

-80℃フリーザーによる糸状菌凍結保存株の 管理体制について

岡根 泉

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源部門 (NBRC)
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

Maintenance of Frozen Cultures of Filamentous Fungi in -80℃-freezers

Izumi Okane

Biological Resource Center(NBRC), Department of Biotechnology,
National Institute of Technology and Evaluation
2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

1. はじめに

NBRCにおける微生物株の分譲ならびに寄託業務については、(財)発酵研究所(IFO)からの微生物株移管後、開始されてから3年余りが経過した。この間、新規NBRC登録株として約1,000株(非公開株を含む)が追加され、2005年6月現在、NBRC登録株はおよそ16,000株となっている(全保存株数は約28,000株)。この中でも、特に糸状菌の株数増加が目立っているが、その中には孢子形成が十分でないために乾燥保存法[NBRCではL-乾燥保存法(6)を採用]が適用できず、-80℃超低温電気フリーザー(以下、-80℃フリーザー)による凍結保存で対応せざるを得ない菌株が依然として多く含まれている。今後もその数が着実に増えることは想像に容易いが、それと同時に、均質な菌株の安定かつ持続的な維持管理と提供、それらの危険分散、そして菌株増加に対応したスペースの確保に関する問題が浮上する。また、特に最近、OECD-BRC認定、ISO9000取得といった微生物系統保存業務における世界標準としての品質管理体制の構築が検討されている。そのような中で、NBRCにおける糸状菌凍結保存株の管理体制については、その見直しと改善の時期に差し掛かっているものと認識している。多くのユーザーからの分譲依頼が毎日のように届く中で、保有する多くの保存株全てについて、それらが抱える問題を一気に解決することは非常に難しいのが現状である。しかしながら、今がその好機として捉え、着実に改善の方向へと進めるべく対策の検討を始めたところであ

る。

ここでは、NBRCにおける糸状菌凍結保存株、特に子囊菌・不完全菌保存株を例に、それらの管理体制について紹介するとともに、現在取り組んでいる凍結保存株に関する改善と試み、さらに在庫管理について紹介する。

2. 糸状菌凍結保存株とその保存方法および管理体制

表1にNBRCで保存している微生物株数の内訳および凍結保存株数を示した。登録株数において糸状菌は約8,000株とその割合は多く、全体のおよそ半数を占める。さらに凍結保存株数を見てみると、その66%にあたる5,400株余りが凍結保存となっている。糸状菌以外の微生物については、アーキア保存株の1/3が液体窒素保存されている一方で、他の微生物株のほとんどはL-乾燥保存法が適用されている。糸状菌凍結保存株については、孢子形成不良株ならびに凍結感受性株に対して-80℃フリーザーまたは液体窒素による凍結保存法が適用されている。

次に、糸状菌保存株についてその内訳と凍結保存株数を表2に示す。ただし、ここに示す担子菌ならびに鞭毛菌については、-80℃凍結では保存性が不安定な凍結感受性株が多く含まれるため、全てに対して液体窒素(気相、約-170℃)による凍結保存法が適用されている。一方、それ以外の糸状菌については、接合菌は全体の7%程度が凍結保存株であるのに対して、子囊菌および不完全菌については、いずれも60%余

表1 NBRC 微生物保存株数の内訳と凍結保存株数 (2005年6月現在)

	糸状菌	酵母	細菌	アーキア	バクテリオファージ
合計 (株)	8284	3267	4495	69	69
凍結保存株 (株)	5450	43	1	23	0
凍結株の割合 (%)	65.8	1.3	0.02	33.3	0

表2 糸状菌保存株数の内訳と凍結保存株数 (2005年6月現在)

	子囊菌	不完全菌	担子菌*	接合菌	鞭毛菌*
合計 (株)	2125	3976	1403	515	265
凍結保存株 (株)	1305	2443	1403	36	265
凍結株の割合 (%)	61.4	61.4	100	7	100

