

## 第6章 変異株選別による水素発生速度の改良

*Enterobacter aerogenes* strain E.82005 は、38℃、嫌気条件下グルコースからおよそ 17 mmol/(g-dry cell·h) の速さで水素を発生する。この発生速度は、他の水素発生菌と比べて、もっとも速いものの一つである。しかし、工業的利用では、装置効率を高めるために、更に速いことが望ましい。そこで、水素発生速度の速い菌株の分離を試みた。

バクテリアの突然変異株を分離する方法は、栄養要求性、薬品耐性、糖資化性など培地にバクテリアが生えるか生えないかで判定できる変異性に関しては、確立されている<sup>1-3)</sup>。また、硫化水素などのガス産生変異性に関する定性的検査法についてもいくつかの判定法がある。それらは、TSI (Triple Sugar Iron) 培地、クリグラー (Kligler) 培地、SIM (Sulfide-Indol-Motility) 培地など半高層に調整した培地に、寒天培地上のコロニーを一つずつ植え付けて、培地の変色の有無あるいは亀裂の発生の有無によって判定している<sup>1)</sup>。しかし、ガス産生速度の速い突然変異株を分離する方法は、まだ開発されていない。したがって、水素発生速度の速い菌株を分離するには、まず、ガス産生速度を定量的に判定できる分離方法を開発する必要がある。

本章では、水素発生速度を定量的に判定できる分離方法を考案し、分離操作を行って得た菌株の水素発生速度を測定して、この分離方法が有効であることを示した。さらに、確率論手法を用いて、最も労力が少なくてすむ操作回数の決定式を導いた。

### 6.1 突然変異菌の一般的選別方法

#### 6.1.1 突然変異の発現

生物の細胞は、何等かの原因、例えば紫外線、X線、薬品などによって遺伝子に損傷を受けると、細胞分裂を起こしたときに、それまでとは形質の異なった細胞が現れることがある。このような突然変異は、自然の状態では非常に低い頻度で発生する。例えば、栄養要求変異はおよそ 100 万回の細胞分裂に 1 度の割合で発生するといわれている<sup>3)</sup>。この発生頻度は高等生物にとっては非常に希な発生であるといえるが、*E. coli* や *E. aerogenes* のようなバクテリアにとっては必ずしも希とはいえない。なぜなら、真核生物の倍加時間は数時間から数十日にもなるのに対し、原核

## 第6章 変異株選別

生物であるバクテリアの倍加時間は 10 分から数時間、と非常に短いからである。*E. aerogenes* st. E.82005 については、図 3.1-9(a) などから、約 25 分程度と見積もられる。100 万回の細胞分裂にどのくらいの時間がかかるか計算してみると、

$$2^n > 10^6$$

$$n > 6/\log 2 = 19.93 \approx 20 \text{ 回}$$

$$20 \text{ (回)} \times 25/60 \text{ (時間/回)} = 8.3 \text{ 時間}$$

対数増殖しているときには、およそ 9 時間に一個の割合で変異菌が現れることになる。このように変異した菌は、さらに 9 時間後には 100 万個に増殖するから、自然発生であれ、人工的発生であれ、母集団に混在している目的変異菌の簡便な分離手段こそが、最も重要な開発課題といえる。

### 6.1.2 栄養要求変異株、薬品耐性変異株の選別方法<sup>1,3)</sup>

栄養要求変異株とは、増殖に必要なアミノ酸、核酸、あるいはビタミンなどの合成経路のあるものに変異が生じ、その物質を生成することができなくなった菌株のことである。したがって、栄養が豊富な普通の培地ではそのような物質が含まれているので増殖するが、野生株なら増殖できる極限の栄養成分で構成される最少培地では、変異株は増殖できない。このような性質を利用して、次のような方法で栄養要求変異株を分離している。

突然変異誘発処理を行った菌を、栄養培地かまたは目的とする栄養を加えた最少培地で培養し、変異形質を発現させた後、栄養培地でできた寒天平板上に塗布して培養する。適当数 (50~200 個) のコロニーが生えた寒天平板 (マスター平板) を選び、図 6.1-1 に示しているように、滅菌したピロードをこの平板に押し付け、そのピロードを最少培地でできた新しい寒天平板に押し付ける (レプリカ平板)。一昼夜培養した後、レプリカ平板とマスター平板のコロニーを比較して、マスター平板に生えているけれどもレプリカ平板には生えなかったコロニーを、マスター平板から拾い上げる。分離を容易にするために、増殖中の菌にのみ溶菌効果を持つ物質、例えば、ペニシリンのように増殖中のグラム陰性菌の細胞壁合成を阻害し溶菌を起こさせる物質、を最少培地に加えて母集団中の原栄養株を選択的に取り除くということが行われることもあるが、このようにして栄養要求変異株は分離される。

薬品耐性変異菌の分離は、親株の増殖を止める薬剤の最少濃度 (限界用量) を知るために、あらかじめいく段階かの濃度に調整した寒天培地で、増殖試験をする手間を必要とするが、このようにして限界用量を決定すると、その後はこの濃度の寒天培地上に生える菌を拾えばよい。

