感染症四方山話(9): 家庭でできる微生物実験 その2

Various topics concerning infectious diseases (9) Microbiological experiments in the home (2)

東京女子医科大学 感染症科 教授 菊池 Ken Kikuchi, MD, PhD.(Professor)

Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University

1. はじめに

THE CHEMICAL TIMESの連載もいつの間にやら9 回を数えるようになった。感染症ネタは浜の真砂のよう に尽きるまじ。お楽しみはこれから。

ついでに私事ながら、4月1日より元在籍していた東 京女子医科大学に8年ぶりに戻ることになった。大学 院生の指導中心の研究生活から、一気に臨床・感染 対策が中心の生活にコペルニクス的転回と相成った。 奇しくも前号で述べた自分の描く理想の感染症医を育 てることが第一の仕事となった訳である。およそ学問的 とは言えないこの随筆ではあるが、日々の気分転換に、 今後も引き続きお付き合い願いたい。

さて、2010年, No.3(217号)の感染症四方山話第1 回は「家庭でできる微生物実験」であった。時期的に 夏休み前であり、問い合わせが結構あったと聞く。以前 から、「あの続編を | との希望が編集部にも寄せられて いた。出し惜しみしていた訳ではないが、夏休み前とい うタイミングを逸していたのだ。今回の原稿が掲載され る頃は丁度、その時期になろう。ルールは前回同様、夏 休み自由研究にも応用ができるように「家庭内にあるも ののみを使用する」である。それでは「家庭で楽しむ微 生物実験第二部」の始まり、始まり。

2. テーマの選択:身の回りから抗菌物質を探そう

さて、家庭で微生物実験をしようと思った時、何が 一番、子供達の興味を引くのであろうか。家庭内にあ るものを用いた上で、

- 1) 結果が目に見え、わかりやすい。
- 2) 自分の日常生活に置き換えて、想像力をかき立て
- 3) 安全で、病原性、危険性がない。

ことが条件となろう。それでは、何を調べてみようか。 最近の日本人の抗菌製品好きは異常な程だと思う が、古来、我々は高度な低温殺菌技術であるパス チュラリゼーションを日本酒の「火入れ」としてパスツー ルが記載する200年以上前から使いこなしてきた。一 方で、梅干し、わさびなど天然の抗菌物質を食中毒 や腐敗防止に役立ててきていた。発酵と抗菌をうまく 使い分けてきた民族なのである。こうした技術を応用 し、最近では弁当にのせる「わさびシート」も発売され ている。また、香辛料のタイム、オレガノ、クローブなど から得られる精油には強い抗菌活性があることも経験 的に知られていた。植物には我々の持つような免疫担 当細胞による複雑なネットワークを介する生体防御機 構はない。その代わり、自身の産生する様々な抗菌物 質による自然免疫(innate immunity)を発達させてい る。我々の身の周りには抗菌物質は思った以上に普 遍的にあるのだ。

医療機関においては、抗菌活性は、感染症由来微 生物に対する治療薬を選択するため、「感受性試験」 という検査で日常、測定されている。古くから用いられ ているのは「ディスク法」という手法だ。調べたい患者 から分離された病原菌を寒天平板に塗り広げ、その 上に候補となる治療薬を含んだ濾紙ディスクを置く。 濾紙ディスクからは抗菌薬が同心円状に寒天にしみ

出し、一定の濃度勾配を形作る。孵卵器に入れ、培 養すると、その病原菌がある抗菌薬に感受性を示せ ば、一定の濃度の所で発育が阻止される。即ち、濾 紙の周りに「発育阻止円」と呼ばれる、菌の発育しな い部分ができる。この直径を測定して、抗菌薬が実際 に使用された時に、感染巣内で効くかどうかを判定す ることになる。

抗菌活性の検出はこれをそのまま使用すれば良い。 指標微生物の上に、抗菌活性を調べたい物質を液状 にして、スポットする。ディスク法では抗菌薬をしみ込ま せた小さな(直径6ないし8mm)濾紙を寒天平板上に 置いていく。ディスク以外では金属製の円筒を置き、そ の中に抗菌薬溶液を注入するカップ法等がある。こう した手法は実験室内でしか用いられない特殊な物品 (濾紙、金属製カップ)を必要とするが、当然、家庭内 にはない。しかし、考えてみよう。第一の目的は「抗菌 活性があるか、ないか」の判定にある。厳密な定量性 を求めている訳ではない。要は、一定量、あまり平板に 広がらないように、載せることができれば良い。とすれ ば、「試料を寒天平板に直接1滴、滴下する」、「同じ 位の面積になるよう、爪楊枝などで塗り付ける」で十分 だ。また、実例を後程示すが、ストローを使えば、簡単 に寒天に一定口径の穴を開けることはできる。

