

## Methylene blue 染色法に依る酵母の死細胞 測定 の 再 検 討

金 丸 毅・藤 原 耕 三\*

### Reexamination on Calculation of Dead Yeast Cell by using Methylene Blue Staining Method

Takeshi KANEMARU, Kōzō FUJIWARA

#### 緒 言

酵母細胞の生死を判別するには、培養法により実測する方法が最も確実であるが、これには多くの時間と手数を要し、迅速を要する場合や多数の実験を行なう場合に、これを行なう事は困難である。そこで簡単に酵母の生死を判別する方法として、生活酵母は Methylene blue を還元脱色して染まらないが、死細胞はこの還元力を失なって着色すると云う事実を応用した H. Fink u. R. Kühles<sup>1)</sup> の提案せる方法が用いられている。即ち Methylene blue の 1:5000 溶液と、1/5 N  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.25ml 及び 1/5N  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  99.75ml を混じた磷酸塩緩衝液との等量を混じて pH4.6 の 1:10000 の色素液を作り、この液 1ml と試験すべき酵母懸游液 1ml とを混じてからその 1 滴を Thoma の血球計上にとり、5 分間以内に顕微鏡下で深青色に染った細胞と、そうでない細胞とを算える方法である。しかしながら橋谷<sup>2)</sup> によれば死細胞の Methylene blue による染色は非常に不安定な事実である様であって、H. Fink の方法は合理的に為されていると述べられてはいるが、これとて或程度の誤差を生ずるものと考えられる。加うるにこの方法は測定に当っては結局統計学的方法に依っているものであって、この方面における誤差或は正確度といったものにも少からぬ疑問が持たれる。そこで私達はこれらの問に就いて些か検討してみた。

#### 実 験 及 び 結 果

##### [1] Methylene blue に依る染色度

報文によれば深青色に染ったものを死細胞とする旨記載されている。しかしながら実際測定する場合、全然染まらない細胞と深青色に染った細胞のみが存在するのであれば、その判別は頗る簡単に行なわれるが、事実その中間に位するものが多数存在するのでこの判定は甚だ困難である。そこで私達は予め酵母を水道水にとかし、これを煮沸して完全に死滅せしめた後、このものの染色程度を観察して死細胞の基準となした。死細胞は全体としての染色程度が淡い場合であっても、細胞内物質は完全に染色する様である。しかしその限界に就いては経験が必要であって、検鏡に当っては

\* 大阪大学工学部醸酵工学教室

個々の細胞に良く焦点を合わせ事も重要な事である。

但しこの場合注意を要する事は、酵母懸游液を蒸留水を用いて作った場合、Methylene blue の濃度或は pH の関係等によって、顕微鏡検査の結果染色されていた細胞が新たに増殖したという報告<sup>3)</sup>のある事である。しかもこれに反して死細胞が染色しなかったという記録は全くない。つまり死細胞が染色しないという事は先ず無い様であるが、条件によって生細胞が染色する場合があるという事である。

今、正確度を一応問題外として、染色程度による生死の判別を極端に行なった場合、即ち (1) 深青色に染ったもののみを死細胞とする場合、(2) 青色を呈するものは死細胞と見做す場合、の2つに分けて行った実験の結果は Table 1 に示す通りである。

Table 1.

	A (生細胞 %)	B (生細胞 %)	C (生細胞 %)
深青色のもののみを死細胞とした場合	89.56±1.37	78.33±0.40	66.52±1.13
青色を呈するものは死細胞とした場合	78.31±0.82	73.96±2.95	59.93±1.95
誤差	11.25±2.19	4.37±3.35	6.59±3.08

実験には A. B. C. 夫々異なった試料を使用した。測定には何れの場合にも1回に総数 500 個程度の細胞を算え、これを5回繰返してその平均値をとった。尚何れの結果にも相加平均に標準偏差を附して記した。この場合測定中に約1時間の時間が経過しており、この間に酵母の生理に多少の変化は認められようが、この点に就いては後述する。

