



微生物の利活用 基礎講座2025

第1部：嫌気性菌の培養及び保存方法

2025年2月14日（金）

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジーセンター（NBRC）

生物資源利用促進課 玉澤 聡

- 嫌気性菌の基礎知識と今すぐ使える取扱技術の紹介

- ① 嫌気性菌の基礎知識

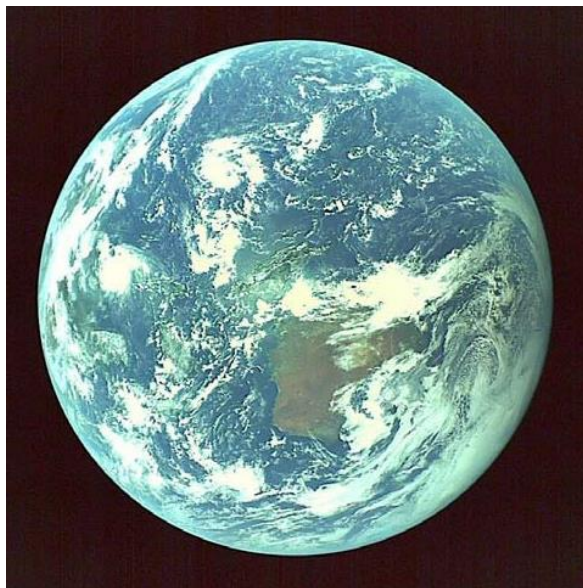
- ② 嫌気性菌の培養

- 培養方法の検討、培地作製、培養

- ③ 嫌気性菌の保存

- 保存方法の検討、凍結標品の作製、凍結標品の復元

①嫌気性菌の基礎知識



https://www.jaxa.jp/countdown/f18/live/missionphoto_j.html

地球上の微生物の総数
~ 10^{30} 個

海洋： 1×10^{29}

海洋堆積物： 5×10^{28}

海底下： 4×10^{29}

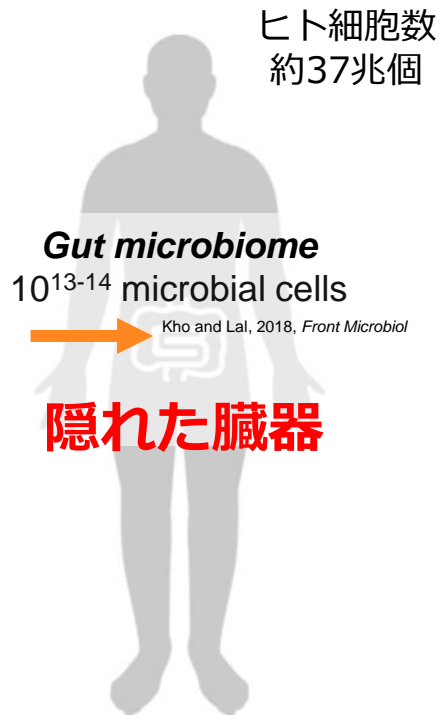
土壌： 3×10^{29}

陸域地下： $2-6 \times 10^{29}$

嫌気性菌はどこにでもいる

嫌気性菌は様々な分野で大活躍

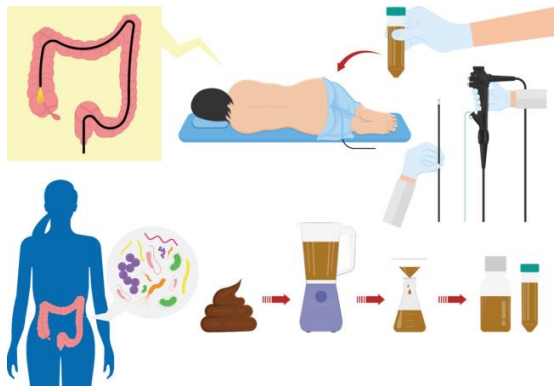
医療・ヘルスケア分野



ヒト腸内細菌、約100兆個、約1000種

- ・ヒトが分解できない物質を分解
 - ・免疫系のバランスを調節
 - ・腸管バリア機能を高める
 - ・ストレス対処能力向上
- ヒトの健康維持には非常に重要

