

# 臨床細菌検査室における菌株保存用 キットマイクロバンクの評価

TAKIZAWA KINJIRO/YAMAI SHIRO/MATSUSHIMA AKIYOSHI

滝沢金次郎/山井志朗/松島章喜 ●神奈川県衛生研究所

MIKI KANJI

三木寛二 ●神戸市中央市民病院

KOSAKO YOSHIMASA

小迫芳正 ●理化学研究所

TAMURA KAZUMITSU

田村和満 ●国立予防衛生研究所

SAKAZAKI RIICHI

坂崎利一 ●東海大学医学部

## はじめに

臨床細菌検査室においては検体からの菌分離のみならず、精度管理用菌株や重要な分離菌株の保存もまた重要な業務の一つである。菌株の保存に最良の方法は凍結乾燥または液体窒素中での保存であるが、検査室ではそれらの菌株は日常の検査に必要で、たとえ原株を凍結乾燥で保存するにせよ、日常の使用のためにはそれに適した方法での保存を講じなくてはならない。この目的のために最も安易なのは寒天培地での継代培養による保存であるが、この方法が好ましくないことは多くの研究者によって指摘されているところである。これらに対して Stamp<sup>®</sup>によるゼラチン-アスコルビン酸培地での乾燥法(いわゆるゼラチンディスク法)は菌が安定に保存され、随時取り出して使用できる点で、臨床細菌検査室に適した短期保存方法として勧められてきた(Douglasら<sup>2)</sup>)。しかし、ゼラチンディスクの作製の手数が検査室の実情にそぐわなかったためかこの方法は広く用いられるには至らなかったようである。

最近、細菌検査室での菌株保存用キットとしてマイクロバンク Microbank (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada: アスカ純薬)が市販された。この製品はドーナツ型セラミックビーズと液体培地を-80°Cに耐えるバイアルに入れたもので、菌を濃厚に浮遊させたのち液体培地を除き、ビーズを凍結保存するもので、使用が簡単な点では細菌検査室に適している。しかし、その性能については不明確なところがあるので、4施設共同で評価実験を行った。

## ■材料および方法

### 供試菌

臨床検査室で取り扱う菌種中、比較的早期に死滅しやすい菌および取り扱いの面倒な菌を対象として次の22菌種を選び、それらの2株以上を供試した。

*Neisseria gonorrhoeae*  
*Neisseria meningitidis*  
*Neisseria lactamica*  
*Streptococcus pyogenes*  
*Streptococcus agalactiae*  
*Streptococcus* sp. Group G  
*Enterococcus faecalis*  
*Enterococcus faecium*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Pseudomonas cepacia*  
*Xanthomonas maltophilia*  
*Acinetobacter baumannii*  
*Shigella dysenteriae*  
*Shigella flexneri*  
*Campylobacter jejuni*  
*Campylobacter fetus*  
*Haemophilus influenzae*  
*Haemophilus parainfluenzae*  
*Bordetella pertussis*  
*Gardnerella vaginalis*  
*Branhamella catarrhalis*  
*Listeria monocytogenes*

### 方法

#### 1) 保 存

供試菌の血液寒天14~18時間(一部の菌株では48時間)培養を、マイクロバンクバイアル内の液体培地にMcFarland #3-4の濃度に浮遊させ、菌をビーズに十分吸着させるためにバイアルを数回上下させたのち、滅菌ピペットで浮遊液を残らず吸引除去し、キャップ

●〒241 横浜市中尾町52-2(神奈川県衛生研究所)

を締めて $-20^{\circ}\text{C}$ のフリーザに保存した。なお、1菌株につきバイアル2本ずつを使用した。

## 2) 評 価

使用した2本のバイアル中、1本は第12週まで毎週1回ずつ、他の1本は3カ月後にフリーザから取り出して菌の生残を調べた。生残テストには、白金耳でビーズ1個をバイアルからとり、血液寒天平板上を転がすようにして接種したのち、 $37^{\circ}\text{C}$ で培養して菌の発育を観察した。生残率の判定は菌が直線状に発育したものを3+、多数の集落を生じたものを2+とし、また数個の集落しかみられなかったものを1+とした。

