

高層培地法および凍結法によるPasteurella piscicidaの保存

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	橋本, 伸一 村岡, 愛一郎 楠田, 理一
巻/号	51巻7号
掲載ページ	p. 1073-1077
発行年月	1985年7月

高層培地法および凍結法による *Pasteurella piscicida* の保存^{*1}

橋本伸一・村岡愛一郎・楠田理一

(1984年12月3日受理)

Stab Culture and Frozen Storage of *Pasteurella piscicida*Shinichi HASHIMOTO,^{*2} Aiichiro MURAOKA,^{*2} and Riichi KUSUDA^{*3}

Long-term preservation of *Pasteurella piscicida* is necessary for producing highly effective bacterins for the control of pseudotuberculosis in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. This report describes the survival and pathogenicity of *P. piscicida* in stab culture and frozen storage. Strain 5866 virulence was maintained by fish passage. And then both preservation methods were investigated. With stab culture in BHIA, strain 5866 was isolated from every fish passage and stocked at 15°C. For frozen storage, a culture medium composed of polypeptone, yeast extract and NaCl was used. Cultures of strain 5866 were stored in either glycerol (10, 30 and 50% V/V), defibrinated horse blood (10, 30 and 50% V/V), 20% skim milk (10, 30 and 50% V/V), calf or horse serum (50% V/V) or dimethyl sulfoxide (10% V/V) and dispensed in sterile screw-cap vials. The suspensions were stored frozen at -20 and -80°C.

After 3 months, strain 5866 lost virulence when stored in BHIA stab cultures. After 6 months in frozen storage, the relationship between viability and the use of protective additives was not clear. All cultures stored at -20°C showed a gradual decrease in numbers of surviving cells and viability was lost between 1 and 6 months. Cultures stored at -80°C gave a high recovery of viable cells showing the lower temperature was preferable for prolonged storage. Strain 5866 stored at -80°C in skim milk maintained virulence and pathogenicity after 6 months.

近年、ブリ稚魚の細菌性類結節症ワクチンの開発が進められつつあり、その実用化が期待されている。ワクチンの有効性は抗原となる菌株の病原性が強いほど高くなることが知られているので、種株となる菌株の病原性を維持して保存することが、ワクチン製造上のもっとも重要な課題の一つである。

一般に細菌は継代培養法、凍結乾燥法および凍結法により保存される。通常、*Pasteurella piscicida* は継代培養法により保存されることが多いが、本菌の病原性は継代によって急激に低下することが知られている。凍結乾燥法および凍結法による保存は、菌株の保存中の変異が少なく、長期保存ができるので、病原細菌の保存に適した保存法であるとされているが、これらの保存法による本菌の生残性および病原性の維持に関する知見は少ない。

凍結乾燥法による保存は適用可能な細菌の範囲が広く保存管理が容易であることから、細菌の長期保存法として広く用いられている。しかし、操作に手間がかかり、多数の菌株の処理ができないなどの欠点もある。これに対して、凍結保存法は操作や装置が簡便であることか

ら、菌株の長期保存が可能で、病原性が維持できれば、極めて有効な保存法であるといえる。

そこで、本報では本菌に適した長期保存法を確立するために、本菌を高層培地によって継代した場合と、分散媒および保存温度を変えて凍結保存した場合の生残性と病原性を比較し、より有効な保存法を検討した。

実験方法

供試菌株 1983年6月に高知県土佐市のハマチ病魚腎臓から分離した *Pateurella piscicida* 5866株を使用した。本株は1~2か月毎に魚体通過を繰り返すことにより病原性を維持した。

高層培地法 供試菌株を魚体通過のつど2%食塩加1/2 BHI高層培地に再分離し、15°Cに1, 2, 3, 4および5か月保存後に病原性試験を行った。

供試培地 凍結保存する菌体の培養にはポリペプトン培地を使用した。本培地の組成は蒸留水1l中にポリペプトン(大五栄養化学製)30g, 粉末酵母エキス(大五栄養化学製)15g, 塩化ナトリウム(和光純薬製)15g,

