L-乾燥法およびゼラチン・ディスク乾燥法による *Pasteurella piscicida* の保存

橋本伸一, 村岡愛一郎, 楠田理一

(1990年6月6日受付)

Preservation of *Pasteurella piscicida* by L-Drying or Gelatin-disk Drying Method

Shinichi Hashimoto,*¹ Aiichiro Muraoka,*¹ and Riichi Kusuda*²

This report describes the survival and pathogenicity of *Pasteurella piscicida* strain 5866, a pathogen of yellowtail *Seriola quinqueradiata*, preserved by L-drying or gelatin-disk drying method. For L-drying storage, drying media with serum base were assessed. Harvested cells were suspended in drying media and stored at 15°C after drying in a vacuum from the liquid state. For the gelatin-disk drying method, harvested cells were suspended in melted 10% Bacto-gelatin containing 1% Bacto-peptone, 0.5% Bacto beef extract, 0.5% NaCl and 0.25% ascorbic acid. Small quantities were dried over P₂O₅ in a vacuum and stored at 15°C after drying. For assessment of pathogenicity, juveniles of yellowtail were infected by waterborne infection in sea water.

Results of L-drying storage experiments showed mist desiccans with 0.5% NaCl 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. In gelatin-disk drying storage, recovery was low immediately after drying but no further decrease was found after a 6 month-storage. In both preservation methods, pathogenicity was well maintained for 6 months.

一般に病原細菌の長期保存には、主として凍結法もしくは凍結乾燥法が用いられているが、このほかに L-乾燥法やゼラチン・ディスク乾燥法も試みられている。L-乾燥法は細胞を凍結せずに直接乾燥する方法であり、Annear¹⁾により開発された。本法は凍結保存に弱い微生物にも適用可能であり、凍結乾燥法の長所も持っているといわれている。また、ゼラチン・ディスク乾燥法はゼラチンとアスコルビン酸を含む分散媒を用い、少量の菌体懸濁液を滅菌パラフィンろ紙上に滴下したのち、減圧下で乾燥する保存方法であり、Stamp²⁾により開発された。本法は操作が簡便で、特別な設備・装置を必要としない点が最大の長所とされている。橋本ら^{3,4)}および村岡ら⁵⁾は凍結法および凍結乾燥法によって *Pasteurella piscicida* の魚体通過株を長期保存したときの生残性と病原性を比較しているが、L-乾燥もしくはゼラチン・ディスク乾燥法による本菌の保存性に関する報告はみあたらない。

そこで、本報では *P. piscicida* の魚体通過株を L-乾燥およびゼラチン・ディスク乾燥法により保存して生残性と病原性を比較し、これらの保存法が本菌に対しても、適用できるかどうかを検討した。

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 *Pasteurella piscicida* 5866 株を 1~2 か月ごとに魚体通過し、病原性の維持されていたものを使用した。

供試分散媒 L-乾燥法では、0.5% NaCl 加 mist desiccans, 1.0% NaCl 加 mist desiccans, 1.0% NaCl 加 mist desiccans に 10 mM MgCl₂ (和光) を加えたもの、1.0% NaCl 加 mist desiccans に 10 mM MgCl₂ と 10 mM カダベリン (和光) を加えたもの、1.0% NaCl 加 mist desiccans に 10 mM MgCl₂, 10 mM カダベリンおよび 0.1% システイン (和光) を加えたものの 5 種

*¹ アース製薬株式会社生物科学研究所 (Biomedical Research Institute, Earth Chemical Co., Ltd., Ako, Hyogo 678-01, Japan).

*² 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).