## ■成 績

毎週1回ずつの生残検査で、たとえ1+の程度でも生残の認められたものを一括して表1に示す。

表にみられるように、生残期間は菌種、ときには菌株によって相違があり、*Neisseria* 菌種は他の菌に比較して著しく生残期間が短かった。特に *N. gonorrhoeae* では供試した5株中3株は第2週目には発育が認められず、また他の2株の発育も第3週目には陰性となった。こうした傾向は *N. meningitidis* と *N. lactamica* にも認められ、前者では5株中2株が第5週で陰性となり、また後者は5株中1株は第4週以後には回収できず、かつ他の菌株の生残も不安定であった。

*Neisseria* 以外の菌種では *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *H. parainfluenzae* および *C. jejuni* の2株中の1株の生残が6~8週以内にとどまり、12週目には回収できなかった菌株が多かったのを除いては、他の菌種ではすべて3カ月後にも十分な生残が認められた。

一方、3カ月間フリーザからだすことなく保存されたバイアルでは、表2に示すように、ほとんど全株が3+の状態で開催されたが、例外的に *N. lactamica* 5株中の2株、*H. parainfluenzae* および *C. jejuni* 2株中1株のバイアルでは生残が認められなかった。

## ■考 察

臨床細菌検査室における菌株保存は系統保存が目的ではなく、主として検査の精度管理用菌株を維持するためのものである。これらの菌株は毎日使用するものであるから、その保存方法は随時取り出せる形式のものでなくてはならない。この形式の保存法で最も簡便

なのは培地での継代培養であるが、菌種によっては数日間隔で移植しなければならないこと、継代による性状変異の頻度が高いこと、雑菌の汚染が起こりやすいこと等から、精度管理用菌株の保存には適当ではない。

これに対して、菌種にかなりの制約があるとはいえ、ゼラチンディスク法はある期間菌を安定した状態で生残させ、かつ随時使用できる点で検査室の実情にあった保存法であるが、その作製に多少の手間と熟練を要するためか、ごく一部の検査室でしか利用されていない。

以上の点からマイクロバンクを考察すると、単に菌を浮遊させるだけの手間で菌株が凍結保存でき、しかも随時取り出して利用できることでゼラチンディスクよりも利用価値が高いと思われる。

マイクロバンクで *Neisseria*, *Campylobacter* など、一部の菌種が短期間しか生残しなかったのは予想されたことで、これらの菌種はゼラチンディスクでも特殊な方法を講じない限り数日間で死滅する。むしろマイクロバンクでそれらがたとえ2週間でも保存できたことは予想外であった。表1にみられるように、*Neisseria* の数菌株および *H. parainfluenzae* 菌株で一度陰性とされながら、次の週に生残が認められるという不安定な成績が示された。その理由として、ビーズによって生残菌数が異なったか、あるいは最初の菌浮遊液が均等でなかったためにビーズごとに吸着菌数が異なったことが考えられるが、いずれにしてもこれらの菌株はマイクロバンクでの長期保存には適さないと考えたほうが無難であろう。

以上のように、一部には2ないし3週間以上の保存には耐えられないものがあるとはいえ、臨床細菌検査室で精度管理に使用される範囲の菌株を含めて、大部分の供試菌株が少なくとも3カ月間の保存に耐えたことは、マイクロバンクが小検査室での菌株保存に有用なことを示したものとみなしてさしつかえないと思われる。

毎週フリーザから取り出したバイアルでの保存菌が、3カ月間フリーザにとどめたバイアルでのそれに比べて死滅しやすいことは上記の成績からも明らかで、これは各週ごとにビーズをとる際の解凍が菌の死滅をもたらすためとみなされる。したがって、マイクロバンクの実際の使用にあたって、バイアルをフリーザから取り出したら直ちにビーズを採取して再びフリーザに戻し、できる限り解凍を避けるよう注意が肝要である。

