恙虫病リケッチアの凍結保存に関する研究

Studies on the Preservation of Strains of *Rickettsia orientalis* by Freezing

東京大学医学部衛生学教室 (主任 羽里彦左衛門教授)

豊 川 行 平 中 村 秀 雄

Kôhei Toyokawa Hideo Nakamura

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, University of Tokyo

緒 言

細菌、ウイルスを凍結状態におくと、かなり長期間その力価が保持される事実から、これらの strains の保存に凍結保存法が広く用いられている。しかし、リケッチア、とくに恙虫病リケッチアについては、凍結保存により力価がどの程度に保存されるかについて信頼すべき資料がないため、われわれが地方病性リケッチア症研究の目的で各地の野鼠より分離した多数のリケッチア strains はマウス継代による保存法と凍結保存法の両者を併用し、安全に確保している。しかし、前者は多大の費用と労力を要する方法であり、できれば後者一本にすべきである。それには恙虫病リケッチアの凍結保存に関する基礎資料が必要である。その目的で、著者らは凍結保存中の恙虫病リケッチアの変化、凍結融解による影響について実験をおこなった。

実験材料および実験方法

1) 恙虫病リケッチア株

主として鶴木株を用いた。これは新潟県において発生した恙病患者血液より分離されたものである。同時に大阪 No. 8 株、中崎株、船橋株をも使用した。

実験に際しては、それぞれのリケッチア株をマウスに接種し、発症をまつて、脾臓および肝臓を摘出し、これを乳鉢内で磨砕し、50%浮遊液になるように後述の保存液を加え、2,000 rpm 5 分間遠心沈澱をおこない、その上清を実験に用いた。

2) 使用した保存液

生理的食塩水

15%グリセリン加食塩水

S. P. G. 液

の3種である。S.P.G. 液の組成は Snyder らの原法にしたがい、Sucrose 0.218M, 第一磷酸カリ 0.0038M, 第二磷酸カリ 0.0072 M, L-グルタミン酸カリ 0.0049 M とし、KOH液で pH 7.0とした。

3) 凍結方法

凍結融解の影響に関する実験では、ドライアイス・アセトンを用い、また凍結保存実験ではドライアイス保存箱を用いた。ドライアイス・アセトンの場合は温度は -70°C — -75°C 、保存箱の場合は -50°C 前後であつた。

リケッチア液は内径 1 cm, 高さ 3.3 cm のガラス管に 0.25 cc を入れ、ゴム栓で密封し、さらにセロテープにて被覆し、ドライアイス箱に保存した。

4) 実験方法

凍結融解の実験では、小試験管にリケッチア材料を入れ、ドライアイス・アセトン液中につけて凍結し、約 5 分おいて、 20°C の温水につけて融解した。最後に 15 g 前後のマウスを用い、S.P.G. 液で稀釈して titration をおこなった。

凍結保存実験では、まず凍結前と凍結後の titration をおこない、一定期間凍結保存して、同様な方法で titration をおこない、これらの間の LD_{50} を比較した。

実験成績

1. 凍結融解の影響に関する実験

凍結保存の鶴木株を用い、凍結融解の影響を調べた。第1表は凍結保存4週目のリケッチアを用いた成績で、凍結融解を3回反復し、マウスを用いて titration をおこなった。表中A群は生理的食塩水に保存したもの、B群は15%グリセリン加生理的食塩水に保存したもの、C群は S.P.G. 液に保存したものである。これらの結果、 LD_{50} はA群では対照 4.70 に対し3回凍結融解したもの

