Campylobacter jejuni と *Campylobacter coli* の菌株保存のための

ゼラチン・ディスク法の検討

板屋民子 首藤栄治 石原ひろみ

埼玉県衛生研究所（浦和市上大久保東 639-1，〒338）

（平成 3 年 1 月 28 日受付・平成 3 年 4 月 19 日受理）

Gelatin-Disk Method for Preservation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*
TAMIKO ITAYA, EIJI SHUTOU and HIROMI ISHIHARA (Saitama Institute of Public Health,
Kamioikubo, Higashi, Urawa 338)

SUMMARY

The gelatin-disk method was applied for the preservation of *Campylobacter*. This method was obviously superior to the conventional method such as the freeze-drying method. Especially, the recovery of viable organisms was excellent when the organisms were preserved in the disk that was prepared by mixing 5 volumes of a 10% sucrose solution added with 3% skin milk, 1 volume of a 5% ascorbic acid solution and 5 volumes of a 20% gelatin solution. The reduction rates of viable organisms of *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) and *Campylobacter coli* (*C. coli*) immediately after making the disks were less than 3 and 1 log CFU/disk, respectively.

The viable organisms were recovered 3 weeks after the preservation at 10°C, even at 35°C in the case of *C. coli*. The recovery rate increased further when the dissolving broth containing a 5×10^{-3} M magnesium sulfate was used in comparison with the dissolvent without magnesium sulfate.

—Key Words: gelatin-disk, freeze-drying method, *C. jejuni*, *C. coli*.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 951~957 (1991)

要 約

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) と *Campylobacter coli* (*C. coli*) を長期保存する目的で、ゼラチン・ディスク法について各種の分散媒を試作し検討したところ、本法は凍結乾燥保存法より優れていた。とりわけ、分散媒に 3% スキムミルク添加 10% シュクロース水溶液 5 容、L-アスコルビン酸水溶液 1 容および 20% ゼラチン水溶液 5 容の混合液を用いた場合、著しい保存効果が認められた。すなわち、ディスク作製直後の生菌数減少は 3 log/ディスク以内で、特に *C. coli* のそれは小さく、1 log/ディスク以内であった。更に、10°C 3 週間保存後も生菌が回収され、*C. coli* においては 35°C 3 週間保存後も生菌が残っていた。

また、復水に 5×10^{-3} M 硫酸マグネシウムを添加して用いると、非添加のものを用いる場合より回収される生菌数が多い傾向があった。

—キーワード: ゼラチン・ディスク保存法、凍結乾燥保存法、*Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*.

Campylobacter jejuni と *Campylobacter coli* は、現在、人の胃腸炎の主要な起因菌の一つとされている。しかし、その病原性の機序、あるいは集団発生時における感染経路等いまだ未解決な問題が多い。

これらの問題を究明するため、分離した菌株の長期間安定保存法を確立することは緊急かつ重要度の高い問題である。

しかし、*Campylobacter* 属の細菌は培地中で増殖した

後急速に死滅して、長期保存の難しいことが指摘されている^{3,6,9)}、著者らは、これまで *Campylobacter* 分離菌株の保存に -80°C 凍結保存法と凍結乾燥保存法²⁾を併用してきた。しかし、前者は取り扱いと維持に、後者は *Campylobacter* の生存が不確実である等問題が多かった。そこで新たに、ゼラチン・ディスク法について検討したところ、前 2 者よりはるかに優れた結果が得られた。

材料および方法

使用菌株

C. jejuni H および Y 株は食中毒患者糞便から分離されたものである。H 株は 10% スキムミルクを分散媒にして凍結乾燥保存されていたものであり、Y 株は変法 TGC 培地（ニッスイ）で継代保存されていた株である。*C. coli* No. 488 株は豚の腸内容物由来で、本実験に供するまで 10% スキムミルクとともに -80°C に凍結保存されていた株である。これら 3 株のこの実験に使用する以前の継代回数は不明である。