<https://www.terumozaidan.or.jp/labo/technology/38/images/humanFloraMap.pdf>



メタジェンセラピューティクス株式会社 プレスリリース, 2021

ヒトマイクロバイオーム 市場規模

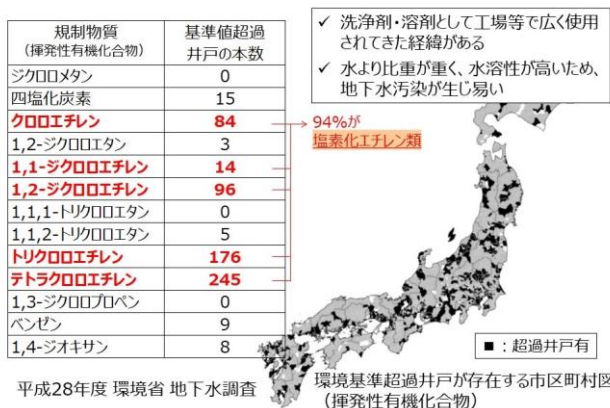
2022年：5.7億ドル
2030年：27億ドル

産総研マガジン マイクロバイオームとは？, 2023

嫌気性菌は様々な分野で大活躍

環境保全分野

「デハロココイデス属細菌UCH007株を用いる塩素化エチレン類で汚染された地下水の浄化技術の開発」



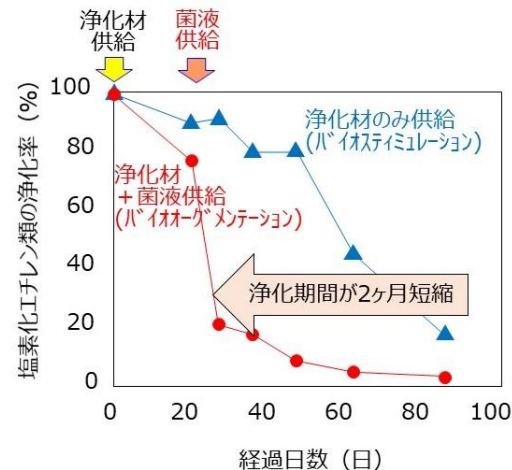
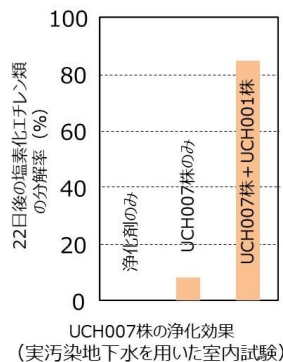
- ✓ 洗浄剤・溶剤として工場等で広く使用されてきた経緯がある
- ✓ 水より比重が重く、水溶性が高いため、地下水汚染が生じ易い

新たな手法で
(シエイクアガー法)
国内で初めてデハロ菌
の単離に成功
(特許第6103518号)



デハロ菌の脱塩素反応を促進する細菌も発見

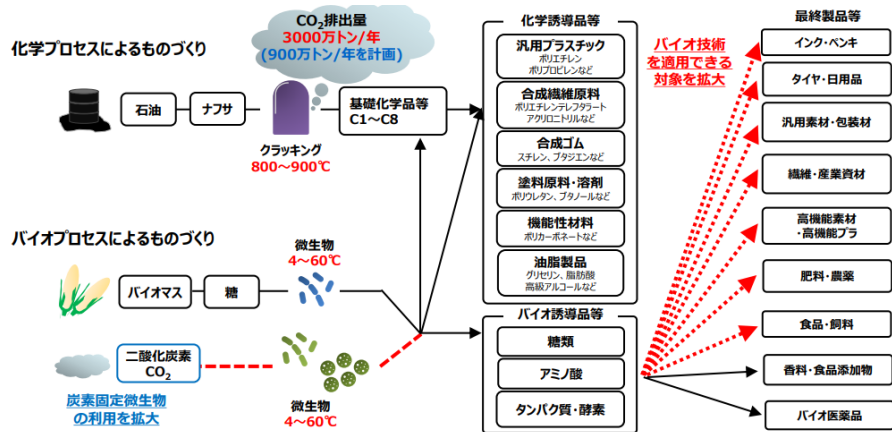
- UCH007株とUCH001株の共培養により
- ✓ 塩素化エチレン類の浄化期間を短縮
 - ✓ 短時間で多くのデハロ菌を培養可能



