

ラボでの微生物ストック維持を避けるべき 5 つの理由

[Laurie Kundrat](#) 2018 年 1 月 25 日



品質管理に使用する標準微生物菌株は、購入した当初と同一であるということは確実でしょうか？

Cross、Russel、Desai が実施した研究では、8 つの微生物検査研究所で調査しました。Listeria monocytogenes および Staphylococcus aureus の培養している菌株のいくつかは、元々の National Collection of Type Cultures (NCTC) 株と遺伝的に異なることが、蛍光増幅断片長多型 (FAFLP) 解析を用いて調査した結果判明しました。最初にイングランドの NCTC から購入し培養した微生物株をクライオビーズで凍結させました。¹

何が原因で遺伝子変異が起こったのでしょうか？ 3 つの可能性があります。

- ・ コンタミネーション
- ・ 繰り返し継代培養による遺伝的浮動
- ・ 冷凍庫での保存に起因する遺伝的改変（微生物を適切に保護するには暖かい場合、等々）

著者らは、菌株のいくつかがヒトの皮膚に見られるブドウ球菌の菌株で汚染されている可能性があると考えています。遺伝的浮動の可能であるが、どの程度の頻度で菌株を継代、培養したかは分かっていません。しかしながら、著者らは、8 つの微生物検査研究所のうち 1 研究所が、8～10 年前に黄色ブドウ球菌株を購入したことを知り、3 つの研究所は黄色ブドウ球菌株をいつ購入したかについての情報を有していませんでした。

多忙な研究所が遺伝的変異のリスクを減らし、汚染を避けるための1つの方法は、標準微生物菌株を使用することです。Microbiologics 社のような定評のある商業用微生物の提供は、培養微生物の生存性、安定性、純度を保証します。研究所は毎月新たな培養を開始し、サプライヤーが提供する方法の指示に従うだけです。標準菌株の保全をアウトソーシングする5つの理由は以下となります。

1. 保存装置は、超低温冷凍庫を使用することを推奨します

-20℃の冷凍庫で1年間保存された細菌は、氷晶と細胞内の化学反応が損傷を引き起こします。^{2,3} いくつかの業界の標準として、微生物を超低温で保管することは、細胞のより長い生存率をもたらすため、-60℃以下の冷凍庫を推奨しています。

- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) は、「いくつかの品質管理 (QC) 菌株、特にプラスミド媒介抵抗性を持つものは、-60℃以上の温度で保存するとプラスミドを失うことが示されています」と述べています。
- ISO 11133 によると、「標準微生物菌株は複数に分けて保存する必要があります。-70℃以下、または凍結乾燥を行う。より高い温度では、生存期間が短縮され、遺伝的改変が起こるかもしれない」とあります。
- Personal Care Products Council (PCPC) の実験マニュアルには、-70℃~-130℃の超低温冷凍法があり、「通常の凍結で得られるものと比較して優れた培養可能性を提供する」と述べています。

Microbiologics 社の標準微生物株を使用している研究所では、高価な超低温冷凍庫を使用して標準微生物菌株を保管する必要はなく、停電により等の事故や間違っ、一晩中冷凍庫外に放置された場合に、培養できなくなるという心配をする必要はありません。さらに、必要な電源も少なく済みます。以下のリストは、凍結培養を維持するために必要な供給源と、Microbiologics 社が提供するすぐに使用可能な標準菌株を使用する場合で、比較しています。

超低温冷凍庫にて保管する菌株

-80℃保管
冷凍庫用アラーム
停電の場合のバックアップシステム
クライオビーズ
培地
ラベル

Microbiologics 社菌株

冷蔵 (2-8℃)
培地

2. 標準微生物菌の保存培養の維持は時間がかかり、ミスをする可能性が高くなります

Microbiologics 社製品を使用する場合、研究室の人員は貴重な時間を費やす必要はありません。

- ・ 凍結培養
- ・ ラベリング
- ・ 融解してからの培養
- ・ 微生物を増殖させた後の形態学的特徴および純度の確認

凍結する作業をなくすことで、時間を節約するだけでなく、混同やミスを回避することができます。

- ・ 凍結の潜在的な問題には、部分的に融解した後のクライオビーズの再凍結（繰り返し凍結融解を行うことで、生物の遺伝的完全性を損なう可能性があります）⁷。
- ・ ミスラベルチューブ
- ・ 流出または汚染する可能性のあるクライオビーズ
- ・ 冷凍庫でのチューブの誤配置と紛失
- ・ 増殖活性を失った微生物

保存維持方法の比較

冷凍 (-20℃~0℃)

