

## 第6章 無菌操作の理論と実際

### 第1節 無菌操作に関する基礎知識

#### 1.1 一般的注意

細菌や真菌（カビなど）の微生物は、実験台、空气中、実験者の皮膚、衣服、呼気などあらゆるところに常在しているが肉眼では見えない存在である。実験操作において、不要な物質、特に実験結果を誤らせる物質が混入することをコンタミネーション（contamination）というが、微生物や動植物細胞の培養においては、実験の過程で他の微生物（以後、雑菌とする。）がコンタミネーションしないように常に注意を払うべきである。雑菌は適当な環境下で自律的に増殖するため、ごく少量のコンタミネーションが重大な失敗につながることに留意すること。具体的には下記の諸点に注意して操作することにより、雑菌の混入の危険性を最小限にできる（しかし0ではない）。

- 1) 使用する実験器具、実験試薬は必ず滅菌する。（【滅菌法】参照）
- 2) 実験器具、実験試薬の滅菌状態を維持するように努め、汚染源にできるだけ接触させないようにする。主な汚染源は操作している研究者自身であることに注意。
  - ・実験台の上はきれいにし、70%エタノールで拭いておく。
  - ・手はよく洗っておく。70%エタノールをかけてもよい。
  - ・白衣の袖口はまくっておく。
  - ・実験中はしゃべらない（口腔中には雑菌が大量に存在する。）。
  - ・手で触ったところは汚染されていると考える。
  - ・実験操作中に未滅菌のものへ接触することを避ける。
- 3) 実験操作中に浮遊塵、落下塵が混入しないようにする。
  - ・試薬や培養液のフタを開けておく時間は最小限にする。
  - ・フタを開けたものの上で作業をしない。
  - ・フタの開いたものの上に器具や手をもっていかない。
  - ・作業中は火炎（ガスバーナーあるいはアルコールランプ）によって上昇気流を起こし、埃が落ちてこないようにする。
  - ・微生物の植菌操作を行うときには、周辺の空気の移動を引き起こす行為を慎む。  
例えば、実験室の窓を開ける、操作中の人の脇をみだりに移動する、咳、くしゃみ等。
- 4) 実験終了後の培養液や菌体は滅菌処理の後に廃棄する。また、雑菌で汚染された培地についてもみだりに栓を開けたりせずに、滅菌処理した後廃棄する。

#### 1.2 無菌操作に必要な器具・装置

- 1) 白金耳（図 6-1A）：白金耳ホルダーの先に針金状の白金をとりつけ、先端をループ（直径 2 mm 程度）の形に加工したもの。細菌の接種などに使われる。白金は火炎滅菌での加熱後ただちに冷え、各種薬品におかされないという利点があるため使われている。
- 2) スプレダー（コンラジ棒；図 6-1B）：3～5mm 径のガラス棒を図のように加工したもの。三角形の部分で寒天平板培地（後述）の表面に細菌液を塗抹する。通常、アルミ箔でくるんで、乾熱滅菌かオートクレーブ滅菌して使用する。しかし 70%エタノール塗布後、火炎滅菌

して使用しても良い。ただしこの場合は白金時と較べてガラスはなかなか冷めにくいこと、急激な温度変化によりガラスにひびが入る可能性があることに注意。

- 3) 滅菌シャーレ、滅菌試験管：シャーレは直径 9 cm のものが多用される。プラスチック製で  $\gamma$  線滅菌済みの使い捨て (disposable) タイプのシャーレが広く使われている。試験管は硬質ガラス製で肉厚のものが適しており使用前に滅菌処理を施す。一般に試験管は反復使用することが多い。
- 4) 綿栓 (図 6-1C)：細菌培養実験に使用する試験管やフラスコの管口部の栓として、青梅綿 (脱脂していない綿) を固めて作る。綿栓の中を空気は通過できるが、微生物の通過は妨げられる。したがって培養中に外部からの雑菌の混入を防ぎながら、通気を確保できる利点がある。最近では、綿栓と同等の機能をもつシリコン製の多孔質の栓や紙製の栓も市販されている。
- 5) クリーンベンチ：無菌操作をするための装置で、前面にあるガラス製シャッターの下から内部に手を入れて実験をする。使用前に内部を紫外線殺菌灯により滅菌する。操作時には HEPA フィルターを通した無菌の空気が循環あるいは前面に吹き出され、外部空気中の雑菌が混入できないようになっている。内部にガスバーナーが備えつけられ、操作中の火炎滅菌が簡単に行えるものもある。
- 6) 滅菌器：乾熱滅菌器、オートクレーブ等。【滅菌法】の項を参照のこと。
- 7) その他：三角フラスコ、ピペット、ガスバーナー (またはアルコールランプ)、試験管立て、70 % エタノール入りの噴霧器等。