栄養要求変異株、薬品耐性変異株などは、このように、平板寒天培地上に生えるか生えない

第6章 変異株選別

かで選ぶことができるので、その意味では非常に簡単な分離操作であるといえる。

6.1.3 ガス産生菌の判別方法<sup>1,4)</sup>

バクテリアの生化学検査の一つに、硫化水素、二酸化炭素などのガス産生を判定する検査がある。栄養要求変異株や薬品耐性変異株は、平板寒天培地上での生育の可否で判定できるが、ガス産生株を平板寒天培地で判別することは不可能である。だから、ガス産生株の判別は高層または半高層培地を使用して行っている。

例えば、腸内細菌確認培地の一つであるクリグラー培地、あるいは TSI 培地などは、ガス産生の判定をする検査培地である。これらは試験管を 3/4 ほど使用し、上層 1/3 は斜面に、下層 2/3 は高層に固めて、いわゆる半高層に培地を調整する。菌は斜面部に塗布すると共に、高層にも穿刺植菌する。そして、培養後の斜面部の色の変化で糖分解の判定を、高層部に生じる気泡または亀裂の有無でガス産生の判定を、それぞれしているのである。

このように、気泡または亀裂の発生の有無で判定する方法は、定性的な判定方法である。しかし、気泡の体積などが測定できればこの手法でも定量的な判定が可能になり、水素発生菌の選別を行う有力な方法が開発できると思われた。そこで、高層培地によるガス生成菌の改良法を検討し、数個のコロニーを混合して選別する効率的な手法を考案した。

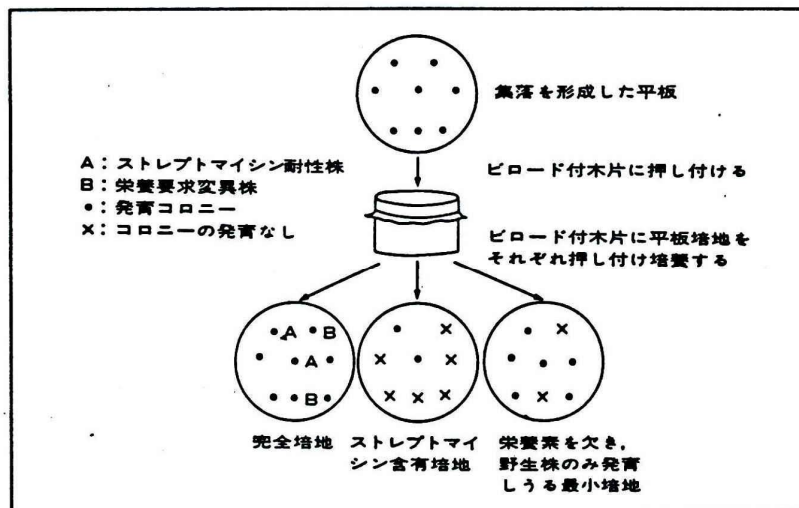


図 6.1-1レプリカ法による菌の選別手順<sup>1)</sup>

## 6.2 水素発生菌選別方法の開発と選別結果

水素産生優良株の選別を行うには、定量的な判定ができなければならない。しかも、この菌が水素と同時に発生する炭酸ガスの影響を排除しなければならない。すなわち、水素発生能の良否だけを判定できる方法であることが望ましい。気泡の発生状況を観測すると、高層培地が湿っているほど概して大きくなっていった。つまり、亀裂が発生したあと、ガス圧で高層培地が容易に試験管の中を滑って上昇できたため、気泡が生成されることがわかった。そこで、CO<sub>2</sub>の影響を少なくするために Ca(OH)<sub>2</sub> を含んだ高層寒天培地を調整し、滑りを良くするために高層の上に水を1ml ほど満たす選別法を考えた。また、大多数のコロニーはまったく同じ性質であるから、数個のコロニーを一つに混ぜて穿刺植菌し、労力の軽減を図った。

表 6.2-1 高層培地の組成

Glucose	5 g
Sodium citrate 2H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	5 g
Peptone	20 g
Ca(OH) <sub>2</sub>	10 g
Agar	10 g
Ion exchanged water	1000 ml

1) Culture was adjusted at pH 7.0 with HCl.

2) The height of stab medium was ca. 45 mm in 13 mm<sup>φ</sup> x 90 mm tube.

### 6.2.1 選別方法

選別は次の手順で行う。

- (1) 表 6.2-1 に示した組成で、外径 13 mm 長さ 90 mm の試験管に高さ約 45 mm の高層培地を作る。
- (2) あらかじめ培養しておいた平板寒天培地のコロニーを、5 コを一つに混ぜ合わせて、母集団にする。
- (3) 一本の高層培地に対して一母集団を穿刺植菌してサンプルを作る。このサンプルに、生理食塩水または pH 7.0 の Ca(OH)<sub>2</sub> 液を約 1 ml 滴下し、綿栓をして 38 °C、20 時間培養する。



第6章 変異株選別

(4) 亀裂あるいは高層が浮上した培地から釣菌をする。

(5) 1本のサンプルあたり、新しい高層培地 5~50本に穿刺植菌する。高層の上に生理食塩水または  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  液を約 1 ml 滴下し、綿栓をして 38℃、20時間培養する。