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

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

D-ガラクトース (和光純薬製) 1g, グルタミン酸ナトリウム (和光純薬製) 6g で, pH は 7.0~7.2 とした。

供試分散媒 グリセリン (和光純薬製), 馬脱繊維素血液 (日本バイオテスト研究所製), 20% スキムミルク (Difco 製), 仔牛血清 (極東製薬製), 馬血清 (日本バイオテスト研究所製) およびジメチルスルフォキシド (和光純薬製, 以下 DMSO と略す) を使用した。

凍結保存法 供試菌株の 24~30 時間培養液に, グリセリン, 馬脱繊維素血液および 20% スキムミルクは 10, 30 および 50%, 仔牛および馬血清は 50%, DMSO は 10% となるように加え, スクリュー・バイアルに 2ml ずつ分注後, -20 と -80°C のフリーザ中で凍結保存した。なお, 対照として寒天濃度を 0.15% としたポリペプトン培地培養液を使用した。

生残菌数の測定 分散媒に仔牛および馬血清を使用した凍結保存サンプルは 1 および 4.5 か月後に, それ以外の分散媒を使用したものは 1.5 と 6 か月後に, 流水中で 1~2 分以内に解冻後, 2% 滅菌食塩水で順次希釈し, 2% 食塩加 Todd Hewitt Broth (Difco 製) の 0.8% 寒天培地を用い, 混積平板法で生残菌数を測定した。

病原性試験 病原性試験は高層培地に保存した菌株, および分散媒に 20% スキムミルクを用い -80°C に 6 か月間凍結保存した菌株と, 分散媒に仔牛もしくは馬血清を用い -80°C に 4.5 か月間凍結保存した菌株について浸漬攻撃法により行った。高層培地保存菌株は 2% 食塩加 BHI で 25°C , 24 時間静置培養したのち, 2% 食塩加 BHI 寒天平板で 25°C , 48 時間培養し, 2% 滅菌食塩水で集菌して攻撃菌液とした。凍結保存菌株は解冻後に 2% 食塩加 BHI 寒天平板に接種し, 25°C , 48 時間培養後に 2% 滅菌食塩水で集菌して攻撃液とした。浸漬攻撃は高層培地保存菌株では平均魚体重 5g のブリ稚魚を 1 群当たり 14~15 尾用い, 攻撃菌濃度を $0.9\sim 2.3 \times 10^5$ CFU/ml とし, 凍結保存菌株では平均魚体重 30g のブリ稚魚を 1 群当たり 10 尾用い, 攻撃菌濃度を $1.5\sim 3.8 \times 10^8$ CFU/ml とし, 攻撃中および攻撃後の飼育水温を $21\sim 24^{\circ}\text{C}$, 試験期間を 7 日として行った。判定は生残率で行ったが, 本菌が再分離されなかった魚体を事故死として処理し, 生残率の計算に加えなかった。

結 果

高層培地保存菌株の病原性試験の結果は Fig. 1 に示すとおりである。5866 株は 5 か月保存後も生存していたが, 病原性は月をおうごとに低下し, 3 か月後には消失した。すなわち, 攻撃 1 週間後の最終生残率は 1 か月保存菌株で 43%, 2 か月保存菌株で 93% であったが, 3, 4 および 5 か月保存菌株と対照区では 100% であっ

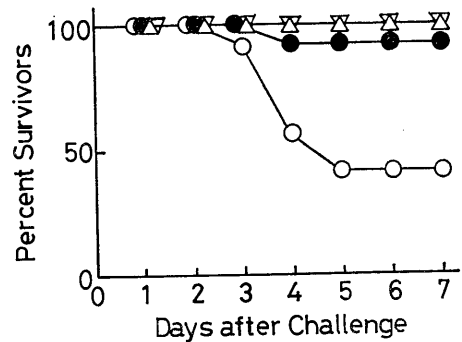


Fig. 1. The effect of stab culture storage of *P. piscicida* on virulence using waterborne infection of yellowtail.

○—○: storage for 1 month, ●—●: storage for 2 months, △—△: storage for 3, 4 and 5 months, ▽—▽: control.