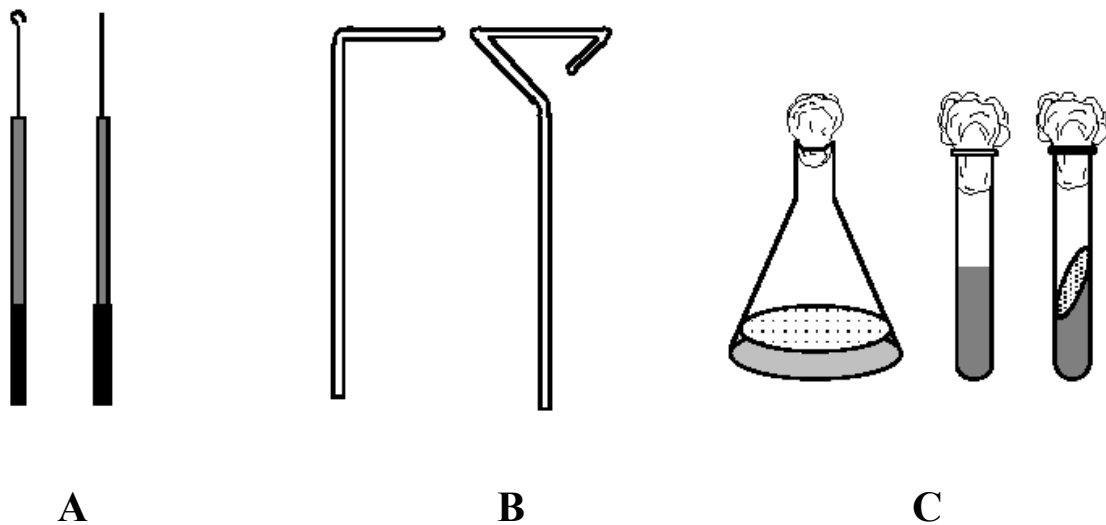


図 6-1 A. 白金耳 (白金線), B. スプレダー (コンラジ棒), C. 綿栓の例。

【滅菌法】滅菌法には以下の種々の方法があるが、対象物によって最適の方法を選ばねばならない。

- 1) 火炎滅菌：白金耳やフラスコ・試験管の口を炎であぶることによって加熱殺菌する。
- 2) 乾熱滅菌：主にガラス製の器具 (試験管, フラスコ, ガラスシャーレ, スプレダー) の滅菌処理に使われる。乾熱滅菌器を用いて、乾燥空气中で 165°C, 1~2 時間滅菌する。器具は十分に冷えてから使用する。試験管やフラスコの管口に綿栓を施したまま乾熱滅菌する

場合は、単に滅菌の意味だけでなく、綿栓にしっかりとした形をつける意味もある。培地等を含んだガラス器具を乾熱滅菌してはいけない。

- 3) オートクレーブ（高圧蒸気滅菌）：密閉した金属製の缶体の中で蒸気を発生させ、加圧水蒸気中（通常は大気圧＋約 1 気圧で、121℃の条件）で 20 分間加熱する。蒸気を用いる滅菌法で最も確実な方法で、細菌の孢子も完全に殺滅することができる。
- 4) ろ過滅菌：微生物の通過を妨げるのに十分な 0.22  $\mu\text{m}$  程度の孔をもつフィルターを通して滅菌を行う方法。加熱により分解される成分を含む培地はろ過滅菌を施す。
- 5) 薬品による滅菌：エチレンオキシドガス (EOG) を用いたガス滅菌が一般的である。加熱滅菌ができないプラスチック製器具の滅菌処理に用いられることがあるが、残留ガスにより微生物の増殖が阻害される可能性があるという問題点が指摘されている。また、無菌操作の開始時に実験者の手指や実験台の上を 70 % エタノールで簡易に殺菌することがよく行われる。
- 6)  $\gamma$  線滅菌：市販のプラスチック製器具の多くは  $\gamma$  線照射により滅菌されている。特殊な放射線照射装置が必要なため通常の実験室で汎用される滅菌法ではない。

