

톡소플라즈마原蟲(RH株)의 5年間 凍結保存試驗

全 永·張 桓
家畜衛生研究所
(1993년 2월 19일 접수)

Preservation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in liquid nitrogen for 5 years

Yeong Jeon, Hwan Jang
Veterinary Research Institute, Anyang, Korea
(Received Feb 19, 1993)

Abstract : *Toxoplasma gondii* frozen by the method of very slow cooling (-30°C/3hrs. → -60°C/1hr. → -196°C of liquid nitrogen) were inoculated mice after storage in the liquid nitrogen for 5 years.

The results obtained were as follows :

1. *Toxoplasma gondii* was detected in mice 4~5th day after intraperitoneal inoculation of organisms stored in the liquid nitrogen once a year for 5 years.
2. *Toxoplasma gondii* could be preserved longer than 5 years in liquid nitrogen being evidenced by the *in vivo* test.

Key words : mouse, *Toxoplasma gondii* (RH strain), liquid nitrogen.

緒 論

톡소플라즈마病(Toxoplasmosis)은 고양이(終宿主)의 消化器 系統에 寄生하는 *Isospora bigemina* (small type) 原蟲이 糞便에 섞이어 糞出된 것을 家畜, 愛玩動物 등이 飼料과 함께 먹게 되면 筋肉內에 *Toxoplasma* 原蟲으로 發育寄生하며, 이들은 中間宿主가 된다. 人體의 感染은 主로 感染된 돼지, 소 등의 고기를 잘못 익힌 것을 먹을 경우이며 따라서 中間宿主의 *Toxoplasma* 原蟲은 다른 中間宿主에도 同一한 *Toxoplasma* 原蟲을 感染시키는 것이 特徴이고 또한 胎盤感染이 되기 때문에 胎兒를 流産, 死産도 시키기도 한다.

本病은 人獸共通性原蟲疾病으로서 世界的으로 分布하고 있으며 또한 各國에서 *Toxoplasma* 原蟲을 보다 쉽게 長期間 保存하고자 하는 理由는 各種 試驗研究을 위한 基本資料를 恒時 適期에 安全하게 取扱하고자 하는데 그 目的이 있다고 思料된다.

國內에 있어서 1965年度 文³이 報告한 成績에 의하면

1957年度에 豚에서 *Toxoplasma* 原蟲을 最初로 分離하였으며 本 原蟲을 保存하기 위하여 돼지의 靜脈에 原蟲 5ml를 接種하고, 7~8日間隔으로 계속 接種繼代하였고 以後 1958年度 日本 農林省 家畜衛生試驗場에서 *Toxoplasma gondii* (RH strain)를 分讓하여 받았으며 이것을 mouse 10首의 腹腔內에 注射하고 4~6日間隔으로 再接種하는 繼代方法을 1967年度까지 계속 實施하여 왔다.

本 試驗의 目的은 1978年度 全² 등이 *Toxoplasma gondii* (RH strain)를 DMSO, glycerine, yolk sol.에 混合하고 低速冷却, 減速冷却, 迅速冷却, 急速冷却한 8個月間의 凍結保存試驗에서 가장 成績이 優秀했던 DMSO의 混合法과 低速冷却法을 利用한 凍結保存法을 1992년까지 계속 實施하여 얻은 結果를 이에 報告하고자 한다.

材料 및 方法

供試動物 : 本 試驗에 使用한 mouse는 12~15g으로서 農村振興廳 家畜衛生研究所 病理科에서 生産 및 普及하는 것을 供試하였다.

供試原蟲: *Toxoplasma gondii* (RH strain)는 1967年度 日本 農林省 家畜衛生試驗場에서 感染된 mouse 2首를 分讓하여 받은 것이며 이 原蟲은 mouse에 3~4日 間隔으로 계속 腹腔內에 接種繼代하여 保存하였다.

凍結保護劑와 *Toxoplasma* 原蟲의 混合:

- 가. TC-M 199(or RPMI-1640) 7ml
- Calf serum 1ml
- DMSO 2ml
- 나. *Toxoplasma gondii* in saline 10ml
(200 organisms per field)

Toxoplasma 原蟲의 凍結 및 融解: 凍結保護劑를 混合한 *Toxoplasma* 原蟲은 2ml의 유리 앰플에 1ml씩 넣고, 入口를 加熱封合한 후 5℃에 3時間以上→-30℃/3時間→-60℃/1時間→-196℃의 順序로 低速冷却하여 5年間 凍結保存하였다. 이것을 1年間隔으로 室温의 水道물에 融解해서 15分以內 mouse에 接種하였다. 詳細한 凍結法은 1988年度 全²등이 毒素플라즈마 原蟲의 凍結保存에 관한 研究에서 發表한 方法에 準하였다.

凍結保存한 *Toxoplasma* 原蟲의 生存期間 調査: 液體室素에 凍結保存한 앰플속의 原蟲은 每年 1회씩 融解해서 12~15g의 mouse 4首에 各各 0.2ml씩 腹腔內注射하고 注射後 臨床症狀이 심한 4~5日째에 食鹽水 1ml를 腹腔內에 注入稀釋한 1滴을 400培로 擴대한 顯微鏡檢査에서 每視野當의 原蟲數를 確認하고, 原蟲이 0個는 -, 100個 以下는 +, 200個 以下는 ++, 300個 以下는 +++ , 400個 以下는 ++++로 表記하였다.

