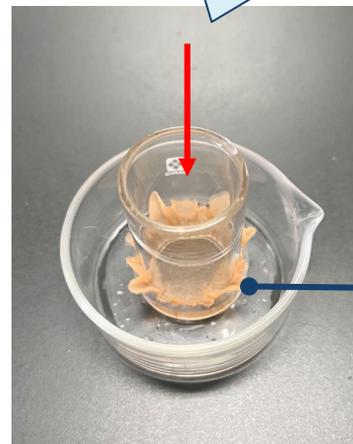
遠心分離機にかける

②



細胞が底に集まる

③



フィルターを通り  
洗浄された  
ゾウリムシが集まる

SMB  
(繊毛虫用生  
理食塩水)

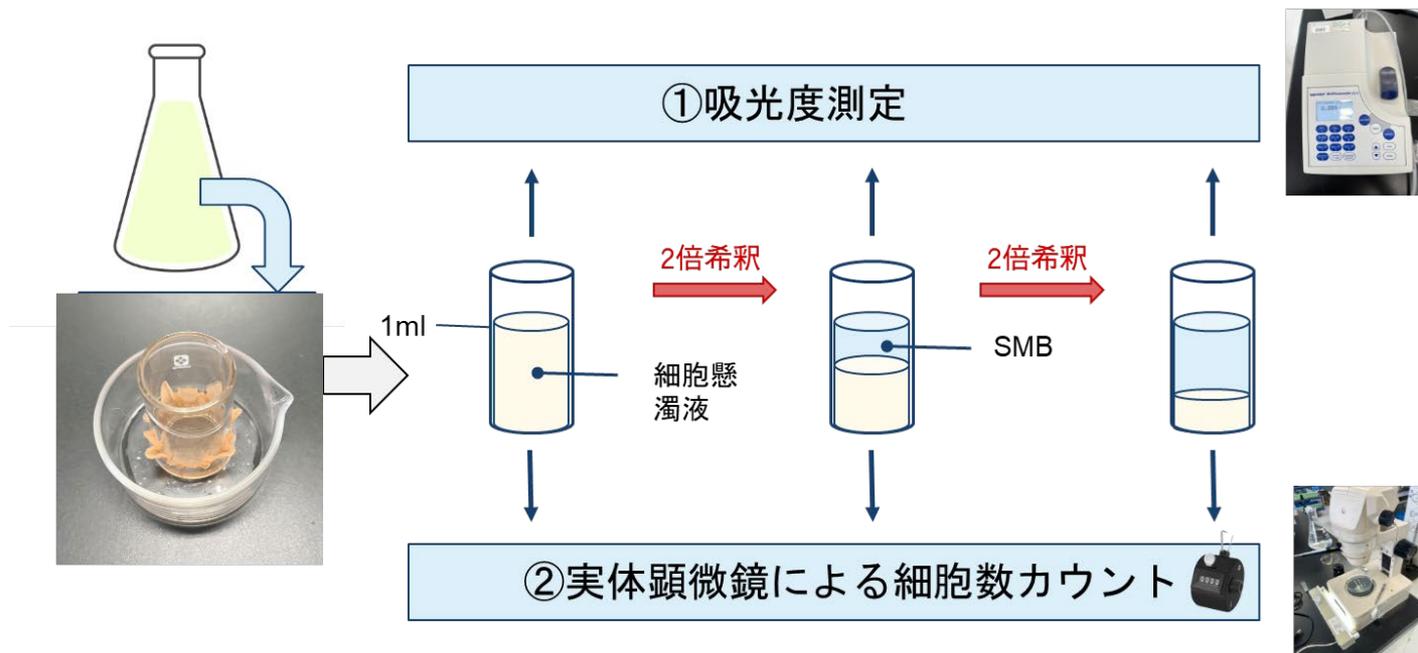
フィルターに通す

# 実験

## 650 nmの波長で検量線は得られるか

**目的** 650 nmの波長で吸光度を調べたときにゾウリムシの細胞数と吸光度の検量線が得られるかを調べる

### 方法



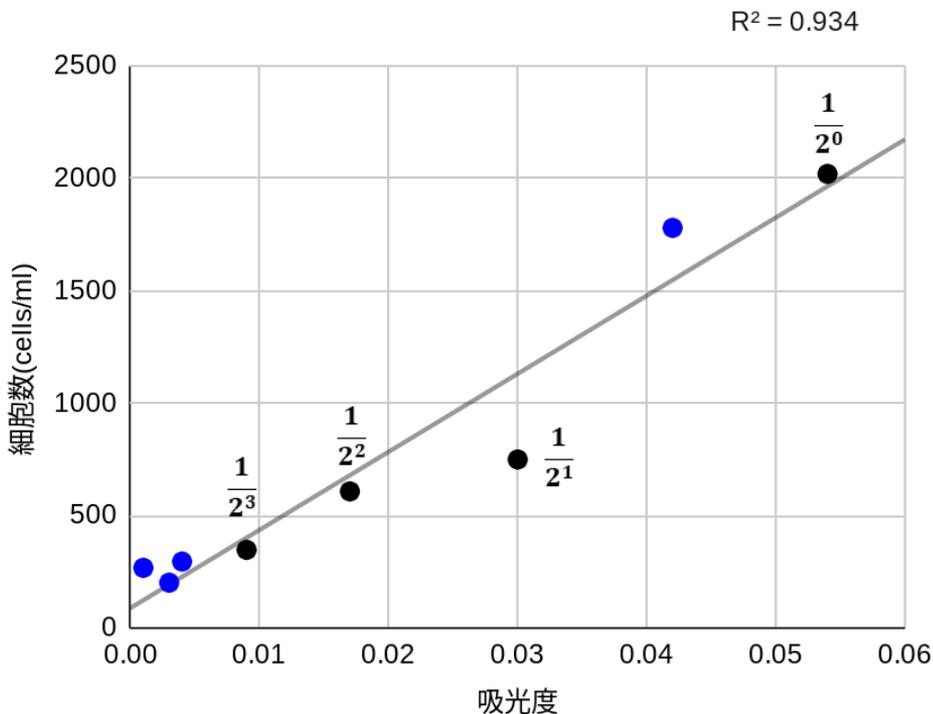