(6) 高層培地全体が浮上したもの、または亀裂が入って浮上したもので、浮上の程度の大きいものを選択する。

(7) 試験管を切って釣菌する。

(8) 水素発生速度の測定をする。あるいは、(5) に戻って同じ手順を続けるか、平板の寒天培地に植え付けてコロニーを作り、(2) からの手順で実験を続ける。

この選別手順を 図 6.2-1 に図示した。

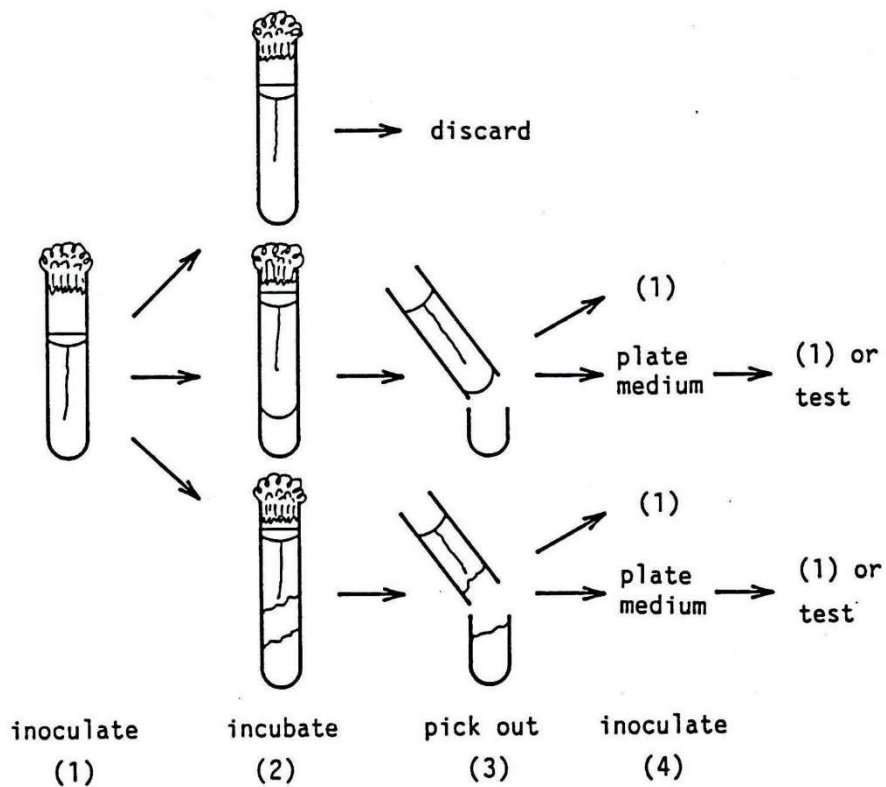


図 6.2-1 高層選別法の選別手順

## 第6章 変異株選別

### 6.2.2 選別実験と結果

親株には *E. aerogenes* st. E.82005 を使用した。突然変異誘発法の一つである紫外線照射法<sup>3)</sup>にしたがって誘発処理をした菌群と照射しなかった菌群を 38℃、20 時間培養した。紫外線をそれぞれ 20、40、60、80、100 秒照射した菌群と、照射しなかった菌群の第 1 回目の高層培養では、80 秒の被照射菌群のサンプルには亀裂がみられなかったが、他の被照射菌群と照射しなかった菌群には亀裂が発生した。これらの亀裂部から釣菌し、手順(5) から操作を繰り返して選別を行った。

数回の選別を通して、紫外線被照射菌群は照射しなかった菌群より高層の浮上程度が小さいことが観察された。8 回目の選別のとき、培養時間を延長して、浮上の発生率と上昇高さの変化を調べた。表 5.2-2 にその結果を示している。一サンプル当たり 10 本の高層に植え付けて調べた結果の一例を述べると、20 時間の培養において浮上発生率 40%、平均上昇高さ 10.8 mm、平均偏差 1.9 mm であった菌群(M.7B6)が、44 時間の培養によって、それぞれ 80%、12.6 mm、7.0 mm になった。このことから、浮上発生率、上昇高さは菌群の水素発生能を良く表していると考え、以後、浮上発生率と上昇高さを目安にして選別を行った。その結果、13 回目の選別では照射しなかった菌群の系列だけが残った。

表 6.2-3 に 15 回目の培養と、22 回目の培養の結果を示している。15 回目の培養では浮上発生率が 30~70% であったが、22 回目では 40~90% の割合で浮上するようになった。また、平均上昇高さ、最大上昇高さの何れの値も、15 回目より 22 回目の方が大きな値を示すようになった。そこで、これら 22 回目の高層 60 本から上昇高さの大きいもの 6 本を選び、平板寒天培地に移植して選別株とした。

表 6.2-2 高層選別法による第8回日の実験結果

20時間培養後の浮上状況

菌群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	頻度 (%)
M.7A4	8	<20>	7	x	x	13	<28>	x	5	15	70
M.7A5	5	x	15	13	7	16	18	14	15	16	90
M.7A7	x	19	x	x	19	25	(<33>)	18	14	<21>	70
M.7B6	x	x	x	8	x	12	<13>	x	<10>	x	40
M.7B8	5	11	13	<15>	x	x	x	x	x	x	40
M.7C1	10	x	x	x	x	x	x	x	14	x	20
M.7F1	15	x	16	16	11	17	26	(35)	x	28	80
M.7F4	x	x	15	22	8	20	28	13	16	16	80
M.7G1	8	7	5	24	22	(34)	x	15	15	10	90
M.7G3	28	9	20	x	18	21	8	16	19	15	90

