

抗酸菌菌株の冷凍保存

東村純雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

名古屋大学医学部第一内科 (主任 日比野進教授)

受付 昭和40年3月24日

STORAGE OF MYCOBACTERIAL STRAINS AT FREEZING STATE*

Sumio TSUKAMURA

(Received for publication March 24, 1965)

It is known that most bacteria maintain their viability at freezing state if they are suspended in 5 to 20% glycerol (1,2). Postgate and Hunter (2) reported that storage of *Aerobacter aerogenes* at -20°C depended on the protective agent used; only glycerol permitted extended storage. They observed that these organisms maintained their viability at 85% after 40 days of freezing at -20°C . Since similar studies on mycobacteria have not been made, the present study has concerned with this, and the storage of mycobacterial strains was extended to 6 months of freezing. The purpose of the study is to find a conventional method for maintenance of stock cultures of mycobacteria.

M. smegmatis Jucho, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. bovis* BCG, *M. kansasii* Forbes 84, nonphotochromogen N 100616, and scotochromogen P-5 were used. *E. coli* K-12 also was used.

M. smegmatis Jucho was suspended in various solutions at concentration of 5.5 mg (wet weight)/ml and stored in a refrigerator at -15°C . At different intervals, one tube of each group was taken and diluted with saline to 1:1 to 1:1,000,000 dilutions. Aliquots (0.02 ml samples) of these dilutions were inoculated to Löwenstein-Jensen medium and the number of colonies was counted after five days of incubation at 37°C . The results are shown in Table 1. When suspended in saline, the organisms decreased their viable numbers, but when suspended in Sauton medium, 3% glycerol broth, and 10% glycerol, all of which contained glycerol, they maintained their viability even after 42 days of storage. Similar experiments were conducted using *E. coli*. Determination of viable numbers was made similarly but in use of nutrient broth agar medium for counting. The results are shown in Table 2. The results showed that storage in 10% glycerol was most satisfactory to maintain the viability. Suspension of nutrient broth without glycerol decreased the viable number markedly.

In view of the above results, storage of five strains at -20°C was examined in 10% glycerol (aqueous solution). The observation was made until the end of the sixth month. The results are shown in Table 3. This method of storage maintained the viability of the test strains almost completely until the end of the third month. After six months of storage also, the viability was maintained fairly well in *M. tuberculosis* and *M. bovis* and almost satisfactorily in other three strains.

In view of the results obtained, storage of mycobacterial strains in 10% glycerol at -20°C was considered to be useful to maintain the stock cultures in laboratories.

* From The Obuso National Sanatorium, Obu near Nagoya, Aichi-pref., Japan.

細菌は一般に冷凍に対しては抵抗が強いが、とくに 5~10% glycerol に懸濁した場合、その生菌数を失うことなく保存できることが知られている (Smith の総説¹⁾)。しかし、いままでの観察期間はあまり長くない、たとえば Postgate & Hunter²⁾ は *Aerobacter aerogenes* を -20°C に保存するさい、10% glycerol が保護剤としてもつとも有効で、40 日後も 85% の生菌数が維持されたと述べている。冷凍の細菌に及ぼす影響は、それ自体生物学的に興味があるが、菌株保存という実用的な面からも注目される。従来、凍結乾燥が細菌類のもつとも有効な保存方法であることは広く知られり、抗酸菌では BCG の凍結乾燥はすでに実用化されている。しかし菌の凍結乾燥には特殊な装置が必要で、どこの実験室でも簡単にこれを行なうわけにはいかない。一方前述の -20°C 保存は、一般に普及している冷蔵庫の凍結箱、または比較的低価格の市販アイスクリーム保存箱 (-15°C のものが多い) で可能である。したがってこの方法を、菌株保存の実用方法として一考する価値があると思われる。問題は保存に用いる媒液であるが、抗酸菌の冷凍保存 (-20°C) については、Heckly³⁾、Stern & Tompsett⁴⁾、Jones⁵⁾、Tarshis⁶⁾ の研究があるが、使用された媒液は、蒸留水、5% bovine serum albumin, liquid oleic-acid-albumin medium, 炭末水、生理食塩水 (0.85% NaCl), glycerol broth などであつて、他の菌でもつとも有効といわれる 10% glycerol についての検討が行なわれていない。また抗酸菌についてのこれらの著者の検討は期間は 3 年の長きにわたっているものもあるが、生菌数保存についての定量的検討は行なわれていない。そこでわれわれは、10% glycerol および他の媒液について、生菌数計算の定量的方法を適用して検討を試みた。

