HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結融解による細菌の酸凝集性の變化について
Author(s)	秋元, 博; AKIMOTO, Hiroshi
Citation	低温科學. 生物篇, 11, 23-45
Issue Date	1954-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17563
Type	departmental bulletin paper
File Information	11_p23-45.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi AKIMOTO 1954 Studies on the Variability in Acid-Agglutination of Bacteria due to Freezing and Thawing. *Low Temperature Science, Ser. B, 11.* (With English résumé p. 45)

凍結融解による細菌の酸凝集性の變化について*

秋　元　　博

(低溫科學研究所　醫學部門)

(昭和28年1月受理)

I. 緒　　言

Hardy が 1905 年蛋白質は兩性体として等電點を有することを明らかにして以來，菌体構成の大部分が蛋白質である細菌体も亦兩性体としてかかる性質を示すことが Michaelis[1] 及び Beniasch[2] により報告された。爾來種々の細菌について檢討された結果，細菌の酸凝集性（等電點現象の1つの）は菌種，菌株，培養條件其の他菌の生理狀態，菌液調製時の處理條件及び緩衝液の種類等により異なつた成績を示すことが知られている[3]。特に細菌の生理狀態，就中菌液中の生菌と死菌の割合と酸凝集性との關係について檢討されたものに青木の所見などがある[4]。

一方細菌は種々の物理的乃至化學的外因によつていろいろの程度の障害を受けるものであるが，低溫處理に伴なう凍結及び融解なる現象によつても亦幾多の障害を受けることは既に周知の事實である。然も冷却の條件，融解の條件によつて細菌の障害度が種々に左右されることも，幾多の實驗成績から實證されている處であるが，その成績は報告者によつて必ずしも一致していない。從つて凍結融解によつて細菌が障害される機構についても諸多の說明が異なつた假說に基づいて下されている現狀である。[5)~9)]

吾々教室同人は低溫條件下で微生物が蒙る影響について種々の角度から檢討を試み，特に微生物の受ける影響がいかなる機序に基づくものであるかを究明しつつあるが[7),8)] 著者はその一連の實驗中の一部を擔當し，たまたま細菌の酸凝集性が菌液の凍結融解によつて變化する事實をみとめた。そこで種々の凍結條件での菌の障害と酸凝集性との關係をしらべると共に，凍結融解菌液の酸凝集性を支配する因子の追究を試み，更に進んで他の 2, 3 の方法によつて菌が障害される場合の酸凝集性と比較檢討することによつて凍結融解による菌障害の機序を知りたいと考え本實驗を行つたものである。

---

* 北海道大學低溫科學研究所業績　第 241 號
なお本研究の一部は文部省科學研究費の補助によつて行われたものである。その要旨は昭和 26 年 3 月及び 12 月の日本細菌學會北海道支部大會に於て發表した。

II. 實驗方法

1. 實驗材料 Escherichia coli と Staphylococcus aureus (寺島株) の兩菌を用いた。グラム陽性菌と陰性菌，或いは球菌と桿菌という意味でこの兩菌を選んだのである。ともに 37°C, 24 時間培養の菌苔を滅菌蒸溜水で 1 回遠心洗滌し，蒸溜水で約 100 mg/cc の濃度の菌浮游液として實驗に供した。蒸溜水を用いた理由は凍結或いは酸凝集反應に關與する條件をなるべく簡單にするためである。

2. 冷却及び融解の方法 冷却速度及び冷却溫度を夫々變えて凍結させた。即ち緩慢凍結には菌液 1.0 cc を直徑約 2.0 cm，厚さ約 1.0 mm，高さ 15.0 cm の平底ガラス管に入れ，更に直徑約 4.0 cm の 2 重管を被せて −35°C の $CaCl_2$-brine に浸し，急速冷却の場合は菌液を入れたガラス管を直接ブライン中に浸した。更に急速且低溫の冷却を行うためには液体空氣 (約−180°C) を用い，その中に直接浸した。

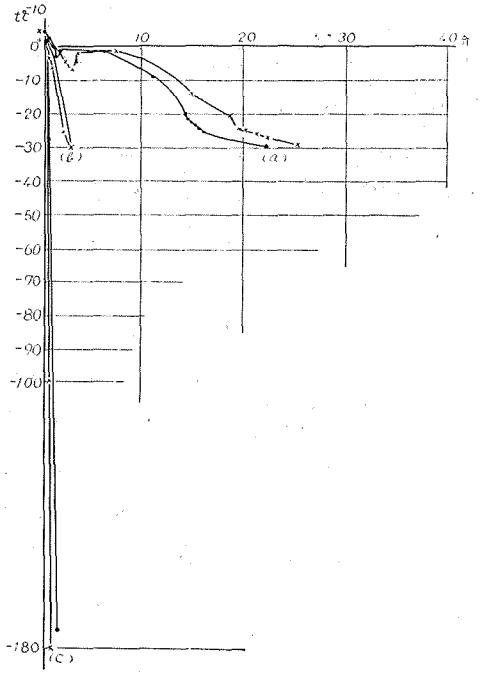
融解は一律に 37°C 恒溫水浴中で行つた。

3. 酸凝集反應 a) 緩衝液，MacIllvaine 緩衝液を用い pH 2.0 から pH 6.0 迄 0.5 間隔の pH 系列を調製した。pH の檢定は「アンチモン—甘汞」電極及び Lead-Northrop potentiometer を用いた。

b) 反應術式，凝集反應用試驗管に緩衝液 0.5 cc と菌液 0.5 cc を混和し直ちに充分振盪して 37°C 恒溫槽內に 3 時間靜置する。後取り出し 1 夜室溫に放置後凝集沈澱の有無を觀察した。

c) 成績判定 菌体が凝集沈澱し上層部が全く透明なものは (卅) とし，凝集塊が透明層に猶浮游しているものを (廿) とし，沈澱を認めるが上層部僅かに不透明であるもの (+)，對照に比し僅かに沈澱の認められるものを (±) として反應程度を記載した。

4. 生菌數の測定 一定稀釋後平板寒天注加



第 1 圖 冷却曲線

第 1 表 冷却速度

+5°C～−5°C 間の溫度降下を min で表わした

	E. coli	Staphylococcus
(a) 緩慢凍結	約 1°C	約 0.7°C
(b) 急速凍結	約 9°C	約 8°C
(c) 液体空氣凍結	約120°C	約120°C

培養24時間後生ずる集落數より算定した。

III. 實驗成績

凍結の條件を正確に知るために，菌液の冷却過程の溫度變化を測定した。それには銅—コンスタンタン熱電對の尖端を菌液の中央部に挿入し，反照檢流計を用いて溫度を記錄した。その冷却曲線は第1圖に示す通りである。冷却速度は凡そ緩慢凍結で1°C/min，急速凍結で10°C/min，液体空氣凍結で120°C/minであつた。

1. 凍結融解による細菌の障害と酸凝集性について

1) 冷却速度を變えた場合（第2表參照）

a) 大腸菌：對照正常菌液ではpH 2.0，2.5及びpH 4.0，4.5の2つの領域に凝集を認め，特にpH 4.0，4.5に著明であるが，−30°Cまでの緩慢並びに急速凍結融解菌液ではpH 4.0 4.5の凝集が弱くなり，逆にpH 2.0〜2.5の凝集が強くなつた。この時の菌の死滅率は凡そ10%及び18%であつた。液体空氣凍結では死菌は凡そ20〜30%となりpH 4.0〜4.5の凝集性は全く失われてpH 2.0〜2.5の凝集が更に著明となつた。

b) ブドウ球菌：對照正常菌液の酸凝集はpH 2.0と2.5にみられpH 2.0が著明である。−30°Cまでの緩慢並びに急速凍結融解では約10%及び20%の菌障害を認め酸凝集の反應域はpH 3.0まで擴大された。液体空氣凍結では菌の死滅は約30%に達し凝集性もpH 3.0〜3.5まで擴大され，しかも一般に反應が強くなつた。