結 果

Toxoplasma gondii (RH strain)는 mouse의 腹腔內에 接種한 후 3~4日째에 增殖한 *Toxoplasma* 原蟲을 食鹽水로 稀釋 採取하고 1,200rpm의 遠心器에서 食鹽水로 數回洗滌하였으며 이것을 400培로 擴대한 光學顯微鏡檢査에서

每視野當 약 200個의 原蟲이 含有되도록 食鹽水를 稀釋하였다. 稀釋한 原蟲은 10% DMSO에 混合하고, 低速冷却한 후 液體室素에 5年間 凍結保存하면서 每年 1回 mouse에 0.2ml씩 接種하여 增殖與否를 調査한 結果 Table 1에서 보는 바와 같이 臨床症狀에 있어서 1~2年間 凍結한 *Toxoplasma* 原蟲을 接種한 mouse는 3日에 弱하였고, 4日은 顯著하였으며 5日은 매우 甚하였다.

그리고 3~5年間 凍結한 *Toxoplasma* 原蟲은 接種후 4~5日에 顯著的한 症狀을 나타내었다. 또한 感染死한 mouse와 臨床症狀이 심한 5日의 mouse는 食鹽水 1ml를 腹腔內에 注入稀釋한 1滴을 鏡檢하였던 바 每年 一部에서 *Toxoplasma* 原蟲이 視野當 100個以上이 出現하여 繼代接種用 原蟲으로서 充分한 增殖을 보인 良好한 成績을 얻었다.

考 察

1987年度 畑中²등에 의하면 Kwautes et al은 *Toxoplasma gondii*의 tachyzoite를 DMSO에 混合하고 -75℃의 冷藏庫에 保存한 結果 730日間 生存保存이 可能하였다고 記述하였고, 根井⁴에 의하면 1969年度 Paine and Meyer는 組織培養시킨 *Toxoplasma* 原蟲을 7% DMSO에 混合하고, -45℃/45分으로 減速冷却한 것을 液體室素에 凍結保存한 結果 333日以上 生存保存이 可能한 成績을 얻었다고 하였다.

1988年度 全²등은 *Toxoplasma* 原蟲을 DMSO, glycerine, yolk sol.에 各各 混合하고 各其 低速冷却, 減速冷却, 迅速冷却, 急速冷却法을 利用한 8個月間의 凍結保存基礎試驗에서 DMSO의 保護劑와 低速冷却法이 가장 良好한 成績을 보였고, 이 良好한 方法으로 處理한 *Toxoplasma* 原蟲은 5年間의 繼續試驗에서 生存保存이 可能하였다. 따라서 筆者는 1967年度에 日本 農林省 家畜衛生試驗場에서 分讓하여 받은 *Toxoplasma* 原蟲을 mouse

Table 1. Viability of *Toxoplasma gondii* (RH strain) frozen in dimethyl sulfoxide(DMSO)

Years of preservation	Freezing rate to -80℃	Dosage /route	No. of mouse inoculated	Clinical signs after inoculation (days)					Survival of <i>Toxoplasma gondii</i>	
				0	1	2	3	4		5
1	Very slow (-30℃/3hrs.)	0.2ml/ I.P.	4	-*	-	-	1+	2+	3+	+*~+++
2	"	"	4	-	-	-	1+	2+	3+	+ ~+++
3	"	"	4	-	-	-	-	2+	3+	+ ~+++
4	"	"	4	-	-	-	-	1+	3+	+ ~+++
5	"	"	4	-	-	-	-	1+	3+	+ ~+++

* - : Normal, 1+ : Slight, 2+ : Moderate, 3+ : Severe

* - : 0 organism in several field(×400), + : Less than 100 organisms per field

++ : Less than 200 organisms per field, +++ : Less than 300 organisms per field

I.P. : Intraperitoneal

에 3~4日間隔으로 계속 繼代接種하여 왔으나 1987년부터 3年間の 試驗成績에 따라 1991年 1月부터는 凍結保存法만으로 本原蟲을 保存하고 있는 實情이다.

動物接種繼代法을 中斷하고 凍結保存法을 利用한 結果 年間 약 600首의 mouse와 飼料費, 各種 消耗品費의 節減이 적지 않았으며 더욱 3~4日間隔으로 接種繼代하는 雜多한 作業과 動物飼育은 完全히 除去되었을 뿐만 아니라 本原蟲이 人體에 感染될 機會도 매우 減少하게 되었고 또한 5年以上 安全하게 凍結保存이 可能하게 됨에 따라 本病에 대한 各種 試驗研究를 언제든지 누구나 簡便하게 遂行할 수 있게된 것이 매우 多幸이라고 생각된다. 그리고 5年以後의 繼續試驗은 2~3年間隔으로 實施할 豫定이다.

結 論

톡소플라즈마病에 대한 各種 試驗研究를 위한 *Toxoplasma* 原蟲을 長期間 保存하고자 低速冷却法(-30℃/3時間→60℃/1時間→-196℃의 液體窒素)으로 凍結하고 液

體窒素에 5年間 保存시킨 것을 mouse에 接種하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 低速冷却시킨 *Toxoplasma* 原蟲은 液體窒素에 5年間 保存하고 每年 mouse의 腹腔內에 接種한 結果, 接種 후 4~5日間 增殖한 原蟲이 檢出되었다.
2. *Toxoplasma gondii*(RH strain)原蟲은 液體窒素에서 5年以上 生存保存이 可能하였다.

參 考 文 獻

1. 畑中 孝晴 等 39人. 微生物の 長期保存法. 日本 農林水産省 1987 ; p 1~183.
2. 全永, 李榮玉, 金相義, 張桓. 톡소플라즈마原蟲(RH株)의 凍結保存에 關한 研究. 農試論文集(家畜衛生篇) 1988 ; 30(1) : 46~50.
3. 文載鳳. 豚으로부터 *Toxoplasma* 分離, 農試研究報告(家畜衛生篇) 1965 ; 8(3) : 143~160.
4. 根井 外喜男. 微生物の 保存法. 東京大學出版會 第2版. 1977 ; p 1~396.