実験方法

被検株 *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. bovis* BCG, *M. kansasii* Forbes 84, Nonphotochromogen N 100616, Photochromogen P-5, *M. smegmatis* 獣調株 (注 1: 獣調株は前に、*M. avium* と命名されていたが、最近の研究の結果、少なくともわれわれの保存株に関する限り、その性質はまったく *M. smegmatis* に一致した⁷⁾)。むしろ定型的 *M. smegmatis* といつたほうがよい。なお獣調株を CF 1 系マウスに尾静注すると一時的に脾で軽度の増殖が起こるが、この現象ははじめから *M. smegmatis* とされている株でも起こる。注 2: Forbes 84, N 100616, P-5 の 3 株は九州大学武谷健二教授より分与を受けた)。以上のほかに、比較の目的で *Escherichia coli* K-12 株も実験に用いた。これらの菌株は Löwenstein-Jensen 培地または 1% 小川培地に継代保存されていた。*E. coli* は普通寒天に継代された。

上記の培地から白金耳で菌をとり、抗酸菌はガラス玉

コルペンで 10 分間振盪して均一化して、表に示した濃度 (湿菌量 mg/ml) に、種々の溶液に浮遊させ、これを -15°C または -20°C の冷凍箱に保存した。分注量は 5 ml また 6 ml で、遠心管または小試験管に入れた。一定期間保存した後、試験管をとり出して室温に保つて融解し、ピペットでパンピングした後、生理食塩水で 10 倍ないし 100 万倍希釈液をつくり、その 0.02 ml を渦巻白金耳で Löwenstein-Jensen 培地に塗抹し、 37°C に培養した。*E. coli* では普通寒天平板に 0.1 ml ずつ接種した。集落数算定は *M. tuberculosis* および *M. bovis* は 4 週後、*M. kansasii*, nonphotochromogen および photochromogen は 3 週後、*M. smegmatis* は 5 日後、*E. coli* は 2 日後に行なつた。

以上の操作の中には菌浮遊液の凍結、そして生菌数測定のための融解という操作が含まれる。したがって生菌数の減少が、この段階で起こることが十分考えられる。ただしこの凍結と融解の操作はいずれのサンプルでも同様に行なわれている。したがってここにいう各溶媒の良否は、この凍結、融解の影響も含めた総合的なものである。なお各サンプルは、はじめに多数作つて 1 本ずつ取り出して生菌数算定に供し、1 回使用したサンプルは棄却した。生菌数算定に当たつては各サンプルから 3 列の希釈列を作り、各希釈列の各希釈液を 5 本 (5 枚) の培地に接種して平均値をとつた。算定の基礎としては、平均値が正規分布からはずれる 10 以下と、集落融合が起こりうる 100 以上を避けて、10~100 の間の平均値を示す希釈度から、生菌数を計算した⁸⁾。したがって 1 サンプルについて、(3 希釈列 \times 7 希釈度 (1:1-1:1,000,000) \times 5 本 = 105 本) の培地を用いた。

結果および考察

1. *M. smegmatis* 獣調株を -15°C に保存する時の媒液 (表 1)

表 1 に示すように生理食塩水を媒液としたときには、2 週以降で生菌数減少が起こつたが、glycerol を含む

Table 1. Viable Numbers of *M. smegmatis* Jucho Maintained at -15°C Various Conditions

