

レプトスピラの凍結保存に関する研究

阿久沢正夫・白沢伸彦・山内聡子・森園 充

(家畜内科学研究室)

平成4年8月10日 受理

Studies on the Freezing Preservation of Leptospires

Masao AKUZAWA, Nobuhiko SHIRASAWA, Satoko YAMAUCHI and Mitsuru MORIZONO

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

凍結して用いることが常法となっている精子の凍結保存法^{1,3)}を参考にして、レプトスピラの凍結保存法を検討した。精子では凍結時に氷点を降下させるとともに細胞内に氷晶の形成を少なくするために、凍害防止剤としてグリセリン (以下 Gly) やジメチルスルフォキシド (以下 DMSO) を5-10%添加する。また、凍結の過程において凍害防止剤と精子をなじませるために、両者を混合した後10分から10時間程度の平衡時間 (equilibrium time) をおく。本研究では凍害防止剤として Gly と DMSO 用い、濃度と平衡時間を変えながら、レプトスピラの凍結保存法を検討した。さらに凍結保存したレプトスピラを融解し培養継代した菌が、凍結保存をしない菌と同様な凝集性を抗血清に対して示すかについて観察した。以下その成績を報告する。

材料と方法

1. 使用抗原

当研究室で継代保存している *Leptospira autumnalis* (以下 A), *L. hebdomadis* (以下 B), *L. australis* (以下 C), *L. icterohaemorrhagiae* (以下 Ict), *L. canicola* (以下 Can), *L. pomona* (以下 Pom), *L. hardjo* (以下 Har) の7種の血清型の菌を用いた。

2. 抗体価測定

マイクロタイタープレートの各 well (穴) に Korthof 液を各50 μ l 注入する。次に被験血清10 μ l を第1列の well に注入混和し、以後順次10 μ l を隣の well に注入混和を繰り返して最後の well では10 μ l を捨てる。さらに菌培養液50 μ l を全 well に加える。対照として被験血清を加えずに Korthof

液50 μ l と菌培養液10 μ l を混合した well を設ける。プレートは蒸発防止のため蓋をのせ、37°Cで3時間反応させる。判定は各 well から1滴取り、暗視野顕微鏡により100倍で鏡検し、菌凝集あるいは対照 well 内容液よりも菌数が著しく減少している場合を陽性とし、陽性を示した well の血清希釈倍率を抗体価とする。

3. 菌の保存

1) 25°Cで培養した菌の生存期間

本研究に用いた7種類の血清型のレプトスピラを培養液に接種してから25°Cに保ち、培養液中の菌が死滅するまでの期間をしらべた。

2) 凍害防止剤と菌の混合による平衡時間の検討

凍害防止剤 Gly と DMSO を蒸留水でそれぞれ50, 40, 30, 20, 10%に希釈した液、および同濃度の Gly と DMSO を1:1に混合した液 (Mix) を調製した。3種類の液は25°Cの保存で生存期間の最も短かった *L. autumnalis* 培養液に、各凍害防止剤の終濃度が25, 20, 15, 10, 5%となるように1:1に添加した。その後25°Cに保って15分、1時間、2時間、12時間後に菌培養の状態を観察した。菌培養液は、毎週の観察で菌の増数が著しい対数期 (log phase) の菌と、観察毎の菌数に差が認められない静止期 (stationary phase) の菌とを用いて、それぞれ25本の試験管について比較した。

3) 対数期と静止期および異なる菌濃度での24時間凍結の影響

凍害防止剤 Gly, DMSO, Mix を終濃度がそれぞれ5%となるように添加した *L. autumnalis* 培養液を用いて、(1)対数期と静止期の菌で、(2)無希釈のものと同濃度の Korthof 培養液で1:10に希釈したものについて、それぞれ25°C15分間保った後-20°Cで24時間保存し、その後37°Cの温湯で融解して培地に接種

し、25°Cで培養して、菌の生存率を比較した。各10本の試験管を用いた。

4) 1, 3, 6ヵ月間凍結保存

凍害防止剤 Gly, DMSO, Mix を終濃度がそれぞれ5%となるように添加した *L. autumnalis* 培養液を25°Cに15分間保ち、さらに-20°Cで1, 3, 6ヵ月間保存した後、37°Cの温湯で融解して培地に接種し、25°Cで培養して、生存率を比較した。また、この培養された菌を用いて *L. autumnalis* に対する抗体の存在が確認されている血清を用いて抗体価を測定し、凍結保存による抗体価の変化について観察した。いずれも各10本の試験管を用いた。