環境汚染物質を無害化する機能を有する

嫌気性菌は様々な分野で大活躍

バイオものづくり分野



CO2固定微生物を用いた事業に取り組んでいるベンチャー・スタートアップ企業 (嫌気性菌を抜粋)

国	企業	連携機関	創業	微生物種	原料等	遺伝子組換え	プロダクト	取組内容等
米国	LanzaTech	積水化学工業、ブリヂストン、住友理工、三井物産(出資)等	2005	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	CO, CO2+ 水素	Y	エタノール、エチレン、イソプロパノール、アセトン、モノエチレンジングリコール等	COやCO2を含むガスを基質としてガス発酵技術によりエタノール等を製造するプロセスを開発し、当該技術のライセンス供与を行っている。
米国	Superbrewed Food	Cargill、Bel Group	2012	<i>Clostridium</i> 属細菌+CO2菌等	糖+CO2	N	タンパク質、バイオケミカル、バイオ燃料	植物を原料として細菌を嫌気発酵し、タンパク質粉末を製造



米国大統領令 (令和4年9月12日)

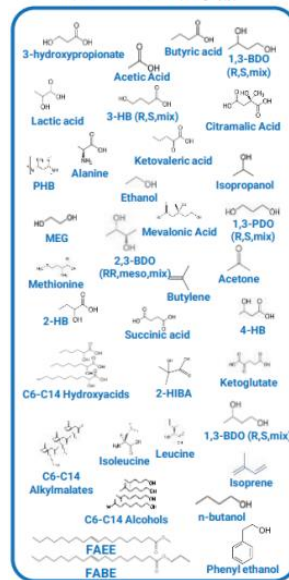
- バイオものづくりが今後10年以内に世界の製造業の3分の1を置き換え、その市場規模が約30兆ドル(約4000兆円)に達すると分析
- 世界中でバイオ分野の技術覇権競争が加速している状況を踏まえ、バイオものづくりの拡大等に向けて集中的な投資を行う方針

米国における合成生物学ベンチャーへの民間投資額

2019年 約4000億円 → 2021年 約2兆円
(注1) 1米ドル=110円換算

経済産業省 バイオものづくり革命の実現より抜粋, 2023

ポテンシャル化学品

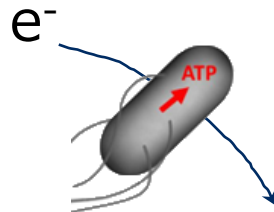


嫌気性菌によるバイオものづくりは急速かつ長期的な発展が期待されている

電子の受け渡しによりエネルギーを生成

エサ（電子供与体）

有機物
無機物



受け皿（電子受容体）

酸素
酸素以外
自身の中間代謝産物（有機物）

呼吸：e⁻の受け渡し先が**酸素**：**好気呼吸**

e⁻の受け渡し先が**酸素以外**：**嫌気呼吸**

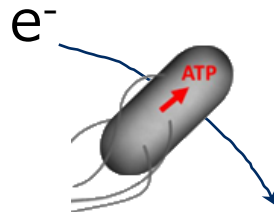
フマル酸、硝酸、鉄、マンガン、硫酸、二酸化炭素

発酵：e⁻（有機物）の受け渡し先が**有機物**：**発酵**

電子の受け渡しによりエネルギーを生成

エサ（電子供与体）

有機物
無機物



受け皿（電子受容体）

酸素
酸素以外
自身の中間代謝産物（有機物）

呼吸： e^- の受け渡し先が**酸素**：**好気呼吸**

e^- の受け渡し先が**酸素以外**：**嫌気呼吸**

フマル酸、硝酸、鉄、マンガン、硫酸、二酸化炭素

発酵： e^- （有機物）の受け渡し先が**有機物**：**発酵**

②嫌気性菌の培養

嫌気性菌の培養に必要な設備・物品

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

設備

- 局所排気装置
- ガス噴射機

物品

- ガスボンベ (Ar, N₂, N₂/CO₂, H₂/CO₂等)
- 密閉可能な培養容器
バイアル瓶、アネロパック
- ブチルゴム栓、アルミシール
- クリッパー (バイアル瓶の蓋締め)
- シリンジ (1, 2.5 ml)
- ニードル (20-27 G)



