

細胞集団の変動の統計的解析法 I

高 橋 宏 一
国立予防衛生研究所 石 田 説 而
国立予防衛生研究所 岩 佐 三 郎
国立予防衛生研究所 黒 川 正 身

(1964 年 11 月受付)

Statistical Analysis of Change in Cell Population

Following the Growth I

Koiti TAKAHASHI

Setsuji ISHIDA

Saburo IWASA

Masami KUROKAWA

National Institute of Health

National Institute of Health

National Institute of Health

The synchronous or synchronized culture is a valuable method for the studies of the life cycle of cells. In the present paper the methods of estimating the size distribution of cells at a fixed age of the cell and the growth curve of a cell during the life cycle were examined basing on electronic particle count patterns of synchronous culture of *E. coli* cells using the Coulter Counter B.

An assumption that the size distribution of cells approximately follows the normal distribution and a deterministic model proposed for the growth curve of a cell were discussed.

Institute of Statistical Mathematics

§1 序

同調培養法とは、微生物やその他の細胞集団の培養に一定の処置を加えて培養することにより、その集団のすべての細胞が同一の生活環から出発し、同じ歩調で生活段階を進み、再び元の段階にかえる過程をくりかえさせようとする方法である。この方法は、同じ種に属する多数の細胞集団を同一の歩調で生活段階を進行させることにより、個々の細胞の生活段階に伴う物質代謝やその他の生理学的変化を拡大して観察することを可能にするもので、生物学の研究に活用されている。

この同調培養法のかなめは出発時の細胞の生活段階を揃えることにあるのであって、ある処理後の細胞集団が完全に同調していること（すべての細胞の生活段階が全く同一であること）が理想的ではあるが、完全な同調状態をうることは不可能であって、現実には多少ともちがった生活段階の細胞集団がえられるに過ぎない。この同調培養の出発時における細胞集団の上記の理想からのずれの程度を実際の同調培養の菌数測定から推定してその同調の度合を同調指数として表現する試みがいくつか提案されている [2, 3]。このような同調培養のデータから同調度を推定する場合、細胞の生活環のくりかえし時間の個体差がこれに影響するはずで

ある。ところが、奇妙なことだが、この個々の細胞の生活環の時間的バラツキが、従来の同調度表現法の提案には十分に考慮されていない。

私どもは、この欠陥を除いた同調度の推定方法を理論的に求め、それを、Coulter Counter を使ってえた実験成績によって裏付けることを試みた。Coulter Counter は後に述べるように、細胞集団の大きさの分布を極めて手軽な操作で測定することのできる装置であって、Coulter Counter でえたデータがこの種の統計学的分析に利用できるなら、同調培養に対してはいうまでもないことだが、一般の細胞集団の変化の解析に極めて有効な手段を与えることになると期待される。ところで、上記の目的を達するためには、この装置でえられた細胞集団の大きさの分布を時間的に追求することにより、その集団のある時点での①細胞の生活段階の分布および②細胞の分裂時間の分布が明らかにされる必要がある。

そこで、私どもは、先ず、大腸菌を用いて同調培養を試み、Coulter Counter を使って菌細胞の大きさの分布を時間的に追求し、そのデータから、培養時間と菌細胞の大きさの分布との関係、同一の生活段階での菌細胞の大きさの分布を解析する方法を検討してみた。この報告は、この解析方法に関する部分である。私どもは、更にこの解析によってえられた結果にもとずいて、一方には私どもの使った同調培養法、Coulter Counter による測定方法等に関する実験技術の改良を行ないながら、上記の最終目的の達成に進む予定である。