結 果

1. 25°Cで培養した菌の生存期間

7種類の血清型のレプトスピラを用いて、培養液に接種後25°Cで保存し、培養液中に菌がみられなくなるまで観察した (Table 1)。培養液中の菌が死滅するまでの平均の期間は、Ict と A が同程度であるが A が最も短かく (3.7ヵ月)、B, C, Pom がほぼ中等度で、Can, Har は長かったがその内でも Har が最も長かった (5.5ヵ月)。

2. 凍害防止剤と菌の混合による平衡時間の検討

対数期および静止期の菌培養液に濃度の異なる3種類の凍害防止剤を同量添加し、15分および1, 2, 12時間後に菌の状態を観察した (Table 2)。菌は室温保存において生存期間の最も短かった *L. autumnalis* を用いた。DMSO は対数期の菌では、菌は全ての培養液中から認められなくなったが、静止期の菌では添加後2時間までは、凍害防止剤が低濃度のもので菌が認められた。Gly では添加後1時間までは全ての濃度で菌が認められたが、2時間では50%液で菌がみられなくなり、さらに12時間後には10%液にみられるだけであった。Mix では対数期の菌が1時間と2時間後には50%と40%液で、ま

た静止期では2時間後に50%液でみられなくなった。Gly と Mix では、Gly のほうが菌の認められる率が高かったが、20と10%の液では Mix のほうに菌の認められる率が高かった。

3. 凍結保存

1) 24時間凍結保存の影響

(1) 対数期と静止期の *L. autumnalis* に対する影響

Table 2. Percentages of media found *L. autumnalis* in the log and the stationary phasic growth in the medium mixed with cryoprotectants and kept at 25°C

Time* ¹	%* ²	Cryoprotectants					
		DMSO		Gly		Mix	
		Log	Stat	Log	Stat	Log	Stat
15m	50	0* ³	0	40	40	12	28
	40	0	0	40	40	16	36
	30	0	0	40	52	32	48
	20	0	8	48	72	64	84
	10	0	20	60	80	100	100
1 h	50	0	0	16	16	0	12
	40	0	0	8	20	0	20
	30	0	0	24	28	12	36
	20	0	0	28	48	40	80
	10	0	20	56	80	100	92
2 h	50	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	8	8	0	20
	30	0	0	16	24	8	32
	20	0	0	28	28	24	68
	10	0	20	60	80	84	84
12h	50	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	8	12
	10	0	0	8	32	48	48

Log; Log phase. Stat; Stationary phase.

*1; Time for equilibrium between medium and cryoprotectant.

*2; Concentration (%) of cryoprotectants.

*3; Percentages of media found leptospire.

Table 1. Time between inoculation and death in leptospire kept at 25°C

	A	B	C	Ict	Can	Pom	Har
Mean	3.7*	4.8	5.0	3.8	5.3	4.8	5.5
SD	1.1	2.0	2.7	2.4	2.7	2.9	3.0

A; *L. autumnalis*, B; *L. hebdomadis*, C; *L. australis*, Ict; *L. icterohaemorrhagiae*, Can; *L. canicola*, Pom; *L. pomona*, Har; *L. hardjo*

* Months

Table 3. The influence of 24 - hour - freezing on *L. autumnalis* in the log and the stationary-phase

	Cryoprotectants* ¹		
	Gly	DMSO	Mix
Log phase	100* ²	80	80
Stationary phase	100	80	80

*1; Final concentration of cryoprotectants was 5%.

*2; Percentages of media found *L. autumnalis*.

菌培養液に終濃度が5%となるように3種の凍害防止剤を添加して-20°Cで24時間保存した (Table 3). 対数期, 静止期ともに Gly では10本全試験管で凍結保存後, 融解接種によって培養液内に菌の増殖が認められた (100%) が, DMSO および Mix では20%の培養液において菌はみられなかった. 対数期, 静止期の菌で差はなかった.

(2) 希釈および無希釈の菌培養液に対する影響

菌培養液を無希釈のまま, および10倍に希釈した液に, 終濃度が5%となるように3種類の凍害防止剤を添加したものと, 無添加のものについて-20°Cで24時間保存した (Table 4). 菌培養液は無希釈の方が, やや菌の生存率が高かった. 凍害防止剤を添加しないで凍結した場合は, 全く菌は培養されなかった.