44時間培養後の浮上状況

菌群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	頻度 (%)
M.7A4	8	<30>	23	x	16	22	*	x	20	19	80
M.7A5	15	x	22	26	15	25	18	18	24	19	90
M.7A7	x	23	19	x	27	*	(33)	24	21	27	80
M.7B6	6	4	3	17	x	19	23	x	16	13	80
M.7B8	7	15	14	15	x	x	10	x	x	x	50
M.7C1	11	x	x	x	x	20	x	x	20	x	30
M.7F1	21	x	25	22	19	27	29	*	x	32	80
M.7F4	x	11	20	25	16	22	*	18	24	23	90
M.7G1	21	21	18	26	30	*	x	23	27	19	90
M.7G3	*	13	20	x	23	25	11	23	27	13	90

x, 浮上しなかったもの; <>, 亀裂が生じて浮上したもの; ( ), 綿栓に接触したもの; \*, 移植したもの; 無印, 高層全体が浮上したもの. 単位, mm.

表 6.2-3 高層培地の浮上頻度と平均上昇高さ

15th cultivation					22nd cultivation				
Strain	Frequency <sup>a)</sup>	Elevation			Strain	Frequency <sup>a)</sup>	Elevation		
		Mean	Stand.Dev.	Maximum			Mean	Stand.Dev.	Maximum
	[%]	[mm]	[mm]	[mm]		[%]	[mm]	[mm]	[mm]
M.15A	67(30)	13.2	5.0	26	M.22A	90(10)	17.3	6.7	32
M.15B	63(20)	16.5	7.6	28	M.22B	80(10)	17.4	7.8	30
M.15C	60(30)	17.7	6.6	26	M.22C	70(10)	20.1	6.4	30
M.15D	35(20)	12.1	6.1	24	M.22D	60(10)	20.7	4.0	25
M.15E	33(30)	13.6	4.3	19	M.22E	50(10)	21.8	5.5	30
M.15F	30(20)	16.5	5.3	20	M.22F	40(10)	23.0	6.7	30

a) Number in parentheses shows samples for one strain.

6.2.3 選別株の水素発生速度

22 回目の高層から選んだ 6 種類の菌株と、べつに平板培地で植継いできた *E. aerogenes* st. E.82005 および *E. aerogenes* Y.Kosako 1027 (理化学研究所微生物系統保存施設保存株) の合計 8 種類について、第 3 章、3.1.1 節で述べた実験方法と同様の方法で水素発生を測定した。

図 6.2-2 は水素発生の測定例を示している。水素発生が活発になってからは、第 3 章でも示したように、菌の増殖状況にかかわらずほぼ一定の速さで水素を発生している。したがって、直線近似した累積発生量の傾きから培地体積当たりの発生速度が求まり、各菌株の水素発生速度を比較することができる。図 6.2-2 の例からは、*E. aerogenes* Y.Kosako 1027 株に比べて、選別株の発生速度の速いことがわかる。計算結果を表 6.2-4 に示した。Y.Kosako 1027 株の 38 °C における水素発生速度 (9.70 mmol/(l-culture · h)) を 100 とすると、E.82005 株の発生速度は Y.Kosako 1027 株より 10 % 速かった。22 回の選別操作で得られた 6 種の変異株では、もっとも速い M.22C3 株は E.82005 株より 22 % 速くなっており、Y.Kosako 1027 株と比べれば 33 % も速くなっていた。ただ、E.82005 株からの選別操作にもかかわらず、M.22A5 株は E.82005 株と殆ど同じ速さであり、操作の効果が現れていなかった。

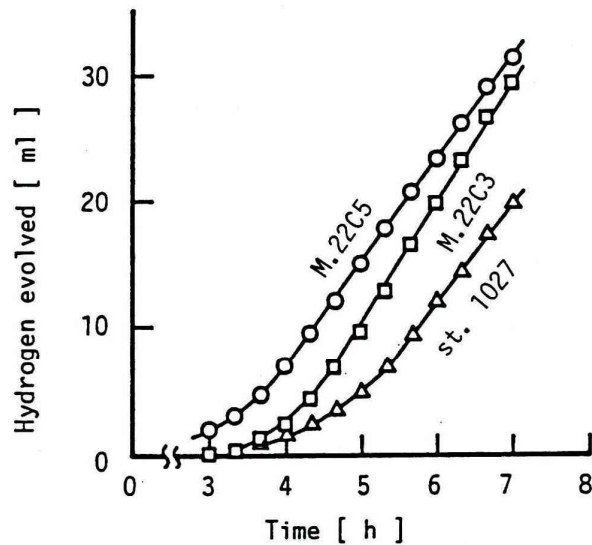


図 6.2-2 選別株の水素発生状態



6.2.4 選別株の生物化学的性状検査

変異株の選別の過程でこれらの菌の代謝性状が変化したか、あるいは汚染されて他の菌に置き換わったかどうかを、腸内細菌同定システムのアピ20E（アスカ純薬）を使用して調べた。表6.2-4には、21種の性状検査の内、何れかの菌で変異性を示した3種の性状検査の結果を水素発生速度と併せて示している。クエン酸資化能、ゼラチン液化能と Voges-Proskauer テストに変異性がみられた。しかし、どの変異性菌も *E. aerogenes* であることが同定システムにより確かめられた。

表 6.2-4 選別株の水素発生速度と生物化学的性状検査

<i>E. aerogenes</i> Strain	H <sub>2</sub> evol.rate <sup>b)</sup> [ % ]	Biochemical test <sup>c)</sup>		
		CIT	GEL	VP
Y.Kosako1027 <sup>a)</sup>	100	+	-	+
E.82005	110	+	-	+
M.22A5	108	+	+	+
M.22B10	114	+	-	+
M.22E8	115	+	+	+
M.22C5	119	+	+	+
M.22D5	120	-	+	-
M.22C3	133	+	-	+

a) Y.Kosako1027 was obtained from Japan Collection of Microorganisms.

b) Estimated the H<sub>2</sub>-evolution rate of Y.Kosako1027 (237ml·g-culture<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) at 100.

c) Listed from 21 biochemical tests in which some strains showed mutations.