また、培地上の継代回数が 5 回未満の新鮮分離株として、食鳥肉由来 *C. jejuni* No. 423, 424 ならびに 433 および豚の腸内容物由来 *C. coli* No. 439, 444 ならびに 445 の各々 3 株ずつを用いた。

集菌法

血液寒天で 42°C 48 時間、酸素 5% 一酸化炭素 10% 一窒素 85% の微好気条件で培養した細菌を滅菌生理食塩液（生食液）に懸濁した。次いで、菌体を 2 回生食液で洗浄し、以下の試験に供した。

細菌の各種保存法

凍結乾燥保存法²⁾：調製した細菌を 10% スキムミルク水溶液に懸濁した。これの 0.1 ml ずつをアンプル管に分注後、 -80°C の冷凍庫内で凍結し、速やかに真空凍結乾燥機（ラプコンコ社）内に移して真空乾燥した。1 夜乾燥後、アンプル管を常圧下にもどして熔封し、 10°C と 35°C で保存した。

ゼラチン・ディスク保存法：小原と山井の方法⁵⁾によった。

前記と同様にして調製した細菌を、表 1 に示すゼラチン（20%）とアスコルビン酸（5%）を含む各種の分散媒に懸濁した。あらかじめ底部にパラフィン（融点 $60\sim 62^{\circ}\text{C}$ ）の薄層をしつらえたシャーレを準備した。この薄層パラフィン上に注射針を除いたツベルクリン用シリンジを用いて、菌液を滴下した。次いで、このシャーレをシリカゲルと五酸化二リンを十分に入れたデシケター内に収め減圧した。約 2 時間後、デシケター内の内圧を常圧にもどし、五酸化二リン表面に形成された水飴状の膜を除去した後、デシケターを再度減圧した。そのまま 1 夜放置して乾燥させ、完成したゼラチン・ディスクをチャック付ポリバッグに入れて密閉して 10°C と 35°C で保存した。一部の試料は -80°C で 4 週間保存後、同様にしてディスクを作製した。

なお、菌液 1 ml からできるゼラチン・ディスクの数は 22 ± 1.7 （平均値 $\pm$ 標準偏差）枚であった。

生残菌数の計測

復水には、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 硫酸マグネシウム添加ブルセラブロス (Mg-BB) を用いた。一部については、ブルセラブロス (BB) と L-システイン塩酸塩 0.1% 添加ブルセラブロス (cy-BB) を併用して、Mg-BB と生菌回収能を比較した。

凍結乾燥保存菌に対しては開封したアンプル管内に復水 1 ml を入れて溶解し、これの全量を生食液 9 ml に移した。ゼラチン・ディスク保存菌はディスク 1 枚を復水

表 1 ゼラチン・ディスク保存法に用いた各種分散媒とその組成

基本型*	A 液 : B 液 : C 液 = 5 : 1 : 5	
	A 液	
	グルコース	5g
	スキムミルク	3g
	活性炭	0.6g
	蒸留水	100ml
	B 液	5% L-アスコルビン酸ソーダ水溶液
	C 液	20% ゼラチン水溶液
変法 A 液**	組 成	
s-A	基本型 A 液のグルコースをシュクロースと置換	
g-A	基本型 A 液のグルコースを L-グルタミン酸 2g と置換	
a-A	基本型 A 液のグルコースを L-アルギニン 2g と置換	
Mg-A	$5 \times 10^{-3}\text{M}$ 硫酸マグネシウム添加 A 液	
ca-A	$5 \times 10^{-3}\text{M}$ カダベリン添加基本型 A 液	
se-A	セミカルバジド 0.6% 添加基本型 A 液	
ca-se-A	$(5 \times 10^{-3}\text{M}$ カダベリン + セミカルバジド 0.6%) 添加基本型 A 液	
se-cy-A	(セミカルバジド 0.6% + L-システイン塩酸塩 0.1%) 添加基本型 A 液	
ca-se-cy-A	$(5 \times 10^{-3}\text{M}$ カダベリン + セミカルバジド 0.6% + L-システイン塩酸塩 0.1%) 添加基本型 A 液	
α -1	15% シュクロース水溶液	
α -2	0.6% 活性炭添加 15% シュクロース水溶液	
α -3	3% スキムミルク添加 10% シュクロース水溶液	

