

CDA-1000 浸透圧が異なる試料の測定

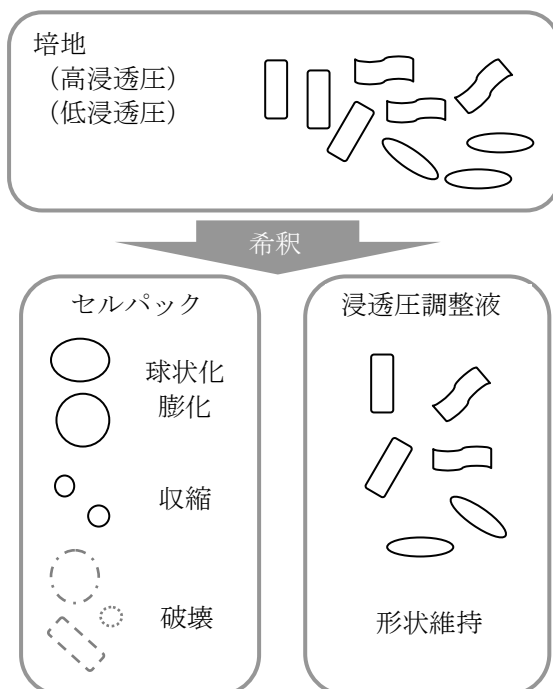
1. はじめに

微生物を対象とした研究は大学、研究施設、民間企業などにおいて様々な分野で実施されている。取り扱う微生物は、細菌、酵母、細胞、藻類など多岐にわたり、生息環境、培養条件も多種多様である。対象となる微生物の多くは、ヒトが対応できる生理的環境下に生息している。

CDAでは、電気検知帯方式という測定原理の特性から、微生物・細胞などの試料を、電解質が溶解した電気伝導性のある希釈液に懸濁してから測定を行う。通常は、装置の内部液として使用しているセルパック（生理学的条件に近い浸透圧）を希釈液として使用する。しかし、生理学的条件から外れた環境・培地で生息・培養する微生物・細胞などの場合、セルパックに懸濁すると形態変化を生じる場合がある。例えば、高塩濃度（高浸透圧）環境下で培養される微生物をセルパックで希釈すると、浸透圧効果によって微生物が膨潤もしくは破裂して正しい大きさを測定できない場合がある。逆に、低浸透圧環境下で育成する微生物をセルパックで希釈すると、浸透圧効果によって収縮する場合がある。このような試料では、生息・培養環境に近い条件（特に浸透圧が同等）の希釈液に試料を懸濁することが好ましい。

ただし、浸透圧は溶液に溶けている物質や塩濃度に依存して変化するので、浸透圧の高低は電気伝導度の高低にもなり、そのままでは大きさ（粒度分布）情報などの測定結果が正しく得られない。

そこで、浸透圧を変化させた希釈液を用いた場合の測定手法について検討した内容を報告する。



2. 検討内容

1) 試薬組成（浸透圧）の影響確認

粒子径が既知の標準ラテックス粒子を用いて、希釈液組成（浸透圧）の影響を確認した。

① 検討に供した希釈液

- (1) 3.5%塩化ナトリウム溶液（3.5%NaCl溶液）
海水と同程度の塩濃度（1100mOsm/kg）
- (2) 低浸透圧塩化ナトリウム溶液
（100mOsm/kg溶液、0.32%NaCl溶液）
塩濃度下限であり、これより塩濃度が低い場合、試料がセットされていないことを示すエラーが発生する
- (3) セルパック（250mOsm/kg）
対照 通常の希釈液として使用

② 標準粒子

Cat No. 4210A（粒子径 10 μm 、CV1%）

2) 粒子径校正作業手順

- (1) 各希釈液に標準粒子を添加
- (2) 下記の装置条件で測定
- (3) 測定結果（粒子径）が標準粒子の表示値と一致するように校正値を変更

3. 装置条件

アパチャー : 100 μm
X軸 : 粒子径
分析量 : 500 μL

4. 結果

校正前（セルパックで校正した状態）では、表 1-1 に示すように希釈液組成によって測定結果が異なったが、希釈液ごとに校正すると、いずれも正しい測定結果を得ることができた。この結果から、希釈液に適した校正を行うことにより、さまざまな浸透圧下で育成する微生物試料を正しく測定できる可能性が示された。

表 1-1 校正前の標準粒子（10 μm ）の測定結果
（校正前：セルパックで校正した状態）

	平均粒子径
セルパック	9.982 μm
浸透圧 100mOsm	10.274 μm
3.5%NaCl 溶液	9.429 μm

解析条件：LD_9 μm 、UD_11 μm

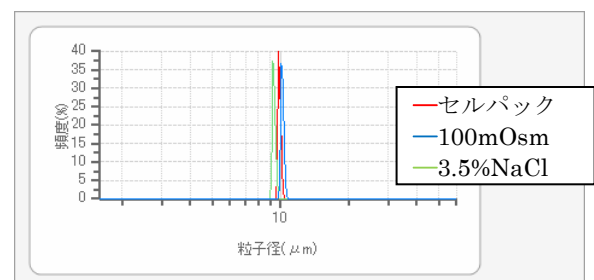


図 1-1 重ね合わせグラフ_校正前

表 1-2 校正後の標準粒子(10 μ m)の測定結果
(校正後：溶液ごとに校正した状態)