2) 菌液の到達溫度を變えた場合

第2表　種々な冷却速度の影響（−30°まで冷却）

1) 大腸菌

No.	冷却條件	酸凝集反應 pH										生菌數/cc		死滅率
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	×10⁷	×10⁸	%
I	對照	−	−	+	−	−	++	+	−	−	−		105	0
	緩慢凍結	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−		104	9.5
	急速凍結	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−		84.5	19.6
	液体空氣凍結	−	+	++	±	−	−	−	−	−	−		74.5	28.6
II	對照	−	+	+	±	−	+++	++	−	−	−	118		0
	緩慢凍結	−	+	++	+	±	+	+	−	−	−	104		10.0
	急速凍結	−	+	++	±	−	+	+	−	−	−	96.6		18.6
	液体空氣凍結	−	+++	++	±	−			−	−	−	81.0		23.0
III	對照	−	+	+	±	−	+++	++	−	−	−	314		0
	緩慢凍結	−	+++	+++	−	−	++	+	−	−	−	274.5		13.6
	急速凍結	−	+++	+++	−	±	±	±	−	−	−	271		15.0
	液体空氣凍結	−	+++	+++	±	−	−	−	−	−	−	205		35.7

2) ブドウ球菌

No.	冷却條件	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁸/cc	死滅率 %
I	對照	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−	126	0
	緩慢凍結	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	118	11.5
	急速凍結	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	101.3	19.6
	液体空氣凍結	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	−	98.0	25.3
II	對照	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−	126.0	0
	緩慢凍結	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	115	8.4
	急速凍結	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	105	17.3
	液体空氣凍結	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	−	88.5	29.6
III	對照	−	+++	±	−	−	−	−	−	−	−	358	0
	緩慢凍結	−	+++	±	±	−	−	−	−	−	−	308	14.0
	急速凍結	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−	294	17.9
	液体空氣凍結	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−	226	35.9

液体空氣を用い冷却速度は同一であるが，最終の到達溫度の異なる菌液について實驗した。即ち數本の試料を用意し，夫々同一速度で凍結を行ない所定溫度に達したならば直ちに融解せしめて比較した所第3表に示す成績を得た。

第 3 表 種々な到達溫度に依る影響

1) 大腸菌

No.	到達溫度	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁷/cc	死滅率 %
I	對照	−	++	++	±	−	+++	+++	−	−	−	1276	0
	− 5°C	−	+++	++	+	±	+	++	−	−	−	1243	2.6
	− 28	−	+++	++	+	−	+	+	−	−	−	1080	17.0
	− 69	−	+	++	+	±	−	−	−	−	−	998	22.0
	約− 90	−	+	++	+	+	−	−	−	−	−	948	25.7
	約−160	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	907	29.0
	約−180	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	921.5	27.8
II	對照	−	++	++	+	−	+	−	−	−	−	140	0
	− 5°C	−	+++	+++	+	−	+	−	−	−	−	138	2.4
	− 25	−	++	++	+	±	±	−	−	−	−	113	24.0
	− 44	−	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−	100	28.6
	約− 80	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	101	28.7
	約−100	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	96	31.5
	約−180	−	+++	+++	+	±	−	−	−	−	−	93	33.5

2) ブドウ球菌

No.	到達溫度	酸凝集反應 pH										生菌數	死滅率
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	×10⁷/cc	%
I	對照	−	+++	+	±	−	−	−	−	−	−	138	0
	− 5°C	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−	131	5.0
	− 20	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	116	16.0
	− 56	−	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−	106	23.0
	約−100	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	95	31.2
	約−160	−	+++	+++	++	±	−	−	−	−	−	92	33.0
II	對照	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	226	0
	− 32°C	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	181	20.0
	− 74	−	+++	+	+++	−	−	−	−	−	−	170	25.0
	約−170	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	158	30.0
	約−180	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	161	28.5

a) 大腸菌； −5°C, −28°C 迄の冷却では菌生殘率は 95%, 84% で，凝集性は對照と大差なく pH 4.0～5.0 で僅に弱く，pH 2.0～3.0 で僅に強くなるにすぎないが，到達溫度が低くなるに從つて生菌は少なくなり，且 pH 4.0～5.0 の凝集性が消失して，pH 2.0～3.0 が漸次著明になる。

b) ブドウ球菌； 生菌の變化は大腸菌とほぼ同樣で，溫度が低くなるに從つて生菌數が減少する。凝集性も pH 2.0～2.5～3.5 に亘つて強く現われるようになつた。

3) 凍結融解を反覆した場合

以上の實驗から液体空氣凍結が細菌に對する障害の最も大きいことが分つた。今回は更に液体空氣による凍結を反覆してみた。その結果は第4表 イ), ロ) に示す通りである。

a) 大腸菌； 凍結融解1回では前實驗と全く同一成績で生菌は約 30% の減少を來し，pH 2.0～3.0 で強い凝集性を示した。次に2回目では菌の減少は約 50% に達し，凝集は pH 4.0 にも僅に認められた。回を重ねるにつれ pH 2.0～3.5 乃至 4.0 にほぼ同程度の凝集を示し，かなり廣い範圍の凝集帶を形成する。同時に死菌は約 50% から 70% まで漸次增加した。

又別の實驗で凍結融解 10 回目と 5 回目を比較すると死菌は約 50% から約 80～90% となつても酸凝集性は著明な變化を來たさなかつた。

b) ブドウ球菌； 凍結融解1回では pH 2.0～2.5 の他に pH 3.0 にやや強い凝集性を示し，この時の死菌は約 25% であつた。以後反覆回數を增すに從い pH 2.0～3.5 に亘つて強く凝集するようになり，一方死菌も凡そ 30% から 50% まで增加した。更に死菌が 70% 以上に增加しても酸凝集性は著明な變化を來さなかつたことは大腸菌の場合と同樣である。

第 4 表 (イ) 凍結融解を反覆した場合に認められる影響 (A)

1) 大 腸 菌

No.	凍融回數	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁷/cc	死滅率 %
I	對照	−	+	+	−	+	+	+	−	−	−	175	0
	1 回	−	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−	120	29.4
	2 〃	−	+++	+++	+++	−	+	−	−	−	−	84	50.1
	3 〃	−	+++	+	++	+	−	−	−	−	−	85	50.0
	4 〃	−	+++	+++	+++	++	+	−	−	−	−	55	67.8
	5 〃	−	+++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	44	74.5
II	對照	−	+	++	−	+	+++	+	±	−	−	127.5	0
	1 回	−	+++	+++	±	−	−	−	−	−	−	105.2	17.8
	2 〃	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	83.2	35.5
	3 〃	−	+++	++	±	−	−	−	−	−	−	62.4	52.0
	4 〃	−	+++	+++	++	++	−	−	−	−	−	50.4	61.0
	5 〃	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	49.0	62.0
III	對照	−	+	++	+	±	+	±	−	−	−	140	0
	1 回	−	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−	97	30.6
	2 〃	−	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	−	77	45.0
	3 〃	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−	72	48.5
	4 〃	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−		
	5 〃	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	48	66.0