§2 実験方法

1. 計測用菌液の調製

菌株：E. Coli B.、培地：普通ブイヨン、このブイオンは、ミリポーフフィルター 0.45 μ で濾過し、120°C 20分で滅菌。

生理食塩水：ミリポーフフィルター 0.45 μ で3回濾過したもの。

1% (v/v) ホルマリン液：薬局方ホルマリン 1 ml に蒸留水 99 ml を加えたもの。

まず、大腸菌を普通ブイオンで振盪培養し、大腸菌の対数増殖期 (1 ml 中の菌数 $10^7 \sim 10^{8.5}$ 個) における菌液約 100 ml を速やかにミリポーフフィルター (1.2 μ) を用いて濾過する。(濾過時間2分、濾液約 30 ml) 濾過後速やかにこの濾液を再び振盪培養する。濾過直後、および濾過培養後5分間隔で16回、おのおの1 ml の菌液を取り、これに菌の分裂を阻止するため、1%ホルマリン液 1 ml を加えて、1日間保存し、計測時に、その1.5 ml に30 ml の生理食塩水を加えて計測に供する。

2. Coulter Counter による計測

Coulter Counter B (Coulter Electronics Inc. U. S. A.) を使用した。

Coulter Counter とは懸濁粒子が、小孔を通過する際の電導度変化により、微細粒子の数と大きさを測定する装置である。

電解液中に小孔 (aperture) を有する隔壁を設け、両側より電圧をかけた場合の電流は、その小孔の抵抗に依存する。今、電解液中に微細粒子が懸濁しており、それが小孔を通過すると、その抵抗が増加し、これを一連の電圧パルスとして取り出すことができる。したがって、一定体積の懸濁液が、小孔を通過したときに生じたパルスを計数すれば、懸濁液中の粒子濃度 (単位懸濁液中の粒子数) を求めることができる。また、パルスの高さは個々の粒子の体積に比例する。したがって、一定の高さの範囲のパルス数を順次測定すれば、粒子の体積分布曲線を求め得る。

計数されるパルスの数は、閾値 (threshold) (1~100)、電流、増幅値によって左右される。一定の電流、増幅値の場合、閾値によって粒子の大きさの下限と上限を規定することができる。このモデルBでは、閾値を25等分して粒子の体積の頻度分布のパルスを測定し、同時にグ

ラフに記録することができる。また、この幅の場所を4秒、8秒、12秒……等の時間をかけて測定することができる。

この実験では、口径 50μ の小孔管を用いた。この実験条件に適する電流、増幅値はおおの Coulter Counter B の目盛でいって $1/2$, $1/8$ であった。以後この値を用いた。また、閾値の幅の測定時間は4秒とした。