Symboles: CIT, citrate utilization; GEL, gelatin liquefaction; VP, Voges-Proskauer; +, positive; -, negative.

6.2.5 考察

1) 選別株 M.22D5 は Voges-Proskauer (VP) テストがマイナスであった。つまり、培地 pH の自己調節機能が欠けた変異株であった。ところで、*E. aerogenes* を利用した水素発生の大きな利点の一つは VP プラスにある。なぜなら、VP プラスであれば、実用装置における水素発生において pH 調節装置を必要としないか、または調節が緩やかになると考えられるからである。したがって、Y.Kosako 1027 株に比べて 20 % 水素発生速度が速くなったけれども、この菌は使用に不向きである。

2) ガス発生速度は菌体濃度にも影響されることが第3章第3節で明らかになったが、植菌量が多くても速くなることが考えられる。そこで、バッチ培養における植菌量と水素発生速度との関係を、植菌量を 0.3、0.6、0.9、1.2 mg と 1~4 倍に変えて調べた。その結果、図 6.4-1 に示すように、植菌量が多いほど水素発生が活発になるまでに要する時間は少なかった。しかし、活発な水素発生が始まってからは、図 6.3-1 の測定例と同様に、菌の増殖状況にかかわらずほぼ一定の速さで水素を発生し、培地体積当たりで表した水素発生速度は植菌量が 4 倍異なっても同じであった。一方、4.5 時間の培養による菌体の収量は、表 5.2-5 に示したように、植え付け量の多

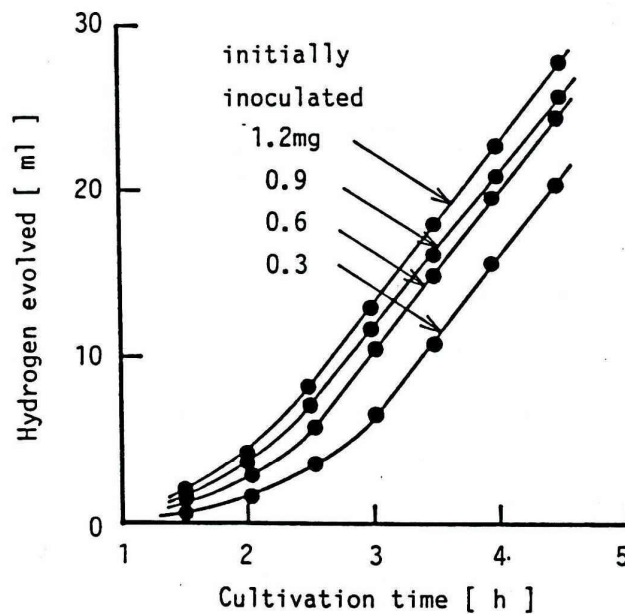


図 6.2-3 植菌量と水素発生の関係

表 6.2-5 水素発生速度におよぼす植菌量の効果

Symbol	Cell mass		Hydrogen evolution rate	
	inoculated [ mg ]	grown [ mg ]	$\left[ \frac{\text{ml}}{\text{g-culture}\cdot\text{h}} \right]$	$\left[ \frac{\text{ml}}{\text{g-dry cell}\cdot\text{h}} \right]$
GP025	0.3	23.8±0.4	324	408
GP050	0.6	25.5±0.7	325	382
GP075	0.9	24.6±1.3	309	377
GP100	1.2	25.2±0.6	327	389

い方がわずかではあるが大きかった。この結果から、高層選別法でも、測定時期に注意を払って単位時間当たりの浮上高さを測定するならば、菌体濃度の影響を受けないで、発生速度の速い菌を選別することが可能であると考えられる。

3) 今回、変異株選別実験を始めるにあたっては、水素発生速度の改良のみを考えていた。しかし、水素発生能の改良には、基質からの水素収率の改善と水素発生速度の向上の2つの異なった改良目標が考えられる。高層の上昇で改良株を判定する場合、収率の高い菌は上昇高さによって判定され、水素発生が速い菌は上昇速度で判定されるであろう。したがって、収率の改良を目的とする場合は、基質を消費してしまうに足る長い時間の培養が必要である。また、発生速度の改良を目的とする場合には、水素発生が活発になった後の単位時間当たりの上昇速度を測定すべきである。今回の実験では、20時間培養後の浮上高さのみを測定して選別を行った。したがって、どちらを目標にした改良か、結果として不明確な実験であったと言える。M.22A5 株で選別操作の効果が現れなかった理由の一つは、ここにあると思われる。