を使用した。なお, mist desiccans[®]はガラクトース (和光) 3 g と Nutrient Broth (Difco) 0.13 g を精製水 10 ml に溶かし, これに 30 ml の組織培養用仔牛血清 (極東) を混合して調製した。

ゼラチン・ディスク乾燥法で用いた分散媒は以下の方法で調製した。すなわち, バクト・ペプトン (Difco) 2%, 肉エキス (Difco) 1% および NaCl 1% の組成の溶液を pH 9.3 としてリン酸塩を除去したのち, pH 7.6 に再調整した。この溶液と加熱溶解した 20% バクト・ゼラチンを等量混合後にオートクレーブで滅菌した。次に, これを固まらない程度まで冷却したのち, ろ過滅菌した 2.5% アスコルビン酸 (和光) を 1/10 量加えて分散媒とした。

L-乾燥法 Annear¹⁾ と飯島・坂根⁷⁾ の方法に準じて行った。すなわち, 供試菌株を 1.8% NaCl 加 Todd Hewitt Broth (THB) を用い, 25°C で 30 時間振とう培養した。この培養液を 5,000 rpm で約 5 分間遠心分離して集菌し, 菌濃度が約 10^8 CFU/ml となるように適当量の分散媒に分散させた。この菌液を脱脂綿を少量入れた滅菌アンプルに 0.2 ml ずつ分注し, 脱脂綿に吸収させた。次いで, 0.1~0.2 Torr で約 8 時間減圧乾燥させたのち, 減圧下で熔封した。熔封部位は保存中に起こり得る空気の侵入を防ぐため, バスボンド[®] (コニシ) を塗布して 15°C で保存した。

ゼラチン・ディスク乾燥法 坂崎⁸⁾ の方法によった。すなわち, 供試菌株を 1.8% NaCl 加 THB を用い, 25°C で 30 時間振とう培養した。この培養液を 5,000 rpm で約 5 分間遠心分離して集菌し, 菌濃度が約 10^8 CFU/ml となるように適当量の分散媒に分散させた。この菌液を 25 μ l ずつシャーレに入れた硬パラフィンろ紙上に滴下した。次に, このシャーレを五酸化リンを入れたデシケーターに移し, 真空ポンプで減圧した。この状態で 3 日間室温で乾燥させたのち, パラフィンろ紙上のゼラチン・ディスクをシリカゲルと脱脂綿を入れたバイアルに移し, 15°C で保存した。なお, 乾燥中は 1 日に 1 回真空ポンプで減圧した。また, 硬パラフィンろ紙は

加熱溶解して沸騰させた硬パラフィンに円形ろ紙を 2 分間浸漬し, よくきって室温で硬化させたものを用いた。

生残菌数の測定 乾燥前および乾燥して 4 もしくは 8 日後と 6 か月後に 1.8% NaCl 加 THB の 0.8% 寒天培地を用い, 混釈平板法により生菌数を求めた。なお, 本菌の希釈には滅菌 2% NaCl を用いた。また, コロニーの計測は 25°C で 4 日間培養後に行った。

病原性試験 6 か月間保存後に浸漬攻撃法により病原性試験を行った。すなわち, 各保存菌株を 1.5% NaCl 加 BHI で復水したのち, 1.5% NaCl 加 BHI 寒天平板で 25°C, 48 時間培養し, 2% 滅菌 NaCl で集菌して攻撃菌液とした。平均魚体重 5 g のブリ稚魚を 1 群当たり 15 尾用い, 菌体濃度を $1.2 \sim 3.3 \times 10^6$ CFU/ml とした攻撃菌液に 5 分間浸漬後, 約 5 分間海水で洗浄し, 飼育水槽にもどした。なお, 対照として攻撃菌液を含まない海水による同様の浸漬と, 洗浄操作のみを行った対照区を設けた。攻撃中および攻撃後の飼育水温は 21 ~ 24°C, 試験期間は 7 日間として行った。判定は生残率によって行ったが, 本菌が再分離されなかった魚体を事故死として処理し, 生残率の計算には加えなかった。

結 果

L-乾燥法による保存と病原性 15°C で 6 か月間保存後の生残菌数は Table 1 に示すとおりである。L-乾燥直後の生残性はいずれの分散媒を用いても良好であったが, 6 か月間保存後の生残率は 1 オーダー低くなっていた。分散媒に保存性を良くするために添加した MgCl₂, カダベリンおよびシステインの効果は認められなかった。また, NaCl の添加による生残性は 0.5% のほうが 1.0% よりもすぐれていた。