第 1 表 凍結融解 (3 回) による影響

		A 生理的食塩水	B 15%グリセリン加生理的食塩水	C S. P. G. 液
対 照	10^{-3}	●●●●●●●● 15 15 14 13 13	●●●●●●●● 20 14 13 12 11	○●●●●●●● 14 14 12 11
	10^{-4}	●●●●●●●● 18 17 16 15 14	○●●●●●●● 18 18 15 14	○●●●●●●● 17 14 14
	10^{-5}	○●●●●●●●	○●●●●●●●	○●●●●●●● 9 20 19 16 15
	10^{-6}	○●●●●●●●	○●●●●●●●	○●●●●●●● 6 19 16
	10^{-7}	○●●●●●●●	○●●●●●●●	○●●●●●●● 17
	LD ₅₀	4.70	4.63	5.41
3 回凍結融解	10^{-3}	○●●●●●●● 17 17 17 15	●●●●●●●● 14 14 13 11 11	○●●●●●●● 13 13 12
	10^{-4}	○●●●●●●● 20 19 11 9	○●●●●●●● 19 18 16 13	○●●●●●●● 24 17 17 16
	10^{-5}	○●●●●●●● 14	○●●●●●●● 17 16	○●●●●●●● 20 16 7
	10^{-6}	○●●●●●●●	○●●●●●●● 19 17	○●●●●●●● 18 16 16
	10^{-7}	○●●●●●●● 20	○●●●●●●● 20 19 17	○●●●●●●● 19 18 17 17
	LD ₅₀	4.50	5.62	6.00

第 2 表 凍結融解 (6 回) による影響

	A 生理的食塩水	B 15%グリセリン加生理的食塩水	C S. P. G. 液
対 照	LD ₅₀ =2.88	LD ₅₀ =5.62	LD ₅₀ =5.59
6 回凍結融解	LD ₅₀ =2.00	LD ₅₀ =6.18	LD ₅₀ =4.52

4.50, B 群では対照4.63に対し3回凍結融解したもの5.62, C 群では対照5.41に対し3回凍結融解したもの6.00であった。

第2表は凍結保存46日目のリケッチアを用いた成績で、凍結融解を6回回復したものである。上記と同じく、A群は生理的食塩水に保存したもの、B群は15%グリセリン加生理的食塩水に保存したもの、C群はS.P.G.液に保存したものである。実験の結果、LD₅₀は、A群では対照2.88に対し凍結融解6回回復したもの2.00, B群では対照3.40に対し凍結融解6回回復したもの6.18, C群では対照5.59に対し凍結融解6回回復したもの4.52であった。

以上の成績より、リケッチアは凍結融解により力価の

低下はみられないといえる。なお15%グリセリン加生理的食塩水においては、凍結保存4週目のものも、凍結保存46日目のものも、凍結融解によって力価の上昇がみられている。

2. 凍結保存に関する実験

第1回の実験は、保存液として生理的食塩水、15%グリセリン加生理的食塩水、S.P.G.液を用いた場合、凍結保存の期間により、リケッチア(鶴木株)の力価にどのような影響があるかを知る目的でおこなった。この場合、各保存液ごとに保存試験管を6本ずつドライアイス箱に保存し、凍結直後、4週目、7週目、1年目に各々その1本を取り出し、マウスによる力価測定をおこなった。その結果、LD₅₀は凍結直後では生理的食塩水5.73, 15%グリセリン加生理的食塩水5.25, S.P.G.液6.20, 4週目では生理的食塩水4.70, 15%グリセリン加生理的食塩水4.63, S.P.G.液5.70, 7週目では生理的食塩水2.80,

第 1 図 凍結保存における保存液の影響

15%グリセリン加生理的食塩水3.40, S.P.G.液4.17, 1年目では生理的食塩水1.46, S.P.G.液3.50であった。なお、1年目の15%グリセリン加生理的食塩水では 10^{-1} でマウスの感染死亡がみられなかった。これらの結果を図示したのが第1図である。この図をみると、凍結保存の初期においては3者の間にあまり差が認められないが、1年という長期間においてはS.P.G.液がもつとも優れており、生理的食塩水では保存に対しかなりの障害があり、15%グリセリン加生理的食塩水では1年の保存に耐えないことがわかる。

以上の成績により、凍結長期保存にはS.P.G.液がもつとも優れていることが明らかになったので、さらにS.P.G.液を用い1年以上長期保存の実験をおこなった。使用したリケッチア株は鶴木株で、凍結直後、2週目、8週目、41週目、1年目、1年半目にその力価測定をお

となった。その成績は第2図のごとくで、LD₅₀は凍結直後3.33, 2週目4.00, 8週目4.60, 14週目3.70, 41週目3.83, 1年目2.83であった。なお1年半目では10⁻¹においてもマウスの感染死亡をみなかった。