表1 マイクロバンクにおける供試菌株の生残—各週ごとに取り出したバイアルでの成績—

菌種	保存期間(週)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>S. dysenteriae</i>	5/5*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
<i>S. flexneri</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
<i>P. aeruginosa</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	0/2	1/2
<i>P. cepacia</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2
<i>X. maltophilia</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>A. baumannii</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>B. catarrhalis</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>H. influenzae</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>H. parainfluenzae</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>B. pertussis</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>G. vaginalis</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>C. jejuni</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	1/2	0/2
<i>C. fetus</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>N. gonorrhoeae</i>	5/5	3/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>N. meningitidis</i>	5/5	3/5	5/5	5/5	3/5	3/5	4/5	3/5	3/5	2/5	2/5	1/5
<i>N. lactamica</i>	4/5	5/5	4/5	4/5	1/5	4/5	3/5	1/5	2/5	2/5	1/5	1/5
<i>S. pyogenes</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
<i>S. agalactiae</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
streptococcus G	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>E. faecalis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>E. faecium</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>L. monocytogenes</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

\*分母は供試菌株数, 分子は発育のみられた菌株数

表2 マイクロバンクにおける供試菌株の生残—3カ月間フリーザ内に放置したバイアルでの成績—

菌種	供試菌株数	生残菌株数
<i>S. dysenteriae</i>	5	5
<i>S. flexneri</i>	5	5
<i>P. aeruginosa</i>	2	2
<i>P. cepacia</i>	2	2
<i>X. maltophilia</i>	2	2
<i>A. baumannii</i>	2	2
<i>B. catarrhalis</i>	2	2
<i>H. influenzae</i>	2	2
<i>H. parainfluenzae</i>	2	0
<i>B. pertussis</i>	2	2
<i>G. vaginalis</i>	2	2
<i>C. jejuni</i>	2	1
<i>C. fetus</i>	2	2
<i>N. gonorrhoeae</i>	5	5
<i>N. meningitidis</i>	5	5
<i>N. lactamica</i>	5	3
<i>S. pyogenes</i>	5	5
<i>S. agalactiae</i>	5	5
streptococcus G	2	2
<i>E. faecalis</i>	1	1
<i>E. faecium</i>	2	2
<i>L. monocytogenes</i>	2	2

また、今回の評価実験では3カ月以上の生残は調べていないが、少なくとも頻回にわたってフリーザから取り出すバイアルでの菌の生残は3カ月を限度として更新すべきであろう。

## ■ 結 論

臨床細菌検査室での菌株保存用として開発された製品、マイクロバンクを23菌種、64菌株を供試して評価したところ、*Neisseria*, *Campylobacter* などごく一部の菌株を除いては、毎週1回フリーザから取り出したバイアルでも2カ月以上、大部分は3カ月以上生残し、精度管理用菌株および通常の臨床分離株の短期保存に十分使用できることが確かめられた。マイクロバンクによる菌株の保存は操作がきわめて簡単で、臨床細菌検査室での使用に適したものと思われる。

## 文 献

- 1) Stamp L: The preservation of bacteria by drying *J Gen Microbiol* 1: 251-265, 1947
- 2) Douglas GW, Balows A, Rhoden D *et al.*: In-use evaluation of a commercially available set of quality control cultures. *Appl Microbiol* 25: 230-234, 1973.

# 菌株保存用バイアル “マイクロバンク”の評価

IWASAKI ERI/MIZUNO NARI/AKAHANE TAKAYUKI/OKIMURA YUKIE

岩崎絵理/水野奈理/赤羽貴行/沖村幸枝

●信州大学医学部附属病院中央検査部

KAWAKAMI YOSHIYUKI

川上由行

●信州大学医療技術短期大学部

## はじめに

細菌検査室では臨床分離株や精度管理用菌株を迅速かつ簡便に保存でき、必要に応じて随時取り出して使用できる菌株保存法が求められている。

細菌を長期間保存したり遺伝的に不安定な菌や栄養要求の複雑な菌を保存するには凍結乾燥法<sup>1)</sup>やセラチンディスク法<sup>2-4)</sup>、液体窒素による保存法<sup>5)</sup>が用いられる。しかし、これらの方法はいずれも操作が煩雑であったり、特別な装置が必要であるため、一般病院の検査室での使用には不適な場合が多い。

菌株保存用キットとして1995年にわが国で入手可能となったマイクロバンク (Microbank; Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada; アスカ純薬, 図1) はバイアル1本中に液体培地とドーナツ型セラミックビーズ25個が含有されており、純培養した菌苔をバイアル内の液体培地中に濃厚に懸濁し、ビーズに菌を付着させた後、余分な培地を除去して凍結保存するというものである。