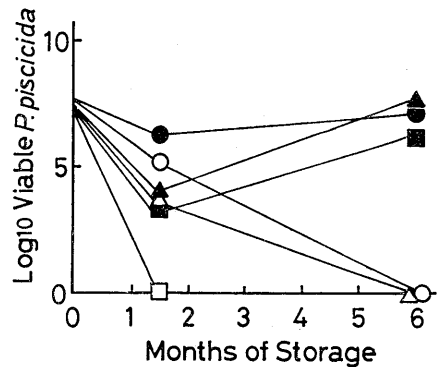


Fig. 2. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in glycerol.

○—○: 10% at -20°C , ●—●: 10% at -80°C , △—△: 30% at -20°C , ▲—▲: 30% at -80°C , □—□: 50% at -20°C , ■—■: 50% at -80°C .

た。

分散媒にグリセリンを用いて -20°C と -80°C に凍結保存したときの生残菌数の推移は Fig. 2 に示すとおりである。本菌株の -20°C における生残性は低く, グリセリンの 10 および 30% 添加区では 6 か月までに, 50% 添加区では 1.5 か月までに死滅した。 -80°C に保存した場合の凍結保存直後の菌数は $4.0\sim 7.2 \times 10^7$ CFU/ml であったが, 1.5 か月後の生残菌数は $5.6 \times 10^8 \sim 2.9 \times 10^8$ CFU/ml まで低下した。しかし, 6 か月後には $1.5 \times 10^9 \sim 8.6 \times 10^7$ CFU/ml となり, 生残菌数の変動が大きくあらわれた。

分散媒に馬脱繊維素血液を用いて -20°C と -80°C に凍結保存したときの生残菌数の推移は Fig. 3 に示すとおりである。本菌株を -20°C に保存した場合には, い

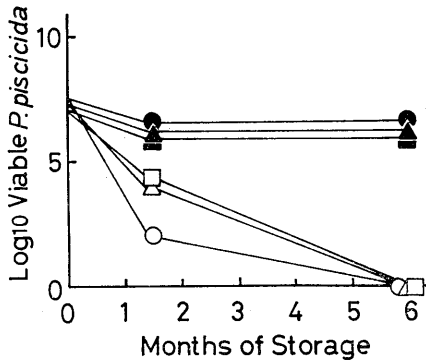


Fig. 3. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in defibrinated horse blood.
 ○—○: 10% at -20°C , ●—●: 10% at -80°C , △—△: 30% at -20°C , ▲—▲: 30% at -80°C , □—□: 50% at -20°C , ■—■: 50% at -80°C .

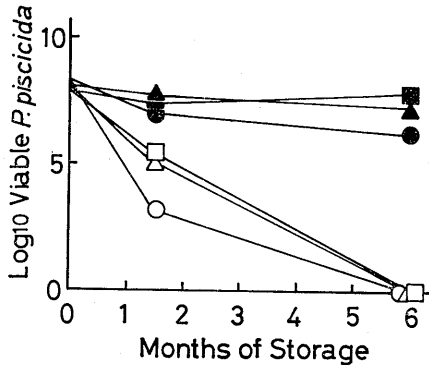


Fig. 4. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in 20% skim milk.
 ○—○: 10% at -20°C , ●—●: 10% at -80°C , △—△: 30% at -20°C , ▲—▲: 30% at -80°C , □—□: 50% at -20°C , ■—■: 50% at -80°C .

ずれの添加量においても1.5か月までに死滅した。これに対して、 -80°C に保存した場合には、凍結保存直後の生残菌数が $2.7\sim 4.9 \times 10^7$ CFU/ml であったのが、1.5か月後には $1.8\sim 4.8 \times 10^8$ CFU/ml まで減少し、生残率は約10%となった。6か月保存後の生残菌数は $1.8 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^7$ CFU/ml となり、1.5か月後と同程度かやや多くなった。

分散媒に20% スキムミルクを用いて -20°C と -80°C に凍結保存したときの生残菌数の推移は Fig. 4 に示すとおりである。本菌株を -20°C に保存したときの生残性は低く、いずれの添加量でも6か月までに死滅した。これに対して、本菌株を -80°C に保存すると6か月後も生残するようになった。すなわち、凍結保存直後の菌数は $4.9\sim 8.9 \times 10^8$ CFU/ml であったが、1.5か月後

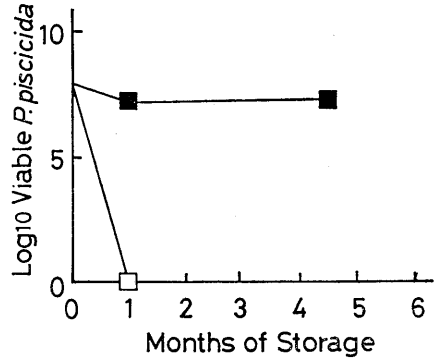


Fig. 5. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in calf serum.
 □—□: 50% at -20°C , ■—■: 50% at -80°C .