## 第2節 細菌（大腸菌など）の培養に関する基礎知識

細菌を含め微生物は肉眼で見ることができない。そのため、自然界の微生物の存在は顕微鏡を通してのみ確認できる。しかし、個々はきわめて小さい微生物でも分裂を繰り返すことによって肉眼で見ることができる集落（コロニー；colony）を形成し、このコロニーを通して我々は微生物の存在を確認できる。

Louis Pasteur（1822～1895）らによって考案された液体培養法（liquid culture method）や Robert Koch（1843～1910）らによって考案された固体培養法（solid culture method）は、微生物研究者にとって、日常的に使用される技法である。さらに分子生物学的手法が広く普及した現在では、微生物以外の生物研究者にとっても大腸菌（*Escherichia coli*）の培養は必須のテクニックとなっている。

実際の実験では、液体培地を用いた液体培養と固体培地を用いた固体培養それぞれの特徴を考慮したうえで、実験目的に適した方法を選択する。

- 1) **液体培養**（liquid culture）：液体培地（liquid media）を用いる。系の中で比較的均一な増殖が期待できる液体培養法は、大量の細菌細胞を必要とする酵素や代謝産物、DNA や RNA などを調製する目的で使用されることが多い。また、細菌の増殖速度を測定するときにも液体培養法が一般的に用いられる。試験管やフラスコに入れた液体培地に細菌を接種しそのまま恒温器（incubator；インキュベーター）の中で静置する方法を静置培養という。一方、接種後に恒温器中で振盪する方法を振盪培養という。振盪器には往復振盪型（レシプロ型）と旋回振盪型（ロータリー型）がある。好気性細菌の培養においては、激しく振盪して十分な通気量が確保されなければならない。
- 2) **固体培養**（solid culture）：液体培地に寒天などを加えて固化させた固体培地（solid media）を用いる。細菌が自由に移動できないため分離したコロニーを得やすい固体培養法は、同じ遺伝形質をもつ一つの細菌細胞に由来するクローン（純系細胞）を取得しやすい。さらに個々のコロニーが一つの細菌細胞に由来すると仮定すれば、得られたコロニー数からもとの試料溶液中の細菌数を算出することができる。これをコロニー計数法といい、得られる数値は colony forming units（CFU）として表される。また液体培養より純系の細菌（細菌株）を維持・保存しやすい。実験目的によって、コロニーを目視し分離しやすい平板培地（plate）、細菌の保存に適した斜面培地（slant）、微好気性細菌の穿刺培養に用いられる高層培地（stab）などを使い分ける。

### 第3節 LB 寒天平板培地の調製

LB (Luria-Bertani) 培地は大腸菌の培養によく使われる。栄養基質としてカゼインの部分加水分解物であるトリプトンと酵母抽出物 (yeast extract) を含む。このような天然の有機物にはエネルギー源や炭素源、窒素源のほか、無機塩類やビタミン類も充分量含まれているので、大腸菌が良好に増殖できる培地を比較的簡単に作製できる。その他、浸透圧調節と pH 調整のために塩化ナトリウムと水酸化ナトリウムを適量添加する。

固体培地を作製するための固化剤としては、寒天、ゼラチン、シリカゲル、ゲランガム等のゲル化剤が用いられる。今回は紅藻由来の複合多糖である寒天 (agar) を LB 培地に加え、プラスチックシャーレに分注して固めた LB 寒天平板培地を作製する。

**【試薬】** Bact Tryptone, Bact Yeast Extract, NaCl, 5N NaOH, 寒天末, 蒸留水

**【器具】** 1L ビーカー, 1L 三角フラスコ, メスシリンダー, スターラー, スターラーバー, 9 cm プラスチック製滅菌シャーレ, 白金耳,

#### 【LB 寒天平板培地 (25 枚分) の調製】

1) 以下の試薬を計り、ビーカーの中に入れ、約 450mL の蒸留水を加えた後スターラーで良く攪拌して溶かす。

Bact Tryptone (Difco)	5g
Bact Yeast Extract (Difco)	2.5g
NaCl	5g
5N NaOH	100 $\mu$ L