嫌気グローブボックスは無くても大丈夫！

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種



もちろん、あると良いですが
使用せずとも多くの嫌気性菌
を培養できます！

目的や菌株の特性に合わせて選択

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

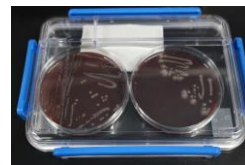
液体培養

- 試験管
- バイアル瓶



個体培養

- 斜面培地 in バイアル瓶
- プレート



腸内細菌の多くはアネロパックで培養可能です

嫌気性菌の培養

市販試薬の使用が楽です！

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

Medium No.	312
Medium	GAM Medium
Composition	
Nissui GAM Broth*	59 g
Distilled water	1 L
	pH 7.3
*Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan.	
Comment	

混ぜるだけで簡単

合成培地の場合

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

Medium No.	1067
Medium	<i>Methanobacterium</i> Medium
Composition	
KH ₂ PO ₄	0.136 g
NH ₄ Cl	0.54 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.147 g
NaHCO ₃	2.5 g
Bacto Yeast Extract (Difco)	0.2 g
Sodium acetate	0.8 g
Vitamin solution*	10 ml
Trace element solution**	10 ml
Resazurin	1 mg
Cysteine-HCl	0.5 g
Na ₂ S·9H ₂ O	0.5 g
Distilled water	1 L

一つ一つ秤量して添加するのは面倒

ストック溶液の作製をおすすめします！

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

Medium No.	1067
Medium	<i>Methanobacterium</i> Medium
Composition	
KH ₂ PO ₄ solution (13.6 g/L)	0.136 g → 10 ml
NH ₄ Cl sol. (53.5 g/L)	0.54 g → 10 ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O sol. (20.3 g/L)	0.2 g → 10 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O sol. (14.7 g/L)	0.147 g → 10 ml
NaHCO ₃	2.5 g
Bacto Yeast Extract (Difco) sol. (20 g/L)	0.2 g → 10 ml
Sodium acetate sol. (80 g/L)	0.8 g → 10 ml
Vitamin solution*	10 ml
Trace element solution**	10 ml
Resazurin solution (1 g/L)	1 mg → 1 ml
Cysteine-HCl	0.5 g
Na ₂ S·9H ₂ O	0.5 g
Distilled water	1 L

個々の試薬添加を高濃度
ストック溶液で行えば
培地作製が楽に

大量に培地を作製する際は
分注器が便利



培地中の酸素をできる限り取り除く操作

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種



ガスポンベ

- ・ N₂ガス (G3グレード)
- ・ Arガス (G3グレード)
- ・ N₂/CO₂ 混合ガス (80:20)
- ・ H₂/CO₂ 混合ガス (80:20)



ガス噴射機
(ドラフト内で使用)



ガス置換装置
(安全キャビネット内で使用)

安価に作製可能

培地を培養容器に分注した後、培地に無酸素ガスを通気することで酸素を除去する

高価だが高機能

バイアル瓶に無酸素ガスを封入、連結する真空ポンプで吸引することで酸素を除去する

任意で陽圧または陰圧にすることができる

嫌気性菌の培養

培地中の酸素をできる限り取り除く操作

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種



ガスポンベ

- ・ N₂ガス (G3グレード)
- ・ Arガス (G3グレード)
- ・ N₂/CO₂ 混合ガス (80:20)
- ・ H₂/CO₂ 混合ガス (80:20)



ガス噴射機
(ドラフト内で使用)



ガス置換装置
(安全キャビネット内で使用)