問題となるのは、抗菌活性を検証する指標微生物 に何を選ぶかである。実験室なら、純培養した微生物 が保管されており、指標微生物を-80℃などの保管状 態から、再度、培養して、汚染がないことを確認した 上で、実験に供する。即ち、家庭内実験で一番問題 になるのは、「純培養した微生物をどのように入手する か」である。微生物実験では「コンタミネーション、汚 染」を最も嫌がる。汚染は実験の失敗を意味し、屈辱 である。家庭内実験であってもコンタミネーションは許 すまじ。

味噌、ぬか漬け、キムチなどの各種漬け物、甘酒、 ヨーグルト、ワイン、最近はやりの麹など、家庭内には生 きたままの微生物を含む食品は多く、本来は材料に事 欠かない筈である。しかし、発酵食品の多くは複雑な 菌叢が地域や「家」の伝統の味を再現している訳で、 これらから実験対象となる微生物を分離・増殖させる のは難易度が高く、子供の科学にはちと無理がある。 では純培養した微生物はないのだろうか。

麹は近年のブームでスーパーマーケット等でも置い てあるところが増えた。いわゆる「もやし(種麹菌)」は Aspergillus oryzaeを蒸し米(rice agarだ!)で増殖させ たものだ。麹表面の緑色の粉状の分生子を取れば、 ほぼ純培養菌として使用することができる。しかし、糸 状菌は増殖させれば、菌糸を延ばし、分生子を作る。 形態的にも大きくなり、試料に抗菌活性がないか、微 弱であれば、周囲の菌糸、分生子に覆い尽くされて、 何が何だかわからなくなるだろう。また、麹に病原性・ 危険性はないが、分生子を周囲に撒き散らすことには なろう。台所にある様々な食品に麹黴が汚染すること にもなりかねない。これは避けたい。

その点、四方山話1に書いたように納豆菌(Bacillus subtilis subsp. natto:正確には枯草菌の亜種)は便利 だ。最近では自家製納豆用に純培養した芽胞液も市 販されている。台所に納豆菌芽胞を常備している家庭 は稀だろうが、納豆はコンビニでも売っている。高温で 培養することで、他の腐敗菌の汚染を防いでいるた め、ほぼ純培養となっている。また、近年の家庭用ベー カリーの普及等で、スーパーなどでドライイーストが簡 単に入手出来る。これも扱いやすいだろう。

それでは、パウル・エーリッヒかフレミングになったつ もりで、「抗菌物質、抗真菌物質を探して」みることに しよう。

3. 材料と方法

材料、機器 図1~9参照

■納豆:

何でも良い 今回はおかめ納豆を使用(図4)

■ドライイースト:

日清 ホームベーカリー用スーパーカメリヤ ドライ イースト(3g 包装品)(図4)

- ■マグカップ2個(菌液調整用)
- ■培地の材料(図1)

砂糖や寒天末をg単位で秤量するのは難しいので、 簡便なステッィクタイプや固形コンソメの素を使用し た。

- コンソメの素: 今回は味の素 固形コンソメを使
- グラニュー糖(コーヒー用のスティックシュガー 3g

入りを使用)

- 粉末寒天(松本寒天産業製 4g入りス ティックタイプ)
- ■培地を流し込む容器:

100円ショップで見つけた蓋にエアー弁の ついたタッパーウェア 3個100円(山田 化学製 ビストロシェフ)(図3)