15°C で 6 か月間保存後の病原性試験の結果は Fig. 1 に示すとおりである。いずれの分散媒を用いた場合にも, 5 日以内にすべての供試魚が死亡し, 強い病原性が認められた。

ゼラチン・ディスク乾燥法による保存と病原性 15°C で 6 か月間保存後の生残菌数は Table 2 に示すとおり

Table 1. Survival of *Pasteurella piscicida* during storage at 15°C in L-drying media

Protective additives	Initial count (cfu/ampoule)	Survival (cfu/ampoule)	
		after 8 days	after 6 months
Mist desiccans+0.5% NaCl	1.2×10^8	1.0×10^8 (83.3%)*	1.0×10^7 (8.3%)
Mist desiccans+1.0% NaCl	1.2×10^8	2.8×10^7 (23.3%)	6.1×10^6 (5.1%)
Mist desiccans+1.0% NaCl+10 mm MgCl ₂	1.2×10^8	3.2×10^7 (26.7%)	3.5×10^6 (2.9%)
Mist desiccans+1.0% NaCl	1.2×10^8	3.7×10^7 (30.8%)	9.4×10^6 (0.8%)
+10 mm MgCl ₂ +10 mm cadaverin			
Mist desiccans+1.0% NaCl+10 mm MgCl ₂	1.2×10^8	3.4×10^7 (28.3%)	2.4×10^6 (2.0%)
+10 mm cadaverin+0.1% cystein			

* Percentage in parentheses indicates the survival rate.

The mist desiccans contained 3 parts calf serum and 1 part nutrient broth with 7.5% galactose.

Fig. 1. The effect of a 6 month-storage at 15°C in L-drying media on virulence of *Pasteurella piscicida* by waterborne infection in yellow-tail. ○—○: Mist desiccans with 0.5% NaCl, ●—●: Mist desiccans with 1.0% NaCl, △—△: Mist desiccans with 1.0% NaCl and 10 mm MgCl₂, ▲—▲: Mist desiccans with 1.0% NaCl, 10 mm MgCl₂ and 10 mm cadaverin, □—□: Mist desiccans with 1.0% NaCl, 10 mm MgCl₂, 10 mm cadaverin and 0.1% cysteine, ■—■: Control.

Table 2. Survival of *Pasteurella piscicida* during storage at 15°C in gelatin disk

Initial count (cfu/disk)	Survival (cfu/disk)	
	after 4 days	after 6 months
2.8×10^7	5.7×10^4 (0.2%)*	2.0×10^5 (0.7%)

* Percentage in parentheses indicates the survival rate.

Fig. 2. The effect of a 6 month-storage at 15°C in dried gelatin-disk on virulence of *Pasteurella piscicida* by waterborne infection in yellow-tail. ○—○: Gelatin P₂O₆ dried *Pasteurella piscicida*, ●—●: Control.

である。乾燥直後の生残率は L-乾燥法に比べると低いですが、6 か月間の保存による生残性の低下は認められなかった。

15°C で 6 か月間保存後の病原性試験の結果は Fig. 2 に示すとおりである。攻撃 5 日後にすべての供試魚が死亡し、強い病原性が認められた。

考 察

本報では *P. piscicida* の強毒株を L-乾燥およびゼラチン・ディスク乾燥法により保存して生残性と病原性を比較し、これらの保存法が本菌に対しても適用できるかどうかを検討した。

L-乾燥あるいは凍結乾燥菌株の保存過程で生じる DNA 障害は、菌株を常に 5°C 以下の低温に保存すると生じないことが判明している⁹⁾。したがって、乾燥系保存菌は通常は 4~5°C に保存される。しかし、本実験においては短期間で生残性や病原性の保存性の優劣を明確にするために、乾燥後の保存温度を 15°C とした。