2) ブドウ球菌

No.	凍融回數	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁷/cc	死滅率 %
I	對照	−	+++	++	−	−	−	−	−	−	−	49.5	0
	1 回	−	+++	++	±	−	−	−	−	−	−	36.0	27.2
	2 〃	−	+++	++	++	+	−	−	−	−	−	31.0	39.4
	3 〃	−	+++	++	+	++	−	−	−	−	−	26.5	47.3
	4 〃	−	+++	++	++	+++	−	−	−	−	−	22.5	54.8
	5 〃	−	+++	+	++	+++	+	−	−	−	−	19.0	61.5
II	對照	−	+++	++	−	−	−	−	−	−	−	497	0
	1 回	−	+++	++	±	−	−	−	−	−	−	397	20.2
	2 〃	−	+++	+++	++	±	−	−	−	−	−	379	23.8
	3 〃	−	+++	++	+++	+	−	−	−	−	−	344	30.9
	4 〃	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	281.5	43.5
	5 〃	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	264.5	46.5
III	對照	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	504	0
	1 回	−	+++	+	++	+	−	−	−	−	−	231.5	32.0
	2 〃	−	+++	+	++	++	−	−	−	−	−	376	33.5
	3 〃	−	+++	+	+	+	−	−	−	−	−	308	36.5
	4 〃	−	+++	++	++	++	−	−	−	−	−	241.5	44.8
	5 〃	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	206.0	55.0

第 4 表 (ロ) 凍結融解を反覆した場合に認められる影響 (B)

1) 大 腸 菌

No.	凍融回數	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁸/cc	死滅率 %
I	對照	--	++	++	±	−	−	±	±	−	−	121	0
	5 回	−	+++	++	+++	++	−	−	−	−	−	55.5	54.0
	10 〃	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	37	69.4
II	對照	−	++	++	+	−	+	+	−	−	−	76	0
	5 回	−	++	+++	+++	++	+	−	−	−	−	30	60.5
	10 〃	−	+++	+++	+++	++	+	−	−	−	−	12	84.2
III	對照	−	++	++	+	−	+	+	−	−	−	76	0
	5 回	−	+++	+++	+++	++	+	−	−	−	−	27	64.2
	10 〃	−	+++	+++	+++	+	+	±	−	−	−	20.5	73.0

2) ブ ド ウ 球 菌

No.	凍融回數	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁸/cc	死滅率 %
I	對照	−	±	±	−	−	−	−	−	−	−	362.5	0
	5 回	−	+++	+++	+++	±	−	−	−	−	−	196	45.9
	10 〃	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	117.5	66.7
II	對照	−	++	±	−	−	−	−	−	−	−	50.5	0
	5 回	−	+++	+++	+++	±	+	−	−	−	−	26.5	48.0
	10 〃	−	+++	+++	+++	++	+	−	−	−	−	14	73.0
III	對照	−	++	+	−	−	−	−	−	−	−	105	0
	5 回	−	+++	+++	+++	+	+	−	−	−	−	54	48.7
	10 〃	−	+++	+++	++	++	±	−	−	−	−	33	68.7

2. 凍結融解菌液の酸凝集性の檢討

以上の實驗から凍結融解によつて菌の障害が大きくなるに從つて酸凝集性が變化し，pH 2.0 −3.5 乃至 4.0 迄の凝集帶を形成することがわかつた。かかる酸凝集性の變化が如何なる因子に基づくものであるかを檢討するために，液体空氣凍結融解を 5 回行つた菌液を用い更に第 5 表のような實驗を試みた。

1) 凍結融解後の菌液 pH 及び菌体の染色による形態的所見 (第 5 表參照)。

兩菌浮游液は凍結融解 1 回，2 回後ではその pH は殆んど差がなく，對照正常菌液の pH を示すが，回を重ね前實驗の如く死菌が 50% くらいになるに從い 0.1〜0.3 くらいの pH の低下を認めた。又 Löffler's methylene blue の染色による鏡檢所見では對照菌或いは 100°C 30 分加

第 5 表 菌浮游液 pH の變化

1) 大 腸 菌

凍融回數	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
對 照	6.15	6.2	6.1
1 回	6.15	6.2	6.15
2 〃	6.2	6.2	6.0
3 〃	6.2	6.1	6.0
4 〃	6.2	6.0	6.0
5 〃	6.2	6.0	5.8

2) ブドウ球菌

凍融回數	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
對 照	6.6	6.6	6.6
1 回	6.5	6.6	6.6
2 〃	6.5	6.6	6.5
3 〃	6.5	6.5	6.5
4 〃	6.6	6.5	6.4
5 〃	6.5	6.4	6.4

熱菌は極めて濃く染色されるが，凍結融解菌は一般に染色性が悪く，時に菌体内部に不染性の部分を認めた。しかし形態的に菌体が特に破壊されているという様子もみられない。

更にギームサ染色を行う場合は兩菌共に對照菌は赤紫色を帶びるに反し，凍結融解菌は深青綠色の明瞭な小顆粒を認めた。

グラム染色では特別な所見を認めなかつた。

2) 凍結融解菌液の遠心上清と沈渣の示す酸凝集性について (第 6 表參照)。

凍結融解菌の酸凝集性の變化を來すものは菌体自身かメヂウムかいずれかの變化に基づくものと考えられるので，處置後の菌液を遠心して上清と沈渣とに分け，上清には正常菌を加え，沈渣には對照菌液上清を加え夫々ほぼ同一濃度の菌液を作り，對照の無處置菌液及び凍結融解菌液の 4 者間の酸凝集性を比較觀察した。まず3000回轉/分 1 時間遠沈を行つて得た上清と沈渣

第 6 表 (イ) 凍融菌液上清と沈渣の示す酸凝集性

1) 大 腸 菌

A.) 3000 回轉/分 1 時間遠沈の場合

No.		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
Ⅰ	對 照	−	±	+	±	±	+	++	−	−	−
	凍 融 菌 液	−	+	+++	+++	+	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	−	±	−	±	+	++	±	−	−
	上 清＋正常菌	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−
Ⅱ	對 照	−	+	+	−	−	+	++	±	−	−
	凍 融 菌 液	−	++	+++	++	+	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	−	+	−	−	+	++	−	−	−
	上 清＋正常菌	−	++	+++	+++	+	−	−	−	−	−
Ⅲ	對 照	−	±	±	−	−	±	++	±	−	−
	凍 融 菌 液	−	+++	+	+	±	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	±	−	+	+	±	−	−	−	−
	上 清＋正常菌	−	+++	+++	+++	±	+	±	−	−	−

2) ブドウ球菌

A) 3000 回轉/分 1 時間遠沈の場合

No.		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
I	對照	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−
	凍融菌液	−	++	+++	+++	++	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−
	上清＋正常菌	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	−
II	對照	−	±	+	±	−	−	−	−	−	−
	凍融菌液	−	++	++	+	−	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	++	+	±	−	−	−	−	−	−
	上清＋正常菌	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	−
III	對照	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
	凍融菌液	−	+++	+++	+++	±	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	++	+	−	−	−	−	−	−	−
	上清＋正常菌	−	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−

に就いて酸凝集性を觀察すると，凍融菌液上清に正常菌を加えたものが凍融菌液自体と，又沈渣に正常菌液上清を加えたものが對照正常菌液と同じ酸凝集性を示した。しかもかかる所見は大腸菌，ブドウ球菌のどちらにも認められた。更に回轉數を増して 6000 回轉とし，肉眼的に全く透明な上清を得ても (3000 回轉ではやや溷濁不透明であるが) 同様の所見が得られた。