- ■滅菌綿棒(100円ショップの開封していな い綿棒でOK)
- ■スポイト(試料添加用、文房具店やスー パーで入手可能)
- ■駒込ピペット用ゴムキャップ(文房具店で 入手可能)
- ■ストロー(口径5mmの比較的太い個別包 装のもの:駒込ピペット用ゴムキャップがピ タリと入る)
- ■消毒用アルコール
- ■大きめの耐熱ガラス容器かタッパーウェア (ここでは、パスタを電子レンジで作るガラ ス容器を使用した)(図5)
- ティッシュペーパー
- ■おろし金(おろしにんにく作成用)
- ■抗菌力を調べた試料(図2)
 - チューブ入り生姜(ハウス食品 おろし 生しょうが)
 - チューブ入りからし(ハウス食品 ねりか
 - チューブ入りおろしにんにく(ハウス食品 おろし生にんにく)
 - チューブ入りわさび (カメヤ おろし伊 豆本わさび)
 - チューブ入り西洋わさび(ハウス 無着 色ホースラディッシュ)
 - チューブ入り梅肉(ハウス 無着色梅 肉)
 - チューブ入りバジルペースト(イタリア GIA製)
 - 辣油(ハウス 辣油 辛口)
 - にんにく(青森産)
- ■手指消毒用アルコールゲル(薬局で購入 可 コントロール用)



図1 培地材料



図2 抗菌力を調べた試料



図3 寒天を入れた容器





図5 培地作成用耐熱ガラス容器(パスタ用)



図6 綿棒で培地に菌液を塗布する



図7ストローで培地に穴を穿つ

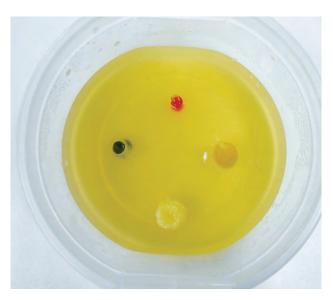


図8 試料添加後の培地



図9 試料添加終了した培地

■簡易孵卵器:

発泡スチロール製保冷コンテナー(魚などを入れる 保冷箱である)

- 2Lのペットボトル
- ■温度計
- ■電子レンジ
- ■やかん

方法

1. 簡易孵卵器の作成

これは四方山話1で使用したもの。保冷コンテナー の蓋に錐で穴をあけ、温度計をさして、孵卵器とし た。沸騰したお湯を入れたペットボトルが熱源であ る。12時間程>37℃を保つことができる。培養用。

- 2. 培地を入れる容器(図3)は洗って、消毒用アルコー ルでよく拭いた。
- 3. 菌液調整用マグカップは水を入れ、電子レンジで沸 騰させて、熱湯消毒した。
- 4. 培地作成

水 300ml、コンソメの素1個、粉末寒天1本(4g)、 スティックシュガー1本(3g)を耐熱ガラス容器に入 れ、電子レンジで加熱する。沸騰して、内容物が 全て溶解し、透明になったら取り出して、触れる位 まで(50℃位)室温で冷ます。

冷めたら、培地作成用のタッパーウェアに30mlず つ注ぎ込み、固める。

- 5. 納豆1パックを菌液調整用マグカップに入れ、水 100 mlを加えて、よく混ぜる(納豆菌液)。
- 6. ドライイースト1袋を菌液調整用マグカップに入れ、 水 100 mlを加えて、よく混ぜる(イースト 菌液)。
- 7. 各菌液に綿棒を浸し、冷えて固まった寒天の上を 傷つけないように塗る。寒天が完全に固まってから 作業すること(図6)。
- 8. ストローに駒込ピペットのゴムキャップをかぶせ、ゴ ムを押したまま、垂直に寒天に穴を開ける。ゴムを 開放しながら(ストローの中に入った寒天を吸い上 げながら)、ストローをゆっくり引き上げると、ストロー 口径の穴が開く(図7)。
- 9. 調べたい試料を寒天の穴の中にスポイトを用いて 入れる(辣油、おろし生にんにく、アルコールゲル、 バジルペーストで使用)。チューブ入りのものはその まま、寒天平板の上に載せる(図8)。

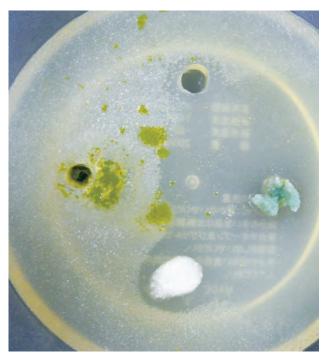


図10 納豆菌の発育阻止円 上より左回りにアルコールゲル、バジルペースト、チューブ入りにんにく、 おろし生にんにく(緑色に変色) おろし生にんにくで大きな阻止円が観察出来る。アルコールでは阻止円 内部に芽胞から発育したと思われる数個のコロニーが観察出来る。