高額ではない

生存率低い

温度による細胞の損傷

冷凍保護剤で凍結 (-70℃)

保存期間が数年

高価：超低温冷凍庫、

凍結保護剤が必要

停電時には冷凍庫のアラームと

バックアップシステムが必要

Microbiologics 社製品及び 維持管理計画を使用した場合

時間削減

凍結乾燥ペレットを冷蔵庫に保存可能

限られた継代数により遺伝的変異リスクを
軽減

トレーサビリティにより研究所に保証を提供
知識豊かで親切なテクニカルサポートを
利用可能

3. 純度と識別が危険にさらされる可能性があります

信頼できる供給源から製品化した標準微生物菌株を手に入れることは、研究所が株の純度と同定を気にして推測する必要がないことを意味します。Microbiologics 社、ISO 17025 認定機関に基づいて認定された試験および技術を使用して同定された各ロットの純度を確認し、微生物が汚染されないことを保証します。Microbiologics 社は、お客様での培養維持を 1 ヶ月以内と推奨しているため、微生物菌株が汚染される機会は少なくなります。Microbiologics 社は、凍結乾燥の前後にタンパク質分解、表現型および/または感受性試験を行うことによって、保存プロセス中に安定したままである株の生理学的特性を検証しています。

4. 過度の継代培養は突然変異のリスクを増加させます

Microbiologics 社製品を使用し、微生物菌株を 1 ヶ月間維持する計画に従うことにより、研究所では標準微生物参照株培養物からの継代数を制限することができます。米国薬局方（USP）によると、過剰な継代培養は表現型の変化または突然変異のリスクを増加させる可能性があります。

いくつかの業界の標準では、1 ヶ月後に作業用ストックカルチャーを廃棄することを推奨しています。

- ISO 11133 によれば、標準微生物菌株は適切な温度で寒天培地に 4 週間まで保存できるとして
い
ます。
- CLSI は、抗菌薬感受性試験で使用される菌株を寒天培地で 1 ヶ月間維持することを推奨していま
す。CLSI は、いくつかの抗生物質耐性株は抗菌性を含むプラスミドを容易に失う可能性があるた
め、
寒天培地で 2 週間のみ維持すべきであることに注意しています。⁸

5. サポートがない、時間が厳しくなります

- Microbiologics 社は、製品を生産するロットごとに試験成績書を発行しています。試験成績書に
は、Microbiologics 社が最初に標準微生物菌株を購入した場所および微生物株についてどのような
生化学的および表現型試験が行われたかを確認することができます。査察官が微生物菌株を参照する
培養のトレーサビリティについて質問する場合は、証明書を提示するだけです。
- ご質問や問題がある場合は、技術サポートチームの経験豊富な微生物学者がお手伝いします。

References

¹Cross, L.J., Russell J.E., and Desai, M. *Examining the genetic variation of reference microbial cultures used within food and environmental laboratories using fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis*. FEMS Microbiology Letters. Volume 321, Issue 2. August 2011.

²OPS DIAGNOSTICS: *A Guide to Bacteria Preservation: Refrigeration, Freezing and Freeze Drying*.

<https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/aguidetobacteriapreservation.htm>

³Petti, C. A. and Carroll, K.C. *Procedures for the Storage of Microorganisms*. In: Manual of Clinical Microbiology 10th Edition (pp. 124-131). Versalovic, J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgenson, J.H., Landry, M.L., Warnock, D.W. (Eds.) ASM Press, Washington, DC. 2011.

⁴Clinical Laboratories Standard Institute, MO2-A12, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Approved Standard 12th Edition. Jan 2012.

⁵ISO 11133. *Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media*. www.iso.org.

⁶Personal Care Products Council Microbiology Guidelines. *Maintenance and Preservation of Test Organisms*. 2016

⁷Smith, D. and Ryan, M. *Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms*. The Scientific World Journal, Volume 2012, Article ID 805659. 2012

Microbiologics 社 BLOG を翻訳しております。原文は下記リンクでご確認できます。※日本語訳は原文解釈の参考としてご利用下さい。

<http://blog.microbiologics.com/5-reasons-to-avoid-maintaining-stock-cultures-in-your-lab/>

ご不明点、ご質問、製品のお問い合わせに関してはレーベン・ジャパン株式会社までお気軽にお問い合わせ下さい。

レーベン・ジャパン株式会社 埼玉県越谷市川柳町 3-110-8

TEL : 048-961-1781 FAX : 048-961-1782

メールでのお問い合わせ : info@raven-japan.com

Microbiologics 社製品紹介 URL : <http://raven-japan.com/>