後述の菌の大きさを表わす値は、25等分した閾値の中央値を、1, 2……25 数値で表現したものである。

図1は以上の条件で、大腸菌の大きさの分布を Coulter Counter B で自動記録したグラフの一例である。

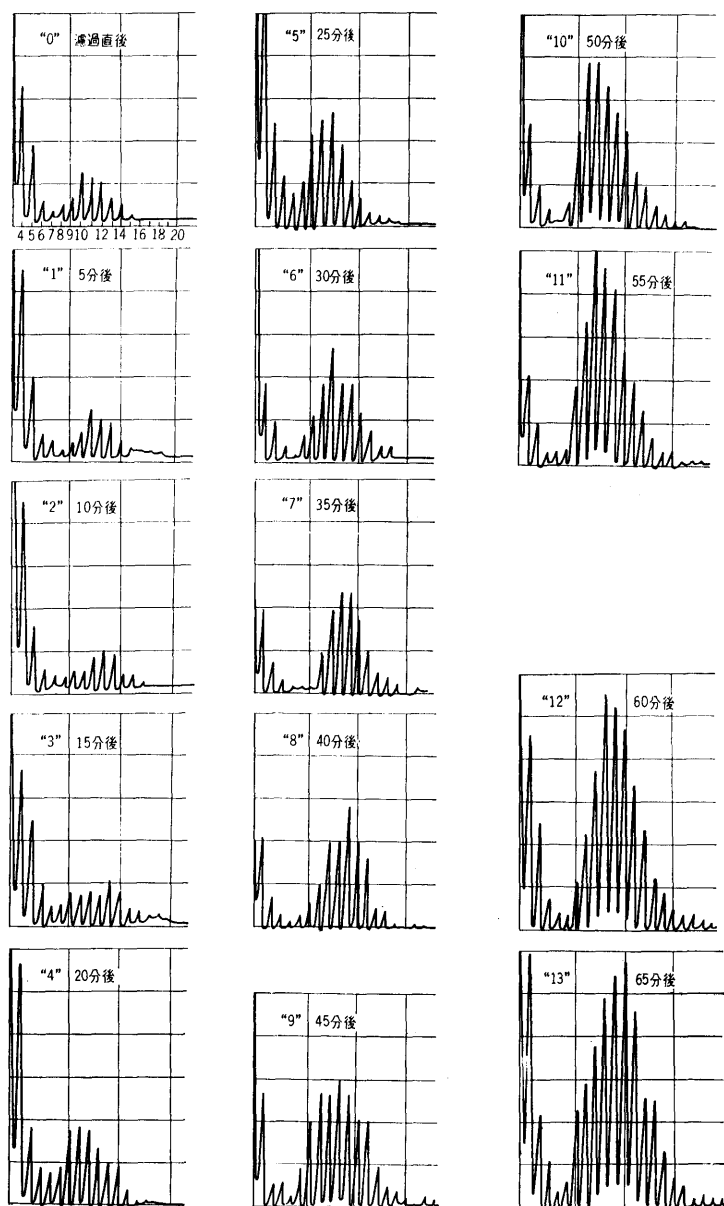


図 1

§3 実験の結果

§2 で説明した方法で数回実験を行なったが、そのうちの一つの資料 (1964. 11. 7 の実験) について以下説明, 解析をしていく。

Coulter Counter では試料を食塩水などに混合して測定する必要があるので、直接計数されて、出てくる数値には食塩水自身の中に含まれている粒子も含まれているため、それを引き算しなければならない。この食塩水にあたるものを一般に back ground と呼んでいる。

〈back ground の度数分布〉

表 1 back ground 中の粒子数

閾 値	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	計
粒子数	43	31	21	13	7	4	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	149

次に各時点で 2 回ずつ測定したものの平均値に、back ground の補正をした同調培養実験結果を示す。

表 2 同調培養実験結果

項目 時点	全 菌 数	平均の大きさ	分 裂 数	分 裂 率 I	分 裂 率 II
0	5145	10.623			
1	5666	11.200	512	0.0904	0.0904
2	6211	11.560	545	0.1059	0.0962
3	7301	11.524	1090	0.2119	0.1755
4	7446	11.297	145	0.0282	0.0199
5	10442	11.098	2996	0.5823	0.4024
6	10740	11.120	298		0.0285
7	11780	11.807	1040	0.0968	0.0968
8	12370	12.170	590	0.0549	0.0501
9	13134	12.271	764	0.0711	0.0618
10	15498	11.356	2364	0.2201	0.1800
11	20559	11.178	5061	0.4712	0.3266
12	21624	11.798	1065	0.0992	0.0518
13	20793	12.271			
14	23791	12.556	2998		0.1442
15	28026	11.919	4235		0.1780
16	33515	11.568	5489		0.1959

表 2 で、時点とは、経過直後を 0 とし、5 分単位で計った値である。また、時点 i での全菌数を N_i とするとき、 i 時点に記入されている分裂数を U_i 、分裂率 (I) を α_i 、分裂率 (II) を β_i で表わすなら、

$$U_i = N_i - N_{i-1}$$

$$\alpha_i = \begin{cases} \frac{U_i}{N_0} & (i=1, 2, \dots, 5) \\ \frac{U_i}{N_i} & (i=7, 8, \dots, 12) \end{cases}$$