* : B 液は -20°C 保存し、使用前に解凍した。A, B および C 液を 5 : 1 : 5 の容量で混合した物を分散媒として使用した。文献 6) を参照。

** : この変法 A 液と上記の基本型分散媒の B および C 液を、基本型の分量で混合して用いた。

1 ml に入れ、42℃ で 15 分間静置してディスクを溶解後、全量を生食水 9 ml に移した。

これらの溶解菌液を生食液でさらに 10 倍段階希釈し、各希釈液の 0.1 ml をバツラー選択培地に塗抹した。42℃ で 48 時間微好気条件下で培養後、菌数を計測した。1 菌数の計測にはアンプル管 3 本、あるいはディスク 3 枚を 1 組として行い、その平均値を求めた。なお、凍結乾燥法では菌液 1 ml 当たりの菌数で、ゼラチン・ディスク法ではディスク 1 枚当たりの菌数でそれぞれ表わした。

統計解析

一元配置法を用いて各群の菌数について、平均値の差の有意性を検定した。

成 績

凍結乾燥保存法の検討

C. jejuni 2 株と *C. coli* 1 株について、乾燥直後および 10℃ と 35℃ の各温度で 3 週間保存後の生菌数を計測した (表 2)。

C. jejuni H 株は良く生残し、処理直後の菌数減は 2

表 2 *Campylobacter* の凍結乾燥保存法の検討

菌 株	凍結前生菌数/ml	凍結乾燥直後生菌数/ml	3 週間保存後生菌数/ml 保 存 温 度 (°C)		減 少 率	
			10 C	35	A-B	A-C
<i>C. jejuni</i> H	9.62	8.04	4.07	0	1.58	5.55
<i>C. jejuni</i> Y	8.14	1.00	0	0	7.14	8.14
<i>C. coli</i> No. 488	8.81	2.83	0	0	5.98	8.81

注：分散媒は 10% スキムミルク水溶液を使用した。生菌数は 3 例の平均値を log 菌数で示した。復水は Mg-BB を使用した。

表 3-1 *Campylobacter* のゼラチン・ディスク保存法に用いる各種分散媒の比較

菌 株	分 散 媒	乾 燥 前 生菌数/滴	乾 燥 後 の 生菌数/ディスク	3 週間保存後生菌数/ディスク 保 存 温 度 (°C)		減 少 率	
				10 C	35	A-B	A-C
<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	8.47	5.58	3.96	0	2.89	4.51
	s-A	8.47	5.82	2.44	0	2.65	6.03
	g-A	8.47	3.41	1.00	0	5.06	7.47
	a-A	8.47	5.41	3.98	0	3.06	4.49
	Mg-A	8.47	6.30	4.24	0	2.17	4.23
<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	9.21	7.08	6.93	0	2.13	2.28
	ca-A	9.21	6.45	6.77	0	2.76	2.44
	se-A	9.21	8.19	7.39	0	1.02	1.82
<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	8.84	5.01	2.00	0	3.83	6.84
	ca-se-A	8.84	6.67	3.26	0	2.17	5.58
	se-cy-A	8.84	6.40	5.45	0	2.44	3.39
	ca-se-cy-A	8.84	6.10	4.62	0	2.74	4.22
<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	7.61	4.69	4.95	0	2.92	2.66
	ca-A	7.61	5.34	4.92	0	2.27	2.69
	se-A	7.61	5.20	4.61	0	2.41	3.00
<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	8.04	4.66	1.16	0	3.38	6.88
	ca-se-A	8.04	4.65	4.98	0	3.39	3.06
	se-cy-A	8.04	1.36	0	0	6.68	8.04
	ca-se-cy-A	8.04	5.22	4.63	0	2.82	3.41
<i>C. coli</i> No. 488	基本型 A	6.15	5.56	6.05	0	0.59	0.10
	ca-A	6.15	5.41	6.24	0	0.74	-0.09
	se-A	6.15	5.91	6.14	0	0.24	0.01
<i>C. coli</i> No. 488	基本型 A	7.58	6.27	5.84	0	1.31	1.74
	ca-se-A	7.58	6.59	5.98	0	0.99	1.60
	se-cy-A	7.58	6.69	6.58	0	0.89	1.00
	ca-se-cy-A	7.58	6.63	5.21	0	0.95	2.37