# 結果①

650 nm



## 細胞数と吸光度 650nm



別日に複数の希釈度の細胞懸濁液を用意し、得られたデータをプロットしたもの

- ・ 決定関数  $R^2=0.934$
- ・ 相関係数  $R = 0.966$

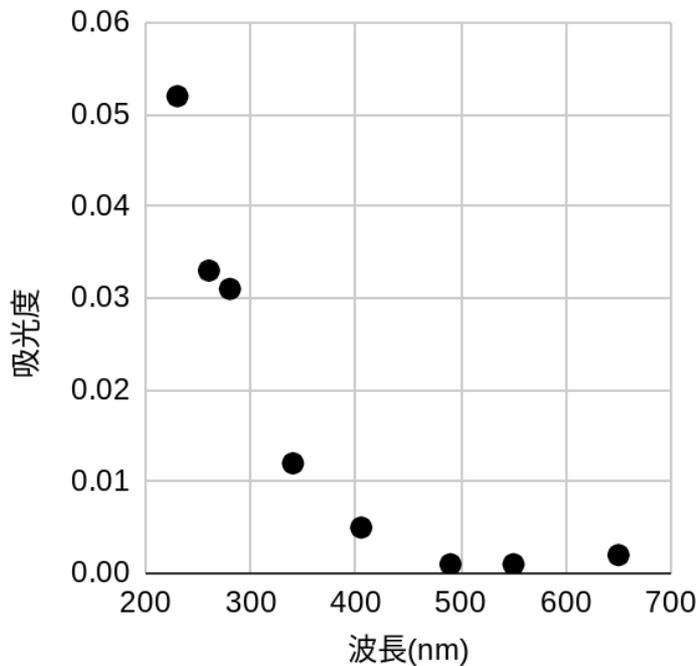
〈回帰直線の式〉  
 $y=33436x+89$



# 波長ごとの吸光度

どの波長が一番吸収するか

波長による吸光度

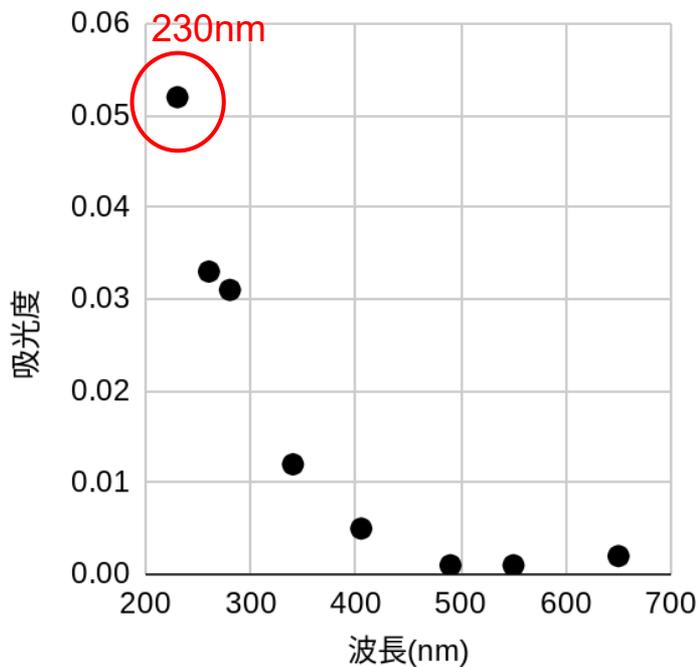


高密度にしたゾウリムシ懸濁液の  
1/20の濃度(300 cells/ml以下相当)  
で調査

# 波長ごとの吸光度

どの波長が一番吸収するか

波長による吸光度



高密度にしたゾウリムシ懸濁液の  
1/20の濃度(300 cells/ml以下相当)  
で調査

230nmの波長で  
一番吸収した





# 考察

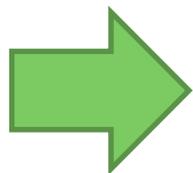
- ① 細胞密度が300 cells/ml以上であれば、  
650 nmの波長での吸光度計による測定が可能

# 考察

- ① 細胞密度が300 cells/ml以上であれば、  
650 nmの波長での吸光度計による測定が可能
- ② 全ての細胞密度において、  
230 nmの波長で測定が可能であることが示唆された。