第 6 表 (ロ)　凍融菌液上清と沈渣の示す酸凝集性

1) 大腸菌

B) 6000 回轉/分 1 時間遠沈の場合

No.		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
I	對照	−	+	+	±	−	+	++	+	−	−
	凍融菌液	−	+++	+++	+++	++	+	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	+	−	−	±	+	±	−	−	−
	上清＋正常菌	−	+++	+++	+++	±	±	−	−	−	−
II	對照	−	±	±	−	±	±	±	−	−	−
	凍融菌液	−	++	+	±	−	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−
	上清＋正常菌	−	++	+	+	±	±	−	−	−	−
III	對照	−	+	+	−	±	+	−	−	−	−
	凍融菌液	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−
	沈渣＋正常菌液上清	−	+	++	−	−	±	−	−	−	−
	上清＋正常菌	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−

2) ブドウ球菌

B) 6000回轉/分1時間遠沈の場合

No.		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
I	對照	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	凍融菌液	−	++	+++	+++	+++	+	+	−	−	−
	沈渣+正常菌液上清	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	上清+正常菌	−	++	+++	+++	+	±	−	−	−	−
II	對照	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	凍融菌液	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−
	沈渣+正常菌液上清	−	±	+++	−	−	−	−	−	−	−
	上清+正常菌	−	+++	+++	+++	±	−	−	−	−	−
III	對照	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	凍融菌液	−	+++	++	++	+	±	−	−	−	−
	沈渣+正常菌液上清	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−
	上清+正常菌	−	+++	+++	++	+	±	−	−	−	−

3) 凍結融解菌液上清を稀釋した場合の酸凝集性について

2) の實驗から凍融液上清が酸凝集性の變化に關與するものと考えられるのでこの點を更に追究する目的で引續き實驗を進めた。

即ち第7表に示す通りで，3倍及び10倍稀釋上清に正常菌を加えたものは凍結融解菌液自身の酸凝集性，即ちpH 2.0～3.5乃至4.0迄の凝集帶を示したが，100倍稀釋上清の場合はpH

第7表 凍結融解菌液上清を稀釋した場合の酸凝集性

1) 大腸菌

		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	+++	++	±	−	−	−	−	−	−
凍融菌液		−	++	+++	+++	++	±	−	−	−	−
凍融上清+正常菌		−	+++	+++	+++	++	±	−	−	−	−
I	10倍上清+正常菌	−	+++	+++	++	+	±	−	−	−	−
	100 〃 〃	−	+++	++	+	±	−	−	−	−	−
	1000 〃 〃	−	+++	++	±	−	−	−	−	−	−
II	10倍上清+正常菌	−	+++	+++	+++	++	±	−	−	−	−
	100 〃 〃	−	++	++	++	+	−	−	−	−	−
	1000 〃 〃	−	+++	++	±	±	−	−	−	−	−
III	10倍上清+正常菌	−	+++	+++	+++	++	±	−	−	−	−
	100 〃 〃	−	+++	++	+	±	−	−	−	−	−
	1000 〃 〃	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−

2) ブドウ球菌

		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	+	±	−	−	−	−	−	−	−
凍融菌液		−	+++	++	+++	++	+	−	−	−	−
凍融上清＋正常菌		−	+++	+++	+++	+	++	−	−	−	−
I	10倍上清＋正常菌	−	+++	+++	+++	+	+				
	100 〃 〃	−	+++	++	+	−	+	−	−	−	−
	1000 〃 〃	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
II	10倍上清＋正常菌	−	++	+++	++	+	+	−	−	−	−
	100 〃 〃	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−
	1000 〃 〃	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
III	10倍上清＋正常菌	−	+++	+++	+++	+	+	−	−	−	−
	100 〃 〃	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−
	1000 〃 〃	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−

第 8 表　大腸菌，ブドウ球菌の凍結融解上清を交叉的に他菌に加えた場合の酸凝集性

1) 大腸菌

		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	±	+++	−	+	+	±	−	−	−
凍結融解菌液		−	+++	+++	+++	++	++	−	−	−	−
ブドウ球菌凍融上清＋大腸菌正常菌	I	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	−
	II	−	+	+++	+++	−	−	−	−	−	−
	III	−	+	++	++	−	−	−	−	−	−

2) ブドウ球菌

		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	+	±	−	−	−	−	−	−	−
凍結融解菌液		−	+++	+++	++	±	±	−	−	−	−
大腸菌凍融上清＋正常ブドウ球菌	I	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−
	II	−	++	+++	+++	+++	++	−	−	−	−
	III	−	++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−

3.0～4.0 の凝集は弱くなり 1000 倍稀釋上清では對照の正常菌液の示す酸凝集性とほぼ一致するようになつた。かかる所見も亦大腸菌，ブドウ球菌の兩者共に同様に認められた。

4) 大腸菌，ブドウ球菌の兩菌凍結融解菌液上清を兩菌々体に交叉的に加えた場合の酸凝集性について

大腸菌の凍融菌液上清を正常ブドウ球菌に，又ブドウ球菌の凍融菌液上清を正常大腸菌に，夫々加えて菌液の酸凝集性を比較した。その結果は第8表に示す通り，正常ブドウ球菌は大腸菌の凍融菌液上清を加えられると，大腸菌の凍融菌液と同様の凝集性を示し，又逆に正常大腸菌はブドウ球菌凍融液上清を加えられると，ブドウ球菌の凍融菌液と同様の凝集性を示した。

5) 凍結融解菌液上清中の酸凝集性に及ぼす因子の吟味

上述の實驗から凍結融解菌の酸凝集性は菌体自身よりもむしろ菌体を除いた部分によつて左右されることが確認されるに至つた。ところで凍結融解の際に用いた菌液のメヂウムは蒸溜水であるから，その遠心上清中に含まれるものはすべて菌体成分に由來するものである。(6000回轉/分1時間の遠心上清であるから微細な菌体の破片も含まれているかもしれない) しかも細菌体の化學的な菌体構成成分としては多くのものがあげられるがその中酸凝集反應に關與すると考えられるところの2,3の物質について檢討を試みた。

A) 凍融菌液上清を透析した場合

先ず上清内に種々の鹽類の存在することが考えられるので，蒸溜水で2日間透析を行い，透析前の上清と比較した。即ち第9表に示す通り透析後の上清は透析前の上清と同一の酸凝集性を示したので，上清中に含まれる程度の鹽類では酸凝集性に殆ど影響しないことが認められた。

第9表 凍融菌液上清の透析による影響

1) 大 腸 菌

		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	++	+	−	−	+	++	−	−	−
上清＋正常菌		−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−
透析上清＋正常菌	Ⅰ	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−
	Ⅱ	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−
	Ⅲ	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−

2) ブ ド ウ 球 菌

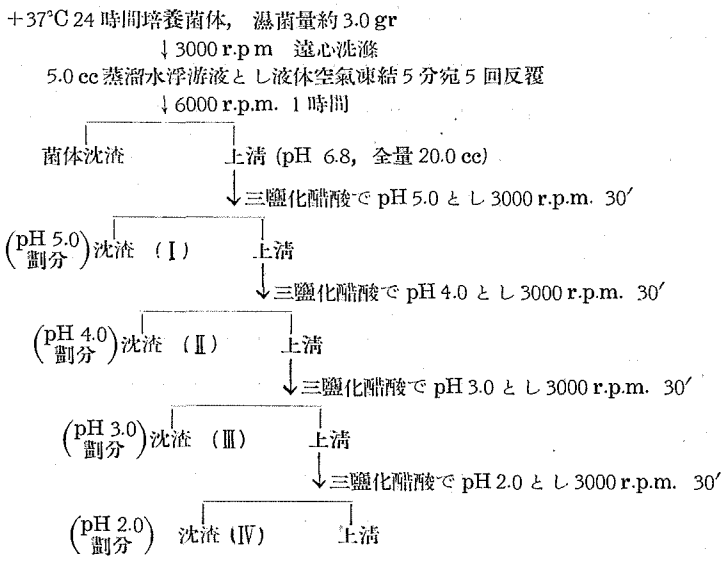
		pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	+	±	−	−	−	−	−	−	−
上清＋正常菌		−	+++	+++	++	++	±	−	−	−	−
透析上清＋正常菌	Ⅰ	−	++	+++	+++	++	+	−	−	−	−
	Ⅱ	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−
	Ⅲ	−	+++	+++	+	+	±	−	−	−	−