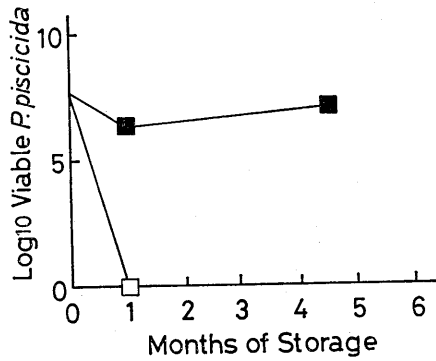


Fig. 6. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in horse serum.
 □—□: 50% at -20°C , ■—■: 50% at -80°C .

の生残菌数は $1.4\sim 6.7 \times 10^7$ CFU/ml に低下し、生残率で1.5~13%となった。6か月保存後の生残菌数は $4.3 \times 10^8 \sim 8.5 \times 10^7$ CFU/ml で、生残率は0.5~17%となり、1.5か月後とほぼ同程度であった。

分散媒に血清を用いて -20°C と -80°C に凍結保存したときの生残菌数の推移のうち、仔牛血清の場合を Fig. 5 に、馬血清の場合を Fig. 6 に示した。 -20°C 保存における本菌株の生残性は低く、いずれの血清を用いても1か月後までに死滅した。これに対して、 -80°C 保存における生残性は高く、凍結保存直後の菌数はいずれの血清でも 8.7×10^7 CFU/ml であったが、1か月保存後の生残菌数は仔牛血清では 3.6×10^8 CFU/ml、馬血清では 1.4×10^7 CFU/ml となり、生残率はそれぞれ4%と16%となった。4.5か月保存後の生残菌数は仔牛血清では 1.3×10^7 CFU/ml、馬血清では 1.4×10^7 CFU/ml となり、生残率はそれぞれ15%と16%となった。

分散媒にDMSOを用いて -20°C と -80°C に凍結保存したときの生残菌数の推移は Fig. 7 に示すとおり

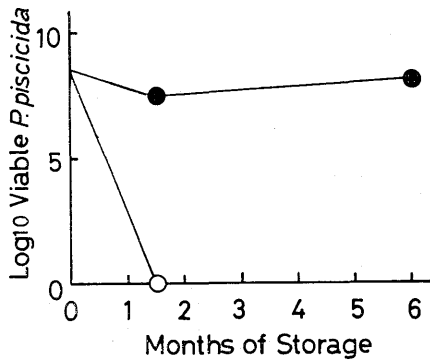


Fig. 7. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in dimethyl sulfoxide.
○—○: 10% at -20°C , ●—●: 10% at -80°C .

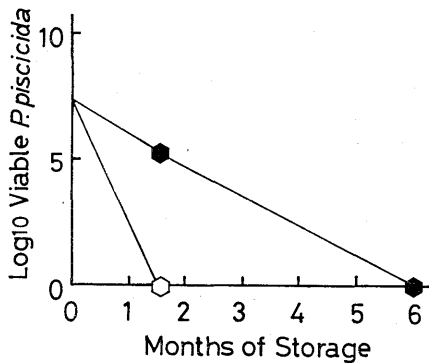


Fig. 8. Survival of *P. piscicida* stored at -20 and -80°C in control.
○—○: -20°C , ●—●: -80°C .