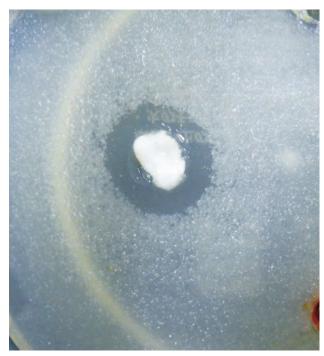


図 11 チューブ入りにんにくによる納豆菌の発育阻止円拡大図

- 10. 寒天容器の蓋をした後、蓋は開のままで簡易孵卵 器に入れる(図9)。
- 11. 温度計を見て、簡易孵卵器の温度が37℃以下に ならないように、お湯を時々交換する(1回の交換 で12時間位、温度を保つことができる)。
- 12. 24時間後に取り出して、阻止円ができたかどうか、 確認する。

4. 結果

図10,11にチューブ入りにんにく、おろし生にんにく の納豆菌に対する発育阻止効果(阻止円)を示す。生 にんにくの抗菌作用はずば抜けており、非常に大きな 阻止円を形成しているのがわかる。チューブ入り生姜に も小さい阻止円を認めた。梅肉は納豆菌の増殖を強力 に抑えた。アルコールゲルは芽胞には効かないので、小 さな阻止円の中に納豆菌がぱらぱら生えてきていた。 バジルペースト、辣油、チューブ入りわさび、チューブ入 り西洋わさび、チューブ入りからしは抗菌活性を示さな かった(表1)。

表1 各試料の抗菌活性

試料	標的微生物に対する 阻止円直径(mm)	
	納豆菌	パン酵母 (イースト)
チューブ入り生姜	7	0
チューブ入りからし	0	0
チューブ入りにんにく	14	8
チューブ入りわさび	0	0
チューブ入り西洋わさび	0	0
チューブ入り梅肉	80	0
チューブ入りバジルペースト	0	0
辣油	0	0
おろし生にんにく	55	35
アルコールゲル	13	14

5. おわりに

にんにくに含まれるアリインはスルホキシドで、システィ ンから合成される。にんにくをすりおろすと、細胞内に含 まれるアリナーゼが活性化し、アリインは強力な抗菌物 質アリシンに変換される。これがにんにくの抗菌活性の 正体である。調べていたら、海外ではこのアリシンが Allimaxというサプリメントとして販売されていることに驚 いた。これだけ強力かつ広域抗菌スペクトラムを持つも のをサプリメントとして摂取したら、腸内細菌叢は大きく 変化すると思うのだが。どのように使用されているのか、 興味深い。また、Allimaxはライム病の治療薬として治験 も行われているそうだ。いつの間にか、にんにくはメ ジャーの舞台に躍り出ようとしている。

今回、作成した寒天は酵母の発育にはあまり適さな かったようで、発育は納豆菌より不明瞭だった。以前、よ く真菌培養に用いるMalt extract agarを模して、「ビール 培地」で実験した経験があり、こちらは非常に発育が良 かったので、イーストを指標とする場合には、こちらの培 地の使用をお勧めする。作り方は簡単である。今回と同 じ寒天4g、砂糖3gに、コンソメの素と水の代わりに一晩 放置して炭酸とアルコールの蒸発した(気の抜けた) Pure malt のビール (エビス、ピュアモルトなど) 300ml を加 え、電子レンジで溶かし、容器に流し込めば良い。余談 だが、この時、一番最初はいわゆる混釈培地を作成し た。すなわち、ドライイーストを冷めたビール培地に塗る のではなく、固まる前にドライイーストを培地の中に加え、 均一にしてから、容器に流し込んだのだ。すると、驚くべ きことが起こった。みるみる培地は膨張し、あたかも地表 に活火山が誕生したように、山頂が炸裂し、「ぱふっ」と 炭酸ガスを放出した。一瞬の出来事にしばし呆然とし た。これは何か細めの容器に入れれば、容器から飛び 出してくる寒天の姿に酵母発酵のダイナミックさを更に 実感出来るのではないかと思う。お試しあれ。

試料調製には、例えばタイム、オレガノなどの香辛料 ならサラダ油などと一緒に砕く、紫蘇、バジルのような葉 もの、花弁、みかんの皮のようなものなら水を少し加えて ブレンダーにかけるか、すり鉢ですりつぶせば良い。かよ うに本実験は様々なバリエーションが可能である。いろ いろ工夫して試して頂ければ、夏休み、親子で楽しいひ と時を過ごせるのではないかと思う。是非、お試しあれ。