注：生菌数は 3 例の平均値を log 菌数で示している。分散媒は表 1 の基本型分散媒の B および C 液と基本型の分量で混合して用いた。1 ml の菌液が 20~25 滴あるいはディスクに相当する。復水は Mg-BB を使用した。

log/ディスク以内にとどまり、10℃ 3 週間保存後も 4 log/ml の生菌数を保っていた。しかし、*C. jejuni* Y 株と *C. coli* No. 488 株は処理直後ですでに生菌数が 6～7 log/ml 減少し、10℃ 3 週間保存後には生菌を検出できなかった。また、3 株とも 35℃ で 3 週間保存した後には全て死滅していた。

ゼラチン・ディスク保存法の検討

各種分散媒の比較：まず、基本的分散媒およびこれの A 液のグルコースを他の糖やアミノ酸に置換した各種の分散媒を用いてゼラチン・ディスクを作製し、*Campylobacter* の生残性を検討した（表 3-1）。

1 例を除き、供試した 3 株ともいずれの分散媒でも 10℃ 3 週間保存後に生菌が回収された。しかし、35℃ 3 週間保存では全例とも死滅していた。また、基本型 A を用いた分散媒で、*C. jejuni* 2 株の処理前後の生菌数減少率は概ね 3 log/ディスク以内であり、*C. coli* のそ

れはとりわけ小さく概ね 1 log/ディスク以内であった。他の分散媒を用いてもほぼ同様の成績であった。

次に、基本型 A のグルコースをシュクロースに置換し、さらに組成を単純にした分散媒について検討した（表 3-2）。*C. jejuni* H および Y 株では、表 3-1 の成績と、処理直後および 10℃ 3 週間保存後生残菌数に大差はなかった。しかし、*C. coli* No. 488 株は基本型 A を用いた場合は前表と同じであったが、組成を単純にした分散媒を用いた時、35℃ 3 週間保存後の生残菌が減少率 3 log/ディスク以内で認められた。

そこで、さらに培地上の継代回数が 5 回未満で、凍結あるいは乾燥等の保存に供していない新鮮分離の *C. jejuni* および *C. coli* を対象に検討した。*C. jejuni* No. 433 株は 35℃ 3 週間保存後に生残菌は認められなかった。しかし、*C. coli* では供試した 3 株とも全て 35℃ 3 週間保存後生菌が回収された。この場合、 α -2 におけ