4) できるだけ多くのコロニーを検査するために、5コのコロニーを混ぜ合わせて、1回当たりの培養本数を少なくした。選別回数を重ねたため、総数では約2000本の培養になったが、このような方法で水素発生が速い菌を分離できることが示された。したがって、多数のコロニーから目的とする変異株を絞り込む方法としては、有効な方法であると言える。今回の実験にあたっては、選別の手順そのものも試行的に変化していったので、複雑になった。しかし、この手順は次のように簡約化できる。

一般化した選別法

- (i) 平板寒天培地のコロニーを、nコを一つに混ぜ合わせて、母集団にする。
  - (ii) 一母集団あたり1~2本の高層培地に定量白金耳で穿刺植菌してサンプルを作る。このサンプルに、生理食塩水またはpH 7.0のCa(OH)<sub>2</sub>液を約1ml滴下し、綿栓をして5~10時間培養する。
  - (iii) 高層培地全体が浮上したもの、または亀裂が入って浮上したものを選んで浮上速度を測定する。
  - (iv) 浮上速度の速いものを選択し、試験管を切って釣菌する。平板寒天培地に植え付けてコロニーを生やす。
  - (v) 手順(i)にもどって再度絞り込むか、コロニー一個毎に水素発生速度を測定する。
- 5) E.82005 菌のグルコースからの水素収率は1 mol/mol-glucose と悪いので、水素収率の大きい菌株の選別が望まれる。水素収率の大きい菌株の選別は、基質が完全に消費されるまで培養時間を長くし、浮上程度の大きいものを選択すればよいのではなかろうか。



### 6.3 確率論による混合数と釣菌数の理論的決定法

微生物の有用代謝産物を高い生産性で得るために、培養方法の検討や優良株の選別など大きな努力が払われている。前者では、培地 pH、培養温度、攪拌条件、前駆物質を考慮した栄養条件、通気条件など、代謝反応の観点からさまざまなアプローチが試みられ、生産性を上げることに成功している。後者では、x 線照射、紫外線照射、中性子照射などの物理的変異原や、エチルメタンサルホネート、マイトマイシン、亜硝酸など化学的変異原を使用して変異性発現を促し、生産性の高い株の出現を図ったりしている。このようにして発現した変異株のうち、たとえば、栄養要求性、薬品耐性、糖資化性のように、生産性ではなく、それまで持っていなかった特殊な性質を持つ変異株については、その微生物が特別に誂えられた培地で生育するかしないかによって判定できる。この判定法は既に確立された判定法である。

しかし、生産性が高い変異株または優良株は、他の株も同様に持っている性質の中から選別することになるので、変異発現を促して生えてきた多数のサンプルから、今もランダムに抜取って、生産試験をせざるを得ない状況にある。この場合、生えてきた多数のコロニーには目的とするコロニーは存在しないかも知れないし、存在しても高々数個かも知れない。ランダムに抜き取れば選から漏れることもあり、1 個ずつ検査するのは労力、コストの両方の面からも非常に無駄の多い検査になる。

このようなとき、一度に数個あるいは十数個ずつのコロニーを混合して調べることができれば、労力、コストを数分の 1 あるいは十数分の 1 に軽減できるばかりでなく、生えてきた全コロニーを検査することも可能になるであろう。ただ、混合数が増えれば増えるほど、他のロットと比較できる生産性の変化の程度が少なくなるから、厳密な測定が必要になっては来る。また、選別された生産速度の速いロットの中には、均等な割合で始めに混合した株の子孫が棲んでいると考えられるから、目的の菌を効果的に選別できなければならない。

本節では、混合した資料の中から、目的の資料を選び出すために必要な試験数を確率計算によって示し、混合菌株選別における総試験数の減少効果を明らかにした。

#### 6.3.1 混合資料から目的資料を取り上げるために必要なサンプル数

a, b, c, d, 4 種類のものが同じ割合で多数混ざっているサンプルから任意に n 個を取り上げたとき、n 個の中に a, b, c, d がそれぞれ少なくとも 1 個以上入っている確率を考えてみよう。問題を簡単にするために、n 個を取り上げても母集団の構成に変化は起きないとする。

第6章 変異株選別

(イ) まず、n個が1種類のみで構成される確率について考えてみると、aが取り上げられる確率は(1/4)であるから、取り上げたn個がすべてaである確率は(1/4)<sup>n</sup>で表される。n個が1種類で構成される確率は、a, b, c, dのどの種類であるかを問わないから、その組み合わせ数は<sub>4</sub>C<sub>1</sub>ある。したがって、n個が1種類のみで構成される確率は次式で表される。

$$p_1(n) = {}_4C_1(1/4)^n \quad (6.3.1)$$

(ロ) 次に、n個が(a, b)の2種類で構成される確率について考えてみよう。aまたはbが取り上げられる確率は(2/4)、n個がaまたはbである確率は(2/4)<sup>n</sup>である。これにはaかbのどちらか1種類だけで構成されている場合も含まれているから、それを差し引いた(2/4)<sup>n</sup> - <sub>2</sub>C<sub>1</sub>(1/4)<sup>n</sup>が、n個の中に少なくとも1個以上のaとbがある確率になる。また、これは(a, b)、(a, c)、・・・(c, d)のどの組み合わせであるかを問わないから、その組み合わせ数は<sub>4</sub>C<sub>2</sub>ある。したがって、n個が2種類で構成される確率は次式で表される。

$$p_2(n) = {}_4C_2[(2/4)^n - {}_2C_1(1/4)^n] \quad (6.3.2)$$

同様に考えていくと、

(ハ) n個が3種類で構成される確率は次式で表される。

$$p_3(n) = {}_4C_3\{(3/4)^n - {}_3C_2[(2/4)^n - {}_2C_1(1/4)^n] - {}_3C_1(1/4)^n\} \quad (6.3.3)$$