である。本菌株の -20°C 保存における生残性は低く、6 か月までに死滅した。これに対して、 -80°C に保存すると、凍結保存直後の菌数は 5.0×10^8 CFU/ml であったが、1.5 か月保存後の生残菌数は 4.4×10^7 CFU/ml で、生残率は 9% となり、6 か月保存後の生残菌数は 1.9×10^8 CFU/ml、生残率は約 38% となった。

対照区の -20°C と -80°C 保存における生残菌数の推移は Fig. 8 に示すとおりである。本菌株の生残性はいずれの保存温度でも低く、 -20°C 保存では 1.5 か月までに、 -80°C 保存では 6 か月までに死滅した。

分散媒に 20% スキムミルクを用い、 -80°C で 6 か月保存後の病原性試験の結果は Fig. 9 に示すとおりである。攻撃 1 週間後の最終生残率は 20% スキムミルクの場合にはいずれの添加量でも 100% となり、病原性は維持されていた。

分散媒に仔牛および馬血清を用い、 -80°C で 4.5 か月保存後の病原性試験の結果は Fig. 10 に示すとおりである。分散媒に 20% スキムミルクを用いた場合に比べ

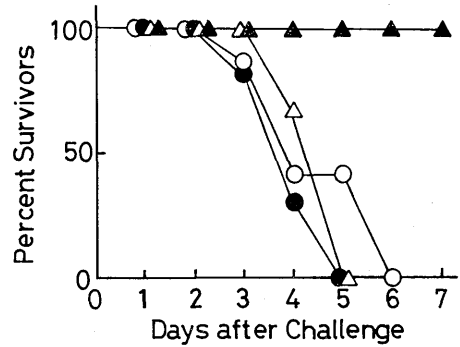


Fig. 9. The effect on *P. piscicida* stored for 6 months at -80°C in skim milk on virulence using waterborne infection of yellowtail.
○—○: 10%, ●—●: 30% △—△: 50%, ▲—▲: control.

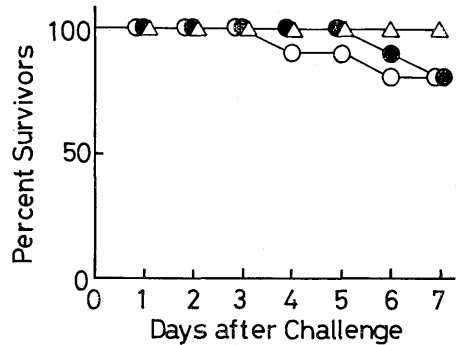


Fig. 10. The effect on *P. piscicida* stored for 4.5 months at -80°C in calf or horse serum on virulence using waterborne infection of yellowtail.
○—○: calf serum, ●—●: horse serum, △—△: control.

て病原性は弱くなり、攻撃 1 週間後の最終生残率は仔牛および馬血清のいずれも 20% であった。

考 察

細菌の凍結保存性については奥野ら¹⁾の報告がある。奥野ら¹⁾は 22 属, 103 種, 180 株の一般好気性細菌を 10% グリセリンに 10^{10-11} CFU/ml の濃度に懸濁して、 -53°C に 92 か月間凍結保存後の生残菌数を測定しており、生残菌数が 10^5 CFU/ml 以上であった菌株の割合はグラム陽性菌で 90.4%, グラム陰性菌で 80.0% であったとしている。著者らは *Pasteurella piscicida* 5866 株のポリペプトン培養液にグリセリン, 馬脱繊維素血液, 20% スキムミルク, 仔牛血清, 馬血清もしくは DMSO を 10~50% 加え、 -20°C と -80°C に 4.5~6 か月間凍結保存後の生残性を比較した。その結果、本菌は

-80°C 保存ではいずれの分散媒を用いても安定して保存することができ、生残性は分散媒の種類と添加量を変えても、ほとんど差異が認められなかった。しかし、さらに長期間にわたって観察した場合には、生残性に差異が認められることも考えられるので、引続き生残性の推移を観察すべきであると思われる。

細菌の凍結保存温度と生残性の関係については KIM ら²⁾および GIBSON ら³⁾の報告がある。KIM ら²⁾は、15 種、20 株の *Mycobacterium* を Tween-albumin liquid medium 中で -20°C と -70°C に 21~24 か月間保存した結果、これらの細菌の生残性は -70°C のほうで高いとしている。GIBSON ら³⁾は 3 種の latic streptococci をスキムミルクを主成分とした分散媒を用いて液化室素中で凍結・保存もしくは液化室素中で凍結後に -23.3°C 中で保存すると生残性が高いが、-23.3°C で凍結・保存すると生残菌数が大きく減少したとしている。著者の結果においても、本菌は -80°C で 4.5~6 か月保存後も生存していたが、-20°C 保存では 1~6 か月の間に死滅し、低温域のほうで生残性のよくなる傾向がみられた。