表 3-2 *Campylobacter* のゼラチン・ディスク保存法に用いる各種分散媒の比較

菌 株	分散媒	乾燥前		乾燥後		3 週間保存後生菌数/ディスク 保 存 温 度 (℃)			減 少 率		
		生菌数/滴	生菌数/ディスク	生菌数/滴	生菌数/ディスク	10		35	A-B	A-C	A-D
						C	D				
<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	9.84	7.26			6.22	0		2.58	3.62	9.84
	α -1	9.84	6.77			4.96	0		3.07	4.88	9.84
	α -2	9.84	7.57			6.04	0		2.27	3.80	9.84
	α -3	9.84	7.90			5.45	0		2.94	4.39	9.84
<i>C. jejuni</i> Y	基本型 A	9.82	6.45			5.29	0		3.37	4.53	9.82
	α -1	9.82	6.99			6.13	0		2.83	3.69	9.82
	α -2	9.82	7.25			6.27	0		2.57	3.55	9.82
	α -3	9.82	7.05			6.44	0		2.77	3.38	9.82
<i>C. coli</i> No. 488	基本型 A	8.19	7.35			7.02	0		0.84	1.17	8.19
	α -1	8.19	7.45			7.11	5.17		0.74	1.08	3.02
	α -2	8.19	7.35			7.06	5.22		0.84	1.13	2.97
	α -3	8.19	7.21			6.92	5.89		0.98	1.27	2.30
<i>C. jejuni</i> * No. 433	基本型 A	9.64	6.06			5.66	0		3.04	3.98	9.64
	α -1	9.64	6.00			5.65	0		3.64	3.99	9.64
	α -2	9.64	6.78			6.22	0		2.86	3.42	9.64
	α -3	9.64	6.70			6.68	0		2.94	2.96	9.64
<i>C. coli</i> * No. 439	基本型 A	9.94	8.08			8.74	0		1.86	1.20	9.94
	α -1	9.94	8.87			8.62	6.07		1.07	1.32	3.87
	α -2	9.94	8.62			8.25	4.78		1.32	1.69	5.16
	α -3	9.94	8.67			8.13	6.28		1.27	1.81	3.66
<i>C. coli</i> * No. 444	基本型 A	10.05	8.20			8.53	0		1.85	1.52	10.05
	α -1	10.05	8.93			8.15	6.41		1.12	1.90	3.64
	α -2	10.05	8.81			8.06	5.59		1.24	1.99	4.46
	α -3	10.05	8.99			8.56	7.00		1.06	1.49	3.05
<i>C. coli</i> * No. 445	基本型 A	9.74	8.20			7.67	0		1.54	2.07	9.74
	α -1	9.74	8.40			7.53	5.05		1.34	2.21	4.69
	α -2	9.74	8.08			7.45	2.88		1.66	2.37	6.86
	α -3	9.74	8.37			7.63	5.76		1.37	2.11	3.98

注：生菌数は 3 例の平均値を log 菌数で示している。分散媒は表 1 の基本型分散媒の B および C 液と基本型の分量で混合して用いた。1 ml の菌液が 20～25 滴あるいはディスクに相当する。復水は Mg-BB を使用した。

*：培地上の継代回数 5 回未満の新鮮分離株を示す。

表4 *Campylobacter* のゼラチン・ディスク保存法の復水の検討

実験	菌 株	分散媒	復 水	乾 燥 前	乾 燥 後	減少率 A-B
				生菌数/滴 A	生菌数/ディスク B	
I	<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	BB	8.47	5.58	2.89
			Mg-BB	8.47	6.26	2.21
			cy-BB	8.47	3.30	5.17
II	<i>C. jejuni</i> H	基本型 A	BB	8.47	3.96	4.51
			Mg-BB	8.47	4.96	3.51
III	<i>C. jejuni</i> H	ca-A	BB	9.21	6.77	2.44
			Mg-BB	9.21	7.03	2.18
			cy-BB	9.21	6.83	2.38
IV	<i>C. jejuni</i> H	se-A	BB	9.21	7.39	1.82
			Mg-BB	9.21	7.30	1.91
			cy-BB	9.21	6.23	2.98
V	<i>C. jejuni</i> H	se-cy-A	BB	9.19	7.34	1.85
			Mg-BB	9.19	7.76	1.43
VI	<i>C. jejuni</i> H	ca-se-A	BB	9.19	8.00	1.19
			Mg-BB	9.19	7.92	1.27
VII	<i>C. jejuni</i> H	ca-se-cy-A	BB	9.19	7.81	1.38
			Mg-BB	9.19	7.45	1.74
VIII	<i>C. jejuni</i> Y	基本型 A	BB	7.61	4.95	2.66
			Mg-BB	7.61	3.97	3.64
IX	<i>C. coli</i> No. 488	基本型 A	BB	6.15	6.05	0.10
			Mg-BB	6.15	6.43	-0.28