Methylene blue に依る染色程度で酵母の生死を判別する場合、甚だしきは 10%以上の誤差を生ずる。

## [2] 測定に要する時間の問題

酵母の Methylene blue に依る染色は一般に時間の経過と共に増大する様である。即ち Methylene blue 液を加えてからの時間が長くなれば、染色細胞は増加する。そこで H. Fink の方法では、測定時間は酵母懸游液に色素液を混じてから、einige minuten 以内と限定している。これを橋谷は5分間と訳している。この5分間以内に顕微鏡下で測定し得る細胞数を求めてみた所、私達の経験では最高 600~500個、普通には 550個前後である。従って検鏡の際の色々な操作に時間を要する事もあるから、それらを予期して正確に5分間以内に測定し得る細胞数は、一応 500個とすべきである。尚 Methylene blue に依る染色は時間と共に増加するものであるから、厳密にはこの5分間にも、最初の1分間と最後の1分間に算える細胞の染色程度は、多少相異なるものと思われるが、この点に就いては常に1回の測定に 500 個程度の細胞を算える事とすれば、各測定に要する時間は大体一定し得るから、全体とし誤差は無視し得ると考える。従って測定時間の問題は、結局常に一定の調子で細胞を算えるとすれば試料の稀釈度に依存する。

## 〔3〕 H. Fink の方法に依る測定値の精度

以上は H. Fink の方法の実験操作に就いての検討であるが、次に、では果してこの方法に依って得られた結果が、どの程度の精度を有するかという問題が起る。これに就いては次の実験を行なった。

Methylene blue 染色法に依る測定値の精度を求めるに当っては、絶対的に正確な生細胞%の判った試料が必要であるが、これを得ることが困難で、従って一応の基準として次の如くした。予め Methylene blue 染色法に依り、比較的生存率の高い酵母試料の生細胞%を測定し、この試料の 10.0000g を秤量する。別に同一の試料の 10.0000g を秤量して、これを適量の水道水にとかし 20分間煮沸して完全に死滅せしめた後、この酵母懸游液を 30°C 以下に冷却して、これに先に秤量した 10.0000g の酵母を加えてよく混和せしめ、この混和した酵母懸游液の生細胞%を Methylene blue 染色法に依り測定した。然る時は理論上新たに作った試料の生細胞%は次の如くなる。

$$\text{生細胞}\% = \frac{A + 0}{2} = \frac{A}{2}$$

(但し A は最初の酵母試料の生細胞%)

10.0000g 宛秤量した酵母試料中の細胞数は、厳密には等数でないと思われるが、その誤差は、全体として 20.0000g 中の細胞数は極端に大きな数となるから、1回の測定に 500 個程度の細胞を測定する位に稀釈した場合無視し得ると考える。実験結果は Table 2 に示す通りである。

Table 2.

	A (生細胞%)	B (生細胞%)	C (生細胞%)	D (生細胞%)	E (生細胞%)
理論値	47.02±0.55	47.02±0.55	47.02±0.55	62.69±0.74	62.69±0.74
測定値	47.66±1.29	47.71±1.22	47.25±0.85	63.37±1.08	62.04±1.41
誤差	0.64±1.84	0.69±1.77	0.23±1.40	0.68±1.82	0.63±2.15

以上の測定値は、何れも 1 回に約 500 個の細胞を検鏡し、これを 5 回宛測定したものの平均値である。尚 D. E. は 10.0000g の酵母を死滅せしめた後、これに 20.0000g の酵母を加えた試料について求めたものである。

測定値の平均値は理論値の標準偏差内に求まるが、測定値の標準偏差が ±1.5% に及ぶから、全体としてこの方法に依って求められた測定値の誤差範囲は ±2% 程度である。しかしながらこの実験に使用した試料は甚だ生活力の強い酵母細胞と、完全に死滅した細胞との混合液であって、生命は保持しているが生活力の非常に衰えた細胞は比較的少なかった筈である。従って若しかかる生活力の衰えた細胞の多数を含む試料を測定する場合においては、誤差は更に増加する可能性がある。

## 〔4〕 測定に際しての試料の稀釈度に対する検討

H. Fink の Methylene blue 染色法に依る酵母の生死細胞の測定は統計学的方法に依るものであるから、出来る限り数多く測定する程正確な値を得る事になる。しかし出来る限り多くのとい

っても、そこに自ら限度があるし、又無暗に多く数える事も無意味な事である。そこで1つの測定値を出すに、全体として最低限何個位の細胞数を測定すべきか、又1回の検鏡に何個位の細胞を算えるのが適当か、即ち試料をどの程度に希釈するかという問題について検討してみた。

