

凍結乾燥法によるPasteurella piscicidaの保存

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	村岡, 愛一郎 橋本, 伸一 楠田, 理一
巻/号	51巻10号
掲載ページ	p. 1659-1663
発行年月	1985年10月

凍結乾燥法による *Pasteurella piscicida* の保存^{*1}

村岡愛一郎・橋本伸一・楠田理一

(1985年3月30日受理)

Preservation of *Pasteurella piscicida* by Freeze-dryingAiichiro MURAOKA^{*2}, Shinichi HASHIMOTO^{*2}, and Riichi KUSUDA^{*3}

Pasteurella piscicida is the causative agent of pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Preservation of the bacteria without genetic changes, especially in pathogenicity, is essential not only for bacteriological and pathological studies but also for the production of highly effective bacterins for the control of the disease.

This report describes the survival and pathogenicity of *P. piscicida* preserved by freeze-drying. Freeze-drying media, prefreezing methods, and storage temperatures were investigated. Freeze-drying media with a serum base were assessed. Prefreezing was carried out in liquid N₂, solid CO₂ with ethanol, solid CO₂, and in a freezer (-20°C). The freeze-dried bacteria were stored at 25, 4, -20 and -80°C. Virulence of the control bacteria was maintained using fish passages where the bacteria were injected into yellowtail and recovered on media. For the pathogenicity assessment, fish were infected by the waterborn route in sea water. Freeze-dried bacteria were recovered from the ampoules and cultured in media, then added to sea water.

The results showed mist desiccans was the most effective drying medium with high survival for 6 months after preservation. The mist desiccans contained 3 parts calf serum and 1 part nutrient broth with 7.5% galactose and 0.5% NaCl. Prefreezing method and storage temperature below 4°C did not affect the survival. However, storage at 25°C decreased survival at 6 months after drying. Pathogenicity was maintained for at least 6 months after freeze-drying.

ブリ類結節症は稚魚期に発生し、ハマチ養殖に大きな被害をもたらす重要な疾病の一つである。本症の原因菌 *Pasteurella piscicida* の病原性は高層培地による継代保存ではすみやかに低下し、分離後約3か月で消失するとされている。¹⁾ しかし、本菌の長期保存法に関する研究は少なく、液体窒素²⁾ およびフリーザー¹⁾ を用いた凍結保存法が知られているのみである。また、近年この疾病に対する予防対策としてワクチンの開発が試みられているが、ワクチンの製造に際しては製造用菌株の形質の保持、特に病原性を維持することが重要な課題となる。

そこで、本研究では菌株の形質の保存性、貯蔵性、輸送性などがすぐれているとされ、多くの微生物菌株の保存施設で採用されている凍結乾燥法について検討した。その結果、本法で広く用いられる数種の血清系分散媒の中から、本菌の保存に適した分散媒を検索することができた。さらに、その分散媒を用いたときの予備凍結速度および保存温度が生残性に与える影響についても明らか

にすることができたので報告する。

材料および方法

供試菌株 1983年6月に高知県土佐市で本症罹患ハマチの腎臓から分離された *P. piscicida* 5866 の2%食塩加1/2濃度 Brain Heart Infusion (BHI: Difco) 高層培地保存株を用いた。なお、本菌株の病原性を魚体通過により維持し、魚体通過後約1か月以内の新鮮再分離株を病原性試験の対照菌株として用いた。

凍結乾燥 特にことわらない限り次の方法で行った。1.8%食塩加 Todd Hewitt Broth (THB: Difco) で24~30時間、25°Cで振盪培養した培養菌液を6,000 rpm、約5分間遠心分離して集菌し、適量量の分散媒に再分散させた。この菌液を滅菌アンプルに0.3 mlずつ分注し、ドライアイス:エタノールまたは液体窒素により予備凍結後、0.1~0.2 Torrで一夜乾燥させた。乾燥終了後減圧下で熔封した。熔封部位は保存中に起こり得

*1 本研究の一部は1984年10月、日本水産学会秋季大会において発表した。

*2 アース製薬(株)技術部 (Technical Research Department, Earth Chemical Co., Ltd., Aiko, Hyogo 678-01, Japan).