L-乾燥法では、血清をベースとした分散媒を用いて乾燥し、生残性と病原性の比較を行った結果、検討した分散媒の中では 0.5% NaCl 加 mist desiccans が高い生残性を示した。Morichi¹⁰⁾は Mg²⁺、カダベリン、システインなどを分散媒に添加して凍結乾燥することにより、生残性を向上させ得ることを報告している。鈴木・山里¹¹⁾はシステインを分散媒に添加して海洋性細菌を L-乾燥すると生残率が向上したと述べている。さらに、坂根ら¹²⁾はシステインの添加は L-乾燥した大腸菌の保存中の変異防止に効果があるとしている。そこで、これらを分散媒に添加して本菌の生残性に及ぼす影響を検討した結果、いずれも効果はみられなかった。また、本菌は好塩性であることから、分散媒の NaCl 濃度を変えて生残性を比較検討した。その結果、生残性は NaCl を 1.0% 添加するよりも 0.5% 添加したほうが高くなる傾向がみられた。

ゼラチン・ディスク乾燥法で保存した結果、本菌は 6 か月後も生残性を保っていた。Stamp²⁾は本法で 28 株の細菌を保存した結果、それらの大部分が少なくとも室温で 4 年間は保存可能であり、*Chromobacterium prodigiosum* では凍結乾燥法よりもすぐれていると述べている。坂崎³⁾は腸内細菌は本法で 5 年以上の保存が可能であり、赤痢菌 *Shigella shigae* (= *Shigella dysenteriae*) では病原性、バクテリオシン産生性および薬剤感受性の変異は認められないとしている。また、木村ら¹³⁾は本法により偏性および通性嫌気性細菌 24 株を保存した結果、5°C で 2 年以上の保存が可能であり、コロニーの性状および形態にまったく変化は認められなかったとしている。本法による保存例は少ないが、急激な温度変化がな

く、乾燥も緩慢であるので、適用可能な菌株の範囲は広いものと考えられる。

L-乾燥およびゼラチン・ディスク乾燥法のいずれにおいても、本菌は6か月間保存後も強い病原性が認められた。村岡ら⁹⁾はブリから新鮮分離した5866株の病原性試験を浸漬法で平均魚体重5gのブリ稚魚を用いて行った結果、攻撃菌濃度が 2.0×10^8 CFU/mlでは攻撃7日後までに80%の供試魚が死亡したことを確認している。病原性試験は供試魚の由来や飼育条件に影響されるので厳密な比較はできないが、今回の実験においてはいずれの保存法とも攻撃5日以内に100%が死亡した。したがって、本法は病原力の保存性は良好なものと思われる。また、本菌を凍結乾燥法により保存した場合においても病原性がよく維持されていることから^{4,9)}本菌の病原性の保持には、乾燥系の保存法が共通してすぐれているのではないと思われる。

文 献

- 1) D. I. Annear: *Austral. J. Exp. Biol.*, **40**, 1-8 (1962).
- 2) L. Stamp.: *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 251-265 (1947).
- 3) 橋本伸一, 村岡愛一郎, 楠田理一: 日本誌, **51**, 1073-1077 (1985).
- 4) 橋本伸一, 村岡愛一郎, 楠田理一: 日本誌, **55**, 979-984 (1989).
- 5) 村岡愛一郎, 橋本伸一, 楠田理一: 日本誌, **51**, 1659-1663 (1985).
- 6) 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.
- 7) 飯島貞二, 坂根 健: 凍結及び乾燥研究会会誌, **16**, 87-94 (1970).
- 8) 坂崎利一: メディヤサークル, **16**, 433-436 (1971).
- 9) 坂根 健, 坂野 勲, 飯島貞二: 凍結及び乾燥研究会会誌, **25**, 59-64 (1979).
- 10) T. Morichi: in "Proceedings of the First International Congress of IAMS" (ed. by T. Hasegawa), Vol. 5, Science Council of Japan, Tokyo, 1975, pp. 597-606.
- 11) 鈴木 誠, 山里一英: 凍結及び乾燥研究会会誌, **32**, 39-46 (1986).
- 12) 坂根 健, 坂野 勲, 飯島貞二: 凍結及び乾燥研究会会誌, **27**, 16-22 (1981).
- 13) 木村修武, 吉金美和子, 小原きよ子, 小林昭男: 凍結及び乾燥研究会会誌, **29**, 41-44 (1983).