第2図 S.P.G. 液による凍結長期保存中の力価の変動

以上の成績より、S.P.G. 液を用いても、1年以上の保存ではその力価がかなり低下するといえる。

総括および考案

1) リケッチアを生理的食塩水、15%グリセリン加生理的食塩水、S.P.G. 液に浮遊し、凍結融解を反復したが、凍結融解3回の場合も6回の場合も、対照と比べてその力価にほとんど差異を認めなかった。

従来細菌類は凍結に対しかなりの感受性を示し、凍結融解を反復することにより生菌数は一次反応的に減少することが知られている。これに反し、ウイルス類は凍結融解による影響はきわめて少ない。本実験の結果から、リケッチアは凍結融解により力価の低下をきたさないことが明らかであるから、この面からいつてもリケッチアはウイルスに近い関係にあるといえる。また、細菌の場合、ブイヨンあるいは生理的食塩水に15%の割合でグリセリンを加えると、凍結の影響が顕著に阻止されることが知られ、細菌類の凍結保存にグリセリン加保存液が用いられているが、リケッチアの場合、これが凍結保存という点で必ずしも有利に働いていない。このことはグリセリンの作用機序が凍結過程それ自体に関係があることを示しているといえよう。

2) 凍結長期保存の実験で、リケッチアの保存液として生理的食塩水、15%グリセリン加生理的食塩水、S.P.G. 液を用いたが、その結果S.P.G. 液がもつとも優れており、ついて生理的食塩水で、15%グリセリン加生理的食塩水がもつとも劣っていた。さらに、S.P.G. 液について1年以上の保存実験をおこなったが、1年をこ

え1年半に至ると、その力価が急激に低下することが明らかとなった。この際、ドライアイス保存箱の温度上昇が起つたのではないかという疑いも起つてくるが、保存箱の管理はかなり厳重におこなわれていた。またこの期間に同時に凍結保存していた別の鶴木株、大阪No. 8株の力価は、第3表のごとくほとんど差がなかったことから、この期間における温度上昇は考えられない。

第3表

	鶴木株	大阪No. 8株
凍結時	LD ₅₀ =5.57	LD ₅₀ >6.00
凍結保存4月後	LD ₅₀ >6.00	LD ₅₀ =5.50

なおS.P.G. 液に保存した場合、1年以上で力価の低下が急激であることは、船橋株、中崎株、大阪No. 8株を用い1年半保存した別の実験でも明らかである。すなわち、凍結直後のLD₅₀は船橋株3.78, 中崎株3.70, 大阪No. 8株3.60であったが、1年半目には3者とも10⁻²でマウスの感染死亡が1匹もみられなかったのである。

結 論

リケッチアの凍結融解による影響および保存液として生理的食塩水、15%グリセリン加生理的食塩水、S.P.G. 液を用いたドライアイス凍結長期保存の影響を調べ、次の結果を得た。

- 1) 恙虫病リケッチア(鶴木株)は凍結融解を3回および6回反復しても、その力価は低下しなかった。
- 2) 恙虫病リケッチア(鶴木株)の凍結長期保存にはS.P.G. 液がもつとも優れ、ついて生理的食塩水で、15%グリセリン加生理的食塩水がもつとも劣っていた。また、S.P.G. 液を用いても1年以上の保存はかなりの力価低下をきたした。

稿を終るに当たつて、本実験は日本における地方病性リケッチア症研究班(班長田宮猛雄)の研究費の援助によるものであることを付記し、深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Anderson, C. R.: J. Bact., 47, 519, 1944.
- 2) Bovarnick, M. R., Miller, J. C. and Snyder, J. C.: J. Bact., 59, 509, 1950.
- 3) Harris, R. J. C.: Freezing and Drying, the Institute of Biology, London, 1951.
- 4) Lord Stamp, Chairman: A Discussion on the Maintenance of Cultures by Freezing Drying, British Commonwealth of Nations Scientific Liaison Offices, London, 1954.
- 5) Polge, C., Smith, A. U. and Parkes, A. S.: Nature, 164, 666, 1949.
- 6) Smith, A. U. and Polge, C.: Vet. Rec., 62, 115, 1950.

(受付: 1959年7月25日, 特別掲載)