2) 蒸留水を加えて 500 mL にメスアップする。

3) 7.5g の寒天末を加える。

4) アルミ箔で二重にフタをして、オートクレーブ滅菌する。(→5-1 参照)

\*滅菌開始前に缶体内に十分な水があることを確認する。

5) オートクレーブから取りだし、冷めないうちに穏やかにフラスコを振って、培地が均一になるようにする。このとき、できるだけ気泡ができないように注意する。

\*滅菌終了時に缶体のフタを開ける前に内部の圧力が充分下がっていることを確認する。

6) 65°C 程度に冷めたら、プラスチック製滅菌シャーレ 1 枚につき、20~25mL ずつ無菌的に分注する。

\*培地の量は適当でよい。液面の高さはシャーレの厚さの約半分のところに調節する。

8) 水平な所に置いて固まらせる。固まった寒天平板培地はビニール袋に入れ、4°C で保存できる。

## 第4節 LB 寒天平板培地への大腸菌液の塗抹と培養

寒天平板培養の目的の一つは、同じ遺伝形質をもつ一つの細胞に由来するクローン（純系細胞）の取得である。そのためには無数の細菌を含む試料溶液をできるだけ均一にかつ分散した形で寒天平板培地に接種する必要がある。まだ固化していない寒天培地を細菌試料溶液と混合した後にシャーレに注ぎ込む混釈法（pour method）は、コロニーが分散しやすいが、比較的熱い寒天含有培地に細菌が接触することから高温に弱い細菌（多くの海洋細菌）には適さない。一方あらかじめ作製した寒天平板培地上に白金耳や専用のスプレダーで細菌液を塗り付ける方法は、温度に気を使う必要がなく、また手法そのものも簡単なことから多用される。この際、細菌の付いた白金耳で平板培地表面に線を書くように塗布する手法を画線法（streak method）、コンラジ棒などを用いて細菌液を寒天平板上に塗抹する方法を塗抹法（spread method）と呼ぶ。ただしいずれの場合もすべての操作は無菌的に行う必要がある。