$$\beta_i = \frac{U_i}{N_{i-1}}$$

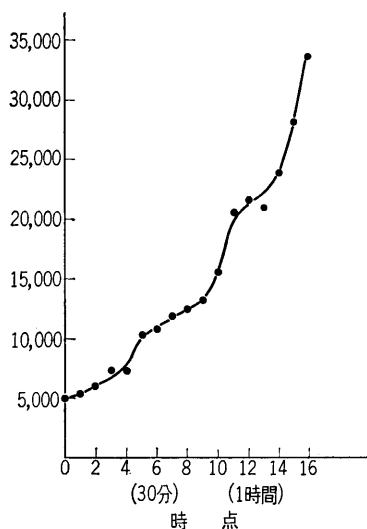


図 2 全菌数の増加

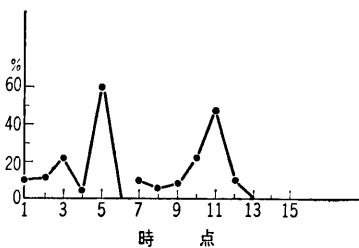


図 3 分裂率 (I)

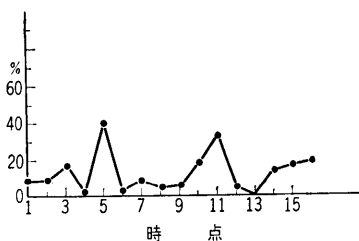


図 4 分裂率 (II)

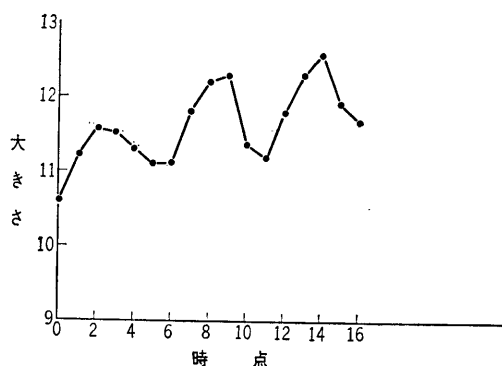


図 5 平均の大きさ

のことである。

上の表を図に表わしてみたのが図 2 から図 5 までである。

また、各時点での大きさについての分布の変化の様子を示すのが図 6 である。ただし、時点 0 から時点 7 までだけのせておく。

§ 4 統計的解析

この研究の一つの目的は、前にも述べたように、age と size の関係を見出すことである。そのためには、成長の過程を確率過程として表現することが望ましいが、現段階では、

- ① 平均成長曲線を求めること
- ② 各 age における size distribution を求めること

の二つに問題を限定しておく。

Schaechter など [1] によると、E. coli B の長さ (length) は指数的に成長するのではなからうかということ述べている。そこで行なわれている実験は、数 10 ヶの細菌を実際に成長や