Time	Viable numbers per 0.1 ml suspension*			
	Saline	Sauton medium	10% glycerol	Glycerol broth
0 days	1.45×10^6	1.05×10^6	1.16×10^6	1.82×10^6
7	1.50×10^6	1.15×10^6	1.20×10^6	1.27×10^6
14	1.32×10^6	1.45×10^6	2.10×10^6	1.37×10^6
21	2.75×10^5	7.10×10^5	8.10×10^5	1.03×10^6
28	4.55×10^5	1.31×10^6	1.23×10^6	1.80×10^6
35	2.00×10^5	1.15×10^6	1.30×10^6	8.00×10^5
42	7.72×10^4	1.74×10^6	1.03×10^6	1.01×10^6

* Suspended in 6 ml of solutions at concentration of 5.5 mg/ml and maintained at -15°C .

Table 2. Viable Numbers of *Escherichia coli* K-12 Maintained at -15°C at Various Conditions

Time	Viable numbers per 0.1 ml suspension*			
	Saline	Nutrient broth	10% Glycerol	Glycerol broth
0 days	6.80×10^6	5.55×10^6	6.25×10^6	9.50×10^6
7	1.65×10^6	5.28×10^6	3.50×10^6	8.05×10^6
14	1.32×10^6	1.02×10^6	1.47×10^6	2.73×10^6
21	7.73×10^5	6.05×10^5	1.54×10^6	1.98×10^6
28	1.28×10^5	3.00×10^3	1.19×10^6	1.75×10^6
35	7.30×10^4	2.18×10^3	2.43×10^6	7.70×10^4
42	2.30×10^4	2.50×10	1.83×10^6	2.90×10^4

* Suspended in 6 ml of solutions at concentration of 3.0 mg/ml and maintained at -15°C .

Sauton 培地, 3% glycerol broth, 10% glycerol に浮遊したときには, 42 日後も生菌数の減少は起こらなかった。

2. *E. coli* K-12 を -15°C に保存するときの溶媒 (表 2)

E. coli の場合は生理食塩水, 普通ブイヨン, 3% glycerol broth に浮遊したときに生菌数の減少が起こった。とくに発育に適当な普通ブイヨンに浮遊させたときの生菌数減少がもつとも著明であつた。*E. coli* の場合も 10% glycerol がもつとも有効であつたが, 若干の生菌数低下は避けられなかつた。一般に *E. coli* よりも抗酸菌のほうが冷却に堪える抵抗力が強いことが考えうる。

3. 抗酸菌の6ヵ月保存 (-20°C)

以上の実験から 10% glycerol が保存に最適と思われたので, 5 株の抗酸菌株について, -20°C 6 ヵ月の凍結実験を行なつた。その結果は表 3 のとおりで, 少なくとも 3 ヵ月までは, 生菌数はほぼ完全に保存された。6 ヵ月になると *M. tuberculosis* および *M. bovis* では軽度の生菌数減少が起こつたが, その程度は表 3 にもみられるとおり著明なものではない。他の 3 株では 6 ヵ月後も生菌数はよく維持されていた。以上の実験から 10% glycerol 浮遊, -20°C 保存の方法は有効で, おおよそ 6 ヵ月は菌株を保存できると思われた。

Table 3. Viable Numbers of Mycobacteria Maintained in 10% Glycerol at -20°C

Strain	Viable numbers per ml*			
	Time			
	0	1 month	3 months	6 months
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	2.27×10^7	1.11×10^7	3.64×10^7	5.21×10^6
<i>M. bovis</i> BCG	2.70×10^7	1.10×10^7	2.35×10^7	5.14×10^6
<i>M. kansasii</i> Forbes 84	1.00×10^6	5.10×10^5	1.76×10^6	5.84×10^5
Nonphotochromogen N 100616	1.85×10^7	4.76×10^7	4.00×10^7	4.33×10^7
Scotochromogen P-5	2.60×10^8	1.01×10^8	1.97×10^8	4.38×10^8

* Suspended in 5 ml of 10% glycerol at concentrations of 0.9 to 1.0 mg/ml and maintained at -20°C .