# 考察

- ① 細胞密度が300 cells/ml以上であれば、  
650 nmの波長での吸光光度計による測定が可能

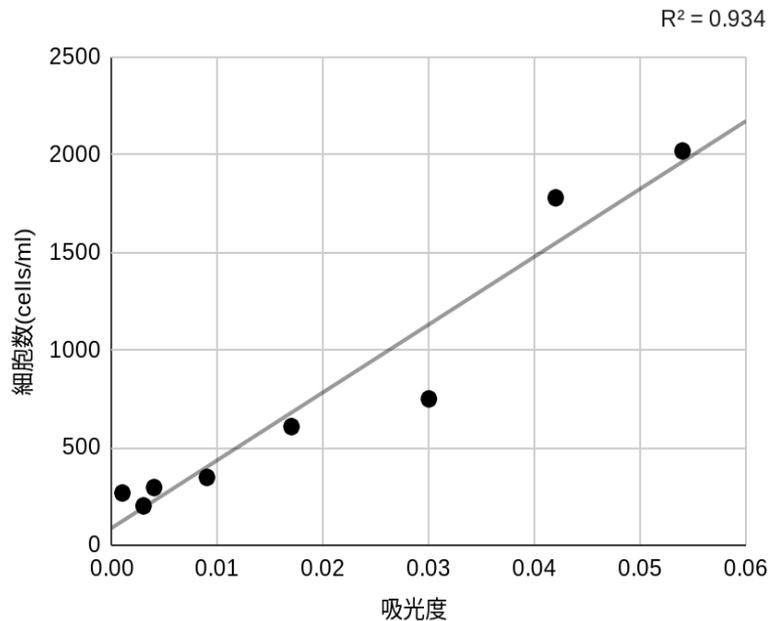


ゾウリムシを高密度に集めて実験に使用する際、  
吸光光度計は、細胞密度の測定に適している。

# 培養したゾウリムシ懸濁液の吸光度が作成したグラフにのるか

※定常期に達したゾウリムシの培養液を利用した

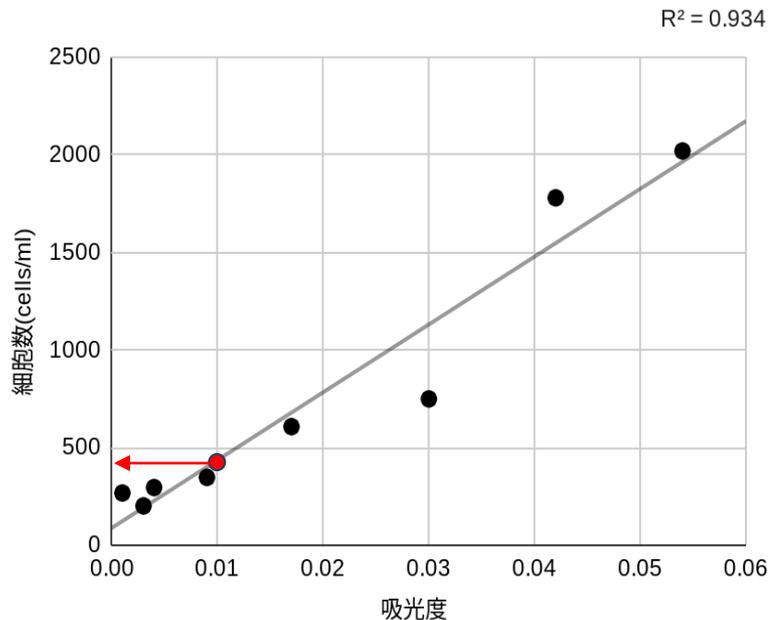
## 細胞数と吸光度 650nm



# 培養したゾウリムシ懸濁液の吸光度が作成したグラフにのるか

※定常期に達したゾウリムシの培養液を利用した

細胞数と吸光度 650nm

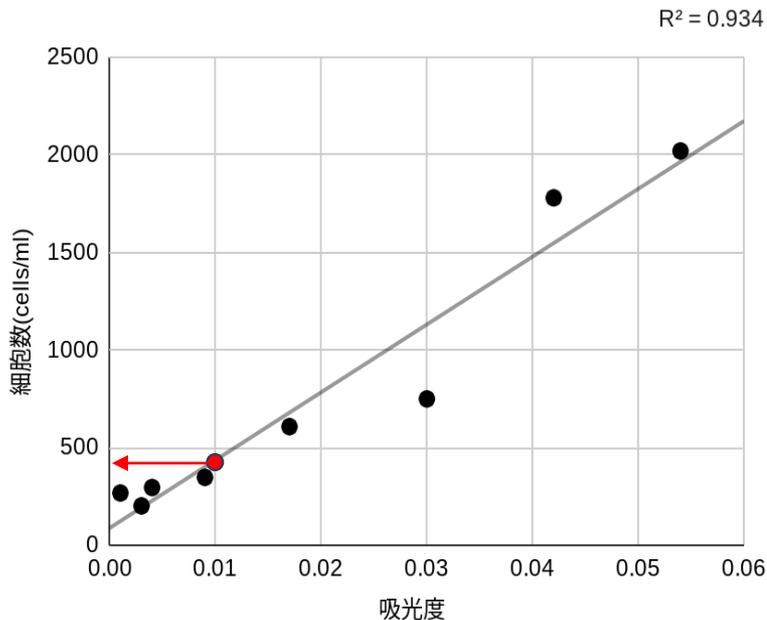


吸光度の値が**0.010**

# 培養したゾウリムシ懸濁液の吸光度が作成したグラフにのるか

※定常期に達したゾウリムシの培養液を利用した

細胞数と吸光度 650nm



吸光度の値が**0.010**



回帰直線  $y = 33436x + 89$  より  
 $x = 0.010$  を代入

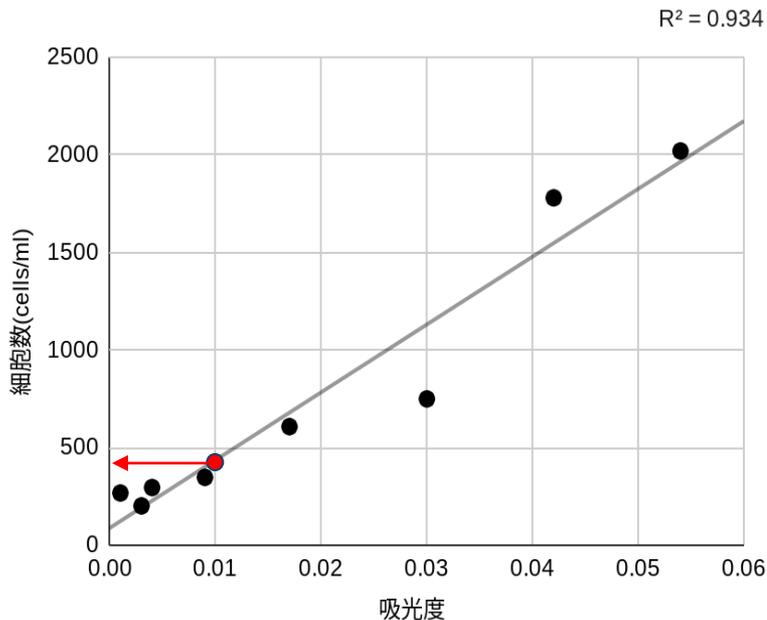


$y = 423.36$  より実際の細胞数は  
**約 423 cells/ml** と予想

# 培養したゾウリムシ懸濁液の吸光度が作成したグラフにのるか

※定常期に達したゾウリムシの培養液を利用した

細胞数と吸光度 650nm



吸光度の値が**0.010**



回帰直線  $y = 33436x + 89$  より  
 $x = 0.010$  を代入

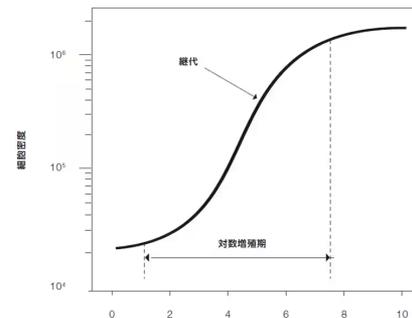


$y = 423.36$  より実際の細胞数は  
**約 423 cells/ml** と予想

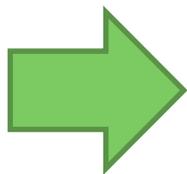


カウントによる細胞数は  
平均 **396 cells/ml** だった

# 今後の展望



- ② 全ての細胞密度において、  
230 nmの吸光度測定による増殖曲線の作成の検討



増殖中のゾウリムシの個体カウントへの利用

# 参考文献

川崎琢真, 清水洋平, 多田匡秀 (2017), 吸光光度計を利用した餌料用微細藻培養密度の簡易推定法, Journal of Fisheries Technology , 9(1), 27–31

[https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/fish\\_tech/9-1/090104.pdf](https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/fish_tech/9-1/090104.pdf)

唐木沢秀之 (2002), 吸光度法を用いたナンノクロロプシスの定量, 深水海研報, 1, 23–26

<https://www.pref.niigata.lg.jp/uploaded/attachment/97868.pdf>

小西正朗, 堀内淳一 (2015), 細胞の増殖を捉える—計算法から比速度算出まで—, 生物工学, 3(93), 149–152

[https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9303/9303\\_yomoyama.pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9303/9303_yomoyama.pdf)