今回われわれは取り扱いが困難で死滅しやすい菌株を中心に検討し、若干の知見を得たので報告する。

## ■材料および方法

### 対 象

供試菌株は栄養要求の厳しい菌、死滅しやすい菌等を対象とし、下記の9菌属43株を選んだ。

1) *Helicobacter pylori*

標準菌株 ATCC43504を含む 5株

2) *Legionella pneumophila*

標準菌株 ATCC33215, ATCC35289および  
*Legionella* spp. 3株

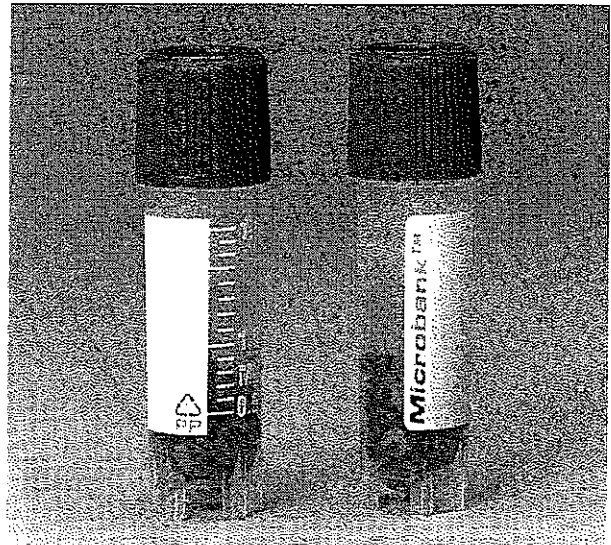


図1 Microbank™

3) *Haemophilus parainfluenzae* 5株

4) *Capnocytophaga* spp. 5株

5) *Moraxella catarrhalis*

標準菌株 ATCC25238を含む 5株

6) *Vibrio cholerae* 1株, *V. fluvialis* 1株

*V. parahaemolyticus* 3株

7) *Gardnerella vaginalis* 5株

8) *Eikenella corrodens* 5株

9) *Campylobacter jejuni* 3株

### 方 法

#### 1) 保 存

増菌した菌株をそれぞれマイクロバンクバイアル内の液体培地に McFarland #3~4に懸濁させた。十分に転倒混和することにより菌をビーズに吸着させた後、

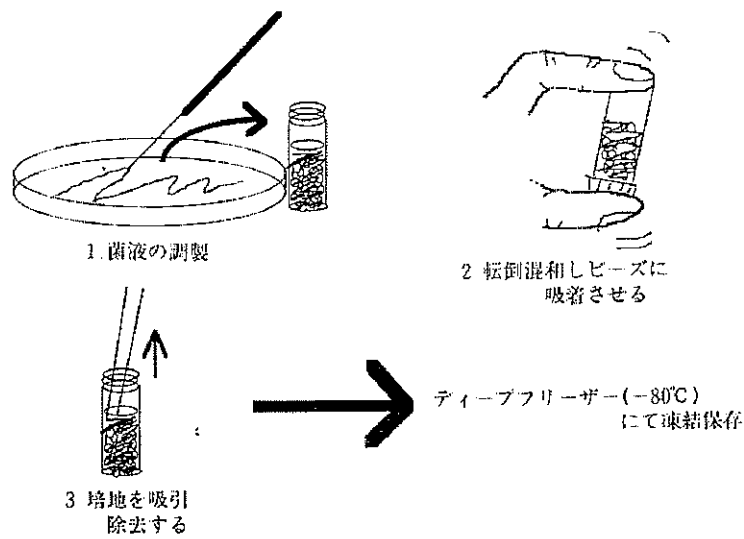


図2 Microbank™の保存方法

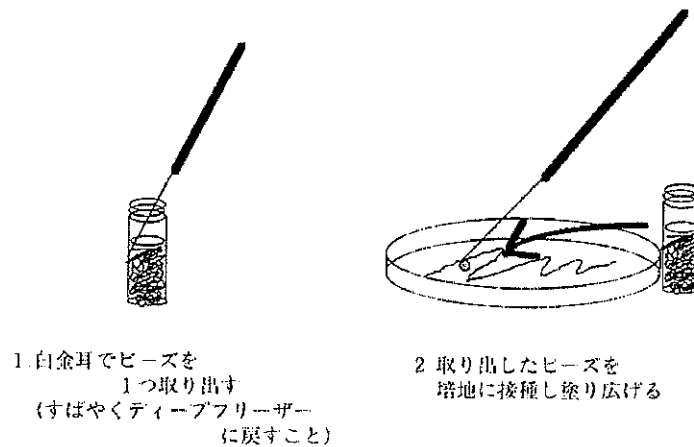