(ニ) 資料は4種類のもので構成されているから、4種類の内のどれかが取り上げられる確率は(4/4 =) 1である。n個を取り上げても(4/4)<sup>n</sup> = 1であるから、結局、n個が4種類で構成される確率は、それ以外の組み合わせで起こり得る(イ)、(ロ)、(ハ)の確率を差し引いたものとして次式で表される。

$$p_4(n) = 1 - \sum_{i=1}^3 p_i(n) \quad (6.3.4)$$

試料を構成する種類をm種(m ≥ 2)であるとして一般式で表すと、次のようになる。

$$p_m(n) = 1 - \sum_{i=1}^{m-1} {}_mC_i f_i(n) \quad (6.3.5)$$

ただし、

$$f_1(n) = (1/m)^n \quad (6.3.6)$$

$$f_i(n) = (i/m)^n - \sum_{j=1}^{i-1} {}_iC_j f_j(n) \quad (i \geq 2) \quad (6.3.7)$$

である。図 6.3-1 には混合数mをパラメータとして式(6.3.5)の関係を示した。また、表 6.3-1 に必要な存在確率を得るために釣り上げなければならないコロニー数を混合数との関係で示した。

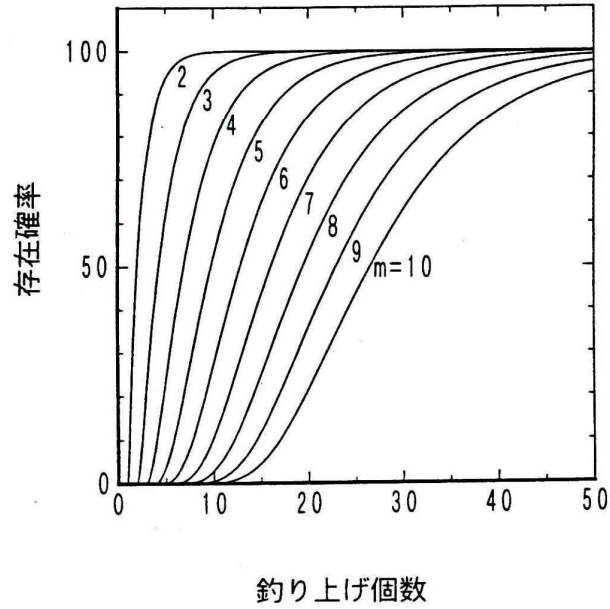


図 6.3-1 混合数をパラメータとしたコロニー釣り上げ数と存在確率との関係

表 6.3-1 必要な確率を得るために釣り上げなければならない個数

確率	混 合 数									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
50	2	5	7	10	13	17	20	23	27	
55	3		8	11	14		18	21	25	28
60			9	12	15	19	22	26	30	
65		6	10	13	16	19	23	27	31	
70		7	11	14	17	20	24	29	33	
75	4	7	12	15	18	22	26	30	35	
80			13	16	19	23	28	32	37	
85		8	11	14	17	20	24	29	33	
90	5	9	12	15	18	22	26	30	35	
			13	16	19	23	28	33	38	
			14	17	20	24	29	33	38	
			15	18	21	25	30	35	40	
			16	19	22	26	31	36	41	
			17	20	23	27	32	37	42	
			18	21	24	28	33	38	43	
			19	22	25	29	34	39	44	

### 6.3.2 労力削減のための最適混合数

変位発現を促して生えてきたT個のコロニーに応用する場合を考える。一個づつ生産性を測定する代わりに、コロニーをm個づつ混合して生産性を測定した場合には、生産性が高いとして選んだロットには高生産性の変異株を含むm株が均等に増殖していると考えられる。したがって、m株のどれが目的株であるかを決定するために再度単離操作を行い、生えたコロニーから適当数のコロニーを釣り上げて生産性試験を行わなければならない。その時に、確率と釣り上げ数を決定するために式(6.3.5)が利用できる。

表 6.3-1 に、10個までの混合数に対して、必要な確率を得るために釣り上げなければならない個数を示した。4種類のを混合したときには、わずか7個を取り上げれば50%以上の確率で4種類のもが含まれている。13個取り上げればその中には90%以上の確率で4種類のもが含まれているから、生産性試験は高々13個も行えば十分である。混合する個数が多くなれば、必要な確率を得るために釣り上げなければならない個数は増加し、10種類を混合した場合、50%以上の確率を得るには27個、90%以上の確率を得るには44個を取り上げて試験しなければならないことがわかる。

今試験総数を比較するために、要求する確率  $p_0$  ( $p_0 \leq p_m$ ) を満たす最も小さい整数  $n_0$  を次のように表す。

$$n_0 = n(p_0, m) \quad (6.3.8)$$

T個のコロニーを1個づつ試験する場合に比べて、始めにm株づつの群に分けて試験するならば、試験数は  $T/m$  に減少している。この中から1つのロットを選んで単離操作で生えたコロニーには、m株がランダムに散在しているから、目的株を決定するために釣り上げて試験しなければならない数は  $n_0$  個である。したがって、試験総数は次式で表される。

$$S = T/m + n(p_0, m) \quad (6.3.9)$$

始めのコロニーをすべて試験する場合と群に分けて試験する場合の試験数の比は、次式で表される。

$$\begin{aligned} R &= S/T \\ &= 1/m + n(p_0, m)/T \end{aligned} \quad (6.3.10)$$