*3 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

るひび割れによる空気の流入を防ぐため、バスボンド®(コニシ(株))を塗布して4°Cで保存した。

凍結乾燥菌の復元 約25°Cの室温において無菌的にアンプルを切断し、1.8%食塩加THBで復元した。

生菌数測定 0.8%寒天加THBを用いた混積平板法により求めた。なお、細菌の稀釈には滅菌2%食塩水を用いた。また、コロニーの計数は25°Cで4日間培養後に行った。

分散媒の比較 供試分散媒には組織培養用仔ウシ血清(CS:極東製薬), 7.5%ブドウ糖(和光純薬)加CS, 5.0%イノシトール(半井化学)加CS,³⁾ およびCSを用いたmist desiccans⁴⁾の4種を用いた。なお、mist desiccansはブドウ糖3gとNutrient Broth(Difco, dehydrated)0.13gを蒸留水10mlに溶かし、これに30mlのCSを混合して調製した。これらの分散媒にはすべて食塩を0.5%添加した。滅菌は汙過滅菌によって行った。

mist desiccansに用いる単糖類の比較 ガラクトース(和光純薬), ブドウ糖(和光純薬), 果糖(半井化学), キシロース(半井化学), マンノース(半井化学)およびアラビノース(半井化学)の6種について、上記mist desiccansにおけるブドウ糖と同濃度の0.42MとなるようにCSによるmist desiccansを調製し、これらの分散媒を用いたときの凍結乾燥直後の生残性を比較した。この場合にはアンプルあたりの凍結乾燥直前菌数を同じくするために、各分散媒中の蒸留水のかわりに同一の2%食塩水の細菌懸濁液を用いた。

mist desiccansに添加する食塩濃度の生残性に及ぼす影響 実験1では前項と同様の方法で菌液を加えたときの終濃度が0.25%間隔で0.50~1.50%となるようにガラクトースを用いたmist desiccansに食塩を添加し、凍結乾燥を行った。そして、12日後の生残率を調べた。実験2では0.5%食塩添加および無添加の実験1と同じ分散媒に菌体を直接分散させ、凍結乾燥を行った。そして、3日後と6か月後に生残率を調べた。なお、生残率は菌液の生菌濃度からアンプルあたりの生菌数を求め、これを凍結乾燥直前の菌数として計算した。

予備凍結法の差異が生残性に及ぼす影響 予備凍結法および速度を液体窒素中に1分間、ドライアイス:エタノール中に1分間、ドライアイス冷気中に15分間および-20°Cのフリーザー中に30分間の4種に変え、凍結乾燥直後(1日後)と5か月保存後のそれぞれの生残菌数を比較し、生残性へ及ぼすそれらの影響を調べた。なお、分散媒にはガラクトースおよびCSによるmist desiccansを用いた。

保存中の温度が生残性に及ぼす影響 凍結乾燥菌を

-80, -20, 4 および25°Cに保存し、凍結乾燥1週間後と6か月後の生残率を比較した。分散媒には0.5%食塩加ガラクトースおよび組織培養用ウマ血清(HS: M. A. Bioproducts)によるmist desiccansを用いた。