実験としては予め生細胞%の判った試料を[3]に述べた方法にて作り、この試料の生細胞の測定を

(i) 1回の検鏡で生死総数 100個程度の細胞が算えられる程度に希釈した場合。

(ii) 200個程度の場合。

(iii) 500個程度の場合。

の3通りに分けて行ない夫々の場合の数値を比較検討してみた。結果は Table 3-(i)~(iii) に示す。

Table 3-(i) 総数 100 個程度算えられる様に希釈した場合

Exp. No.	生細胞数	死細胞数	生細胞 %	2回の平均	5回の平均	10回の平均
1	44	55	44.44			
2	53	51	50.95	47.70±3.26		
3	46	52	46.74	48.85±1.11	47.33±3.39	
4	54	48	52.96	49.65±3.11	47.95±3.94	
5	40	56	41.55	47.26±5.71	46.50±3.30	
6	41	43	47.57	44.56±3.01	45.72±4.15	46.29±4.01
7	44	59	43.69	45.63±1.94	43.28±2.23	46.16±3.35
8	46	41	42.85	43.27±0.42	45.28±3.86	46.28±4.12
9	44	64	40.74	41.80±1.06	44.36±3.71	46.88±4.75
10	47	44	51.54	46.14±5.40	46.06±4.61	46.00±3.97
11	43	57	43.00	47.27±4.27	48.03±4.85	46.33±4.20
12	48	44	52.18	47.59±4.59	48.72±3.68	46.03±4.30
13	49	44	52.69	52.44±0.26	47.39±3.98	46.36±4.00
14	42	53	44.21	48.45±4.24	47.70±4.05	46.87±4.09
15	48	59	44.86	44.54±0.33	46.65±3.24	47.65±3.40
16	41	51	44.56	44.68±0.13	45.71±1.48	47.88±3.52
17	46	52	46.93	45.75±1.14	46.58±1.67	
18	48	52	48.00	47.47±0.54	48.36±2.70	
19	49	54	48.57	48.29±0.29		
20	48	43	52.75	50.66±2.09		

全体の平均 47.08±3.66

試料の生細胞%理論値 47.02±0.55

Table 3-(ii) 総数 200 個程度算えられる様に希釈した場合

Exp. No.	生細胞数	死細胞数	生細胞 %	2回の平均	3回の平均	5回の平均
1	103	116	47.03			
2	108	134	44.63	45.83±1.20	46.04±1.02	
3	96	111	46.47	45.52±0.89	45.92±0.85	46.50±0.94
4	98	112	46.67	46.57±0.10	46.79±0.09	46.66±1.13
5	102	114	47.22	46.95±0.28	47.30±0.70	47.73±1.29
6	100	107	48.31	47.77±0.55	48.51±1.15	47.75±1.28
7	104	104	50.00	49.16±0.85	48.31±1.43	47.98±1.25
8	102	117	46.57	48.29±1.72	48.14±1.14	47.98±1.27
9	107	116	47.98	47.28±0.71	47.20±0.18	
10	104	117	47.06	47.52±0.46		

全体の平均 47.19±1.34

試料の生細胞%理論値 47.02±0.55

Table 3-(i)~(iii) において2回の平均, 3回の平均, ……は夫々の平均値を記入せし項を中央

Table 3—(iii) 総数 500 個程度算えられる様に稀釈した場合

Exp. No.	生細胞数	死細胞数	生細胞 %	2 回の平均	3 回の平均	5 回の平均
1	241	275	46.71	47.81±1.10		
2	239	257	48.91	47.17±1.74	47.02±1.48	
3	259	312	45.43	47.00±1.57	47.64±1.68	47.66±1.29
4	272	288	48.57	48.13±0.45	47.23±1.32	47.71±1.22
5	247	271	47.68	47.72±0.04	47.67±0.62	47.25±0.85
6	256	280	47.76	47.33±0.43	47.11±0.54	47.32±0.84
7	242	274	46.90	46.55±0.35	46.93±0.59	47.02±0.58
8	231	269	46.20	46.36±0.16	46.54±0.10	46.82±0.53
9	234	269	46.52	46.62±0.10	46.48±0.03	
10	242	276	46.72			