図 6.3-2 は、90%以上の確率で目的株を決定するとして、式(6.3.10)の関係を百分率で示したものである。始めのコロニー数が100個であれば、5株づつ混合して試験したときに最も少ない試験数で目的株を決定でき、そのときの総試験数は、全株試験に比べ、38.0%に軽減する。200個では6株、500個では9株、1000個では13株づつ混合したときに最も少ない試験総数になり、それぞれ28.5%、18.7%、13.8%に軽減することができる。コロニー数が多くなるほど混合による軽減の効果が顕著になり、10,000になると20株の混合で6.0%まで試験数が軽減される。



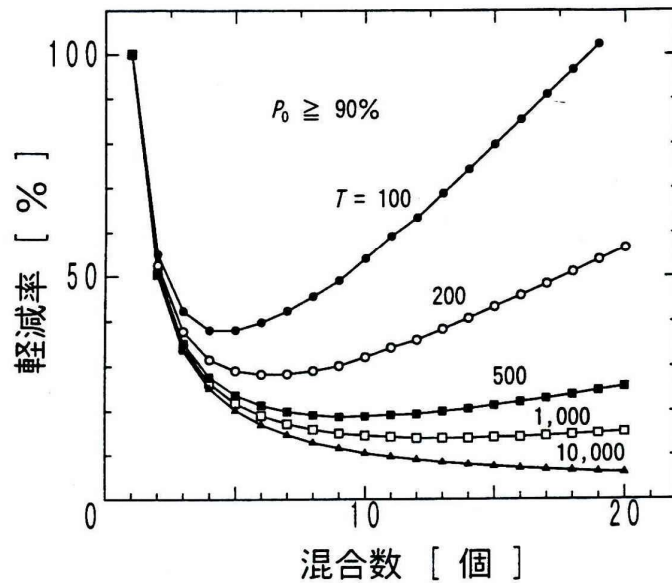


図 6.3-2 90%以上の確率で目的株を決定するとして混合法で選別したときの試験数の減少度。

### 6.3.3 考察

始めのコロニー数が100個のとき、5株ずつ混合したときに最も少ない試験数38になり、内訳は始めに20、2回目に18の試験数である。これを  $\text{Sum}_{100,5}(20,18)=38$  と表すことにする。4株ずつ混合して試験したときも総試験数では同じであるが、4株ずつのときは  $\text{Sum}_{100,4}(25,13)$  になるので、もし試験装置の有効利用を考えるなら、5株ずつ混合する方が好ましいといえる。同様に、200個の時には  $\text{Sum}_{200,6}(34,23) = \text{Sum}_{200,7}(29,28) = 57$  で7株ずつの方が良く、500個の時には  $\text{Sum}_{500,9}(56,38) = \text{Sum}_{500,10}(50,44) = 94$  で10株ずつ、1000個の時には  $\text{Sum}_{1000,13}(77,61) + 1 = \text{Sum}_{1000,14}(72,67) = 139$  で試験数は一つ増えるが14株ずつ混合する方が好ましいといえる。ただし、混合数が増えれば増えるほど現れる生産性の変化は小さくなるので、発見が難しくなるという不利が生じるので、このことを考慮すれば、混合数は少ない方が好ましいともいえるだろう。

## 第6章 変異株選別

### 6.4 結論

突然変異株の選別方法、ガス産生菌の判別方法などを参考にして、水素発生速度を定量的に判定できる分離方法を考案した。分離操作を行って得た菌株の水素発生速度を測定することによって、次のことが明らかになった。

(1) 高層培地での亀裂の発生頻度、あるいは培地の浮上高さを基準にした判別方法は、有効にガス産生株を分離することがわかった。この方法によって、水素発生速度の速い菌株を数株選別することに成功した。最も速い株は、親株 (E.82005) より 22% 水素発生速度が速かった。

(2) 数コのコロニーの混合母集団をつくることで、選別サンプルの個数を減らせることがわかった。これによって、コロニーを1コずつ調べる場合に比べて、労力を大幅に軽減することが可能になった。

(3) 基質のエネルギーをできるだけ水素エネルギーとして取り出すために、水素収率の大きい菌の選別が望まれるが、収率の改良も、高層選別法で培養時間を長くすることによって可能であると考えられた。

(4) 確率論を用いてコロニー混合数と必要な確率で目的株が存在するための釣菌数との確率関係を導いた。さらに、試験の労力を軽減するために、初期コロニー数と最も適した混合数との関係を示した。

### 参考文献

- 1 Nasu, M., K. Nishimoto, M. Akashi, T. Oguri, Y. Saito;  
新臨床検査技師講座, 医学書院, (1985)  
"微生物学"
- 2 Koshihara, H.; 現代細胞生物学, 培風館, (1979)  
"現代細胞生物学"
- 3 微生物研究法懇談会; 微生物学実験法, (1975)  
"微生物学実験法"
- 4 Eiken; EIKEN Manual, 栄研化学, (1977)  
"栄研マニュアル"