

尿素液中 *Corynebacterium renale* 生菌数の凍結による影響平塚恵子¹⁾・岩野英知²⁾・高橋樹史¹⁾・横田 博²⁾・平棟孝志¹⁾*・菊池直哉¹⁾Effects of freezing on viable count of *Corynebacterium renale* in a urea solutionKeiko HIRATSUKA¹⁾, Hidetomo IWANO²⁾, Tatsufumi TAKAHASHI¹⁾, Hiroshi YOKOTA²⁾, Takashi HIRAMUNE¹⁾* and Naoya KIKUCHI¹⁾¹⁾ Epizootiology and ²⁾ Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

* Former faculty.)

(2011. 4. 5 受付 / 2011. 5. 31 受理)

Summary

We performed a series of experiments on the effects of preservation conditions on the viable count of *Corynebacterium renale* in a urea solution. A decrease in viable count was observed when the organisms were preserved by freezing in compared to preservation by non-freezing. No decrease was observed on preservation in distilled water. The amount of effluent protein from the organisms was greater when preserved by freezing. These results indicate that the urea initially affected the cell membrane protein of *C. renale*, and subsequent freezing resulted in bactericidal injury to the protein. Therefore, the viable count of *C. renale* in urine is decreased remarkably when preserved by freezing.

Keywords : *Corynebacterium renale*, viable count, urea, freezing

家畜衛生学雑誌 37, 1~4 (2011)

序 文

臨床材料の細菌検索は採材後、直ちに好適な培地に塗抹、培養することが望ましい。しかし、種々の理由で培養まで時間を要するときには、材料を4℃または-20℃に保存後、培養するのが一般的である。

牛の腎盂腎炎は *Corynebacterium renale* の感染による尿路感染症であり、尿中に多数の菌を排出する。*C. renale* を排菌している牛の尿を4℃と-20℃に1日保存後培養すると、4℃では菌数の増減は見られないが、-20℃では死滅し、菌の増殖はほとんど認められない³⁾。また本菌を尿素濃度10、1、0.1および0.01%の溶液に加え、-20℃に1日保存し培養したところ、10%と1%尿素液のみで菌が著減したことが報告されてい

る²⁾。しかし、この報告では-20℃での凍結時の菌の減少を調べているのみで、尿素液中の菌数は低温保存で減少するのか、あるいは凍結によりそれが見られるのかについて触れていない。

今回、著者らは5%尿素液と対照の蒸留水に *C. renale* を加え、低温槽で0℃から-20℃までの各温度および-30℃での24時間保存後、それぞれの生菌数を測定した。その結果、尿素液中の菌数は低温保存では減少せず、凍結により著減することが判明した。そこで、尿素液中の細菌が凍結によりなぜ減少するのかについて若干の実験を行ったので、それらの成績について報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

牛の腎盂腎炎の原因菌である *Corynebacterium renale* ATCC19412の他、*Staphylococcus aureus* 209-P、*Streptococcus agalactiae* ATCC27956、*Escherichia coli* NIHJ、*Klebsiella pneumoniae* H9を用いた。

酪農学園大学獣医学部 ¹⁾ 獣医伝染病学・²⁾ 獣医生化学

* 元酪農学園大学獣医学部獣医伝染病

〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582

2. 低温における尿素液および蒸留水中の *C.renale* 生菌数

5%尿素 (和光純薬、大阪) 液および対照として用いた蒸留水 (DW) に、*C.renale* 菌液を加え 10^8 /ml に調整したものを材料とした。これを各温度の設定した定温槽 (プロクールバス NCB3100、東京理科機械、東京) に入れ、24時間保持した。その後 DW で 10 倍階段希釈し、各希釈液の 1 白金耳量 (約 $10\mu\text{l}$) を血液寒天培地に接種し、 37°C 24時間培養し、菌数を記録した。なお、低温槽の温度は 0°C から -20°C までは 1°C づつ温度を変え、さらに -30°C についても調べた。*C.renale* 以外の菌については -4°C 、 -8°C おおび -20°C について同様に行った。

3. 尿素液および DW 中の *C.renale* 生菌数に及ぼす凍結時間の影響

-20°C に設定した低温槽に試料を入れ、15分、30分、1、3、5 および 12 時間おいた後、上記の方法で生菌数を測定した。

4. グリセリン加尿素液および DW 中の *C.renale* 生存菌数

試料に最終濃度が 10% になるようにグリセリン (和光純薬、大阪) を加え -20°C に 24 時間置いた後、生菌数を調べた。

5. 各温度における塩酸グアニジン、グリセリン添加塩酸グアニジンおよび DW 中の *C.renale* 生存菌数

尿素液の代わりに 5% 塩酸グアニジン (和光純薬、大阪) 液、グリセリン加 5% 塩酸グアニジン液および対照の DW に *C.renale* を加え、室温、 -4°C および -20°C で 24 時間保持後、生菌数を測定した。