図3 菌株復元方法

表 各菌種における判定時培養条件

菌種	培養条件	使用培地
<i>H. pylori</i>	35°C (15% CO <sub>2</sub> ), 72時間培養	ポアメディア® HP 分離培地(栄研化学)
<i>Legionella</i> spp	35°C, 1週間培養	ポアメディア® WYO-α 寒天培地(栄研化学)
<i>Haemophilus</i> spp.	35°C (5% CO <sub>2</sub> ), 24時間培養	チョコレート II™ 寒天培地(BBL)
<i>Capnocytophaga</i> spp.	35°C (5% CO <sub>2</sub> ), 24時間培養	チョコレート II™ 寒天培地(BBL)
<i>M. catarrhalis</i>	35°C (5% CO <sub>2</sub> ), 24時間培養	TSA II™ 5% ヒソジ血液寒天培地(BBL)
<i>Vibrio</i> spp.	35°C, 24時間培養	TCBS 寒天培地 “栄研®” (栄研化学)
<i>G. vaginalis</i>	35°C (5% CO <sub>2</sub> ), 48時間培養	チョコレート II™ 寒天培地(BBL)
<i>E. corrodens</i>	35°C (5% CO <sub>2</sub> ), 48時間培養	TSA II™ 5% ヒソジ血液寒天培地(BBL)
<i>C. jejuni</i>	42°C (5% O <sub>2</sub> , 10% CO <sub>2</sub> ), 48時間培養	ポアメディア® HP 分離培地(栄研化学)

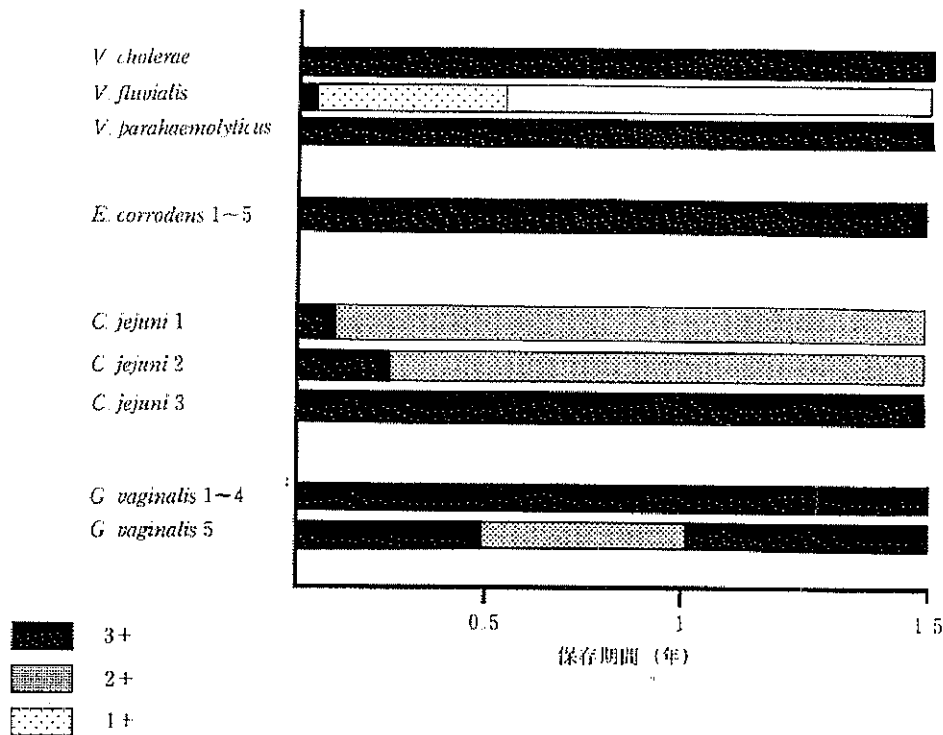


図4 菌量の変化(1年半)