	平均粒子径
セルパック	9.982 μ m
浸透圧 100mOsm	10.009 μ m
3.5%NaCl 溶液	9.997 μ m

解析条件：LD_9 μ m, UD_11 μ m

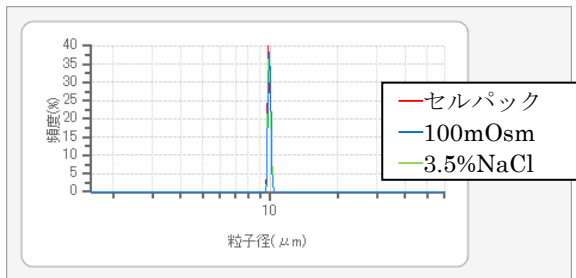


図 1-2 重ね合わせグラフ_校正前

校正前にばらついていた粒子径がほぼ同じ値を示すように調整できたので、ほとんど同じ位置に各粒度分布が出現した。

5. 試料の測定

5-1 分布幅の大きな粒子の測定

校正に用いる標準粒子(CV1%程度)に比べて分布幅の大きな(CV20%以下)粒子(Cat No. 7508A)を使用

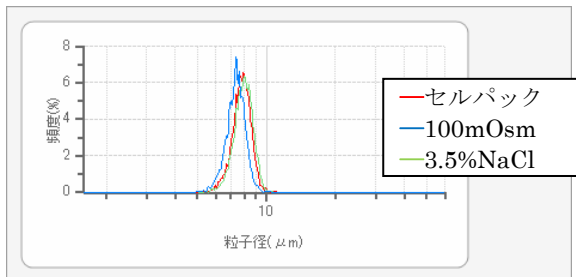


図 1-1 校正前

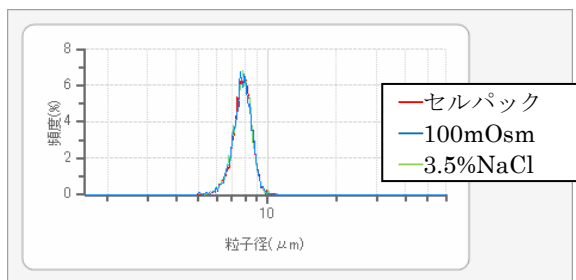


図 1-2 校正後

標準粒子(4210A)で校正した時の校正値を用いて、各溶液に 7508A 粒子を懸濁させた試料を測定したところ、ほぼ同じ粒度分布を得た。

5-2 培養細胞の測定

1) 試料

細胞株：CHO-K1

ハム F12 (血清加) 培地で培養したシャーレからトリプシンを用いて細胞を回収し、培地に懸濁したものを原液とした

2) 装置条件

アパチャー：100 μ m

X 軸：粒子径

分析量：500 μ L

モード：セルモード

3) 希釈液

(1) 塩化ナトリウム溶液

培地とほぼ同じ浸透圧に調整

(2) ハム F12 (血清加) 培地

微粒子の影響を避けるため使用前に 0.45 μ m フィルターで濾過

4) 測定

カウント数が 3000~5000 程度となるように、原液を希釈液で希釈した試料を測定

5) 結果

図 2 の粒度分布を示しており、特に問題となる所見を認めなかった。

希釈液に浸透圧調整溶液あるいは培地を用いることで、希釈による細胞の形態変化を最小限にとどめることができる。実験条件によって弱くなった細胞を測定する場合などに有効な手段と思われる。

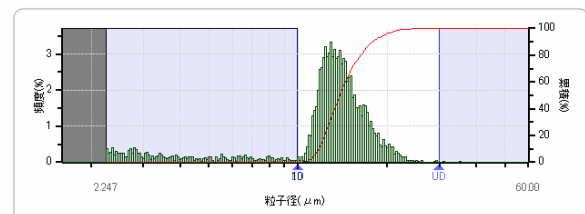


図 2-1 塩化ナトリウム溶液

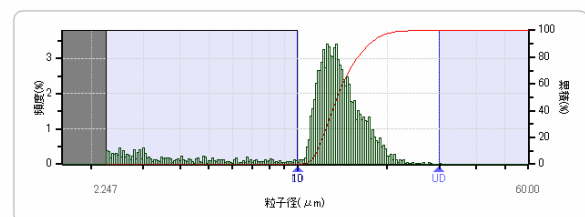


図 2-2 ハム F12 培地

発行：シスメックス株式会社 国内事業推進部 理化学課

〒651-2271 神戸市西区高塚台 4 丁目 4 番地の 4

Tel. (078) 991-2091 Fax (078) 997-9976

URL : <http://www.sysmex.co.jp/labscience/>

Published by : SYSEMEX CORPORATION SCIENTIFIC INSTRUMENTATION BUSINESS DIV.

Copyright © 2010 by SYSEMEX CORPORATION

No part of this publication may be reproduced without the prior the written permission of the publisher.

Printed in Japan.

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。