B) 凍融菌液上清の濾紙クロマトグラフに就いて

菌体構成成分の大部分を占めるものは蛋白質及び蛋白複合体であることから，上清中にもこれ等の物質が多く含まれることが考えられる。此の事實を確かめるため本學醫學部第一生理學教室中村助教授に依頼し凍結融解液上清のペーパークロマトグラフを分析した。その結果多量の蛋白質成分の存在を認めたが對照の正常菌液上清で此の方法による蛋白成分の存在は認められなかつた。更に凍融菌液上清を 70% アルコールを用い，冷所で蛋白質を沈澱除去し，2次元法でアミノ酸を檢した結果兩菌共に，ロイシン，メチオニン，プロリン，メチールズルホチサイド？，グルタミン？，タウリン，グルタミン酸，アスパギラン酸，システイン酸の9種のアミノ酸を檢出し得た。

C) 凍結融解菌液上清中の酸性沈澱分劃の分離とそれらの物質の酸凝集性に及ぼす影響について

凍融菌液上清を三鹽化醋酸を用い次の要領で酸沈物質を得た。



かくして得た4劃分を pH 7.0 乃至 6.0 に戻し，蒸溜水で透析すること2日後，凍結乾燥を行い各劃分の乾燥量を測定した所 (I) 劃分 10.980 mg，(II) 劃分 15.525 mg，(III) 劃分 4.27 mg，(IV) 劃分 0.145 mg であつて pH 4.1 以上で沈澱する物質が最も多量であつて，これらの分劃に蒸溜水を加え原上清量とし，更にそれらの液に正常菌体を加えて酸凝集性を檢した結果は第10表(イ)，(ロ)に示す通りである。

第10表（イ） 凍結融解菌液上清の酸性沈澱劃分の示す酸凝集性

1) 大 腸 菌

	pH									
	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−
凍結融解菌液	−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−
凍結融解上清＋正常菌	−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−
上清の酸性沈澱	−	±	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−

各劃分稀釋倍數		3 倍										10 倍										100 倍									
		pH																													
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
I	對照	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−	+	⧺	±	−	+	±	−	−	−	−	+	⧺	±	−	+	±	−	−	−
	全液	−										−	⧺	⧺	⧺	⧺	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−
	5.0劃分	−	⧺	⧺	⧺	⧺	±	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	±	−	−	−	−	−	⧺	+	⧺	+	+	−	−	−	−
	4.0 〃	−	±	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−
	3.0 〃	−	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	−	−	−	−	−	−
	2.0 〃	−	⧺	⧺	⧺	±	−	−	−	−	−	−	⧺	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	±	−	−	−	−	−	−
II	對照	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	+	±	−	−	−
	全液	−										−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−
	5.0劃分	−	⧺	⧺	⧺	+	±	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	±	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	−	−
	4.0 〃	−	−	+	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	±	−	−	−	−
	3.0 〃	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	⧺	+	⧺	−	−	−	−	−	−
	2.0 〃	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	+	±	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
III	對照	−	⧺	⧺	±	−	−	−	−	−	−	−	+	+	±	−	+	±	−	−	−	−	+	⧺	±	−	+	±	−	−	−
	全液	−									−		⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	−	−
	5.0劃分	−	⧺	⧺	⧺	+	±	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	±	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	−	−
	4.0 〃	−	−	+	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	−	−
	3.0 〃	−	⧺	⧺	+	±	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	+	−	−	−	−	−	−
	2.0 〃	−	⧺	⧺	+	±	−	−	−	−	−	−	⧺	⧺	⧺	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−

第10表（ロ）　凍結融解菌液上清の酸性沈澱劃分の示す酸凝集性

2）ブドウ球菌

	pH									
	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照	−	++	+	±	−	−	−	−	−	−
凍結融解菌液	−	+++	+++	+++	+	+	−	−	−	−
凍結融解上清＋正常菌	−	+++	+++	+++	+	+	−	−	−	−
上清の酸性沈澱	−	++	++	++	+++	+	−	−	−	−

各劃分稀釋倍數		3倍										10倍										100倍									
		pH										pH										pH									
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
I	對照	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−
	全液											−	++	+++	+	++	±	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−
	5.0劃分	−	+++	+++	+++	+++	+	±	−	−	−	−	++	++	+++	++	−	−	−	−	−	−	++	+++	++	±	−	−	−	−	−
	4.0 〃	−	+++	+++	+++	+++	+	±	−	−	−	−	++	+++	+++	++	+	±	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−
	3.0 〃	−	±	+	+	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−
	2.0 〃	−	+	+	±	−	−	−	−	−	−	−	±	+	−	−	−	−	−	−	−	−	++	+++	+	−	−	−	−	−	−
II	對照	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
	全液											−	+	++	+++	++	±	−	−	−	−	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−
	5.0劃分	−	++	+++	+++	+++	±	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−
	4.0 〃	−	+++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	++	±	−	−	−	−	+	++	+++	++	−	−	−	−	−
	3.0 〃	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−
	2.0 〃	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	±	−	−	−	−	−	−	−	++	−	−	−	−	−	−	−	−
III	對照	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
	全液											−	++	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	+++	++	++	+	−	−	−	−	−
	5.0劃分	−	+++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	++	++	++	+	−	−	−	−	−	−	++	++	+	±	−	−	−	−	−
	4.0 〃	−	+++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	+	++	+++	++	+	−	−	−	−
	3.0 〃	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−
	2.0 〃	−	+	+	±	−	−	−	−	−	−	−	+	±	±	−	−	−	−	−	−	−	+	±	±	−	−	−	−	−	−

a) 大 腸 菌： 少量の菌液と異なり，今回のごとく大量の場合は對照の正常菌液でpH 2.0～3.0に著明な凝集を示した。凍融菌液上清を劃分に分ける前に緩衝液の系列に加えるとpH 2.0～4.5に亘つて酸沈することを認め，特にpH 3.0～4.0に著明であることから，上清中にこれらの物質が極めて多量に含まれていることが分る。更に採取した此の4劃分は第10表の如く，(I)乃至(II)劃分に正常菌体を加えた場合にはpH 2.0からpH 3.5乃至4.0迄の酸凝集帶を形成し，(III)及び(IV)劃分は僅かにpH 2.0～3.0間に凝集するのを認めた。

次に4劃分液を等量宛混和し正常菌体を加えた場合には凍融菌液及び凍融菌液上清に正常菌体を加えた場合の酸凝集性と類似した所見を示した。此の際各劃分を10倍に稀釋してもその酸凝集性は殆んど變化せず，100倍稀釋上清劃分を用いた場合，混和したものも，夫々の劃分のものも僅かにpH 3.0～4.0間變化することが認められるに過ぎなかつた。

b) ブドウ球菌： 對照の正常菌液がpH 2.0～3.0に凝集を示すことは今迄の實驗と同様である。此の凍融菌液上清を分劃前に1系列の緩衝液に混入するとpH 2.0～4.0，特にpH 2.0～3.5に著明に酸沈が惹起されることを認めた。次に前述の如くして得た4劃分は大腸菌の場合と全く同様で(I)及び(II)劃分がpH 2.0～4.0の間に凝集を示し，100倍稀釋でも變化が少ない。又4劃分の等量宛混和したものは凍融菌液及び凍融液上清の示す酸凝集性を示した。