凍結によつてなぜ菌の寿命が延長するか, また glycerol がなぜ有効かについてはまだ十分分かつていない。凍結すなわち菌の代謝の停止がこれに関係することは当然考えられることである。東村⁹⁾は前に *M. smegmatis* を燐欠乏培地に培養すると菌の生菌数が著しく長く保たれることを観察している (温度 37°C)。この場合も燐欠乏によつて代謝が低下していることが考えられなくはない。菌の発育能力の喪失という現象が燐代謝と関係しているかどうかは将来の問題であろう。著者は抗酸菌を chloramphenicol (CM) 20 γ /ml 含有 Sauton 培地に培養し, 対照の Sauton 培地における生菌数の推移と比較した。CM は蛋白合成阻害剤として知られるので, 蛋白合成阻害の影響を考えたのであるが, 結果は菌株によりまちまちであつた (成績省略)。すなわち, 培養 1 ヵ月後の mg 当り生菌数は, Sauton 培地では $1/4 \sim 1/10^5$ に低下したが, CM 含有培地では, *M. tuberculosis* と *M. bovis* では対照より生菌数の低下が著しく, 一方 *M. kansasii*, nonphotochromogen, scotochromogen では mg 当り生菌数は培養当初とほとんど同じに保たれた。

菌の代謝を低下させることが, 生菌数保存に関係しているかどうかをしる試みとして, 抗酸菌の嫌氣的保存の検討も行なつた。1% 小川培地に発育した *M. tuberculosis* 青山 B 株および *M. smegmatis* 獣調株を 3% glycerol broth に浮遊させて (操作を実用的且簡易化するため, 集落を白金耳でかきとつて, そのまま浮遊させた), 50~100 mg/5 ml の懸濁液とし (青山 B 株では集落は速やかに管底に沈降する), そのうゑに滅菌した局法流動パラフィン 2 cc を重量して室温に保存した。6 ヵ月後および 2 年後に, 懸濁液を 1 白金耳すくつて 1% 小川培地に塗抹し, 36°C 6 週培養すると数十集落の発育を認めた。この実験では定量的検討は行なわなかつたが, 6 ヵ月後, とくに 2 年後にはかなり著明な生菌減少があるごとく思われた。しかし菌株保存の目的には, 一応簡単に使用できる便法であると思われた。

以上の凍結, 燐欠乏, 嫌氣条件などが, 菌生菌数を延長保存させることをみると, 菌の代謝停止ないし鈍化が, 菌の生菌数保存と関係することが示唆される。

結 論

抗酸菌菌株保存の方法を生菌数の定量的算定を行なつて検討した結果, 次の方法が適当と思われた。抗酸菌菌株を 10% glycerol に浮遊させて, -20°C に保存すると少なくとも 3 ヵ月は生菌数の減少を起こすことなく保存できる。6 ヵ月後には軽度の生菌数減少を起こす株があるが, その程度は

軽微であるゆえ、実用的には6カ月に1回の継代で菌株を保存することができよう。

文 献

- 1) Smith, A. U.: Biological Effects of Freezing and Supercooling. London, Edward Arnold, 74, 1961.
- 2) Postgate, J. R. & Hunter, J. R.: J. Gen. Microbiol., 26 : 367, 1961.
- 3) Heckly, R. J.: Amer. Rev. Tuberc., 62 : 99, 1950.
- 4) Stern, K. & Tompsett, R.: Amer. Rev. Tuberc., 64 : 696, 1951.
- 5) Jones, W. D.: Amer. J. Clin. Path., 27 : 363, 1957.
- 6) Tarshis, M. S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 83 : 762, 1961.
- 7) 東村道雄・外山春雄・水野松司: 日本細菌学雑誌, 19 : 469, 1964.
- 8) 東村道雄・野田用: 結核, 32 : 639, 1957.
- 9) Tsukamura, M.: Japan. J. Microbiol., 5 : 461, 1961.