今回は、大腸菌試料を第3節で作製した LB 寒天平板培地に画線法で接種し、クローン化の技術を習得するとともに、無菌操作の必要性を実感してもらう。

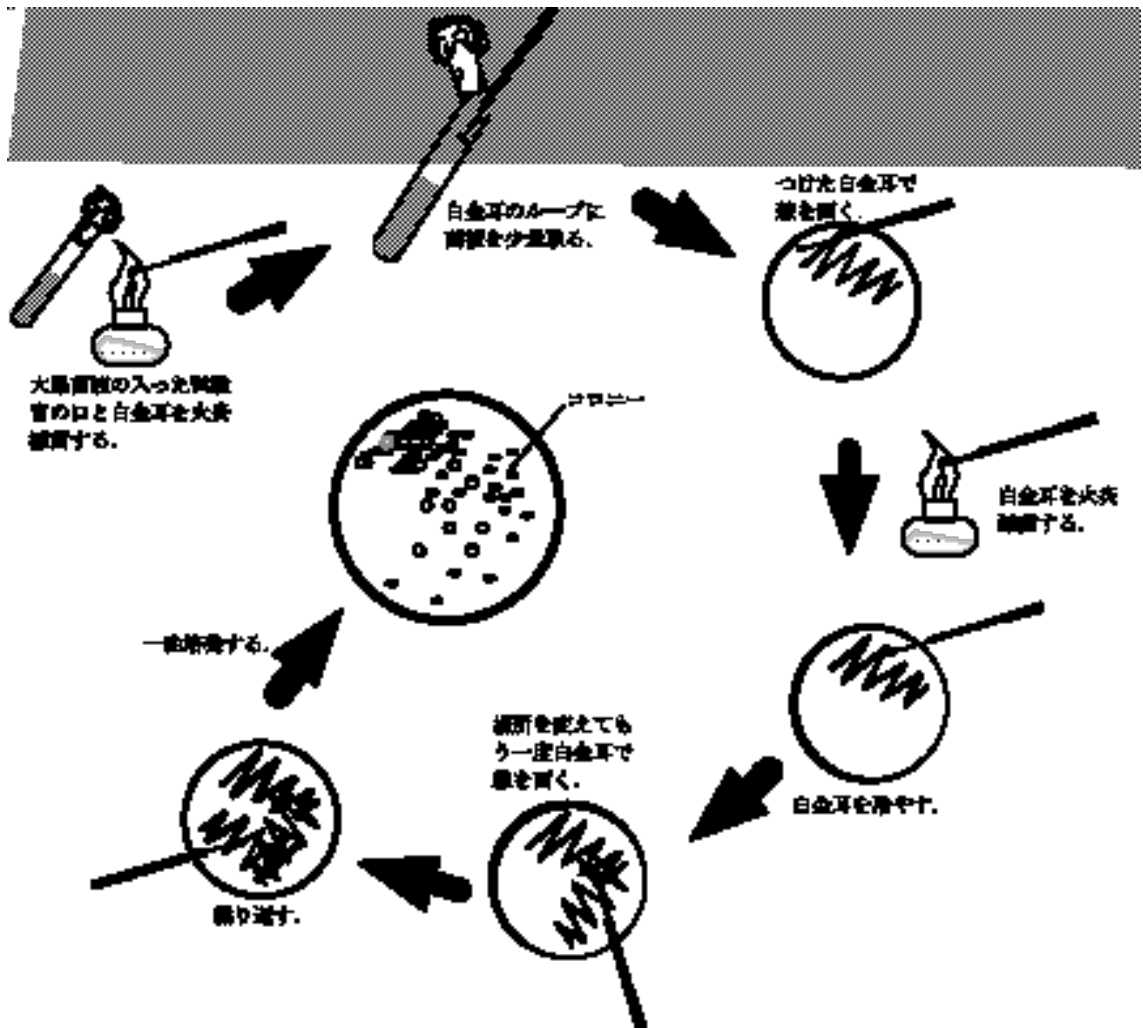


図 6-2 寒天平板培地への細菌の接種法（画線法）。

【細菌試料】 1) 大腸菌の菌液, 2) その他

【培地・器具】 第3節で作製したLB寒天平板培地, 白金耳, ガスバーナー

【大腸菌の接種】 (図6-2)

- 1) 実験台を無菌操作ができるように整える.
- 2) 白金耳をガスバーナーの炎であぶって滅菌する.
- 3) 白金耳を菌液に浸け, 冷めてから引き出す.
- 4) シャーレのフタの部分を下にして置いた平板培地の皿部分を逆さまのまま持ち上げ, 下からのぞき込むようにして下図のように画線する (力を入れすぎて, 寒天平板培地の表面を傷つけないように).
- 5) 白金耳を火炎であぶり, 一度滅菌する.
- 6) 白金耳を, 寒天平板培地の端の部分に刺して冷ます (寒天が融けない程度まで冷めればよい).
- 7) 3) で塗り付けた大腸菌を引き伸ばすように画線する.
- 8) 7) で画線した部分をさらに引き伸ばすように, 4) から 7) をもう一度繰り返す.
- 9) シャーレを逆さまにしたままパラフィルムを巻く\*.
- 10) 下記の温度条件で一晩培養し, 得られたコロニーを観察する.
  - a) 37°C, 気相インキュベーター
  - b) 室温 (約 15°C~25°C)
  - c) 5°Cの冷蔵庫

\*シャーレを逆さまにして培養するのは, 培養中に寒天平板の表面ににじみ出る水分 (凝集水) をフタの部分に落とすことにより, 1 つの細胞から増殖して形成されたそれぞれのコロニーが重なりあったりつながったりするのを防ぐためである.

【雑菌の確認】

- 1) 実験台を無菌操作ができるように整える.
- 2) LB寒天平板培地に指を押し付ける.
- 3) 手をよく洗浄した後, 別のLB寒天平板にもう一度指を押し付ける.
- 4) 実験室やトイレ, 廊下などでシャーレのフタを開け, 約10分間放置する.
- 5) 37°C, 気相のインキュベーターで1週間培養する.