6. 菌液上清の濃縮と SDS-PAGE

5%尿素液、10%尿素液、5%塩酸グアニジン液およびそれぞれにグリセリン液を 10% 添加したもの、さらに対照の DW に *C.renale* を 10^8 /ml になるように加え -20°C に 24 時間保持した。溶解後、菌液を 4°C で 10,000 rpm 15 分遠心分離した。各上清 0.75 ml に 20% トリクロロ酢酸を等量加え、30 分水中で放置した後、10,000 rpm 15 分遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した。冷アセトンに 1 ml 加え 2 回洗浄した後、懸濁液 (2% SDS、10 mM Tris-HCl pH 7.8) $40\mu\text{l}$ を加え、超音波処理した。よく溶解させた後、サンプルバッファーを $10\mu\text{l}$ 加え 100°C 3 分間煮沸した。SDS-PAGE は Laemmli⁴⁾ の方法に従って行った。さらに -4°C に 24 時間保存したのものについても同様に行った。

結果

1. 低温における尿素液および蒸留水中の *C.renale* 生存菌数

5%尿素液に *C.renale* を加え、各温度に設定した低温槽に入れ、24 時間保存後の生菌数を測定した (図 1)。尿素液では 0°C から -6°C に保存した場合、菌数の変化は認められなかった。 -7°C 以下の保存することにより菌数の減少が見られ、 -10°C 以下では生菌数はさらに減少し、 -20°C 以下では生存が確認できなかった。対照の DW 中では 0°C から -30°C まで菌数の減少は認められなかった。なお、5%尿素液と DW は -6°C までの冷却では凍結せず、 -10°C 以下で完全に凍結した。 -7°C から -9°C 間での凍結は不定であった。次に *S.aureus*、*S.galactiae*、*E.coli*、*K.pneumoniae* を用いて -20°C 、 -8°C 、 -4°C について同様の実験を行ったが、4 菌種とも *C.renale* と同様な傾向を示した。

2. 尿素液および DW 中の *C.renale* 生菌数に及ぼす凍結時間の影響

尿素液中の生菌数は -20°C で 15 分凍結すると著減し、それ以上凍結時間を長くしても同様な結果が得られた (図 2)。対照の DW 中の生菌数は凍結時間が長期間におよんでも変化は見られなかった。このように尿素液中の細菌は凍結により生存障害を受け、凍結時間の長短は生菌数に影響しなかった。

3. グリセリン加尿素液および DW 中の *C.renale* 生菌数

凍結におけるグリセリンの影響を調べた結果、尿素液中の生菌数は著減したが、10%グリセリン添加尿素液および DW 中のそれは減少しなかった。この時グリセリン加尿素液は、尿素液、対照の DW と同様凍結していた。