懸濁液を残らず吸引除去し、ディープフリーザー(-80°C)で凍結保存した(図2)。

2) 判定

保存後1週, 2週, 3週, 4週, 2カ月, 3カ月, 6カ月, 12カ月, 1年半, 2年と定期的にビーズを取り出し培地上で転がした後, 白金耳で培地全体に塗り広げ(図3), 表に示した条件で培養した。

ただし *H. pylori* は白金耳で塗り広げることにより菌が死滅しやすいためビーズを培地上で転がすのみとした。

なお, バイアル内のビーズの取り出しは可能な限り速やかに行い, 直ちにフリーザーに戻した。

菌株の評価は下記のように定義した。

1. *H. pylori*

- 3+ 一直線上に発育したもの
- 2+ 10~多数のコロニーが発育したもの
- 1+ 1~9個のコロニーが発育したもの

2. *H. pylori* 以外の菌株

- 3+ 培地全体に菌が発育したもの
- 2+ 一直線上に発育したもの
- 1+ 数個のコロニーが発育したもの

■ 結 果

1年半保存した菌株の成績を図4に示す。*V. fluvialis* は他の菌と比較して著しく生存期間が短く, 2週目で減少がみられ1年半で生存が認められなくなった。*V. fluvialis* 以外の菌株では *C. jejuni*, *G. vaginalis* に菌量の減少がみられたが *G. vaginalis* は *Capnocytophaga* spp. 同様その後の培養では3+を示した。その他の菌株では1年半まで減少することなく十分な生存が認められた。

2年間保存した菌株の成績を図5に示す。図にみられるように *H. pylori* の2株, *H. parainfluenzae* の1株に菌量の減少がみられた。1年半の時点で減少のみられた *Capnocytophaga* spp. は2年では3+であった。

■ 考 察

われわれは *H. pylori* や *H. parainfluenzae* などの菌種はきわめて死滅しやすく, -80°Cで凍結しても長期保存が困難なことを経験してきた。当初これらの菌種はマイクロバンクにおいても長期の保存には耐えら

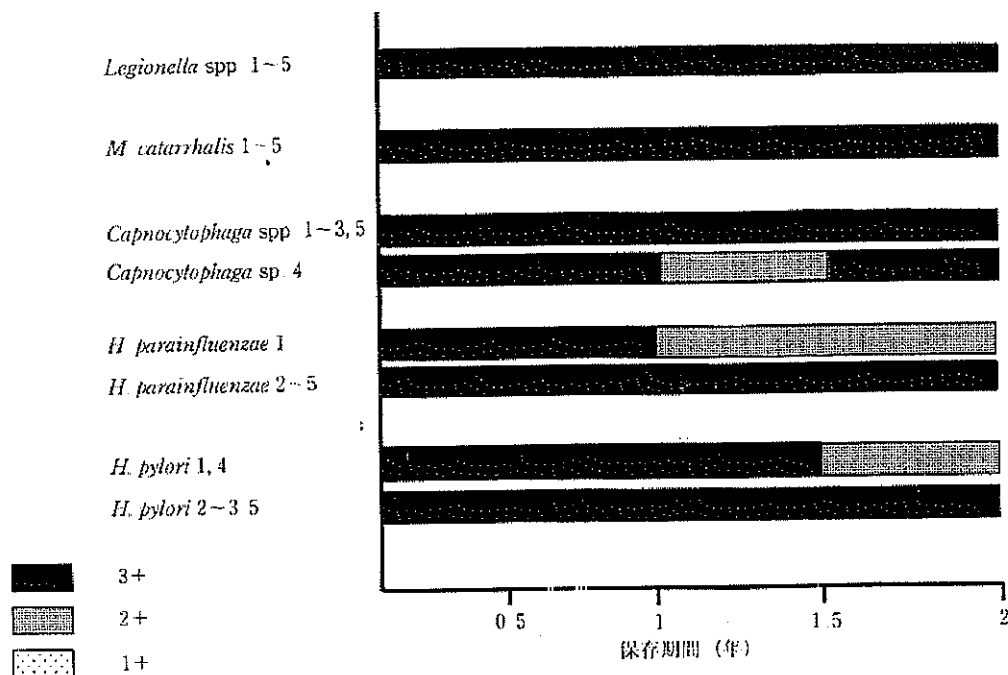


図5 菌量の変化(2年)