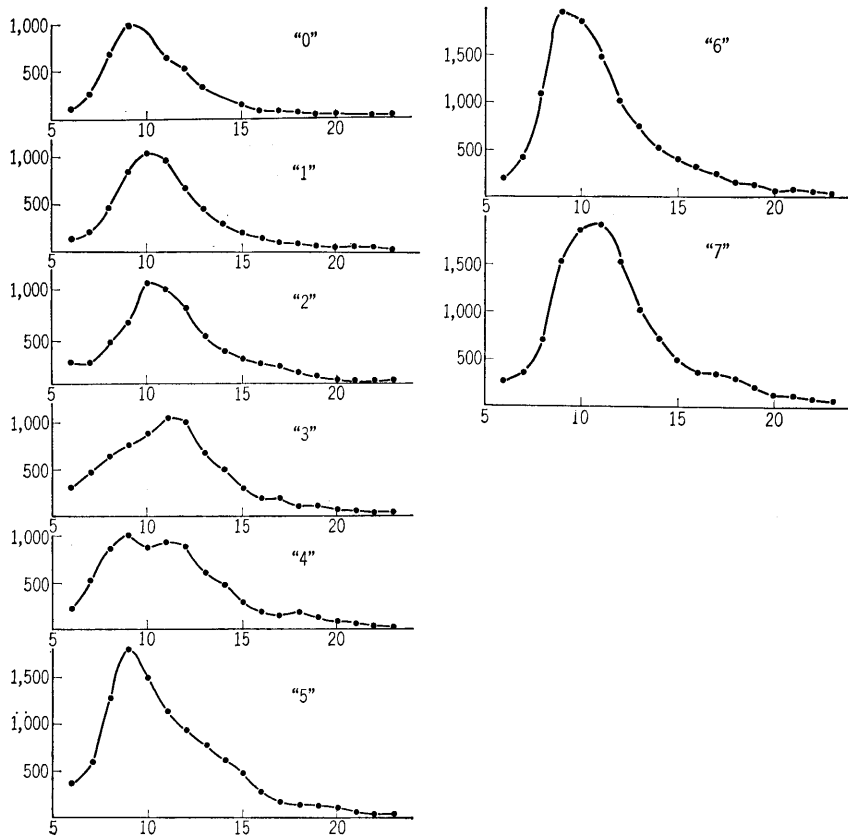


図 6

分裂の様子を顕微鏡的に観測しているものである。ところで、同調度のきわめて高い培養ができるなら、母集団全体としての平均 size を、一分裂期から次の分裂期まで追跡することにより容易に結論が導かれるはずである。しかし、多くの例が示すように、通常同調培養は、いわば完全同調と非同調(母集団として分裂率が一定)の中間状態を示す。したがって、平均成長曲線をうるためには、一工夫が必要である。我々の利用しうる資料は、各時点の size distribution であるが、これを十分に活用する前に、各時点での平均 size, \bar{x}_i で i 時点におけるものを示す、と各時点間の分裂数だけを使って平均成長曲線を求めることを考えてみた。ただし、今後の研究への足がかりとしての試みの程度のものであることを留意されたい。

§2 に結果が出ている実験でいうと、図2から、時点0(以下“0”と略す)から“5”までの間で“0”の母集団にいた個体はすべて分裂をすませているとみられる。また同じことは“6”から“11”についてもいえる。勿論、各期間内で同一個体が2回以上分裂することはないと仮定してのことであるが、図3から考えて許されそうである。(〔1〕の427頁参照) “0”における母集団は、個体の分裂の時期がどの時点間に入るかにより5つの層にわけて考えられる。すなわち §3 の記号でいうと、“ $i-1$ ”と“ i ”の間で分裂する層は U_i 個の個体を含んでいる ($i=1, 2, 3, 4, 5$)。一般にある時点を原点として、 $i-1$ 時点と i 時点の間に分裂する層をその時点での母集団の第 i 層となづける。ここで、時点には無関係に i 層の平均 size, y_i と記す、は一定とする。この仮定は図5からみて現在の資料に対しては無理のようにみえる。というのは、全体的に size が大きくなっていく傾向がみられるからである。ここでは、近似的に成立するものとみて、この点に関する検討は後の機会にゆずる。更に、分裂時間(分裂間隔時間の

こと) が変動なしで丁度 25 分とするなら“5”の母集団構成は, “0”の各層がそれぞれ 2 倍になったものである. 勿論この仮定は便宜的, 近似的なものである. ここまで仮定すると, 平均値間の関係として,