*全て液体窒素保存

りの菌株に対して-80℃フリーザーを用いた凍結保存が行われている。

続いて、糸状菌凍結保存株の保存方法ならびにこれまでの管理体制について述べる。

まず、凍結保存株の保存標品 (以下、凍結標品) 作製には、容器として耐凍性プラスチックチューブを使用する (NBRCではインナーキャップ式セラムチューブ2mlを使用)。凍結保護剤としては10%グリセロール+5%トレハロース水溶液を採用している。10%グリセロール水溶液でも概ね問題はないが、酵素タンパクや細胞膜の保護作用が知られているトレハロースが安価に購入出来るようになったことで、現在ではグリセロールにトレハロースを添加した保護剤を使用している。その採用に際しては、凍結感受性株が多く含まれる鞭毛菌類を用いた予備試験を行い、その復元率で好成績が確認されている (中桐, 未発表)。

凍結標品の作製方法は、まず、寒天平板培地に菌を接種し、コロニーが十分発達した時点で滅菌コルクボーラーまたはストローを用いて菌体を寒天培地ごとディスク状に打ち抜く。その際、出来る限りコロニー周縁部の菌糸成長が活発な場所を選ぶようになっている。それらをオートクレーブ滅菌済みの上記保護剤 (1ml) 入りチューブに入れ、十分に保護剤が菌体ディスクに浸透するまで30分から1時間ほど低温 (4℃) で放置する。その後、それらのチューブを-80℃フリーザーに入れ凍結する。解凍に際しては、30℃の温浴で急

速解凍する。

現在NBRCで行われている糸状菌の凍結保存の有効性については、IFOで詳細に検討された (1, 3, 4, 5)。また、解凍した凍結標品の常温での直接送付の安全性についても、実際に国内外の保存機関に送付後、復元試験を実施してもらいその生残の有無について確認が行われた (2)。全ての該当菌株について凍結標品が作製され分譲体制が整備されたのは、およそ12年前の筆者がIFOに入所した頃のことである。

IFOでは標品収納引き出しケースも含め全てアルミ製の保存容器が用いられていたが、その重量についてはNBRCへの移管作業であらためて実感することとなった。また、凍結標品は室温での作業でも支障のないL-乾燥アンプルに比べ、融解を避けるために標品取り出しや移動で作業時間が制限され、標品管理や在庫管理にはより時間と労力を必要とする。また、標品整理の点でも取り扱い上の時間的な制限や保存スペースが簡単に再編できないため、たびたび分譲用標品とは別に、補充標品作製時に収まりきれない標品の保存ラック (バックヤード) を用意せざるを得ない。そのため、必然的に同一株が複数カ所に散在した状態で管理せざるを得ない状況が生ずる。さらには、途中で孢子形成能低下によりL-乾燥保存から凍結保存に切り換えねばならず、連番をやむなく無視して保管せざるを得ない株もたびたび生ずる。また、一度凍った保存ラックやチューブへのラベリングの難しさも凍結標品



図1 アルミ製ラック(左)および紙製収納ケースとクリップ止めラベル(右)

の管理を面倒にしている要因の一つといえる。ただし、最近では凍結標品の表面にラベル等が貼り付け可能な特殊な接着剤が開発されており、この点に関しては大幅な改善が出来るものと期待している。

以上のように、 -80°C フリーザーを用いた凍結標品の保存・管理では、その作業上の制限と保存スペースの問題が常に頭を悩ますところである。このような現状の中で、系統保存業務における世界標準としての品質管理体制の構築を目指し、これまで以下のような改善を行っている。

3. 改善点

1) 保存容器

前述のとおり、IFOでは全てアルミ製の保存容器(図1左)を用いていたが、その重量から標品の出し入れでは労力を要した。また、凍結後の収納ケースに新たに菌株番号等を明瞭に加筆することには難があった。そのため、NBRCにおける新規受託株(NBRC 100000台番号)については、収納ケース部分に紙製保存ケースを採用した。また、収納ケース部へのラベリングについては、ケースサイズに合わせて作製した紙製ラベルに菌株番号を記し、それを市販のクリップで止めることで収納標品の変更時などに融通が利くよ