病原性試験 0.5%食塩加ガラクトースおよびCSによるmist desiccansと0.5%食塩加HSによるmist desiccansを用いた6か月間凍結乾燥保存菌の病原性を比較した。病原性試験は浸漬攻撃によって行った。すなわち、両保存菌株の復水液を1.5%食塩加BHI寒天平板を用いて25°Cで2日間培養後、菌体を滅菌絵筆でかき取り、滅菌2%食塩水に濁懸させ、海水で稀釈したこの菌液にブリ稚魚を5分間浸漬後、約5分間海水で洗滌し、飼育水槽にもどした。なお、対照として新鮮分離株による同様の攻撃群、および浸漬と洗滌操作のみの未攻撃群の2区を設けた。1群の供試尾数および平均魚体重はCSによるmist desiccansの場合がそれぞれ14~15尾および5.0g, HSによる場合がそれぞれ10尾および32gであった。攻撃菌濃度は前者の場合で 1.1×10^5 cfu/ml, その対照の新鮮分離株で 2.0×10^5 cfu/ml, 後者の場合で 2.1×10^6 cfu/ml, その対照の新鮮分離株で 4.1×10^5 cfu/mlとなった。実験中の飼育水温はいずれの場合も21~24°Cであった。また、生残率の計算においては本菌の検出されなかった死亡個体は除外した。

結 果

分散媒の検討 良好な生残性を示す基本的な分散媒を見出すために、数種の血清系分散媒を用いて凍結乾燥し、その2日後に生残率を比較した。その結果、生残率はFig. 1に示すように分散媒の種類により大きく異なり、0.5%食塩加mist desiccansが21%と最も高く、次いでブドウ糖加CSが4.1%、イノシトール加CSが0.31%、CSのみが0.0094%となった。そこで、基本分散媒としてはmist desiccansを採用した。この分散

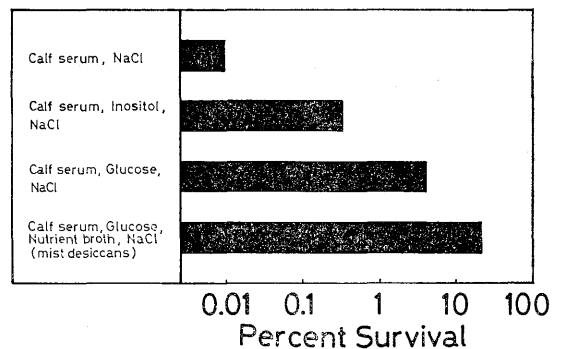


Fig. 1. Survival of *P. piscicida* immediately after freeze-drying comparing various serum based freeze-drying media.

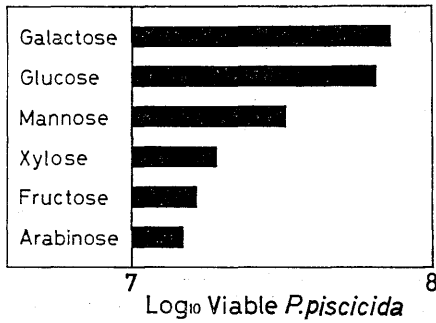


Fig. 2. Survival of *P. piscicida* in mist desiccans with supplementation with galactose, glucose, mannose, xylose, fructose or arabinose.

Table 1. Effect of supplemented NaCl concentration in mist desiccans on survival of *P. piscicida*

NaCl concentration (%)	Survival (%)		
	Exp. 1 after 12 days	Exp. 2 after 3 days	Exp. 2 after 6 months
0.00	—	84	28
0.50	25	67	25
0.75	28	—	—
1.00	29	—	—
1.25	6.8	—	—
1.50	10	—	—

媒に用いるブドウ糖のかわりに、その他の数種の単糖類を用いて凍結乾燥し、その4日後の生残性を比較した。その結果、Fig. 2 に示すようにガラクトースがブドウ糖と同等の効果を示し、生残菌数はマンノース、キシロース、果糖、アラビノースの順に低下した。一方、ガラクトースはブドウ糖よりも水に溶けにくい、凍結乾燥初期過程での融解がやや少ない傾向がみられたので、以後の実験にはブドウ糖のかわりにガラクトースを用いた。次に mist desiccans への食塩の添加量が凍結乾燥直後の生残性に及ぼす影響について調べたところ、実験1では添加量 0.5~1.0% ではほとんど差はなく、それ以上の濃度でやや生残性が低下する傾向がみられた (Table 1)。そこで、実験2では食塩無添加と 0.5% 添加の場合について比較した。その結果、凍結乾燥直後の生残率は前者が 84%、後者が 67%、また6か月後において、それぞれ 28%、25% と余り大きな差異は認められなかった (Table 1)。これらの結果だけでは至適添加食塩濃度の判定は難しいが、塩類濃度が高くなると凍結乾燥途中で融解しやすくなること、本菌が海産魚由来の細菌であることなどを考慮して、主に 0.5% に食塩を添加した mist desiccans を用いて実験を行った。