魚病細菌の凍結保存と病原性については若林ら⁴⁾の報告がある。若林ら⁴⁾は、分散媒にグリセリンを用いて *Chondrococcus columnaris*, *Vibrio anguillarum*, *Pasteurella piscicida* などの菌株を液化室素中に保存した結果、いずれも良好な状態で保存が可能であったとしている。なかでも、*C. columnaris* は 2 年以上の保存が可能であり、病原性も完全に保持されたとしている。著者は高層培地に保存した菌株と、分散媒に 20% スキムミルクと仔牛および馬血清を用い -80°C に凍結保存した菌株の病原性試験を行った結果、高層培地保存菌株の病原性は月をおうごとに低下し、3 か月後には消失した。凍結保存菌株では、分散媒に 20% スキムミルクを用いると病原性は 6 か月保存後も維持されていたが、分散媒に仔牛もしくは馬血清を用いると病原性の低下が認められた。したがって、本菌の長期保存法としては分散媒にスキムミルクを用いて -80°C に凍結保存する方法がすぐれているものと思われる。

本試験では混釈平板法により生残菌数の測定をしたが、測定結果の変動が大きく、なかでもグリセリンを分散媒に使用した試験区では 6 か月後の生残菌数は 1.5 か月後の約 10~260 倍であった。これらの原因については生残菌数の測定に使用した培地の温度などに起因するものと考えられるので、引続き生残菌数の推移を観察する必要があると思われる。

以上の結果から、本菌の保存法は分散媒にスキムミルクを用いて -80°C に凍結保存する方法がすぐれていることが判明した。今後は、本報で検討した分散媒について生残性と病原性の検討を継続して行うとともに、複合組成の分散媒や液化室素による保存法の検討、ならびに培地や培養時間、凍結・融解の繰り返しなどが本菌の生残性と病原性に及ぼす影響についても検討すべきであると思われる。

要 約

ブリ稚魚の細菌性類結節症ワクチンの開発には抗原菌株の病原性を維持できる長期保存法の確立が必要である。そこで、本菌に適した長期保存法を究明するために、高層培地継代法と凍結保存法とを種々の条件下で比較し、より有効な保存法の検討を行った。高層培地法では本菌を魚体通過のつど 2% 食塩加 1/2 BHI 高層培地に再分離し、1 か月毎に 5 か月間保存した菌株の病原性試験を行った。その結果、本菌は 5 か月保存後も生存していたが、病原性は保存期間が長くなるほど低下する傾向がみられ、3 か月後には消失した。凍結保存法では、本菌の培養液にグリセリン、馬脱繊維素血液、20% スキムミルク、仔牛血清、馬血清もしくは DMSO を 10~50% となるように加え、-20°C と -80°C に 4.5~6 か月間凍結保存して、本菌の生残性に及ぼす分散媒と保存温度の影響を調査した。また、分散媒に 20% スキムミルク、仔牛血清もしくは馬血清を用いて -80°C に凍結保存した菌株の病原性についても検討した。その結果、本菌の生残性には分散媒の種類と添加量を変えてもほとんど差異が認められなかった。本菌は低温のほうで高い生残性を示し、-80°C に保存すると 4.5~6 か月後も生存していたが、-20°C に保存すると 6 か月以内に死滅した。本菌の病原性は、分散媒に 20% スキムミルクを用いた場合には 6 か月保存後も維持されていたが、仔牛もしくは馬血清を用いた場合には低下する傾向が認められた。

文 献

- 1) 奥野大路・山里一英・大友 俊允・峰村 由美子・宇波栄子・黒田 恵：凍結及び乾燥研究会会誌，24，41-53 (1978)。
- 2) T. KIM and G. KUBICA: *Appl. Microbiol.*, 25, 956-960 (1973)。
- 3) C. GIBSON, G. LANDERKIN, and P. MORSE: *Appl. Microbiol.*, 14, 665-669 (1966)。
- 4) 若林久嗣・江草周三：魚病研究，8，125-127 (1972)。