全体の平均 47.14±1.01

試料の生細胞 % 理論値 47.02±0.55

として前後 2 回或は 3 回の測定に依って求められた生細胞 % の平均値であって、例えば 3 回の平均の項の第 1 番目の値は Exp. No. 1, 2, 3, の測定で得た結果から求められた生細胞 % の平均値である。Table の最後段に示した全体の平均とは、そこでなされた測定に依って得られた生細胞 % の全部の平均値である。

Table 3-(i)~(iii) において明らかな如く試料の稀釈度が增大すると、即ち 1 回の検鏡で算える細胞数が少なくなると、個々の測定値の示す範囲が相当広範囲となる。つまり (i) で求められた生細胞 % よりも (ii) の方が、更に又 (iii) の方が比較的一定の値を示すという訳である。この様に稀釈度が增大するにつれて個々の測定値の誤差が大きくなるという事は、[1] でも述べた如く H. Fink の方法による死細胞の判別には、Methylene blue の染色程度に依る生死の判定が困難であって、今若し 1 個の細胞の生死の判別を誤った場合、それに依って生ずる影響が全体の % に大きく表われるという事も考えられるが、それ以外にも試料の稀釈が増すにつれて試料の分布が一定にならず、試料のとり方自体に依って生ずる誤差も大きくなって来るものと考えられる。かかる理由に依って生ずる誤差は、測定回数を増す事に依り互に補足し合って数回の平均値をとれば次第に理論値に接近して行く事は Table 3 の何れの場合にも示される事であるが、その限度は 1 回に 100 個程度の細胞を算えて測定する場合には、少なくとも 10 回以上測定を繰返す必要のある事が結果的に判る。

しかしながら若し単なる相加平均を以て母集団の生細胞 % を示すものとすれば、1 回の測定に算える細胞数が少なくとも、それを数回繰返す事に依って、比較的理論値に近似した値を求め得るが、標準偏差は相変らず大きな値を示すから、1 回の測定に算える細胞数は多い程有利であるとい得る。而して 1 回の測定に 500 個程度の細胞を算え、これを 5 回繰返して求められた生細胞 % の平均値は、その誤差が ± 2 % 程度で抑えられる。

##### [5] 試料の作り方

以上の如く試料のとり方は誤差を生ずる大きな要因となるのであって、従って試料の作り方が問題となる。若し試料が液体培地中の酵母の如く既に水の中に懸游しているものであれば、これを充分攪拌して測定すべき事はいう迄もないが、乾燥酵母や市販の圧搾酵母の如く固形の集塊を呈して

いるものは、測定に先だってこれを水にとかさねばならない。この点に就いて次の実験を行なった。

同一の試料をとって

- (A) 試料に極く少量の水道水を加え、これを攪拌棒でよく捏ねてから次第に稀釈して、充分分散せしめたものを測定した。
- (B) 試料に一度に相当量の水道水を加え、暫く静置すると、固形の酵母は次第に軟かとなって来るからこれを攪拌した。然る時は一部凝塊を生ずるからこれを除いて上澄液を測定した。
- (C) (B) に用いたものを更によく攪拌して完全に凝塊をなくしてから測定した。

実験の結果は Table 4 に示す通りである。

Table 4.

	A (生細胞 %)	B (生細胞 %)	C (生細胞 %)
試料 I	81.50±1.00	78.65±0.30	81.68±1.07
試料 II	82.61±0.70	77.40±0.50	—

試料 I は生の市販圧搾パン酵母を用い、試料 II は赤外線乾燥を若干行なったものを用いた。測定値は 1 回に約 500 個程度の細胞を算え、これを 5 回繰返して求められた生細胞%の平均値を以て示した。

Table 4 より死細胞は比較的比重が小で浮き易い事が推定される。尚 (C) の方法をとると、検鏡の際に所々凝集した酵母が現れ測定に誤差を生ずるから、予め酵母を少量の水道水で捏ねてよく潰す事が肝要である。

#### [6] 試料を水道水にとかして放置した場合の時間的な変化

既に今迄の実験でも再三問題となった点であるが、試料を水道水にとかして酵母懸游液を作り、このものの生細胞%を H. Fink の方法で求める場合、数多く測定すればその間に時間が経過する。或は乾燥酵母を水にとかした場合、とかした直後と数時間放置した後とでは、酵母の生理に多少の相異があろうと推定される。そこでそれらが測定値にどんな影響を与えるかという問題について、次の実験を行なった。