れないと考えていたが、予想以上に良好な成績が得られた。

また、菌量の減少がみられたものの今回検討した *V. fluvialis* を除くすべての菌株において $-80^{\circ}\text{C}$ で1年半および2年の長期保存が可能であることが示された。滝沢ら<sup>6)</sup>は種々の菌株を $-20^{\circ}\text{C}$ で3カ月間検討し、十分に保存可能と報告している。ディープフリーザーがなくても使用できるという点では利用価値は高いが、今回の検討と比較すると菌種によっては $-80^{\circ}\text{C}$ に比べ生存期間がきわめて短く、頻回に接種し直さなければならぬ。

また、滝沢ら<sup>6)</sup>は *H. parainfluenzae* や *Campylobacter* spp は3カ月以上の保存には耐えられない、もしくは不安定であるとしており、菌の生存限度を3カ月としている。 $-80^{\circ}\text{C}$ では多少の減少はあるものの *Campylobacter* spp では1年半、*H. parainfluenzae* では2年の長期保存が可能であった。今後もさらに長期保存が可能であるか継続観察中である。

*Capnocytophaga* spp と *G. vaginalis* は一度菌量が2+に減少したが、次に取り出した時点では3+となっていた。これは菌液調整時にビーズに菌を均等に付着させることができなかつたためと考えられる。

現在用いられている方法のなかで簡便なものとしては、ハートインフュージョン寒天培地の高層に穿刺培養後、密栓保存する方法や培地での継代培養、L-brothを用いた $-80^{\circ}\text{C}$ での凍結保存法がある。しかし、穿刺による保存方法は場所の確保が大変であり、対象菌種が限定されている難点を有している。継代培地は頻りに植え継ぎを行うため雑菌の混入の危険性が高く、変異が起こりやすい。L-brothを用いた保存は凍結融解を繰り返すため菌株が死滅しやすく、雑菌混入の危険性を伴っている。

これらに対して、マイクロバンクは操作が簡便でしかも1バイアル中にビーズを多数含有しているため随時取り出して使用でき、頻回に取り出しても菌液を調製し直す必要がない。今回、一部保存できない菌株もあったが、現在使用されているさまざまな保存法の問題点を解消することができ、かつ検査室の実状にあった保存法として今後検査室での利用価値は高いと思われる。

菌株保存用キットとして市販されているマイクロバンクを用いて9菌属43菌株を検討し評価したところ、多くの菌株で1年半以上の長期保存が可能であった。

マイクロバンクは操作が簡便で随時取り出して使用でき頻回に菌液を調製し直す必要がなく、検査室の実状にあった保存法として利用価値は高いことが確認された。

文 献

- 1) Owen RJ, On SI, Costas M : The effect of cooling rate, freezing-drying suspending fluid and culture age on the preservation of *Campylobacter pylori* *J Appl Bacteriol* 66 : 331-337, 1989.
- 2) Stamp L : The preservation of bacteria by drying *J Gen Microbiol* 1 : 251-265, 1947.
- 3) Douglas GW, Balows A, Rhoden D *et al.* : In-use

evaluation of a commercially available set of quality control cultures *Appl Microbiol* 25 : 230-234, 1973.

- 4) Obara Y, Yamai S, Nikkawa T *et al.* : Preservation and transportation of bacteria by a simple gelatin disk method. *J Clin Microbiol* 14 : 61-66, 1981.
- 5) Gilmour MN, Turner G, Berman RG *et al.* : Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of gram-negative anaerobes. *Appl & Environ Microbiol* 35 : 84-88, 1978.
- 6) 滝沢金次郎, 山井志朗, 松島章喜ほか : 臨床細菌検査室における菌株保存用キットマイクロバンクの評価. *臨床と微生物* 20 : 375-377, 1993.

\* \* \*