

ヘリコバクター汚染マウスからの細菌分離

鍵山壮一郎、田島 優、竹中やよい、吉川理香、黒澤 努

大阪大学医学部附属動物実験施設

はじめに

ヘリコバクターはマウスに腸炎や肝炎を引き起こすことが知られており、マウスの重要な病原菌となりつつある。大阪大学医学部附属動物実験施設ではSPF環境下で免疫不全を伴う多くのトランスジェニックマウスを収容している。近年、他の研究施設から多くのマウスが導入されているが、この病原菌に関する微生物モニタリングを行っていない。免疫不全動物にとって重要な病原菌である可能性があることから、この病原菌による汚染動物の検出法を確立することは重要である。我々は第130回日本獣医学会で糞便からのPCR法を用いた菌の検出法を報告した。今回、その方法で陽性と判定された個体から菌の検出を試み、分離株を得ることができたので報告する。

材料と方法

動物 : A社から導入したマウス2系統、各3匹を用いた。

液体培地 : 5%ウシ胎児血清加ブルセラブローズ。

寒天培地 : 5%ウシ胎児血清加1%バクトアガー加ブルセラブローズ。

材料採取 : 滅菌したピーカーに動物を1匹ずつ収容し、30分後に動物を取りだし、排泄された糞を無菌的に個体別にチューブに採取し、分離まで4°Cに保存した。

分離 : 採取した糞1個を滅菌チューブに取り0.5mlの液体培地を加えホモジナイザーで懸濁後、さらに0.5mlの液体培地を加え攪拌し、0.45 μ mのフィルターで濾過後、その濾液20 μ lを寒天培地に滴下し微嫌気培容器で培養した。各材料から平均3個のコロニーを三角に裁断した滅菌ろ紙を使って釣菌し、新たな寒天培地に画線し培養した。コロニーが観察できる培養4から5日後にろ紙を使って同様に釣菌し、この操作を3回行なって菌の株化を行なった。株化した菌をろ紙で釣菌し、このろ紙を液体培地0.5mlを入れたチューブに入れ、増菌培養した。

培養条件 : 培養時のガス濃度はそれぞれN₂ 85%、CO₂ 10%、O₂ 5%とした。培養温度は37°Cとし、培養期間は4から5日とした。培容器内の湿度を保持するため、キムタオルに蒸留水を含ませたものを容器内に用意した。

菌染色 : 増菌培養した菌液をスライドガラスに取り火炎固定後ギムザ染色した。

PCR : 既報の方法により、PCRを行ない、アガロースゲルで電気泳動し、バンドを確認した。

結果

各分離材料からは数個から数百個のコロニーが観察された。全15株の菌株を分離、増菌した。菌の染色による形態観察やPCR法による菌の同定を行い、分離された菌種を明らかにした。