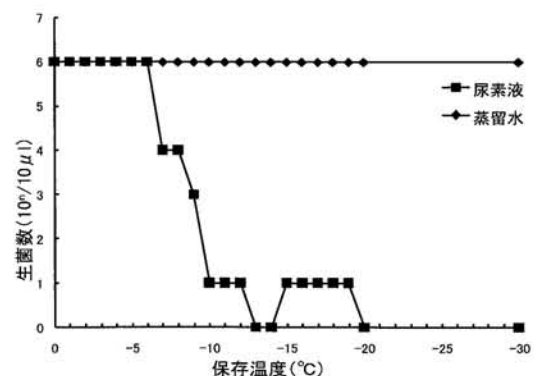


図 1. 様々な低温条件下における 5%尿素液および蒸留水中での *C.renale* 生菌数の変化

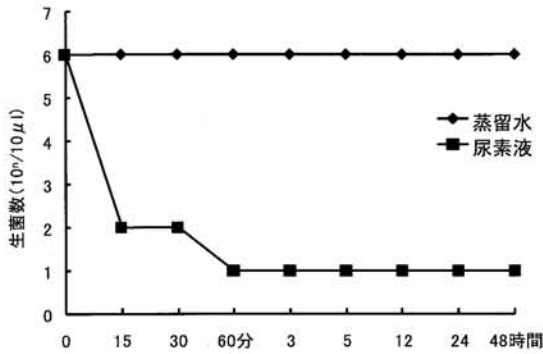


図2. 凍結時における10%グリセリン添加尿素液および蒸留水中の *C.renale* 生菌数

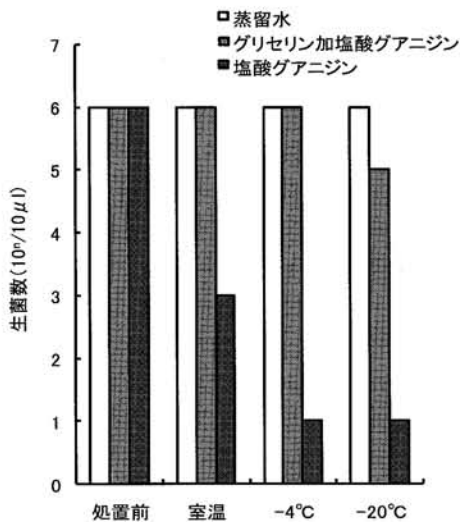


図3. 凍結および非凍結条件下における塩酸グアニジン、グリセリン添加塩酸グアニジンおよび蒸留水中での *C.renale* 生菌数

4. 各温度における塩酸グアニジン、グリセリン添加塩酸グアニジンおよびDW中の *C.renale* 生菌数

塩酸グアニジンは尿素と同様に蛋白変性剤として知られている。尿素の代わりに塩酸グアニジンを加え、生菌数を測定した(図3)。塩酸グアニジン液中の生菌数は室温保存でも減少が見られ、 -4°C 下および -20°C 下では著減した。この時塩酸グアニジン液は -20°C 下では凍結していたが、 -4°C では凍結は見られなかった。したがって、塩酸グアニジン液中の生菌数は凍結に関係なく減少することが判明した。一方、DWおよびグリセリン加塩酸グアニジン液中では菌数はいずれの温度でも変わらなかった。

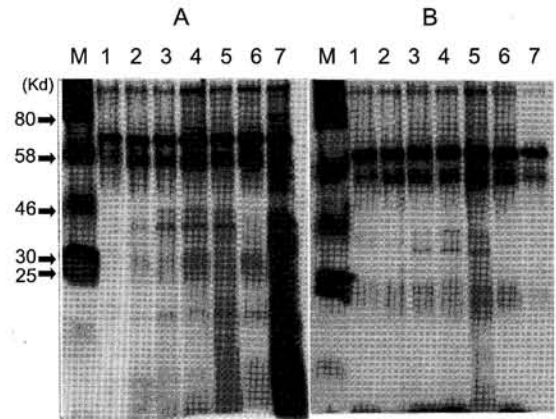


図4. 凍結保存後(A)と過冷却(非凍結)保存後(B)の *C.renale* 菌液上清蛋白質のSDS-PAGE像。M: 分子量マーカー、1: 蒸留水、2: グリセリン加5%尿素液、3: 5%尿素液、4: グリセリン加10%尿素液、5: 10%尿素液、6: グリセリン加5%塩酸グアニジン液、7: 5%塩酸グアニジン液

5. SDS-PAGEの結果

尿素液中の菌は凍結により著減したが、グリセリンを加えた尿素液の菌数は減少しなかった。このことから、尿素が細菌の膜蛋白に作用し、さらに凍結により致命的障害を受けるのではないかと推測した。そこで -20°C 下で凍結後、SDS-PAGEにより溶出蛋白の検出を試みた(図4A)。5%尿素液、10%尿素液、塩酸グアニジン液およびそれぞれにグリセリンを加えた菌液の上清では、DWのそれに比べ蛋白の溶出量が多かった。また、グリセリンの存在により蛋白の溶出量は減少する傾向が見られた。次に、凍結と冷却時の蛋白の溶出量の差を見るために、過冷却(-4°C)後の上清のSDS-PAGEを行った(図4B)。それぞれにおける尿素液中の蛋白の溶出量を比較すると、 -20°C における溶出量が若干多かった。 -4°C 保存では、尿素の濃度が高くなるほど蛋白溶出量が多くなった。また、グリセリン加尿素液の上清の蛋白溶出量は尿素液のそれよりわずかに減少していた。過冷却(-4°C)における塩酸グアニジン液の菌体からの溶出量はDWのそれと大きな差は見られなかった。

考 察

牛の尿を 4°C で保存すれば尿中の *C.renale* に変化はないが、凍結保存するとその中に含まれる細菌数は著しく減少する³⁾。この減少は尿素が関与していることが報告されている²⁾が、 -20°C での凍結時の菌の減少を調べているに過ぎない。そこで本研究では、より幅広い温度域