$$\begin{cases} x_0 = \frac{U_1}{N_0} y_1 + \frac{U_2}{N_0} y_2 + \frac{U_3}{N_0} y_3 + \frac{U_4}{N_0} y_4 + \frac{U_5}{N_0} y_5 \\ x_1 = \frac{U_2}{N_1} y_1 + \frac{U_3}{N_1} y_2 + \frac{U_4}{N_1} y_3 + \frac{U_5}{N_1} y_4 + 2 \frac{U_1}{N_1} y_5 \\ x_2 = \frac{U_3}{N_2} y_1 + \frac{U_4}{N_2} y_2 + \frac{U_5}{N_2} y_3 + 2 \frac{U_1}{N_2} y_4 + 2 \frac{U_2}{N_2} y_5 \\ x_3 = \frac{U_4}{N_3} y_1 + \frac{U_5}{N_3} y_2 + 2 \frac{U_1}{N_3} y_3 + 2 \frac{U_2}{N_3} y_4 + 2 \frac{U_3}{N_3} y_5 \\ x_4 = \frac{U_5}{N_4} y_1 + 2 \frac{U_1}{N_4} y_2 + 2 \frac{U_2}{N_4} y_3 + 2 \frac{U_3}{N_4} y_4 + 2 \frac{U_4}{N_4} y_5 \end{cases}$$

がえられる. x_i, U_i, N_i は観測値であり, y_i が未知変数である. これを解いてえられる y_i の意味は, 分裂までと $(i-1)$ 時点から i 時点までを残しているものの平均 size のことであつたから, 逆に y_5, y_4, y_3, y_2, y_1 の順に並べて考えると平均成長曲線に対応すると考えられる. 上述の資料の“6”から“10”までを使って上の計算をしてみると,

$$y_5 = 10.43, \quad y_4 = 11.98, \quad y_3 = 12.28, \quad y_2 = 13.26, \quad y_1 = 11.08$$

となる. グラフを書いてみると図 8 のごとくなる. y_1 , すなわち, 分裂直前にあたる部分が不当に小さく出ているとしか思えない. このことが仮定の無理によるのか, 資料の含む errors によるのか, それとも上のモデル化の考え方に誤りがあるのか, あるいは, 実際にそうなっているのか大いに検討しなければならない. 引きつづき, 時点をもっと細分し, 更に実験上の精度をあげ, またもっと一般にランダムな要素を入れたモデルとして扱う方向に進む予定で, ここでは疑問のまま残しておく.

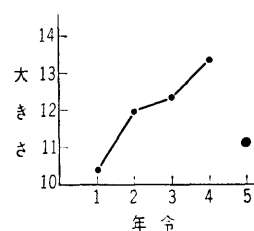


図 8

次に一定の年令 (直前の分裂から経過時間のこと) にある個体の size distributions を求める試みにうつる. これも同調度が極端に高い場合にはほとんど分裂時から次の分裂時まで母集団の size distributions を観測すればこと足るわけである. 我々の場合, “0”から“6”までの様子を見ると, “4”と“5”の間に分裂率 [I] の意味で 6 割弱が集中しており “2” “3” 間で 2 割強分裂している. そこで “5” の size distribution は, 上の 2 つおよび残りの 3 つの部分の分布が混合されていると考えられる. また全体の分布の小さい方の部分は, 上の 6 割強にあたる部分のもので大部分が占められている筈である. 一方, 分布の左の方は正規分布に近い型であることがみられる. 以上から次のことを行なってみる. 今全体の分布関数を $F(x)$ とし,

$$F(x) \doteq 0.6 F_1(x) + 0.2 F_2(x) + 0.2 F_3(x)$$

となっており, $F_i(x)$ ($i=1, 2, 3$) は正規分布の分布関数とする. このとき,

$$F_1(x) = 1/0.6(F(x) - 0.2 F_2(x) - 0.2 F_3(x))$$

$$F_2(x) = 1/0.2(F(x) - 0.6 F_1(x) - 0.2 F_3(x))$$

$$F_3(x) = 1/0.2(F(x) - 0.6 F_1(x) - 0.2 F_2(x))$$

である.

