

原 著

## 抗 酸 菌 菌 株 の 保 存 法

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和 57 年 1 月 29 日

## PRESERVATION OF MYCOBACTERIAL STRAINS

Michio TSUKAMURA\* and Shoji MIZUNO

(Received for publication January 29, 1982)

Effective methods for preserving mycobacterial strains were studied. The results are shown in Tables 1, 2 and 3.

1) A simple method of storing cultures, which grew on Ogawa egg medium slants, is to keep them in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The method succeeded to maintain the viability of bacteria for more than one year (Table 1).

2) By storing bacteria suspended in a 1% glycerol solution, 1% sodium glutamate solution, or 10% glucose solution in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  the viability was maintained for at least one year. Storage in a phosphate buffer solution and in distilled water were inferior to the above methods (Table 2).

3) By storing lyophilized cultures in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$ , the viability was maintained for at least two years. As a medium used in lyophilization, distilled water was more suitable than a 1% glycerol solution. Storage of lyophilized samples at room temperature caused loss of the viability after one month (Table 3).

While storing cultures in a freezer, Ogawa egg medium slants or tubes containing bacterial suspension were directly placed into a freezer. The ampules containing bacterial suspension were immersed individually into an ethanol-dry-ice mixture ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) and then dried at  $-30^{\circ}\text{C}$ .

The first method is the simplest, but the tubes occupy a lot of space in the freezer. The second method is suitable for preservation of a large number of strains, as the method does not occupy a large space in the freezer. The third method needs some explanation. We did not put Silica Gel in the ampules. Under such condition, we could probably provide a better condition for drying, when we used distilled water as a suspension medium than using a 1% glycerol solution.

抗酸菌の分類・同定に携わる者が最も苦心することの一つに、標準菌株の保存がある。菌株の保存に際しては、可及的継代を避けねばならぬことは周知のことである。これは、継代を重ねて行くと菌株が分離時の性状と違つたものになることがあるためである。例えば、現在、諸所の研究室に保存されている *Mycobacterium smegmatis*

は殆んど全部R型か、R型とS型との中間型である。しかし、土壌から新たに *M. smegmatis* を分離してみると、すべてS型（それも mucoid に近いS型）である<sup>1)</sup>。

抗酸菌に限らず、一般細菌においても、菌株保存に最もしばしば用いられる方法は、凍結乾燥 (lyophilization) または凍結 (freezing) である。抗酸菌の凍結保存および

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

凍結乾燥についても若干の報告がある<sup>2)-8)</sup>。このうち、凍結保存について、Heckly<sup>3)</sup>は $-34^{\circ}\text{C}$ 、Kubica<sup>7)</sup>は $-70^{\circ}\text{C}$ を用いているが、この温度は手軽に得られる温度ではない。したがって、多数の菌株を保存するには経済的な制約を免れえない。先に、東村(純)<sup>5)</sup>は、10% glycerol 液に菌株を浮遊して $-20^{\circ}\text{C}$ に保存することにより、少なくとも6カ月間、菌株を保存できることを報告した。我々の研究室は、2,000株以上の抗酸菌およびその類縁菌を保存しているため、これらの菌株を、いかにして経済的に、そして最小の手間で保存するかに苦心している。したがって、前報<sup>5)</sup>以後、菌株保存法について経験したことを本報に記したい。

### 実験方法

実験に使用した菌株および方法については、表1～表3に英文で記したので、ここに重複しては述べない。

保存方法としては、凍結保存と凍結乾燥を用いた。

凍結保存は東芝業務用冷凍庫(RGC-41RS)(東京芝浦電気KK, 東京)を使用した。これに抗酸菌の浮遊液を入れた小試験管または菌の発育した小川培地斜面を含む中試験管(165×16.5mm)を直接入れた。冷凍庫に入れる前に、浮遊液を ethanol-dry ice mixture を凍結させるような前処置(例えば Heckly<sup>3)</sup>)は行なわなかった。凍結した浮遊液は $37^{\circ}\text{C}$ のフラン器に放置して溶解し、その菌液を1%小川培地に接種して菌の生存を確かめた。

凍結乾燥には、凍結真空乾燥器(共和真空技術KK, 共和式 RL-7MB, 東京)を使用した。菌液をアンプルに入れて ethanol-dry ice mixture ( $-15^{\circ}\text{C}$ )で凍結した後、真空乾燥器にかけた。真空乾燥時のトラップの温度は、カタログによれば $-30^{\circ}\text{C}$ である。凍結乾燥した標品の生菌数測定には、アンプルを切つて、滅菌ピペットで0.9% NaCl 液 0.5 ml を入れて菌を浮遊させ、その1白金耳(0.02 ml)を1%小川培地に接種し $37^{\circ}\text{C}$ に培養した。

### 実験結果および考察

#### 1) 小川培地に発育したままの冷凍保存

1%小川培地に発育した菌を、小川培地に生やしたまま $-20^{\circ}\text{C}$ に保存しても、菌は少なくとも16カ月後には発育可能であつた。この方法は最も簡単であるが、常用の培地のままでは冷凍庫内の space を多くとり、多数の菌株の保存のためには不適當である。しかし、少数の菌株の保存のためには最も簡便で、良い方法と思われる(表1)。