で実験を行い、さらに尿素液中の細菌が凍結によりなぜ減少するのか、その機序について解析した。

*C.renale*を0℃から-6℃に保存した場合、尿素液には凍結は見られず、菌数にも変化は見られなかったが、-10℃から-20℃および-30℃での保存では尿素液は凍結し、菌数は著減した。さらに、菌数の減少は凍結時間の長短には関係なく、わずか15分の凍結で菌数は大幅に減少した。これらの成績から、*C.renale*は尿素存在下で凍結されることにより生存障害を受け、生菌数が激減するものと考えられた。これらの結果は、腎盂腎炎感染牛の尿を凍結保存した場合、菌数が激減する現象を裏付けるものである。

また、*C.renale*以外の4菌種で同様の実験を行ったところ、同じ現象が見られたことから、これらの菌による尿路感染症の場合も、腎盂腎炎の場合と同様に尿の凍結保存は避けるべきであろう。

一般に、微生物を保存する場合、凍結または凍結乾燥が行われている。その際、微生物が受ける障害は、冷却速度や凍結温度により異なるが、1)細胞外水分の凍結によって起こる細胞外凍結、2)細胞外での氷晶生成による細胞からの脱水、3)凍結速度が十分に大きいとき細胞成分の移動が間に合わず細胞外部の氷晶が細胞に直接接触することで細胞内部位が凍結する細胞内凍結、などがあげられる^{1),5),6)}。細胞外凍結やそれによる脱水は、障害の一因にはなるが致命的な障害は細胞内凍結により、細胞膜が損傷を受けると考えられている⁷⁾。グリセリンは凍結時の氷晶の粗大化を防ぐことで膜を保護するため、凍結障害の保護材として知られている。今回、グリセリンを尿素剤に加え、凍結後生菌数を測定したが、その減少は見られなかった。尿をやむなく凍結保存せざるを得ない場合は、グリセリンを添加して保存することにより菌数の減少を回避できるものと思われる。

SDS-PAGEによる凍結後の溶出蛋白の検出を試みたが、蛋白変性剤(尿素、塩酸グアニジン)溶液中の蛋白溶出量がDWのそれより増加すること、また、グリセリン存在下ではその溶出量が減少することが確認された。過冷却(-4℃)保存の電気泳動像では凍結時のものに比べ溶出量は少なかった。このことより、蛋白変性剤が菌の細胞膜蛋白に作用し、さらに凍結により致命的障害を受けるものと考えられた。そして、その致命的障害はグリセリンの膜保護作用により抑制されるのであろうと推測された。

腎盂腎炎感染牛の尿の保存状態により菌数の減少が見られるが、本研究では尿素液を用いた実験によりその機序が明らかになった。塩酸グアニジンは、蛋白の変性力

が尿素より強いと考えられる。-20℃凍結ではより多くの蛋白が溶出し、菌数も著減したが、過冷却(-4℃)における菌数の減少と蛋白溶出量は一致しなかった。今後、さらに検討する必要がある。

引用文献

- 1) 檜枝光太郎(1980)凍結・乾燥による微生物の致死および遺伝的变化,微生物の生態8—極限環境の微生物,50-64頁。微生物生態研究会編,学会出版センター,東京
- 2) 平棟孝志,久米常夫(1966)凍結が牛の尿中細菌に与える影響について。第61回日本獣医学会講演要旨,344。
- 3) 平棟孝志(1988)膀胱炎および腎盂腎炎,牛病学第2版,329-331頁。清水高正ら編,近代出版,東京。
- 4) LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- 5) 根井外喜男(1983)細胞の凍結,低温医学,28-48頁。阿曾弘一,隅田幸男編,朝倉書店,東京。
- 6) 僧都博(1987)微生物の凍結および乾燥障害と耐性,凍結保存—動物・植物・微生物—,23-29頁。酒井昭編,朝倉書店,東京。
- 7) SOUZU, H. (1980) Studies on the damage to *Escherichia coli* cell membrane caused by difference rates of freeze-thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*. **603**: 13-26.

要旨

尿素液中での *Corynebacterium renale* の菌数が凍結により減る現象を解明するために実験を行った。非凍結状態での保存では菌数の減少は見られなかったが、凍結状態での保存では生菌数は減少した。蒸留水中の菌数は凍結の有無に関わらず減少しなかった。凍結および非凍結状態に保存した菌液の遠心上清を SDS-PAGE により解析したところ、凍結保存時の溶出蛋白量は非凍結保存時のそれより多かった。以上の結果より、尿素液中の *C.renale* 生菌数が凍結で著減するのは、尿素が細胞膜蛋白に作用し、さらに凍結により致命的傷害を与えるのであろうと推測した。

キーワード: *Corynebacterium renale*、生菌数、尿素、凍結