①曝気法

培地を培養容器 (バイアル瓶) に分注



培地に無酸素ガスを通気

5-10 min



ブチルゴム栓、アルミキャップで密栓してオートクレーブ

<要注意>

培地によっては吹きこぼれる

- ・ 消泡材の添加
- ・ ニードルを立てる

嫌気性菌の培養

培地中の酸素をできる限り取り除く操作

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

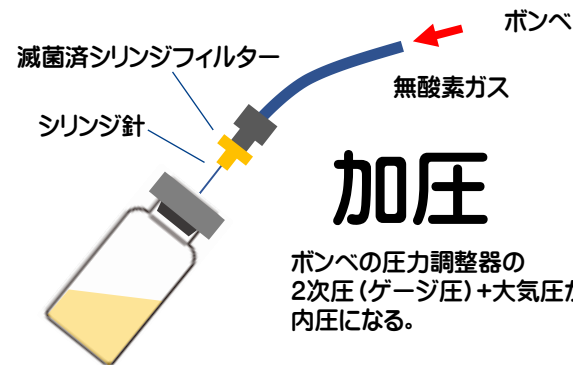
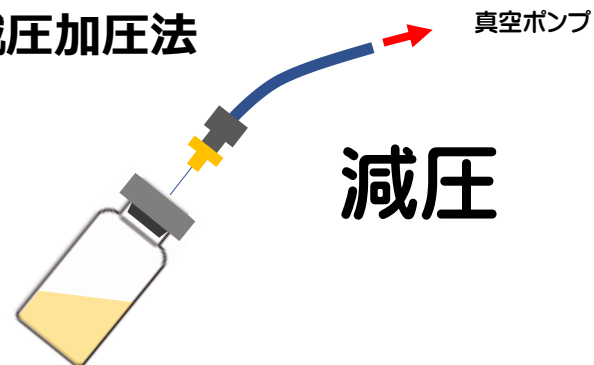


ガス置換装置
(安全キャビネット内で使用)