之を要するに酸凝集帶形成に關與するものはpH 4.0附近以上のpHで酸性沈澱する物質によるものと考えられる。

D) 酸凝集生成機轉に就いて

兩菌液共に原上清と同量の蒸溜水に溶解した各劃分液を1系列の緩衝液に混入すると(II)劃分のみがpH 3.5～4.5に酸沈を示し，4劃分液を稀釋した場合はいずれも酸沈を示さない。これは上清内物質が菌体に吸着して，酸沈を生ずるために菌液の酸凝集性を變ずるという考えと相反する。

3. 他の致死的處理による細菌の酸凝集性について

凍結融解によるのと同程度に菌の障害を起すような處置を行つた場合の酸凝集性を觀察し，凍融菌の場合と比較した。

1) 加熱による酸凝集性の變化について

a) 大 腸 菌： 凡そ90 mg/ccの蒸溜水浮游液を52°C±1°Cの温水に浸し，10分から120分まで時間を追つて觀察した所，第11表に示すごとく菌の死滅率は凡そ45%から92%まで增加するのに，酸凝集の反應域はあまり變らず，ただpH 2.0～2.5の凝集の強くなることが認められた。また死菌（100°C 120分加熱）ではpH 2.0～2.5に僅かに凝集が認められるに過ぎず，このような所見は凍結融解でみられるものとはかなり異なつている。

b) ブドウ球菌： 48～45°Cの10分から120分までの加熱で，死菌は凡そ50～98%となるが，酸凝集の反應は對照と比較して漸次弱くなり，且つ反應域が狹くなつている。なお100°C 120分加熱死菌では大腸菌同様pH 2.0で僅かに凝集がみられるにすぎない。

第11表　加温菌の酸凝集性と生菌數

1) 大腸菌　+52°C～+53°C 加温

No.	時間(分)	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁷/cc	死滅率 %
I	對照	−	−	+	±	±	++	+	−	−	−	213	0
	10	−	+++	+++	−	+	+	±	−	−	−	125	40.8
	20	−	+++	+++	−	+	+	+	−	−	−	114	47.5
	30	−	+++	+++	−	−	+	±	−	−	−	85	59.3
	60	−	+++	+++	+	−	−	±	−	−	−	52.5	75.5
	120	−	+++	+++	−	−	+	±	−	−	−	27	87.2
II	對照	−	+++	+	+	−	++	+	−	−	−	431	0
	10	−	−	+++	−	+	+	±	±	−	−	249	50.5
	20	−	+++	+++	−	+	+	+	−	−	−	168	61.2
	30	−	+++	+++	−	−	+	−	−	−	−	117	73.0
	60	−	+++	+++	+	−	−	±	±	−	−	74	83.0
	120	−	+++	+++	+	−	−	±	±	−	−	18	96.0
III	對照	−	−	+	−	−	++	+	−	−	−	420	0
	10	−	+++	+++	−	+	+	±	−	−	−	233	44.2
	20	−	+++	+++	−	+	+	+	−	−	−	184	56.4
	30	−	+++	+++	−	−	+	−	−	−	±	145	65.5
	60	−	+++	+++	+	−	−	±	−	−	−	98.5	76.6
	120	−	+++	+++	−	−	+	±	−	−	−	23	92.0
IV	100°C 120分	−	±	+	−	−	−	−	−	−	−	0	0

2) ブドウ球菌　+45°C～+48°C 加温

No.	時間(分)	酸凝集反應 pH C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	生菌數 ×10⁷/cc	死滅率 %
I	對照	−	+++	+	±	−	−	−	−	−	−	147	0
	10	−	++	±	±	−	−	−	−	−	−	66	54.5
	20	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	47	67.2
	30	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	34.5	75.0
	60	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−	18.5	87.0
	120	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	6.0	95.2
II	對照	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	−	158	0
	10	−	+++	+	+	−	−	−	−	−	−	79	50.0
	20	−	+++	±	+	−	−	−	−	−	−	58	63.1
	30	−	+++	±	±	−	−	−	−	−	−	42	73.3
	60	−	+++	±	−	−	−	−	−	−	−	18	89.9
	120	−	+++	±	−	−	−	−	−	−	−	2	99.0
III	對照	−	+++	+	±	−	−	−	−	−	−	234	0
	10	−	+++	±	±	−	−	−	−	−	−	119	49.9
	20	−	+++	+	±	−	−	−	−	−	−	99	68.7
	30	−	+++	±	−	−	−	−	−	−	−	71.5	70.1
	60	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	23	89.5
	120	−	+++	±	−	−	−	−	−	−	−	4	99.0
IV	100°C 120分	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	0	0

2)　自家融解による酸凝集性の變化について

蒸溜水浮游菌液を 37C° 孵卵器中に 1～2 晝夜靜置すると兩菌共に約 50～90% まで死滅する。かかる自家融解菌液の酸凝集性は pH 2.0 から pH 4.5 乃至 5.0 に達する可成り廣い pH 域に亘つてみとめられた。此の菌液を 6000 回轉/分 1 時間遠心して，上清と沈渣に分けると，此の上

第12表 自家融解菌の酸凝集性と生菌數
(該菌上清と沈査の酸凝集性)

1) 大 腸 菌

No.		酸凝集反應 pH										生菌數	死滅率
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	×10⁸/cc	%
I	對照	−	++	+	±	−	±	+	−	−	−	102	0
	自家融解菌液	−	+++	+++	+++	++	±	±	−	−	−	52	49.1
	沈渣+正常菌上清	−	+++	++	±	±	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	++	+++	++	+++	±	−	−	−	−		
II	對照	−	+	±	−	±	±	±	−	−	−	76.5	9
	自家融解菌液	−	+++	+++	++	+	±	−	−	−	−	37.5	50.9
	沈渣+正常菌上清	−	++	±	+	+	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−		
III	對照	−	+	±	−	+	±	±	−	−	−	165	0
	自家融解菌液	−	+++	+++	++	±	+	+	−	−	−	103	37.0
	沈渣+正常菌上清	−	+++	±	±	−	+	±	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	++	++	+	−	−	−	−	−		
IV	對照	−	++	++	±	+	±	±	−	−	−	74.5	0
	自家融解菌液	−	+++	+++	+++	+++	+	±	+	−	−	11	85.2
	沈渣+正常菌上清	−	+++	+++	++	++	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	+++	+++	+++	+	−	−	−	−		

2) ブドウ球菌

No.		酸凝集反應 pH										生菌數	死滅率
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	×10⁷/cc	%
I	對照	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−	136	0
	自家融解菌液	−	+++	+++	+++	+	−	−	−	−	−	62.5	51.7
	沈渣+正常菌上清	−	+++	+	−	−	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	+++	+++	++	−	−	−	−	−		
II	對照	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−	369	0
	自家融解菌液	−	++	++	+	+	−	−	−	−	−	202.5	45.3
	沈渣+正常菌上清	−	±	±	−	−	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−		
III	對照	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−	369	0
	自家融解菌液	−	+++	+++	++	+	−	−	−	−	−	192.5	48.2
	沈渣+正常菌上清	−	±	±	−	−	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−		
IV	對照	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	71.5	0
	自家融解菌液	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	6.5	91.6
	沈渣+正常菌上清	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−		
	上清+正常菌	−	+++	+++	+++	+++	+	+	±	−	−		

清に正常菌を加えたものは自家融解菌數とほぼ同様の凝集性を示すが，沈渣に正常菌液上清を加えたものは對照の正常菌液に比し pH 2.5～3.5 附近でやや凝集の強くなることがわかつた。