図 9 でいって 9 以下には $F_2(x), F_3(x)$ の部分は影響せず, また $F_3(x)$ は 13 以下に影響し

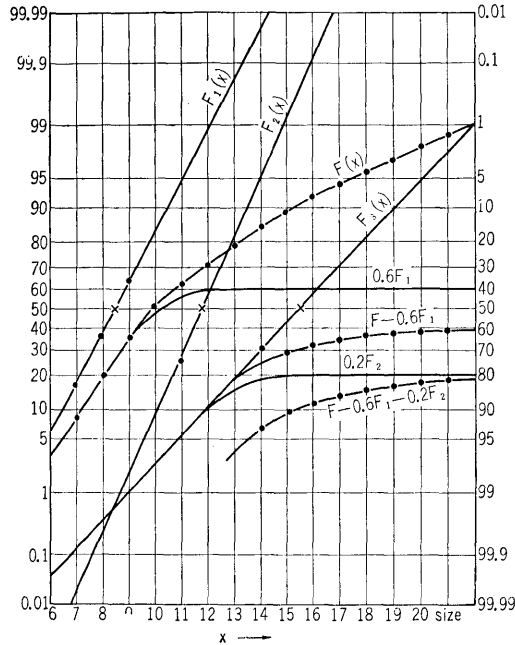


図9 三つの成分の求め方

ないと考えて、次々に $F_1(x)$, $F_2(x)$, $F_3(x)$ を求めていくと、 $F_3(x)$ でほとんど残りがなくなる。

$$F^*(x) = 0.6 F_1(x) + 0.2 F_2(x) + 0.2 F_3(x)$$

とし、 $F_1(x)$ は $N(8.5, 1.5^2)$, $F_2(x)$ は $N(11.7, 1.3^2)$, $F_3(x)$ は $N(15.5, 3.0^2)$ として、逆に $F^*(x)$ に従う size distribution を求めてみると次のようになる。

x	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
$100F^*(x)$	2.9	9.5	22.4	41.7	55.8	64.4	73.6	80.9	85.4	88.6	91.3	93.8	95.9	97.5	98.6	99.3
$100F(x)$	3.5	9.1	21.1	38.3	52.5	63.3	72.0	79.6	85.5	89.9	92.7	94.4	95.8	97.2	98.1	98.7

断るまでもなく、簡易法でおおよその見当をつけてあてはめたものであり、なお多くの資料について、精密な推定を行ない、適合度検定などもした上でないと結論的なことはいえませんが、予備的考察としてなら、age 一定の size distribution は正規分布に少なくとも近いと考えてよさそうである。なお、この方法が有効であるなら、前半に述べた成長曲線の検討に役立つであろう。

§5 考 察

まず測定方法について改良検討すべき点は、

- ① back ground の粒子として食塩水だ

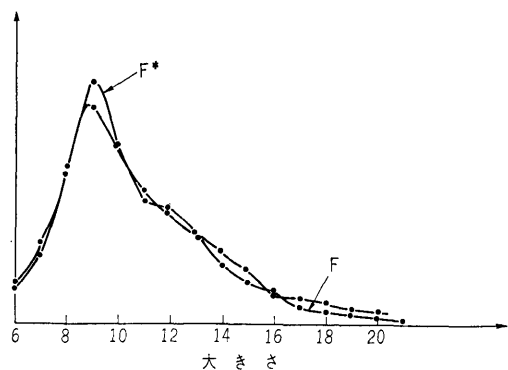


図10 F と F*

けを考慮しているが、更に培養液とホルマリン中に含まれるものも考慮すべきであること。更に、この実験では計数した菌数が少ないので coincidence loss について補正しなかったが、この点についても考慮すべきである。

② 実験全体を通じて菌液濃度をあげるか、閾値間幅の測定時間を長くするかにより、菌数測定の標本誤差を小さくすべきこと、③ coulter counter への電気的ノイズの影響が皆無とは考えられないのでその点の検討などである。