注：生菌数は3例の平均値をlog 菌数で示してある。分散媒は表1の基本型分散媒のBおよびC液と基本型の分量で混合して用いた。1 mlの菌液が20～25滴あるいはディスクに相当する。実験Iのみ処理直後に計測し、他は10℃3週間保存後計測した。

表5 *Campylobacter* のゼラチン・ディスク保存法に供する株および菌液調製法の検討

菌 株	処理前生菌数/滴	菌液調製直後乾燥 生菌数/ディスク	-80℃凍結後乾燥 生菌数/ディスク	減 少 率	
	A	B	C	A-B	A-C
<i>C. jejuni</i> No. 423	7.85	6.02	5.44	1.83	2.41
<i>C. jejuni</i> No. 424	8.48	5.12	5.14	3.36	3.34
<i>C. jejuni</i> H	9.59	6.70	7.45	2.89	2.14
<i>C. jejuni</i> Y	8.69	3.64	5.92	5.05	2.77
<i>C. coli</i> No. 488	8.90	6.91	6.64	1.99	2.26

注：生菌数は3例の平均値をlog 菌数で示してある。1mlの菌液が、20～25滴あるいはディスクに相当する。分散媒は全て表1の基本型を、復水はMg-BBを使用した。-80℃での凍結は4週間実施した。*C. jejuni* No. 423 および No. 424 は継代5回未満の新鮮分離株である。

る生残菌数が3例とも少ないが、有意差が認められたのは *C. coli* No. 444 株の事例のみであった。

各種復水の比較：II-4で示した3種類の復水を用いて、各々の生残菌の回収能を比較検討した（表4）。

cy-BBは他の2者と比べて生菌回収能が劣り（表4、実験I、IIIおよびIV）、Mg-BBは良好である（表4、実験I、II、III、VおよびIX）傾向がうかがわれた。しかし、表4の成績で、使用復水によって回収生残菌数に統計的有意差が認められたのは、実験II、IVおよびVIIのみであった。

ゼラチン・ディスク保存法に供する *Campylobacter*

株および菌液調製法の検討：供試菌を懸濁した分散媒を2等分し、一方は常法どおりゼラチン・ディスクを作製し、もう一方は-80℃で4週間凍結保存後、融解した試料を用いてディスクを作製し、各々の菌の生残性を調べた（表5）。

食鳥肉に由来する *C. jejuni* の新鮮分離株2株を、常法のゼラチン・ディスク法で処理した場合の減少率は1.8～3.4 log/ディスクであった。同一菌を-80℃で凍結した後の処理では2.4～3.3 log/ディスクの減少率であった。また、実験室保存株の *C. jejuni* 2株および *C. coli* 1株も常法による減少率は2～5 log/ディスクであ

り、 -80°C 凍結後の処理によるそれは $3 \log/\text{ディスク}$ 以内であった。

考 察

著者らは、*C. jejuni* あるいは *C. coli* について調査研究をこの数年実施してきた。その際、分離した *Campylobacter* 株を変法 TGC 培地で増殖させた後室温に保存すると、早い場合で 2 週間、遅くとも 4 週間以内に全て死滅することを経験した。そこで、分離株の保存のために 7.5% シュークロースを分散媒にして、 -80°C 凍結保存と凍結乾燥保存を併用してきた。