試料を水道水にとかして酵母懸游液を作り、このものの生細胞%を時間的に間隔を置いて測定した。測定は 1 回に約 500 個の細胞を算え、これを 5 回繰返して得た結果の平均値を求めた。従って 1 つの値を求める為に各々約半時間の時間を要している。結果は Table 5 に示す通りである。

試料 A は市販圧搾パン酵母を用いたものであり、試料 B 及び C は夫々異なった程度に赤外線乾燥を施したものである。

Table 5 より生の酵母では水道水にとかして放置した場合、時間の経過に伴う変化は殆ど見られないが、乾燥を施したものは時間の経過と共に若干生細胞%が高くなる。この事は一部乾燥に依って非常に痛めつけられていた細胞が再び水を得る事に依り Methylene blue 還元力を恢復して

Table 5.

	A (生細胞 %)	B (生細胞 %)	C (生細胞 %)
直後より 30 分間	92.23±1.26	69.53±1.03	75.82±0.82
1 時 間 後	91.67±2.20	70.69±1.03	—
4 時 間 後	91.69±1.16	73.95±0.93	76.83±0.69

生細胞と判断されたものと考えられる。逆にいえば乾燥を施したものではまだ完全に死に至っていない細胞も、Methylene blue 還元力を失なって死細胞と判別される事があるという事になる。

### 総括並びに結論

H. Fink の Methylene blue 染色法に依る酵母の死細胞測定における諸問題を再検討した。実験の結果得られた事柄は次の通りである。

- (1) Methylene blue の染色程度によって酵母の生死を判定する事は容易でないが、死細胞は常に細胞内容物質が完全に染色する。そして H. Fink 法で生細胞率を求める場合、この染色程度による生死細胞の判定が誤差を生ずる最大の要因となる。
- (2) H. Fink 法で死細胞の測定をなす場合、1回の検鏡で算える細胞数が 500 個程度である事が好ましい。
- (3) H. Fink 法で死細胞を測定する場合、最低限総数 1000個の細胞を算える事が必要である。但しこれは1回の測定細胞数が少ない場合の事であって、上述の如く1回の測定に 500 個の細胞を算えるならば5回以上繰返すべきである。
- (4) H. Fink 法で死細胞を測定した結果は、それが適当な方法でなされているならば、誤差は±2%以内に抑え得る。
- (5) 死細胞は一般に生細胞に比して比重が小の様である。従って酵母懸游液の上澄部では生細胞率は低く表われる。
- (6) 酵母を水道水にとかして放置する場合、試料が生酵母ならば測定に要する様な時間内では酵母に大した変化は認められないが、乾燥の施されたものであれば時間と共に生細胞率は若干増大する。

終りに臨み終始御懇切な御指導を賜った阪大教授寺本四郎先生に深く感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) H. Fink, R. Kühles : Wochenschr. Brau., **50**, 180 (1933)
- 2) 橋谷 : 酵母学 p. 311.
- 3) H. Fink, F. Weinfurtner : Wochenschr. Brau., **47**, 89, 110, 124 (1930), **48**, 159 (1931).

### Summary

Reexamined various problems of the calculation of dead yeast cells using methylene blue staining method by H. Fink.

The results of the experiment were as follows:

(1) It is not easy to discriminate between the dead cell and the living according to the degree of staining. But the intra-cellular substance is entirely stained in dead cell. The discrimination between the living cell and the dead by methylene blue staining becomes the maximum factor that makes an error, in case of requiring the living cell ratio by H. Fink's method.

(2) It is desirable that the total cells in one microscopy should be counted about 500, when calculating dead cells by H. Fink's method.

(3) When calculating dead cells by H. Fink's method, it is necessary that the total cells should be counted 1000 at minimum. But this is when the cells are small in number in one calculation. If the cells are counted 500 in one microscopy, it should be repeated more than five times.

(4) When calculating dead cells by H. Fink's method, the error can be made under  $\pm 2\%$ , if it is done by the proper operation.

(5) The dead cells are generally small in specific gravity, compared with the living cells. Therefore the living cell ratio becomes low in the supernatant fluid of yeast suspension.

(6) When the sample is suspended in tap water and set alone, the sample doesn't show much change, if the yeast is raw, during the time needed for the calculation. If the yeast is dried, the living cell ratio increase a little with time.