予備凍結法の差異が生残性に及ぼす影響 ガラクトー

Table 2. Effects of prefreezing methods on survival of *P. piscicida*

Methods	Survival (cfu/ampoule)	
	immediately after drying	after 5 months
Liquid nitrogen	1.7×10^9	1.3×10^9
Dry ice/ethanol	1.2×10^9	1.3×10^9
Dry ice	1.5×10^9	1.2×10^9
Freezer (-20°C)	8.9×10^8	1.8×10^9

スおよび CS による mist desiccans を用いて、予備凍結法を変えて生残性に及ぼす影響を調べた。その結果は Table 2 に示すとおりで、凍結乾燥直後と5か月保存後の生残菌数はそれぞれ $8.9 \times 10^8 \sim 1.7 \times 10^9$ 、 $1.3 \sim 1.8 \times 10^9$ cfu/ml となり、予備凍結法および速度を変えても、生残性にはほとんど差異が認められなかった。また、5か月保存後も生残菌数に大きな変化はなく、保存性は良好であった。

保存中の温度が生残性に及ぼす影響 ガラクトースおよび HS による 0.5% 食塩加 mist desiccans を用いた場合の凍結乾燥菌を種々の温度で保存し、生残率を比較した結果を Table 3 に示す。凍結乾燥後1週間では保存中の温度による差は認められず、生残率は 31~44% であった。しかし、6か月後では4°C 以下では差は認められず、38~68% と良好な生残率を保っていたが、25°C で保存した場合には 0.055% と著しい生残率の低下が認められた。この点については再実験を行ったが、いずれもほぼ同様の結果が得られた。

Table 3. Effects of storage temperatures on survival of *P. piscicida*

Storage temperatures (°C)	Survival (cfu/ampoule)	
	after 7 days	after 6 months
25	44% (8.8×10^8)	0.055% (1.1×10^6)
4	37% (7.3×10^8)	68% (1.4×10^9)
-20	31% (6.1×10^8)	38% (7.7×10^8)
-80	44% (8.8×10^8)	51% (1.0×10^9)

病原性試験 ガラクトースおよび CS を用いた 0.5% 食塩加 mist desiccans, CS のかわりに HS を用いた同様の凍結乾燥した場合の6か月保存後の病原性を調べた結果を Fig. 3 に示す。対照菌株の病原性がやや低い傾向が認められたが、いずれの分散媒を用いた場合にも、6日以内にすべての供試魚が死亡し、病原性は十分に保持されていた。