3) ペニシリンで溶菌した場合の酸凝集性の變化について

兩菌をそれぞれ Bouillon に凡そ 60 mg/dl の濃度に接種し，同時にペニシリンを大腸菌は 1000.0 ou/cc，ブドウ球菌は 1.0 ou/cc となるように加え，37°C 恒溫槽での培養過程を逐うて生菌數と酸凝集性を比較してみた。その結果は第 13 表に示す通り，この實驗ではブイヨン，ペニシリン鹽が加わつているためか，對照菌に於て既にその凝集性は蒸溜水浮游液と異なり大腸

第 13 表　ペニシリンによる細菌の酸凝集性と生菌數の影響

1) 大　腸　菌　1000.0 ou/cc

No.	培養時間	酸凝集反應 pH										生菌數	死滅率
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	×10⁷/cc	%
I	對照	−	−	−	+	+	+	++	−	−	−	170	0
	1時間	−	−	−	−	±	+	++	−	−	−	125	26.5
	1½ 〃	−	−	−	−	+	+	++	−	−	−	102	37.7
	2 〃	−	−	−	+	+	++	−	−	−	−	77.5	55.8
	24 〃	−	++	±	±	++	+	±	−	−	−	64	62.5
II	對照	−	−	−	+	+	+	++	−	−	−	234	0
	1時間	−	−	−	−	±	+	++	−	−	−	171	26.9
	1½ 〃	−	−	−	±	+	++	±	−	−	−	141.5	40.0
	2 〃	−	−	−	+	+	++	−	−	−	−	110	53.0
	24 〃	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	72.5	69.1

2) ブドウ球菌　1.0 ou/cc

No.	培養時間	酸凝集反應 pH										生菌數	死滅率
		C:	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	×10⁷/cc	%
I	對照	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	130	0
	1時間	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	101	22.3
	2 〃	−	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	−	92	34.5
	3 〃	−	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	−	64.5	50.5
	4 〃	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	47.5	63.4
	24 〃	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	8.5	93.0
II	對照	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	56	0
	1時間	−	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	48	14.2
	2 〃	−	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	−	42	25.0
	3 〃	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−	24.5	56.4
	4 〃	−	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−	18.0	68.0
	24 〃	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	0	0

第14表 凍結融解による蛋白質の酸凝集性の變化

		ヘモグロビン										カゼイン									
		pH																			
		C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	C.	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
對照		−	−	−	−	−	−	+	++	−		−	−	−	−	−	++	+++	+	+	−
緩慢凍結	Ⅰ	−	−	−	−	−	−	+	++	−	−	−	−	−	−	−	+	+++	+	+	−
	Ⅱ	−	−	−	−	−	−	+	+++	−	−	−	−	−	−	−	++	+++	+	+	−
液体空氣凍結	Ⅰ	−	−	−	−	−	−	+	+++	−	−	−	−	−	−	−	±	+++	+	+	−
	Ⅱ	−	−	−	−	−	−	+	+++	−	−	−	−	−	−	−	++	+++	+	+	−
	Ⅲ	−	−	−	−	−	−	+	++	−	−	−	−	−	−	−	++	+++	+	+	−

菌では pH 3.0～4.5 に亘る稍々幅廣い凝集帶を形成し，ブドウ球菌では pH 2.0 より pH 3.5 迄の強い凝集帶を形成している。しかも時間の經過と共に生菌數は可成り減少して行くが酸凝集性にはあまり變化はなく，反應 pH 域が僅かに高い方の pH 域が低くなる傾向がみとめられたに過ぎない。

IV. 考按並びに總括

凍結融解によつて細菌がある程度の障害を受けること，並びにその條件によつて障害度の異なることは既に知られているが，冷却速度の大きいほど或いは冷却溫度が低いほど障害が大きいと主張するものと，冷却速度は小さい方が或いは冷却溫度が高い方が障害が大きいと稱えるものがあり意見が一致していない。[5)～9)]

著者の實驗では前者を支持する結果となり，冷却速度が大きく，冷却溫度が低いほど菌の障害の大きいことをみとめた。又大腸菌とブドウ球菌とではその抵抗性にほとんど差がみられなかつた。

一方大腸菌の酸凝集性については Michaelis[1)], Beniasch[2)] は之を認めず，寶意[3)], Sgalitzer[10)], 長澤[11)] は大腸菌の 50% は凝集するが pH 3.2 及び 4.4 の範圍に現われるもの多く，時に pH 2.2 附近に現われると述べ，又青木[4)] は pH 2.0～2.5, 山羽[12)] は 2.2～2.6 に酸凝集性を認めている。

ブドウ球菌について青木[1)] は pH 2.0～2.5 に，山羽[12)] は pH 2.0, 岡崎[13)] 及び寶意[3)] は pH 2.2～4.6 迄に酸凝集性を認めている。

私は對照の正常菌液で大腸菌は pH 2.0～2.5 と pH 4.0～4.5 の 2 箇所に，ブドウ球菌では pH 2.0～2.5 に凝集性を認めたが，凍結融解により死菌が增加すると共に酸凝集性にも變化を來たし，しかもその變化の程度は菌の受ける障害程度と一定の關係のあることが明らかになつた。

即ち菌の障害が大きくなつて死滅率が 10% から 30～50% と增加するに從つて，大腸菌正常菌液の示す 2 箇所の酸凝集性が變化し pH 2.0 から pH 3.5 乃至 4.5 迄の凝集帶を形成するようになり，ブドウ球菌も亦死菌の增加と共に pH 2.0～2.5 から pH 4.0 乃至 4.5 迄擴大する凝集帶

を示した。しかも此の凝集帶の幅は更に死菌が増加して80～90%となつても50%の場合と大差ない凝集性を示すことは凍結融解による菌液の酸凝集性の變化が或る限界を持つことを示していると考えられる。

このような凍結融解による酸凝集性の變化は如何なる機序によるものか，即ち菌体は殆んど酸凝集性の變化に關與しないことは菌体自体の酸凝集性が正常菌液のそれと異ならず，又3000 r.p.m. 1時間遠心の或いは菌の破片がまだかなり殘存すると思われる不透明な上清でも，6000 r.p.m. 1時間遠心の殘存菌体の殆んどないと思われる透明な上清でも酸凝集性に及ぼす影響に殆んど差のないことからもうなづかれる。

又單一蛋白質のカゼイン，ヘモグロビンは凍結融解により酸凝集性が變化しないことから，菌体内の蛋白性成分が凍結融解により變性などを起して酸凝集性を變ずるものとは思われない。

一方凍結融解菌液上清が酸凝集性の變化に關與する重要な因子であることは種々の實驗成績，特に菌体と上清との種々の組合せから明らかにされた。しかも菌体の染色上，形態的に明らかな破壞的傾向を認めないが，不染部分の存在，ギムザ染色上の差異などから菌体が凍結融解により或る變化を受けているものと考えられるので，上清の示す現象と關聯して恐らくは菌体成分が周圍のメヂウム中に遊離し，この遊離した物質の存在によつて酸凝集性が變化するものと想像される。

しかして細菌体は極めて多數の物質から成る複合体であるから，凍結融解によつて菌体から遊離して溶媒内に滲出する物質も極めて多種多様であると考えられるが，それ等の物質で特に酸凝集性に關與するものとして蛋白性成分と鹽類とに注目した。就中蛋白性成分は菌体構成物質として質的にも量的にも最も重要な意義を有するものであることは今更述べるまでもない。