#### 2) 菌液としての冷凍保存

この実験には、*Mycobacterium aurum* と抗酸菌と近縁の *Gordona aurantiaca* を用いた。5種の媒体に菌を浮遊し、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に入れて凍結した後、時間を追つて

Table 1. Preservation of Mycobacterial Strains at  $-20^{\circ}\text{C}$ —Preservation on Ogawa Egg Medium Slants

Strain	Time of preservation (months)	
	6	16
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	卅	卅
<i>M. bovis</i> B.C.G.	卅	卅
<i>M. smegmatis</i> Jucho	卅	卅

Each Ogawa egg medium slant was inoculated with one loopful of test strain and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 14 days (*M. tuberculosis* and *M. bovis*) or 6 days (*M. smegmatis*). The media with growing bacteria were preserved in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After preservation for 6 months and for 16 months, one loopful of bacteria on the surface of medium was inoculated onto two Ogawa egg medium slants, respectively, and growth was observed after incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 weeks (*M. tuberculosis* and *M. bovis*) or for one week (*M. smegmatis*).  
卅 Membraneous growth.

菌の生死を検査した。その結果、4週までは、いずれの媒体でも同じであるが、それ以上になると優劣が生じた。1%グリセリン液、1%グルタミン酸ソーダ、10%グルコース液では1年後も菌は生存していたが、磷酸緩衝液および水では、*M. aurum* の生菌数が減少した(表2)。

この方法は、0.5 ml の菌液を  $5 \times 50$  mm の細試験管(特別注文品)に入れて凍結するもので、冷凍庫内の space を取らず、多数の菌株の保存に便利である。

#### 3) 凍結乾燥による保存

凍結乾燥の際に菌を浮遊させる媒体としては、蒸溜水の方が1%グリセリン液に勝つていた。これは、やや意外な結果であつたが、1%グリセリン液を使用した際には、乾燥に時間がかかり、かつ、いかに時間をかけても菌が膠状状態になつた。すなわち、恐らく、水分の除去が不十分な状態にとどまるために、発育能力の喪失が起こるのではないかと想像される。また、凍結乾燥した菌を室温に放置すると急速に発育能力喪失が起こつた。しかし、蒸溜水に浮遊して凍結乾燥したサンプルを $-20^{\circ}\text{C}$ に保存する場合は2年後でも充分発育可能であつた(表3)。

以上の我々の実験では、凍結乾燥用アンプル内に Silica Gel は入れてない。しかし、American Type Culture Collection (ATCC) または National Collection of Type Cultures (NCTC) から凍結乾燥した菌株を受け取つた場合、アンプル内には Silica Gel が封入されている。これらの Type Culture Collections から受け取つた菌株が発育しなかつたことはない。これに対して、外国の研究所(上記のような菌株保存機関以外の研究所)から凍結乾燥した菌株を受けると30~50株に1株は発育不能(菌が死んでいる)のものがある。これらの研究所の凍結乾燥標本には Silica Gel が封入されていない。

Table 2. Preservation of Mycobacterial Strains at  $-20^{\circ}\text{C}$ —Comparison among Various Suspension Media

Suspension medium	<i>Gordona aurantiaca</i> ATCC 25938						<i>Mycobacterium aurum</i> ATCC 23366					
	Time of preservation (weeks)						Time of preservation (weeks)					
	0	1	2	4	12	52	0	1	2	4	12	52
1% Glycerol solution	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1% Sodium glutamate solution	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10% Glucose solution	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M/15 Phosphate buffer solution (pH 7.1)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Distilled water	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Each 0.5 ml sample of a bacterial suspension (1mg wet weight/ml) was poured into tubes, 5 by 50mm, and stored in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After various intervals, tubes were melted allowing to stand at  $37^{\circ}\text{C}$ , and one loopful (0.02 ml) of suspensions was inoculated onto two Ogawa egg medium slants. The growth was observed after incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 7 days.

+++ Abundant membranous growth; ++ Partially confluent growth; + Discrete colonies (more than 100).

Table 3. Preservation of Mycobacterial Strains by Lyophilization—Comparisons of Suspension Medium and of Method of Storage

Method of storage	Suspension medium	Strain	Time of preservation (months)				
			0	1	2	12	24
Freezing at $-20^{\circ}\text{C}$	Distilled water	<i>G. aurantiaca</i> ATCC25938	+++	+++	+++	+++	+++
		<i>M. aurum</i> ATCC23366	+++	+++	+++	+++	+++
	1% Glycerol solution	<i>G. aurantiaca</i> ATCC25938	+++	+++	+	+	-
		<i>M. aurum</i> ATCC23366	+++	+	±	±	-
Room temperature	Distilled water	<i>G. aurantiaca</i> ATCC25938	+++	++	-	-	-
		<i>M. aurum</i> ATCC23366	+++	+++	+++	-	-
	1% Glycerol solution	<i>G. aurantiaca</i> ATCC25938	+++	-	-	-	-
		<i>M. aurum</i> ATCC23366	+++	-	-	-	-

A 0.5 ml sample of a bacterial suspension (10 mg wet weight/ml) was poured into ampules, 10 by 50 mm, and lyophilized. After various intervals of storage in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  or in room temperature, the content of ampules was suspended in 0.5 ml of a 0.9% NaCl solution and its 0.02 ml sample was inoculated with a spiral loop onto two Ogawa egg medium slants. The growth on these media was observed after incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 7 days.

