

2) 腸内細菌に関する実験操作

(独)農研機構 食品総合研究所 田村 基

はじめに

ビフィズス菌は乳酸菌とともにヒトの健康に寄与する重要な腸内細菌であり、ビフィズス菌の中には、プロバイオティクスとして食品に利用されているものがある。プロバイオティクスとして利用されているビフィズス菌は、ヒト由来であるため、ビフィズス菌のヒト糞便からの分離は、新奇機能を有するビフィズス菌を獲得する上でも重要なことである。本項では、腸内細菌に関する実験操作法の一つであるヒト糞便からのビフィズス菌の分離方法について述べる。

準備するもの

1. 実験器具

- ・無酸素注入装置(三紳工業株式会社製)等の無酸素ガス注入装置
- ・ガンマー線滅菌済みプラスチックシャーレ
- ・コンラージ棒(滅菌して使用)
- ・スプーン(滅菌して使用)
- ・白金耳(滅菌して使用)
- ・三角フラスコ 1L(培地の滅菌に利用)
- ・ブチルゴム栓 4号
- ・ビーカー
- ・試験管
- ・ビニール袋
- ・輪ゴム
- ・ステンレス製ブチルゴム栓押さえ(ステンレス製で高圧蒸気滅菌可能 写真1参照)
- ・嫌気性菌培養装置(アネロパック, ガスパックもしくはスチールウール法による嫌気ジャーいずれも可)
- ・グラム染色液
- ・スライドガラス(予めよく洗浄しておく)
- ・マグネティックスターラー
- ・回転子
- ・顕微鏡
- ・ミキサー(ボルテックス等)

- ・ ウォーターバス
- ・ 10mL ピペット(乾熱滅菌して使用)
- ・ 乾熱滅菌器
- ・ 高圧蒸気滅菌装置



写真 1 ステンレス製ブチルゴム栓押さえ (特注品)

2. 試薬

1) BL 寒天培地(日水製薬で調合済み培地として販売されている。)

- ・ 無菌馬脱繊維血液(日本生物材料センター製, 100mL 入り)

2) 嫌気性希釈液 A

- ・ KH_2PO_4
- ・ Na_2HPO_4
- ・ L-cystein · HCl · H_2O
- ・ Tween 80
- ・ カンテン

プロトコール

1. 嫌気性希釈液 A の組成および調整方法

1) 下記組成を混合し, Agar が完全に溶解するまで加熱する.

KH ₂ PO ₄	4.5 g
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
L-cystein · HCl · H ₂ O	0.5 g
Tween 80	0.5 g
カンテン	0.75 g
蒸留水	1000 mL

2) 無酸素ガス注入装置を利用し, O₂ free-CO₂ ガスを吹き込みながら嫌気性希釈液 A を試験管に 9mL ずつ分注し, ブチルゴム栓をする.

3) ブチルゴム栓押さえをして, 115℃, 20 分間高圧蒸気滅菌する.

2. BL 寒天培地の組成 58g(1 L 分)中および調整方法

1) 下記成分を精製水 1000mL に加温溶解する.

肉エキス	2.4g
プロテオーゼペプトン	10.0g
ペプトン	5.0g
ダイズペプトン	3.0g
酵母エキス	5.0g
肝臓エキス	3.2g
ブドウ糖	10.0g
溶性デンプン	0.5g
K ₂ HPO ₄	1.0g
KH ₂ PO ₄	1.0g
硫酸マグネシウム(七水塩)	0.2g
硫酸第一鉄(七水塩)	0.01g
塩化ナトリウム	0.01g
硫酸マンガン	0.007g
消泡剤(シリコン)	0.2g
Tween 80	1.0g
L-cystein · HCl · H ₂ O	0.5g
カンテン	15.0g
pH 7.2	

2) pH を調整後, 115℃で 20 分間高圧蒸気滅菌する.