バイアル瓶に無酸素ガスを封入、
連結する真空ポンプで吸引する
ことで酸素を除去する

任意で陽圧または陰圧に
することができる

② 減圧加圧法



ポンプの圧力調整器の
2次圧(ゲージ圧)+大気圧が
内圧になる。

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

①後入れ試薬の添加

- ビタミン溶液
- 還元剤
- 基質

②バイアル瓶ヘッドスペース（気相）の再置換（オプション）



この部分

嫌気性菌の培養

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

① 後入れ試薬の添加（予めガス置換しておく）

- ビタミン溶液（フィルターろ過）
- 還元剤（オートクレーブ or フィルターろ過）
- 基質

シリンジ内のガス置換



シリンジにニードルをセット
無酸素ガスを吸引&排出×2回

後入れ試薬の溶液を吸引



シリンジを軽く弾いて気泡を除去

ニードルを外し、フィルターと新しいニードルをセット
溶液を少量排出



培地のブチルゴム栓に刺し入れ溶液を添加

嫌気性菌の培養

①後入れ試薬の添加（予めガス置換しておく）

- ビタミン溶液（フィルターろ過）
- 還元剤（オートクレーブ or フィルターろ過）
- 基質

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



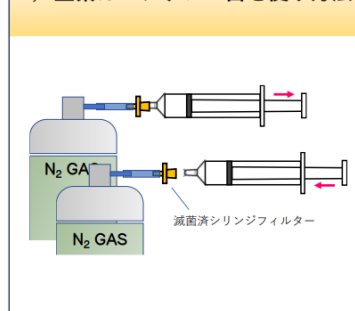
3) 菌の接種

シリンジ内のガス置換

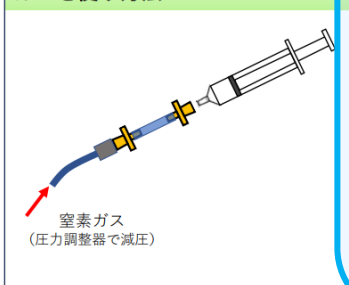


シリンジにニードルをセット
無酸素ガスを吸引&排出×2回

A) 窒素ガスプッシュ缶を使う方法

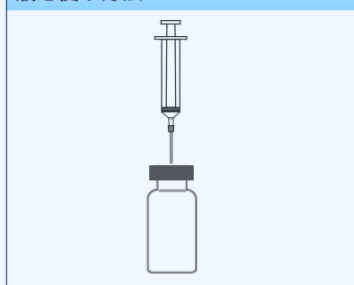


B) 窒素ガスボンベから供給されるガスを使う方法



未使用培地の気相

C) 窒素ガスで加圧されたバイアル瓶を使う方法



培地のブチルゴム栓に刺し入れ溶液を添加

嫌気性菌の培養

培地中の酸素をできる限り取り除く操作（オプション）

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



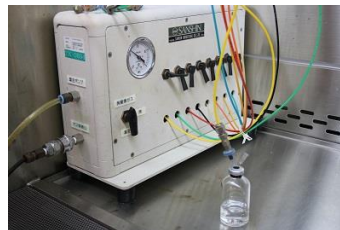
3) 菌の接種



ガス置換装置
(安全キャビネット内で使用)

バイアル瓶ヘッドスペース（気相）の再置換

後入れ試薬添加により、
微量の大気（酸素）が混入



<要注意>

圧を上げすぎない（破裂事故防止）

- ・ ガス二次圧を低く設定
- ・ ガスの出口が塞がっていないか確認

1) 培養方法検討



2) 培地作製

- ・ 試薬混合・分注
- ・ ガス置換
- ・ オートクレーブ後の調製



3) 菌の接種

L-乾燥標品から



[【NBRC】 L-乾燥標品 \(ガラスアンプル\) の開封と復元方法](#)

YouTube · NITE official
2017/02/17

凍結標品から



[【NBRC】 嫌気性菌の取扱い方法～凍結標品から培地への接種～](#)

YouTube · NITE official
2024/03/28

培養物から



シリンジ内のガス置換



シリンジにニードルをセット
無酸素ガスを吸引&排出×2回

培養液を吸引



シリンジを軽く弾いて気泡を除去

培地に接種

嫌気性菌の培養にあると良い設備・物品



LAS system

Anoxomat

Anoxomat

ジャーの内部を短時間で嫌気に
することができる
(大量の平板培養が可能)



LAS system

高ガスバリア性のバッグ内を
嫌気にできる
(ガスの変更が可能)
(個別の平板培養が可能)



嫌気グローブボックス

分離プロセスの全てを嫌気条件で行うことが
可能となる

装置内での無菌操作は出来ないが、分離の
初期プロセスにおいては実用的

③嫌気性菌の保存

嫌気性菌も比較的簡単に長期保存ができます！

1) 保存方法検討



2) 凍結標品作製

- ・ 培養物・凍結保護剤・保存容器の準備
- ・ 凍結保護剤の添加、分注



3) 凍結標品の復元

- ・ 凍結保護剤の除去、接種

適切な菌株保存のメリット

- 菌株の喪失を防ぐ
- 中長期的に菌株を利用可能
- 継代培養の回数を揃えたロットで試験可能

1) 保存方法検討



2) 凍結標品作製

- ・ 培養物・凍結保護剤・保存容器の準備
- ・ 凍結保護剤の添加、分注



3) 凍結標品の復元

- ・ 凍結保護剤の除去、接種

短期保存

- 冷蔵（中温菌）
- 至適生育温度より低い温度（好熱菌）

長期保存

- 凍結保存（適用可能な範囲が広い）
 - 80℃ ディープフリーザー
 - 170℃ 液体窒素タンク気相
- 乾燥保存（適さない菌もいる）

凍結乾燥
L-乾燥



ディープフリーザー



液体窒素タンク

嫌気性菌の保存



1) 保存方法検討



2) 凍結標品作製

- ・ 培養物・凍結保護剤・保存容器の準備
- ・ 凍結保護剤の添加、分注



3) 凍結標品の復元

- ・ 凍結保護剤の除去、接種

	-80℃凍結	液体窒素凍結	凍結乾燥	L-乾燥
長期保存性	◎	◎	◎	◎
適用可能微生物の種類	○	◎	△	△
操作の簡便性	◎	○	△	△
保存標品の取扱い易さ	○	△	◎	◎
ランニングコスト	○	△	◎	◎
保管スペース	○	△	◎	◎
必要な機器	ディープフリーザー	液体窒素タンク	ディープフリーザー 凍結乾燥機	凍結乾燥機