しかし、 -80°C 凍結保存法は配線ミスや落雷等の不慮の事故による停電で冷凍庫が停止する、あるいは菌株輸送時の不都合を体験した。また、凍結乾燥保存法では菌の生残性および保存性が不確実で、保存法として適当ではなかった。ちなみに、今回使用した *C. jejuni* H 株は凍結乾燥を 2 回繰り返したものである。最初は 10% スキムミルクを分散媒にして処理し、室温保存約 1 年後に回復させた。次いで、2 回目は 7.5% シュークロースを分散媒に使い、 10°C で約 8 年間保存した。この 2 回目の H 株の回復の際には 15 本のアンプル管を開封しなければならなかった。

このようなことから、著者らは *C. jejuni* や *C. coli* 分離菌の長期保存に小原と山井⁵⁾が改良したゼラチン・ディスク法を利用できるか否か検討したところ、分散媒を改良することで、従来法より優れた成績が得られた。

スキムミルクを分散媒とした凍結乾燥保存法では、*C. jejuni* H 株のみが処理直後の生残性および 10°C での保存性ともに良好であった。しかし、その他の株は処理直後で生菌数が $6 \log/\text{ml}$ 以上減少し、きわめて不良であった。*C. jejuni* H 株は、前述のごとくくり返しの凍結乾燥保存に耐えて生残した株であり、凍結乾燥処理に順応したためと推測された。

また、10% スキムミルク水溶液以外に 19 種類の分散媒を試作し予備実験を行ったが、表 2 の成績と大差ないか、あるいはさらに劣り、実用的なものではなかった。今回の実験ではアンプル管内を減圧することなく、アンプル管を熔封した。糖やアスコルビン酸を保護剤として加えれば、必ずしも真空条件を保たなくとも酸素の致死作用は回避できるとされていること⁶⁾、さらに凍結乾燥細菌を空气中でシールしても真空状態でシールしても細菌の保存性に差はなく、嫌気性菌も同様であったという報告⁴⁾があることから、著者らは本実験でアンプル管内の酸素の影響は極めて小さいと考えている。

ゼラチン・ディスク保存法では、小原と山井⁵⁾の改良分散媒（基本型 A を用いたもの）を用いても、凍結乾燥に抵抗性が弱い *C. jejuni* Y 株および *C. coli* No. 488 株も良く生残し、とりわけ *C. coli* は処理前後の菌数減

少が $1 \log/\text{ディスク}$ 以内であったことから、従来法に勝る方法であった。さらに各種の分散媒（表 1）を試作し検討した結果、基本型 A のグルコースをシュークロースに置換し、さらに組成を基本型 A より単純にした分散媒を用いると、*C. coli* では 35°C 3 週間保存後も生残菌が認められた。細菌の長期保存において、 35°C 3 週間保存後の生残菌数は冷蔵保存 1～2 年後の生残菌数に相当し、この時点での生菌数は半永久的に維持される⁷⁾ことから、著者らが改良した分散媒は、*C. coli* の保存に対して最良の分散媒と考えられた。これらの分散媒のうち $\alpha-3$ は他の 2 者より良好な保存成績を示したので、著者らは特に本分散媒の使用を推奨したい。なお、*C. jejuni* に対する保護効果はいずれの分散媒も基本型 A と差は認められなかったため、本菌に対する分散媒は、さらに改良する必要がある。

硫酸マグネシウムを添加したブルセラブイオンで復水して得られた生菌数と、非添加ブイオンによるそれとの間に有意差は認められなかった。しかし、前者の生菌回収率は後者より勝る傾向にあった。また、分散媒に硫酸マグネシウムを添加した場合も、非添加のものより保護効果が増加する傾向がうかがわれた。

Mg^{2+} イオンは凍結乾燥処理過程で起こる細胞障害を防ぎ、この目的で Mg^{2+} イオンを添加する時期は処理中でも処理後でも有効である⁸⁾とされ、本実験でもそのことが確認された。しかし、分散媒にスキムミルクを使用していると、乳カゼインが Mg^{2+} イオンと会合してミセルを形成し不都合であった。それ故、細菌の長期保存法において、硫酸マグネシウムの添加は細菌保護のために推奨されるが、乳カゼインを含む物質との同時使用は禁忌と考えられた。