- 3) 滅菌後，ウォーターバスを用いて 50℃程度に冷却する。
- 4) 50℃程度に冷却の後，滅菌ピペットを用いて，無菌馬脱繊維血液を培地量に対して 5%の割合で加えてよく混合した後，シャーレに分注する。
3. 糞便の採取および糞便希釈液の培地への接種方法
 - 1) ヒト糞便試料としては，一般に，自然排泄の糞便を用いる。一回の排便をビニール袋に集め，O₂ free-CO₂ ガスを満たし，ゴムバンドで縛り，均質になるようにビニール袋をよくこねて糞便を均質化する。
 - 2) 滅菌したスプーンを用いて速やかに秤量し，糞便を試験管内に入れる。
 - 3) 糞便約 1 グラム当たり嫌気性希釈液 A を 9mL 加え，O₂ free-CO₂ ガスを吹き込み，ブチルゴム栓をして，ボルテックスで均質になるまで混ぜる。
 - 4) 糞便希釈液に O₂ free-CO₂ ガスを吹き込みながら，順次 10 倍ずつ嫌気性希釈液で段階的に希釈を行う。
 - 5) 各希釈段階の希釈液を乾熱滅菌済みの L 型ガラス製コンラージ棒で，BL 寒天平板培地に 1/4 区画ずつ塗布する。
 - 6) 塗布終了した平板培地は嫌気性菌培養装置を用いて速やかに炭酸ガス培養を行う。
 - 7) 培養は，培養温度 37℃で，48～72 時間培養する。
4. ビフィズス菌の鑑別方法と分離
 - 1) ビフィズス菌の鑑別方法としては，最初に，BL 寒天培地上での集落の性状をよく見極め，ビフィズス菌であるか否かの推定を行うことが重要である。ビフィズス菌は，BL 寒天培地上で正円，半球状に隆起し，茶～褐色を呈する(写真 2 参照)。
 - 2) ビフィズス菌の分離の際には，このような集落の中で十分に分離した集落を BL 寒天培地上で見出し，滅菌処理済みの白金耳を用いて，釣菌し，新しい BL 寒天培地上に塗布し，再度，嫌気性菌培養装置を用いて炭酸ガス培養を行う。
 - 3) 培養は，培養温度 37℃で，48～72 時間培養する。
 - 4) ビフィズス菌の菌形態は，顕微鏡観察下で，多形性で，こん棒状，Y 字状，V 字状，湾曲状，球桿菌状を呈し，単在，二連鎖，短連鎖などの状態で観察されやすい。ビフィズス菌は，BL 寒天培地上では特徴的な形態を呈する。(写真 3 参照)



写真2 ビフィズス菌のコロニー
形態例 (BL 培地)

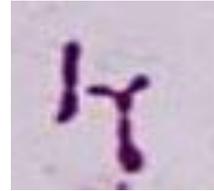


写真3 ビフィズス菌
の光学顕微鏡像写真

プロトコールのポイント

1. 糞便検体はなるべく新鮮なものを用いる。最も一般的なのが、自然排泄を用いる方法である。
2. 検体採取してから何らかの理由で直ぐには培養できず、数時間～十数時間輸送等を要する場合には、輸送培地に入れる。
3. 輸送培地の組成は、

ブレインハートインフュージョン (Difco)	37.0g
レサズリン(0.1%溶液)	0.5mL
カンテン (Difco)	1.0g
L-cystein · HCl · H ₂ O	0.5g
精製水	1000mL

である。

4. 輸送培地の作り方としては、上記各成分を加熱して水に溶かし、O₂ free-CO₂ ガスを吹き込みながら試験管に 9 mL ずつ分注し、素早くブチルゴム栓をする。
5. ブチルゴム栓押さえをしっかりとして、121℃ 15 分間高圧蒸気滅菌する。
6. シャーレに分注終了したばかりの BL 培地は、シャーレ内に水滴が付着している。これらの水滴は、嫌気培養の際のコンタミネーションの原因になるため、シャーレを逆さにし、乾燥器に入れ、37℃程度で一昼夜程度乾燥させて水分を取ってから使用する。
7. 高度な嫌気度を発育に要求する絶対偏性嫌気性菌を含む腸内細菌の糞便からの分離には、嫌気性希釈液 B を用いる。
8. ビフィズス菌であるかどうかの遺伝子レベルでの確認には、16S rRNA でのホモロジー解析等を活用する。

参考文献

- 1) 光岡知足, 腸内常在菌叢, 臨床検査, **23**, 320-334(1979).
- 2) 光岡知足, 腸内菌の世界, (叢文社), pp.53-65(1980).