解析の面は、ここで述べたことを更に多くの実験資料で検討すべきであることは勿論、同調培養の経過を確率過程的に総合的に把握することに進まねばならない。

なお、同調指数 (synchronization index) をついでにわれわれの資料について求めてみる。指数の定義は数多く出されているが、ここでは、Scherbaum [2] のものと、Blumenthal 他 [3] のものについて求める。前者の定義は、

$$SI = 1 - \frac{t + g(2 - n)}{1.12g}$$

ただし、 t は同調増殖の起っている時間(分)、

g は指数的増殖培養での分裂時間、

n は $n = 1 + \frac{\text{同調菌数}}{\text{全菌数}}$ であたえられる。

結果および求め方は図7の中にある。

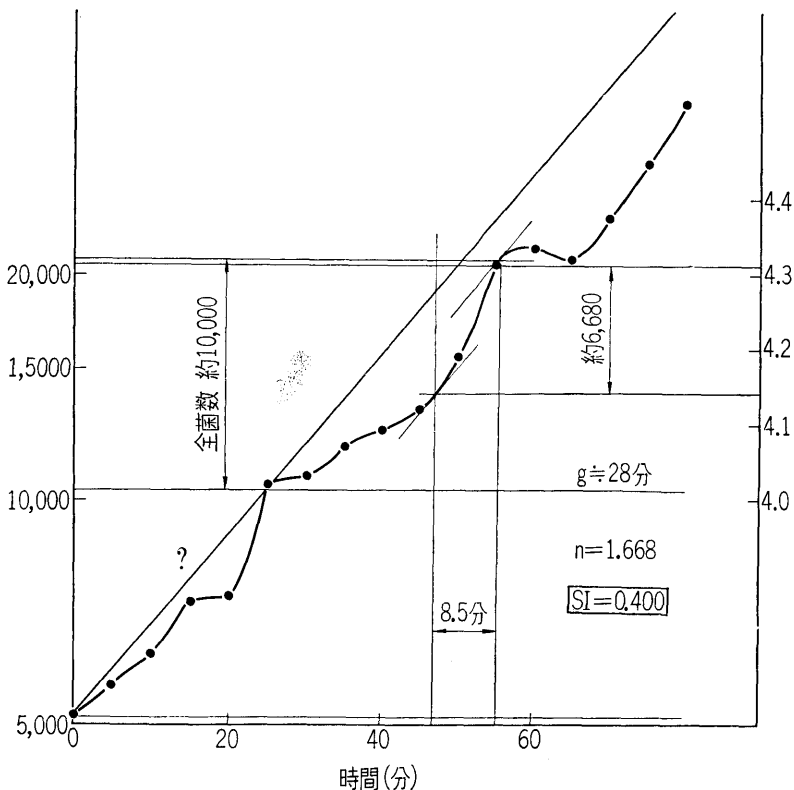


図7 同調指数を求めること

後者の定義は,

$$T < g \text{ として,}$$

$$F = \frac{M}{M_0} - 2^{T/g}$$

でもって区間 T の Index とする. ここに, M は区間 T で分裂した菌数, 区間 T の長さも T と記す. M, M_0 の意味は, 区間 T を通じて菌数が M_0 から M へ増加することである. さて, われわれの場合 T として前者の同調区間をとると,

$$F = \frac{20,560}{13,882} - 2^{8.5/28} = 0.237 \text{ をえる.}$$

統計数理研究所

参 考 文 献

- [1] Schaechter, M., Williamson, J. P., Hood, J. R. & Koch, A. L. (1962) Growth, Cell and Nuclear Divisions in some Bacteria. *Exp. Cell Res.*, 29, 421-434.
- [2] Scherbaum, O. H. (1964) Comparison of Synchronous and Synchronized Cell Division. *Exp. Cell. Res.*, 33, 89-98.
- [3] Blumenthal, Linda K. & Zahler, S. A. (1962) *Science*, 135, 724.
- [4] Anderson, P. A. & Pettijohn, D. E. (1960) Synchronization of Division in *Escherichia Coli*. *Science*, 131, 1098.