嫌気性菌の保存

1) 保存方法検討



2) 凍結標品作製

- ・ 培養物・凍結保護剤・保存容器の準備
- ・ 凍結保護剤の添加、分注



3) 凍結標品の復元

- ・ 凍結保護剤の除去、接種

培養物の準備

増殖段階を考慮

- 一般的には対数増殖期
- 過培養に注意、自己溶菌する菌もいる
- 菌株によっては孢子を形成させると良い

凍結保護剤の準備

- グリセロール（終濃度10-15%）
- **DMSO（終濃度5-7%）** ← 嫌気性菌で成績が良い

ガス置換した高濃度のストック溶液を作製

80%グリセロール溶液

DMSO原液

をバイアル瓶に分注



N₂ガス置換して密栓



オートクレーブ

保存容器の準備

ガス置換した保存容器を用意

2 ml バイアル瓶をN₂ガス置換し密栓



オートクレーブ

凍結保護剤の添加、分注

1) 保存方法検討



2) 凍結標品作製

- ・ 培養物・凍結保護剤・保存容器の準備
- ・ 凍結保護剤の添加、分注



3) 凍結標品の復元

- ・ 凍結保護剤の除去、接種

液体培養

培養液に凍結保護剤を添加



上記をガス置換済バイアル瓶に分注



-80℃保存

凍結保護剤をガス置換済バイアル瓶に分注



培養液を上記バイアル瓶に分注



-80℃保存

固体培養

プレートから菌体を掻き取り、
凍結保護剤を添加した培地または緩衝液に懸濁



ガス置換済バイアル瓶に分注



-80℃保存

出来る限り素早く操作
or
嫌気チャンバー内で操作

1) 保存方法検討



2) 凍結標品作製

- ・ 培養物・凍結保護剤・保存容器の準備
- ・ 凍結保護剤の添加、分注



3) 凍結標品の復元

- ・ 凍結保護剤の除去、接種

凍結保護剤

- グリセロール（終濃度10-15%）
- DMSO（終濃度5-7%）

凍結保護剤は菌の増殖を阻害することがある
特に**DMSO**は阻害的に働く場合が多い
そのため、接種前に取り除く必要がある

遠心分離により除去

凍結標品を速やかに融解



ガス置換処理したシリンジで菌液を吸引し
マイクロチューブに移す



遠心分離して集菌し、
シリンジでペレットを吸わないよう上清を除去



ガス置換処理したシリンジを用いて
0.2 ml程度の液体培地で懸濁し、
気泡を除去した後、培地に接種

出来る限り素早く操作
or
嫌気チャンバー内で操作

- 嫌気性菌の基礎知識と今すぐ使える取扱技術の紹介

- ① 嫌気性菌の基礎知識

- ② 嫌気性菌の培養

- 培養方法の検討、培地作製、培養

- ③ 嫌気性菌の保存

- 保存方法の検討、凍結標品の作製、凍結標品の復元

嫌気性菌の培養・利用について少しでもハードルが下がった
と感じていただけたら幸いです

下記もご参照ください

[【NBRC】L-乾燥標品（ガラスアンプル）の開封と復元方法 YouTube](#)

[【NBRC】嫌気性菌の取扱い方法～凍結標品から培地への接種～ YouTube](#)

[NITE バイオ基礎講座2023 技術編1. 様々な微生物の培養方法](#)

[NITE バイオ基礎講座2023 技術編2. 微生物の長期保存法](#)

[微生物株の培養と保存 | バイオテクノロジー | 製品評価技術基盤機構](#)

ご清聴ありがとうございました

nite

ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジーセンター（NBRC）
生物資源利用促進課

(お問い合わせはこちら)

E-mail: nbrc@nite.go.jp

TEL: 0438-20-5763

URL: <https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/index.html>