うにした。また、それまで原則として凍結保存株1株当たり10標品を用意していたところを各20標品とし、1株あたりの保存スペースに余裕を持たせることとした(図1右)。

2) バックヤード

異なる保存担当者がそれぞれ子囊菌および不完全菌の保存標品を取り扱う状況の中で、補充標品の余剰分をバックヤードとして管理する際、これまでは分譲標品と同様にこれらを合わせて、菌株番号順に並べて管理してきた。しかし、やはりここでもスペースの問題が生じ、さらに標品の散在化と在庫管理上での混乱を招く状況となった。そこで、現在はそれらを保存担当者別に分割して管理することで、これまで感じられていた煩雑さの軽減を図り、保存スペースにも余裕を持って標品の在庫管理が出来るように努めている。

3) シード標品の整備

将来的なOECD-BRC認定機関としての認可およびISO9000取得を踏まえた対策の1つとして、より均質な菌株の提供とクレームに対する迅速な対応を目的に、全ての子囊菌・不完全菌凍結保存株に対して、シード標品およびロット保管用ラックを準備した。その内訳としては、シード用5本、ロット保管用5本の計10標品分のスペースを用意した(図2)。このうち、

最古ロットについては永久保存としている。また、12段式ラックの最下部についてはL-乾燥保存法から保存法変更となる菌株のための予備スペースとして確保した。なお、シード用標品の補充については、シードを元にして再調整することとしている。

4. 在庫管理

NBRC データベースは保存微生物株に関する各種情報データベースで構成されているが、在庫管理については分譲管理データベースで行っている。まず、各菌株の分譲用標品の新規ロットが作製された時点で、それらの情報とその菌株担当者によって入力され、分譲担当者による承認後、正式に登録される。そして、分譲依頼株について分譲受付が済み、標品が出庫された段階で自動的に標品数が減算される仕組みとなっている。また、分譲用として登録されている標品数が残り2本、あるいは各種検定株については残り10本などとなれば、それらの情報とその菌株担当者に報告され新たなロット作製が促される。以上のことは、糸状菌およびアーキア凍結保存株を除く全ての微生物株について適用され、運用されている。

糸状菌凍結保存株の在庫管理については、基本的には保存担当者が各自で行っている。その理由としては、先にも述べたような標品の取り扱いの面倒さや、特にバックヤードにおける標品の保存フリーザーあるいはフリーザー内の収納位置の決定と把握が保存担当者に委ねざるを得ないこと、そして、それらの理由から実際に -80°C フリーザーからの標品の出庫については保存担当者自身に任されていることが挙げられる。

現在は以上のような状況ではあるが、子囊菌・不完全菌凍結保存株については解凍後の復元についてもほとんど問題がなく、需給は基本的に1対1であるため、L-乾燥アンプルと同様にNBRC データベース上での在庫管理は可能であることから現在整備を進めているところである（図3）。

しかしながら、凍結チューブ解凍後、スラントに移植し生育確認をした上で送付している担子菌、特に菌根性のものは、需給が1対1で無いケースがほとんどである。すなわち、2つの分譲依頼に対して1チューブ当たり2個入っているディスクをそれぞれ1本の斜面培地に移植し対応するケース、または生育不良のため新たに標品を解凍、使用するケースがある。そのため、子囊菌・不完全菌と同様に即、データベース上で

在庫管理を行うことはむしろ煩雑な作業を伴うことが予想される。

糸状菌凍結保存株の全てについての一元的な在庫管理については、外箱は出来ているものの未だに実際の運用がそれに則していないのが実状である。また、別報で紹介されているようなバーコードによる在庫管理という方法も非常に魅力的ではあるが、現在保有する全微生物株にそのシステムを導入することには、保存されている膨大な標品を前にして躊躇を覚えるのが正直なところである。しかしながら、保存担当者だけしか把握しきれていない情報あるいは状況が存在することは適当ではないと思われ、例えば、保存担当者変更時に業務引継ぎに相当な時間を要するような状況は避けるべく、可能な限り一元的な管理が出来るような方向で改善を進めていきたいと考えている。