Table 4. The influence of 24 hour-freezing on the diluted and the undiluted *L. autumnalis* in the medium mixed with cryoprotectants

	Without cryoprotectant	Cryoprotectants* ¹		
		Gly	DMSO	Mix
Undiluted	0* ²	100	60	100
Diluted 1:10* ³	0	80	60	60

*1; Final concentration of cryoprotectants was 5%.

*2; Percentages of media found *L. autumnalis*.

*3; Diluted with Korthof medium.

2) 凍結保存後培養した菌の生存期間

24時間凍結の成績を参考にして, Gly と DMSO の終濃度が5%になるよう添加したものと, 無添加の菌培養液を-20°Cで1, 3, 6ヵ月間保存後, 融解接種培養を行った (Table 5). DMSO の添加では1ヵ月後の生存率は20%であった. Gly では1ヵ

Table 5. The influence of 1, 3 and 6 month-freezing on *L. autumnalis* in the medium mixed with cryoprotectants

Frozen periods	Without cryoprotectant	Cryoprotectants* ¹	
		Gly	DMSO
1 month	0* ²	100	20
3 months	0	80	0
6 months	0	20	0

*1; Final concentration of cryoprotectants was 5%.

*2; Percentages of media found *L. autumnalis*.

月は100%, 3ヵ月は80%と高率であったが, 6ヵ月では20%と急激に低下した. 無添加群では生存は皆無であった.

3) 凍結保存後培養した菌の既知血清による抗体価測定

上記の実験で-20°Cで1, 3, 6ヵ月間保存後, 融解接種培養した菌を用いて, 抗体の存在が既知の血清について抗体価を測定した (Table 6). 凍結保存期間が DMSO では1ヵ月間, Gly では1, 3, 6ヵ月間であった菌を培養液に接種培養した菌による抗体測定では, いずれも同じ抗体価が得られた.

Table 6. Titration of antibody in a serum with a known titer using *L. autumnalis* cultivated after the freezing preservation for 1, 3 and 6 months

Frozen periods	Cryoprotectants* ¹		Control* ²
	DMSO	Gly	
1 month	2,592	2,592	2,592
3 months	—	2,592	2,592
6 months	—	2,592	2,592

*1; Final concentration of cryoprotectants was 5%.

*2; Titrated using *L. autumnalis* cultivated at 25°C.

考 察

レプトスピラの25°C保存における生存期間を比較すると, A, Ict が短く Can, Har が長く, また平均値は3.7から5.5ヵ月の範囲内であった. このように血清型によって多少の差はみられたが, 培養液に接種後増殖が確認されるまでに, 遅いものは数週間かかることから, レプトスピラの継代培養は, 生存期間の最短のものに合わせて, さらに幾分の余裕を持って行うように, 1-2ヵ月毎に行うべきであることが示唆された.

冷凍時の凍害防止剤の添加は, 菌によっては有害とされるが⁴⁾, 本研究で凍害防止剤を添加せずに凍結保存した培養液では, その後の培養でいずれも菌の発育が全く認められなかった. このことから, レプトスピラの凍結保存では, 凍害防止剤が必要であることが確認された.

凍害防止剤添加後の平衡時間は, 精液を凍結するときのグリセリン平衡時間が3-16時間であること¹⁾を参考にして, 15分から12時間の間に設定した.

平衡時間が短いほうが、また濃度の低いほうが生存率が高くなる傾向がみられたが、DMSOを用いた培養液では、添加から15分後でも菌はほとんど認められなかった。Glyでは生存する培養液が多く、MixではGlyとほぼ同等の生存率が得られた。平衡時間が12時間になると3種類のいずれの凍害防止剤も、どの濃度においても菌の生存は低下し、また生きてはいても運動の活発な菌は減少した。このように、凍害防止剤による菌の傷害作用が認められたことから、平衡時間は短く、液は低濃度であるほうが菌の損傷が少なく望ましいと考えられた。

レプトスピラを凍結保存する場合、対数期の菌と静止期の菌および菌培養液の無希釈のものと10倍希釈したものを用いて、 -20°C に24時間保存した菌について比較したが、解凍後の培養成績では対数期と静止期の菌では差がなかったが、無希釈と10倍希釈した菌培養液では、解凍後の培養成績は無希釈培養液がやや勝っていた。一方、菌の種類によっては凍結に対して対数期の菌のほうが抵抗力が強いといわれる²⁾が、本実験のレプトスピラではとくに差は認められなかった。一方、凍害防止剤を菌培養液に添加した場合、対数期よりも静止期の菌において、添加後に生存している率が高かった。