分離した *Campylobacter* をゼラチン・ディスク用分散媒に懸濁して -80°C で 4 週間凍結保存した後ディスクにしたものとの生残菌数に差は認められなかった。また、同時に検討した新鮮分離株も保存菌株と同様の成績が得られた。したがって、本法で分離菌を保存する際には -80°C で凍結して一時的に保存し、菌株がある程度集まったところでゼラチン・ディスクを作製することが可能で、効率良く処理できることが示された。

なお、ディスクを作製するために一般にはパラフィン紙⁵⁾を使用する。しかし、本実験で著者らは融解したパラフィンをタンポンで直接シャーレ底部に塗布してパラフィン薄層を作り、この上にゼラチンを滴下してディスクを作製した。この方がパラフィン紙よりも簡単に作れ、完成したディスクを集めるのも容易であった。

以上、著者らは本実験の結論として、*C. jejuni* および *C. coli* の長期保存のために以下のことを推奨する。

① 3% スキムミルク添加 10% シュークロース水溶液 5

容, 5% L-アスコルビン酸水溶液 1 容, および 20% ゼラチン水溶液 5 容を混合して分散媒としたゼラチン・デイスクリ法が従来法より優れている。②デイスクリを 10℃ 以下で保存する。③復水には 5×10^{-3} M 硫酸マグネシウムを添加する。

本実験のために、貴重な資料を提供していただいた鹿児島大学農学部柚木弘之博士に深甚なる謝意を表します。また、実験の実施に当たり技術協力をいただいた当所の川口千鶴子主任技師に深謝いたします。

引用文献

- 1) 森地敏樹：冷凍, 48, 723~730 (1973).
- 2) 森地敏樹, 山里一英, 鈴木正敏, ほか：微生物の保

存法, 根井外喜男編 第3刷, 3~77, 東京大学出版会, 東京 (1978).

- 3) 根本 久：Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth., 77, 74~76 (1978).
- 4) Obayashi Y., Ota S., Arai S., et al.: J. Hyg., 59, 77~91 (1961).
- 5) 小原 寧, 山井士郎：メディアサークル, 25, 95~100 (1980).
- 6) 斎藤香彦：都衛研年報, 31-1, 1~7 (1980).
- 7) 坂根 健, 坂野 勲：凍結及び乾燥研究会会誌, 26, 96~1000 (1980).
- 8) 佐藤幹夫：凍結・乾燥と細胞障害第, 根井外喜男編第2版, 65~82, 東京大学出版会, 東京, (1972).
- 9) 柚木弘之, 小林弘幸, 中沢宗生, ほか：凍結及び乾燥研究会会誌, 23, 12~17 (1977).

乳熱、産前産後起立不能症の予防に

新 発 売

動物用医薬品

水性ビタミンD₃注「ミタカ」

——畜産・水産の安定した生産性に奉仕する——

製造発売元

三鷹製薬株式会社
東京都三鷹市下連雀4-16-39 TEL.0422-46-9191

SHOP in

総合医科器械

株式会社 **本郷いわしや**

本社 ● 東京都文京区本郷2-39-5 〒113 Tel. 03(3813)4791(代)
地下鉄丸の内線：本郷三丁目駅前 Fax. 03(3812)4175

HONGO iwashiya

本郷いわしやは、永年の実績と多彩なノウハウを活用し医療機に関する最新の情報をいち速くお届けできるよう、カタログによる販売および、店頭販売をさらに充実いたします。良い製品をより良いサービスと低料金でお届けできますよう、全社一体となって取り組んでまいります。〈カタログ資料お送りします〉

●新規開業・増改築をお考えの先生へ

- ①資金計画②建設計画③医療機器導入
- ④事業計画作成…おまかせ下さい。