5. おわりに

子囊菌・不完全菌凍結保存株を例に、それらの管理体制ならびに現在取り組んでいる改善策と在庫管理について述べた。今後も着実に増加する凍結標品の均質な菌株の安定かつ持続的な維持管理と提供、そして危険分散については今後もより良い対策を講じていきたいと考える。しかしながら、その一方で、菌株増加に対応したスペース確保の問題については、それを解消する術は未だもって良策を見出せていない。より現実的な対策の1つとしては、容器形状といった保存形態そのものを見直すことも必要となるだろう。そして、それに即した菌体培養方法の検討や、適切で安全な保存作業工程についても模索していく必要があるだろう。いずれにしても、この保存スペースの問題を常に念頭に入れ、将来を見据えながらハード面、ソフト面からの対策を講じていく必要がある。

文 献

1. Ito, T. Frozen storage of fungal cultures deposited in the IFO culture collection. *IFO Res. Commun.* **15**: 119-128 (1991).
2. Ito, T. A simple method for the transport of fungal cultures stored by freezing. *Bull. JFCC* **9**: 9-12 (1993).
3. Ito, T. and Nakagiri, A. Viability of frozen cultures of basidiomycetes after fifteen-year storage. *Microbiol. Cult. Coll.* **12**: 67-78 (1996).

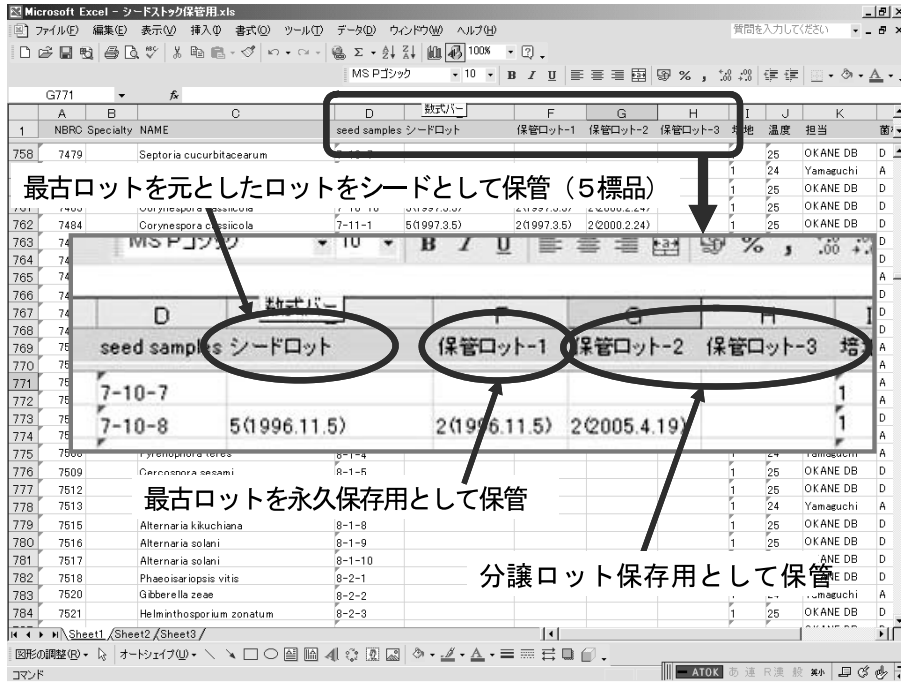


図2 シードおよびロット保管用標品の管理



図3 NBRCデータベースによる凍結標品の在庫管理

4. Ito, T. and Yokoyama, T. Preservation of basidiomycete cultures by freezing. *IFO Res. Commun.* **11**: 60–70 (1983).
 5. Ito, T. and Yokoyama, T. Further investigation on the preservation of basidiomycete cultures by freezing. *IFO Res. Commun.* **13**: 69–81 (1987).
 6. 坂根 健, 西井忠止, 伊藤忠義, 見方洪三郎. L-乾燥法による微生物株の長期保存法. *日本微生物資源学会誌* **12**: 91–97 (1996).
-