先ず透析によつて鹽類を除いた上清を用いても酸凝集性に變りのないことから，上清中の鹽類の存在が酸凝集性に殆んど關與しないことがわかつた。次いで蛋白性成分については第一に定性反應によつてその存在が證明されたが，更にその因子を分析的に考察するために三鹽化醋酸を用いてpH 5.0, 4.0, 3.0, 2.0で夫々酸性沈澱する劃分を得て，それらの劃分が菌の酸凝集性に及ぼす影響を檢討した所，pH 5.0及び4.0で沈澱する劃分が極めて重要な因子であることが確認せられた。一般に菌体構成成分である蛋白質及びその複合体またアミノ酸の多くは等電點がpH 4.0～6.0にあるといわれ，しかも著者の實驗で得られた酸性沈澱物質が，凍結融解上清中に極めて多量に含まれていることから，凍結融解により菌体が障害をうけたために，菌体構成成分（特に蛋白質及びその複合体とアミノ酸）が菌体から遊離して溶媒内に滲出しその菌の示す酸凝集性を變化させたものであろうと思われる。

然もこれらの滲出した物質は菌浮游液内で菌体と吸着し酸性沈澱を惹起するものでないことは實驗により明らかにされたので，酸凝集發現の機序は恐らくGirard and Audubert[14]のい

う如く，此等の物質の添加により菌の表面荷電が變化し，その電位の低下を來して凝集沈澱するものと考えられる。なお守山[15]等は凝集性のない大腸菌でも破壊する時は凝集が著明にかつ帶狀を示し，これは菌体のファーヂ様微粒子蛋白によるものであろうと報告している。

翻つて他の致死的處理を行つた場合の酸凝集性を凍結融解を行つた際のそれと比較すると，加熱により或いはペニシリン添加によつて凍結融解とほぼ同程度の菌の減少率を示したものでも正常菌液の酸凝集性と殆んど差異がみられないことから，これらの處置によつて受ける菌障害の機序は凍結融解の場合と異なることが想定される。

37°C に長時間放置して自家融解を起したと考えられる菌は凍融菌液にやや類似の酸凝集性を示し，しかもその遠心上清は凍融菌液上清と同様，正常菌に加えて處置液とほぼ一致する凝集性を示したが，沈渣である自家融解菌を再び浮游液とした場合は凍融菌体と異なり，正常菌液とはやや違つた凝集性がみられた。即ち自家融解菌に於ても凍結融解菌とはいささか性狀の差異があるものと思われる。更に超音波による破壊菌液について比較檢討するつもりであつたが機械の都合で實施できなかつたことは遺憾である。

以上要するに大腸菌，ブドウ球菌菌液を凍結融解すると，菌液の示す酸凝集性が變化するが，凍結融解の條件によつて菌の死滅の程度が異なり，その死滅度に應じて酸凝集性の變化が左右されることがわかつた。しかも酸凝集性を支配するものは凍結融解によつて菌体から溶媒中に遊離した菌体成分就中蛋白性成分にあることが明らかにされ，更に他の處置で障害を受けた菌液の酸凝集性と比較することにより凍結融解によつて菌が如何なる障害を受けるかの機序の說明に一つの有力な示唆を得たものといえよう。

V. 結　　論

凍結融解によつて細菌のうける障害の機序を知るために，大腸菌及びブドウ球菌を用いて種々の凍結條件で，菌の死滅度と酸凝集性との關係をしらべ，更に凍結融解によつて酸凝集性の變化を來たす理由を吟味して次のような事實をも認めた。

1) 凍結融解により大腸菌，ブドウ球菌は冷却度の大きいほど，凍結溫度の低いほど，又凍結融解を反覆するに從つて障害が大きく死菌が增加し，それに應じて菌液の示す酸凝集性が變化する。

しかもこの酸凝集性の變化をもたらすものは菌体自身には無關係で凍結融解菌液の遠心上清にあることが確認せられ，特に此の上清中の pH 4.0 以上で酸性沈澱を起す菌体成分が重要な因子をなすものであると考えられる。

2) 又他の致死的處置を行つた菌液の酸凝集性の變化は凍結融解菌液のそれとは異なつているので菌障害の機序も異なるものと想像される。

要するに凍結融解によつて菌体が障害された結果，菌体より遊離する成分がその菌液の酸凝集性を變化させるのであろうと考えられる。

擱筆するに臨み，終始御懇篤な御指導，御校閲を賜わつた恩師根井教授に對し滿腔の謝意を表すると共に，種々御教示，御指導を賜わつた林助教授ならびに種々御便宜を賜わつた本學醫學部第一生理學教室中村助教授に深謝します。

文　　献

1) Michaelis, L. & Davidson, H. 1911 Zur Theorie des isoelektrischen Punktes. Bioch. Z., **30**. 5143.
2) Beniasch, M. 1912 Die Säureagglutination der Bakterien. Zschr. f. Immunifätforsch, **12**, 268.
3) 寶意武彦 1950, 1951 細菌の酸凝集反應に關する研究. 米子醫學雜誌. **2**, 58. **3**, 28.
4) 青木義勇 1941 等電點理論により説明し得らるる細菌の生活機能並びに細胞現象. 長崎醫學雜誌, **19**, 1405.
5) Haines, R. B. 1938 The effects of freezing on bacteria. Proc. Roy. Soc. London, B, **124**, 451.
6) Weiser, R. S. & Osterud, C. M. 1945. 1946. Studies on the death of bacteria at low temperatures. J. Bact, **50**, 413. **52**, 71.
7) 根井外喜男 1951 酵母の凍結過程. 科學, **21**, 94.
——— 1954 酵母の凍結過程. 農化, **28**, 91.
8) 根井外喜男・小川忠人・兼平信一・秋元博 1954 酵母の機能に及ぼす低溫の影響. 農化, **28**, 94.
9) Rahn, O. 1945 Physical methods of sterilization of microorganisms. Bact. Rev., **9**, 1.
10) Sgalitzer, M. 1914 Ueber Säureagglutination. Zschr. f. Hyg, **76**, 209.
11) 長澤修三郎 1922 酸凝集反應について. 北越醫學雜誌, **41**, 2.
12) 山羽儀兵 1933 Über die Wasserstoffionenkonzentration und die isoelektrische Reaktion der Pflanzlichen Protoplasten, insbesondere des Zellkernes und der Plastiden Protoplasma, **19**, 194.
13) 岡崎　一 1937 大腸菌の酸凝集反應に關する研究. 千葉醫學雜誌, **15**, 1018.
14) Girard, P. & A udubert, R, 1918 Les charges électriques des microbes et leur tension superficielle. Compt. rend. acad. sci. **167**, 351
15) 守山英雄・大橋睿吉 1949 チフス菌の凝集性について. 醫學と生物學, **9**, 326.

Résumé

In order to get information as to the mechanism of low-temperature injury of bacteria due to freezing and thawing, the relationships between the death rate of bacteria and acid-agglutinability were investigated under various freezing conditions, employing the bacterial suspensions of Escherichia coli and Staphylococcus aureus as samples. The cause for the change of the acid-agglutinability produced by freezing and thawing was made clear in connection with the following experimental facts.

In freezing and thawing, the faster the cooling rate, the lower the cooling temperature and the more frequent repetition of the treatment, the more severely was the damage inflicted on bacteria and the higher was the death rate of bacteria. The acid-agglutinability of bacteria treated in the same way manifested a remarkable change corresponding to the change of bacterial death rate.

The variability of bacterial acid-agglutination caused by freezing and thawing was not due to the disintegrated bacterial cell bodies themselves, but rather to some bacterial components, which precipitated in the buffer of pH 4.0 and below, being separated from bacterial cells by freezing-thawing and appeared in the supernatant fluid by centrifugation of treated bacterial suspensions.

The acid-agglutinability of bacteria injured by other fatal treatments proved not to coincide with that of frozen-thawed bacteria, so that the mechanism of bacterial injury may be considered to be different in each treatment.