考 察

凍結乾燥法は細菌の形質を変化させることなく保存できる方法として、多くの微生物保存機関で用いられてい

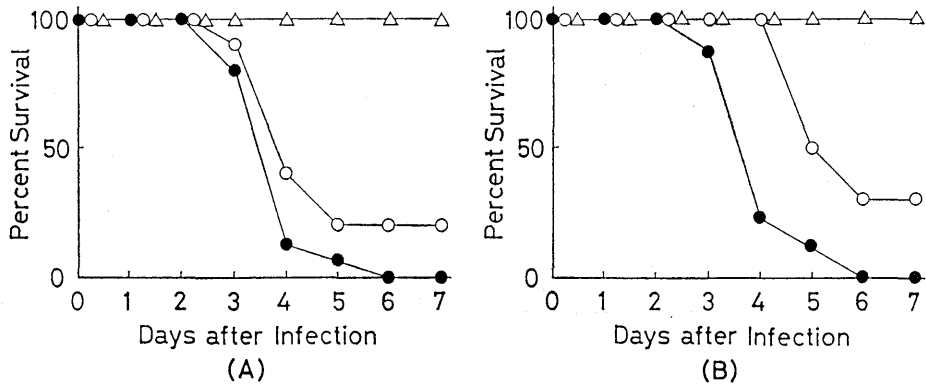


Fig. 3. Virulence of freeze-dried *P. piscicida* after 6 months storage. Infections were conducted by the waterborn route in sea water with freeze-dried and freshly isolated reference strains. (A); The drying medium mist desiccans contained calf serum with 0.5% NaCl. Bacterial concentrations for infection were 1.1×10^5 (freeze-dried strain) and 2.0×10^5 (freshly isolated strain) cfu/ml sea water. (B); Mist desiccans with horse serum instead of calf serum was used. Bacterial concentrations were 2.1×10^5 (freeze-dried strain) and 4.1×10^5 (freshly isolated strain) cfu/ml sea water. The infection methods and conditions were detailed in the text.

●—●: Freeze-dried strain, ○—○: Freshly isolated strain, △—△: Control.

る。そこで、本菌においても一般の細菌の凍結乾燥法で広く用いられている血清系分散媒による凍結乾燥保存を試みた。

微生物保存機関の凍結乾燥保存に使用されている分散媒の主な種類は NRRL*⁴ が CS のみ、NCTC*⁵ がブドウ糖加 CS、NCTC や NCIB*⁶ が mist desiccans であるとされている。また、REDWAY ら³⁾ は分散媒としてイノシトール加血清がすぐれているとしている。しかし、実際にはいずれの場合においても分散媒には CS ではなく HS が用いられている。これらのほかにも血清をベースとした分散媒を用いた諸外国の報告では、CS も用いられているが、⁵⁾ HS が多く使われている。その理由は単に入手のしやすさによるものと思われる。

凍結乾燥法における分散媒には、ベースとなる血清やスキムミルクなどの高分子物質のほかに生存性を高めるために、ブドウ糖やグルタミン酸などの低分子物質が添加される場合が多い。本菌についても、血清をベースとした基本分散媒を比較した結果、イノシトールやブドウ糖のような低分子物質の添加により、凍結乾燥直後の生残性が著しく向上することがわかった。特に良好な生残性を示した mist desiccans は FRY and GREAVES⁹⁾ により報告された分散媒で、古くからその有用性が認められており、⁷⁾ 血清系分散媒の中では最もすぐれた分散媒の一つであると思われる。

本菌は海産魚に由来する細菌で、生育至適食塩濃度は 1.5% 前後であり、⁹⁾ 海水の食塩濃度 (3.3~3.7%) よりもかなり低いことから、食塩は主に 0.5% 添加した分散媒を用いた。しかし、食塩無添加の場合でも生残性は同程度に良好であることから、特に添加する必要はないと思われる。

構造が複雑な原虫や高等動物の細胞の凍結保存では、凍結速度は緩慢な方がよいとされるが、根井⁹⁾ によると、これは細胞内での氷晶形成による障害を防ぐためであり、その障害の程度は細胞内容積と表面積の比率に相関するとされている。したがって、細菌の場合には細胞内容積に比較して表面積が大きいので、細胞内水分は急速な凍結によっても十分に脱水されるため障害は受けにくいと思われる。しかし、一般的には細菌の場合でも液体窒素などによる急速凍結は避けたほうがよいとされるが、本菌の場合にはそのような急速凍結によっても、保存性には影響は認められなかった。

凍結乾燥菌の保存温度については、経験的に冷暗所がよいことが知られている。4°C 前後の冷蔵保存で成績がよくない場合には、冷凍保存により生残性がよくなることがあるとされているので、この点についても検討を行ったが、4°C 保存と大差は認められず冷蔵保存で十分であると考えられる。一方、25°C での保存性は極めて悪くなるので、室温での保存は避けるべきであると思われる。

*⁴ Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, U.S.A.