1, 3, 6ヵ月間の凍結保存後の培養で得られた*L. autumnalis*を用いて、抗体の存在が確認されている血清の抗体価を測定したが、 25°C で保存した菌を用いて測定した抗体価と差は認められなかった。1種類の血清型だけについての結果ではあるが、レプトスピラは凍害防止剤の使用により凍結保存が可能であり、これを融解後培養したものを抗体価測定に用いることができることが示された。

要 約

レプトスピラの凍結保存法を精子の方法を参考にして検討した。凍結時の凍害防止剤として、グリセリン (Gly) とジメチルスルフォキシド (DMSO)

を用いた。菌培養液と凍害防止剤を混合する平衡処理では防止剤の濃度を低くし、平衡時間は短時間のほうが菌の傷害が少なかった。7種の血清型を用いて菌を 25°C で培養したとき、平均生存期間は*L. icterohaemorrhagiae*と*L. autumnalis*が同程度であるが後者が最も短かく(3.7ヵ月)、*L. hebdomadis*, *L. australis*, *L. pomona*がほぼ中等度で、*L. canicola*, *L. hardjo*は長かったがその内でも後者が最も長かった(5.5ヵ月)。平均生存期間の最も短かった*L. autumnalis*の培養液に凍害防止剤を終濃度が5%になるように添加し、 25°C で15分間の平衡処理後に -20°C で24時間保存した。保存した菌培養液を解凍後培地に接種して培養すると、増殖のみられる培地の割合は、対数期と静止期の菌では差がなかったが、無希釈と10倍希釈した菌培養液では、無希釈の菌培養液がやや勝っていた。凍害防止剤なしで菌を -20°C で凍結すると、1ヵ月保存では解凍後の培養で菌増殖は認められなかった。DMSO添加では凍結保存1ヵ月後でも融解後接種した培養液のうち菌が増殖したのは20%であったが、Glyでは3ヵ月後でも80%と高率であり、6ヵ月後に20%に低下した。また、1, 3, 6ヵ月凍結保存後の培養で得られた*L. autumnalis*を用いて、抗体の存在が確認されている血清の抗体価を測定したが、 25°C で保存した菌による抗体価と差は認められなかった。

文 献

- 1) 星 修三・山内 亮：新版家畜臨床繁殖学。朝倉書店、(1989)
- 2) 根井外喜男：微生物の保存法、3-77。東京大学出版会(1977)
- 3) Roberts, S. J.: Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology). Edwards brothers, Inc., Ann Arbor, Michigan (1971)
- 4) 梁川 良：病原スピロヘータの保存法、根井外喜男編、252-259。東京大学出版会(1977)

Summary

In reference to the semen-freezing-process, a method applicable to leptospire was studied. In order to protect the possible distraction in cells by ice crystals, cryoprotectants, glycerol and dimethylsulfoxide (DMSO), were added to the cultivating medium. In the equilibrium-process, decreasing of leptospire-destruction was tried by making the concentration of cryoprotectants low, and by letting the equilibrating-time shortened.

The average life span of seven serotypes of leptospire kept at 25°C, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. autumnalis* were both shortest and between the two, the latter was shorter. (3.7 months); *L. hebdomadis*, *L. australis* and *L. pomona* were middle; *L. canicola* and *L. hardjo* were both longest and between the two, the latter was longer. (5 months).

To the cultivating medium of *L. autumnalis*, that was shortest in the average life span, cryoprotectants were added so as to make its final concentration within the medium to the degree of 5%, then the cultivating medium was equilibrated at 25°C for 15 minutes, and stored at -20°C for 24 hours. Concerning the percentages of growth in leptospire after the cultivation of melted frozen cultivating medium, there was no difference between the log-phase and the stationary phase, while it was slightly higher in the undiluted medium than in the diluted medium at the ratio of 1:10. No growth was detected in leptospire when they were kept at -20°C for one month without cryoprotectants. In case of the DMSO added cultivating medium, the growth of leptospire was kept within 20% in the medium melted after one month's freezing. And in that of glycerol-addition, the growth of leptospire was kept within 20% in the cultivating medium, the growth showed a high ratio of 80% even after 3 months' freezing, though it lowered to 20% after 6 months' freezing. Concerning the values of antibody titers, no significant difference was noted between those obtained by using the preliminarily titrated serum supplied with *L. autumnalis* and then cultivated at -20°C, after 1, 3 and 6 months' freezing and those of the ones cultivated at 25°C.