+++ Membranous growth; ++ Partially confluent growth; + More than 100 discrete colonies; ± Less than 10 colonies; - No growth.

Silica Gel の封入は無意味にされているはずはなく、長期に安定して菌株を保存するためには必要なものであることは間違いない。しかし、このような Silica Gel 入りのアンプルは我々には入手困難であった。Silica Gel の封入されていないアンプルを使用する場合、菌を蒸留水に浮遊させるのが、よい方法であることが分かった。

我々は昭和43年から凍結乾燥による菌株保存を始めたが、当時は媒体として、10%グルコース液および1%グルタミン酸ソーダを使用した。これらの標本を冷蔵庫(5°C)に約1,000本、室温に約1,000本保存したが、10年後にアンプルを切つて菌の生死を検すると、冷蔵庫保存のものは約30%が生存していた。これに対して室温保存標本で発育可能のものは1本もなかった。この経験と本報の結果を考えると、経済的に余裕のできた現在では、

凍結乾燥標本は $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存するのが適当であると考える。

最近、Kubica<sup>7)</sup>は菌株の移送(送付)には凍結乾燥が最適と述べている。これは、当然のことで、ATCCまたはNCTCも全的に凍結乾燥標本を移送に使用している。しかし、ATCCまたはNCTCのようなSilica Gel入りのアンプルが使用されない場合は、必ずしも凍結乾燥が最適とはいえない面がある。それは、国際間での菌株の授受の場合、移送に暇がかかること、移送中の温度上昇があるためである。このため、米国のような先進国から菌株が送られて来る場合でも、菌が発育不能のことが希とはいえない。ある中進国から凍結乾燥標本を受け取つた場合には約半数が発育不能であった。このとき、時間的にはるかに短いヨーロッパに送られた株は発

育可能であつたと聞くので、日本に来るまでに多くの時間がかかったことおよび移送時の温度上昇などが発育能力の喪失の原因と考えられる。

(税関吏の知識不足のために通関のため税関に放置される場合がある。夏季など数日放置されると影響が大きいと思われる。) 以上のような凍結乾燥標本の発育能力喪失の事情は、表 3 の結果からも推定される。上述の我々の経験にかんがみると、菌株移送には、むしろ培地のままの送付の方が確実と考えられる。培地のまま送付された菌株が発育不能であつたことはない。不完全な凍結乾燥よりは、培地のままの移送の方が勝れている。そして、ATCC および NCTC 以外で完全な凍結乾燥標本を受け取つたことはない。菌株の移送に凍結乾燥を用いることは、Kubica の言うごとく簡単ではない。

以上を総括して次の結論を得た。

#### 結 論

1) 菌株保存の最も簡単な方法は、小川培地に菌を発育させて、これをそのまま $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存することである。この方法で少なくとも1年は菌を保存できる。

2) 多数の菌株を保存するには、次の方法がよい。菌を1%グリセリン液、1%グルタミン酸ソーダ液、10%グルコース液に浮遊させて小試験管に入れ、そのまま冷凍庫に入れて $-20^{\circ}\text{C}$ で保存する。この方法で少なくとも

1年は保存可能である。

3) 凍結乾燥する場合は、菌を蒸溜水に浮遊させ、凍結乾燥してアンプルの封をし、冷凍庫で $-20^{\circ}\text{C}$ に保存する。この方法で少なくとも2年間は保存できる。

#### 文 献

- 1) Tsukamura, M.: Properties of *Mycobacterium smegmatis* freshly isolated from soil, Japan J Microbiol, 20: 355, 1976.
- 2) Ungar, J.: Viability of freeze-dried BCG cultures, Tubercle, 30: 2, 1949.
- 3) Heckly, R.J.: The preservation of stock cultures of *Mycobacterium tuberculosis* by freezing, Amer Rev Tuberc, 62: 99, 1950.
- 4) Lind, A.: Stability of dried BCG vaccine stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-25^{\circ}\text{C}$ , and  $+4^{\circ}\text{C}$ , Scand J Respir Dis, 48: 343, 1967.
- 5) 東村純雄: 抗酸菌菌株の冷凍保存, 結核, 40: 219, 1965.
- 6) Karlson, A.G., Harrington, R. Jr., Runyon, E.H., and Lessel, E.F.: Comparison of the virulence for chickens of lyophilized and of cultures of *Mycobacterium avium*, J Bacteriol, 93: 1195, 1967.
- 7) Kubica, G.P.: Preservation of mycobacteria at  $-70^{\circ}\text{C}$ : Survival of unfrozen suspensions in transit, Tubercle, 60: 37, 1979.
- 8) Smith, A.U.: Biological effects of freezing and supercooling, p. 74-137, Edward Arnold Publisher, London, 1961.