*⁵ National Collection of Type Cultures, England

*⁶ National Collection of Industrial Bacteria, Scotland

る。このような傾向は多くの細菌で認められており、HECKLY¹⁰⁾ は *Pasteurella pestis* で同様の現象を報告している。L-乾燥¹¹⁾ においてもこのような傾向が認められており、¹²⁾ 乾燥系保存法に共通した現象であると思われる。

病原性の保存については、対照菌株である高層培地保存の新鮮分離株のほうが、特に Fig. 3(B) において、病原性が弱いようにみえるが、これは攻撃菌濃度が凍結乾燥菌よりも低かったことが大きな原因と考えられる。凍結乾燥法では一般に変異は極めて起きにくいと考えられているが、*Serratia marcescens*¹³⁾ や *Escherichia coli*¹⁴⁾ における変異例もあるので、さらに病原性の確認試験は将来も定期的に行う必要があると思われる。

微生物の変異誘発率は一般に死滅率の増加とともに高まる傾向があるといわれているので、本研究では凍結乾燥直後の生残性を指標にして、まず基本分散媒を見だし、次に保存中の死滅率を低下させる添加剤を選抜するという方針で分散媒の検討を行った。しかし、実際には mist desiccans のみではほぼ満足できる生残性が得られた。現在のところ、mist desiccans の単独使用以上の保存性を示す添加剤は見いだされていない。

今回の研究においては予備試験の結果、スキムミルクをベースとした分散媒の成績がよくなかったので、血清分散媒について検討した。しかし、最近のわれわれの研究ではスキムミルクをベースとした分散媒を用いても良好な保存性が期待できるものが見いだされている。また、血清は Lot. による差異が予想されるため、今後はスキムミルク系分散媒についても検討する必要があると

思われる。

文 献

- 1) 橋本伸一・村岡愛一郎・楠田理一： 日水誌, **51**, 1073-1077 (1985).
- 2) 若林久嗣・江草周三： 魚病研究, **6**, 125-127 (1972).
- 3) K. F. REDWAY and S. P. LAPAGE: *Cryobiology*, **11**, 73-79 (1974).
- 4) S.P. LAPAGE, J.E. SHELTON, and T.G. MITCHELL: in "Methods in Microbiology" (ed. by J.R. NORRIS and D. W. RIBBONS), Vol. 3A, Academic Press, London and New York, 1970, p. 135.
- 5) J. ŠOUREK: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**, 353-365 (1974).
- 6) R. M. FRY and R. I. N. GREAVES: *J. Hyg.*, **49**, 220-246 (1951).
- 7) K. J. STEEL and H. E. LOSS: *J. Appl. Bact.*, **26**, 370-375 (1963).
- 8) 橋本伸一・村岡愛一郎・三原 茂・楠田理一： 日水誌, **51**, 63-67 (1985).
- 9) 根井外喜男： 凍結及び乾燥研究会会誌, **29**, 53-58 (1983).
- 10) R. J. HECKLY: *Advanc. Appl. Microbiol.*, **3**, 1-76 (1961).
- 11) 坂根 健・板野 勲： 凍結及び乾燥研究会会誌, **22**, 101-108 (1976).
- 12) 飯島貞二・坂根 健： 凍結及び乾燥研究会会誌, **16**, 87-94 (1970).
- 13) M. SERVÍN-MASSIEU and R. CRUZ-CAMARILLO: *Appl. Microbiol.*, **18**, 689-691 (1969).
- 14) M. J. ASHWOOD-SMITH and E. GRANT: *Cryobiology*, **13**, 206-213 (1976).